รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2550

โครงการวิจัยเรื่อง การเกิดคราบของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและการควบคุมการแพร่กระจายจุลินทรีย์บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

ระยะเวลาการวิจัยตั้งแต่ วันที่ 1 ตุลาคม 2550 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2551

ชื่อหัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล

ชื่อผู้ร่วมโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธ์ศักดิ์ สุขในศิลป์

หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยในการเกาะติดและการเจริญเป็นไบโอฟิล์มของ *Salmonella* Anatum DMST17362 บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร ได้แก่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการเกาะติด เกรดและความขรุขระของพื้นผิวของ stainless steel อุณหภูมิ และ แหล่งของสารอาหาร ต่อการเกิดไบโอฟิล์ม พบว่าในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/mL) เพียงแค่สัมผัส (0 นาที) ก็เพียงพอที่ทำให้ *S.* Anatum สามารถเกาะติดบนแผ่น stainless steelได้ ส่วนสภาวะที่มีเชื้อน้อย (3 log CFU/mL) จะต้องอาศัยเวลาให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนจึงจะตรวจพบได้ แบคทีเรียสามารถเกาะและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ โดยพบว่าการเกาะและการเพิ่มจำนวนเซลล์บน stainless steel เกรด 430 เซลล์สามารถเกาะและมีจำนวนเซลล์มากกว่ากว่าเกรด 304 และ 316L ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเซลล์บนพื้นผิวชนิด BA มีจำนวนเซลล์มากกว่าพื้นผิวชนิด 2B และอุณหภูมิ 30 °C *S.* Anatum สามารถเพิ่มจำนวนบนแผ่น stainless steel ได้ดีกว่าอุณหภูมิ 20 และ 15 °C โดยมีค่าเท่ากับ 6.08±0.35, 5.45±0.39 และ 3.50±0.22 logCFU/cm^2 ที่ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหารเซลล์สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกัน ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์และกรดเปอร์อะซิติก ในการลดปริมาณ *S.* Anatum ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อและเกิดเป็นไบโอฟิล์มบนผิวสัมผัสอาหาร พบว่า เมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm และกรดเปอร์อะซิติก 50 ppm สามารถทำลาย *S.* Anatum ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้ทั้งหมดภายในระยะเวลา 1 นาทีและ 5 นาที ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากันในการลดปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) พบว่าโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้น้อยลง ส่วนในกรณีของกรดเปอร์อะซิติกนั้นพบว่าสารอาหารไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์แต่อย่างใด ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์ม เมื่อสร้างสภาวะให้เกิดไบโอฟิล์มบนแผ่น stainless steel 304/2B ใน TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 °C และทดสอบกับสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิด พบว่าไบโอฟิล์มของ *Salmonella* ทนต่อสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น โดยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ไม่สามารถทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้เมื่อครบเวลาที่กำหนด ส่วนกรดเปอร์อะซิติกความเข้มข้น 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้ทั้งหมดเมื่อครบเวลา 30 นาที

เลขหมู่
เลขทะเบียน 014234
วัน, เดือน, ปี 2 ก.ย. 52

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัทเคมิคอล แลป จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิจัย บริษัทไทยน๊อคซ์สตีล จำกัด ที่อนุเคราะห์เหล็กกล้าไร้สนิม และบริษัทเพอร็อกซี่ไทย จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้

การวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2550 (Thai Government Research Fund: The Bureau of the Budget Office of the Prime Minister) ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

กลไกการเกิดไบโอฟิล์ม..... 4

การเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร..... 7

การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์ม..... 8

ความสำคัญของ*Salmonella* 12

เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel)..... 18

ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม..... 18

การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ..... 21

คลอรีนและสารประกอบคลอรีน..... 22

กรดเปอร์ออกซีแอซิติก (Peroxyacetic acid)..... 25

3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 27

จุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ในการวิจัย..... 27

พื้นผิวทดสอบที่ใช้ในการวิจัย..... 27

สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย..... 28

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย..... 29

4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 36

5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 77

เอกสารอ้างอิง..... 78

ภาคผนวก..... 79

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและการเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสม	9
2.2	การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ	10
2.3	ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่แนะนำให้ใช้ในการฆ่าเชื้อพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรรอาหาร	11
2.4	ลักษณะทางชีวเคมีที่เป็นแบบฉบับของซัลโมเนลลา	13
2.5	ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไปของ stainless steel	19
2.6	ชนิดของ Stainless steel	20
2.7	สารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆ	22
4.1	ค่าความขรุขระของ stainless steel ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี surface roughness	36
4.2	ค่าความขรุขระของ stainless steel ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี surface roughness	37
4.3	ค่าความขรุขระของ stainless steel ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Atomic force Microscopy (AFM)	38
4.4	ค่าความเป็นกรด- เบส (pH) และปริมาณ Available chlorine ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่างๆ	67
4.5	ค่าความเป็นกรด- เบส (pH) ของสารละลาย Proxitane® ความเข้มข้นต่างๆ	71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบที่ หน้า

2.1 การเกิดเป็นไบโอฟิล์ม ตั้งแต่การเกิดเกาะติดจนเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์..... 6

2.2 การเกิด Passive layer ของ stainless steel..... 21

2.3 สมการการแตกตัวของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก..... 26

4.1 กราฟที่เกิดจากการทดสอบด้วยวิธี Surface roughness..... 36

4.2 สเกลบอกความเรียบความขรุขระของแผ่นทดสอบจากตรวจสอบด้วยวิธี AFM..... 39

4.3 ลักษณะพื้นผิวของแผ่นทดสอบเกรดต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี SEM และ AFM..... 40

4.4 ลักษณะพื้นผิวของแผ่นทดสอบพื้นผิวต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี SEM และ AFM 41

4.5 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel 304/2B และ 304/BA ที่เวลาต่างๆ โดยใช้วิธี Spread plate technique..... 42

4.6 การตรวจวัดจำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum บนแผ่นstainless steel ด้วยการวัดพลังงาน ATP ที่เวลาต่างๆ..... 45

4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์ของ S. Anatum บนแผ่น Stainless steel โดยนับจำนวนเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการตรวจวัดพลังงาน ATP..... 46

4.8 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบเกรด 304 กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 48

4.9 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบเกรด 316L กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 49

4.10 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบเกรด 430 กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 50

4.11 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เกรด 304, 316L และ 430..... 50

4.12 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบพื้นผิว 2B กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 52

4.13 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบพื้นผิว BA กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 53

4.14 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบพื้นผิว 2B และ BA..... 54

ภาพประกอบที่ หน้า

4.15 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ ที่อุณหภูมิ 15, 20 และ 30 °C ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL).....56

4.16 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ ที่อุณหภูมิ 15, 20 และ 30 °C ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL)..... 56

4.17 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบที่บ่มภายในหลอดปลอดเชื้อ ซึ่งมีน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 58

4.18 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบที่บ่มภายในหลอดปลอดเชื้อ ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสมกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 59

4.19 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบที่บ่มภายในหลอด ปลอดเชื้อซึ่งมีแหล่งของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันไป..... 60

4.20 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบที่บ่มภายในหลอดปลอดเชื้อ ซึ่งไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ.....61

4.21 ตรวจสอบการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบ ตรวจสอบโดยใช้SEM 62

4.22 ตรวจสอบการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบ ตรวจสอบโดยใช้SEM 63

4.23 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น100 ppm ppm โดยแขวนลอยในสารละลายเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 0.85.....64

4.24 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น100 ppm 200 ppm และ 400 ppm โดยแขวนลอย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB.....66

4.25 ร้อยละของการลดลงของเซลล์ที่รอดชีวิตที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หลัง สัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....66

4.26 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxitane® ความเข้มข้น 25 ppm ,50 ppm และ100 ppm โดยแขวนลอยในสารละลาย เกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85.....69

4.27 ร้อยละของการลดลงของเซลล์ที่รอดชีวิตที่แขวนลอยในสารละลายเกลือเข้มข้น ร้อยละ 0.85 หลังสัมผัส Proxitane® ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....69

ภาพประกอบที่ หน้า

4.28 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxitane®
ความเข้มข้น 25 ppm 50 ppm และ100 ppm โดยแขวนลอยในอาหารเลี้ยง
เชื้อ TSB..... 70

4.29 ร้อยละของการลดลงของเซลล์ที่รอดชีวิตที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB
หลังสัมผัส Proxitane® ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....71

4.30 จำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิตหลังสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความ
เข้มข้น 100 200 และ 400 ppm.....72

4.31 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิต
หลังสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm.....73

4.32 จำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxitane® ที่ความเข้มข้น
25 50 และ 100 ppm..... 74

4.33 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิต
หลังสัมผัส Proxitane® ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm..... 75

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณภาพนั้น ถึงแม้จะมีการนำมาตรการควบคุมที่เข้มงวดมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร โดยเฉพาะการนำหลักการ HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) มาประยุกต์ในกระบวนการผลิตแล้ว อัตราความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก็ยังคงมีอยู่ ส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากพื้นที่ผิวสัมผัสในสายการผลิต โดยเฉพาะสายพานการผลิตอาหาร การปนเปื้อนจากคนงานในสายการผลิต หรือแม้แต่การรักษาความสะอาดในระบบการผลิต เครื่องจักรอุปกรณ์ต่างๆ ที่ไม่ถูกสุขลักษณะก็อาจเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนของเชื้อโรคสู่อาหารได้ กล่าวคือ คราบของเศษอาหารที่ตกค้างอยู่ที่สายพานการผลิตนั่นเอง หากการทำความสะอาดไม่ถูกต้องหรือใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมีทำความสะอาดที่ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ก็อาจจะไม่สามารถขจัดคราบอาหารที่ตกค้างออกไปได้หมด ซึ่งคราบอาหารเหล่านี้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญ เพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเกิดเป็นไบโอฟิล์ม ในการผลิตครั้งต่อไปจุลินทรีย์ที่เจริญบนพื้นผิวนั้นมีโอกาสที่จะปนเปื้อนติดไปกับอาหารได้มากขึ้น

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) เป็นปัญหาสำคัญของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร กำจัดได้ยากแม้จะทำความสะอาดและฆ่าเชื้อแล้ว มีรายงานว่ากลุ่มของเซลล์แบคทีเรียที่เป็นไบโอฟิล์ม สามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อโรคได้มากกว่าปกติ ด้วยเหตุนี้สารฆ่าเชื้อจึงมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้ลดลง ไบโอฟิล์มยังเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์หลายชนิด พบได้บนพื้นผิวต่างๆในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น พื้นผิวของอุปกรณ์และเครื่องมือ ท่อ และสายพานการผลิต เป็นต้น เป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์อาหารในระหว่างและหลังกระบวนการผลิต การปน เปื้อนดังกล่าวส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ทำให้อายุการเก็บรักษาลดลง ไบโอฟิล์มอาจเกิดขึ้นเกิดจากการรวมตัวของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* *Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น ซึ่ง *Salmonella* จัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และถูกกำหนดไว้ว่าจะต้องตรวจไม่พบในอาหาร จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมไม่ให้มีการแพร่กระจายได้ ดังนั้นความสะอาดของพื้นผิวที่สัมผัสอาหารมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการผลิตอาหาร เนื่องจากเป็นส่วนที่มีการสัมผัสกับอาหารโดยตรง ถ้าพื้นผิวที่สัมผัสมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่มาก ก็จะเป็นสาเหตุหนึ่งในการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ให้กับอาหาร ทั้งส่วนที่เป็นวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์ การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยการเกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* รวมทั้งการป้องกัน/ควบคุมไบโอฟิล์ม จึงเป็นข้อมูล

พื้นฐานในการวิจัยเพื่อพัฒนาด้านสุขลักษณะของการผลิตอาหาร ช่วยให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารน้อยลง ผู้ประกอบการอุตสาหกรรมอาหาร และผู้ให้บริการอาหารสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการทำความสะอาดพื้นผิวสัมผัสอาหารอย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มและวิธีการควบคุมไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้น โดยได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกาะติดของ *S.* Anatum บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร และการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มภายใต้สภาวะต่างๆ ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ชนิดของอาหาร และเกรดและพื้นผิวของ stainless steel ส่วนที่สองมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลาย/ลดปริมาณเซลล์อิสระและ *Salmonella* biofilm บนพื้นผิวสัมผัสอาหารนั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศเกษตรอุตสาหกรรม สินค้าที่ส่งออกส่วนใหญ่จึงเป็นสินค้าที่มาจากการเกษตรโดยเฉพาะอาหาร ซึ่งนอกจากจะใช้บริโภคภายในประเทศแล้ว ยังมีการส่งออกปีหนึ่งๆ คิดเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท เช่นการส่งออกอาหารของไทยปี 2550 มีมูลค่าการส่งออก 617,620 ล้านบาท เพิ่มขึ้นร้อยละ 9.5 หรือคิดเป็นมูลค่าส่งออกในรูปดอลลาร์ 17,866 ล้านเหรียญสหรัฐฯ เพิ่มขึ้นร้อยละ 20.2 โดยเฉพาะ ข้าว ปาล์มน้ำมัน มันสำปะหลัง รวมทั้งกลุ่มผลิตภัณฑ์ประมง เช่น ทูน่ากระป๋อง ปลาหมึก ปลากระป๋อง และปลาแปรรูปแบบต่างๆ (กรมการส่งออก, 2551) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการผลิตอาหารเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญของประเทศไทย ดังนั้นผู้ผลิตอาหารจึงต้องมีความระมัดระวังถึงคุณภาพ และมาตรฐานด้านสุขอนามัยและความปลอดภัยของผู้บริโภค การตรวจสอบคุณภาพด้านจุลชีววิทยา โดยเฉพาะจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จะเป็นดัชนีที่สามารถบ่งชี้ถึงความสด ความสะอาดของผลิตภัณฑ์ รวมถึงการดูแลผลิตภัณฑ์ระหว่างการขนส่ง และการเก็บรักษาระหว่างรอจำหน่ายของผู้ค้าด้วย

ในกระบวนการผลิตอาหารที่มีวัตถุดิบเป็นเนื้อสัตว์ไม่ว่าจะเป็นสัตว์ปีกหรือเนื้อสัตว์ต่างๆนั้น มีจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและทำให้เกิดโรคกับผู้บริโภคได้อยู่หลายชนิด ในกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ *Salmonella* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สำคัญ มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งถ้าเกิดขึ้นกับพื้นผิวที่สัมผัสอาหารจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากกระบวนการมีปริมาณจุลินทรีย์สูง อายุการเก็บสั้น และอาหารไม่ปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) คือกลุ่มสังคมของจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวและฝังตัวอยู่ภายใต้สารกลุ่มพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์นั้นสร้างขึ้นแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ (Stepanovic et al, 2004; Surdeau, Bouthors and Gelle, 2006; Oulahal et al. 2008) ไบโอฟิล์มสามารถเกิดขึ้นได้บนพื้นผิวชนิดต่างๆในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะพื้นผิวสัมผัสอาหารเช่น พื้นผิวอุปกรณ์และเครื่องมือ ท่อ สายพานการผลิต เป็นต้น เมื่อพื้นผิวดังกล่าวมีการทำความสะอาดหรือฆ่าเชื้อที่ไม่ดีพอ จุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่อาจเกิดการสะสมและเจริญกลายเป็นไบโอฟิล์มต่อไป ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตและหลังกระบวนการผลิตทำให้อาหารไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมอาหารได้

กลไกการเกิดไบโอฟิล์ม

กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มนั้นจัดเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (Dynamic process) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (Trachoo, 2003; Surdeau et al, 2006; Rode et al. 2007) ได้แก่ การเกาะติดบนพื้นผิวของจุลินทรีย์ การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ และการเจริญเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์

1. **การเกาะติดบนพื้นผิวของจุลินทรีย์** (Attachment)

การเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิวของอาหารหรือวัสดุที่สัมผัสกับอาหารอาจเกิดขึ้นได้จากตัวเซลล์หรือการกระทำจากภายนอก (Chmielewski and Frank, 2003) ถ้าเป็นการเกาะติดแบบแพสซีฟ (Passive) จะเกิดขึ้นจากแรงโน้มถ่วงของโลก และแรงที่เกิดจากของไหลที่อยู่รอบๆบริเวณเซลล์ ได้แก่ แรงขับเคลื่อนของของไหล (fluid dynamic force) และแรงขับเคลื่อนจากการแพร่ (diffusion dynamic force) ส่วนการเกาะติดแบบแอคทีฟ (active) เกิดขึ้นเนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะของผิวเซลล์ที่มีส่วนประกอบที่จำเพาะต่อการเกาะติด เช่น แฟลกเจลลา (flagella) พิไล (pili) โปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะแอดฮีซิน (adhesion protein) แคปซูล (capsule) และประจุที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ (Kumar and Anand, 1998) เป็นต้น การเกาะติดของเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 การเกาะติดแบบผันกลับ (Reversible adhesion) เซลล์แบคทีเรียจะเกิดพันธะอย่างอ่อนกับพื้นผิว พันธะที่เกิดขึ้นได้แก่ แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals forces) electrostatic forces และ hydrophobic interaction ในระยะนี้เซลล์แบคทีเรียยังคงมีการเคลื่อนที่ได้ โดยเป็นการเคลื่อนที่แบบบราวน์เนียน (Brownian movement) ซึ่งมีผลทำให้สามารถถูกกำจัดได้ง่ายโดยการชะล้างด้วยน้ำหรือสารฆ่าเชื้อ (Kumar and Anand, 1998)

ระยะที่ 2 การเกาะติดแบบไม่ผันกลับ (Irreversible adhesion) เซลล์แบคทีเรียจะมีการสร้างพันธะที่แข็งแรง ได้แก่ dipole-dipole interaction พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) พันธะโควาเลนต์ (covalent bonding) และ hydrophobic interaction กับพื้นผิวโดยสร้างโครงสร้างของเซลล์ เช่น แฟลกเจลลา (flagella) ฟิมเบรีย (fimbriae) พิไล (pili) เป็นต้น นอกจากนี้เซลล์จะมีการสร้างไฟบริน (fibril) เพื่อเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับพื้นผิวอีกด้วย ทำให้มีการยึดเกาะที่เหนียวแน่นกว่าในระยะแรก ซึ่งการกำจัดเซลล์แบคทีเรียในระยะนี้ออกไปทำได้ยากขึ้น ต้องใช้แรงเช่น การขัดถู (scrubbing) หรือการขัดลอก (scruping) เข้าช่วยเพื่อให้เซลล์หลุดออกไป หรือประยุกต์ใช้เอนไซม์ สารทำความสะอาด (detergent) สารฆ่าเชื้อ

และ/หรือ ความร้อนเพื่อช่วยทำลายแรงที่ใช้ในการเกาะติดของเซลล์กับพื้นผิว การเกาะติดของจุลินทรีย์ เกิดขึ้นในเวลาไม่นานเพียง 5 ถึง 30 วินาทีเท่านั้น (Chemielewski and Frank, 2003) โดยเซลล์จะมีการเกาะติดแบบระยะที่ 1 ก่อนแล้วตามด้วยระยะที่ 2

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิว ได้แก่

1. ชนิดและโครงสร้างของเซลล์ เซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้างบนเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) หรือ LPS โปรตีนแอดฮีซิน และโปรตีนชนิดอื่น กรดไทโคอิก (teichoic acid) เป็นต้น โครงสร้างเหล่านี้จะแสดงถึงความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ของ เซลล์ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเกาะติดบนพื้นผิว มีรายงานว่า แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น ใช้แฟลกเจลลา พิไล และ โปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ในการเกาะติดขั้นต้น การสูญเสียโครงสร้างเหล่านี้มีผลในการลดความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวบางชนิดได้ (Kumar and Anand, 1998)

2. สภาพแวดล้อมและองค์ประกอบของสารอาหารที่อยู่ล้อมรอบ เมื่อเกิดการสะสมของสารอาหารบนพื้นผิวจนเป็นลักษณะของฟิล์มที่เรียกว่า Conditioning film ฟิล์มดังกล่าวจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพของพื้นผิว เช่น ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว (surface free energy) ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิตี้ (hydrophobicity) และประจุของพื้นผิว ซึ่งอาจส่งผลถึงการเกาะติดของจุลินทรีย์ (Kumar and Anand, 1998)

3. ลักษณะและคุณสมบัติของพื้นผิว อัตราการเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของพื้นผิว ได้แก่ ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิตี้ ความเรียบผิว (Roughness) และประจุบนพื้นผิว Chmielewski และ Frank (2003) ได้รวบรวมงานวิจัยและสรุปว่า การเกาะติดของจุลินทรีย์เกิดขึ้นบนพื้นผิวที่มีพลังงานอิสระสูงหรือมีความเปียกน้ำ (hydrophilic) ได้ง่าย ได้ดีกว่าพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิกหรือสมบัติไม่ชอบน้ำ เช่น เทฟลอน (Teflon) ไนลอน (nylon) ยาง (buna-N-rubber) เป็นต้น

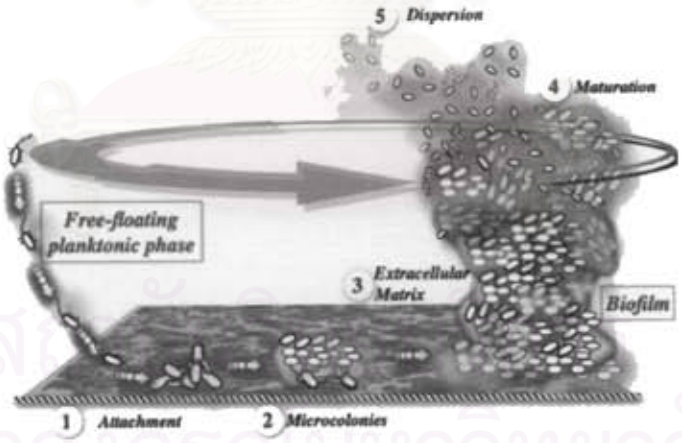
2. **การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์** (Colonization)

หลังจากเซลล์มีการเกาะติดในระยะที่ 2 การเกาะติดแบบไม่ผันกลับแล้ว เซลล์จะมีการเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปโดยการใช้สารอาหารที่อยู่รอบๆในสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กขึ้น (microcolony) ซึ่งกลุ่มของเซลล์นี้จะขยายใหญ่

และเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) ปกคลุมบริเวณพื้นผิว (Poulsen,1999) ในขั้นนี้เซลล์ที่เกาะติดอยู่เริ่มมีการผลิตสารกลุ่มพอลิเมอร์แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ คลุมอยู่ที่ผิวของกลุ่มเซลล์ เรียกสารกลุ่มนี้ว่า Exopolysaccharide Substances (EPS) อาจประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ฟอสโฟไลพิด กรดไทโคอิก กรดนิวคลีอิก และสารพอลิเมอร์อื่นๆ สารเหล่านี้จะช่วยให้เซลล์ยึดเกาะพื้นผิวได้ดีและมีความเสถียรมากขึ้นจากสภาพแวดล้อมรอบๆที่มีการแปรปรวนอยู่ตลอดเวลา (Kumar and Anand, 1998; Chemielewski and Frank, 2003)

3. **การเจริญเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์** (Maturation)

จากกลุ่มของเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนซ้อนทับกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ภายใต้สาร EPS จะเกิดการพัฒนาจนเป็นไบโอฟิล์มต่อไป โครงสร้างของไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่อาจเป็นชั้นของเซลล์เพียงชั้นเดียวภายใต้โครงข่ายของ EPS ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (porous) หรือเป็นชั้นของเซลล์หลายชั้นซ้อนกันโดยมีการเชื่อมกันด้วย EPS และมีช่องสำหรับลำเลียงน้ำ (water channel) กระจายอยู่ทั่วไป (Chemielewski and Frank, 2003) นอกจากสาร EPS จะมีหน้าที่สำคัญในการเชื่อมโยงเซลล์ภายในไบโอฟิล์มและยึดเหนี่ยวกับผิวเซลล์แล้ว ยังมีความสำคัญในการอยู่รอดของไบโอฟิล์มด้วย EPS มีหน้าที่ห่อหุ้มและกักเก็บสารอาหารไว้สำหรับเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม ช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้ง สารเคมีต่างๆ เป็นต้น



รูปที่2.1 การเกิดเป็นไบโอฟิล์ม ตั้งแต่การเกิดเกาะติดจนเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์

ที่มา: http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2006/Ggb-en.html

การเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร

ไบโอฟิล์มเป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร ส่งผลให้คุณภาพอาหารลดต่ำลงและไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค การสะสมของไบโอฟิล์มบนพื้นผิวพบได้ในหลายบริเวณของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เช่น พื้น ท่อ ซีลยาง (rubber seal) สายพาน (conveyor belt) สแตนเลสสตีล (stainless steel) เป็นต้น มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการตรวจพบจุลินทรีย์บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค (Kumar and Anand, 1998) เช่น *L. monocytogenes* (Gram et al, 2007; Oulahal et al, 2008), *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157: H7 และ *Salmonella* spp. (Joseph, Otta and Kurunasagar, 2001; Oliveira et al, 2007; Rode et al , 2007; Oulahal et al, 2008) จากรายงานวิจัยต่างๆจะเห็นว่า เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเกิดและสร้างไบโอฟิล์มได้ และพบว่าเซลล์ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มจะมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จนทำให้มีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมอาหารถ้ามีการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต Oulahal et al. (2008) ได้สรุปปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิว ไว้ว่า ขึ้นกับระยะการเจริญของเซลล์ ชนิดและคุณสมบัติของพื้นผิว ปริมาณสารอินทรีย์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการเกาะติด และพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มได้

การที่เซลล์จุลินทรีย์ภายใต้ไบโอฟิล์มสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น เกิดจาก

1. สารพอลิเมอร์ที่เซลล์สร้างขึ้นปกคลุมไว้ มีผลในการลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ
2. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์
3. ความจำกัดของสารอาหารมีผลทำให้เซลล์เกิดการปรับตัวและชักนำเข้าสู่สภาวะเครียด
4. ความหนาแน่นของเซลล์ภายใต้ไบโอฟิล์มที่มีการตอบสนองต่อสารฆ่าเชื้อได้แตกต่างกัน

ดังนั้นการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการปกติอาจไม่เพียงพอในการทำลายและกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวได้ Jessen และ Lammert (2003) รายงานว่า หลังจากการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวด้วยสารทำความสะอาดร่วมกับสารประกอบคลอรีนหรือสารผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับกรดเปอร์แอซีติก พบว่า แบคทีเรียยังคงรอดชีวิตอยู่มากถึง 3-4 log CFU/cm^2 ซึ่งการหลงเหลือของจุลินทรีย์ถือเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้

การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์ม (Control and removal of biofilms)

ขั้นตอนในการกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มประกอบด้วย การทำความสะอาด (cleaning) และการฆ่าเชื้อ (sanitizing) ส่วนใหญ่เริ่มจากการใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็นล้างสิ่งสกปรกต่างๆออกจากพื้นผิว และใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การขัดถูร่วมกับสารทำความสะอาด เป็นต้น ล้างส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ต่างๆที่ฝังแน่นออกไป จากนั้นจะใช้สารฆ่าเชื้อเข้าทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ ถ้าสารทำความสะอาดไม่สามารถล้างสารอินทรีย์ได้หมด สารฆ่าเชื้อจะไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นในการเลือกวิธีการทำลาย ชนิดและความเข้มข้นของสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสม รวมถึงระยะเวลาในการทำความสะอาดจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

1. วิธีการทางกายภาพ (Physical methods)

การทำลายไบโอฟิล์มด้วยวิธีทางกายภาพสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม คือ การใช้แรงกลในการขัดลอกแผ่นไบโอฟิล์ม การขัดลอกนั้นถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีที่ง่ายและราคาไม่แพง แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่เหมาะสมเมื่อใช้กับพื้นผิวขรุขระ ปัจจุบันจึงได้มีการประยุกต์ใช้วิธีอื่นๆร่วมด้วย เช่น การใช้คลื่นเสียง (sonication) การใช้แรงดันสูง (high pressure) เป็นต้น นอกจากนี้ การใช้น้ำที่มีอุณหภูมิสูงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ให้ผลในการกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มได้ พบว่า ในระบบการผลิตน้ำดื่มจะต้องใช้น้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 100 นาที หรืออาจใช้ระบบหมุนเวียนของน้ำที่มีอุณหภูมิ 80°C จึงจะทำลายไบโอฟิล์มได้ นอกจากวิธีที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการใช้วิธีอื่นๆ ได้แก่ Super-high magnetic field, Ultrasound treatment, High pulsed electrical field และ Low electrical field เป็นต้น

2. วิธีการทางเคมี (Chemical methods)

การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มประกอบด้วย การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ ซึ่งการทำให้ทั้งสองขั้นตอนมีประสิทธิภาพมากขึ้น จำเป็นต้องมีการเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสมเข้าช่วย ขั้นตอนของการทำความสะอาดจำเป็นต้องกำจัดเศษอาหารและสารอินทรีย์ต่างๆที่ช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ออกไป สารทำความสะอาดที่ดีจึงต้องมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว ทำให้ไขมันกระจายตัวออก และย่อยสลายโปรตีนได้ เพื่อกำจัด EPS ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปกคลุมเซลล์ออกไปได้ สารทำความสะอาดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารทำความสะอาดชนิดเบสและชนิดกรด ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นสารประกอบชนิดเบสที่มีฤทธิ์ในการกำจัดไขมันและโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมมีความหลากหลายและมี

ลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนั้น การเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ Marriott (1994) แนะนำการเลือกใช้สารทำความสะอาดสำหรับพื้นผิว (ตารางที่ 2.1) ประเภทแก้ว เซรามิค สเตนเลสสตีล และ พลาสติก ควรใช้สารทำความสะอาดชนิดเบส (alkaline detergent) หรือสารไม่มีประจุ (nonionic detergent) จึงจะเหมาะสม ถึงแม้ว่าสารทำความสะอาดจะกำจัดไบโอฟิล์มบางส่วนได้ แต่จุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้ไบโอฟิล์มนั้น อาจไม่ถูกทำลายไปด้วย (Surdeau et al, 2006) ขั้นตอนการฆ่าเชื้อหลังจากทำความสะอาด จึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 2.1 พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและการเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสม

วัสดุพื้นผิว	ลักษณะ	ข้อควรระวัง
ไม้	ดูดซับความชื้น และไขมันได้ ยากต่อการดูแลรักษา ถูกทำลายด้วยสารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อน	ไม่ควรนำมาใช้เพราะทำความสะอาดได้ยาก ควรเลือกใช้วัสดุชนิดอื่น เช่น โพลีเอทิลีน สแตนเลสสตีล และยางแทน
โลหะ	สามารถเกิดสนิมได้เมื่อสัมผัสกับสารทำความสะอาดที่เป็นกรดหรือมีคลอรีนเป็นส่วนประกอบ	โลหะมีโอกาสในการเกิดสนิมได้ จึงควรเคลือบด้วยดีบุกหรือสังกะสี สารที่เหมาะสมคือพวกที่มีฤทธิ์เป็นกลาง
แก้ว	มีความเรียบและสามารถกันน้ำได้ อาจถูกกัดกร่อนได้เมื่อใช้สารทำความที่มีความเป็นเบสมาก	แก้วควรทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาดที่มีความเป็นกลางหรือเบสปานกลาง
ยาง	ยางที่เลือกใช้ไม่ควรเป็นรูพรุนไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อล้างด้วยสารทำความสะอาดชนิดเบส แต่อาจเสื่อมสภาพได้ถ้า ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และกรดเข้มข้น	แผ่นยางที่นำมาใช้เมื่อใช้งานไประยะหนึ่งอาจเกิดการโค้งงอได้
สเตนเลสสตีล	ต้านทานต่อการกัดกร่อน มีความเรียบและกันน้ำได้ ต้านทานการ oxidation ที่อุณหภูมิสูง ทำความสะอาดได้ง่าย	ราคาแพง บางชนิดถูกทำลายด้วยสารในกลุ่มฮาโลเจน (คลอรีน ไอโอดีน โบรมีน และ ฟลูออรีน)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriott (1994)

การฆ่าเชื้อมีจุดประสงค์เพื่อทำลายกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นไบโอฟิล์มซึ่งถูกปกคลุมด้วยสาร EPS สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ ได้แก่ สารในกลุ่มฮาโลเจน เช่น คลอรีนและไอโอดีน เป็นต้น สารประกอบเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ และสารประกอบแอมโมเนีย (Quaternary ammonium compound, Quat) (ตารางที่ 2.2) ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร เวลาในการสัมผัส ปริมาณของสารอินทรีย์ ความกระด้างของน้ำ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และความสามารถของสารในการเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์ (Marriott, 1994) สมบัติของสารฆ่าเชื้อที่ดีควรมีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (broad spectrum) ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะที่มีสารอินทรีย์ปริมาณสูง ความกระด้างของน้ำสูง และค่าความเป็นกรด-เบสไม่แน่นอน สารฆ่าเชื้อที่ดียังควรละลายน้ำได้ดี ใช้งานง่าย ราคาไม่แพง ตรวจวัดง่าย และที่สำคัญต้องไม่เป็นพิษหรือระคายเคืองต่อร่างกาย การเลือกใช้สารฆ่าเชื้อความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำความสะอาดพื้นผิวชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ

สารฆ่าเชื้อ	การประยุกต์ใช้
คลอรีน	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยการสเปรย์ clean-in-place(CIP) และฉีดพ่น
ไอโอดีน	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยการใช้มือจุ่ม(hand dip)
กรดเปอร์แอซิติก	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยวิธี CIP โดยเฉพาะในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำและมีคาร์บอนไดออกไซด์
Acid anionics	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยการสเปรย์ การใช้ร่วมกับสารฆ่าเชื้อและกรด
Quaternary ammonium compound	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด ส่วนใหญ่ใช้ในการควบคุมสิ่งแวดล้อม เช่น ผนัง ท่อระบายน้ำ

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriot (1994)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่แนะนำให้ใช้ในการฆ่าเชื้อพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

บริเวณหรือพื้นผิว	สารฆ่าเชื้อที่แนะนำให้ใช้	ความเข้มข้น(ppm)
เครื่องมือที่มีพื้นผิวเป็นอะลูมิเนียม	Iodophor	25
ฟิล์มของแบคทีเรีย	Quat[a]	200
	Acid-quat	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
	Acid-anionic	100
การทำความสะอาดแบบ CIP	Acid sanitizer	130
	Active chlorine	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
	Iodophor	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
พื้นคอนกรีต	Active chlorine	1,000-2,000
	Quat	500-800
ลังพลาสติก	Iodophor	25
พื้นผิวที่มีรูพรุน	Active chlorine	200
เครื่องมือที่ใช้ผลิต(อะลูมิเนียม)	Quat	200
	Iodophor	25
เครื่องมือที่ใช้ผลิต(สแตนเลส)	Acid sanitizer	130
	Acid-quat	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
	Active chlorine	200
	Iodophor	25
สายพานยาง	Iodophor	25
ผนัง	Active chlorine	200
	Quat	200
	Acid-quat	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
ลังไม้	Active chlorine	1,000

หมายเหตุ [a] Quat = Quaternary ammonium compound

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriot (1994)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีการทางชีวภาพ

การใช้วิธีการทางชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันเนื่องจากผู้บริโภคอาหารส่วนใหญ่ให้ความสนใจเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารมากขึ้น ได้มีการนำสารชีวภาพ เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ มาเคลือบบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารเพื่อยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย เป็นต้น แบคเทอริโอซินที่ใช้อย่างแพร่หลายคือ ไนซิน (nisin) ซึ่งได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration (FDA) ในปี 1988 ว่าสามารถใช้กับอาหารได้ (Generally Recognized As Safe; GRAS) มีรายงานพบว่า ไนซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ (spore former) ได้ นอกจากสารในกลุ่มแบคเทอริโอซินแล้ว เอนไซม์เป็นสารชีวภาพอีกกลุ่มหนึ่งที่ถูกเลือกใช้ในการทำลายไบโอฟิล์มเพราะเอนไซม์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ และจุลินทรีย์ได้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัด EPS และไบโอฟิล์มได้ แต่เอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์แตกต่างกัน จึงมีข้อจำกัดในการเลือกใช้ ที่จำเป็นต้องเลือกให้จำเพาะกับชนิดของสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์ที่สร้างไบโอฟิล์มนั้น

ความสำคัญของ *Salmonella*

Salmonella เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่รุนแรง และเป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของอาหารเป็นพิษขึ้นบ่อยที่สุดในหลายประเทศรวมทั้งในประเทศไทย แบคทีเรียนี้จัดอยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซิอี (Family Enterobacteriaceae) เช่นเดียวกับแบคทีเรียพวก Coliform และ *E. coli* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ขนาดตั้งแต่ 0.7-1.5×5 ไมโครเมตร เจริญได้ทั้งสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิปานกลาง แม้ว่าที่ 37°C จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม แต่ที่ 42°C เป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้บ่มเพาะเชื้อในขั้น Selective Enrichment เพราะที่อุณหภูมินี้ *Salmonella* เจริญแข่งกับแบคทีเรียอื่นๆได้ดี ทดสอบ oxidase ให้ผลลบ แต่ทดสอบ catalase ให้ผลบวก อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 35-37°C และยังสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 8-45°C ในช่วง pH 4-9 ค่า water activity มากกว่า 0.94 บางครั้งพบมี filaments ยาว ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ หมักน้ำตาลกลูโคสให้ทั้งกรดและแก๊ส เชื้อชนิดนี้จะทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ เนื่องจากสารพิษ endotoxin ซึ่งสารพิษที่สร้างขึ้นนี้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ polysaccharide-polypeptide-lipid A ซึ่งจะปรากฏอยู่ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย คนและ สัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติแห่งแรก (Primary habitat) ของ *Salmonella* มนุษย์เกิดโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนผ่านทางเดินอาหาร ซึ่งลักษณะทางชีวเคมีชนิดอื่นๆ ของเชื้อชนิดนี้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ลักษณะทางชีวเคมีที่เป็นแบบฉบับของซัลโมเนลลา

Test	Typicl reaction	%positive
Decarboxylation		
Lysine	+	97.4
Ornithine	+	90.0
Production of;		
Hydrogen sulphide	+	95.3
Indole	-	1.1
Urease	-	0
Arginine dihydrolase	+	92.8
Phenylalanine deaminase	-	0
Metabolism of glucose:		
Fermentation	+	100
Methyl red	+	100
Voges-Proskauer	-	0
Gas production	p	89.4
Fermentation of:		
Arabinose	+	90
Xylose	+	94.6
Rhamnose	+	91.4
Maltose	+	97.3
Lactose	-	0.3
Sucrose	-	0.2
Mannitol	+	99.7
Sorbitol	+	94.5
Utilization of citrate	p	86.9

+ = >90% ให้ผลบวก; - = ให้ผลบวก< 10% ; p = 10-90% ที่ให้ผลบวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปัจจุบันนี้มักจะระบุซีโรวาร์ที่เฉพาะเจาะจงโดยอาศัยเทคนิคทางซีโรวิทยาเป็นเครื่องจำแนกมีหลักการ คือ การตกตะกอน (agglutination) ของโปรตีนจากแอนติเจน (antigens) บนเซลล์ของแบคทีเรียจากแอนติบอดี (antibodies) ที่มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรม ซึ่งใช้เป็นตัวทดสอบแอนติเจนบนเซลล์ของ *Salmonella* spp. ซึ่งจำแนกออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

แอนติเจนที่ผิวเซลล์ เรียกว่า somatic antigen หรือ O antigen มีสารประกอบชนิด lipopolysaccharide (LPS) อยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ O antigen เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน

แอนติเจนที่แส้หรือที่หนวด เรียกว่า flagella antigen หรือ H antigen ประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน

แอนติเจนที่เปลือกหุ้มเซลล์หรือแคปซูล เรียกว่า capsular antigen หรือ Vi antigen ซึ่งมีอยู่ในซัลโมเนลลาบางสปีชีส์เท่านั้น ได้แก่ *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C และ *S.* Dublin ซึ่งมีแคปซูล

การแบ่งกลุ่ม โดยอาศัยหลักการทางระบาดวิทยา ทำให้จำแนก *Salmonella* spp. ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

<u>กลุ่มที่ 1</u> *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคเฉพาะในคนที่สำคัญมี 2 ซีโรวาร์ คือ *S.* Typhi และ *S.* Paratyphi ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดสามารถแพร่กระจายไปได้ทั่วทั้งร่างกาย (systemic) ก่อให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ และไข้รากสาดน้อยตามลำดับอาจเรียกรวมกันว่าโรคไข้เอนเทอริค (enteric fever)

<u>กลุ่มที่ 2</u> *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคในสัตว์ เป็นกลุ่มของ *Salmonella* spp. ที่โดยปกติแล้วจะพบในสัตว์ที่เป็นโฮสท์แต่ละชนิด เช่น *S.* Pullorum และ *S.* Gallinarum พบในไก่ *S.* Dublin พบในวัว *S.* Abortus-equi พบในม้า *S.* Abortus-ovine พบในแกะ *S.* Choleraesuis พบในสุกร

<u>กลุ่มที่ 3</u> *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคทางเดินอาหารอักเสบ (gastroenteritidis *Salmonella* spp.) เป็นกลุ่มของ *Salmonella* spp. ที่อยู่นอกเหนือจาก 2 กลุ่มที่กล่าวมาข้างต้น เนื่องจากสามารถมีชีวิตอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เป็นผลให้ *Salmonella* spp. กลุ่มนี้แพร่กระจายไปได้กว้างในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน น้ำ อุปกรณ์ เครื่องมือ หรือแม้กระทั่งแพร่ไปกับคนหรือสัตว์ เป็นต้น จึงพบว่ามีการแพร่กระจายของ *Salmonella* spp. ในห่วงโซ่อาหารกว้างขวาง

และทำให้เกิดปัญหาให้ต้องทำการควบคุมอุบัติการณ์ของโรคที่มาจาก *Salmonella* spp. โดยผ่านอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า ซัลโมเนลโลซีส (Salmonellosis) กับมนุษย์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอด

เนื่องจาก *Salmonella* มีความสามารถในการปรับตัวได้ดีจึงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำความเข้าใจปัจจัยต่างๆ ที่จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและความอยู่รอดของ *Salmonella* ในสิ่งแวดล้อมเพื่อจะได้ใช้ปัจจัยเหล่านี้มาควบคุมการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของของ *Salmonella* ในธรรมชาติได้

อุณหภูมิ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดี ณ อุณหภูมิในร่างกายคนหรือ สัตว์ หรือเรียก mesophilic bacteria โดยช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้อย่างเหมาะสม (optimal temperatures) อยู่ระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม *Salmonella* มีสมบัติที่จะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี ดังนั้นอุณหภูมิต่ำสุด (minimum temperature) ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในเนื้อไก่หรือเนื้อวัว คือ 2-3 องศาเซลเซียส โดยอยู่ได้นานถึง 2-3 วัน ในขณะที่อุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) ที่เคยมีรายงานว่าเจริญเติบโตได้คือที่ 54 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* สามารถปรับตัวให้เข้ากับอุณหภูมิที่สูงขึ้นเป็น 48 องศาเซลเซียส อย่างน้อยหนึ่งรุ่น (generation) ก่อนจะกลายพันธุ์ (mutants) สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 54 องศาเซลเซียส เนื่องจาก *Salmonella* spp. มีระบบการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบเฉียบพลัน (heat shock response)

เมื่ออุณหภูมิในอาหารอันเป็นสิ่งแวดล้อมของ *Salmonella* spp. เพิ่มสูงขึ้น *Salmonella* spp. จะเริ่มตายเนื่องจากความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์แบคทีเรียส่วนที่เป็นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ มีผลให้เยื่อหุ้มเซลล์รั่วและการสังเคราะห์โปรตีนหยุดชะงักลง ผลสุดท้ายคือเซลล์ไม่สามารถรักษาสภาวะสมดุลที่เป็นสภาวะปกติไว้ได้และต้องตายไปในที่สุด

ความเป็นกรดด่าง ช่วง pH ที่ *Salmonella* spp. เจริญเติบโตได้ อยู่ระหว่าง 4.5-9.5 แต่ช่วง pH ที่มันเจริญเติบโตได้ดี คือ pH 6.5-7.5 ปัญหาการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในอาหารที่เป็นกรดนั้นน่าจะมาจากความสามารถของ *Salmonella* ในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่ค่อย ๆ เป็นกรดทีละน้อย เช่น ในกรณีที่น้ำนมหมักที่ทำให้เกิดรสเปรี้ยวจากกรดแลคติค (lactic acid) *S.* Typhimurium สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่เป็นกรดได้ (acid-adapted strain) ในเนยแข็ง เช่น cheddar cheese, Swiss cheese และ mozzarella cheese เป็นต้น

วอเตอร์แอคติวิตี (water activity; a_w) ความหมายของวอเตอร์แอคติวิตี คือ ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหารและนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นวอเตอร์แอคติวิตีจึงมักจะมีค่าต่ำกว่าความชื้น(moisture)ในอาหารเสมอ เนื่องจากน้ำในอาหารบางส่วนจุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้เนื่องจากน้ำดังกล่าวอาจใช้สร้างพันธะทางเคมีรวมอยู่ในโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบต่างๆ ซึ่งเรียกว่าน้ำผูกพัน (bound water) ตัวอย่างเช่นน้ำเกลือหรือน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นสูง ๆ อาจจะมีค่าความชื้นหรือน้ำอยู่สูง แต่จะมีปริมาณวอเตอร์แอคติวิตีต่ำ เนื่องจากน้ำส่วนใหญ่จะไปจับรวมตัวกับโมเลกุลของเกลือหรือน้ำตาลจนแทบจะไม่เหลือน้ำอิสระ (free water) ให้แบคทีเรียนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ตามปกติ *Salmonella* สามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับ a_w ไม่ต่ำกว่า 0.93 ความเข้มของน้ำเกลือที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Salmonella ได้ คือที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3-4 การที่ *Salmonella* สามารถทนต่อความแห้งหรือ a_w ระดับต่ำๆได้จึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อม นอกร่างกายของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเชื่อว่า *Salmonella* อาศัยกลไกการสะสมสารอาหารบางอย่าง (compatible solutes หรือ osmolytes) ที่ทำให้ความเข้มของ electrolyes ภายในเซลล์เท่าเดิม แต่มีปริมาณน้ำในเซลล์ (cytoplasmic water) มากขึ้น เช่น glycine betain, praline และ glutamate

อากาศหรือออกซิเจน บทบาทสำคัญของอากาศที่กำหนดการอยู่รอดของแบคทีเรียที่สำคัญ คือ ออกซิเจน ซึ่งแบคทีเรียชนิดที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ไม่มีเอนไซม์ที่กำจัดพิษของออกซิเจน อันเป็นอุปสรรคต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ไวต่อออกซิเจนหากได้รับสัมผัสกับอากาศ แต่ *Salmonella* ไม่เป็นเช่นนั้นเพราะ *Salmonella* จำเป็นต้องอาศัยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย (final electron acceptor) ในกระบวนการถ่ายเทอิเลคตรอนเพื่อสร้างพลังงาน (ATP) ให้แก่เซลล์ *Salmonella* สามารถเจริญได้ไม่ว่าจะมีออกซิเจนหรือไม่ก็ตาม เนื่องจากสามารถสร้างพลังงานโดยอาศัยการหมัก (fermentation) ได้ด้วย กระนั้นก็ตามเหตุที่การสร้างพลังงานจากการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) มีประสิทธิผลสูงกว่าการสร้างพลังงานจากการหมัก (ไม่ใช้ออกซิเจน) ดังนั้นเมื่อมีออกซิเจน *Salmonella* จึงเลือกที่จะหายใจแบบใช้ออกซิเจนมากกว่า การที่ *Salmonella* สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ เป็นผลให้การเก็บรักษาเนื้อไก่หรือเนื้อปลาที่อุณหภูมิ 10 °C ในบรรจุภัณฑ์ที่ทำการบรรจุแบบสุญญากาศ (Vacuum packing) หรือดัดแปลงบรรยากาศ (modified atmosphere) ไม่ว่าจะใช้ CO_2 หรือ N_2 ในสัดส่วนเท่าใดก็ตาม *Salmonella* ก็ยังสามารถเจริญได้

แม้ว่า *Salmonella* spp. จะมีเอนไซม์ superoxide dismutase และ catalase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนออกซิเจนที่เป็นพิษ คือ superoxide radical (O_2^-) เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

(H_2O_2) และเปลี่ยน H_2O_2 เป็นออกซิเจนและน้ำได้ก็ตาม แต่ออกซิเจนที่เป็นพิษนี้ก็ยังสามารถก่อความ เสียหายขึ้นกับเซลล์ได้

ความเจ็บป่วยและอาการ

เมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีเชื้อ *Salmonella* เข้าไปในปริมาณที่สูงพอจะสามารถเกิดโรคขึ้นได้ โดยอาการของโรคจะมีความรุนแรงหรือระยะเวลานานเท่าใดนั้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อน จำนวนเซลล์ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายและสภาวะส่วนบุคคลของผู้ที่ได้รับเชื้อ ได้แก่ความแข็งแรง อายุ เป็นต้น โดยทั่วไปผู้ที่ได้รับเชื้อนี้เข้าสู่ร่างกายจะแสดงอาการภายใน 6-36 ชั่วโมง ซึ่งอาการของโรคมีตั้งแต่อาการเพียงเล็กน้อยที่สามารถหายเองได้ จนถึงระดับที่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล อาการที่เกิดขึ้นในคนนั้นสามารถจำแนกออกดังนี้

1. โรคอุจจาระร่วง (Gastroenteritis) หรือโรคอาหารเป็นพิษ เป็นอาการที่พบมากที่สุด ส่วนใหญ่เกิดจาก *S.* Typhimurium ซึ่งโดยปกติจะปนเปื้อนจากอาหารจำพวกสัตว์ปีก เช่น เป็ด ไก่ รวมถึงไข่ของสัตว์เหล่านี้ อาการของโรคนี้ เชื้อจะมีระยะฟักตัว 12-36 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการ อักเสบในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ และท้องร่วง จะมีอาการอยู่ 1-4 วัน ในช่วงที่มีอุจจาระร่วงจะพบเชื้อในอุจจาระของผู้ป่วยประมาณ 10^6-10^9 CFU/g

2. ไข้เอนเทอริค (Enteric fever) อาจหมายถึง ไข้ไทฟอยด์ หรือ พาราไทฟอยด์ เกิดจากเชื้อ *S.* Typhi, *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B (บางทีหมายถึง *S.* Schottmuleri) และ *S.* Paratyphi C (บางทีเรียกว่า *S.* Hirschfeldii) ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นต้นเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อขึ้นในมนุษย์โดยการบริโภคน้ำหรืออาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อเหล่านี้ เชื้อจะเข้าสู่กระเพาะอาหารและถูกกรดในกระเพาะอาหารทำลายไปบ้าง เชื้อที่รอดชีวิตได้จะเข้ามาถึงลำไส้เล็กเข้าสู่เนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid tissue) ของผนังลำไส้และต่อมน้ำเหลืองบริเวณนั้น เชื้อจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นและเริ่มเข้าสู่กระแสโลหิต ซึ่งจะมีเชื้อจำนวนหนึ่งที่ตาย และปล่อย endotoxin ออกมากระตุ้นเม็ดเลือดขาวทำให้เกิด endogenous pyrogen ทำให้เกิดไข้สูง นอกจากนี้ผู้ป่วยจะมีอาการปวดศีรษะ มีผื่นคัน มีจุดแดงที่ผิวของช่องท้อง อืดอัดภายในช่องท้อง มีอาการท้องผูก จะมีอาการอยู่ 1-3 สัปดาห์ การติดเชื้อในมนุษย์ส่วนใหญ่จะมีจำนวนเซลล์มากกว่า10^5 เซลล์

3. โลหิตเป็นพิษ (Septicemia) เป็นอาการที่เกิดจากเชื้อ *S.* Choleraesuis เชื้อจะเข้าสู่กระแสโลหิตโดยตรง ทำให้ระบบหมุนเวียนโลหิตทำงานผิดปกติ นอกจากนี้อาจพบการ

เปลี่ยนแปลงที่ระบบทางเดินอาหาร และเกิดติดเชื้อที่ระบบน้ำเหลือง มักพบมากในเด็ก และผู้ใหญ่ที่อายุมากกว่า 50 ปี โดยเฉพาะผู้ชาย ผู้ป่วยจะมีอาการอยู่หลายสัปดาห์

เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel)

เหล็กกล้าไร้สนิมซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า "สเตนแลส" เป็นเหล็กกล้าที่มีปริมาณคาร์บอนต่ำ และมีส่วนผสมของโครเมียมอย่างน้อยที่สุด 10.5% เนื่องจากเหล็กกล้าไร้สนิทจะมีแผ่นฟิล์มบางๆซึ่งสร้างขึ้นได้เองจากปฏิกิริยา เกิดเป็นชั้นบางๆเคลือบอยู่บนผิวเหล็ก ทำให้เหล็กสามารถต้านทานการเกิดสนิมจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation)ได้ และเมื่อเกิดรอยขีดข่วนหรือถูกสารเคมี ชั้นฟิล์มบางๆนี้จะสร้างขึ้นใหม่ได้เอง ซึ่งช่วยป้องกันการกัดกร่อน หรือ การเป็นสนิมที่เป็นผลมาจากปริมาณโครเมียมในเนื้อเหล็ก เหล็กกล้าไร้สนิมจึงแตกต่างจากเหล็กธรรมดาทั่วไปที่มีการป้องกันการกัดกร่อนด้วยการชุบ หรือเคลือบผิวด้วยไฟฟ้า เช่นสังกะสี หรือเคลือบผิวอินทรีย์สาร เช่น การเคลือบสี

เหล็กกล้าไร้สนิมเป็นวัสดุที่สมบูรณ์แบบสำหรับใช้ในครัวเรือนและอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีความทนทานต่อการกัดกร่อนสูง จึงไม่เป็นสนิมและไม่ทำปฏิกิริยากับกรดและเกลือที่มีอยู่ในอาหาร มีพื้นผิวที่เรียบและมีความเป็นกลางจึงไม่ดูดซึมรสใดๆ ทำความสะอาดได้ง่ายและถูกหลักอนามัยในทุกขั้นตอนการใช้ ทนความร้อน ความเย็น และการเปลี่ยนอุณหภูมิโดยฉับพลันได้ดี (Oliveira et al, 2007; Rossoni and Gaylarde 2000)

ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม

เหล็กกล้าไร้สนิมแบ่งออกเป็น 4 ชนิดหลัก

1. เกรดออสเตนิติก แม่เหล็กดูดไม่ติด นอกจากส่วนผสมของโครเมียม 18 % แล้วยังมีนิเกิลที่ช่วยเพิ่มความต้านทานการกัดกร่อน เหล็กชนิดนี้ผลิตได้ง่ายจึงเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง
2. เกรดเฟอร์ริติก แม่เหล็กดูดติด มีส่วนผสมของคาร์บอนต่ำ และมีโครเมียมเป็นส่วนผสมหลัก คือ ประมาณ 13% หรือ 17%
3. เกรดมาร์เทนซิติก แม่เหล็กดูดติด โดยทั่วไปจะเป็นโครเมียมผสมอยู่12% และมีส่วนผสมของคาร์บอนในระดับปานกลาง มักนำไปใช้ทำส้อม มีด เครื่องมือผ่าตัด และเครื่องมือวิศวกรอื่นๆ ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นในการต้านทานการสึกกร่อนและความแข็งแรงทนทาน
4. เกรดดูเพลกซ์ แม่เหล็กดูดติด มีโครงสร้างผสมระหว่างเฟอร์ไรต์และออสเตไนต์ มีโครเมียมผสมอยู่ประมาณ18-28% และนิกเกิล 4.5-8% เหล็กชนิดนี้มักถูกนำไปใช้งานที่มีคลอรีน

สูง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการกัดกร่อนแบบรูเข็ม (pitting corrosion) และช่วยเพิ่มความต้านทานการกัดกร่อนที่เป็นรอยร้าว อันเนื่องมาจากแรงกดดัน (Stress corrosion cracking resistance)

เหล็กกล้าไร้สนิมที่เราพบเห็นโดยทั่วไปจะอยู่ใน 3 ชนิดใหญ่ๆ โดยแบ่งตามชนิดและปริมาณโลหะที่ผสมลงไป ซึ่งเป็นตัวกำหนดโครงสร้างทางโลหะวิทยา ตลอดจนคุณสมบัติเชิงกล คุณสมบัติทางฟิสิกส์และความต้านทานการกัดกร่อน ซึ่งตารางที่ 2.5 ได้แสดงลักษณะชื่อมาตรฐานสากลของ stainless steel และส่วนประกอบโดยประมาณของ stainless steel

ตารางที่2.5 ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไป

ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม									
ชนิด	ชื่อมาตรฐานสากล					ส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไป			
	ไทยน๊อคซ์	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	304	304	1.4301	0.04	18.5	8.5	-
ออสเตนิติกผสมโมลิบดินัม	TNX LM 1811	SST 316L	316L	316L	1.4404	0.025	17.5	11.5	2.0

ที่มา: บริษัทไทยน๊อคซ์ (2006)

พื้นผิวของ Stainless steel

พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมมีให้เลือกมากมาย มีทั้งชนิดเงาเหมือนกระจก แบบด้าน แบบเรียบหรือขัดผิว (ตารางที่ 2.6) ซึ่งแต่ละพื้นผิวสามารถใช้ร่วมกับวัสดุอื่นหรือใช้พื้นผิวต่างชนิดกันในงานเดียวกัน ให้ภาพลักษณ์ทันสมัย สง่างาม นอกจากนั้น เหล็กกล้าไร้สนิมยังมีค่าความแข็งแรงสูง ทนแรงกระแทก รอยขีดข่วน หรือรอยเปื้อนต่างๆได้ดีและไม่แตกหัก

ตารางที่2.6 ชนิดของ Stainless steel

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: บริษัทไทยน็อคซ์ (2006)

เหล็กกล้าไร้สนิมรีดเย็นชนิดผิวบีเอ

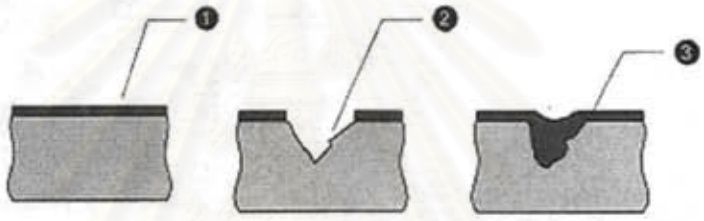
หลักการผลิตเหล็กกล้าไร้สนิมรีดเย็นชนิดผิวบีเอนั้น กล่าวคือพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมจะได้รับการปกป้องมิให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งทำให้เกิดการกัดกร่อนเป็นสนิมระหว่างผ่านกระบวนการอบขจัดออกไซด์ขั้นสุดท้าย กระบวนการรีดเย็นโดยเครื่องรีดเย็นเซนด์ซิเมียร์ จะทำให้แผ่นเหล็กมีพื้นผิวมันเงางาม อย่างไรก็ดี แรงกดซึ่งจำเป็นต่อการลดความหนาของเหล็กในระหว่างการรีดเย็นนั้นจะทำให้ม้วนเหล็กกล้าไร้สนิมแข็งเพิ่มมากขึ้น

เหล็กกล้าไร้สนิมรีดเย็นชนิดบีเอสามารถรักษาคุณสมบัติเชิงกล ซึ่งจะทำให้ลูกค้าสามารถนำเหล็กกล้าไร้สนิมไปประยุกต์ใช้ได้ในงานหลากหลาย เช่น ในการขึ้นรูปพิมพ์ลึก หรือในการขึ้นรูป จำเป็นต้องมีกระบวนการอบอ่อนโดยใช้อุณหภูมิสูงในเตาอบแอนนีลลิ่งก่อน

ในกระบวนการผลิตเหล็กกล้าไร้สนิมชนิดผิวบีเอนี้ การอบอ่อนจะต้องทำในภาวะแวดล้อมที่ปกคลุมด้วยไฮโดรเจนเพื่อป้องกันมิให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นบนพื้นผิว อีกทั้งยังคงความเงางามซึ่งมีเพียงผู้เชี่ยวชาญทางกระบวนการรีดเย็นจริงๆเท่านั้นที่สามารถทำได้

ความต้านทานการกัดกร่อน

โลหะทุกชนิดโดยทั่วไปจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นฟิล์มออกไซด์บนผิวโลหะหรือออกไซด์ที่เกิดบนผิวเหล็กทั่วไปจะทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์และทำให้สภาพพื้นผิวเหล็กผุกร่อน ที่เรียกว่า เป็นสนิม แต่เหล็กกล้าไร้สนิมมีโครเมียมผสมอยู่ 10.5% ขึ้นไป ทำให้คุณสมบัติของฟิล์มออกไซด์บนพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไป กลายเป็นฟิล์มปกป้องหรือ พาสซิฟเลเยอร์ (Passive layer) ที่เหมือนเกราะป้องกันการกัดกร่อน ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า พาสซิวิตี้ (passivity) ฟิล์มปกป้องจะมีความบางมาก และมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ฟิล์มนี้จะเกาะติดแน่นและทำหน้าที่ปกป้องเหล็กจากสารกัดกร่อนทั้งมวล หากนำไปผลิตแปรรูปหรือใช้งานในสภาพเหมาะสม เมื่อเกิดมีการขีดข่วนฟิล์มปกป้องนี้จะสร้างขึ้นใหม่ได้เองตลอดเวลา ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การเกิด Passive layer ของ stainless steel

ที่มา: http://www.thainox.co.th/steelfacts_what_thai.htm

การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ

โรงงานควรพิจารณาเลือกใช้การฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี (chemical disinfectants) ให้เหมาะสมสำหรับแต่ละส่วนงาน เนื่องจากสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิดมีจุดเด่นจุดด้อยแตกต่างกันไป สารฆ่าเชื้อที่ดีต้องมีคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษ ไม่ทำให้เกิดการสึกกร่อนของพื้นผิวที่ใช้ ไม่มีผลต่อกลิ่น รส และสีของอาหาร มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้หลายชนิด ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ ระยะเวลาในการสัมผัส ความสะอาดของพื้นผิว ความเป็นกรดด่าง (pH) ความกระด้างของน้ำ และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวที่จะทำความสะอาด

คลอรีนและสารประกอบคลอรีน

สมบัติของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน

คลอรีนเป็นธาตุหมู่ที่ 7 (Halogen) เมื่ออยู่ในรูปแก๊สมีสีเขียวแกมเหลือง แก๊สคลอรีนเริ่มใช้ครั้งแรกตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 18 เพื่อใช้เป็นสารฟอกสีในอุตสาหกรรมสิ่งทอ การที่นิยมใช้คลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด

นอกเหนือจากคลอรีนในรูปแก๊สแล้ว สารประกอบคลอรีนที่ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อมีหลายรูปแบบดังแสดงในตารางที่ 2.7 สารประกอบคลอรีนหลายชนิดนิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในน้ำประปาหรือฆ่าเชื้อในสระว่ายน้ำ คลอรีนจะทำลายเชื้อโรคในน้ำได้ดี เช่น *E. coli*, *S.* Typhimurium และ *Entamoeba histolytica* ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อของผิวหนังจากน้ำในสระว่ายน้ำ เป็นต้น

ตารางที่2.7 สารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆ

ชนิดของสาร	สูตรทางเคมี	คุณสมบัติการละลายน้ำที่อุณหภูมิ 70°F
Gaseous chlorine	Cl_2	0.70%
Hypochlorous acid	HOCl	ละลายได้ดีมาก
Sodium hypochlorite	NaOCl	ละลายได้ดีมาก
Calcium hypochlorite	$Ca(OCl)_2$	ละลายได้ปานกลาง
Chloramine-T	$H_3C\text{-}C_6H_4SO_2\text{-}N\text{-}NaCl$	15%
Dichlorodiethyl-hydantoin	$C_5H_6Cl_2N_2O_2$	1.20%
Trichlorocyanuric acid	$Cl_3(NCO)_3$	1.20%
Dichlorocyanuric acid	$Cl_2H(NCO)_3$	2.60%
Chlorine dioxide	ClO_2	200 cm^3 per 100 mL.

ที่มา: ดัดแปลงจาก รุ่งทิวา (2541)

ปัจจุบันมีการนำสารประกอบคลอรีนมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้เพื่อฆ่าเชื้อในแหล่งน้ำ ใช้ฆ่าเชื้อเครื่องมือ หรือ อุปกรณ์ที่มีพื้นผิวสัมผัสอาหาร ใช้ฉีดพ่นเครื่องมือระหว่างกระบวนการผลิตอาหารเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษาเป็นต้น

โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เป็นสารประกอบคลอรีนชนิดหนึ่ง มีสูตรทางเคมีคือ NaOCl โซเดียมไฮโปคลอไรท์อยู่ในรูปของสารละลาย เตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และคลอรีนในน้ำ เป็นกลุ่มของสารประกอบคลอรีนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุด เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ เกิดปฏิกิริยาได้เร็ว ทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิดและราคาถูก มีสมบัติฟอกสี แต่มีข้อเสียคือกัดกร่อนโลหะบางชนิด และประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ลดลงเมื่อมีสารอินทรีย์ปะปนในสารละลาย โดยเฉพาะเมื่อคลอรีนมีความเข้มข้นต่ำ ปัจจุบันใช้เป็นสารฟอกสี ฆ่าเชื้อโรคในแหล่งน้ำ และใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมนมและอาหารอย่างกว้างขวาง รวมทั้งอุตสาหกรรมแปรรูปผักและผลไม้

การเกิดปฏิกิริยาของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนในน้ำ

การใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อ นิยมเตรียมในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นคลอรีนอิสระตามที่ต้องการ โดยคลอรีนและสารประกอบคลอรีนทำปฏิกิริยากับน้ำได้กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ดังสมการ

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

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

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

$HOCl \longleftrightarrow OCl^-$

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน

ความเข้มข้น การที่คลอรีนและสารประกอบคลอรีนจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้มากน้อยเพียงใดนั้นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน ก็คือความเข้มข้น การเพิ่มความเข้มข้นของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน จะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของคลอรีนดีขึ้น

อุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน

pH ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความคงตัวของ hypochlorous acid ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน โดยทั่วไปเมื่อนำคลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนนี้มาละลายน้ำ จะทำให้เกิดการแตกตัวเป็นคลอรีนอิสระ ซึ่งอยู่ในรูปของ Cl_2, hypochlorous acid และ hypochlorite ion ซึ่งการแตกตัวให้ hypochlorous acid นั้น จะอยู่ในช่วง pH 4-5 แต่สำหรับโซเดียมไฮโปคลอไรท์นั้น มักจะถูกนำมาใช้ในช่วง pH 7-9 ทั้งนี้เนื่องจากที่ช่วง pH 4-5 จะมีความคงตัวน้อย

ปริมาณสารเจือปน การที่มีสารเจือปนต่างๆ กระจายตัวปนอยู่ในน้ำ สารเจือปนเหล่านี้จะเป็นสารอินทรีย์ หรืออนินทรีย์ต่างๆ การเพิ่มคลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนลงในที่มีสารเจือปนดังกล่าวจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลดลง โดยสารอินทรีย์หรือ อนินทรีย์เหล่านี้จะเปรียบเสมือนเป็นเกราะที่ช่วยป้องกันจุลินทรีย์ให้พ้นจากปฏิกิริยาของคลอรีนโดยพบว่าการเติมคลอรีนลงในน้ำที่มีตะกอน จะพบจำนวนแบคทีเรียมากกว่าน้ำที่ไม่มีตะกอน

ระยะเวลาสัมผัส (Exposure time) เมื่อคลอรีนสัมผัสกับเซลล์จุลินทรีย์ เซลล์จะถูกทำลายมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคลอรีนและระยะเวลาที่ให้คลอรีนสัมผัสเซลล์

ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น อัตราการทำลายโดยคลอรีนมีค่าต่ำเมื่อมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหารปริมาณสูง หากจุลินทรีย์เริ่มต้นในอาหารมีปริมาณต่ำ อัตราการทำลายเซลล์โดยสารฆ่าเชื้อจะเร็ว นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีสมบัติต้านทานต่อการทำลายของสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน

ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของโซเดียมไฮโปคลอไรท์

โซเดียมไฮโปคลอไรท์จัดเป็นสารประกอบคลอรีนชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆจัดเป็นสารที่มีเสถียรภาพดี ในทางการค้าจะมีการจำหน่ายสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นของคลอรีนที่ใช้ได้ (Available Chlorite) 10% หรือ 100,000 ppm (parts per millionหรือส่วนในล้านส่วน) แต่ในการทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการ เครื่องจักรและอุปกรณ์ต่างๆ จะนิยมใช้ความเข้มข้นประมาณ 100-200 ppm แต่บริเวณที่สกปรกมากๆ หรือในโรงพยาบาลที่อาจมีเชื้ออันตรายอาจใช้ถึง 1,000 ppm หรือมากกว่าก็ได้ ที่ระดับความเข้มข้น 50-300 ppm มีpH อยู่ในช่วง 7-9 ที่ pH 5 จะมีความคงตัวน้อยลง โซเดียมไฮโปคลอไรท์นี้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆรวมไปถึงสปอร์และไวรัสได้เป็นอย่างดีทั้งยังไม่ก่อให้เกิดฟอง และมีราคาไม่สูงนัก ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย สารไฮโปคลอไรท์เป็นสารประกอบที่มีประจุลบ จึงไม่

ควรใช้ร่วมกับสารชะล้างหรือสารทำความสะอาด (Detergent) ที่มีประจุบวก นอกจากนี้ยังไม่ควรผสมไฮโปคลอไรท์ในสารทำความสะอาดที่มีฤทธิ์เป็นกรด เพราะจะทำให้เกิดก๊าซคลอรีนซึ่งเป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจของผู้ปฏิบัติงานเมื่อสูดดมเข้าไป นอกจากนี้โซเดียมไฮโปรคลอไรท์ซึ่งเป็นสารประกอบคลอรีนมีสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ใน 3 ตำแหน่ง ดังต่อไปนี้

ส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มสปอร์ ซึ่งส่วนของผนังเซลล์นั้นสารประกอบคลอรีนสามารถทำลายแบคทีเรียได้โดยการเกิดปฏิกิริยาของคลอรีนกับโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการสร้างสารประกอบ N-chloro ซึ่งไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ ทำให้คุณสมบัติการควบคุมการผ่านเข้าออกของเซลล์สูญเสียไป และสารประกอบคลอรีนมีคุณสมบัติทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารอาหารได้ การที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายนี้ จะทำให้ไม่สามารถรับสารอาหารได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน หรือสารอาหารที่จะเป็นในการดำรงชีพเข้าสู่เซลล์ได้ เมื่อเซลล์ขาดสารอาหาร จะทำให้การเจริญของจุลินทรีย์หยุดลงและตายในที่สุด

ส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ (Protoplasm) พบว่าสารประกอบคลอรีนจะไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับส่วนโปโตพลาสมของเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนที่เป็นโปรตีน โดยจะไปตกตะกอนส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์ สารประกอบคลอรีนจะทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลโฟดริล (sulhydryl) ของโปรตีน เกิดการรบกวนการทำงานของเซลล์

ส่วนที่เป็นเอนไซม์ สารประกอบคลอรีนรบกวนการทำงานของเอนไซม์และยังสามารถทำลายเอนไซม์ได้อีกด้วย เอนไซม์โดยส่วนใหญ่นั้นเป็นโปรตีน สารประกอบคลอรีนที่เข้าไปในเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือเกิดการรวมตัวของเอนไซม์ ทำให้ระบบการทำงานของเอนไซม์เสียไป เอนไซม์หลายชนิดที่ได้รับผลกระทบจากคลอรีนได้แก่ Triosephosphate dehydrogenase, glucose oxidase, D-amino acid oxidase, Transaminase, succinic oxidase เป็นต้น

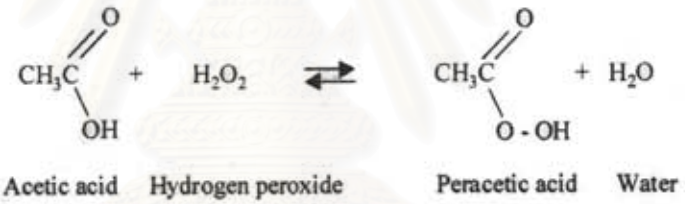
กรดเปอร์ออกซีแอซีติก (Peroxyacetic acid)

กรดเปอร์ออกซีแอซีติก คือ เปอร์ออกไซด์ของกรดแอซีติก มีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง (Fatemi and Frank, 1999) ละลายน้ำได้ดี และที่ความเข้มข้นสูงมีกลิ่นฉุน โดยทั่วไปมีสารให้ความคงตัวผสมอยู่ด้วย ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง และเมื่อมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้ว สารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อดีกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีสารอินทรีย์

ปะปนอยู่ นอกจากนี้แล้วสารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกไม่ทำปฏิกิริยากับ คะตะเลส และเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แตกต่างจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Kunigk and Almeida, 2001)

กรดเปอร์ออกซีแอซีติกสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้โดยการรบกวนพันธะซัลไฮดริลและซัลเฟอร์ในโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ โดยทำหน้าที่เป็นสารออกซิไดส์ นอกจากนั้นยังสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ นอกจากนี้กรดเปอร์ออกซีแอซีติกยังสามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพ ขัดขวางการขนส่งของผนังเซลล์ ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ สามารถรบกวนการเข้าออกที่เยื่อหุ้มเซลล์ จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด

เมื่อสารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกสลายตัว จะได้น้ำ ออกซิเจน และกรดแอซีติก ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษในอาหารและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดโฟมและสารประกอบฟอสเฟต ไม่มีคุณสมบัติในการกัดกร่อนสแตนเลส อลูมิเนียม รวมถึงดีบุก กรดเปอร์ออกซีแอซีติก สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในน้ำกระด้าง และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ



รูปที่2.3 สมการการแตกตัวของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

จุลินทรีย์ทดสอบ

เชื้อบริสุทธิ์ *Salmonella* Anatum DMST 17362 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

พื้นผิวทดสอบ

Stainless steel ชนิด 304 No. 2B

Stainless steel ชนิด 316L No. 2B

Stainless steel ชนิด 430 No. 2B

Stainless steel ชนิด 304 No. BA

ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยน๊อคสตีล จำกัด (มหาชน)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Trypticase Soy Broth (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Nutrient Agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Agar-agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Xylose lysine deoxycholate agar (Difco, France)

Shigella-Salmonella agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Triple Sugar Iron agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Lysine iron agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

สารเคมี

Sodium thiosulfate-pentahydrate ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)	AR grade
Sodium chlorine (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)

Proxitane®5:20 (Peroxyacetic acid: POA) (PeroxyThai, Thailand)

น้ำมันกานพลู (Clove oil) (บริษัทศรีจันทร์สหโอสถ จำกัด)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert รุ่น 600, Germany)

เตาให้ความร้อน (Hot plate) (Framo®-Gerätetechnik รุ่น M 21/1)

เครื่อง Spectrophotometer (JAS.CO รุ่น V-530, Japan)

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 VX100, USA)

เครื่อง Autoclave (TOMY Autoclave รุ่น SS-320, Japan)

เครื่อง Autoclave (SANYO Labo Autoclave รุ่น MLS-2400, Japan)

เครื่อง Water bath shaker (GFL รุ่น 1083)

ตู้บ่มเพาะเชื้อ Incubator (Heraeus instruments รุ่น B6)

ตู้บ่มเพาะเชื้อ Incubator (Memmert รุ่น500, Germany)

ตู้บ่มเพาะเชื้อ Incubator shaker (Memmert รุ่น LINE-LAB, Germany)

เครื่องCentrifuge (Zentrifugen รุ่น 40G257)

เครื่อง Colony counters (Suntex, Taiwan)

ตู้ Laminar flow cabinet (BVT-123, Thailand)

เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็น

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การตรวจสอบความขรุขระของพื้นผิวทดสอบ

3.1.1 หาค่าความขรุขระของพื้นผิวทดสอบทุกชนิด ได้แก่ stainless steel เกรด 304 316L และ 430 และ stainless steel พื้นผิว 2B และ BA ด้วยวิธี Mitutoyo Oldmix Standard โดยใช้เครื่อง surface roughness tester: SV-3000 ซึ่งพื้นผิวทดสอบทั้งหมดจะทำการหาค่าความขรุขระของพื้นผิวตามแนวขวางรอยรีดและตามรอยแนวรีด ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซึ่งตัวอย่างพื้นผิวทดสอบทั้งหมดทำการทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 หาค่าความขรุขระของพื้นผิวทดสอบทุกชนิด ได้แก่ stainless steel เกรด 304 316L และ 430 และ stainless steel พื้นผิว 2B และ BA ด้วยวิธี Atomic Force Microscopy (AFM) โดยใช้เครื่อง SPM: multimode Nanoscopo IV ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดทำการทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3 ทดสอบความขรุขระของพื้นผิวทดสอบทุกชนิด ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) ถ่ายภาพผิวหน้าของ stainless steel ทุกชนิด ได้แก่ stainless steel เกรด 304 316L และ 430 และ stainless steel พื้นผิว 2B และ BA โดยใช้เครื่อง SEM: JSM-5410LV ตัวอย่างทั้งหมดทำการทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การเตรียมเซลล์ *Salmonella* Anatum และการนับจำนวนเซลล์

3.2.1 การเตรียมเซลล์ *S.* Anatum

เตรียมเซลล์แบคทีเรียจากแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Agar (NA) เอียงในหลอดทดลอง (slant) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C โดยถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) 20 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (28±1°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกตะกอนเซลล์ออกโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28±1°C) เก็บส่วนตะกอนเซลล์ มา re-suspension ด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร และปรับให้ได้ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.3 จะได้เชื้อเริ่มต้นที่ 9 log CFU/mL จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาละลายใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ตามความเข้มข้นของปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่ต้องการ โดยเจือจางตะกอนเซลล์ใน 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นประมาณ 9 log CFU/mL สำหรับการทดสอบปริมาณเชื้อตั้งต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) ส่วนในการทดสอบปริมาณเชื้อตั้งต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) นั้น เจือจางให้มีความเข้มข้นของตะกอนเซลล์ใน 0.85% NaCl ประมาณ 4 log CFU/mL ตรวจนับปริมาณเซลล์ในอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 3.2.2 จากนั้นนำไปทดสอบการเกิดไบโอฟิล์มและประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อต่อไป

3.2.2 การนับปริมาณเซลล์ *S.* Anatum

ตรวจนับปริมาณเซลล์เริ่มต้นของแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate technique โดยปิเปตเชื้อเริ่มต้น 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองซึ่งมี 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี คำนวณหาปริมาณ *Salmonella* ทั้งหมดในสารละลาย 1 มิลลิลิตร ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.3 การเกาะติดและการเกิดเป็นไบโอฟิล์ม

3.3.1 การเตรียมพื้นผิวทดสอบ

เตรียมพื้นผิว stainless steel ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ stainless steel เกรด 304 316L และ 430 และ stainless steel พื้นผิว 2B และ BA โดยเตรียมพื้นผิวทดสอบให้มีขนาด

1× 5 เซนติเมตร (ความหนาของแผ่นพื้นผิวทดสอบ 1 มิลลิเมตร โดยประมาณ) และนำมาทำความสะอาดโดยดัดแปลงวิธีของ Rivas, Dykes และ Fegan (2007) โดยการแช่แผ่นสเตนเลสสตีลในอะซีโตน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นแช่ใน alkaline detergent ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง ก่อนนำเข้าฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ121°C เวลา 15 นาที

3.3.2 การทดสอบการเกาะติด (Attachment) ของ *Salmonella*

ปิเปตสารละลายเซลล์ที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.2.1 ซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์ 9 log CFU/mL ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นพื้นผิวทดสอบแต่ละแผ่นที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.3.1 ใส่ลงในหลอดดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±1°C) โดยแปรเวลาในการแช่เป็นเวลา 0 ถึง 120 นาที เพื่อทดสอบการเกาะติดของ Salmonella เมื่อครบตามเวลาจึงนำแผ่นพื้นผิวทดสอบมาล้างด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบออก แล้วนับปริมาณเซลล์ที่เกาะติดตามวิธีในข้อ 3.4 ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น สำหรับความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ที่ 3 log CFU/mL ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น

3.3.3 การสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm formation)

ปิเปตสารละลายเซลล์ที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้น 9 log CFU/ml ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นทดสอบแต่ละชนิด ๆ ละ 1 แผ่นที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.3.1 ใส่ลงในหลอดดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±1°C) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างเซลล์ส่วนเกินออกด้วย 0.85%NaCl ปลอดเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงนำแผ่นสเตนเลสไปใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ที่ปลอดเชื้อและมีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นพื้นผิวทดสอบมาล้างด้วย 0.85%NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ส่วนเกินออก แล้วตรวจนับปริมาณ Salmonella ที่อยู่บนแผ่นสเตนเลสทดสอบ ตามวิธีในข้อ 3.4 ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น สำหรับการเกิดไบโอฟิล์มเมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ 3 log CFU/mL ทำการทดลองเช่นเดียวกับการที่กล่าวข้างต้น

3.3.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดไบโอฟิล์ม

3.3.4.1 ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel ทดสอบที่มีเกรด และ พื้นผิว (finish) แตกต่างกัน โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 แต่เปลี่ยนชนิดของแผ่นทดสอบจากเกรด 304 เป็นเกรด 316L และ 430 และเปลี่ยนพื้นผิว (finish) จาก 2B เป็น BA ตามลำดับ โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.3.4.2 ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum บนแผ่นทดสอบในสภาวะที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 15 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.3.4.3 ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum บนแผ่นทดสอบที่มีแหล่งของสารอาหารแตกต่างกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 แต่เปลี่ยนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก TSB เป็น 0.85% NaCl และ TSB ที่ผสม D-glucose เข้มข้นร้อยละ1 โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่ 8 log CFU/mL ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.3.4.4 ศึกษาการอยู่รอดของเซลล์ *S.* Anatum บนแผ่นทดสอบ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 แต่หลังจากมีการเกาะติดของเชื้อบนแผ่นทดสอบแล้ว ย้ายแผ่นทดสอบดังกล่าวใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ ขนาด 50 มิลลิลิตรที่ปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วตรวจนับปริมาณ *Salmonella* ที่อยู่บนแผ่นทดสอบ ตามวิธีในข้อ 3.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.4 การตรวจวิเคราะห์การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวทดสอบ

3.4.1 Spread plate technique

นับปริมาณการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* บนแผ่นทดสอบ โดยนำแผ่นทดสอบที่เกิดการเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์ม ด้วยการใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อกวาดบนพื้นผิว ทดสอบขนาดพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร นำไม้พันสำลีไปใส่ใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 1 นาที นำสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ทำให้สามารถตรวจนับเชื้อได้ในช่วง 30-300 โคโลนี และปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธี spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และคำนวณหาปริมาณเชื้อทั้งหมดต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.4.2 ATP bioluminescence

เป็นวิธีการที่รวดเร็วในการตรวจสอบการเกาะติดและการเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ *Salmonella* โดยวัดปริมาณ ATP จากเซลล์ของ *Salmonella* บนพื้นผิวทดสอบ ด้วยเครื่องวัดพลังงาน ATP (Hylite®2: Merck) วิธีใช้ตามคำแนะนำของผู้ผลิต เปรียบเทียบกับวิธี Spread plate technique ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.5 ประเมินผลการเกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* บนพื้นผิวทดสอบด้วย SEM

การประเมินผลการเกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* บนพื้นผิวทดสอบทุกชนิด ด้วย Scanning Electron Microcropic (SEM) โดยใช้พื้นผิวทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ส่วนเกินออกด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำตัวอย่างทั้งหมดแช่ใน glutaraldehyde (เพื่อตรึงเซลล์ไม่ให้แบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน) และทำการส่งตัวอย่างตรวจที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์และไบโอฟิล์มของ *Salmonella*

3.6.1 การเตรียมสารฆ่าเชื้อ

สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite: NaOCl) โดยมี active chlorine 6-14% และกรดเปอร์รอกซีแอซิติก (peroxyacetic acid: POA) หรือชื่อทางการค้าว่า Proxitane® ความเข้มข้น 5% วิธีการเตรียมตามแสดงในภาคผนวก ข

3.6.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และกรดเปอร์อะซิติก เพื่อลดปริมาณเซลล์ของ *S. Anatum* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดที่มีปริมาณสารอินทรีย์แตกต่างกัน ได้แก่ 0.85% NaCl และอาหารเลี้ยงเชื้อTSB โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูงเท่ากับ 8 log CFU/mL ในการทดสอบประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ กำหนดความเข้มข้นที่ 100 200 และ400 ppm กรดเปอร์อะซีติกทดสอบที่ความเข้มข้น 25 50 และ100 ppm

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณเชื้อ โดยนำสารละลายฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ ใส่ในหลอดปลอดเชื้อ ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 9 มิลลิลิตรต่อ 1 หลอด ปิเปตสารละลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เตรียมขึ้นตามวิธีข้างต้น 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดจะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นลดลง 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) ส่วนกรดเปอร์อะซีติกจะยับยั้งค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH7.2 ก่อนนำไปทำการ serial dilution และตรวจนับเชื้อตามวิธีในข้อ 3.7 ในแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

3.6.3 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

สร้างไบโอฟิล์มตามวิธีข้อ 3.3.3 บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ชนิด 304/2B นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ โดยปิเปตสารฆ่าเชื้อตามความเข้มข้นเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2 จำนวน 30 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นพื้นผิวทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แช่ในสารฆ่าเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 0 1 5 10 20 และ30 นาที ทดสอบที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (28±1°C) เมื่อครบเวลาที่กำหนดใช่ปากคีบปลอดเชื้อ คีบแผ่นทดสอบล้างด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 เข้มข้น 0.5% (sodium thoisulphate in phosphate buffer) (ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็นSodium hypochlorite ส่วนในกรณีของ Proxitane® จะใช้ PBS) 2 ครั้งๆ ละ 10 วินาที จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ เช็ดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว แล้วนำมาตรวจนับเชื้อตามวิธีในข้อ 3.7 ในแต่ละการทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.7 การตรวจนับปริมาณ *Salmonella* ที่เหลือรอดชีวิตด้วยวิธี spread plate technique

การตรวจนับปริมาณ *Salmonella* ที่เหลือรอดชีวิต ทำได้ด้วยการปิเปตสารแขวนลอยเชื้อ มา 1 มิลลิลิตร แล้วใส่ในสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 เข้มข้น 0.5% (ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็น sodium hypochlorite ส่วนในกรณีของ Proxitane® จะใช้ PBS) ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางจนได้ระดับที่เหมาะสมแล้วจึงปิเปตสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ด้วยวิธี spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่เหลือรอดชีวิต

ส่วนกรณีของไบโอฟิล์มใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อกวาดเช็ดลงบนพื้นผิวทดสอบขนาด ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร นำไม้พันสำลีไปใส่ในสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 เข้มข้น 0.5% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร(ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็น sodium hypochlorite ส่วนในกรณีของ Proxitane® จะใช้ PBS) แล้วปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 1 นาที นำสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ต้องการ และปิเปตสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ด้วยวิธี spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตทั้งหมดต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ ต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณ available chlorine (Iodometric Method)

นำตัวอย่างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm ที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณคลอรีนประมาณ 150 mL ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL เติม glacial acetic acid เพื่อให้สารละลายมีค่า pH อยู่ระหว่าง 3-4 แล้วเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ประมาณ 1 g แล้วเขย่า ถ้าสารละลายมีสีเหลืองให้ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.01 N (ตามภาคผนวก จ) ทันที ในที่ที่ไม่มีแสงจ้า จนเป็นสีเหลืองจาง จึงเติมน้ำแป้งลงไป 1 mL สารละลายจะมีสีน้ำเงินให้ไตเตรตต่อจนสีน้ำเงินจางหายไป จดบันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต

สำหรับสารละลายที่เป็น Blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง การคำนวณหา Available chlorine สามารถคำนวณได้จากสูตร

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

V_1 = ปริมาตร (mL) ของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตร (mL) ของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต blank

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มัลของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

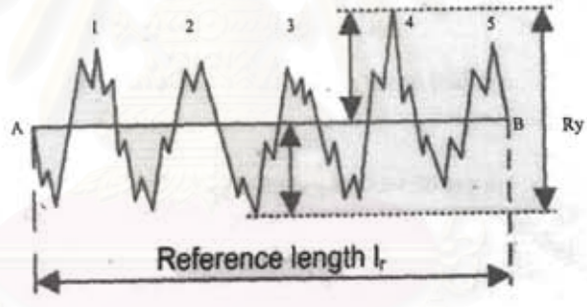
บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิว stainless steel

4.1.1 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวทดสอบด้วยเครื่อง Surface roughness tester

การวิเคราะห์พื้นผิวทดสอบด้วยวิธี Mitutoyo Oldmix Standard ด้วยเครื่อง surface roughness tester: SV-3000 โดยใช้เข็มขนาดเล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1μm ลากผ่านพื้นผิวทดสอบทั้งตามแนวขวางรอยรีด และตามแนวรอยรีด เป็นระยะทาง 15 มิลลิเมตร ด้วยความเร็ว 0.1 มิลลิเมตร/วินาที ทำให้ได้กราฟเกิดขึ้นดังแสดงในภาคผนวก ช และรูปที่ 4.1 และทำให้ทราบค่าต่างๆดังตารางที่ 4.1 และ 4.2



รูปที่4.1 กราฟที่เกิดจากการใช้เข็มขนาดเล็ก (1μm) ลากไปบนพื้นผิวของ Stainless steel

ตารางที่ 4.1 ตรวจวัดความขรุขระของพื้นผิวทดสอบตามแนวรอยรีด ด้วยเครื่อง surface roughness tester: SV-3000

ชนิดของ Stainless steel	Parameter (μm)		
	R_a^*	R_y^{**}	R_z^{***}
304/2B	0.126±0.007	1.628±0.120	1.243±0.051
316L/2B	0.143±0.007	1.592±0.111	1.255±0.075
430/2B	0.091±0.003	0.992±0.112	0.769±0.052
304/BA	0.022±0.000	0.417±0.035	0.274±0.018

ตารางที่ 4.2 ตรวจวัดความขรุขระของพื้นผิวทดสอบตามแนวขวางรอยรีด ด้วยเครื่อง surface roughness tester: SV-3000

ชนิดของ Stainless steel	Parameter (μm)		
	$R_a^{\cdot}$	$R_y^{\cdot\cdot}$	$R_z^{\cdot\cdot\cdot}$
304/2B	0.138±0.002	1.689±0.141	1.379±0.082
316L/2B	0.163±0.009	1.960±0.175	1.470±0.134
430/2B	0.139±0.006	1.534±0.103	1.121±0.026
304/BA	0.020±0.001	0.384±0.038	0.227±0.018

โดย ค่า $^{\cdot}R_a$ คือ ค่าเฉลี่ยความขรุขระของพื้นผิวทั้งหมดที่วัดได้ (R_a: the integral of the absolute value of the roughness profile height over the evaluation length)

$^{\cdot\cdot}R_y$ คือ ค่าเฉลี่ยความขรุขระของพื้นผิวค่าวัดได้จากยอด ถึงจุดที่ลึกที่สุดของพื้นผิว แบ่งออกเป็น 5 ช่วง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (R_y is the maximum peak to lowest valley vertical distance within a single length, for a standard five cutoff trace there are five different values of R_y)

$^{\cdot\cdot\cdot}R_z$ คือ ผลรวมของค่าที่วัดได้จากยอด peak ที่สูงที่สุดบวกกับ peak ที่ลึกที่สุดของพื้นผิว ภายใน Reference length (Rz is the sum of the height of the highest peak plus the lowest valley depth within a sampling length)

จากการวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวทดสอบทำให้ได้ค่าความขรุขระของพื้นผิวดังแสดงในตารางที่ 4.1และ 4.2 ซึ่งจะเห็นได้ว่า การตรวจวัดความขรุขระตามแนวขวางรอยรีดและตามแนวรอยรีดมีค่าใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นเมื่อใช้ค่า R_a เป็นตัวระบุความขรุขระของพื้นผิว stainless steel จะเห็นได้ว่า stainless steel ชนิด 316L/2B จะขรุขระมากที่สุด มีค่า 0.143±0.007 และ 0.163±0.009 μm เมื่อตรวจวัดตามแนวรอยรีด และขวางแนวรีด ตามลำดับ ในขณะที่ stainless steel 304/2B และ 430/2B มีความขรุขระของพื้นผิวไม่แตกต่างกันคือมีค่า 0.138±0.002 และ 0.139±0.006 μm ตามลำดับ เมื่อตรวจวัดตามแนวขวางรอยรีด แต่ถ้าตรวจวัดตามแนวรอยรีด พบว่าค่าที่ได้แตกต่างกันคือมีค่า 0.126±0.007 และ 0.091±0.003 μm ตามลำดับ และ stainless steel 304/BA จะขรุขระน้อยที่สุด คือมีค่า 0.022±0.000 และ 0.020±0.001 μm ตามลำดับ หรืออาจกล่าวได้ว่ามีความเรียบมากที่สุด และถ้าใช้ ค่า R_z เป็นตัว

ระบุความขรุขระของพื้นผิว stainless steel จากตารางที่ 4.1 และ 4.2 จะเห็นว่า stainless steel 316L/2B มีความหยาบหรือความขรุขระมากที่สุด รองลงมาคือ stainless steel 304/2B และ 430/2B ตามลำดับ ส่วน 304/BA มีความเรียบมากที่สุด

4.1.2 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวทดสอบด้วยวิธี Atomic Force Microscopy

เมื่อทำการวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวทดสอบด้วย Atomic force microscopy (AFM) ด้วยเครื่อง scanning probe microscope (SPM) ทำให้ได้ค่าต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่4.3 ตรวจวัดความขรุขระด้วยวิธี Atomic force microscopy (AFM)

ชนิดของ Stainless steel	Parameter (nm)			Srf. Aera (μm^2)
	$R_{ms}(R_q)$	R_a	R_{max}	
304/2B	50.752	37.952	428.69	27.109
316L/2B	64.888	43.957	506.24	26.554
430/2B	23.588	16.875	319.43	26.851
304/BA	8.138	6.167	71.515	25.320

จากตารางที่ 4.3 เมื่อใช้ค่า R_{ms}, R_a และ R_{max} เป็นตัวระบุความขรุขระของพื้นผิว stainless steel จะเห็นว่า จะให้ค่าลักษณะความเรียบความขรุขระเช่นเดียวกับการใช้ค่า R_a และR_z จากวิธี surface roughness นั่นคือ stainless steel 316L/2B มีความขรุขระมากที่สุด รองลงมาคือ 304/2B 430/2B และ 304/BA ตามลำดับ

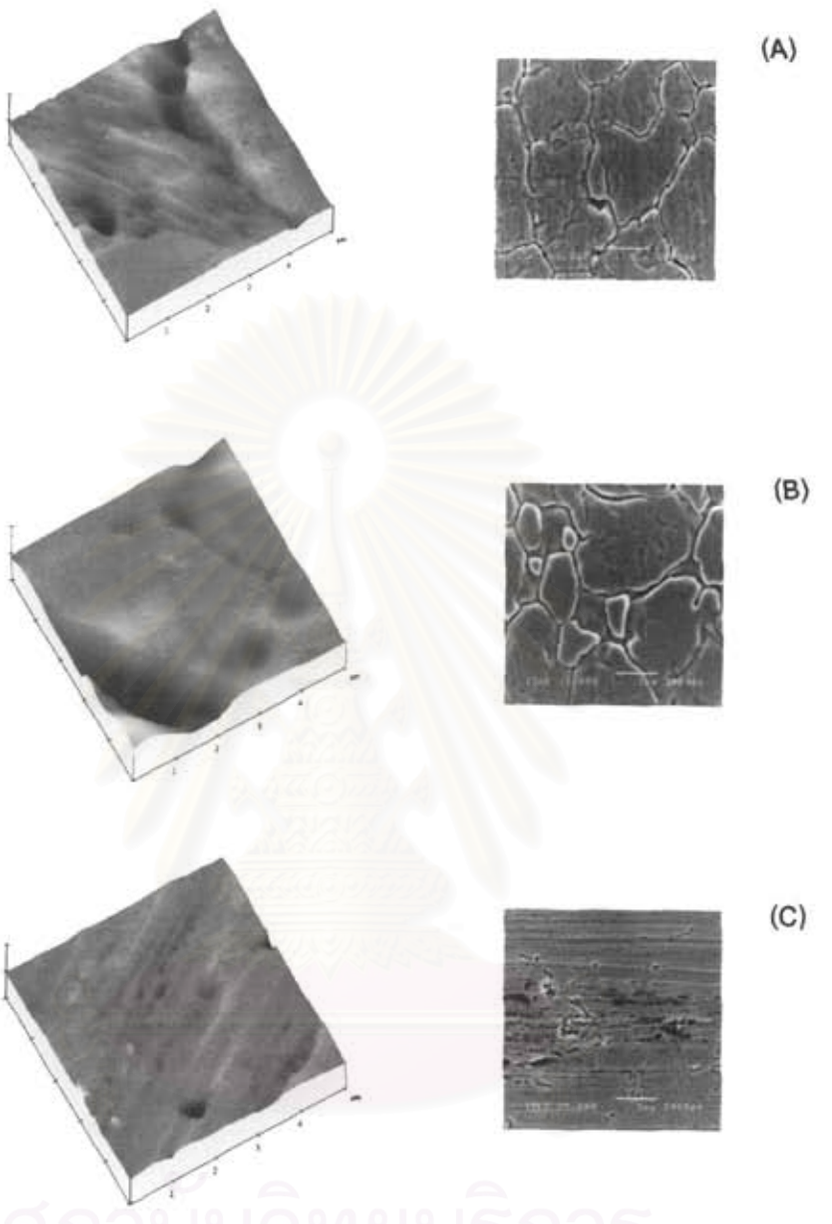
สาเหตุที่วิธี Surface roughness ไม่สามารถใช้ค่า R_y เป็นตัวระบุความเรียบความขรุขระได้ เนื่องจากในการวิเคราะห์แต่ละครั้งเข็มที่ลากลงบนพื้นผิว stainless steel อาจจะลากไปสัมผัสกับบริเวณที่มีความขรุขระมากกว่าบริเวณอื่นๆ ซึ่งไม่ใช่บริเวณที่เป็นตัวแทนของพื้นผิว stainless steel ที่ดี ทำให้ได้แตกต่างจากความเป็นจริง จากเอกสารเผยแพร่ของบริษัทไทยน๊อคซ์ ได้ระบุค่า roughness ของ stainless steel ชนิดต่างๆ ไว้ คือ stainless steel ชนิด 2B จะมีค่า roughness ประมาณ 0.03-0.2 ไมครอน และ stainless steel ชนิด BA จะมีค่า 0.02-0.06 ไมครอน ซึ่งตรงกับค่าที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองครั้งนี้

ความเรียบความขรุขระของพื้นผิว Stainless steel นั้นเกิดจากขั้นตอนการผลิตตั้งเริ่มแรกจนถึงกระบวนการรีดออกมาเป็นแผ่น ไม่ว่าจะเป็นการรีดร้อน หรือรีดเย็น ซึ่งบางครั้งอาจมีการปรับแต่งผิวหน้าเพื่อให้เหมาะสมกับลักษณะงานที่ใช้ ซึ่งค่าความเรียบความขรุขระไม่สามารถกำหนดได้ ดังนั้นถึงแม้จะเป็น stainless steel ชนิดหรือ เกรด หรือ พื้นผิวเดียวกัน การผลิตแต่ละครั้งค่าความเรียบความขรุขระก็อาจจะไม่เท่ากัน ดังนั้นการซื้อขาย stainless steel ในท้องตลาดจะนิยมระบุการซื้อขายเป็น เกรด และพื้นผิว เป็นส่วนใหญ่

วิธี AFM นอกจากจะให้ค่าต่างๆที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังสามารถวิเคราะห์ออกมาเป็นรูปภาพได้ รูปภาพที่วิเคราะห์ออกมานั้นจะเป็นภาพสามมิติ (3-D) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากภาพแล้วจะสามารถบอกได้ว่าพื้นผิว stainless steel ชนิดใดมีความเรียบหรือความขรุขระมากกว่ากัน โดยใช้แถบสีที่มีสเกลบอกความขรุขระของพื้นผิวระบุไว้ดังแสดงในรูปที่ 4.2

รูปที่4.2 สเกลบอกความเรียบ ความขรุขระ ของ Stainless steel ด้วยวิธี AFM

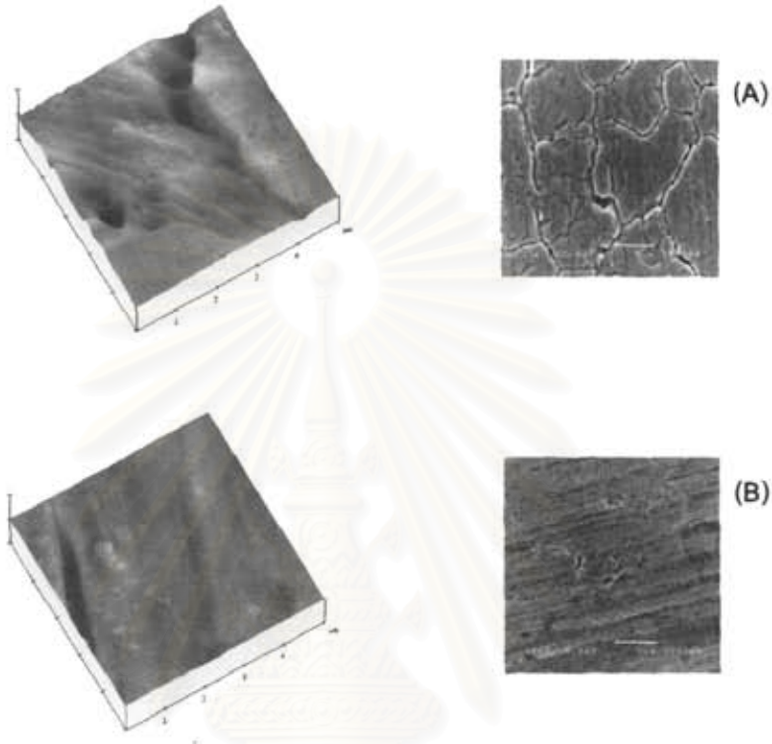
จากรูปที่ 4.3 เป็นการเปรียบเทียบรูปภาพที่ได้จากการวิเคราะห์ ด้วยวิธี SEM และ AFM โดยรูปทางซ้ายมือ เป็นรูปที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย AFM มีลักษณะเป็นภาพสามมิติ มองเห็นความเรียบความขรุขระได้อย่างชัดเจน ส่วนทางขวามือเป็นรูปภาพที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM มีลักษณะเป็นภาพสองมิติ ซึ่งจะเห็นรอยแตกบนผิวหน้าของ stainless steel ได้อย่างชัดเจนเช่นกัน



รูปที่ 4.3 ลักษณะพื้นผิวของ stainless steel เกรดต่างๆ เมื่อตรวจด้วยวิธี AFM และ SEM
A) stainless steel 304/2B B) stainless steel 316L/2B และ C) stainless steel 430/2B

จากรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า รูป A ทางซ้ายมือ (AFM) พื้นผิวมีความขรุขระค่อนข้างมาก เนื่องจากมีร่องและหลุมเป็นจำนวนมาก เมื่อเทียบสีกับสเกล (รูปที่ 4.2) แล้ว พบว่าหลุมไม่ลึกมากนัก และเมื่อดูรูปทางขวามือ (SEM) จะเห็นไปในทิศทางเหมือนกัน คือ ผิวหน้าค่อนข้างขรุขระและช่องรอยแตกของพื้นผิวอยู่ห่างกัน นั่นอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเข็มที่ใช้ในการวิเคราะห์ลากผ่านพื้นผิวชนิดนี้อาจจะไม่สัมผัสรอยแยกดังกล่าว จึงทำให้ค่าที่ตรวจวัดได้มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง

ในขณะที่รูป B ซ้ายมือ พื้นผิวหน้าค่อนข้างเรียบแต่มีหลุมลึก เมื่อเทียบกับสเกลสี ส่วนรูปขวามือ (SEM) ช่องรอยแตก ค่อนข้างอยู่ใกล้ชิดกัน และสุดท้ายรูป C พื้นผิวค่อนข้างเรียบ มีร่องน้อย และมีหลุมอยู่บ้างแต่ไม่ลึก

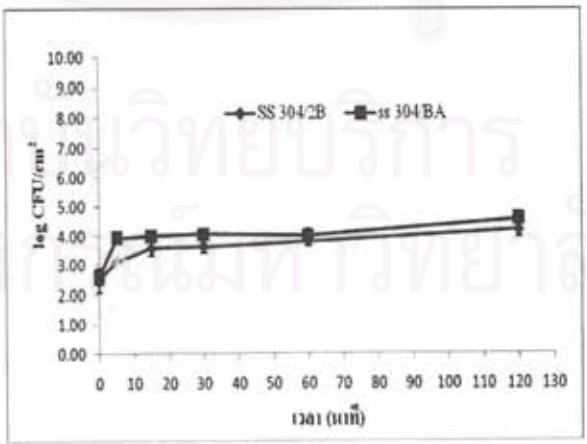


รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของพื้นผิวของ stainless steel เมื่อตรวจด้วยวิธี AFM และ SEM โดย A) stainless steel 304/2B และ B) stainless steel 304/BA

จากรูปที่ 4.4 เห็นได้ชัดเจนว่ารูป A มีความขรุขระมากกว่ารูป B อย่างชัดเจน ทั้งวิธี AFM และ SEM นั้นแสดงว่า พื้นผิว 2B มีความหยาบหรือขรุขระมากกว่าพื้นผิว BA (พื้นผิว BA เรียบกว่า 2B) ซึ่งจากข้อมูลของบริษัทไทยน๊อคซ์ได้ระบุไว้ว่า พื้นผิว BA มีความเรียบจนสามารถสะท้อนแสงได้ 54% กล่าวคือเมื่อนำวัตถุวางลงบน stainless steel สามารถมองเห็นวัตถุบนพื้นผิวได้ ในขณะที่พื้นผิว 2B สามารถสะท้อนแสงได้เพียง13 % เท่านั้น

4.2 การเกาะติดของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel

ระยะเวลาในการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวสัมผัสอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องศึกษา เพราะจะเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าอาหารหรือผลิตภัณฑ์จากอาหารที่ผลิตขึ้น เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวสัมผัสอาหารดังกล่าวได้ตั้งแต่เมื่อไร ซึ่งมีความสำคัญสำหรับผู้ประกอบการผลิตอาหาร ดังนั้นในหัวข้อนี้ผู้วิจัยจึงได้เลือกระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองตั้งแต่ 0 นาที (จุ่มแผ่นทดสอบแล้วยกขึ้นทันที) เป็นต้นไป เพื่อศึกษาการเกาะติดของ *S.* Anatum บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร คือ stainless steel 2 ชนิด (ชนิด 304/2B และ 304/BA) ซึ่งเป็นตัวแทนของ stainless steel ที่ใช้เป็นส่วนใหญ่ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารแขวนลอยของเชื้อ ทิ้งไว้ให้เกิดการเกาะติดที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0 นาที เป็นต้นไป แล้วตรวจสอบการเกาะติด พบว่า การเกาะติดของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel ชนิด 304/2B และ Stainless steel ชนิด 304/BA ที่ระยะเวลา 0-120 นาที โดยตรวจสอบจำนวนเซลล์บนแผ่น stainless steel ด้วยวิธี spread plate technique พบว่าในสารละลาย Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL ที่เวลา 0 นาที (จุ่มแล้วยกขึ้นทันที) สามารถตรวจพบเชื้อบนแผ่น stainless steel ทั้งสองชนิดประมาณ 2.49±0.39 และ 2.57±0.23 log CFU/cm^2 ตามลำดับ และหลังจาก 0 นาที เชื้อสามารถเกาะบนแผ่น stainless steel ได้เพิ่มมากขึ้น สังเกตได้ว่ากราฟในรูปที่ 4.5 ชันขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0-15 นาที ดังรูปที่ 4.5 หลังจากนั้นตรวจพบจำนวนเชื้อได้เพิ่มมากขึ้น และถ้าทิ้งแผ่น stainless steel ไว้ในอาหารเป็นเวลานานก็จะมีจำนวนเชื้อที่เกาะติดและเจริญบนแผ่น stainless steel เพิ่มมากขึ้นด้วย และที่เวลา 120 นาที ตรวจพบจำนวนเซลล์มีค่า 4.21±0.24 และ 4.59±0.07 log CFU/cm^2 บนแผ่นพื้นผิวทดสอบชนิด 304/2B และ 304/BA ตามลำดับ (ภาคผนวก ฉ1)



รูปที่ 4.5 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel ชนิด 304/2B และ 304/BA ที่จุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL ณ เวลาต่างๆกัน โดยใช้วิธี Spread plate technique

การเกาะติดของ *S.* Anatum บน Stainless steel ทั้งสองชนิด ที่ 0 นาที มีค่าใกล้เคียงกันมาก (รูปที่ 4.5) แต่ในช่วงเวลา 0 ถึง 5 นาที จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ที่เจริญบนแผ่น stainless steel ชนิด 304/BA เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็น 3.95±0.11 log CFU/cm^2 กล่าวคือ เพิ่มขึ้นประมาณ 1.38 log CFU/cm^2 ในขณะที่จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ที่เจริญบนแผ่น stainless steel 304/2B เพิ่มขึ้นเพียง 0.58 log CFU/cm^2 จากเริ่มต้น หลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 นาทีเป็นต้นไป การเพิ่มจำนวนของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel ทั้งสองชนิดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ ค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลานานมากขึ้น

สำหรับในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 3 log CFU/mL พบว่าที่เวลา 0-120 นาที ไม่สามารถตรวจพบเชื้อบนแผ่นทดสอบด้วยวิธี spread plate techniqueได้ ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่าไม่มีเซลล์ของ *S.* Anatum เกาะบนแผ่น stainless steel แต่กลับแสดงว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมในการตรวจหาจำนวนเชื้อบนแผ่นทดสอบที่มีปริมาณเชื้อระดับต่ำ ซึ่งเป็นไปได้ว่าการเกาะติดของเชื้อบนพื้นผิวระยะนี้เกิดการเกาะติดกันอย่างหลวมๆ ระหว่างตัวเซลล์กับพื้นผิวสัมผัส เซลล์สามารถหลุดออกจากพื้นผิวสัมผัสได้ง่าย เมื่อมีการเคลื่อนย้ายพื้นผิว การเกิดการสั่นสะเทือน หรือขั้นตอนการล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนพื้นผิวออกไป อาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยอยู่แล้วบนพื้นผิวสัมผัสหลุดออกไปได้ จึงทำให้การตรวจหาเชื้อบนแผ่น stainless steel ทำได้ยากยิ่งขึ้น ซึ่งแตกต่างกับปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL ถึงแม้จะเกิดการเกาะติดกันอย่างหลวมๆ และเมื่อเซลล์หลุดออกไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วก็ตาม แต่ปริมาณเชื้อที่มีมากกว่า จึงยังคงสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี spread plate technique

ปัจจุบันนอกเหนือจาก conventional cultivating method แล้ว วิธีการตรวจหาปริมาณเชื้อบนพื้นผิวยังมีด้วยกันอีกหลายวิธี ค่าที่ตรวจวัดได้สามารถออกมาในรูปเชิงปริมาณ (quantitative) เช่น epifluorescence microscopy ด้วยการย้อมสีเซลล์ แล้วนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นต้น หรือการตรวจเชื้อบนพื้นผิวในเชิงคุณภาพ (qualitative) เช่น scanning electron microscopy, ATP bioluminescence และ การตรวจวัดการดูดกลืนแสง (spectophotometer) เมื่อย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมเซลล์ เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้อาจจะเหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อบนแผ่น stainless steel ได้ดีกว่า conventional cultivating method ก็เป็นได้

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์บนพื้นผิว ขึ้นกับระยะการเจริญของเซลล์ (growth phase) ชนิดและคุณสมบัติของพื้นผิว สารอินทรีย์ ตลอดจน สิ่งแวดล้อมต่างๆ pH และอุณหภูมิ เป็นต้น (Oulahal et al., 2008)

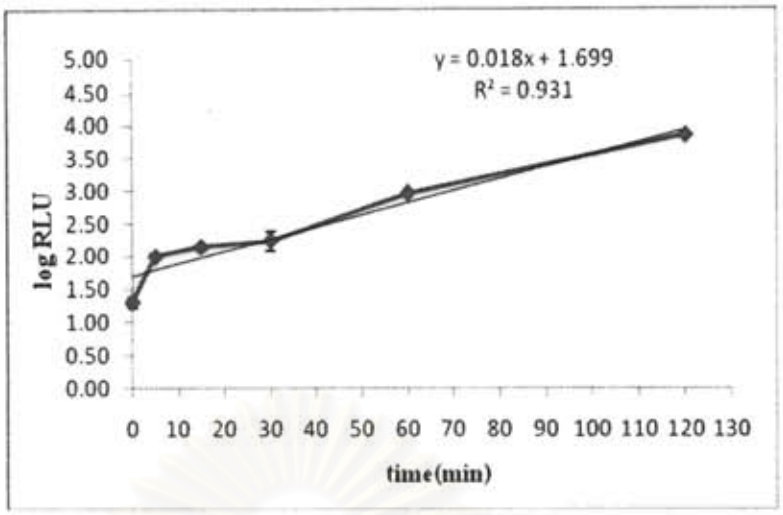
กนกทิพย์ และวราภา (2549) อธิบายถึงกลไกของการเกาะติดและสร้างฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่างๆ โดยแสดงความสัมพันธ์ของแรงยึดเกาะกับระยะห่างของเซลล์กับพื้นผิว กล่าวคือ เมื่อมีสารอาหารหลงเหลือบนพื้นผิวจนเกิดเป็นฟิล์มของอาหาร (Conditioning film)

เซลล์จุลินทรีย์อิสระ (planktonic cell) ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมจะเคลื่อนที่เข้าหาพื้นผิว จนเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวมากกว่า 50 นาโนเมตร เซลล์จะเกิดการเกาะติดกับพื้นผิวด้วยแรงอย่างอ่อน เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์เข้าใกล้กับพื้นผิวมากขึ้นจนระยะห่างมีค่า 10-20 นาโนเมตร แรงที่ยึดเกาะนั้นจะเพิ่มขึ้น ทั้งสองระยะนี้เป็นขั้นตอนของการเกาะติดแบบผันกลับได้ จนในที่สุดเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวลดลงต่ำกว่า 15 นาโนเมตร เซลล์จุลินทรีย์เหล่านั้นจะเกิดการสร้างพันธะพิเศษเกิดเป็นการเกาะติดแบบไม่ผันกลับ เซลล์ต่างๆ เหล่านั้นจะมีการเจริญเพิ่มจำนวนและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มต่อไป

Mafu และคณะ (1990) ศึกษาการเกาะติดของ *L. monocytogenes* บนพื้นผิวหลายชนิด ได้แก่ สแตนเลสสตีล แก้ว โพลิโพรพิลีน และยาง จากการศึกษาพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด (scanning electron microscope) พบว่าเนื่องจากแผ่นแก้วมีพื้นผิวที่เรียบกว่าพื้นผิวอื่น ส่วนยางมีลักษณะเป็นช่องลึกและมีรอยแยกขนาดใหญ่กว่า ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเกาะติดพื้นผิวของยางได้มากกว่าพื้นผิวชนิดอื่น

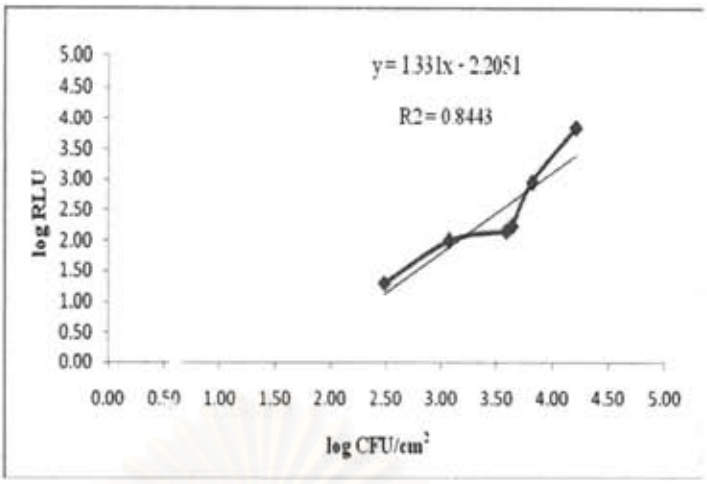
ต่อมา Chmielewski และ Frank (2003) ได้รวบรวมงานวิจัยและสรุปว่า การเกาะติดของจุลินทรีย์เกิดขึ้นบนพื้นผิวที่มีพลังงานอิสระสูงหรือมีความเปียกน้ำได้ง่าย เช่น สเตนเลสสตีลและแก้วที่มีลักษณะเป็นไฮโดรฟิลิกหรือคุณสมบัติชอบน้ำ ได้ดีกว่าพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิกหรือไม่ชอบน้ำ เช่น เทฟลอน ไนลอน ยาง เป็นต้น แต่จากข้อสรุปดังกล่าวอาจไม่เป็นจริงเสมอไป มีรายงานวิจัยพบว่า แบคทีเรียบางชนิดสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกมากกว่าพื้นผิวไฮโดรฟิลิก (Sinde and Carballo, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ไม่สม่ำเสมอ มีรอยแยก จะทำให้เกิดการเกาะติดได้ดีกว่าพื้นผิวที่เรียบ

ส่วนวิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel ที่ระยะเวลา 0 -120 นาที ด้วยวิธีการตรวจวัด ATP จากเครื่อง Hy-lite®2 วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว (Rapid method) ค่าที่ตรวจวัดได้สามารถบอกออกมาในรูป RLU (Relative Light Unit) ซึ่ง RLU จะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีอยู่บนแผ่นทดสอบ ถ้ามีจำนวนเซลล์อยู่บนแผ่นทดสอบจำนวนมาก ค่าที่ตรวจวัดออกมาได้ก็จะสูง โดยพบว่าที่เวลา 0 นาที สามารถตรวจวัดค่า ATP ได้ 1.30±0.08 log RLU/cm^2 (รูปที่ 4.6) และเมื่อเวลานานมากขึ้น ค่า RLU ก็มีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย แสดงว่ามีเซลล์แบคทีเรียเกาะติดบนแผ่นทดสอบได้มากขึ้นด้วย โดยพบว่าที่เวลา 120 นาที มีค่า RLU เท่ากับ 3.84±0.03 log RLU/cm^2 (ภาคผนวก ฉ2) เมื่อคำนวณหาค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.9319 แสดงว่าระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม และค่า RLU ที่ตรวจวัดได้สัมพันธ์กันเป็นอย่างดี



รูปที่ 4.6 จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* Anatum บนแผ่น stainless steel ชนิด 304/2B ที่จุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL ณ เวลาต่างๆกัน โดยใช้วิธี ATP bioluminescense

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์บนแผ่น Stainless steel ทั้งสองวิธีคือ spread plate technique และ การตรวจวัด ATP ที่เวลา 0-120 นาที พบว่ามีความสัมพันธ์กันน้อย (R^2=0.8443) (รูปที่ 4.7) ที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่นในการตรวจวัด ATP จะต้องอาศัยการทำปฏิกิริยากันระหว่างเอนไซม์ลูซิเฟริน/ลูซิเพเรส กับโมเลกุล ATP ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต แล้วปล่อยแสงออกมาจึงจะสามารถตรวจวัดค่าได้ แต่ในขบวนการการตรวจวัด ตั้งแต่การใช้ไม้สำลีกวาดลงบนตัวอย่าง จนถึงการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ตัวอย่างถูกเจือจางอยู่หลายขั้นตอน ทำให้ความเข้มข้นของตัวอย่างเซลล์ลดลงไป เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ทำให้ตรวจวัดค่า ATP ได้ค่าน้อยกว่าความเป็นจริง และทั้งนี้เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า ATP มีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ทั้ง prokaryotic และ eukaryotic cell (Kaskova et al., 2006) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำหรับเซลล์ เซลล์ดังกล่าวนี้จึงสามารถวัด ATP ได้ด้วยวิธีการนี้เช่นกัน ประกอบกับเศษอาหารหรือสารอินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่บนพื้นผิวก็เป็นแหล่งที่สามารถให้ ATPได้ ค่าATPที่ตรวจวัดได้จึงไม่สามารถบอกได้ว่ามาจากเซลล์ของ *S.* Anatum เพียงอย่างเดียว อาจมาจากแหล่งอื่นก็เป็นได้ และเป็นที่น่าสังเกตว่าค่าที่มากที่สุดที่สามารถตรวจวัดค่า ATP แบบ linearได้ด้วยวิธีนี้ อยู่ในช่วง 0-99,000 RLU หรือ แบบ logarithimic อยู่ในช่วง 0-5.00 $\log_{10}$ RLU ดังนั้นถ้าการตรวจวัดด้วยวิธี spread plate technique มีค่ามากกว่า 5 log CFU เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจึงส่งผลให้มีความสัมพันธ์กันน้อยดังกล่าว



รูปที่ 4.7 วิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์ของ S. Anatum บนแผ่น stainless steel ชนิด 304/2B โดยแกน X เป็นวิธีการตรวจสอบด้วยการนับจำนวนเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate technique) แกนY เป็นการตรวจวัด ATP ด้วยวิธี ATP bioluminescense

จากที่กล่าวไปข้างต้นว่า การตรวจวัด ATP จะต้องอาศัยการทำปฏิกริยาระหว่างเอนไซม์กับโมเลกุลของ ATP ดังนั้นเอนไซม์จึงมีความสำคัญ จะต้องทำการเก็บรักษาให้ถูกต้องและถูกวิธีเพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์เสียสภาพได้

อย่างไรก็ตามวิธี ATP bioluminescense ก็ไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้หาปริมาณเชื้อทั้งหมด (total count) บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร (Aycicek, Uzus and Karci., 2006) เพราะว่าของเสียที่หลงเหลือจากการทำความสะอาดในกระบวนการผลิต เช่น เลือด หรือ เศษเนื้อ เป็นต้น จะเป็นตัวเพิ่มค่า RLU ได้ (Kaskova et al, 2006) ทำให้การตรวจสอบผิดพลาดหรือ อาจสรุปได้ว่าวิธี ATP bioluminescense มีช่วงในการตรวจวัดที่จำกัดและไม่สามารถบอกความแตกต่างของแหล่งปนเปื้อนได้นั่นเอง ดังนั้นโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร จึงควรใช้ในการตรวจสอบขั้นต้นว่าสายการผลิตอาหาร ณ ตอนนั้นหรือเวลานั้นมีการปนเปื้อนมากน้อยเพียงใด จำเป็นต้องทำความสะอาดหรือไม่เท่านั้น

4.3 ผลการศึกษาชนิดของเกรดของ stainless steel ต่อการเกิดไบโอฟิล์ม

เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel) เป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพเพราะมีคุณสมบัติต้านทานการกัดกร่อน แข็งแรง และสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย เราสามารถจำแนกประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิมได้จากเลขรหัสที่กำหนดขึ้นตามมาตรฐาน AISI เช่น 304 304L 316 และ 316L เป็นต้น ซึ่งส่วนผสมจะเป็นตัวกำหนดเกรดของเหล็กกล้าไร้สนิม ซึ่งโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมีความต้องการในการใช้งานที่แตกต่างกันไป ดังนั้นเพื่อให้เหมาะสมกับกระบวนการผลิตอาหารของ

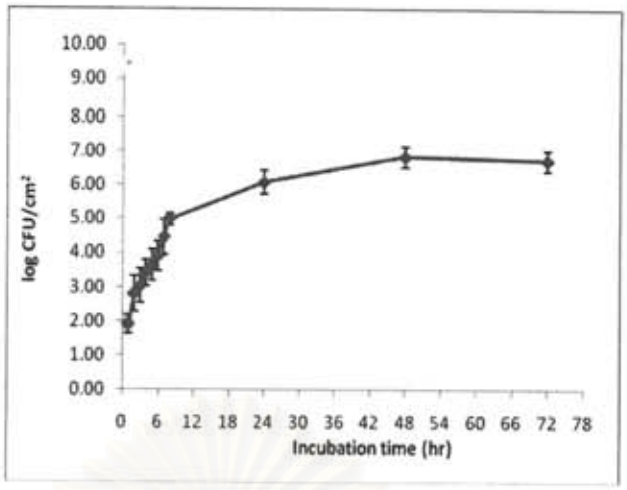
แต่ละโรงงาน ปัจจัยอีกปัจจัยหนึ่งที่น่าสนใจและสมควรศึกษาว่ามีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์มหรือไม่ นั้นคือชนิดของเกรดของ stainless steel ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้เลือกเกรดของ stainless steel 304 316L และ 430 มาเป็นหัวข้อในการศึกษา

จากการทดลองข้างต้น ทำให้ทราบว่าที่เวลา 0 นาทีก็เพียงพอที่จะทำให้ *S.* Anatum สามารถเกาะติดบน stainless steelได้ทันที ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงจุ่มแผ่นทดสอบใน suspension ของเชื้อเพียง 30 วินาที เพื่อเป็นการยืนยันว่ามีเชื้อติดมาแน่นอน แล้วย้ายใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ ทิ้งไว้ตามระยะเวลาที่กำหนดคือเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้วิธี spread plate technique ตรวจปริมาณเซลล์ของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel ในช่วงเวลา 1-8 ชั่วโมงแรก พบว่าสามารถตรวจพบจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบเกรด 304 มีค่า1.91±0.27 – 4.98±0.18 log CFU/cm^2 หลังจากการบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์ 6.08±0.35 log CFU/cm^2 ในขณะที่จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบเกรด 316L มีจำนวนเซลล์ 3.37±0.24 – 4.36±0.18 log CFU/cm^2 ที่เวลา 1-8 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมากที่สุดหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบไว้ 72 ชั่วโมง พบว่ามีค่า 6.58±0.47 log CFU/cm^2 และจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบเกรด 430 ในช่วง 1-8 ชั่วโมง มีค่า 2.83±0.31 – 5.61±0.01 log CFU/cm^2 และมีค่า 7.11±0.18 log CFU/cm^2 ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ6)

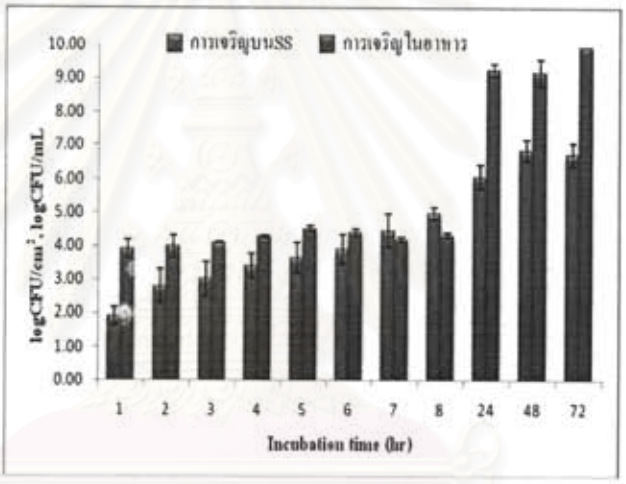
เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เกาะและตรวจสอบได้บนแผ่นทดสอบกับจำนวนเซลล์ที่เป็นอิสระภายในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า แผ่นทดสอบเกรด 304 มีปริมาณเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่นที่เวลา 1 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมีค่า 1.91±0.27 log CFU/cm^2 ในขณะที่ปริมาณเซลล์ที่เป็นอิสระภายอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า 3.93±0.27 log CFU/mL (รูปที่ 4.8B) แสดงให้เห็นว่าปริมาณเซลล์ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณมากกว่าที่สามารถตรวจวัดได้บนแผ่นทดสอบ และเมื่อมีการบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลานานมากขึ้นจำนวนเซลล์ที่สามารถตรวจวัดได้กับจำนวนเซลล์ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ยังคงแตกต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(A)

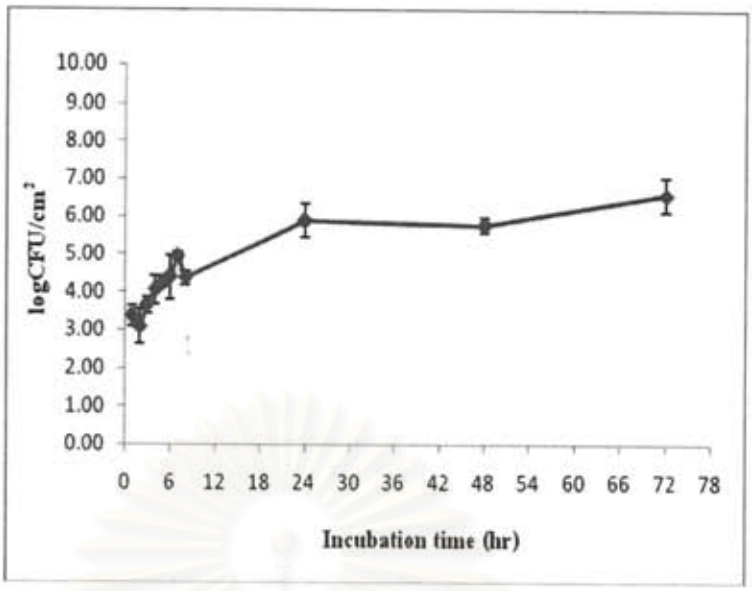


(B)

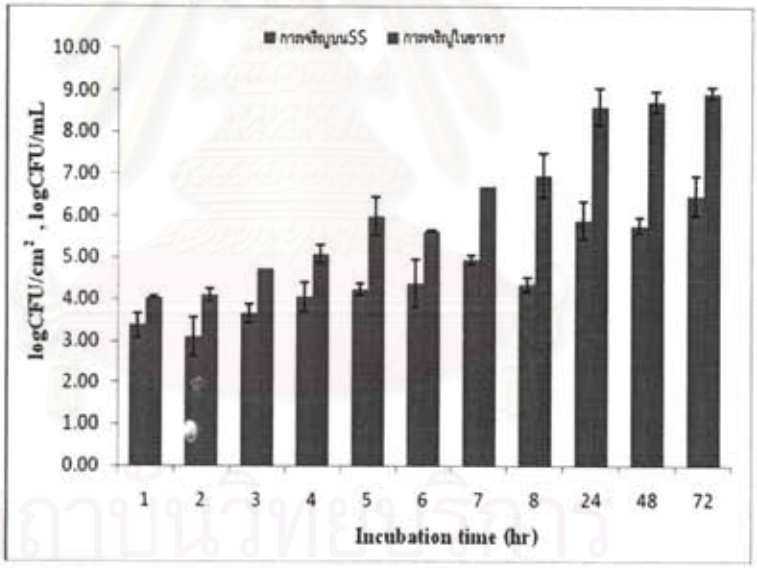


รูปที่ 4.8 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นstainless steel เกรด 304 เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ8 log CFU/mLแล้วย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ (B) เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของ Salmonella บนแผ่นพื้นผิวทดสอบกับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

(A)

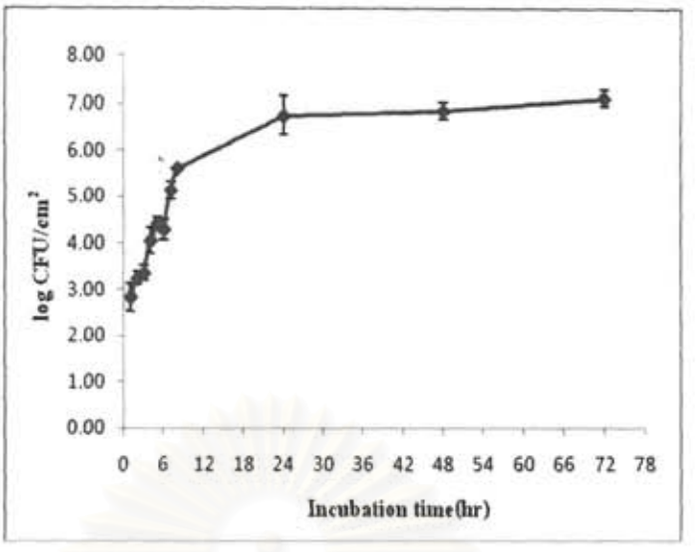


(B)

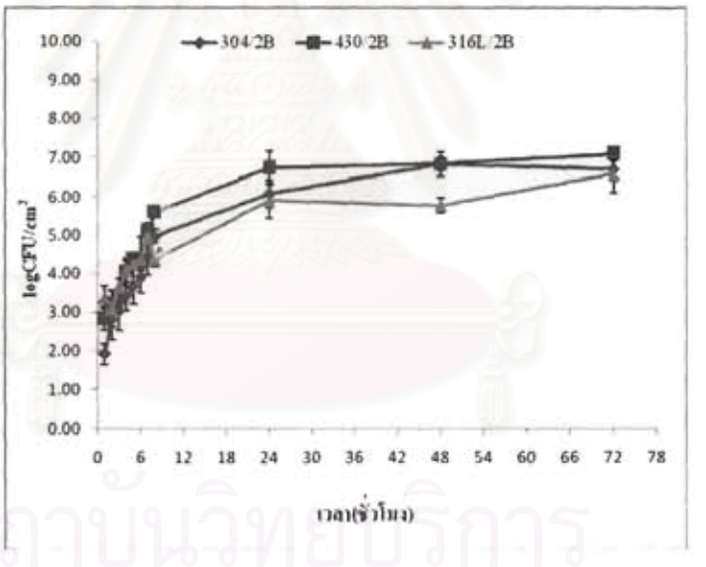


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.9 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นstainless steel เกรด316L เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ (B) เปรียบเทียบ จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบกับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นstainless steel เกรด 430 เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.11 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบเกรด 304, 316L และ 430

จากรูปที่ 4.11 เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ *S.* Anatum บนแผ่นทดสอบทั้งสามเกรด คือ 304 316L และ 430 โดยคำนวณค่า specific growth rate ของเชื้อ พบว่ามีค่า 10.54 11.68 และ 12.49 ต่อนาที บนแผ่นทดสอบเกรด 304 316L และ 430 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเจริญของ *S.* Anatum บนแผ่นทดสอบเกรด 430 สามารถเจริญได้ดีกว่าเกรด 304 และ เกรด 316L

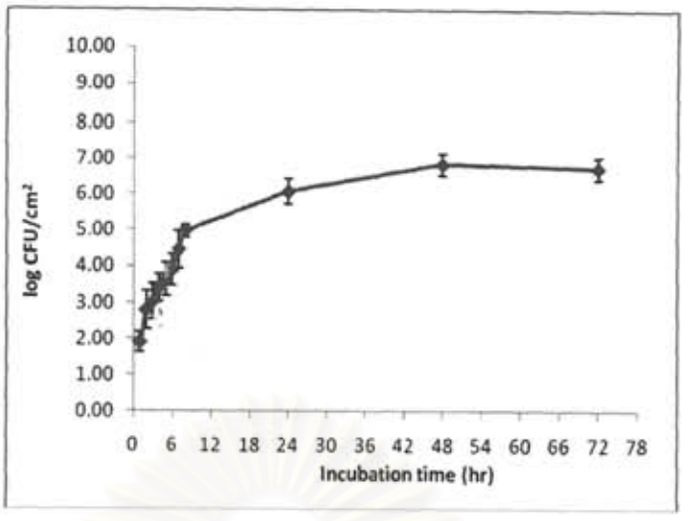
4.4 ผลการศึกษาชนิดของพื้นผิว (Finish) ของ Stainless steel ต่อการเกิดไบโอฟิล์ม

ลักษณะของพื้นผิว stainless steel ที่จะสัมผัสกับอาหารนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเกิดไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังนั้นการเลือกชนิดของพื้นผิวไม่ถูกต้องจะมีผลในการสะสมของเศษอาหารและเกิดเป็นไบโอฟิล์มขึ้นได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกชนิดของพื้นผิวมาเป็นทดสอบการเกิดไบโอฟิล์ม การทดลองครั้งนี้เลือกใช้ stainless steel พื้นผิวชนิด BA มาทดสอบการเกิดไบโอฟิล์ม เปรียบเทียบกับ stainless steel พื้นผิวชนิด 2B เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าแม้จะมีการเปลี่ยนพื้นผิวจาก 2B เป็น BA แล้วก็ตาม แต่จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบของ พื้นผิวชนิด BA ก็ไม่ได้มีค่าแตกต่างไปจาก พื้นผิวชนิด 2B แต่อย่างใด พบว่าจำนวนเซลล์ *S.* Anatum บนแผ่นพื้นผิวทดสอบชนิดพื้นผิวชนิด BA ที่เวลา 1-8 ชั่วโมงแรก มีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ 3.10±0.30 – 5.45±0.31 log CFU/cm^2 และหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ 7.35±0.22 log CFU/cm^2 (รูปที่ 4.12, ภาคผนวก ฉ7) และเมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบและจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีลักษณะแบบแผนเช่นเดียวกับเกรดของ stainless steel คือมีความแตกต่างกันของเซลล์บนแผ่นทดสอบและจำนวนเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นพื้นผิวชนิด BA ที่เวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมีจำนวน 6.41±0.22 log CFU/cm^2 แต่จำนวนเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำนวน 8.90±0.30 log CFU/mL (รูปที่ 4.12 AและB)

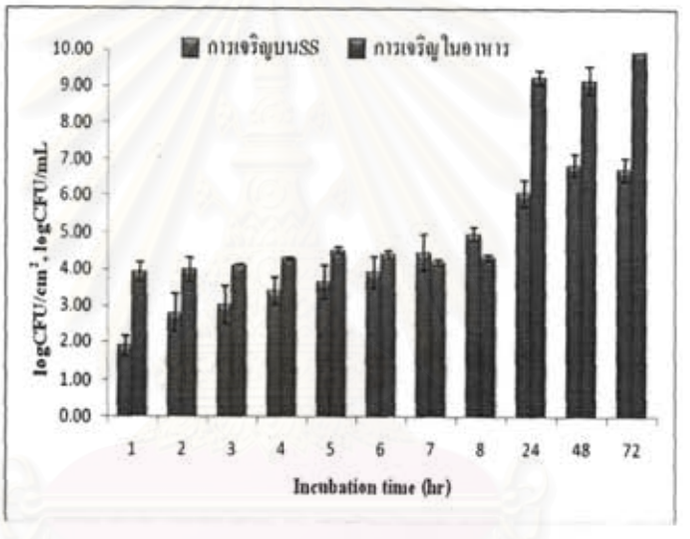
ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ที่เกาะติดบนพื้นผิวในช่วงเวลา 1-8 ชั่วโมงแรก เซลล์จะเกาะติดบนพื้นผิวแบบไม่ผันกลับ เซลล์ที่มีการเกาะติดแล้วจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น และอาจจะหลุดออกมาเป็นเซลล์อิสระ (planktonic cell) ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นจึงตรวจพบจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มาก (Kumar and Anand, 1998)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(A)

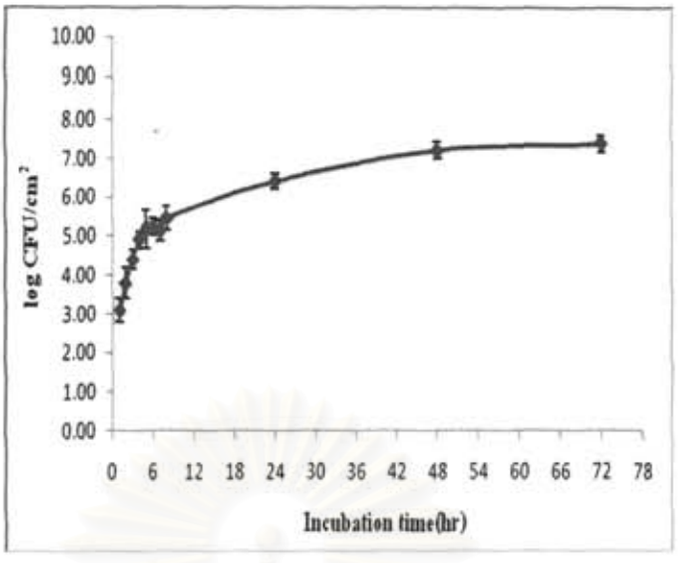


(B)

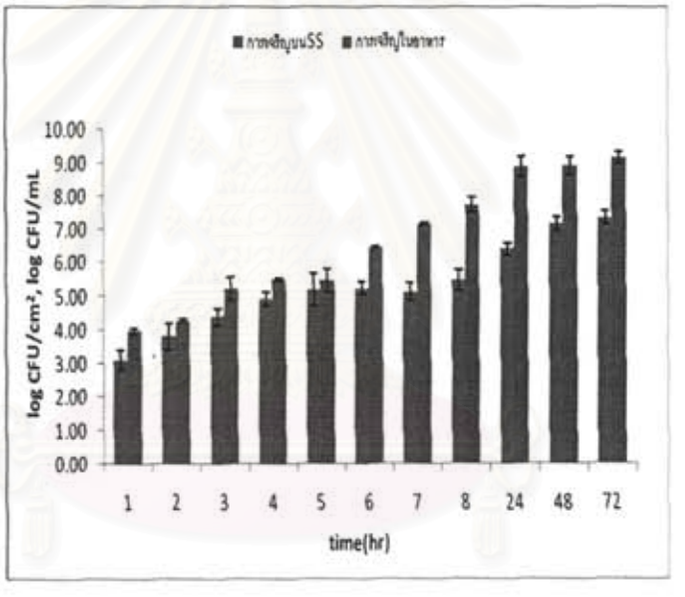


รูปที่ 4.12 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นstainless steel พื้นผิว 2B เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ (B) เปรียบเทียบ จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบกับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

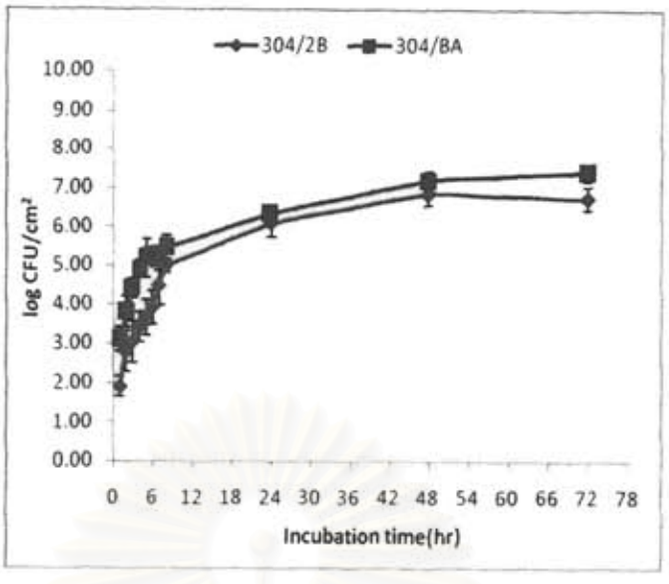
(A)



(B)



รูปที่ 4.13 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นstainless steel พื้นผิว BA เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ (B) เปรียบเทียบ จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบกับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.14 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่น stainless steel พื้นผิว 2B กับ BA เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.14 เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum บน stainless steel ที่มีพื้นผิวแตกต่างกันพบว่า ปริมาณเซลล์ของ *S.* Anatum ที่ชั่วโมงแรกมีค่า 1.91±0.27 และ 3.10±0.30 logCFU/cm^2 บน stainless steel พื้นผิวชนิด 2B และ BA ตามลำดับ นั่นแสดงว่าเชื้อสามารถการเกาะติดมาบนแผ่นทดสอบพื้นผิว BA ได้ดีกว่าบนพื้นผิว 2B และเมื่อนำมาบ่มโดยได้รับสารอาหารในการเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวน จึงทำให้การเจริญบนพื้นผิว BA เจริญได้ดีกว่าที่พื้นผิว 2B ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาค่า specific growth rate ของเชื้อ บนพื้นผิวทั้งสองชนิดพบว่ามีค่า growth rate เท่ากับ 10.54 และ11.50 ต่อนาที ตามลำดับ ค่านี้แสดงให้เห็นว่าการเจริญของ *S.* Anatum บนพื้นผิว BA เจริญได้ดีกว่าพื้นผิว 2B

4.5 อุณหภูมิและปริมาณเชื้อที่มีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel ชนิด 304/2B

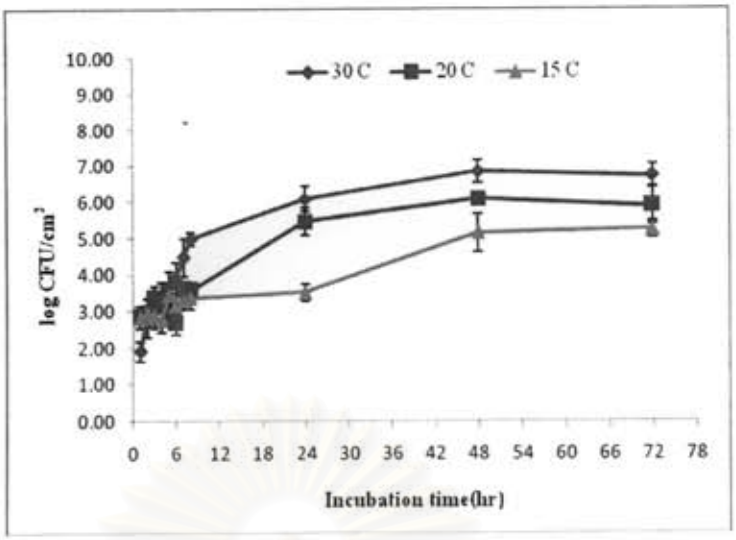
อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้อย่างเหมาะสม เมื่อจุลินทรีย์มีการเกาะติดบนพื้นผิวแล้วอุณหภูมิจะทำให้จุลินทรีย์สามารถพัฒนาไปเป็นไบโอฟิล์มได้ จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน จึงทำให้เกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นอิทธิพลของอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จะต้องทำการศึกษา ประกอบกับจำนวนเชื้อในธรรมชาติที่ไม่เท่ากันจึงมีความสามารถในการเกิดไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้อง

ทำการศึกษาควบคู่กันไป การทดลองครั้งนี้ได้เลือกอุณหภูมิที่ครอบคลุมกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์ปีก เช่น เนื้อไก่ คือเลือกศึกษาที่อุณหภูมิ 15 20 และ 30 องศาเซลเซียส

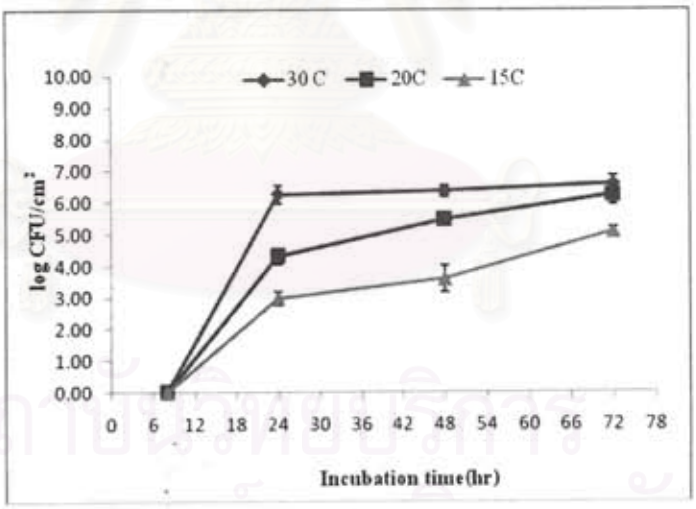
จากการทดลองข้างต้น ทำให้ทราบว่าที่เวลา 0 นาที(จุ่มแล้วยกขึ้นทันที) *S.* Anatum สามารถเกาะติดบนแผ่น stainless steel ได้ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงจุ่มแผ่นทดสอบใน suspension ของเชื้อ เพียง 30 วินาที แล้วย้ายแผ่นทดสอบใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ ทิ้งไว้ตามระยะเวลาที่กำหนด ซึ่งจากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อเป็น 8 log CFU/mL ช่วง 1-8 ชั่วโมงแรก สามารถตรวจพบ *S.* Anatum ที่เกาะติดบนแผ่น stainless steel ได้ และสามารถตรวจพบได้มากในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/mL พบว่า ที่เวลา 1-8 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อบนแผ่น stainless steel ด้วยวิธี spread plate technique ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเชื้อที่ติดมาอาจมีปริมาณน้อยมาก และหลุดไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงต้องอาศัยระยะเวลาพอสมควรที่จะให้เชื้อเพิ่มจำนวน จึงจะตรวจพบเชื้อได้

เมื่อพิจารณาถึงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *S.* Anatum บนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มแผ่นทดสอบลงใน suspension ของเชื้อ ความเข้มข้น 8 log CFU/mL ก่อนจะย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S.* Anatum สามารถเจริญได้ดีและเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 20 และ15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมีค่า 6.08±0.35, 5.45±0.39 และ 3.50±0.35 log CFU/cm^2 (รูปที่ 4.15) ซึ่งแต่ละอุณหภูมิจะแตกต่างกันอยู่ประมาณ 1 log cycle และพบว่าที่ เวลา 72 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อมากที่สุด มีค่า 6.72±0.31, 5.87±0.51 และ 5.22±0.22 log CFU/cm^2 ที่อุณหภูมิ 30, 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาคผนวก ฉ3) และถ้าจุ่มแผ่นทดสอบลงใน suspension ของเชื้อ 3 log CFU/mL ก่อนจะย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ พบว่าสามารถตรวจพบได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง เป็นต้นไป โดยมีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ 6.24±0.27, 4.30±0.25 และ 2.98±0.21 log CFU/cm^2 ที่อุณหภูมิ 30, 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาคผนวก ฉ4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่4.15 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum บนแผ่นทดสอบที่จุ่มลงใน TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL ก่อนที่จะย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C, 20°C และ 15°C ทำการตรวจนับเชื้อด้วยวิธี spread plate technique



รูปที่ 4.16 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum บนแผ่นทดสอบที่จุ่มลงใน TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 3 log CFU/mL ก่อนที่จะย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C, 20°C และ 15°C ทำการตรวจนับเชื้อด้วยวิธี spread plate technique

จึงอาจสรุปได้ว่าเมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นเริ่มต้นของ *S.* Anatum พบว่าถ้ามีปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *S.* Anatum ระดับสูง (8 log CFU/mL) จะทำให้ *S.* Anatum สามารถติดมากับแผ่น stainless steel ได้มากและจะเจริญและเพิ่มจำนวนบนแผ่นstainless steel ได้ดี ในขณะที่ปริมาณเริ่มต้นของเชื้อระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ความสามารถในการเกาะติดมาบนแผ่นทดสอบน้อย จึงต้องอาศัยระยะเวลาในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน จึงสามารถตรวจสอบได้

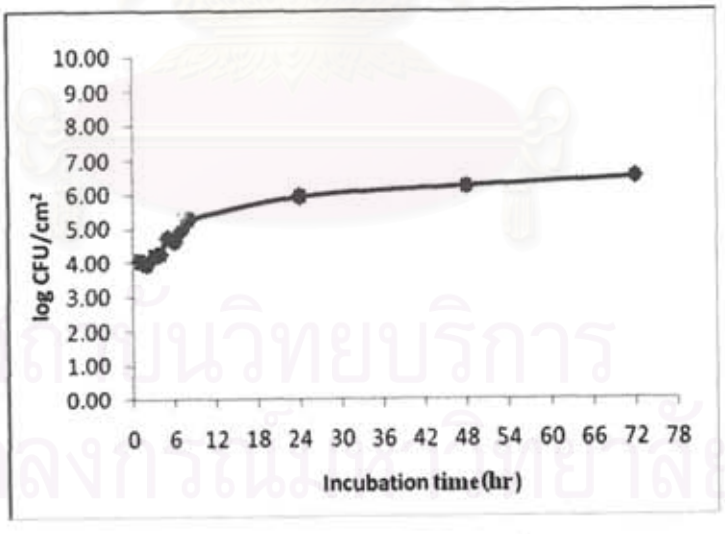
ในปี ค.ศ. 2003 Stepanovic และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการบ่ม (Incubation temperature) ต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ Salmonella โดยได้เลือกใช้อุณหภูมิในการบ่มที่ 37°C, 30°C และอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 °C) เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วทำการประมาณการเกิดไบโอฟิล์ม พบว่าหลังจากการบ่มไว้ 24 ชั่วโมง ไบโอฟิล์มเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 30 °C และหลังจากการบ่มไว้ 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 22 °C เกิดไบโอฟิล์มได้ดีที่สุด ต่อมาในปี 2007 Rode และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (incubation temperature) ต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *Staphylococcus aureus* โดยอุณหภูมิที่เลือกใช้คือ 20°C และ 25°C ทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 30°C 37°C 42°C 46°C และ 48 °C ทำการบ่มเป็นเวลา 24ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ที่ 20°C และ 25°C ไบโอฟิล์มเกิดขึ้นได้น้อย ส่วนการบ่มที่อุณหภูมิ 30-42 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเกิดไบโอฟิล์มไม่แตกต่างจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเกิดไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ต่าง ๆ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญที่แตกต่างกัน อุณหภูมิที่จุลินทรีย์เจริญได้จะอยู่ระหว่างอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) และอุณหภูมิต่ำสุด (minimum temperature) ซึ่งถ้าอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่านี้ จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ (optimum temperature) จึงแตกต่างกันออกไปตามแต่ชนิดของจุลินทรีย์ สำหรับ *Salmonella spp.* พบว่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิในร่างกายคนหรือสัตว์ หรือเรียกว่า Mesophilic bacteria โดยช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้อย่างเหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-45°C แต่อย่างไรก็ตามในอุตสาหกรรมอาหาร กระบวนการตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งถึงปลายทางมีความต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ โดยผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้าจะใช้เป็นวัตถุดิบ (raw material) สำหรับขั้นตอนต่อมา การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนของการผลิตจึงส่งผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดไบโอฟิล์มขึ้นได้ในกระบวนการผลิต

4.6 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารต่อการเกิดไบโอฟิล์ม

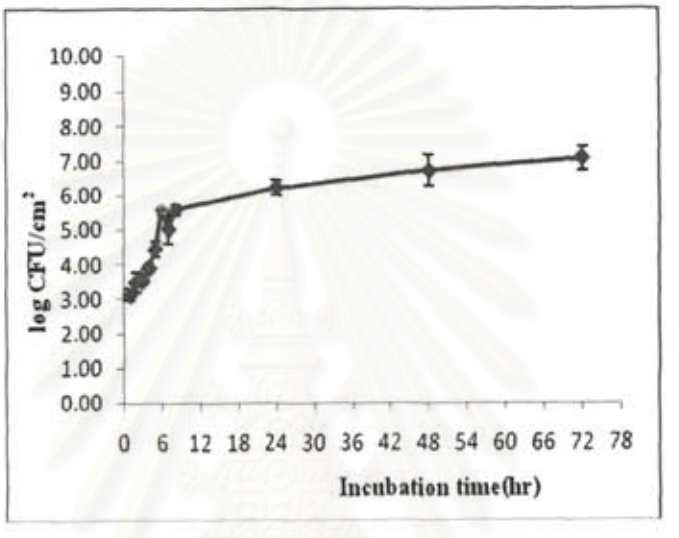
สารอาหารเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะจุลินทรีย์ต้องการสารอาหารไปใช้เป็นกิจกรรมภายในเซลล์สำหรับแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การที่มีสารอาหารมากหรือน้อยแตกต่างกัน จะมีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์มหรือไม่ เป็นสิ่งที่จะต้องทำการศึกษา ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า *S.* Anatum สามารถเกาะติดและเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่น stainless steel ชนิด 304/2B ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ได้ที่ระยะเวลา 1-72 ชั่วโมง ด้วยการตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยวิธี spread plate technique บนอาหาร TSA ดังนั้นขั้นตอนต่อไปจึงทำการเปลี่ยนชนิดของสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งเป็นอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นสารอาหารชนิดอื่นๆ โดยการทดลองครั้งนี้ ได้เลือกใช้อาหารที่มีสารอินทรีย์ต่างๆกันไป ตั้งแต่ สารละลายเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ0.85, อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีการผสม glucose เข้มข้นร้อยละ 1

จากการทดลองพบว่าเมื่อเปลี่ยนแหล่งของสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85% NaCl) พบว่ายังคงมีการเจริญของ *S.* Anatum ได้แม้จะมีแค่เกลือเท่านั้น พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถตรวจนับเซลล์ Salmonella บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 5.94±0.17 log CFU/cm^2 และมีจำนวน 6.50±0.21 log CFU/cm^2 เมื่อทำการตรวจวัดที่เวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่4.17)



รูปที่ 4.17 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มอยู่ในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

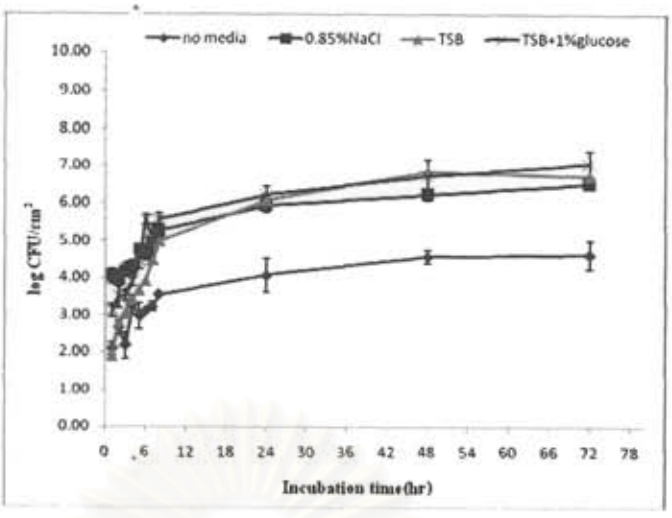
เมื่อมีการเติมกลูโคส (D-glucose) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จำนวน 1% เพื่อเพิ่มแหล่งของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าน่าจะทำให้เซลล์ Salmonella มีการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ดียิ่งขึ้น ผลการทดลองพบว่า การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบแทบจะไม่มีความแตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ไม่ได้เติมกลูโคส เพราะพบว่าจำนวนเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า 6.22±0.23 และ 7.06±0.35 log CFU/cm^2 ที่เวลา 72 ชั่วโมงตามลำดับ (รูปที่4.18)



รูปที่ 4.18 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหารมาเปรียบเทียบกัน(รูปที่4.19) จะเห็นได้ว่าแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารไปหลายชนิด แต่จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบก็ยังคงมีการเจริญ พร้อมทั้งแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ แม้จะไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้การเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงยังคงไม่เห็นความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

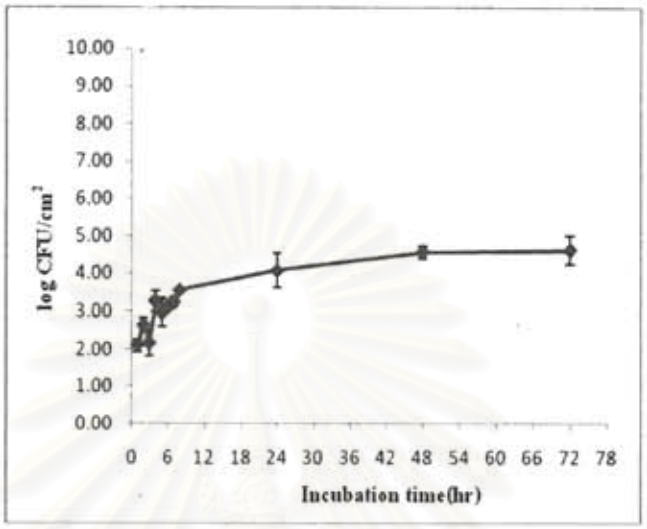


รูปที่ 4.19 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อมีการเปลี่ยนแหล่งของสารอาหารชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.7 ผลการศึกษาการอยู่รอดของเซลล์ *S.* Anatum ในสภาวะที่ไม่มีอาหาร

จากการทดลองพบว่า เมื่อเปลี่ยนแหล่งของสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นไม่มีแหล่งของสารอาหารที่ *Salmonella* สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนได้ ซึ่งจะบ่มแผ่นทดสอบที่มีการเกาะติดของเชื้อไว้ในหลอดเซนตริฟิวซ์ ขนาด 50 mL ที่ปลอดเชื้อและมีฝาปิด ผลการทดลองพบว่า แม้จะไม่มีแหล่งของสารอาหาร *S.* Anatum ก็ยังสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนบนแผ่นทดสอบได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *Salmonella* สามารถใช้ค่า a_w (water activity) หรือปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหารและสามารถนำมาใช้ได้ มาใช้แบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน พบว่าที่เวลา 1-8 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ 2.10±0.16 – 3.35±0.05 log CFU/cm^2 หลังจากการบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวน *Salmonella* บนแผ่นทดสอบ 4.08±0.46 log CFU/cm^2 (รูปที่4.20) และเมื่อทำการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์ *Salmonella* บนแผ่นทดสอบถึง 4.63±0.38 log CFU/cm^2 จากการทดลองครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าแม้จะไม่มีสารอาหารที่เหมาะสำหรับการเจริญ แต่ *S.* Anatum ก็ยังสามารถมีชีวิต (survival) อยู่บนแผ่นทดสอบได้และมีค่ามากพอที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อนข้าม (cross-contamination)ไปกับผลิตภัณฑ์อาหารได้ หากไม่มีการทำความสะอาดที่ดีพอ (ภาคผนวก ฉ 5) ซึ่งการที่ *Salmonella* มีความสามารถในการปรับตัวได้ดีจึงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยได้ และสามารถทนต่อความแห้งหรือ a_w ระดับต่ำๆ ได้ จึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมนอกร่างกายของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเชื่อว่า *Salmonella* อาศัยกลไกการสะสมสารอาหารบางอย่าง (compatible solutes หรือ osmolytes) ที่ทำให้ความ

เข้มข้นของ electrolytes ภายในเซลล์เท่าเดิม แต่มีปริมาณน้ำในเซลล์ (cytoplasmic water) มากขึ้น เช่น glycine betaine, choline, proline และ glutamate เป็นต้น (สุมณฑา และคณะ, 2548)



รูปที่ 4.20 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่ออยู่ในแหล่งที่ไม่มีสารอาหาร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

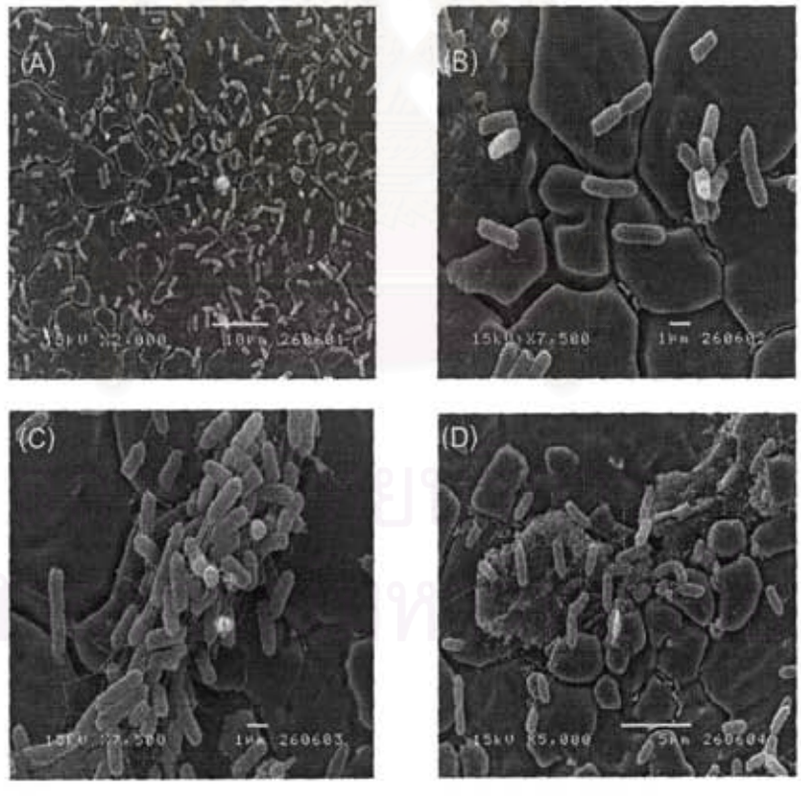
จากรายงานการวิจัยที่บ่งชี้ว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้บนเสื้อผ้า หรือแม้พื้นผิวสัมผัสอาหาร เช่น *E. coli*, *Staph. aureus* และ *Salmonella* spp. โดยพบว่าสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นชั่วโมงหรือเป็นวันหลังจากการเกาะติดแล้ว

ในปี 2003 K.sumaningrum และคณะ (2003) ได้ศึกษาการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (foodborne pathogens) บนพื้นผิว stainless steel พบว่าหลังจากการปนเปื้อนของเชื้อเป็นเวลา 4 วัน สามารถตรวจพบเซลล์ของ *Staph. aureus* และ*S.* Enteritidis ได้ 10^5 และ 10^3 CFU/cm^2 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

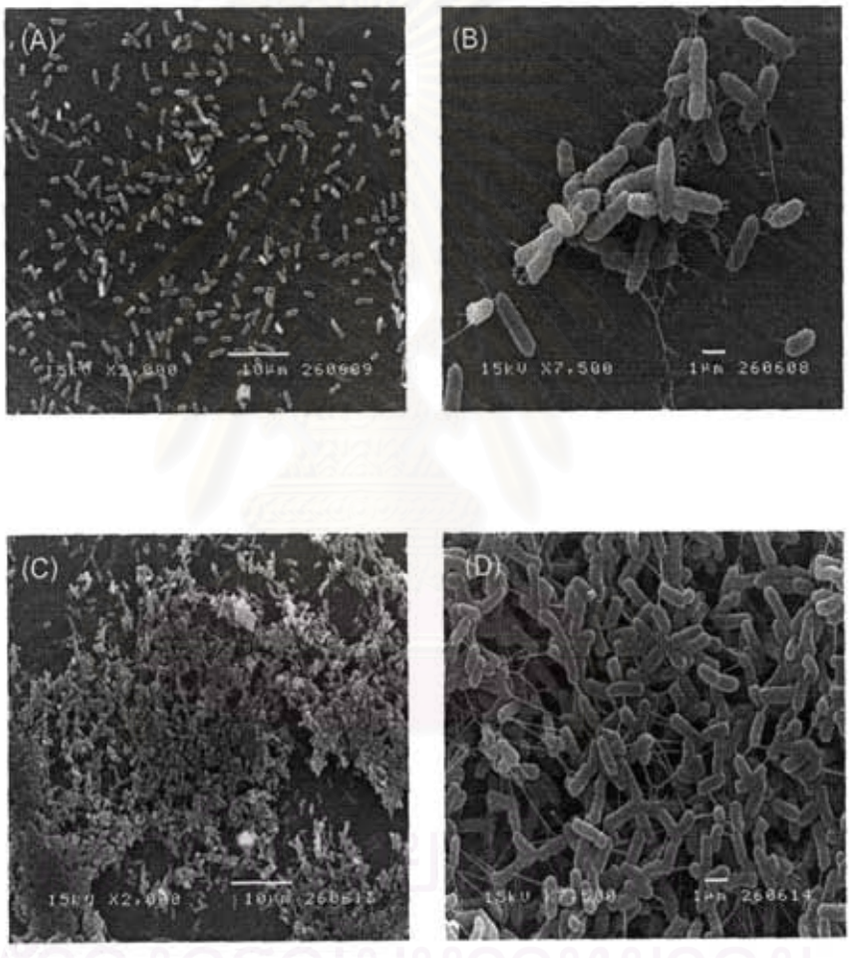
4.8 ลักษณะไบโอฟิล์มบนแผ่นพื้นผิวทดสอบเมื่อตรวจด้วย Scanning Electron Microscope (SEM)

เมื่อจุ่มแผ่นทดสอบ304/2B ลงในTSB ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL แล้วนำแผ่นทดสอบดังกล่าวที่มีการเกาะติดของเชื้อ บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หลอดใหม่ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วตรวจลักษณะการเกิดไบโอฟิล์มของ Salmonella บนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว โดยใช้ SEM ด้วยเครื่อง JEM-5410LV ทำการทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากรูป 4.21 พบว่าเซลล์จะมีการเกาะติดบนแผ่นทดสอบ และกระจายไปทั่วพื้นผิวของแผ่นทดสอบ และพบได้บ่อยๆ ไม่ว่าส่วนไหนของแผ่นทดสอบ เกิดเป็น monolayer biofilm (รูปที่ 4.21A) ซึ่งลักษณะการเกาะของเซลล์กับพื้นผิวของแผ่นทดสอบนั้นจากรูปจะเห็นว่าเซลล์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้เลย ไม่ได้เกาะโดยอาศัยช่องว่าง หรือรอยแตกของพื้นผิว จากรูปที่4.21B จะเห็นได้ว่าจากเดิมที่เซลล์เกาะบนแผ่นทดสอบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่จากรูปพบว่าเซลล์เริ่มมีการเกาะกลุ่มกัน ถ้าให้เวลาในการบ่มแผ่นทดสอบมากขึ้นเป็น 48ชั่วโมง จะเห็นเซลล์ Salmonella เกิดการรวมกลุ่มกันอย่างเห็นได้ชัด และเห็นชั้นของจุลินทรีย์หลายๆ ชั้น (multilayer biofilm) โดยการสร้างเส้นใยออกมาเพื่อยึดเหนี่ยวกัน (รูปที่ 4.21 C, D)



รูปที่ 4.21 การเกาะติด และการเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum บนแผ่น stainless steel
A)304/2B ที่เวลา24ชั่วโมง กำลังขยาย 2000X B)316L/2B ที่เวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย7500X
C)304/2B ที่เวลา 48 ชั่วโมง กำลังขยาย 7500X D)316L/2B ที่เวลา 48 ชั่วโมง กำลังขยาย 5000X

เช่นเดียวกันกับพื้นผิวชนิด 430/2B ซึ่งลักษณะพื้นผิวของเกรดนี้ค่อนข้างเรียบกว่าเกรด 304 และ 316L จะสังเกตเห็นร่องหรือรอยแตกได้ค่อนข้างน้อย หรือแทบมองไม่เห็นรอยแตกของ stainless steel เลย แต่ถึงแม้จะไม่มีรอยแตกบนพื้นผิว แต่เซลล์ของ *S.* Anatum ก็สามารถเกาะติดบนพื้นผิวทดสอบนี้ได้ โดยจะเห็นการเกาะติดของ *Salmonella* ได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง และสามารถเห็นการรวมกลุ่มได้อย่างชัดเจนที่เวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.22) โดยสามารถเห็นชั้นของเซลล์ได้หลายชั้น



รูปที่ 4.22 การเกาะติด และการเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum บนแผ่น Stainless steel 430/2B

A) กำลังขยาย 2000X, B) กำลังขยาย 7500X ที่เวลา 24 ชั่วโมง

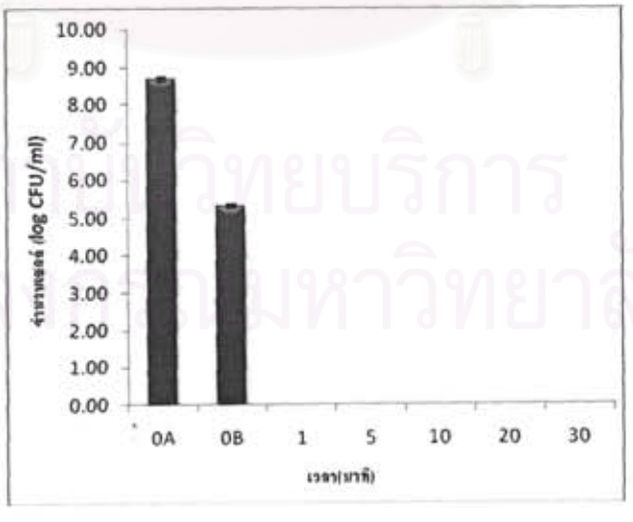
C) กำลังขยาย 2000X, D) กำลังขยาย7500X ที่เวลา 48 ชั่วโมง

4.8 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์ *Salmonella*

ในการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด คือ sodium hypochlorite และ peroxyacetic acid ในการทำลายเซลล์ของ *S.* Anatum เมื่อแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 2 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85% NaCl) และTryptic Soy Broth (TSB) โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL)

4.8.1 ประสิทธิภาพของ sodium hypochlorite ในการทำลาย *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

การทดสอบประสิทธิภาพของ sodium hypochlorite ในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 2 ชนิด โดยกำหนดความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite 3 ระดับคือ 100 200 และ 400 ppm (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) สำหรับการทดสอบกับสารแขวนลอยเซลล์ *S.* Anatum ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL เมื่อนำเซลล์ในอาหารเหลวสัมผัสกับ sodium hypochlorite ที่อุณหภูมิ 28±1 °C เป็นเวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที แล้วทำการตรวจนับจำนวน *S.* Anatum บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA ผลการทดลองพบว่า เมื่อเซลล์ *S.* Anatum แขวนลอยอยู่ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และใช้ sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายปริมาณเซลล์ของ *S.* Anatum ในสารละลายเกลือได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาทีหลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อ ดังรูปที่ 4.23

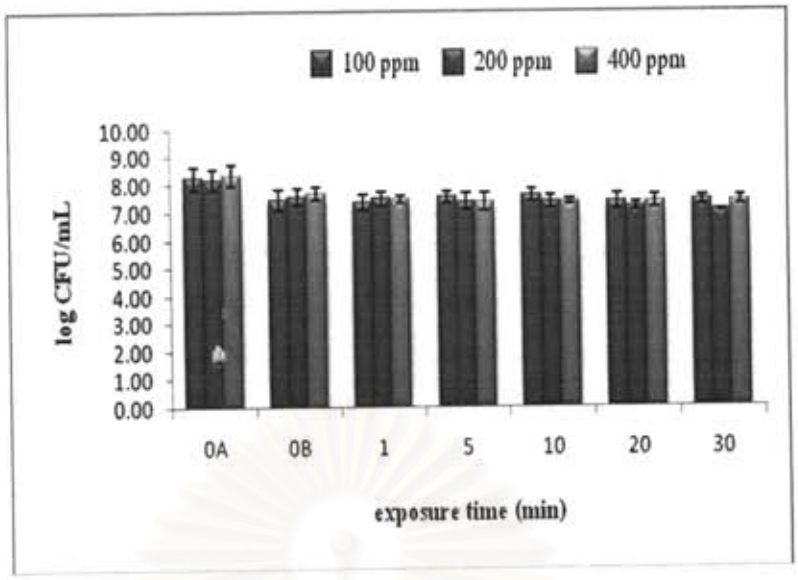


รูปที่ 4.23 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 100 ppm ที่อุณหภูมิ 28±1 °C

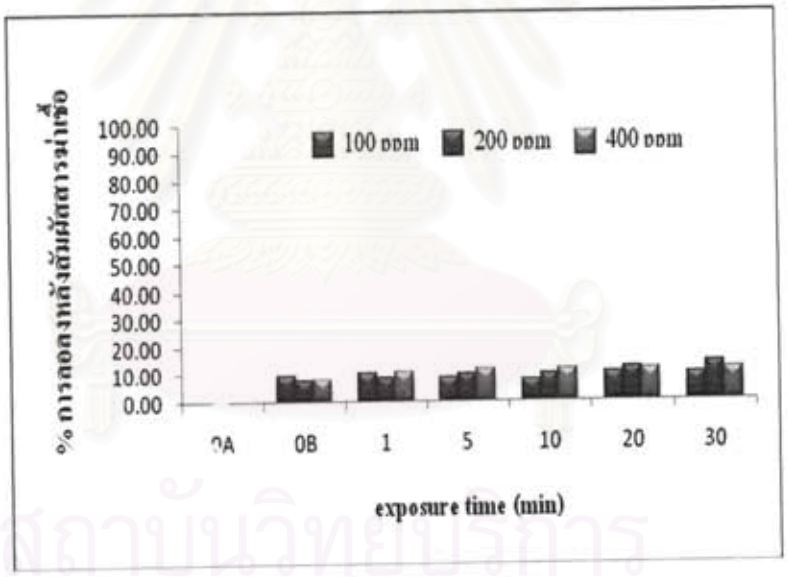
จากรูปที่ 4.23 จะเห็นว่าที่เวลา 0 นาที นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรก (0_A) จะเป็นเวลาที่ยังไม่ได้ทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ *S.* Anatum (เชื้อเริ่มต้น) ลงในสารละลาย sodium hypochlorite ส่วนช่วงที่สอง (0_B) จะเป็นเวลาที่ทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ *S.* Anatum ลงในสารละลาย sodium hypochlorite แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที พบว่า เชื้อมีปริมาณลดลงทันทีเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลาย *sodium hypochlorite* การสุ่มตัวอย่างเชื้อ ในแต่ละเวลานั้น จะทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อแล้วนำไปเติมลงในสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ที่ละลายอยู่ใน PBS บัฟเฟอร์ เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อที่เวลานั้นๆก่อนที่จะทำการ serial dilution เพื่อหาเซลล์ที่รอดชีวิตต่อไป

แต่เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของ sodium hypochlorite ในการทำลาย *S.* Anatum ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลง กล่าวคือ sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้น 100 ppm ไม่สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด ภายในระยะเวลา 30 นาที เหมือนกับที่ทำลายเชื้อที่แขวนลอยในสารละลายเกลือ โดยพบว่า ที่เวลา 1 นาที ประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ *S.* Anatum ของ sodium hypochlorite ลดลงร้อยละ10.33 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น (8.23±0.42 log CFU/mL) และเมื่อเพิ่มเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็น 30 นาที ก็ไม่สามารถทำลายเชื้อได้หมด พบว่าลดลงเพียงร้อยละ 10.09 เท่านั้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sodium hypochlorite เป็น 200 ppm ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ภายในระยะเวลา 30 นาทีได้เช่นกัน พบว่าที่เวลา 30 นาที หลังจากเซลล์ *S.* Anatum สัมผัสกับ sodium hypochlorite เซลล์ลดลงเพียงร้อยละ14.06 และเช่นเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sodium hypochlorite เป็น 400 ppm ซึ่งเพิ่มความเข้มข้นขึ้นอีกเท่าตัวแล้วก็ตาม ก็ยังไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที สามารถทำลายเซลล์ของ S. Anatum ได้ลดลงจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นเพียงร้อยละ11.62 เท่านั้น ดังรูปที่ 4.24

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของ sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm (รูปที่ 4.25) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันเลย เนื่องจากไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมดภายในระยะเวลาที่กำหนดคือ 30 นาที และร้อยละของการลดลงของเซลล์เมื่อสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อยังมีปริมาณต่ำ คือ สามารถลดลงได้มากที่สุดเพียงร้อยละ 14.06 หรือสามารถทำลายเซลล์ได้ไม่เกิน 1 log cycle



รูปที่ 4.24 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่รอดชีวิตภายหลังสัมผัส sodium hypochlorite ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28±1°C



รูปที่4.25 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBภายหลังสัมผัส sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ28±1 °C

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์ที่ปะปนในอาหาร โดยสารฆ่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ในสารละลายเกลือได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB มีรายงานว่าการใช้สารประกอบคลอรีน เช่นโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์สูงนั้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลาย

เชื้อจุลินทรีย์ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากคลอรีนบางส่วนจะทำปฏิกิริยา คลอริเนชันและออกซิเดชันกับหมู่อะมิโนของสารอินทรีย์ (Wei, Cook and Kirk., 1995) ดังนั้นการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์เพื่อทำลายเซลล์ของ *S.* Anatum ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จึงไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ เพราะสารอาหารต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ช่วยสนับสนุนให้เซลล์จุลินทรีย์รอดชีวิตและเจริญต่อไปได้ ดังนั้นการใช้สารประกอบคลอไรด์ซึ่งมีกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) เป็นองค์ประกอบสำคัญ จึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายน้ำเกลือได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

การที่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น100 200 และ 400 ppmไม่สามารถทำลายเชื้อ *S.* Anatum ได้หมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสลายตัวอย่างรวดเร็วของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการแตกตัวได้เป็นกรดไฮโปคลอรัส(HOCl) ซึ่งสามารถวัดได้จากปริมาณ available chlorine ที่มีอยู่ในน้ำนั้น มีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อ การสลายตัวของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ จะมีอัตรามากน้อยเพียงใดนั้นเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อการสลายตัวของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ คือค่า pH ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณ available chlorine พร้อมทั้งตรวจวัด pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงใน ตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ค่า pH และ ปริมาณของ available chlorine ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ในการทำลายเซลล์ *S.* Anatum ที่อุณหภูมิ 28±1 °C

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ppm)	ค่า pH	ปริมาณ available chlorine (ppm)
100	7.50±0.02	8.67±0.07
200	7.62±0.09	16.46±0.04
400	8.63±0.05	32.06±0.02

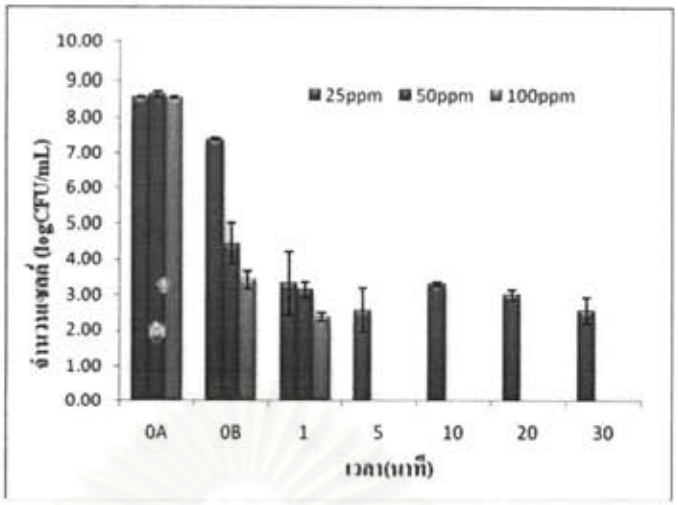
พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ 100 ppm มีค่า pH 7.50±0.02 โดยประมาณ และปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้มีค่า 8.67±0.07 ppm และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็น 200 ppm พบว่า มีค่า pH 7.62±0.09 และปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้มีค่า 16.46±0.04 ppm ซึ่งปริมาณคลอรีนเพิ่มขึ้นสองเท่าจากความเข้มข้นที่ 100 ppm และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็น 400 ppm พบว่ามีค่า pH อยู่ที่ 8.63±0.05 และ

ปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้มีค่า 32.06±0.02 ppm จากค่า pH และปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้นี้มีความสัมพันธ์ในการฆ่าเชื้อ

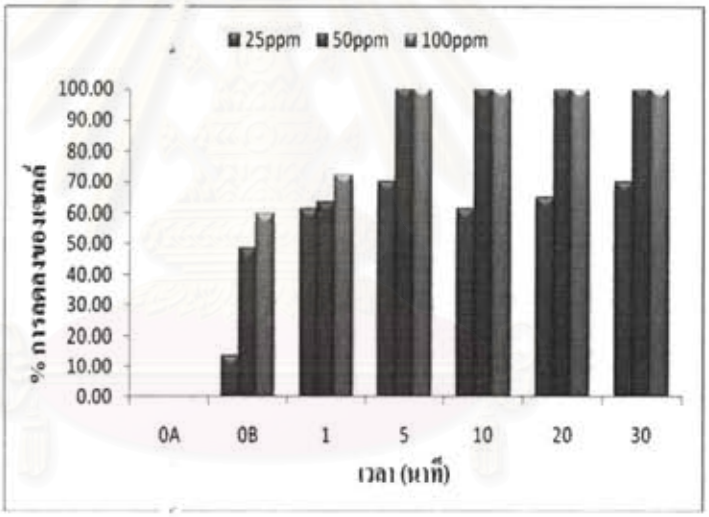
4.8.2 ประสิทธิภาพของ Proxitane® 5% ในการทำลาย *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ Proxitane® ในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 2 ชนิด คือ สารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 อาหารเลี้ยงเชื้อ และ TSB ผลการทดลองพบว่า เมื่อเซลล์ *S.* Anatum แขวนลอยอยู่ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และใช้ Proxitane® ที่ความเข้มข้น 25 ppm ไม่สามารถทำลายปริมาณเซลล์ของ *S.* Anatum ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้เมื่อครบเวลา 30 นาที พบว่าร้อยละของการลดลงมีค่า 70.01 เมื่อครบเวลา 30 นาที (รูปที่4.29) แต่เมื่อความเข้มข้นของ Proxitane® เป็น 50 ppm เวลา 5 นาทีก็เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายเกลือได้หมด และ Proxitane® 100ppm แม้จะทำลาย *Salmonella* ได้มากขึ้นกว่าที่ความเข้มข้น 50 ppm แต่ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้ทั้งหมดตั้งแต่นาทีแรก แต่สามารถทำลายเซลล์ได้ทั้งหมดหลังจากเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาทีเช่นกัน (รูปที่4.28)

เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นที่ 25 ppm ถึงแม้จะไม่สามารถทำลายเชื้อได้เมื่อครบเวลา 30 นาที แต่พบว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที สามารถทำลายเชื้อให้ลดลงได้ถึง 61.14 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตที่เวลา 1 นาที 3.33±0.89 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.57±0.02 log CFU/mL ในขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อได้ 100% หลังจากที่สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่น้อยกว่า 5 นาที (พิจารณาที่เวลา 1 นาที) พบว่าความเข้มข้นที่ 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 63.54% มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 3.15±0.21 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.64±0.08 log CFU/mL และที่ความเข้มข้น100 ppm สามารถทำลายให้ลดลงได้ 72.08 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 2.34±0.12 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.56±0.03 log CFU/mL และเป็นที่น่าสังเกตว่า ความเข้มข้นที่ 100 ppm เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 0_B (เวลาที่ทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ *S.* Anatum ลงในสารละลาย sodium hypochlorite แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อขึ้นทันที) สามารถลดปริมาณเซลล์ได้ถึง 59.81% เลยทีเดียว



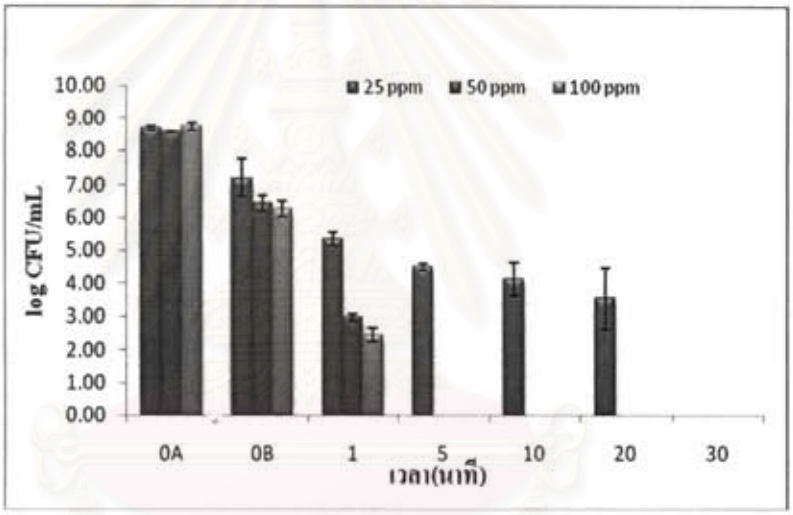
รูปที่4.26 จำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxitane® ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28±1°C



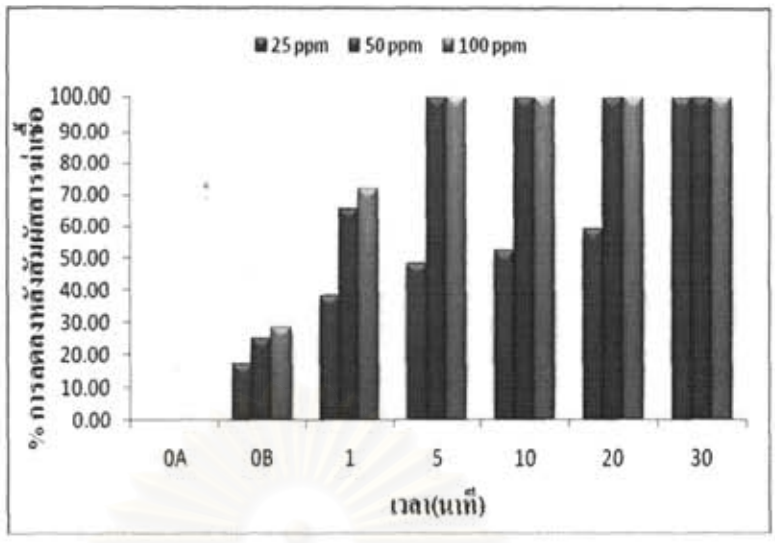
รูปที่4.27 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *S.* Anatum ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ภายหลังสัมผัส Proxitane® ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ28±1 °C

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของ Proxitane® ในการทำลาย *S.* Anatum ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB พบว่าที่ความเข้มข้น 25ppm สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมดได้ 100 % ในระยะเวลา 30 นาที จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.68±0.07 log CFU/mL และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Proxitane® เป็น 50 ppm พบว่าสามารถทำลายเซลล์ได้หมด 100 % ในเวลา 5 นาที เช่นเดียวกับความเข้มข้น 100 ppm ก็สามาะาทำลายเซลล์ได้หมดในเวลา 5 นาทีเช่นกัน (รูปที่ 4.30)

เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นที่ 25 ppm ถึงแม้จะสามารถทำลายเชื้อได้เมื่อครบเวลา 30 นาที แต่พบว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที สามารถทำลายเชื้อให้ลดลงได้ถึง 52.30% ในขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อที่แขวนลอยใน TSB ได้ 100% หลังจากที่สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่น้อยกว่า 5 นาที (พิจารณาที่เวลา 1 นาที) พบว่าความเข้มข้นที่ 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 65.34% มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 2.97±0.10 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.57±0.02 log CFU/mL และที่ความเข้มข้น100 ppm สามารถทำลายให้ลดลงได้ 72.00 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 2.45±0.21 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.75±0.12 log CFU/mL



รูปที่4.28 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของ *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxitane® ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28±1°C



รูปที่4.29 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ภายหลังสัมผัส Proxitane® ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28±1 °C

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ Proxitane® พบว่ามีค่า pH ค่อนข้างเป็นกรด ซึ่งแต่ละความเข้มข้นมีค่า pH ตามที่แสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ Proxitane® ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการวัดที่อุณหภูมิ 28±1 °C

ความเข้มข้นของ Proxitane® (ppm)	ค่า pH
25	3.86±0.02
50	3.63±0.01
100	3.47±0.01
400	3.14±0.05

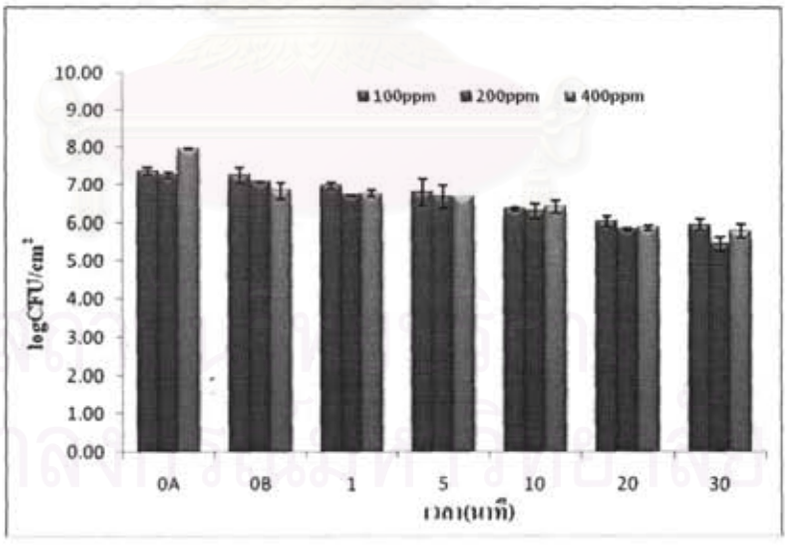
จากตารางที่ 4.6 จะเห็นว่าความเข้มข้นของ Proxitane® ที่ความเข้มข้นสูงจะมีค่า pHน้อยกว่าความเข้มข้นต่ำกว่า จึงอาจเป็นไปได้ว่าอิทธิพลของ pH อาจจะไปมีผลในการทำลายเซลล์ของ *S.* Anatum ได้ดีกว่า sodium hypochlorite ที่มีค่า pH เป็นเบส ก็เป็นได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

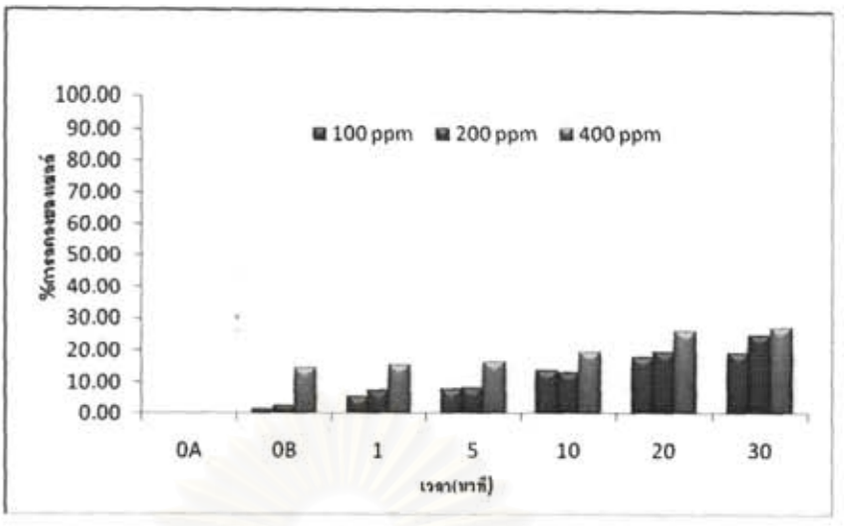
4.9 ผลการศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์ม

4.9.1 ประสิทธิภาพของ sodium hypochlorite ในการทำลายไบโอฟิล์ม

การทดสอบประสิทธิภาพของ sodium hypochlorite ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum บนพื้นผิวที่เป็น stainless steel ชนิด 304/2B ที่มีอายุ 24 ชั่วโมงโดยกำหนดความเข้มข้นของ sodium hypochlorite 3 ระดับคือ 100 200 และ 400 ppm โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับ sodium hypochlorite ที่อุณหภูมิ 28±1°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจไบโอฟิล์มของ *Salmonella* ในที่เวลา 0, 1, 5, 10, 20 และ 30 นาที ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้น 100 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ของไบโอฟิล์มได้ 19.29% ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต 5.92±0.14 log CFU/cm^2 จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น 7.36±0.11 log CFU/ cm^2 ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 200 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ของไบโอฟิล์มให้ลดลงได้เพียง 24.97% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต 5.44±0.18 log CFU/ cm^2 จากปริมาณเซลล์ไบโอฟิล์มเริ่มต้น 7.25 ±0.08 log CFU/ cm^2 และ ความเข้มข้นที่ 400 ppm พบว่าสามารถลดจำนวนเซลล์ไบโอฟิล์มได้เพียง 27.35% มีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตถึง 5.79±0.18 log CFU/ cm^2 จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น 7.97±0.02 log CFU/ cm^2 หลังจากที่สัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 30 นาที



รูปที่4.30 จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส sodium hypochlorite ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28±1 °C



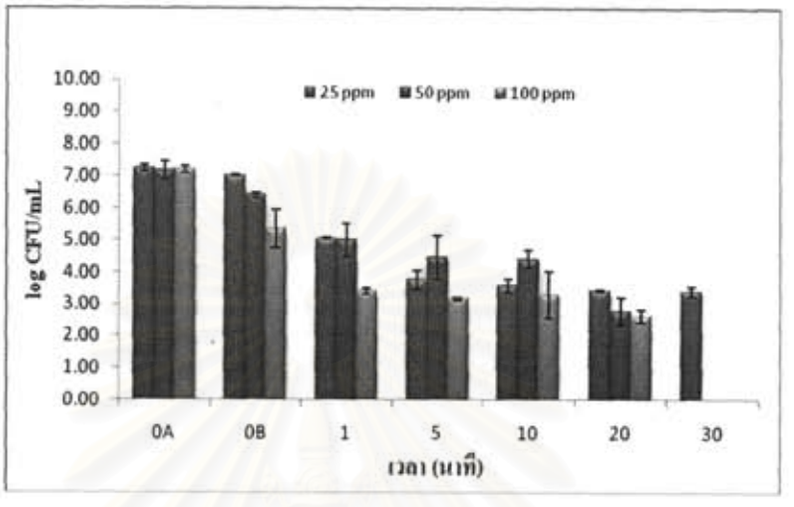
รูปที่4.31 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *Salmonella* biofilm บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส sodium hypochlorite ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28±1 °C

สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ นอกจากจะนิยมใช้ฆ่าเชื้อในผัก เช่น ผักกาดหอมแล้ว ยังนิยมใช้ฆ่าเชื้อในผลไม้และเมล็ดพืชด้วย จากรายงานการวิจัยพบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 200 ppm สามารถลดจำนวน *E. coli* บนผลแอปเปิ้ลได้ถึง 2 log cycle แต่พบว่าในกรณีของเมล็ดพืชที่ปนเปื้อน *E. coli* กลับพบว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1000 ppm ไม่สามารถลดจำนวน *E. coli* ได้ ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 2000 ppm แช่และล้างเป็นเวลา 3 หรือ 10 นาที จึงจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้

4.9.2 ประสิทธิภาพของ Proxitane® ในการทำลายไบโอฟิล์ม

การทดสอบประสิทธิภาพของ Proxitane® ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum บนพื้นผิวที่เป็น stainless steel ชนิด 304/2B โดยกำหนดความเข้มข้นของ Proxitane® 3 ระดับคือ 25 50 และ 100 ppm สำหรับการทดสอบกับ *Salmonella* biofilm อายุ 24 ชั่วโมง โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับ Proxitane® ที่อุณหภูมิ 28±1 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจ *Salmonella* ที่รอดชีวิตที่เวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ผลการทดลองพบว่า เมื่อครบ 30 นาที ที่ความเข้มข้น 25 ppm ปริมาณเซลล์ลดลงถึง 52.97% มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่เพียง 3.41±0.15 logCFU/cm^2 จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น 7.25±0.10 log CFU/cm^2 แต่ถึงอย่างไรก็ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 ppm พบว่าสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมด 100% ที่เวลา 30 นาที และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น

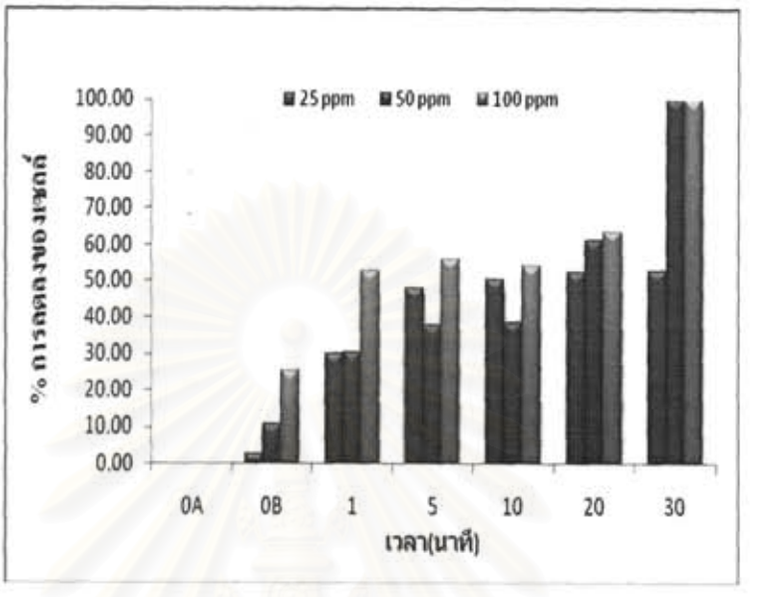
100 ppm พบว่ายังไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมด 100% ที่เวลาน้อยกว่า 30นาที (รูปที่ 4.32)



รูปที่4.32 จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxitane® ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28±1 °C

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Proxitane® ที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ความเข้มข้นพบว่า ความเข้มข้นที่ 25 ppm ต้องใช้เวลานานกว่า 30 นาที ในการทำลายไบโอฟิล์ม ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้นของ Proxitane® ที่ 50 และ 100 ppm แต่จากการทดลองพบว่าทั้งสองความเข้มข้นสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้ลดลง 100 % ที่ระยะเวลาเท่ากันคือ 30 นาที ดังนั้นจึงควรพิจารณาที่เวลาน้อยกว่า 30 นาที (พิจารณาที่ 20 นาที) พบว่า ความเข้มข้นที่ 50 ppm สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้ลดลง 61.25% มีปริมาณเซลล์ไบโอฟิล์มที่เหลือรอดชีวิต 2.79±0.44 log CFU/cm^2 จากปริมาณเซลล์ในไบโอฟิล์มเริ่มต้น 7.20±0.26 log CFU/cm^2 และความเข้มข้น 100 ppm ที่ เวลา 20 นาที สามารถทำลายเซลล์ไบโอฟิล์มได้ลดลง 63.52% มีปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต 2.63±0.21 log CFU/cm^2 จากปริมาณเซลล์ไบโอฟิล์มเริ่มต้น 7.21±0.11 log CFU/cm^2 ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นที่ 50 และ 100 ppm ที่ระยะเวลาในการทำลายเชื้อ 20 นาที แทบจะไม่มีความแตกต่างกันเลย ดังนั้นหากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารจะเลือกนำ Proxitane® ไปใช้ในการทำลายไบโอฟิล์มจาก *Salmonella* จึงควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 50 ppm เพราะจะช่วยประหยัดการใช้สารฆ่าเชื้อและช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ด้วย แต่ถ้าต้องการเวลาในการฆ่าเชื้อน้อยๆ ควรจะเลือก Proxitane® ที่ความเข้มข้น 100 ppm เพราะสามารถลดปริมาณเชื้อในไบโอฟิล์มได้

52.70 % ภายในเวลา 1 นาที เท่านั้น หรืออาจจะเพิ่มความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm ก็ได้ ซึ่งจากการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นที่ 400 ppm ก็เพียงพอในการทำลายเชื้อใน ไบโอฟิล์มได้ 100% ที่เวลา 0_B (ไม่ได้แสดงข้อมูล)



รูปที่4.33 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *Salmonella* biofilm บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxitane® ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28±1 °C

Byun และคณะ (2006) ได้ใช้ โซเดียมไฮไปคลอไรท์ในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เกาะติดเป็นไบโอฟิล์มบนพื้นผิวคอนเทนเนอร์ (container) ประเภท polypropylene (PP) polyethylene (PET) และ polycarbonate (PC) ร่วมกับการใช้รังสีแกมมา ซึ่งพบว่าการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 100-400 ppm ไม่สามารถทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas aeroginosa, L. monocytogenes* และ *E. coli* ให้ลดลงได้ ในขณะที่ รังสีแกมมา 3 kGy สามารถทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้มากกว่า

Rossoni และ Gaylarde (2000) เปรียบเทียบการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์และกรดเพอร์อะซิติก (peracetic acid) ต่อเซลล์ของ *E. coli, P. aeroginosa* และ *Staph. aureus* ที่เกาะบน stainless steel เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ กรดเพอร์อะซิติกความเข้มข้น 250 และ 1000 mgL^{-1} และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 100 และ 200 mgL^{-1} เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบเซลล์ที่รอดชีวิตภายใต้กล้อง epifluorescence microscopy พบว่า *P. aeroginosa* มีความสามารถในการเกาะได้ดีกว่า *E. coli* ในขณะที่ *Staph. aureus* เกาะบน stainless steel ได้น้อยที่สุด และโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ได้ดีกว่ากรดเพอร์อะซิติก

Fatemi และ Frank (1999) ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ สองชนิด ได้แก่ ไฮโปคลอไรท์ และ กรดเพอร์อะซิติก ในการทำลายไบโอฟิล์มที่เกิดจากเชื้อ *L. monocytogenes* และ *Pseudomonas* บนพื้นผิว stainless steel โดยจุ่มแผ่นทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์ม 48 ชั่วโมง ในสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิด ซึ่งพบว่ากรดเพอร์อะซิติกมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้มากกว่าคลอไรด์ ซึ่งลดจำนวนเซลล์ลงได้มากกว่า 3 log CFU/cm^2 ที่ความเข้มข้น 160 ppm หลังจากการสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที เช่นเดียวกับ Loukili และคณะ(2004) ที่ศึกษากรดกรดเพอร์อะซิติกในการทำลายไบโอฟิล์มก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่าเซลล์ *Salmonella* เกาะติดบนแผ่นทดสอบและเกิดเป็นไบโอฟิล์ม ซึ่งเซลล์ที่สะสมภายในไบโอฟิล์มนั้นมีการต้านทานสารฆ่าเชื้อได้ปีนอย่างดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะของไบโอฟิล์มมีเซลล์รวมกลุ่มกันอยู่หลายชั้น ประกอบกับมีการหลั่งสารเมือกเหนียวออกมาทำให้สารฆ่าเชื้อซึมผ่านเข้าไปทำลายได้ยาก และเมื่อเปรียบเทียบกับความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อของเซลล์อิสระที่แขวนลอยในอาหารจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าเซลล์ในสภาพสารละลาย จึงถูกทำลายด้วยสารฆ่าเชื้อได้ยากกว่าเซลล์อิสระ Kumar และ Anand (1998) ได้อธิบายไว้ว่าการที่เซลล์ภายในไบโอฟิล์มสามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อได้ดีกว่าเซลล์ในสารละลายนั้น เป็นเพราะเซลล์ภายในไบโอฟิล์มจะลดอัตราการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อผ่านเข้าไปภายในไบโอฟิล์ม เนื่องมาจากการสร้าง Exopolysaccharide substance (EPS) ออกมาซึ่ง EPS จะทำหน้าที่เป็นตัวลดการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อ เพราะEPS จะทำการดูดซับเอาไว้ก่อน และมีช่องทางที่ให้สารฆ่าเชื้อผ่านเข้าไปได้น้อย หรือแม้แต่ลักษณะทางกายภายของไบโอฟิล์มเมื่อเซลล์มีการรวมกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่ลักษณะทางโครงสร้างก็จะเป็นตัวขัดขวางการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อ และการสร้างเอนไซม์ออกมาลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อดังนั้นวิธีในการทำลายเซลล์ที่เกิดการรวมกลุ่มบนพื้นผิวสัมผัสอาหารนั้น จึงอาจจะต้องใช้วิธีการทางกายภาพเข้ามาช่วย เช่นในการทำความสะอาดจะต้องล้างทำความสะอาดสิ่งสกปรกออกไปก่อน แล้วจึงจะใช้ การขัด การถู เอาคราบจุลินทรีย์ออกไปควบคู่กับการใช้สารฆ่าเชื้อในการทำลายอีกครั้ง จึงจะทำให้การทำความสะอาดมีประสิทธิภาพมากที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. ในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/mL) เวลา 0 นาทีก็เพียงพอที่ทำให้ *S.* Anatum สามารถเกาะติดบนแผ่น stainless steel ได้ และถ้าเวลายิ่งนานมากขึ้น ก็สามารถตรวจพบ *S.* Anatum ได้มากยิ่งขึ้น โดยอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *S.* Anatum จากการทดลอง พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S.* Anatum สามารถเพิ่มจำนวนบนแผ่น stainless steel ได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 20 และ 15องศาเซลเซียส ตามลำดับ และน่าสังเกตว่าอุณหภูมิที่ ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส ก็ยังคงพบการเจริญของ *S.* Anatum ในสภาวะที่มีเชื้อน้อย (3 log CFU/mL) จะต้องอาศัยเวลาให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนถึงจะมีการตรวจพบได้

2. *S.* Anatum สามารถเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่น stainless steel ที่มีเกรดและพื้นผิวที่มีความเรียบความขรุขระแตกต่างกันออกไปได้ ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ stainless steel ให้เหมาะสมและถูกต้องกับลักษณะของงาน

3. อาหารเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ แต่จากการทดลองพบว่า ในสภาวะที่ไม่มีอาหารสำหรับการเจริญ *S.* Anatum ก็ยังคงมีชีวิตรอดได้อย่างน้อย 3 วัน และมีจำนวนมากพอที่จะปนเปื้อนไปกับผลิตภัณฑ์อาหารได้

4. การเลือกชนิดของสารฆ่าเชื้อเพื่อใช้ในการทำความสะอาดพื้นผิวสัมผัสอาหารมีความจำเป็นมาก ต้องเลือกให้มีความเหมาะสมกับลักษณะของงานที่จะใช้ทำความสะอาด จากการทดลองพบว่า โซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดีถ้าไม่มีสารอินทรีย์เข้ามาปะปน แต่เมื่อมีสารอินทรีย์ปะปนเข้ามา การฆ่าเชื้อจะต้องใช้เวลานานมากขึ้น ส่วนการทำลายไบโอฟิล์มของ *S.* Anatum ทั้งนี้ระยะเวลา 30 นาที ไม่เพียงพอในการทำลายไบโอฟิล์มทั้งนี้จะต้องใช้การขัดถูเข้ามาร่วมด้วย ส่วน peroxyacetic acid มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้เป็นอย่างดี สารอินทรีย์ไม่มีผลในการลดประสิทธิภาพของ peroxyacetic acid แต่ทั้งนี้จะต้องเลือกความเข้มข้นและระยะเวลาในการสัมผัสเชื้อให้เหมาะสม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเกิดเป็นไบโอฟิล์ม ได้แก่ ชนิดของพื้นผิวในการสัมผัสอาหาร เช่น ยาง พลาสติก และ ซีเมนต์ เพื่อเป็นการเลียบแบบพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ที่ประสบปัญหาการเกิดไบโอฟิล์ม หรือแม้กระทั่งจุลินทรีย์ที่เป็นปัญหาในโรงงานอุตสาหกรรม

2. ควรมีการศึกษาถึงอายุของไบโอฟิล์ม ที่มีผลต่อการต้านทานสารฆ่าเชื้อ เพราะผู้ทดลองเล็งเห็นว่า การศึกษาในเรื่องนี้ยังมีผู้สนใจศึกษาน้อย

3. ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อและเวลาในการสัมผัสสารของไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวสัมผัสอาหารต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมได้ แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ภายในไบโอฟิล์มด้วย เนื่องจากไบโอฟิล์มที่มีการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ผสมหลายชนิด (Mix biofilms) ซึ่งอาจมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อแตกต่างจากไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว (single biofilm) ดังที่มีการสร้างขึ้นในการทดลองนี้ จึงควรมีการทดลองสร้างไบโอฟิล์มที่มีจุลินทรีย์หลายชนิดเพื่อให้มีความใกล้เคียงกับไบโอฟิล์มในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล. 2549. ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำ อิเล็กโทรไลซ์ไน การทำลายฟิล์มชีวภาพของบาซิลลัส ซีเรียส สแตฟฟิโลคอกคัส ออเรียส และสปอร์เกาะติดของบาซิลลัส ซีเรียส บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรมการส่งออก, รายงานการส่งออกประจำปี. Online: http://www.depthai.go.th/TabID/300/Default.aspx?aOfficeID=225. วันที่ 14 กันยายน 2551.

บริษัทไทยน็อคซ์สตีล จำกัด. 2006. ข้อมูลเหล็กกล้าไร้สนิม. เอกสารแผยแพร่. ห้องสมุดคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุ่งทิวา อิศราวพร. 2541. การเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimurium. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักระบาดวิทยา. 2544. *รายงานการระบาดปี พ.ศ. 2544*. กรมควบคุมโรค. กระทรวงสาธารณสุข

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ กมล บุษบา อรุณ บ่างตระกูลนนท์ กษิดิศ อื้อเชียวชาญกิจ และ สุวิทย์ กิ่งแก้ว. 2548. การประเมินความเสี่ยงและการสร้างผู้เชี่ยวชาญด้านการประเมินความเสี่ยงสำหรับอันตรายประเภทจุลินทรีย์: *Salmonella* spp. ห้องสมุดคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Aissa, R.B., Al-Gallas, N., Troudi, H., Belhadj, N. and Belhadj, A. 2007. Trends in *Salmonella enterica* serotypes isolated from human, food, animal and environment in Tunisia, 1994-2004. *Journal of Infection*. 55: 324-339.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Vol.2. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

Arnold, J.W. and Bailey, G.W. 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poultry Science*. 79: 1839-1845.

Arnold, J.W. and Silvers S. 2000. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poultry Science*. 79: 1215-1221.

Aycicek, H., Ozuz, U., and Karci, K. 2006. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *International Journal Hygiene Environ-Health*. 209: 203-206.

Bonafonte, M.A., Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Montuenga, L., Garcia-Ros, D. and Gamazo, C. 2000. The relationship between glycogen systhesis, biofilm formatiom and virulence in *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiology. 19: 31-36.

Bower, C.K., McGuire, J. and Daeschel, M.A. 1996. The adhesion and detachment of bacteria and spore on food-contact surfaces: Review. *Trends in Food Science&Technology*. 7:152-157.

Byun, M.W., Kim, J.H., Kim, D.H., Kim H.J. and Jo, C. 2006. Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the microorganisms attached to a commercial food container. *Food Microbiology*. 24: 544-548.

Chmielewski, R.A.N. and Frank, J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 22-32.

Fatemi, P. and Frank, J.F. 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection*. 62(7): 761-765.

Food and Agriculture Organization (FAO)/ World Health Organization (WHO). 2002. Microbiological risk assessment series, 2. Food Safety Department. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva, Switzerland and Rome, Italy.

Fuster-Valls, N., Hernandez-Herrero, M., Marin-de-Mateo, M. and Rodriguez-Jerez, J.J. 2008. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*. 19: 308-314.

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

Giaouris, E.D. and Nychas, G.J.E. 2006. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*. 23: 747-752.

Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E., and Holah, J.T. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 87: 41-48.

Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y.Y., Gymoese, P. and Vogel, B. F. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18: 1165-1171.

Guobjornsdottir, B., Einarsson, H. and Thorkelsson, G. 2004. Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: Influence of stainless steel surface finish and presence of gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*.

http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2006/Ggb-en.html วันที่ 14 มิถุนายน 2551.

http://www.thainox.co.th/steelfacts_what_thai.htm วันที่ 14 มิถุนายน 2551.

Hilbert, L.R., Bagge-Rave, D , Kold, J., and Gram, L. 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 52: 175-185.

Hughes, C., Gillespie, I.A. and O'Brien, S.J. 2007. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. *Food Control*. 18: 766-772.

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.

Kaskova, A., Sokol, J., Vargova, M. and Chovance, M. 2006. Efficiency of sanitary treatment in poultry breeding and poultry meat processing plant. *ACTA VET*. 75: 611-617.

Kumar, G.C. 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.

Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C. and Beumer, R.R. 2003. Survival of foodbrone pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to food. *International Journal of Food Microbiology*. 85: 227-236.

Larson, E.L., Aiello, A.E., Gomez-duarte, C., Lin, S.X., Lee, L., Della-Latta, P. and Lindhardt, C. 2003. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. *Food Microbiology*. 20: 735-739.

Leuschner, R.G.K. and Zamparini, J. 2002. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* o157 and *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. *Food Control*. 13: 399-404.

Loukili, N.H., Becker, H., Harno, J., Bientz, M. and Meunier, O. 2004. Effect of peracetic acid and aldehyde disinfectants on biofilm. *Journal of Hospital Infection*. 58: 151-154.

Marriott N.G. 1994. Principles of Food Sanitation. 3rd ed. An Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg, Marryland.

Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. and Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact time. *Journal of Food Protect*. 53(9): 742-746.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Moreira, M.R., Ponce, A.G., Valle, C.E. and Roura, S.I. 2005. Inhibitory parameter of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*. 38: 565-570.

Mytle, N., Anderson, G.L., Doyle, M.P. and Smith, M,A. 2006. Antimicrobial activity of clove (*Syzgium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control*. 17: 102-107.

Oliveira, K., Olivera, T., Teixeira, P., Azerdo, J. and Olivera, R. 2007. Adhesion of *Salmonella* enteritidis to stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 318-323.

Oulahal, N., Brice, W., Martial, A. and Degraeve, P. 2008. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control*. 19: 178-185.

Peeters E., Nelis H.J, and Coenye T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 72: 157-165.

Pitts, B., Hamilto, M.A., Zelver, N. and Stewart, P.S. 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*. 54: 269-276.

Planchon, S., Leroy, S., Bellon-Fontaine, M.N., Fadda, S. and Talon, R. 2007. Surface properties and behavior on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food Microbiology*. 24: 44-51.

Pompermayer, D.M.C. and Gaylarde, C.C. 2000. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology*. 17: 361-365.

Poulsen, L.V. 1999. Microbial biofilm in food processing: review. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 32: 321-326.15.

Ramesh, N., Joseph, S.W., Carr, L.E., Douglass, L.W., and Wheaton, F.W. 2002. Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poultry Science.* 81: 904-910.

Rivas, L., Dykes, G.A. and Fegan, N. 2007. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *Journal of Microbiological Methods.* 69: 44-51.

Rode, T.M., Langsrud, S., Holck, A. and Moretro, T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology.* 116: 372-383.

Rossoni, E.M.M. and Gaylarde, C.C. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifiuorescence microscopy. *International Journal of Microbiology.* 61: 81-85.

Sakakibara, T., Murakami, S. and Imai, K. 2003. Enumeration of bacterial cell numbers by amplified firefly bioluminescence without cultivation. *Analytical Biochemistry.* 312: 48-56.

Scher K., Romling U. and Yaron S. 2005. Effect of heat, acidification and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Applied and Environmental Microbiology.* 1163- 1168.

Sharma, M. and Anand, S.K. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control.* 13: 469-477.

Sinde, E. and Carballo, J. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*. 17: 439-447.

Singh, A., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Singh, N. 2003. Efficacy of plant oils as antimicrobial agent against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensm.-Wiss Technology*. 36: 787-794.

Spoering, A.L. and Lewis, K. 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*. 183: 6746-6751.

Stepanovic, S., Cirkovic, I., Mijac, V. and Svabic-Volhovic, M. 2003. Influence of the incubation temperature , atmosphere and dynamic condition on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*. 20: 339-343.

Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L. and Svabic-Volhovic, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*. 38: 428-432.

Surdeau, N., Bouthors, S. and Gelle, M.P. 2006. Sensitivity of bacterial biofilms and planktonic cells to a new antimicrobial agent, Oxsil®320N. *Journal of Hospital Infection*. 62: 487-493.

Trachoo, N. 2003. Biofilms and the food industry: Review article. *Journal Science Technol*. 25(6): 807-815.

Verran, J. and Whitehead, K.A. 2006. Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. *Food and Bioproducts Processing*. 84: 260-264.

Vivas, J., Padilla, D., Real, F., Brovo, J., Grasso, V. and Acosta, F. 2008. Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Veterinary Microbiology*. 129: 150-155.

Wei, C., Cook, D.L. and Kirk, R. 1995. Growth and survival of *Salmonella* Montevideo on tomatoes and disinfections with chlorinated water. *Journal Food Protect.* 58 (8): 829-836.

Whitehead K.A., Smith L.A. and Verran J. 2008. The detection of food soils and cells on stainless steel using industrial methods : UV illumination and ATP bioluminescence. *International Journal of Food Microbiology*. 117: 25-34

Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I.M. and Mattila-Sandholm, T. 2001. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloid and Surfaces*. 20:37-50.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. Tryptic Soy Broth (TSB, Merck Laboratories, Darmstat, Germany)

Peptone from casein	17%
Peptone from soy meal	3.0%
D (+) glucose	2.5%
NaCl	5.0%
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5%
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 30 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลองและขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Tryptic Soy Agar

เตรียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB แล้วเติม Agar-agar (Merck Laboratories, Darmstat, Germany) ร้อยละ 1.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Nutrient Agar (NA, Merck Laboratories, Darmstat, Germany)

Peptone from meat	5.0	กรัม
Meat extracts	3.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD, Difco, France)

Yeast Extract	3.0	กรัม
L-Lysine	5.0	กรัม
Xylose	3.5	กรัม
Saccharose	7.5	กรัม
Sodium Desoxycholate	2.5	กรัม
Ferric Ammonium Citrate	0.8	กรัม
Sodium Thiosulfate	6.8	กรัม
Sodium Chlorine	5.0	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Phenol Red	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปใช้ตามที่ต้องการ (โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที)

5. Triple sugar iron agar (TSI, Merck Laboratories, Darmstat, Germany)

Peptone from casein	15.0	กรัม
Peptone from meat	5.0	กรัม
Meat extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Sodium chlorine	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม

D (+) Glucose	1.0	กรัม
Ammonium iron (III) citrate	0.5	กรัม
Sodium thiosulfate	0.5	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบเวลา นำหลอดมาเอียงทำเป็น slant

6. Salmonella-Shigella (SS) agar (Merck Laboratories, Darmstat, Germany)

Beef extract	5.0	กรัม
Proteose-peptone	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bactobile salt No.3	8.5	กรัม
Sodium citrate	8.5	กรัม
Ferric citrate	1.0	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Brilliant green	0.00033	กรัม
Neutral red	0.025	กรัม
D.W.	1	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 60 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปใช้ตามที่ต้องการ (โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที)

7. Lysine iron agar (LIA)

Peptone from meat	5.00	กรัม
Yeast extract	3.00	กรัม
D(+)glucose	1.00	กรัม
L-lysine monohydrochloride	10.0	กรัม
Sodium thiosulfate	0.04	กรัม
Ammonium iron(III) citrate	0.50	กรัม
Bromocresol purple	0.02	กรัม
Agar-agar	12.50	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบเวลา นำหลอดมาเอียงทำเป็น slant

8. Phosphate Buffer Saline (PBS, pH7.2)

Sodium chloride (NaCl)	7.650	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	0.210	กรัม
di-sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4)	0.724	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดละลายให้น้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น แบ่งใส่ขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9. สารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (Normal saline)

NaCl	8.50	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลองและขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite)

สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) เตรียมได้จากชั่งโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ตามความเข้มข้นที่ต้องการ เช่นถ้าต้องการโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 100 ppm ก็ให้ชั่งโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0.1000 กรัม (ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นต้น ส่วนสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นอื่นๆก็ใช้วิธีเดียวกัน

2, สารละลายกรดเปอร์ออกซีอะซีติก (Peroxyacetic acid); Proxitane® 5%

สารละลายกรดเปอร์ออกซีอะซีติกเตรียมจากสารผสมกรดเปอร์ออกซีอะซีติกทางการค้า (Proxitane® 5%, Peroxythai Ltd., Thailand) โดยเจือจางจากคำแนะนำของบริษัท ใช้ Proxitane® 5% 1 ส่วนละลายน้ำ 125 ส่วน จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 400 ppm จากนั้นปรับสัดส่วนตามความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตรให้ได้ความเข้มข้นของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก 25, 50 และ 100 ppm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine (Iodometric Method)

1. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (sodium thoisulfate) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

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

2. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ชั่งโพแทสเซียมไดโครเมต ปริมาณ 0.4904 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วทำให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. การ standardize สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (Conc. Sulfuric acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล 10 มิลลิลิตร ลงไป แล้วจึงเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) ปริมาณ 1 กรัม ปิดจุกยางเขย่า แล้วเก็บไว้ในที่มืด 6 นาที นำมาไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต เข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (นอร์มัล)} = \frac{10 \times \text{นอร์มัลของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต}}{\text{มิลลิลิตรของโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต}}$$

4. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate) ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล

เตรียมโดยปิเปตสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วทำปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ

4. สารละลายแป้ง

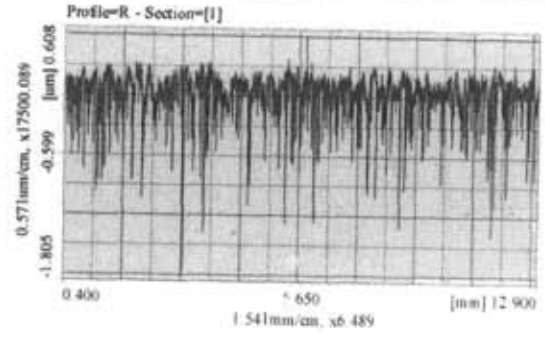
ชั่งแป้ง (Starch indicator) 1 กรัม ผสมกับน้ำเล็กน้อย แล้วเทลงในน้ำเดือดประมาณ 200 มิลลิลิตร คนแล้วทิ้งค้างคืน รินเอาส่วนใส เก็บโดยการเติมกรดซาลิไซลิก ปริมาณ 0.25 กรัมและซิงค์คลอไรด์ ปริมาณ 0.8 กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

กราฟแสดงค่า Roughness ของ Stainless steel ด้วยวิธี Surface roughness tester

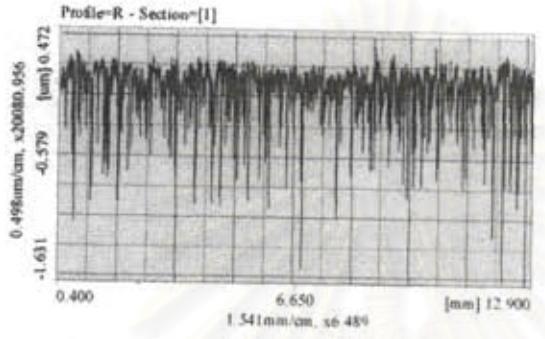
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



MTL/09/083
1. 304/2B Longitudinal

Parameter Sum Table

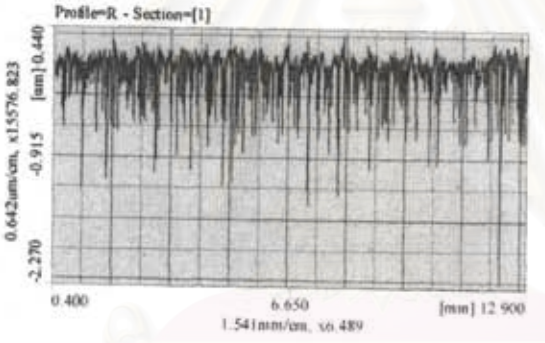
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.132	0.132
Ry (um)	1.663	1.663
Rz (um)	1.294	1.294



MTL/09/084
2. 304/2B Longitudinal

Parameter Sum Table

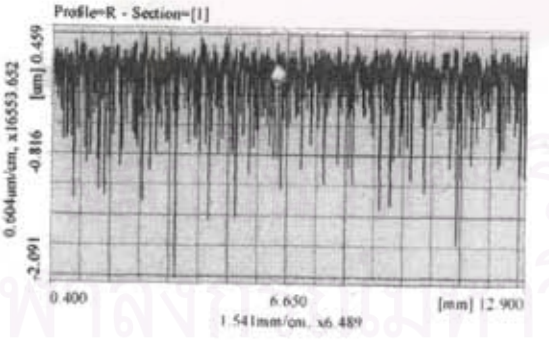
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.118	0.118
Ry (um)	1.494	1.494
Rz (um)	1.192	1.192



MTL/09/085
3. 304/2B Longitudinal

Parameter Sum Table

	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.129	0.129
Ry (um)	1.727	1.727
Rz (um)	1.242	1.242

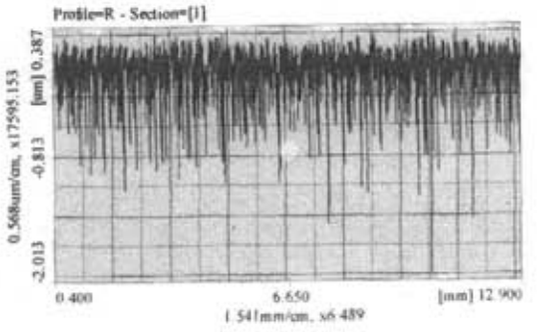


MTL/09/086
4. 304/2B Transverse

Parameter Sum Table

	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.140	0.140
Ry (um)	1.838	1.838
Rz (um)	1.471	1.471

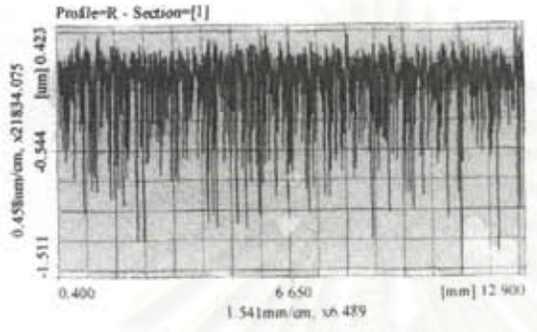
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



MTL/09/087
5. 304/2B Transverse

Parameter Sum Table

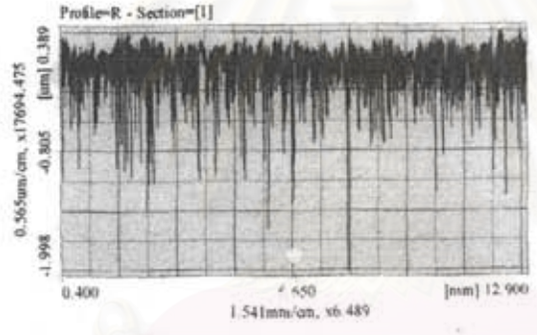
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.136	0.136
Ry (um)	1.669	1.669
Rz (um)	1.314	1.314



MTL/09/088
6. 304/2B transverse

Parameter Sum Table

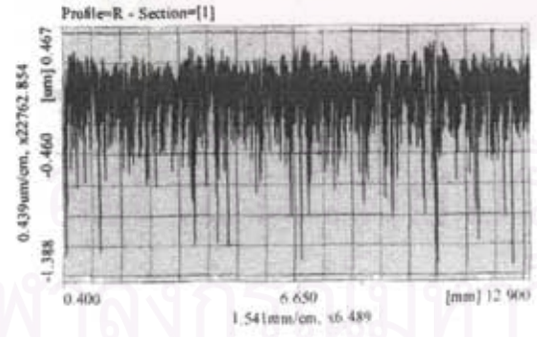
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.137	0.137
Ry (um)	1.559	1.559
Rz (um)	1.352	1.352



MTL/09/089
7. 316L/2B Longitudinal

Parameter Sum Table

	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.149	0.149
Ry (um)	1.714	1.714
Rz (um)	1.338	1.338

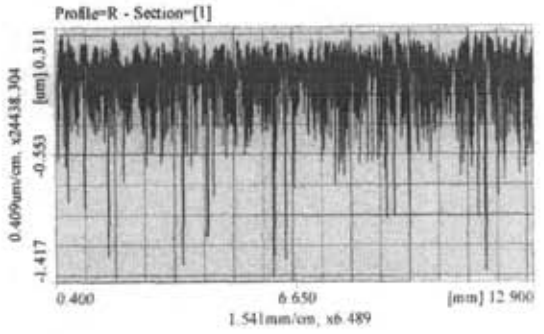


MTL/09/090
8. 316L/2B Longitudinal

Parameter Sum Table

	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.145	0.145
Ry (um)	1.564	1.564
Rz (um)	1.235	1.235

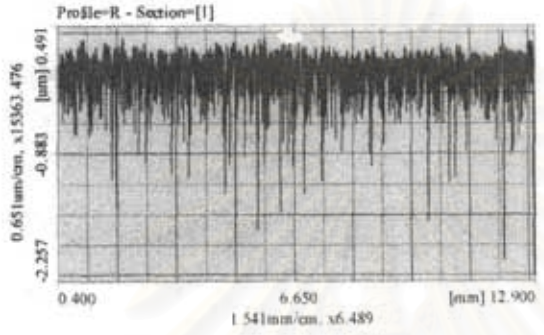
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



MTL/09/091
9. 316L/2B Longitudinal

Parameter Sum Table

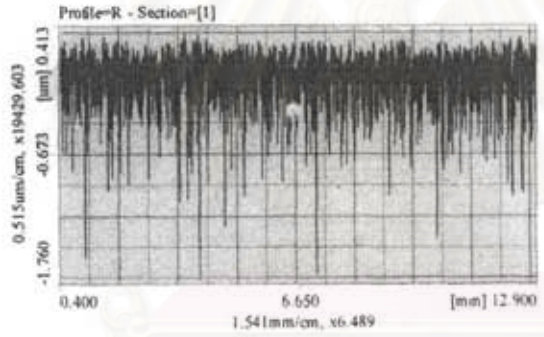
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.135	0.135
Ry (um)	1.498	1.498
Rz (um)	1.192	1.192



MTL/09/092
10. 316L/2B Transverse

Parameter Sum Table

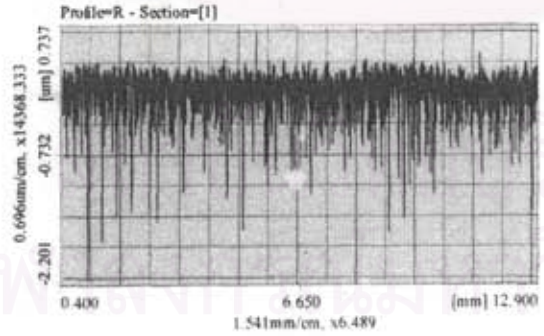
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.162	0.162
Ry (um)	2.116	2.116
Rz (um)	1.532	1.532



MTL/09/093
11. 316L/2B Transverse

Parameter Sum Table

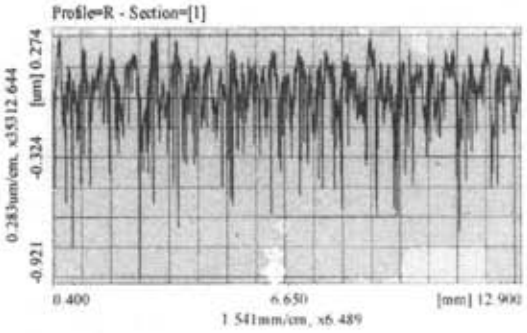
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.155	0.155
Ry (um)	1.770	1.770
Rz (um)	1.316	1.316



MTL/09/094
12. 316L/2B Transverse

Parameter Sum Table

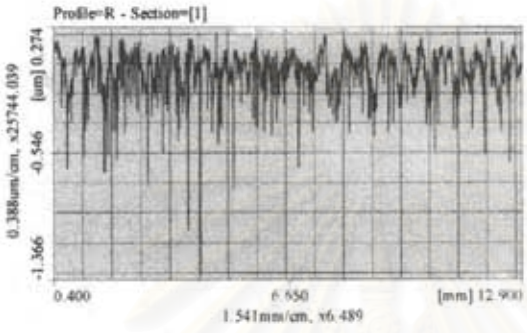
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.172	0.172
Ry (um)	1.994	1.994
Rz (um)	1.562	1.562



MTL/09/095
13. 430/2B Longitudinal

Parameter Sum Table

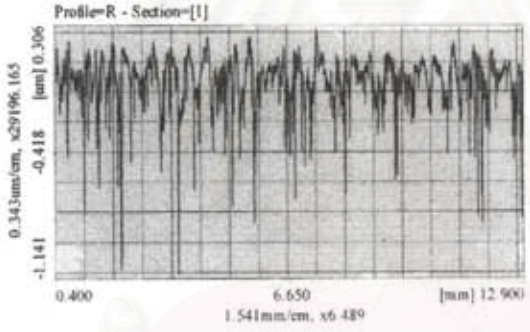
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.088	0.088
Ry (um)	0.893	0.893
Rz (um)	0.728	0.728



MTL/09/096
14. 430/2B Longitudinal

Parameter Sum Table

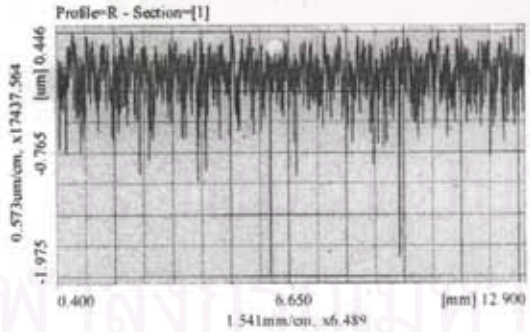
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.090	0.090
Ry (um)	0.970	0.970
Rz (um)	0.752	0.752



MTL/09/097
15. 430/2B Longitudinal

Parameter Sum Table

	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.094	0.094
Ry (um)	1.113	1.113
Rz (um)	0.828	0.828

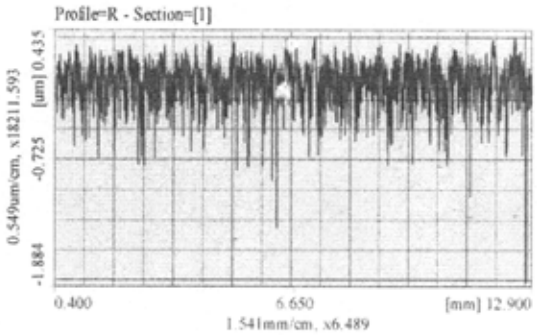


MTL/09/098
16. 430/2B Transverse

Parameter Sum Table

	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.145	0.145
Ry (um)	1.647	1.647
Rz (um)	1.151	1.151

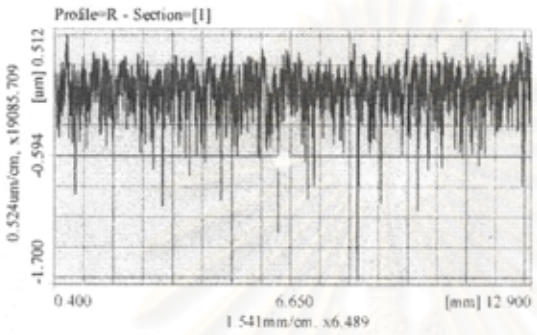
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



MTL/09/099
17. 430/2B Transverse

Parameter Sum Table

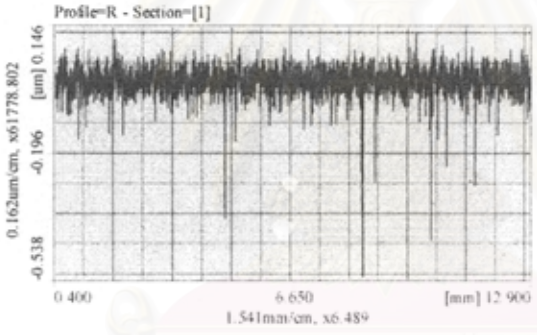
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.134	0.134
Ry (um)	1.446	1.446
Rz (um)	1.101	1.101



MTL/09/100
18. 430/2B Transverse

Parameter Sum Table

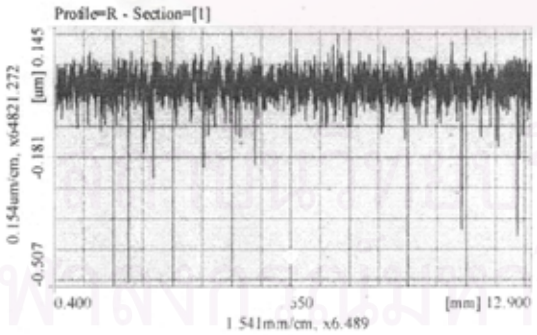
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.138	0.138
Ry (um)	1.509	1.509
Rz (um)	1.112	1.112



MTL/09/101
19. 304/BA Longitudinal

Parameter Sum Table

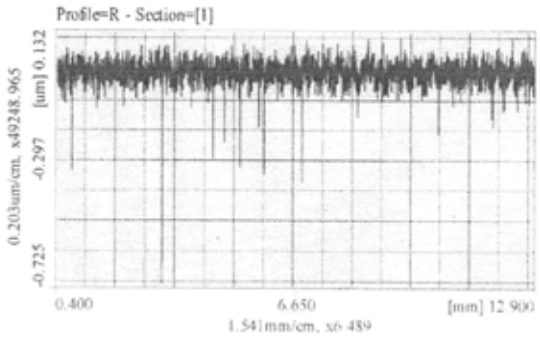
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.022	0.022
Ry (um)	0.401	0.401
Rz (um)	0.284	0.284



MTL/09/102
20. 304/BA Longitudinal

Parameter Sum Table

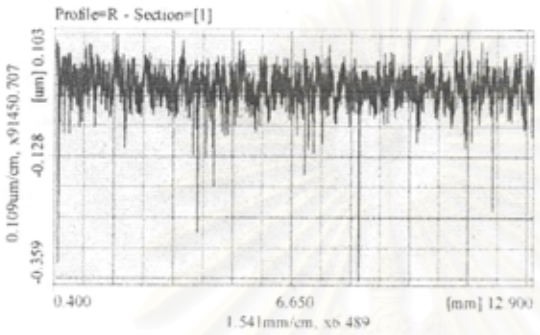
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.022	0.022
Ry (um)	0.393	0.393
Rz (um)	0.253	0.253



MTL/09/103
21. 304/BA Longitudinal

Parameter Sum Table

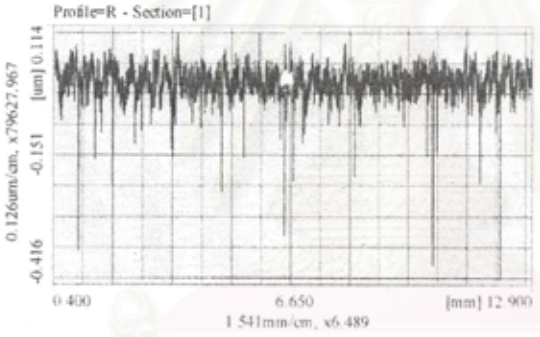
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.022	0.022
Ry (um)	0.457	0.457
Rz (um)	0.284	0.284



MTL/09/104
22. 304/BA Transverse

Parameter Sum Table

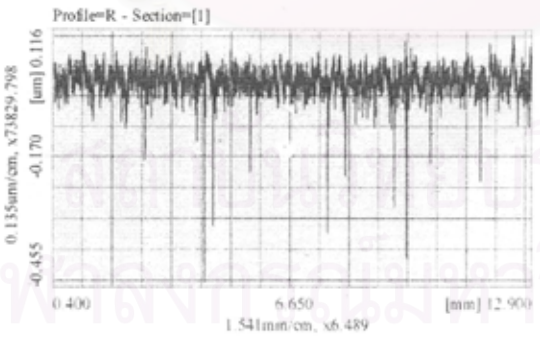
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.020	0.020
Ry (um)	0.342	0.342
Rz (um)	0.206	0.206



MTL/09/105
23. 304/BA Transverse

Parameter Sum Table

	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.020	0.020
Ry (um)	0.417	0.417
Rz (um)	0.241	0.241



MTL/09/106
24. 304/BA Transverse

Parameter Sum Table

	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.019	0.019
Ry (um)	0.394	0.394
Rz (um)	0.233	0.233

กราฟแสดงการหาค่า Roughness ของ stainless steel ชนิดต่างๆ

การตั้งค่า Conditions เพื่อการทดสอบแผ่น stainless steel ชนิดต่างๆ

Measurement Condition

Measurement Length	15.0 mm	Measurement Start Position	0.0 mm
Column Escape	5.0 mm	Measurement Axis Escape	Return
Auto-Leveling	Off	Range	800.0 um
Speed	0.1 mm/s	R-Surface Auto-Measurement	Off
Over Range	Abort	Stylus Start Position	0.0 um
Pitch	1.0 um	Number of Points	15000
Machine	SV-3000S4	Measurement Axis	Drive Unit(100mm)
Detector	Detector(0.75mN)	Stylus	Standard (12AAC731-12AAB355)
Polar Reversal	Off	Straightness Compensation	Off
Arm compensation	Off	Stylus Radius Compensation	Off
Auto-Notch(+)	Off	Auto-Notch(-)	Off
Compensation Method	Off		

Evaluate Condition List<<Profile=R - Section=[1]>>

Standard	OLDMIX
Kind of Profile	R
Smplg Length(lc)	2.5 mm
No of Smplg(nle)	5
Lc	0.8 mm
Kind of Filter	Gaussian
Evltn Length(lm)	12.5 mm
Pre-Travel	0.4 mm
Post-Travel	0.4 mm
Smooth Connection	Off
Mean Line Compensation	Off

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

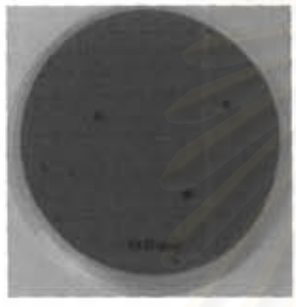
ภาคผนวก ฉ
การทดสอบยืนยัน *Salmonella*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

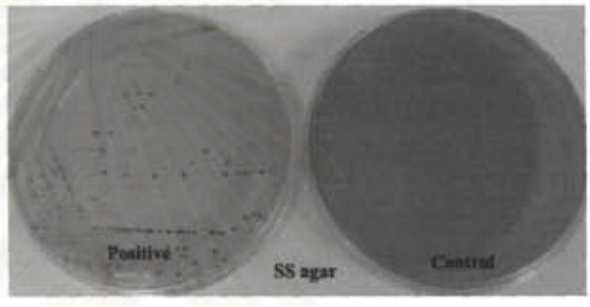
ภาคผนวก ฉ

การทดสอบยืนยัน *Salmonella*

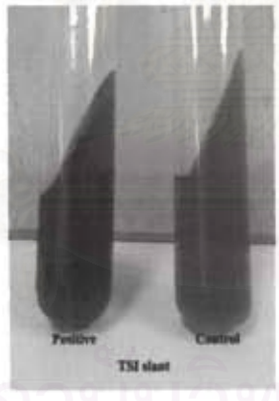
ทำการทดสอบยืนยัน เซลล์ของ *Salmonella* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยทำการเขี่ยเชื้อมาย้อมสี (Gram's stain) ส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อเป็นการทดสอบเบื้องต้น จากนั้นจึงทดสอบบนอาหารเฉพาะ (Selective media) เช่น XLD agar (A) และ SS agar (B) และยืนยันผลทางชีวเคมี ด้วยอาหาร TSI (C) และ LIA (D)



(A)



(B)



(C)

(D)

A) ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* ที่เจริญบนอาหาร XLD agar จะให้ โคโลนีสีดำ

B) ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* ที่เจริญบนอาหาร SS agar จะให้โคโลนีสีดำ อาหารเลี้ยงเชื้อ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม

C) การเปลี่ยนแปลงของอาหาร TSI slant; positive จะให้ผลเป็น acid butt / alk. slant และผลิต H_2S เมื่อเปรียบเทียบกับ control

D) การเปลี่ยนแปลงของอาหาร LIA slant ; positive จะให้ผลเป็นดังแสดงในภาพเมื่อเปรียบเทียบกับ control