รายงานการวิจัย

เรื่อง การป้องกันและควบคุมการเกิดคราบของซูโดโมแนสบนพื้นผิวโลหะ

Protection and control *Pseudomonas* biofilm on metal surface

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล

รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.ดร.รมณี สงวนดีกุล: การป้องกันและควบคุมการเกิดคราบของซูโดโมแนสบนพื้นผิวโลหะ

Romanee Sanguandeekul

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพมหานคร

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok Province.

*Corresponding author. E-mail: sromanee@chula.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยในการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 385 บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร ได้แก่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการเกาะติด อุณหภูมิและแหล่งของสารอาหาร ต่อการเกิดไบโอฟิล์ม พบว่าในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/mL) เพียงสัมผัส(0นาที)ก็เพียงพอให้ *Pseudomonas fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นสเตนเลสสตีลเกรด 304 ชนิด2Bและตรวจพบเชื้อได้ ส่วนสภาวะที่มีเชื้อน้อย (3 log CFU/mL) จะต้องอาศัยเวลาให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนจึงจะตรวจพบได้ แบคทีเรียสามารถเกาะติดบนพื้นผิวสเตนเลสสตีล และเกิดไบโอฟิล์มได้ โดยพบว่า *Pseudomonas fluorescens* สามารถเกาะติดและเพิ่มจำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์ 3.72 ± 0.34 log CFU/cm^2 และมีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมากที่สุดหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบได้ 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่า 5.05± 0.18 log CFU/cm^2 และในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28 C *Pseudomonas fluorescens* สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้บนพื้นผิวสเตนเลสสตีลดีกว่าอุณหภูมิ 20 และ 15 C โดยมีค่าเท่ากับ 4.97± 0.22 ,4.85 ± 0.18 และ 4.22 ± 0.20 log CFU/cm^2 ที่ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหาร (น้ำเกลือปลอดเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อTSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v)) พบว่า การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้และไม่มีการแตกต่างกันมากนัก เนื่องจากมีสารอาหารที่สมบูรณ์ ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และกรดเปอร์รอกซีแอซีติกในการลดปริมาณ *Pseudomonas fluorescens*

ABSTRACT

Factors affect attach and Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* TISTR 385 on stainless steel grade 304/2B under different condition were studied. The ability of bacterial cell to generate biofilm on stainless steel coupons was studied for a total period of 48 hour, under three different experiment treatments: (i) initial inoculums (8 log and 3 log CFU/mL), (ii) incubation temperature (15, 20 and 30 C), (iii) growth medium (0.85% NaCl, TSB, soiling agent). It was found that at 0 min bacterial cell can attach and growth on coupons.The influence of incubation temperature and initial cells inoculums were studied together.The result showed that at initial load of 3 log CFU/mL, no cell can be deteched up to 9 hours but at 24 and 48 hours the number of the bacterial cells is 3.72 ± 0.34 and 5.05± 0.18 log log CFU/cm^2, respectively. The experiment using 8 log CFU/mL gave similar results. The number of the bacterial cells on coupons at 28 C was higher than 20 and 15 C, respectively. Whereas, cell could attach and form biofilm nearly the same in different medium (0.85% NaCl, TSB, soiling agent).

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๒ ขอบคุณบริษัทไทยน็อคซ์สตีล จำกัด ที่อนุเคราะห์เหล็กกล้าไร้สนิมสำหรับใช้ในการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาคเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการอำนวยความสะดวกในการวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่
1 บทนำ 1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
กลไกการเกิดไบโอฟิล์ม 4
การเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร 7
การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์ม 8
ความสำคัญและการปนเปื้อนของ *Pseudomonas* ในผลิตภัณฑ์อาหาร 8
เหล็กกล้าไร้สนิม(Stainless steel) 9
ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม 9
การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ 12
คลอรีนและสารประกอบคลอรีน 12
การใช้สารประกอบคลอรีนในการลดปริมาณจุลินทรีย์ 13
ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 13
3 วิธีดำเนินงานวิจัย 15
จุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ในการวิจัย 15
พื้นผิวที่ใช้ในการทดสอบ 15
สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย 15
ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย 16
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 22
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 43
เอกสารอ้างอิง 45
ภาคผนวก 47
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง 49
ภาคผนวก ข สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง 52
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine 54
ภาคผนวก ง ตารางแสดงข้อมูล 56

สารบัญตาราง

หน้า

2.1 ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไปของ Stainless steel 10
2.2 ชนิดของสเตนเลสสตีล..... 11
4.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณสารอินทรีย์ในตัวกลางชนิดเหลวทั้ง 3 ชนิด..... 29
4.2 ค่า pH และปริมาณของ available chlorine ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์
ที่ใช้ในการทำลายเซลล์ *Pseudomonas fluorescent* ที่อุณหภูมิ 23± 2 องศาเซลเซียส..... 34
4.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ
ทำการวัดที่อุณหภูมิ 28± 2 องเซลเซียส..... 38

ภาคผนวกที่

ง1 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิต
หลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ 56
ง2 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* (planktonic cell)
ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 57
ง3 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิต
หลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 58
ง4 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* (planktonic cell)
ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 59
ง5 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบ
หลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 60
ง6 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบ
หลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 61
ง7 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบ
หลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 62
ง8 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบ
หลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 63

สารบัญภาพ

ภาพประกอบที่ หน้า

1.1 กระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม..... 4
4.1 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นสเตนเลสตีล.....22
4.2 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นสเตนเลสสตีล และ จำนวนเซลล์อิสระของ *Pseudomonas fluorescens* ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL)..... 23
4.3 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นสเตนเลสสตีล และ จำนวนเซลล์อิสระของ *Pseudomonas fluorescens* ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/mL) 24
4.4 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นสเตนเลสสตีล ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28± 2, 20± 2,15± 2 องศาเซลเซียส (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL).....26
4.5 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ ภายในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 % ที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง (28± 2 องศาเซลเซียส) (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL)..... 27
4.6 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ ภายในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง (28± 2 องศาเซลเซียส) (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL)..... 28
4.7 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหารชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง (28± 2 องศาเซลเซียส) (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL)..... 28
4.8 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)..... 30
4.9 ร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 หลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น100 ppm เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)..... ...31
4.10 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL).....32
4.11 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL).....32
4.12 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 33

ภาพประกอบที่ หน้า

4.13 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ภายหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 33
4.14 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 35
4.15 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ภายหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 36
4.16 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB ที่รอดชีวิต หลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 36
4.17 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB หลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 37
4.18 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 38
4.19 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ภายหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 39
4.20 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 40
4.21 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 40
4.22 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 41
4.23 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) 42

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันผู้บริโภคตื่นตัวในเรื่องความปลอดภัยของอาหารเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นความปลอดภัยทั้งทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ ทำให้ผู้ผลิตอาหารต้องดำเนินกิจกรรมต่างๆที่เกี่ยวกับระบบการจัดการด้านความปลอดภัยอย่างเคร่งครัด ซึ่งระบบพื้นฐานที่ต้องจัดทำได้แก่ ระบบ GMP (Good Manufacturing Practices) ที่ว่าด้วยการจัดการและควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัย และ ระบบ HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) ซึ่งเป็นระบบประกันคุณภาพด้านความปลอดภัยของอาหาร (Shia and Zhu, 2009) ในการผลิตอาหารให้ปลอดภัยนั้นการทำความสะอาดมีความสำคัญอย่างมากหากมีการทำความสะอาดไม่เพียงพอ จะทำให้มีการสะสมของแบคทีเรียและเกิดการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิต

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) เป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านการสุขาภิบาลในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากการเกาะติดของแบคทีเรียเกิดเป็นไบโอฟิล์มจะทำให้แบคทีเรียถูกกำจัดได้ยากเพราะสามารถทนทานต่อสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อ (Garrett, Bhakoo and Zhang, 2008) ไบโอฟิล์มสามารถเกิดขึ้นได้บนพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเมื่อพื้นผิวดังกล่าวผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อไม่ดีพอ โดยเฉพาะพื้นผิวที่สัมผัสอาหาร เช่น ผนัง พื้น ท่อน้ำทิ้ง พื้นผิววัสดุยาง สายพานการผลิตและเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิต เป็นต้น (Kumar and Anand, 1998) การทำความสะอาดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการผลิตอาหาร เนื่องจากเป็นส่วนที่มีการสัมผัสกับอาหารโดยตรง ถ้าพื้นผิวสัมผัสมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่มากก็จะมีส่วนในการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ให้กับอาหาร

ในการผลิตอาหารที่มีวัตถุดิบเป็นเนื้อสัตว์นั้น มีจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและทำให้เกิดโรคกับผู้บริโภคได้อยู่หลายชนิด ในกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ ซูโดโมแนสเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สำคัญในการทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดี (Wiedmann et al., 2000; Olofsson, Ahrne and Molin, 2007) อาจจะจับหรือปกป้องจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคให้รอดชีวิตอยู่ในฟิล์มได้ ในแง่ความปลอดภัยของอาหารมีความสำคัญอย่างยิ่งถ้าไบโอฟิล์มเกิดขึ้นจากการรวมตัวของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารเป็นพาหะ เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น Oulahal และคณะ (2007) รายงานว่า ไบโอฟิล์มของแบคทีเรียทำให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพจึงให้ความสำคัญเกี่ยวกับการศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มและการกำจัดไบโอฟิล์ม หากจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารก็จะทำให้อาหารมีความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นความสะอาดของพื้นผิวที่สัมผัสอาหารมีความสำคัญเป็นอย่างมากในกระบวนการผลิตอาหาร การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยการเกิดไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas* รวมทั้งการป้องกันและควบคุมไบโอฟิล์ม เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยเพื่อพัฒนาสุขลักษณะของกระบวนการผลิตอาหาร สามารถควบคุมการเกิดซูโดโมแนสไบโอฟิล์มเพื่อแก้ปัญหาการเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะในแง่ความปลอดภัยของอาหาร ช่วยลดความเสี่ยงของผู้บริโภคจากการเกิดโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหาร และลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งจะทำให้อาหารเน่าเสีย

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มและวิธีการควบคุมไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้น โดยได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกาะติดของ *Pseudomonas fluorescens* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร และการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มภายใต้สภาวะต่างๆ ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ปริมาณเชื้อ ชนิดของอาหาร ส่วนที่สองมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายหรือลดปริมาณเซลล์อิสระและ *Pseudomonas* biofilm บนพื้นผิวสัมผัสนั้น

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในโรงงานผลิตอาหารอาจมีการปนเปื้อนข้ามจากวัตถุดิบ พื้นผิวที่มีการสัมผัสอาหาร พนักงานการผลิต เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องมีการสุขาภิบาลโรงงานอาหารที่ดี การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวชนิดต่างๆโดยเฉพาะพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับอาหารโดยตรง เช่น พื้นผิวอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต ท่อ สายพานการผลิต เป็นต้น มีความจำเป็นหากพื้นผิวดังกล่าวมีความจำเป็นการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อที่ไม่เพียงพอจะทำให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์และเจริญเป็นไบโอฟิล์มได้

ในกระบวนการผลิตอาหารที่มีวัตถุดิบเป็นเนื้อสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นสัตว์ปีกหรือเนื้อต่างๆนั้นอาจมีจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและทำให้เกิดโรคปนเปื้อนอยู่หลายชนิด ในกระบวนการตัดหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เหล่านี้ หากมีการสะสมของจุลินทรีย์ที่ส่วนของใบมีดจะทำให้เกิดการส่งผ่านเชื้อจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์ได้ ซูโดโมแนสเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สำคัญ ทำให้เกิดการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม การเกิดซูโดโมแนสไบโอฟิล์มที่พื้นผิวสัมผัสอาหารจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนผลิตนั้นมีปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูง อายุการเก็บสั้น ทำให้อาหารเสื่อมเสียและไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

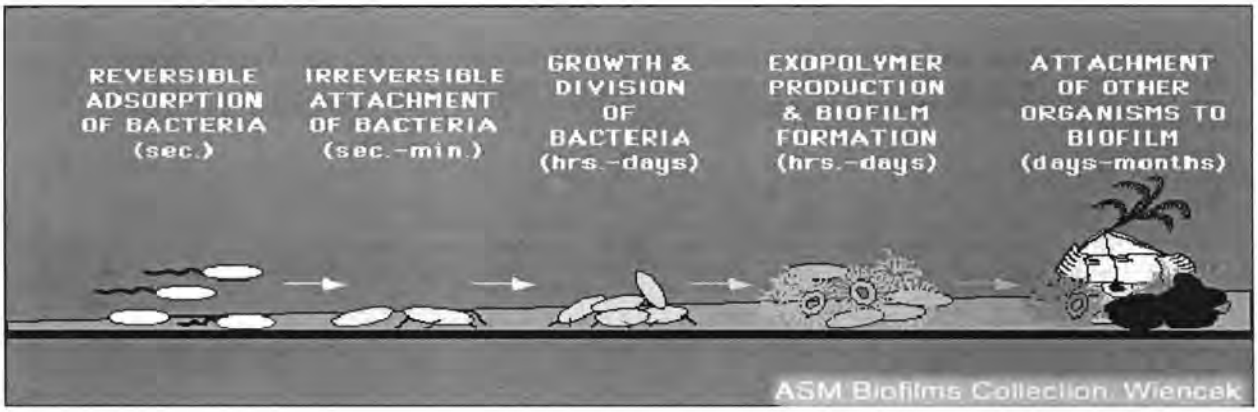
ไบโอฟิล์มเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านการสุขาภิบาลในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากการเกาะติดของแบคทีเรียและเกิดไบโอฟิล์มจะทำให้ถูกกำจัดได้ยากเพราะสามารถทนทานต่อสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อ แบคทีเรียสร้างไบโอฟิล์มเพื่อป้องกันตัวเองต่อสารฆ่าเชื้อหรือสารทำความสะอาด และเพื่อให้ทนภาวะแวดล้อมต่างๆ (Garrett, Bhakoo and Zhang, 2008) ไบโอฟิล์มสามารถเกิดขึ้นได้บนพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเมื่อพื้นผิวดังกล่าวผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อไม่ดีพอ โดยเฉพาะพื้นผิวที่สัมผัสอาหาร (Kumar and Anand, 1998) การทำความสะอาดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการผลิตอาหารเนื่องจากเป็นส่วนที่มีการสัมผัสกับอาหารโดยตรง ถ้าพื้นผิวสัมผัสมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่มากก็จะมีส่วนในการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ให้กับอาหาร Jessen and Lammert (2003) รายงานว่า หลังจากการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิตแฮมด้วยสารทำความสะอาดร่วมกับสารประกอบคลอรีนหรือสารผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับกรดเปอร์แอซีติก พบว่า ยังพบแบคทีเรียมากถึง 3-4 log CFU/cm^2 ซึ่งการหลงเหลือของจุลินทรีย์ถือเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้

ไบโอฟิล์ม คือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวและฝังตัวอยู่ภายใต้สารกลุ่มพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์นั้นสร้างขึ้นแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์เซลล์ เรียกสารกลุ่มนี้ว่า Extracellular Polymeric Substances (EPS) (Costerton and Lewandowski, 1995; Garrett, Bhakoo and Zhang, 2008) เกิดขึ้นเมื่อพื้นผิวดังกล่าวมีการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อไม่เพียงพอ ทำให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์และเจริญกลายเป็นไบโอฟิล์ม (Marshal, 1994; Flint, Bremer and Brooks ,1997) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้บนพื้นผิวชนิดต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะพื้นผิวสัมผัสอาหาร เช่นพื้นผิวอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต ท่อ สายพานการผลิต เป็นต้น ดังนั้นการเกาะติดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารของจุลินทรีย์และเจริญเป็นไบโอฟิล์มมีความสำคัญต่อโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมจุลินทรีย์และเป็นสาเหตุอาจจะเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตและหลังกระบวนการผลิตทำให้อาหารอาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรม

อาหารได้ มักพบไบโอฟิล์มในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานผลิตอาหาร ,โรงงานอุตสาหกรรมนม, โรงพยาบาล, ระบบน้ำ, เป็นต้น

กลไกการเกิดไบโอฟิล์ม

กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มนั้นจัดเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (Dynamic process) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การเกาะติดบนพื้นผิวของจุลินทรีย์ การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ และ การเจริญเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์



รูปที่ 1.1 กระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม

ที่มา : http://img.photobucket.com/albums/v159/skdevitt/biofilm_formation.gif

ปัจจัยของการเกิดไบโอฟิล์ม

- ปริมาณสารอาหาร
- ความเป็นกรดด่าง
- อุณหภูมิ
- ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์
- ประจุบนพื้นผิว
- ความเป็นไฮโดรโฟบิก
- โครงสร้างของสาร EPS
- ช่วงการเจริญของจุลินทรีย์ (Garrett, Bhakoo and Zhang, 2008)

1. **การเกาะติดบนพื้นผิวของจุลินทรีย์** (Attachment)

การเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิวของอาหารหรือวัสดุที่สัมผัสกับอาหารอาจเกิดขึ้นได้จากตัวเซลล์หรือการกระทำจากภายนอก ถ้าเป็นการเกาะติดแบบแพสซีฟ (passive) จะเกิดขึ้นจากแรงโน้มถ่วงของโลก และแรงที่เกิดขึ้นจากของไหลที่อยู่รอบๆบริเวณเซลล์ ได้แก่ แรงขับเคลื่อนของของไหล (fluid dynamic force) และแรงขับเคลื่อนจากการแพร่ (diffusion dynamic force) ส่วนการเกาะติดแบบแอคทีฟ (active) เกิดขึ้นเนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะของผิวเซลล์ที่มีส่วนประกอบที่จะเพาะต่อการเกาะติด เช่น แฟลกเจลลา (flagella) พิไล(pili) โปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะแอดฮีซิน (adhesin protein) แคปซูล (capsule) และประจุที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ การเกาะติดของเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ (กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล, 2550)

ระยะที่ 1 การเกาะติดแบบผันกลับ (reversible adhesion) เซลล์แบคทีเรียจะเกิดพันธะอย่างอ่อนกับพื้นผิว พันธะที่เกิดขึ้นได้แก่ แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waals forces) electrostatic forces และ hydrophobic interaction ในระยะนี้เซลล์แบคทีเรียยังคงมีการเคลื่อนที่ได้โดยเป็นการเคลื่อนที่แบบบราวน์เนียน (Brownian movement)

ระยะที่ 2 การเกาะติดแบบไม่ผันกลับ (irreversible adhesion) เซลล์แบคทีเรียจะมีการสร้างพันธะที่แข็งแรง ได้แก่ dipole-dipole interaction พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) พันธะโควเลนต์ (covalent bonding) และ hydrophobic interaction กับพื้นผิวโดยอาศัยโครงสร้างของเซลล์เช่น แฟลกเจลลา (flagella) ฟิมเบรีย (fimbriae) พิไล(pili) เป็นต้น นอกจากนี้เซลล์จะมีการสร้างไฟบริล (fibril) เพื่อเป็นการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับพื้นผิวอีกด้วยทำให้มีการยึดเกาะที่เหนียวแน่นกว่าในระยะแรก ซึ่งการกำจัดเซลล์แบคทีเรียในระยะนี้ออกไปทำได้ยากขึ้น

Zottola (1994) ทำการรวบรวมข้อมูลจากนักวิจัยหลายท่านเพื่ออธิบายกลไกการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่างๆ โดยแสดงความสัมพันธ์ของแรงยึดเกาะกับระยะห่างของเซลล์กับพื้นผิว กล่าวคือ เมื่อมีสารอาหารหลงเหลือบนพื้นผิวจนเกิดเป็นฟิล์มของอาหาร (conditioning film) เซลล์จุลินทรีย์อิสระที่อยู่ในสภาพแวดล้อมจะเคลื่อนที่เข้าหาพื้นผิว จนเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวมากกว่า 50 นาโนเมตร เซลล์จะเกิดการเกาะติดกับพื้นผิวด้วยแรงอย่างอ่อน เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์จะเข้าใกล้ผิวมากขึ้นจนระยะห่างมีค่า 10-20 นาโนเมตร แรงยึดเกาะนั้นจะเพิ่มขึ้น ทั้งสองระยะนี้จะเป็นขั้นตอนของการเกาะติดแบบผันกลับได้ จนในที่สุดเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวลดลงต่ำกว่า 15 นาโนเมตร เซลล์จุลินทรีย์เหล่านั้นจะเกิดการสร้างพันธะพิเศษเกิดเป็นการเกาะติดแบบไม่ผันกลับ เซลล์ต่างๆเหล่านั้นจะมีการเจริญเพิ่มจำนวนและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มต่อไป

กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล (2550) รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิว พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิว ได้แก่

(1) ชนิดและโครงสร้างของเซลล์ เซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้างบนเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) หรือ LPS โปรตีนแอดฮีซินและโปรตีนชนิดอื่น กรดไทโคอิก (teichoic acid) เป็นต้น โครงสร้างเหล่านี้จะแสดงถึงโฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ของเซลล์ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเกาะติดบนพื้นผิว มีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* ใช้แฟลกเจลลา พิไล และโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ในการเกาะติดขั้นต้น การสูญเสียโครงสร้างเหล่านี้มีผลในการลดความสามารถ

ในการเกาะติดบนพื้นผิวบางชนิดได้ รายงานว่า สปอร์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้ดีกว่าเซลล์เนื่องจากมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงและผิวของสปอร์มีลักษณะเป็นขน (hairy surface)

(2) สภาพแวดล้อมและองค์ประกอบของสารอาหารที่อยู่ล้อมรอบ เมื่อการการสะสมของสารอาหารบนพื้นผิวจนเป็นลักษณะของฟิล์มที่เรียกว่า conditioning film ฟิล์มดังกล่าวจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีและกายภาพของพื้นผิว เช่น ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว (surface free energy) ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิตี้ (hydrophobicity) และประจุของพื้นผิว ซึ่งอาจส่งผลถึงการเกาะติดของจุลินทรีย์ มีหลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า สารอินทรีย์บนพื้นผิวนั้นสนับสนุนให้จุลินทรีย์เกาะติดบนพื้นผิวได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม บางงานวิจัยรายงานว่า สารอินทรีย์ เช่น นมและโปรตีนนมมีผลในการลดการเกาะติดของ *Salmonella* Typhimurium และ *L. monocytogenes* ได้ นอกจากปัจจัยของสารอินทรีย์แล้ว อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบสของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมยังส่งผลต่อการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มด้วย

(3) ลักษณะและคุณสมบัติของพื้นผิว อัตราการเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นกับลักษณะทางกายภาพของพื้นผิว ได้แก่ ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิตี้ ความเรียบผิว (roughness) และประจุบนพื้นผิว การเกาะติดของจุลินทรีย์เกิดขึ้นบนพื้นผิวที่มีพลังงานอิสระสูงหรือมีความเปียกน้ำได้ง่าย (เช่น เทฟลอน (Teflon) ไนลอน (nylon) ยาง (buna-N rubber) เป็นต้น) แต่ข้อสรุปดังกล่าวอาจให้ผลที่ไม่เป็นความจริงเสมอไป มีบางงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกมากกว่าพื้นที่ผิวไฮโดรฟิลิก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพื้นผิวลักษณะเป็นรูพรุน ไม่สม่ำเสมอ มีรอยแยก จะทำให้เกิดการเกาะติดได้ดีกว่าพื้นผิวเรียบ

2. **การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์** (Colonization)

หลังจากเซลล์มีการเกาะติดในระยะที่ 2 การเกาะติดแบบไม่ผันกลับแล้ว เซลล์จะมีการเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปโดยใช้สารอาหารที่มีอยู่รอบๆในสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็ก (microcolony) ซึ่งกลุ่มของเซลล์นี้จะขยายใหญ่และเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) ปกคลุมบริเวณพื้นผิว microcolony ประกอบด้วยกลุ่มของแบคทีเรียกลุ่มเดียวหรือหลายๆสายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ล้อมรอบกลุ่มเซลล์ กลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กจะมีเซลล์อยู่ 10-25% และมีสาร Extracellular Polymeric Substances (EPS) ซึ่งเป็นสารกลุ่มพอลิเมอร์ที่เซลล์หลั่งออกมาและปกคลุมอยู่ที่ผิวของเซลล์ 75-90 % (Poulsen, 1999) จะช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้งและสารเคมีต่างๆ เช่น สารทำความสะอาด เป็นต้น

3. **การเจริญเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์** (Maturation)

กลุ่มเซลล์เพิ่มจำนวนซ้อนทับกันและเกิดเป็นชั้นของเซลล์ภายใต้สาร EPS จะเกิดการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มและมีโครงสร้างรูปเห็ด (mushroom-like shape) (Jessen and Lammert, 2003) โครงสร้างของไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่อาจเป็นชั้นของเซลล์เพียงชั้นเดียวภายใต้โครงข่ายของ EPS ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (porous) หรือเป็นชั้นของเซลล์หลายชั้นซ้อนกันโดยมีการเชื่อมกันด้วย EPS และมีช่องสำหรับลำเลียงน้ำ (water channel) กระจายอยู่ทั่วไป นอกจากสาร EPS จะมีหน้าที่สำคัญในการเชื่อมโยงเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพและยึดเหนี่ยวเซลล์กับพื้นผิวแล้ว ยังมีความสำคัญในการอยู่รอดของฟิล์มชีวภาพด้วย

EPS มีหน้าที่ห่อหุ้มและกักเก็บสารอาหารไว้เก็บกักเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้ง สารเคมีต่างๆ เป็นต้น

การเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) เป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์ ซึ่ง อาจจะเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตและหลังกระบวนการผลิตทำให้อาหารอาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมอาหารได้

การสะสมไบโอฟิล์มบนพื้นผิวพบได้ในหลายบริเวณของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ พื้น ท่อ ซีลยาง (rubber seal) สายพาน (conveyor belt) สแตนเลสสตีล เป็นต้น Garrett และคณะ (2008) รวบรวมเอกสารเกี่ยวกับการตรวจพบจุลินทรีย์บนพื้นผิวโดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคและชนิดที่ทำให้เกิดการเน่าเสียกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบว่ามักสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ *Pseudomonas, Salmonella, Listeria monocytogenes , Enterobacter, Flavobacterium, Alcaligenes, Staphylococcus* และ *Bacillus* อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม พบไบโอฟิล์มจากแบคทีเรียกลุ่ม *Flavobacterium, Acinotobacter, Bacillus, Pseudomonas, Alcaligenes* และ *Achromobacter* อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม พบไบโอฟิล์มจาก *Streptococcus thermophilus* ที่เครื่องแลกเปลี่ยนความร้อน (heat exchangers) อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ตัวอย่างในผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก พบไบโอฟิล์มจากแบคทีเรียกลุ่ม*Salmonella,Campylobacter,Yersinia enterocolitica Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* (Poulsen, 1999) ผลิตภัณฑ์ไส้กรอก พบไบโอฟิล์มจากแบคทีเรียกลุ่ม *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* และ *Pseudomonas spp.* (Antonia et al., 2008)

การตรวจพบจุลินทรีย์ที่เกิดในโรงงานการผลิตเนื้อสัตว์ มากกว่าร้อยละ 70 ของแบคทีเรียทั้งหมด โดยตรวจพบบริเวณพื้นที่การผลิต อุปกรณ์ และเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและสัมผัสกับอาหาร จากรายงานการวิจัยต่างๆ (Garrett, Bhakoo and Zhang, 2008) จะเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์มากมายถูกตรวจพบบนพื้นผิวสัมผัสอาหารและเกิดการสร้างเป็นไบโอฟิล์มได้ ซึ่งเซลล์ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มจะมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จนทำให้มีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมอาหารถ้ามีการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต

การที่เซลล์จุลินทรีย์ภายใต้ไบโอฟิล์มสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น เกิดจาก

(1) สารพอลิเมอร์ที่เซลล์สร้างขึ้นปกคลุมไว้มีผลในการลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ

(2) การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์

(3) ความจำกัดของสารอาหารมีผลให้เซลล์เกิดการปรับตัวและชักนำเข้าสู่สภาวะเครียด

(4) ความหนาแน่นของเซลล์ภายใต้ฟิล์มชีวภาพที่มีการตอบสนองต่อสารฆ่าเชื้อได้แตกต่างกัน

ดังนั้นการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อด้วยวิธีปกติอาจไม่เพียงพอในการทำลายและการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนผิวได้ การทำความสะอาดในการหลงเหลือจุลินทรีย์ ซึ่งการหลงเหลือของจุลินทรีย์ถือเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้ การพบเชื้อบนพื้นผิวที่สามารถปนเปื้อนสู่อาหารได้

ความสำคัญและการปนเปื้อนของ *Pseudomonas* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ซูโดโมแนสเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ มีลักษณะเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อยู่ในกลุ่มของ Psychrotrophs สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในเนื้อสัตว์ที่อุณหภูมิ 2 – 15 °C (Gill and Newton, 1997) ส่วนใหญ่พบมากในอาหารสด เนื้อสัตว์ต่าง ๆ พวกพืชผักและผลไม้โดยเฉพาะอาหารแช่เย็น เนื่องจากหลายสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียประเภททนความเย็นและสามารถสร้างเอนไซม์ได้ เป็นแบคทีเรียที่ทำให้อาหารหลายชนิดเน่าเสียมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหาร เช่น เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรส สี หรือเกิดเมือก และเนื้อสัมผัสเปลี่ยนไป เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าซูโดโมแนสบางสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ในการก่อให้เกิดโรคปอดบวม เป็นต้น ซูโดโมแนสเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดี (Wiedmann et al., 2000; Olofsson, Ahrne and Molin, 2007)

เมื่อเกิดไบโอฟิล์มทำให้การกำจัดเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในฟิล์มทำได้ยากมาก การทำความสะอาดตามปกติไม่สามารถกำจัดได้หมด จะต้องใช้แรงทางกายภาพช่วยในการกำจัด นอกจากนี้แบคทีเรียที่เจริญในไบโอฟิล์มยังมีความสามารถในการต้านทานสารทำความสะอาด (Costerton, 2005) และสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลาย (Planktonic) (Chavant, Gaillard-Martinie and Hébraud, 2004) เนื่องจากการพัฒนาทางพันธุกรรมขึ้นกับการเกาะติดบนพื้นผิวและการแฝงตัวในภาวะที่เป็นไบโอฟิล์ม และเกิดการปรับตัวทางด้านลักษณะปรากฏ นอกจากนี้การแทรกซึมของสารฆ่าเชื้อเข้าไปในไบโอฟิล์มยังเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งขึ้นกับชนิดของสารที่ใช้ การเกาะติดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารของจุลินทรีย์และเจริญเป็นไบโอฟิล์มมีความสำคัญต่อโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์และอาจจะเกิดการปนเปื้อนข้ามของเชื้อจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์อาหาการกำจัดและทำลายไบโอฟิล์ม

การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์ม

ขั้นตอนในการกำจัดและการทำลายไบโอฟิล์มประกอบด้วย การทำความสะอาด(cleaning) และการฆ่าเชื้อ (sanitizing) ส่วนใหญ่เริ่มจากการใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็นล้างสิ่งสกปรกต่างๆออกจากพื้นผิว และใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การขัดถูร่วมกับสารทำความสะอาด เป็นต้น ล้างส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ที่ฝังแน่นออกไป จากนั้นจะใช้สารฆ่าเชื้อเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์ ถ้าสารทำความสะอาดไม่สามารถล้างสารอินทรีย์ได้หมด สารฆ่าเชื้อจะไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นการเลือกวิธีการทำลาย ชนิดและความเข้มข้นของสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสม รวมถึงระยะเวลาในการทำความสะอาดจึงมีความสำคัญอย่างมาก (จีระเดช มาลา, 2551) การกำจัดและการทำลายไบโอฟิล์มสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

1. วิธีทางกายภาพ

การทำลายไบโอฟิล์มด้วยวิธีทางกายภาพสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม คือ การใช้แรงกลในการขัดลอกไบโอฟิล์ม แต่ไม่เหมาะกับพื้นผิวขรุขระ ปัจจุบันจึงได้มีการประยุกต์ใช้วิธีอื่นๆร่วมด้วย เช่น การใช้คลื่นเสียง (sonication) การใช้แรงดันสูง (high pressure) เป็นต้น นอกจากนี้การใช้น้ำที่อุณหภูมิสูงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ให้ในการกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มได้

2. วิธีการทางเคมี

การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มประกอบด้วย การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงควรเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสมเข้าช่วยขั้นตอนของการทำความสะอาดจำเป็นต้องกำจัดเศษอาหารและสารอินทรีย์ต่างๆ ที่ช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป สารทำความสะอาดที่ดีจึงต้องมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว ทำให้ไขมันกระจายตัวออกและย่อยสลายโปรตีนได้ เพื่อกำจัด EPS ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปกคลุมเซลล์ออกไป

3. วิธีการทางชีวภาพ

การใช้วิธีทางชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากผู้บริโภคอาหารส่วนใหญ่ให้ความสำคัญเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารมากขึ้น ได้มีการนำสารชีวภาพ เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ มาใช้เคลือบบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารเพื่อยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย เป็นต้น นอกจากสารในกลุ่มแบคเทอริโอซินแล้ว เอนไซม์เป็นสารชีวภาพกลุ่มหนึ่งที่ถูกเลือกใช้ในการทำลายไบโอฟิล์ม เพราะเอนไซม์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และจุลินทรีย์ต่างๆได้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัด EPS และไบโอฟิล์มได้ แต่เอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์แตกต่างกัน จึงมีข้อจำกัดในการเลือกใช้ ที่จำเป็นต้องเลือกให้จำเพาะกับชนิดของสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์ที่สร้างไบโอฟิล์มนั้น (กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล,2550)

เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel)

เหล็กกล้าไร้สนิม หรือ สเตนเลส นั้น ในทางโลหกรรมถือว่าเป็นโลหะผสมเหล็ก ที่มีโครเมียมอย่างน้อยที่สุด 10.5% เนื่องจากโลหะผสมดังกล่าวไม่เป็นสนิมอันเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยากันระหว่าง ออกซิเจนในอากาศกับโครเมียมในเนื้อสเตนเลส เกิดเป็นฟิล์มบางๆเคลือบผิวไว้ ทำให้เหล็กสามารถต้านทานการการเกิดสนิมจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation)ได้ โดยทำหน้าที่ปกป้องการเกิดความเสียหายให้กับตัวเนื้อสเตนเลสได้เป็นอย่างดี ปกป้องการเกิดการกัดกร่อน (Corrosion) และไม่ชำรุดหรือสึกกร่อนง่ายอย่างโลหะทั่วไป หรือการเป็นสนิมที่เป็นผลมาจากปริมาณโครเมียมในเนื้อเหล็ก เหล็กกล้าไร้สนิมจึงแตกต่างจากเหล็กธรรมดาทั่วไปที่มีการป้องกันการกัดกร่อนด้วยการชุบ หรือเคลือบผิวอินทรีย์สาร เช่น การเคลือบสี เป็นต้น

เหล็กกล้าไร้สนิม เป็นวัสดุที่สมบูรณ์แบบสำหรับใช้ในครัวเรือนและอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีความต้านทานต่อการกัดกร่อนสูง จึงไม่เป็นสนิมและไม่ทำปฏิกิริยากับกรดและเกลือที่มีอยู่ในอาหาร มีพื้นผิวเรียบและมีความเป็นกลางจึงไม่ดูดซึมรสใดๆ ทำความสะอาดได้ง่ายและถูกหลักอนามัยในทุกขั้นตอนการใช้ ทนความร้อน ความเย็น และการเปลี่ยนอุณหภูมิโดยฉับพลันได้ดี

ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม

เหล็กกล้าไร้สนิมแบ่งออกเป็น 4 ชนิดหลัก คือ

1. เกรดออสเตนิติก แม่เหล็กดูดไม่ติด นอกจากส่วนผสมของโครเมียม18 % แล้วยังมีนิเกิลที่ช่วยเพิ่มความต้านทานการกัดกร่อน เหล็กชนิดนี้ผลิตได้ง่ายจึงเป็นที่นอยมอย่างกว้างขวาง
2. เกรดเฟอร์ริติก แม่เหล็กดูดติด มีส่วนผสมของคาร์บอนต่ำ และมีโครเมียมเป็นส่วนผสมหลัก คือ ประมาณ 13 % หรือ 17%

3 เกรดมาร์เทนซิติก แม่เหล็กดูดติด โดยทั่วไปจะเป็นโครเมียมผสมอยู่ 12 % และมีส่วนผสมของคาร์บอนในระดับปานกลาง มักนำไปใช้ทำล้อม มีด เครื่องมือผ่าตัด และเครื่องวิศวกรอื่นๆ ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นในการต้านทานการสึกกร่อนและความแข็งแรงทนทาน

4 เกรดดูเพลกซ์ แม่เหล็กดูดติด มีโครงสร้างผสมระหว่างเฟอร์ไรต์และออสเตไนต์ มีโครเมียมผสมอยู่ประมาณ 18-28 %และนิเกิล 4.5-8% เหล็กชนิดนี้มักถูกนำไปใช้งานที่มีคลอรีนสูง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการกัดกร่อนแบบรูเข็ม (pitting corrosion) และช่วยเพิ่มความต้านทานการกัดกร่อนที่เป็นรอยร้าว อันเนื่องมาจากแรงกดดัน (stress corrosion cracking resistance)

เหล็กกล้าไร้สนิมโดยทั่วไปจะอยู่ใน 3 ชนิดใหญ่ๆ โดยแบ่งตามชนิดและปริมาณโลหะที่ผสมลงไป ซึ่งเป็นตัวกำหนดโครงสร้างทางโลหะวิทยา ตลอดจนคุณสมบัติเชิงกลคุณสมบัติทางฟิสิกส์และความต้านทานการกัดกร่อนซึ่งตารางที่ 2.1 ได้แสดงชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบโดยประมาณของสเตนเลสสตีล (บริษัทไทยน๊อคซ์สตีล จำกัด, 2006)

ตารางที่ 2.1 ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไป

ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม										
ชื่อมาตรฐานสากล						ส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไป				
ชนิด	ไทยน๊อกซ์	TISI ไทย	AISI USA	JIS ญี่ปุ่น	EN10088 ยุโรป	คาร์บอน	โคบอล	นิเกิล	โมลิบดินัม
เฟอร์ริติก	TNX SC17	SST 430	430	430	1.4016	0.05	16.5	-	-
ออสเตนิติก	TNX S189	SST 304	430	430	1.4016	0.04	18.5	-	-
ออสเตนิติก ผสมโมลิบดินัม	TNX LM 1811	SST 316L	316L	316L	1.4404	0.025	17.5	11.5	2.0

ที่มา: บริษัทไทยน๊อคซ์สตีล จำกัด (2006)

พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel)

พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมมีหลายชนิด โดยมีทั้งชนิดเงาเหมือนกระจก แบบด้าน แบบเรียบหรือขัดผิว ซึ่งแต่ละพื้นผิวสามารถใช้ร่วมกับวัสดุอื่นหรือใช้พื้นผิวชนิดต่างๆได้ดีและไม่แตกหัก ซึ่งตารางที่ 2.2 ได้แสดงชนิดของพื้นผิว ลักษณะ ความเรียบ และความสะท้อนแสงของสเตนเลสสตีล

ตารางที่ 2.2 ชนิดของสเตนเลสสตีล

ชนิด	ลักษณะ	ความเรียบ (ไมครอน)	ความสะท้อนแสง%
2D	รีดเย็น, อบอ่อนและพิคคลิ่ง: ผิวด้าน	0.1 - 0.03	13
2B	รีดเย็น, อบอ่อนและพิคคลิ่ง: ผิวเงาขึ้นเล็กน้อย จากการรีดเย็นออกเป็นสีเทา	0.03 – 0.02	22**
BA	หลังรีดเย็นและอบด้วยความร้อน: ผิวมันเงา	0.02 – 0.06	-
No.4	ขัดด้วยกระดาษทราย *80	<1.0	-
HL	มีลายเส้นยาวจากการขัดแต่งผิว (Hair Line)	0.1 - 0.03	-
No.8	ขัดผิว buffering: ผิวเงาเหมือนกระจก (mirror finish)	-	85

*ความเรียบ หมายถึง ความเรียบของพื้นผิวซึ่งวัดด้วยโปรฟิลโลมิเตอร์

**46% สำหรับเฟอร์ริติก

ที่มา: บริษัทไทยน๊อคซ์สตีล จำกัด (2006)

การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ

โรงงานควรจะพิจารณาเลือกใช้สารฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี (chemical disinfectants) ให้เหมาะสมสำหรับแต่ละส่วนงาน เนื่องจากสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิดมีจุดเด่นจุดด้อยต่างกันไป สารฆ่าเชื้อที่ดีต้องมีคุณสมบัติไม่เป็นพิษ ไม่ทำให้เกิดการสึกกร่อนของพื้นผิวที่ใช้ ไม่มีผลต่อกลิ่น รสและสีของอาหาร มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ ระยะเวลาในการสัมผัส ความสะอาดของพื้นผิว ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความกระด้างของน้ำ และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวที่จะทำความสะอาด

ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจะมี 5 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการทำความสะอาด 3 ขั้นตอนและขั้นตอนการฆ่าเชื้ออีก 2 ขั้นตอน ดังนี้

- การกำจัดสิ่งสกปรก (soil or dirt) ขนาดใหญ่ด้วยวิธีกล เช่น การปัด กวาด ถู ขัดหรือชะล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นต้น
- การกำจัดสิ่งสกปรกที่เหลืออยู่ด้วยสารชะล้าง (detergent)
- การล้างด้วยน้ำ (rinsing) เพื่อล้างสารชะล้างและสิ่งสกปรก
- การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือสารฆ่าเชื้อ
- การล้าง (rinsing) สารฆ่าเชื้อออกจากพื้นผิวเครื่องจักรและอุปกรณ์

คลอรีนและสารประกอบคลอรีน

คลอรีนเป็นธาตุหมู่ที่ 7(Halogen) เมื่ออยู่ในรูปแก๊สมีสีเขียวแกมเหลือง แก๊สคลอรีนเริ่มใช้ครั้งแรกตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 18 เพื่อใช้เป็นสารฟอกสีในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ปัจจุบันมีการนำสารประกอบคลอรีนมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้เพื่อฆ่าเชื้อในแหล่งน้ำ ใช้ฆ่าเชื้อเครื่องมือ หรืออุปกรณ์ที่มีพื้นผิวสัมผัสอาหาร ใช้ฉีดพ่นเครื่องมือระหว่างกระบวนการผลิตอาหารเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ เป็นต้น

คลอรีนและสารประกอบคลอรีนในรูปแบบต่างๆ ได้จัดให้เป็นสารประเภทที่เรียกว่า "Generally Recognized as Safe" (GRAS) ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ ซึ่งมักใช้คลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนเพื่อวัตถุประสงค์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีการใช้คลอรีนในอุตสาหกรรมประเภทอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมการผลิตยา เป็นต้น

การเกิดปฏิกิริยาของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนในน้ำ

การใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อ นิยมเตรียมในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นของคลอรีนอิสระตามที่ต้องการ โดยคลอรีนและสารประกอบคลอรีนทำปฏิกิริยากับน้ำได้กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ดังสมการ

$$Cl_2 + H_2O \longrightarrow HOCl^- + H^+ + Cl^-$$

$$Ca(OCl)_2 + H_2O \longrightarrow Ca^{2+} + H_2O + 2OCl^-$$

$$Ca(OCl)_2 + H_2O \longrightarrow Ca(OH)_2 + 2HOCl$$

$$HOCl \longleftrightarrow OCl^-$$

การใช้สารประกอบคลอรีนในการลดปริมาณจุลินทรีย์

การใช้สารประกอบคลอรีนในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีการเติมในน้ำที่ใช้ในกระบวนการ โดยได้แบ่งคลอรีนเป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ คือคลอรีนเหลว สารประกอบไฮโปคลอไรต์ (hypochlorite) สารอนินทรีย์คลอรามีน (inorganic chloramines) สารอินทรีย์คลอรามีน (organic chloramines) และคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) ซึ่งมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน

คลอรีนจะทำปฏิกิริยารวมตัวกับโปรโตพลาสซึมของเซลล์จุลินทรีย์ โดยเข้าไปไปแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมในกลุ่มอะมิโน เกิดเป็นสารประกอบขึ้นใหม่ คือ คลอรามีน ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ คลอรีนจะทำให้เกิดการตกตะกอนขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญภายในเซลล์ และยับยั้งการใช้กลูโคสของเชื้อจุลินทรีย์ (กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล, 2549)

ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของโซเดียมไฮโปคลอไรท์

โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เป็นสารประกอบคลอรีนชนิดหนึ่ง มีสูตรทางเคมีคือ NaOCl โซเดียมไฮโปคลอไรท์อยู่ในรูปของสารละลาย เตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และคลอรีนในน้ำ เป็นกลุ่มของคลอรีนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุด เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ เกิดปฏิกิริยาได้เร็ว ทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิดและราคาถูก มีสมบัติฟอกสี แต่มีข้อเสีย คือ กัดกร่อนโลหะบางชนิดและประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ลดลงเมื่อมีสารอินทรีย์ปะปนในสารละลาย ปัจจุบันใช้ในอุตสาหกรรมฟอกสี สารฆ่าเชื้อโรคในแหล่งน้ำ และใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมนมและอาหารอย่างกว้างขวาง

โซเดียมไฮโปคลอไรต์ซึ่งเป็นสารประกอบคลอรีนมีสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ใน 3 ตำแหน่ง ดังต่อไปนี้ (สุดาพร เทียบจัตุรัส, 2545)

ส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มสปอร์ ซึ่งเป็นส่วนของผนังเซลล์ สารประกอบคลอรีนสามารถทำลายแบคทีเรียได้โดยการเกิดปฏิกิริยาของคลอรีนกับโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการสร้างสารประกอบ N-chloro ซึ่งไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ทำให้คุณสมบัติการควบคุมการผ่านเข้าออกของเซลล์สูญเสียไป และสารประกอบคลอรีนมีคุณสมบัติทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารอาหารได้ การที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายนี้ จะทำให้ไม่สามารถรับสารอาหารได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน หรือสารอาหารที่จำเป็นในการดำรงชีพเข้าสู่เซลล์ได้ เมื่อเซลล์ขาดสารอาหาร จะทำให้การเจริญของจุลินทรีย์หยุดลงและตายในที่สุด

ส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ (protoplast) พบว่าสารประกอบคลอรีนไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับส่วนโปรโตพลาสซึมของเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนที่เป็นโปรตีน โดยจะไปตกตะกอนส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์ สารประกอบคลอรีนจะไปทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลโฟดริล(sulhydryl) ของโปรตีน เกิดการรบกวนการทำงานของเซลล์(สุดาพร เทียบจัตุรัส, 2545)

ส่วนที่เป็นเอนไซม์ สารประกอบคลอรีนรบกวนการทำงานของเอนไซม์และยังสามารถทำลายเอนไซม์ได้อีกด้วย เอนไซม์เป็นโปรตีน สารประกอบคลอรีนที่เข้าไปในเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือเกิดการรวมตัวของเอนไซม์ ทำให้ระบบการทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนไป เอนไซม์หลายชนิดที่ได้รับผลกระทบจากคลอรีน เช่น Triosephophate dehydrogenase, glucose oxidase, transaminase, succinic oxidase เป็นต้น

กรดเปอร์ออกซีแอซีติก (Peroxyacetic acid)

กรดเปอร์ออกซีแอซีติก คือ เปอร์ออกไซด์ของกรดแอซีติก มีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง ละลายน้ำได้ดี และที่ความเข้มข้นสูงมีกลิ่นฉุน โดยทั่วไปมีสารคงตัวผสมอยู่ด้วย ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง และเมื่อมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก

กรดเปอร์ออกซีแอซีติก สามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้โดยการรบกวนพันธะซัลไฮดริลและซัลเฟอร์ในโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ โดยทำหน้าที่เป็นสารออกซิไดซ์ และยังสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ นอกจากนี้กรดเปอร์ออกซีแอซีติกยังสามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพ ขัดขวางการขนส่งของผนังเซลล์ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ สามารถรบกวนการเข้าออกที่เยื่อหุ้มเซลล์จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด (Kunigk and Almeida,2001)

เมื่อสารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกสลายตัว จะได้น้ำ ออกซิเจน และกรดแอซีติก ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษในอาหารและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดโฟมและสารประกอบฟอสเฟต สามารถเกิดปฏิกิริยาในน้ำกระด้าง และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

จุลินทรีย์ทดสอบ

เชื้อบริสุทธิ์ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

พื้นผิวทดสอบ

Stainless steel ชนิด 304 No.2B

ได้รับจากการอนุเคราะห์จากบริษัทไทยน๊อคซ์สตีล จำกัด(มหาชน)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Trypticase Soy Broth (Merck Laboratories,Darmstadt, Germany)

Trypticase Soy Agar (Merck Laboratories,Darmstadt, Germany)

Pseudomonas Agar Base (Merck Laboratories,Darmstadt, Germany)

Nutrient Agar (Merck Laboratories,Darmstadt, Germany)

สารเคมี

Sodium thiosulfate-pentahydrate ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)	AR grade
Sodium chloride (NaCl)	AR grade
Potassium iodide (KI)	AR grade
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	AR grade
Di- Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4)	AR grade
Acetone ($(CH_3)_2CO$)	AR grade
Absolute ethanol (C_2H_5OH)	AR grade

สารฆ่าเชื้อ

Sodium hypochlorite (NaOCl) (Merck Laboratories,Darmstadt, Germany)

Peroxyacetic acid: POA (Peroxy Thai, Thailand)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert รุ่น 600, Germany)
เครื่อง Spectrophotometer (รุ่น Genesys 10 UV, USA)
เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP3100S, Germany)
เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น A2005, Germany)
เครื่อง pH meter (Eutech รุ่น Cyber Scan pH 1000 Bench,Singapore)
เครื่อง Vortex (Labnet รุ่น VX 100, USA)
เครื่อง Autoclave (TOMY Autoclave รุ่น SS-320, Japan)
ตู้บ่มเชื้อ Incubator (Heraeus instrumevt รุ่น B6)
ตู้บ่มเพาะเชื้อ Incubation shaker (Mennert รุ่น LINE-LAB, Germany)
เครื่อง Centrifuge (Zentrifugen รุ่น 40G257, Germany)
เครื่อง Colony counters (Suntex, Taiwan)
ตู้ Laminar flow cabinet (BVT-123, Thailand)
เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็น

