616.014
ก52ล

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดถึงผลกระทบของโอโซน ที่มีต่อโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ

Scanning Electron Microscopic Study of the effects of Ozone Treatment on Structural Changes in gram positive and gram negative Bacteria

- 6 พ.ค. 2546

หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร.วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ทุนอุดหนุนวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2544

ห 157042

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
รายงานการวิจัยฉบับย่อ	1
รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์	3
รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย	3
Abstract & บทคัดย่อ	5
บทนำ	7
วิธีการทดลอง	10
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	13
บทสรุป	28
บรรณานุกรม	29
ประวัติย่อผู้วิจัย	31

รายงานการวิจัยฉบับย่อ

ชื่อโครงการ **การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดถึงผลกระทบของโอโซนที่มีต่อโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ**

Scanning Electron Microscopic Study of the effects of Ozone treatment On Structural Changes in gram positive and gram negative Bacteria

หัวหน้าโครงการ . ผศ. ดร. วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์: Asst. Prof. Vipavee Anupunpisit, Ph.D

ที่มา/ปัญหาในการวิจัย

โอโซน (O_3) เป็นก๊าซธรรมชาติ มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อโรค ทำลายมลพิษ ดับกลิ่น และ ฟอกสี ถ้าใช้โอโซนบริสุทธิ์ในปริมาณที่เหมาะสมและถูกต้องจะสามารถก่อให้เกิดประโยชน์ได้หลายประการ มีการศึกษาที่พบว่าโอโซนสามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานผลที่ศึกษาและบ่งชี้โดยเฉพาะเกี่ยวกับผลกระทบของโอโซนที่มีต่อโครงสร้างละเอียดของเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของโอโซนในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ที่ช่วงเวลาต่างๆกัน และในการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นเหตุผลที่สำคัญ เพื่อที่จะเป็นการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทรัพยากร และเครื่องมืออุปกรณ์ มาประยุกต์ใช้เพื่อการมีส่วนช่วยในการสร้างวิธีการและระบบวินิจฉัยและการส่งเสริมสุขภาพทางการแพทย์ และเพื่อนำประโยชน์ของโอโซนมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาคุณภาพชีวิตในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านการแพทย์ การเกษตร ด้านสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโอโซนในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ ที่ช่วงเวลาต่างๆกัน
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโอโซนในการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเชื้อแบคทีเรีย และการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ ที่มีการศึกษาโดยละเอียดในระดับจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

การดำเนินการวิจัยและผลงานวิจัยโดยสังเขป

1. **การทดสอบประสิทธิภาพของโอโซนที่มีต่อการมีชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย**
(Effect of Ozone to Cell Viability Test of Bacteria)

การศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของโอโซนมีต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยการทำ Cell Viability Test (ทำ colony count) เพื่อการดูผลและการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ (survival activity) และที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ การทดลองครั้งนี้ ใช้เชื้อแบคทีเรียสองชนิด ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Salmonella species* และแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นเชื้อที่อาจพบว่ามีการปนเปื้อนทั่วไปจากดิน น้ำ และอากาศ และอาจเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ พบว่าโอโซนสามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด หลังจากมีการให้โอโซนแก่เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ พบว่าจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^3, 10^4

,10^5 และ10^6 cfu/ml ลดลงเป็นลำดับในลักษณะที่สอดคล้องไปกับเวลา (time dependent mamner) จนกระทั่งหยุดการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายในเวลา 30 นาที อย่างไรก็ตาม เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นที่ระดับสูงมากที่ 10^6และ 10^7 cfu/ml มีจำนวนลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้น และโอโซนไม่สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม ถึงแม้ว่าจะทำการเพิ่มเวลานานไปถึง 150 นาที ในทางตรงกันข้าม เชื้อแบคทีเรียกลุ่มควบคุมทั้งสองชนิดที่ไม่ได้ผ่านโอโซนสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และสามารถเพิ่มจำนวนอย่างเป็นปกติ

2. ผลของโอโซนที่มีต่อโครงสร้างละเอียดภายนอกของเชื้อแบคทีเรีย

Effect of Ozone to Ultrastructural Changes of Bacterial Surface Structure

การศึกษาและวิเคราะห์เปรียบเทียบในห้องปฏิบัติการทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงผลการทดลองที่ว่า โอโซนสามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด โดยสามารถทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ในภาพระดับ 3 มิติ การทดลอง ใช้เชื้อแบคทีเรียสองชนิด ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Salmonella species* และแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* แต่กำหนดที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml เท่านั้นเพื่อให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการศึกษา ผลการศึกษา พบว่ามีการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเชื้อแบคทีเรีย ที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ โดยความรุนแรงของการทำลายเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นของการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย (

ระดับความรุนแรงของการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเชื้อแบคทีเรีย สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ระดับที่ 1 เป็นช่วงเวลา 30 นาทีหลังจากการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย พบว่า เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียบางส่วนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปร่างภายนอกไปจากสภาพปกติ (deformity) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ว่า เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^3, 10^4 และ10^5 cfu/ml ไม่สามารถมีชีวิตอยู่และไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างเป็นปกติ (รูปที่ 1)

ระดับที่ 2 เป็นช่วงเวลา 60 นาทีหลังจากการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่วิกฤตและเริ่มมีผลกระทบรุนแรงต่อการมีชีวิตอยู่และการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีโครงสร้างรูปร่างภายนอกที่ถูกทำลายและสูญเสียสภาพไปจากสภาวะปกติ (damage and deformity) โดยเฉพาะ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus sp* ที่มีแสดงผลการทำลายและสูญเสียสภาพที่รุนแรงมาก โครงสร้างรูปร่างเซลล์เหี่ยวและยุบตัวลง มีการแตกสลาย พร้อมทั้งมีส่วนต่างๆของเซลล์ที่แตกสลายและส่วนต่างๆของซัยโตปลาสม (cell debris) เริ่มถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ลักษณะนี้สอดคล้องไปกับสภาพการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์

ระดับที่ 3 เป็นช่วงเวลา 90-120 นาทีหลังจากการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นช่วงเวลาโอโซนมีผลกระทบรุนแรงมากต่อเชื้อแบคทีเรียเกือบทั้งหมด ต่อการที่จะมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเกือบทั้งหมด มีโครงสร้างรูปร่างภายนอกที่ถูกทำลายและสูญเสียสภาพไปจากสภาวะปกติ เซลล์แบคทีเรียมีสภาพการยุบตัว การแตกหักของพื้นผิวภายนอก ซึ่งอาจทำให้เห็นร่องรอยการทำลายระหว่างโครงสร้างภายนอกและภายในของเชื้อแบคทีเรีย เซลล์มีการแตกสลายอย่างรุนแรง พร้อมทั้งมีส่วนต่างๆของเซลล์ที่แตกสลายและส่วนต่างๆของซัยโตปลาสม (cell debris) ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเป็นจำนวนมาก ในลักษณะเป็นเศษเล็กๆ รูปร่างไม่แน่นอน ลักษณะนี้สอดคล้องไปกับสภาพการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์ (damage and deformity)

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย: การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดถึงผลกระทบของโอโซนที่มีต่อโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ

Scanning Electron Microscopic Study of the effects of Ozone treatment On Structural Changes in gram positive and gram negative Bacteria

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ 1. ผศ. ดร. วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์: Asst. Prof. Vipavee Anupunpisit, Ph.D.

ผู้วิจัย
1. ผศ. ดร. เบญจมาศ ถนอมทรัพย์: Asst. Prof. Benjamas Thanomsub, Ph.D.
2. อาจารย์ รักษวรรณ พูนคำ: Arjorn Raksawan Poonkhum, M.Sc.
3. นาย ศิลป์ชัย จันทร์เพ็ชร: Mr. Silchai Chanphetch
4. นางสาว ถนอมรัตน์ วัชรชัยพงศ์: Ms. Thanomrat Watcharachaipong
5. แพทย์หญิง ชุดา สังสิทธ์: Dr. Chuda Srisukon, MD.

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย และที่อยู่

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, ทบวงมหาวิทยาลัย
สุขุมวิท 23 คลองตัน กรุงเทพมหานคร 10110
โทรศัพท์ 02-664-1000 ต่อ 4501, 4502, 02-2601532
โทรสาร 02-2601532

ทุนอุดหนุนวิจัยประเภท งบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ **ประจำปี** 2544
จำนวนเงิน 45,000 บาท

ประเภทของงานวิจัย เป็นการวิจัยพื้นฐาน (basic research)
สาขาวิชาการ ที่ทำการวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คำสำคัญของเรื่องที่ทำการวิจัย (Keywords)

- Scanning electron microscopy : จุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด
- Ozonated water: น้ำผสมก๊าซโอโซน
- Microscopic structural changes: การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์
- Gram positive bacteria: เชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก
- Gram negative bacteria: เชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ

Abstact

Ozone appeared to inhibit growth and caused death of gram negative and gram positive tested bacteria: *Escherichia coli, Salmonella sp.*, *Staphyllococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. Bacterial cultures at 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 and 10^7 cfu/ml were exposed to 0.167/mg/min/litre of ozone at different time intervals (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 and 150 min). Cell viability was observed in all types of tested bacteria at 10^3, 10^4, 10^5 cfu/ml within 30 min after ozone exposure. However, cell inactivation was not significantly observed at concentration of 10^6 ,10^7 cfu/ml, even after an exposure of 150 min. Within 30 min of the ozone exposure, all types of tested bacteria showed deformation, rough damage and surface destruction revealed by a scanning electron microscopy. Some bacterial cells showed collapsed and shrunk patterns together with broken bodies after ozone exposure for 60 min. Moreover, after 90 min of ozone treatment, severe rupture of bacterial surface, cell lysis and cell debris clumping were demonstrated. Severe and urgent destruction was observed in gram-positive bacteria, especially in *B. subtilis*. The study supports the proposed mechanism of the bacteria inactivation by ozone that caused cell membrane destruction. Subsequently, bacterial death involved the changes of membrane permeability and integrity followed by the lysis reaction. Thus an appropriate concentration of ozone should be used as a biocide in order to control bacterial contamination.

