การใช้อนุภาคนาโนของไทเทเนียมไดออกไซด์และนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์
ร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรด ในการควบคุมไบโอฟิล์ม

นางสาวลนิดา เพียรเจริญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Utilization of Titaniumdioxide nanoparticles and Titaniumdioxide-Grapheneoxide nanocomposite with Near-Infrared on biofilm control

Miss Lanida Peancharoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Mechanical Engineering
Department of Mechanical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2016
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้อนุภาคนาโนของไทเทเนียมไดออกไซด์และนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรด ในการควบคุมไบโอฟิล์ม
โดย	นางสาวลนิดา เพียรเจริญ
สาขาวิชา	วิศวกรรมเครื่องกล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระยุทธ ศรีธุระวานิช

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อลงกรณ์ พิมพ์พิณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระยุทธ ศรีธุระวานิช)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนัตต์ รัตนสุมาวงศ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. คัคนานต์ สรุงบุญมี)

ลนิดา เพียรเจริญ : การใช้อนุภาคนาโนของไทเทเนียมไดออกไซด์และนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรด ในการควบคุมไบโอฟิล์ม (Utilization of Titaniumdioxide nanoparticles and Titaniumdioxide-Grapheneoxide nanocomposite with Near-Infrared on biofilm control) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.วีระยุทธ ศรีธุระวานิช, 73 หน้า.

ไบโอฟิล์มที่เกิดบนอุปกรณ์ทางการแพทย์สามารถทำให้เกิดปัญหาการติดเชื้อที่รุนแรงกับผู้ใช้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของการใช้ตัวกลางความร้อนเชิงแสง 2 ตัว คือ อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และนาโนคอมโพสิตอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์ ในการควบคุมการเกิดไบโอฟิล์ม นาโนคอมโพสิตอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์สังเคราะห์โดยการติดอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และกราฟีนออกไซด์ที่สร้างด้วยกระบวน chemical exfoliation โดยใช้กระบวน hydrothermal ตัวกลางความร้อนเชิงแสงทั้ง 2 ตัวถูกประยุกต์ใช้ในการดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรดและเปลี่ยนเป็นความร้อนที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของไบโอฟิล์ม ในการทดลองตัวกลางความร้อนเชิงแสงทั้ง 2 ตัวใช้ทดสอบกับไบโอฟิล์มของ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 โดยการใช้นาโนคอมโพสิตอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์กับไบโอฟิล์มภายใต้แสงเนียร์อินฟราเรดสามารถลดจำนวนไบโอพิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการใช้นาโนคอมโพสิตอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์สำหรับการพัฒนาอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาควิชา วิศวกรรมเครื่องกล ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมเครื่องกล ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2559

5770457721 : MAJOR MECHANICAL ENGINEERING

KEYWORDS: BIOFILM, TITANIUMDIOXIDE, TITANIUMDIOXIDE/GRAPHENE OXIDE NANOCOMPOSITE

LANIDA PEANCHAROEN: Utilization of Titaniumdioxide nanoparticles and Titaniumdioxide-Grapheneoxide nanocomposite with Near-Infrared on biofilm control. ADVISOR: ASST. PROF.WERAYUT SRITURAVANICH, Ph.D., 73 pp.

Biofilm formed on implantable medical devices could cause serious infections to users. In this work, the effects of two photothermal agents: titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles and titanium dioxide/graphene oxide (TiO_2/GO) nanocomposite, on control of biofilm growth were investigated. TiO_2/GO nanocomposite was obtained by coupling TiO_2 nanoparticle with chemically exfoliated GO using hydrothermal process. These photothermal agents were used to absorb Near Infrared (NIR) light and convert to heat which can be used to control the growth of biofilm. In the experiment, the two photothermal agents were tested with biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Treating these biofilms with TiO_2/GO nanocomposite under NIR irradiation resulted in a significant reduction of biofilms suggesting a potential of using TiO_2/GO nanocomposite for development of antibacterial implantable medical devices.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department: Mechanical Engineering Student's Signature .....
Field of Study: Mechanical Engineering Advisor's Signature .....
Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ซึ่งผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ คือ ผศ. ดร. วีระยุทธ ศรีธุระวานิช อาจารย์ประจำภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล ซึ่งเป็นที่ปรึกษางานวิจัยนี้ เป็นผู้ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการวิจัย สนับสนุนทุนในการวิจัย และช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆให้ลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผศ. ทญ. ดร. พนิดา ธัญญศรีสังข์ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ รวมถึงนักวิทยาศาสตร์ ที่ช่วยแนะนำ เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลอง และอนุเคราะห์เครื่องมือต่างๆ ในการเลี้ยงไบโอฟิล์ม ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. วรวีร์ โฮเว่น อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมถึงนิสิตปริญญาเอกของภาควิชาเคมี ที่ช่วยเหลือในเรื่องการใช้เครื่องมือต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมถึงผู้ช่วยวิจัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และให้คำแนะนำในการทดลองในส่วนของการย้อมแบคทีเรีย และการวิเคราะห์ผลการทดลอง ขอขอบคุณครอบครัว ญาติพี่น้อง และเพื่อนๆ ที่คอยเป็นกำลังใจในการทำวิจัยเสมอมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญภาพ ..... ญ

สารบัญตาราง ..... ฏ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตการศึกษา 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

1.5 ระเบียบงานวิจัย 3

1.5.1 การทบทวนวรรณกรรม 3

1.5.2 การเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO 3

1.5.3 การวัดค่าความดูดกลืนแสงของวัสดุนาโนที่เตรียมขึ้น 3

1.5.4 การวัดค่าอุณหภูมิของวัสดุนาโนที่เตรียมขึ้น 3

1.5.5 การทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุนาโนที่เตรียมขึ้นในการยับยั้งและลดการเกิดไบโอฟิล์ม 3

1.5.6 สรุปผลการทดลองและจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ 4

1.6 ส่วนประกอบของวิทยานิพนธ์ 4

บทที่ 2 หลักการทฤษฎีและปริทัศน์วรรณกรรม 5

2.1 ไบโอฟิล์ม (Biofilm) 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.1.1 การยึดเกาะ (initial attachment)..... 6
2.1.2 การยึดเกาะแบบไม่ย้อนกลับ (irreversible attachment)..... 7
2.1.3 การก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม (maturation)..... 7
2.1.4 การหลุดออกของไบโอฟิล์ม (dispersion)..... 7
2.2 วิธีการยับยั้งและป้องกันการเกิดไบโอฟิล์ม..... 8
2.2.1 การใช้สารอนุภาคซิลเวอร์นาโน..... 8
2.2.2 การใช้สารอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์..... 11
2.3 สรุป..... 13
บทที่ 3 การเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO..... 14
3.1 การเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2)..... 14
3.1.1 การแยกอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ด้วยกระบวนการโซนิเคชัน (sonication)..... 14
3.1.2 การกรองอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์..... 15
3.1.3 การตรวจดูขนาดของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์..... 16
3.2 การเตรียมสารนาโนคอมโพสิตอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์..... 17
3.2.2 การตรวจดูคุณลักษณะของนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์..... 19
3.3 สรุป..... 20
บทที่ 4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทดลอง..... 21
4.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย..... 21
4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย..... 21
4.1.2 การเตรียมอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ..... 22
4.1.3 การแยกแบคทีเรีย (Streak plate)..... 23
4.1.4 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว..... 23
4.1.5 การเก็บรักษาเชื้อ (Stock)..... 24

หน้า

4.2 การสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 25
4.2.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 บนอาหารวุ้นแข็ง TSA 26
4.2.2 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ในอาหารเหลว TSB 27
4.2.3 การสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 27
4.3 การย้อมแบคทีเรีย 28
4.4 การตรวจสอบไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล 30
4.5 สรุป 31
บทที่ 5 การตรวจสอบคุณสมบัติของสาร 32
5.1 การเกาะติดของสาร 32
5.2 การวัดอุณหภูมิของสารไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ 34
5.3 การมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ 37
5.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อแบคทีเรีย (Toxicity test) 39
5.5 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยสารไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ร่วมกับการฉายแสง NIR 41
5.6 การตรวจดูลักษณะของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล 44
5.7 สรุป 47
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย 49
รายการอ้างอิง 52
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 73

สารบัญภาพ

รูปที่ 2.1 การเกิดและการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์ม 6

รูปที่ 2.2 ความสามารถในการยับยั้งสาร extracellular polymeric substance (EPS) ของสารซิลเวอร์นาโน 10

รูปที่ 2.3 การจัดเตรียมชุดทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* ของสารไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เคลือบบน OPP film 12

รูปที่ 3.1 รูปแบบการกรองสารไทเทเนียมไดออกไซด์ 15

รูปที่ 3.2 ผงอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ได้จากการ freeze dry 16

รูปที่ 3.3 ภาพ SEM ของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) 17

รูปที่ 3.4 ชุดอุปกรณ์โลหะสำหรับทำกระบวนการไฮโดรเทอร์มอล 18

รูปที่ 3.5 ผงนาโนคอมโพสิตของไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ 19

รูปที่ 3.6 ภาพ SEM ของสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์(TiO_2/GO) 20

รูปที่ 4.1 อาหารวุ้นแข็ง TSA 22

รูปที่ 4.2 การบ่มแบบเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที 24

รูปที่ 4.3 เชื้อที่เจริญเติบโตในอาหารเหลว TSB ซึ่งมีลักษณะขุ่น 25

รูปที่ 4.4 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 26

รูปที่ 4.5 ลักษณะของไบโอฟิล์ม 28

รูปที่ 4.6 สารย้อม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT 29

รูปที่ 4.7 ภาชนะที่ใช้สำหรับสร้างไบโอฟิล์ม 30

รูปที่ 5.1 อุปกรณ์สำหรับกระบวน oxygen plasma 33

รูปที่ 5.2 การเกาะติดของสารบนภาชนะ 96 wells plate 34

รูปที่ 5.3 schematic diagram ของการฉายแสง NIR เพื่อวัดอุณหภูมิของสาร 35

รูปที่ 5.4 ชุดการทดลองการวัดอุณหภูมิของสาร 36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 5.5 ลักษณะของสารที่โค๊ดบนแผ่นโลหะสังกะสี 36
รูปที่ 5.6 อุณหภูมิของสารทดสอบ 37
รูปที่ 5.7 อัตราการมีชีวิตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ 39
รูปที่ 5.8 การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อแบคทีเรียของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ 40
รูปที่ 5.9 schematic diagram การทดสอบสารนาโนร่วมกับการฉายแสง NIR 42
รูปที่ 5.10 ชุดการทดสอบสารนาโนร่วมกับการฉายแสง NIR 43
รูปที่ 5.11 ลักษณะการฉายแสง NIR ของแต่ละหลุม 43
รูปที่ 5.12 ผลของการใช้สารวัสดุนาโนร่วมกับการฉายแสง NIR ต่ออัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย ... 44
รูปที่ 5.13 ไบโอฟิล์มกรณีตัวควบคุมหรือ control 45
รูปที่ 5.14 ไบโอฟิล์มที่ทำการฉายแสง NIR เป็นเวลา 10 นาที 46
รูปที่ 5.15 ไบโอฟิล์มที่ถูกยับยั้งด้วยสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับการฉายแสง NIR 10 นาที 46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตาราง ก. ตารางแสดงค่า OD (Optical Density) ของสารนาโนก่อน wash และหลัง wash 54

ตาราง ข. ตารางแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของสารนาโนและเวลา 55

ตาราง ค. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – ผลของอุณหภูมิ..... 57

ตาราง ง. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – Toxicity..... 61

ตาราง จ. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – NIR Laser 69

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

อักษรย่อ

TiO_2	ไทเทเนียมไดออกไซด์
TiO_2/GO	นาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์
PBS	Phosphate Buffer Saline
SEM	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
NIR	Near Infrared Laser
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMSO	Dimethyl sulfoxide

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) หรือกลุ่มของแบคทีเรียที่เกาะติดบนพื้นผิวของวัตถุ โดยไบโอฟิล์มที่พบบ่อยและเป็นที่รู้จัก ได้แก่ คราบแบคทีเรียในปาก (Dental plaque) นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังเป็นปัญหาที่เกาะบนผิวของวัสดุและอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น ท่อระบายน้ำ (shunt) วัสดุฝังในต่างๆ ท่อหายใจ เป็นต้น การที่มีไบ-โอฟิล์มอยู่บนผิววัสดุและอุปกรณ์ทางการแพทย์ จะทำให้เกิดปัญหาการติดเชื้อตามมา ไบโอฟิล์มเป็นโครงสร้างที่เกิดจากกลุ่มของแบคทีเรียเกาะติดบนพื้นผิววัตถุ โดยกลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่รวมกันนี้ประกอบด้วยสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ ที่ทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใน และยังสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอีกด้วย ในกรณีที่มีไบโอฟิล์มเกาะติดบนพื้นผิวของอุปกรณ์ทางการแพทย์ต่างๆ จะทำให้ผู้ใช้อุปกรณ์ดังกล่าวเกิดอาการติดเชื้อได้ หรืออาจจะทำให้อุปกรณ์ดังกล่าวทำงานได้อย่างไม่เต็มประสิทธิภาพ และทำให้อายุการใช้งานของอุปกรณ์นั้นสั้นลง ดังนั้นเพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวที่อาจจะเกิดขึ้นจากไบโอฟิล์ม จึงมีความจำเป็นในการป้องกันและยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของอุปกรณ์ทางการแพทย์ต่างๆ ที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยที่ศึกษาการยับยั้งและลดการเกิดไบโอฟิล์มด้วยวิธีต่างๆ เช่น การยับยั้งและลดการเกิดไบโอฟิล์มด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโน [1, 2] โดยการใช้สารละลายซิลเวอร์นาโนกับอุปกรณ์ที่ใช้ในชีวิตประจำวันของมนุษย์ที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ ดังเช่น คอนเทคเลนส์ ชิ้นส่วนของฟัน เป็นต้น ซึ่งสามารถยับยั้งสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างโดยแบคทีเรีย และลดโอกาสในการเกิดไบโอฟิล์มได้ แต่เพราะซิลเวอร์นาโนเมื่ออยู่ในรูปของสารละลาย อนุภาคซิลเวอร์จะแตกตัวเป็นไอออน และจะทำให้ซิลเวอร์นาโนมีความเป็นพิษสูงขึ้น ซึ่งอาจจะส่งผลข้างเคียงกับต่อร่างกายมนุษย์ได้ อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์เป็นวัสดุนาโนที่มีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงเมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเลต (UV) จะสามารถสร้าง reactive oxygen species ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียได้เช่นกันจึงมีการศึกษาประยุกต์ใช้อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ติดบนพื้นผิวของพลาสติกที่ใช้ในการ

เก็บอาหารซึ่งเมื่อฉายแสง UV ลงบนพลาสติกที่มีอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์จะสามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มได้ อย่างไรก็ดีการใช้แสง UV ก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับร่างกายมนุษย์ ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการใช้แสง UV ในการยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มในอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ใช้กับร่างกายมนุษย์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุศึกษานี้การใช้อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และนาโนคอมโพสิตอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์ (TiO_2/GO) มายับยั้งและลดการเกิดไบโอฟิล์มภายใต้การใช้แสงเนียร์อินฟราเรด ซึ่งวัสดุนาโนดังกล่าวสามารถดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรดแล้วเปลี่ยนเป็นความร้อนที่สามารถกำจัดแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของไบโอฟิล์มได้ อีกทั้งวัสดุนาโนดังกล่าวไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต TiO_2/GO

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2 particle) และนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO ร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรดในการควบคุมไบโอฟิล์ม

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1.3.1 สังเคราะห์กราฟีนออกไซด์ด้วยวิธีการของ Hummer

1.3.2 สังเคราะห์นาโนคอมโพสิต TiO_2/GO โดยวิธีไฮโดรเทอร์มอล

1.3.3 ตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2 particle) และนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO

1.3.4 ตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งและลดการเกิดไบโอฟิล์มจากการใช้นาโนคอมโพสิต TiO_2/GO

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาวัสดุนาโนอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และนาโนคอมโพสิตอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์ในการยับยั้งและลดการเกิดไบโอฟิล์มได้

1.5 ระเบียบงานวิจัย

1.5.1 การทบทวนวรรณกรรม

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยซึ่งครอบคลุม ไบโอฟิล์ม วิธีการยับยั้งและป้องกันการเกิดไบโอฟิล์ม การสังเคราะห์กราฟีนออกไซด์ การเลี้ยงแบคทีเรียและการทดลองในการยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์ม เป็นต้น

1.5.2 การเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO

นำอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ไปทำการโซนิเคชัน (sonication) เพื่อทำให้อนุภาคกระจายตัวไม่ติดกันภายในตัวทำละลาย จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการกรองเพื่อให้ได้อนุภาคไทเทเนียมได-ออกไซด์ขนาดที่ต้องการ แล้วทำการวัดขนาดของอนุภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) หลังจากนั้นเตรียมกราฟีนออกไซด์ (GO) ด้วยวิธีการ Hummer แล้วนำไปติดกับอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ด้วยวิธีการไฮโดรเทอร์มอล

1.5.3 การวัดค่าความดูดกลืนแสงของวัสดุนาโนที่เตรียมขึ้น

ทำการวัดค่าความดูดกลืนแสงของสารที่เตรียมขึ้น คือ อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO ด้วยเครื่องนาโนดรอป โหมด UV-VIS

1.5.4 การวัดค่าอุณหภูมิของวัสดุนาโนที่เตรียมขึ้น

ทำการวัดอุณหภูมิของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO ที่โค๊ดบนแผ่นโลหะซิงค์ด้วยเทอร์โมคัปเปิล

1.5.5 การทดสอบประสิทธิภาพของวัสดุนาโนที่เตรียมขึ้นในการยับยั้งและลดการเกิดไบโอฟิล์ม

ทำการทดลองเลี้ยงไบโอฟิล์ม และดูผลของการยับยั้งและลดการเกิดไบโอฟิล์มของสารไทเทเนียมไดออกไซด์ และนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ โดยวิธีการวิเคราะห์

การมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียด้วย MTT assay และตรวจดูลักษณะของไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นจากกล้อง confocal

1.5.6 สรุปผลการทดลองและจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์

1.6 ส่วนประกอบของวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ประกอบไปด้วย 6 บท โดยบทที่ 1 บทนำ กล่าวถึงที่มาและความสำคัญ และขอบเขตในการศึกษาการยับยั้งและลดการเกิดไบโอฟิล์มด้วยอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์ บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม กล่าวถึงทฤษฎีความรู้ ข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์ม และวิธีการยับยั้งและป้องกันการเกิดไบโอฟิล์ม บทที่ 3 กล่าวถึงการเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และการเตรียมนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์ และบทที่ 4 กล่าวถึงการเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองสร้างไบโอฟิล์ม รวมถึงการย้อมแบคทีเรียและการตรวจดูไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล ในส่วนของบทที่ 5 จะกล่าวถึงการทดสอบคุณสมบัติของสารและการวิเคราะห์ผลของการยับยั้งไบโอฟิล์ม และในบทที่ 6 คือการสรุปผลการวิจัยของวิทยานิพนธ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
หลักการทฤษฎีและปริทัศน์วรรณกรรม

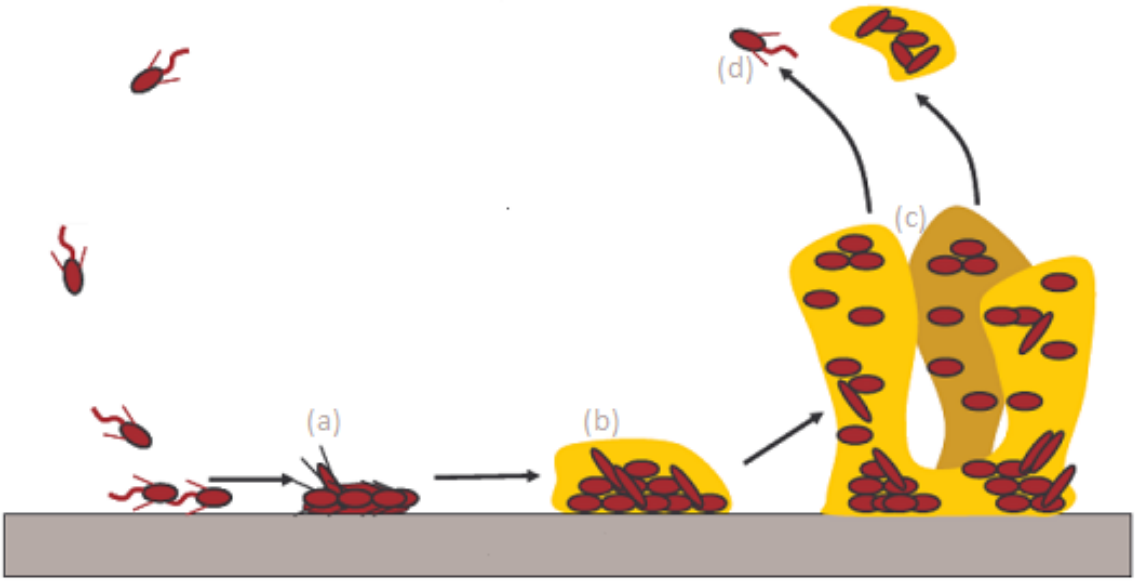
เนื่องจากไบโอฟิล์มเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นและสามารถพบได้ทั่วไป ไม่ว่าจะเป็นอุปกรณ์ภายในครัวเรือน อุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นต้น อุปกรณ์เหล่านี้เป็นสิ่งที่มนุษย์จะต้องใช้และคลุกคลีอยู่เสมอๆ ซึ่งหากอุปกรณ์เหล่านี้มีไบโอฟิล์มเกิดขึ้น อาจทำให้ส่งผลถึงอายุการใช้งานของอุปกรณ์สั้นลง รวมถึงส่งผลทางด้านสุขภาพของมนุษย์ได้ ในบทนี้จะกล่าวถึงการเกิดไบโอฟิล์ม งานวิจัยที่เกี่ยวข้องซึ่งเป็นแนวทางในการลดและการยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มด้วยอนุภาคสารนาโนประเภทต่างๆ เช่น สารซิลเวอร์นาโน สารไทเทเนียมไดออกไซด์ร่วมกับการฉายแสงยูวี

2.1 ไบโอฟิล์ม (Biofilm)

ไบโอฟิล์มเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เกาะติดและเจริญเติบโตบนพื้นผิววัตถุ การเจริญเติบโตและการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มมีผลมาจากหลายๆ ปัจจัย ประกอบด้วย สายพันธุ์ของแบคทีเรีย, คุณสมบัติของพื้นผิววัตถุ, และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น pH, ปริมาณสารอาหาร และอุณหภูมิ [3] ไบโอฟิล์มมีความสามารถในการต้านทานสารประเภทต่อต้านแบคทีเรียได้ดีกว่าแบคทีเรียที่อยู่ในรูป planktonic หรือแบคทีเรียที่ลอยอยู่ในน้ำ เนื่องจากแบคทีเรียในรูปของ planktonic จะทำได้เพียงป้องกันการสัมผัสกับสารต่อต้านแบคทีเรีย แบคทีเรียมีหลากหลายสายพันธุ์ที่นอกจากจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหรือความเจ็บป่วยต่างๆ ยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มขึ้นได้อีกด้วย เมื่อแบคทีเรียอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต แบคทีเรียจะสร้างไบโอฟิล์มขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวมันเองให้สามารถอยู่รอดได้ การสร้างไบโอฟิล์มจะมีขั้นตอนในการสร้างที่ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ การยึดเกาะ (initial attachment), การยึดเกาะแบบไม่ย้อนกลับ (irreversible attachment), การก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม (maturation) และ การหลุดออกของไบโอฟิล์ม (dispersion) ตามลำดับ [4] โดยแสดงขั้นตอนในการเกิดไบโอฟิล์มดังรูปที่ 2.1

2.1.1 การยึดเกาะ (initial attachment)

การยึดเกาะของแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นด้วยตัวมันเองหรือจากสิ่งแวดล้อมภายนอก, การเคลื่อนที่ของแบคทีเรียหรือการเคลื่อนย้ายตามแรงโน้มถ่วงของโลก, การแพร่หรือแรงเฉือนของของไหลในสิ่งแวดล้อม การยึดเกาะของแบคทีเรียกับพื้นผิววัตถุในขั้นตอนนี้จะปล่อยสาร extracellular polymeric substance (EPS) [5] ออกมาจำนวนหนึ่งในปริมาณไม่มากเพื่อยึดเกาะกับผิววัตถุและเป็นขั้นตอนที่นำไปสู่การก่อไบโอฟิล์มต่อไป ซึ่งการเกาะติดของแบคทีเรียในขั้นตอนนี้จะเป็นการเกาะติดแบบไม่ถาวร จึงมีแบคทีเรียบางส่วนหลุดออกจากการเกาะพื้นผิววัตถุและลอยอยู่ในน้ำในรูป planktonic สำหรับประเภทของพื้นผิววัตถุนั้นได้มีส่วนสำคัญในการเกาะติดของแบคทีเรีย โดยที่แบคทีเรียมักจะเกาะติดกับพื้นผิววัตถุที่เป็น พลาสติก, แก้ว, โลหะ และไม้ เป็นต้น [6]



รูปที่ 2.1 การเกิดและการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์ม โดยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้ (a) การยึดเกาะ (initial attachment), (b) การยึดเกาะแบบไม่ย้อนกลับ (irreversible attachment), (c) การก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม (maturation) และ (d) การหลุดออกของไบโอฟิล์ม (dispersion) [4]

2.1.2 การยึดเกาะแบบไม่ย้อนกลับ (irreversible attachment)

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการยึดเกาะที่ถาวร โดยแบคทีเรียมีการปล่อยสาร extracellular polymeric substance (EPS) ออกมาในจำนวนที่มากขึ้น [5] โดยสารดังกล่าวเป็นสารไฮโดรเจลเชิงซ้อนที่ทำให้แบคทีเรียนั้นรวมกลุ่มกัน ไฮโดรเจลมีส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรีย เช่น กรดโคลานิก, ไคโตซาน, แอลจิเนต หรือมาจากส่วนประกอบอื่นๆ เช่น เอนไซม์, DNA, RNA, สารอาหาร, โปรตีน, สารลดแรงตึงผิว เป็นต้น [4] ไฮโดรเจลช่วยปกป้องกลุ่มของแบคทีเรียจากสภาวะสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย สำหรับการก่อตัวของไบโอฟิล์มจะหนาแน่นและซับซ้อนขึ้นเมื่อกลุ่มของแบคทีเรียสร้าง extracellular จำนวนมากขึ้น

2.1.3 การก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม (maturation)

การพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มของกลุ่มแบคทีเรียในขั้นตอนนี้ ไบโอฟิล์มจะมีความหนาแน่นและความซับซ้อนเพิ่มขึ้นเมื่อกลุ่มของแบคทีเรียสร้างสาร extracellular ซ้ำๆ หรือในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อยึดเกาะกับพื้นผิววัตถุให้แข็งแรงขึ้น [4] การพัฒนาของไบโอฟิล์มเกิดขึ้นด้วยหลายๆ กระบวนการ เช่น quorum sensing, gene transfer, persister development เป็นต้น กระบวนการเหล่านี้มีส่วนสำคัญในการเจริญเติบโตของไบโอฟิล์มและการกระจายตัวของไบโอฟิล์มที่เพิ่มขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.4 การหลุดออกของไบโอฟิล์ม (dispersion)

Dispersion เป็นขั้นตอนสุดท้ายของวงจรไบโอฟิล์ม ซึ่งไบโอฟิล์มจะมีอายุมากที่สุดและมีไบโอฟิล์มบางส่วนหลุดออก ทำให้แบคทีเรียหลุดกลับออกไปลอยในน้ำหรืออยู่ในรูป planktonic [4] ซึ่งการหลุดออกของไบโอฟิล์มมีสาเหตุมาจากสิ่งรบกวนภายนอกและภายใน โดยสิ่งรบกวนภายนอก ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของแรงเฉือนในของไหล และสำหรับสิ่งรบกวนภายใน ได้แก่ การเสื่อมลงของเอนไซม์ภายในเซลล์หรือการปล่อยสาร extracellular polymeric substance (EPS) นอกจากนี้การขาดอาหารหรือการมีอาหารที่ไม่เพียงพอสำหรับแบคทีเรียยังเป็นอีกปัจจัยที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการหลุดออกของไบโอฟิล์ม และการหลุดออกของไบโอฟิล์มนี้ที่ทำให้แบคทีเรีย

หลุดออกไปอยู่ในรูป planktonic แบคทีเรียเหล่านี้จะกลับเข้าสู่กระบวนการยึดเกาะ (initial attachment) เพื่อสร้างเป็นไบโอฟิล์มอีกครั้ง [7]

2.2 วิธีการยับยั้งและป้องกันการเกิดไบโอฟิล์ม

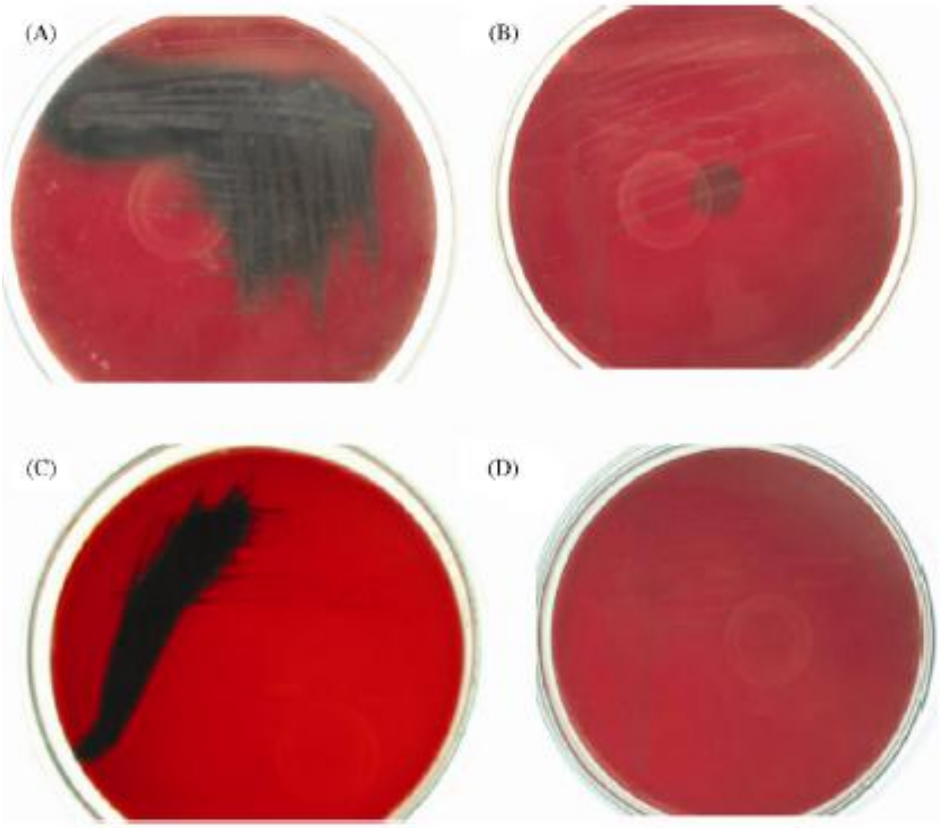
โดยทั่วไปไบโอฟิล์มเป็นสิ่งที่กำจัดได้ยาก เพราะไบโอฟิล์มเกาะติดบนพื้นผิววัตถุอย่างแน่นหนา กล่าวคือ เมื่อแบคทีเรียเกาะติดบนพื้นผิววัตถุแล้วนั้นจะสร้างสารยึดติดประเภท extracellular polymeric substance (EPS) ออกมา และสร้างสารดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นจนเกิดเป็นไบโอฟิล์มเกาะบนพื้นผิววัตถุนั้นๆ หากเวลาผ่านไปไบโอฟิล์มจะยิ่งเกาะติดและสะสมมากขึ้น ทำให้ยากต่อการกำจัดออก แต่เนื่องจากไบโอฟิล์มเป็นปัญหาทำให้อุปกรณ์ต่างๆ มีอายุการใช้งานที่สั้นลง รวมถึงการเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นเพื่อเปลี่ยนอุปกรณ์ใช้งาน จึงมีการศึกษาวิจัยต่างๆ อาทิเช่น การใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโน การใช้อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ การใช้อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ร่วมกับการฉายแสง เป็นต้น เพื่อเป็นแนวทางในการลดและยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์ม

2.2.1 การใช้สารอนุภาคซิลเวอร์นาโน

อนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรียและไวรัสที่เป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบต่างๆ ปัจจุบันมีการนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และทางเภสัชกรรมเพื่อใช้รักษาโรค เช่น โรคที่มีการติดเชื้อเรื้อรัง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาเคลือบลงบนผิวของอุปกรณ์ทางการแพทย์หรือใช้ในการพัฒนาคุณสมบัติของวัสดุชีวภาพ (biomaterial) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดไบโอฟิล์ม อนุภาคซิลเวอร์นาโนจะมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียมากขึ้นเมื่ออนุภาคของสารอยู่ในรูปไอออน (Ag^{+}) และในรูปสารประกอบ [8] ที่ผ่านมา มีการศึกษายับยั้งไบโอฟิล์มที่เกิดจากแบคทีเรียสองชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus epidermidis* ด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ขึ้นจากวิธีทางชีววิทยาของ Kalishwaralal et al. [1] โดยทำการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียสองชนิดดังกล่าวด้วยวิธี well-diffusion และ congo red ซึ่งวิธี well-diffusion เป็นวิธีทดสอบเพื่อดูว่าสารอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียหรือไม่ ซึ่งสามารถ

ตรวจสอบจากการเกิดขึ้นเชื้อแบคทีเรียในบริเวณที่เรียกว่า clear zone หรือ inhibiton zone วิธีนี้จะทดสอบโดยการเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแข็ง TSA ที่บรรจุในจานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการเจาะรูอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วหยอดสารละลายซิลเวอร์นาโนที่มีความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ ลงในหลุมที่ทำการเจาะ ซึ่งพบว่ามีบริเวณ clear zone หรือ inhibiton zone เกิดขึ้นขนาด 12 ± 1.2 มิลลิเมตร สำหรับ *Pseudomonas aeruginosa* และขนาด 9.5 ± 0.9 มิลลิเมตร สำหรับ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งจากการที่มีบริเวณ clear zone หรือ inhibiton zone เกิดขึ้นนั้น เป็นการบ่งบอกถึงความสามารถของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ได้ และสำหรับวิธี congo red จะเป็นวิธีทดสอบการยับยั้งการเกิดสารประเภท extracellular polymeric substance (EPS) จากแบคทีเรียซึ่งเป็นสารที่จะก่อให้เกิดไบโอฟิล์มในเวลาต่อมา โดยการทดสอบจะแบ่งออกเป็นสองชุด คือ ชุดที่หนึ่งจะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแดงโดยไม่ใส่สารซิลเวอร์นาโนลงไป และชุดที่สองจะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแดงโดยใส่สารซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์ลงไป จากการทดสอบพบว่า ชุดทดสอบที่หนึ่งซึ่งไม่ได้ใช้สารซิลเวอร์นาโน จะมีผลึกสีดำเกิดขึ้น โดยผลึกสีดำนี้คือสาร extracellular polymeric substance (EPS) ที่เกิดขึ้น ส่วนในชุดที่สองที่ใส่สารซิลเวอร์นาโนไว้นั้น มีผลึกสีดำเกิดขึ้นเบาบางกว่าชุดที่หนึ่ง แสดงดังรูปที่ 2.2 นอกจากนี้ Besinis [9] ได้ทำการศึกษาการยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มด้วยซิลเวอร์นาโนซึ่งทำการเคลือบลงบนชิ้นส่วนฟันของมนุษย์ โดยพบว่าสารซิลเวอร์นาโนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่นำไปสู่การสร้างไบโอฟิล์มได้ถึง 98%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

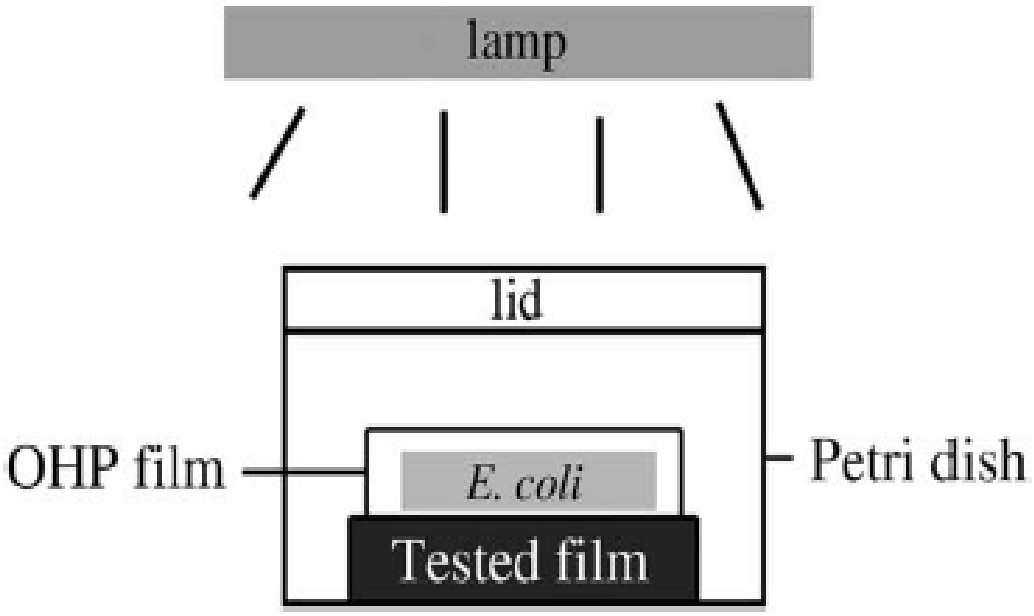


รูปที่ 2.2 ความสามารถในการยับยั้งสาร extracellular polymeric substance (EPS) ของสารซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์ (a) และ (c) คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยไม่ใช้สารซิลเวอร์นาโน ตามลำดับ ขณะที่ (b) และ(d) คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยใช้สารซิลเวอร์นาโนตามลำดับ [1]

อย่างไรก็ตามถึงแม้ซิลเวอร์นาโนจะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ในด้านกลไกในการต่อต้านแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม และมีจุดด้อยของซิลเวอร์นาโนในด้านการนำไปเคลือบกับอุปกรณ์ทางการแพทย์ กล่าวคือ การฆ่าเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์นาโนอาจให้ผลทางลบได้หากซิลเวอร์นาโนที่เคลือบบนอุปกรณ์ทางการแพทย์นั้นเกิดการสึกกร่อนจากการสัมผัสกับเลือด ทำให้ซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียลดลง นอกจากนี้ยังเป็นที่ไม่ทราบแน่ชัดว่าซิลเวอร์นาโนนั้นเป็นอันตรายมากน้อยเพียงใดหากเข้าสู่ร่างกายมนุษย์

2.2.2 การใช้สารอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์

อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) มีลักษณะเป็นอนุภาคของแข็ง สีขาว มีคุณสมบัติที่เข้ากับเนื้อเยื่อได้ดี ในขณะเดียวกันยังเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงที่ดีอีกด้วย [10, 11] เมื่ออนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ถูกกระตุ้นด้วยแสง UV จะมีอนุมูลอิสระ (OH^-) หลุดออกมา [12] อนุมูลอิสระนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ โดยทำปฏิกิริยาออกซิไดส์กับฟอสโฟลิพิดที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย คุณสมบัติเหล่านี้จึงเป็นทางเลือกในการนำไปประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์ ที่ผ่านมามีการศึกษาการประยุกต์ใช้ไทเทเนียมไดออกไซด์มายับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดไบโอฟิล์มในด้านต่างๆ ดังเช่นงานของ Chawengkijwanich [10] ที่ทำการศึกษาการใช้สารไทเทเนียมไดออกไซด์เพื่อยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มที่เกิดจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* บนภาชนะบรรจุอาหาร โดยทำการเคลือบสารไทเทเนียมไดออกไซด์ลงบนฟิล์มพลาสติกสำหรับห่ออาหาร (OPP film) ด้วยเครื่อง bar coater จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็น 1 คืน มาหยดบนฟิล์มห่ออาหารที่ทำการเคลือบด้วยสารไทเทเนียมไดออกไซด์ และทำการฉายแสง UVA ที่มีค่า intensity 1 mW/cm^2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 2.3 จากการทดสอบพบว่ามีปริมาณแบคทีเรีย 4.8 ± 0.19 CFU/ml ซึ่งมีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มห่ออาหารที่ไม่ได้ทำการเคลือบสารไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีปริมาณแบคทีเรีย 7.8 ± 0.1 CFU/ml ซึ่งผลของการลดลงของแบคทีเรียนี้เป็นไปในทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Chorianopoulos [13] ที่ทำการศึกษาโดยใช้สารไทเทเนียมไดออกไซด์เคลือบลงบนผิวของอุปกรณ์ที่เป็นสแตนเลสและแก้ว และจุ่มลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart, (BHI) และบรรจุเชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* จากนั้นบ่มเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 16 ℃ จากนั้นนำมาฉายแสง UVAที่มีความยาวคลื่น 315 – 400 นาโนเมตร เป็นเวลา 90 นาที โดยผลการทดสอบพบว่าปริมาณแบคทีเรียลดลงถึง 3 log CFU/cm^2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 2.3 การจัดเตรียมชุดทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* ของสารไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เคลือบบน OPP film [10]

อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ถูกนำไปใช้กันอย่างแพร่หลายทางด้านการแพทย์ เนื่องด้วยการเป็นสารที่ค่อนข้างปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสารทางพันธุกรรม และด้วยการที่เป็นสารเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงที่สามารถฆ่าเชื้อโรคด้วยตัวเองได้ คุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้การผลิตอุปกรณ์ทางการแพทย์จำนวนมากมีไทเทเนียมไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบในการผลิต แต่ทั้งนี้การใช้ประโยชน์จากอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ในการเคลือบอุปกรณ์ทางการแพทย์เพื่อยับยั้งแบคทีเรียยังมีข้อจำกัดบางอย่างของการใช้งาน กล่าวคือ การประยุกต์ใช้อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ในการยังยั้งแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้แสง UV ร่วมด้วย ซึ่งแสง UVก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับร่างกายมนุษย์ ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการใช้แสง UV ในการยังยั้งการเกิดไบโอฟิล์มในอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ใช้กับร่างกายมนุษย์

