บทที่ 3

การควบคุมจุลินทรีย์ทางกายภาพ

การใช้สภาวะการณ์ทางกายภาพเพื่อควบคุมจุลินทรีย์

ในทางปฏิบัติใช้อยู่ 3 ประเภท คือ

3.1 **ความร้อน** การใช้ความร้อนเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) นั้นทำได้ 3 ทาง คือ โดยใช้ไอน้ำหรือน้ำร้อน (moist heat) โดยการอบในตู้อบนาน ๆ (dry heat) และโดยการเผาไหม้ (incineration) สำหรับการเผาไหม้นี้จะต้องใช้วิจารณญาณเอาเองว่าสิ่งใดควรจะเผาไหม้ และจะต้องดูให้สิ่งนั้นเผาไหม้จนหมดไม่เป็นควันหรือขี้เถ้าที่ทำให้มลภาวะทางอากาศเสียไป

3.1.1 ความร้อนชื้น (moist heat)

(1) การต้ม (boiling) ใช้ในการถนอมอาหาร และทำให้เครื่องมือบางอย่างปราศจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค แต่จะต้องจำไว้ว่าสปอร์ของแบคทีเรีย (family Bacillaceae) อาจจะยังมีชีวิตอยู่ถึงแม้จะต้มเป็นชั่วโมงแล้วก็ตาม โดยทั่ว ๆ ไปในการฆ่าจุลินทรีย์(disinfect)เครื่องครัวใช้ต้มเพียง 5 นาทีก็เพียงพอแล้ว ถ้าจุลินทรีย์ได้รับการสัมผัส (contact) กับน้ำร้อน แต่ในการทำให้วัตถุปราศจากเชื้อจริง ๆ จะใช้วิธีนี้ไม่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าสถานที่นั้นอยู่สูงกว่าระดับน้ำทะเล (เนื่องจากน้ำจะเดือดที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 °ซ)

(2) ไอน้ำ (steam) มักจะใช้กับภาชนะที่มีฝาปิดหลวม ๆ ซึ่งจะทำให้ไอน้ำอยู่ในนั้นโดยไม่มีความดัน น้ำเดือด และไอน้ำมักจะมีอุณหภูมิไม่สูงกว่า 100°ซ

Tyndallization หรือ fractional sterilization เป็นวิธีการทำให้ปราศจากเชื้อซึ่งคิดขึ้นโดย John Tyndall ทำโดยใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 100°ซ ฆ่าเชื้อเป็นเวลา 3-4 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง แต่ละครั้งจะต้องเว้นระยะเวลาห่างกัน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพื่อต้องการให้สปอร์งอกออกมาเป็นเซลธรรมดา ซึ่งจะฆ่าได้ง่ายที่อุณหภูมิ 100°ซ ข้อดีของวิธีนี้คือ ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก ส่วนข้อเสียคือต้องใช้เวลานานในการทำให้ปราศจากเชื้อแต่ละครั้ง นอกจากนี้ถ้าของเหลวนั้นเป็นน้ำ สปอร์

016394

ก็อาจจะงอกไม่ดีนัก หรือถ้าเป็นสปอร์ที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic spores) ก็จะไม่งอกถ้าได้รับอากาศ ในทางกลับกันสปอร์ที่ต้องการอากาศ(aerobic spores) ก็จะไม่งอกถ้าขาดอากาศ

(3) ไอน้ำภายใต้ความดัน (steam under pressure) เป็นการฆ่าจุลินทรีย์โดยใช้หม้อนึ่งความดัน(autoclave) ไอน้ำที่อยู่ภายใต้ความดันสูงจะร้อนกว่าน้ำเดือดหรือไอน้ำธรรมดา ยิ่งความดันสูงขึ้นเท่าไร อุณหภูมิก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย (ตารางที่ 3.1)