Keywords---- bacteria; biocide; cell growth; ozone; scanning electron microscope; ultrastructure

บทคัดย่อ

โอโซนมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพที่สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย ทั้งกลุ่มแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Salmonella species* และกลุ่มแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^3, 10^4 , 10^5, 10^6, และ 10^7 cfu/ml ได้รับโอโซนที่ความเข้มข้น 0.167 mg/min/litre เป็นระยะเวลา 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 และ150 นาที หลังจากมีการให้โอโซนแก่เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^3, 10^4, และ 10^5 cfu/ml เป็นเวลา 30 นาที ได้มีการทดสอบการมีชีวิตและการเจริญเติบโต (cell viability test) พบว่าจำนวนของเชื้อแบคทีเรียลดลงเป็นลำดับในลักษณะที่สอดคล้องไปกับเวลาที่เพิ่มขึ้นจนกระทั่งหยุดการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นที่ระดับสูงมากที่ 10^6และ 10^7 cfu/ml มีจำนวนลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้น และโอโซนไม่สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ถึงแม้ว่าจะทำการเพิ่มเวลานานไปถึง 150 นาที ผลของโอโซนที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างละเอียดภายนอกของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ภายในเวลา 30 นาที เซลล์แบคทีเรียทุกชนิด แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปร่างภายนอกไปจากสภาพปกติ โครงสร้างพื้นผิวภายนอกบางส่วนถูกทำลาย โดยความรุนแรงของการทำลายเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นของการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย ภายในเวลา 60 นาทีพบว่าเซลล์แบคทีเรียมีโครงสร้างรูปร่างที่ถูกทำลายและสูญเสียสภาพไปจากสภาวะปกติ เซลล์มีสภาพการยุบตัวและแตกหักพร้อมทั้งมีส่วนต่างๆของเซลล์ที่แตกสลายถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ภายในเวลา 90 นาทีเซลล์มีการแตกสลายอย่างรุนแรง แสดงสภาพการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์ โอโซนมีประสิทธิภาพที่สามารถทำลายที่รุนแรงมากในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้ดีกว่ากลุ่มแกรมลบ โดยเฉพาะ *Bacillus sp.* ซึ่งแสดงผลการทำลายเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ การทดลองในครั้งนี้สรุปได้ว่าโอโซนมีคุณสมบัติและความสามารถในการทำลายและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีผลต่อการทำลายที่ผนังเซลล์ ทำให้สูญเสียหน้าที่ด้านการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารและความแข็งแกร่งของเซลล์ไปและทำให้เซลล์ตายในที่สุด ดังนั้น การนำโอโซนที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมมาใช้ให้เป็นประโยชน์ในด้านการทำลายและฆ่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำดื่มได้ จึงเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึงและนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงปฏิบัติ

บทนำ
Introduction

ปัจจุบันนี้ มีการนำเครื่องผลิตโอโซนทั้งชนิดในน้ำและในอากาศเพื่อใช้ในชีวิตประจำวัน โดยมีการนำมาใช้ในครัวเรือน ในด้านสุขภาพอนามัย ด้านการเกษตร ด้านสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม ถ้าใช้เครื่องผลิตโอโซนที่มีมาตรฐาน ผลิตโอโซนออกมาในปริมาณที่ถูกต้อง และมีปริมารของก๊าซที่ไม่ต้องการ (ออกไซด์ของไนโตรเจน) ไม่เกินปริมาณที่จะเป็นอันตรายต่อร่างกาย ในการใช้โอโซนกับมนุษย์และสัตว์พบว่า หากใช้โอโซนในปริมาณที่เหมาะสม โอโซนจะไม่เป็นอันตรายหรือมีผลข้างเคียงต่อมนุษย์และสัตว์มีการนำโอโซนไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียและอากาศเป็นพิษโดยจะช่วยเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซอ๊อกซิเจนในอากาศ ทำให้อากาศบริสุทธิ์ขึ้น ในทางชีววิทยามีการกล่าวว่า โอโซนมีผลทำให้ระบบการผลิตเซลล์ในร่างกายทดแทนเซลล์ที่ตายแล้วได้อย่างดีและช่วยให้การหมุนเวียนของโลหิตดีขึ้น นอกจากนี้โอโซนยังสามารถสลายก๊าซพิษที่เป็นพิษ ขจัดกลิ่น ทำลายและฆ่าเชื้อโรคต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส สปอร์หรือเชื้อรา ข้อมูลเหล่านี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจและน่าจะได้มีการศึกษาวิจัยในเชิงวิทยาศาสตร์ในทุกๆด้านอย่างลึกซึ้งและละเอียดรอบคอบ เพื่อที่ว่าจะได้มีการนำคุณสมบัติและประสิทธิภาพข้อดีของโอโซนมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชีวิตและสุขภาพโดยไม่ก่อให้เกิดผลอันตรายใดๆ สิ่งเหล่านี้จึงเป็นเหตุผลและแรงจูงใจที่ทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจในการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับโอโซนในเชิงจุลชีววิทยาและจุลกายวิภาคศาสตร์ในครั้งนี้

โอโซน (O_3) เป็นก๊าซธรรมชาติ เกิดจากก๊าซออกซิเจน (O_2) แตกตัวเป็นอะตอมของธาตุออกซิเจน (O) หลังจากนั้น อะตอมของธาตุออกซิเจนจะไปรวมกับก๊าซออกซิเจนกลายเป็นก๊าซโอโซน โอโซนเป็นก๊าซที่ไม่คงตัวจะแตกสลายให้ก๊าซออกซิเจนและออกซิเจนอะตอมเรื่อยๆ ดังสมการเคมีต่อไปนี้

$O_3 \longleftrightarrow O_2 + O$ ออกซิเจนอะตอม (O) นี้เองที่มีบทบาทสำคัญไปทำหน้าที่ออกซิไดซ์ หรือ ออกซิเดชั่นมีผลก่อให้มีการทำลาย ไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อราบางชนิด รวมทั้งทำลายมลพิษบางอย่าง (แพทย์หญิงชุดา และ คณะ 2541) โอโซนเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษ ถ้าใช้โอโซนบริสุทธิ์ในปริมาณที่เหมาะสมและถูกต้องจะสามารถก่อให้เกิดประโยชน์ได้นานัปการ โดยทั่วไป โอโซนมีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อโรค ทำลายมลพิษ ดับกลิ่น และ ฟอกสี ข้อมูลทางฟิสิกส์เคมีอธิบายว่าคุณสมบัติเหล่านี้ของโอโซนเป็นผลเนื่องมาจากประจุลบของอิเล็กตรอน (electronegativity) ของโอโซนมีค่าสูงสุดที่ทำให้โอโซนสามารถทำลายพันธะทางเคมี (chemical bonds) ระหว่างธาตุคาร์บอนกับธาตุอื่นๆได้ เช่น ไฮโดรเจน คลอรีน ซัลเฟอร์ ไนโตรเจน ฯลฯ ดังนั้นถ้าใช้โอโซนบริสุทธิ์ในปริมาณที่เหมาะสมและถูกต้องจะสามารถก่อให้เกิดประโยชน์ได้หลายประการ จึงมีการวิจัยและทดลองทางวิทยาศาสตร์ถึงผลของโอโซนในแง่ต่าง ๆ อย่างมากมายในเบื้องต้น เช่น ผลของโอโซนต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Jakab et al.,1995; Peden and Dailey, 1995; Bocci 1996) ผลของโอโซนต่อการรักษาด้วยการนำโอโซนเข้าสู่ระบบไหลเวียนของเลือดในร่างกาย (Hernandez et

al., 1995; Berson et al., 1996) โอโซนทำให้ออกซิเจนที่ไปเซลล์ส่วนปลายเพิ่มขึ้นและโอโซนยังกระตุ้นทำให้เซลล์ในร่างกายสามารถดูดซับเอาออกซิเจนที่เม็ดเลือดแดงนำพาไปดีขึ้น (Berson et al., 1996; Verrazzo et al., 1995) แบคทีเรียในผู้ป่วยเท้าเบาหวานติดเชื้อและการรักษาด้วยน้ำผสมก๊าซโอโซน (นายแพทย์ไวกูณฐ์ และคณะ, 2542) นอกจากนี้ โอโซนยังมีผลในการกระตุ้น antioxidative response (Hernandez et al., 1995) ไปมีส่วนในการทำงานของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันประเภท mast cell (Peden and Dailey, 1995) มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมีของเอนไซม์หลายชนิด (Berlett et al., 1996; Rao et al., 1996) มีรายงานว่าโอโซนอาจมีส่วนในการช่วยทำให้บาดแผลที่ผิวหนังมีลักษณะดีขึ้นและมีผลต่อการรักษาบาดแผลลึก (Turcic et al., 1995)

จากการศึกษาที่ค้นพบว่าโอโซนสามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดีมาก มีการทดลองที่เกี่ยวข้อง ตัวอย่างเช่น การเปรียบเทียบการใช้โอโซนยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อไวรัส Hepatitis A Virus, Poliovirus 1 (Herbold et al., 1989) การใช้โอโซนทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli K-12* (Komanapalli and Lau, 1996) การเปรียบเทียบการใช้โอโซนทำลายจุลชีพสามชนิด ได้แก่ bacteriophage, *Escherichia coli, Candida albicans* (Komanapalli and Lau, 1998) การใช้โอโซนทำลายเชื้อแบคทีเรียห้าชนิดในปลาน้ำจืด (de Silva et al., 1998) การใช้โอโซนทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli K-12* (Komanapalli and Lau, 1996) อย่างไรก็ตามไม่มีการทดลองและรายงานผลใดที่ศึกษาและบ่งชี้โดยเฉพาะเกี่ยวกับผลกระทบของโอโซนที่มีต่อโครงสร้างละเอียดของเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ

ดังนั้นการศึกษาและวิเคราะห์เปรียบเทียบในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาและทางจุลกายวิภาคศาสตร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ของโครงการ เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโอโซนในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ ที่ช่วงเวลาต่างๆกัน และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโอโซนในการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเชื้อแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ ที่มีการศึกษาโดยละเอียดในระดับจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ประกอบกับเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรีย กลุ่มแกรมบวกและแกรมลบต่างมีคุณสมบัติของโครงสร้างทางเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนอีกด้วย ผลการศึกษาและวิเคราะห์เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นผลที่สำคัญต่อไปในการแสดงข้อมูลที่มีเหตุผลทางวิทยาศาสตร์ เพื่อหาขั้นตอนสรุปถึงผลของโอโซนที่มีต่อโครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบอันจะเป็นการนำไปสู่แนวทางพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ ทั้งนี้นับเป็นการนำวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทรัพยากร กำลังคน และเครื่องมืออุปกรณ์ มาใช้ในเชิงวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อการมีส่วนช่วยในการสร้างวิธีการและระบบวินิจฉัยและการส่งเสริมสุขภาพทางการแพทย์ และเพื่

ประกอบเหตุผลที่จะนำประโยชน์ของโอโซนที่มีมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาคุณภาพชีวิตในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านการแพทย์ การเกษตร ด้านสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม ต่อไป

วิธีการทดลอง

Material & Method

1. **วัสดุและเครื่องมือ**

เชื้อแบคทีเรีย

การทดลองครั้งนี้ใช้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก 2 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* และใช้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Salmonella species*

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกใช้ nutrient broth และ nutrient agar plate อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบใช้ nutreint broth และ McConkey agar plate โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ McConkey agar จะมีคุณสมบัติเป็น differential media ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ และสามารถแยกกลุ่ม lactose fermenter ออกจากกลุ่ม nonfermenter group ได้ จึงทำให้สามารถแยกการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในการทดลองได้ดี

เครื่องผลิตโอโซน

เครื่องผลิตโอโซนที่ใช้เป็นเครื่อง Brightzone (Model OZ100, USA) ที่สามารถผลิตโอโซนและปรับสภาวะการให้โอโซนได้ทั้งในน้ำและอากาศ กำหนดให้มีค่าความเข้มข้นของโอโซนที่ผลิตออกมาในน้ำในหน่วย 20 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง (mg/h) พร้อมทั้งสามารถปรับระยะเวลาในการผลิตโอโซนได้ตามต้องการที่อุณหภูมิห้อง

2. **การทดลองในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา**

2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

– ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดลงใน nutrient broth ที่มีปริมาตร 1 ลิตรลงในภาชนะประเภท flask ขนาด 2 ลิตร บ่มเชื้อพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37° C (ยกเว้น *Bacillus subtilis* ทำที่อุณหภูมิ 37° C) เป็นเวลา 18-24 ชม.

– นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงข้ามคืนส่วนหนึ่งมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่บริสุทธิ์ ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเป็น 10^3, 10^4 ,10^5 ,10^6, และ 10^7 cfu/ml (ดังนั้นจึงมี เชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงข้ามคืน และเชื้อแบคทีเรียที่เจือจาง)

2.2 การทดลองให้โอโซนในเชื้อแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ

- กลุ่มควบคุม: ก่อนเริ่มการให้โอโซน นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงข้ามคืนและเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางอย่างละ 0.1 ml กระจายเพื่อการเพาะเลี้ยง (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis*: nutrient agar plate) และลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ (*Escherichia coli* และ *Salmonella species* :McConkey agar plate)

- กลุ่มทดลอง: นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงข้ามคืนและเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางใส่ในภาชนะแก้วทรงสูงปราศจากเชื้อที่มีความจุ 3 ลิตร เริ่มทำการให้โอโซนโดยจุ่มตัว diffuser ที่เป็นตัวแพร่โอโซนลงไปในภาชนะแก้วทรงสูงนี้ ตั้งค่าที่เครื่องผลิตโอโซนให้ทำงานผลิตโอโซนในน้ำความจุ 2 ลิตรโดยมีการผลิตโอโซนในปริมาณ 20 mg ต่อชั่วโมง จากนั้นกำหนดระยะช่วงเวลาที่ 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 และ150 นาที นำเชื้อแบคทีเรียอย่างละ 0.1 ml กระจายเพื่อการเพาะเลี้ยง (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก (nutrient agar plate) และลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรีย กลุ่มแกรมลบ (McConkey agar plate)

- นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar plate) ทั้งหมดเข้าอบในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{O} C เป็นเวลาข้ามคืน และนำมานับจำนวน colony (Branson colony counter, USA) ของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญและขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อในวันรุ่งขึ้น ซึ่งเป็นการทำ colony count เพื่อการดูผลและการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ (survival activity) และสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. **การวางแผนการทดลองในห้องปฏิบัติการทางจุลกายวิภาคศาสตร์**

3.1 การศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์ระดับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope : SEM)

- นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 10^7 cfu/ml ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ผ่านโอโซน ระยะช่วงเวลาที่ .0, 30, 60, 90, และ 120 นาที) แช่น้ำยา 2.5% glutaraldehyde ที่ 4^{O}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย cacodylate buffer 3 ครั้งๆละ 5 นาที ต่อจากนั้นผ่านสู่น้ำยา 1% osmium tetroxide เป็นเวลา2 ชั่วโมง แล้วล้างในน้ำกลั่น 3 ครั้ง

- กระบวนการ dehydration โดยผ่านใน 50 %, 70%, 90%, 95%, และ 100% ethanol ตามลำดับ ขั้นตอนละ 10 นาที ผ่านกระบวนการทำให้แห้งสนิทแบบ critical point drying แล้วจึงนำไปเคลือบผิวด้วยละอองของธาตุทอง (gold coating: SPI-module, 1.4 kV, 12 mA) เวลา 4 นาที

- ศึกษาด้วยกล้องจุทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope : SEM JAOL, JSM-5400, 0.5-30 kV) เพื่อศึกษาโครงสร้างละเอียดสามมิติของโครงสร้างภายนอก โดยเน้นไปที่การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดลองแต่ละชนิด

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

Result & Discussion

การทดสอบประสิทธิภาพของโอโซนมี่มีต่อการมีชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

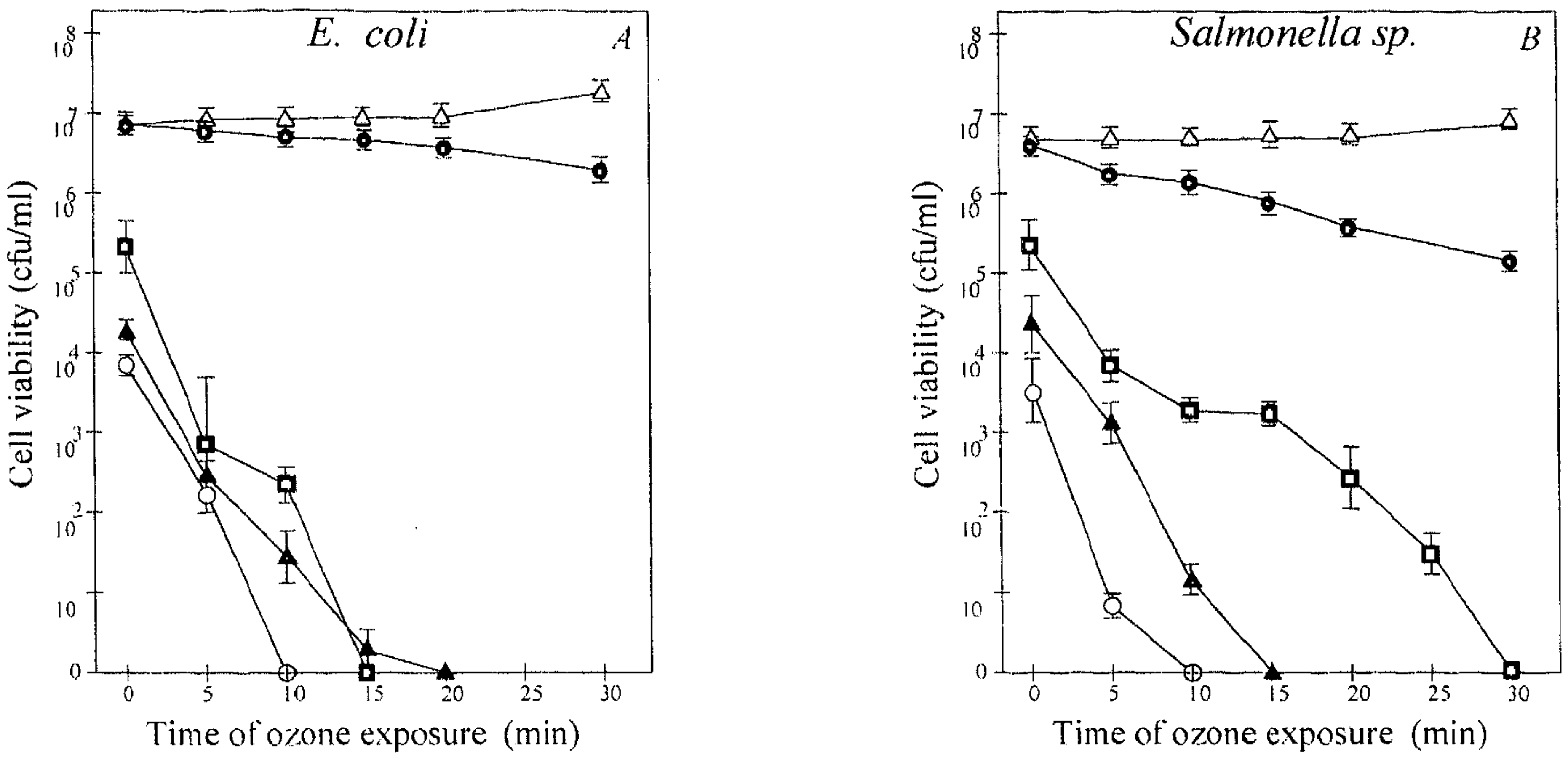
Effect of Ozone to Cell Viability Test of Bacteria

