บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมฟิล์มด้วยอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมฟิล์มด้วยอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสด้วยวิธี Agar Disc Diffusion Susceptibility Test พบว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้น 200 ppm แต่ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ไม่ให้ผลการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินพบว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์มีประสิทธิภาพน้อยกว่ายาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด ส่วนพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *P. mirabilis* ส่วนยาเตตราซัยคลินยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิด แสดงดังตารางที่ 4-1 อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธี Agar Diffusion Susceptibility Test ยังแสดงผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่ชัดเจน

ตารางที่ 4-1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย 3 ชนิด ของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิเมตร)							
	40 ppm	100 ppm	200 ppm	500 ppm	1000 ppm	Control		
						PU	AMP 10 μg/ดิสก์	TET 30 μg/ดิสก์
E. coli ATCC 25913	-	-	-	-	-	-	-	7.00±0.00
P. aeruginosa	-	-	7.00±0.17	7.00±0.17	-	-	-	21.17±0.06
P. mirabilis	-	-	-	-	-	-	21.67±0.17	9.67±0.06

หมายเหตุ: - หมายถึง เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร อักษรย่อ PU หมายถึง พอลิยูรีเทน AMP หมายถึง ยาแอมพิซิลลิน TET หมายถึง ยาเตตราซัยคลิน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

เมื่อนำพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์มาทดสอบด้วยวิธี Broth dilution Susceptibility Test ให้ผลการทดสอบชัดเจนมากขึ้น กล่าวคือ พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* และ *P. mirabilis* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 100 ppm และน้อยที่สุดคือ *E. coli* ATCC 25913 และ *P. aeruginosa* ดื้อยา มีค่า MIC เท่ากับ 1000 ppm และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินพบว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์มีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามการแปลผลอาจจะคลาดเคลื่อนเนื่องจากปริมาณยาที่นำมาเปรียบเทียบไม่เท่ากับนาโนซิลเวอร์ที่ผสมในพอลิยูรีเทน หรืออัตราการแพร่กระจายของซิลเวอร์ไอออนอาจจะต่ำ จึงมีโอกาสสัมผัสกับเชื้อทั้งสามชนิดได้น้อยกว่ายาทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่าจำนวนโคโลนีมาเปรียบเทียบค่าทางสถิติ พบว่ากลุ่มที่ทดสอบด้วยพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์มีความแตกต่างกับพอลิยูรีเทนที่ไม่ผสมนาโนซิลเวอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 แสดงดังตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-1

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยค่า The effectiveness of the PU-silver nitrate antibacterial activity (EAA)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสด้วยค่า EAA พบว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. aeruginosa* สูงที่สุดร้อยละ 86.70 รองลงมาคือประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. mirabilis* มีค่า EAA ร้อยละ 74.14 เมื่อใช้พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 200 ppm และพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 ppm ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25913 ได้ร้อยละ 60.97 แต่พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. aeruginosa* ดื้อยา ต่ำที่สุด มีค่า EAA ร้อยละ 56.43 อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่า EAA กับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินพบว่ายาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดยับยั้งแบคทีเรียได้ ร้อยละ 29.75 และ 26.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-3 และภาพที่ 4-2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้นของนาโนซิลเวอร์ 1000 ppm ดังแสดงด้วยค่า EAA และ MIC (ตารางที่ 4-2 และ 4-3) จากนั้นจึงเลือก *P. aeruginosa* มาพิจารณาประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ต่อหน่วยเวลาในตอนต่อไป อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* กับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินคือ ร้อยละ 86.65 และ 98.75 ตามลำดับ