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* และการนับจำนวนเซลล์

3.1.1 การเตรียมเซลล์ *Pseudomonas fluorescens*

เตรียมเซลล์แบคทีเรียจากแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Agar (NA) เอียงในหลอดทดลอง (slant) (เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) โดยถ่ายเชื้อ 1 ลูปลงในอาหารเหลว Trypticase Soy Broth (TSB) 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงโดยการเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นแยกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 °C เก็บส่วนตะกอนมา resuspension ด้วย 0.85%NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และปรับให้ได้ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.3 จะได้เชื้อเริ่มต้นที่ 9 log CFU/mL เตรียมความเข้มข้นของปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่ต้องการ โดยเจือจางตะกอนเซลล์ตั้งต้นใน 0.85%NaCl ปลอดเชื้อให้มีความเข้นข้นของตะกอนเซลล์ 9 log CFU/ml สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) เจือจางให้มีความเข้นข้นของตะกอนเซลล์ 4 log CFU/mL

3.1.2 การนับปริมาณเซลล์ *Pseudomonas fluorescens*

ตรวจนับปริมาณเซลล์เริ่มต้น ของแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate technique โดยปิเปตเชื้อเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองซึ่งมี 0.85%NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปิเปต

สารละลายเชื้อเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวณหาปริมาณ *Pseudomonas fluorescens* ทั้งหมดในสารละลาย 1 มิลลิลิตร ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์ม

3.2.1 การเตรียมพื้นผิวทดสอบ (stainless steel)

เตรียมพื้นผิวที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ stainless steel เกรด 304 ชนิด 2B ความหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร โดยตัดพื้นผิวให้มีขนาด 1×7 เซนติเมตร ทำความสะอาดโดยแช่แผ่นสเตนเลสสตีลในอะซีโตน (acetone) เพื่อล้างคราบไขมันออก 30 นาที ล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์ (deionized water) 2 ครั้ง แช่ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 5 N เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์ (deionized water) 2 ครั้งและแช่ในสารทำความสะอาด 30 นาที ล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์ (deionized water) เพื่อกำจัดสารทำความสะอาดที่หลงเหลืออยู่และใส่ลงในภาชนะแก้วฝาปิดนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

3.2.2 การทดสอบการเกาะติด (Attachment) ของ *Pseudomonas fluorescens*

ปิเปตสารสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลวที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.1.1 ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ 9 log CFU/mL ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นพื้นผิวทดสอบแต่ละแผ่นที่เตรียมขึ้นตามวิธี 3.2.1 ใส่ลงในหลอดดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C โดยแปรเวลาในการแช่ เป็นเวลา 0 ถึง 120 นาที เพื่อทดสอบการเกาะติดของ *Pseudomonas fluorescens* เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำแผ่นผิวทดสอบมาล้างด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นผิวทดสอบออก แล้วนับปริมาณเซลล์ที่เกาะติดตามวิธีในข้อ 3.3 สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น

3.2.3 การเกิดไอฟิล์ม (Biofilm formation)

สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) ปิเปตสารสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลวที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.1.1 ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ 9 log CFU/mL ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นพื้นผิวทดสอบแต่ละแผ่นที่เตรียมขึ้นตามวิธี 3.2.1 ใส่ลงในหลอดดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 30 วินาที ล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นผิวทดสอบออกด้วย 0.85%NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วจึงนำแผ่นสเตนเลสสตีลไปใส่ในหลอดปลอดเชื้อหลอดใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นผิวทดสอบมาล้างด้วย 0.85%NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ส่วนเกินออก แล้วตรวจนับปริมาณ *Pseudomonas fluorescens* ที่อยู่บนแผ่นผิวทดสอบ ตามวิธี 3.3 ทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น

3.2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดไบโอฟิล์ม

3.2.4.1 ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่น stainless steelเกรด 304 ชนิด 2B โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิจาก อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็น 15± 2 และ 20± 2 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.4.2 ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นทดสอบที่มีแหล่งของอาหารแตกต่างกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 แต่เปลี่ยนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก TSB เป็น 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ และ soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ทดลอง 3 ซ้ำ

3.3 การตรวจวิเคราะห์การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวทดสอบ

นับปริมาณจุลินทรีย์ที่เกาะติดและเกิดไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นทดสอบ โดยการใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อกวาดบนพื้นผิวทดสอบที่เกิดการเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์ม ขนาดพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ที่เกิดการ จากนั้นนำไม้พันสำลีไปใส่ใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ แล้วปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 1 นาที นำสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ทำให้สามารถตรวจนับเชื้อได้ในช่วง 30 ถึง 300 โคโลนี และปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธี spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 30.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ คำนวณหาปริมาณเชื้อทั้งหมดต่อพื้นที่ของพื้นผิว 1 ตารางเซนติเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ

3.4 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์และไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens*

ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) โดยมี active chlorine 6-14% และกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ความเข้มข้น 5 % เพื่อลดปริมาณเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* เมื่อแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/ml)

การทดลองในการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณเชื้อ โดยนำสารละลายฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ ใส่ในหลอดปลอดเชื้อ ขนาด 50 mL ปริมาตร 9 mL ต่อ 1 หลอด ปิเปตสารละลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดจะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นลดลง 10 เท่า คือ 8 log CFU/mL จากนั้นทำการปิเปตตัวอย่างสารละลายดังกล่าวมา 1 mL ที่เวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที นำไปตรวจนับเชื้อรอดชีวิต โดยจะทำการยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะมีผลต่อเชื้อก่อนด้วย 0.5 % sodium thiosulfate (NaOCl) ส่วนกรดเปอร์อะซิติก จะหยุดปฏิกิริยาด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ก่อนนำไปทำ serial dilutionและตรวจนับเชื้อ ทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) ในการทำลายเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ทดลอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน โดยกำหนดความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ 100, 200 และ400 ppm สำหรับการทดสอบกับสารแขวนลอยเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) เมื่อนำสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลวมาสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 ,5, 10, 20, 30 นาที ทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อในแต่ละเวลานั้น 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเติมลงในสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ที่ละลายอยู่ใน PBS บัฟเฟอร์1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อก่อนที่จะทำการ serial dilution เพื่อหาเซลล์ที่รอดต่อไป แล้วทำการตรวจนับจำนวน *Pseudomonas fluorescens* ตามวิธี 3.5

3.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก 5% ในการทำลาย *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก 5% ในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกันโดยกำหนดความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ 25 50 และ100 ppm สำหรับการทดสอบกับสารแขวนลอยเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) เมื่อนำเซลล์ในอาหารเหลวมาสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 ,5,10, 20และ 30 นาที ทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อในแต่ละเวลานั้น 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเติมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) pH 7.2 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อก่อนที่จะทำการ serial dilution เพื่อหาเซลล์ที่รอดต่อไป แล้วทำการตรวจนับจำนวน *Pseudomonas fluorescens* ตามวิธี 3.5

3.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

สร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ชนิด 304/2B ตามวิธีข้อ 3.2.3 นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อโดยปิเปตสารฆ่าเชื้อตามความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 30 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นพื้นผิวทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แช่ในสารฆ่าเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 0 ,1 ,5 ,10 ,20 และ 30 นาที ทดสอบที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (28± 2 องศาเซลเซียส) เมื่อครบเวลาที่กำหนดใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบแผ่นทดสอบออกจากหลอดสารฆ่าเชื้อ จุ่มในสารละลาย 0.5 % sodium thiosulfate (NaOCl) เพื่อเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อ ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนกรดเปอร์อะซิติกจะหยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มใน phosphate buffer saline (PBS pH 7.2) ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อเช็ดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว และตรวจนับปริมาณ *Pseudomonas fluorescens* ที่เหลือรอดบนแผ่นผิวทดสอบ ตามวิธี 3.5 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5 การตรวจนับปริมาณ *Pseudomonas fluorescens* ที่เหลือรอดชีวิตด้วยวิธี Spread plate technique

3.5.1 การตรวจนับปริมาณ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เหลือรอดชีวิต

ตรวจนับปริมาณ *Pseudomonas fluorescens* ที่เหลือรอดชีวิต โดยการปิเปตสารแขวนลอยเชื้อ 1 มิลลิลิตร แล้วใส่ในสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ที่ละลายอยู่ใน PBS บัฟเฟอร์ (กรณีสารฆ่าเชื้อเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนกรดเปอร์อะซิติก ใช้ PBS pH 7.2) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี คำนวณหาปริมาณเชื้อที่เหลือรอด

3.5.2 การตรวจนับปริมาณ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวสัมผัสอาหารที่เหลือรอดชีวิต

ส่วนกรณีของไบโอฟิล์มใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อกวาดเช็ดลงบนพื้นผิวทดสอบพื้นที่ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร นำไม้พันสำลีไปใส่ในสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ที่ละลายอยู่ใน PBS บัฟเฟอร์ กรณีสารฆ่าเชื้อเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนกรณีสารฆ่าเชื้อเป็นกรดเปอร์อะซิติก ใช้ PBS pH 7.2 ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 1 นาที นำสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85%NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ทำให้สามารถตรวจนับเชื้อได้ในช่วง 25 ถึง 250 โคโลนี และปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธี spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 30.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ คำนวณหาปริมาณเชื้อที่เหลือรอดทั้งหมดต่อพื้นที่ของพื้นผิว 1 ตารางเซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine (Iodometric Method) (กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล, 2549)

นำตัวอย่างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 ppm ที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณคลอรีน ประมาณ 150 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid เพื่อให้สารละลายมีค่า pH อยู่ระหว่าง 3-4 แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ประมาณ 1 กรัม ทันที ถ้าสารละลายมีสีเหลืองให้ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.01 นอร์มัล ทันที ในที่ไม่มีแสงจ้า จนเป็นสีเหลืองจาง จึงเติมน้ำแป้งลงไป 1 มิลลิลิตร สารละลายจะมีสีน้ำเงินจางหายไป จดบันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต

สำหรับสารละลายที่เป็น Blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง การคำนวณหา available chlorine สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{Available chlorine} = \frac{(V_1-V_2) \times N \times 35450}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ(มิลลิลิตร)}}$$

V_1 = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

V_2 =ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต Blank

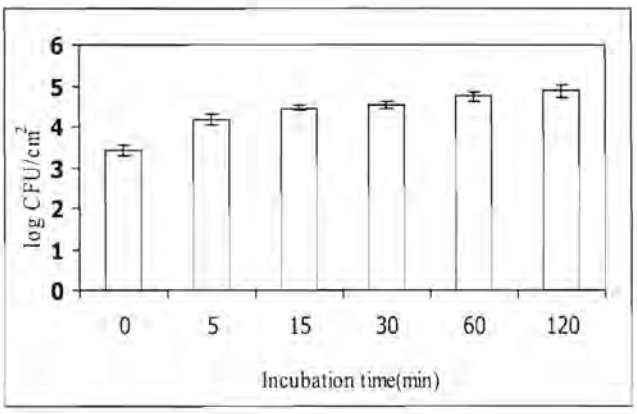
N =ความเข้มข้นเป็นนอร์มัลของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาการเกาะติดของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นสเตนเลสสตีล

การเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวชนิดต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะพื้นผิวสัมผัสอาหารของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์และเจริญกลายเป็นไบโอฟิล์ม ระยะเวลาในการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องศึกษา เนื่องจากสามารถใช้เป็นตัวชี้บ่งระยะเวลาในการเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารดังกล่าว ซึ่งมีความสำคัญต่อผู้ประกอบการในอุตสาหกรรมอาหารและผู้ให้บริการอาหารเป็นอย่างมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองตั้งแต่ 0 นาที (จุ่มแผ่นทดสอบแล้วยกขึ้นทันที) เป็นต้นไป เพื่อศึกษาการเกาะติดของ *Pseudomonas fluorescens* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร คือ แผ่นสเตนเลสสตีล ชนิด 304/2B ซึ่งเป็นตัวแทนของสเตนเลสสตีล ที่ใช้เป็นส่วนใหญ่ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว ทิ้งไว้ให้เกิดการเกาะติดที่เวลาที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0 นาที เป็นต้นไป แล้วตรวจสอบการเกาะติดพบว่า การเกาะติดของ *Pseudomonas fluorescens* แผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่ระยะเวลา 0 – 120 นาที โดยตรวจสอบจำนวนเซลล์บนแผ่นสเตนเลสสตีล ด้วยวิธี spread plate technique พบว่าในสารละลาย Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL ที่เวลา 0 นาที (จุ่มแผ่นทดสอบแล้วยกขึ้นทันที) สามารถตรวจพบเชื้อบนแผ่นสเตนเลสสตีล ประมาณ 3.44 ± 0.13 log CFU/cm^2 และหลังจาก 0 นาที เชื้อสามารถเกาะบนแผ่นสเตนเลสสตีลได้มากขึ้น สังเกตได้จากกราฟในรูป 4.1 ในช่วงเวลา 0 – 15 นาที มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และถ้าทิ้งแผ่นสเตนเลสสตีลไว้ในอาหารเป็นเวลานานก็จะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เกาะติดและเจริญบนแผ่นสเตนเลสสตีลเพิ่มมากขึ้นด้วย และที่เวลา 120 นาที ตรวจพบจำนวนเซลล์มีค่า 4.87 ± 0.17 log CFU/cm^2 (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่จุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/ mL ณ เวลาต่างๆ กัน ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดยวิธี spread plate technique

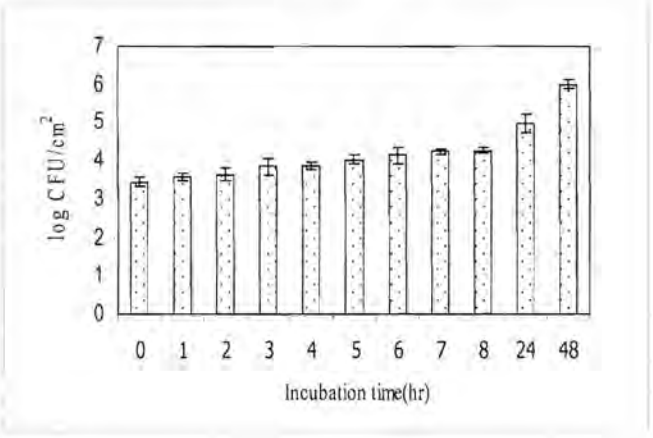
สำหรับในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 3 log CFU/mL พบว่าที่เวลา 0 - 120 นาที ไม่สามารถตรวจพบเชื้อบนพื้นผิวทดสอบด้วยวิธี spread plate technique ทั้งนี้ไม่ได้แสดงว่าไม่มีเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* เกาะบนแผ่นสเตนเลสสตีล โดยพบว่ามีโคโลนีของ *Pseudomonas fluorescens* บนจานเพาะเชื้อ แต่มีจำนวนเซลล์น้อยมาก ซึ่งอาจ

เป็นไปได้ว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อบนแผ่นทดสอบที่มีปริมาณเชื้อระดับต่ำ เนื่องจากเซลล์เริ่มต้นมีปริมาณน้อย การเกาะติดของเชื้อบนแผ่นสเตนเลสสตีลในช่วงระยะนี้ 0 – 120 นาที มีการเกาะติดแบบหลวมๆ เซลล์แบคทีเรียจะต้องใช้เวลาในการสร้างเซลล์และเพิ่มจำนวนเซลล์

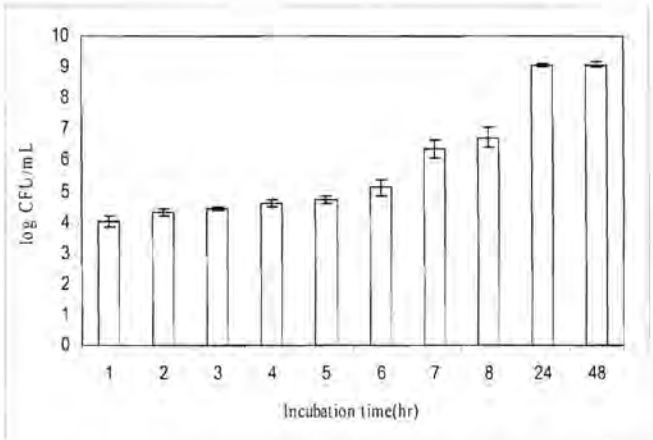
4.2 ผลการศึกษาการเกิด *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนแผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B

จากการทดลองข้างต้น ทำให้พบว่าที่เวลา 0 นาที ก็เพียงพอที่จะทำให้ *Pseudomonas fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นสเตนเลสสตีลได้ทันที ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงจุ่มแผ่นทดสอบในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL เนื่องจากการเกาะติดของเซลล์บนแผ่นสเตนเลสสตีลที่เวลา 0-5 นาที ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก จึงเลือกจุ่มสารแขวนลอยเซลล์ 30 วินาที เพื่อความสะดวกของความต่อเนื่องในการทำการทดลอง แล้วย้ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ทิ้งไว้ตามระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองพบว่าการตรวจปริมาณเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B โดยวิธี spread plate technique ในช่วงเวลา 1- 8 ชั่วโมงแรก พบว่า สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ มีค่า 3.56 ± 0.09 - 4.27 ± 0.07 log CFU/cm^2 หลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์ 4.97 ± 0.22 log CFU/cm^2 และมีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมากที่สุดหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบได้ 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่า 6.00 ± 0.12 log CFU/cm^2 (รูปที่ 4.2)