2.3 สรุป

ไบโอฟิล์มเป็นปัญหาหนึ่งที่มักเกิดขึ้นกับอุปกรณ์การใช้งานต่างๆ หรือแม้แต่เครื่องมือแพทย์ก็ยังสามารถเกิดไบโอฟิล์มขึ้นได้ เครื่องมือแพทย์ที่กล่าวถึง เช่น ท่อระบายน้ำออกจากสมอง (shunt) สายยางฉีดน้ำสำหรับกรอฟัน ข้อเข่าเทียม เป็นต้น หากอุปกรณ์ต่างๆ ดังกล่าว มีการสะสมของไบโอฟิล์มเป็นเวลานานจะทำให้ไบโอฟิล์มมีความหนาเพิ่มมากขึ้น และทำให้ยากต่อการกำจัด จึงอาจทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพื่อซื้ออุปกรณ์ใหม่ วิธีในการยับยั้งและป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มที่สามารถยืดอายุการใช้งานของอุปกรณ์และไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ดังเช่น การยับยั้งและป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโน และการยับยั้งและป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มด้วยสารไทเทเนียมไดออกไซด์

สารที่มีขนาดอนุภาคนาโน ไม่ว่าจะเป็นซิลเวอร์นาโน หรือ ไทเทเนียมไดออกไซด์ก็ตาม ต่างมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ที่เป็นสาเหตุในการก่อไบโอฟิล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของซิลเวอร์นาโนนั้นสามารถส่งผลแก่สิ่งแวดล้อมและยังไม่ทราบแน่ชัดว่าซิลเวอร์นาโนจะเป็นอันตรายมากน้อยเพียงใดต่อร่างกายมนุษย์ สำหรับไทเทเนียมไดออกไซด์ซึ่งเป็นสารเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงนั้นจะมีคุณสมบัติพิเศษในการฆ่าเชื้อด้วยตัวมันเอง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดไบโอฟิล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากต้องมีการใช้สารไทเทเนียมได-ออกไซด์ร่วมกับแสง UV จึงอาจเป็นอันตรายต่อมนุษย์เมื่อได้รับแสง UV

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
การเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO

ในบทนี้จะกล่าวถึงการจัดเตรียมวัสดุนาโนประเภทต่างๆที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ การเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และการสังเคราะห์สารนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO ด้วยวิธีการไฮโดรเทอร์มอล รวมถึงการตรวจดูภาพคุณลักษณะของวัสดุนาโนทั้งสองชนิดดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) โดยการเตรียมวัสดุนาโนเหล่านี้ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในด้านต่างๆ ของสาร ดังเช่น การดูผลของการใช้สารวัสดุนาโนในการควบคุมไบโอฟิล์ม รวมถึงดูความสามารถในการดูดกลืนแสง NIR ของสารนาโนเหล่านี้

3.1 การเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2)

การเตรียมอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) นั้นมีขั้นตอนดังนี้ คือ เริ่มจากกระบวนการโซนิเคชั่น การกรองสาร การทำแห้งสารแบบเยือกแข็ง (freeze dry) และการตรวจดูขนาดอนุภาคสารไทเทเนียมไดออกไซด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดหรือ SEM

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

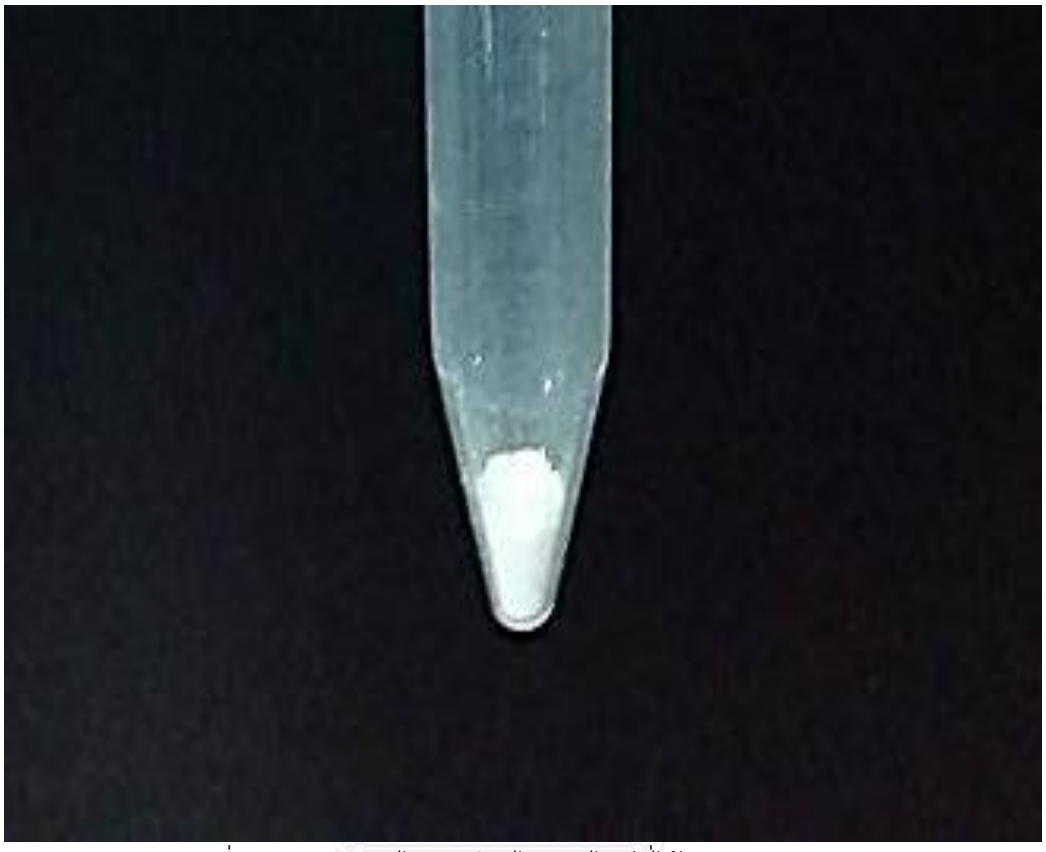
3.1.1 การแยกอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ด้วยกระบวนการโซนิเคชัน (sonication)

อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ที่อยู่รวมกันมักจะมีการเกาะติดกันเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ จึงทำการแยกกลุ่มก้อนของไทเทเนียมไดออกไซด์โดยใช้กระบวนการโซนิเคชันเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงในการแยกอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ออกจากกันและทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง

3.1.2 การกรองอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์

อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ใช้มีลักษณะเป็นผงทรงกลม จัดเตรียมโดยนำผงไทเทเนียมไดออกไซด์มาละลายด้วยน้ำ DI ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร ในการกรองอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์นั้นจะใช้กระดาษกรองเบอร์ 5 ที่มีขนาด 2.5 ไมครอน โดยนำกระดาษกรองมาพับเป็นทรงกรวยและรองด้วยภาชนะกรวยสำหรับกรองสาร แสดงดังรูปที่ 3.1 จะได้อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เป็นของเหลวและมีขนาดอนุภาคเล็กลง จากนั้นนำไปทำการ freeze dry หลังจากทำการ freeze dry จะได้อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ในสถานะของแข็งสีขาวแสดงดังรูปที่ 3.2

รูปที่ 3.1 รูปแบบการกรองสารไทเทเนียมไดออกไซด์

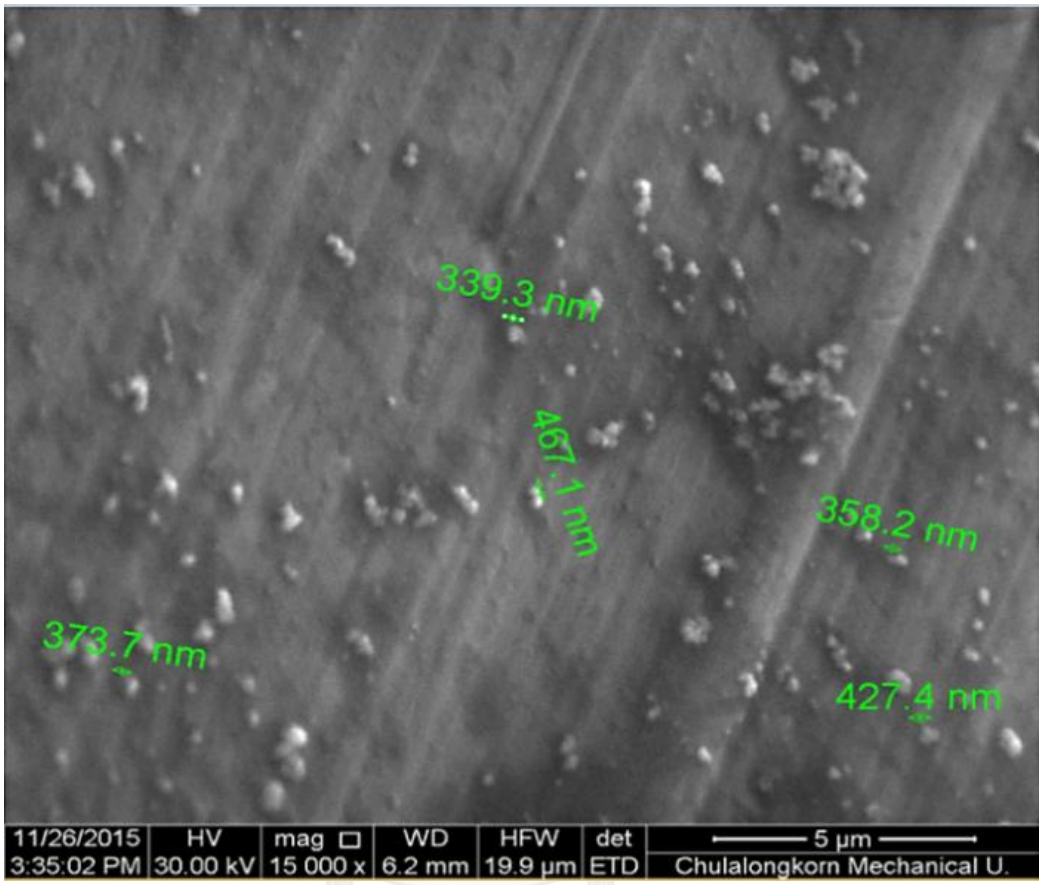


รูปที่ 3.2 ผงอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ได้จากการ freeze dry

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.3 การตรวจดูขนาดของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์

อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ผ่านการเตรียมจากกระบวนการโซนิเคชันและการกรองแล้ว จะนำมาตรวจดูขนาดอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดหรือ SEM แสดงดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ภาพ SEM ของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

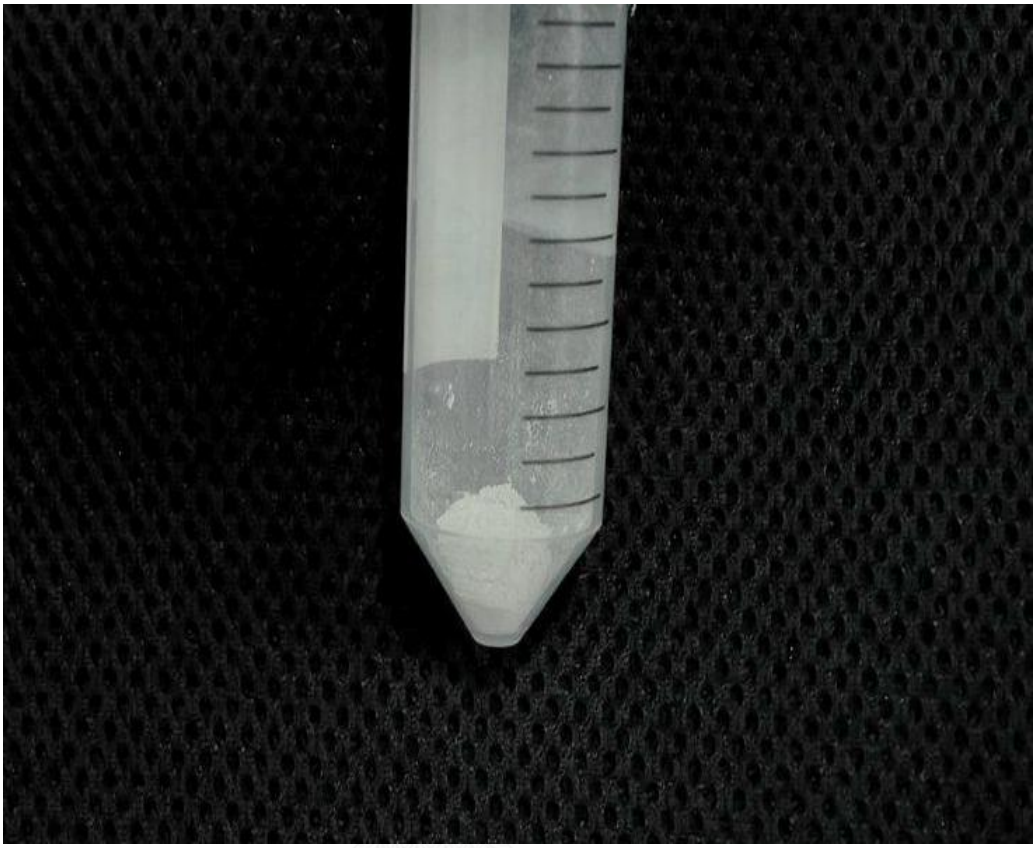
3.2 การเตรียมสารนาโนคอมโพสิตอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์

ในการเตรียมสารนาโนคอมโพสิตของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ โดยทำการติด กราฟีนออกไซด์บนอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ด้วยกระบวนการไฮโดรเทอร์มอล และกล่าวถึงการตรวจดูคุณลักษณะของสารนาโนคอมโพสิตของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดหรือ SEM

3.2.1 การติดกราฟีนออกไซด์บนผิวของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์

เตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และกราฟีนออกไซด์ (GO) ในอัตราส่วน 1 : 0.2 นำสารทั้งสองชนิดดังกล่าวไปละลายน้ำ และคนสารละลายให้เข้ากันโดยการใช้แมกเนติกบาร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันอย่างทั่วถึง จากนั้นเทสารละลายลงในขวดสีขาว teflon-lined autoclave และนำขวดดังกล่าวไปใส่ในชุดอุปกรณ์โลหะสำหรับทำกระบวนการไฮโดรเทอร์มอล แสดงดังรูปที่ 3.4 จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยกราฟีนออกไซด์ (GO) จะลดรูปลงเป็น RGO เมื่อครบ 6 ชั่วโมง นำสารละลายออกจากตู้อบ สารละลายที่ได้จะมีอุณหภูมิสูง จึงทิ้งสารละลายให้เย็นในอุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำสารละลายไปทำการ freeze dry จะได้นาโนคอมโพสิตของ TiO_2/GO ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเทา แสดงดังรูปที่ 3.5

รูปที่ 3.4 ชุดอุปกรณ์โลหะสำหรับทำกระบวนการไฮโดรเทอร์มอล

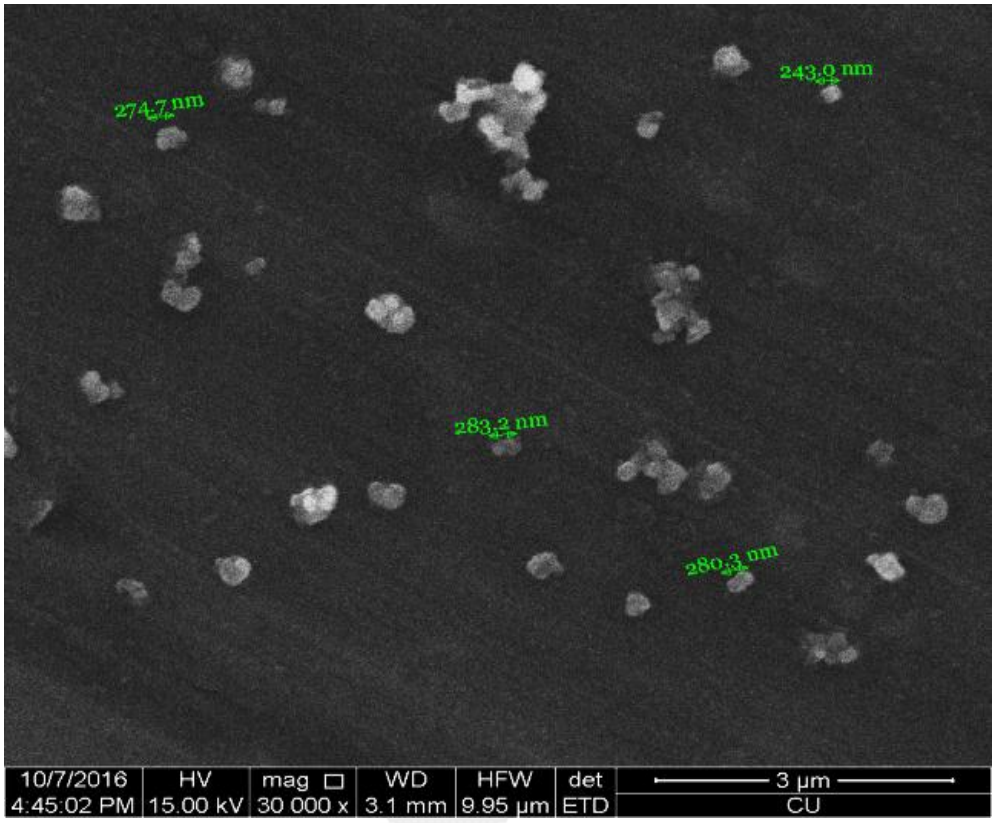


รูปที่ 3.5 ผงนาโนคอมโพสิตของไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.2 การตรวจดูคุณลักษณะของนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์

คุณลักษณะของนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ จะนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดหรือ SEM แสดงดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 ภาพ SEM ของสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์/กราฟีนออกไซด์ (TiO_2/GO)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 สรุป

ในบทนี้เป็นการอธิบายถึงการเตรียมอนุภาคสารไทเทเนียมไดออกไซด์ โดยเตรียมด้วยการโซนิเคชัน จากนั้นนำไปการกรองสารด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ขนาด 2.5 ไมครอนเพื่อให้สารมีขนาดอนุภาคเล็กลง และนำไปทำแห้งสารแบบเยือกแข็ง ซึ่งจะได้สารไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีขนาดไม่เกิน 1 ไมครอน โดยตรวจดูขนาดของสารด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดหรือ SEM สำหรับสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์ – กราฟีนออกไซด์ ทำการเตรียมสารทั้งสองชนิดดังกล่าวด้วยอัตราส่วน 1 : 0.2 และนำไปทำกระบวนการไฮโดรเทอร์มอลเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำแห้งสารแบบเยือกแข็ง ซึ่งจะได้นาโนคอมโพสิต และทำการตรวจดูคุณลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดหรือ SEM

บทที่ 4
การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทดลอง

ในบทนี้จะกล่าวถึงการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 เพื่อนำไปสร้างเป็นไบโอฟิล์ม และนำไปทำการทดลองร่วมกับสารนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ที่เตรียมขึ้น โดยจะเริ่มจากวิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียและการเตรียมอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป และกล่าวถึงวิธีการสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงการเตรียมอาหารสำหรับใช้ในการสร้างไบโอฟิล์ม จากนั้นจะกล่าวถึงการย้อมแบคทีเรียเพื่อนำไปตรวจดูการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียด้วยวิธี MTT รวมถึงการตรวจดูลักษณะของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล

4.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

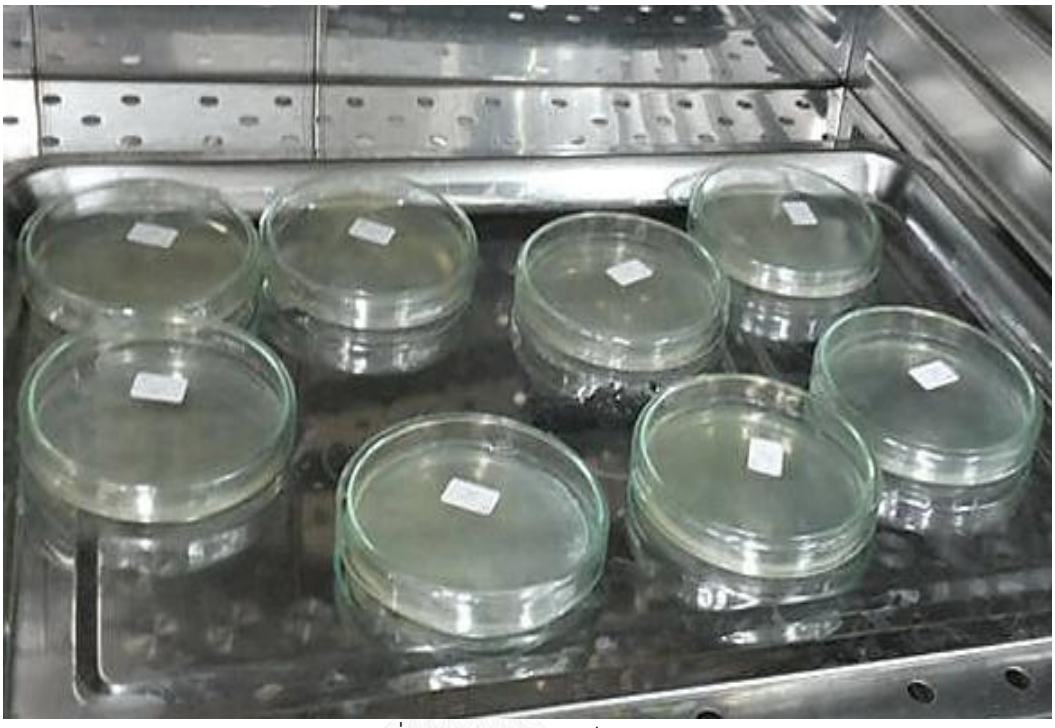
ในส่วนนี้จะกล่าวถึงวิธีการเตรียมอาหารสำหรับใช้เก็บรักษาแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และการเก็บเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว (stock) เพื่อไว้ใช้ในการทดลองครั้งต่อๆ ไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียคืออาหารวุ้นแข็ง Trypticase soy agar, TSA และอาหารเหลว Trypticase soy broth, TSB ทำการเตรียมโดยชั่งผง TSA 8 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปริมาณ 200 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) จากนั้นนำ TSA ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วมาอุ่นบน hot plate ใส่แมกเนติกบาร์ลงไปเพื่อช่วยคนให้เข้ากัน เมื่อขวดรูปชมพู่ที่บรรจุ TSA เริ่มอุ่นๆ จึงยกลงจาก hot plate ทำให้เย็นลงประมาณ 55 องศาเซลเซียสด้วยการนำไปจุ่มใน water bath จากนั้นนำ TSA เทลงในจาน petri dish ในตู้ชีวนิรภัย แสดงดังรูปที่ 4.1 โดยก่อนเท TSA จะลนไฟบริเวณปากขวดเพื่อป้องกันการปนเปื้อน รอให้ TSA แข็งตัวจึงปิดฝา

จานและคว่ำ petri dish ลง สำหรับ TSB เตรียมโดยการชั่งผง TSB 1.5 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วทรงกระบอก เติมน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อ



รูปที่ 4.1 อาหารวุ้นแข็ง TSA

4.1.2 การเตรียมอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ

เตรียมกลีเซอรอล 40% จำนวน 4 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ และเตรียม TSB จำนวน 1.6 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำปริมาณ 6 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นเท TSB ลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุกลีเซอรอล และนำไปวางบน hot plate ใส่แมกเนติกบาร์ช่วยในการคนให้เข้ากัน เมื่อสังเกตเห็นว่าเกิดฟองขึ้นจึงยกลงจาก hot plate ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นมาปริมาณ 750 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดสำหรับทำการเก็บรักษาเชื้อ จากนั้นนำไปทำการอบฆ่าเชื้อ

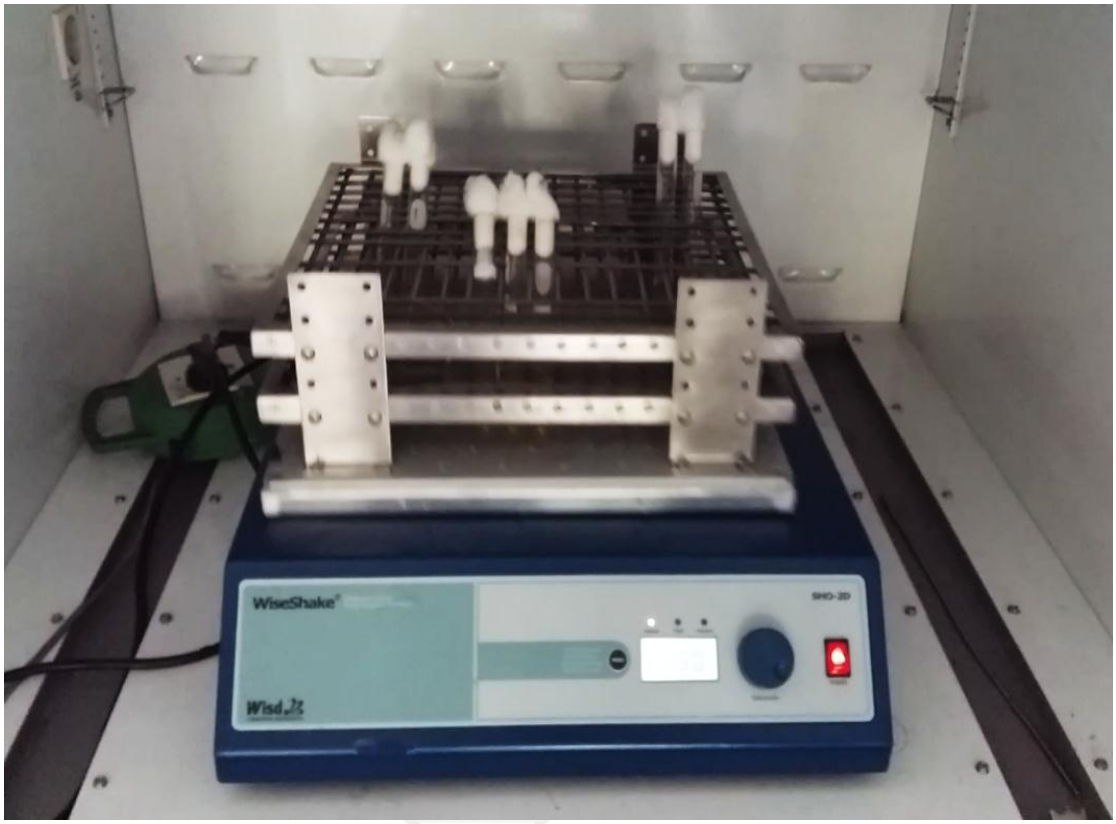
4.1.3 การแยกแบคทีเรีย (Streak plate)

การแยกเชื้อแบคทีเรียนั้นเป็นการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ซึ่งเป็นวิธีการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยนำห่วงเขี่ยเชื้อไปลนไฟที่บริเวณปลายห่วงเพื่อเป็นการฆ่าเชื้อก่อนใช้งานจนห่วงเขี่ยเชื้อร้อน สังเกตได้จากที่ปลายห่วงจะเกิดสีแดง ทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ จากนั้นจึงนำมาแตะเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 แล้วขีดเชื้อไปบนอาหารวุ้นแข็ง TSA ที่เตรียมไว้ โดยขีดเชื้อให้เป็นแนวระนาบประมาณ 3 - 4 ระนาบ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้การแยกเชื้อแบคทีเรียจะทำในตู้ชีวนิรภัยเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

4.1.4 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว

อาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 คือ TSB ที่ได้เตรียมไว้ข้างต้น โดยจะทำในตู้ชีวนิรภัย การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวทำโดยนำห่วงเขี่ยเชื้อไปทำการฆ่าเชื้อด้วยการลนไฟบริเวณปลายห่วงจนปลายห่วงเป็นสีแดง ทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ จากนั้นใช้ปลายห่วงเลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากวิธีการแยกแบคทีเรีย (streak plate) และย้ายโคโลนีเดี่ยวที่เลือกไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วทดลองปริมาณ 6 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ โดยทำการบ่มที่ 180 รอบต่อนาที ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

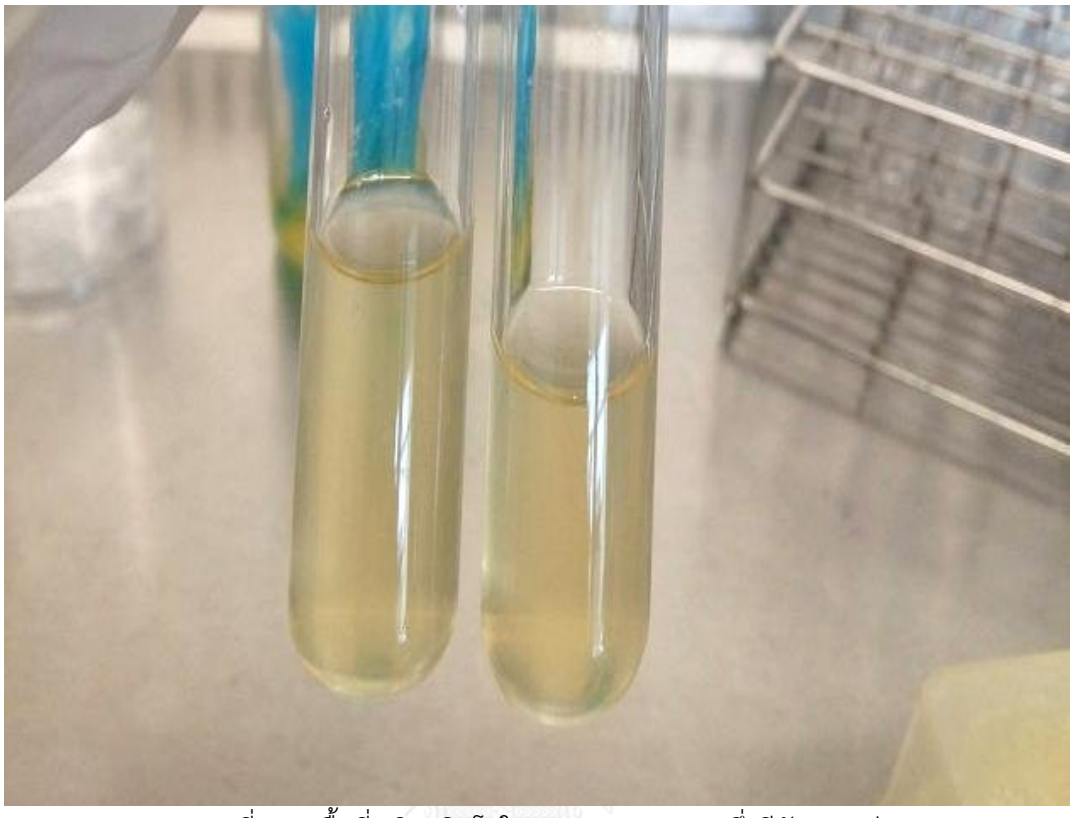


รูปที่ 4.2 การบ่มแบบเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.1.5 การเก็บรักษาเชื้อ (Stock)

นำเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ที่ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงออกจากตู้บ่ม โดยเชื้อในหลอดแก้วทดลองจะมีลักษณะขุ่นแสดงดังรูปที่ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการเจริญเติบโต นำเชื้อแบคทีเรียไปทำการเขย่าบนเครื่อง vortex เพื่อให้เชื้อกระจายตัวโดยทั่วกัน จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อแบคทีเรียขึ้นมาปริมาณ 750 ไมโครลิตร ใส่ลงขวดที่ทำการเก็บเชื้อ และนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำใช้ทำการทดลองในครั้งต่อไป



รูปที่ 4.3 เชื้อที่เจริญเติบโตในอาหารเหลว TSB ซึ่งมีลักษณะขุ่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

วิธีการสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 โดยเริ่มจากการนำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้ในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส มาทำการ streak plate บนอาหารวุ้นแข็ง TSA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวและนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB และกล่าวถึงการเตรียมอาหารสำหรับใช้ในการสร้างไบโอฟิล์ม

4.2.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 บนอาหารวุ้นแข็ง TSA

นำแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาทำการ streak plate บนอาหารวุ้นแข็ง TSA โดยนำห่วงเขี่ยเชื้อลนไฟบริเวณปลายห่วงจนกระทั่งปลายห่วงมีสีแดงเพื่อเป็นการฆ่าเชื้อที่อาจติดกับปลายห่วง จากนั้นนำปลายห่วงจุ่มลงในขวดเก็บเชื้อดังกล่าว แล้วนำมาขีดเป็นระนาบประมาณ 3 – 4 ระนาบบนอาหารวุ้นแข็ง TSA ที่เตรียมไว้ใน petri dish แสดงดังรูปที่ 4.4 จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

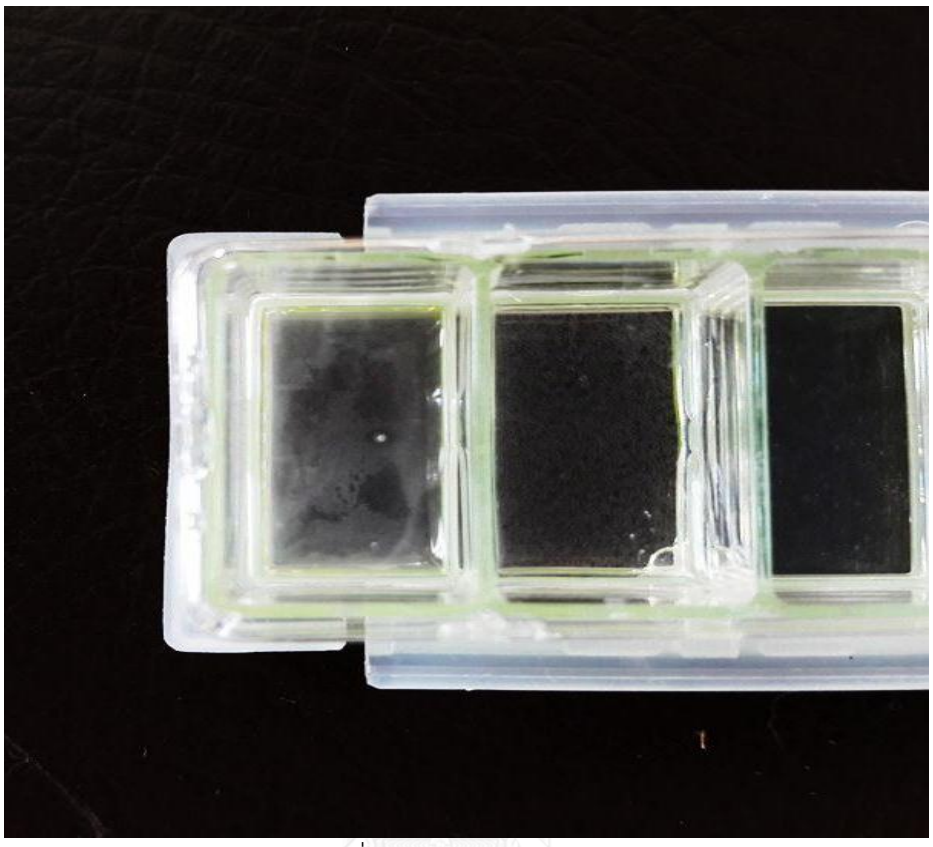
รูปที่ 4.4 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 บนอาหารวุ้นแข็ง TSA

4.2.2 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ในอาหารเหลว TSB

เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวที่เลี้ยงไว้บนอาหารวุ้นแข็ง TSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ สีขาว ซึ่งจะทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวโดยใช้ปลายห่วงเขี่ยเชื้อที่ทำการลนไฟที่บริเวณปลายห่วงเพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ และทำการเลือกโคโลนีออกมาจำนวนหนึ่งโคโลนี นำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB ที่บรรจุในหลอดแก้วทดลองปริมาณ 6 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 - 12 ชั่วโมง

4.2.3 การสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคเรีย *S. epidermidis* ATCC 12228 ในอาหารเหลวเป็นเวลา 8 – 12 ชั่วโมงแล้ว นำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาทำการตรวจวัดค่า Optical Density, OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เพื่อดูความขุ่นของแบคทีเรีย จากนั้นทำการปรับค่า OD ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.1 – 0.2 โดยทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารเหลว TSB เพื่อให้แบคทีเรียเริ่มเจริญเติบโตใหม่ และนำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 180 rpm ทิ้งไว้ระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นนำแบคทีเรียมาทำการตรวจวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.4 – 0.6 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วง mid-log phase ของแบคทีเรีย นำแบคทีเรียที่มีค่าอยู่ในช่วง mid-log phase มาสร้างไบโอฟิล์มโดยการนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มีกลูโคสผสมอยู่ 0.25% ซึ่งอัตราส่วนของเชื้อแบคทีเรียต่ออาหารเหลว TSB + กลูโคส 0.25% ที่ใช้ในแต่ละหลุมของภาชนะคือ 1 : 200 นำไปบ่มในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะของไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นจะมีสีขาวขุ่นเกาะติดอยู่พื้นผิวของภาชนะ แสดงดังรูปที่ 4.5



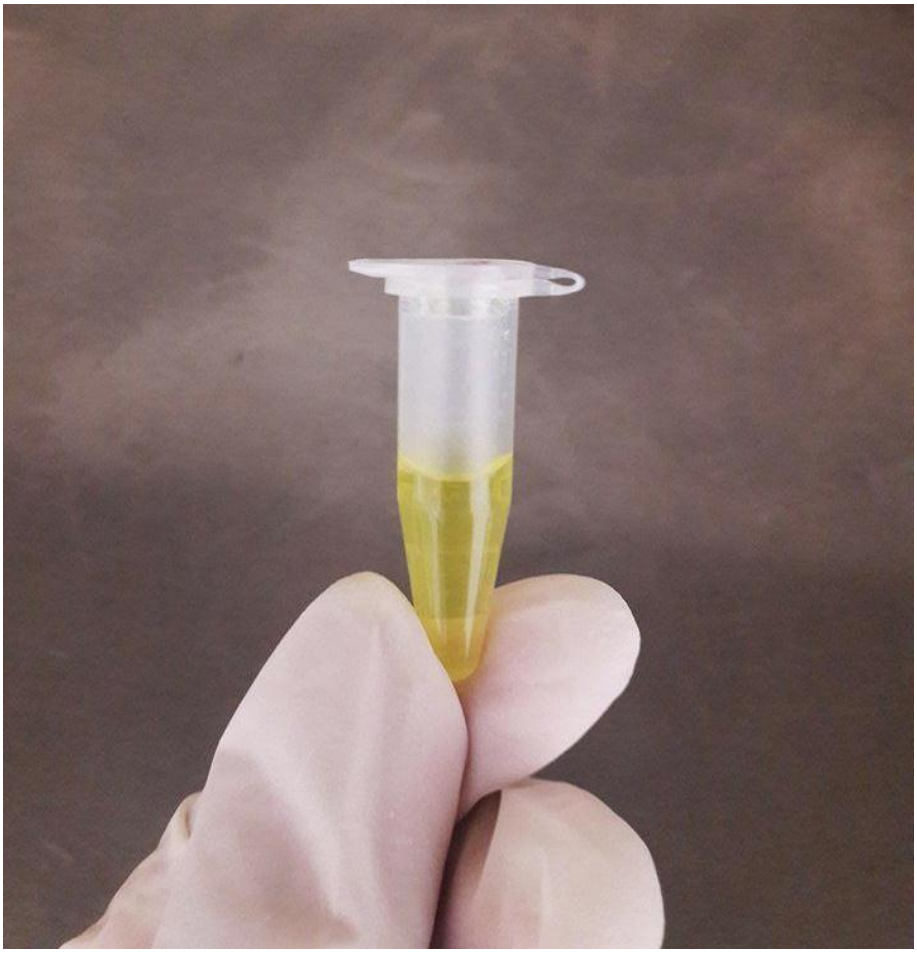
รูปที่ 4.5 ลักษณะของไบโอฟิล์ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3 การย้อมแบคทีเรีย

ในการย้อมแบคทีเรีย จะทำการย้อมด้วย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT โดยสาร MTT จะใช้วิเคราะห์การมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่มีชีวิตจะสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาทำปฏิกิริยากับสาร MTT และได้เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานที่มีสีม่วง ส่วนแบคทีเรียที่ตายแล้วจะไม่สามารถผลิตเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับสาร MTT จึงไม่มีผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานเกิดขึ้น ทำให้สารย้อม MTT ยังคงมีสีเดิม คือสีเหลือง ลักษณะของสารย้อม MTT แสดงดังรูปที่ 4.6 ในการย้อมแบคทีเรียเริ่มโดยการนำแบคทีเรีย *S. epidermidis* ATCC 12228 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB + กลูโคส 0.25% เพื่อสร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาชนะ 96 wells plate มาทำการล้างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline, PBS จำนวน 3

ครั้ง เพื่อล้างแบคทีเรียที่อยู่ในรูป planktonic ออก จากนั้นย้อมด้วยสาร MTT ปริมาณ 200 ไมโครลิตรนำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยหลีกเลี่ยงจากแสง เมื่อครบ 4 ชั่วโมง มาทำการเติมสาร Dimethyl sulfoxide, DMSO 100% เพื่อทำการละลายผลึกฟอร์มาซานซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากสาร MTT [14] จากนั้นดูดของเหลวจากแต่ละหลุมขึ้นมาปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และวัดแบล็คกราวที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร ทั้งนี้การวัดค่าแบล็คกราว คือการวัดค่าของสิ่งรบกวนอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย



รูปที่ 4.6 สารย้อม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT

4.4 การตรวจสอบไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล

ในส่วนนี้จะกล่าวถึงการตรวจดูภาพของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล (Confocal microscopy) โดยก่อนทำการตรวจดูภาพ แบคทีเรียจะถูกย้อมด้วยสารย้อม LIVE/DEAD คือ SYTO 9 ซึ่งจะย้อมติดเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิตและแสดงผลออกมาเป็นสีเขียว และ สารย้อม Propidium iodide, PI ซึ่งจะย้อมติดเซลล์ของแบคทีเรียที่ไม่มีชีวิตและแสดงผลออกมาเป็นสีแดง โดยภาชนะที่ใช้ในการตรวจดูไบโอฟิล์มแสดงดังรูปที่ 4.7

รูปที่ 4.7 ภาชนะที่ใช้สำหรับสร้างไบโอฟิล์ม

4.5 สรุป

ในบทนี้ได้อธิบายถึงการเตรียมเชื้อสำหรับการทดลอง เชื้อแบคทีเรียที่ใช้คือ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 โดยทำการเก็บรักษาเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ประกอบด้วยกลีเซอรอล 40% และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองสร้างไบโอฟิล์มในครั้งต่อไป การสร้างไบโอฟิล์ม จะทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้นแข็ง TSA เพื่อให้ได้เป็นโคโลนี และจึงนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB จากนั้นจะสร้างไบโอฟิล์มด้วยการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่มีส่วนผสมของกลูโคส 0.25% ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการย้อมแบคทีเรียด้วยสารย้อม SYTO 9 และสารย้อม Propidium iodide, PI จากนั้นทำการตรวจดูไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล โดยเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิตจะติดสีเขียวของ SYTO 9 และเซลล์ของแบคทีเรียที่ไม่มีชีวิตจะติดสีแดงของ PI

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
การตรวจสอบคุณสมบัติของสาร

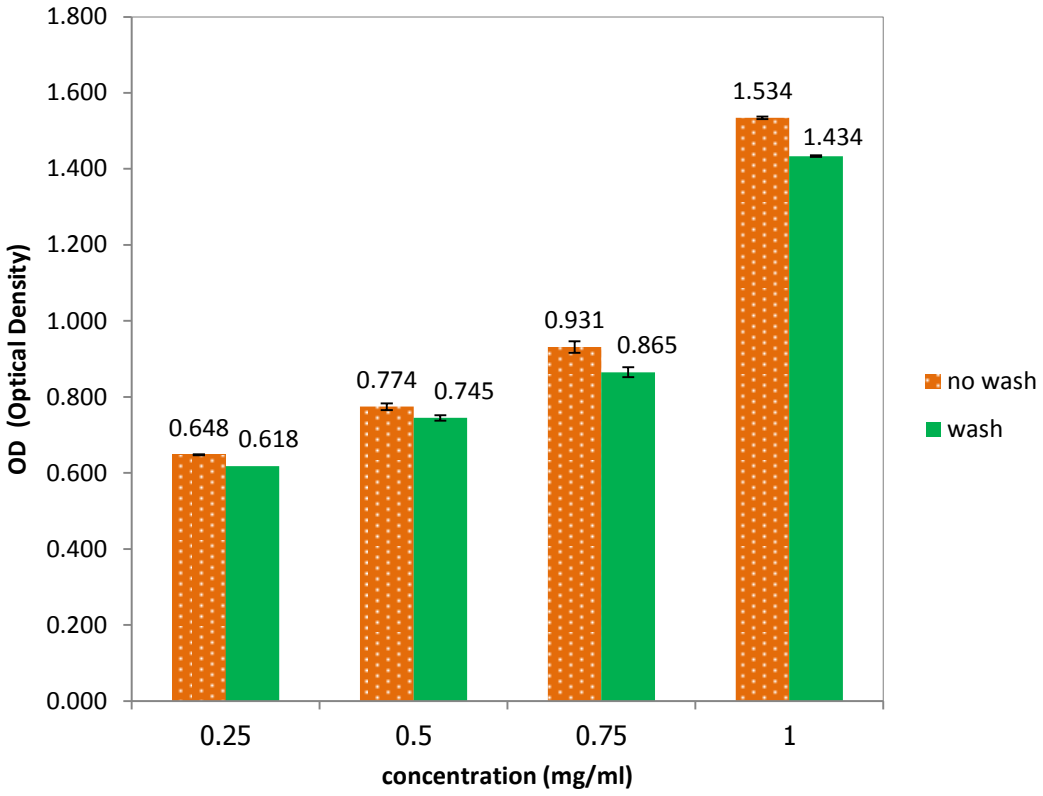
ในบทนี้จะกล่าวถึงการตรวจสอบคุณสมบัติของสารอนุภาคนาโน TiO_2 และนาโนคอมโพสิตของ TiO_2/GO ในด้านของการเกาะติดของสารบนภาชนะ 96 wells plate ด้านความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารทั้งสองชนิดดังกล่าว ดูผลความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบต่ออัตราการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรีย และดูผลของสารเมื่อใช้ร่วมกับการฉายแสง NIR ต่ออัตราการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรีย รวมถึงดูลักษณะของภาพไบโอฟิล์มที่ตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล

5.1 การเกาะติดของสาร

การทดสอบการเกาะติดของสาร ทำการทดสอบเพื่อดูว่าสารที่ใช้ในการทดสอบมีการเกาะติดที่ดีบนภาชนะหรือไม่ รวมถึงดูการกระจายตัวของสารบนภาชนะ 96 wells plate ทำการทดสอบโดยนำภาชนะ 96 wells plate ไปทำความสะอาดด้วยวิธี oxygen plasma แสดงดังรูปที่ 5.1 เพื่อให้ภาชนะดังกล่าวมีความเป็น hydrophilic จากนั้นเตรียมสารละลาย TiO_2 และสารนาโนคอมโพสิต TiO_2/GO ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายไปทำการ sonicate เป็นเวลา 30 นาที และนำไป vortex เพื่อให้สารละลายมีการกระจายตัวที่ดีก่อนนำมาทดสอบ จากนั้นดูดสารละลายทั้งสองชนิดดังกล่าวในปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะ 96 wells plate ทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส บนเตา hotplate เมื่อสารแห้งจึงนำไปวัดค่า OD (Optical Density) ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร จากนั้นนำมาใส่น้ำ DI ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการ wash จำนวน 3 ครั้ง และดูดน้ำออก ทำให้แห้งด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส บนเตา hotplate จากนั้นนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร อีกครั้ง โดยทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยผลการทดลองแสดงดังรูป

ที่ 5.2 ซึ่งพบว่าค่า OD ของสารในแต่ละความเข้มข้นที่ได้ทำการใส่น้ำทิ้งไว้เป็นเวลาหนึ่งคืนและมีการ wash นั้นไม่ค่อยมีความแตกต่างจากค่า OD ของสารที่ไม่มีการใส่น้ำและการ wash ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารมีการเกาะติดที่ดีบนภาชนะ 96 wells plate ที่ผ่านกระบวนการ oxygen plasma

รูปที่ 5.1 อุปกรณ์สำหรับกระบวน oxygen plasma



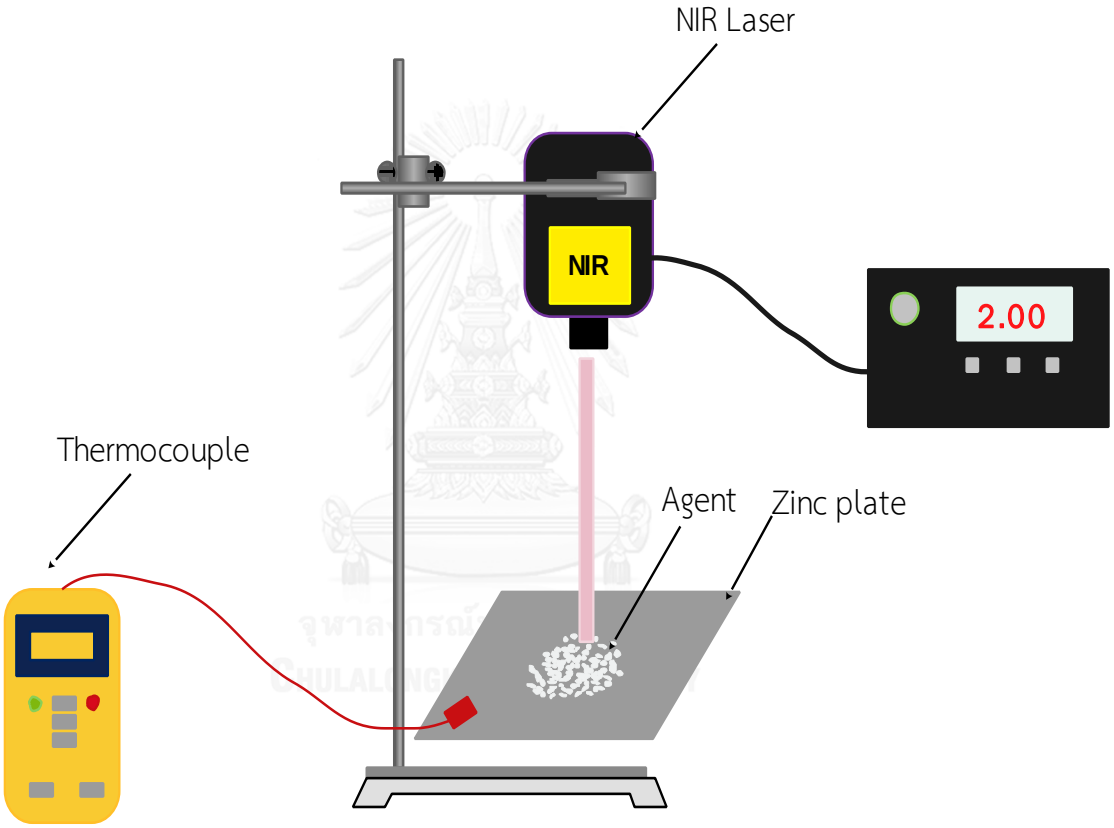
รูปที่ 5.2 การเกาะติดของสารบนภาชนะ 96 wells plate

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

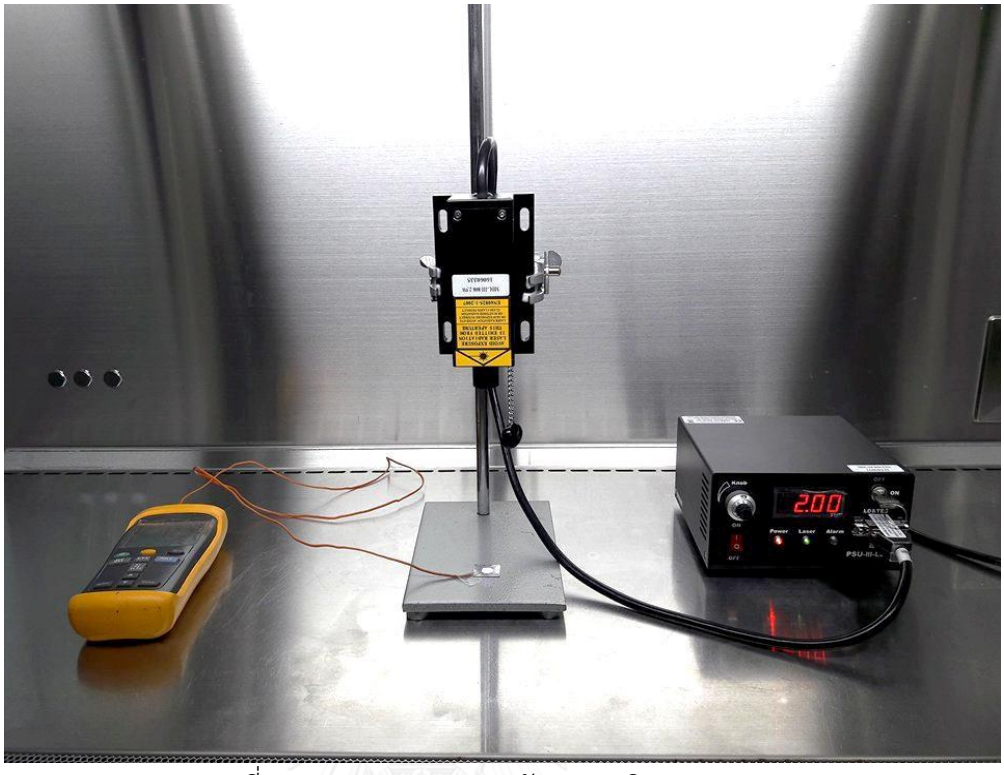
5.2 การวัดอุณหภูมิของสารไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์

การทดสอบในส่วนนี้ เป็นการทดสอบเพื่อดูความสามารถในการดูดกลืนแสง NIR ของสารนาโนที่ใช้ทดสอบ โดยดูจากค่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นของสารนาโนที่ทำการฉายแสง NIR ในการทดสอบจะทำการเตรียมแผ่นโลหะสังกะสี (Zn) ขนาด 2x2 เซนติเมตร ทำการโค๊ดสารไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการฉายแสง NIR กำลังที่ใช้เท่ากับ 2 วัตต์ ตรงบริเวณที่โค๊ดสาร จากนั้นวัดอุณหภูมิทุกๆ 1 นาที ด้วยอุปกรณ์วัดอุณหภูมิเทอร์โมคัปเปิล แสดงดังรูปที่ 5.3 และ 5.4 โดยลักษณะของสารที่โค๊ดบนแผ่นโลหะสังกะสีและทำการฉายแสง NIR แสดงดังรูปที่

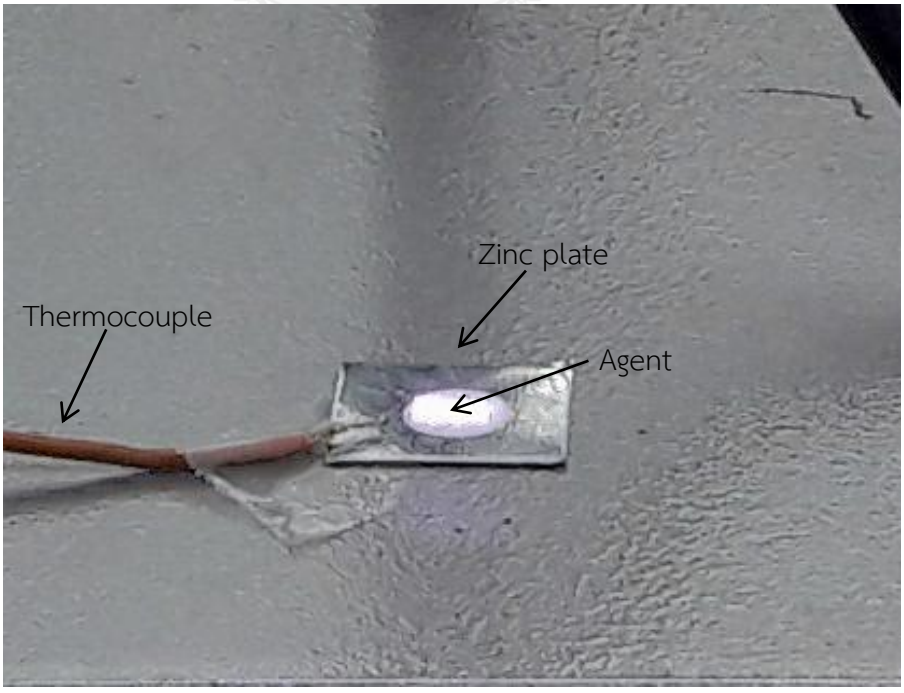
5.5 ในการทดสอบพบว่าสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์สามารถดูดกลืนแสงและทำให้อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าค่าอุณหภูมิของ blank ซึ่งใช้เป็นแผ่นโลหะสังกะสี และสารไทเทเนียมไดออกไซด์ ที่มีอุณหภูมิสูงสุดในการดูดกลืนที่ 37 และ 43 องศาเซลเซียส แสดงดังรูปที่ 5.6 ตามลำดับ



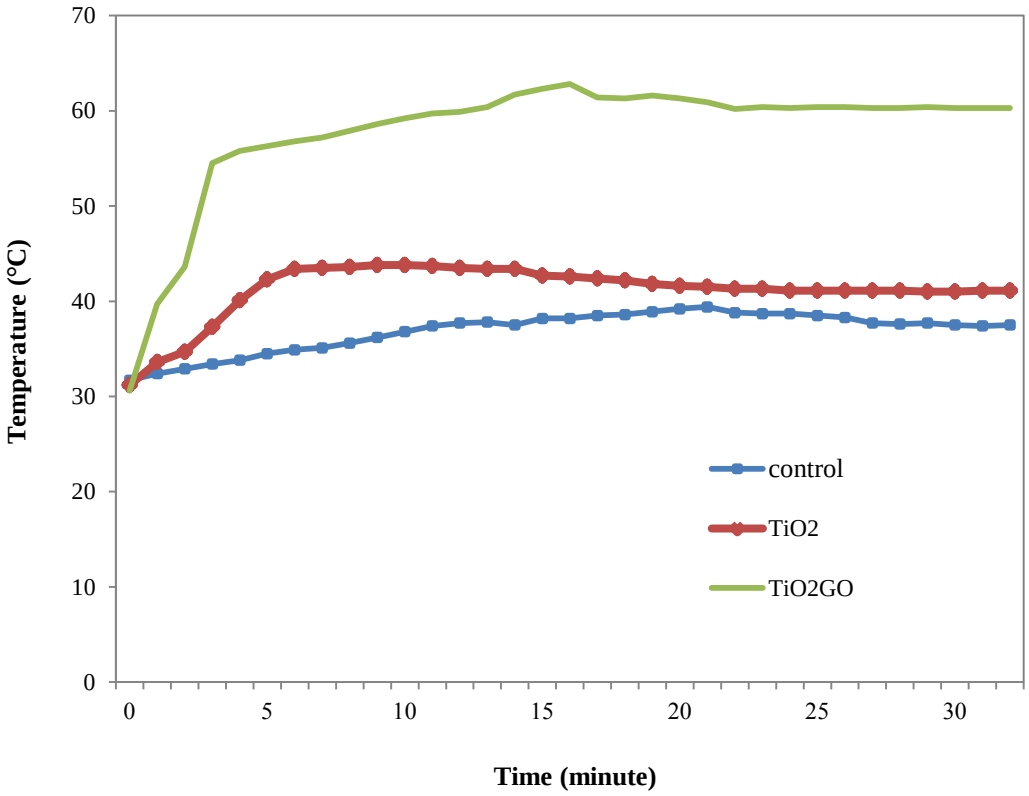
รูปที่ 5.3 schematic diagram ของการฉายแสง NIR เพื่อวัดอุณหภูมิของสาร



รูปที่ 5.4 ชุดการทดลองการวัดอุณหภูมิของสาร



รูปที่ 5.5 ลักษณะของสารที่โค๊ดบนแผ่นโลหะสังกะสี



รูปที่ 5.6 อุณหภูมิของสารทดสอบ

5.3 การมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ

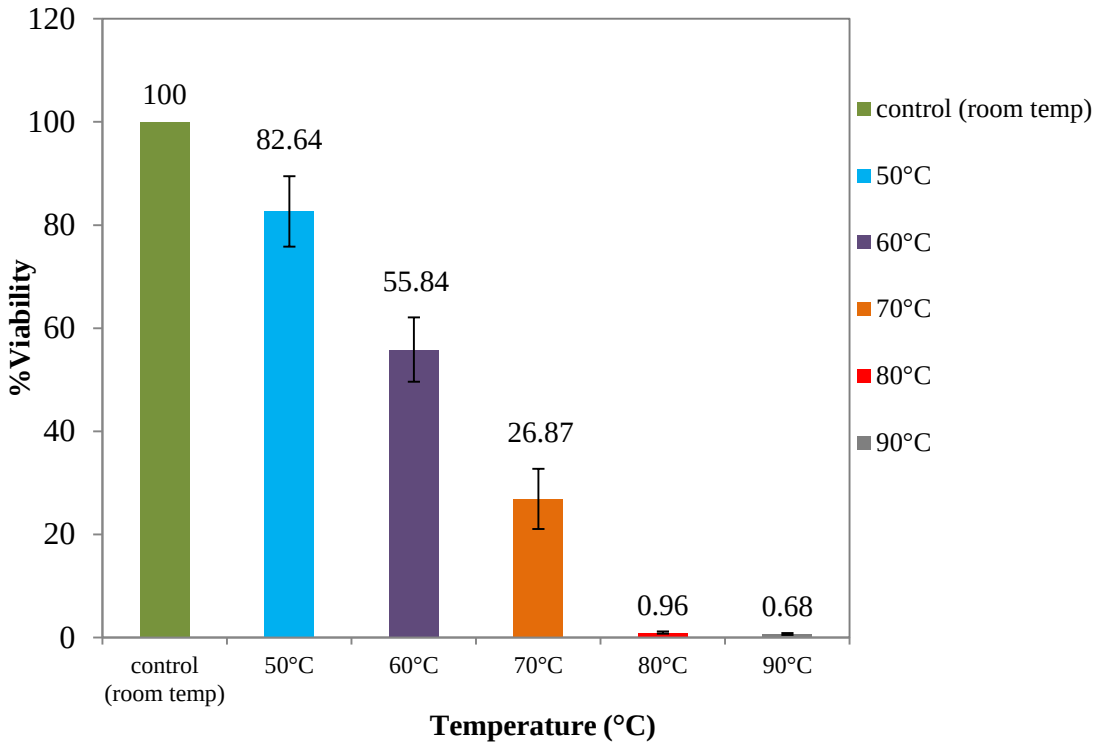
เป็นการทดสอบเพื่อดูผลของการมีชีวิตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ หรือดูว่าที่อุณหภูมิใดๆ แบคทีเรียจะมีการตายอย่างมีนัยสำคัญ โดยการทดสอบนี้ทำขึ้นเพื่อแสดงความสอดคล้องกับค่าอุณหภูมิของสารนาโนที่ได้มีการฉายแสง NIR ในการทดสอบนี้จะทำการสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermisdis* ATCC 12228 โดยนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจากตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส มาทำการ streak plate บนอาหารวุ้นแข็ง TSA บ่มทิ้งไว้ในตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียและนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 180 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปทำการเจือจางให้มีค่า OD (Optical density) 0.1-0.2 ทำการบ่มต่อจนมีค่า OD อยู่ในช่วง 0.4-0.6 เพื่อให้แบคทีเรียอยู่ในช่วง mid-log phase จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ 0.25% ในภาชนะ 96 wells plate ที่ผ่านการทำความ

สะอาดด้วยวิธี oxygen plasma บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปให้ความร้อนบนเตา hotplate ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการให้ความร้อนจนครบทุกอุณหภูมิ จึงนำไปวิเคราะห์อัตราการมีชีวิตของแบคทีเรียด้วยสารย้อม MTT โดยก่อนทำการย้อม จะทำการ wash ด้วย PBS เป็นจำนวน 3 ครั้ง และย้อมด้วยสาร MTT โดยหลีกเลี่ยงจากแสง นำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO 100% เพื่อสลายผลึกฟอร์มาซานที่เกิดขึ้น นำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และวัดค่าแบล็คกราวที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร ทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ครั้ง จากการทดสอบดังรูปที่ 5.7 พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น จะทำให้อัตราการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลง และแบคทีเรียจะตายอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสขึ้นไป ทั้งนี้การวิเคราะห์ผลการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียสามารถคำนวณได้ตามสมการ 5.1 ดังนี้

$$\%\,Viability = \frac{(OD_{570} - OD_{690})_{test} - (OD_{570} - OD_{690})_{blank}}{(OD_{570} - OD_{690})_{control} - (OD_{570} - OD_{690})_{blank}} \times 100 \qquad (5.1)$$

โดยที่ OD 570 หมายถึง ค่า Optical density วัดที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

OD 690 หมายถึง ค่า Optical density วัดที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร

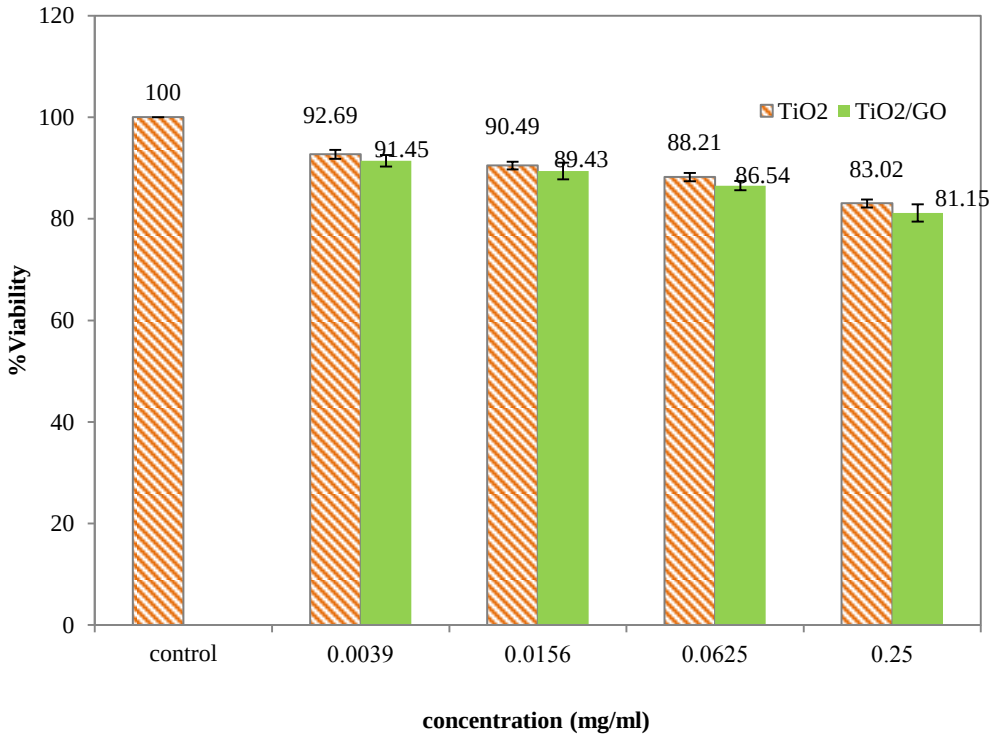


รูปที่ 5.7 อัตราการมีชีวิตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ

5.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อแบคทีเรีย (Toxicity test)

ในส่วนของการทดสอบนี้ ทำการทดสอบเพื่อดูความเป็นพิษของวัสดุนาโนที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย โดยการทดสอบจะทำการโค๊ดวัสดุนาโน คือ สารไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ ความเข้มข้น 0.0039, 0.0156, 0.0625 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนภาชนะ 96 wells plate ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยวิธี oxygen plasma โดยใช้ความร้อนในการโค๊ดสารที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นสร้างไบโอฟิล์มจากแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermisdis* ATCC 12228 บนภาชนะ 96 wells plate ที่มีสารสองชนิดดังกล่าวโค๊ดอยู่ ด้วยการเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการทำ steak plate บนอาหารวุ้นแข็ง TSA มาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ทำการวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เจือจางเชื้อแบคทีเรียให้ได้ค่า OD 0.1-0.2 ทำการบ่มต่อจนเชื้อแบคทีเรียมีค่า OD อยู่ในช่วง 0.4-0.6 จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบอยู่ 0.25%

บ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากสร้างไบโอฟิล์มแล้ว นำไป wash ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างแบคทีเรียที่ลอยอยู่ในน้ำในรูป planktonic ออก และนำไปย้อมด้วย MTT ปริมาณ 200 ul บ่มในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม DMSO 100% ปริมาณ 200 ul เพื่อสลายผลึกฟอร์มาซานซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก MTT และนำไปวิเคราะห์ผลด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และวัดค่าแบล็คกราวที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร ทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำ จากการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อการมีชีวิตของแบคทีเรียนั้น แบคทีเรียมีแนวโน้มของอัตราการมีชีวิตลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 5.8 โดยที่ความเข้มข้นที่สูงกว่าความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียที่มากขึ้น ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารนาโนที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียไม่มากนัก โดยความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองถัดไป คือ 0.0039, 0.0156 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือกล่าวคือ เพื่อจะแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในการทดสอบผลของการใช้สารนาโนในการควบคุมไบโอฟิล์มกับการทดสอบผลของการใช้สารนาโนร่วมกับการฉายแสง NIR ในการควบคุมไบโอฟิล์ม



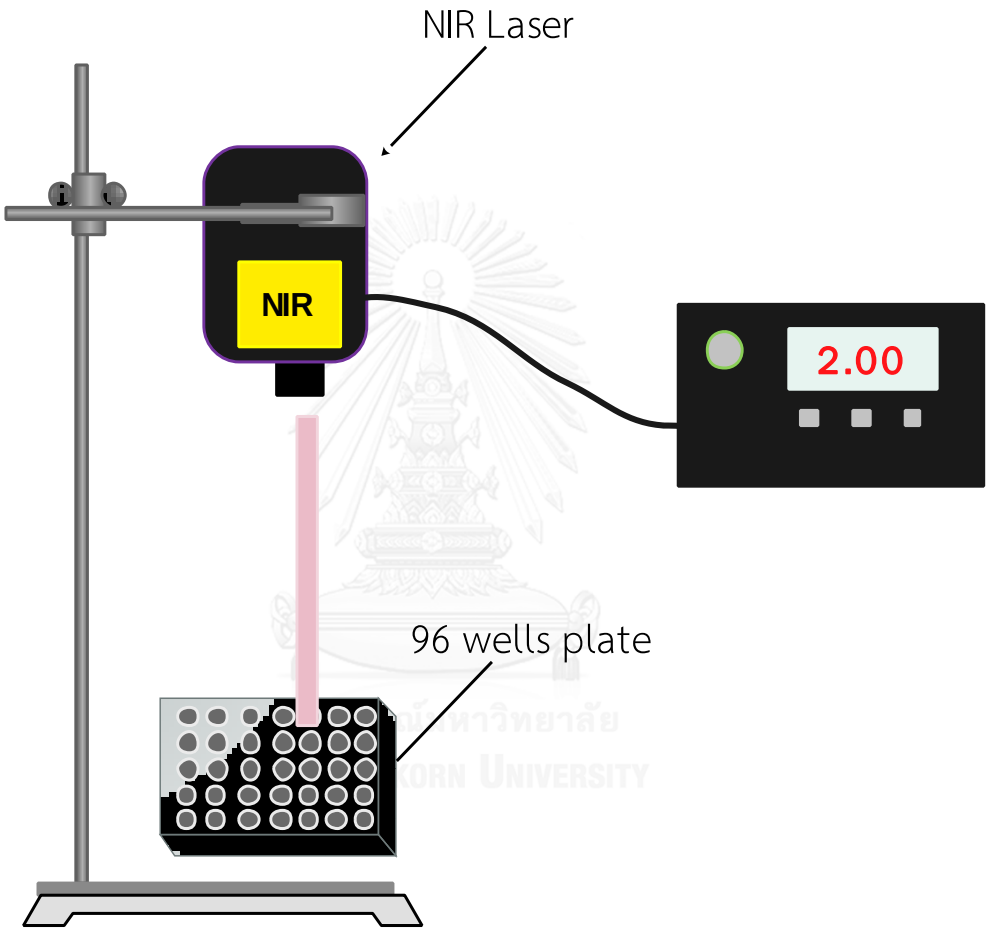
รูปที่ 5.8 การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อแบคทีเรียของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ

5.5 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยสารไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ร่วมกับการฉายแสง NIR

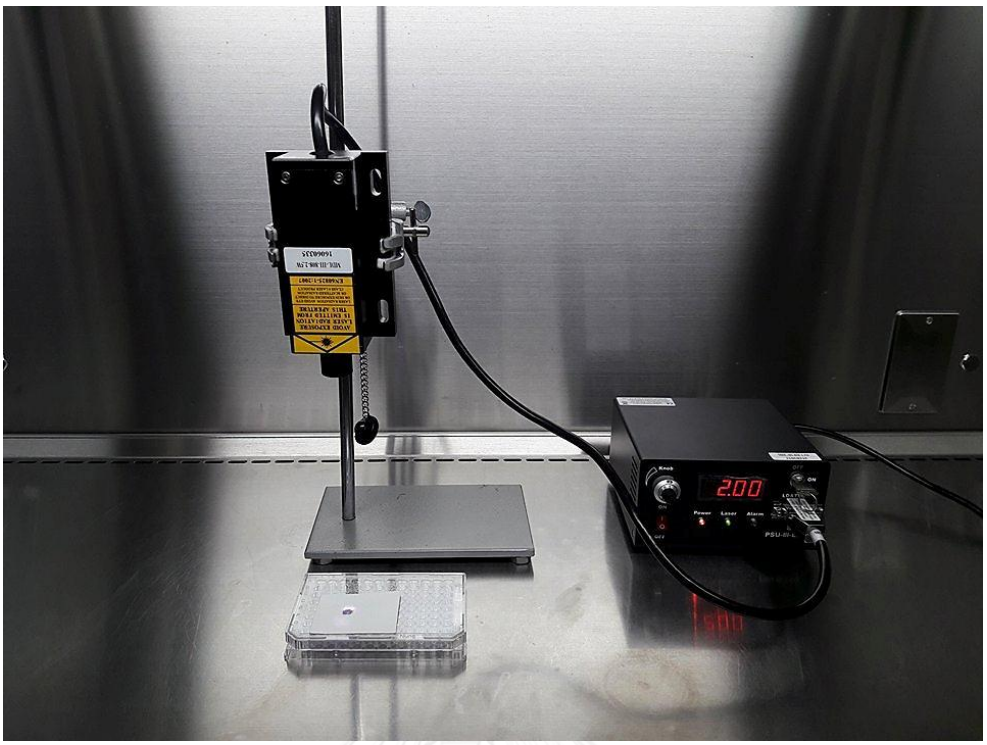
ในการทดสอบนี้จะทำการทดสอบเพื่อดูผลของการใช้วัสดุนาโนร่วมกับการฉายแสง NIR ต่อการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรีย โดยความเข้มข้นของวัสดุนาโนที่ใช้ในการทดสอบส่วนนี้จะพิจารณามาจากการทำ Toxicity ในหัวข้อ 5.3 ในการทดสอบจะทำการโค๊ดสารไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.0039, 0.0156 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนภาชนะ 96 wells plate ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยวิธี oxygen plasma ทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส บนเตา hotplate จากนั้นสร้างไบโอฟิล์มจากแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus epidermisdis* ATCC 12228 บนภาชนะ 96 wells plate ที่มีสารสองชนิดดังกล่าวโค๊ดอยู่ โดยทำการเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้จากการ streak plate บนอาหารวุ้นแข็ง TSA นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียให้ได้ค่า OD อยู่ในช่วง 0.1-0.2 นำไปบ่มต่อในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 180 รอบต่อนาที จนเชื้อแบคทีเรียมีค่า OD อยู่ในช่วง 0.4-0.6 จึงนำเชื้อแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบอยู่ 0.25% ทำการบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปฉายแสง NIR ที่กำลัง 2 วัตต์ เป็นเวลา 10 นาทีต่อหลุม โดยชุดการทดสอบร่วมกับการฉายแสง NIR แสดงดังรูปที่ 5.9 และ 5.10 สำหรับลักษณะการฉายแสง NIR ในแต่ละหลุมแสดงดังรูปที่ 5.11 หลังจากการฉายแสง นำไป wash ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง และย้อมด้วย MTT ปริมาณ 200 ul โดยหลีกเลี่ยงจากแสง นำไปบ่มในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม DMSO 100% ปริมาณ 200 ul เพื่อสลายผลึกฟอร์มาซานซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก MTT และนำไปวิเคราะห์ผลด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และวัดค่าแบล็คกราวที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร ทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำ จากการทดสอบพบว่าเมื่อทำการฉายแสง NIR ร่วมด้วย ทำให้การมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียลดลงแสดงดังรูปที่ 5.12 ที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์พบว่าแบคทีเรียมีชีวิตอยู่ 57.89% ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบที่ความเข้มข้นเดียวกันแต่ไม่มีการฉายแสง ด้วยผลการทดสอบเช่นนี้ เนื่องมาจากสารสามารถดูดกลืนแสง NIR และเปลี่ยนเป็นความร้อน ทำให้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

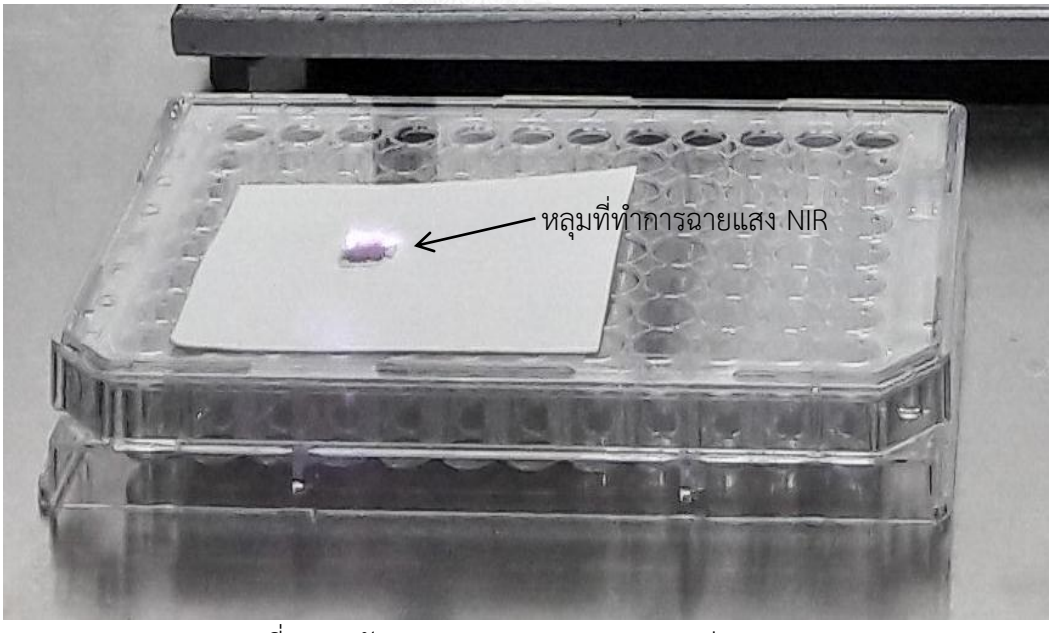
สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ โดยที่สารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์สามารถดูดกลืนแสง NIR ได้ดีกว่าสารอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ ซึ่งเป็นไปตามการทดสอบในหัวข้อที่ 5.2



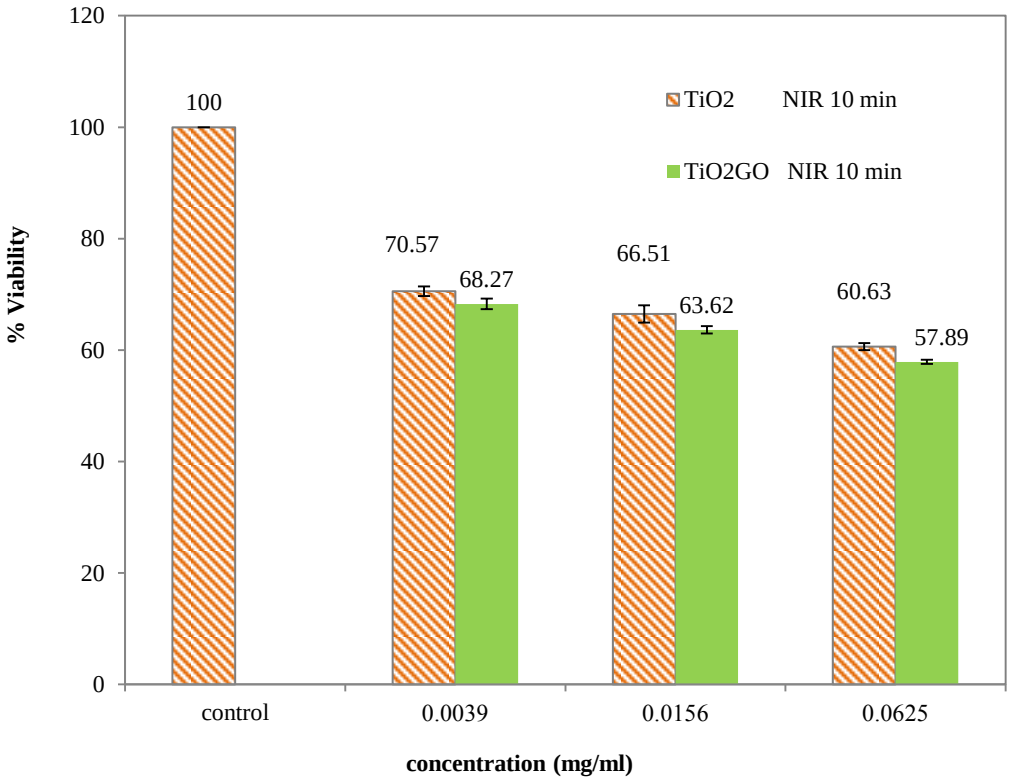
รูปที่ 5.9 schematic diagram การทดสอบสารนาโนร่วมกับการฉายแสง NIR



รูปที่ 5.10 ชุดการทดสอบสารนาโนร่วมกับการฉายแสง NIR



รูปที่ 5.11 ลักษณะการฉายแสง NIR ของแต่ละหลุม



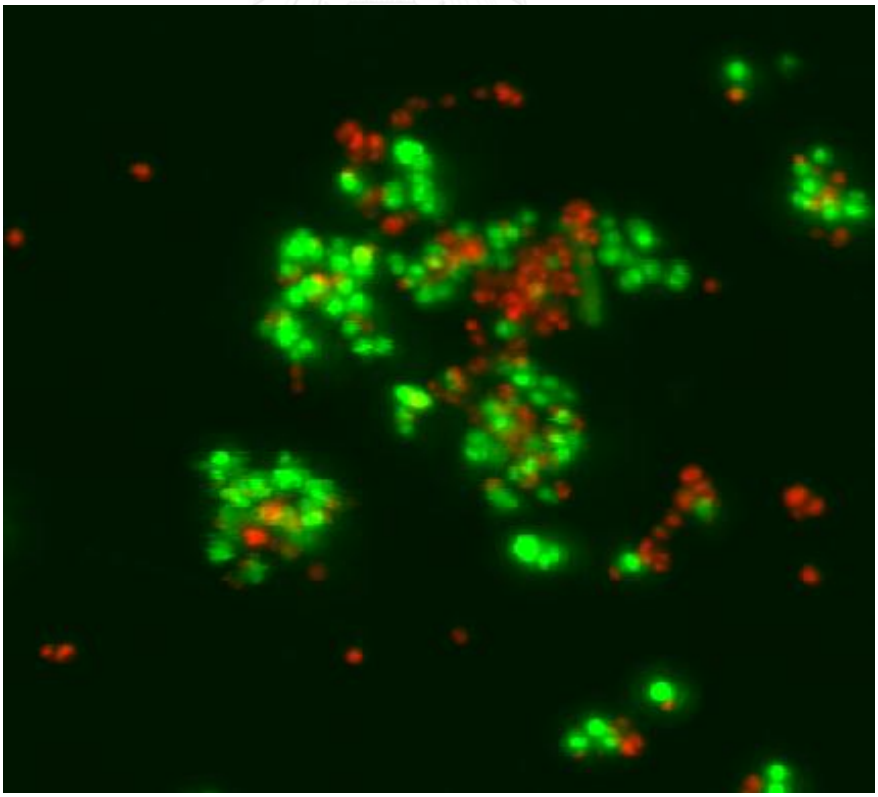
รูปที่ 5.12 ผลของการใช้สารวัสดุนาโนร่วมกับการฉายแสง NIR ต่ออัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

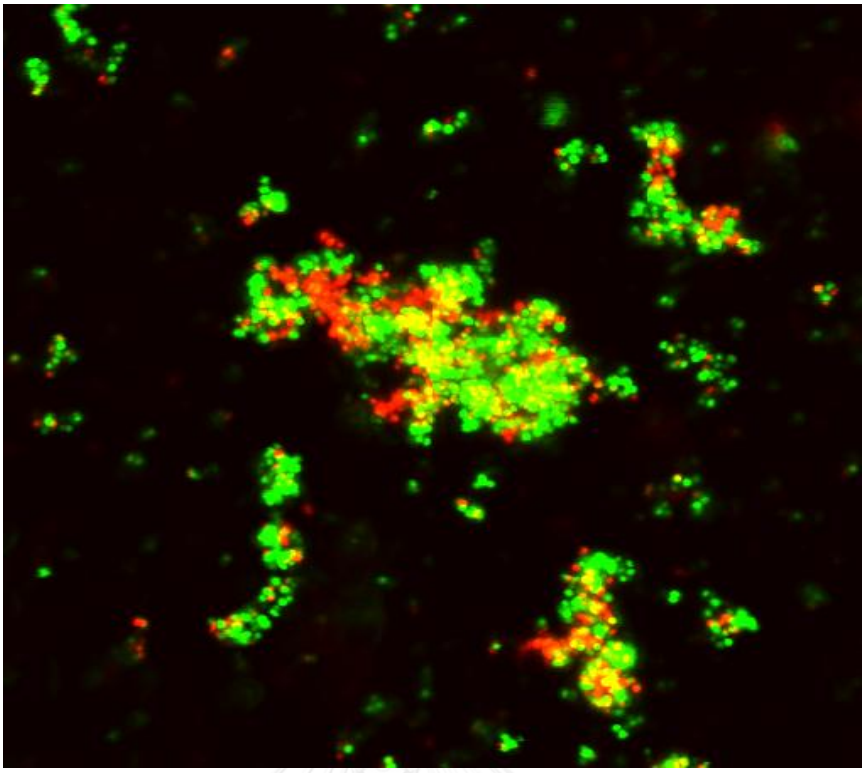
5.6 การตรวจดูลักษณะของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล

ในส่วนนี้จะทำการตรวจดูลักษณะของไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้น ซึ่งประกอบด้วยไบโอฟิล์มที่ใช้เป็นตัวควบคุมในการทดสอบ (control) ไบโอฟิล์มที่ทำการฉายแสง NIR เป็นเวลา 10 นาที และไบโอฟิล์มที่ถูกยับยั้งด้วยสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับการฉายแสง NIR 10 นาที โดยจะนำตัวอย่างในการทดสอบดังกล่าวเหล่านี้มาทำการ wash ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างแบคทีเรียที่อยู่ในรูป planktonic ออก และทำการย้อมแบคทีเรียด้วยชุดสารย้อม LIVE/DEAD ที่ประกอบด้วย สารย้อม SYTO9 และสารย้อม PI ซึ่งจะทำการเตรียมสารย้อมโดยการดูดสารย้อมทั้งสองชนิดในปริมาณอย่างละ 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด centrifuge ขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไป vortex เพื่อให้สารย้อมผสมเข้ากันอย่างทั่วถึง จากนั้นนำไปย้อมแบคทีเรียในปริมาณ 200 ไมโครลิตร

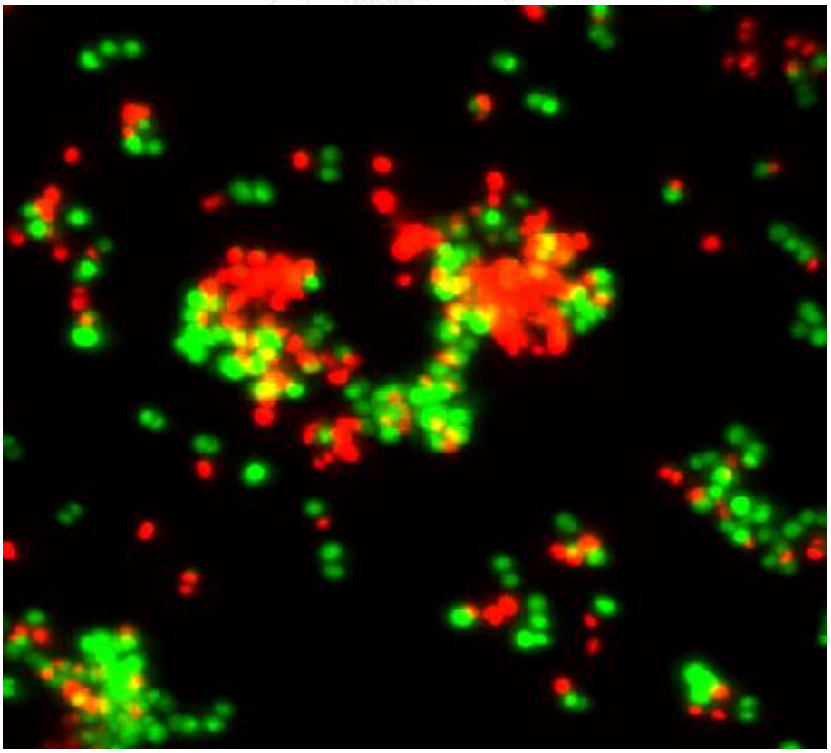
ต่อหลุม ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที โดยหลีกเลี่ยงจากแสง จากนั้นดูดสารย้อมส่วนเกินออกและปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slide) และเคลือบบริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บแบบใสเพื่อป้องกันการเลื่อนหลุดของแผ่นกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปตรวจดูภาพไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล จากภาพของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบทั้งสามกรณี พบว่าไบโอฟิล์มกรณีของตัวควบคุมในการทดสอบหรือ control ย้อมติดสีเขียวเป็นส่วนใหญ่และย้อมติดสีแดงเป็นส่วนน้อยซึ่งเกิดจากการครบวัฏจักรชีวิตของแบคทีเรียเอง แสดงดังรูปที่ 5.13 สำหรับกรณีของไบโอฟิล์มที่ทำการฉายแสง NIR เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งแสดงดังรูปที่ 5.14 พบว่าย้อมติดสีเขียวเป็นส่วนใหญ่เช่นเดียวกับกรณีของ control และในกรณีของไบโอฟิล์มที่ถูกยับยั้งด้วยสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับการฉายแสง NIR 10 นาที พบว่าย้อมติดสีแดงเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากแบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยความร้อนที่เกิดจากการดูดกลืนแสง NIR ของสารวัสดุนาโนดังกล่าวข้างต้น แสดงดังรูปที่ 5.15



รูปที่ 5.13 ไบโอฟิล์มกรณีตัวควบคุมหรือ control



รูปที่ 5.14 ไบโอฟิล์มที่ทำการฉายแสง NIR เป็นเวลา 10 นาที



รูปที่ 5.15 ไบโอฟิล์มที่ถูกยับยั้งด้วยสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับการฉายแสง NIR 10 นาที

5.7 สรุป

ในบทนี้ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของสารทั้งสองชนิด คือ อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ โดยมีการทดสอบในเรื่องของการเกาะติดของสารบนภาชนะ 96 wells plate ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยวิธี oxygen plasma และวิเคราะห์ผลการเกาะติดของสารจากค่า OD (Optical density) ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ซึ่งวัดค่าโดยเครื่อง microplate reader จากการทดสอบนั้นสารทั้งสองชนิดมีการกระจายตัว และเกาะติดบนผิวของภาชนะได้ดี การทดสอบต่อมาเป็นการทดสอบดูความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารนาโนที่โค๊ดบนแผ่นโลหะสังกะสี (Zn) และทำการฉายแสง NIR พร้อมกับวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมคัปเปิลทุกๆ 1 นาที จากการทดสอบ สารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์สามารถดูดกลืนแสงได้ดีกว่าสารไทเทเนียมไดออกไซด์ โดยมีอุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ต่อมาเป็นการทดสอบเพื่อดูอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี MTT โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสขึ้นไป แบคทีเรียมีการตายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นได้ทดสอบความเป็นพิษของสารนาโนต่อแบคทีเรีย (Toxicity) ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ คือ 0.0039, 0.0156, 0.0625 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งโค๊ดบนภาชนะ 96 wells plate ที่ผ่านทำ oxygen plasma จากนั้นเลี้ยงไบโอฟิล์มลงบนภาชนะดังกล่าวที่มีสารนาโนโค๊ดอยู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี MTT ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของสารนาโนเพิ่มมากขึ้น แบคทีเรียจะมีอัตราการมีชีวิตอยู่ลดลง โดยที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียมีอัตราการมีชีวิตที่ลดลงมากขึ้น ในการทดสอบถัดไปซึ่งเป็นการทดสอบเพื่อดูผลของการใช้สารนาโนร่วมกับการฉายแสง NIR ต่ออัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารนาโนที่ 0.0039, 0.0156 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งโค๊ดบนภาชนะ 96 wells plate ที่ผ่านทำ oxygen plasma จากนั้นเลี้ยงไบโอฟิล์มลงบนภาชนะดังกล่าวที่มีสารนาโนโค๊ดอยู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการฉายแสง NIR เป็นเวลา 10 นาทีต่อหลุม และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี MTT ผลที่ได้จากการทดสอบ แบคทีเรียมีอัตราการมีชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับการทดสอบที่ไม่มีการฉายแสง และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ สามารถทำให้อัตราการมีชีวิตของแบคทีเรียลดลงได้มากกว่าอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และเมื่อทำการตรวจดู

ภาพไบโอฟิล์มจากกล้องคอนโฟคอล โดยเลือกกรณีของชนิดและความเข้มข้นของสารนาโนที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุด คือ สารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการฉายแสง NIR 10 นาที เทียบกับภาพไบโอฟิล์มที่เป็นตัวควบคุม (Control) ภาพที่ได้เป็นไปตามผลการทดสอบด้วยวิธี MTT กล่าวคือ ภาพไบโอฟิล์มที่มีการใช้สารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการฉายแสง NIR 10 นาที มีสีแดงเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงมีการตายของแบคทีเรียเกิดขึ้น สำหรับกรณีของไบโอฟิล์มที่เป็นตัวควบคุม จะพบสีเขียวในรูปเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแบคทีเรียยังมีชีวิตอยู่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

ในบทนี้จะจะกล่าวสรุปผลการวิจัย โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการวิจัยเพื่อสังเคราะห์นาโนคอมโพสิตของไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ (TiO_2/GO) และทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2 particle) และนาโนคอมโพของไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรดในการควบคุมไบโอฟิล์ม รวมถึงทดสอบคุณสมบัติของสารวัสดุนาโนในด้านของความสามารถในการดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรด ในการวิจัยได้มีการเตรียมสารอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ด้วยการโซนิเคตเพื่อแยกอนุภาคสารที่ติดกันให้มีกระจายตัวที่ดีขึ้น จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 2.5 ไมครอน เพื่อให้อนุภาคสารไทเทเนียมไดออกไซด์มีขนาดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน แล้วนำไป freeze dry จากการเตรียมสารอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์จะมีขนาดของอนุภาคสารเฉลี่ยไม่เกิน 1 ไมครอน ซึ่งทำการตรวจสอบคุณลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด หรือ กล้อง SEM สำหรับการเตรียมสารนาโนคอมโพสิตของไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ เป็นการนำสารสองชนิด กล่าวคือ ไทเทเนียมไดออกไซด์และกราฟีนออกไซด์ มาทำการติดกัน ด้วยวิธีไฮโดรเทอร์มอล โดยนำอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ทำการเตรียมในข้างต้นมาผสมกับกราฟีนออกกไซด์ ซึ่งสังเคราะห์ได้จากวิธีของ Hummer ในอัตราส่วน 1 : 0.2 แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการ freeze dry และตรวจดูคุณลักษณะด้วยกล้อง SEM ซึ่งพบว่าสารนาโนคอมโพสิตของไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ที่ได้มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยไม่เกิน 1 ไมครอน

ต่อมาเป็นการนำสารนาโนสองชนิดดังกล่าวไปใช้ในการทดสอบต่างๆ ซึ่งได้นำสารนาโนไปทดสอบการเกาะติดของสารบนภาชนะ 96 wells plate ด้วยการโค๊ดสารนาโนลงบนภาชนะ และให้ความร้อนด้วยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่า OD (Optical density) ที่ความยาวคลื่น 492 และ 570 นาโนเมตร จากนั้นนำมาเติมน้ำ DI เป็นเวลา 1 คืน แล้วดูดน้ำออก ทำให้แห้ง และนำไปวัดค่า OD อีกครั้งที่ความยาวคลื่นเดียวกัน ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารนาโนที่โค๊ดบนภาชนะ 96 wells plate มีการเกาะติดที่ไม่เป็น homogeneous กล่าวคือเมื่อให้ความร้อนจนสารแห้ง สารมักจะอยู่กันอย่างหนาแน่นบริเวณขอบภาชนะ ทำให้บริเวณตรงกลางของภาชนะมีสารอยู่ในปริมาณ

น้อย ด้วยเหตุนี้จึงทำการปรับปรุง โดยการนำภาชนะ 96 wells plate ไปทำความสะอาดด้วยกระบวนการ oxygen plasma เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำมาทดสอบ พบว่าสารนาโนมีการกระจายตัวที่ดี และยึดเกาะบนภาชนะได้ดีขึ้น ต่อมาได้ทำการทดสอบการวัดอุณหภูมิของสาร โดยนำสารอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ ทำการโค๊ดบนแผ่นโลหะสังกะสี (Zn) ขนาด 2x2 เซนติเมตร แล้วทำการฉายแสงเนียร์อินฟราเรด ที่กำลัง 2 วัตต์ และวัดอุณหภูมิทุกๆ 1 นาที ด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิเทอร์โมคัปเปิล จากการทดสอบพบว่าสารนาโนคอมโพสิตของไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์มีความสามารถในการดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรดได้ดี มีอุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าสารอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิสูงเพียง 43 องศาเซลเซียส ถัดมาเป็นการดูอัตราการตายของแบคทีเรีย*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบ คือ 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส และให้ความร้อนเป็นเวลา 15 นาที จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียมีการตายอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสขึ้นไป ในส่วนของการทดสอบผลของการใช้สารนาโนร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรดในการควบคุมไบโอฟิล์ม จะทำการทดสอบในเรื่องของความเป็นพิษของสารต่ออัตราการมีชีวิตของแบคทีเรียหรือ Toxicity โดยความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ คือ 0.0039, 0.0156, 0.0625 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบจะทำการเตรียมสารนาโนสองชนิด คือ อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ ตามความเข้มข้นที่ระบุข้างต้น จากนั้นโค๊ดสารนาโนทั้งสองชนิดลงบน 96 wells plate ที่ทำความสะอาดด้วยวิธี oxygen plasma แล้ว ด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเลี้ยงไบโอฟิล์มลงบนภาชนะ 96 wells plate ที่มีสารนาโนโค๊ดอยู่ ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี MTT จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียมีอัตราการมีชีวิตลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียมีอัตราการมีชีวิตที่ลดลงมากขึ้น จึงเลือกความเข้มข้นของสารนาโนทั้งสองชนิดที่ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบถัดไป ต่อมาเป็นการทดสอบผลในการใช้สารนาโนร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรด โดยการทดสอบในส่วนนี้จะใช้ความเข้มข้นที่ได้จากการทดสอบ Toxicity ในข้างต้น คือ 0.0039, 0.0156 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการโค๊ดสารนาโนทั้งสองชนิดลงในภาชนะ 96 wells plate ที่ทำความสะอาดด้วยวิธี oxygen plasma ด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเลี้ยงไบโอฟิล์มลงในภาชนะที่โค๊ดด้วยสารนาโน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาฉายแสงเนียร์อินฟราเรดเป็นเวลา 10

นาที และนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี MTT จากการทดสอบพบว่า เมื่อใช้สารโนร่วมกับการฉายแสง ทำให้อัตราการมีชีวิตของแบคทีเรียลดลงเมื่อเทียบกับไม่มีการฉายแสงที่ความเข้มข้นเดียวกัน เนื่องจากเมื่อสารนาโนทั้งสองชนิดได้รับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรดจะเปลี่ยนเป็นความร้อน ซึ่งความร้อนจะทำให้แบคทีเรียตายเพิ่มขึ้น จึงทำให้แบคทีเรียมีอัตราการมีชีวิลดลง โดยอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรียจากการควบคุมด้วยสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการฉายแสง เท่ากับ 57.89 ซึ่งน้อยกว่าในกรณีของสารอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรดที่ความเข้มข้นเดียวกัน ผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการทดสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารนาโนทั้งสองชนิด สำหรับการตรวจดูลักษณะของไบโอฟิล์มจากกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจดูภาพ คือ ไบโอฟิล์มที่ใช้เป็นตัวควบคุม ไบโอฟิล์มที่มีการฉายแสงเนียร์อินฟราเรด และไบโอฟิล์มที่มีการยับยั้งด้วยสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรด สารย้อมที่ใช้ คือ ชุดสารย้อม LIVE/DEAD ประกอบด้วยสารย้อม SYTO9 ซึ่งจะย้อมติดสีเขียวเมื่อแบคทีเรียยังมีชีวิตอยู่ และสารย้อม PI จะย้อมติดสีแดงสำหรับแบคทีเรียที่ตายแล้ว จากภาพไบโอฟิล์มที่ได้ พบว่าเป็นไปตามที่ได้จากการวิเคราะห์อัตราการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียด้วยวิธี MTT โดยกรณีของไบโอฟิล์มที่ใช้เป็นตัวควบคุมและไบโอฟิล์มที่มีการฉายแสงเนียร์อินฟราเรดย้อมติดสีเขียวเป็นส่วนใหญ่เกือบทั้งหมด และไบโอฟิล์มที่มีการยับยั้งด้วยสารนาโนคอมโพสิตไทเทเนียมไดออกไซด์-กราฟีนออกไซด์ร่วมกับการฉายแสงเนียร์อินฟราเรดย้อมติดสีแดงเป็นส่วนใหญ่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

[1] K. Kalishwaralal, S. BarathManiKanth, S. R. Pandian, V. Deepak, and S. Gurunathan, "Silver nanoparticles impede the biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis," *Colloids Surf B Biointerfaces,* vol. 79, no. 2, pp. 340-4, Sep 1, 2010.

[2] K. Markowska, A. M. Grudniak, and K. I. Wolska, "Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms," *Acta Biochim Pol,* vol. 60, no. 4, pp. 523-30, 2013.

[3] S. Srey, Jahid, I. K., & Ha, S. D. , "Biofilm formation in food industries: a food safety concern," *Food Control,* vol. 31, no. 2, pp. 572-585, 2013.

[4] A. Filloux, & Vallet, I. , "Biofilm: set-up and organization of a bacterial community," *Medecine sciences: M/S,* vol. 19, no. 1, pp. 77-83, 2003.

[5] G. O'Toole, Kaplan, H. B., & Kolter, R, "Biofilm formation as microbial development," *Annual Reviews in Microbiology,* vol. 54, no. 1, pp. 49-79, 2000.

[6] R. M. Donlan, "Biofilms: microbial life on surfaces," *Emerg Infect Dis,* vol. 8, no. 9, 2002.

[7] P. Stoodley, K. Sauer, D. Davies, and J. W. Costerton, "Biofilms as complex differentiated communities," *Annual Reviews in Microbiology,* vol. 56, no. 1, pp. 187-209, 2002.

[8] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, and C.-Y. Hwang, "Antimicrobial effects of silver nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,* vol. 3, no. 1, pp. 95-101, 2007.

[9] A. Besinis, T. De Peralta, and R. D. Handy, "Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine," *Nanotoxicology,* vol. 8, no. 7, pp. 745-54, Nov, 2014.

[10] C. Chawengkijwanich, and Y. Hayata, "Development of TiO2 powder-coated food packaging film and its ability to inactivate Escherichia coli in vitro and in

CHULALONGKORN UNIVERSITY

actual tests," *International Journal of Food Microbiology,* vol. 123, no. 3, pp. 288-292, 2008.

[11] L. Visai, L. De Nardo, C. Punta, L. Melone, A. Cigada, M. Imbriani, and C. R. Arciola, "Titanium oxide antibacterial surfaces in biomedical devices," *Int J Artif Organs,* vol. 34, no. 9, pp. 929-46, Sep, 2011.

[12] H. A. Foster, I. B. Ditta, S. Varghese, and A. Steele, "Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity," *Appl Microbiol Biotechnol,* vol. 90, no. 6, pp. 1847-68, Jun, 2011.

[13] N. G. Chorianopoulos, D. S. Tsoukleris, E. Z. Panagou, P. Falaras, and G. J. Nychas, "Use of titanium dioxide (TiO2) photocatalysts as alternative means for Listeria monocytogenes biofilm disinfection in food processing," *Food Microbiol,* vol. 28, no. 1, pp. 164-70, Feb, 2011.

[14] S. Chusri, K. Sompetch, S. Mukdee, S. Jansrisewangwong, T. Srichai, K. Maneenoon, S. Limsuwan, and S. Voravuthikunchai, "Inhibition of Staphylococcus epidermidis biofilm formation by traditional Thai herbal recipes used for wound treatment," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* vol. 2012, 2012.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

ตาราง ก. ตารางแสดงค่า OD (Optical Density) ของสารนาโนก่อน wash และหลัง wash

	1st	2nd	3rd	avg	sd
OD blank	0.035	0.034	0.037	0.0353	0.00153
OD 0.25 mg/ml no wash	0.638	0.652	0.654	0.648	0.00872
OD 0.25 mg/ml wash	0.614	0.613	0.626	0.618	0.00723
OD 0.5 mg/ml no wash	0.784	0.757	0.782	0.774	0.01504
OD 0.5 mg/ml wash	0.747	0.731	0.757	0.745	0.01311
OD 0.75 mg/ml no wash	0.932	0.934	0.927	0.931	0.00361
OD 0.75 mg/ml wash	0.865	0.867	0.863	0.865	0.00200
OD 1 mg/ml no wash	1.528	1.542	1.533	1.534	0.00709
OD 1 mg/ml wash	1.433	1.437	1.431	1.434	0.00306

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หมายเหตุ OD หมายถึง ค่า Optical density

ตาราง ข. ตารางแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของสารนาโนและเวลา

Time (min)	Temperature (°C)		
	control	TiO_2	TiO_2/GO
0	31.7	31.2	30.6
1	32.4	33.6	39.7
2	32.9	34.7	43.6
3	33.4	37.3	54.5
4	33.8	40.1	55.8
5	34.5	42.3	56.3
6	34.9	43.4	56.8
7	35.1	43.5	57.2
8	35.6	43.6	57.9
9	36.2	43.8	58.6
10	36.8	43.8	59.2
11	37.4	43.7	59.7
12	37.7	43.5	59.9
13	37.8	43.4	60.4
14	37.5	43.4	61.7
15	38.2	42.7	62.3
16	38.2	42.6	62.8
17	38.5	42.4	61.4
18	38.6	42.2	61.3
19	38.9	41.8	61.6
20	39.2	41.6	61.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง ข. ตารางแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของสารนาโนและเวลา (ต่อ)

Time (min)	Temperature (°C)		
	control	TiO_2	TiO_2/GO
21	39.4	41.5	60.9
22	38.8	41.3	60.2
23	38.7	41.3	60.4
24	38.7	41.1	60.3
25	38.5	41.1	60.4
26	38.3	41.1	60.4
27	37.7	41.1	60.3
28	37.6	41.1	60.3
29	37.7	41	60.4
30	37.5	41	60.3
31	37.4	41.1	60.3
32	37.5	41.1	60.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง ค. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – ผลของอุณหภูมิ

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 control	1.361	1.384	1.412	OD690 control	0.006	0.006	0.006
	1.648	1.906	1.721		0.005	0.006	0.006
	1.727	1.567	1.596		0.006	0.006	0.005
OD570 50°C	1.294	1.234	1.236	OD690 50°C	0.006	0.006	0.006
	1.397	1.362	1.386		0.006	0.006	0.006
	1.295	1.271	1.283		0.006	0.005	0.005
OD570 60°C	0.712	0.957	0.966	OD690 60°C	0.006	0.004	0.006
	0.872	0.964	0.871		0.006	0.006	0.006
	0.965	0.853	0.846		0.005	0.006	0.006
OD570 70°C	0.443	0.419	0.435	OD690 70°C	0.005	0.006	0.006
	0.327	0.423	0.431		0.006	0.006	0.004
	0.368	0.496	0.576		0.004	0.006	0.006
OD570 80°C	0.036	0.039	0.034	OD690 80°C	0.006	0.005	0.006
	0.041	0.037	0.033		0.006	0.006	0.006
	0.032	0.035	0.029		0.007	0.006	0.007
OD570 90°C	0.033	0.027	0.029	OD690 90°C	0.006	0.006	0.006
	0.034	0.031	0.036		0.006	0.005	0.005
	0.03	0.028	0.024		0.006	0.006	0.005

หมายเหตุ OD 570 หมายถึง ค่า Optical density วัดที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

OD 690 หมายถึง ค่า Optical density วัดที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร

ตาราง ค. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – ผลของอุณหภูมิ (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
blank570	0.015	0.015	0.015	**blank690**	0.002	0.001	0.001
	0.015	0.014	0.015		0.001	0.001	0.001
	0.017	0.015	0.015		0.003	0.001	0.001
blank570	0.014	0.015	0.014	**blank690**	0.003	0.001	0.001
	0.014	0.015	0.014		0.003	0.003	0.001
	0.015	0.015	0.015		0.001	0.001	0.003
blank570	0.015	0.015	0.015	**blank690**	0.001	0.002	0.001
	0.015	0.016	0.015		0.002	0.001	0.002
	0.016	0.015	0.015		0.001	0.003	0.001
blank570	0.015	0.014	0.014	**blank690**	0.002	0.002	0.001
	0.016	0.015	0.015		0.001	0.001	0.002
	0.016	0.016	0.015		0.001	0.001	0.001
blank570	0.017	0.016	0.016	**blank690**	0.002	0.001	0.001
	0.015	0.015	0.015		0.001	0.001	0.001
	0.015	0.015	0.015		0.002	0.002	0.001
blank570	0.016	0.016	0.017	**blank690**	0.001	0.003	0.003
	0.015	0.015	0.016		0.002	0.001	0.001
	0.016	0.015	0.015		0.001	0.002	0.002

ตาราง ค. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – ผลของอุณหภูมิ (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 - 690	1.355	1.378	1.406	**blank570-690**	0.013	0.014	0.014
	1.643	1.9	1.715		0.014	0.013	0.014
	1.721	1.561	1.591		0.014	0.014	0.014
OD570 - 690	1.288	1.228	1.23	**blank570-690**	0.011	0.014	0.013
	1.391	1.356	1.38		0.011	0.012	0.013
	1.289	1.266	1.278		0.014	0.014	0.012
OD570 - 690	0.706	0.953	0.96	**blank570-690**	0.014	0.013	0.014
	0.866	0.958	0.865		0.013	0.015	0.013
	0.96	0.847	0.84		0.015	0.012	0.014
OD570 - 690	0.438	0.413	0.429	**blank570-690**	0.013	0.012	0.013
	0.321	0.417	0.427		0.015	0.014	0.013
	0.364	0.49	0.57		0.015	0.015	0.014
OD570 - 690	0.03	0.034	0.028	**blank570-690**	0.015	0.015	0.015
	0.035	0.031	0.027		0.014	0.014	0.014
	0.025	0.029	0.022		0.013	0.013	0.014
OD570 - 690	0.027	0.021	0.023	**blank570-690**	0.015	0.013	0.014
	0.028	0.026	0.031		0.013	0.014	0.015
	0.024	0.022	0.019		0.015	0.013	0.013

หมายเหตุ OD 570 - 690 หมายถึง การลบกันของค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 570 และ 690 นาโนเมตร

ตาราง ค. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – ผลของอุณหภูมิ (ต่อ)

	1st	2nd	3rd	%Viability
% Viability	100	100	100	100
	100	100	100	100
	100	100	100	100
			avg	100
% Viability	95.156	89.003	87.423	90.529
	84.715	71.224	80.364	78.768
	74.692	80.930	80.279	78.634
			avg	**82.644**
% Viability	51.565	68.915	67.960	62.813
	52.363	49.974	50.089	50.808
	55.360	53.975	52.378	53.905
			avg	**55.842**
% Viability	31.669	29.399	29.885	30.318
	18.784	21.357	24.339	21.493
	20.445	30.705	35.257	28.802
			avg	**26.871**
% Viability	1.118	1.393	0.934	1.148
	1.289	0.901	0.764	0.985
	0.703	1.034	0.507	0.748
			avg	**0.960**
% Viability	0.894	0.587	0.647	0.709
	0.921	0.636	0.941	0.832
	0.527	0.582	0.380	0.496
			avg	**0.679**

ตาราง ง. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – Toxicity

TiO_2	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 control	1.373	1.352	1.365	OD690	0.008	0.01	0.01
	1.368	1.377	1.371		0.009	0.006	0.006
	1.356	1.364	1.386		0.008	0.009	0.009
OD570 0.0039 mg/ml	1.266	1.241	1.274	OD690	0.011	0.014	0.013
	1.281	1.273	1.278		0.014	0.013	0.013
	1.265	1.269	1.257		0.014	0.014	0.012
OD570 0.0156 mg/ml	1.252	1.243	1.246	OD690	0.013	0.015	0.017
	1.244	1.24	1.241		0.014	0.015	0.015
	1.247	1.236	1.239		0.016	0.017	0.015
OD570 0.0625 mg/ml	1.228	1.219	1.224	OD690	0.017	0.016	0.016
	1.231	1.213	1.226		0.016	0.016	0.015
	1.207	1.194	1.214		0.016	0.017	0.016
OD570 0.25 mg/ml	1.153	1.145	1.166	OD690	0.015	0.017	0.017
	1.164	1.146	1.157		0.017	0.016	0.016
	1.147	1.158	1.162		0.017	0.018	0.017

ตาราง ง. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – Toxicity (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
blank570	0.015	0.018	0.017	**blank690**	0.002	0.002	0.004
	0.017	0.017	0.018		0.003	0.004	0.004
	0.017	0.016	0.018		0.003	0.002	0.003
blank570	0.012	0.015	0.013	**blank690**	0.006	0.007	0.007
	0.013	0.012	0.013		0.005	0.007	0.007
	0.013	0.012	0.013		0.005	0.006	0.006
blank570	0.015	0.019	0.018	**blank690**	0.007	0.008	0.007
	0.018	0.016	0.016		0.007	0.008	0.008
	0.019	0.018	0.018		0.008	0.007	0.005
blank570	0.021	0.022	0.019	**blank690**	0.008	0.006	0.006
	0.019	0.023	0.023		0.007	0.006	0.006
	0.021	0.022	0.019		0.006	0.008	0.008
blank570	0.031	0.033	0.028	**blank690**	0.005	0.007	0.007
	0.026	0.024	0.03		0.008	0.007	0.008
	0.03	0.028	0.026		0.007	0.008	0.005

ตาราง ง. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – Toxicity (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 - 690	1.365	1.342	1.355	**blank570 - 690**	0.013	0.016	0.013
	1.359	1.371	1.365		0.014	0.013	0.014
	1.348	1.355	1.377		0.014	0.014	0.015
OD570 - 690	1.255	1.227	1.261	**blank570 - 690**	0.006	0.008	0.006
	1.267	1.26	1.265		0.008	0.005	0.006
	1.251	1.255	1.245		0.008	0.006	0.007
OD570 - 690	1.239	1.228	1.229	**blank570 - 690**	0.008	0.011	0.011
	1.23	1.225	1.226		0.011	0.008	0.008
	1.231	1.219	1.224		0.011	0.011	0.013
OD570 - 690	1.211	1.203	1.208	**blank570 - 690**	0.013	0.016	0.013
	1.215	1.197	1.211		0.012	0.017	0.017
	1.191	1.177	1.198		0.015	0.014	0.011
OD570 - 690	1.138	1.128	1.149	**blank570 - 690**	0.026	0.026	0.021
	1.147	1.13	1.141		0.018	0.017	0.022
	1.13	1.14	1.145		0.023	0.02	0.021

ตาราง ง. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – Toxicity (ต่อ)

	1st	2nd	3rd	%Viability
% Viability	100	100	100	100
	100	100	100	100
	100	100	100	100
			avg	100
% Viability	92.382	91.931	93.517	92.610
	93.606	92.415	93.190	93.070
	93.178	93.139	90.896	92.405
			avg	92.695
% Viability	91.050	91.780	90.760	91.197
	90.632	89.617	90.155	90.135
	91.454	90.082	88.913	90.150
			avg	90.494
% Viability	88.609	89.517	89.046	89.058
	89.442	86.892	88.379	88.238
	88.156	86.726	87.151	87.344
			avg	88.213
% Viability	82.249	83.107	84.054	83.136
	83.941	81.959	82.828	82.909
	82.984	83.520	82.526	83.010
			avg	83.018

ตาราง ง. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – Toxicity (ต่อ)

TiO_2/GO	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 control	1.341	1.327	1.364	OD690	0.006	0.006	0.009
	1.368	1.382	1.351		0.005	0.006	0.007
	1.376	1.355	1.327		0.007	0.009	0.009
OD570 0.0039 mg/ml	1.245	1.253	1.255	OD690	0.013	0.015	0.011
	1.248	1.252	1.254		0.016	0.015	0.015
	1.251	1.246	1.243		0.016	0.015	0.017
OD570 0.0156 mg/ml	1.23	1.228	1.223	OD690	0.016	0.015	0.015
	1.231	1.219	1.217		0.015	0.014	0.017
	1.216	1.232	1.224		0.015	0.017	0.018
OD570 0.0625 mg/ml	1.176	1.183	1.193	OD690	0.016	0.018	0.015
	1.186	1.178	1.173		0.018	0.016	0.017
	1.197	1.184	1.192		0.015	0.017	0.017
OD570 0.25 mg/ml	1.137	1.122	1.114	OD690	0.016	0.019	0.018
	1.143	1.126	1.123		0.018	0.018	0.017
	1.125	1.134	1.138		0.017	0.016	0.019

ตาราง ง. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – Toxicity (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
blank570	0.016	0.015	0.013	**blank690**	0.004	0.005	0.005
	0.017	0.013	0.014		0.006	0.004	0.006
	0.015	0.015	0.018		0.004	0.004	0.006
blank570	0.016	0.018	0.018	**blank690**	0.008	0.008	0.007
	0.022	0.017	0.021		0.007	0.006	0.006
	0.018	0.023	0.024		0.008	0.007	0.01
blank570	0.025	0.022	0.019	**blank690**	0.005	0.008	0.007
	0.019	0.026	0.023		0.013	0.007	0.009
	0.021	0.025	0.019		0.008	0.013	0.011
blank570	0.024	0.021	0.018	**blank690**	0.011	0.007	0.008
	0.019	0.022	0.021		0.008	0.014	0.007
	0.023	0.018	0.02		0.014	0.009	0.008
blank570	0.036	0.033	0.042	**blank690**	0.009	0.008	0.0014
	0.032	0.038	0.027		0.007	0.01	0.008
	0.03	0.035	0.041		0.015	0.008	0.008

ตาราง ง. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – Toxicity (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 - 690	1.335	1.321	1.355	**blank570 - 690**	0.012	0.01	0.008
	1.363	1.376	1.344		0.011	0.009	0.008
	1.369	1.346	1.318		0.011	0.011	0.012
OD570 - 690	1.232	1.238	1.244	**blank570 - 690**	0.008	0.01	0.011
	1.232	1.237	1.239		0.015	0.011	0.015
	1.235	1.231	1.226		0.01	0.016	0.014
OD570 - 690	1.214	1.213	1.208	**blank570 - 690**	0.02	0.014	0.012
	1.216	1.205	1.2		0.006	0.019	0.014
	1.201	1.215	1.206		0.013	0.012	0.008
OD570 - 690	1.16	1.165	1.178	**blank570 - 690**	0.013	0.014	0.01
	1.168	1.162	1.156		0.011	0.008	0.014
	1.182	1.167	1.175		0.009	0.009	0.012
OD570 - 690	1.121	1.103	1.096	**blank570 - 690**	0.027	0.025	0.0406
	1.125	1.108	1.106		0.025	0.028	0.019
	1.108	1.118	1.119		0.015	0.027	0.033

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง ง. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – Toxicity (ต่อ)

	1st	2nd	3rd	%Viability
% Viability	100	100	100	100
	100	100	100	100
	100	100	100	100
			avg	**100**
% Viability	92.517	93.669	91.537	92.574
	90.015	89.685	91.617	90.439
	90.206	91.011	92.802	91.340
			avg	**91.451**
% Viability	90.249	91.457	88.790	90.165
	89.497	86.759	88.772	88.343
	87.482	90.112	91.730	89.775
			avg	**89.428**
% Viability	86.697	87.796	86.711	87.068
	85.577	84.418	85.479	85.158
	86.377	86.742	89.051	87.390
			avg	**86.539**
% Viability	82.691	82.227	78.352	81.090
	81.361	79.005	81.362	80.576
	80.486	81.723	83.155	81.788
			avg	**81.151**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง จ. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – NIR Laser

TiO_2	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 control	1.391	1.378	1.382	OD690	0.01	0.009	0.012
OD570 control + NIR 10 min	1.379	1.371	1.369	OD690	0.007	0.011	0.008
OD570 0.0625 + NIR 10 min	0.863	0.856	0.847	OD690	0.016	0.015	0.018
OD570 0.0156 + NIR 10 min	0.917	0.953	0.928	OD690	0.019	0.017	0.018
OD570 0.0039 + NIR 10 min	0.982	0.976	0.993	OD690	0.016	0.014	0.014

ตาราง จ. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – NIR Laser (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
blank570	0.017	0.017	0.016	blank690	0.004	0.007	0.006
blank570	0.015	0.016	0.016	blank690	0.006	0.005	0.007
blank570	0.018	0.023	0.021	blank690	0.007	0.009	0.007
blank570	0.016	0.017	0.017	blank690	0.008	0.007	0.009
blank570	0.015	0.017	0.014	blank690	0.008	0.007	0.008

ตาราง จ. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – NIR Laser (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 - 690	1.381	1.369	1.37	**blank570 - 690**	0.013	0.01	0.01
OD570 - 690	1.372	1.36	1.361	**blank570 - 690**	0.009	0.011	0.009
OD570 - 690	0.847	0.841	0.829	**blank570 - 690**	0.011	0.014	0.014
OD570 - 690	0.898	0.936	0.91	**blank570 - 690**	0.008	0.01	0.008
OD570 - 690	0.966	0.962	0.979	**blank570 - 690**	0.007	0.01	0.006

ตาราง จ. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – NIR Laser (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		% Viability
% Viability	100	100	100	**avg**	100
% Viability	99.63	99.26	99.41	**avg**	99.44
% Viability	61.11	60.85	59.93	**avg**	60.63
% Viability	65.06	68.14	66.32	**avg**	66.51
% Viability	70.10	70.05	71.54	**avg**	70.57

ตาราง จ. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – NIR Laser (ต่อ)

TiO_2/GO	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 control	1.391	1.378	1.382	OD690	0.01	0.009	0.012
OD570 control + NIR 10 min	1.379	1.371	1.369	OD690	0.007	0.011	0.008
OD570 0.0625 + NIR 10 min	0.817	0.813	0.806	OD690	0.014	0.011	0.016
OD570 0.0156 + NIR 10 min	0.884	0.891	0.897	OD690	0.015	0.014	0.017
OD570 0.0039 + NIR 10 min	0.943	0.956	0.962	OD690	0.013	0.016	0.014

ตาราง จ. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – NIR Laser (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
blank570	0.017	0.017	0.016	blank690	0.004	0.007	0.006
blank570	0.015	0.016	0.016	blank690	0.006	0.005	0.007
blank570	0.021	0.018	0.017	blank690	0.01	0.008	0.009
blank570	0.018	0.015	0.016	blank690	0.009	0.006	0.008
blank570	0.018	0.016	0.023	blank690	0.007	0.013	0.009

ตาราง จ. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – NIR Laser (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd
OD570 - 690	1.381	1.369	1.37	**blank570 - 690**	0.013	0.01	0.01
OD570 - 690	1.372	1.36	1.361	**blank570 - 690**	0.009	0.011	0.009
OD570 - 690	0.803	0.802	0.79	**blank570 - 690**	0.011	0.01	0.008
OD570 - 690	0.869	0.877	0.88	**blank570 - 690**	0.009	0.009	0.008
OD570 - 690	0.93	0.94	0.948	**blank570 - 690**	0.011	0.003	0.014

ตาราง จ. ตารางแสดงค่าการคำนวณอัตราการมีชีวิตของแบคทีเรีย – NIR Laser (ต่อ)

	1st	2nd	3rd		% Viability
% Viability	100	100	100	**avg**	100
% Viability	99.63	99.26	99.41	**avg**	99.44
% Viability	57.89	58.28	57.50	**avg**	57.89
% Viability	62.87	63.87	64.12	**avg**	63.62
% Viability	67.18	68.95	68.68	**avg**	68.27

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวลนิดา เพียรเจริญ เกิดเมื่อวันที่ 17 กรกฎาคม พ.ศ. 2534 จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับปริญญาตรี จากคณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท คณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University