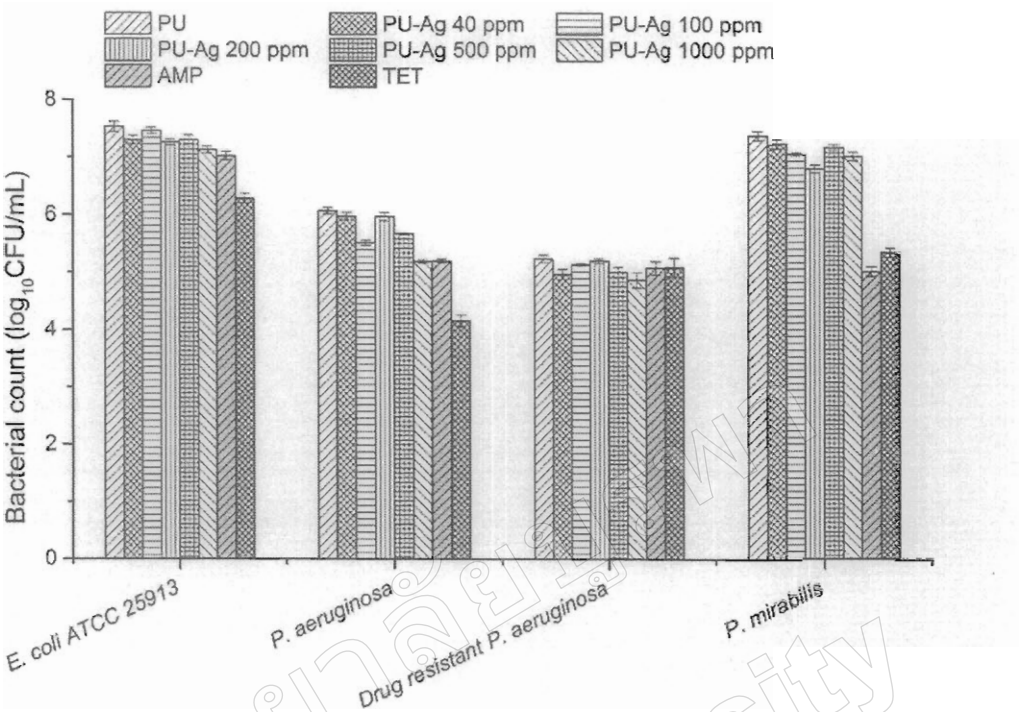
ตารางที่ 4-2 จำนวนโคโลนีแบคทีเรียในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Broth dilution Susceptibility Test

เชื้อแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี ($\times 10^5$ CFU/mL)								MIC (ppm)
	PU-Ag 40 ppm	PU-Ag 100 ppm	PU-Ag 200 ppm	PU-Ag 500 ppm	PU-Ag 1000 ppm	Control PU	Control AMP 10 µg/ดิสก์	Control TET 30 µg/ดิสก์	
E. coli ATCC 25913	199.67 ± 33.50^{de}	286.67 ± 35.12^{fg}	180.67 ± 20.65^{cde}	200.67 ± 38.55^{de}	134.00 ± 18.68^{bcd}	343.33 ± 66.58^{g}	61.33 ± 15.89^{ab}	2.43 ± 0.49^{a}	1000
P. aeruginosa	9.50 ± 1.42^{d}	3.23 ± 0.29^{bc}	9.30 ± 1.48^{d}	4.67 ± 0.15^{c}	1.56 ± 1.22^{ab}	11.70 ± 1.57^{e}	1.57 ± 1.17^{ab}	0.15 ± 3.23^{a}	100
P. aeruginosa ดื้อยา	0.94 ± 0.19^{a}	1.36 ± 0.06^{abc}	1.58 ± 0.15^{bc}	1.01 ± 0.22^{ab}	0.76 ± 0.21^{a}	1.74 ± 0.25^{c}	1.22 ± 0.33^{abc}	1.28 ± 0.44^{abc}	1000
P. mirabilis	165.67 ± 29.70^{d}	110.67 ± 9.29^{bc}	62.33 ± 9.29^{b}	145.33 ± 15.82^{cd}	102.67 ± 16.65^{bc}	241.00 ± 41.94^{e}	1.03 ± 0.21^{a}	22.13 ± 0.42^{a}	100