(A)



(B)

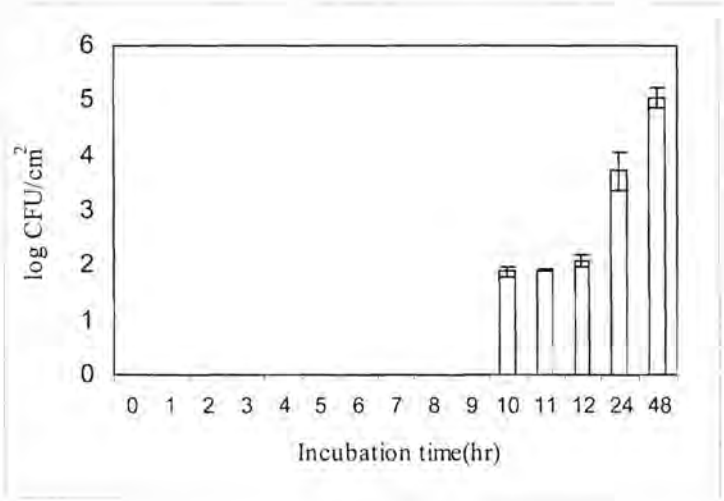


รูปที่ 4.2 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B เมื่อจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหาร TSB หลอดใหม่ (B) จำนวนเซลล์อิสระของ *Pseudomonas fluorescens* ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส

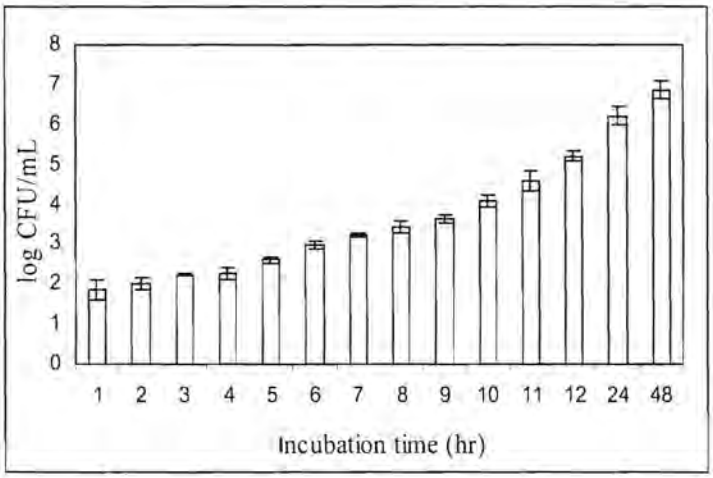
ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/mL ที่เวลา 1 – 9 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อบนแผ่นสเตนเลสสตีล ด้วยวิธี spread plate technique ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าเชื้อที่ติดมาบนแผ่นสเตนเลสสตีลน้อยมากเซลล์มีการเกาะติดแบบหลอมๆ มีผลทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวสัมผัสได้ง่ายและหลุดไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงต้องอาศัยระยะเวลาพอสมควรที่เชื้อเพิ่มจำนวน จึงจะตรวจพบได้แต่เมื่อตรวจด้วยวิธี Pour plate ในช่วงเวลา12 ชั่วโมง สามารถตรวจพบ *Pseudomonas fluorescens* ที่เกาะติดบนแผ่นสเตนเลสสตีลได้ 2.09± 0.10 log CFU/cm^2

หลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์ 3.72 ± 0.34 log CFU/cm^2 และมีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมากที่สุดหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบได้ 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่า 5.05± 0.18 log CFU/cm^2 (รูปที่ 4.3)

(A)



(B)



รูปที่ 4.3 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B เมื่อจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 3 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหาร TSB หลอดใหม่ (B) จำนวนเซลล์อิสระของ *Pseudomonas fluorescens* ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบ หลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) มีจำนวนเซลล์ 4.97 ± 0.22 log CFU/cm^2 ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ(3 log CFU/mL) ถึงแม้ว่าที่เวลา 1 – 9 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อบนแผ่นสเตนเลสสตีล เนื่องจากมีเชื้อมีปริมาณน้อย แต่พบว่าเมื่อบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลานานขึ้น ณ เวลาที่ 10 ชั่วโมง มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ และหลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ 3.72 ± 0.34 log CFU/cm^2

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เกาะแผ่นทดสอบแผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B กับจำนวนเซลล์ที่เป็นอิสระภายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณเซลล์ที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีมากกว่าที่สามารถตรวจวัดได้บนแผ่นทดสอบ และเมื่อมีการบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลานานมากขึ้นจำนวนเซลล์ที่สามารถตรวจวัดได้กับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ยังคงแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ที่มีการเกาะติดพื้นผิวแบบไม่ผันกลับ เซลล์ที่มีการเกาะติดแล้วจะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นและอาจหลุดออกมาเป็นเซลล์อิสระ(planktonic cell) ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นจึงตรวจพบจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มาก (Kumar and Anand, 1998)

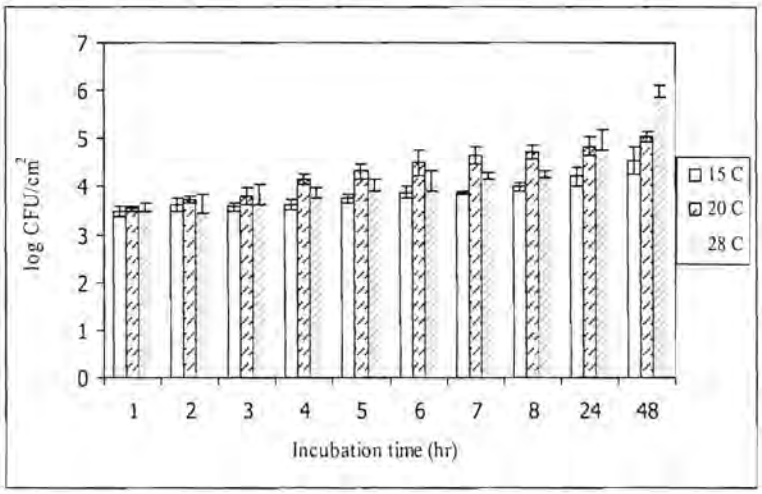
4.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิและปริมาณเชื้อที่มีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์มีการเกาะติดบนพื้นผิวแล้วเมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์สามารถพัฒนาเจริญเป็นไบโอฟิล์มได้ จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน จึงทำให้เกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นอิทธิพลของอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จะต้องทำการศึกษา ประกอบกับจำนวนเชื้อในธรรมชาติที่ไม่เท่ากันจึงมีความสามารถในการเกิดไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน การทดลองในครั้งนี้ได้เลือกอุณหภูมิที่ครอบคลุมกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์ในขั้นตอนการตัดหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น แฮม เป็นต้น คือ เลือกอุณหภูมิ 15, 20 และ 28 องศาเซลเซียส

จากการทดลองข้างต้น ทำให้ทราบว่าที่เวลา 0 นาที(จุ่มแผ่นทดสอบแล้วยกขึ้นทันที) *Pseudomonas fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นสเตนเลสสตีลได้ทันที ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงจุ่มแผ่นทดสอบในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อเพียง 30 วินาที แล้วย้ายไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ทิ้งไว้ตามระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของเชื้อ 8 log CFU/ml ในช่วงเวลา 1- 8 ชั่วโมงแรก พบว่า สามารถตรวจพบ *Pseudomonas fluorescens* ที่เกาะติดบนแผ่นสเตนเลสสตีลได้และสามารถตรวจพบได้มากในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/mL พบว่าที่เวลา 1- 9 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อบนแผ่นสเตนเลสสตีล ด้วยวิธี spread plate technique ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเชื้อที่ติดมาบนแผ่นสเตนเลสสตีลน้อยมากเซลล์มีการเกาะติดแบบหลวมๆ มีผลทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวสัมผัสได้ง่ายและหลุดไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงต้องอาศัยระยะเวลาพอสมควรที่เชื้อเพิ่มจำนวน จึงจะตรวจพบได้แต่เมื่อตรวจด้วยวิธี Pour plate ในช่วงเวลา10 ชั่วโมงสามารถตรวจพบ *Pseudomonas fluorescens* ที่เกาะติดบนแผ่นสเตนเลสสตีลได้และสามารถตรวจพบได้มากในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง จึงอาจกล่าวได้ว่า มีเชื้อเกาะติดบนแผ่นทดสอบแต่เชื้อที่เกาะติดมีจำนวนน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดด้วยวิธี spread plate technique ที่ใช้กันโดยทั่วไปได้

เมื่อพิจารณาถึงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มแผ่นทดสอบในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อความเข้มข้น 8 log CFU/mL ก่อนจะย้ายไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส *Pseudomonas fluorescens* สามารถเจริญได้ดีและรวดเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 20และ15 องศาเซลเซียส

ตามลำดับ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมีค่า 4.97± 0.22 ,4.85 ± 0.18 และ 4.22 ± 0.20 log CFU/cm^2 ซึ่งแต่ละอุณหภูมิจะแตกต่างกันและพบว่าที่ เวลา 48 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อมากที่สุด มีค่า 6.00± 0.12 ,5.05± 0.12 และ4.55 ± 0.28 log CFU/cm^2 ที่อุณหภูมิ 28,20 และ15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อจุ่มแผ่นทดสอบในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อความเข้มข้น 3 log CFU/mL ก่อนจะย้ายไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ4.97± 0.22 ,4.86± 0.18และ 4.22 ± 0.22 log CFU/cm^2 ที่อุณหภูมิ 28 , 20 และ15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (รูปที่ 4.4)



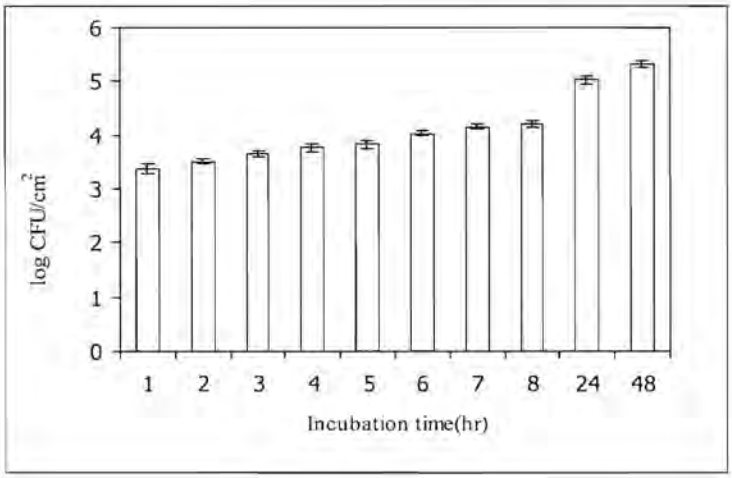
รูปที่ 4.4 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* บนแผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B เมื่อจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหาร TSB หลอดใหม่ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28± 2, 20± 2,15± 2 องศาเซลเซียส ทำการตรวจนับโดยวิธี spread plate technique

จึงอาจสรุปได้ว่าเมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นเริ่มต้นของ *Pseudomonas fluorescens* พบว่าถ้ามีปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Pseudomonas fluorescens* ระดับสูง (8 log CFU/mL) จะทำให้ *Pseudomonas fluorescens* สามารถติดมากับแผ่นสเตนเลสสตีลได้ สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนบนแผ่นสเตนเลสสตีลได้ดี ในขณะที่เชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ความสามารถในการเกาะติดมาบนแผ่นทดสอบน้อย จึงต้องอาศัยระยะเวลาในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน จึงสามารถตรวจสอบได้

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเกิดไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ต่าง เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญที่แตกต่างกัน อุณหภูมิที่จุลินทรีย์เจริญได้จะอยู่ระหว่างอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) และอุณหภูมิต่ำสุด(minimum temperature) ซึ่งถ้าอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่านี้ จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ(optimum temperature) จึงแตกต่างกันออกไปตามแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ สำหรับ *Pseudomonas fluorescens* พบว่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิหรือเรียกว่า Psychrotrophs โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 26 - 30.5 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามในอุตสาหกรรมอาหาร กระบวนการเริ่มต้นจนกระทั่งถึงปลายทางมีความต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ โดยผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้าจะใช้เป็นวัตถุดิบ(raw material) สำหรับขั้นตอนต่อมา การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนของการผลิตจึงส่งผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดไบโอฟิล์มขึ้นได้ในกระบวนการผลิต (สุมณฑา วัฒนสินธุ์ และคณะ,2548)

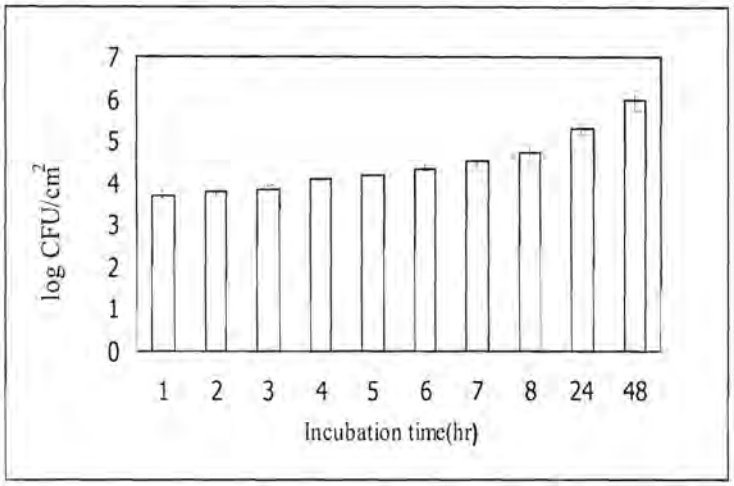
4.4 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารอาหารของตัวกลางชนิดเหลวต่อการเกิดไบโอฟิล์ม

สารอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน โดยจุลินทรีย์ต่างชนิดกันมีความต้องการสารอาหารที่ต่างกัน การที่มีสารอาหารมากหรือน้อยแตกต่างกัน จะมีผลต่อการเจริญเป็นไบโอฟิล์มหรือไม่ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารต่อการเจริญไบโอฟิล์ม เป็นปัจจัยที่ต้องทำการศึกษา ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า *Pseudomonas fluorescens* สามารถเกาะติดและเจริญเป็นไบโอฟิล์มบนแผ่นสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ได้ที่ระยะเวลา 1-48 ชั่วโมง ด้วยการตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยวิธี spread plate technique บนอาหาร TSB ดังนั้นขั้นตอนต่อไปจึงทำการเปลี่ยนชนิดสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งเป็นอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นสารอาหารจากตัวกลางชนิดเหลวชนิดอื่น ๆ โดยการทดลองครั้งนี้ ได้เลือกใช้สารอาหารที่มีองค์ประกอบต่าง ๆ กันไป ตั้งแต่ สารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85, อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) จากการทดลอง พบว่า เมื่อเปลี่ยนแหล่งของสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85 % NaCl) พบว่า ยังมีการเจริญของ *Pseudomonas fluorescens* และพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถตรวจนับเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ได้ 5.03± 0.07 log CFU/cm^2 และมีจำนวน 5.33±0.06 log CFU/cm^2 เมื่อทำการตรวจวัดที่เวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.5)

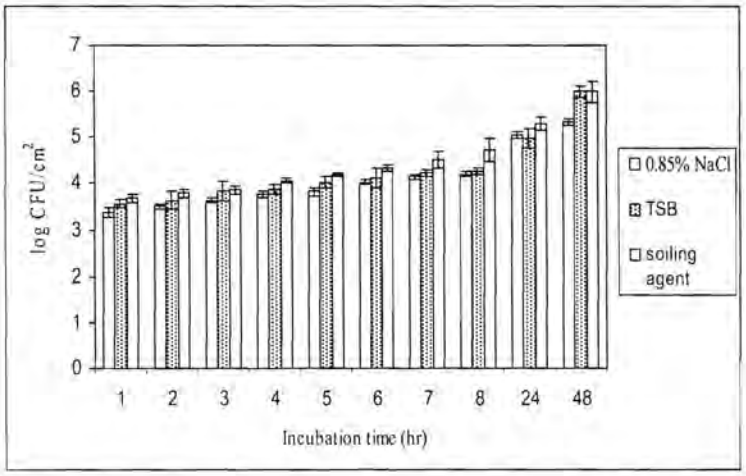


รูปที่ 4.5 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มอยู่ในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 % ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส

เมื่อเปลี่ยนแหล่งของสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็น soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยการนำเนื้อหมูในน้ำดีไอโอไนซ์ปลอดเชื้อ จำลองการปนเปื้อนสารอินทรีย์เป็นตัวกลางชนิดเหลว ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าน่าจะทำให้เซลล์ *Pseudomonas fluorescens* มีการเกาะติดและเจริญเป็นไบโอฟิล์มได้ดียิ่งขึ้น ผลการทดลอง พบว่า การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบ เพราะพบว่าจำนวนเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่า 5.29± 0.15 log CFU/cm^2 และ 5.99± 0.24 log CFU/cm^2 ที่เวลา 48 ชั่วโมงตามลำดับ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มอยู่ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหารชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหารมาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 4.7) จะเห็นได้ว่าช่วงแรกแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหาร แต่จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบก็ยังคงมีการเจริญ พร้อมทั้งมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ และไม่มีการแตกต่างกันมากนัก เมื่อเปลี่ยนแหล่งของสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85 % NaCl) พบว่า ยังมีการเจริญของ *Pseudomonas fluorescens* เนื่องจากมีสารอาหารติดมา เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน จะเห็นได้ว่าที่หลังจากบ่มแผ่นทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85 % NaCl) เริ่มช้าลง แต่การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ และไม่มีการแตกต่างกันมากนัก เนื่องจากมีสารอาหารที่สมบูรณ์

4.5 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์ *Pseudomonas fluorescens*

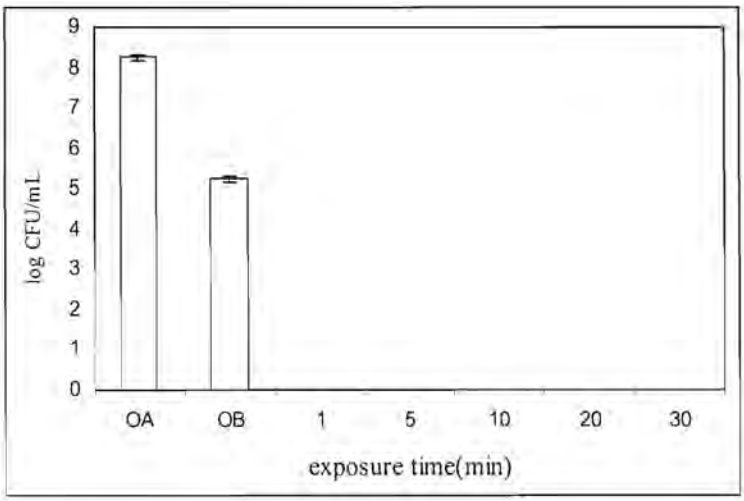
การเกิดไบโอฟิล์มทำให้การกำจัดเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในฟิล์มทำได้ยากมาก การทำความสะอาดตามปกติไม่สามารถกำจัดได้หมด จะต้องใช้แรงทางกายภาพช่วยในการกำจัด นอกจากนี้แบคทีเรียที่เจริญในไบโอฟิล์มยังมีความสามารถในการต้านทานสารทำความสะอาด (Costerton, 2005) และสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลาย (Planktonic) (Chavant, Gaillard-Martinie and Hébraud, 2004) การทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด คือ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) และกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ในการทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* เมื่อแขวนลอยอยู่ในตัวกลางชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง(8 log CFU/ml) ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ กำหนดความเข้มข้นที่ 100 ,200 และ400 ppm การทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก กำหนดความเข้มข้นที่ 25, 50 และ100 ppm ตัวกลางชนิดเหลวที่นำมาทดสอบทั้ง 3 ชนิด มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในปริมาณต่างกัน

ตารางที่ 4.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณสารอินทรีย์ในตัวกลางชนิดเหลวทั้ง 3 ชนิด

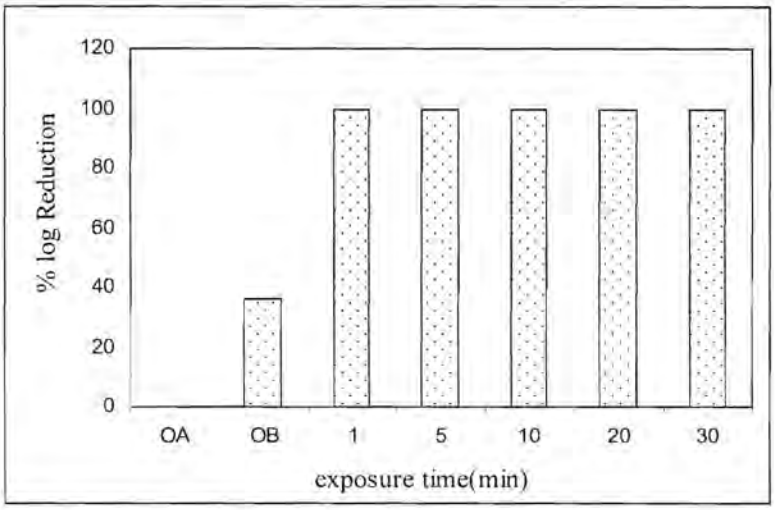
ชนิดของตัวกลาง	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	องค์ประกอบและปริมาณสารอินทรีย์ (% w/w)	
สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl)	7.38 ± 0.04	NaCl	0.85
TSB	7.32 ± 0.08	โปรตีน	17.037
		ไขมัน	0.108
		คาร์โบไฮเดรต	2.508
soiling agent (beef meat 5%w/v)	6.69 ± 0.12	โปรตีน	0.25

4.5.1 **ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์** (sodium hypochlorite: NaOCl) **ในการทำลายเซลล์** *Pseudomonas fluorescens* **ในตัวกลางที่เซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยอยู่**

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการทำลายสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยกำหนดความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ ที่ 100, 200 และ400 ppm สำหรับการทดสอบกับสารแขวนลอยเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) เมื่อนำสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลวมาสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 5, 10 , 20 และ 30 นาที การสุ่มตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลวในแต่ละเวลานั้น 1มิลลิลิตร นำไปเติมลงในสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ที่ละลายอยู่ใน PBS บัฟเฟอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อก่อนที่จะทำการ serial dilution นับจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดต่อไป แล้วทำการตรวจนับจำนวน *Pseudomonas fluorescens* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA ผลการทดลอง พบว่า เมื่อเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* แขวนลอยอยู่ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และใช้สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลายเกลือทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อ ดังรูปที่ 4.8 และรูปที่ 4.9

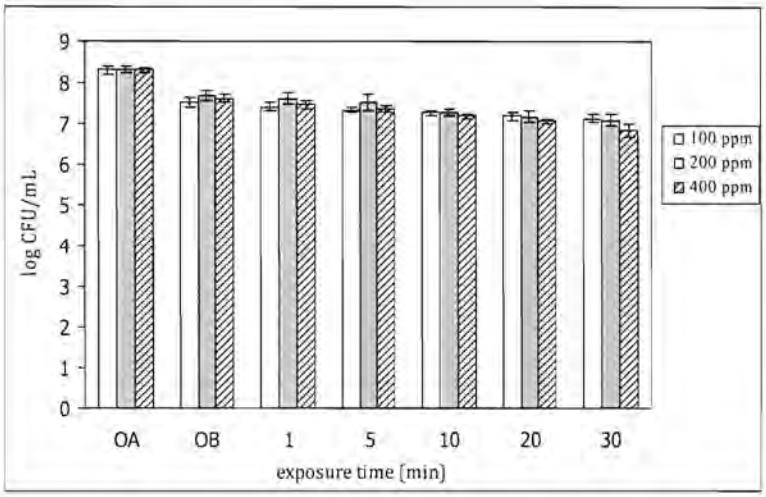


รูปที่ 4.8 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

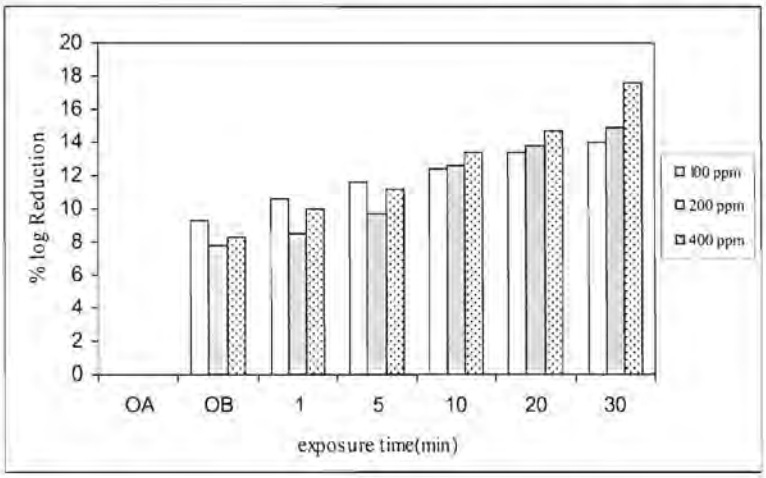


รูปที่ 4.9 ร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ภายหลังหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น100 ppm เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

จากรูปที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าที่เวลา 0 นาที สามารถแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรก จะเป็นเวลาที่ไม่ได้เติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ *Pseudomonas fluorescens* (เชื้อเริ่มต้น) ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนช่วงที่สอง จะเป็นเวลาที่มีการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที หลังจากมีการแพร่กระจายตัวของเซลล์ในสารละลาย พบว่าเชื้อมีปริมาณลดลงทันทีเมื่อสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์แต่เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการทำลายเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (รูปที่ 4.10) พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลง คือสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppm ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมด ภายในระยะเวลา 30 นาที ประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ลดลงเพียงร้อยละ 13.98 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น (8.21± 0.24 log CFU/mL) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 200 ppm พบว่าที่เวลา 30 นาที หลังจากเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* สัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด โดยเซลล์ลดลงร้อยละ 14.89 และเช่นเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ เป็น 400 ppm ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที สามารถทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ลดลงจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นเพียงร้อยละ 17.59



รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

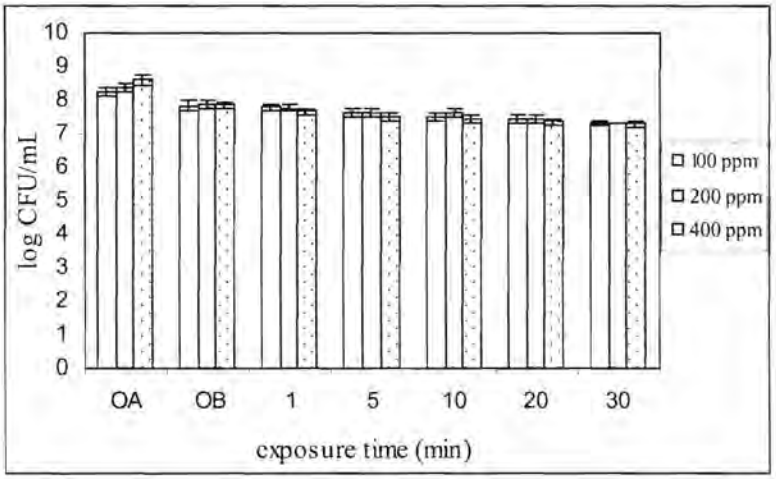


รูปที่ 4.11 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ภายหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

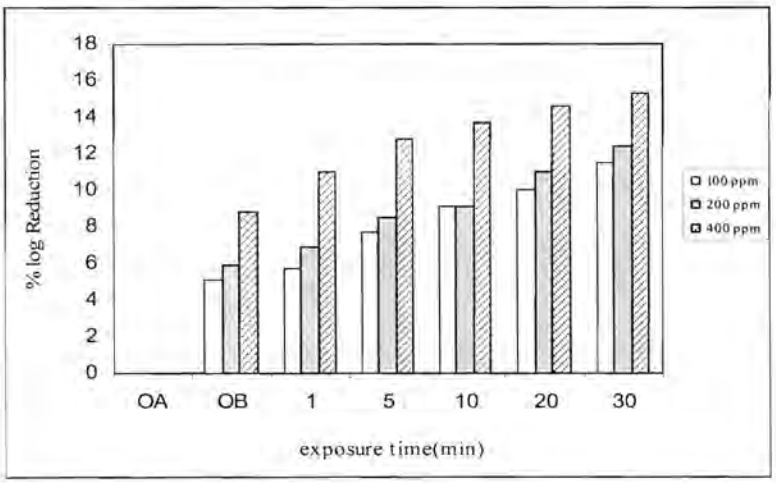
ส่วนการทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* เมื่อแขวนลอยในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น100, 200 และ400 ppm (รูปที่ 4.12)พบว่าไม่มีความแตกต่างกันกับประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เพราะว่าที่เวลา 30 นาที หลังจากเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* สัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ไม่สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการลดลงของเซลล์เมื่อสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อมีปริมาณต่ำกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อขึ้นกับปริมาณสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยสารฆ่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ในสารละลายเกลือได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) (รูปที่ 4.13) จีระเดช มาลา(2551) รายงานว่า การใช้สารประกอบคลอรีน เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์สูงนั้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลดลง ทั้งนี้

เนื่องจากคลอรีนบางส่วนจะทำปฏิกิริยาคลอริเนชันและออกซิเดชันกับหมู่อะมิโนของสารอินทรีย์ ดังนั้นการใช้ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent จึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลง เพราะสารอาหารต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยสนับสนุนให้เซลล์จุลินทรีย์รอดชีวิตและเจริญได้ ดังนั้นการใช้สารประกอบคลอไรด์ซึ่งมีกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) เป็นองค์ประกอบสำคัญ จึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายน้ำเกลือได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent



รูปที่ 4.12 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ภายหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

การที่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น100,200 และ400 ppm ไม่สามารถทำลายเชื้อได้หมด ทั้งนี้อาจเนื่องจากมาจากการสลายตัวอย่างรวดเร็วของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NOCl) ซึ่งมีผลทำให้การแตกตัวได้เป็นกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ซึ่งสามารถวัดได้จากปริมาณ available chlorine ที่มีอยู่ในน้ำ มีความเข้มข้นไม่พอต่อการทำลาย ดังนั้นการสลายตัวของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อการสลายตัว คือค่า pH ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณ available chlorine พร้อมทั้งตรวจวัด pH ของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงใน ตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่า pH และปริมาณของ available chlorine ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ในการทำลายเซลล์ *Pseudomonas fluorescent* ที่อุณหภูมิ 23± 2 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์	ค่า pH	ปริมาณ available chlorine (ppm)
100	7.38 ± 0.06	5.27 ± 0.06
200	7.57± 0.08	8.46 ± 0.08
400	8.72 ± 0.05	20.85 ± 0.02

พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 100 ppm มีค่า pH 7.38 ± 0.06 โดยประมาณ และปริมาณคลอรีนที่วิเคราะห์ได้มีค่า 5.27 ± 0.06 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์เป็น 200 ppm มีค่า pH 7.57± 0.08และปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้มีค่า 8.46 ± 0.08 และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์เป็น 400 ppm พบว่ามีค่า pH อยู่ที่ 8.72 ± 0.05 และปริมาณคลอรีนที่วิเคราะห์ได้มีค่า 20.85 ± 0.02 ซึ่งมีปริมาณคลอรีนเพิ่มขึ้นจากความเข้มข้น 100 ppm จากค่า pH และปริมาณคลอรีนที่วิเคราะห์ได้นี้มีความสัมพันธ์ในการฆ่าเชื้อ

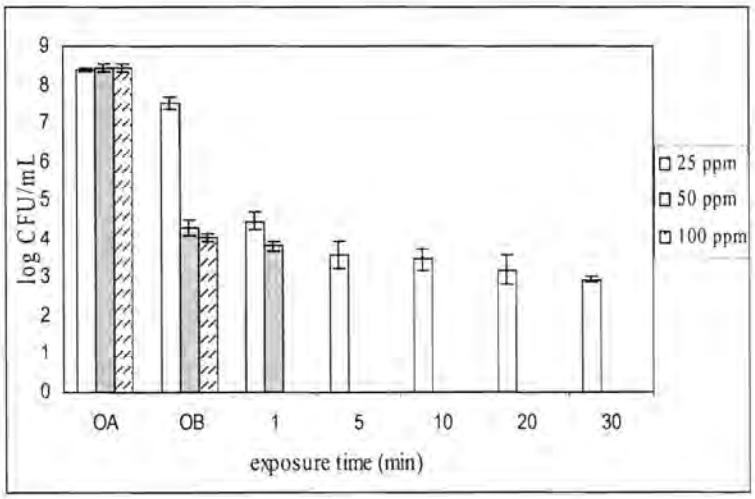
4.6.2 ประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก 5% ในการทำลาย *Pseudomonas fluorescens* ในตัวกลางชนิดเหลว

การทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก 5% ในการทำลายสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยกำหนดความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ 25, 50 และ100 ppm สำหรับการทดสอบกับสารแขวนลอยเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/ml) เมื่อนำเซลล์ในอาหารเหลวมาสัมผัสกับกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0,5 ,10, 20 และ 30 นาที แล้วทำการตรวจนับจำนวน *Pseudomonas fluorescens* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA

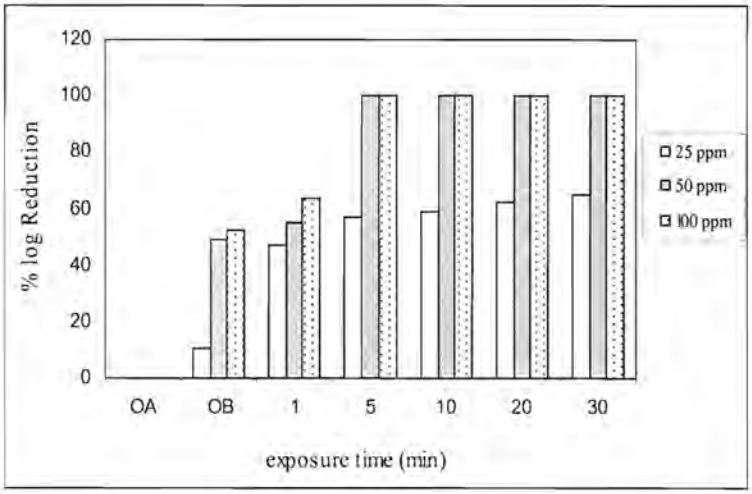
ผลการทดลองพบว่า เมื่อเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* แขวนลอยอยู่ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และใช้กรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้น 25 ppm ไม่สามารถทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ใน

สารละลายเกลือทั้งหมดภายในระยะเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา 30 นาทีหลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อ พบว่า ร้อยละของการลดลงมีค่า 65.04 (รูปที่ 4.14) แต่เมื่อความเข้มข้นกรดเปอร์รอกซีแอซีติกเป็น 50 ppm เวลา 5 นาที ก็เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายน้ำเกลือได้หมด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติกเป็น 100 ppm แม้จะทำลายเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ได้มากขึ้นกว่าที่ความเข้มข้น 50 ppm แต่ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมดตั้งแต่นาทีแรก โดยทำลายเซลล์ได้ทั้งหมดหลังจากเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที

เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 ppm ถึงแม้ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ภายในระยะเวลา 30 นาที แต่พบว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที สามารถทำลายเชื้อให้ลดลงได้ถึง 46.85 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตที่เวลา 1 นาที 4.47± 0.24 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.41 ± 0.05log CFU/ml ในขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที เมื่อพิจารณาที่เวลา 1 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 54.89 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 3.82 ± 0.12 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.45 ± 0.10 log CFU/mL และที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายเซลล์ได้100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาทีเช่นกัน เมื่อเซลล์สัมผัสสารฆ่าเชื้อ ที่เวลา 0_B (ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที) สามารถลดปริมาณเซลล์ได้ถึง 52.31%

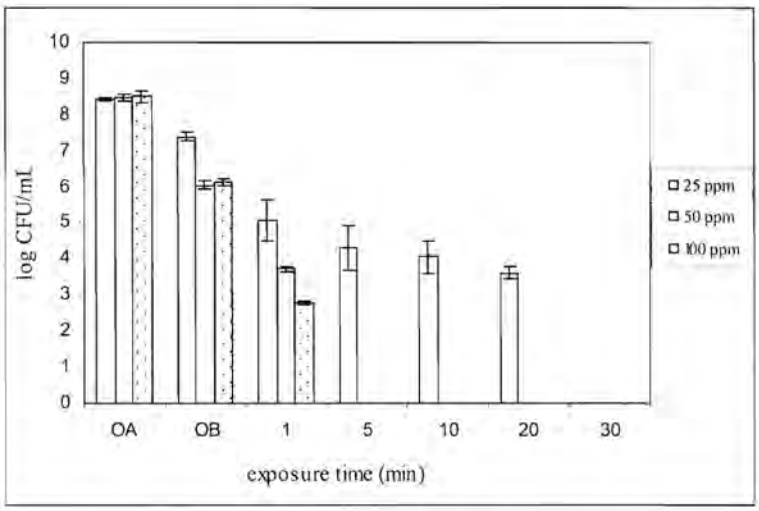


รูปที่ 4.14 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที



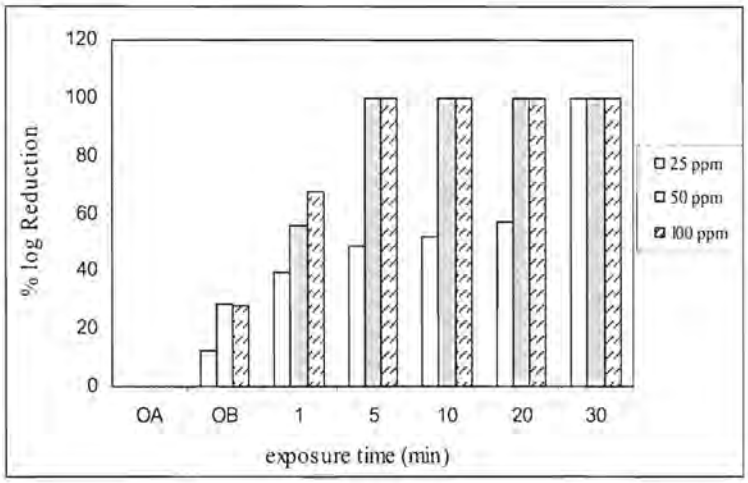
รูปที่ 4.15 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ภายหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ในการทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB พบว่าที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด 100 % ภายในระยะเวลา 30 นาที จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.42 ± 0.04log CFU/mL เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก เป็น 50 ppm และ 100 ppm พบว่าสามารถทำลายเซลล์ได้หมด 100 % ในเวลา 5 นาที (รูปที่ 4.16)



รูปที่ 4.16 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น (รูปที่ 4.17) พบว่า ความเข้มข้นที่ 25 ppm ถึงแม้จะสามารถทำลายเชื้อได้ภายในเวลา 30 นาที แต่พบว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที สามารถทำลายเชื้อให้ลดลงได้ถึง 57.13% ในขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อได้ภายในระยะเวลา 5 นาที แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่ 1 นาที พบว่าที่ความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 56.08% มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 3.72±0.06 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.47 ± 0.11 log CFU/mL และที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 67.41 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 2.77± 0.05 log CFU/mLจากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.50 ± 0.17 log CFU/mL



รูปที่ 4.17 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB ภายหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ในการทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) พบว่าที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด 100 % ภายในระยะเวลา 30 นาที จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.6 ± 0.17 log CFU/mL เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเปอร์รอก-ซีแอซีติก เป็น 50 ppm พบว่าสามารถทำลายเซลล์ได้หมด 100 % ในเวลา 5 นาทีและเมื่อเพิ่มความเข้มข้น 100 ppm ก็สามารถทำลายเซลล์ได้หมด100 % ในเวลา 1 นาที (รูปที่ 4.18 และ 4.19)

เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นที่ 25 ppm ถึงแม้จะสามารถทำลายเชื้อได้ภายในเวลา 30 นาที แต่พบว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที สามารถทำลายเชื้อให้ลดลงได้ถึง 63.02 % ในขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อที่แขวนลอยในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อได้ภายในระยะเวลา 5 นาที แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่ 1 นาที พบว่าที่ความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 57.79 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 3.18 ± 0.57log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.6 ± 0.17 log CFU/mL และที่ความเข้มข้น 100 ppm ถึงแม้ว่าสามารถทำลายเชื้อที่แขวนลอยในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ได้100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลาที่ 1 นาที เมื่อพิจารณาที่เวลา 0_B

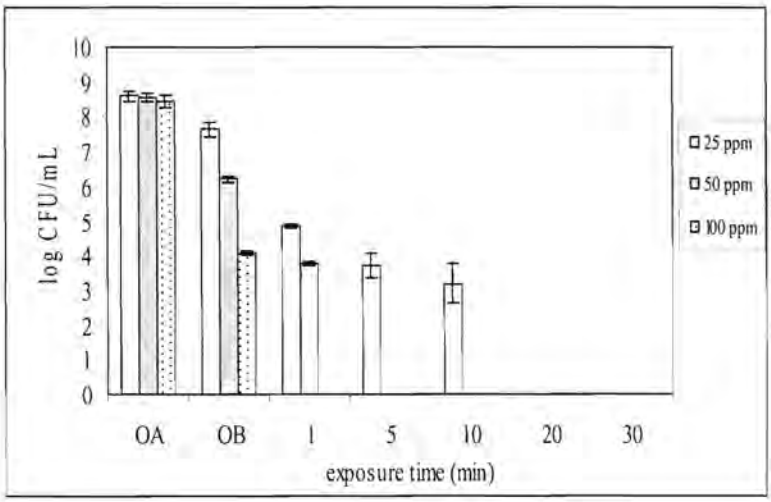
(เวลาที่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที) สามารถลดปริมาณเซลล์ได้ถึง 52.31 % มีปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต 4.10 ± 0.06 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.46 ± 0.17 log CFU/mL

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) ของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก พบว่ามีค่า pH ค่อนข้างเป็นกรด ซึ่งแต่ละความเข้มข้นมีค่า pH ตามที่แสดงในตารางที่ 4.3

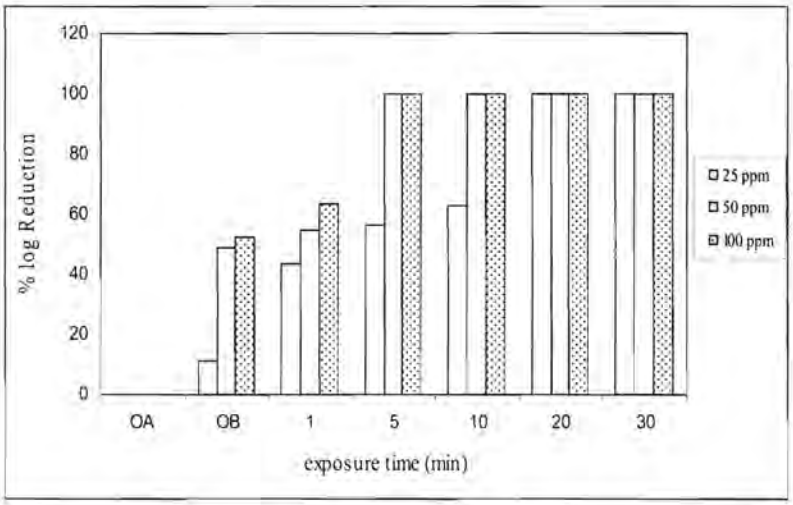
ตารางที่ 4.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการวัดที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (ppm)	ค่า pH
25	3.86±0.02
50	3.63±0.01
100	3.47±0.01

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นสูงจะมีค่า pH น้อยกว่าค่าความเข้มข้นต่ำกว่า ดังนั้นจึงอาจเป็นได้ได้ว่าอิทธิพลของ pH อาจจะมีผลในการทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ได้ดีกว่าสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ที่มีค่า pH เป็นเบส



รูปที่ 4.18 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที



รูปที่4.19 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ภายหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

4.7 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* ในพื้นผิวสัมผัสอาหาร

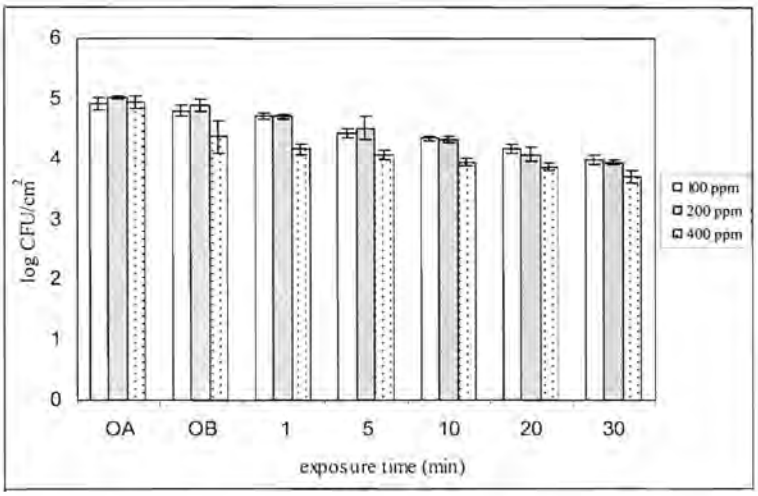
สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) โดยมี active chlorine 6-14% และกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) หรือชื่อทางการค้าว่า Proxitan® ความเข้มข้น 5 %

สร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ชนิด 304/2B นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ โดยปิเปตสารฆ่าเชื้อตามความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 30 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นพื้นผิวทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แช่ในสารฆ่าเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 0 ,1 ,5 ,10 ,20 และ 30 นาที ทดสอบที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (28± 2 องศาเซลเซียส) เมื่อครบเวลาที่กำหนดใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบแผ่นทดสอบออกจากหลอดสารฆ่าเชื้อ จุ่มในสารละลาย 0.5 % sodium thiosulfate (NaOCl) เพื่อเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อ ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็นสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ ส่วนกรดเปอร์อะซิติกจะหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ phosphate buffer saline (PBS pH 7.2) 2 ครั้ง จากนั้นใช้ลำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อเช็ดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว และตรวจนับเชื้อที่เหลือรอดบนพื้นผิวทดสอบ

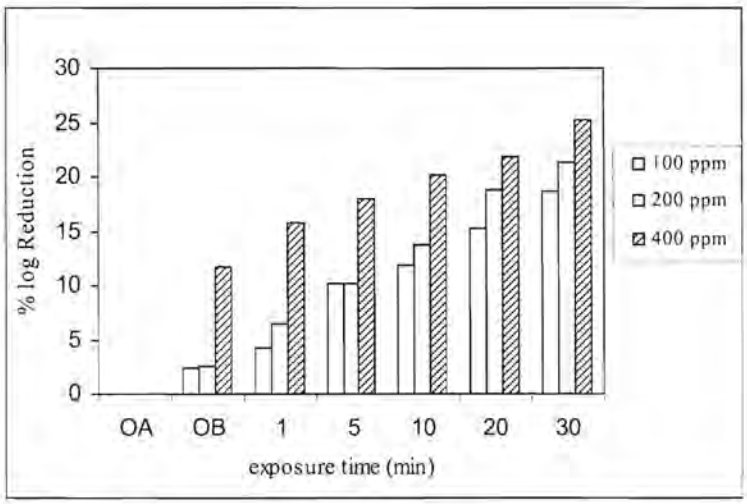
4.7.1ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens*

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) ในการทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* บนพื้นผิวสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดความเข้มข้นที่ 100 200 และ400 ppm โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* ที่เวลา 0 ,1 ,5 ,10 ,20 และ 30 นาที ผลการทดลอง พบว่า

ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 18.70 % ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีเซลล์เหลือรอดชีวิต 4.0 ± 0.08 log CFU/cm^2 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.92 ± 0.10 log CFU/cm^2 ในขณะที่ความเข้มข้น 200 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 21.31 % ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีเซลล์เหลือรอดชีวิต 3.95 ± 0.04 log CFU/cm^2 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.02 ± 0.02 log CFU/cm^2 และที่ความเข้มข้น 400 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 25.25% ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีเซลล์เหลือรอดชีวิต 3.70 ± 0.10 log CFU/cm^2 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.95 ± 0.11 log CFU/cm^2 หลังจากที่สัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 30 นาที (รูปที่ 4.20 และ 4.21)



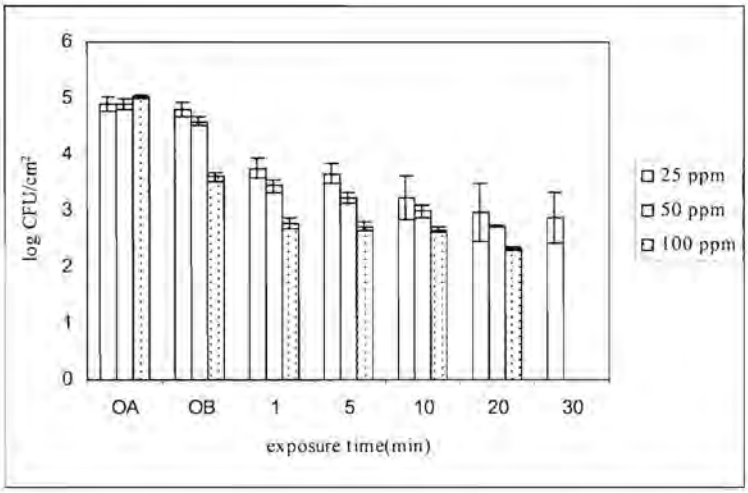
รูปที่ 4.20 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที



รูปที่ 4.21 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

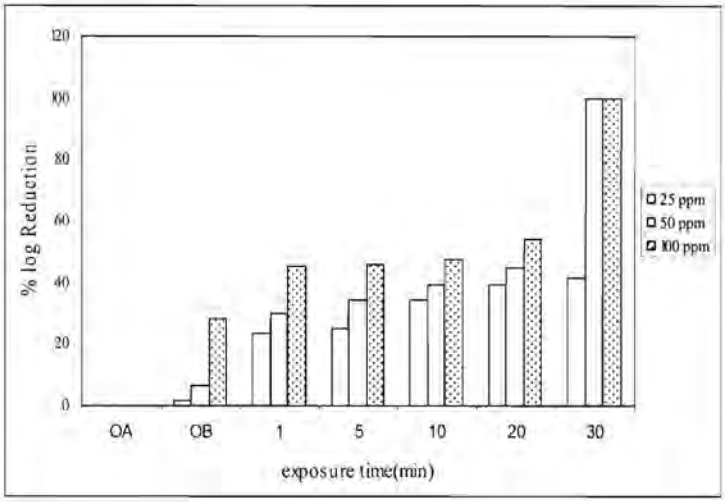
4.7.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) **ในการทำลายไบโอฟิล์มของ** *Pseudomonas fluorescens*

การทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ในการทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* บนพื้นผิวสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดความเข้มข้นที่ 25 50 และ100 ppm โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* ที่เวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ผลการทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 41.63 % ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ 2.86 ± 0.45 log CFU/cm^2 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.90 ± 0.12 log CFU/cm^2 แต่อย่างไรก็ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที เมื่อเพิ่มความเข้มข้น 50 และ100 ppm สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมด 100 % (รูปที่ 4.22)



รูปที่ 4.22 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 3 ความเข้มข้น พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 ppm ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 50 และ100 ppm สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมด 100 % ภายในระยะเวลา 30 นาที ที่ระยะเวลาเท่ากัน ดังนั้นจึงพิจารณาที่เวลา 20 นาที พบว่า พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 44.60% โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ 2.72 ± 0.12 log CFU/cm^2 จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น 4.91 ± 0.10 log CFU/cm^2 และ ที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 53.77 % โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ 2.33 ± 0.03 log CFU/cm^2 จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5.04 ± 0.03 log CFU/cm^2 ซึ่งจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ระดับความเข้มข้น 50 และ100 ppm ที่เวลา 20 นาที แทบไม่มีความแตกต่างกันเลย ดังนั้นหากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารจะเลือกนำกรดเปอร์รอกซีแอซีติกไปใช้ในการทำลายไบโอฟิล์มจาก *Pseudomonas fluorescens* จึงควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 50 ppm เพราะจะช่วยประหยัดการใช้สารฆ่าเชื้อและลดต้นทุนในการผลิต แต่ถ้าต้องการเวลาในการฆ่าเชื้อน้อยๆ ควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 100 ppm เพราะสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ 45.04 % ภายในเวลา 1 นาที หรืออาจเพิ่มความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm ก็ได้



รูปที่ 4.23 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นทดสอบและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ซึ่งการสะสมของจุลินทรีย์ภายในไบโอฟิล์มสามารถทนทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลาย(Planktonic) เนื่องจากการพัฒนาทางพันธุกรรมขึ้นกับการเกาะติดบนพื้นผิวและการแฝงตัวในภาวะที่เป็นไบโอฟิล์ม และเกิดการปรับตัวทางด้านลักษณะปรากฏ Kumar และ Anand (1998)ได้อธิบายว่า การที่เซลล์ภายในไบโอฟิล์มสามารถทนทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลายนั้น เพราะกลุ่มเซลล์นี้จะขยายใหญ่และเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) ปกคลุมบริเวณพื้นผิว เซลล์จะผลิตสารกลุ่มพอลิเมอร์แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ปกคลุมที่ผิวของกลุ่มเซลล์ เรียกสารกลุ่มนี้ว่า Extracellular Polymeric Substances (EPS)) จะช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้งและสารเคมีต่างๆ เช่น สารทำความสะอาด เป็นต้น และการรวมกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่ลักษณะทางโครงสร้างก็จะเป็นตัวขัดขวางการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อและการสร้างเอนไซม์ออกมาลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ

นอกจากนี้การแทรกซึมของสารฆ่าเชื้อเข้าไปในไบโอฟิล์มยังเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งขึ้นกับชนิดของสารที่ใช้ การเกาะติดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารของจุลินทรีย์และเจริญเป็นไบโอฟิล์มมีความสำคัญต่อโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นการวิธีการกำจัดเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในฟิล์มทำได้ยากมาก การทำความสะอาดตามปกติไม่สามารถกำจัดได้หมด จะต้องใช้แรงทางกายภาพช่วยในการกำจัด เช่น การขัดถูร่วมกับสารทำความสะอาด เป็นต้น ล้างส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ที่ฝังแน่นออกไป จากนั้นจะใช้สารฆ่าเชื้อเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์จึงทำให้สารทำความสะอาดมีประสิทธิภาพมากที่สุด

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1 ในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/ml)เวลา 0 นาทีก็เพียงพอที่จะทำให้ *Pseudomonas fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่น stainless steel ได้และเมื่อเวลานานมากขึ้น ก็สามารถตรวจพบ *Pseudomonas fluorescens* ได้มากยิ่งขึ้นสำหรับ ในสภาวะที่มีปริมาณเชื้อน้อย(3 log CFU/ml) พบว่าที่เวลา 0 - 120 นาที ไม่สามารถตรวจพบเชื้อบนพื้นผิวทดสอบด้วยวิธี spread plate technique ทั้งนี้ไม่ได้แสดงว่าไม่มีเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* เกาะบนแผ่นสเตนเลสสตีล โดยพบว่ามีโคโลนีของ *Pseudomonas fluorescens* บนจานเพาะเชื้อ แต่มีจำนวนเซลล์น้อยมาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อบนแผ่นทดสอบที่มีปริมาณเชื้อระดับต่ำ เนื่องจากเซลล์เริ่มต้นมีปริมาณน้อย จะต้องอาศัยเวลาให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนถึงจะมีการตรวจพบได้ โดยอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *Pseudomonas fluorescens* จากการทดลอง พบว่าอุณหภูมิ 28°C *Pseudomonas fluorescens* สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 20 และ15 °C ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหาร (น้ำเกลือปลอดเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v)) พบว่า การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้และไม่มีการแตกต่างกันมากนัก เนื่องจากมีสารอาหารที่สมบูรณ์

2. การเลือกชนิดของสารฆ่าเชื้อเพื่อใช้ในการทำความสะอาดพื้นผิวสัมผัสอาหารมีความจำเป็นมาก ต้องเลือกให้มีความเหมาะสมกับลักษณะของงานที่จะใช้ทำความสะอาด จากการทดลองพบว่า สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพดีเมื่อไม่มีสารอินทรีย์เข้ามาปะปน แต่เมื่อมีสารอินทรีย์ปะปนเข้ามาทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ลดลง การฆ่าเชื้อต้องใช้เวลานานมากขึ้น ส่วนการทำลายไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* ทั้งนี้ระยะเวลา 30 นาที ไม่เพียงพอในการทำลายไบโอฟิล์ม ส่วนกรดเปอร์รอกซีแอซีติก มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้เป็นอย่างดี สารอินทรีย์ไม่มีผลในการลดประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก แต่ทั้งนี้ต้องเลือกความเข้มข้นและระยะเวลาในการสัมผัสเชื้อให้เหมาะสม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการเกาะติดและเกิดไบโอฟิล์มในสภาวะที่มีเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณน้อย (3 log CFU/ml) เพื่อเลียนแบบสภาวะการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารหลังจากการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิต หากมีการทำความสะอาดไม่เพียงพอจุลินทรีย์ที่หลงเหลือจะเกิดการสะสมและสามารถสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิตได้

2. ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์ม ได้แก่ ชนิดของพื้นผิวสัมผัสอาหาร เช่น ยาง พลาสติก และซีเมนต์ เป็นต้น เพื่อเลียนแบบพื้นผิวที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นปัญหาในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

3. ควรมีการทดลองสร้างไบโอฟิล์มที่มีจุลินทรีย์หลายชนิด เพื่อให้มีลักษณะใกล้เคียงกับไบโอฟิล์มในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากไบโอฟิล์มที่มีการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ผสมหลายชนิด (Mix biofilms)

4. ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อและเวลาในการสัมผัสสารของไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวสัมผัสอาหารต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมได้ แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ภายในไบโอฟิล์มด้วย เนื่องจากไบโอฟิล์มที่มีการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ผสมหลายชนิด (Mix biofilms) ซึ่งอาจมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อแตกต่างจากไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว (Single biofilms)

เอกสารอ้างอิง

กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล. 2550. ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพของบาซิลลัส ซีเรียส สแตฟฟิโลคอกคัส ออเรียส และสปอร์เกาะติดของบาซิลลัส ซีเรียส บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จีระเดช มาลา.2551. การเกิดและการควบคุมไบโอฟิล์มของ *Salmonella* บนพื้นผิวเหล็กสแตนเลส. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บริษัทไทยน๊อคซ์สตีล จำกัด(มหาชน).2006.ข้อมูลเหล็กกล้าไร้สนิม.เอกสารเผยแพร่.

สุดาพร เทียบจัตุรัส.2545. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโซเดียมคลอไรด์และคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลาย *Escherichia coli* และ *Sallmonella* Typhimurium บนข้าวโพดฝักอ่อนและหน่อไม้ฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ กมล บุษบา อรุณ บ่างตระกูลนนท์ กษิดิศ เอื้อเชียวชาญกิจ และสุวิทย์ กิ่งแก้ว. 2548. รายงานการวิจัย.การประเมินความเสี่ยงและการสร้างผู้เชี่ยวชาญด้านการประเมินความเสี่ยง สำหรับอันตรายประเภทจุลินทรีย์.*Salmonella* spp.

Chavant, P., Gaillard-Martinie, B. and Hébraud, M. 2004. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. FEMS Microbiology Letters. 23:241-248.

Costerton, J.W. 2005. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. Clinical Orthopaedics and Related Research. 437: 7-11.

Costerton, J.W. and Lewandowski, Z. 1995. Microbial biofilms: a common cause of persistent infections. Science.284: 1318-1322.

Flint, S.H., Bremer, P.J. and Brooks, J.D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant description, current concerns and methods of control. Biofouling The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research.11: 81-97.

Garrett, T. R., Bhakoo, M. and Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science.18: 1049-1056.

Gill, C.O. and Newton, K.G. 1997. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. Journal of Applied Bacteriology. 43: 189-195.

http://img.photobucket.com/albums/v159/skdevitt/biofilm_formation.gif.html วันที่สืบค้น 12 พฤษภาคม 2552.

Jessen, B. and Lammert, L. 2003. Biofilm and disinfection in meat processing plants. International Biodeterioration & Biodegradation. 51: 265-269.

Joseph, B., Otta, S. K. and Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. International Journal of Food Microbiology. 64: 367-372.

Karen,S.,Kim.,S.H.,Martin Lo,Y and Cheng- I,W. 2009. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. Food Microbiology. 26:514-519.

Kumar, C.G., and Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: A review. International Journal of Food Microbiology. 42: 9-27.

Kunigk,L. and Almeida,M.C.B.2001. Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. Brazilian Journal of Microbiology.32:38-41.

Lebert, I., Robles-Olvera, V. and Lebert, A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. International Journal of Food Microbiology. 61: 27-39.

Marshall, K.C. 1994. Microbial adhesion in biotechnological processes. Current Opinion in Biotechnology. 5:296-301.

Olofsson, T.C., Ahrne, S. and Molin, G. 2007. Composition of the bacterial population of refrigerated beef, identified with direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. International Journal of Food Microbiology. 118:233-240.

Oulahal, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M. and Blum, L.J. 2007.Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 8:192-196.

Poulsen, L. V. 1999. Microbial biofilm in food processing. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 32: 321-326.

Shia, X., Zhu,X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in Food Science & Technology. Review: 1-7.

Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S.S., Malyea, R. and Boor, K.J. 2000. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk. Applied and Environmental Microbiology. 66: 2085-2095.

Zottola, E.A. 1994. Microbial attachment and biofilm formation: A new problem for the food industry. Food Technol. 48(7): 107-114.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine (จีระเดช มาลา, 2551)

1. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต(Sodium thiosulfate) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) ปริมาณ 6.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มให้เดือดใหม่ๆ แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ 2 อาทิตย์แล้ว standardize กับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เก็บสารละลายที่ได้โดยการเติมคลอโรฟอร์มลงไป 2-3 มิลลิลิตร

2. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต(Potassium dichromate) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ชั่งโพแทสเซียมไดโครเมต ปริมาณ 0.4904 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. การ standardize สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต

เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (Conc.Sulfuric acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในขดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล 10 มิลลิลิตร ลงไป แล้วจึงเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) ปริมาณ 1 กรัม ปิดจุกยางเขย่า แล้วเก็บไว้ในที่มืด 6 นาที นำมาไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต(นอร์มัล)} = \frac{10 \times \text{นอร์มัลของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต}}{\text{มิลลิลิตรของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต}}$$

4. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต(Sodium thiosulfate) ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล

เตรียมโดยปิเปตสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ

5. สารละลายแป้ง

ชั่งแป้ง (Starch indicator) 1 กรัม ผสมกับน้ำเล็กน้อย แล้วเทลงในน้ำเดือดประมาณ 200 มิลลิลิตร คนแล้วทิ้งค้างคืน รินเอาส่วนใส เก็บโดยการเติมกรดซาลิไซลิก ปริมาณ 0.25 กรัมและซิงค์คลอไรด์ ปริมาณ 0.8 กรัม

ภาคผนวก ง
ตารางแสดงข้อมูล

ภาคผนวก ง
ตารางแสดงข้อมูล

ตารางที่ ง1 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น(ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log CFU/ml)		
		สารละลายเกลือ	TSB	soiling agent
100	O_A	8.25±0.06	8.26±0.14	7.68±0.12
	OB	5.24±0.06	7.84±0.13	7.68±0.12
	1	0.00±0.00	7.79±0.11	7.68±0.12
	5	0.00±0.00	7.62±0.14	7.68±0.12
	10	0.00±0.00	7.51±0.13	7.68±0.10
	20	0.00±0.00	7.43±0.13	7.68±0.12
	30	0.00±0.00	7.31±0.09	7.68±0.12
200	O_A	ND	8.33±0.08	8.36±0.14
	O_B	ND	7.68±0.12	7.87±0.12
	1	ND	7.62±0.13	7.78±0.10
	5	ND	7.52±0.19	7.65±0.13
	10	ND	7.28±0.07	7.60±0.12
	20	ND	7.18±0.13	7.44±0.14
	30	ND	7.09±0.14	7.32±0.02
400	O_A	ND	8.30±0.06	8.61±0.17
	OB	ND	7.61±0.10	7.85±0.10
	1	ND	7.47±0.11	7.66±0.11
	5	ND	7.37±0.07	7.51±0.11
	10	ND	7.19±0.06	7.43±0.14
	20	ND	7.08±0.06	7.35±0.11
	30	ND	6.84±0.16	7.29±0.10

หมายเหตุ จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส

โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

ND คือ not determined (ไม่ได้ทำการทดลอง)

ตารางที่ ง2 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น(ppm)	เวลา (นาที)	ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์		
		สารละลายเกลือ	TSB	soiling agent
100	O_A	0.00	0.00	0.00
	O_B	36.48	9.28	5.08
	1	100.00	10.60	5.69
	5	100.00	11.57	7.75
	10	100.00	12.41	9.08
	20	100.00	13.37	10.05
	30	100.00	13.98	11.50
200	O_A	ND	0.00	0.00
	O_B	ND	7.80	5.86
	1	ND	8.52	6.94
	5	ND	9.72	8.49
	10	ND	12.61	9.09
	20	ND	13.81	11.00
	30	ND	14.89	12.44
400	O_A	ND	0.00	0.00
	O_B	ND	8.31	5.86
	1	ND	10.00	6.94
	5	ND	11.20	8.49
	10	ND	13.37	9.09
	20	ND	14.70	11.00
	30	ND	17.59	12.44

หมายเหตุ จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส

โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

ND คือ not determined (ไม่ได้ทำการทดลอง)

ตารางที่ ง7 จำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (peroxyacetic acid. POA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

peroxyacetic acid: POA (ppm)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm^2) และ เวลา (นาที)						
	O_A	O_B	1	5	10	20	30
25	4.90±0.12	4.82±0.13	3.75±0.06	3.66±0.08	3.22±0.04	2.97±0.07	2.86±0.08
50	4.91±0.10	4.59±0.08	3.44±0.12	3.22±0.10	2.99±0.12	2.72±0.12	0.00±0.00
100	5.04±0.03	3.60±0.07	2.77±0.10	2.72±0.08	2.66±0.06	2.33±0.03	0.00±0.00

หมายเหตุ จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm
สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อบนแผ่นทดสอบเริ่มต้น
O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

ตารางที่ ง8 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

peroxyacetic acid: POA (ppm)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm^2) และ เวลา (นาที)						
	O_A	O_B	1	5	10	20	30
25	0.00	1.63	23.47	25.31	34.29	39.39	41.63
50	0.00	6.52	29.94	34.42	39 10	44.60	100
100	0.00	28.57	45.04	46.03	47.22	53.77	100

หมายเหตุ จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm
สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อบนแผ่นทดสอบเริ่มต้น
O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที