

ผลของความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ  
เชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

กุมภาพันธ์ 2565

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

ผลของความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Pseudomonas putida*  
สายพันธุ์ KT2440



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

กุมภาพันธ์ 2565

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SILVER NANOPARTICLES ON BIOFILM  
FORMATION OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* KT2440



A Thesis Submitted to University of Phayao  
in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Master of Science Degree in Environmental Science  
February 2022  
Copyright 2022 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Pseudomonas putida*

สายพันธุ์ KT2440

ของ รุ่งนภา ตาคำ

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร. ภูมิศร์ ทับทิมแดง)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤตชญา อีสกุล)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร. สุมล นิลรัตน์นิศากร)

..... คณบดีคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ต่อพงศ์ กวีธาดา)

- เรื่อง:** ผลของความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440
- ผู้วิจัย:** รุ่งนภา ตาคำ, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2564
- อาจารย์ที่ปรึกษา:** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤตชญา อีสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.สุมล นิลรัตน์นิศากร
- คำสำคัญ:** อนุภาคซิลเวอร์นาโน, แบคทีเรีย, ไบโอฟิล์ม

### บทคัดย่อ

อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ จากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ AgNPs มากขึ้นจึงมีการปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม อาจส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในรูปไบโอฟิล์มได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้าง ปริมาณ และองค์ประกอบของไบโอฟิล์มของเชื้อ *Pseudomonas putida* KT2440 ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มใน 96-well plate และ 24-well plate ในสภาวะที่มีอนุภาคซิลเวอร์นาโน (ขนาดเฉลี่ย 5-20 นาโนเมตร) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100, 500 และ 1000 mg/L วัดปริมาณไบโอฟิล์มด้วยการย้อม crystal violet พบว่า ไบโอฟิล์มที่เจริญเติบโตที่มี AgNPs ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/L ที่เวลา 12 ชั่วโมง ใน 96-well plate และ 18 ชั่วโมงใน 24-well plate มีปริมาณไบโอฟิล์มมากกว่าชุดควบคุม (AgNPs ความเข้มข้น 0 mg/L) เมื่อนำไบโอฟิล์มที่ระยะเวลาไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) พบว่าไม่มีความแตกต่างขององค์ประกอบ EPS ของไบโอฟิล์ม แสดงให้เห็นว่า AgNPs ส่งผลต่อปริมาณการสร้างของไบโอฟิล์ม ทั้งนี้ ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของ EPS ที่สกัดได้จากไบโอฟิล์มรวมถึงภาพถ่ายไบโอฟิล์มจากกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลแบบใช้เลเซอร์ในการสแกน (CLSM) ยืนยันการเพิ่มขึ้นของปริมาณไบโอฟิล์มที่เกิดจากการรับสัมผัส AgNPs ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า AgNPs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในระดับความเข้มข้นที่ต่ำอาจสามารถเกิดผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มให้มีปริมาณมากขึ้นกว่าระดับปกติซึ่งจำเป็นต้องการศึกษาต่อไปว่า การเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลในเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ ในสิ่งแวดล้อมได้มากน้อยเพียงใด

**Title:** EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SILVER NANOPARTICLES ON BIOFILM FORMATION OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* KT2440

**Author:** Rungnapa Takam, Thesis: M.S. (Environmental Science), University of Phayao, 2021

**Advisor:** Assistant Professor Dr. Kritchaya Issakul Co–advisor Dr.Sumol Nilratnisakon

**Keywords:** Silver Nanoparticles, Bacteria, Biofilms

#### ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) have been commonly used due to their antimicrobial ability, which can inhibit the growth of bacteria. Their uses may lead to their contamination and adverse effects on environmental bacteria especially bacteria in biofilms. The objective of this study is to investigate the effects of different levels of AgNP concentrations on the biofilm formation, biomass quantity, and EPS composition of *Pseudomonas putida* KT2440, which is the representative of environmental bacteria used in this study. Biofilm formation was conducted in 96–well plates and 24–well plates under the presence of AgNPs (size distribution of 5–20 nm) at 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100, 500 and 1000 mg/L. The biomass quantity was determined by crystal violet staining. The results showed higher biomass in the biofilms forming under 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mg/L for 12–h and 18–h biofilms in the 96–well plates and 24–well plates, respectively, compared with the control (0 mg/L of AgNPs). EPS of biofilms was analyzed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT–IR), and the results showed no effect of AgNPs on biofilm chemical compositions. The effect of low AgNP concentrations on the biomass of biofilms was also proved by the observation under the confocal scanning laser microscope (CLSM). The data from this research point out that the low contamination level of AgNPs to the environment might result in the increased formation of biofilms, which requires further studies to determine its effects on the growth rate of other microorganisms in the environment.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของบุคคลหลายท่าน ซึ่งผู้มีพระคุณสามท่านแรกที่ผู้ศึกษาใคร่ขอขอบพระคุณคือผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤตชญา อิศกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ภูมิศร์ ทับทิมแดง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ดร. สุมล นิลรัตน์นิศากร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน เพื่อให้การเขียนรายงานฉบับนี้สมบูรณ์ที่สุด ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ นักวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ในการทำวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ทำวิจัย จนสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์

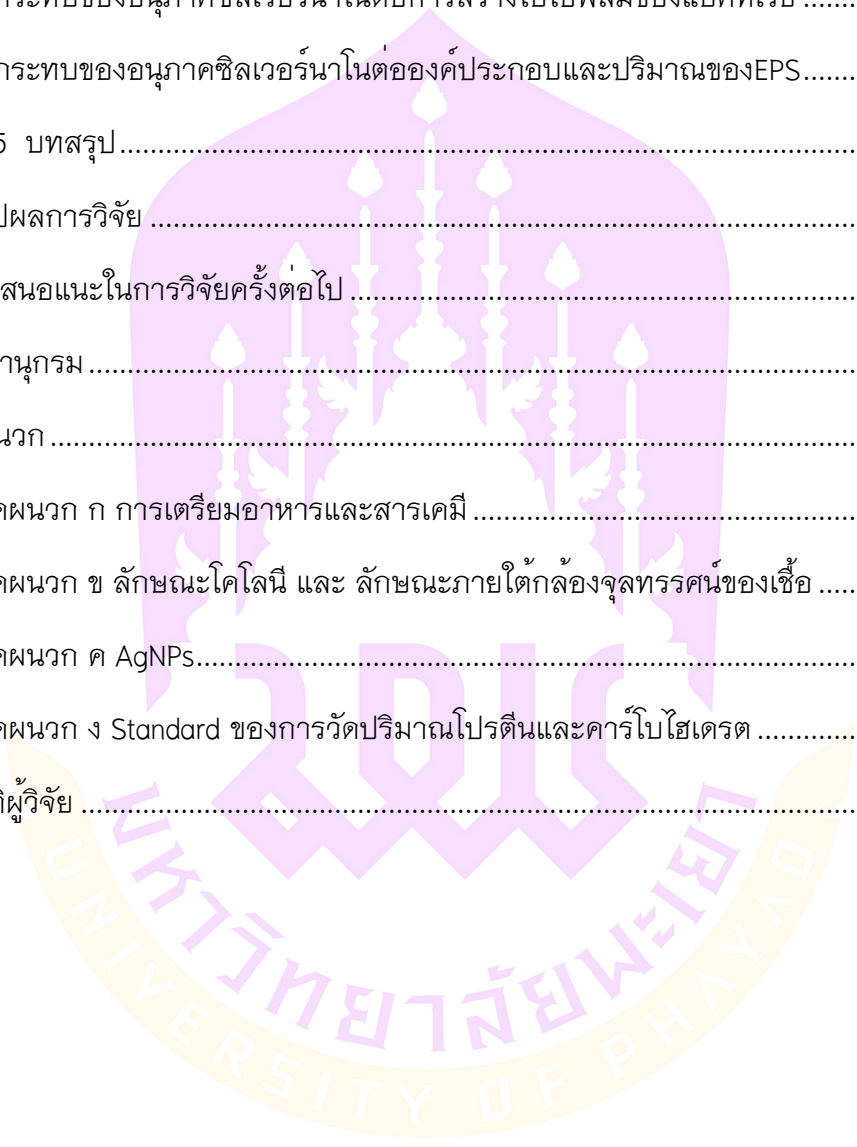
สุดท้ายนี้ ผู้จัดทำขอขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนเป็นผู้อยู่เบื้องหลังในความสำเร็จที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจตลอดมา

รุ่งนภา ตาคำ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย .....	3
ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
แบคทีเรีย <i>Pseudomonas putida</i> และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย .....	4
ไบโอฟิล์มและการสร้างไบโอฟิล์ม.....	6
Extracellular Polymeric Substance (EPS) .....	8
อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) .....	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
แบคทีเรียและอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในการทดลอง .....	15
วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี.....	15
การวางแผนการวิจัย .....	17

วิธีการทดลอง.....	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	22
ขนาดและศักย์ซีตาของ AgNPs.....	22
ผลกระทบของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย .....	23
ผลกระทบของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อองค์ประกอบและปริมาณของEPS.....	27
บทที่ 5 บทสรุป.....	34
สรุปผลการวิจัย .....	34
ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป .....	35
บรรณานุกรม .....	36
ภาคผนวก .....	43
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารและสารเคมี .....	44
ภาคผนวก ข ลักษณะโคโลนี และ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ .....	46
ภาคผนวก ค AgNPs.....	47
ภาคผนวก ง Standard ของการวัดปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต .....	48
ประวัติผู้วิจัย .....	50

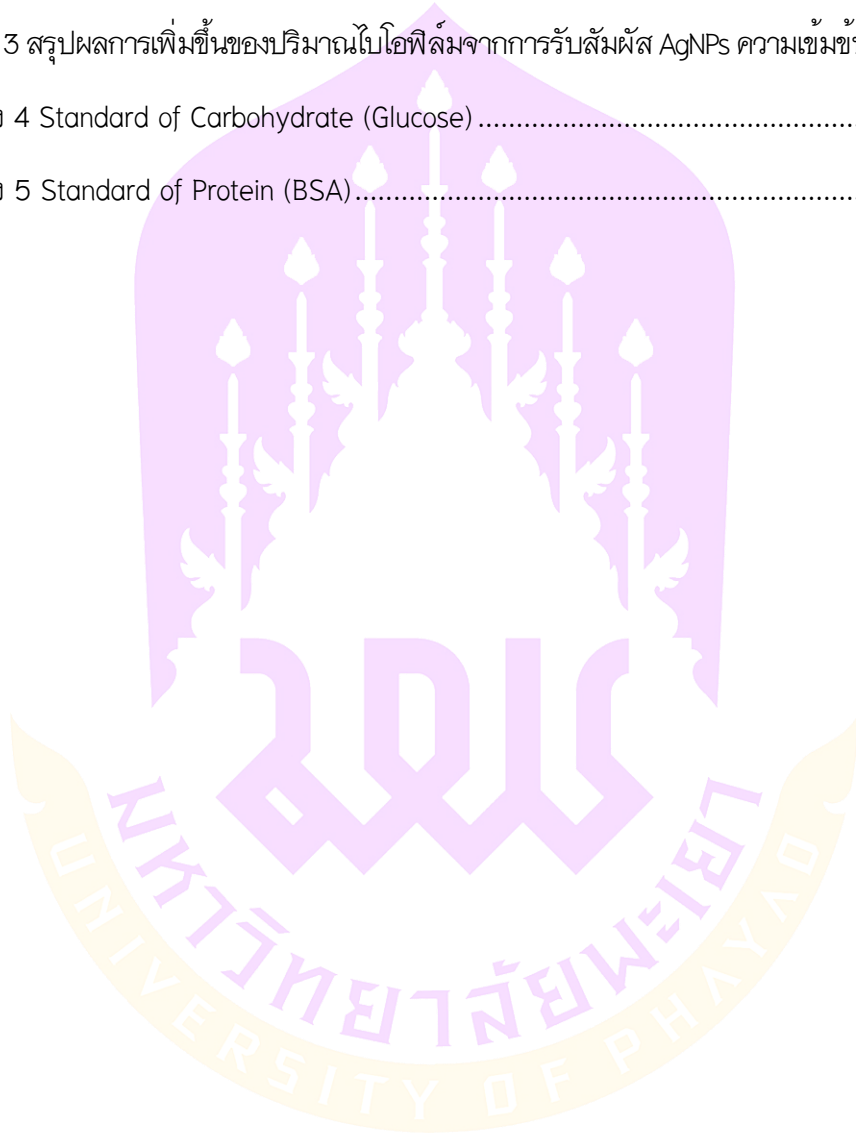


## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 เชื้อ <i>Pseudomonas putida</i> สายพันธุ์ KT2440 ที่ย้อมติดสีของ Safranin O .....	4
ภาพ 2 การเจริญเติบโต (Growth curve) ของแบคทีเรีย .....	6
ภาพ 3 ขั้นตอนการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย .....	8
ภาพ 4 แสดงแนวโน้มที่มากขึ้นในการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีอนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็น .....	11
ภาพ 5 แผนการดำเนินการวิจัย .....	18
ภาพ 6 อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในงานวิจัย : (a) การกระจายตัวของขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโน .....	23
ภาพ 7 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ .....	24
ภาพ 8 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ .....	26
ภาพ 9 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ .....	28
ภาพ 10 อินฟราเรดสเปกตรัมของ EPS ของ <i>P. putida</i> KT2440 ที่มีอนุภาคซิลเวอร์นาโน .....	30
ภาพ 11 ภายใต้อุปกรณ์ Confocal Laser Scanning Microscope .....	32
ภาพ 12 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Pseudomonas putida</i> สายพันธุ์ KT2440 .....	46
ภาพ 13 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ <i>Pseudomonas putida</i> สายพันธุ์ .....	46
ภาพ 14 ลักษณะและขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโน .....	47
ภาพ 15 Standard of Carbohydrate (Glucose) .....	48
ภาพ 16 Standard of Protein (BSA) .....	49

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนจาก EPS ของไบโอฟิล์มที่เจริญเติบโตใน AgNPs.....	29
ตาราง 2 การวิเคราะห์ภาพไบโอฟิล์มภายใต้กล้อง CLSM โดยใช้โปรแกรม ImageJ .....	33
ตาราง 3 สรุปผลการเพิ่มขึ้นของปริมาณไบโอฟิล์มจากการรับสัมผัส AgNPs ความเข้มข้นต่ำ.....	35
ตาราง 4 Standard of Carbohydrate (Glucose) .....	48
ตาราง 5 Standard of Protein (BSA) .....	49



# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน อนุภาคซิลเวอร์นาโน (Silver nanoparticles; AgNPs) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งใช้อุปโภค บริโภค ใช้ในผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ ผลิตภัณฑ์สำหรับอุตสาหกรรม เป็นต้น (Gambino et al., 2015; Samarajeewa, 2017) เนื่องจาก AgNPs มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ (Garuglieri et al., 2017) จากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ AgNPs มากขึ้นจึงมีการปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมทั้งทางแหล่งน้ำและดิน (Benn et al., 2008) จากรายงานวิจัยพบความเป็นอันตรายของ AgNPs ในระดับไมโครกรัม ระดับเซลล์ จนถึงเซลล์ของยูคาริโอต (Gupta et al., 2015) ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้ อาทิทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย และ AgNPs ที่สะสมอยู่ในดินจะทำให้กิจกรรมและความหลากหลายของแบคทีเรียลดน้อยลง นอกจากนี้ยังทำให้ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการกำจัดสารมลพิษในน้ำเสียลดลงอีกด้วย (Morones et al., 2005; Nadell, 2009; Samarajeewa, 2017)

แบคทีเรียในดินนั้นมีความสำคัญต่อระบบนิเวศในดิน มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการละลายของธาตุอาหารในดิน เช่น ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน โพแทสเซียม ทำให้พืชได้รับสารอาหารมากขึ้น และช่วยหมุนเวียนธาตุอาหารเหล่านั้น (Zamboudis and Pieterse, 2012; Potthast et al., 2012) ผลกระทบของ AgNPs ต่อแบคทีเรียอาจทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลงได้ ในสิ่งแวดล้อมมีแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ที่สำคัญ แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่พบในสิ่งแวดล้อม เป็นตัวแทนสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการกำจัดมลพิษอินทรีย์ในดิน ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและสามารถกำจัดโรคพืช (Beda, 2016; Galli et al., 1992) อีกทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการเมแทบอลิซึมทำให้ใช้แหล่งอาหารจากธรรมชาติได้หลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นสารประกอบคาร์บอน ไนโตรเจน ซัลเฟต หรือฟอสฟอรัส (Ramos et al., 1994) และมีความสามารถอยู่ในดินที่แตกต่างกันได้ (Nusslein et al., 1992) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาเป็นตัวแทนสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการศึกษาผลกระทบของ AgNPs ต่อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม

แบคทีเรียในธรรมชาติมักอาศัยอยู่ในรูปของไบโอฟิล์ม (Biofilms) ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในสารที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular Polymeric Substance; EPS) มีลักษณะเป็นเมือกปกคลุมแบคทีเรียและยึดเกาะกับพื้นผิว แบคทีเรียสร้าง

ไบโอฟิล์มเพื่อเพิ่มการดูดซับสารอาหาร ป้องกันเซลล์จากสารพิษ (Flemming et al., 2007; Jamal, 2015) และป้องกันเซลล์จากสภาวะที่ไม่เหมาะสม (Donlan, 2002) จากการใช้ AgNPs และการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในปริมาณที่มากขึ้น อาจส่งผลให้แบคทีเรียที่ได้รับ AgNPs ปริมาณต่ำและสะสมเป็นเวลานาน อาจรบกวนกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม ส่งผลต่อกระบวนการบำบัดน้ำเสียด้วยไบโอฟิล์มหรือกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญของไบโอฟิล์มในธรรมชาติได้ (Yang and Alvarez, 2015)

การศึกษาผลกระทบของ AgNPs ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียยังมีจำนวนไม่มากและกลไกของผลกระทบยังไม่ชัดเจน ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาผลกระทบของ AgNPs ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อไบโอฟิล์ม เพื่อเปรียบเทียบผลกระทบกับงานวิจัยอื่น ๆ และเป็นแนวทางการประเมินผลกระทบของ AgNPs ต่อไปในอนาคต งานวิจัยนี้ทำการทดลองด้วยการวัดปริมาณไบโอฟิล์ม ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (Confocal laser scanning microscope; CLSM) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาอีกอย่างหนึ่ง ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ การวัดองค์ประกอบของ EPS โดยใช้เทคนิค FTIR ในการวิเคราะห์ รวมถึงตรวจสอบปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตใน EPS ที่ผลิตโดยไบโอฟิล์ม ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในไบโอฟิล์มของแบคทีเรียเมื่อได้รับสัมผัสกับ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสามารถนำผลการทดลองไปช่วยอธิบายผลกระทบของ AgNPs ต่อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมเมื่อ AgNPs ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มักจะมีความเข้มข้นต่ำ นำไปสู่การพัฒนาแนวทางในการแก้ไขปัญหาของ AgNPs ที่จะส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมต่อไปได้

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้าง ปริมาณ และองค์ประกอบของไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* KT2440

### สมมติฐานของการวิจัย

AgNPs ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1 mg/L ส่งผลให้ *P. putida* KT2440 สร้างไบโอฟิล์มได้มากขึ้นและมีโครงสร้างที่หนาแน่นกว่าสภาวะควบคุมที่ไม่มี AgNPs

### ขอบเขตของการวิจัย

#### 1. ขอบเขตด้านเนื้อหา

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลกระทบของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *P. putida* KT2440 อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในงานวิจัย เป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์จากบริษัท Prime Nano ประเทศไทย และแบคทีเรีย *P. putida* KT2440 ได้จากศูนย์เก็บเชื้อจุลินทรีย์ American Type Culture Collection (ATCC) รหัส ATCC 47054 ใช้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม ขอบเขตของสถานที่ทำการทดลอง

#### 2. ขอบเขตของเวลา

ในช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2562-พฤศจิกายน พ.ศ. 2564

#### 3. ขอบเขตของสถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

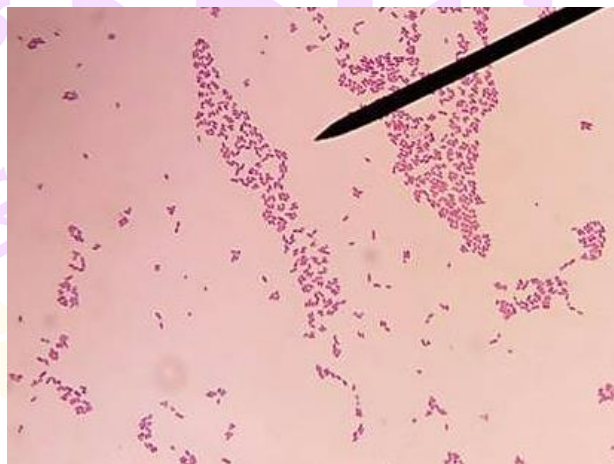
ทราบผลการเปลี่ยนแปลงการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียหลังจากสัมผัสกับ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่ำ เพื่อต่อยอดไปสู่การวิจัยศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงการสร้างไบโอฟิล์ม และผลกระทบต่อจุลินทรีย์อื่น ๆ ในสิ่งแวดล้อมต่อไป

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

*Pseudomonas putida* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบมากในดิน เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25–30°C แบคทีเรียชนิดนี้ถือว่าเป็นตัวแทนที่มีศักยภาพในการบำบัดทางชีวภาพ ถูกนำมาใช้ในการกำจัดมลพิษอินทรีย์ในดิน ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและสามารถใช้กำจัดโรคพืช (Belda, 2016) *P. putida* KT2440 เป็นหนึ่งในแบคทีเรีย *P. putida* ที่พบในสิ่งแวดล้อมทั้งน้ำและดินมาก ดังภาพ 1 (Gall et al., 1992) ลักษณะเป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ย้อมติดสีแดงของ Safranin O จากการศึกษาค้นพบว่าแบคทีเรีย *P. putida* สามารถผลิตสารเคมีที่เรียกว่าไซเดอโรฟอรัส (siderophore) ที่มีความสามารถตรึงธาตุเหล็กในดินไปใช้จนทำให้เชื้อก่อโรคพืชขาดธาตุเหล็ก ส่งผลให้เชื้อโรคลดลงและไม่สามารถก่อให้เกิดโรคได้และยังช่วยย่อยพอสฟอรัสในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ได้มากขึ้น (Mehnaz et al., 2010)



ภาพ 1 เชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440 ที่ย้อมติดสีของ Safranin O ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ กำลังขยาย 4x

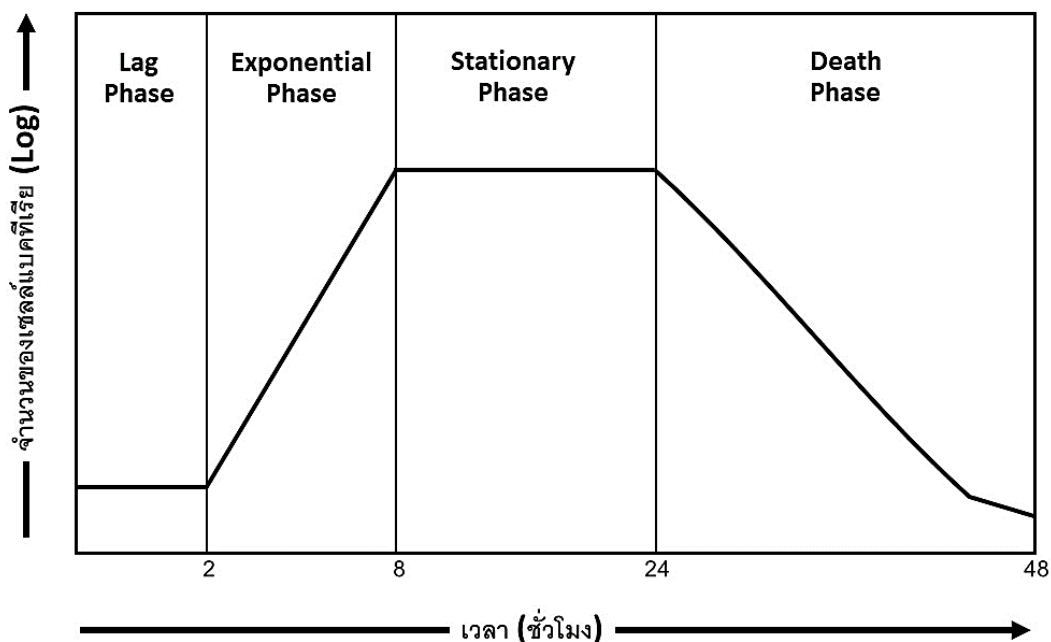
การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacterial growth) หมายถึง การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย โดยการแบ่งตัวจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ ทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว กราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนแบคทีเรียจึงต้องแสดงผลในรูปของกราฟ logarithmic (log) จะเรียกว่า Bacterial growth curve ดังภาพ 2 คือภาพกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับระยะเวลา โดยแกน X จะแสดง ระยะเวลา และแกน Y จะแสดงปริมาณของแบคทีเรีย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2554) จากภาพจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสามารถแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ได้ 4 ระยะ คือ

1. Lag phase เป็นระยะที่แบคทีเรียจะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ และจำนวนแบคทีเรียยังไม่เพิ่มขึ้นมากนัก จึงทำให้อัตราการเกิดเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียไม่สูง เส้นกราฟจะค่อนข้างคงที่ ระยะเวลาของ lag phase นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

2. Exponential phase เป็นระยะที่แบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ โดยการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่า ๆ กัน จึงทำให้อัตราการเจริญเติบโตในระยะนี้จะมากที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมากและรวดเร็ว เซลล์เกิดกิจกรรมทางเคมีต่าง ๆ มากที่สุด จึงทำให้ลักษณะของเส้นกราฟเป็นแบบ exponential

3. Stationary phase เป็นระยะที่มีปริมาณแบคทีเรียสูงสุด แต่การเพิ่มจำนวนอยู่ในอัตราคงที่ เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม แบคทีเรียบางส่วนจึงไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ อัตราการเกิดของแบคทีเรียและอัตราการตายของแบคทีเรียจึงมีค่าใกล้เคียงกัน

4. Death phase เป็นระยะที่มีปริมาณแบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการตายหรือการลดลงของจำนวนแบคทีเรีย มาจากสารอาหารที่หมดไป แบคทีเรียจะมีอัตราการตายที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เช่น พวกทรงกลม แกรมลบ จะตายอย่างรวดเร็วมากภายใน 2-3 วัน และเหลือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่น้อยมาก แบคทีเรียบางชนิดตายช้าจึงทำให้มีแบคทีเรียมีชีวิตเหลืออยู่เป็นเวลานานหลายเดือน และหลังจากผ่านระยะนี้ไปแบคทีเรียอาจมีการเจริญเติบโตอีกครั้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและสภาพแวดล้อม ซึ่งสิ่งมีชีวิตบางชนิดที่สามารถต้านทานสภาวะที่ไม่เหมาะสมนี้ได้โดยการสร้างเอนโดสปอร์ (Todar K, 2012; Bailey R, 2018)



ภาพ 2 การเจริญเติบโต (Growth curve) ของแบคทีเรีย

ที่มา: Garrison and Huigens, 2016

### ไบโอฟิล์มและการสร้างไบโอฟิล์ม

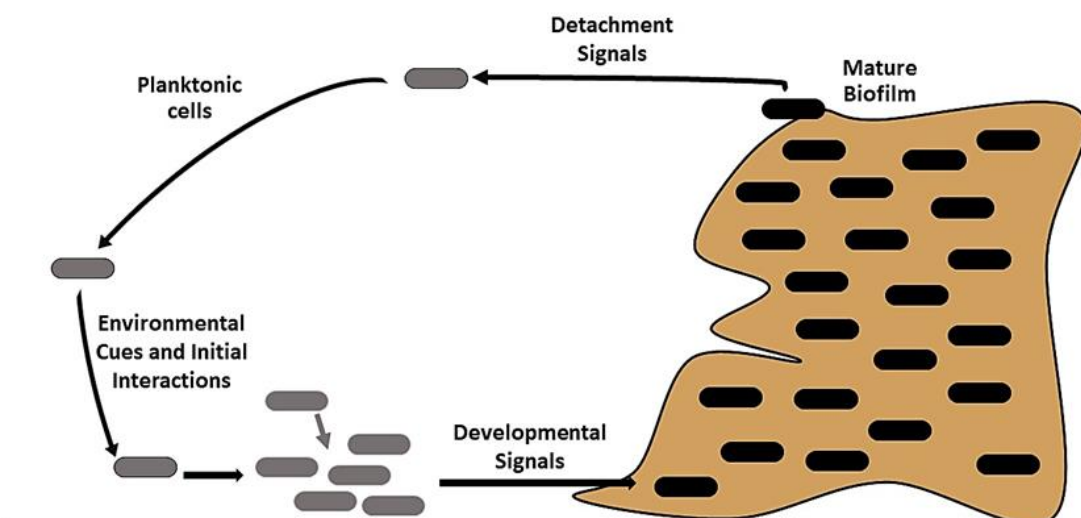
ไบโอฟิล์มคือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน มีโครงสร้างจากสารพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น และปล่อยออกมานอกเซลล์ เป็นชั้นปกป้องแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใน รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ภายใน (Nadell, 2009)

การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียเป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในธรรมชาติ บริเวณใต้ดิน จุลินทรีย์จะก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มรอบ ๆ Rhizosphere หรือพื้นที่ระหว่างรากกับดินในพืช และเกิดปฏิกิริยาทางเคมี ทำให้ทั้งสองฝ่ายเข้าถึงสารอาหารที่ไม่สามารถใช้ได้ อีกทั้งไบโอฟิล์มยังช่วยบำบัดทางชีวภาพ และสามารถย่อยสลายอนุภาคอินทรีย์ นอกจากนี้ในดินแล้วไบโอฟิล์มยังถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดน้ำเสียได้ ในกระบวนการนี้ไบโอฟิล์มจะเจริญเติบโตบนตัวกลางที่อยู่ในน้ำเสียเพื่อทำความสะอาดของเสียจากน้ำอย่างช้า ๆ (Marianne, 2019)

ในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียจะเคลื่อนที่วนไปมาจนเกาะติดบนพื้นผิว หลังได้รับสัญญาณจากสิ่งรอบตัว ซึ่งเป็นสารเคมีส่งสัญญาณ (communication network) ให้เซลล์แบคทีเรียอื่นรับรู้ ที่เรียกกันว่า Quorum sensing (QS) จนทำให้เกิดการรวมกลุ่มกันของแบคทีเรีย การตอบสนองต่อสัญญาณนี้เป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งที่แบคทีเรียใช้ควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมและ

มีผลต่อการแสดงออกของยีนหลายชนิด เมื่อแบคทีเรียรวมกลุ่มกันแล้วจึงเริ่มมีการสร้างโคโลนี และเพิ่มจำนวน พร้อมทั้งสร้าง EPS จนเกิดโครงสร้างไบโอฟิล์ม หลังจากไบโอฟิล์มเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว แบคทีเรียอาจมีการแยกตัวออกจากโครงสร้างไบโอฟิล์มเดิม เคลื่อนที่ไปเกาะพื้นผิวใหม่และ เริ่มขั้นตอนการสร้างไบโอฟิล์มใหม่ต่อไป (เขมาภรณ์ บุญบำรุง, 2561) ในขั้นตอนการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ขั้นตอน ดังภาพ 3

1. เซลล์อิสระเคลื่อนที่ไปเกาะติดกับพื้นผิวด้วยองค์ประกอบของเซลล์ (organelles) ที่สำคัญ เช่น แฟกเจลลา (flagella)
2. เซลล์มีการเกาะกลุ่มกันมากยิ่งขึ้น และเกาะติดกับพื้นผิวแน่นจนหลุดออกจากพื้นผิวไม่ได้อีก ในขั้นตอนนี้มีการใช้ organelles อื่น ๆ เช่น แคปซูล (capsule) หรือ เคอร์ไล (curli)
3. เซลล์แบคทีเรียเริ่มมีการแบ่งจำนวนมากขึ้น
4. เป็นการพัฒนาโครงสร้างของไบโอฟิล์มและมีการผลิตสาร QS เพื่อการรับรู้และตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การเลือกอาหาร รับสัมผัสแสง การตรวจจับและหลีกเลี่ยงสารพิษหรืออันตราย และในขั้นตอนนี้จะมีการหลั่ง EPS ออกมา (Hera and Roberto, 2010) ซึ่งใน EPS ประกอบไปด้วย พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน ลิพิด และกรดนิวคลีอิก เพื่อปกป้องและช่วยให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้แม้ในสภาพที่ไม่เหมาะสมและเป็นสารเชื่อมระหว่างเซลล์ด้วยกันเอง ส่งผลทำให้เกิดการรวมตัวในรูปของโคโลนีที่แข็งแรง เมื่อโคโลนีมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ทำให้ลักษณะของการเกิดชั้นไบโอฟิล์มมีรูปร่างที่แตกต่างกันตามสภาวะและปัจจัยต่าง ๆ (Flemming and Wingender, 2010)
5. เซลล์แบคทีเรียจะมีการเคลื่อนย้ายออกจากไบโอฟิล์มเพื่อกลับไปเป็นเซลล์อิสระ และหาพื้นผิวใหม่ในการยึดเกาะต่อไป



ภาพ 3 ขั้นตอนการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย

ที่มา: Toole et al., 2000

### Extracellular Polymeric Substance (EPS)

เกิดจากสารชีวเคมีที่ต่างกัน ซึ่งถูกปล่อยออกมาจากจุลินทรีย์ มีลักษณะเป็นเมือกห่อหุ้มจุลินทรีย์ไว้ ชั้นป้องกันเซลล์ในสภาพแวดล้อมภายนอกที่ไม่เหมาะสม (Liu and Fang, 2002) ซึ่งหน้าที่พื้นฐานของ EPS คือ ช่วยยึดติดกับพื้นผิว ช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ เป็นองค์ประกอบโครงสร้างของไบโอฟิล์ม เป็นเกราะป้องกันสำหรับเซลล์ ช่วยกักเก็บน้ำ ดูดซับสารอินทรีย์ภายนอกและการดูดซับของไอออนอนินทรีย์ ที่สำคัญยังมีศักยภาพสำหรับการใช้งานในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น (More, 2014) จุลินทรีย์ที่ผลิต EPS สามารถพบได้ในระบบนิเวศต่าง ๆ สภาพแวดล้อมมีคาร์บอน ไนโตรเจนสูง และสภาพแวดล้อมที่ให้สารอินทรีย์ในปริมาณสูง (Singha, 2012)

#### 1. องค์ประกอบของ EPS

ใน EPS ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน ลิพิด และกรดนิวคลีอิก เพื่อปกป้องและช่วยให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้แม้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม และเป็นสารเชื่อมระหว่างเซลล์ด้วยตัวเอง ส่งผลทำให้เกิดการรวมตัวในรูปของโคโลนีที่แข็งแรง เมื่อโคโลนีมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ลักษณะของการเกิดชั้นไบโอฟิล์มจะแตกต่างกันตามสภาวะและปัจจัยต่าง ๆ (Flemming and Wingender, 2010)

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharides) เป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งอาจมีได้สูงถึงร้อยละ 90 โดยมีสมบัติทั้งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และชอบน้ำ (hydrophilic) สารประกอบภายในโครงสร้างไบโอฟิล์มมีความซับซ้อนมาก สามารถพบทั้งโปรตีน หรือไขมัน และที่สำคัญมีการตรวจพบสารพันธุกรรมชนิด extracellular DNA (eDNA) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการส่งต่อ ถ่ายทอด และแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมให้สมาชิกของเซลล์ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม (Flemming et al., 2000)

ในส่วนของโปรตีนมีหน้าที่ในการช่วยยึดเกาะกันของเซลล์ของแบคทีเรีย และส่งเสริมการสร้างไบโอฟิล์ม (Jahn et al., 1999) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของไบโอฟิล์มที่สร้างโดยเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย mannose และ galactose ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการยึดเกาะกับพื้นผิวและผลิตโครงสร้าง EPS (Ghafoor et al., 2011) จากงานวิจัยของ Yang et al., (2011) ที่ทำการศึกษายาต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างของ EPS ในการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* พบว่า ชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง Pel และ Psl มีส่วนช่วยในการก่อตัวของโครงสร้าง microcolony แต่ Pel กลับไม่มีส่วนเกี่ยวข้องของในการสร้างไบโอฟิล์ม

## 2. ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง EPS

ความทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมของไบโอฟิล์มนั้นเกิดจากการมี EPS เพื่อช่วยป้องกันเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม (Thuptimjang et al., 2017) ซึ่งกระบวนการป้องกันตัวและการแสดงออกที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มได้แก่ กระบวนการ QS การสร้าง LPS (lipopolysaccharide biosynthesis) และการดื้อยา (antibiotic resistance) จากการศึกษาของ Yang และ Alvarez ในปี 2015 ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มเมื่อได้รับสัมผัสกับ AgNPs พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสาร (QS) และการสร้าง LPS ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับ QS จะประกอบไปด้วย lasI lasR และ rhIR ทำให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มมากขึ้น สำหรับการสร้าง LPS ประกอบไปด้วยยีน 3 ตัว คือ pelA pslA และ sagS ซึ่งเป็นยีนที่ช่วยในการเกาะติด นอกจากนี้ยังมียีนอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม เช่น dsbA ในเชื้อ *P. putida* KT2440 (Lee et al., 2009) อีกทั้ง csgD เป็นยีนหลักที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งมีหน้าที่ควบคุม csgBAC และ csgDEFG ซึ่งยีนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีหน้าที่ในการหลั่ง และการสังเคราะห์ EPS นอกจากนี้ CsgD ยังมีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพของการสร้างไบโอฟิล์มและยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์อีกด้วย (Ogasawara et al., 2011)

## อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs)

เป็นอนุภาคโลหะเงินที่มีขนาดเล็ก อยู่ในช่วง 1–100 นาโนเมตร และมีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่พิเศษแตกต่างไปจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากขนาดอนุภาคที่เล็ก มีพื้นที่ผิวสัมผัสที่สูง จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีบริเวณพื้นผิวได้ดี (Wang et al., 2006) AgNPs นั้นนิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย อาทิ ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางการแพทย์ ผลิตภัณฑ์ในโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น (Gambino et al., 2015; Samarajeewa, 2017) เนื่องจาก AgNPs มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ โดยก่อให้เกิดอันตรายในระดับเซลล์ ระดับโมเลกุล และแม้แต่เซลล์ยูคาริโอตก็ตาม (Gupta et al., 2015) รวมถึงนำมาผลิตเป็นยาปฏิชีวนะช่วยป้องกันการติดเชื้อ ซึ่งโลหะเงินสามารถขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เผาผลาญออกซิเจนและพลังงานของแบคทีเรีย จึงทำให้แบคทีเรียที่เป็นเชื้อโรคขาดอาหารและตายในที่สุด (สถาพร คำหอม, 2554)

ในทางวิทยาศาสตร์พบว่า ในทางวิทยาศาสตร์พบว่า AgNPs สามารถฆ่าแบคทีเรียได้มากถึง 600 กว่าชนิด นอกจากนี้ AgNPs มีปฏิกิริยาตอบสนองโต้ตอบอย่างมากกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของจุลินทรีย์ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2553) โดยพบว่า มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Burell et al., 1999) ต้านเชื้อรา (Wright et al., 1999) และต้านเชื้อไวรัส (Sun et al., 2005)

### 1. สมบัติทางกายภาพของ AgNPs

AgNPs อาจอยู่ในรูปที่มีขนาดนาโนใน 1, 2 หรือ 3 มิติ

1.1 ซิลเวอร์นาโนชนิดฟิล์มบาง (Silver nanofilm) มีขนาดนาโนใน 1 มิติ คือมีความหนาเป็นขนาดนาโน

1.2 ลวดซิลเวอร์นาโน (Silver nanowire) มีขนาดนาโนใน 2 มิติ คือมีความกว้างกับความหนาเป็นขนาดนาโน ส่วนความยาวไม่จำเป็นต้องเป็นขนาดนาโน

1.3 อนุภาคซิลเวอร์นาโน (Silver nanoparticle) มีขนาดนาโนใน 3 มิติ คือมีความกว้าง ความยาว และความหนาเป็นขนาดนาโน (Asoro et al., 2009)

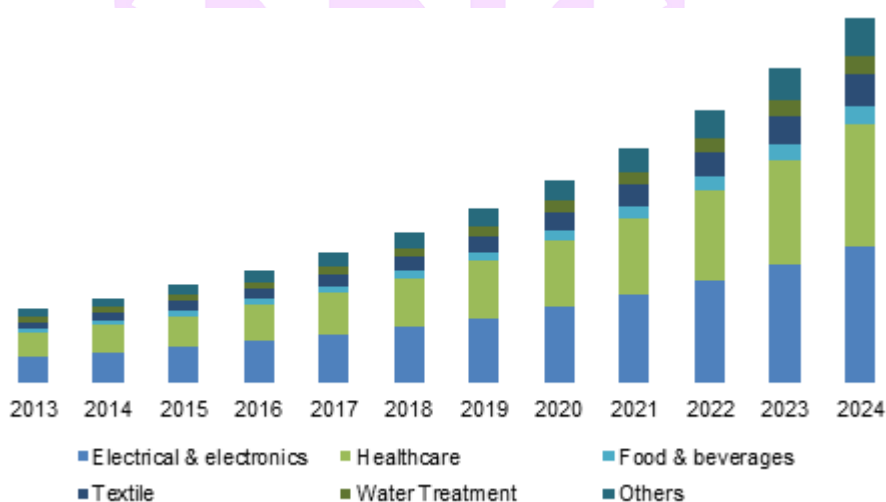
### 2. การสังเคราะห์ AgNPs

AgNPs สามารถถูกสังเคราะห์ได้จากการรีดิวซ์ ไอออนบวกของซิลเวอร์ (silver cation) ให้เป็นโลหะเงิน (zero-valent silver metal) โดยใช้สารรีดิวซ์เอเจนต์ต่าง ๆ กัน เช่น โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) ซึ่งมีความเป็นพิษค่อนข้างมาก หรือหากต้องการให้กรรมวิธีปลอดภัยมากขึ้น สามารถใช้สารรีดิวซ์เอเจนต์อื่น ๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส หรืออาจใช้สารสกัดจากพืช

ซึ่งในทางปฏิบัติทำได้ง่ายเนื่องจากพืชทุกชนิดเมื่อบีบน้ำออกมาเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ก็จะเป็นแหล่งของสารรีติวซิงเอเจนต์ที่พร้อมใช้ในการสังเคราะห์ AgNPs ได้ทันที

### 3. การใช้ประโยชน์จาก AgNPs

AgNPs มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Marambio Jones and Hoek, 2010) จึงมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์นาโนและผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพมากมาย ดังภาพ 4 (Tolaymat et al., 2010) โดยส่วนใหญ่จะใช้ในทางอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของยางรถยนต์และแบตเตอรี่ เป็นส่วนประกอบของถุงเท้าทำให้ไม่มีกลิ่นเหม็นเนื่องจาก AgNPs มีสมบัติฆ่าเชื้อโรคได้ดี หรือนำมาเป็นส่วนผสมในเสื้อนาโนที่สวมใส่แล้วไม่ต้องซักบ่อย รวมถึงผลิตผงซักฟอกที่ใช้ซักผ้าเวลากลางคืนได้โดยเสื้อที่ตากไว้ไม่มีกลิ่นเหม็นอับ หรือใช้เป็นส่วนประกอบของพลาสติกและผ้าพันแผลที่ช่วยฆ่าเชื้อโรคและทำให้แผลหายเร็ว เป็นต้น อีกทั้งยังนำมาใช้ในการเคลือบอุปกรณ์ทางการแพทย์ (เอี่ยมพร และคณะ, 2557), เซนเซอร์สำหรับการแพทย์ (Moore and Goettmann, 2006), การทำเลเซอร์และระบบการนำส่งยา (drug delivery) (Skirtach et al., 2004) ซึ่ง AgNPs มีส่วนช่วยในการส่งผ่านความร้อนไปยังโพลีเมอร์โดยรอบ ทำให้ยาที่ถูกห่อหุ้ม (encapsulated) สามารถกระจายตัวออกมาจากแคปซูลพอลิเมอร์ได้ (Radziuk et al., 2007) เป็นต้น



ภาพ 4 แสดงแนวโน้มที่มากขึ้นในการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีอนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็นองค์ประกอบในปี 2013 – 2024

ที่มา: Global Market Insights Inc, 2018

#### 4. การปนเปื้อนของ AgNPs ในสิ่งแวดล้อม

การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ AgNPs แล้วปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติโดยตรง หรือน้ำเสียที่เข้าสู่โรงงานบำบัด (Sewage Treatment Plant, STP) อาจมีซิลเวอร์หลงเหลือในปริมาณเล็กน้อย และปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมต่อไป ส่วนกากตะกอนที่เหลือบางส่วนถูกใช้ในการเกษตร บางส่วนถูกทิ้งสู่ดิน และเมื่อถูกชะด้วยน้ำฝน AgNPs สามารถเคลื่อนที่ไปสะสมในดินชั้นล่างและน้ำใต้ดิน หากกำจัดกากตะกอนด้วยวิธีการเผา ซิลเวอร์จะอยู่ในตะกรัน (slag) ถ้ำลอย (fly ash) ซึ่งก็จะอยู่บนพื้นดิน และอีกส่วนจะฟุ้งในอากาศ

จากการสำรวจในปี 1983 พบว่าในมหาสมุทรแปซิฟิกมีซิลเวอร์ความเข้มข้นเพียง 0.03–0.1 ng/L และได้มีการศึกษาอีกครั้งในปี 2002 พบว่ามีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 1.3 ng/L (Ranville and Flegal, 2005) จากการศึกษาดังกล่าวทำให้เห็นว่าได้มีการปล่อยอนุภาคซิลเวอร์นาโนสู่สิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

จากการวัดคุณภาพน้ำมาตรฐานในสิ่งแวดล้อมในสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental water quality standard) พบว่าซิลเวอร์มีค่าไม่เกิน 1,920–3,200 ng/L ในลำธารและน่านน้ำชายฝั่ง (Environmental Protection Agency, 2002)

ในน้ำผิวดินพบ AgNPs ปนเปื้อนเท่ากับ 0.088–10000 ng/L, ในน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสียเท่ากับ 0.0164–17 ug/L และในกากตะกอนเท่ากับ 1.29–39 mg/kg (Melissa et al., 2013)

#### 5. ความเป็นพิษของ AgNPs

AgNPs เกิดความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิตทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต แต่ความเป็นพิษมากหรือน้อยอาจแตกต่างกันไป เนื่องจากมีความแตกต่างของโครงสร้างและทางสรีรวิทยา เนื้อเยื่อเซลล์เป็นด่านแรกของการป้องกันสารพิษ เช่น เซลล์เยื่อบุผิวหรือเยื่อเมือก เนื้อเยื่อทั้งนี้สิ่งมีชีวิตชั้นสูง ได้แก่ พืชและสัตว์ จะมีกลไกในการป้องกันหลายอย่างซึ่งช่วยให้ทนต่อความเข้มข้นสูงของสารพิษ ทั้งนี้การเกิดความเป็นพิษในมนุษย์จำเป็นต้องได้รับ AgNPs ในปริมาณที่มากและความเข้มข้นสูง ซึ่งในผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ได้มีการใช้ในปริมาณที่น้อยและความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนจึงไม่มีความเสี่ยงต่อสุขภาพมนุษย์มากนัก (Muñoz, et al., 2017) อย่างไรก็ตาม ในด้านผลกระทบต่อจุลินทรีย์ AgNPs มีขนาดเล็กทำให้สามารถกระจายผ่านเข้าไปในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จึงเกิดการสลายตัวและมีการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออน ทำให้มีผลกระทบต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยส่งผลให้เกิดการรบกวนการทำงานในระดับเซลล์ของแบคทีเรีย (Ming et al., 2012) และกลไกการทำงานของซิลเวอร์ไอออนมีประสิทธิภาพสูงต่อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบ มีชั้น Peptidoglycan หนาเพียง 2–3 nm ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกหนาประมาณ 30 nm โดยอนุภาคซิลเวอร์นาโน จะมีประสิทธิภาพ

ในการฆ่าแบคทีเรียอยู่ในช่วง 1–10 nm เพราะอนุภาคที่เล็กจะสามารถทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดมากขึ้น ดังนั้นพื้นที่ผิวที่เพิ่มขึ้นจะช่วยเพิ่มความว่องไวของการเกิดปฏิกิริยาและมีผลกระทบต่อแบคทีเรียมากยิ่งขึ้น Puay et al. (2015) ได้นำ AgNPs มาทดสอบในระบบบำบัดน้ำเสียขนาดเล็ก ภายในระบบประกอบด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ และสารอินทรีย์อื่น ๆ พบว่า AgNPs มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบคทีเรีย แบคทีเรียได้รับผลกระทบและถูกกำจัด

จากการศึกษาของ Xiu et al. (2012) พบว่า กลไกหลัก 3 กลไก ทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถต่อต้านแบคทีเรียได้ดี ได้แก่ อนุภาคซิลเวอร์นาโนในช่วง 1 – 10 nm จับกับผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและรบกวนการทำงานของระดับเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น การขนส่งสารเข้าออกจากเซลล์และการหายใจ AgNPs สามารถแทรกเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียและรบกวนการทำงานของระดับโมเลกุลโดยจับกับสารที่มีกำมะถันและฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ เช่น DNA และ AgNPs เกิดการสลายตัวและปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนเนื่องจาก AgNPs มีขนาดเล็กและมีเป็นจำนวนมาก ทำให้สามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนออกมาด้วยความเข้มข้นสูงสามารถฆ่าแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งการศึกษาของ Yuan et al. (2013) พบว่า *Nitrosomonas europaea* สายพันธุ์ ATCC 19718 ที่ได้รับ AgNPs ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ ของ *N. europaea* เกิดความเสียหาย ทำให้ nucleoids สลายตัว และจากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนเพิ่มเติมแสดงให้เห็นว่า AgNPs จะยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่สำคัญของเชื้อรวมถึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การแสดงออกของยีน การสร้างพลังงานและไนตริฟิเคชัน ของเชื้อ *N. europaea* อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Thuptimrang et al. (2015) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *P. putida* สายพันธุ์ KT2440 ในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน วิธีการทดสอบจะใช้ crystal violet (CV) ย้อมไบโอฟิล์ม และวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด อีกทั้งยังทำการตรวจวัดกิจกรรมของแบคทีเรียใช้วิธี ATP assay นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาถึงระดับยีนส์โดยวิธีการ RNA extraction ซึ่งจะใช้เทคนิค qPCR จากผลการศึกษาพบว่าไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแต่ละช่วงการเจริญเติบโต มีการตอบสนองต่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ต่างกัน และไบโอฟิล์มในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตที่มากกว่า พบว่า กิจกรรม ATP มีการลดลงหลังจากที่มีการสัมผัสกับ AgNPs ในงานวิจัยต่อมา Thuptimrang et al. (2017) พบว่าเมื่อไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* สายพันธุ์ KT2440 สร้างขึ้นภายใต้สภาวะคงที่ที่มีแหล่งกำเนิดคาร์บอน, ความเข้มข้นของคาร์บอน และอุณหภูมิที่ต่างกัน จะมีปริมาณไบโอฟิล์ม, ความหนาของไบโอฟิล์ม, อัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร และค่าสัมประสิทธิ์ความขรุขระ ที่ต่างกัน ซึ่งส่งผลให้ความทนทานต่อ AgNPs มีความแตกต่างกันไปตามโครงสร้าง

Khan et al. (2011) ศึกษาความทนของแบคทีเรียที่เรียต่อ AgNPs จากสิ่งปฏิภูลในสิ่งแวดล้อม จากการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ที่ถูกทดสอบด้วย AgNPs มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับสภาวะที่ไม่มี AgNPs นอกจากนี้การทดลองชี้ให้เห็นการที่แบคทีเรียสร้าง EPS เป็นกลไกที่ทำให้แบคทีเรียทนต่อ AgNPs ได้ และ Sheng et al. (2011) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของ AgNPs ต่อโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์มในระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่าไบโอฟิล์มในระบบบำบัดน้ำเสียมีความทนต่อ AgNPs และมีการสะสมของ AgNPs ในไบโอฟิล์มซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ และจากผลการทดสอบการสกัด EPS ออกจากไบโอฟิล์มพบว่า ไบโอฟิล์มที่ยังมี EPS อยู่มาก สามารถปกป้องเซลล์จาก AgNPs ในทางกายภาพได้ เนื่องจาก EPS มีบทบาทสำคัญในการปกป้องแบคทีเรีย ดังนั้น ไบโอฟิล์มที่สกัด EPS ออกบางส่วนจะมีความไวต่อ AgNPs มากกว่าไบโอฟิล์มที่ยังไม่ได้สกัด EPS ในงานวิจัยนี้สายพันธุ์ *Thiotrichales* มีความไวต่อ AgNPs มากกว่าสายพันธุ์อื่นในไบโอฟิล์มที่วิเคราะห์ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียที่มีลักษณะแบบเส้นใย (filamentous) จะมีความไวต่อ AgNPs

Yang และ Alvarez (2015) ได้ทำการศึกษาการใช้ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่ำเพื่อดูการพัฒนาการสร้างไบโอฟิล์ม โดยใช้เชื้อในรูปของ mixed culture จากระบบบำบัดน้ำเสีย (WWTP) และเพื่อให้ได้กลไกการทดลองเพิ่มเติมจึงได้ทดลองกับเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 ซึ่งจะสังเกตการสร้างไบโอฟิล์มโดยสองภายใต้กล้อง Fluorescence Microscopy นอกจากนี้ยังได้ศึกษาอีกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ การศึกษาการแสดงออกของยีน รวมถึงดูปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ผลการทดลองพบว่า การใช้ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่ำ ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของไบโอฟิล์ม รวมถึงการแสดงออกที่เกี่ยวข้องกับการสร้างของไบโอฟิล์ม เช่น การสื่อสาร, การเกาะติด, การสร้าง LPS และการดีออกซา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่ำส่งผลให้กระตุ้นการสร้างไบโอฟิล์มทำให้เกิดการยึดเกาะ การกักกร่อน และเพิ่มยีนดีออกซา รวมถึงมีปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่สูง

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### แบคทีเรียและอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ *Pseudomonas putida* KT2440 ได้จากศูนย์เก็บเชื้อจุลินทรีย์ American Type Culture Collection (ATCC) รหัส ATCC 47054 เชื้อ *Bacillus subtilis* 1248 และ 1451 ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) เป็นตัวแทนของเชื้อในสิ่งแวดล้อม และอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) เป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์จากบริษัท Prime Nano Technology ประเทศไทย โดยมีขนาดอนุภาคประมาณ 5–20 นาโนเมตร

##### วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

###### 1. วัสดุอุปกรณ์

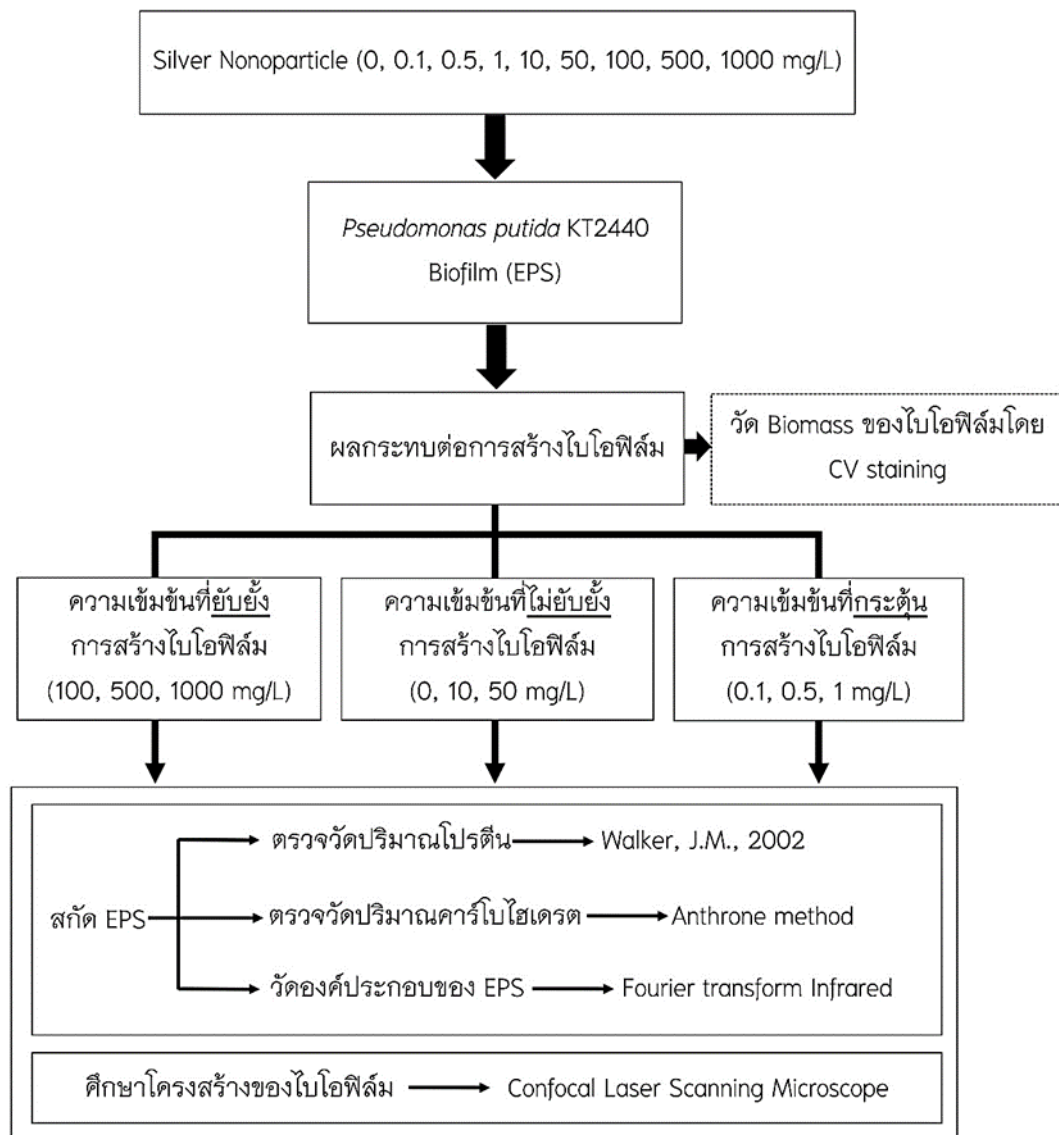
- 1.1 กระจกตวง (Cylinder) ขนาด 100, 250, 500 มิลลิลิตร
- 1.2 กระจกใสจานเพาะเชื้อ (Plate can)
- 1.3 กล่องเก็บไมโครปิเปตทิป (Tip box)
- 1.4 ขวดดูแรนใส (Duran bottle) ขนาด 20, 40, 50, 250, 500 มิลลิลิตร
- 1.5 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.6 ขวดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 1.7 คิวเวทท์ (Cuvettes)
- 1.8 ควอร์ต คิวเวทท์ (Quartz Cuvette)
- 1.9 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 1.10 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- 1.12 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack)
- 1.13 ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96-well plate)
- 1.14 ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100, 500, 1000 มิลลิลิตร
- 1.15 หลอดทดลองฝาเกลียว (Test Tube Screw Cap)
- 1.16 หลอดเซนตริฟิวจ์พลาสติก (centrifuge tube)
- 1.17 หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube)

- 1.18 สำลี (Cotton)
- 1.19 ท่วงเชี่ยเชื่อ (Loop)
- 1.20 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
- 1.21 แผ่นฟอยล์อลูมิเนียม (Aluminium foil)
- 1.22 ไฟแช็ก
- 1.23 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
- 1.24 ไมโครปิเปตต์ทีป (Micropipettetip)
2. เครื่องมือ
  - 2.1 กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์ (CLSM)
  - 2.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
  - 2.3 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaker Incubator)
  - 2.4 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
  - 2.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
  - 2.6 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
  - 2.7 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
  - 2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
  - 2.9 เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer
  - 2.10 เครื่อง Vortex
3. สารเคมี
  - 3.1 คริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet)
  - 3.2 น้ำ DI (Deionized water)
  - 3.3 น้ำ RO (Reverse Osmosis)
  - 3.4 ผงวุ้น (Ager)
  - 3.5 อนุภาคซิลเวอร์ขนาดนาโน (AgNPs) ยี่ห้อ Prime Nano Technology
  - 3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB medium)
  - 3.7 เอทานอล:อะซิโตน อัตราส่วน 80:20 (Ethanol : Acetone 80:20)
  - 3.8 โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85% (NaCl 0.85%)
  - 3.9 Bovine serum albumin
  - 3.10  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
  - 3.11 FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit

- 3.12 Folin reagent
- 3.13 Glucose
- 3.14  $\text{NaCO}_3$
- 3.15 Phosphate Buffer Saline (PBS)
- 3.16 RNA Extraction Kit
- 3.17 Sodium potassium tartrate
- 3.18 0.2 % แอนไทโรนในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น
- 3.19 2% EDTA ใน Tris-HCl 0.3 mol/L
- 3.20 2N NaOH

#### การวางแผนการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการทดลองด้วยการทดสอบผลกระทบของ AgNPs ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย โดยใช้ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100, 500 และ 1000 mg/L และเชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440 เมื่อทราบผลการทดลองได้นำไปทำการทดลองต่อไปคือการวัดปริมาณไบโอฟิล์มศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์ (CLSM)



ภาพ 5 แผนการดำเนินการวิจัย

### วิธีการทดลอง

#### 1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas putida* KT2440 บนอาหารร่วน LB ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 1248 และ 1451 บนอาหารร่วน NB ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลองในแต่ละการทดลอง จะนำเชื้อที่เพาะไว้มา 1 โคโลนี มาเลี้ยงใน LB broth

หรือ NB broth จากนั้นนำไปเขย่าข้ามคืนที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °C ก่อนนำไปใช้เลี้ยงไบโอฟิล์ม

## 2. การเตรียมอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs)

เจือจางอนุภาคซิลเวอร์นาโน ความเข้มข้น 10,000 mg/L ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ น้ำ DI (Deionized water) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในการปรับให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ

## 3. การทดสอบผลกระทบของ AgNPs ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย

3.1 นำเชื้อที่เตรียมไว้โดยการเขย่าข้ามคืน มาผสมกับ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100, 500 และ 1000 mg/L ก่อนเติมลงใน 96-well plate โดยในแต่ละหลุม จะมีปริมาตร 200  $\mu$ L ประกอบด้วย LB broth ปริมาตร 100  $\mu$ L, AgNPs ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 95  $\mu$ L และเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 5  $\mu$ L ในแต่ละความเข้มข้นของ AgNPs ทำ 3 ซ้ำ โดยใช้ 3 หลุม

3.2 นำ 96-well plate ไปบ่มที่ 30°C โดยไม่ต้องเขย่า เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3 เก็บตัวอย่างโดยการดูดของเหลวออกจากหลุมทั้งหมด แล้วล้างด้วย NaCl 0.85% ปริมาตร 200  $\mu$ L จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง เพื่อทำการวัดการเจริญเติบโตของไบโอฟิล์มด้วยการวัดปริมาณ biomass

## 4. การวัด biomass ของไบโอฟิล์ม

การวัด biomass ของไบโอฟิล์มใน 96-well plate ทำโดยการดัดแปลงวิธีการของ Sule และคณะ, 2009 ดังนี้

4.1 หยด Crystal Violet ปริมาตร 200  $\mu$ L ลงในหลุมที่มีไบโอฟิล์มที่แห้งแล้ว ทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบ 15 นาที ล้างด้วย NaCl 0.85% 2 ครั้ง และทิ้งไว้ให้แห้ง

4.2 เมื่อแห้งแล้วหยด Ethanol:Acetone ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตร 200  $\mu$ L ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที เพื่อล้างสีของ Crystal Violet

4.3 ทำการเจือจาง 1:10 โดยดูดจากหลุมมา 100  $\mu$ L ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ที่มี Ethanol:Acetone อัตราส่วน 80:20 ปริมาตร 900  $\mu$ L

4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer โดยปริมาณ biomass แปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสง ( $A_{600}$ )