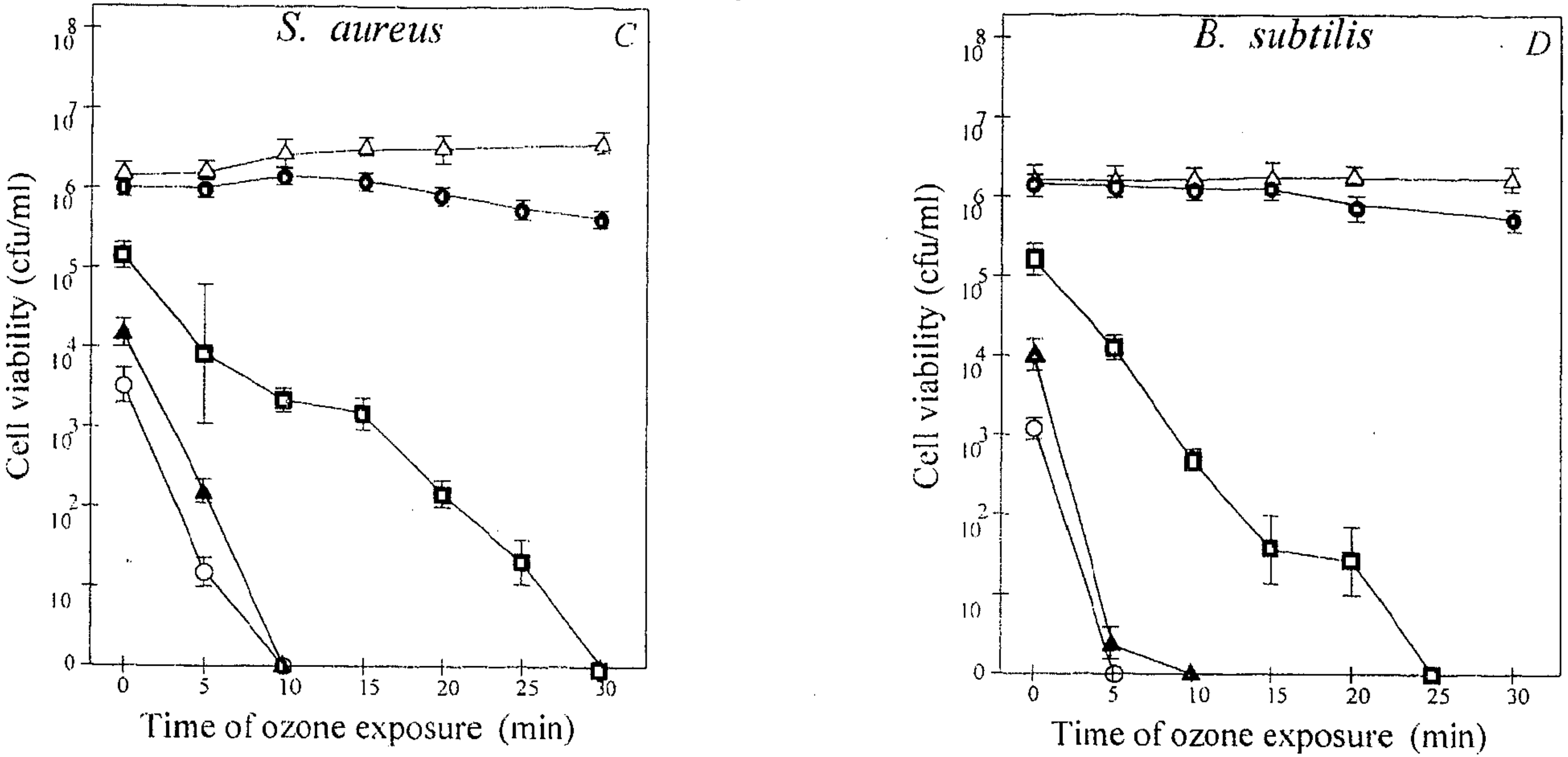
ในการทดลอง ใช้เชื้อแบคทีเรียสองชนิด ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Salmonella species* และแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นเชื้อที่อาจพบว่ามีการปนเปื้อนทั่วไปจากดิน น้ำ และอากาศ และอาจเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ การศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของโอโซนมี่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยการทำ Cell Viability Test (ทำ colony count) เพื่อการดูผลและการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ (survival activity) และที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ พบว่าโอโซนสามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด หลังจากมีการให้โอโซนแก่เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ พบว่าจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^3, 10^4 ,10^5 และ10^6 cfu/ml ลดลงเป็นลำดับในลักษณะที่สอดคล้องไปกับเวลา (time dependent mamner) จนกระทั่งหยุดการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายในเวลา 30 นาที ดังแสดงในกราฟ (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตาม เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นที่ระดับสูงมากที่ 10^6และ 10^7 cfu/ml มีจำนวนลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้น และ โอโซนไม่สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม ถึงแม้ว่าจะทำการเพิ่มเวลานานไปถึง 150 นาที ในทางตรงกันข้าม เชื้อแบคทีเรียกลุ่มควบคุมทั้งสองชนิดที่ไม่ได้ผ่านโอโซนสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และสามารถเพิ่มจำนวนอย่างเป็นปกติ (รูปที่ 1) ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการรายงานที่ผ่านมา (Da Silva et al., 1998; Komanapalli and Lau, 1996; Komanapalli and Lau, 1998).

รูปที่ 1

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโอโซนที่มีต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย.

เชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ได้รับโอโซนที่มีความเข้มข้น 0.167mg/min/litre เป็นเวลา 0 นาที. ข้อมูลที่แสดงในกราฟเป็น means ± standard errors. A: *Escherichia coli*, B: *Salmonella* C: *Staphylococcus aureus*, D: *Bacillus subtilis* ที่ความเข้มข้น (O):10^3, (▲)10^4, ( )10^5, and ( ): cfu/ml. กลุ่มควบคุม (Δ).


E. coli
A
Cell viability (cfu/ml)
Time of ozone exposure (min)
Salmonella sp.
B
Cell viability (cfu/ml)
Time of ozone exposure (min)


S. aureus
C
B. subtilis
D
Cell viability (cfu/ml)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10
0
0
5
10
15
20
25
30
Time of ozone exposure (min)

ผลของโอโซนที่มีต่อโครงสร้างละเอียดภายนอกของเชื้อแบคทีเรีย

Effect of Ozone to Ultrastructural Changes of Bacterial Surface Structure

ในการทดลอง ใช้เชื้อแบคทีเรียสองชนิด ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Salmonella species* และแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* แต่กำหนดที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml เท่านั้นเพื่อให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการศึกษา

การศึกษาและวิเคราะห์เปรียบเทียบในห้องปฏิบัติการทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด แสดงผลการทดลองที่ว่า โอโซนสามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด โดยสามารถทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในภาพระดับ 3 มิติ ผลการศึกษา พบว่ามีการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเชื้อแบคทีเรีย ที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ โดยความรุนแรงของการทำลายเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นของการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 2-5)

ระดับความรุนแรงของการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเชื้อแบคทีเรีย สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ระดับที่ 1 เป็นช่วงเวลา 30 นาทีหลังจากการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย พบว่า เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียบางส่วนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปร่างภายนอกไปจากสภาพปกติ (deformity) (รูปที่ 2A-B, 3A-B, 4A-B, 5A-B) อาจมีผลเนื่องมาจาก โอโซนทำให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถทนทานต่อแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ::ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ว่า เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^3, 10^4 และ10^5 cfu/ml ไม่สามารถมีชีวิตอยู่และไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างเป็นปกติ (รูปที่ 1)

ระดับที่ 2 เป็นช่วงเวลา 60 นาทีหลังจากการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่วิกฤตและเริ่มมีผลกระทบรุนแรงต่อการมีชีวิตอยู่และการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีโครงสร้างรูปร่างภายนอกที่ถูกทำลายและสูญเสียสภาพไปจากสภาวะปกติ (damage and deformity) (รูปที่ 2C, 3C, 4C, 5C) โดยเฉพาะ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus sp.* (รูปที่ 5C) ที่มีแสดงผลการทำลายและสูญเสียสภาพที่รุนแรงมาก โครงสร้างรูปร่างเซลล์เหี่ยวและยุบตัวลง มีการแตกสลาย พร้อมทั้งมีส่วนต่างๆของเซลล์ที่แตกสลายและส่วนต่างๆของซัยโตปลาสม (cell debris) เริ่มถูกปลดปล่อยออกมาภายนอก ลักษณะนี้สอดคล้องไปกับสภาพการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์

ระดับที่ 3 เป็นช่วงเวลา 90-120 นาทีหลังจากการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นช่วงเวลาโอโซนมีผลกระทบรุนแรงมากต่อเชื้อแบคทีเรียเกือบทั้งหมด ต่อการที่จะมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อ พบว่า เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเกือบทั้งหมด มีโครงสร้างรูปร่างภายนอกที่ถูกทำลายและสูญเสียสภาพไปจากสภาวะปกติ เซลล์แบคทีเรียมีสภาพการยุบตัว การแตกหักของพื้นผิวภายนอก ซึ่งอาจทำให้เห็นร่องรอยการทำลายระหว่างโครงสร้างภายนอกและภายในของเชื้อแบคทีเรีย เซลล์มีการแตกสลายอย่างรุนแรง พร้อมทั้งมีส่วนต่างๆของเซลล์ที่แตกสลายและส่วนต่างๆของซัยโตปลาสม (cell debris) ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเป็นจำนวนมาก ในลักษณะเป็นเศษเล็กๆ รูปร่างไม่แน่นอน ลักษณะนี้สอดคล้องไปกับสภาพการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์ (damage and deformity) (รูปที่ 2D, 3D, 4D-F, 5D-E) ผลของโอโซนที่มีต่อโครงสร้างละเอียดของเชื้อแบคทีเรียที่รายงานในครั้งนี้ ส่งเสริมและสนับสนุนผลการรายงานที่ผ่านมา ที่ว่า โอโซนก่อให้เกิดผลกระทบเริ่มต้น (primary target) มีการทำลายที่โครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้สูญเสียหน้าที่ด้าน membrane permeability และ cell integrity จากนั้นจึงก่อให้เกิดผลกระทบต่อเนื่องไปถึงการการทำลาย การแตกสลายของของโครงสร้างละเอียดภายในเซลล์และสูญเสียสภาพของเซลล์ที่มีชีวิตในที่สุด (cell lysis) (Komanapalli and Lau, 1996; Pryor,1992).

