

การเกิดและการควบคุมไบโอฟิล์มของ *Salmonella* บนพื้นผิวเหล็กสแตนเลส



นายจีระเดช มาลา

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

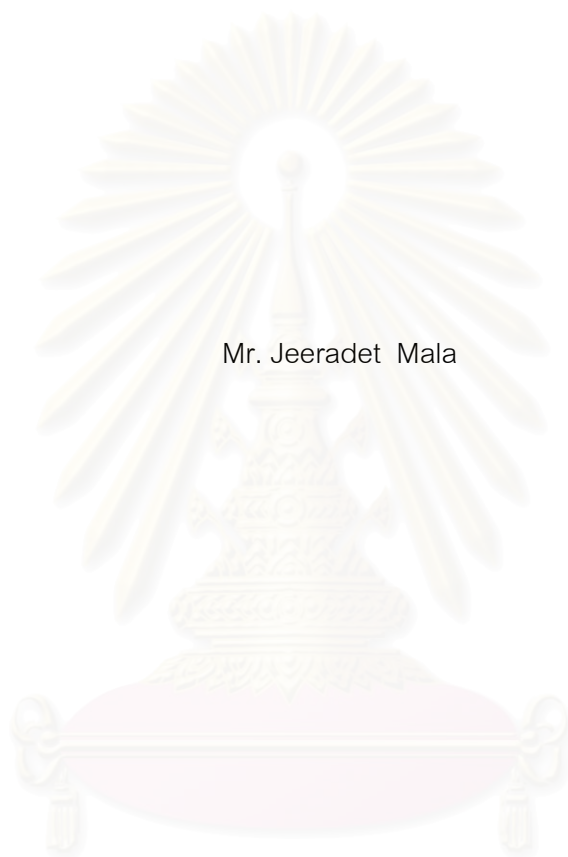
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FORMATION AND CONTROL OF *Salmonella* BIOFILM ON STAINLESS STEEL SURFACES



Mr. Jeeradet Mala

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

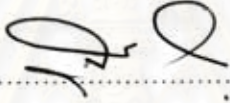
Chulalongkorn University

Academic Year 2008

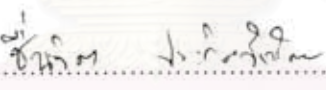
Copyright of Chulalongkorn University


หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเกิดและการควบคุมไบโอฟิล์มของ <i>Salmonella</i> บนพื้นผิวเหล็ก สแตนเลส
โดย	นายจิระเดช มาลา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมนี สงวนดีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเจียร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารหนองบัว)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมนี สงวนดีกุล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเจียร)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. วราวุฒิ ครุสง)

จิระเดช มาลา: การเกิดและการควบคุมไบโอฟิล์มของ *Salmonella* บนพื้นผิวเหล็กสแตนเลส. (FORMATION AND CONTROL OF *Salmonella* BIOFILM ON FOOD CONTACT SURFACES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร. รมณี สงวนดีกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร. สุเมธ ตันตระเจียร, ผศ. สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์, 163 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยในการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* Anatum DMST17362 บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร ได้แก่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการเกาะติด เกรดและพื้นผิวของ stainless steel อุณหภูมิ และแหล่งของสารอาหาร ต่อการเกิดไบโอฟิล์ม พบว่าในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/mL) เพียงแค่สัมผัส (0 นาที) ก็เพียงพอที่ทำให้ *S. Anatum* สามารถเกาะติดบนแผ่น stainless steel และตรวจพบเชื้อได้ ส่วนสภาวะที่มีเชื่อน้อย (3 log CFU/mL) จะต้องอาศัยเวลาให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนจึงจะตรวจพบได้ แบคทีเรียสามารถเกาะบนพื้นผิว stainless steel และการเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ โดยพบว่า *S. Anatum* สามารถเกาะและเพิ่มจำนวนเซลล์บน stainless steel เกรด 430 ได้มากกว่าเกรด 304 และ 316L ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเซลล์บนพื้นผิวนิต BA มีจำนวนเซลล์มากกว่าพื้นผิวนิต 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/cm² ที่ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหาร (น้ำเกลือ ปลอดเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสม 1% กลูโคส) พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกัน ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์และกรดเปอร์อะซิติกในการลดปริมาณ *S. Anatum* เมื่อแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อและเกิดเป็นไบโอฟิล์มบนผิวสัมผัสอาหาร พบว่า เมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm และกรดเปอร์อะซิติก 50 ppm สามารถทำลาย *S. Anatum* ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้ทั้งหมดภายในระยะเวลา 1 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากันในการลดปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) และน้ำนึ่งไก่ พบว่าโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการทำละลายเชื้อได้น้อยลง ส่วนในกรณีของกรดเปอร์อะซิติกนั้นพบว่าสารอาหารไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำละลายเซลล์แต่อย่างใด ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์ม เมื่อสร้างสภาวะให้เกิดไบโอฟิล์มบนแผ่น stainless steel 304/2B ใน TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 °C และทดสอบกับสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิด พบว่าไบโอฟิล์มของ *Salmonella* ทนทานต่อสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดเพิ่มมากขึ้น โดยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ไม่สามารถทำลายเซลล์ภายใน ไบโอฟิล์มได้เมื่อครบเวลา 30 นาที ส่วนกรดเปอร์อะซิติกความเข้มข้น 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้ทั้งหมดภายในเวลา 30 นาที ส่วนประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่ระดับ Minimum Bactericidal Concentration (2.25 mg/mL) นั้นไม่สามารถทำลายเซลล์เมื่อแขวนลอยในอาหาร (น้ำเกลือปลอดเชื้อ TSB และ TSB ผสม 1% กลูโคส) และไบโอฟิล์มของ *Salmonella* ได้เมื่อครบเวลา 30 นาที

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....จิระเดช มาลา

ปีการศึกษา.....2551.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4972591323 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: BIOFILM FORMATION / *Salmonella Anatum* / STAINLES STEEL / CONTROL

JEERADET MALA: FORMATION AND CONTROL OF *Salmonella* BIOFILM ON FOOD CONTACT SURFACES. ADVISOR: ASST. PROF. ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D.
CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D., ASST. PROF. SUTISAK SUKNISULP, M.Sc., 163 pp.

Factors affect attachment and biofilm formation by *Salmonella Anatum* DMST 17362 on stainless steel surfaces under different conditions were studied. The ability of bacterial cells to generate biofilms on the stainless steel coupons was studied for a total period of 72 hour, under four different experiment treatment: (i) grades and finish of stainless steel, (ii) initial cells inoculums (8 log and 3 log CFU/mL), (iii) incubation temperature (15, 20 and 30 °C) and (iv) growth medium (0.85% NaCl, TSB and TSB supplement with 1% glucose). It was found that at 0 min bacterial cells can attach on coupons. The number of cells attachment and growth on coupons grade 430 was better than other grades and BA finish was better than 2B finish. The influence of incubation temperature and initial cells inoculums were studied together. The results showed that at initial load of 3 log CFU/mL, no cells can be detected up to 8 hours but at 24 hours the number of bacterial cells on coupons at 30°C was higher than 20°C and 15°C, respectively. The experiment using 8 log CFU/mL gave similar results. Whereas, cell could attach and form biofilm nearly the same in different medium (0.85% NaCl, TSB and TSB+1%glucose). The efficacy of sodium hypochlorite (NaOCl) and peroxyacetic acid (POA) were investigated. In planktonic state, the results showed that NaOCl 100 ppm (w/v) and POA 50 ppm (v/v) completely eliminated cells in 0.85% NaCl with in 1 min and 5 min at high inoculums (8 log CFU/mL), respectively. However, the same concentration of NaOCl showed less effective in eliminating cells when tested in either TSB or chicken broth. The efficacies of both sanitizers on *Salmonella* biofilm were studied. The results showed that only POA completely eliminated cells in biofilm. In this study we can conclusion that cell in biofilm was more resistant to sanitizers than planktonic cells.

Field of Study.....Biotechnology..... Student's signature.....*Jeeradet Mala*.....

Academic Year.....2008..... Advisor's signature.....*R. Sanguandeekul*

Co-advisor's signature.....*Sumate Tantratian*

Co-advisor's signature.....*S. Suknisulp*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากทุนประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550 (Thai Government Research Fund: The Bureau of the Budget Office of the Prime Minister) ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเถียร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ให้การดูแล ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำที่ดี ในการทำวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อผิดพลาด ที่เกิดจากการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา ที่กรุณาเป็น ประธานสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วราวุฒิ คุรุสง ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นกับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ บริษัทเคมิกอล แลป จำกัด ที่ให้ความกรุณาเอื้อเฟื้ออุปกรณ์เครื่องมือ สำหรับการวิจัย บริษัทไทยน็อคส์สตีล จำกัด ที่อนุเคราะห์เหล็กกล้าไร้สนิม และบริษัท เพอร์อ็อกซีไทย ที่ อนุเคราะห์สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวฝน ต้นสกุล นางสาวเพียงจันทร์ ไพฑูริย์น้อย นายธีระรักษ์ ศรี นวลกราย และนางสาวทิมพร ระย้า และชอบใจเพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีทาง อาหาร และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา คุณยายถนอม จิปริก คุณแม่จิตรา ดาวเรือง น้าบรรจบ จิปริก และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้ความอบอุ่น ให้กำลังใจที่ดีเยี่ยมเสมอมา ตลอดจนสนับสนุนทุนทรัพย์ จนทำให้การทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
กลไกการเกิดไบโอฟิล์ม.....	4
การเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร.....	7
การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์ม.....	8
ความสำคัญและการปนเปื้อนของ <i>Salmonella</i> ในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	12
เหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel).....	22
ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม.....	22
การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ.....	25
คลอรีนและสารประกอบคลอรีน.....	26
การเกิดปฏิกิริยาของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนในน้ำ.....	28
การใช้สารประกอบคลอรีนในการลดปริมาณ <i>Salmonella</i>	28
ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีน และสารประกอบคลอรีน.....	29
ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของโซเดียมไฮโปคลอไรท์.....	30
กรดเปอร์ออกซีแอซิติก (Peroxyacetic acid).....	32
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	33
จุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ในการวิจัย.....	33
พื้นผิวทดสอบที่ใช้ในการวิจัย.....	33
สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย.....	34
ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย.....	35
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	43
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	91

เอกสารอ้างอิง.....	93	
ภาคผนวก.....	103	
ภาคผนวก ก	วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง.....	104
ภาคผนวก ข	สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....	110
ภาคผนวก ค	การหาค่า MIC และ MBC ของน้ำมันกานพลู.....	112
ภาคผนวก ง	การเตรียมน้ำนึ่งไก่อ และการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมี.....	117
ภาคผนวก จ	การวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine.....	122
ภาคผนวก ฉ	ตารางแสดงข้อมูล.....	125
ภาคผนวก ช	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	145
ภาคผนวก ซ	การหาค่า Roughness ของ Stainless steel	153
ภาคผนวก ฌ	การทดสอบยืนยัน <i>Salmonella</i>	161
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	163	



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

	หน้า
2.1	พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและการเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสม..9
2.2	การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ.....10
2.3	ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่แนะนำให้ใช้ในการฆ่าเชื้อพื้นผิว ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร.....11
2.4	ลักษณะทางชีวเคมีที่เป็นแบบฉบับของซัลโมเนลลา.....15
2.5	ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไปของ stainless steel.....23
2.6	ชนิดของ stainless steel24
2.7	สารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆ.....27
4.1	ค่าความขรุขระของ stainless steel ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี surface roughness.....43
4.2	ค่าความขรุขระของ stainless steel ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี surface roughness.....44
4.3	ค่าความขรุขระของ stainless steel ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Atomic Force Microscopy (AFM).....45
4.4	ค่าความเป็นกรด- เบส (pH) และปริมาณสารอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....71
4.5	ค่าความเป็นกรด- เบส (pH) และปริมาณ Available chlorine ในสารละลายไฮเดียม ไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่างๆ.....76
4.6	ค่าความเป็นกรด- เบส (pH) ของสารละลาย Proxitane [®] ความเข้มข้นต่างๆ.....80
ภาคผนวกที่	
ฉ1	จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่สามารถเกาะได้บน Stainless steel ที่ระยะเวลา ต่างๆ ตรวจวัดด้วยวิธี Spread plate technique.....126
ฉ2	จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่สามารถเกาะได้บน Stainless steel ที่ระยะเวลา ต่างๆ ตรวจวัดด้วยวิธี วัด ATP.....127
ฉ3	การเกิดไบโอฟิล์มของ S. Anatum บนแผ่นทดสอบ ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 logCFU/mL) ที่อุณหภูมิต่างๆ128
ฉ4	การเกิดไบโอฟิล์มของ S. Anatum บนแผ่นทดสอบ ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 logCFU/mL) ที่อุณหภูมิต่างๆ129
ฉ5	การเกิดไบโอฟิล์มของ S. Anatum บนแผ่นทดสอบ ที่มีแหล่งของสารอาหาร ที่แตกต่างกัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 30 °C.....130

๑๖	การเกิดไบโอฟิล์มของ <i>S. Anatum</i> บนแผ่นทดสอบที่มีเกรด (Grade) แตกต่างกัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 30 °C.....	131
๑๗	การเกิดไบโอฟิล์มของ <i>S. Anatum</i> บนแผ่นทดสอบที่มีพื้นผิว (finish) แตกต่างกัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 30 °C.....	132
๑๘	การเจริญของเซลล์ <i>S. Anatum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีแผ่นทดสอบ ชนิดต่างๆ อยู่ภายใน อุณหภูมิ 30 °C.....	133
๑๙	จำนวนเซลล์ใน <i>Salmonella</i> Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสสารละลาย Sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	134
๑๑๐	ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ภายใน <i>Salmonella</i> Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่างๆ.....	135
๑๑๑	จำนวนเซลล์ใน <i>Salmonella</i> Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสสารละลาย Proxitane [®] ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	136
๑๑๒	ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ภายใน <i>Salmonella</i> Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสสารละลาย Proxitane [®] ความเข้มข้นต่างๆ.....	137
๑๑๓	จำนวนเซลล์ของ <i>S. Anatum</i> ภายใน biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC.....	138
๑๑๔	จำนวนเซลล์ <i>S. Anatum</i> (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส สารละลาย Sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	139
๑๑๕	ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียม-ไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นต่างๆ.....	140
๑๑๖	จำนวนเซลล์ <i>S. Anatum</i> (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส สารละลาย Proxitane [®] ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	141
๑๑๗	ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย Proxitane [®] ความเข้มข้นต่างๆ.....	142
๑๑๘	จำนวนเซลล์(planktonic cell)ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับ ความเข้มข้นที่ MBC.....	143
๑๑๙	ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ (planktonic cell)ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ ระดับความเข้มข้นที่ MBC.....	144

สารบัญญภาพ

		หน้า
2.1	การเกิดเป็นไบโอฟิล์ม ตั้งแต่การเกิดเกาะติดจนเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์.....	6
2.2	การเกิด Passive layer ของ stainless steel.....	25
2.3	สมการการแตกตัวของกรดเปอร์ออกซีแอซิดิก.....	32
4.1	กราฟที่เกิดจากการทดสอบด้วยวิธี Surface roughness.....	43
4.2	สเกลบอกความเรียบความขรุขระของแผ่นทดสอบจากตรวจสอบด้วยวิธี AFM.....	46
4.3	ลักษณะพื้นผิวของแผ่นทดสอบเกรดต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี SEM และ AFM.....	47
4.4	ลักษณะพื้นผิวของแผ่นทดสอบพื้นผิวต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี SEM และ AFM	48
4.5	จำนวนเซลล์ของ S. Anatum บนแผ่น stainless steel 304/2B และ 304/BA ที่เวลาต่างๆ โดยใช้วิธี Spread plate technique.....	49
4.6	การตรวจวัดจำนวนเซลล์ของ S. Anatum บนแผ่นstainless steel ด้วยการวัด พลังงาน ATP ที่เวลาต่างๆ.....	52
4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์ของ S. Anatum บนแผ่น Stainless steel โดยนับจำนวนเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการตรวจวัด พลังงาน ATP.....	53
4.8	จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบเกรด 304 กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร เลี้ยงเชื้อ.....	55
4.9	จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบเกรด 316L กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร เลี้ยงเชื้อ.....	56
4.10	จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบเกรด 430 กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร เลี้ยงเชื้อ.....	57
4.11	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เกรด 304, 316L และ 430.....	57
4.12	จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบพื้นผิว 2B กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร เลี้ยงเชื้อ.....	59
4.13	จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบพื้นผิว BA กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร เลี้ยงเชื้อ.....	60
4.14	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบพื้นผิว 2B และ BA.....	61
4.15	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ ที่อุณหภูมิ 15, 20 และ 30 °C ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL).....	63

4.16	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ ที่อุณหภูมิ 15, 20 และ 30 °C ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL).....	64
4.17	จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบที่บ่มภายในหลอดเซนตริฟิวซ์ปลอดเชื้อ ซึ่งมีน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	66
4.18	จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบที่บ่มภายในหลอดเซนตริฟิวซ์ปลอดเชื้อ ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสมกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	66
4.19	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบที่บ่มภายในหลอดเซนตริฟิวซ์ ปลอดเชื้อซึ่งมีแหล่งของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันไป.....	67
4.20	จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบที่บ่มภายในหลอดเซนตริฟิวซ์ปลอดเชื้อ ซึ่งไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	68
4.21	ตรวจสอบการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบ ตรวจสอบโดยใช้SEM...69	
4.22	ตรวจสอบการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบ ตรวจสอบโดยใช้SEM...70	
4.23	จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 100 ppm ppm โดยแขวนลอยในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85.....	72
4.24	จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppm 200 ppm และ 400 ppm โดยแขวนลอย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB.....	73
4.25	ร้อยละของการลดลงของเซลล์ที่รอดชีวิตที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หลัง สัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	74
4.26	จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppm 200 ppm และ 400 ppm โดยแขวนลอยในน้ำนิ่งไก่.....	75
4.27	ร้อยละของการลดลงของเซลล์ที่รอดชีวิตที่แขวนลอยในน้ำนิ่งไก่หลังสัมผัสโซเดียม ไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	75
4.28	จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxidane® ความเข้มข้น 25 ppm ,50 ppm และ 100 ppm โดยแขวนลอยในสารละลาย เกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85.....	77
4.29	ร้อยละของการลดลงของเซลล์ที่รอดชีวิตที่แขวนลอยในสารละลายเกลือเข้มข้น ร้อยละ 0.85 หลังสัมผัส Proxidane® ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	78
4.30	จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxidane® ความเข้มข้น 25 ppm 50 ppm และ 100 ppm โดยแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB.....	79

- 4.31 ร้อยละของการลดลงของเซลล์ที่รอดชีวิตที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB
หลังสัมผัส Proxidane[®] ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....79
- 4.32 จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxidane[®]
ความเข้มข้น 25 ppm 50 ppm และ 100 ppm โดยแขวนลอยในน้ำนิ่งไก่.....81
- 4.33 ร้อยละของการลดลงของเซลล์ที่รอดชีวิตที่แขวนลอยในน้ำนิ่งไก่หลังสัมผัส
Proxidane[®] ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....81
- 4.34 จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมันกานพลู
ที่ระดับความเข้มข้น MBC โดยเซลล์แขวนลอยในสารละลายเกลือเข้มข้นร้อยละ
0.85 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ น้ำนิ่งไก่.....82
- 4.35 ร้อยละของการลดลงของเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมันกานพลู
ที่ระดับความเข้มข้น MBC โดยเซลล์แขวนลอยในสารละลายเกลือเข้มข้น
ร้อยละ 0.85 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ น้ำนิ่งไก่.....83
- 4.36 จำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิตหลังสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความ
เข้มข้น 100 200 และ 400 ppm.....84
- 4.37 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิต
หลังสัมผัสโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm.....85
- 4.38 จำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxidane[®] ที่ความเข้มข้น
25 50 และ 100 ppm.....86
- 4.39 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิต
หลังสัมผัส Proxidane[®] ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm.....87
- 4.40 จำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับความ
เข้มข้นที่ MBC.....89
- 4.41 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่รอดชีวิตหลังสัมผัส
น้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC.....89

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

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

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) เป็นปัญหาสำคัญของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร กำจัดได้ยากแม้จะทำความสะอาดและฆ่าเชื้อแล้ว มีรายงานว่ากลุ่มของเซลล์แบคทีเรียที่เป็นไบโอฟิล์ม สามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อโรคได้มากกว่าปกติ ด้วยเหตุนี้สารฆ่าเชื้อจึงมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้ลดลง ไบโอฟิล์มยังเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์หลายชนิด พบได้บนพื้นผิวต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น พื้นผิวของอุปกรณ์และเครื่องมือ ท่อ และสายพานการผลิต เป็นต้น เป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์อาหารในระหว่างและหลังกระบวนการผลิต การปนเปื้อนดังกล่าวส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ทำให้อายุการเก็บรักษาลดลง ไบโอฟิล์มอาจเกิดขึ้นเกิดจากการรวมตัวของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* *Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น ซึ่ง *Salmonella* จัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และถูกกำหนดไว้ว่าจะต้องตรวจไม่พบในอาหาร จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมไม่ให้มีการแพร่กระจายได้ ดังนั้นความสะอาดของพื้นผิวที่สัมผัสอาหารมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการผลิตอาหาร เนื่องจากเป็นส่วนที่มีการสัมผัสกับอาหารโดยตรง ถ้าพื้นผิวที่สัมผัสมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่มาก ก็จะเป็นสาเหตุหนึ่งในการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ให้กับอาหาร ทั้งส่วนที่เป็นวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์ การศึกษาเกี่ยวกับ ปัจจัยการเกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* รวมทั้งการป้องกัน/ควบคุมไบโอฟิล์ม จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยเพื่อพัฒนาด้านสุขลักษณะของ

การผลิตอาหาร ช่วยให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารน้อยลง ผู้ประกอบการอุตสาหกรรมอาหาร และผู้ให้บริการอาหารสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการทำ ความสะอาดพื้นผิวสัมผัสอาหารอย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มและวิธีการควบคุมไบโอฟิล์มที่ เกิดขึ้น โดยได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกาะติดของ *S. Anatum* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร และการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มภายใต้สภาวะต่างๆ ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ชนิดของอาหาร เกรดและพื้นผิวของ stainless steel ส่วนที่สองมี วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อและประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจาก สมุนไพรในการทำลายหรือลดปริมาณเซลล์อิสระและ *Salmonella* biofilm บนพื้นผิวสัมผัสอาหารนั้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

ในกระบวนการผลิตอาหารที่มีวัตถุดิบเป็นเนื้อสัตว์ไม่ว่าจะเป็นสัตว์ปีกหรือเนื้อสัตว์ต่าง ๆ นั้น มีจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและทำให้เกิดโรคกับผู้บริโภคได้อยู่หลายชนิด ในกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ *Salmonella* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สำคัญ มีความสามารถในการสร้าง ไบโอฟิล์ม ซึ่งถ้าเกิดขึ้นกับพื้นผิวที่สัมผัสอาหารจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากกระบวนการมีปริมาณจุลินทรีย์สูง อายุการเก็บสั้น และอาหารไม่ปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) คือกลุ่มสังคมของจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวและฝังตัวอยู่ภายในใต้สารกลุ่มพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์นั้นสร้างขึ้นแล้วหลั่งออกมาออกเซลล์ (Stepanovic et al., 2004; Surdeau, Bouthors and Gelle, 2006; Oulahal et al. 2008) ไบโอฟิล์มสามารถเกิดขึ้นได้บนพื้นผิวชนิดต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะพื้นผิวสัมผัสอาหารเช่น พื้นผิวอุปกรณ์และเครื่องมือ ท่อ สายพานการผลิต เป็นต้น เมื่อพื้นผิวดังกล่าวมีการทำความสะอาดหรือฆ่าเชื้อที่ไม่ดีพอ จุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่อาจเกิดการสะสมและเจริญกลายเป็นไบโอฟิล์มต่อไป ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตและหลังกระบวนการผลิตทำให้อาหารไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมอาหารได้

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) ถ้าเป็นการเกาะติดแบบพาสซีฟ (passive) จะเกิดขึ้นจากแรงโน้มถ่วงของโลก และแรงที่เกิดจากของไหลที่อยู่รอบๆบริเวณเซลล์ ได้แก่ แรงขับเคลื่อนของของไหล (fluid dynamic force) และแรงขับเคลื่อนจากการแพร่ (diffusion dynamic force) ส่วนการเกาะติดแบบแอคทีฟ (active) เกิดขึ้นเนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะของผิวเซลล์ที่มีส่วนประกอบที่จำเพาะต่อการเกาะติด เช่น แฟลกเจลลา (flagella) พิล (pili) โพรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะแอดฮีชัน (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) ซึ่งมีผลทำให้สามารถถูกกำจัดได้ง่าย โดยการชะล้างด้วยน้ำหรือสารฆ่าเชื้อ (Kumar and Anand, 1998; Bower, McGuire and Daeschel, 1996)

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) พิล (pili) เป็นต้น นอกจากนี้เซลล์จะมีการสร้างไฟบริล (fibril) เพื่อเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับพื้นผิวอีกด้วย ทำให้มีการยึดเกาะที่เหนียวแน่นกว่าในระยะแรก ซึ่งการกำจัดเซลล์แบคทีเรียในระยะนี้ออกไปทำได้ยากขึ้น ต้องใช้แรงเช่น การขัดถู (scrubbing) หรือการขูดลอก (scraping) เข้าช่วยเพื่อให้เซลล์หลุดออกไป หรือประยุกต์ใช้เอนไซม์ สารทำความสะอาด (detergent) สารฆ่าเชื้อและ/หรือ ความร้อนเพื่อช่วยทำลายแรงที่ใช้ใน

การเกาะติดของเซลล์กับพื้นผิว การเกาะติดของจุลินทรีย์ เกิดขึ้นในเวลาไม่นานเพียง 5 ถึง 30 วินาที เท่านั้น (Chmielewski and Frank, 2003) โดยเซลล์จะมีการเกาะติดแบบระยะที่ 1 ก่อนแล้วตามด้วย ระยะที่ 2

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิว ได้แก่

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

2. สภาพแวดล้อมและองค์ประกอบของสารอาหารที่อยู่ล้อมรอบ เมื่อเกิดการสะสมของสารอาหารบนพื้นผิวจนเป็นลักษณะของฟิล์มที่เรียกว่า Conditioning film ฟิล์มดังกล่าวจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพของพื้นผิว เช่น ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว (surface free energy) ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิติ (hydrophobicity) และประจุของพื้นผิว ซึ่งอาจส่งผลถึงการเกาะติดของจุลินทรีย์ (Garrett, Bhakoo and Zhang, 2008)

3. ลักษณะและคุณสมบัติของพื้นผิว อัตราการเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิว แต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของพื้นผิว ได้แก่ ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิติ ความเรียบผิว (Roughness) และประจุบนพื้นผิว Chmielewski และ Frank (2003) ได้รวบรวมงานวิจัยและสรุปว่า การเกาะติดของจุลินทรีย์เกิดขึ้นบนพื้นผิวที่มีพลังงานอิสระสูง หรือมีความเปียกน้ำ (hydrophilic) ได้ง่าย ได้ดีกว่าพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิกหรือสมบัติไม่ชอบน้ำ เช่น เทฟลอน (Teflon) ไนลอน (nylon) ยาง (buna-N-rubber) เป็นต้น

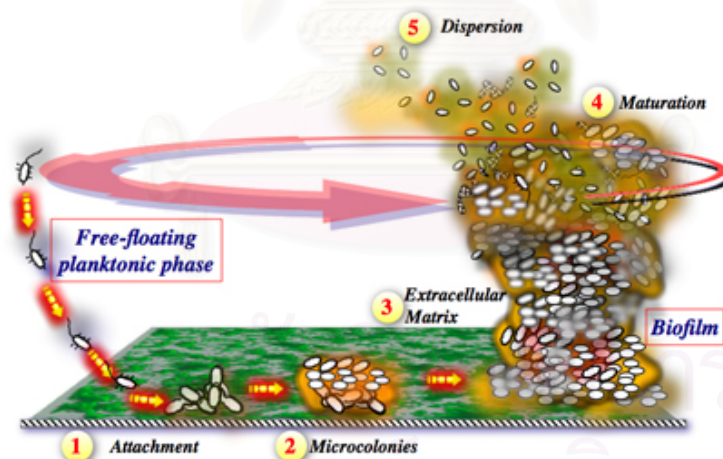
2. การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ (Colonization)

หลังจากเซลล์มีการเกาะติดในระยะที่ 2 การเกาะติดแบบไม่ผันกลับแล้ว เซลล์จะมีการเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปโดยการใช้อาหารที่อยู่รอบๆ ในสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กขึ้น (microcolony) ซึ่งกลุ่มของเซลล์นี้จะขยายใหญ่และเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) ปกคลุมบริเวณพื้นผิว (Poulsen, 1999) ในขั้นนี้เซลล์ที่

เกาะติดอยู่เริ่มมีการผลิตสารกลุ่มพอลิเมอร์แล้วหลังจากออกมาจากเซลล์ กลุ่มอยู่ที่ผิวของกลุ่มเซลล์ เรียกว่า สารกลุ่มนี้ว่า Exopolysaccharide Substances (EPS) อาจประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ฟอสโฟไลพิด กรดไทโคอิก กรดนิวคลีอิก และสารพอลิเมอร์อื่นๆ สารเหล่านี้จะช่วยให้เซลล์ยึดเกาะพื้นผิวได้ดีและมีความเสถียรมากขึ้นจากสภาพแวดล้อมรอบๆที่มีการแปรปรวนอยู่ตลอดเวลา (Kumar and Anand, 1998; Chemielewski and Frank, 2003)

3. การเจริญเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (Maturation)

จากกลุ่มของเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนขึ้นทับกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ภายใต้สาร EPS จะเกิดการพัฒนามาเป็นไบโอฟิล์มต่อไป โครงสร้างของไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่อาจเป็นชั้นของเซลล์เพียงชั้นเดียวภายใต้โครงข่ายของ EPS ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (porous) หรือเป็นชั้นของเซลล์หลายชั้นซ้อนกันโดยมีการเชื่อมกันด้วย EPS และมีช่องสำหรับลำเลียงน้ำ (water channel) กระจายอยู่ทั่วไป (Chemielewski and Frank, 2003) นอกจากสาร EPS จะมีหน้าที่สำคัญในการเชื่อมโยงเซลล์ภายในไบโอฟิล์มและยึดเหนี่ยวกับผิวเซลล์แล้ว ยังมีความสำคัญในการอยู่รอดของไบโอฟิล์มด้วย EPS มีหน้าที่ห่อหุ้มและกักเก็บสารอาหารไว้สำหรับเซลล์ภายใน ไบโอฟิล์ม ช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้ง สารเคมีต่างๆ เป็นต้น



รูปที่ 2.1 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 ส่งผลให้เกิดเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมอาหาร ถ้ามีการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต Oulahal และคณะ (2008) ได้สรุปปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิว ไว้ว่า ขึ้นกับระยะเวลาการเจริญของเซลล์ ชนิดและคุณสมบัติของพื้นผิว ปริมาณสารอินทรีย์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการเกาะติดและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มได้

การที่เซลล์จุลินทรีย์ภายใต้ไบโอฟิล์มสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น เกิดจาก

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

ดังนั้นการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการปกติอาจไม่เพียงพอในการทำลายและกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวได้ Jessen และ Lammert (2003) รายงานว่า หลังจากการทำ ความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวด้วยสารทำความสะอาดร่วมกับสารประกอบคลอรีนหรือสารผสมของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับกรดเปอร์แอสติก พบว่า แบคทีเรียยังคงรอดชีวิตอยู่มากถึง 3-4 log CFU/cm² ซึ่งการหลงเหลือของจุลินทรีย์ถือเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้

การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์ม (Control and removal of biofilms)

ขั้นตอนในการกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มประกอบด้วย การทำความสะอาด (cleaning) และการฆ่าเชื้อ (sanitizing) ส่วนใหญ่เริ่มจากการใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็นล้างสิ่งสกปรกต่างๆออกจากพื้นผิว และใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การขัดถูร่วมกับสารทำความสะอาด เป็นต้น ล้างส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ต่างๆที่ฝังแน่นออกไป จากนั้นจะใช้สารฆ่าเชื้อเข้าทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ ถ้าสารทำความสะอาดไม่สามารถล้างสารอินทรีย์ได้หมด สารฆ่าเชื้อจะไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ได้ (Hilbert et al., 2003) ดังนั้นในการเลือกวิธีการทำลาย ชนิดและความเข้มข้นของสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสม รวมถึงระยะเวลาในการทำความสะอาดจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

1. วิธีการทางกายภาพ (Physical methods)

การทำลายไบโอฟิล์มด้วยวิธีทางกายภาพสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม คือ การใช้แรงกลในการขูดลอกแผ่นไบโอฟิล์ม การขูดลอกนั้นถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีที่ง่ายและราคาไม่แพง แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่เหมาะสมเมื่อใช้กับพื้นผิวขรุขระ ปัจจุบันจึงได้มีการประยุกต์ใช้วิธีอื่นๆร่วมด้วย เช่น การใช้คลื่นเสียง (sonication) การใช้แรงดันสูง (high pressure) เป็นต้น นอกจากนี้ การใช้น้ำที่มีอุณหภูมิสูงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ให้ผลในการกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มได้ พบว่าในระบบการผลิตน้ำดื่มจะต้องใช้น้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 100 นาที หรืออาจใช้ระบบหมุนเวียนของน้ำที่มีอุณหภูมิ 80°C จึงจะทำลายไบโอฟิล์มได้ นอกจากนี้วิธีที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการใช้วิธีอื่นๆ ได้แก่ Super-high magnetic field, Ultrasound treatment, High pulsed electrical field และ Low electrical field เป็นต้น (Kumar and Anand, 1998)

2. วิธีการทางเคมี (Chemical methods)

การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มประกอบด้วย การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ ซึ่งการทำให้ทั้งสองขั้นตอนมีประสิทธิภาพมากขึ้น จำเป็นต้องมีการเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสมเข้าช่วย ขั้นตอนของการทำความสะอาดจำเป็นต้องกำจัดเศษอาหารและสารอินทรีย์ต่างๆที่ช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ออกไป สารทำความสะอาดที่ดีจึงต้องมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว ทำให้ไขมันกระจายตัวออก และย่อยสลายโปรตีนได้ เพื่อกำจัด EPS ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปกคลุมเซลล์ออกไปได้ สารทำความสะอาดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารทำความสะอาดชนิดเบสและชนิดกรด ในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นสารประกอบชนิดเบสที่มีฤทธิ์ในการกำจัดไขมันและโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมมีความหลากหลายและมีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนั้น การเลือกใช้สาร

ทำความสะอาดที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ Marriott (1994) แนะนำการเลือกใช้สารทำความสะอาดสำหรับพื้นผิว (ตารางที่ 2.1) ประเภท แก้ว เซรามิก 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 สเตนเลสสตีล และยางแทน
โลหะ	สามารถเกิดสนิมได้เมื่อสัมผัสกับสารทำความสะอาดที่เป็นกรดหรือมีคลอรีนเป็นส่วนประกอบ	โลหะมีโอกาสในการเกิดสนิมได้ จึงควรเคลือบด้วยดีบุกหรือสังกะสี สารที่เหมาะสมคือพวกที่มีฤทธิ์เป็นกลาง
แก้ว	มีความเรียบและสามารถกันน้ำได้ อาจถูกกัดกร่อนได้เมื่อใช้สารทำความสะอาดที่มีความเป็นเบสมาก	แก้วควรทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาดที่มีความเป็นกลางหรือเบสปานกลาง
ยาง	ยางที่เลือกใช้ไม่ควรเป็นรูปพวงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อล้างด้วยสารทำความสะอาดชนิดเบส แต่อาจเสื่อมสภาพได้ถ้า ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และกรดเข้มข้น	แผ่นยางที่นำมาใช้เมื่อใช้งานไประยะหนึ่ง อาจเกิดการโค้งงอได้
สเตนเลส สตีล	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 และสารประกอบแอมโมเนียม (Quaternary ammonium

compound, Quat) (ตารางที่ 2.2) ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร เวลาในการสัมผัส ปริมาณของสารอินทรีย์ ความกระด้างของน้ำ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และความสามารถของสารในการเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์ (Marriott, 1994) สมบัติของสารฆ่าเชื้อที่ดีควรมีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (broad spectrum) ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และราอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะที่มีสารอินทรีย์ปริมาณสูง ความกระด้างของน้ำสูง และค่าความเป็นกรด-เบสไม่แน่นอน สารฆ่าเชื้อที่ดียังคงละลายน้ำได้ดี ใช้งานง่าย ราคาไม่แพง ตรວรจวัดง่าย และที่สำคัญต้องไม่เป็นพิษหรือระคายเคืองต่อร่างกาย การเลือกใช้สารฆ่าเชื้อความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำทำความสะอาดพื้นผิวชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ

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

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriott (1994)

ตารางที่ 2.3 ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่แนะนำให้ใช้ในการฆ่าเชื้อพื้นผิวใน
โรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

บริเวณหรือพื้นผิว	สารฆ่าเชื้อที่แนะนำให้ใช้	ความเข้มข้น(ppm)
เครื่องมือที่พื้นผิวเป็นอะลูมิเนียม	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
ถังพลาสติก	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
ถังไม้	Active chlorine	1,000

หมายเหตุ ^a Quat = Quaternary ammonium compound

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriot (1994)

3. วิธีการทางชีวภาพ

การใช้วิธีการทางชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับการสนใจในปัจจุบันเนื่องจากผู้บริโภคอาหารส่วนใหญ่ให้ความสนใจเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารมากขึ้น ได้มีการนำสารชีวภาพ เช่น แบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ มาเคลือบบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารเพื่อยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย เป็นต้น แบคทีเรียโอซินที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ ไนซิน (nisin) ซึ่งได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration (FDA) ในปีค.ศ. 1988 ว่าสามารถใช้กับอาหารได้ (Generally Recognized As Safe; GRAS) มีรายงานพบว่า ไนซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ (spore former) ได้ นอกจากสารในกลุ่มแบคทีเรียโอซินแล้ว เอนไซม์เป็นสารชีวภาพอีกกลุ่มหนึ่งที่ถูกเลือกใช้ในการทำลายไบโอฟิล์มเพราะเอนไซม์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ และจุลินทรีย์ได้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัด EPS และไบโอฟิล์มได้ แต่เอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์แตกต่างกัน จึงมีข้อจำกัดในการเลือกใช้ ที่จำเป็นต้องเลือกให้จำเพาะกับชนิดของสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์ที่สร้างไบโอฟิล์มนั้น (กนกทิพย์, 2549)

ความสำคัญและการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

Salmonella เป็นชื่อจีนัสมีหลายซีโรวาร มีบทบาททำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับอาหารเป็นพาหะ ถูกพบครั้งแรกในช่วงปลายปี 1800 ทำให้เกิดไข้ไทฟอยด์ นับแต่นั้นมาได้มีการพยายามที่จะทำความเข้าใจและควบคุมจำนวน *Salmonella* และกลายเป็นปัญหาสำคัญต่อนักจุลชีววิทยาอาหารทั่วโลก เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม *Salmonella* อาศัยในลำไส้เล็กของมนุษย์และสัตว์ตามธรรมชาติ น้ำและอาหารที่มีมาจากสัตว์ มีโอกาสปนเปื้อนมูลสัตว์จึงเป็นพาหะการแพร่กระจายของ *Salmonella*

Salmonella ทุกสายพันธุ์เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในมนุษย์ แต่ระดับความรุนแรงของการเกิดโรคขึ้นกับสายพันธุ์ และยิ่งขึ้นกับสุขภาพของคน คนที่มีสุขภาพอ่อนแอ แม้ว่าจะได้รับปริมาณ *Salmonella* เพียงเล็กน้อยก็สามารถเกิดโรคได้ (Hughes, Gillespie and O'Brien, 2007)

ความสำคัญของ *Salmonella*

Salmonella เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่รุนแรง และเป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของอาหารเป็นพิษขึ้นบ่อยที่สุดในหลายประเทศ (Hughes et al., 2007) รวมทั้งในประเทศไทย แบคทีเรียนี้จัดอยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (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* เจริญแข่งกับแบคทีเรียอื่นๆ ได้ดี 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 หมักน้ำตาล กลูโคสให้ทั้งกรดและแก๊ส เชื้อชนิดนี้จะทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ เนื่องจากสารพิษ endotoxin ซึ่งสารพิษที่สร้างขึ้นนี้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ polysaccharide-polypeptide-lipid A ซึ่งจะปรากฏอยู่ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย คนและ สัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติแห่งแรก (primary habitat) ของ *Salmonella* มนุษย์เกิดโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนผ่านทางเดินอาหาร (สุมนทนา และคณะ, 2548)

1. ลักษณะพื้นฐานของ *Salmonella*

การเรียกชื่อ (Nomenclature) ได้มีการปรับปรุงวิธีการจำแนก *Salmonella* ครั้งใหญ่เมื่อไม่นานมานี้ ในอดีตการจำแนกเชื้อซัลโมเนลลาอาศัยชนิดของซีโรวาร (serovars) ที่ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาทางซีโรวิทยา (serology) คือปฏิกิริยาการตกตะกอนของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่ผิว (somatic cells) และที่แฉ่ (flagella cells) ซึ่งมีความสัมพันธ์กัน เป็นตัวกำหนด สปีชีส์ เทคนิคอื่นที่ใช้จีนส์เป็นตัวทดสอบ คือ DNA-DNA hybridization และ Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) typing มีผลให้ *Salmonella* ทั้งหมดถูกนำมาจัดใหม่เป็น 2 สปีชีส์ คือ *Salmonella enterica* และ *Salmonella bongori* แต่ละสปีชีส์จำแนกออกเป็นอีกหลายสปีชีส์ย่อย (Subspecies) *Salmonella* กว่า 2,000 ซีโรวารถูกนำมาจัดอยู่ในสปีชีส์ *Salmonella enterica* ซึ่งจำแนกย่อยออกเป็น 5 กลุ่ม หรือ subspecies ดังนี้

- Group II : *S. enterica* subsp. *salamae*
- Group III a : *S. enterica* subsp. *arizonae*
- Group III b : *S. enterica* subsp. *diarizonae*
- Group IV : *S. enterica* subsp. *houtenae*
- Group VI : *S. enterica* subsp. *indica*

การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนำไปสู่พัฒนาการของวิธีการเขียนชื่อแบคทีเรียใหม่ กล่าวคือ เดิมเคยเขียนว่า *Salmonella typhimurium* ต่อไปนี้จะต้องเขียนว่า *Salmonella enterica* serovar Typhimurium หรือเขียนย่อว่า *Salmonella* Typhimurium โดยชื่อจีนส์ใช้ตัวเอน ส่วนชื่อสปีชีส์ ย่อยใช้ตัวธรรมดา และตัวอักษรแรกให้เป็นตัวพิมพ์ใหญ่ หรือเขียนย่อว่า *S. Typhimurium* ดังนี้เป็นต้น (สุมณฑา และคณะ, 2548)

อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ซัลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น (short rod) เป็นสมาชิกในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซี้ (family Enterobacteriaceae) *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่จะเคลื่อนไหวได้ (motile) โดยอาศัย แฟลกเจลลัม (flagellum) มีการดำรงชีวิตแบบใช้หรือไม่ใช้อากาศก็ได้ (facultative anaerobe) คือสามารถจะหายใจแบบใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจน (aerobic หรือ anaerobic respiration) กระบวนการผลิตพลังงานโดยไม่ใช้ออกซิเจนในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ จะอาศัยกระบวนการหมักทำนองเดียวกันกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (fermentation) ในกระบวนการเมตาบอลิซึมแบบไกลโคไลซิส (glycolysis) ซึ่งลักษณะทางชีวเคมีชนิดอื่นๆ ของเชื้อชนิดนี้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ที่มา: ดัดแปลงจาก Robinson, Batt และ Patel (2000)

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

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

แอนติเจนที่แฉะหรือที่หนวด 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. ออกได้ เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคเฉพาะในคนที่สำคัญมี 2 ซีโรวาร คือ *S. Typhi* และ *S. Paratyphi* ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดสามารถแพร่กระจายไปได้ทั่ว ทั้งร่างกาย (systemic) ก่อให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ และใช้รากสาดน้อยตามลำดับอาจเรียกรวมกันว่าโรคไข้เอนเทอริค (enteric fever)

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

กลุ่มที่ 3 *Salmonella* spp. ที่ก่อโรคทางเดินอาหารอักเสบ (gastroenteritidis *Salmonella* spp.) เป็นกลุ่มของ *Salmonella* spp. ที่อยู่นอกเหนือจาก 2 กลุ่มที่กล่าวมาข้างต้น เนื่องจากสามารถมีชีวิตอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เป็นผลให้ *Salmonella* spp. กลุ่มนี้แพร่กระจายไปได้กว้างในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน น้ำ อุปกรณณ์ เครื่องมือ หรือแม้กระทั่งแพร่ไปกับคนหรือสัตว์ เป็นต้น จึงพบว่าการแพร่กระจายของ *Salmonella* spp. ในห่วงโซ่อาหารกว้างขวาง และทำให้เกิดปัญหาให้ต้องทำการควบคุมอุบัติการณ์ของโรคที่มาจาก *Salmonella* spp. โดยผ่านอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า ซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) กับมนุษย์

2. การแพร่กระจาย

แหล่งที่อยู่อาศัยลำดับแรกของ *Salmonella* คือ ลำไส้ของสัตว์ เช่นสัตว์ปีก สัตว์เลี้ยง คชาน สัตว์เลี้ยง มนุษย์ รวมทั้งแมลง (Aissa et al., 2007) แต่บางครั้งพบ *Salmonella* อยู่ตามร่างกายของ มนุษย์และสัตว์ก็เป็นได้ จากลำไส้ แบคทีเรียออกมาทางอุจจาระ อาศัยสัตว์ แมลง และน้ำแพร่กระจาย ไปเข้าสู่สิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ ปุ๋ย ซากสัตว์ที่เน่าเปื่อย วนเวียนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร สู่ลำไส้ของมนุษย์และ สัตว์ วนเวียนเป็นวัฏจักรเช่นนี้เรื่อยไป การเคลื่อนย้ายสัตว์และอาหารระหว่างประเทศมีผลให้ *Salmonella* แพร่กระจายอยู่ทั่วโลก (สุมนงทา และคณะ, 2548)

แม้ว่าจะพบ *Salmonella* ในสัตว์แทบทุกชนิด แต่บริเวณที่พบเขื่อนั้นอาจเล็กน้อยแตกต่างกัน บางครั้งอาจพบเชื้อในต่อมน้ำเหลืองมากกว่าอุจจาระ จากการศึกษาซากสุกรในโรงฆ่าพบ *Salmonella* ใน ม้าม ตับ ถุงน้ำดี ต่อมน้ำเหลือง และในกระบังลม ในปริมาณที่ใกล้เคียงที่พบในอุจจาระ การแพร่ *Salmonella* จากสัตว์ที่มีเชื้อไปยังสัตว์ที่ปลอดเชื้อมักเกิดขึ้นบ่อยๆ เพราะมนุษย์และสัตว์อาจเป็น พาหะ (carriers) คือ มี *Salmonella* อยู่ในร่างกายหรือในอุจจาระ แต่ไม่แสดงอาการของโรคออกมา (รุ่งทิศา, 2541)

3. ความเชื่อมโยงระหว่างการเจ็บป่วยของมนุษย์กับ *Salmonella* ในอาหาร

ซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) หมายถึงโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Salmonella* ซึ่งมี มากกว่า 2,000 ซีโรวารี่ ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษขึ้นทั่วโลก (FAO/WHO, 2002) ในสหรัฐอเมริกา Center for Disease Control and Prevention (CDC) รายงาน ว่าในแต่ละปี ประชากรในสหรัฐฯ ป่วยจากโรคซัลโมเนลโลซิสที่ได้รับการตรวจยืนยันผลทาง ห้องปฏิบัติการแล้วปีละประมาณ 40,000 ราย ในจำนวนนี้ประมาณร้อยละ 96 เกิดจากการบริโภค อาหารที่ปนเปื้อน

ในประเทศไทยไม่พบรายงานการติดเชื้อซัลโมเนลโลซิสโดยตรง แต่จะพบในรายงานที่ระบุว่า เป็นการระบาดของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน (Acute diarrhea) โรคไข้เอนเทอริค (enteric fever) และ โรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ในสรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคของสำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2544 สำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคได้ปรับปรุงวิธี รายงานใหม่ โดยจัดกลุ่มของโรคอาหารเป็นพิษไว้ในประเภทโรคติดต่อระบบทางเดินอาหารและน้ำ ใน กลุ่มนี้การรายงานยังแยกประเภทย่อยออกเป็น ตับอักเสบบ ไข้เอนเทอริค ไข้ทัยฟอยด์ ไข้พาราทัยฟอยด์ บิด โรคมือ เท้าปากเปื่อย เห็ดพิษ อุจจาระร่วงอย่างแรง อาหารเป็นพิษ อุจจาระร่วงเฉียบพลัน เป็นต้น ทั้งนี้สำนักโรคระบาดวิทยากล่าวว่า ตามรายงานในปี พ.ศ. 2538 – 2544 ร้อยละ 0.29-6.6 เท่านั้นที่มีการ ระบุเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุของโรค ส่วนในปี พ.ศ. 2544 มีการรายงานที่ระบุสาเหตุของเชื้อร้อยละ 0.74 เนื่องจากไม่มีการเก็บตัวอย่างตรวจหรือเก็บตัวอย่างส่งตรวจไม่ได้ ทั้งนี้จะตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุใน

กรณีที่มีการระบาดหรือผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาเป็นผู้ป่วยในหรือผู้ป่วยที่เสียชีวิตเท่านั้น สำนักกระบาดวิทยาได้สรุปในการรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ โดยประมาณว่าจากรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ น่าจะมีสาเหตุจากเชื้อซัลโมเนลลาราวร้อยละ 30.74 (สำนักกระบาดวิทยา, 2544) ทำให้อนุมานได้ว่าอัตราการป่วยจากโรคซัลโมเนลโลซิสของประชากรไทยต่อประชากรหนึ่งแสนคน น่าจะอยู่ที่ 67.27

Salmonella อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียลำไส้ที่ทำให้เกิดโรค (enteric pathogens) จำแนกออกได้เป็น 2 สปีชีส์ คือ *S. Enteritidis* และ *S. bongori* แต่ละสปีชีส์ยังจำแนกย่อย (subspecies) ออกได้อีก เฉพาะสปีชีส์ *S. Enteritidis* มีมากกว่า 2,500 ซีโรวาร์ และทุกซีโรวาร์ทำให้เกิดโรคซัลโมเนลโลซิส (salmonellosis) ในมนุษย์ ดังนั้นการระบาดบ่อยครั้งจึงมีสาเหตุมาจากเชื้อซัลโมเนลลาและเกิดขึ้นเป็นวงกว้างกระจายไปทั่วโลก

อาหารที่เป็นสื่อ

เปิด ไก่ ไก่วงและไข่ไก่ เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของเชื้อซัลโมเนลลา (Natural reservoir) และเป็นตัวการแพร่กระจาย *Salmonella* มาสู่มนุษย์ เพราะ *Salmonella* สามารถเพิ่มจำนวนในลำไส้ของสัตว์เหล่านี้ รอดชีวิตและติดมากับซากสัตว์ที่นำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์ โดยเฉพาะติดมากับเครื่องใน

ความรุนแรงของเชื้อซัลโมเนลลาที่เกิดกับมนุษย์ คือการติดเชื้อไทฟอยด์ ซึ่งจะมีผลให้อัตราการเสียชีวิตสูง เชื้อซัลโมเนลลาที่ทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษจัดอยู่ในกลุ่มอาการที่ เรียกว่า gastroenteritis ประกอบด้วยอาการ ท้องเดิน ปวดท้อง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ส่วน อาการไข้ไทฟอยด์ และไข้รากสาดน้อยนั้นจะเกิดการติดเชื้อขึ้นใน กระแสโลหิต ทำให้ผู้ป่วยมีไข้สูง อาการเรื้อรังของการติดเชื้อ ซัลโมเนลลา คือ อาการข้อเสื่อมที่ เรียกว่า reactive arthritis ทำให้มีอาการปวดกระดูก ปวดข้อและปวดหลังจนถึงการติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะ แม้ว่าซัลโมเนลลาหลายซีโรวาร์จะมีสัตว์บางชนิดเป็นโฮสต์ประจำแต่ก็สามารถปรับตัวตามโฮสต์หรือโฮสต์ลำดับที่ 2 เช่นมนุษย์ได้ ดังนั้น *Salmonella* จึงเป็นแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอด

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

4.1 อุณหภูมิ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดี ณ อุณหภูมิในร่างกายคนหรือ สัตว์ หรือเรียก mesophilic bacteria โดยช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้อย่างเหมาะสม (optimal temperatures) อยู่ระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส (Robinson et al., 2000) อย่างไรก็ตาม *Salmonella* มีสมบัติที่จะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี ดังนั้นอุณหภูมิต่ำสุด (minimum temperature) ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในเนื้อไก่หรือเนื้อวัว คือ 2-3 องศาเซลเซียส โดยอยู่ได้ นานถึง 2-3 วัน ในขณะที่อุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) ที่เคยมีรายงานว่าเจริญได้ คือที่ 54 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* สามารถปรับตัวให้เข้ากับอุณหภูมิที่สูงขึ้น เป็น 48 องศาเซลเซียส อย่างน้อยหนึ่งรุ่น (generation) ก่อนจะกลายพันธุ์ (mutants) *Salmonella* สามารถเจริญได้ที่ 54 องศาเซลเซียส เนื่องจาก *Salmonella* spp. มีระบบการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบเฉียบพลัน (heat shock response) (ราชา, 2546)

เมื่ออุณหภูมิในอาหารอันเป็นสิ่งแวดล้อมของ *Salmonella* spp. เพิ่มสูงขึ้น *Salmonella* spp. จะเริ่มตายเนื่องจากความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์แบคทีเรียส่วนที่เป็นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์และ โปรตีนของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ มีผลให้เยื่อหุ้มเซลล์รั่วและการสังเคราะห์ โปรตีนหยุดชะงักลง ผลสุดท้ายคือเซลล์ไม่สามารถรักษาสภาวะสมดุลที่เป็นสภาวะปกติไว้ได้และ ต้องตายไปในที่สุด (Robinson et al., 2000)

4.2 ความเป็นกรดต่าง ช่วง pH ที่ *Salmonella* spp. เจริญเติบโตได้ อยู่ระหว่าง 4.5-9.5 แต่ช่วง pH ที่มันเจริญเติบโตได้ดี คือ pH 6.5-7.5 ปัญหาการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในอาหารที่เป็นกรดนั้นน่าจะมาจากความสามารถของ *Salmonella* ในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่ ค่อย ๆ เป็นกรดทีละน้อย เช่น ในกรณีที่น้ำนมหมักที่ทำให้เกิดรสเปรี้ยวจากกรดแลคติก (lactic acid) *S. Typhimurium* สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่เป็นกรดได้ (acid-adapted strain) ในเนยแข็ง เช่น cheddar cheese และ Swiss cheese เป็นต้น (วชิรภรณ์, 2545)

4.3 วอเตอร์แอกติวิตี (water activity; a_w) ความหมายของวอเตอร์แอกติวิตี คือ ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหารและนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นวอเตอร์แอกติวิตี จึงมักจะมีค่าต่ำกว่าความชื้น (moisture) ในอาหารเสมอ เนื่องจากน้ำในอาหารบางส่วนจุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้เนื่องจากน้ำดังกล่าวอาจใช้สร้างพันธะทางเคมีรวมอยู่ในโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบต่างๆ ซึ่งเรียกว่าน้ำผูกพัน (bound water) ตัวอย่างเช่นน้ำเกลือหรือน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นสูง ๆ อาจจะมีค่าความชื้นหรือน้ำอยู่สูง แต่จะมีปริมาณวอเตอร์แอกติวิตีต่ำ เนื่องจากน้ำส่วนใหญ่จะไปจับรวมตัวกับโมเลกุลของเกลือหรือน้ำตาลจนแทบจะไม่เหลือน้ำอิสระ (free water) ให้แบคทีเรียนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ตามปกติ *Salmonella* สามารถเจริญเติบโต ได้ที่ระดับ a_w

ไม่ต่ำกว่า 0.93 ความเข้มข้นของน้ำเกลือที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ได้ คือที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3-4 การที่ *Salmonella* สามารถทนต่อความแห้ง หรือ a_w ระดับต่ำๆ ได้จึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมนอกร่างกายของมนุษย์และสัตว์ได้

4.4 อากาศหรือออกซิเจน บทบาทสำคัญของอากาศที่กำหนดการอยู่รอดของแบคทีเรียที่สำคัญ คือ ออกซิเจน ซึ่งแบคทีเรียชนิดที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ไม่มีเอนไซม์ที่กำจัดพิษของออกซิเจน อันเป็นอุปสรรคต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ไวต่อออกซิเจนหากได้รับสัมผัสกับอากาศ แต่ *Salmonella* ไม่เป็นเช่นนั้นเพราะ *Salmonella* จำเป็นต้องอาศัยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (final electron acceptor) ในกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนเพื่อสร้างพลังงาน (ATP) ให้แก่เซลล์ *Salmonella* สามารถเจริญได้ไม่ว่าจะมีออกซิเจนหรือไม่ก็ตาม เนื่องจากสามารถสร้างพลังงานโดยอาศัยการหมัก (fermentation) ได้ด้วย กระนั้นก็ตามเหตุที่การสร้างพลังงานจากการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) มีประสิทธิภาพสูงกว่าการสร้างพลังงานจากการหมัก (ไม่ใช้ออกซิเจน) ดังนั้น เมื่อมีออกซิเจน *Salmonella* จึงเลือกที่จะหายใจแบบใช้ออกซิเจนมากกว่า การที่ *Salmonella* สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ เป็นผลให้การเก็บรักษาเนื้อไก่หรือเนื้อปลาที่อุณหภูมิ 10 °C ในบรรจุภัณฑ์ที่ทำการบรรจุแบบสุญญากาศ (Vacuum packing) หรือตัดแปลงบรรยากาศ (modified atmosphere) ไม่ว่าจะใช้ CO₂ หรือ N₂ ในสัดส่วนเท่าใดก็ตาม *Salmonella* ก็ยังสามารถเจริญได้

แม้ว่า *Salmonella* spp. จะมีเอนไซม์ superoxide dismutase และ catalase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนออกซิเจนที่เป็นพิษ คือ superoxide radical (O₂⁻) เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) และเปลี่ยน H₂O₂ เป็นออกซิเจนและน้ำได้ก็ตาม แต่ออกซิเจนที่เป็นพิษนี้ก็ยังสามารถก่อความเสียหายขึ้นกับเซลล์ได้

