RMUTP Research Journal Special Issue
The 5th Rajamangala University of Technology National Conference

การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอีโคไลด้วยซิงก์ออกไซด์เตตระพอต

Bacterial Growth Inhibition of *E. coli* by ZnO Tetrapods

สุชีวัน กรอบทอง[1] ชวลิต ภู่มณี[2,4] สุภาพ ชูพันธ์[3,4] อัฐสิษฐ์ ทับทิมแท้[1] ศุภเดช สุจินพรัหม[1] และ สุทธิพจน์ สุทธนะ[1*]

[1]อาจารย์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม 73140
[2]นักศึกษา [3]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาฟิสิกส์และวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200
[4]นักวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านฟิสิกส์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50202

บทคัดย่อ

ซิงก์ออกไซด์เตตระพอต (ZnO tetrapods) ถูกเตรียมด้วยเทคนิคออกซิเดชันด้วยความร้อนภายใต้ความดันบรรยากาศ ให้มีโครงสร้างในระดับจุลภาคเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวต่อปริมาตรซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ดีขึ้น จากนั้นนำไปผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient broth; NB) ด้วยความเข้มข้น 1,000 – 500,000 ppm และนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอีโคไล (*Escherichia coli*) ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอีโคไลทำได้ด้วยการวัดความขุ่น (optical density; OD) ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากการทดสอบพบว่าค่า OD จะลดลงแบบเชิงเส้นเมื่อความเข้มข้นของซิงก์ออกไซด์เตตระพอตมีค่าตั้งแต่ 1,000 – 50,000 ppm และจะลดลงอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้น 100,000 ppm และ 500,000 ppm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอีโคไลลดลงทำให้สามารถสรุปได้ว่าซิงก์ออกไซด์เตตระพอตมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอีโคไล

Abstract

ZnO tetrapods were synthesized by thermal oxidation technique under atmospheric pressure, to forming as microstructural scale for increasing a high surface to volume ratio which effects to higher reaction rate. ZnO was mixed in nutrient broth (NB) by varies ZnO concentration from 1,000 ppm to 500,000 ppm. *E. coli* was growth in mixed NB under temperature of 37 °C for 24 h. The bacterial growth was investigated by a measurement of optical density (OD) using UV-Visible spectrophotometer at wavelength of 600 nm. It was showed that the OD decreasing as a linear function of ZnO concentration at the concentration in range of 1,000 ppm to 50,000 ppm. Moreover, it was rapidly decreased at the concentration are 100,000 ppm and 500,000 ppm. The result shows the bacterial growth has been decreased. Therefore, we concluded that ZnO tetrapods have an inhibition potential for *E. coli*.

คำสำคัญ : ซิงก์ออกไซด์เตตระพอต เชื้อแบคทีเรียอีโคไล
Keywords : ZnO tetrapods, E. coli.

[*]*ผู้นิพนธ์ประสานงานไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ sutthipoj.s@ku.ac.th โทร. 0 3428 1105 ต่อ 7620*

1. บทนำ

ซิงก์ออกไซด์นับว่าเป็นส่วนประกอบในสารเคมีบางอย่างที่มีใช้อยู่ในชีวิตประจำวัน โดยที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย เช่น แป้งทาหน้า ครีมกันแดด และเครื่องสำอางบางชนิดเป็นต้น ซิงก์ออกไซด์เป็นสารที่เตรียมให้มีโครงสร้างในระดับจุลภาคได้หลายรูปแบบในราคาถูกและใช้สามารถเตรียมได้ด้วยเทคนิคที่หลากหลาย และถูกนำไปใช้งานมากมาย เช่น อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ ตัวเร่งปฏิกิริยา สารเคลือบผิว เป็นต้น ยิ่งกว่านั้นซิงก์ออกไซด์ยังได้รับความสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์ด้วย จากรายงานการวิจัยของ Ruparelia และคณะ (Ruparelia *et al*., 2008) พบว่าเมื่อทำให้โครงสร้างของเงินและทองแดงมีขนาดเล็กลงในระดับจุลภาคพบว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งจุลชีพได้มากขึ้น และจากงานวิจัยของ Dreaden และคณะ (Dreaden *et al*., 2012) ได้ทำการทดลองกับอนุภาคทองก็พบว่าได้ผลลัพธ์เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ดีวัสดุเหล่านี้จัดว่าเป็นวัสดุที่มีราคาค่อนข้างแพง ไม่เหมาะกับการใช้งานในปริมาณากๆ รวมถึงไม่เหมาะกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นซิงก์ออกไซด์จึงเป็นวัสดุทางเลือกที่น่าสนใจกว่าเงิน ทองแดง และทอง เนื่องจากมีราคาถูกและสามารถใช้ได้ในปริมาณมากๆ อีกทั้งจากรายงานวิจัยของ Dutta และคณะ (Dutta *et al*., 2013) พบว่าโครงสร้างอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์สามารถยับยั้งเชื้ออีโคไล (*Escherichia coli*, *E. coli*) ได้ ซึ่งเป็นผลมาจากอนุมูลอิสระประเภทออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ของโลหะออกไซด์ที่ทำปฏิกิริยาต่อผนังเซลล์ของเชื้ออีโคไล สำหรับงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้สนใจการสังเคราะห์ซิงก์ออกไซด์ให้มีโครงสร้างในระดับจุลภาคเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสสำหรับการทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยนำไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียกับเชื้ออีโคไล