การกำหนดวัตถุประสงค์และทำการวิจัยในครั้งนี้ กำหนดตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียทั้งกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบนั้น ต้องการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโอโซนในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม จากผลการวิจัยนี้พบว่า โอโซนมีประสิทธิภาพที่สามารถทำลายเชื้อและยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียกลุ่มบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ โดยเฉพาะ *Bacillus sp.* ซึ่งแสดงผลการทำลายที่รุนแรงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (รูปที่ 5D-E) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเหตุผลทางวิทยาศาสตร์ที่ว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มมีโครงสร้างระดับเซลล์วิทยาที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนมาก โดยทั่วไป โครงสร้างระดับเซลล์วิทยาของพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรียประกอบด้วยลำดับชั้นต่างๆ (จากด้านนอกไปด้านใน) ดังนี้ ผนังเซลล์ (cell wall), เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane), และ ซัยโตปลาสม (cytoplasm) โดยที่ว่า ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบเป็นสารประเภท ไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการห่อหุ้ม ปกป้องอันตราย ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ระหว่างสิ่งแวดล้อมภายนอกและเซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกมีผนังเซลล์ (cell wall) ที่หนา ประกอบด้วยสารประเภทโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (peptidoglycan) เป็นหลัก และมีลักษณะเป็นจำนวนหลายๆชั้น ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบโดยทั่วไป มีผนังเซลล์ (cell wall) ที่บางกว่า ประกอบด้วย outer membrane ที่มีลักษณะเป็นชั้นบางๆ แต่ประกอบด้วยสารประเภทคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นจำนวนมาก (lipopolysachharide, lipoprotein) และมีจำนวนชั้นของ peptidoglycan เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่าโอโซนมีประสิทธิภาพที่สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย โดยมีผลการทำลายอย่างรวดเร็วและรุนแรงที่สารประเภทโปรตีนมากกว่าสารประเภทคาร์โบไฮเดรต :ซึ่งสอดคล้องกับผลการรายงานที่ผ่านมาของ Komanapalli and Lau (1998)

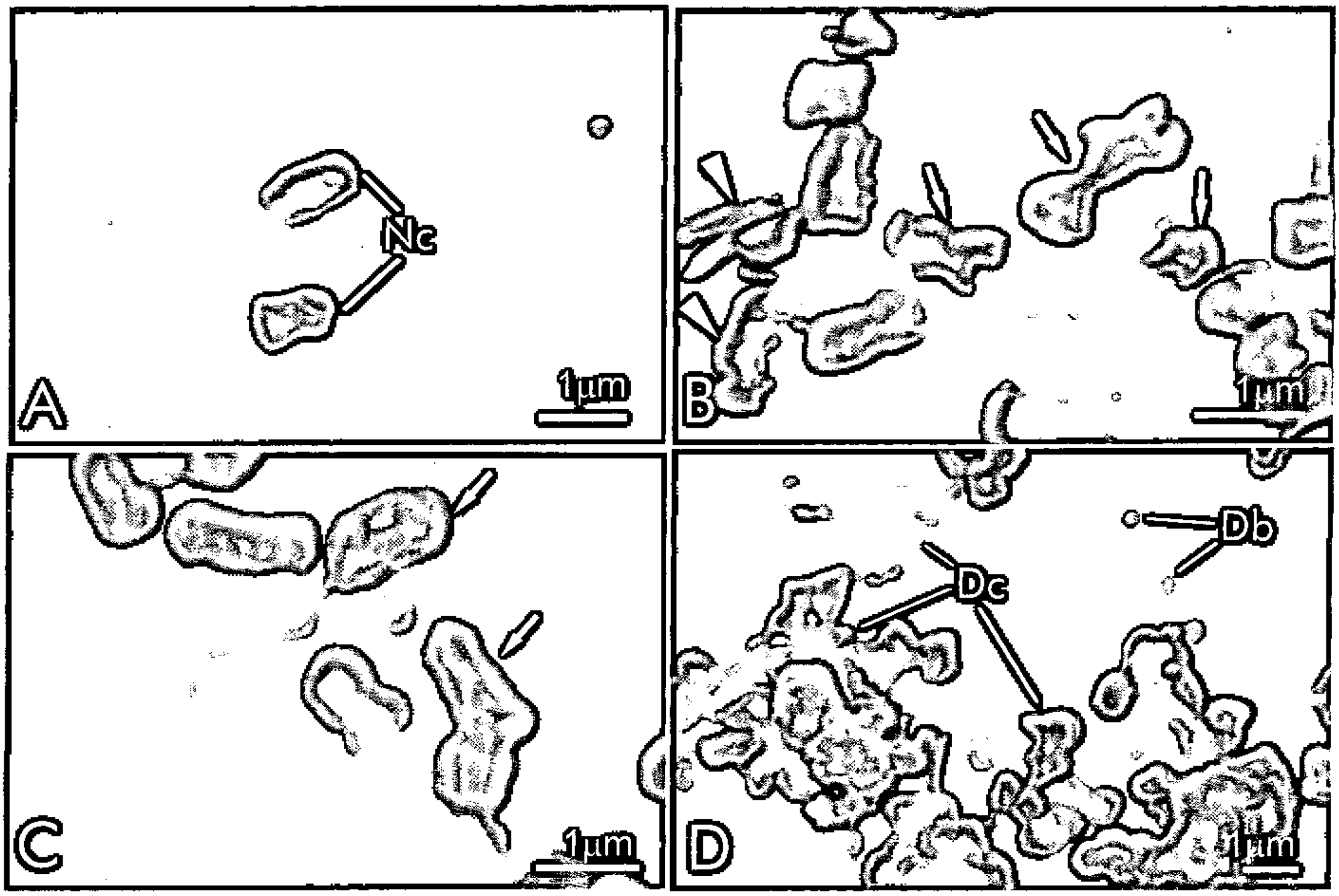
ผลการศึกษาและรายงานที่ผ่านมา กล่าวพอสังเขปได้ว่า โอโซนมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพที่สามารถทำลายเชื้อและยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและไวรัส อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรีย (sensitivity) ต่อโอโซนมีความแตกต่างกันอย่างมากขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ มากมาย ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ สิ่งแวดล้อมภายนอก อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพทางกายภาพ สภาพห้องปฏิบัติการ ชนิดของเซลล์แบคทีเรีย สภาวะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ระยะเวลา และ ความเข้มข้นของโอโซน ฯลฯ

จากผลการทดลองในครั้งนี้ ที่พบว่าโอโซนมีคุณสมบัติและความสามารถในการทำลายและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้น การนำโอโซนมาประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในด้านสุขภาพให้ได้มาตรฐานระดับสากลนั้นเป็นสิ่งที่อาจทำได้ง่ายและสะดวก ด้านการแพทย์ ตัวอย่างเช่น การทำลายและฆ่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำดื่ม การทำลายและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นอันตรายในโรงพยาบาลและสถานสาธารณสุข ด้านการเกษตร ตัวอย่างเช่น การทำลายและฆ่าเชื้อแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้งและปลา ด้านสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น การทำลายและฆ่าเชื้อแบคทีเรียในโรงงานอุตสาหกรรม และระบบการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น

รูปที่ 2

ภาพจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของ Escherichia coli ที่ได้รับโอโซน.

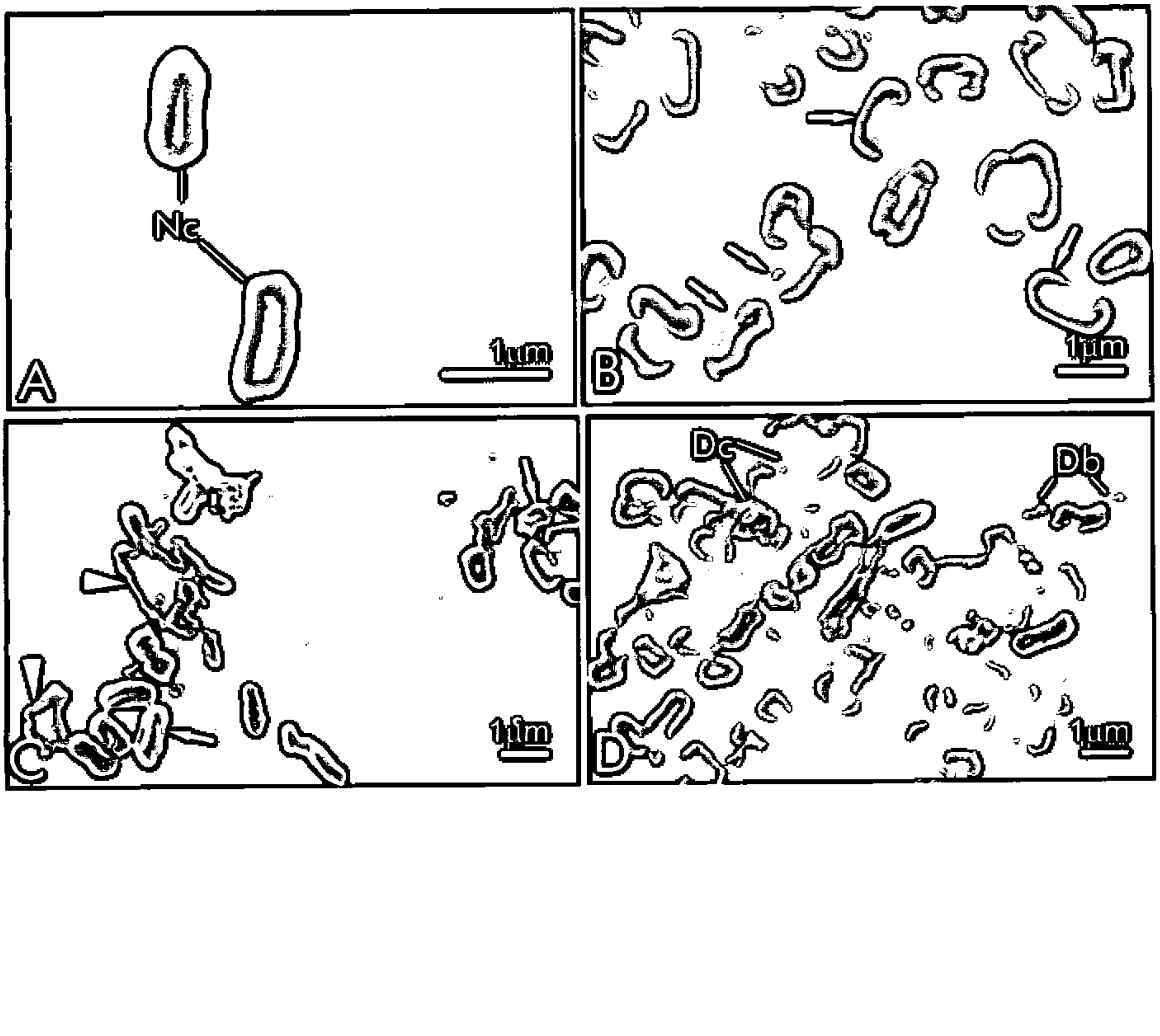
ภายหลังจากการผ่านโอโซนให้กับเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นเวลา 30-90 นาที โอโซนสาม ทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอก ความรุนแรงของ ทำลายเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นของการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย. A: กลุ่มควบคุม (Nc), B-C: แบคทีเรียที่ได้รับโอโซนเป็นเวลา 30 และ 60 นาที ตามลำดับ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปร่างภายนอกไป สภาพปกติ (arrow) และมีการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเซลล์แบคทีเรีย (arrowheads). D: แบคทีเรียที่ได้รับโอโซนเป็นเวลา 90 นาที แสดงสภาพเซลล์แบคทีเรียที่ถูกทำลาย (destroyed cell: Dc) และ ต่างๆของเซลล์ที่แตกสลาย (debris :Db).


Nc
A
1µm
B
1µm
C
1µm
Db
Dc
D
1µm

รูปที่ 3

ภาพจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของ Salmonella sp. ที่ได้รับโอโซน.

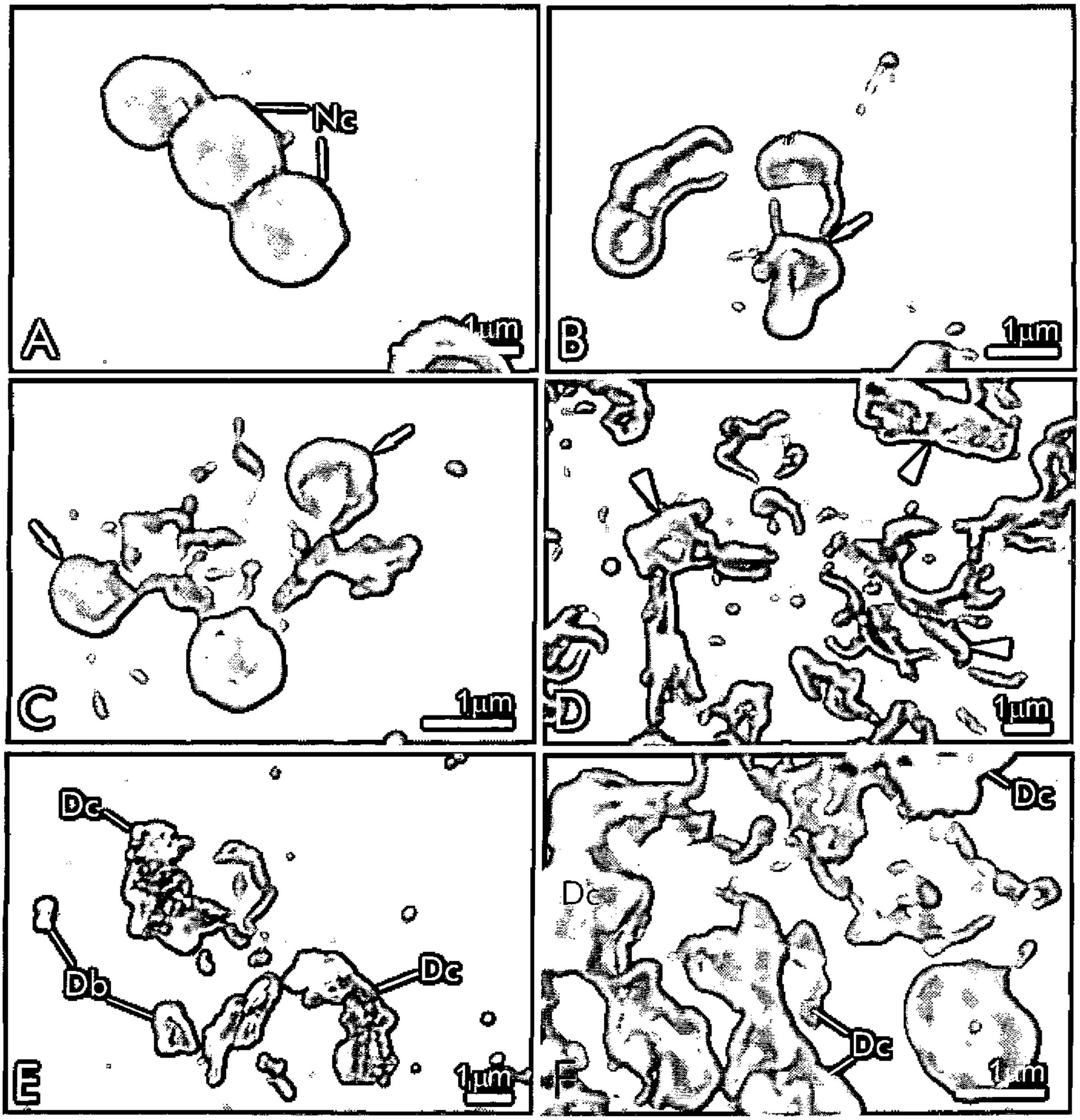
ภายหลังจากการผ่านโอโซนให้กับเชื้อแบคทีเรีย Salmonella sp. เป็นเวลา 30-90 นาที โอโซนสาม ทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอก ความรุนแรงของ ทำลายเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นของการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย. A: กลุ่มควบคุม (Nc), B-C: แบคทีเรียที่ได้รับโอโซนเป็นเวลา 30 และ 60 นาที ตามลำดับ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปร่างภายนอกไป สภาพปกติ (arrow) และมีการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเซลล์แบคทีเรีย (arrowheads). D: แบคทีเรียที่ได้รับโอโซนเป็นเวลา 90 นาที แสดงสภาพเซลล์แบคทีเรียที่ถูกทำลาย (destroyed cell: Dc) และ ต่างๆของเซลล์ที่แตกสลาย (debris :Db).


A
Nc
1µm
B
1µm
C
1µm
D
Dc
Db
1µm

รูปที่ 4

ภาพจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของ Staphylococcus aureus. ที่ได้รับโอโซน.

ภายหลังจากการผ่านโอโซนให้กับเชื้อแบคทีเรีย Salmonella sp. เป็นเวลา 30-120 นาที โอโซนสาม ทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอก ความรุนแรงของ ทำลายเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นของการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย. A: กลุ่มควบคุม (Nc), B-D: แบคทีเรียทีได้รับโอโซนเป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปร่างภายนอ จากสภาพปกติ (arrow) และมีการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเซลล์แบคทีเรีย (arrowheads). E: แบคทีเรียทีได้รับโอโซนเป็นเวลา 120 นาที แสดงสภาพเซลล์แบคทีเรียที่ถูกทำลายอย่างรุนแรง (destroyed c Dc) และ แสดงส่วนต่างๆของเซลล์ที่แตกสลาย (debris :Db) เป็นจำนวนมาก.

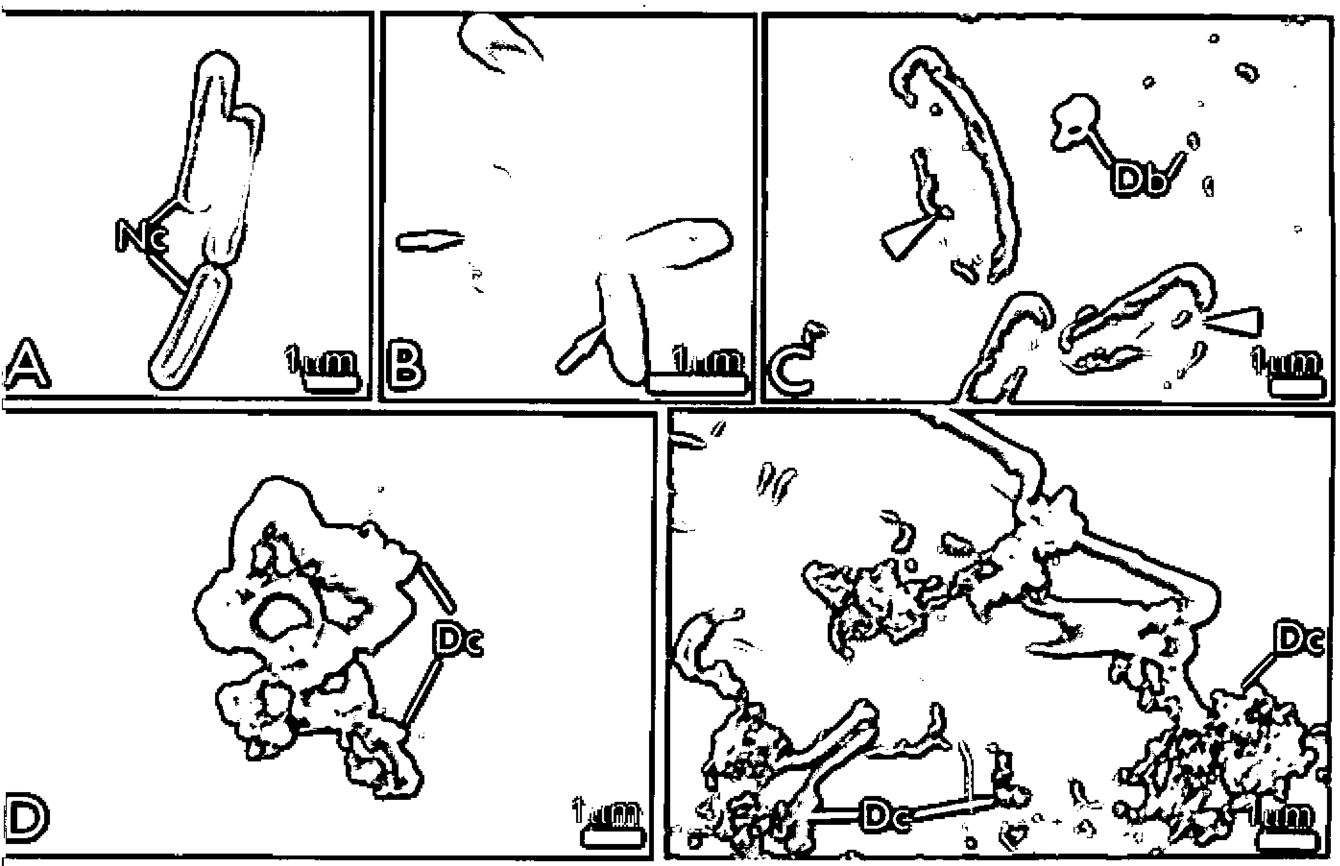


Nc
A
1µm
B
1µm
C
1µm
D
1µm
Dc
Db
Dc
E
1µm
Dc
Dc
Dc
F
1 µm

รูปที่ 5

ภาพจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของ* Bacillus subtilis *ที่ได้รับโอโซน.

*ภาย*หลังจากการผ่านโอโซนให้กับเชื้อแบคทีเรีย. *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 30-120 นาที โอโซนสาม ทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอก ความรุนแรงของ ทำลายเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นของการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย. A: กลุ่มควบคุม (Nc), B-C: แบคทีเรียที่ได้รับโอโซนเป็นเวลา 30 และ 60 นาที ตามลำดับ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปร่างภายนอกไป สภาพปกติ เซลล์แบคทีเรียมีสภาพการยุบตัว การแตกหักของพื้นผิวภายนอกอย่างรุนแรง ปรากฏเป็นร่อง การทำลายระหว่างโครงสร้างภายนอกและภายในของเชื้อแบคทีเรีย (arrow) มีการทำลายโครงสร้างพื้นผิว นอกของเซลล์แบคทีเรีย (arrowheads) ส่วนต่างๆของเซลล์ที่แตกสลาย (debris :Db) เป็นจำนวนมาก D-E: แบคทีเรียที่ได้รับโอโซนเป็นเวลา 120 นาที แสดงสภาพเซลล์แบคทีเรียที่แตกหักและถูกทำลายอย่างรุน (destroyed cell: Dc)



Nc
1 µm
A
1 µm
B
Db
1 µm
C
Dc
1 µm
D
Dc
Dc
1 µm

บทสรุป

Summary

โอโซนที่ความเข้มข้น 0.167 mg/min/litre สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งกลุ่มแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Salmonella species* และกลุ่มแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* หลังจากมีการให้โอโซนแก่เชื้อแบคทีเรีย พบว่าจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^3, 10^4 , และ10^5 cfu/ml ลดลงเป็นลำดับในลักษณะที่สอดคล้องไปกับเวลาที่เพิ่มขึ้นจนกระทั่งหยุดการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายในเวลา 30 นาที อย่างไรก็ตาม เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นที่ระดับสูงมากที่ 10^6 และ 10^7 cfu/ml มีจำนวนลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้น และโอโซนไม่สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ถึงแม้ว่าจะทำการเพิ่มเวลานานไปถึง 150 นาที ในทางตรงกันข้าม เชื้อแบคทีเรียกลุ่มควบคุมทั้งสองชนิดที่ไม่ได้ผ่านโอโซนสามารถเจริญเติบโตอย่างเป็นปกติ

ผลของโอโซนที่มีต่อโครงสร้างละเอียดภายนอกของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ทำการศึกษาและวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ในภาพระดับ 3 มิติ พบว่า โอโซนสามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด โดยสามารถทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ โดยความรุนแรงของการทำลายเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นของการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย ระดับความรุนแรงของการทำลายโครงสร้างพื้นผิวภายนอกของเชื้อแบคทีเรีย สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระดับ เป็นช่วงเวลา 30, 60, 90-120 นาทีตามลำดับ หลังจากการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรีย โดยที่ช่วงเวลา 60 นาทีหลังจากการผ่านโอโซนให้แก่เชื้อแบคทีเรียเป็นช่วงเวลาที่วิกฤตและเริ่มมีผลกระทบรุนแรงต่อการมีชีวิตอยู่และการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียมีโครงสร้างรูปร่างภายนอกที่ถูกทำลายและสูญเสียสภาพไปจากสภาวะปกติ เซลล์แบคทีเรียมีสภาพการยุบตัว การแตกหักของพื้นผิวภายนอก มีลักษณะการทำลายระหว่างโครงสร้างภายนอกและภายในของเชื้อแบคทีเรีย เซลล์มีการแตกสลายอย่างรุนแรง พร้อมทั้งมีส่วนต่างๆของเซลล์ที่แตกสลายและส่วนต่างๆของซัยโตปลาสม (cell debris) ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์เป็นจำนวนมาก ในลักษณะเป็นเศษเล็กๆ รูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งเป็นสภาวะที่แสดงสภาพการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์ นอกจากนี้ พบว่า โอโซนมีประสิทธิภาพที่สามารถทำลายเชื้อและยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียกลุ่มบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ โดยเฉพาะ *Bacillus sp.* ซึ่งแสดงผลการทำลายที่รุนแรงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ข้อควรคำนึงถึงประโยชน์และการประยุกต์จากข้อมูลของการวิจัยในครั้งนี้ น่าจะเป็นการนำคุณสมบัติและประสิทธิภาพของโอโซนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาใช้ให้เป็นประโยชน์ในมาตรฐานระดับสากล ทั้งในด้านการแพทย์ ด้านการเกษตร ด้านสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม ฯลฯ

บรรณานุกรม

References

1. แพทย์หญิง ชุดา ศรีสุคนธ์, นายแพทย์ ไวกูณฐ์ สถาปนาวัตร และ ดร. วัฒนา ศรีสุคนธ์: การทำให้อายุยืนยาวและมีความสุข โดยวิธีธรรมชาติบำบัด ภาคหนึ่ง "โอโซน", 2541

2. นายแพทย์ ไวกูณฐ์ และคณะ เรื่อง Ozonated Water Therapy in Diabetic Foot Infection, The Bulletin of Vascular Surgery เดือนตุลาคม 2542: 68-76

3. Berlett B.S., Levine R.L., and Stadtman E.R. 1996. Comparison of the effects of ozone on the modification of amino acid residues in glutamine synthetase and bovine serum albumin. J-Biol-Chem. Feb 23; 271(8): 4177-82

4. Berson E.L., Remulla J.F., Rosner B., Sandberg M.A., and bi Franco W.C. 1996. Evaluation of patients with retinitis pigmentosa receiving electric stimulation, ozonated blood, and ocular surgery in Cuba, Arch Gpthalmol 114(5) : 560-3

5. Bocci V. 1996. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. Med-Hypotheses. Feb; 46(2): 150-4.

6. De Silva M.V., Gibbs P.A., and Kirby R.M. 1998. Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). J. Appl. Microbiol. 84: 802-10.

7. Hernandez-F., Menendez-S., Wong-R. 1995. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. Free-Radic. Biol. Med. Jul; 19(1): 115-9

8. Jakab G.J, Spannhake E.W. Canning B.J., Kleeberger S.R. 2 Gilmour M.I. 1995. The effects of ozone on immune function. Environ Health Perspect 103 (2) : 77-89.

9. Peden D.B. and Dailey L. 1995. Modulation of mast cell functions by in vitro ozone exposure. Am of Physiol 268(6 Pt. 1) : L902-10.

10. Hernandez F., Menendez S. & Wong R. 1995. Decrease of blood cholesterl and stimulation of antioxiolative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. Free Radic Biol Med 19(1) : 115-9.

11. Herbold K., Flehmig B., and Botzenhart K. 1989. Omparison of ozone inactivation, in fllowing water, of hepatits A virus, poliovieus 1, and indicator organisms. Appl. Environ. Microbiol. 55 (11): 2949-53.

12. Komanapalli I.R. and Lau B.H.S. 1996. Ozone-induced damage of *Escherichia coli K-12.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 610-14.

13. Komanapalli I.R. and Lau B.H.S. 1996. Inactivation of bacteriophage , *Escherichia coli,* and *Candida albicans* by ozone. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 766-69.

14. Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P. 1996. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of Arabidopsis thaliana. Plant. Physiol. Jan; 110(1): 125-36

15. Turcic J., Hancevic J., Antolijak T., Zic R., and Slfirevic I. 1995. Effects of ozone on how well split-thick ness skin grafts according to Thiersch take in war wounds. Results of prospective study. Langenbecks Arch Chir. 380(3) : 144-8.

16. Verrazzo G., Coppola L., LuongoC., Sammartino A., Giunta R., Grassia A., Ragone R., and Tirelli A. 1995. Hyperbaric oxygen, oxygen-ozone therapy, and rheologic parameters of blood in-patients with peripheral occlusive arterial disease. Undersea-Hyperb-Med. 1995 Mar; 22(1): 17-22.

ประวัติย่อผู้วิจัย

Vita

1. ชื่อ-นามสกุล ผศ. ดร. วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์
2. สัญชาติ ไทย
3. สถานที่ทำงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

   คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 กทม. 10110

   โทรศัพท์ 2602950-3 ต่อ 4501,4502

   โทรสาร 260-1532

   E-mail vanupunp@psm.swu.ac.th

4. การศึกษา

   4.1 ประถมศึกษา โรงเรียนเซนต์จอห์น กรุงเทพมหานคร

   4.2 มัธยมศึกษา โรงเรียนสตรีวิทยา, โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา กรุงเทพมหานคร

   4.3 มหาวิทยาลัย -ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา-สัตววิทยา) พ.ศ. 2525

   จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

   -ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์) พ.ศ. 2528

   มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

   -ปริญญาเอก Ph.D. of Biological Sciences (Molecular Biology)

   พ.ศ. 2539 Illinois State University, IL, USA

   4.4 ระดับหลังมหาวิทยาลัย

   -Postdoctoral Fellow (Molecular Biology) พ.ศ. 2540 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประเทศไทย (ในความร่วมมือกับหน่วยอิเล็กตรอนและเซลล์วิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

   -Adjunct Professor (Neuroscience) พ.ศ. 2542 Illinois State University, IL, USA (สนับสนุนโดยโครงการแลกเปลี่ยนนักศึกษาและบุคลากรของสถาบันอุดมศึกษาไทยกับต่างประเทศ ประจำปี 2541, ทบวงมหาวิทยาลัย, ประเทศไทย)

   4.5 ประกาศนียบัตร

   -Certificate in Cell Biology and Electron Microscopy Asia-Pacific Training Course, Electron Microscopy Institute. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2531

   -Certificate in Basic Neuroscience IBRO Pan Asianic Training Course All India Institute of Medical Sciences (AIIMS), New Delhi, India พ.ศ. 2533

5. ประสบการณ์ทำงาน

   5.1 การเรียนการสอน

   5.1.1 อาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2529-ปัจจุบัน (ภาระงานสอน คณะแพทยศาสตร์ และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ)

5.1.2 อาจารย์พิเศษในส่วนของการสอนวิชา Neuroanatomy แก่นิสิตนานาชาติ International College มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2544-2545

5.1.3 อาจารย์พิเศษในส่วนของการสอนวิชาชีวเภสัชศาสตร์ 1, 2,3 แก่นิสิตคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2540-2543

5.1.4. อาจารย์พิเศษ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี พ.ศ. 2539-2541

5.1.5 ผู้ประสานงานและร่วมจัดตารางสอน วิชาชีวเภสัชศาสตร์ 1, 2, 3 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2539 - 2541

5.1.6 Teaching and Research Assistantships
Department of Biological Sciences, Illinois State University, USA พ.ศ. 2534-2539

5.1.7 อาจารย์ที่ปรึกษานิสิตแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2540-2543

5.1.8 งานที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

- กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา: ปริญญาโท พ.ศ. 2541- ปัจจุบัน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- กรรมการสอบปริญญานิพนธ์ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา: ปริญญาโท พ.ศ. 2541- ปัจจุบัน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- อาจารย์ที่ปรึกษา และควบคุมดูแล ปริญญานิพนธ์ นิสิตระดับปริญญาตรี: นิสิตฝึกงานภาคฤดูร้อน และนิสิตในโครงการปัญหาพิเศษ พ.ศ. 2540-ปัจจุบัน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

5.2 การวิจัยและงานวิชาการ

งานวิจัยที่ได้ทำไปแล้ว

5.2.1 การศึกษาการพัฒนาโครงสร้างผิวของพยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma sp.* โดย ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและแบบส่งกราด พ.ศ. 2527-2528 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย
(ด้วยความสนับสนุนจาก UNDP/ WORLD BANK / WHO, Special Program for Research and Training in Tropical Diseases)

5.2.2 การศึกษาเส้นทางการเคลื่อนย้ายตำแหน่งภายในวงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverini* พ.ศ. 2529-2530 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

5.2.3 การศึกษาการกระจายของเส้นเลือดฝอยในลูกตาในกระแต *Tupaia glis* โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พ.ศ. 2531 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประเทศไทย

5.2.4 การวิเคราะห์และบ่งบอกตำแหน่งของ Somatostatin ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ของกระแต *Tupaia glis* ด้วยวิธีการทาง Immunohistochemistry พ.ศ. 2532 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประเทศไทย

5.2.5 การพัฒนาการวิเคราะห์และตรวจสอบเพื่อหาแอนติเจนของพยาธิใบไม้ในสัตว์ *Fasciola gigantica* โดยการใช้ monoclonal antibodies พ.ศ. 2533 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

5.2.6 การวิเคราะห์ตำแหน่งของสาร "Entactin" (Extracellular matrix) ในต่อมน้ำ-เหลืองด้วยวิธี Immunofluorescene พ.ศ. 2535-2536 Department of Biological Sciences, Illinois State University, USA

5.2.7 -การแสดงผลของยีน Kinesin-related Protein ของ *Caenorhabditis elegans* ในเจ้าบ้านประเภทแบคทีเรีย

5.2.8 การวิเคราะห์และรวบรวมการเรียงลำดับของยีน *Unc-104* (Kinesin-related Gene) ใน *Caenorhabditis elegans* พ.ศ. 2535-2539 Department of Biological Sciences, Illinois State University, USA

งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

5.2.9 การศึกษาวิเคราะห์และโคลนนิ่งของ cDNA ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง growth hormone จากปมประสาทของหอยเป๋าฮื้อ *Holiotis asinina* Linnaeus
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประเทศไทย
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย (หัวหน้าโครงการ)

5.2.10 การศึกษาทางด้านประสาทกายวิภาคศาสตร์ ประสาทสรีรวิทยาของ dopaminergic neurons ที่เกี่ยวข้องในขบวนการเกิดโรค Parkinson's Disease การศึกษาการสร้างและหลั่ง dopamine ของสายพันธุ์เซลล์ประสาท PC12 :พ.ศ. 2542-ปัจจุบัน
Department of Biological Science, IllinoisState University, USA (ผู้ร่วมวิจัย)

5.2.11 เรื่อง การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในบาดแผลผู้ป่วยเท้าเบาหวานติดเชื้อที่ได้รับการรักษาด้วยน้ำผสมก๊าซโอโซน
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2544-ปัจจุบัน (หัวหน้าโครงการวิจัย)

5.2.12 เรื่อง การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในบาดแผลหนูเบาหวานติดเชื้อที่ได้รับการรักษาด้วยน้ำผสมก๊าซโอโซน
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2544-ปัจจุบัน (ที่ปรึกษาโครงกาวิจัย)

5.2.13 เรื่อง การศึกษาในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) ถึงผลของโอโซนที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ*แบคทีเรีย E.Coli, Salmonella sp* ,. *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*. พ.ศ. 2544-ปัจจุบัน
(หัวหน้าโครงการวิจัย) (submitted publication)

5.2.14 การศึกษา โครงสร้าง ตำแหน่ง และการกระจายตัวของเซลล์ประสาท dopamine neurons ในสมองของ กระแต พ.ศ. 2544-ปัจจุบัน (ที่ปรึกษาโครงการวิจัย)

5.2.15 การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดถึงผลกระทบของคลอโรฟีลล์ชนิดละลายในน้ำที่มีต่อโครงสร้างของเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ 2544-ปัจจุบัน (ผู้ร่วมวิจัย)

5.3 รางวัลและเงินทุนสนับสนุนการวิจัย

พ.ศ.	**รางวัลและเงินทุน**	**สถาบัน**
2524	The Thap Foundation Award	Chulalongorn University
2531	IBRO Fellowship	Chulalongorn University
2533	IBRO Fellowship	All India Institute of Medical Sciences
2535	Rilett Scholarship Award	Department of Biological Sciences
2536-2537	Sigma Xi Research Grant	The Scientific Research Society. ISU
2536-2537	Grant-in aid Research Grant	Graduate School Association, ISU
2537	Poster Presentation Award	Graduate School Association, ISU
2537	Rilett Scholarship Award	Graduate School Association, ISU
2537	Phi Sigma Research Grant	Beta Lambda Chapter, ISU
2537-2538	Grant-in aid Research Award	Graduate School Association, ISU
2537-2538	Grant-in aid Research Professional Advancem Award	Graduate School Association, ISU
2538	Illinois State Academy of Science Research Grant	Illinois State Academy of Science, Illinois State Museum, Springfield. IL
2538	Lela Winegarner Fellowship	Graduate School Association, ISU
2539	Ada Belle Clark Welsh Scholarship	Graduate School Association, ISU
2540	Post-doctoral Grant	The Thai Research Fund
2541-2542	Adjunct Professor	Department of Biological Sciences, ISU
2543	Grant, supporting for Academic 7th APEM Conference, Singapore	Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University
2544	National Research Grant	Srinakharinwirot University, Ministry of University Affairs
2544	Research Grant	Srinakharinwirot University
2544	Grant, supporting for International 14th Endocrinology Conference, Italy	Srinakharinwirot University Prof. Dr. Sudjai Lausunthorn Funding
2545	Grant, Visiting Scholar (Neuroanatomy) Illinois State University, USA	Anatomy Network of Thailand, Ministry of University Affairs

5.4 ผลงานทางวิชาการ

- Sobhon, P., Anupunpisit V., Yuan, H.C., Upathum, E.S., and Saitongdee, P. 1988 *Schistosoma japonicum* (Chinese): Changes of the Tegument Surface in Cercaria, Schistosomula and Juvenile Parasites During Development. International Journal for Parasitology, 18 (8): 1093

- Anupunpisit V., Schroen, D. J., Mathus, T.L., and Cheung, H.T. 1993 Localization of Entactin in Lymphoid organs by Immunofluorescence. The FASEB Journal. 7(4): 140

- Schroen, D. J., Anupunpisit V., Mathus, T.L., and Cheung, H.T. 1993 Adhesion of a Mouse Lymphoid cell line to Entactin and Matrigel. The FASEB Journal. 7(3): 835

- Otsuka, A.J., Boontrakoonpoontawee, P., Anupunpisit V., and Barczak, W. 1993 Molecular Analysis of the *Ceanorhabditis elegans* gene. Molecular Biology of the Cell. 4: 285

- Anupunpisit V., and Otsuka, A.J. 1994 Towards Expression of the *unc-104* Kinesin-related Protein from *Ceanorhabditis elegans*. Molecular Biology of the Cell. 5: 172

- Anupunpisit V., and Otsuka, A.J. 1996 Expression and Characterization of the *unc-104* Kinesin-related Protein from *Ceanorhabditis elegans* The Phi Sigma Research

- Anupunpisit, V. 1998 Dopamine Content and Release of PC12 Cells Srinakharinwirot University Science Journal 14 (2) : 3

- Anupunpisit, V. 1998 A Schema of Compensatory Events for Parkinson's Disease Srinakharinwirot University Science Journal 14 (2) : 56

Thanomsub, B, Anupunpisit V., Chanphetch S., Watcharachaaipong T, Poonkhum R., and Srisukonth C. 2002 Effects of Ozone Treatment on cell Growth and Ultrastructural Changes in Bacteria Journal of General and Applied Microbiology (in press)

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 วัฒนา กรุงเทพฯ 10110 โทร. 2584002-8