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเจ็บป่วยและอาการ

เมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีเชื้อ *Salmonella* เข้าไปในปริมาณที่สูงพอจะสามารถเกิดโรคขึ้นได้ โดยอาการของโรคจะมีความรุนแรงหรือระยะเวลาที่นานเท่าใดนั้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อน จำนวนเซลล์ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายและสภาวะส่วนบุคคลของผู้ที่ได้รับเชื้อ เช่นความแข็งแรง อายุ เป็นต้น โดยทั่วไปผู้ที่ได้รับเชื้อนี้เข้าสู่ร่างกายจะแสดงอาการภายใน 6-36

ชั่วโมง ซึ่งอาการของโรคมีตั้งแต่อาการเพียงเล็กน้อยที่สามารถหายเองได้จนถึงระดับที่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล อาการที่เกิดขึ้นในคนนั้นสามารถจำแนก ออกดังนี้

1. โรคอุจจาระร่วง (Gastroenteritis) หรือโรคอาหารเป็นพิษ เป็นอาการที่พบมากที่สุด ส่วนใหญ่เกิดจาก *S. Typhimurium* ซึ่งโดยปกติจะปนเปื้อนจากอาหารจำพวกสัตว์ปีก เช่น เป็ดไก่ 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. ไข้เนอเทอริค (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 อึดอัดภายในช่องท้อง มีอาการท้องผูก จะมีอาการอยู่ 1-3 สัปดาห์ การติดเชื้อในมนุษย์ส่วนใหญ่จะมีจำนวนเซลล์มากกว่า 10^5 เซลล์

3. โลหิตเป็นพิษ (Septicemia) เป็นอาการที่เกิดจากเชื้อ *S. Choleraesuis* เชื้อจะเข้าสู่กระแสโลหิตโดยตรง ทำให้ระบบหมุนเวียนโลหิตทำงานผิดปกติ นอกจากนี้อาจพบการเปลี่ยนแปลงที่ระบบทางเดินอาหาร และเกิดติดเชื้อที่ระบบน้ำเหลือง มักพบมากในเด็ก และผู้ใหญ่ที่อายุมากกว่า 50 ปี โดยเฉพาะผู้ชาย ผู้ป่วยจะมีอาการอยู่หลายสัปดาห์

เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel)

เหล็กกล้าไร้สนิมซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “สแตนเลส” เป็นเหล็กกล้าที่มีปริมาณคาร์บอนต่ำ และมีส่วนผสมของโครเมียมอย่างน้อยที่สุด 10.5% เนื่องจากเหล็กกล้าไร้สนิมจะมีแผ่นฟิล์มบางๆ ซึ่งสร้างขึ้นได้เองจากปฏิกิริยา เกิดเป็นชั้นบางๆเคลือบอยู่บนผิวเหล็ก ทำให้เหล็กสามารถต้านทานการเกิดสนิมจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ได้ และเมื่อเกิดรอยขีดข่วนหรือถูกรบกวนสารเคมี ชั้นฟิล์มบางๆนี้จะสร้างขึ้นใหม่ได้เอง ซึ่งช่วยป้องกันการกัดกร่อน หรือ การเป็นสนิมที่เป็นผลมาจากปริมาณโครเมียมในเนื้อเหล็ก เหล็กกล้าไร้สนิมจึงแตกต่างจากเหล็กธรรมดาทั่วไปที่มีการป้องกันการกัดกร่อนด้วยการชุบ หรือเคลือบผิวด้วยไฟฟ้า เช่นสังกะสี หรือเคลือบผิวอินทรีย์สาร เช่น การเคลือบสี

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

ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม

เหล็กกล้าไร้สนิมแบ่งออกเป็น 4 ชนิดหลัก

1. เกรดออสเทนิติก แม่เหล็กดูดไม่ติด นอกจากส่วนผสมของโครเมียม 18 % แล้วยังมีนิกเกิลที่ช่วยเพิ่มความต้านทานการกัดกร่อน เหล็กชนิดนี้ผลิตได้ง่ายจึงเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง
2. เกรดเฟอร์ริติก แม่เหล็กดูดติด มีส่วนผสมของคาร์บอนต่ำ และมีโครเมียมเป็นส่วนผสมหลัก คือ ประมาณ 13% หรือ 17%
3. เกรดมาร์เทนซิติก แม่เหล็กดูดติด โดยทั่วไปจะเป็นโครเมียมผสมอยู่ 12% และมีส่วนผสมของคาร์บอนในระดับปานกลาง มักนำไปใช้ทำส้อม มีด เครื่องมือผ่าตัด และเครื่องมือวิศวกรรมอื่นๆ ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นในการต้านทานการสึกกร่อนและความแข็งแรงทนทาน
4. เกรดดูเพล็กซ์ แม่เหล็กดูดติด มีโครงสร้างผสมระหว่างเฟอร์ไรต์และออสเตไนต์ มีโครเมียมผสมอยู่ประมาณ 18-28% และนิกเกิล 4.5-8% เหล็กชนิดนี้มักถูกนำไปใช้งานที่มีคลอรีนสูง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการกัดกร่อนแบบรูเข็ม (pitting corrosion) และช่วยเพิ่มความต้านทานการกัดกร่อนที่เป็นรอยร้าว อันเนื่องมาจากแรงกดดัน (stress corrosion cracking resistance)

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

ตารางที่ 2.5 ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไป

ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม									
ชนิด	ชื่อมาตรฐานสากล					ส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไป			
	ไทย น็อคซ์	TISI ไทย	AISI USA	JIS ญี่ปุ่น	EN10088 ยุโรป	คาร์บอน	โค บอล	นิ เกิล	โม ลิบดีนัม
เฟอร์ริติก	TNX	SST	430	430	1.4016	0.05	16.5	-	-
	SC17	430							
ออสเทนิติก	TNX	SST	304	304	1.4301	0.04	18.5	8.5	-
	S189	304							
ออสเทนิติก ผสมโม ลิบดีนัม	TNX LM 1811	SST 316L	316L	316L	1.4404	0.025	17.5	11.5	2.0

ที่มา: บริษัทไทยน็อคซ์ (2006)

พื้นผิวของ Stainless steel

พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมมีให้เลือกมากมาย มีทั้งชนิดเงาเหมือนกระจก แบบด้าน แบบเรียบ หรือขัดผิว ซึ่งแต่ละพื้นผิวสามารถใช้ร่วมกับวัสดุอื่นหรือใช้พื้นผิวต่างชนิดกันในงานเดียวกัน ให้ภาพลักษณ์ทันสมัย สวยงาม นอกจากนี้ เหล็กกล้าไร้สนิมยังมีค่าความแข็งแรงสูง ทนแรงกระแทก รอยขีดข่วน หรือรอยเปื้อนต่างๆ ได้ดีและไม่แตกหัก ซึ่งตารางที่ 2.6 ได้แสดงชนิดของพื้นผิว ลักษณะ ความเรียบ และความสะท้อนแสงของ stainless steel

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.6 ชนิดของ Stainless steel

ชนิด	ลักษณะ	ความเรียบ* (ไมครอน)	ความสะท้อนแสง%
2D	รีดเย็น, อบอ่อนและพิคคิลิง: ผิวด้าน	0.1 – 0.03	13
2B	รีดเย็น, อบอ่อนและพิคคิลิง: ผิวเงาขึ้นเล็กน้อย จาก การรีดเย็นออกเป็นสีเทา	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 ความเรียบของพื้นผิวซึ่งวัดด้วยโปรไฟล์โลมิเตอร์

** 46% สำหรับเฟอริติก

ที่มา: บริษัทไทยน็อคซ์ (2006)

เหล็กกล้าไร้สนิมรีดเย็นชนิดผิวบีเอ

หลักการผลิตเหล็กกล้าไร้สนิมรีดเย็นชนิดผิวบีเอนั้น กล่าวคือพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมจะได้รับการปกป้องมิให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งทำให้เกิดการกัดกร่อนเป็นสนิมระหว่างผ่านกระบวนการอบขจัดออกไซด์ขั้นสุดท้าย กระบวนการรีดเย็นโดยเครื่องรีดเย็นเซนดซิเมียร์ จะทำให้แผ่นเหล็กมีพื้นผิวมันเงางาม อย่างไรก็ตาม แรงกดซึ่งจำเป็นต่อการลดความหนาของเหล็กในระหว่างการรีดเย็นนั้นจะทำให้มวลเหล็กกล้าไร้สนิมแข็งเพิ่มมากขึ้น

เหล็กกล้าไร้สนิมรีดเย็นชนิดบีเอสามารถรักษาคุณสมบัติเชิงกล ซึ่งจะทำให้สามารถนำเหล็กกล้าไร้สนิมไปประยุกต์ใช้ได้ในงานหลากหลาย เช่น ในการขึ้นรูปพิมพ์ลึก หรือในการขึ้นรูปจำเป็นต้องมีกระบวนการอบอ่อนโดยใช้อุณหภูมิสูงในเตาอบแอนนีลลิ่งก่อน

ในกระบวนการผลิตเหล็กกล้าไร้สนิมชนิดผิวบีเอนี้ การอบอ่อนจะต้องทำในภาวะแวดล้อมที่ปกคลุมด้วยไฮโดรเจนเพื่อป้องกันมิให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันบนพื้นผิว อีกทั้งยังคงความเงางามซึ่งมีเพียงผู้เชี่ยวชาญทางกระบวนการรีดเย็นจริงๆ เท่านั้นที่สามารถทำได้

ความต้านทานการกัดกร่อน

โลหะทุกชนิดโดยทั่วไปจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นฟิล์มออกไซด์บนผิวโลหะ หรือออกไซด์ที่เกิดบนผิวเหล็กทั่วไปจะทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์และทำให้สภาพพื้นผิวเหล็กผุกร่อน ที่เรียกว่า เป็นสนิม แต่เหล็กกล้าไร้สนิมมีโครเมียมผสมอยู่ 10.5% ขึ้นไป ทำให้คุณสมบัติของฟิล์มออกไซด์บนพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไป กลายเป็นฟิล์มปกป้องหรือ พาสซีฟเลเยอร์ (Passive layer) ที่เหมือนเกราะป้องกันการกัดกร่อน ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า พาสซีวิตี (passivity) ฟิล์มปกป้องจะมีความบางมาก และมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ฟิล์มนี้จะเกาะติดแน่นและทำหน้าที่ปกป้องเหล็กจากสารกัดกร่อน หากนำไปผลิตแปรรูปหรือใช้งานในสภาพเหมาะสม เมื่อเกิดมีการขีดข่วนฟิล์มปกป้องนี้จะสร้างขึ้นใหม่ได้เองตลอดเวลา ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การเกิด Passive layer ของ stainless steel

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

การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ

โรงงานควรพิจารณาเลือกใช้การฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี (chemical disinfectants) ให้เหมาะสม สำหรับแต่ละส่วนงาน เนื่องจากสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิดมีจุดเด่นจุดด้อยแตกต่างกันไป สารฆ่าเชื้อที่ดี ต้องมีคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษ ไม่ทำให้เกิดการสึกกร่อนของพื้นผิวที่ใช้ ไม่มีผลต่อกลิ่น รส และสีของอาหาร มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้หลายชนิด ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ ระยะเวลาในการสัมผัส ความสะอาดของพื้นผิว ความเป็นกรดต่าง (pH) ความกระด้างของน้ำ และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวที่จะทำความสะอาด

ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจะมี 5 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการทำความสะอาด 3 ขั้นตอนและขั้นตอนการฆ่าเชื้ออีก 2 ขั้นตอน ดังนี้

- การกำจัดสิ่งสกปรก (soil or dirt) ขนาดใหญ่ด้วยวิธีการ เช่นการปัด กวาด ถู ขัด หรือชะล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นต้น
- การกำจัดสิ่งสกปรกที่เหลืออยู่ด้วยสารชะล้าง (detergent)
- การล้างด้วยน้ำ (rinsing) เพื่อล้างสารชะล้างและสิ่งสกปรก
- การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือสารฆ่าเชื้อ
- การล้าง (rinsing) สารฆ่าเชื้อออกจากพื้นผิวเครื่องจักรและอุปกรณ์

คลอรีนและสารประกอบคลอรีน

สมบัติของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน

คลอรีนเป็นธาตุหมู่ที่ 7 (Halogen) เมื่ออยู่ในรูปแก๊สมีสีเขียวแกมเหลือง แก๊สคลอรีนเริ่มใช้ครั้งแรกตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 18 เพื่อใช้เป็นสารฟอกสีในอุตสาหกรรมสิ่งทอ การที่นิยมใช้คลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด

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

ตารางที่ 2.7 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 ₃ C-C ₆ H ₄ SO ₂ -N-NaCl	15%
Dichlorodiethyl-hydantoin	C ₅ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₂	1.20%
Trichlorocyanuric acid	Cl ₃ (NCO) ₃	1.20%
Dichlorocyanuric acid	Cl ₂ H(NCO) ₃	2.60%
Chlorine dioxide	ClO ₂	200 cm ³ per 100 mL.

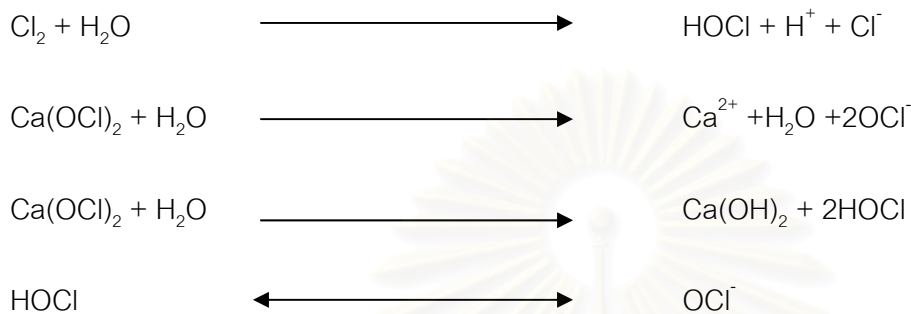
ที่มา: ดัดแปลงจาก รุ่งทิวา (2541)

ปัจจุบันมีการนำสารประกอบคลอรีนมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้เพื่อฆ่าเชื้อในแหล่งน้ำ ใช้ฆ่าเชื้อเครื่องมือ หรือ อุปกรณ์ที่มีพื้นผิวสัมผัสอาหาร ใช้ฉีดพ่นเครื่องมือระหว่างกระบวนการผลิตอาหารเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษา เป็นต้น

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

การเกิดปฏิกิริยาของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนในน้ำ

การใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อ นิยมเตรียมในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นคลอรีนอิสระตามที่ต้องการ โดยคลอรีนและสารประกอบคลอรีนทำปฏิกิริยากับน้ำได้กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ดังสมการ



ที่มา: ดัดแปลงจาก วชิรภรณ์ (2545)

การใช้สารประกอบคลอรีนในการลดปริมาณ *Salmonella*

การนำสารประกอบคลอรีนมาใช้ในอาหาร มีวัตถุประสงค์ของการใช้แตกต่างกันคือ ใช้เป็นสารสำหรับทำความสะอาด สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ และเป็นวัตถุเจือปนอาหาร ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการใช้สารประกอบคลอรีนในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ซึ่งจะมีการนำมาเติมในน้ำที่ใช้ในกระบวนการ โดยได้แบ่งคลอรีนออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ คือ คลอรีนเหลว สารประกอบไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite) สารอนินทรีย์คลอรามิน (inorganic chloramines) สารอินทรีย์คลอรามิน (organic chloramines) และคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ต่างกัน สารประกอบไฮโปคลอไรท์เป็นตัวที่นิยมใช้กันมาก โดยสารประกอบไฮโปคลอไรท์จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดอะมิโนพิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) ภายในเซลล์ ทำให้เกิดสารที่เป็นพิษขึ้นได้ กลไกในการฆ่าเชื้อของสารประกอบคลอรีนก็ยังไม่ทราบแน่ชัด มีการตั้งสมมติฐานในการทำลายเชื้อต่าง ๆ กัน เช่น คลอรีนจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีนของเซลล์ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้ความสามารถในการยอมให้สารต่างๆ ซึมผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไป จึงไม่สามารถนำสารอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตเข้าไปในเซลล์ได้ (วชิรภรณ์, 2545)

คลอรีนจะทำปฏิกิริยารวมตัวกับโปรตีนของเซลล์จุลินทรีย์ โดยเข้าไปแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมในกลุ่มอะมิโน เกิดเป็นสารประกอบขึ้นใหม่ คือ คลอรามิน ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ คลอรีนจะทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญภายในเซลล์ และยับยั้งการใช้กลูโคสของเชื้อจุลินทรีย์ (กนกทิพย์, 2549)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน (สุดาพร, 2545)

ความเข้มข้น การที่คลอรีนและสารประกอบคลอรีนจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้มากน้อยเพียงใดนั้นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน ก็คือ ความเข้มข้น 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 ทั้งนี้เนื่องจากในช่วง 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 million หรือ ส่วนในล้านส่วน) แต่ในการทำมาความสะอาดพื้นผิวใต๊ะปฏิบัติการ เครื่องจักรและอุปกรณ์ต่างๆ จะนิยมใช้ความเข้มข้นประมาณ 100-200 ppm แต่บริเวณที่สกปรกมากๆ หรือในโรงพยาบาลที่อาจมีเชื้ออันตรายอาจใช้ถึง 1,000 ppm หรือมากกว่าก็ได้ ที่ระดับความเข้มข้น 50-300 ppm มี pH อยู่ในช่วง 7-9 ที่ pH 5 จะมีความคงตัวน้อยลง โซเดียมไฮโปคลอไรท์นี้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆรวมไปถึงสปอร์และไวรัสได้เป็นอย่างดีทั้งยังไม่ก่อให้เกิดฟอง และมีราคาไม่สูงนัก ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย สารไฮโปคลอไรท์เป็นสารประกอบที่มีประจุลบ จึงไม่ควรใช้ร่วมกับสารชะล้างหรือสารทำความสะอาด (detergent) ที่มีประจุบวก นอกจากนี้ยังไม่ควรผสมไฮโปคลอไรท์ในสารทำความสะอาดที่มีฤทธิ์เป็นกรด เพราะจะทำให้เกิดก๊าซคลอรีนซึ่งเป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจของผู้ปฏิบัติงานเมื่อสูดดมเข้าไป นอกจากนี้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ซึ่งเป็นสารประกอบคลอรีนมีสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ใน 3 ตำแหน่ง ดังต่อไปนี้

ส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มสปอร์ ซึ่งส่วนของผนังเซลล์นั้น สารประกอบคลอรีนสามารถทำลายแบคทีเรียได้โดยการเกิดปฏิกิริยาของคลอรีนกับโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการสร้างสารประกอบ N-chloro ซึ่งไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ทำให้คุณสมบัติการควบคุมการผ่านเข้าออกของเซลล์สูญเสียไป และสารประกอบคลอรีนมีคุณสมบัติทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ทำให้ไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารอาหารได้ การที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายนี้ จะทำให้ไม่สามารถรับสารอาหารได้ เช่นคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน หรือสารอาหารที่จะเป็นในการดำรงชีพเข้าสู่เซลล์ได้ เมื่อเซลล์ขาดสารอาหาร จะทำให้การเจริญของจุลินทรีย์หยุดลงและตายในที่สุด (สุดาพร, 2545)

ส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ (protoplasm) พบว่าสารประกอบคลอรีนจะไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับส่วนโปรตีนของเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนที่เป็นโปรตีน โดยจะไปตกตะกอนส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์ สารประกอบคลอรีนจะทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลไฟด์ริล (sulhydryl) ของโปรตีน เกิดการรบกวนการทำงานของเซลล์ (สุดาพร, 2545)

ส่วนที่เป็นเอนไซม์ สารประกอบคลอรีนรบกวนการทำงานของเอนไซม์และยังสามารถทำลายเอนไซม์ได้อีกด้วย เอนไซม์โดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีน สารประกอบคลอรีนที่เข้าไปในเซลล์ทำให้เกิด

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือเกิดการรวมตัวของเอนไซม์ ทำให้ระบบการทำงานของเอนไซม์เสียไป เอนไซม์หลายชนิดที่ได้รับผลกระทบจากคลอรีนเช่น Triosephosphate dehydrogenase, glucose oxidase, D-amino acid oxidase, transaminase, succinic oxidase เป็นต้น

การใช้และข้อจำกัดของสารประกอบคลอรีนในอุตสาหกรรมอาหาร

การใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนในอุตสาหกรรมอาหาร

คลอรีนและสารประกอบคลอรีนในรูปแบบต่าง ๆ ได้ถูกจัดให้เป็นสารประเภทที่เรียกว่า “Generally Recognized as Safe” (GRAS) ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่าง ๆ ซึ่งมักใช้คลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนเพื่อวัตถุประสงค์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ตามที่ The American Public Health Association (APHA) ได้มีรายงานรับรองการใช้คลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อ (disinfectant) นั้น ทำให้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย นอกจากวัตถุประสงค์หลักในการฆ่าเชื้อแล้ว ในอุตสาหกรรมแป้งยังใช้คลอรีนเพื่อวัตถุประสงค์ในการฟอกสีแป้งให้ขาวขึ้น นอกจากนี้ยังมีการใช้คลอรีนในอุตสาหกรรมประเภทอื่น ๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมการผลิตยา เป็นต้น

การใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีน มีคุณสมบัติในการทำละลายและยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี ดังนั้น จึงได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เกือบทุกประเภท ซึ่งจะใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีน เพื่อวัตถุประสงค์หลักในการฆ่าเชื้อ ในน้ำที่ใช้สำหรับการหล่อเย็น น้ำที่ใช้ล้างวัตถุดิบต่างๆ น้ำที่ใช้ในการล้างทำความสะอาดเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ใช้ในการแปรรูป

ข้อจำกัดของการใช้สารประกอบคลอรีน

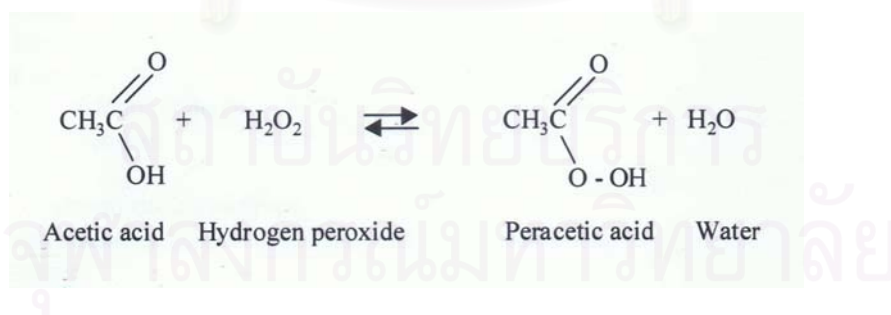
ในการใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนประเภทไฮโปคลอไรท์ อาจทำให้เกิดปัญหาได้หลายประการ เช่น ในน้ำที่มีสารแขวนลอย ซึ่งสารเหล่านี้จะห่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ไว้ไม่ให้ถูกทำลายโดยคลอรีน นอกจากนี้สารอินทรีย์ต่างๆในน้ำยังทำปฏิกิริยากับคลอรีนทำให้เสียคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อตามปกติเมื่อแอมโมเนีย (NH_3) เกิดปฏิกิริยากับคลอรีน จะทำให้เกิดผลผลิตจำพวกคลอรามิน (chloramine) ขึ้น ซึ่งทำให้คุณสมบัติในการทำละลายเชื้อต่ำกว่ากรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid) ถ้ามีอนุมูลเหล็กและแมงกานีสอยู่ในน้ำ จะทำให้เกิดกลิ่นที่ผิดปกติขึ้นหลังการใช้คลอรีนนอกจากนี้การใช้คลอรีนในระดับความเข้มข้นสูงอาจทำให้เกิดความเป็นพิษ โดยพบว่าคลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนนี้ ก่อให้เกิดสารก่อมะเร็งได้ในสัตว์ทดลอง

กรดเปอร์ออกซีแอซีติก (Peroxyacetic acid)

กรดเปอร์ออกซีแอซีติก คือ เปอร์ออกไซด์ของกรดแอซีติก มีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง (Fatemi and Frank, 1999) ละลายน้ำได้ดี และที่ความเข้มข้นสูงมีกลิ่นฉุน โดยทั่วไปมีสารให้ความคงตัวผสมอยู่ด้วย ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง และเมื่อมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้ว สารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อดีกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีสารอินทรีย์ปะปนอยู่นอกจากนี้แล้วสารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกไม่ทำปฏิกิริยากับ คะตะเลส และเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แตกต่างจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Kunigk and Almeida, 2001)

กรดเปอร์ออกซีแอซีติกสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้โดยการรบกวนพันธะชั้นไฮดริลและซัลเฟอร์ไนโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ โดยทำหน้าที่เป็นสารออกซิไดส์ นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ นอกจากนี้กรดเปอร์ออกซีแอซีติกยังสามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพ ขัดขวางการขนส่งของผนังเซลล์ ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ สามารถรบกวนการเข้าออกที่เยื่อหุ้มเซลล์ จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด

เมื่อสารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกสลายตัว จะได้น้ำ ออกซิเจน และกรดแอซีติก ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษในอาหารและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิด โฟมและสารประกอบฟอสเฟต ไม่มีคุณสมบัติในการสแตนท์เลส อลูมิเนียม รวมถึงดีบุก กรดเปอร์ออกซีแอซีติก สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในน้ำกระด้าง และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ



รูปที่ 2.3 สมการการแตกตัวของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก

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

ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยน็อคสตีล 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 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	AR grade
Sodium chloride (NaCl)	AR grade
Potassium iodide (KI)	AR grade
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	AR grade
Di-sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4)	AR grade
Acetone ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$)	AR grade
Absolute ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	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)

ตู้อบเพาะเชื้อ Incubator (Heraeus instruments รุ่น B6)

ตู้อบเพาะเชื้อ Incubator (Memmert รุ่น 500, Germany)

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

เครื่อง Centrifuge (Zentrifugen รุ่น 40G257)

เครื่อง Colony counters (Suntex, Taiwan)

ตู้ Laminar flow cabinet (BVT-123, Thailand)

เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็น

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การตรวจสอบความขรุขระของพื้นผิว stainless steel

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 ซึ่งจะทำความสะอาดพื้นผิวทดสอบทั้งหมด ก่อนจะทำการหาค่าความขรุขระของพื้นผิวตามแนวขวางรอยขีดและตามรอยแนวขีด 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 Nanoscopto IV ซึ่งจะทำความสะอาดพื้นผิวทดสอบทั้งหมด ก่อนจะทำการทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 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 หลบลงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) 20 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกตะกอนเซลล์ออกโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$) เก็บส่วนตะกอนเซลล์ มา re-suspension ด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร และปรับให้ได้ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.3 จะได้เชื้อเริ่มต้นที่ $9 \log \text{CFU/mL}$ จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาละลายใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ตามความเข้มข้นของปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่ต้องการ โดยเจือจางตะกอนเซลล์ใน 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นประมาณ $9 \log \text{CFU/mL}$ สำหรับการทดสอบปริมาณเชื้อตั้งต้นระดับสูง ($8 \log \text{CFU/mL}$) ส่วนในการทดสอบปริมาณเชื้อตั้งต้นระดับต่ำ ($3 \log \text{CFU/mL}$) นั้น เจือจางให้มีความเข้มข้นของตะกอนเซลล์ใน 0.85% NaCl ประมาณ $4 \log \text{CFU/mL}$ ตรวจสอบปริมาณเซลล์ในอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 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 ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวน้ำอาหาร 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 (stainless steel)

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) และนำมาทำความสะอาด

โดยดัดแปลงวิธีของ Rivas, Dykes และ Fegan (2007) โดยการแช่แผ่นสแตนเลสสตีลในอะซีโตน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นแช่ใน alkaline detergent ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง ก่อนนำเข้ามาเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

3.3.2 การทดสอบการเกาะติด (Attachment) ของ *Salmonella*

ปิเปตสารละลายเซลล์ที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.2.1 ซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์ 9 log CFU/mL ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 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 ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 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 แล้วจึงนำแผ่นสแตนเลสไปใส่ในหลอดปลอดเชื้อหลอดใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นพื้นผิวทดสอบมาล้างด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ส่วนเกินออก แล้วตรวจนับปริมาณ *Salmonella* ที่อยู่บนแผ่นสแตนเลสทดสอบ 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 และเปลี่ยนพื้นผิวจาก 2B เป็น BA ตามลำดับ โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3.4.2 ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* บนแผ่นทดสอบในสภาวะที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 องศา

เซลเซียส เป็น 15 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้เชื้อเริ่มต้น $8 \log$ CFU/mL ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3.4.3 ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* บนแผ่นทดสอบที่มีแหล่งของสารอาหารแตกต่างกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 แต่เปลี่ยนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก TSB เป็น 0.85% NaCl และ TSB ที่ผสม D-glucose เข้มข้นร้อยละ 1 โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่ $8 \log$ CFU/mL ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3.4.4 ศึกษาการอยู่รอดของเซลล์ *S. Anatum* บนแผ่นทดสอบ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 แต่หลังจากมีการเกาะติดของเชื้อบนแผ่นทดสอบแล้ว ย้ายแผ่นทดสอบดังกล่าวใส่ในหลอดปลอดเชื้อที่ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วตรวจนับปริมาณ *Salmonella* ที่อยู่บนแผ่นทดสอบ ตามวิธีในข้อ 3.4 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.4 การตรวจวิเคราะห์การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวทดสอบ

3.4.1 Spread plate technique

นับปริมาณการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* บนแผ่นทดสอบ โดยนำแผ่นทดสอบที่เกิดการเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์ม ด้วยการใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อกวาดบนพื้นผิวทดสอบขนาดพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร นำไม้พันสำลีไปใส่ใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 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°C 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 Microscopic (SEM) โดยใช้พื้นผิวทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ส่วนเกินออกด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำตัวอย่างทั้งหมดแช่ใน glutaraldehyde เพื่อตรึงเซลล์ให้มีจำนวนเท่าเดิม (ไม่ให้แบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน) และทำการส่งตรวจที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อและน้ำมันกานพลูในการทำลายเซลล์และไบโอฟิล์มของ *Salmonella*

3.6.1 การเตรียมสารฆ่าเชื้อ

สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) โดยมี active chlorine 6-14% และกรดเปอร์อะซิติก (peroxyacetic acid: POA) หรือชื่อทางการค้าว่า Proxitan[®] ความเข้มข้น 5% วิธีการเตรียมตามแสดงในภาคผนวก ข

3.6.2 การเตรียมน้ำมันกานพลู

น้ำมันกานพลูที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะนำมาหาค่าความไวของน้ำมันกานพลู ต่อ *S. Anatum* ซึ่งวิธีการทดลองแสดงในภาคผนวก ค จากนั้นจึงนำค่าดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์และไบโอฟิล์มของ *S. Anatum*

3.6.3 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อและน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นที่ MBC ในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และกรดเปอร์อะซิติก และน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นที่ MBC เพื่อลดปริมาณเซลล์ของ *S. Anatum* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดที่มีปริมาณสารอินทรีย์แตกต่างกัน ได้แก่ 0.85% NaCl, อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และน้ำนึ่งไก่ (วิธีการเตรียมแสดงตามภาคผนวก ง) โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูงเท่ากับ 8 log CFU/mL ในการทดสอบประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ กำหนดความเข้มข้นที่ 100 200 และ 400 ppm กรดเปอร์อะซิติกทดสอบที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm ส่วนน้ำมันกานพลูทดสอบที่ความเข้มข้นที่ MBC (2.25 mg/mL)

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อและน้ำมันกานพลูในการลดปริมาณเชื้อ โดยนำสารละลายฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ ใส่ในหลอดปลอดเชื้อ ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 9 มิลลิลิตรต่อ 1 หลอด ปิเปตสารละลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เตรียมขึ้นตามวิธีข้างต้น 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดจะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นลดลง 10 เท่า คือ $8 \log \text{CFU/mL}$ จากนั้นทำการปิเปตตัวอย่างสารละลายดังกล่าวมา 1 mL ที่เวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที นำไปตรวจนับเชื้อรอดชีวิต โดยจะทำการยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะมีผลต่อเชื้อก่อนด้วย 0.5% sodium thiosulfate (NaOCl) ส่วนกรดเปอร์อะซิติคจะยับยั้งค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH7.2 ก่อนนำไปทำการ serial dilution และตรวจนับเชื้อตามวิธีใน ข้อ 3.7 ในแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

3.6.4 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อและน้ำมันกานพลูในการทำลายไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

สร้างไบโอฟิล์มตามวิธีข้อ 3.3.3 บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ชนิด 304/2B นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อและน้ำมันกานพลู โดยปิเปตสารฆ่าเชื้อหรือน้ำมันกานพลูตามความเข้มข้นเช่นเดียวกับข้อ 3.6.3 จำนวน 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นพื้นผิวทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แช่ในสารฆ่าเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ทดสอบที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) เมื่อครบเวลาที่กำหนดใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบแผ่นทดสอบล้างด้วยสารละลายไฮเดียมไฮโอซัลเฟตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 เข้มข้น 0.5% (sodium thiosulphate in phosphate buffer) (ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็น sodium hypochlorite ส่วนในกรณีของ Proxitane[®] และน้ำมันกานพลูจะใช้ PBS) 2 ครั้งๆ ละ 10 วินาที จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ เช็ดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว แล้วนำมาตรวจนับเชื้อตามวิธีใน ข้อ 3.7 ในแต่ละการทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.7 การตรวจนับปริมาณ *Salmonella* ที่เหลือรอดชีวิตด้วยวิธี spread plate technique

การตรวจนับปริมาณ *Salmonella* ที่เหลือรอดชีวิต ทำได้ด้วยการปิเปตสารแขวนลอยเชื้อ มา 1 มิลลิลิตร แล้วใส่ในสารละลายไฮเดียมไฮโอซัลเฟต ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 เข้มข้น 0.5% (ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็น Sodium hypochlorite ส่วนในกรณีของ Proxitane[®] และน้ำมันกานพลูจะใช้ 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

ส่วนกรณีของไบโอฟิล์มใช้ไม้พินสำลีปลอดเชื้อกวาดเช็ดลงบนพื้นผิวทดสอบขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร นำไม้พินสำลีไปใส่ในสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 เข้มข้น 0.5% (ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็น sodium hypochlorite ส่วนในกรณีของ Proxitan[®] และน้ำมันกานพลูจะใช้ 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 การวิเคราะห์ปริมาณ available chlorine (Iodometric Method) (กนกทิพย์, 2549)

นำตัวอย่างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm ที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณคลอรีน ประมาณ 150 mL ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL เติม glacial acetic acid เพื่อให้สารละลายมีค่า pH อยู่ระหว่าง 3-4 แล้วเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ประมาณ 1 g แล้วเขย่า ถ้าสารละลายมีสีเหลืองให้ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต 0.01 N (ตามภาคผนวก จ) ทันที ในที่ที่ไม่มีแสงจ้า จนเป็นสีเหลืองจาง จึงเติมน้ำแบ่งลงไป 1 mL สารละลายจะมีสีน้ำเงินให้ไตเตรตต่อจนสีน้ำเงินจางหายไป จดบันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต

สำหรับสารละลายที่เป็น Blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตัวอย่าง การคำนวณหา available chlorine สามารถคำนวณได้จากสูตร

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

ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ (mL)

V_1 = ปริมาตร (mL) ของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตร (mL) ของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต blank

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มัลของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

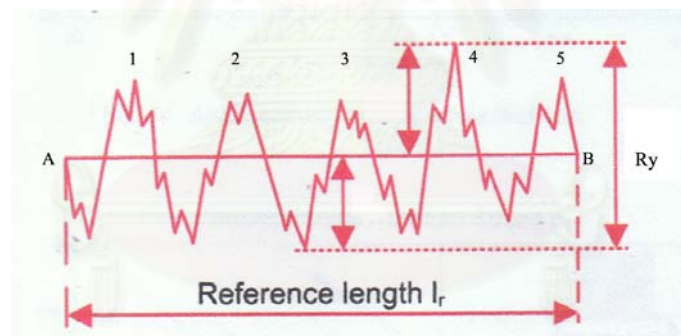
บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การตรวจวัดความขรุขระของพื้นผิว stainless steel

4.1.1 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิว stainless steel ด้วยเครื่อง Surface roughness tester

การวิเคราะห์พื้นผิวทดสอบด้วยวิธี Mitutoyo Oldmix Standard ด้วยเครื่อง surface roughness tester: SV-3000 ทำได้โดยใช้เข็มขนาดเล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด $1\mu\text{m}$ ลากผ่านพื้นผิวทดสอบทั้งตามแนวขวางรอยรีด และตามแนวรอยรีด เป็นระยะทาง 15 มิลลิเมตร ด้วยความเร็ว 0.1 มิลลิเมตร/วินาที ทำให้ได้กราฟเกิดขึ้นดังแสดงในภาคผนวก ข และรูปที่ 4.1 และทำให้ทราบค่าต่างๆดังตารางที่ 4.1 และ 4.2



รูปที่ 4.1 กราฟที่เกิดขึ้นจากการใช้เข็มขนาดเล็ก ($1\mu\text{m}$) ลากไปบนพื้นผิวของ Stainless steel

ตารางที่ 4.1 ตรวจวัดความขรุขระของพื้นผิว stainless steel ตามแนวรอยรีด 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 ตรวจสอบความขรุขระของพื้นผิว stainless steel ตามแนวขวางรอยรีด ด้วยเครื่อง surface roughness tester: SV-3000

ชนิดของ Stainless steel	Parameter (μm)		
	R_a^*	R_y^{**}	R_z^{***}
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 R_a^* คือ ค่าเฉลี่ยความขรุขระของพื้นผิวทั้งหมดที่วัดได้ (R_a : the integral of the absolute value of the roughness profile height over the evaluation length)

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

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

จากการวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวทดสอบทำให้ได้ค่าความขรุขระของพื้นผิวดังแสดงใน ตารางที่ 4.1 และ 4.2 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการตรวจสอบความขรุขระตามแนวขวางรอยรีดและตามแนวรอยรีดมีค่าใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นเมื่อใช้ค่า R_a เป็นตัวระบุความขรุขระของพื้นผิว stainless steel จะเห็นได้ว่า stainless steel ชนิด 316L/2B จะขรุขระมากที่สุด มีค่า 0.143 ± 0.007 และ $0.163\pm 0.009 \mu\text{m}$ เมื่อตรวจสอบตามแนวรอยรีด และขวางแนวรีด ตามลำดับ ในขณะที่ stainless steel 304/2B และ 430/2B มีความขรุขระของพื้นผิวไม่แตกต่างกันคือมีค่า 0.138 ± 0.002 และ $0.139\pm 0.006 \mu\text{m}$ ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบตามแนวขวางรอยรีด แต่ถ้าตรวจสอบตามแนวรอยรีด พบว่าค่าที่ได้แตกต่างกันคือมีค่า 0.126 ± 0.007 และ $0.091\pm 0.003 \mu\text{m}$ ตามลำดับ และ stainless steel 304/BA จะขรุขระน้อยที่สุด คือมีค่า 0.022 ± 0.000 และ $0.020\pm 0.001 \mu\text{m}$ ตามลำดับ หรืออาจกล่าวได้ว่ามีความเรียบมากที่สุด และถ้าใช้ ค่า R_z เป็นตัวระบุความขรุขระของพื้นผิว stainless steel จากตารางที่ 4.1 และ 4.2 จะ

เห็นว่า stainless steel 316L/2B มีความหยาบหรือความขรุขระมากที่สุด รองลงมาคือ stainless steel 304/2B และ 430/2B ตามลำดับ ส่วน 304/BA มีความเรียบมากที่สุด

4.1.2 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวทดสอบด้วย Atomic Force Microscopy

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

ตารางที่ 4.3 ตรวจวัดความขรุขระด้วยวิธี Atomic force microscopy (AFM)

ชนิดของ Stainless steel	Parameter (nm)			Srf. Area (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

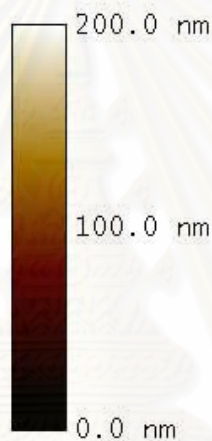
จากตารางที่ 4.3 เมื่อใช้ค่า R_{ms} , R_a และ R_{max} เป็นตัวระบุความขรุขระของพื้นผิว stainless steel จะเห็นว่า จะให้ค่าลักษณะความเรียบความขรุขระเช่นเดียวกับการใช้ค่า R_a และ R_z จากวิธี surface roughness นั่นคือ stainless steel 316L/2B มีความขรุขระมากที่สุด รองลงมาคือ 304/2B 430/2B และ 304/BA ตามลำดับ

สาเหตุที่วิธี Surface roughness ไม่สามารถใช้ค่า R_y เป็นตัวระบุความเรียบความขรุขระได้ เนื่องจากในการวิเคราะห์แต่ละครั้งเข็มที่ลากลงบนพื้นผิว stainless steel อาจจะไปสัมผัสกับบริเวณที่มีความขรุขระมากกว่าบริเวณอื่นๆ ซึ่งไม่ใช่บริเวณที่เป็นตัวแทนของพื้นผิว stainless steel ที่ดี ทำให้ได้แตกต่างจากความเป็นจริง จากเอกสารเผยแพร่ของบริษัทไทยน็อคซ์สตีล (2006) 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 นั้นเกิดจากขั้นตอนการผลิตตั้งเริ่มแรก จนถึงกระบวนการรีดออกมาเป็นแผ่น ไม่ว่าจะเป็นการรีดร้อน หรือรีดเย็น ซึ่งบางครั้งอาจมีการปรับแต่ง

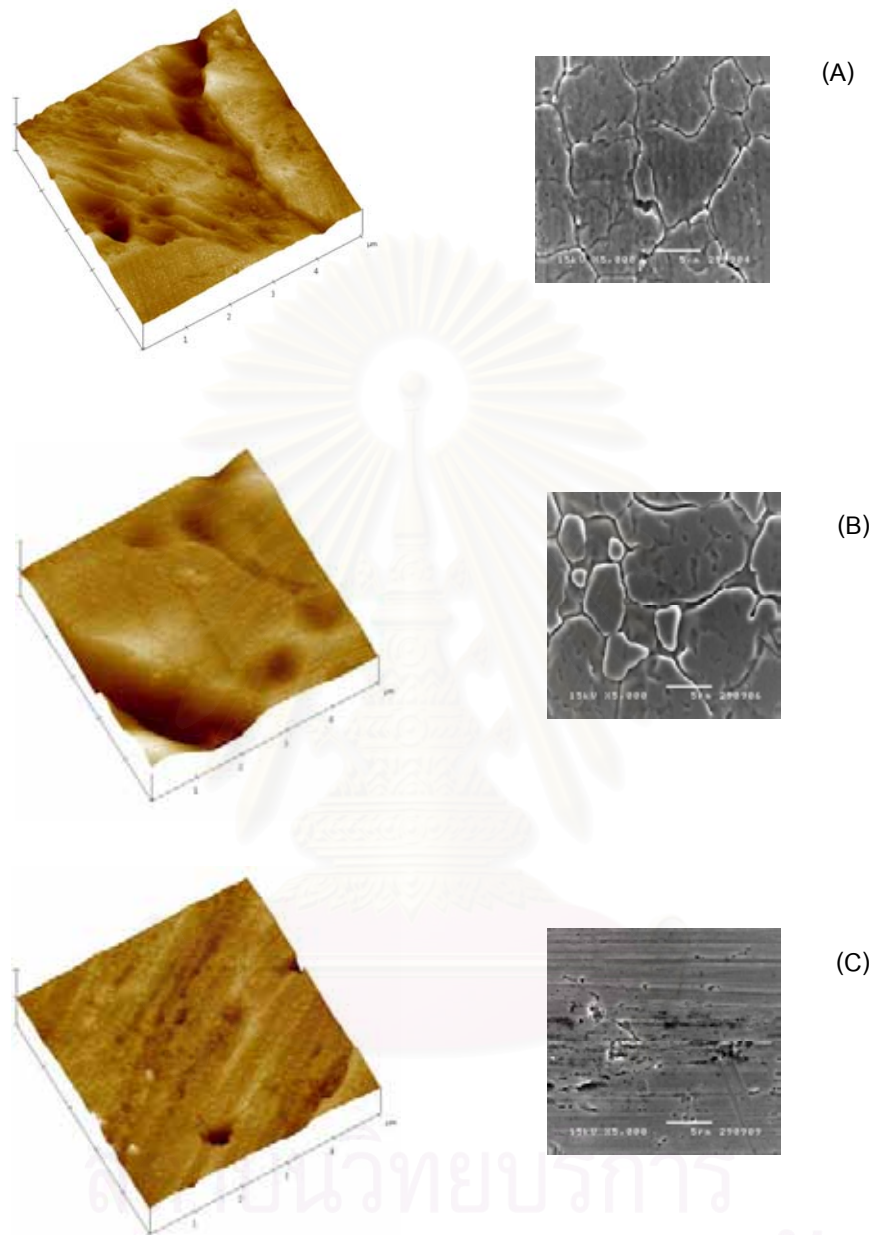
ผิวหน้าเพื่อให้เหมาะสมกับลักษณะงานที่ใช้ ซึ่งค่าความเรียบความขรุขระไม่สามารถกำหนดได้ ดังนั้น ถึงแม้จะเป็น stainless steel ชนิดหรือ เกรด หรือ พื้นผิวเดียวกัน การผลิตแต่ละครั้งค่าความเรียบ ความขรุขระก็อาจจะไม่เท่ากัน ดังนั้นการซื้อขาย stainless steel ในท้องตลาดจะนิยมระบุการซื้อขาย เป็น เกรด และพื้นผิว เป็นส่วนใหญ่ (บริษัทไทยน็อกซ์สตีล, 2006)

วิธี AFM นอกจากจะให้ค่าต่างๆที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังสามารถวิเคราะห์หรือออกมาเป็นรูปภาพได้ รูปภาพที่วิเคราะห์ออกมานั้นจะเป็นภาพสามมิติ (3-D) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากภาพแล้วจะสามารถบอกได้ว่าพื้นผิว stainless steel ชนิดใดมีความเรียบหรือความขรุขระมากกว่ากัน โดยใช้แถบสีที่มีสเกล บอกความขรุขระของพื้นผิวระบุไว้ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 สเกลบอกความเรียบ ความขรุขระ ของ Stainless steel ด้วยวิธี AFM

จากรูปที่ 4.3 เป็นการเปรียบเทียบรูปภาพที่ได้จากการวิเคราะห์ ด้วยวิธี SEM และ AFM โดย รูปทางซ้ายมือ เป็นรูปที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย AFM มีลักษณะเป็นภาพสามมิติ มองเห็นความเรียบ ความขรุขระได้อย่างชัดเจน ส่วนทางขวามือเป็นรูปภาพที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM มี ลักษณะเป็นภาพสองมิติ ซึ่งจะเห็นรอยแตกบนผิวหน้าของ stainless steel ได้อย่างชัดเจนเช่นกัน

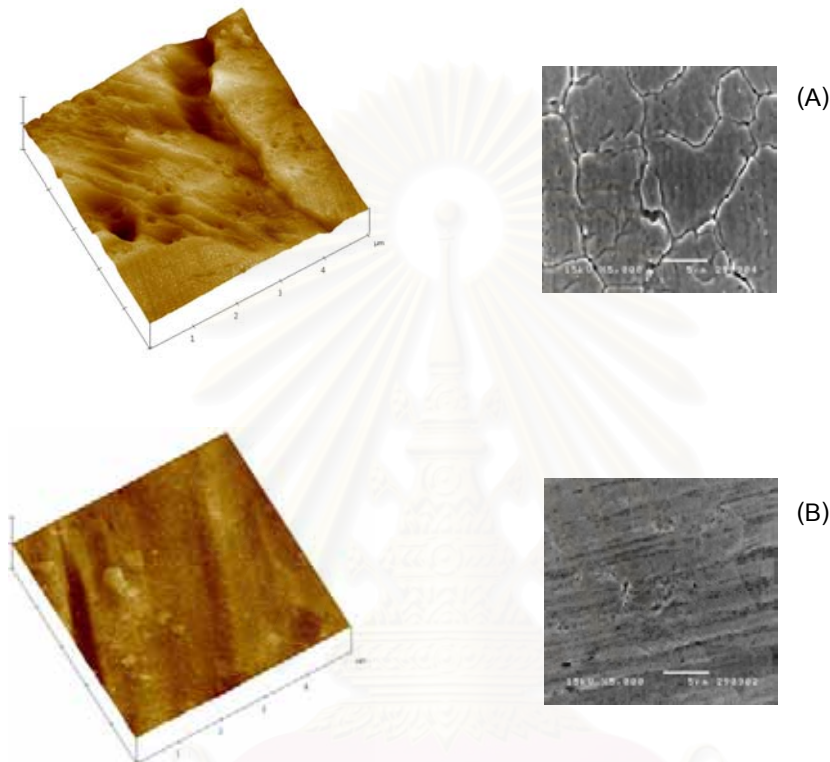


รูปที่ 4.3 ลักษณะพื้นผิวของ stainless steel เกรดต่างๆ เมื่อตรวจด้วยวิธี AFM และ SEM

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 เมื่อเทียบกับสเกล (รูปที่ 4.2) แล้ว พบว่าหลุมไม่ลึกมากนัก และเมื่อดูรูปทางขวามือ (SEM) จะเห็นไปในทิศทางเหมือนกัน คือ ผิวหน้าค่อนข้างขรุขระและช่องรอย

แตกของพื้นผิวอยู่ห่างกัน นั่นอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเข็มที่ใช้ในการวิเคราะห์ลากผ่านพื้นผิว ชนิดนี้อาจจะไม่สัมผัสรอยแยกดังกล่าว จึงทำให้ค่าที่ตรวจวัดได้มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง ในขณะที่รูป B ซ้ายมือพื้นผิวหน้าค่อนข้างเรียบแต่มีหลุมลึก เมื่อเทียบกับสเกลลี ส่วนรูปขวามือ(SEM) ซองรอยแตก ค่อนข้างอยู่ใกล้ชิดกัน และสุดท้ายรูป C พื้นผิวค่อนข้างเรียบ มีร่องน้อย และมีหลุมอยู่บ้างแต่ไม่ลึก

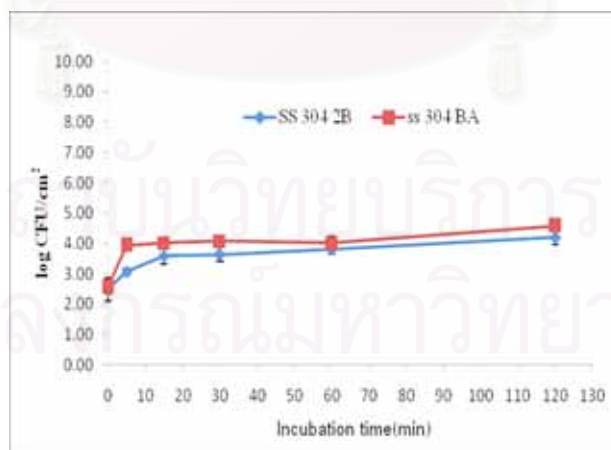


รูปที่ 4.4 ลักษณะของพื้นผิวของ stainless steel เมื่อตรวจด้วยวิธี AFM และ SEM โดย A) stainless steel 304/2B และ B) stainless steel 304/BA

จากรูปที่ 4.4 เห็นได้ชัดเจนว่ารูป A มีความขรุขระมากกว่ารูป B อย่างชัดเจน ทั้งวิธี AFM และ SEM นั้นแสดงว่า พื้นผิว 2B มีความหยาบหรือขรุขระมากกว่าพื้นผิว BA (พื้นผิว BA เรียบกว่า 2B) ซึ่งจากข้อมูลของบริษัทไทยน็อคซีได้ระบุไว้ว่า พื้นผิว BA มีความเรียบจนสามารถสะท้อนแสงได้ 54% กล่าวคือเมื่อนำวัตถุวางลงบน stainless steel สามารถมองเห็นวัตถุบนพื้นผิวได้ ในขณะที่พื้นผิว 2B สามารถสะท้อนแสงได้เพียง 13 % 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 ที่ก่อให้เกิดการเกาะติดที่เวลาต่างๆ 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/cm² ตามลำดับ และหลังจาก 0 นาที เชื้อสามารถเกาะบนแผ่น stainless steel ได้เพิ่มมากขึ้น สังเกตได้จากกราฟในรูปที่ 4.5 ซึ่งขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0-15 นาที (รูปที่ 4.5) และถ้าทิ้งแผ่น stainless steel ไว้ในอาหารเป็นเวลานานก็จะมีจำนวนเชื้อที่เกาะติดและเจริญบนแผ่น stainless steel เพิ่มขึ้นด้วย และที่เวลา 120 นาที ตรวจพบจำนวนเซลล์มีค่า 4.21 ± 0.24 และ 4.59 ± 0.07 log CFU/cm² บนแผ่นพื้นผิวทดสอบชนิด 304/2B และ 304/BA ตามลำดับ (ภาคผนวก ข1)



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 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็น $3.95 \pm 0.11 \log \text{CFU/cm}^2$ กล่าวคือเพิ่มขึ้นประมาณ $1.38 \log \text{CFU/cm}^2$ ในขณะที่จำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่เจริญบนแผ่น stainless steel 304/2B เพิ่มขึ้นเพียง $0.58 \log \text{CFU/cm}^2$ จากเริ่มต้น หลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 นาทีเป็นต้นไป การเพิ่มจำนวนของ *S. Anatum* บนแผ่น stainless steel ทั้งสองชนิดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ ค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อเวลานานมากขึ้น

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

ปัจจุบันนอกเหนือจาก conventional cultivating method แล้ว วิธีการตรวจหาปริมาณเชื้อบนพื้นผิวยังมีด้วยกันอีกหลายวิธี ค่าที่ตรวจวัดได้สามารถออกมาในรูปเชิงปริมาณ (quantitative) เช่น epifluorescence microscopy ด้วยการย้อมสีเซลล์ แล้วนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือในเชิงคุณภาพ (qualitative) เช่น scanning electron microscopy, ATP bioluminescence และ การตรวจวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เมื่อย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมเซลล์ เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้อาจจะเหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อบนแผ่น stainless steel ได้ดีกว่า conventional cultivating method ก็เป็นได้ ซึ่งพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์บนพื้นผิว ขึ้นกับระยะการเจริญของเซลล์ (growth phase) ชนิดและคุณสมบัติของพื้นผิว สารอินทรีย์ ตลอดจนสิ่งแวดล้อมต่างๆ pH และอุณหภูมิ เป็นต้น (Oulahal et al., 2008)

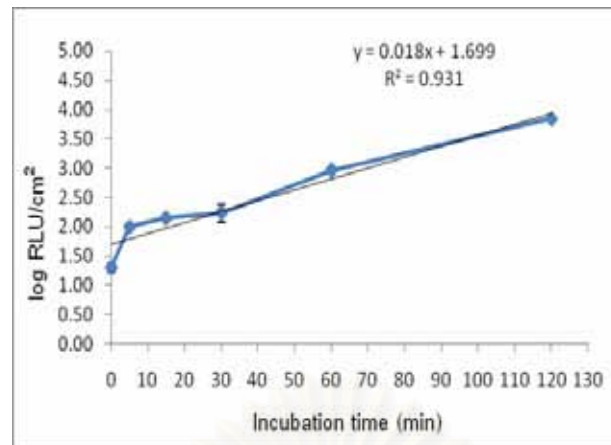
กนกทิพย์ (2549) อธิบายถึงกลไกของการเกาะติดและสร้างฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่างๆ โดยแสดงความสัมพันธ์ของแรงยึดเกาะกับระยะห่างของเซลล์กับพื้นผิว กล่าวคือ เมื่อมีสารอาหารหลงเหลือบนพื้นผิวจนเกิดเป็นฟิล์มของอาหาร (Conditioning film) เซลล์จุลินทรีย์อิสระ (planktonic cell) ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมจะเคลื่อนที่เข้าหาพื้นผิว จนเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับ

พื้นผิวมากกว่า 50 นาโนเมตร เซลล์จะเกิดการเกาะติดกับพื้นผิวด้วยแรงอย่างอ่อน เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์เข้าใกล้กับพื้นผิวมากขึ้นจนระยะห่างมีค่า 10-20 นาโนเมตร แรงที่ยึดเกาะนั้นจะเพิ่มขึ้น ทั้งสองระยะนี้เป็นขั้นตอนของการเกาะติดแบบผันกลับได้ จนในที่สุดเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวลดลงต่ำกว่า 15 นาโนเมตร เซลล์จุลินทรีย์เหล่านั้นจะเกิดการสร้างพันธะพิเศษ เกิดเป็นการเกาะติดแบบไม่ผันกลับ เซลล์ต่างๆ เหล่านี้จะมีการเจริญเพิ่มจำนวนและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มต่อไป

Mufu และคณะ (1990) ศึกษาการเกาะติดของ *L. monocytogenes* บนพื้นผิวหลายชนิด ได้แก่ สแตนเลสสตีล แก้ว โพลีโพรพิลีน และยาง จากการศึกษาพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด (scanning electron microscope) พบว่าเนื่องจากแผ่นแก้วมีพื้นผิวที่เรียกว่าพื้นผิวอื่น ส่วนยามีลักษณะเป็นช่องลึกและมีรอยแยกขนาดใหญ่กว่า ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเกาะติดพื้นผิวของยางได้มากกว่าพื้นผิวชนิดอื่น

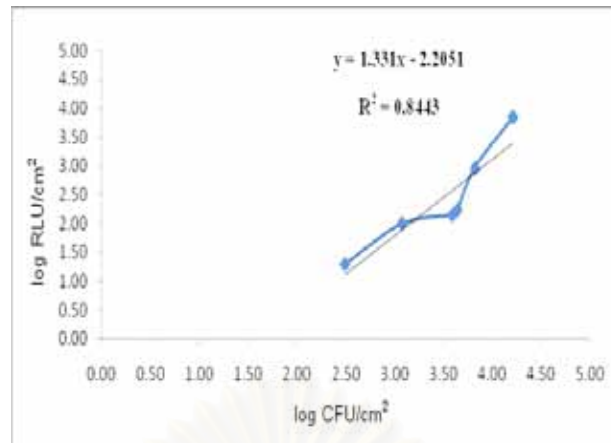
ต่อมา Chmielewski และ Frank (2003) ได้รวบรวมงานวิจัยและสรุปว่า การเกาะติดของจุลินทรีย์เกิดขึ้นบนพื้นผิวที่มีพลังงานอิสระสูงหรือมีความเปียกน้ำได้ง่าย เช่น สแตนเลสสตีลและแก้วที่มีลักษณะเป็นไฮโดรฟิลิกหรือคุณสมบัติชอบน้ำ ได้ดีกว่าพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิก หรือไม่ชอบน้ำ เช่น เทฟลอน ไนลอน ยาง เป็นต้น แต่จากข้อสรุปดังกล่าวอาจไม่เป็นจริงเสมอไป มีรายงานวิจัยพบว่า แบคทีเรียบางชนิดสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกมากกว่าพื้นผิวไฮโดรฟิลิก (Sinde and Carballo, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ไม่สม่ำเสมอ มีรอยแยก จะทำให้เกิดการเกาะติดได้ดีกว่าพื้นผิวที่เรียบ

ส่วนวิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* บนแผ่น stainless steel ที่ระยะเวลา 0-120 นาที ใช้วิธีการตรวจวัด ATP จากเครื่อง Hy-lite[®] 2 ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว (rapid method) ค่าที่ตรวจวัดได้สามารถระบุในรูป RLU (Relative Light Unit) ซึ่ง RLU จะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีอยู่บนแผ่นทดสอบ ถ้ามีจำนวนเซลล์อยู่บนแผ่นทดสอบจำนวนมาก ค่าที่ตรวจวัดออกมาได้ก็จะสูง โดยพบว่าที่เวลา 0 นาที สามารถตรวจวัดค่า ATP ได้ $1.30 \pm 0.08 \log \text{RLU/cm}^2$ (รูปที่ 4.6) และเมื่อเวลานานมากขึ้น ค่า RLU ก็มีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย แสดงว่ามีเซลล์แบคทีเรียเกาะติดบนแผ่นทดสอบได้มากขึ้นด้วย โดยพบว่าที่เวลา 120 นาที มีค่า RLU เท่ากับ $3.84 \pm 0.03 \log \text{RLU/cm}^2$ (ภาคผนวก ข2) เมื่อคำนวณหาค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.9319 แสดงว่าระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม และค่า RLU ที่ตรวจวัดได้สัมพันธ์กันเป็นอย่างดี



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

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์บนแผ่น stainless steel ทั้งสองวิธีคือ spread plate technique และการตรวจวัด ATP ที่เวลา 0-120 นาที พบว่ามีความสัมพันธ์กันน้อย ($R^2=0.8443$) (รูปที่ 4.7) ที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่นในการตรวจวัด ATP จะต้องอาศัยการทำปฏิกิริยากันระหว่างเอนไซม์ลูซิเฟอริน/ลูซิเฟอเรส กับโมเลกุล ATP ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต แล้วปล่อยแสงออกมาจึงจะสามารถตรวจวัดค่าได้ แต่ในขบวนการการตรวจวัด ตั้งแต่การใช้ไม้อัดกวาดลงบนตัวอย่าง จนถึงการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ตัวอย่างถูกเจือจางหลายขั้นตอน ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ในตัวอย่างลดลงไป เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ทำให้ตรวจวัดค่า ATP ได้ค่าน้อยกว่าความเป็นจริง และ ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำหรับเซลล์มีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั้ง prokaryotic และ eukaryotic cell (Kaskova et al, 2006) จึงสามารถตรวจวัด ATP ของเซลล์ดังกล่าวได้ด้วยวิธีการนี้ ประกอบกับเศษอาหารหรือสารอินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่บนพื้นผิวก็เป็นแหล่งที่สามารถให้ ATP ได้เช่นกัน ค่า ATP ที่ตรวจวัดได้จึงไม่สามารถบอกได้ว่ามาจากเซลล์ของ *S. Anatum* เพียงอย่างเดียว อาจมาจากแหล่งอื่นก็เป็นได้ และเป็นที่น่าสังเกตว่าค่าที่มากที่สุดที่สามารถตรวจวัดค่า ATP แบบ linear ได้ด้วยวิธีนี้ อยู่ในช่วง 0-99,000 RLU หรือ แบบ logarithmic อยู่ในช่วง 0-5.00 log₁₀ RLU ดังนั้นถ้าการตรวจวัดด้วยวิธี spread plate technique มีค่ามากกว่า 5 log CFU เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจึงส่งผลให้มีความสัมพันธ์กันน้อยดังกล่าว



รูปที่ 4.7 วิธีการตรวจสอบจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* บนแผ่น stainless steel ชนิด 304/2B โดย แกน X เป็นวิธีการตรวจสอบด้วยการนับจำนวนเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate technique) แกน Y เป็นการตรวจวัด ATP ด้วยวิธี ATP bioluminescence

จากที่กล่าวไปข้างต้นว่า การตรวจวัด ATP จะต้องอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ โมเลกุลของ ATP ดังนั้นการเก็บรักษาเอนไซม์อย่างถูกต้องตามวิธีที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญมากเพื่อ ป้องกันไม่ให้เอนไซม์เสียสภาพได้

อย่างไรก็ตามวิธี ATP bioluminescence ก็ไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้หาปริมาณเชื้อทั้งหมด (total count) บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร (Aycicek, Ozus and Karci., 2006) เพราะว่าของเสียที่ หลงเหลือจากการทำความสะอาดในกระบวนการผลิต เช่น เลือด หรือ เศษเนื้อ เป็นต้น จะเป็นตัวเพิ่ม ค่า RLU ได้ (Kaskova et al, 2006) ทำให้การตรวจสอบผิดพลาดกล่าวคือ อาจสรุปได้ว่าวิธี ATP bioluminescence มีช่วงในการตรวจวัดที่จำกัดและไม่สามารถบอกความแตกต่างของแหล่งปนเปื้อน ได้ชัดเจน ดังนั้นโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร จึงน่าจะใช้ในการตรวจสอบขั้นต้นว่าสายการผลิตอาหาร ณ ตอนนั้นหรือเวลานั้นมีการปนเปื้อนมากน้อยเพียงใด จำเป็นต้องทำความสะอาดหรือไม่เท่านั้น

4.3 ผลการศึกษาชนิดของเกรดของ stainless steel ต่อการเกิดไบโอฟิล์ม

เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel) เป็นวัสดุที่มีคุณภาพเพราะมีคุณสมบัติด้านทานการกัดกร่อน แข็งแรง และสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย สามารถจำแนกประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม ได้จากเลขรหัสที่กำหนดขึ้นตามมาตรฐาน AISI เช่น 304 304L 316 และ 316L เป็นต้น โดยส่วนผสม จะเป็นตัวกำหนดเกรดของเหล็กกล้าไร้สนิม โรงงานอุตสาหกรรมอาหารมีความต้องการในการใช้งานที่ แตกต่างกันไป ดังนั้นเพื่อให้เหมาะสมกับกระบวนการผลิตอาหารของแต่ละประเภท ปัจจุบันก็ปัจจัยหนึ่งที่น่าสนใจและควรศึกษาว่ามีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์มหรือไม่ คือชนิดของเกรดของ stainless steel

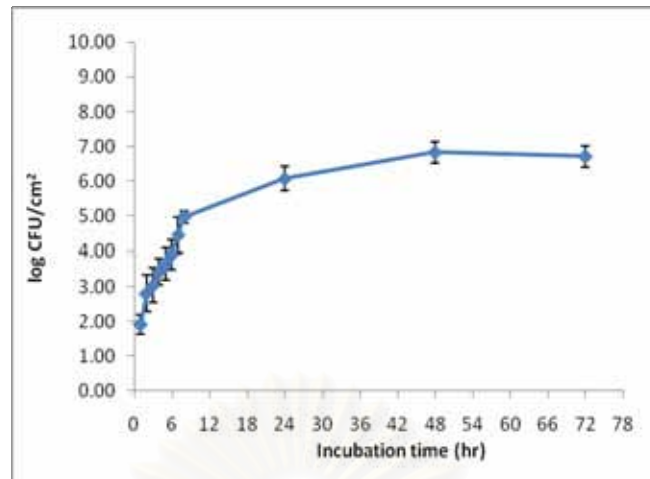
ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้เลือกเกรดของ stainless steel 304 316L และ 430 มาเป็นหัวข้อในการศึกษา เพราะเกรดทั้งสามชนิดนี้ ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

จากการทดลองข้างต้น ทำให้ทราบว่าที่เวลา 0 นาทีก็เพียงพอที่จะทำให้ *S. Anatum* สามารถเกาะติดบน stainless steel ได้ทันที ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงจุ่มแผ่นทดสอบใน suspension ของเชื้อเพียง 30 วินาที เพื่อเป็นการยืนยันว่ามีเชื้อติดมาแน่นอน แล้วย้ายใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ ที่ไว้ตามระยะเวลาที่กำหนดคือเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้วิธี spread plate technique ตรวจปริมาณเซลล์ของ *S. Anatum* บนแผ่น stainless steel ในช่วงเวลา 1-8 ชั่วโมงแรก พบว่าสามารถตรวจพบจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบเกรด 304 มีค่า $1.91 \pm 0.27 - 4.98 \pm 0.18 \log \text{CFU/cm}^2$ หลังจากการบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์ $6.08 \pm 0.35 \log \text{CFU/cm}^2$ ในขณะที่จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบเกรด 316L มีจำนวนเซลล์ $3.37 \pm 0.24 - 4.36 \pm 0.18 \log \text{CFU/cm}^2$ ที่เวลา 1-8 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมากที่สุดหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบไว้ 72 ชั่วโมง พบว่ามีค่า $6.58 \pm 0.47 \log \text{CFU/cm}^2$ และจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบเกรด 430 ในช่วง 1-8 ชั่วโมง มีค่า $2.83 \pm 0.31 - 5.61 \pm 0.01 \log \text{CFU/cm}^2$ และมีค่า $7.11 \pm 0.18 \log \text{CFU/cm}^2$ ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ภาคผนวก ๖)

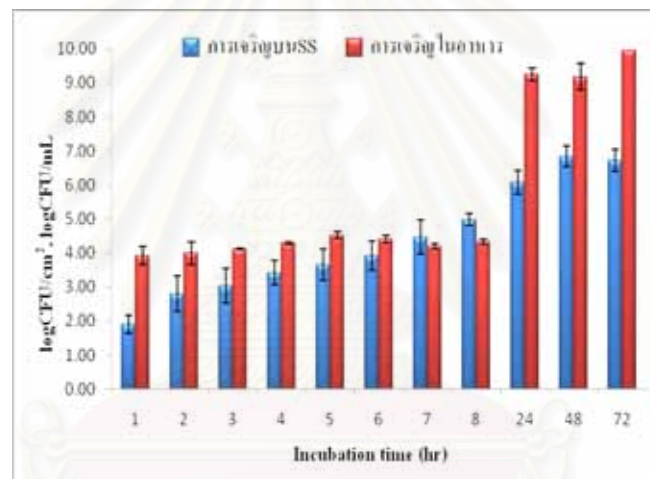
เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เกาะและตรวจสอบได้บนแผ่นทดสอบกับจำนวนเซลล์ที่เป็นอิสระภายในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า แผ่นทดสอบเกรด 304 มีปริมาณเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่นที่เวลา 1 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมีค่า $1.91 \pm 0.27 \log \text{CFU/cm}^2$ ในขณะที่ปริมาณเซลล์ที่เป็นอิสระภายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า $3.93 \pm 0.27 \log \text{CFU/mL}$ (รูปที่ 4.8B) แสดงให้เห็นว่าปริมาณเซลล์ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณมากกว่าที่สามารถตรวจวัดได้บนแผ่นทดสอบ และเมื่อมีการบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลานานมากขึ้นจำนวนเซลล์ที่สามารถตรวจวัดได้กับจำนวนเซลล์ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ยังคงแตกต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(A)

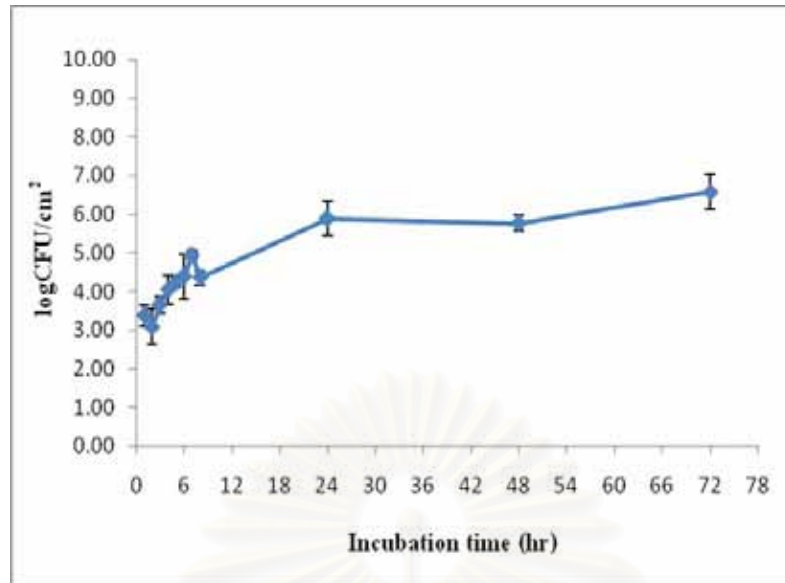


(B)

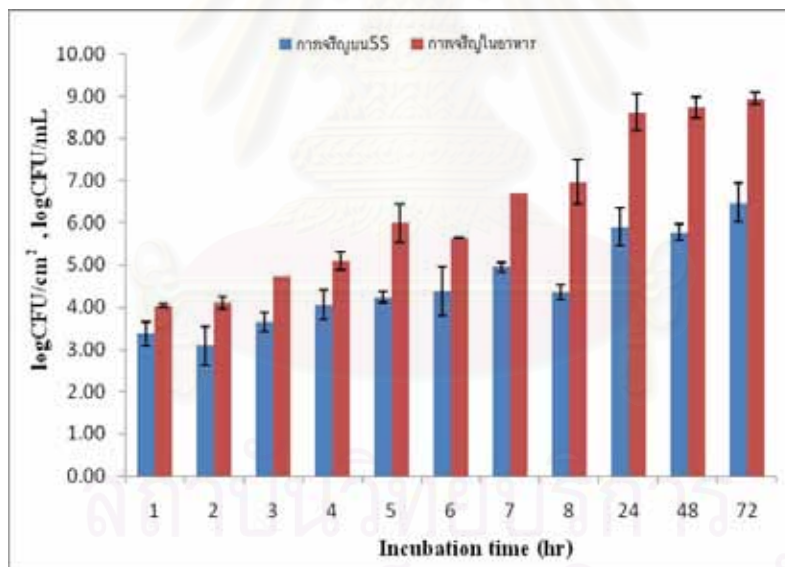


รูปที่ 4.8 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่น stainless steel เกรด 304 เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ (B) เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของ *Salmonella* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบกับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

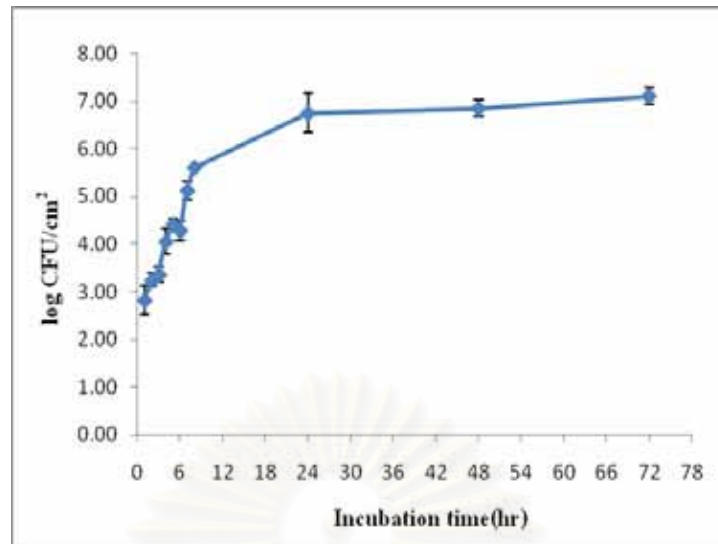
(A)



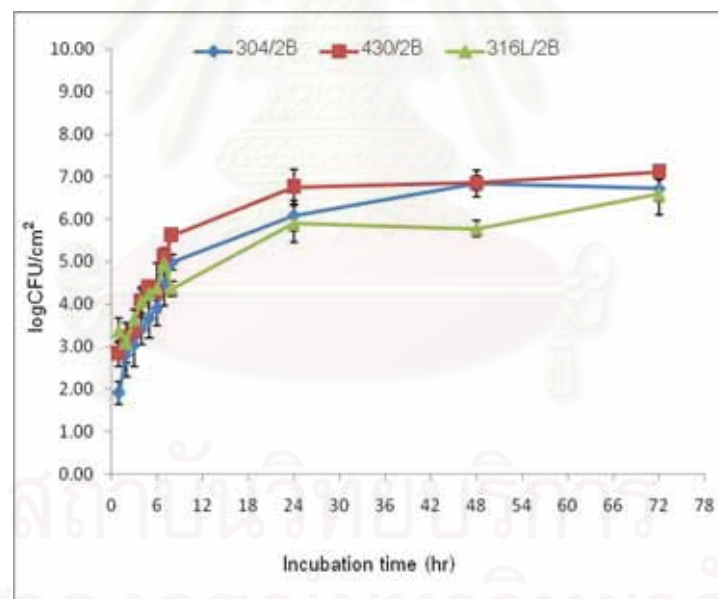
(B)



รูปที่ 4.9 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่น stainless steel เกรด 316L เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารสดใหม่ (B) เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของ *Salmonella* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบกับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่น stainless steel เกรด 430 เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มี ปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.11 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบเกรด 304, 316L และ 430

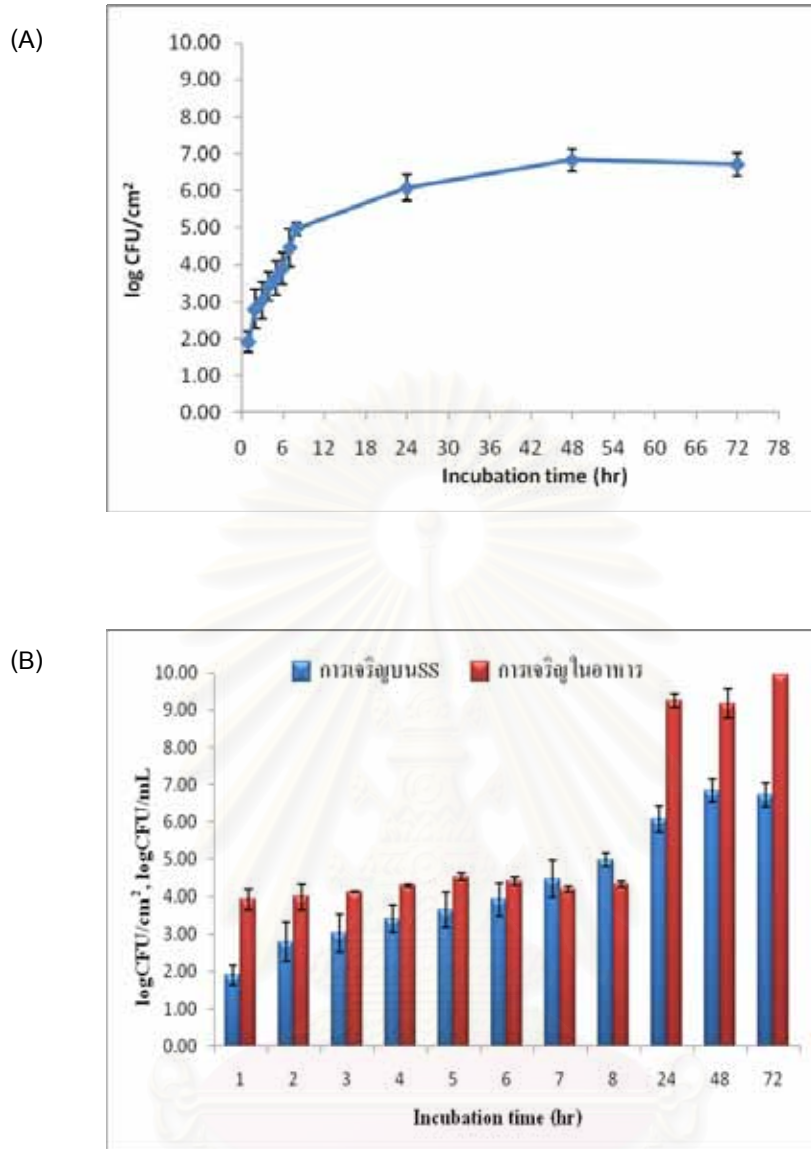
เมื่อพิจารณาถึงความเรียบความขรุขระของพื้นผิวของ stainless steel ที่ได้ทดสอบแล้วข้างต้นนั้น พบว่า stainless steel เกรด 316L มีความขรุขระมากที่สุด ในขณะที่เกรด 430 มีความเรียบที่สุด แต่จำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่สามารถตรวจวัดได้บนพื้นผิวกลับพบว่า สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* บนพื้นผิวที่เรียบ (เกรด 430) ได้มากกว่าพื้นผิวขรุขระ (เกรด 316L) ดังแสดงในรูปที่ 4.11 และเมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ *S. Anatum* บนแผ่นทดสอบทั้งสาม

เกรด คือ 304 316L และ 430 โดยคำนวณค่า specific growth rate ของเชื้อ พบว่ามีค่า growth rate เท่ากับ 10.54 11.68 และ 12.49 ต่อหน้าที่ บนแผ่นทดสอบเกรด 304 316L และ 430 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของ *S. Anatum* บนแผ่นทดสอบเกรด 430 สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าเกรด 304 และ เกรด 316L ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าความขรุขระของเกรดของ stainless steel ซึ่งเมื่อสัมผัสด้วยสายตาไม่สามารถประเมินความแตกต่างได้ ไม่ได้มีผลต่อการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าส่วนประกอบทางเคมีของ stainless steel แต่ละเกรด อาจส่งผลต่อการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์ม

4.4 ผลการศึกษาชนิดของพื้นผิว (Finish) ของ Stainless steel ต่อการเกิดไบโอฟิล์ม

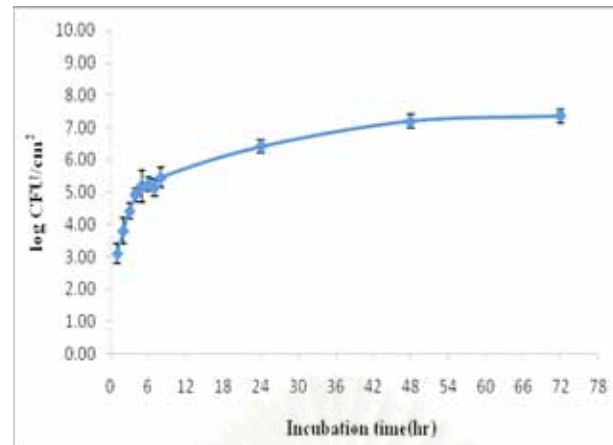
ลักษณะของพื้นผิว ที่จะสัมผัสกับอาหารนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเกิดไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังนั้นการเลือกชนิดของพื้นผิวไม่ถูกต้อง จะมีผลในการสะสมของเศษอาหารและเกิดเป็นไบโอฟิล์มขึ้นได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกชนิดของพื้นผิวที่แตกต่างกันมาทดสอบการเกิดไบโอฟิล์ม โดยเลือกใช้ stainless steel พื้นผิวชนิด BA และพื้นผิวชนิด 2B มาทดสอบการเกิดไบโอฟิล์มเปรียบเทียบกัน 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 $3.10 \pm 0.30 - 5.45 \pm 0.31 \log \text{ CFU/cm}^2$ และหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ $7.35 \pm 0.22 \log \text{ CFU/cm}^2$ (รูปที่ 4.12, ภาคผนวก ข7) และเมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบและจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีลักษณะแบบแผนเช่นเดียวกับเกรดของ stainless steel คือมีความแตกต่างกันของเซลล์บนแผ่นทดสอบและจำนวนเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นพื้นผิวชนิด BA ที่เวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมีจำนวน $6.41 \pm 0.22 \log \text{ CFU/cm}^2$ แต่จำนวนเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำนวน $8.90 \pm 0.30 \log \text{ CFU/mL}$ (รูปที่ 4.12 A และ B)

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

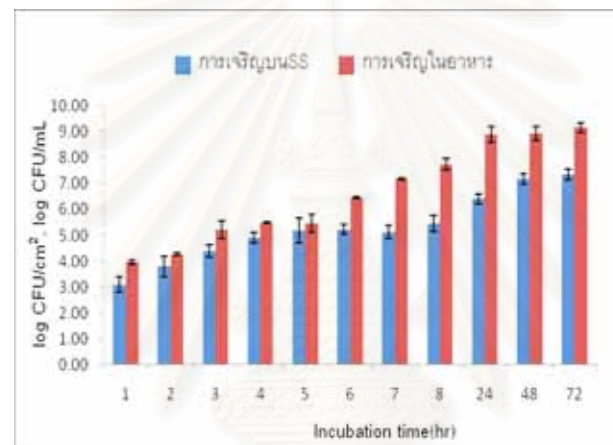


รูปที่ 4.12 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่น stainless steel พื้นผิว 2B เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มี ปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ (B) เปรียบเทียบ จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบกับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

(A)

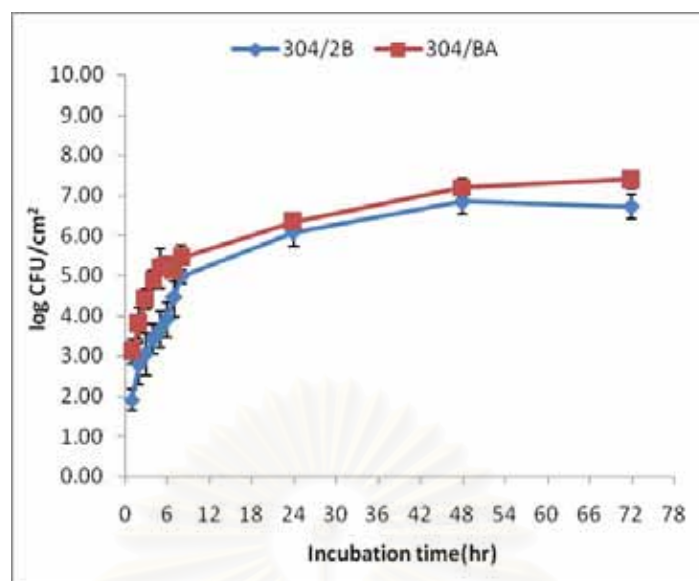


(B)



รูปที่ 4.13 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่น stainless steel พื้นผิว BA เมื่อจุ่มในสารละลาย TSB ที่มี ปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหารสดใหม่ (B) เปรียบเทียบ จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบกับจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



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/cm² บน stainless steel พื้นผิวชนิด 2B และ BA ตามลำดับ นั้นแสดงว่าเชื้อสามารถเกาะติดมาบนแผ่นทดสอบพื้นผิว BA ได้ดีกว่าบนพื้นผิว 2B และเมื่อนำแผ่นทดสอบมาบ่มโดยให้ได้รับสารอาหารในการเจริญและแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน ทำให้การเจริญบนพื้นผิว BA เจริญได้ดีกว่าที่พื้นผิว 2B ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาค่า specific growth rate ของเชื้อบนพื้นผิวทั้งสองชนิดพบว่ามีค่า growth rate เท่ากับ 10.54 และ 11.50 ต่อวันที่ ตามลำดับ ค่านี้แสดงให้เห็นว่าการเจริญของ *S. Anatum* บนพื้นผิว BA เจริญได้ดีกว่าพื้นผิว 2B แต่ถ้าพิจารณาจากความขรุขระของพื้นผิวด้วยการทดสอบข้างต้น พบว่าพื้นผิว 2B มีความขรุขระมากกว่าพื้นผิวชนิด BA เป็นอย่างมาก ดังนั้นการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* จึงไม่ได้สัมพันธ์กับความขรุขระแต่อย่างใด ทั้งนี้จึงอาจเป็นไปได้ว่า *S. Anatum* สามารถใช้โครงสร้างของเซลล์ เช่น แฟลกเจลลา หรือพิไล ช่วยในการเกาะติดและเกิดไบโอฟิล์ม มากกว่าจะอาศัยความเรียบความขรุขระของพื้นผิว stainless steel เป็นตัวช่วยในการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์ม

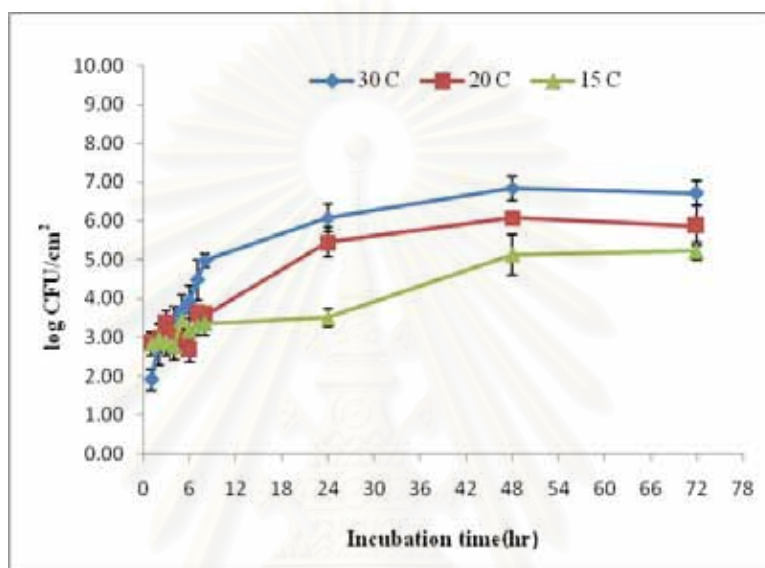
4.5 อุณหภูมิและปริมาณเชื้อที่มีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* บนแผ่น stainless steel ชนิด 304/2B