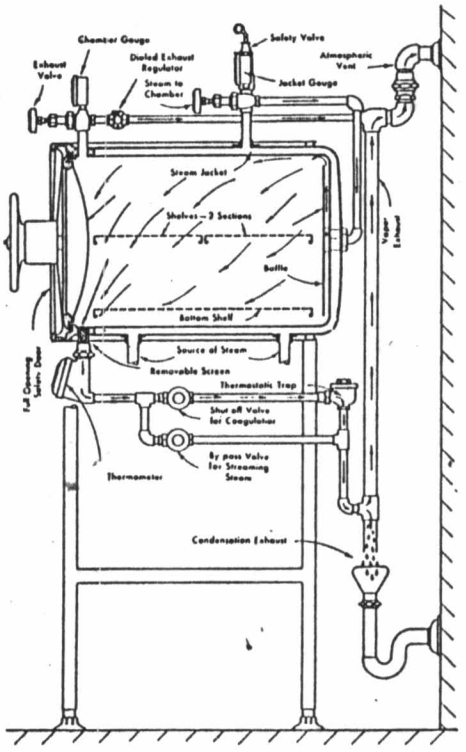
ตารางที่ 3.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความดันของไอน้ำในหม้อนึ่งความดัน

ความดัน (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)	อุณหภูมิ	
	°ซ	°ฟ
0	100	212
5	109	228
10	115	240
15	121	250
20	126	259
25	130	267
30	135	275

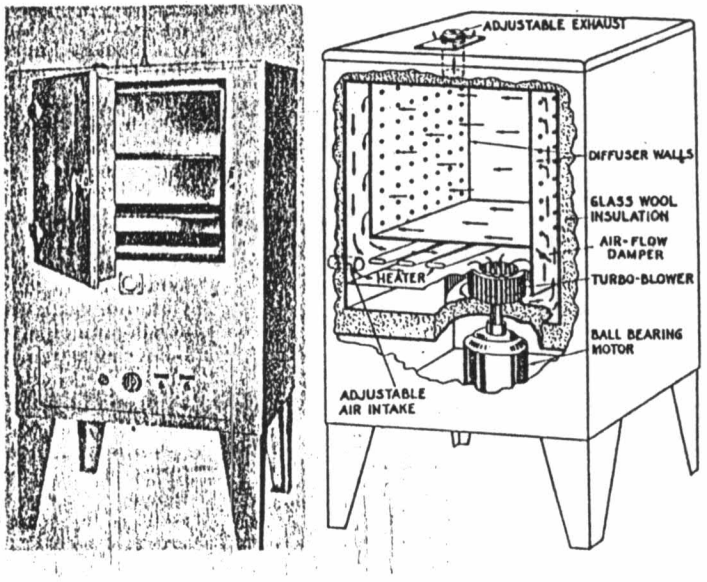
จะเห็นว่าที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิจะขึ้นสูงถึง 121 °ซ แต่ถ้าไอน้ำปนกับอากาศด้วยปริมาณเท่า ๆ กัน ที่ความดันเดิม อุณหภูมิจะลดลงเหลือ 110 °ซ และถ้าอากาศมีถึง 2/3 ส่วน ก็จะทำให้อุณหภูมิลดลงเป็น 109 °ซ เท่านั้น ดังนั้นในการใช้หม้อนึ่งความดันจึงจำเป็นต้องเปิดวาลว์ (valve) (แสดงรูปที่ 3.1) เพื่อให้อากาศออกไปหมดก่อนที่จะให้ความดันสูงขึ้น เทอร์โมมิเตอร์ที่ติดอยู่บนหม้อนึ่งความดันจะเป็นตัวสำคัญเกี่ยวกับวิธีการใช้เครื่องมือนี้ อย่าดูที่เครื่องวัดความดัน และ วาล์วนิรภัย (safety valve) ซึ่งมีไว้เพื่อความปลอดภัยในเวลาใช้เครื่องเท่านั้น

โดยทั่ว ๆ ไปในการนึ่งเครื่องมือเพื่อฆ่าเชื้อ และของเหลวบางอย่างจะใช้อุณหภูมิ 115°ซ - 125°ซ เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นแล้วจะต้องปล่อยให้ความดันลดลงอย่างช้าๆ มิฉะนั้นของเหลวที่อยู่ในหลอดทดลองจะเดือดล้นขึ้นมาปนจุก แต่ถ้าหลอดทดลองนั้นมีจุกปิดแน่น หลอดก็จะแตก ถ้าเป็นของแข็งขนาดใหญ่จะต้องใช้เวลานึ่งฆ่าเชื้อนาน เพื่อให้ความร้อนซึมเข้าไปข้างในด้วย ถ้าสิ่งที่ต้องการทำให้ปราศจากเชื้อเป็นพวกน้ำมันแร่ ,ปิโตรเลียม, ทราย, วัตถุแห้งที่อยู่ในขวดปิด หรือวัตถุที่ไอน้ำซึมเข้าไปไม่ได้ สิ่งเหล่านี้ไม่สมควรที่จะใช้วิธีหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิอาจจะขึ้นสูงถึง 125°ซ แต่เมื่อไม่มีความชื้นก็จะไม่มีผลร้ายแรงต่อจุลินทรีย์ ดังนั้นสิ่งเหล่านี้ควรจะทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้วิธีอบในตู้อบ

ไดอะแกรมของหม้อนึ่งความดันดังรูปที่ 3.1 ไอน้ำจะเข้าทาง jacket ซึ่งอยู่ใต้ cylinder แล้วจึงผ่านขึ้นข้างบนโดยท่อที่ติดอยู่ wheel valve จะเป็นทางให้ไอน้ำเข้าสู่ inner chamber ส่วน safety valve จะเป็นตัวที่บอกว่าค่าความดันใน jacket ไอน้ำจะเข้า inner chamber ที่ทางด้านขวาของไดอะแกรม และจะกระจายเต็มส่วนบน ความดันของส่วนนี้จะปรากฏบน chamber gauge ไอน้ำอาจจะปล่อยออกได้อย่างรวดเร็ว โดยทาง exhaust valve นี้ปิดไอน้ำจะดันอากาศที่อยู่ในส่วนล่างออกไปทางด้านล่าง (ซ้าย) ทำให้เทอร์โมมิเตอร์ที่ติดอยู่แสดงอุณหภูมิที่แท้จริง เมื่ออากาศผ่านออกไปแล้ว และมีไอน้ำผ่านตามออกมา ถ้าเปิด by-pass valve ไอน้ำที่จะถูกปล่อยออกมา และความดันก็จะไม่สูงขึ้น ถ้าปิด by-pass valve และเปิด Shut-off valve ไอน้ำก็จะผ่านไปยัง thermostatic trap ซึ่งความดันจะทำให้รูต่างๆ ปิด และความดันใน chamber ก็จะสูงขึ้น อย่างไรก็ดีก่อนที่เราจะปิด by-pass valve ก็ควรจะเปิดให้ไอน้ำผ่านออกสัก 1-2 นาทีก่อน



รูปที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบหม้อนึ่งความดัน



รูปที่ 3.2 แสดงรูปตู้อบ

3.1.2 การเผาไหม้ (incineration) เป็นการฆ่าจุลินทรีย์ที่ติดอยู่กับเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติ เช่น เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) โดยใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์ หรือ ตะเกียงบุนเซน

3.1.3 ความร้อนแห้ง (dry heat) ใช้ในการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ตู้อบ (oven) (แสดงรูปที่ 3.2) สิ่งที่จะใช้อบจะต้องเป็นของแห้ง และจะต้องไม่มีการเสียหายจากการอบด้วยความร้อนนาน ๆ เช่น เครื่องแก้ว เครื่องมือต่าง ๆ น้ำมันแร่ ปิโตรเลียม แป้ง ฝุ่น ฯลฯ ในการอบจะต้องใช้ความร้อนสูงมาก (165 °ซ - 170 °ซ หรือ 329°ฟ - 338°ฟ) จึงจะฆ่าสปอร์ได้ ตามปกติจะอบที่อุณหภูมิ 165° ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือนานกว่านั้นซึ่งจะทำให้กระดาษห่อเครื่องแก้วกลายเป็นสีน้ำตาล ผ้า หรือ เชือกที่ใช้ห่อและผูกวัสดุจะเป็นสีเหลืองอ่อน

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน

ปริมาณของจุลินทรีย์ที่ตายเมื่อเราใช้ความร้อน (heat) แต่ละครั้งนั้นมีสาเหตุมาจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น

(1) อุณหภูมิ

(2) จำนวนจุลินทรีย์ ถ้าจุลินทรีย์มีจำนวนมากจะต้องให้ความร้อนนานกว่าจุลินทรีย์จำนวนน้อย นอกจากนี้ถ้าเป็นสปอร์ก็จะทนความร้อนได้ดีกว่าเซลธรรมดา

(3) ชนิดของจุลินทรีย์ แต่ละชนิดทนความร้อนได้ดีไม่เท่ากัน T. pallidum ต้นเหตุของโรคซิฟิลิส จะถูกฆ่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 41.5 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ส่วนใหญ่จะถูกฆ่าภายใน 10-15 นาที ที่ 60°ซ- 65°ซ

(4) สารอาหาร (medium) เช่น สารจำพวกโปรตีน ไขมัน และสารอื่นที่ละลายอยู่ในสารละลาย จะช่วยป้องกันจุลินทรีย์จากความร้อน ดังนั้นถ้าสารอาหารมีสารเหล่านี้มาก ก็จะทำให้ thermal death point ของจุลินทรีย์สูงขึ้น ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ผลของสารอาหาร (medium) ที่มีผลต่อ thermal death point ของ Escherichia coli

Medium	Thermal Death Point (°C)
Cream	73
Whole milk	69
Skim milk	65
Whey	63
Broth	61

(5) พีเอช(pH) โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะทนความร้อนได้ดีที่พีเอชที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นั่นคือที่พีเอชใกล้เคียงกับ 7.0 แต่ถ้าสารอาหารเป็นกรดหรือด่างก็จะฆ่าจุลินทรีย์ได้เร็วขึ้น ยกตัวอย่าง เช่น death time ของ C.tetani ที่ 100°ซ คือ 30 นาทีที่พีเอช 7 แต่ที่พีเอช 6 หรือ 8 จะเหลือเพียง 15 นาทีเท่านั้น

3.2 การกรอง (filtration)

เครื่องกรองหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในทางจุลชีววิทยา เพื่อใช้ในการกำจัดแบคทีเรียจากของเหลวที่ไม่สามารถทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อนหรือสารเคมีใด ๆ โดยที่ไม่ทำลายสภาพธรรมชาติของของเหลวนั้น ของเหลวที่ผ่านเครื่องกรองนี้จะไม่ sterilize เนื่องจากไวรัสและ bacteriophage สามารถผ่านเครื่องกรองได้ แต่ถ้าต้องการจะกำจัดไวรัสด้วย จะต้องใช้เครื่องกรองชนิดพิเศษซึ่งมีขนาดของรูเล็กมาก จนไวรัสผ่านไม่ได้

เครื่องกรองที่ใช้กันทั่วไปมี 3 ชนิดคือ

(1) Seitz filter ใช้แผ่นกรองทำด้วย asbestos fiber

(2) Hollow tube หรือ candle filter จะมีแท่งกรองอยู่ตรงกลาง แท่งกรองนี้ทำด้วย diatomaceous earth (Berkefeld filter) หรือ unglazed porcelain (Chamberland-Pasteur filter)

(3) Sintered glass filter ใช้แผ่นของ fused powdered glass กรอง ที่น่าสนใจคือ เครื่องกรองทั้ง 3 ชนิดนี้มีรูขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย แต่ประสิทธิภาพของเครื่องกรองจะขึ้นกับการดูดแบคทีเรีย (ซึ่งมีประจุลบ) ติดกับผิวของแผ่นกรอง (ซึ่งมีประจุบวก)

เครื่องกรองที่มีประโยชน์และใช้กับงานได้แทบทุกชนิด คือ membrane filter ซึ่งทำด้วย cellulose acetate หรือสารอย่างอื่นที่ใกล้เคียง ที่พบบ่อยที่สุด จะเป็นแผ่นกลม ลักษณะคล้ายกระดาษ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร และหนา 0.1 มิลลิเมตร แผ่นกรองนี้จะมีรูขนาดต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ขนาดใหญ่ทางด้านบน จนถึงขนาดเล็กมากทางด้านล่าง รูทางด้านล่างจะมีขนาดเล็กกว่า 0.005 นาโนเมตร และสามารถกรองไวรัสไว้ได้

Membrane filter ไม่เหมือนกับเครื่องกรองอย่างอื่นที่ได้กล่าวแล้วคือประสิทธิภาพจะขึ้นกับขนาดของรู และมีข้อดีคือ จุลินทรีย์ที่อยู่ในของเหลวที่มีปริมาณมาก เช่น น้ำ นม ปัสสาวะ เลือด จะติดอยู่บนแผ่นกรอง ซึ่งสามารถจะนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ทันที หรือมิฉะนั้นก็นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้

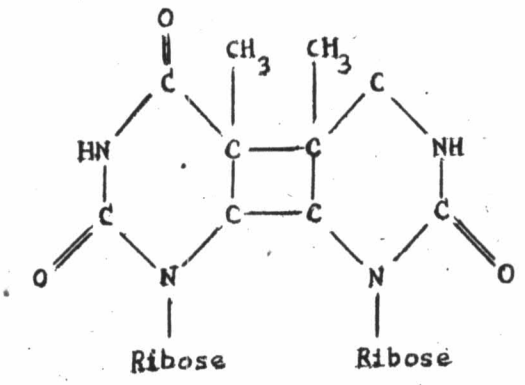
นอกจากนี้ยังมีเครื่องกรองอีกชนิดหนึ่งที่เพิ่งประดิษฐ์ขึ้นมา เรียก nucleopore โดยใช้ polycarbonate film ซึ่งบางมาก (หนาราว 10 นาโนเมตร) และที่ฟิล์มนี้จะมีรูขนาดเล็กซึ่งมีประจุอยู่ด้วย จะเลือกขนาดของรูที่แผ่นกรองได้ ตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.8 นาโนเมตร

3.3 <u>รังสี</u>

<u>รังสีอุลตราไวโอเลต</u> จะฆ่าจุลินทรีย์ได้ถ้าใช้ถูกวิธี รังสีนี้มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำ ดังนั้นจึงต้องใช้แสงที่มีความเข้มมากและส่องตรง ๆ เป็นเวลานานๆ มักจะใช้ในการทำให้ห้องผ่าตัดหรือห้องเขี่ยเชื้อ ปราศจากจุลินทรีย์ เพราะได้มีรายงานว่ารังสีนี้ฆ่าจุลินทรีย์บนโต๊ะ เครื่องมือในอากาศ บนพื้นและฝาผนังได้ดี นอกจากนี้ยังใช้ในโรงงานขนมปัง และอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของรา

ผลของรังสีอุลตราไวโอเลตที่จะฆ่าจุลินทรีย์หรือเป็น mutagen ขึ้นกับความยาวคลื่น ความยาวคลื่นที่ฆ่าจุลินทรีย์ได้ดีจะอยู่ในช่วง 240 - 280 นาโนเมตร และมีช่วงพอเหมาะ (optimum) ที่ 260 นาโนเมตร ซึ่งเท่ากับช่วงคลื่นแสงที่ DNA ดูดได้ดี กลไกในการฆ่าจุลินทรีย์ของรังสีนี้ เป็นผลมาจากการดูดแสงเข้าไปโดย DNA แล้วทำให้ DNA ถูกทำลาย แสงอุลตราไวโอเลตจะทำให้เกิด covalent bond ระหว่าง pyrimidine residues ที่อยู่

ติดกันในสายเดียวกันของ DNA เป็นผลให้เกิด pyridine dimer ขึ้น (แสดงรูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 Tnymine dimer

Dimer เหล่านี้จะทำให้โครงรูป DNA เสียไปและขัดขวางการจับคู่ของ base อันเป็นผลให้การสังเคราะห์ DNA ถูกยับยั้ง และมีผลอื่นๆ ตามมาคือ ยับยั้งการเจริญเติบโตและการหายใจด้วย

<u>วิธีใช้</u> รังสีนี้ได้จาก mercury vapor lamp และพลังงานของรังสีจะวัดในหน่วย microwatt/unit area/unit time เช่น แสงอุลตราไวโอเลต 15 วัตต์จะให้พลังงาน 38 ไมโครวัตต์/ซม^2/วินาที ที่ระยะห่าง 1 เมตร สำหรับขนาดที่ใช้ในการฆ่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์จะอยู่ในช่วง 1800 ไมโครวัตต์/ซม^2 ถึง 6500 ไมโครวัตต์/ซม^2 ถ้าเป็นสปอร์ต้องใช้ขนาดมากกว่านี้อีก 10 เท่า