## 5. การสกัด EPS

5.1 ทำการเลี้ยงไบโอฟิล์มใน 24-well plate โดยในแต่ละหลุมจะมีปริมาตร 1 mL ประกอบด้วย LB broth ปริมาตร 500  $\mu$ L, AgNPs ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 475  $\mu$ L และเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 25  $\mu$ L ภายใต้ความเข้มข้นที่ต่างกันของ AgNPs ดังนี้ 0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/L

5.2 ดูดตัวอย่างไบโอฟิล์มจาก 24 หลุมต่อ 1 ความเข้มข้นไปเซนตริฟิวซ์ที่ 10,000 x g เป็นเวลา 20 นาที

5.3 ล้างด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง

5.4 นำไป Sonication 6 นาที

5.5 เซนตริฟิวซ์ที่ 10,000 x g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต

## 6. การตรวจวัดปริมาณโปรตีน

ทำตามวิธีการของ Walker, J.M., 2002

6.1 ใช้ตัวอย่างของ EPS ที่สกัดได้จากข้อ 3.4.6 ความเข้มข้นละ 0.1 mL

6.2 เติม 2N NaOH ปริมาณ 0.1 mL นำไปบ่มในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที

6.3 เติมสาร A : B : C ( $\text{NaCO}_3$  :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  : Sodium potassium tartrate) 1 ml ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

6.4 เติม Folin reagent 0.1 mL ทำการ Vortex

6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที

6.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็น standard เพื่อหาปริมาณโปรตีนในหน่วย  $\mu$ g/L

## 7. การตรวจวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต

วิธีการ Anthrone test

7.1 นำตัวอย่างของ EPS ที่สกัดได้จากข้อ 3.4.6 ปริมาณ 1 mL เติมลงใน 0.2 % แอนโทรนในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ที่มีปริมาณ 2 mL จากนั้นทำการ Vortex ให้เข้ากัน

7.2 นำไปบ่มในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้เย็นลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 4 °C

7.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 nm และใช้ Glucose เป็น standard เพื่อหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในหน่วย  $\mu$ g/L

## 8. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ EPS โดยใช้เทคนิค FTIR ในการวิเคราะห์

8.1 นำตัวอย่าง EPS ที่สกัดได้จากข้อ 3.4.6 ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Freeze Dryer ยี่ห้อ Snijders รุ่น 2040

8.2 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ EPS ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy ยี่ห้อ Bruker รุ่น Tensor 27

## 9. การศึกษาโครงสร้างของไบโอฟิล์ม

9.1 ทำการเลี้ยงไบโอฟิล์มใน 24-well plate ภายใต้ความเข้มข้นที่ต่างกันของ AgNPs ตามวิธีที่กล่าวไปแล้ว

9.2 เมื่อไบโอฟิล์มเจริญเติบโตในระยะเวลาที่ต้องการ ดูดของเหลวออกจากหลุมจนหมด ทำการล้างด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง

9.3 ทำการย้อมสีด้วย FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit ประกอบด้วย SYTO 9 (สีเขียว) และ PI (สีแดง)

9.4 นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์ (CLSM) ยี่ห้อ Nikon Laser Confocal microscope รุ่น C1Si ที่มีความยาวคลื่นของ excitation/emission เท่ากับ 482/500 นาโนเมตร สำหรับ SYTO 9 และ 490/635 สำหรับ PI ตามลำดับ

9.5 ชั้นความหนาของไบโอฟิล์มแสดงด้วยสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว โดยแสดงเป็นภาพด้านบนและภาพตัดขวางของไบโอฟิล์ม

## บทที่ 4

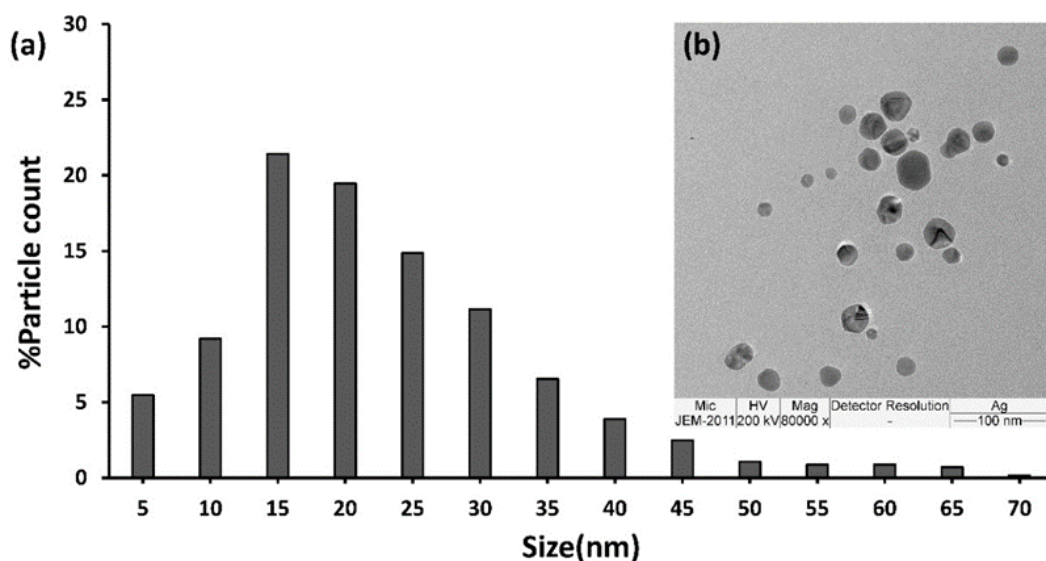
### ผลการทดลอง

#### ขนาดและศักย์ซีตาของ AgNPs

อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีลักษณะกลมและมีการกระจายของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 5–20 นาโนเมตร ดังภาพผนวก ค ทำการยืนยันโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าขนาดอนุภาคโดยส่วนใหญ่ (82%) อยู่ในช่วง 5–30 นาโนเมตร ดังภาพ 6(a) และมีลักษณะทรงกลม ซึ่งตรงกับข้อมูลจากผู้ผลิต Xu และคณะ (2019) พบว่า AgNPs ที่มีขนาดเล็กจะมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพที่สูง ทั้งนี้ไม่ได้แสดงข้อมูลสำหรับอนุภาคที่มีขนาดมากกว่า 70 นาโนเมตร (75–140 นาโนเมตร) ในภาพ เนื่องจากมีจำนวนเพียง 2% จากอนุภาคทั้งหมด และจะทำให้การแสดงผลการกระจายตัวไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังวัดขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยวิธี Dynamic light scattering โดยอาศัยการวัดการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่แขวนลอยในของเหลวหรือคอลลอยด์ (Waghmare et al., 2018; กระทรงอุตสาหกรรม., 2557) พบว่าได้ค่าเฉลี่ยของอนุภาคอยู่ที่ 78.59 นาโนเมตร เนื่องจากวิธีวิเคราะห์ที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนในน้ำ ดังนั้นขนาดที่ได้จึงเป็นผลของ hydrodynamic radius ที่เป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ถูกล้อมรอบด้วยอนุภาคของน้ำ จึงทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่กว่าการมองภายใต้กล้อง TEM นั่นเอง

ค่า zeta potential หรือศักย์ซีตา เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งบอกความเสถียรภาพของอนุภาคนาโนได้ ค่าศักย์ซีตาที่เป็นบวกมากหรือลบมากจะแสดงพลังงานศักย์ผลักระหว่างอนุภาคมาก จึงทำให้มีการกระจายตัวของอนุภาคได้ดี (J.M Cho et al., 2001) จากการวัด zeta potential ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนพบค่าเฉลี่ยที่  $-21.07$  mV ซึ่งถือว่ามีค่าค่อนข้างเป็นลบมาก โดยจากงานวิจัยของ Jeffrey และคณะ แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนที่มี zeta potential ที่มากกว่า  $+30$  mV หรือน้อยกว่า  $-30$  mV ถือว่าเป็นประจุบวกและประจุลบที่รุนแรง (Jeffrey et al., 2010)

ผลการวิเคราะห์ขนาดและศักย์ซีตาแสดงให้เห็นว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีขนาดเล็กและมีความเสถียร จึงแนวโน้มมีความเป็นพิษหรือส่งผลกระทบต่อโอโอฟิล์มมาก

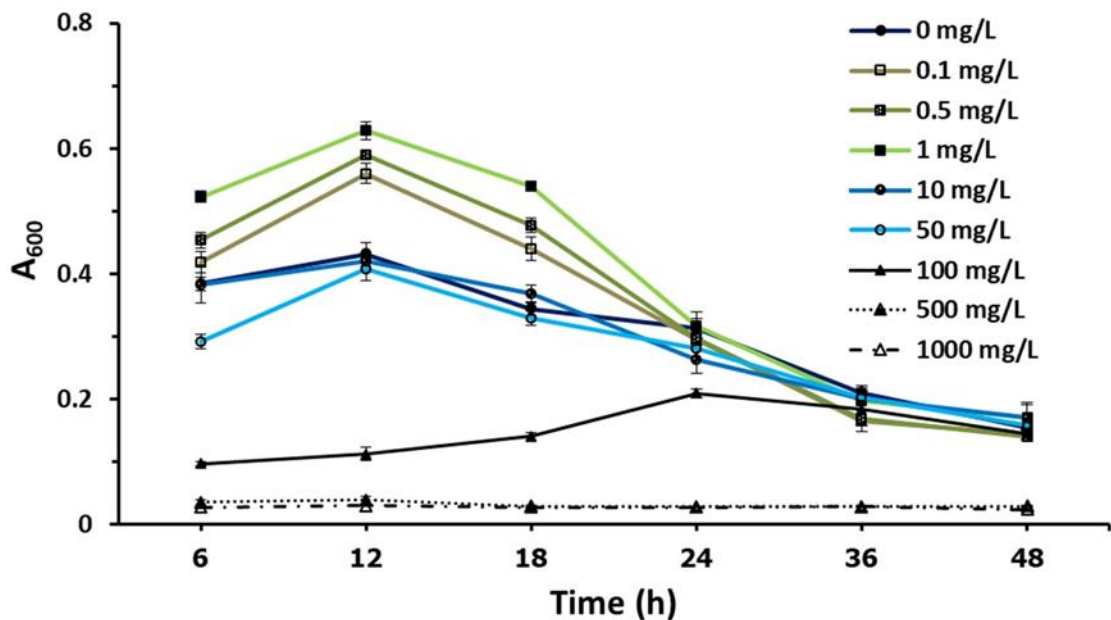


ภาพ 6 อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในงานวิจัย : (a) การกระจายตัวของขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโน และ (b) ลักษณะอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

#### ผลกระทบของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย

ทดสอบผลกระทบของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียด้วยการเติมอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100, 500 และ 1000 mg/L ลงไปในการเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* KT2440 ที่ช่วงเวลา 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นวัด biomass (มวลชีวภาพ) ของไบโอฟิล์มด้วยวิธีการย้อมคริสตัลไวโอเลตและวัดค่าการดูดกลืนแสงของคริสตัลไวโอเลตที่ถูกไบโอฟิล์มดูดซับไว้ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สามารถสร้างกราฟการเจริญเติบโต (growth curve) ของไบโอฟิล์มได้ ดังภาพ 7 โดยไบโอฟิล์มสร้างมวลชีวภาพมากขึ้นและสูงที่สุดภายใน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลงจนสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง จากผลการทดลองพบว่าซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 mg/L ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ประมาณ 0.2 ทั้งนี้ความเป็นพิษของซิลเวอร์นาโนเกิดจากไอออนของซิลเวอร์ที่ปลดปล่อยจากอนุภาคซิลเวอร์นาโน สามารถสร้างพันธะกับสารประกอบในผนังเซลล์ หรือแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำลาย DNA ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เซลล์ของแบคทีเรียไม่เกิดการสร้างไบโอฟิล์มและตายในที่สุด (Feng et al., 2000) ในขณะที่ซิลเวอร์นาโนความเข้มข้น 10 และ 50 mg/L ไม่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและมีการสร้างไบโอฟิล์มใกล้เคียงกับความเข้มข้น 0 mg/L ที่เป็นชุดการทดลองควบคุม ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ประมาณ 0.4 อย่างไรก็ตามพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 mg/L มีการสร้างชีวมวล

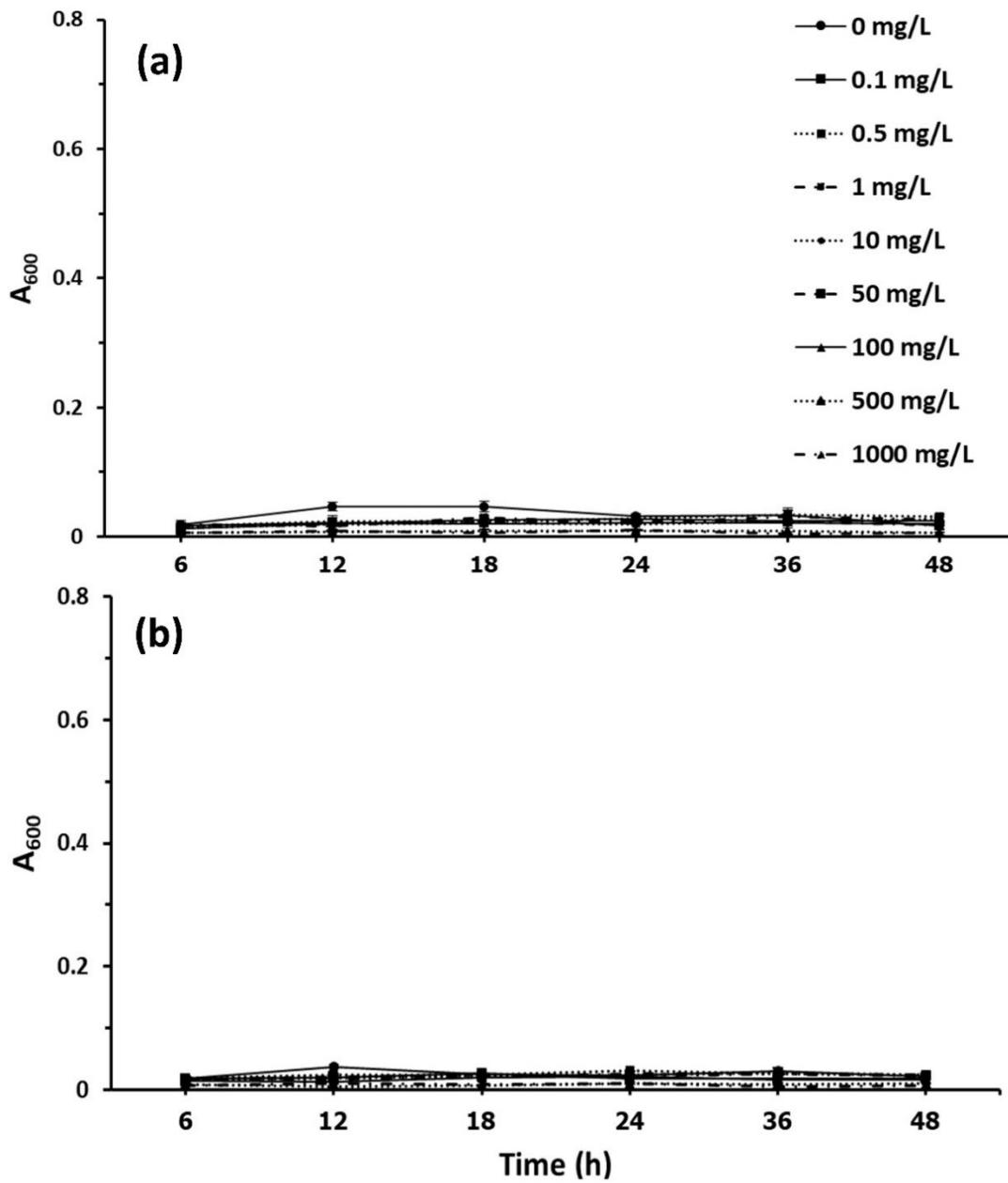
ของไบโอฟิล์มมากกว่าชุดควบคุม (0 mg/L) โดยมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ประมาณ 0.6 ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้นต่ำนอกจากจะไม่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้แล้ว อาจสามารถกระตุ้นการสร้างไบโอฟิล์มไบโอฟิล์มที่มากขึ้นได้ อาจสามารถอธิบายกระบวนการนี้ได้จาก อนุภาคซิลเวอร์นาโนความเข้มข้นต่ำสามารถสร้างสภาวะเครียด (stress) มีผลกระตุ้นให้เกิดการป้องกันตัวเองของเซลล์แบคทีเรีย จึงมีการสร้างไบโอฟิล์มมากขึ้น ผลการทดลองยืนยันได้จากงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 0.0108 และ 0.0216 mg/L สามารถกระตุ้นการสร้างไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ได้ โดยพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง lipopolysaccharide และ quorum sensing (Yang and Alvarez, 2015)