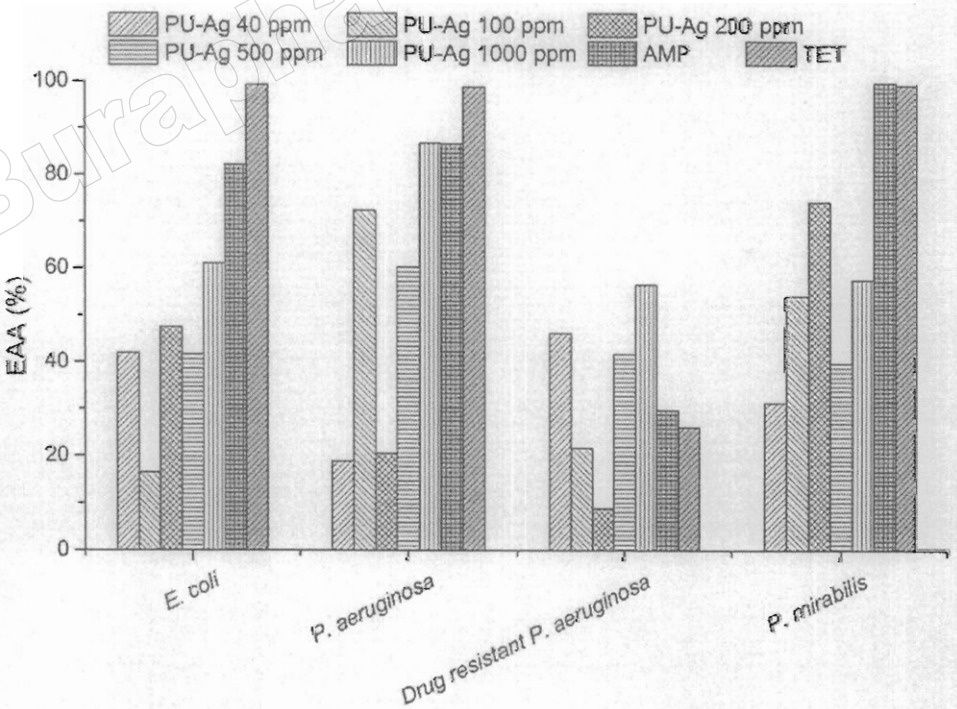
หมายเหตุ: ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

ตารางที่ 4-3 ประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (EAA)

แบคทีเรีย	ประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (ร้อยละ)						
	PU-Ag 40 ppm	PU-Ag 100 ppm	PU-Ag 200 ppm	PU-Ag 500 ppm	PU-Ag 1000 ppm	AMP 10 µg	TET 30 µg
E. coli ATCC 25913	41.84	16.50	47.38	41.55	60.97	82.14	99.29
P. aeruginosa	18.80	72.36	20.51	60.11	86.70	86.55	98.75
P. aeruginosa ดื้อยา	46.07	21.69	8.83	41.65	56.43	29.75	26.10
P. mirabilis	31.26	54.08	74.14	39.70	57.40	99.57	90.82



ภาพที่ 4-1 เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (Log_{10}CFU ต่อมิลลิลิตร) พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4-2 ประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (EAA)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาผลของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา (Time-kill assay)

