บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Disc Diffusion นั้นแสดงบริเวณใส (clear zone) ไม่ชัดเจน น่าจะเกิดจากการแตกตัวเป็นซิลเวอร์ไอออนและการแพร่กระจายในอาหารวุ้นของนาโนซิลเวอร์ในพอลิยูรีเทนนั้นอาจจะไม่เหมาะสม หรืออัตราการแพร่กระจายของอนุภาคซิลเวอร์ไอออนมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ จึงทำให้ผลการทดสอบไม่ชัดเจน แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Broth Dilution Susceptibility Test พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 แสดงให้เห็นว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสทั้ง 3 สปีชีส์ และพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 ppm ยังยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ดื้อยา มีค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (EAA) ร้อยละ 56.43 ซึ่งมากกว่ายาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน อาจเป็นเพราะเมื่อเปลี่ยนวิธีในการทดสอบทำให้ประสิทธิภาพการละลายของซิลเวอร์ไอออนสูงมากขึ้น จึงแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น เนื่องจากซิลเวอร์ไอออนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ซึ่งมีน้ำเป็นตัวทำละลาย ได้ดีกว่าอาหาร MHA ซึ่งมีลักษณะเป็นอาหารวุ้น สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาพบว่าสารละลายนาโนซิลเวอร์ (Aqueous solution) มีความสามารถในการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนออกมา (Sanpui, Murugadoss, Prasadc, Ghosha, & Chattopadhyay, 2008; Morones et al., 2005; Lok et al., 2007) งานวิจัยนี้พิสูจน์ให้เห็นว่า นาโนซิลเวอร์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียน่าจะมาจากซิลเวอร์ไอออนที่ปลดปล่อยออกมาสามารถเข้าไปจับกับหมู่ thiol group ของโปรตีนที่พบในเอนไซม์หลายชนิดของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์แบคทีเรียและทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย ทั้งนี้ยังพบว่าซิลเวอร์ไอออนจะยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียในกลุ่มแอนาโรบิคในอัตราที่ต่ำกว่าแบคทีเรียกลุ่มแอโรบิค จึงคาดว่าซิลเวอร์ไอออนน่าจะยับยั้งกลไกการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน โดยที่ซิลเวอร์ไอออนจะจับกับโปรตีนหรือเอนไซม์ของแบคทีเรียเนื่องจากมีสมบัติเป็น Soft Acid ซึ่งจะจับกับ Soft Base ได้แก่ กำมะถันและฟอสฟอรัส ซึ่งนอกจากพบในโปรตีนแล้วยังเป็นองค์ประกอบหลักของดีเอ็นเอ ส่งผลให้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียเสียสภาพ และยังยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Park et al., 2009)

การศึกษาของ Shrivastava et al. (2007) ชี้ให้เห็นว่านาโนซิลเวอร์รบกวนกระบวนการสื่อสารภายในเซลล์ (Signal Transduction) ของแบคทีเรียเนื่องจากนาโนซิลเวอร์จะเข้าไปจับกับ

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (Phosphorylation) ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่เป็นสัญญาณสื่อสารของแบคทีเรีย (Signal Protein) กลไกต่าง ๆ ภายในเซลล์จึงถูกยับยั้งและส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด นอกจากนี้งานวิจัยนี้พิสูจน์ให้เห็นว่านาโนซิลเวอร์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากลักษณะของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบนั้นจะมีเพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ที่บางกว่าและมีชั้นไขมันซึ่งมีโปรตีนประจุลบเป็นองค์ประกอบจึงทำให้อนุภาคนาโนซิลเวอร์แทรกซึมเข้าไปจับกับโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li, Xie, Shi, Zeng, OU-Yang, and Chen (2010) ที่พบว่านาโนซิลเวอร์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* ได้ เพราะนาโนซิลเวอร์จะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane) ของแบคทีเรีย ทำให้เซลล์เสียรูปทรงและเกิดรูเล็ก ๆ บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ออกมา หรือทำให้น้ำแพร่เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียทำให้เซลล์แตกตายในที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่านาโนซิลเวอร์จะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Inner membrane) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียและยับยั้งกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เนื่องจากนาโนซิลเวอร์มีผลต่อโปรตีนและฟอสโฟลิปิดจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด ดังนั้นกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วย พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ น่าจะเกิดจากปัจจัยสอง ปัจจัยคือซิลเวอร์ไอออนที่ถูกปลดปล่อยออกมา และจากอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่ผสมอยู่ในพอลิยูรีเทนซึ่งจะสัมผัสกับแบคทีเรียเมื่ออยู่ในอาหารเหลว

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ดื้อยา ด้วยวิธี Broth Dilution Susceptibility Test พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* ดื้อยา ต่ำกว่า *P. aeruginosa* ที่ไม่ดื้อยา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pournaras et al. (2007) ที่ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตต่อช่วงเวลา (growth curve) ระหว่าง *P. aeruginosa* ดื้อยาและไม่ดื้อยา พบว่า เชื้อดื้อยาจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งปัจจัยที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตช้านั้นอาจมาจากกลไกการปรับตัวทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียให้สามารถต่อต้านยาปฏิชีวนะได้ ส่งผลให้เกิดสภาวะความเครียดและขาดสารอาหารที่จำเป็นทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงในช่วงที่อัตราการเจริญเติบโตช้าหรือไม่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับการต่อต้านยาปฏิชีวนะ โดยการแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้าหรือไม่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จะดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้น (Mah & O'Toole, 2001)

การศึกษาความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของนาโนซิลเวอร์ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้นสูงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้สูงขึ้น สอดคล้องกับรายงานการวิจัย

ของ Paul, Sarkar, Pal, Das, and Manna (2012) ซึ่งรายงานว่าอนุภาคนาโนฟลูอิดผสมนาโนซิลเวอร์ที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้อนุภาคของนาโนซิลเวอร์มีขนาดเล็กลง และขนาดที่เล็กลงจะทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสูงขึ้น เพราะนาโนซิลเวอร์สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ปริมาณมากและง่ายขึ้น เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยที่ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียระหว่างพอลิอีเทอร์ยูรีเทน (Polyetherurethane) ผสมนาโนซิลเวอร์ขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ พบว่ายิ่งขนาดของนาโนซิลเวอร์มีขนาดเล็กก็จะยิ่งทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากขึ้น (Liu, Dai, Fu, & Hsu, 2010) และการเตรียมพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้นมาก จะทำให้มีอัตราการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนออกจากพอลิยูรีเทนมากขึ้นเช่นกัน ส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ดีที่ความเข้มข้นของนาโนซิลเวอร์สูงมากขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Zapata, Tamayo, Páez, Cerda, Azócar, and Rabagliati (2011) ที่กล่าวว่า พอลิเอทิลีน (Polyethylene) ผสมนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้นสูงจะมีอัตราการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนสูงขึ้น และจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* สูงกว่าพอลิเอทิลีนที่ไม่ผสมนาโนซิลเวอร์ร้อยละ 99 แต่เมื่อเตรียมความเข้มข้นของนาโนซิลเวอร์ต่ำ อาจทำให้อัตราการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนอาจจะอยู่ในระดับที่ไม่แน่นอน หรือปลดปล่อยได้น้อยลง ส่งผลให้การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมีแนวโน้มที่ไม่คงที่

การศึกษาผลของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา (time-kill curve assay) พบว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลทำให้จำนวนโคโลนีแบคทีเรียลดลงจากจำนวนเริ่มต้นถึงชั่วโมงที่ 6 และทำให้จำนวนโคโลนีมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 903.43 เท่าในชั่วโมงที่ 8 แต่เมื่อเวลาผ่านไปจะการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องการทดสอบประสิทธิภาพของ Ag vanadate nanowires ต่อการเจริญเติบโตของ *E. coli* พบว่าจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 8 จากนั้นจำนวนโคโลนีจะเพิ่มขึ้น แต่ยังน้อยกว่ากลุ่มควบคุม คาดว่าผลิตภัณฑ์จากของเสียที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของเซลล์และซากโปรตีนของแบคทีเรียที่แตกสลาย อาจจะไปรบกวนการทำงานของนาโนซิลเวอร์ หรือลดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างวัสดุผสมและแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตทำให้หลังจากชั่วโมงที่แปดจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น (Holtz, Lima, Filho, Brocchi, & Alves, 2012)

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการเตรียมฟิล์มที่แตกต่างกัน ได้แก่ 25, 60 และ 80 องศาเซลเซียส ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส พบว่าให้ผลการทดสอบ เช่นเดียวกับการทดลองของ Sedlarlk et al. (2010) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Poly(vinyl aclcohol)) ผสมซิลเวอร์ไนเตรทที่เตรียมฟิล์มด้วยอุณหภูมิ

แตกต่างกัน พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อคุณสมบัติของความยืดหยุ่นและการละลายน้ำของพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน ความยืดหยุ่นและการละลายน้ำที่เพิ่มขึ้นอาจกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนสู่สารละลายมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC25913 *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาและไม่ดื้อยา และ *P. mirabilis* ได้แตกต่างกัน และให้ค่า MIC ระหว่าง 100 – 1000 ppm โดยพบว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพดีที่สุด จึงนำ *P. aeruginosa* มาศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ โดยการวัดอัตราการเติบโตของแบคทีเรียต่อหน่วยของเวลา เมื่อใช้พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 1000 ppm ในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ในช่วง log phase และผลของอุณหภูมิในการเตรียมฟิล์มพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าการเตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 และ 60 องศาเซลเซียส จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 ซึ่งอาจจะพัฒนาพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เป็นเวชภัณฑ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกซึ่งก่อให้เกิดโรคในโรงพยาบาลในปัจจุบัน เช่น MRSA
2. ศึกษากลไกการยับยั้ง *P. aeruginosa* ดื้อยาเพิ่มเติม และปรับเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้อัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น และเปรียบเทียบกับ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยา
3. ควรทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์หรือเซลล์มนุษย์เพิ่มเติม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University