2. วิธีการทดลอง

นำผงโลหะซิงก์ (Zn) ซึ่งมีความบริสุทธิ์ 99.9% ผลิตโดยบริษัท Ajax Chemicals ผสมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีความบริสุทธิ์ 30% ผลิตโดยบริษัท Merck Schnchardt OHG ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักจากนั้นบดให้เข้ากัน โลหะซิงก์จะทำปฏิกิริยากับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อตัวเป็นซิงก์ไฮดรอกไซด์ ($Zn(OH)_2$) ดังสมการ (1) จากนั้นนำซิงก์ไฮดรอกไซด์ใส่ในถ้วยอะลูมินาเพื่อนำเข้าเตาเผาความร้อนสูงเพื่อให้เกิดกระบวนการออกซิเดชัน ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศเป็นเวลา 1 นาที ซิงก์ไฮดรอกไซด์จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นซิงก์ออกไซด์เตตระพอต (ZnO tetrapods) ที่มีลักษณะเป็นสีขาวดังสมการ (2)

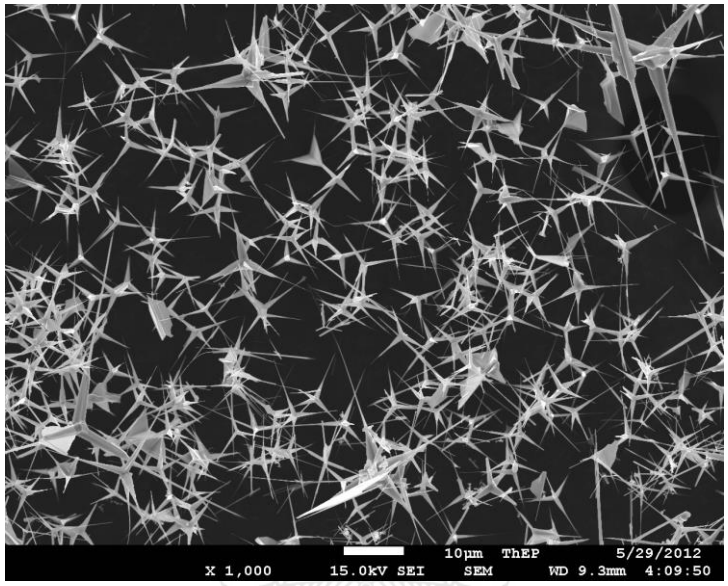
$$Zn + H_2O_2 \rightarrow Zn(OH)_2 \quad (1)$$

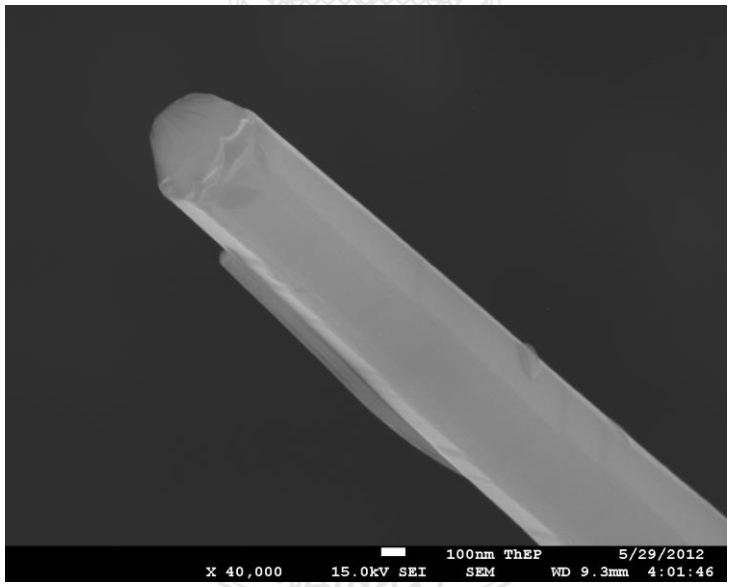
$$Zn(OH)_2 \rightarrow ZnO + H_2O \quad (2)$$