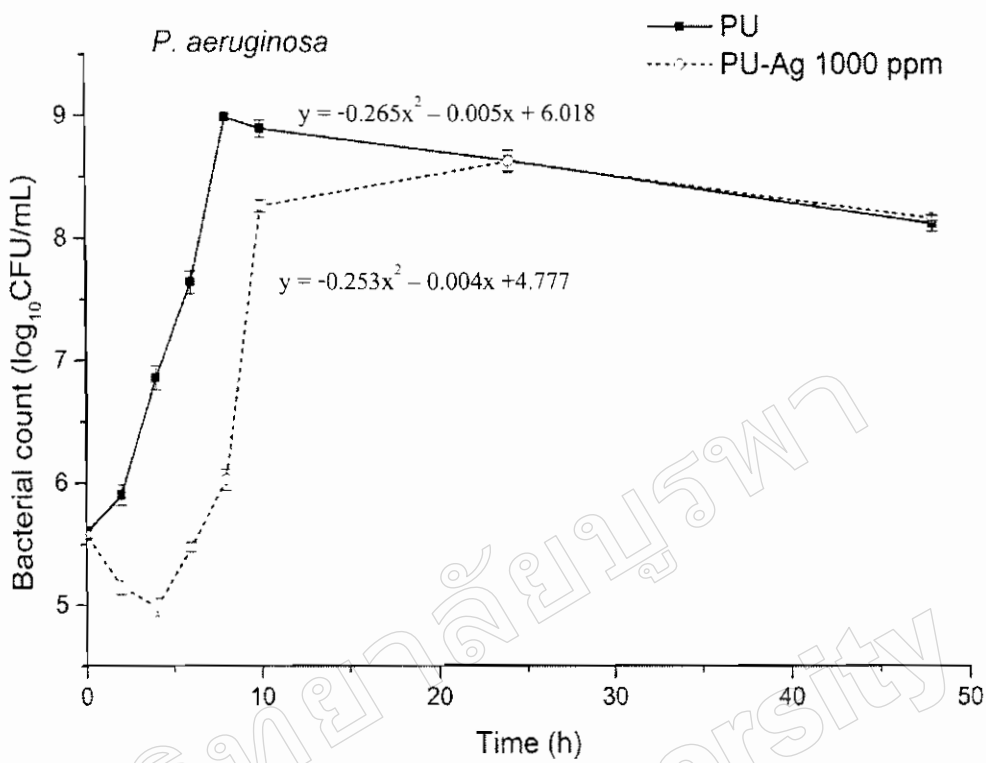
การศึกษาการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อหน่วยเวลาพบว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 ppm ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 4 และ 6 กล่าวคือ จำนวนโคโลนีแบคทีเรียจะลดลงจากเวลาเริ่มต้น คือ ร้อยละ 8.38, 11.98 และ 1.88 ตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อจะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 8 (จำนวนโคโลนีแบคทีเรียน้อยกว่ากลุ่มควบคุม คือพอลิยูรีเทน 903.43 เท่า) จนกระทั่งในชั่วโมงที่ 24 และ 48 จะมีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แสดงดังภาพที่ 4-3 และตารางที่ 4-4 ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* ในกลุ่มควบคุมแสดงได้ดังสมการ $y = -0.004x^2 + 0.264x + 6.018$ ($R^2 = 0.712$) และกลุ่มพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น 1000 ppm แสดงได้ด้วยสมการ $y = -0.003x^2 + 0.252x + 4.771$ ($R^2 = 0.774$) แสดงว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอัตราการเจริญของ *P. aeruginosa* ในช่วงเริ่มต้นของ log phase (ชั่วโมงที่ 2 – 8) เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง เชื้อจะปรับตัวไม่ตอบสนองต่อพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ จากนั้นเชื้อในกลุ่มควบคุม และพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ จะมีอัตราการตายใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4-4 จำนวนโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ทดสอบด้วยพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ความเข้มข้น 1000 ppm

ชั่วโมงที่	ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงจาก		ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (เท่า)
	กลุ่มควบคุม	PU-Ag 1000 ppm	
0	0.00	0.00	1.03
2	5.32	-8.38	5.73
4	18.49	-11.94	75.00
6	26.82	-1.88	146.67
8	37.80	7.39	903.43
10	37.14	32.45	4.30
24	35.22	35.28	1.02
48	31.09	31.57	0.91

หมายเหตุ: * ค่าติดลบ (-) หมายถึงจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (CFU ต่อมิลลิลิตร) ลดลง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-3 การเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ในกลุ่มควบคุม (พอลิยูรีเทน) และกลุ่มทดลอง (พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 ppm) ในช่วงเวลา 0 – 48 ชั่วโมง

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 60 และ 80 องศาเซลเซียส

วิธี Agar Diffusion Susceptibility Test

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิแตกต่างกันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Diffusion Susceptibility Test พบว่า พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 และ 2000 ppm เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25913 และ *P. aeruginosa* แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของ *P. mirabilis* ส่วนที่ความเข้มข้น 1000 ppm เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสองชนิด คือ *E. coli* และ *P. mirabilis* แต่ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ทั้งนี้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญจะน้อยกว่าพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แสดงดังตารางที่ 4-5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมฟิล์มด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน

แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิเมตร)						
	60 องศาเซลเซียส		80 องศาเซลเซียส		Control		
	PU-Ag 1000 ppm	PU-Ag 2000 ppm	PU-Ag 1000 ppm	PU-Ag 2000 ppm	PU	AMP 10 µg/ดิสก์	TET 30 µg/ดิสก์
E. coli ATCC 25913	7.00±0.17	6.33±0.06	-	-	-	-	7.00±0.00
P. aeruginosa	8.67±0.23	10.67±0.06	6.33±0.06	-	-	-	21.17±0.06
P. mirabilis	-	-	-	-	-	21.67±0.17	9.67±0.06

หมายเหตุ: - หมายถึง เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร อักษรย่อ PU หมายถึง พอลิยูรีเทน AMP หมายถึง ยาแอมพิซิลลิน TET หมายถึง ยาเตตราซัยคลิน

วิธี Broth Dilution Susceptibility Test

การทดสอบผลของอุณหภูมิในการเตรียมฟิล์มพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี Broth Dilution Susceptibility Test แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติ Three-way ANOVA พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมฟิล์มมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01 โดยพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 และ 60 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกัน แต่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าการเตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4-6 ภาพที่ 4-4 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (EAA) ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-5

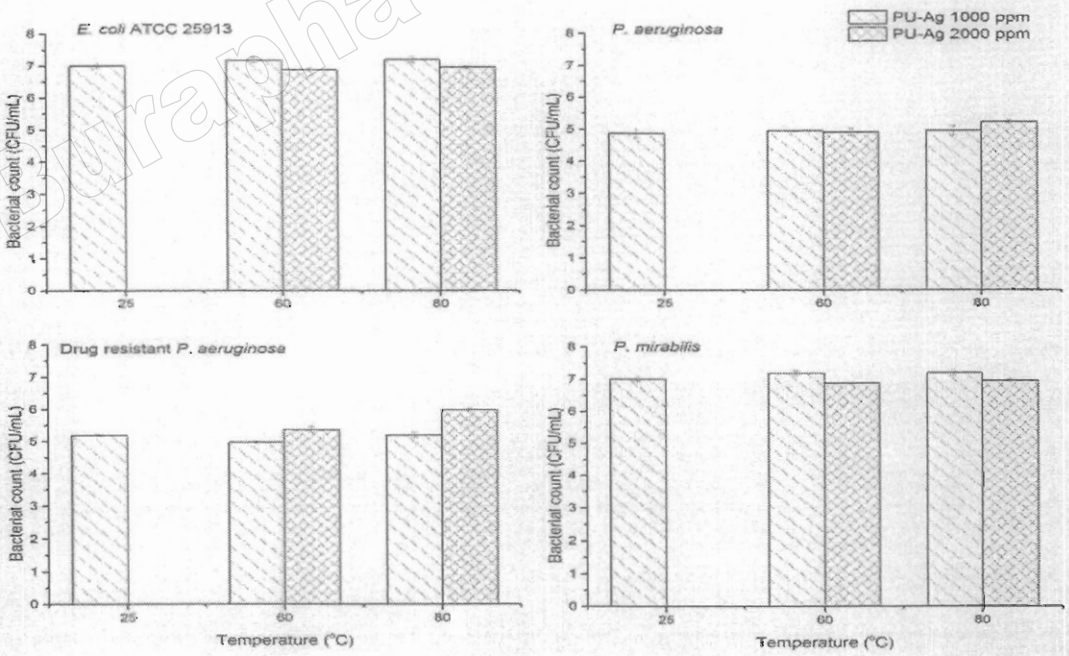
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-6 การทดสอบผลของอุณหภูมิในการเตรียมฟิล์มพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี Broth Dilution Susceptibility Test

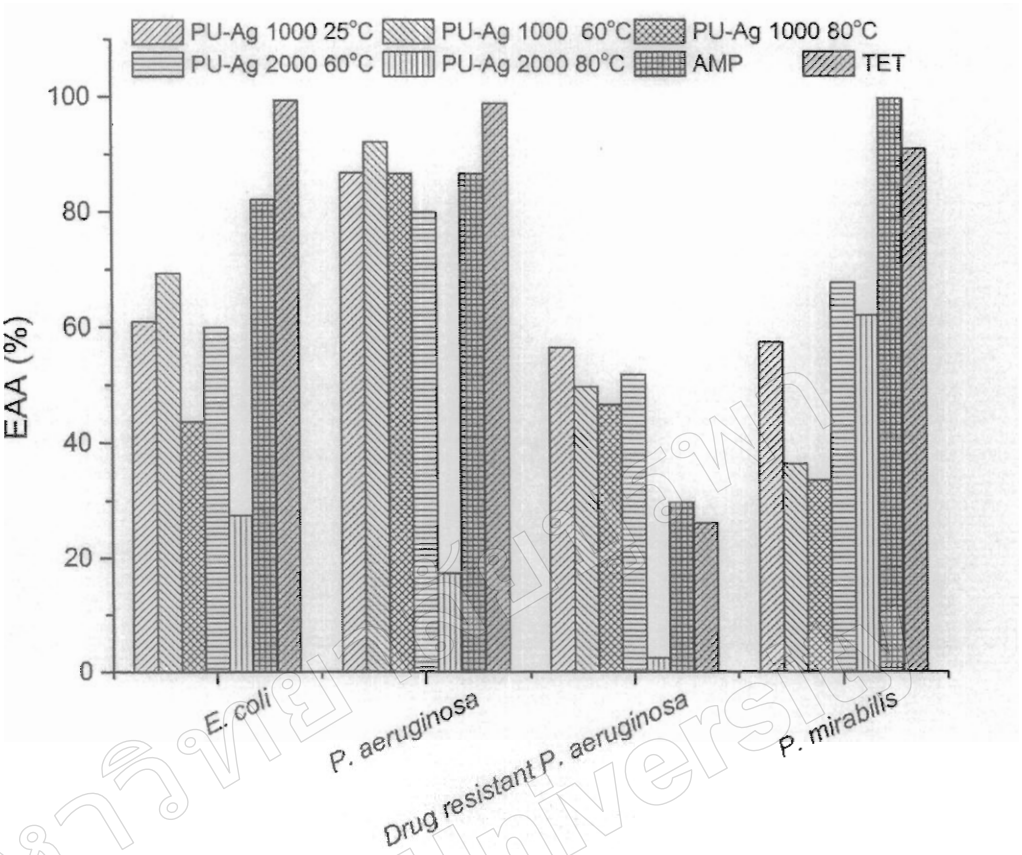
แบคทีเรีย	ความเข้มข้นของนาโนซิลเวอร์	จำนวนโคโลนี ($\times 10^5$ CFU/mL)		
		25°C	60°C	80°C
E. coli ATCC 25913	1000 ppm	134.00 ± 18.68^{abc}	105.33 ± 18.58^{a}	193.33 ± 35.10^{cd}
	2000 ppm	ND	137.67 ± 24.01^{bc}	249.00 ± 5.00^{d}
P. aeruginosa	1000 ppm	1.56 ± 0.12^{abc}	0.93 ± 0.77^{ab}	1.57 ± 0.30^{abc}
	2000 ppm	ND	2.35 ± 0.49^{bc}	9.67 ± 1.30^{d}
P. aeruginosa ดื้อยา	1000 ppm	0.76 ± 0.21^{a}	0.87 ± 0.06^{a}	0.93 ± 0.30^{a}
	2000 ppm	ND	0.84 ± 0.20^{a}	1.69 ± 0.22^{b}
P. mirabilis	1000 ppm	102.67 ± 16.65^{ab}	153.33 ± 26.31^{bc}	160.00 ± 29.61^{bc}
	2000 ppm	ND	78.00 ± 11.53^{a}	91.67 ± 9.50^{a}

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทดลอง

ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01



ภาพที่ 4-4 เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย เมื่อทดสอบกับพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมฟิล์มด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน



ภาพที่ 4-5 เปรียบเทียบประสิทภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (EAA) ของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 และ 2000 ppm เตรียมฟิล์มที่ความอุณหภูมิแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University