ภาพ 7 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* KT2440 ใน 96 well plate

นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบผลกระทบของอนุภาคซิลเวอร์นาโนกับไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยการเติมอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้นเช่นเดียวกันลงไปใน การเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 1248 และสายพันธุ์ 1451 วัดปริมาณชีวมวล ของไบโอฟิล์มที่ช่วงเวลา 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และสร้างกราฟการเจริญเติบโต ดังภาพ 8 (a) และ (b) ผลการทดลองพบว่าปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มที่ความเข้มข้นของ อนุภาคซิลเวอร์นาโนต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกันกับ control ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสร้างไบโอฟิล์ม ของเชื้อทั้งสองชนิดทำได้น้อย ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ประมาณ 0.03 และที่ความเข้มข้น 500 กับ 1000 mg/L ค่อนข้างเห็นชัดเจนว่าไม่มีการสร้างไบโอฟิล์ม ทั้งนี้หลังจากลองเลี้ยงเชื้อ ทั้งสองชนิดในอาหารหลายชนิด ก็ไม่พบการสร้างไบโอฟิล์มที่มากขึ้น อาจเนื่องมาจาก ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. subtilis* ในปริมาณต่ำ (Branda et al., 2001) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่การศึกษา *P. putida* KT2440 เพียงชนิดเดียว อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัย ที่ผ่านมา พบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากขึ้นในไบโอฟิล์มของ *B. subtilis* สายพันธุ์ Cu1065 หลังจากสัมผัส AgNPs ความเข้มข้น 1 และ 10 mg/L โดยอาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นจาก ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) (Gambino et al., 2015)





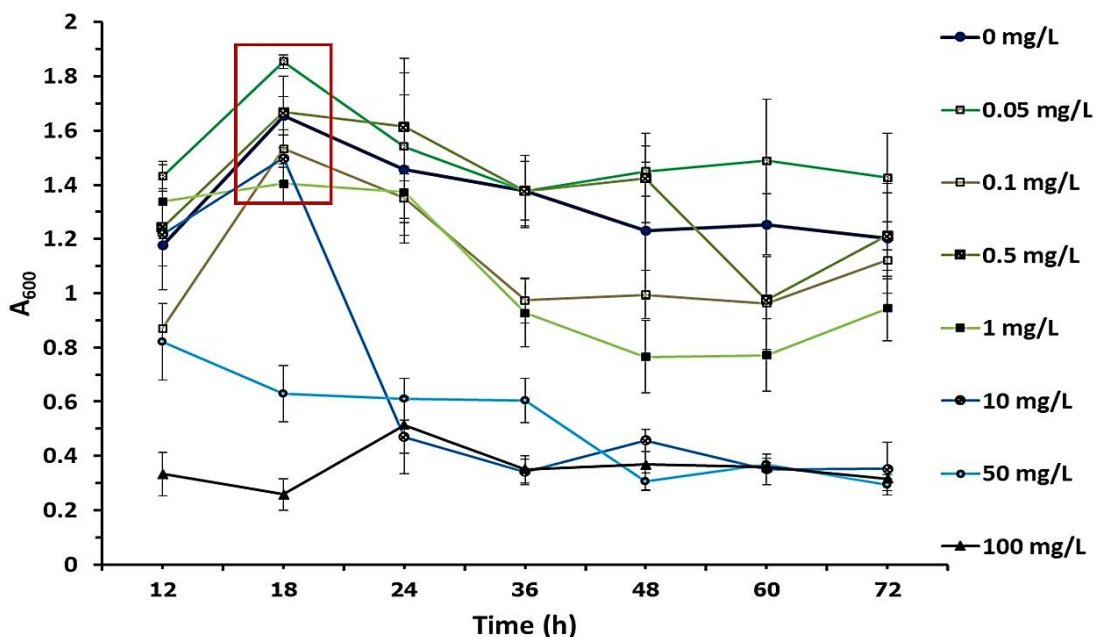
ภาพ 8 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ

*B. subtilis* 1248 (a) และ *B. subtilis* 1451 (b)

### ผลกระทบของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อองค์ประกอบและปริมาณของEPS

ในการสกัด EPS เพื่อวัดปริมาณและองค์ประกอบนั้น จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างไบโอฟิล์ม ปริมาณมาก ปริมาณของไบโอฟิล์มที่เจริญเติบโตใน 96-well plate (มีปริมาตร 200  $\mu$ L ต่อหลุม) จึงไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนการทดลองเป็น 24-well plate (มีปริมาตร 1 mL ต่อหลุม) อย่างไรก็ตามด้วยปริมาตรที่เพิ่มขึ้น จึงทำการทดลองซ้ำในส่วนหนึ่งของผลกระทบของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย เพื่อยืนยันผลการยับยั้งและกระตุ้น ต่อไบโอฟิล์ม และเลือกช่วงเวลาในการสกัดของไบโอฟิล์มได้อย่างถูกต้องสะท้อนกับผลจาก 96-well plate ที่ผ่านมา กราฟการเจริญเติบโตของไบโอฟิล์มที่อนุภาคซิลเวอร์นาโนความเข้มข้นต่าง ๆ ใน 24-well plate ดังภาพ 9 โดยมีผลการทดลองที่คล้ายคลึงกับภาพ 7 ที่พบการกระตุ้นการสร้างไบโอฟิล์มใน ความเข้มข้น AgNPs ต่ำ อย่างไรก็ตามด้วยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น ทำให้ไบโอฟิล์ม สามารถเจริญเติบโตได้มากขึ้น กราฟจึงไม่แสดงลักษณะระยะการเจริญเติบโตที่ชัดเจน (การขึ้นและลง ของปริมาณไบโอฟิล์ม) ดังภาพ 7

ไบโอฟิล์มในชั่วโมงที่ 18 ที่ความเข้มข้นของ AgNPs เท่ากับ 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/L (ตัวอย่างที่ล้อมรอบด้วยกรอบสี่เหลี่ยม) สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด และสร้างมวลชีวภาพได้ใกล้เคียง หรือมากกว่าชุดควบคุม (AgNPs ที่ 0 mg/L) โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของ AgNPs เท่ากับ 0.05 mg/L สามารถทำให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด ดังนั้นจึงใช้ไบโอฟิล์มที่ 18 ชั่วโมงที่เจริญเติบโตที่ ความเข้มข้น 0 – 1 mg/L ไปทำการสกัด EPS จากไบโอฟิล์มต่อไป



ภาพ 9 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* KT2440 ใน 24 well plate

#### 1. การสกัด EPS เพื่อวัดปริมาณของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต

เนื่องจากการศึกษาปริมาณไบโอฟิล์มด้วยคริสตัลไวโอเล็ตนั้นสามารถแสดงผลการย้อมติดทั้งเซลล์แบคทีเรียในไบโอฟิล์มและ EPS ของไบโอฟิล์ม ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าไบโอฟิล์มมีการสร้างที่เพิ่มมากขึ้น หรือการหลั่งสาร EPS ออกมามากขึ้น จึงศึกษาผลกระทบของ AgNPs ต่อปริมาณของไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* KT2440 โดยวิเคราะห์ที่ปริมาณ EPS โดยตรง ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.5, และ 1 mg/L ในการเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* KT2440 ชั่วโมงที่ 18 ใน 24-well plate จากนั้นนำไปสกัด EPS และวัดปริมาณของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ EPS ของเชื้อชนิดนี้ ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนดังตาราง 1 และ 2 ตามลำดับ (กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนแสดงดังภาคผนวก ง)

ตาราง 1 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนจาก EPS ของไบโอฟิล์มที่เจริญเติบโตใน AgNPs

ความเข้มข้นของ AgNPs (mg/L)	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )	ปริมาณโปรตีน ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )
0	0.06240 $\pm$ 0.01411	0.01224 $\pm$ 0.00307
0.05	0.06387 $\pm$ 0.02037	0.01741 $\pm$ 0.00530
0.1	0.06728 $\pm$ 0.06174	0.01419 $\pm$ 0.00593
0.5	0.06406 $\pm$ 0.03839	0.01929 $\pm$ 0.01423
1	0.06222 $\pm$ 0.02366	0.01695 $\pm$ 0.01137

ผลการทดลองพบว่า EPS ที่สกัดได้ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากกว่าปริมาณโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Flemming et al. (2000) ที่ระบุว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharides) เป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งอาจมีได้สูงถึงร้อยละ 90 นอกจากนี้ยังพบว่า EPS ของไบโอฟิล์มที่รับสัมผัส AgNPs ในความเข้มข้นต่ำมีปริมาณมากกว่าไบโอฟิล์มที่ไม่ได้รับสัมผัส AgNPs ดังนี้ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของไบโอฟิล์มที่รับสัมผัส AgNPs ความเข้มข้น 0.05 – 0.5 mg/L มีค่าอยู่ระหว่าง 0.06387 – 0.06728  $\mu\text{g}/\text{well}$  เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มี AgNPs) ที่มีค่าเท่ากับ 0.06240  $\mu\text{g}/\text{well}$  และปริมาณโปรตีนของไบโอฟิล์มที่รับสัมผัส AgNPs ความเข้มข้น 0.05 – 1 mg/L มีค่าอยู่ระหว่าง 0.01419 – 0.01929  $\mu\text{g}/\text{well}$  เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 0.01224  $\mu\text{g}/\text{well}$  ผลจากปริมาณองค์ประกอบ EPS ของไบโอฟิล์มยืนยันว่า AgNPs ในความเข้มข้นที่ต่ำสามารถทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างไบโอฟิล์มที่มากขึ้นได้

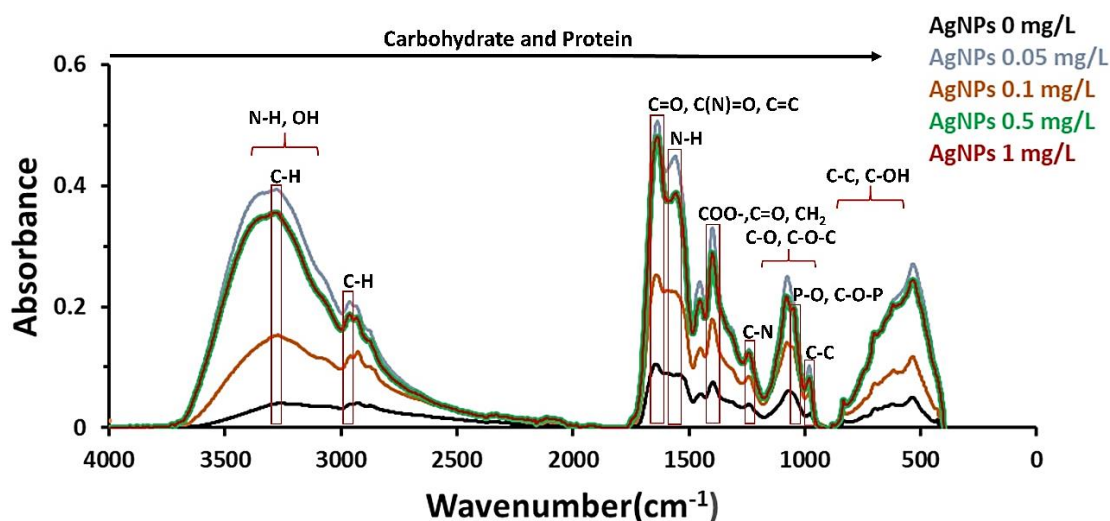
## 2. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ EPS โดยเทคนิค FTIR

ผลกระทบของ AgNPs ที่ทำให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มที่มากขึ้น อาจทำให้หมู่ฟังก์ชันของไบโอฟิล์มเปลี่ยนแปลงไปได้ จึงศึกษาหมู่ฟังก์ชันของ EPS ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อไบโอฟิล์มรับสัมผัส AgNPs ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/L ด้วย FTIR spectroscopy (เทคนิค ATR) ผลการวิเคราะห์ ดังภาพ 10 แสดงให้เห็นว่าสารที่เป็นส่วนประกอบของไบโอฟิล์มที่รับสัมผัส AgNPs ทุกความเข้มข้น มีหมู่ฟังก์ชันของ EPS ที่เหมือนกัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม (ความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 0 mg/L) ทราบได้จากลักษณะของพีค (wavenumber หรือเลขคลื่น) ที่ใกล้เคียงกัน และพีคที่เกิดขึ้นยืนยันผลการสกัด EPS ว่าเป็นหมู่ฟังก์ชันของคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจากกราฟสรุปได้ว่า คาร์โบไฮเดรตและ

โปรตีนเกิดพีคขึ้นในช่วง Wavenumber ที่  $3435-600\text{ cm}^{-1}$  (Ding et al., 2019) สามารถอธิบายได้ดังนี้

พีคที่บ่งบอกว่าเป็นพีคของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ พีคของหมู่ฟังก์ชัน C-O-C, C-O stretching ที่ช่วง  $1200-1000\text{ cm}^{-1}$  พีคของหมู่ฟังก์ชัน C-C, C-OH ที่ช่วง  $900-600\text{ cm}^{-1}$  พีคของหมู่ฟังก์ชัน P-O, C-O-P ที่  $1115\text{ cm}^{-1}$  ของ polysaccharide และ พีคของหมู่ฟังก์ชัน C-C ที่  $987\text{ cm}^{-1}$  (Wei et al., 2011; Xue et al., 2013; Kavita et al., 2014; Zhao et al., 2016; Ding et al., 2019)

พีคที่บ่งบอกว่าเป็นพีคของโปรตีน ได้แก่ พีคของหมู่ฟังก์ชัน C-N ที่  $1241\text{ cm}^{-1}$  ของ amide III พีคของหมู่ฟังก์ชัน COO-, C=O, CH<sub>2</sub> ที่ช่วง  $1443-1413\text{ cm}^{-1}$  ของ carboxyl groups พีคของหมู่ฟังก์ชัน N-H ที่  $1540\text{ cm}^{-1}$  ใน amide groups พีคของหมู่ฟังก์ชัน C=O, C(N)=O, C=C ที่ช่วง  $1648-1632\text{ cm}^{-1}$  ของ amide groups พีคของหมู่ฟังก์ชัน C-H ที่  $2961\text{ cm}^{-1}$  ของ aliphatic CH<sub>2</sub> group พีคของหมู่ฟังก์ชัน C-H ที่  $3236\text{ cm}^{-1}$  พีคของหมู่ฟังก์ชัน N-H, OH ที่ช่วง  $3435-3120\text{ cm}^{-1}$  ของ amide groups (Wei et al., 2011; Xue et al., 2013; Kavita et al., 2014; Zhao et al., 2016; Ding et al., 2019)



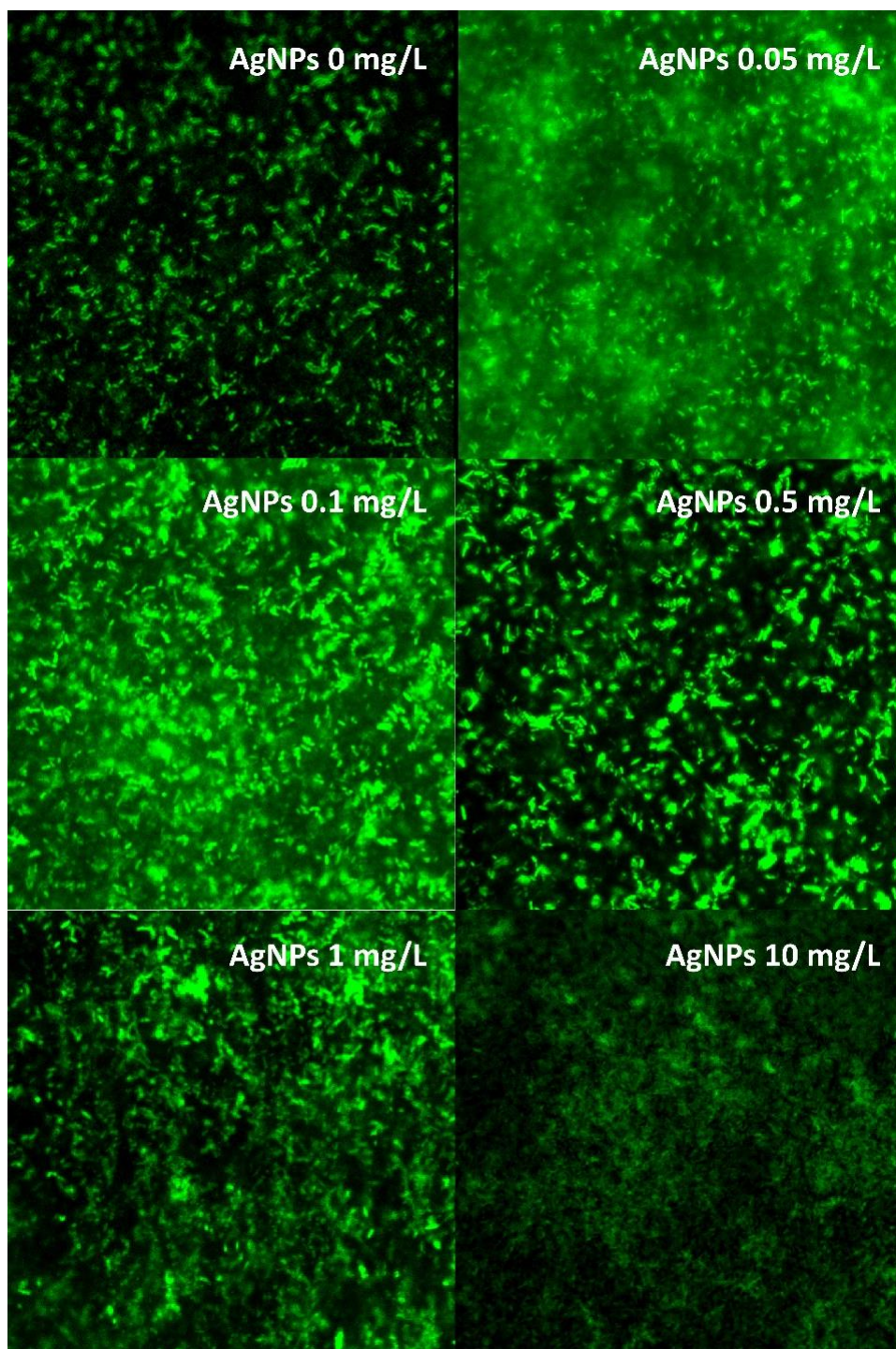
ภาพ 10 อินฟราเรดสเปกตรัมของ EPS ของ *P. putida* KT2440 ที่มีอนุภาคซิลเวอร์นาโน ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/L

### 3. การศึกษาลักษณะของไบโอฟิล์มด้วย CLSM

ศึกษาลักษณะและปริมาณของไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* KT2440 ที่รับสัมผัส AgNPs ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 10 mg/L (ชั่วโมงที่ 18 ใน 24 well plate) ด้วยการย้อมสี ฟลูออเรสเซนซ์จากชุด FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit สำหรับศึกษาปริมาณไบโอฟิล์ม ประกอบด้วย SYTO 9 (สีเขียว) และ PI (สีแดง) นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ CLSM สามารถเห็นลักษณะของไบโอฟิล์มได้ ดังภาพ 11 โดยปริมาณไบโอฟิล์มที่มีชีวิต แสดงด้วยความเข้มของสีเขียว พบว่าไบโอฟิล์มที่เจริญเติบโตที่ AgNPs 0.05 และ 0.1 mg/L มีปริมาณที่แสดงด้วยสีเขียวชัดเจนกว่าชุดควบคุม (AgNPs 0 mg/L) และมากที่สุดสอดคล้องกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตดังตารางที่ 1 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ AgNPs เป็น 0.5 และ 1 mg/L พบว่าไบโอฟิล์มมีปริมาณลดลงแต่ยังคงค่อนข้างมากกว่าชุดควบคุม และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น AgNPs จนเป็น 10 mg/L จะทำให้ไบโอฟิล์มมีปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุมเมื่อสังเกตจากสีเขียวที่เกิดขึ้น

อีกทั้งยังได้ยืนยันผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ CLSM จากการวิเคราะห์ภาพโดยใช้โปรแกรม ImageJ ดังตาราง 2 ซึ่งจะวิเคราะห์ได้จากค่าเฉลี่ยระดับเทา (Mean gray value) และผลรวมของค่าข้อมูลภายในพื้นที่ (Integrated Density) ของสีเขียว จากตารางแสดงให้เห็นว่าไบโอฟิล์มที่เจริญเติบโตที่ AgNPs 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/L มีค่าเฉลี่ยและผลรวมของค่าข้อมูลภายในพื้นที่สูงกว่าชุดควบคุม (AgNPs 0 mg/L) และที่ความเข้มข้น AgNPs ที่ 10 mg/L มีค่าเฉลี่ยและผลรวมของค่าข้อมูลภายในพื้นที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุม

จากผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าการเติมอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้นในปริมาณที่ต่ำในการเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* KT2440 ไม่มีผลกระทบต่อองค์ประกอบ แต่มีผลต่อปริมาณของไบโอฟิล์มทำให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น



ภาพ 11 ภายใต้กล้อง Confocal Laser Scanning Microscope

ตาราง 2 การวิเคราะห์ภาพไบโอฟิล์มภายใต้กล้อง CLSM โดยใช้โปรแกรม ImageJ

ความเข้มข้นของ AgNPs (mg/L)	Area	Mean gray value	Integrated Density
0	99999711	33.706	3370629520.000
0.05	99999711	109.900	10989991259.000
0.1	99999711	112.517	11251660875.000
0.5	99999711	67.338	6733752104.000
1	99999711	61.380	6137962259.000
10	99999711	35.817	3581669167.000



## บทที่ 5

### บทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. putida* สายพันธุ์ KT2440 พบว่า แบคทีเรียมีแนวโน้มสร้างไบโอฟิล์มมากขึ้นเมื่อได้รับสัมผัส AgNPs ความเข้มข้น 0 – 1 mg/L โดยยืนยันจากผลของการย้อมสีคริสตัลไวโอเล็ต ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนของ EPS ของไบโอฟิล์ม และลักษณะของไบโอฟิล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ CLSM ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยที่องค์ประกอบทางเคมีของไบโอฟิล์มไม่เปลี่ยนแปลงไปดังแสดงจากผลวิเคราะห์ FTIR spectroscopy

ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นผลกระทบของการตกค้างในสิ่งแวดล้อมของ AgNPs ที่แม้อาจมีความเข้มข้นไม่สูงนัก แต่สามารถรบกวนกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม ทำให้เกิดปริมาณไบโอฟิล์มที่มากกว่าปกติ และอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางชีวภาพอื่น ๆ ในสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับไบโอฟิล์ม อาทิ การสร้างไบโอฟิล์มที่มากขึ้นทำให้แบคทีเรียไม่สามารถหลั่งสาร Indole-3-acetic acid ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญอยู่ในกลุ่มออกซิน (Auxin) มีบทบาทสำคัญต่อการงอกของเมล็ด การยืดยาวของเซลล์และการแบ่งเซลล์ของพืช (Slavov et al., 2003) มีส่วนเกี่ยวข้องในแทบทุกด้านของการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช (Spaepen et al., 2007) เป็นต้น

ตาราง 3 สรุปผลการเพิ่มขึ้นของปริมาณไบโอฟิล์มจากการรับสัมผัส AgNPs ความเข้มข้นต่ำ

ความเข้มข้น AgNPs ที่ใช้ (mg/L)	ปริมาณไบโอฟิล์ม ที่วัดด้วย CV (Absorbance)	ปริมาณของ คาร์โบไฮเดรต ใน EPS ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )	ปริมาณ ของโปรตีน ใน EPS ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )	ปริมาณไบโอฟิล์มภายใต้ กล้อง CLSM
0	1.6549	0.06240	0.01224	-
0.05	1.8536	0.06387	0.01741	มากกว่าชุด ควบคุมมาก
0.1	1.5320	0.06728	0.01419	มากกว่าชุด ควบคุมมาก
0.5	1.6676	0.06406	0.01929	มากกว่าชุด ควบคุมเล็กน้อย
1	1.4030	0.06222	0.01695	มากกว่าชุด ควบคุมเล็กน้อย

#### ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

- ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มเพื่ออธิบายกลไกที่เกิดขึ้นจากผลกระทบของ AgNPs
- ศึกษาผลกระทบของ AgNPs ต่อแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นที่เป็นประโยชน์ในสิ่งแวดล้อมที่อาจปนเปื้อนด้วยผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ AgNPs

## บรรณานุกรม

- Agency, E. P. (2002). **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. Retrieved March 1, 2019, from [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual\\_2002.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual_2002.pdf)
- Alshareef, A., Laird, K., and Cross, R. (2017). Shape-dependent antibacterial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* bacterium. **Applied Surface Science**, 424(3), 310–315.
- Asoro, M. A., Damiano, J., and Ferreira, P. J. (2009). Size effects on the melting temperature of silver nanoparticles: In-situ TEM observations. **Microscopy and Microanalysis**, 15(2), 706–707.
- Bailey, R. (2018). **Phases of the Bacterial Growth Curve**. Retrieved March 15, 2019, from <https://www.thoughtco.com/bacterial-growth-curve-phases-4172692>
- Bal, H. B., Das, S., Dangar, T. K., and Adhya, T. K. (2013). ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. **Journal of Basic Microbiology**, 53(12), 972–984.
- Belda, E., Heck, R. G., Sanchez, M. J., Cruveiller, S., Barbe, V., and Fraser, C., et al. (2016). The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. **Environmental Microbiology**, 18(10), 3403–3424.
- Benn, T. M., and Westerhoff, P. (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. **Journal of Environmental Science and Technology**, 42, 4133–4139.
- Breyers, J. D., and Ratner, B. D. (2004). Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **American Society for Microbiology**, 70, 232–237.
- Burrell, R. E., Heggors, J. P., Davis, G. J., and Wright, B. (1999). Efficacy of Silver-Coated Dressings as Bacterial Barriers in a Rodent Burn Sepsis Model. **Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice**, 11(4), 64–71.
- Ding, X. S., Zhao, B., An, Q., Tian, M., and Guo, J. S. (2019). Role of extracellular polymeric substances in biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 103, 9169–9180.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, 8(9), 881–890.

- Flemming, H. C., Neu, T. R., and Wozniak, D. J. (2007). The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. **Journal of Bacteriology**, 189(22), 7945–7947.
- Flemming, H. C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, 8, 623–633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Griegbe, T., and Mayer, C. (2000). **Physico-chemical properties of biofilms**. Retrieved March 15, 2019, from [https://www.researchgate.net/publication/227033178\\_Introduction\\_to\\_Biofilms](https://www.researchgate.net/publication/227033178_Introduction_to_Biofilms)
- Galli, E., Silver, S., & Witholt, B. (2012). **Pseudomonas: molecular biology and biotechnology**. Washington D.C: American Society for Microbiology.
- Gambino, M., Marzano, V., Villa, F., Vitali, A., Vannini, C., and Landini, P., et al. . (2015). Effects of sublethal doses of silver nanoparticles on *Bacillus subtilis* planktonic and sessile cells. **Journal of Applied Microbiology**, 118, 1103–1115.
- Garrison, A. T., and Huigens, R. W. (2017). Eradicating Bacterial Biofilms with Natural Products and their Inspired Analogues that Operate Through Unique Mechanisms. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 17, 1–8.
- Garuglieri, E., Meroni, E., Cattò, C., Villa, F., Cappitelli, F., and Erba, D. (2017). Effects of Sub-lethal Concentrations of Silver Nanoparticles on a Simulated Intestinal Prokaryotic-Eukaryotic Interface. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1–13.
- Ghafoor, A., Hay, I. D., and Rehm, B. H. A. (2011). Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. **Applied and Environmental Microbiology**, 77(15), 5238–5246.
- Gupta, I. R., J., A. A., and Rai, M. (2015). Toxicity of fungal-generated silver nanoparticles to soil-inhabiting *Pseudomonas putida* KT2440, a rhizospheric bacterium responsible for plant protection and bioremediation. **Journal of Hazardous Materials Volume**, 286, 48–54.
- Jahn, A., Griebe, T., and Nielsen, P., H. . (1999). Composition of *Pseudomonas putida* Biofilms: **Accumulation of Protein in the Biofilm Matrix**. **Biofouling**, 14(1), 49–45.
- Jamal, M., Hussain, T., Das, C. R., and Andleeb, S. (2015). Characterization of Siphoviridae phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm. **Journal of Medical Microbiology**, 64, 454–462.
- Kavita, K., Singh, V. K., Mishra, A., and Jha, B. (2014). Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. **Carbohydrate Polymers**, 101, 29–35.

- Khan, S., Mukherjee, A., and Chandrasekaran, N. (2011). Silver nanoparticles tolerant bacteria from sewage environment. **Journal of Environmental Sciences**, 23(2), 346–352.
- Lavakush, Yadav, J., Verma, J. P., Jaiswal, D. K., and Kumar, A. (2014). Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). **Ecological Engineering**, 62, 123–128.
- Lee, Y., Oh, S., and Park, W. (2009). Inactivation of the *Pseudomonas putida* KT2440 *dsbA* gene promotes extracellular matrix production and biofilm formation. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, 297, 38–48.
- Liu, H., and Fang, H. H. P. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. **Journal of Biotechnology**, 95, 249–256.
- Marambio-Jones, C., and Hoek, E. M. (2010). A Review of the Antibacterial Effects of Silver Nanomaterials and Potential Implications for Human Health and the Environment. **Journal of Nanoparticle Research**, 12, 1531–1551.
- Marianne. (2019). **How Biofilms Work**. Retrieved April 21, 2019, from <https://science.howstuffworks.com/life/cellularmicroscopic/biofilm.htm>
- Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynolds, B., and Lazarovits, G. (2010). Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, 42, 1848–1856.
- Melissa, A., Jones, M., , Gunsolus, I. L., Murphy, C. J., and Haynes, C. L. (2013). Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. **Analytical Chemistry**, 85(6), 3036–3049.
- Ming, X., Stein, T. P., Barnes, V., Rhodes, N., and Guo, L. (2012). Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: a metabolomics study. **Journal of Proteome Research**, 11(12), 5856–5862.
- Moore, A., and Goettmann, F. (2006). The Plasmon Band in Noble Metal Nanoparticles: An Introduction to Theory and Applications. **New Journal of Chemistry**, 30(8), 1121–1132.
- More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of Environmental Management**, 144, 1–25.
- Morones, J. R. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Journal of Nano-technology**, 16(10), 2346–2353.

- Muñoz, R. C., et al., (2017). Conventional and technical diving surveys reveal elevated biomass and differing fish community composition from shallow and upper mesophotic zones of a remote United States coral reef. **Plos One**, 12(11), 1–25.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., and Foster, K. R. (2009). The sociobiology of biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, 33(1), 206–224.
- Nüsslein, K., Maris, D., Timmis, K., and Dwyer, D. F. (1992). Expression and Transfer of Engineered Catabolic Pathways Harbored by *Pseudomonas* spp. Introduced into Activated Sludge Microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, 58(10), 3380–3386.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review of Microbiology**, 54, 49–79.
- Ogasawara, H., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2011). Role of the Biofilm Master Regulator CsgD in Cross-Regulation between Biofilm Formation and Flagellar Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 193(10), 2587–2597.
- Potthast, K., Hamer, U., and Makeschin, F. (2012). Land-use change in a tropical mountain rainforest region of southern Ecuador affects soil microorganisms and nutrient cycling. **Biogeochemistry**, 111, 151–167.
- Puay, N. Q., Qiu, G., and Ting, Y. P. (2015). Effect of Zinc oxide nanoparticles on biological wastewater treatment in a sequencing batch reactor. **Journal of Cleaner Production**, 88, 139–145.
- Radziuk, D., Skitach, A., Sukhorukov, G., and Shchukin, D. G. (2007). Stabilization of Silver Nanoparticles by Polyelectrolytes and Poly(ethylene glycol). **Macromolecular Rapid Communications**, 28(7), 848 – 855.
- Ranville, M. A., and Flegal, A. R. (2005). Silver in the North Pacific Ocean. **Geochemistry Geophysics Geosystems**, 6(3), 1–8.
- Samarajeewa, A. D. (2017). Effect of silver nano-particles on soil microbial growth, activity and community diversity in a sandy loam soil. **Journal of Environmental pollution**, 504–513.
- Sheng, Z., Nostrand, V., Zhou, J. D., and Liu, Y. (2011). Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. **Journal of Water Research**, 45(18), 6039–6050.