นำซิงก์ออกไซด์เตตระพอตจากสมการ (2) ผสมในอาหารเหลว (nutrient broth; NB) โดยแปรค่าความเข้มข้น 1,000 - 500,000 ppm แยกใส่ในหลอดทดลองจากนั้นนำเข้าเครื่อง autoclave เพื่อกำจัดเชื้ออื่นๆ ในขณะเดียวกันก็ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยนำเชื้ออีโคไลเลี้ยงในอาหารเอียง (nutrient agar; NA) ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายเชื้ออีโคไลไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวในตู้บ่มเชื้อด้วยเงื่อนไขเดียวกัน จากนั้นทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้ออีโคไลโดยดูดเชื้ออีโคไลใส่ในหลอดทดลองข้างต้นแล้วเลี้ยงต่อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงนำไปวัดความขุ่น (optical density; OD) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสังกะสีออกไซด์เตตระพอตซึ่งสังเคราะห์ด้วยกระบวนการออกซิเดชันด้วยความร้อนดังรูปที่ 1 พบว่าโครงสร้างของซิงก์ประกอบไปด้วยแขนที่ยื่นออกมาสี่ข้างซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้นั้นเป็นซิงก์ออกไซด์เตตระพอต





รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างซิงก์ออกไซด์เตตระพอต

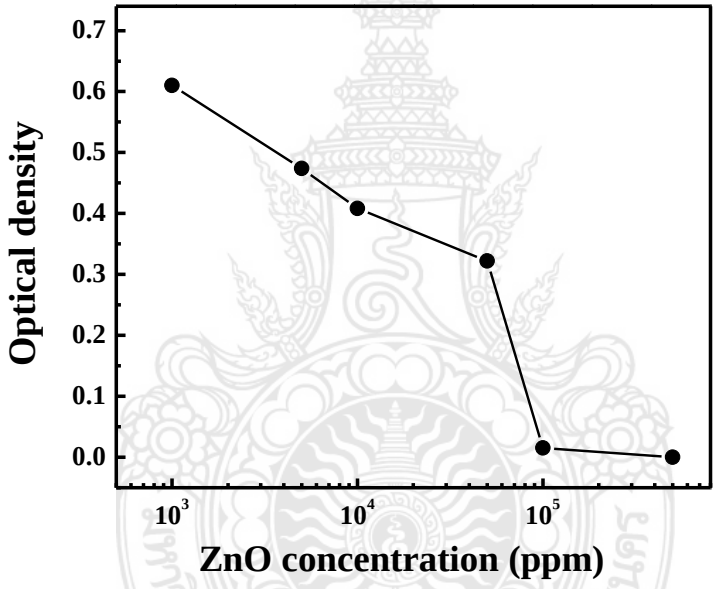
ซึ่งกระบวนการฟอร์มตัวนี้เกิดขึ้นเมื่อซิงก์ไฮดรอกไซด์ในสมการ (2) ได้รับพลังงานความร้อนจะทำให้เกิดการดีไฮเดรชันอย่างฉับพลันเป็นซิงก์ไอออน (Zn^{2+}) และไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) (Wahab *et al*., 2012) และไอออนทั้งสองจะฟอร์มตัวใหม่เป็นซิงก์ออกไซด์ (ZnO) และน้ำ (H_2O)

$$Zn(OH)_2 \rightarrow Zn^{2+} + 2OH^- \rightarrow ZnO + H_2O \quad (3)$$

แต่เนื่องจากกระบวนการนี้เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงน้ำจึงระเหยออกไปทำให้ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ในถ้วยอะลูมินาเหลือเพียงซิงก์ออกไซด์ และเมื่อซิงก์ออกไซด์ยังคงได้รับพลังงานความร้อนอย่างต่อเนื่องจะทำให้เกิดภาวะอิ่มตัวยวดยิ่งจนความเค้นภายในเพิ่มขึ้นอย่างมาก กระทั่งทำให้ซิงก์ออกไซด์ เกิดการขยายตัวผ่านเกรนออกมามีลักษณะคล้าย

แขนสี่ข้างของซิงก์ออกไซด์ ซึ่งโครงสร้างนี้เรียกว่าซิงก์ออกไซด์เตตระพอต (Hongsith *et al*., 2009) อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณาแขนของซิงก์ออกไซด์พบว่าแขนแต่ละข้างนั้นมีขนาดและลักษณะแตกต่างกันออกไปโดยที่แขนบางอันจะมีขนาดสม่ำเสมอ บางแขนจะมีขนาดใหญ่และเล็กลงบริเวณปลายแขน ในขณะที่บางแขนจะมีขนาดใหญ่ที่บริเวณโคนและเรียวเล็กลงบริเวณปลายของแขน

เมื่อนำซิงก์ออกไซด์เตตระพอตไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้ออีโคไลที่ความเข้มข้น 1,000 – 500,000 ppm พบว่าในช่วงแรกเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 1,000 ppm ถึง 50,000 ppm ค่าความขุ่นจะลดลงแบบเชิงเส้นโดยลดลงจาก 0.61 เป็น 0.32 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 100,000 ppm และ 500,000 ppm ค่าความขุ่นลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 0.02 และ 0.00 ตามลำดับ แสดงว่าเชื้ออีโคไลยังคงเจริญได้บ้างที่ความเข้มข้นต่ำ แต่การเจริญจะลดลงเมื่อความเข้มข้นมีค่าสูงขึ้น และไม่สามารถเจริญได้เลยเมื่อความเข้มข้นมีค่าเป็น 500,000 ppm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าซิงก์ออกไซด์เตตระพอตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออีโคไลได้



รูปที่ 2 ความขุ่นของตัวอย่างเมื่อแปรค่าความเข้มข้นซิงก์ออกไซด์เตตระพอต

โดยกลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้ออีโคไลสามารถอธิบายได้จากอนุมูลอิสระประเภทออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ของโลหะออกไซด์ เช่น ไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) ซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet}$) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จัดว่าเป็นสารก่อปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีประสิทธิรูปที่ดี ซึ่งจะไปทำลายผนังเซลล์ของเชื้ออีโคไลทำให้โครงสร้างของเชื้ออีโคไลถูกทำลายและถูกยับยั้งการเจริญไปในที่สุด อีกทั้งเมื่ออนุมูลอิสระมีปริมาณมากๆ ก็จะยิ่งทำให้การยับยั้งแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วย (Snega *et al*., 2013) สำหรับการทดลองนี้อนุมูลอิสระซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งเชื้ออีโคไลนั้นอาจจะเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเกิดขึ้นจากการละลายซิงก์ออกไซด์เตตระพอต (Li *et al*., 2008) ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั่นเอง

4. สรุป

การยับยั้งการเจริญของเชื้ออีโคไลของซิงก์ออกไซด์เตตระพอตแปรผันกับความเข้มข้นของซิงก์ออกไซด์เตตระพอต ซึ่งเกิดจากปริมาณอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งทำหน้าที่ทำลายผนังเซลล์ของเชื้ออีโคไลในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น โดยเมื่อความเข้มข้นของซิงก์ออกไซด์เตตระพอตมีค่าเป็น 100,000 – 500,000 ppm ส่งผลให้ความขุ่นมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ แสดงให้เห็นว่าซิงก์ออกไซด์เตตระพอตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออีโคไลได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และชวลิต ภู่มณี ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านฟิสิกส์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6. เอกสารอ้างอิง

Dutta, R.K., Nenavathu, B.P., Gangishetty, M.K., Reddy, A.V.R. 2013. Antibacterial effect of chronic exposure of low concentration ZnO nanoparticles on *E. coli*. Journal of Environmental Science and Health, Part A 48, 871–878.

Dreaden, E.C., Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., El-Sayed, M.A. 2012. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. Chemical Society Reviews 41 (7) 2740-2779.

Hongsith, N., Chairuangsri, T., Phaechamud, T. and Choopun, S. 2009. Growth kinetic and characterization of tetrapod ZnO nanostructures. Solid State Communications 149 (29-30) 1184-1187.

Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D. and Alvarez, P.J.J. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. Water Research 42 (18) 4591-4602.

Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P., Mukherji, S. 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomaterialia 4 (3) 707-716.

Snega, S., Ravichandran, K., Begum, N.J. and Thirumurugan, K. 2013. Enhancement in the electrical and antibacterial properties of sprayed ZnO films by simultaneous doping of Mg and F. Journal of Materials Science: Materials in Electronics 24 (1) 135-141.

Wahab, R., Mishra, A., Yun, S.-I., Hwang, I.H., Mussarat, J., Al-Khedhairy, A.A., Kim, Y.-S. and Shin, H.-S. 2012. Fabrication, growth mechanism and antibacterial activity of ZnO micro-spheres prepared via solution process. biomass and bioenergy 39, 227-236.