- Sheng, Z., Nostrand, V., Zhou, J. D., and Liu, Y. (2015). The effects of silver nanoparticles on intact wastewater biofilms. **Frontiers in Microbiology**, 6, 680.
- Singha, T. K. (2012). Microbial Extracellular Polymeric Substances: Production, Isolation and Applications. **International Organization of Scientific Research Journal of Pharmacy**, 2(2), 276–281.
- Skirtach, A. G., Antipov, A. A., Shchukin, D. G., and Sukhorukov, G. (2004). Remote activation of capsules containing Ag nanoparticles and IR dye by laser light. **Langmuir**, 20, 6988–6992.
- Slavov, e. a. (2003). A Simple and Rapid Plate Assay for the Screening of Indole-3-acetic Acid (IAA) Producing Microorganisms. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, 2, 120–123.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, 31(4), 425–448.
- Sule, P., et al.,. (2009). A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants. **Letters in Applied Microbiology**, 49(3), 299–304.
- Sun, R. W., Chen, R., Chung, N. P., Ho, C. M., Lin, C. L., and Che, C. M. (2005). Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. **Chemical Communications**, 40, 5059–5061.
- Thuptimdang, P., Limpiyakorn, T., and Khan, E. (2017). Dependence of toxicity of silver nanoparticles on *Pseudomonas putida* biofilm structure. **Chemosphere**, 188, 199–207.
- Thuptimdang, P., Limpiyakorn, T., McEvoy, J., Prüß, B. M., and Khan, E. (2015). Effect of silver nanoparticles on *Pseudomonas putida* biofilms at different stages of maturity. **Journal of Hazardous Materials Volume**, 290, 127–133.
- Todar, K. (2012). **Bacterial Resistance to Antibiotics**. Retrieved March 15, 2019, from [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)
- Tolaymat, T. M., Badawy, A. M., Genaidy, A., Scheckel, K. G., Luxton, T. P., and Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. **Science of the Total Environment**, 408, 999–1006.

Wei, X., et al., . (2011). Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria.

**Environmental Pollution**, 159(2011), 1369–1374.

Wright, J. B., Lam, K., Hansen, D., and Burrell, R. E. (1999). Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. **American Journal of Infection Control**, 27, 344–350.

Xiu, Z. M. (2012). Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles.

**Journal of Nano Letters**, 12(8), 4271–4275.

Xu, Q., Jin, L., Wang, Y., Chen, H., and Qin, M. (2019). Synthesis of silver nanoparticles using dialdehyde cellulose nanocrystal as a multi-functional agent and application to antibacterial paper. **Cellulose**, 26, 1309–1321.

Xue, Z., Hessler, C. M., Panmanee, W., Hassett, D. J., and Seo, Y. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances with chlorine and monochloramine. Federation of European **Microbiological Societies Microbiology Letters**, 83, 101–111.

Yang, L., et al.,. (2011). Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Environmental Microbiology**, 13(7), 1705–1717.

Yang, Y., and Alvarez, P. J. J. (2015). Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles Stimulate Biofilm Development. **Environmental Science & Technology Letters**, 2, 221–226.

Yuan, Z., Li, J., Cui, L., Xu, B., Zhang, H., and Yu, C. P. (2013). Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria. **Chemosphere**, 90(4), 1404–1411.

Zamioudis, C., and Pieterse, C. M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes.

**Molecular Plant-Microbe Interactions**, 25(2), 139–150.

Zhang, H., et al., . (2012). Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. **Free Radical Biology and Medicine**, 52(9), 2038–2046.

Zhao, L., et al., . (2016). Characteristics of extracellular polymeric substances from sludge and biofilm in a simultaneous nitrification and denitrification system under high salinity stress. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 39, 1375–1389.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2554). **จุลชีววิทยาทั่วไป** (พิมพ์ครั้งที่ 9 ed.). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- พนัส เจลิสมแสนยากร. (2558). **แบคทีเรีย**. สืบค้นเมื่อ 12 มกราคม 2561, จาก <http://haamor.com>
- สถาพร คำหอม. (2554). **อนุภาคนาโนของซิลเวอร์**. สืบค้นเมื่อ 12 มกราคม 2561, จาก <https://www.rsu.ac.th/engineer/che/news/News%20Data/Silver.pdf>
- สิริวิโรจน์ ธรรมชัชวาล. (2555). **ประโยชน์ของแบคทีเรีย**. สืบค้นเมื่อ 12 มกราคม 2561, จาก <http://ahjgh.blogspot.com/2012/09/blog-post.html>
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2553). **Nano Safety**. สืบค้นเมื่อ 12 มกราคม 2561, จาก <http://203.157.72.106/fulltext2/public/17223/1.pdf>
- เขมาภรณ์ บุญบำรุง. (2561). **ไบโอฟิล์ม: ผลกระทบต่อการสาธารณสุข**. สืบค้นเมื่อ 20 เมษายน 2562, จาก file:///C:/Users/NITRO/Downloads/596-289289382-1-SM.pdf
- เอี่ยมพร เอี่ยมแพร. (2557). **ประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบจวดยโอกลาส**. สืบค้นเมื่อ 12 มกราคม 2561, จาก <http://science.buu.ac.th/ojs246/index.php/sci/article/viewFile/280/392>





ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยพะเยา

UNIVERSITY OF PHAYAO

## ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารและสารเคมี

### 1. Luria-Bertani (LB) Medium

Luria-Bertani	20 กรัม
Deionized water	1000 มิลลิลิตร

#### วิธีการ

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) Medium จะชั่งตามสูตรอาหารข้างต้น หลังจากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 2. Luria-Bertani (LB) Agar

Luria-Bertani	20 กรัม
Agar	15 กรัม
Deionized water	1000 มิลลิลิตร

#### วิธีการ

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) Agar จะชั่งตามสูตรอาหารข้างต้น หลังจากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเสร็จแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อออกหม้อนึ่งความดัน รอให้อุ่นซักพัก (หากเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ร้อนจัด จะทำให้มีหยดน้ำเกาะบริเวณใต้ฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียได้) จากนั้นเปิดฝาขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทำการลนบริเวณปากขวดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ก่อนเทอาหาร แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงจานอาหารภายในตู้ปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้รอจนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) Agar เย็นและแข็งตัว

### 3. การเตรียม 0.85% NaCl

0.85% NaCl	0.85 กรัม
Deionized water	100 มิลลิลิตร

#### วิธีการ

ในการเตรียม 0.85% NaCl จะชั่งตามสูตรข้างต้น หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 4. การเตรียม Crystal violet

0.1% Crystal violet	0.1 กรัม
Deionized water	100 มิลลิลิตร

## วิธีการ

ในการเตรียม 0.1% Crystal violet จะชั่งตามสูตรข้างต้น หลังจากนั้นเขย่าให้ Crystal violet ละลาย

## 5. การเตรียม Ethanol:Acetone

Ethanol	80 มิลลิลิตร
Acetone	20 มิลลิลิตร

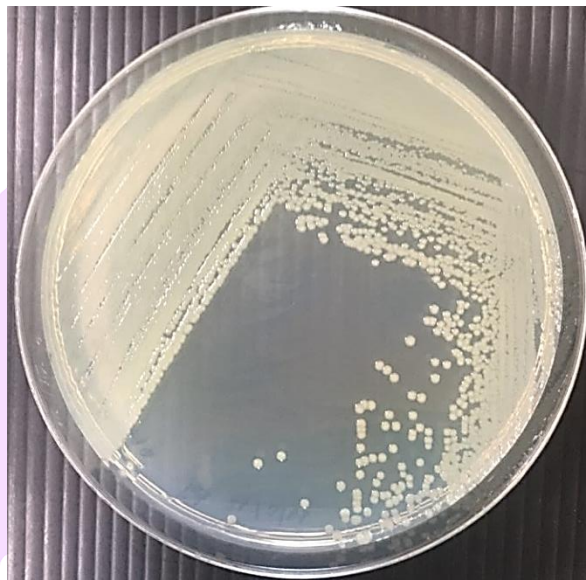
## วิธีการ

ในการเตรียม Ethanol:Acetone จะเตรียมในอัตราส่วนข้างต้น หลังจากนั้นทำการเขย่าเพื่อให้ Ethanol และ Acetone ผสมกัน



ภาคผนวก ข ลักษณะโคโลนี และ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ

1. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440



ภาพ 12 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440

2. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2440



ภาพ 13 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์  
KT2440

## ภาคผนวก ค AgNPs

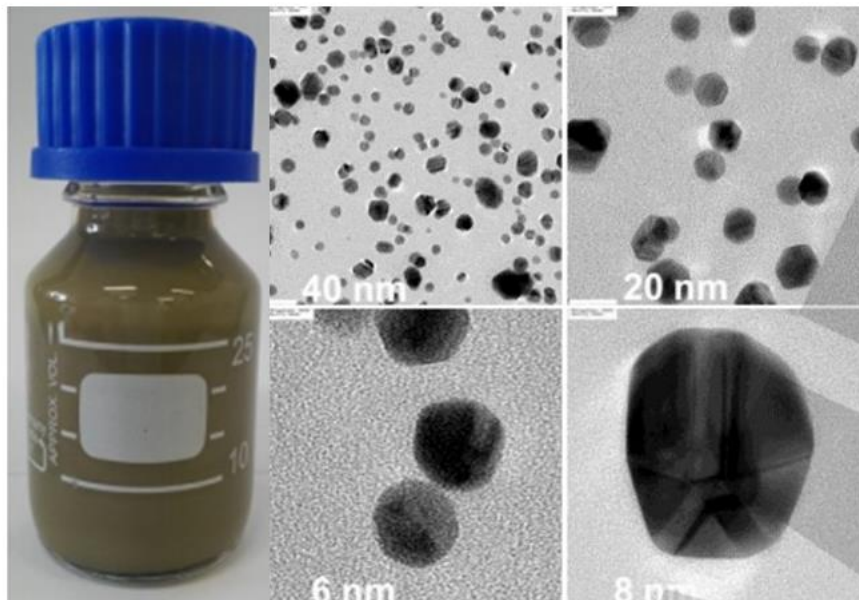
รายละเอียดผลิตภัณฑ์

สูตรเคมี : Ag (CAS No.7440-22-4)

รหัสสินค้า : ag-102

ขนาดอนุภาค : 5-20 นาโนเมตร

รูปร่างของอนุภาค : Nanospheres



ภาพ 14 ลักษณะและขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโน

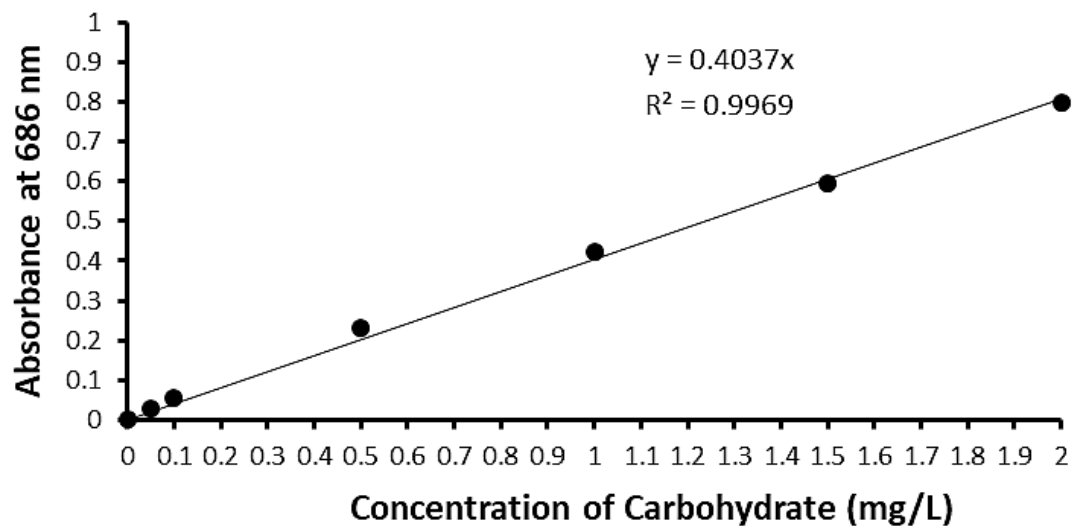
ที่มา: บริษัท ไพรม์ นาโนเทคโนโลยี จำกัด

ภาคผนวก ง Standard ของการวัดปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต

ตาราง 4 Standard of Carbohydrate (Glucose)

ความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตที่เตรียม (mg/L)	Absorbance ที่ 686 nm	ความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรต (mg/L)
0	0.0026	0.006440426
0.05	0.0298	0.073817191
0.1	0.0562	0.139212286
0.5	0.2308	0.571711667
1	0.4233	1.048550904
1.5	0.5958	1.475848402
2	0.7965	1.972999752

หมายเหตุ: Molar absorptivity 0.3246

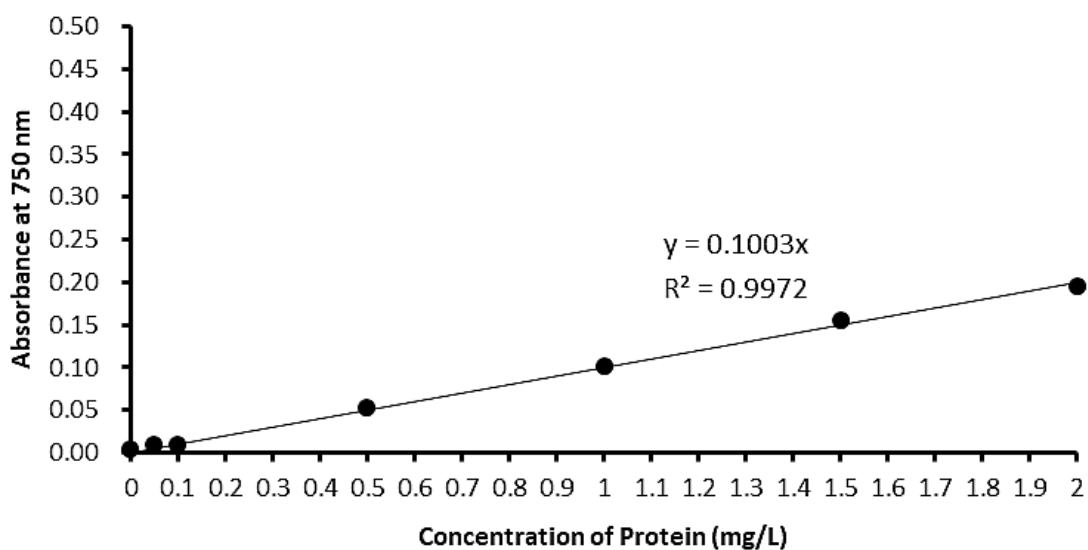


ภาพ 15 Standard of Carbohydrate (Glucose)

ตาราง 5 Standard of Protein (BSA)

ความเข้มข้นของโปรตีนที่เตรียม (mg/L)	Absorbance ที่ 750 nm	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/L)
0	0.0038	0.037886341
0.05	0.0104	0.10402127
0.1	0.0102	0.101694915
0.5	0.0523	0.521768029
1	0.1023	1.020272516
1.5	0.1550	1.545363908
2	0.1953	1.947490861

หมายเหตุ: Molar absorptivity 0.3246



ภาพ 16 Standard of Protein (BSA)



ประวัติผู้วิจัย

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	รุ่งนภา ตาคำ
วัน เดือน ปี เกิด	10 กันยายน 2538
สถานที่เกิด	เชียงราย
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2559 วท.บ. (จุลชีววิทยา), มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	19/28 หมู่ที่ 2 ตำบลแม่กา อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยา 56000
ผลงานตีพิมพ์	Rungnapa Takam (Speaker). (13–15 JUNE 2019). Effect of Silver Nanoparticles on Pseudomonas putida and Bacillus subtilis Biofilm Formation. The 5th EnvironmentAsia International Conference (Page95–104). Convention Center, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand