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้อย่างเหมาะสม เมื่อจุลินทรีย์มีการเกาะติดบนพื้นผิวแล้วอุณหภูมิจะทำให้จุลินทรีย์สามารถพัฒนาไปเป็นไบโอฟิล์มได้ จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน จึงทำให้เกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นอิทธิพลของอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จะต้องทำการศึกษาค้นคว้า ประกอบกับจำนวนเชื้อในธรรมชาติที่ไม่เท่ากันจึงมีความสามารถในการเกิดไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาค้นคว้าไป การทดลองครั้งนี้ได้เลือกอุณหภูมิที่ครอบคลุมกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์ปีก เช่น เนื้อไก่ คือเลือกศึกษาที่อุณหภูมิ 15 20 และ 30 องศาเซลเซียส

จากการทดลองข้างต้น ทำให้ทราบว่าที่เวลา 0 นาที (จุ่มแผ่นทดสอบแล้วยกขึ้นทันที) *S. Anatum* สามารถเกาะติดบนแผ่น stainless steel ได้ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงจุ่มแผ่นทดสอบใน suspension ของเชื้อ เพียง 30 วินาที แล้วย้ายแผ่นทดสอบใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ ทิ้งไว้ตามระยะเวลาที่กำหนด ซึ่งจากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อเป็น $8 \log \text{CFU/mL}$ ช่วง 1-8 ชั่วโมงแรก สามารถตรวจพบ *S. Anatum* ที่เกาะติดบนแผ่น stainless steel ได้ และสามารถตรวจพบได้มากในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $3 \log \text{CFU/mL}$ พบว่า ที่เวลา 1-8 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อบนแผ่น stainless steel ด้วยวิธี spread plate technique ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเชื้อที่ติดมาอาจมีปริมาณน้อยมาก และหลุดไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงต้องอาศัยระยะเวลาพอสมควรที่จะให้เชื้อเพิ่มจำนวน จึงจะตรวจพบเชื้อได้ แต่จากการตรวจสอบด้วยการตรวจวัดพลังงาน ATP จากเซลล์ สามารถตรวจวัดพลังงาน ATP ได้ในช่วง 1-8 ชั่วโมงแรก แต่ค่าที่ตรวจวัดได้ค่อนข้างที่จะมีความแปรผันเป็นอย่างมากคือ มีค่าตั้งแต่ 4 – 66 RLU/cm² จึงอาจจะกล่าวได้ว่า จริงๆแล้วมีเชื้อเกาะติดบนแผ่นทดสอบ แต่เชื้อที่เกาะติดมีจำนวนน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี spread plate technique ที่ใช้กันโดยทั่วไปได้ ในขณะที่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป สามารถตรวจวัดได้ทั้งวิธี spread plate technique และการตรวจวัดพลังงาน ATP โดยการตรวจวัดพลังงาน ATP สามารถวัดค่าการตรวจสอบได้ตั้งแต่ 2,200 – 15,000 RLU/cm²

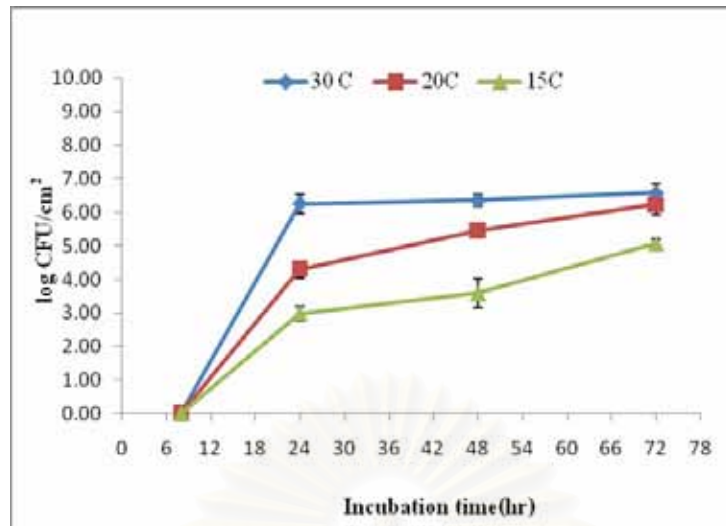
เมื่อพิจารณาถึงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *S. Anatum* บนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มแผ่นทดสอบลงใน suspension ของเชื้อ ความเข้มข้น $8 \log \text{CFU/mL}$ ก่อนจะย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S. Anatum* สามารถเจริญได้ดีและเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมีค่า 6.08 ± 0.35 , 5.45 ± 0.39 และ $3.50 \pm 0.35 \log \text{CFU/cm}^2$ (รูปที่ 4.15) ซึ่งแต่ละอุณหภูมิจะแตกต่างกันอยู่ประมาณ 1 log cycle และพบว่าที่ เวลา 72 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อมากที่สุด มีค่า 6.72 ± 0.31 , 5.87 ± 0.51 และ $5.22 \pm 0.22 \log \text{CFU/cm}^2$ ที่อุณหภูมิ 30, 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาคผนวก ๓) และ

ถ้าจุ่มแผ่นทดสอบลงใน 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/cm² ที่อุณหภูมิ 30, 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาคผนวก ข4)



รูปที่ 4.15 จำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* บนแผ่นทดสอบที่จุ่มลงใน TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL ก่อนที่จะย้ายไปใส่ในอาหารหลอดใหม่ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C, 20°C และ 15°C ทำการตรวจนับเชื้อ ด้วยวิธี spread plate technique

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



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 ได้มากและจะเจริญและเพิ่มจำนวนบนแผ่น stainless steel ได้ดี ในขณะที่ปริมาณเริ่มต้นของเชื้อระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ความสามารถในการเกาะติดมาบนแผ่นทดสอบน้อย จึงต้องอาศัยระยะเวลาในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน จึงสามารถตรวจสอบได้

ในปี ค.ศ. 2003 Stepanovic และคณะ 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 ต่อมา 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 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ที่ 20°C และ 25°C ไบโอฟิล์มเกิดขึ้นได้น้อย ส่วนการบ่มที่อุณหภูมิ 30-42 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเกิดไบโอฟิล์มไม่แตกต่างจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

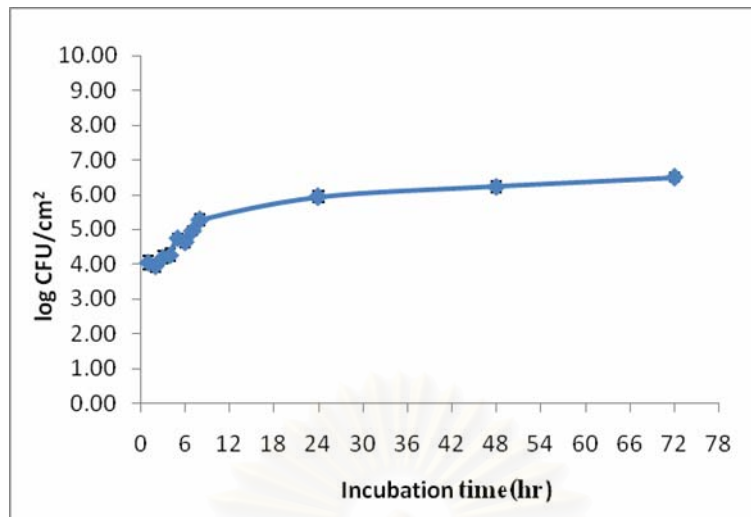
ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเกิดไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ต่าง ๆ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญที่แตกต่างกัน อุณหภูมิที่

จุลินทรีย์เจริญได้จะอยู่ระหว่างอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) และอุณหภูมิต่ำสุด (minimum temperature) ซึ่งถ้าอุณหภูมิต่ำหรือต่ำกว่านี้ จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ (optimum temperature) จึงที่แตกต่างกันออกไปตามแต่ชนิดของจุลินทรีย์ สำหรับ *Salmonella* spp. พบว่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิในร่างกายคนหรือสัตว์ หรือเรียกว่า Mesophilic bacteria โดยช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้อย่างเหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-45°C แต่อย่างไรก็ตาม ในอุตสาหกรรมอาหาร กระบวนการตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งถึงปลายทางมีความต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ โดยผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้าจะใช้เป็นวัตถุดิบ (raw material) สำหรับขั้นตอนต่อมา การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนของการผลิตจึงส่งผลกระทบต่อโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดไบโอฟิล์มขึ้นได้ในกระบวนการผลิต (สุมนทนา และคณะ, 2548)

4.6 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารต่อการเกิดไบโอฟิล์ม

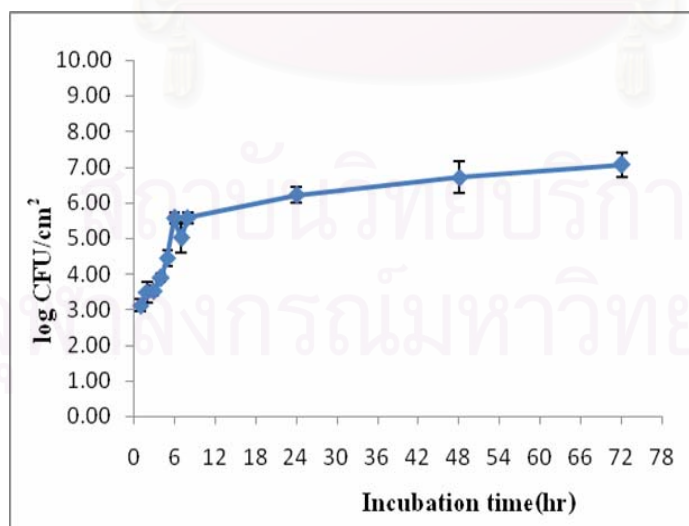
สารอาหารเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะจุลินทรีย์ต้องการสารอาหารไปใช้เป็นกิจกรรมภายในเซลล์สำหรับแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การที่มีสารอาหารมากหรือน้อยแตกต่างกัน จะมีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์มหรือไม่ เป็นสิ่งที่จะต้องทำการศึกษา ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า *S. Anatum* สามารถเกาะติดและเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่น stainless steel ชนิด 304/2B ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ได้ที่ระยะเวลา 1-72 ชั่วโมง ด้วยการตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยวิธี spread plate technique บนอาหาร TSA ดังนั้นขั้นตอนต่อไปจึงทำการเปลี่ยนชนิดของสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งเป็นอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นสารอาหารชนิดอื่นๆ โดยการทดลองครั้งนี้ ได้เลือกใช้อาหารที่มีองค์ประกอบต่างๆกันไป ตั้งแต่ สารละลายเกลือปลดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85, อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีการผสม glucose เข้มข้นร้อยละ 1

จากการทดลองพบว่าเมื่อเปลี่ยนแหล่งของสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็น น้ำเกลือปลดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85% NaCl) พบว่ายังคงมีการเจริญของ *S. Anatum* และพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถตรวจนับเซลล์ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ $5.94 \pm 0.17 \log \text{CFU/cm}^2$ และมีจำนวน $6.50 \pm 0.21 \log \text{CFU/cm}^2$ เมื่อทำการตรวจวัดที่เวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.17)



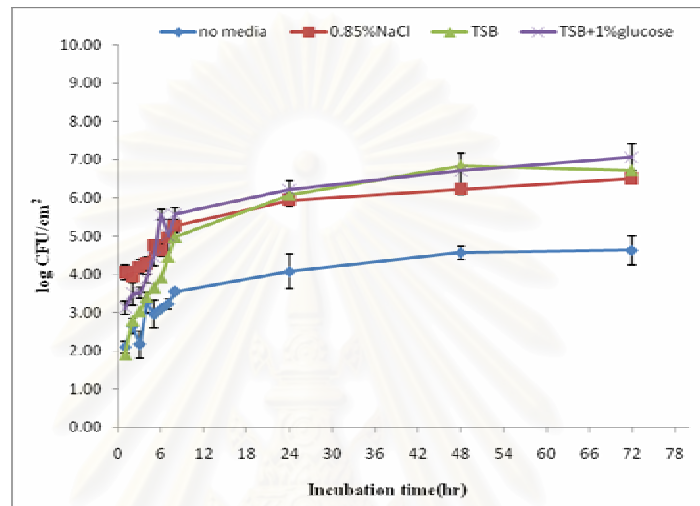
รูปที่ 4.17 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มอยู่ในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อมีการเติมกลูโคส (D-glucose) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จำนวน 1% เพื่อเพิ่มแหล่งของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าน่าจะทำให้เซลล์ *Salmonella* มีการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ดียิ่งขึ้น ผลการทดลองพบว่า การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบไม่มีความแตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ไม่ได้เติมกลูโคส เพราะพบว่าจำนวนเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า 6.22 ± 0.23 และ 7.06 ± 0.35 log CFU/cm² ที่เวลา 72 ชั่วโมงตามลำดับ (รูปที่ 4.18)



รูปที่ 4.18 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหารมาเปรียบเทียบกัน(รูปที่4.19) จะเห็นได้ว่าแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารไปหลายชนิด แต่จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบก็ยังคงมีการเจริญ พร้อมทั้งแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ และไม่มี ความแตกต่างกันมากนัก ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้การเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงยังคงไม่เห็นความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

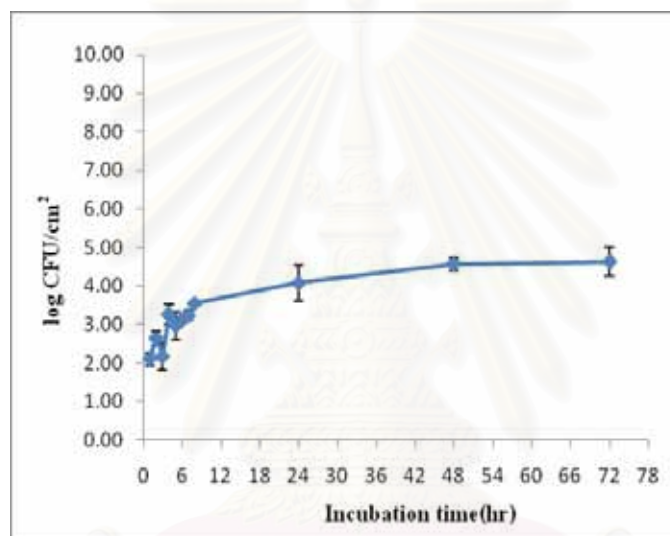


รูปที่ 4.19 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อมีการเปลี่ยนแหล่งของสารอาหารชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.7 ผลการศึกษาการอยู่รอดของเซลล์ *S. Anatum* ในสภาวะที่ไม่มีอาหาร

จากการทดลองพบว่า เมื่อเปลี่ยนแหล่งของสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นไม่มีแหล่งของสารอาหารที่ *Salmonella* สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนได้ ซึ่งจะบ่มแผ่นทดสอบที่มีการเกาะติดของเชื้อไว้ในหลอดปลอดเชื้อที่มีฝาปิด ขนาด 50 mL ผลการทดลองพบว่า แม้จะไม่มีแหล่งของสารอาหาร *S. Anatum* ก็ยังสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนบนแผ่นทดสอบได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ของ *Salmonella* ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ได้มีการเตรียมความพร้อมสำหรับการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมาแล้ว เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีสารอาหาร จึงสามารถเพิ่มจำนวนได้ และประกอบกับมีน้ำ หรือสารอาหารติดมาบนแผ่นทดสอบ โดยไม่สามารถมองด้วยตาเปล่า *Salmonella* จึงอาจใช้น้ำ หรือสารอาหารดังกล่าวนี้ในการเพิ่มจำนวน และอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์สามารถใช้ค่า a_w (water activity) หรือปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหาร หรือความชื้น นำมาใช้แบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน โดยพบว่าที่เวลา 1-8 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ $2.10 \pm 0.16 - 3.35 \pm 0.05$ log CFU/cm² หลังจากการบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวน *Salmonella* บนแผ่นทดสอบ 4.08 ± 0.46 log CFU/cm² (รูปที่4.20) และเมื่อ

ทำการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์ *Salmonella* บนแผ่นทดสอบถึง $4.63 \pm 0.38 \log \text{CFU/cm}^2$ จากการทดลองครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าแม้จะไม่มีสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ แต่ *S. Anatum* ก็ยังสามารถรอดชีวิต (survival) อยู่บนแผ่นทดสอบได้และมีค่ามากพอที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อนข้าม (cross-contamination) ไปกับผลิตภัณฑ์อาหารได้ หากไม่มีการทำความสะอาดที่ดีพอ (ภาคผนวก ข 5) ซึ่งการที่ *Salmonella* มีความสามารถในการปรับตัวได้ดีจึงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยได้ และสามารถทนต่อความแห้งหรือ a_w ระดับต่ำๆ ได้ จึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมนอกร่างกายของมนุษย์และสัตว์ (สุนันทา และคณะ 2549)

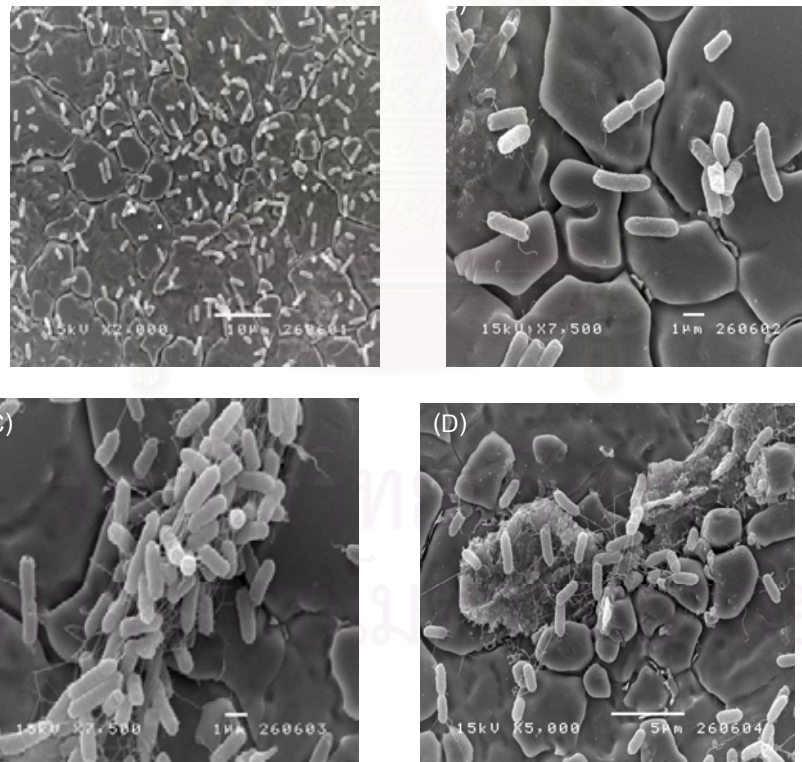


รูปที่ 4.20 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่ออยู่ในแหล่งที่ไม่มีสารอาหาร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากรายงานการวิจัยที่บ่งชี้ว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้บนเสื้อผ้า หรือแม้พื้นผิวสัมผัสอาหาร เช่น *E. coli*, *Staph. aureus* และ *Salmonella* spp. โดยพบว่าสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นชั่วโมงหรือเป็นวันหลังจากการเกาะติดแล้ว Kusumaningrum และคณะ (2003) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (foodborne pathogens) บนพื้นผิว stainless steel พบว่าหลังจากการปนเปื้อนของเชื้อเป็นเวลา 4 วัน สามารถตรวจพบเซลล์ของ *Staph. aureus* และ *S. Enteritidis* ได้ 10^5 และ 10^3CFU/cm^2 ตามลำดับ

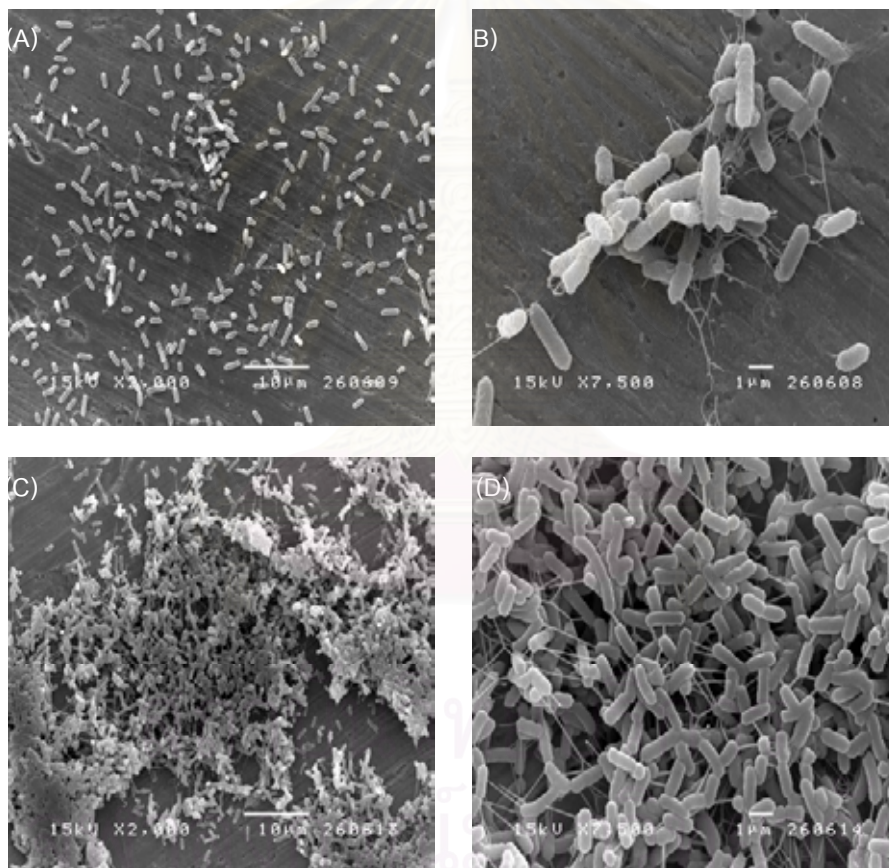
4.8 ลักษณะไบโอฟิล์มบนแผ่นพื้นผิวทดสอบเมื่อตรวจด้วย Scanning Electron Microscope (SEM)

เมื่อจุ่มแผ่นทดสอบ 304/2B ลงใน TSB ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL แล้วนำแผ่นทดสอบดังกล่าวที่มีการเกาะติดของเชื้อ บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หลอดใหม่ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วตรวจลักษณะการเกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว โดยใช้ SEM ด้วยเครื่อง JEM-5410LV ทำการทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากรูป 4.21 พบว่าเซลล์จะมีการเกาะติดบนแผ่นทดสอบ และกระจายไปทั่วพื้นผิวของแผ่นทดสอบ และพบได้ทุกส่วนของแผ่นทดสอบ เกิดเป็น monolayer biofilm (รูปที่ 4.21A) ซึ่งลักษณะการเกาะของเซลล์กับพื้นผิวของแผ่นทดสอบนั้นจากรูปจะเห็นว่าเซลล์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้เลย ไม่ได้เกาะโดยอาศัยช่องว่าง หรือรอยแตกของพื้นผิว (รูปที่ 4.21B) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าจากเดิมที่เซลล์เกาะบนแผ่นทดสอบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาบ่มนานมากขึ้น จากรูปพบว่าเซลล์เริ่มมีการเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มเล็กๆ ถ้าให้เวลาในการบ่มแผ่นทดสอบมากขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง 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 ที่เวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 2000X B) 316L/2B ที่เวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 7500X
 C) 304/2B ที่เวลา 48 ชั่วโมง กำลังขยาย 7500X D) 316L/2B ที่เวลา 48 ชั่วโมง กำลังขยาย 5000X

เช่นเดียวกับพื้นผิวชนิด 430/2B ซึ่งลักษณะพื้นผิวของเกรดนี้ค่อนข้างเรียกว่าเกรด 304 และ 316L จะสังเกตเห็นร่องหลุมหรือรอยแตกบริเวณผิวหน้าได้ค่อนข้างน้อย หรือแทบมองไม่เห็นรอยแตกของ stainless steel ได้เลย แต่ถึงแม้จะไม่มีรอยแตกบนพื้นผิว เซลล์ของ *S. Anatum* ก็สามารถเกาะติดบนพื้นผิวทดสอบนี้ได้ โดยจะเห็นการเกาะติดของ *Salmonella* ได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง และสามารถเห็นการรวมกลุ่มได้อย่างชัดเจนที่เวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.22) โดยสามารถเห็นชั้นของเซลล์ได้หลายชั้น ซึ่งการรวมกลุ่มที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากส่งสัญญาณทางเคมีของเซลล์จุลินทรีย์ (Quorum sensing) (Jefferson, 2004; Bower et al. 1996) ทำให้เซลล์ที่เกาะติดอยู่ใกล้กันๆ สามารถมารวมกลุ่มกันเป็นกลุ่มเล็กๆ แล้วจึงมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (รูปที่ 4.22 C, D)



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) กำลังขยาย 7500X ที่เวลา 48 ชั่วโมง

4.8 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำละลายเซลล์ *Salmonella*

ในการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด คือ sodium hypochlorite และ peroxyacetic acid และน้ำมันหอมระเหย 1 ชนิด คือ น้ำมันกานพลู ในการทำลายเซลล์ของ *S. Anatum* เมื่อแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85% NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB) และ นํ้านึ่งไก่ โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่นำมาทดสอบทั้ง 3 ชนิด มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในปริมาณต่างกัน แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณสารอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทั้ง 3 ชนิด

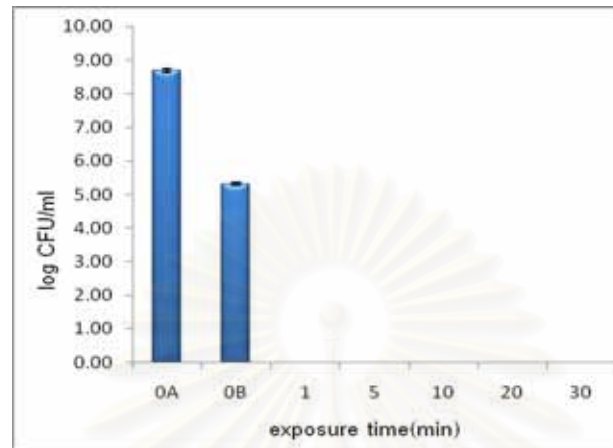
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	pH	องค์ประกอบและปริมาณสารอินทรีย์(%)
สารละลายเกลือ 0.85%	7.44±0.02	NaCl
TSB	7.30±0.07	Peptone from casein 17% Peptone from soy meal 3.0% D(+)-glucose 2.5%, NaCl 5.0% di-Potassium hydrogen phosphate 2.5%
นํ้านึ่งไก่	6.60±0.02	*โปรตีน 0.46±0.21 % คาร์โบไฮเดรต 0.49±0.12 % ไขมัน 5.67±0.18 %

* วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ (proximate analysis) ในนํ้านึ่งไก่ แสดงตามภาคผนวก ง

4.8.1 ประสิทธิภาพของ sodium hypochlorite ในการทำลาย *S. Anatum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

การทดสอบประสิทธิภาพของ sodium hypochlorite ในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 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* แขวนลอยอยู่ใน

สารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และใช้ sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายปริมาณเซลล์ของ S. Anatum ในสารละลายเกลือได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาทีหลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อ ดังรูปที่ 4.23



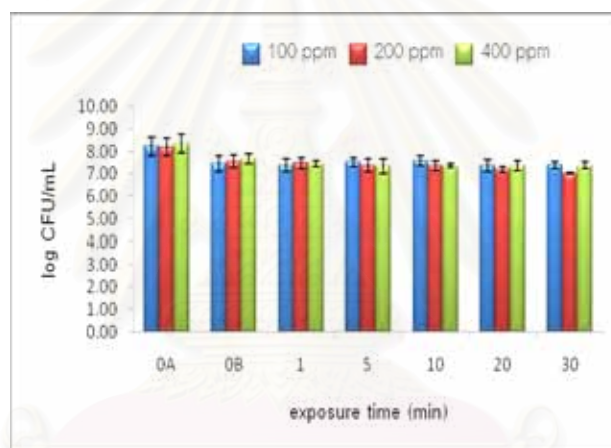
รูปที่ 4.23 จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส sodium hypochlorite ความเข้มข้น 100 ppm ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C

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 แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันทีหลังจากมีการกระจายตัวของเซลล์ในสารละลาย (ประมาณ 10 วินาที) พบว่าเชื้อมีปริมาณลดลงทันทีเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลาย sodium hypochlorite การสุ่มตัวอย่างเชื้อ ในแต่ละเวลานั้น จะทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อแล้วนำไปเติมลงในสารละลายไซโตเดียมไฮโอซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ที่ละลายอยู่ใน PBS บัฟเฟอร์ เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อที่เวลานั้นๆ ก่อนที่จะทำการ 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 ลดลงร้อยละ 10.33 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น (8.23 ± 0.42 log CFU/mL) และเมื่อเพิ่มเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็น 30 นาที ก็ไม่สามารถทำลายเชื้อได้หมด พบว่าลดลงเพียงร้อยละ 10.09 เท่านั้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sodium

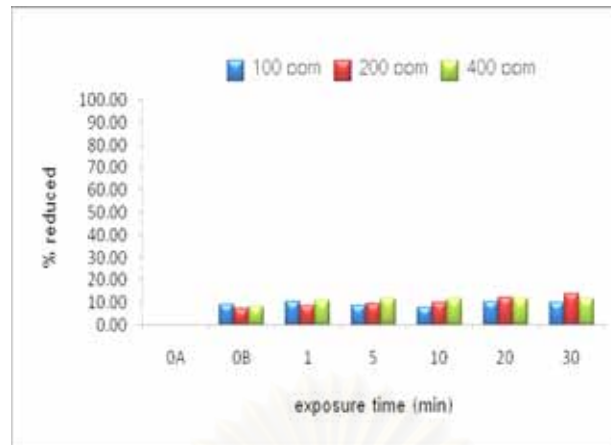
hypochlorite เป็น 200 ppm ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ภายในระยะเวลา 30 นาทีได้เช่นกัน พบว่าที่เวลา 30 นาที หลังจากเซลล์ S. Anatum สัมผัสกับ sodium hypochlorite เซลล์ลดลงเพียงร้อยละ 14.06 และเช่นเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sodium hypochlorite เป็น 400 ppm ซึ่งเพิ่มความเข้มข้นขึ้นอีกเท่าตัวแล้วก็ตาม ก็ยังไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที สามารถทำลายเซลล์ของ S. Anatum ได้ลดลงจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นเพียงร้อยละ 11.62 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 ที่รอดชีวิต ภายหลังจากสัมผัส sodium hypochlorite ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

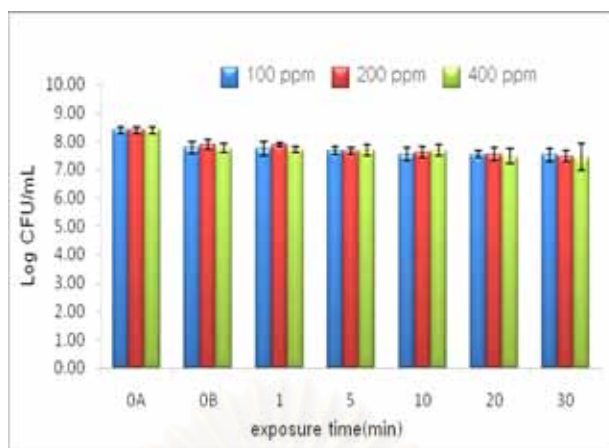
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



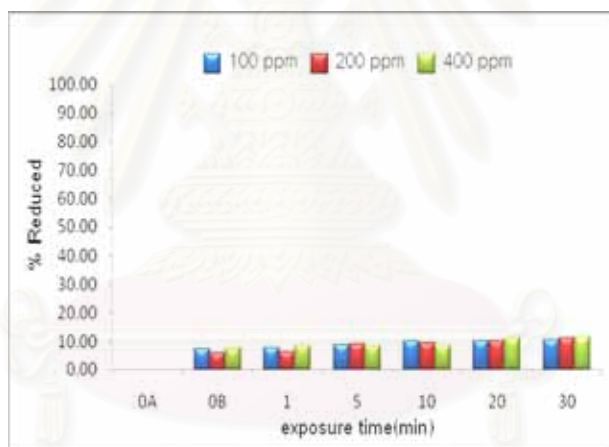
รูปที่ 4.25 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *S. Anatum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ภายหลังจากสัมผัส sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

ส่วนการทำลายเซลล์ของ *S. Anatum* เมื่อเซลล์แขวนลอยในน้ำนึ่งไก่ ด้วย sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นที่เท่ากันนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน จากเดิมที่เซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เพราะว่าหลังจากเซลล์สัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาทีแล้วก็ตาม ก็ยังไม่สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงจนหมดได้ และร้อยละของการลดลงของเซลล์เมื่อสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อที่มีปริมาณต่ำกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB พบว่าประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์นั้น ลดลงได้มากที่สุดเพียงร้อยละ 11.43 เท่านั้นที่ความเข้มข้น 400 ppm

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์ที่ปะปนในอาหาร โดยสารฆ่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ในสารละลายเกลือได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และน้ำนึ่งไก่ มีรายงานว่า การใช้สารประกอบคลอรีน เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์สูงนั้น จะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลดลง เช่น ในน้ำนึ่งไก่ที่มีปริมาณไขมัน $5.67 \pm 0.18\%$ โปรตีน $0.46 \pm 0.21\%$ และ คาร์โบไฮเดรต $0.49 \pm 0.12\%$ (ตารางที่ 4.4) ทั้งนี้เนื่องจากคลอรีนบางส่วนจะทำปฏิกิริยา คลอรีเนชันและออกซิเดชันกับหมู่อะมิโนของสารอินทรีย์ (Wei, Cook and Kirk., 1995) ดังนั้นการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์เพื่อทำลายเซลล์ของ *S. Anatum* ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และน้ำนึ่งไก่จึงไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ เพราะสารอาหารต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และน้ำนึ่งไก่ ช่วยสนับสนุนให้เซลล์จุลินทรีย์รอดชีวิตและเจริญต่อไปได้ ดังนั้นการใช้สารประกอบคลอไรด์ซึ่งมีกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) เป็นองค์ประกอบสำคัญ จึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายน้ำเกลือได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และน้ำนึ่งไก่



รูปที่ 4.26 จำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ในน้ำนึ่งไก่ ที่รอดชีวิตภายหลังจากสัมผัส sodium hypochlorite ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/mL) ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



รูปที่ 4.27 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *S. Anatum* ในน้ำนึ่งไก่ ภายหลังจากสัมผัส sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

การที่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm ไม่สามารถทำลายเชื้อ *S. Anatum* ได้หมด ทั้งนี้เนื่องจากเนื่องมาจากการสลายตัวอย่างรวดเร็วของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการแตกตัวได้เป็นกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ซึ่งสามารถวัดได้จากปริมาณ available chlorine ที่มีอยู่ในน้ำนั้น มีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อ การสลายตัวของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ จะมีอัตราเล็กน้อยเพียงใดนั้นเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อการสลายตัว

ของไฮเดียมไฮโปคลอไรท์ คือค่า pH ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณ available chlorine พร้อมทั้งตรวจวัด pH ของสารละลายไฮเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงใน ตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่า pH และ ปริมาณของ available chlorine ในสารละลายไฮเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ในการทำละลายเซลล์ S. Anatum ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C

ความเข้มข้นของสารละลายไฮเดียมไฮโปคลอไรท์ (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

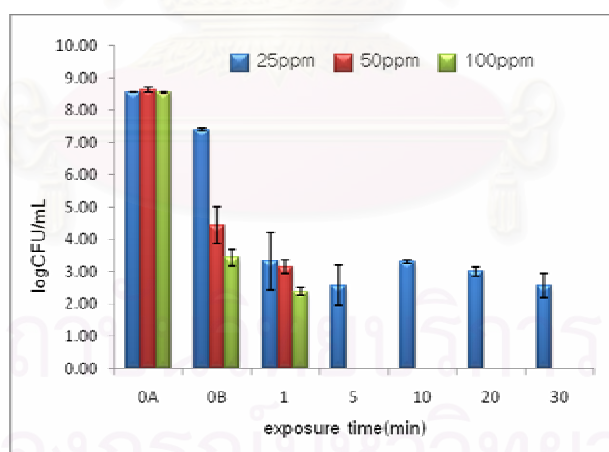
พบว่าความเข้มข้นของไฮเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ 100 ppm มีค่า pH 7.50 ± 0.02 โดยประมาณ และปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้มีค่า 8.67 ± 0.07 ppm และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฮเดียมไฮโปคลอไรท์เป็น 200 ppm พบว่า มีค่า pH 7.62 ± 0.09 และปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้มีค่า 16.46 ± 0.04 ppm ซึ่งปริมาณคลอรีนเพิ่มขึ้นสองเท่าจากความเข้มข้นที่ 100 ppm และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของไฮเดียมไฮโปคลอไรท์เป็น 400 ppm พบว่ามีค่า pH อยู่ที่ 8.63 ± 0.05 และปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้มีค่า 32.06 ± 0.02 ppm จากค่า pH และปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้นี้มีความสัมพันธ์ในการฆ่าเชื้อ

4.8.2 ประสิทธิภาพของ Proxitan[®] 5% ในการทำลาย S. Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

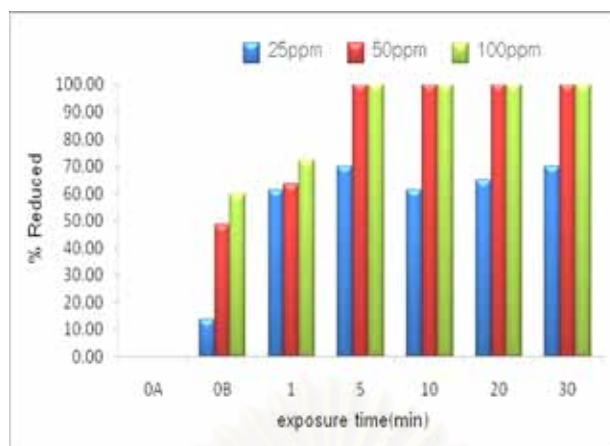
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ Proxitan[®] ในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 ชนิด คือ สารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และน้ำนึ่งไก่ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเซลล์ S. Anatum แขวนลอยอยู่ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และใช้ Proxitan[®] ที่ความเข้มข้น 25 ppm ไม่สามารถทำลายปริมาณเซลล์ของ S. Anatum ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้เมื่อครบเวลา 30 นาที พบว่าร้อยละของการลดลงมีค่า 70.01 เมื่อครบเวลา 30 นาที (รูปที่ 4.29) แต่เมื่อความเข้มข้นของ Proxitan[®] เป็น 50 ppm เวลา 5 นาทีก็เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายเกลือได้หมด และ Proxitan[®] 100ppm แม้จะทำลาย *Salmonella* ได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 50 ppm แต่ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้ทั้งหมด

ตั้งแต่นาทีแรก โดยทำลายเซลล์ได้ทั้งหมดหลังจากเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาทีเช่นกัน (รูปที่ 4.28)

เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นที่ 25 ppm ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถทำลายเชื้อได้เมื่อครบเวลา 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% หลังจากสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 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 และที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายให้ลดลงได้ 72.08 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 2.34 ± 0.12 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.56 ± 0.03 log CFU/mL และเป็นที่น่าสนใจว่า ความเข้มข้นที่ 100 ppm เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 0_B (เวลาที่ทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ S. Anatum ลงในสารละลาย sodium hypochlorite แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อขึ้นทันที) สามารถลดปริมาณเซลล์ได้ถึง 59.81% เลยทีเดียว



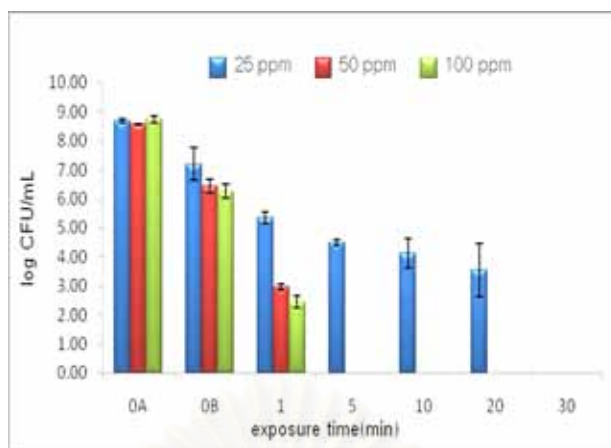
รูปที่ 4.28 จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxitane® ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



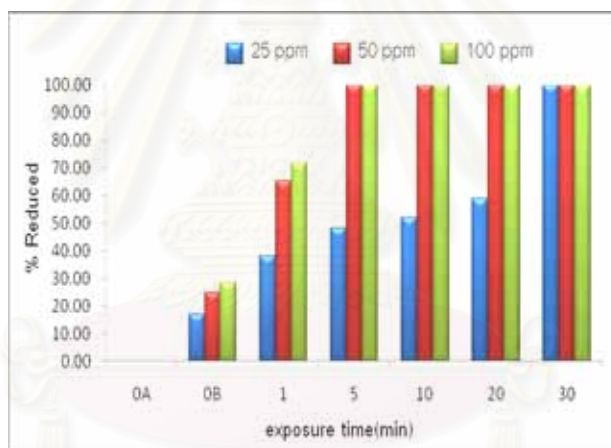
รูปที่ 4.29 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *S. Anatum* ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ภายหลังสัมผัส Proxidane[®] ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของ Proxidane[®] ในการทำลาย *S. Anatum* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB พบว่าที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมดได้ 100 % ในระยะเวลา 30 นาที จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.68 ± 0.07 log CFU/mL และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Proxidane[®] เป็น 50 ppm พบว่าสามารถทำลายเซลล์ได้หมด 100 % ในเวลา 5 นาที เช่นเดียวกับความเข้มข้น 100 ppm ก็สามารถทำลายเซลล์ได้หมดในเวลา 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% หลังจากสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 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 และที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายให้ลดลงได้ 72.00 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 2.45 ± 0.21 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.75 ± 0.12 log CFU/mL



รูปที่ 4.30 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxidane® ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $8 \log \text{CFU/mL}$) ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^\circ \text{C}$ โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



รูปที่ 4.31 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *S. Anatum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ภายหลังสัมผัส Proxidane® ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^\circ \text{C}$ โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของ Proxidane® ในการทำลาย *S. Anatum* ที่แขวนลอยในน้ำนิ่งได้ พบว่าที่ความเข้มข้น 25ppm สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมดได้ 100 % ในระยะเวลา 20 นาที จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $8.62 \pm 0.28 \log \text{CFU/mL}$ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Proxidane® เป็น 50 ppm พบว่าสามารถทำลายเซลล์ได้หมด 100 % ในระยะเวลา 5 นาที และความเข้มข้น 100 ppm ก็สามารถทำลายเซลล์ได้หมด 100 % ในเวลา 1 นาที (รูปที่ 4.32)

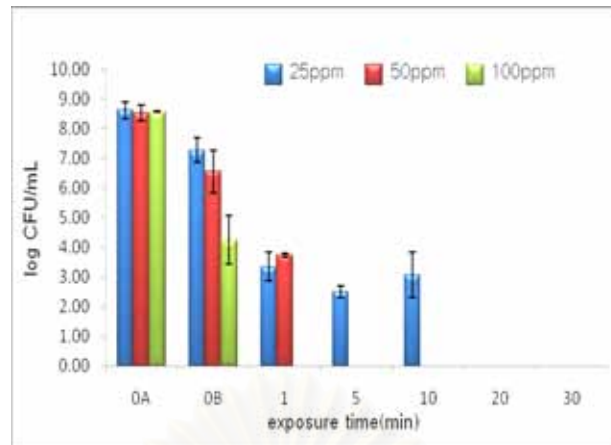
เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นที่ 25 ppm ถึงแม้จะสามารถทำลายเชื้อได้เมื่อครบเวลา 20 นาที แต่พบว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที สามารถทำลายเชื้อให้ลดลงได้ถึง 61.14% ในขณะที่ความเข้มข้น 50 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อที่แขวนลอยในน้ำนิ่งได้ 100% หลังจากสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่น้อยกว่า 5 นาที (พิจารณาที่เวลา 1 นาที) พบว่าความเข้มข้นที่ 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 56.21% มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต $3.74 \pm 0.06 \log \text{CFU/mL}$ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $8.54 \pm 0.26 \log \text{CFU/mL}$ และที่ความเข้มข้น 100 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อที่แขวนลอยในน้ำนิ่งได้ 100% หลังจากสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาทีนั้น แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่น้อยกว่า 1 นาที (พิจารณาที่เวลา 0.5 นาที) สามารถทำลายให้ลดลงได้ 50.41 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต $4.25 \pm 0.82 \log \text{CFU/mL}$ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $8.57 \pm 0.02 \log \text{CFU/mL}$

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

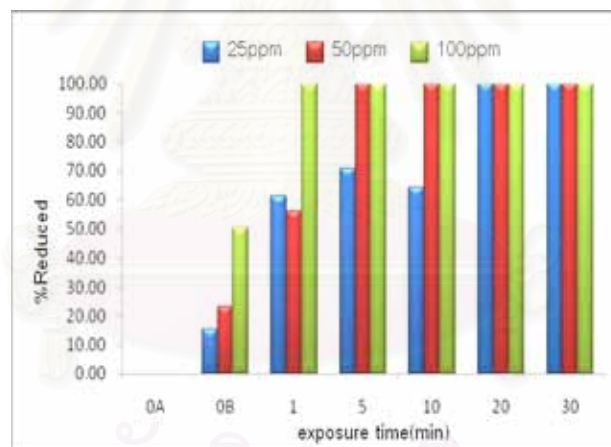
ตารางที่ 4.6 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ Proxitane[®] ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการวัดที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C

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 pH น้อยกว่าความเข้มข้นต่ำกว่า จึงอาจเป็นไปได้ว่าอิทธิพลของ pH อาจจะไปมีผลในการทำลายเซลล์ของ S. Anatum ได้ดีกว่า sodium hypochlorite ที่มีค่า pH เป็นเบส ก็เป็นไปได้



รูปที่ 4.32 จำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ในน้ำนึ่งไก่ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxidane[®] ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28±1°C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

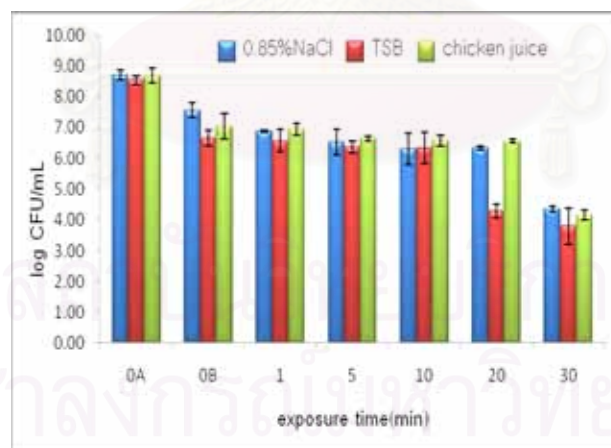


รูปที่ 4.33 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *S. Anatum* ในน้ำนึ่งไก่ ภายหลังสัมผัส Proxidane[®] ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28±1 °C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

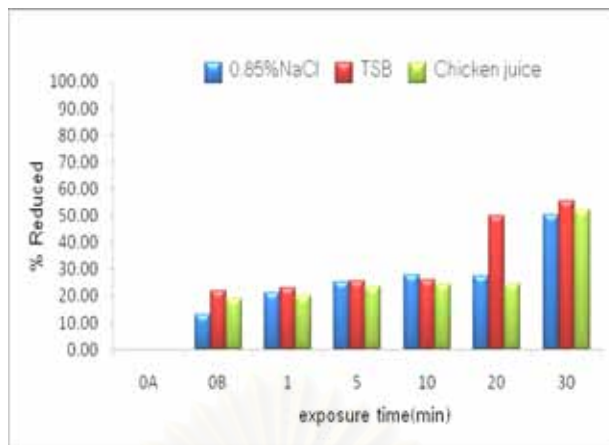
4.8.3 ประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูในทำลาย *S. Anatum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถทำลายเซลล์ของ *S. Anatum* ได้ หรือ ค่า MBC (Minimum Bactericidal Concentration) นั้น พบว่าน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ทั้งหมดภายในระยะเวลา 30 นาที (รูปที่ 4.34) ไม่ว่าเซลล์จะแขวนลอยอยู่ในสารละลายน้ำเกลือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หรือละลายในน้ำนิ่งก็ก็ตาม โดยพบว่าเมื่อครบระยะเวลา 30 นาทีในการสัมผัสกับเชื้อแล้วปริมาณของเซลล์ *Salmonella* ที่สัมผัสกับน้ำมันกานพลู มีปริมาณลดลงเพียงร้อยละ 50.29, 55.67 และ 52.30 ในสารละลายเกลือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ น้ำนิ่งไก่ ตามลำดับ (รูปที่ 4.35)

ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาหารเป็นองค์ประกอบซับซ้อน และมีสารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มาก ดังนั้นจุลินทรีย์จึงมีโอกาสใช้สารอาหารเหล่านั้นได้อย่างเต็มที่ และอีกประการหนึ่ง ประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะลดลง ถ้าในอาหารมีปริมาณไขมันและโปรตีนในปริมาณมาก โดยไขมันจะทำให้สารประกอบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อในน้ำมันกานพลูมีโอกาสในการแพร่เข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้น้อยลง นอกจากนั้นปริมาณน้ำในอาหารยังมีผลต่อประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูเช่นกัน โดยสารที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับจุดที่ไวต่อปฏิกิริยา (active site) ที่เซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งถ้าในอาหารมีน้ำมากจะทำให้มีการถ่ายเทสารได้ดีมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูเพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 4.34 จำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ในแหล่งสารอาหารชนิดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC (2.25 mg/mL) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในน้ำมันกานพลูแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



รูปที่ 4.35 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *S. Anatum* ในแหล่งของสารอาหารชนิดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC (2.25 mg/mL เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในน้ำมันกานพลูแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

Singh และคณะ (2003) ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ essential oil ในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ในไส้กรอก (hotdog) โดยได้เลือกใช้น้ำมันกานพลูในการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 และ 1.0 mL/L ในการทำลายเชื้อที่เวลา 5 และ 10 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0 mL/L สามารถทำลายเชื้อได้หมดทั้งที่เวลา 5 และ 10 นาที โดยพบว่าปริมาณเชื้อลดลง 100 % จากปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 7.17 log CFU/g

ต่อมา Mytle และคณะ (2006) ได้ศึกษาความสามารถของน้ำมันกานพลู (clove oil) ที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูเป็น 0% 1% และ 2% ในการยับยั้ง *L. monocytogenes* บนไส้กรอกรมควันเป็นเวลา 30 นาที พบว่าหลังจาก 30 นาที ที่ระดับความเข้มข้น 1% สามารถลดปริมาณเชื้อได้ 0.2-1.3 log CFU/g จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/g และถ้าใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 2% พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อได้ 0.4-3.4 log CFU/g จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6 log CFU/g

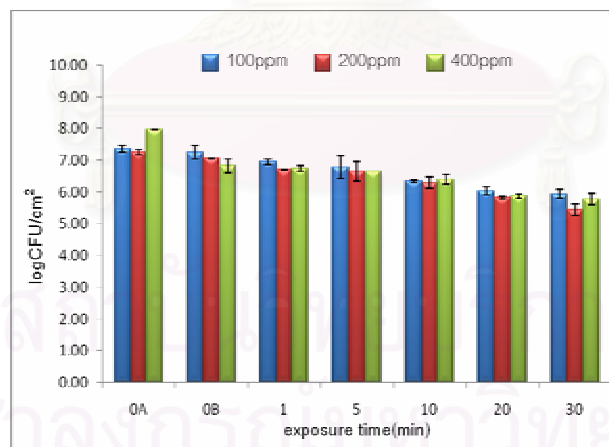
จากรายงานการวิจัยพบว่าสารที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันกานพลูคือสารประกอบยูจีนอล (Eugenol) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก (Mytle et al, 2006) และมีปริมาณมากที่สุด ในน้ำมันกานพลู ยูจีนอลเป็นสารประเภทฟีนอลิก (Phenolic compound) ซึ่งสารดังกล่าวสามารถทำลายจุลินทรีย์โดยไปรบกวนการเลือกซึมผ่าน (selective permeability) ของเมมเบรน (cytoplasmic membrane) ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารประกอบที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังทำให้โปรตีนสูญเสียสมบัติและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (Matan et al, 2006; Moreira et al, 2005; Prabuseenivasan, Jayakumar and Ignacimuthu, 2006) ซึ่งสาร ประกอบที่

นอกลีนี้ก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) ได้ โดยขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ด้วย (Shan et al, 2007)

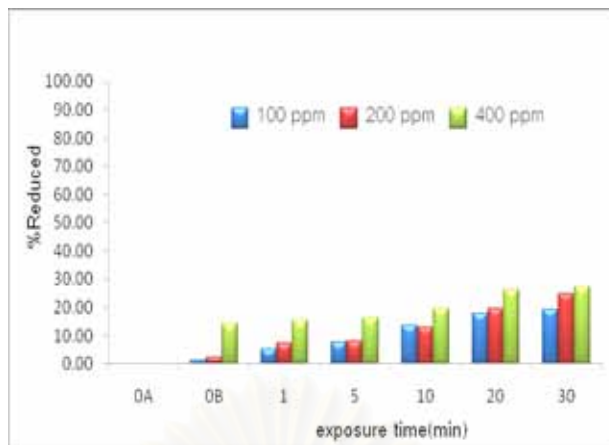
4.9 ผลการศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อและน้ำมันกานพลูในการทำลายไบโอฟิล์ม

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 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจไบโอฟิล์มของ *Salmonella* ที่เวลา 0, 1, 5, 10, 20 และ 30 นาที ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้น 100 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 19.29% ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต $5.92\pm 0.14 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $7.36\pm 0.11 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 200 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ให้ลดลงได้เพียง 24.97% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต $5.44\pm 0.18 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ จากปริมาณเซลล์ในไบโอฟิล์มเริ่มต้น $7.25 \pm 0.08 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ และ ความเข้มข้นที่ 400 ppm พบว่าสามารถลดจำนวนเซลล์ได้เพียง 27.35% มีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตถึง $5.79\pm 0.18 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $7.97\pm 0.02 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 30 นาที



รูปที่ 4.36 จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส sodium hypochlorite ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



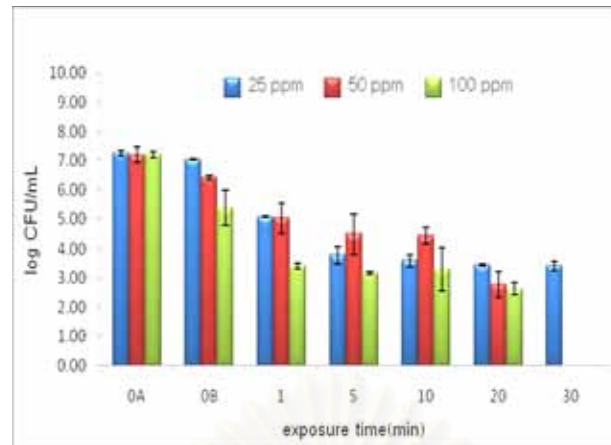
รูปที่ 4.37 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *Salmonella* biofilm บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส sodium hypochlorite ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่ อุณหภูมิ 28 ± 1 °C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

นอกจากสารละลายไฮโปคลอไรท์จะนิยมใช้ฆ่าเชื้อในผัก เช่น ผักกาดหอม เป็นต้นแล้วยังนิยมใช้ฆ่าเชื้อในผลไม้และเมล็ดพืชด้วย จากรายงานการวิจัยพบว่า ความเข้มข้นของไฮโปคลอไรท์ 200 ppm สามารถลดจำนวน *E. coli* บนผลแอปเปิ้ลได้ถึง 2 log cycle แต่พบว่าในกรณีของเมล็ดพืชที่ปนเปื้อน *E. coli* กลับพบว่าสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1000 ppm ไม่สามารถลดจำนวน *E. coli* ได้ ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 2000 ppm แช่และล้างเป็นเวลา 3 หรือ 10 นาที จึงจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้

4.9.2 ประสิทธิภาพของ Proxidane® ในการทำลายไบโอฟิล์ม

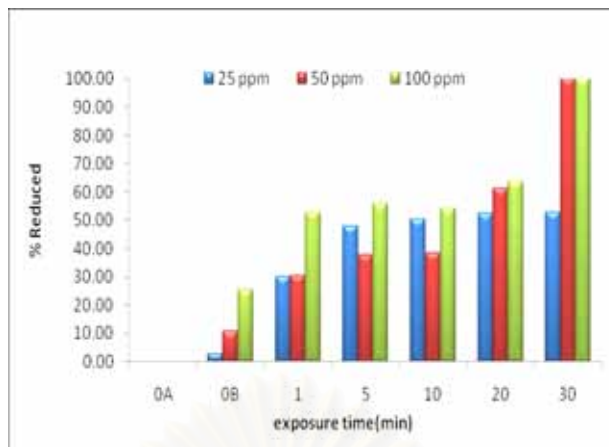
การทดสอบประสิทธิภาพของ Proxidane® ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* บนพื้นผิวที่เป็น stainless steel ชนิด 304/2B โดยกำหนดความเข้มข้นของ Proxidane® 3 ระดับคือ 25 50 และ 100 ppm สำหรับการทดสอบกับ *Salmonella* biofilm อายุ 24 ชั่วโมง โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับ Proxidane® ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจเชื้อ *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/cm² จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น 7.25 ± 0.10 log CFU/cm² แต่ถึงอย่างไรก็ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 ppm

พบว่าสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมด 100% ที่เวลา 30 นาที และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 100 ppm พบว่ายังไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมด 100% ที่เวลาน้อยกว่า 30 นาที (รูปที่ 4.38)



รูปที่ 4.38 จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxitane® ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

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% มีปริมาณเซลล์ในไบโอฟิล์มที่เหลือรอดชีวิต 2.79 ± 0.44 log CFU/cm² จากปริมาณเซลล์ในไบโอฟิล์มเริ่มต้น 7.20 ± 0.26 log CFU/cm² และความเข้มข้น 100 ppm ที่ เวลา 20 นาที สามารถทำลายเซลล์ในไบโอฟิล์มได้ลดลง 63.52% มีปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต 2.63 ± 0.21 log CFU/cm² จากปริมาณเซลล์ในไบโอฟิล์มเริ่มต้น 7.21 ± 0.11 log CFU/cm² ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นที่ 50 และ 100 ppm ที่ระยะเวลาในการทำลายเชื้อ 20 นาที แทบจะไม่มี ความแตกต่างกันเลย ดังนั้นหากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารจะเลือกนำ Proxitane® ไปใช้ในการทำลายไบโอฟิล์มจาก *Salmonella* จึงควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 50 ppm เพราะจะช่วยประหยัดการใช้สารฆ่าเชื้อและช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ด้วย แต่ถ้าต้องการเวลาในการฆ่าเชื่อน้อยๆ 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 O_B (ไม่ได้แสดงข้อมูล)



รูปที่ 4.39 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *Salmonella* biofilm บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส Proxidane[®] ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

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

Rossoni และ Gaylarde (2000) เปรียบเทียบการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์และกรดเพอร์อะซิติก (peracetic acid) ต่อเซลล์ของ *E. coli*, *P. aeruginosa* 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. aeruginosa* มีความสามารถในการเกาะได้ดีกว่า *E. coli* ในขณะที่ *Staph. aureus* เกาะบน stainless steel ได้น้อยที่สุด และ โซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ได้ดีกว่ากรดเพอร์อะซิติก

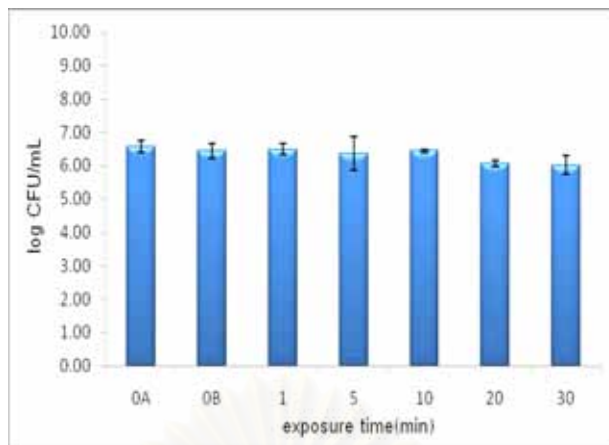
Fatemi และ Frank (1999) ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ สองชนิด ได้แก่ ไฮโปคลอไรท์ และ กรดเพอร์อะซิติก ในการทำลายไบโอฟิล์มที่เกิดจากเชื้อ *L. monocytogenes* และ *Pseudomonas* บนพื้นผิว stainless steel โดยจุ่มแผ่นทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์ม 48 ชั่วโมง ในสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิด ซึ่งพบว่ากรดเพอร์อะซิติกมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้มากกว่าคลอรีน ซึ่งลด

จำนวนเซลล์สูงได้มากกว่า 3 log CFU/cm² ที่ความเข้มข้น 160 ppm หลังจากการสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที เช่นเดียวกับ Loukili และคณะ(2004) ที่ศึกษากรดกรดเพอร์อะซิติกในการทำลายไบโอฟิล์มก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

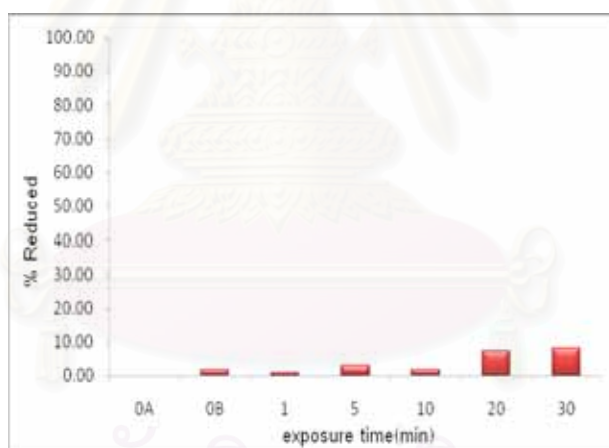
4.9.3 ประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC (2.25mg/mL) ในการทำลายไบโอฟิล์ม

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูในการทำลายไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* บนพื้นผิวที่เป็น stainless steel ชนิด 304/2B ที่มีอายุ 24 ชั่วโมงโดยกำหนดความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC (2.25mg/mL) โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับน้ำมันกานพลูที่อุณหภูมิ 28±1 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจเชื้อ *Salmonella* ในไบโอฟิล์มที่เวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของไบโอฟิล์มให้ลดลงได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที พบว่าสามารถลดจำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้เพียง 8.23 % โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต 6.02±0.28 log CFU/cm² จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น 6.56±0.18 log CFU/cm²

ทั้งนี้การที่สารฆ่าเชื้อและน้ำมันกานพลูไม่สามารถลดปริมาณเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้ อาจเนื่องจาก เซลล์ของแบคทีเรียภายในไบโอฟิล์มมีการจัดเรียงตัวกันอย่างหนาแน่น และประกอบไปด้วยชั้นของไบโอฟิล์มหลายชั้น นอกจากนั้นยังมีการหลั่งสาร EPS ออกมานอกเซลล์ จึงทำให้สารฆ่าเชื้อหรือน้ำมันกานพลูยากที่จะซึมเข้าไปทำลายเซลล์ของแบคทีเรียที่อยู่ภายในได้ ประกอบกับเวลาที่สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อหรือน้ำมันกานพลูค่อนข้างน้อยเพียง 30 นาทีจึงทำให้เซลล์ภายในไบโอฟิล์มเหลือรอดชีวิตได้ ทั้งนี้ได้มีการศึกษาเพิ่มเติม พบว่าเมื่อให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับน้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC เป็นเวลามากขึ้น คือ 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถทำลายเซลล์ของไบโอฟิล์มได้ประมาณ 30 % เท่านั้น จากเซลล์เริ่มต้น



รูปที่ 4.40 จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* biofilm บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส น้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC (2.25 mg/mL) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในน้ำมันกานพลูแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



รูปที่ 4.41 ร้อยละการลดลงของเซลล์ *Salmonella* biofilm บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส น้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้น MBC (2.25 mg/mL) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 °C โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในน้ำมันกานพลูแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่าเซลล์ *Salmonella* เกาะติดบนแผ่นทดสอบและเกิดเป็นไบโอฟิล์ม ซึ่งเซลล์ที่สะสมภายในไบโอฟิล์มนั้นมีการต้านทานสารฆ่าเชื้อได้ดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะของไบโอฟิล์มมีเซลล์รวมกลุ่มกันอยู่หลายชั้น ประกอบกับมีการหลั่งสารเมือกเหนียวออกมาทำให้สารฆ่าเชื้อซึมผ่านเข้าไปทำลายได้ยาก และเมื่อเปรียบเทียบกับความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อของเซลล์อิสระที่แขวนลอยในอาหารจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าเซลล์ในสภาพสารละลาย จึงถูกทำลายด้วยสารฆ่าเชื้อได้ง่ายกว่าเซลล์อิสระ Kumar และ Anand (1998) ได้อธิบายไว้ว่า การที่เซลล์ภายในไบโอฟิล์มสามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อได้ดีกว่าเซลล์ในสารละลายนั้น เป็นเพราะ เซลล์ภายในไบโอฟิล์มจะลดอัตราการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อผ่านเข้าไปภายในไบโอฟิล์ม เนื่องมาจากการสร้าง Exopolysaccharide substance (EPS) ออกมาซึ่ง EPS จะทำหน้าที่เป็นตัวลดการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อ เพราะ EPS จะทำการดูดซับเอาไว้ก่อน และมีช่องทางที่ให้สารฆ่าเชื้อผ่านเข้าไปได้น้อย หรือแม้แต่ลักษณะทางกายภาพของไบโอฟิล์มเมื่อเซลล์มีการรวมกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่ ลักษณะทางโครงสร้างก็จะเป็นตัวขัดขวางการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อ และการสร้างเอนไซม์ออกมาลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื่อดังนั้นวิธีในการทำลายเซลล์ที่เกิดการรวมกลุ่มบนพื้นผิวสัมผัสอาหารนั้น จึงอาจจะต้องใช้วิธีการทางกายภาพเข้ามาช่วย เช่น ในการทำความสะอาดจะต้องล้างทำความสะอาดสิ่งสกปรกออกไปก่อน แล้วจึงจะใช้ การขัด การถู เอาคราบจุลินทรีย์ออกไปควบคู่กับการใช้สารฆ่าเชื้อในการทำลายอีกครั้ง จึงจะทำให้การทำความสะอาดมีประสิทธิภาพมากที่สุด

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 โดยอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการเพิ่ม จำนวนของ *S. Anatum* จากการทดลอง พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S. Anatum* สามารถ เพิ่มจำนวนบนแผ่น stainless steel ได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และน่าสังเกตว่าอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส ก็ยังคงพบการเจริญของ *S. Anatum* ในสภาวะที่มีเชื้อน้อย (3 log CFU/mL) จะต้องอาศัยเวลาให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนถึงจะมีการตรวจพบได้
2. *S. Anatum* สามารถเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่น stainless steel ที่มีเกรดและพื้นผิวที่แตกต่างกันออกไปของ stainless steel ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ให้เหมาะสมและถูกต้องกับลักษณะของงาน
3. อาหารเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ แต่จากการทดลองพบว่า ในสภาวะที่ไม่มีอาหารสำหรับการเจริญ *S. Anatum* ก็ยังคงมีชีวิตรอดได้ และมีจำนวนมากพอที่จะปนเปื้อนไปกับผลิตภัณฑ์อาหารได้
4. การเลือกชนิดของสารฆ่าเชื้อเพื่อใช้ในการทำความสะอาดพื้นผิวสัมผัสอาหารมีความจำเป็นมาก ต้องเลือกให้มีความเหมาะสมกับลักษณะของงานที่จะใช้ทำความสะอาด จากการทดลองพบว่า โซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดีถ้าไม่มีสารอินทรีย์เข้ามาปะปน แต่เมื่อมีสารอินทรีย์ปะปนเข้ามา การฆ่าเชื้อจะต้องใช้เวลานานมากขึ้น ส่วนการทำลายไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* ทั้งนี้ระยะเวลา 30 นาที ไม่เพียงพอในการทำลายไบโอฟิล์มทั้งนี้จะต้องใช้การขัดถูเข้ามาช่วยด้วย ส่วน peroxyacetic acid มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้เป็นอย่างดี สารอินทรีย์ไม่มีผลในการลดประสิทธิภาพของ peroxyacetic acid แต่ทั้งนี้จะต้องเลือกความเข้มข้นและระยะเวลาในการสัมผัสเชื้อให้เหมาะสม
5. น้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC (2.25 mg/mL) ไม่สามารถทำลายเซลล์ของ *S. Anatum* ได้ และระยะเวลา 30 นาที ก็ไม่เพียงพอสำหรับการฆ่าเชื้อในไบโอฟิล์ม จึงอาจจะต้องเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสเชื้อให้นานมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเกิดเป็นไบโอฟิล์ม ได้แก่ ชนิดของพื้นผิวในการสัมผัสอาหาร เช่น ยาง พลาสติก และ ซีเมนต์ เป็นต้น เพื่อเป็นการเลียนแบบพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ที่ประสบปัญหาการเกิดไบโอฟิล์ม หรือแม้กระทั่งจุลินทรีย์ที่เป็นปัญหาในโรงงานอุตสาหกรรม
2. ควรมีการศึกษาถึงอายุของไบโอฟิล์ม ที่มีผลต่อการต้านทานสารฆ่าเชื้อ เพราะผู้ทดลองสังเกตเห็นว่า การศึกษาในเรื่องนี้ยังมีผู้สนใจศึกษาน้อย
3. ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อและเวลาในการสัมผัสสารของไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวสัมผัสอาหารต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมได้ แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ภายในไบโอฟิล์มด้วย เนื่องจากไบโอฟิล์มที่มีการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ผสมหลายชนิด (Mix biofilms) ซึ่งอาจมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อแตกต่างจากไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว (single biofilm) ดังที่มีการสร้างขึ้นในการทดลองนี้ จึงควรมีการทดลองสร้างไบโอฟิล์มที่มีจุลินทรีย์หลายชนิด เพื่อให้มีความใกล้เคียงกับไบโอฟิล์มในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล. 2549. ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำ อีเล็กโทรไลต์ ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของบาสซิลลัส ซีเรียส สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส และสปอร์ เกาะติดของบาสซิลลัส ซีเรียส บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรมการส่งออก, รายงานการส่งออกประจำปี. Online:

<http://www.dephtai.go.th/TabID/300/Default.aspx?aOfficeID=225>.

วันที่ 14 กันยายน 2551

บริษัทไทยน็อคส์สตีล จำกัด. 2006. ข้อมูลเหล็กกล้าไร้สนิม. เอกสารเผยแพร่.

รชา เทพชร. 2546. ผลของกรดเปอร์ออกซีแอซีติกต่อการลดปริมาณการปนเปื้อนใน กระบวนการผลิตไก่สดแช่เยือกแข็ง และการเกิดเซลล์บาดเจ็บของ *Salmonella* sp. สายพันธุ์ที่ติดต่อสารต้านจุลชีพ ซึ่งแยกได้จากเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะ อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุ่งทิภา อิศราวพร. 2541. การเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการ ลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimurium. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วชิรภรณ์ เขียมพันธ์. 2545. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อเพื่อลดจำนวน *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium ปนเปื้อนบนผักกาดหอม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักกระบวนศึกษา. 2544.
รายงานการระบาดปี พ.ศ. 2544. กรมควบคุมโรค. กระทรวงสาธารณสุข.

สุมนทนา วัฒนสินธุ์ ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ กมล บุษบา อรุณ บ่างตระกุลนนท์ กษิติศ
อื้อเขียวชาญกิจ และ สุวิทย์ กิ่งแก้ว. 2548. รายงานการวิจัย. การประเมินความ
เสี่ยงและการสร้างผู้เชี่ยวชาญ ด้านการประเมินความเสี่ยงสำหรับอันตรายประเภท
จุลินทรีย์: *Salmonella* spp.

สุดาพร เทียบจัตุรัส. 2545. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโซเดียมคลอไรด์และ
คลอรีนไดออกไซด์ในการทำลาย *Escherichia coli* และ *Salmonella*
Typhimurium บนข้าวโพดฝักอ่อนและหน่อไม้ฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรม
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2547. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้ง
การเจริญของ *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* เชื้อสาเหตุโรคเน่าและ
ของผัก. วิทยาสารกำแพงแสน 2, 2: 72-81.

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.

A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis. 16th ed. Vol.2. Washington, D.C.:
Association of Official Analytical Chemists.

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.

- 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: 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.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M. and Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* 18:1049-1056.
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y.Y., Gyomese, 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.
- <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2006/Ggb-en.html>
วันที่สืบค้น 14 กันยายน 2551.

http://www.thainox.co.th/steelfacts_what_thai.htm วันที่สืบค้น 14 กันยายน 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.

Jefferson, K.K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiology Letters* 236: 163-173.

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 foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to food. *International Journal of Food Microbiology* 85: 227-236.
- 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, Maryland.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V. and Parker, M. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology* 107: 180-185.
- 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.
- Mufu, 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 Protection* 53: 742-746.
- Mytle, N., Anderson, G.L., Doyle, M.P. and Smith, M.A. 2006. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium 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.
- Poulsen, L.V. 1999. Microbial biofilm in food processing: review. *LWT* 32: 321-326.
- Prabuseenivasan, S. Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S. 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6: 39-52
- 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.
- Robinson, R.K., Batt, C.A. and Patel, P.D. 2000. Encyclopedia of food microbiology. V.3. San Diego, Calif London
- 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 epifluorescence microscopy. *International Journal of Microbiology* 61: 81-85.

Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D. and Corke, H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International of Food Microbiology* 117: 112-119.

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.

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 Technology* 25: 807-815.

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

บรรณานุกรม

- 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.
- Bonafonte, M.A., Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Montuenga, L., Garcia-Ros, D. and Gamazo, C. 2000. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology* 19: 31-36.
- 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.
- 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.
- 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*. *Food Control* 12: 145-154.
- 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.
- 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., Zelter, 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.
- 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.

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* 7: 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.

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.

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.

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.



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 แบ่งใส่หลอดทดลองและขวดตามปริมาณที่ต้องการ 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

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 chloride	5.0	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 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. Shigella - Salmonella (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

ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดและนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดละลายให้น้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น แบ่งใส่ขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ปิดฝาแล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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
สารพิมพ์เชื้อที่ใช้ในการทดลอง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite)

สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) เตรียมได้จากซิงโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ตามความเข้มข้นที่ต้องการ เช่นถ้าต้องการโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 100 ppm ก็ให้ซิงโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 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 มิลลิลิตรให้ได้ความเข้มข้นของกรดเปอร์ออกซีอะซีติก 25, 50 และ 100 ppm



ภาคผนวก ค
การหาค่า MIC และ MBC ของน้ำมันกานพลู

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
การหาค่า MIC และ MBC ของน้ำมันกานพลู

1. ทดสอบความไว (Sensitivity) ของเชื้อ S. Anatum ต่อน้ำมันกานพลู 100 %

ทดสอบความไว (sensitivity) ด้วยวิธี Agar diffusion โดยหยดน้ำมันกานพลู 100% ปริมาตร 10 μ L ลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร ที่นั่งฆ่าเชื้อแล้ว (10 μ L/disc) โดยใช้ micropipette ขนาด 10 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นกระดาษกรองที่หยดน้ำมันกานพลูแล้ววางลงผิวหน้าอาหาร Nutrient agar (NA) ที่มีการเกลี่ยเชื้อ S. Anatum 10^6 CFU/mL เอาไว้ก่อนหน้านั้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเป็น มิลลิเมตร

2. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ S. Anatum (Minimal inhibitory Concentration: MIC)

ทดสอบหาความไวของ S. Anatum ต่อน้ำมันกานพลูด้วยวิธี broth dilution technique การทดสอบวิธีนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC (Minimum Inhibition Concentration) และ MBC (Minimal Bactericidal Concentration) ของน้ำมันกานพลูต่อแบคทีเรียซึ่งทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ การเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีน้ำมันกานพลูในปริมาณต่างๆกันผสมอยู่ด้วย และสังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีน้ำมันกานพลูในปริมาณต่างๆกัน การทดสอบหาความไวของแบคทีเรียต่อน้ำมันกานพลูโดยวิธี Broth dilution technique นี้สามารถทำได้ทั้ง macro broth dilution technique และ micro broth dilution technique ในที่นี้ทำการทดสอบโดยวิธี Macro broth dilution technique

2.1 การเตรียม S. Anatum ที่ใช้ทดสอบ

S. Anatum ที่ใช้ในการทดสอบต้องอยู่ในระยะที่เซลล์ทุกๆเซลล์พร้อมที่จะเจริญหรือ แบ่งเซลล์ได้ ควรเป็นแบคทีเรียที่มีอายุไม่มากนัก โดยทั่วไปใช้เซลล์ที่มีอายุไม่มากกว่า 24 ชั่วโมง ซึ่งวิธีการเตรียมเซลล์ของ S. Anatum นั้นทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 ในวิธีดำเนินงานวิจัย

2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

2.3 การเตรียมน้ำมันกานพลูที่ใช้ในการทดสอบ

นำน้ำมันกานพลูมาละลายใน 1% tween 80 ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ (หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

2.4 การทดสอบความไวต่อน้ำมันกานพลู ด้วยวิธี Macro broth dilution technique

- 2.4.1 นำหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้แห้ง จำนวน 12 หลอด เขียนหมายเลขกำกับไว้ที่หลอด
- 2.4.2 ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth) ใส่ลงในหลอดที่ 2 - 12 หลอดละ 1 มิลลิลิตร
- 2.4.3 ใช้ปิเปตดูดสารสกัดลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมสารในหลอดที่ 2 ให้เข้ากัน
- 2.4.4 ใช้ปิเปตดูดสารในหลอดที่ 2 หลอด จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3
- 2.4.5 ทำซ้ำในข้อ 2.4.4 ไปจนถึงหลอดที่ 11 (เปลี่ยนไปเปตทุกครั้งที่เปลี่ยนหลอด) เมื่อผสมสารละลายในหลอดที่ 11 ให้เข้ากันได้ดีแล้วให้ใช้ปิเปตดูดสารละลายทิ้งไป 1 มิลลิลิตร หลอดที่ 12 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัด จึงใช้เป็น positive control
- 2.4.6 เติมเซลล์ S. Anatum ที่เตรียมไว้ลงไปในทุกหลอด จำนวนหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร
- 2.4.7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18 ชั่วโมง

2.5 การอ่านผลการหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16 -18 ชั่วโมง แล้ว ให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์ เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร

3. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าได้เชื้อ S. Anatum (Minimal Bactericidal Concentration: MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลว นั้น สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอด มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ก็ จะไม่พบการเจริญของเชื้อในอาหารหลอดใหม่ แต่ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดไม่สามารถทำลายเชื้อได้ จะพบการเจริญของเชื้อในอาหารหลอดใหม่

4. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC ในการฆ่าเชื้อ ด้วยวิธี agar diffusion

วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1 โดยใช้ น้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC และใช้ chloramphenicol (30mg/disc) เป็น positive control และใช้ 1% tween 80 เป็น negative control

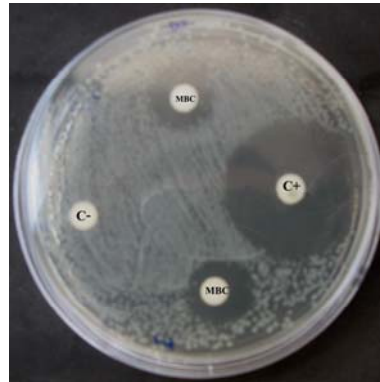
5. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC ในการฆ่าเชื้อ ด้วยวิธี Microdilution agar plate method (Moreira et al., 2005)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NA จำนวน 90 mL นำไปหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เติมน้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC (2.25 mg/mL) จำนวน 10 mL ลงไปผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NA ให้เข้ากัน ก่อนเทลงใน petri dish (plate) ที่มีเชื้อ *Salmonella Anatum* 10^6 CFU/mL จำนวน 0.1 mL จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผล สังเกตการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเทียบกับ control

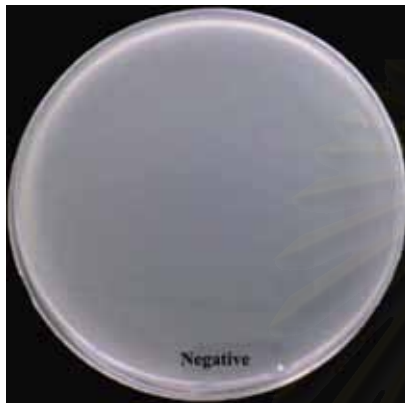
จากการศึกษาพบว่า *S. Anatum* มีความไวต่อน้ำมันกานพลู 100% (pure clove oil) โดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ 2.47 ± 0.09 มิลลิเมตร (รูป A) จากนั้นจึงได้หาค่า MIC และ MBC ต่อไปด้วยวิธี Macro broth dilution technique พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 1.25 mg/mL และมีค่า MBC เท่ากับ 2.25 mg/mL จึงได้นำค่า MBC ที่หาได้จากวิธีทดสอบดังกล่าวมาทดสอบยืนยันประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อด้วยวิธี agar diffusion อีกครั้ง พบว่า เซลล์ของ *Salmonella Anatum* มีความไวต่อค่า MBC โดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ 1.59 ± 0.28 มิลลิเมตร (รูป B) ส่วน chloramphenicol (positive control) มีค่า inhibition zone 3.39 ± 0.10 มิลลิเมตร ส่วนวิธี Microdilution agar plate method นั้น พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อ *Salmonella Anatum* (รูป C) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เมื่อเปรียบเทียบกับ plate ที่เป็น positive control (รูป D)



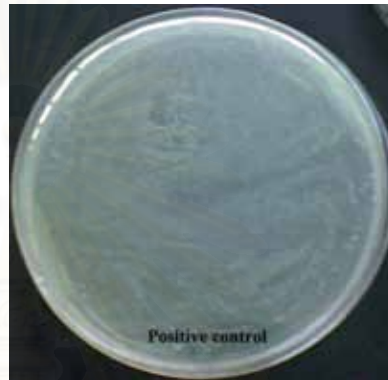
(A)



(B)



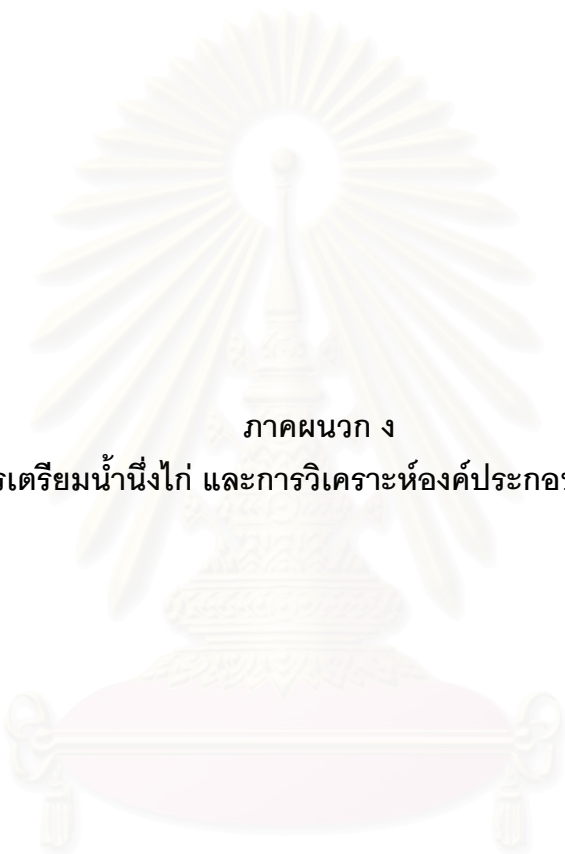
(C)



(D)

- A) ความไวของเชื้อ *S. Anatum* ต่อน้ำมันกานพลู 100%
- B) ความไวของเชื้อ *S. Anatum* ต่อน้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC โดยมี Chloramphenicol เป็น positive control และ 1% tween 80 เป็น negative control
- C) ไม่มีการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เมื่อทดสอบด้วยวิธี Microdilution agar plate method
- D) Plate positive control เมื่อทดสอบด้วยวิธี Microdilution agar plate method

จากการทดลองข้างต้นเมื่อทราบค่า MBC ของน้ำมันกานพลูต่อเชื้อ *S. Anatum* แล้วจึงนำค่าที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อที่แขวนลอยในสารอาหารต่างๆ เช่น สารละลายเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และน้ำนึ่งไก่ และทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของ *Salmonella* ในไบโอฟิล์มต่อไป



ภาคผนวก ง
การเตรียมน้ำนึ่งไก่อ และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
การเตรียมน้ำนึ่งไก่อ และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การเตรียมน้ำนึ่งไก่

ใช้น้ำนึ่งไก่อหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาด แล้วนำไปนึ่งโดยเติมน้ำเปล่า 2 ลิตร ใช้เวลาในการนึ่ง 30 นาที น้ำนึ่งไก่ที่ได้เก็บใส่ขวดๆ ละ 100 mL แช่ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำมาใช้

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนึ่งไก่

ง.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด A.O.A.C (2000)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดวิเคราะห์โปรตีน (ประกอบด้วย digestion unit รุ่น BUCHI, K-424 และ B-324, Switzerland)
2. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius BP 310, Germany)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (A.R.grade)
2. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก (A.R.grade) ความเข้มข้น 0.1 N
3. สารละลายบอริก (A.R.grade) ความเข้มข้น 4 %
4. selenium reagent mixture (A.R.grade)
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 35 %
6. สารละลายอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยผสมสารละลาย methyl blue 0.2 % ในแอลกอฮอล์ แล้วกรอง 25 มิลลิลิตร กับสารละลาย methyl red 0.2 % ในแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ตัวอย่างน้ำนึ่งไก่ประมาณ 5 มิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน
2. เติม selenium reagent mixture ซึ่งใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ประมาณ 5 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร
3. นำตัวอย่างไปย่อยด้วยเครื่อง BUCHI digestion unit โดยใช้ความร้อนเบอร์ 8 (ก่อนนำตัวอย่างเข้าย่อยควรเปิดเครื่อง BUCHI digestion unit โดยใช้ความร้อนเบอร์ 10 ก่อน

ประมาณ 15 นาที) และปิดฝาด้านที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดไอกกรด (scrubber) ย่อยตัวอย่างจน ส่วนผสมในหลอดย่อยกลายเป็นสีเขียวใส และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. นำมากลั่นโดยเติม 35 % sodium hydroxide และรองรับสารที่กลั่นด้วยสารละลาย 4 % boric acid หยดสารละลายเมทิลเรด-โบโรโมครีซอลกรีนเป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ในระหว่าง การกลั่นจะเกิดแอมโมเนียขึ้น และจะถูกจับไว้ด้วยสารละลาย 4 % boric acid จะได้ สารละลายสีเขียว
5. ล้างส่วนปลายของ condenser ด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในพลาสติกที่รองรับสิ่งที่กลั่นได้
6. นำสารละลายที่กลั่นได้ในพลาสติกทั้งหมดมาไทเทรตด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 N จนถึงจุดยุติ (end point) เป็นสีม่วงแดง
7. ทำตัวอย่างควบคุม (control) โดยเตรียมเหมือนกับข้อ 2 และวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับตัวอย่าง
8. คำนวณหาปริมาณโปรตีนดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \frac{(\text{Va}-\text{Vb}) \times \text{N} \times 1.4 \times \text{CF}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (mL)}}$$

เมื่อ Va คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต มีหน่วยเป็น Normal

CF คือ Conversion factor สำหรับเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นหน่วยโปรตีน (ในการทดลองใช้ 6.25) (ใน

ง. 2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ตามวิธี A.O.A.C. (2000)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Memmert, USA)
2. Mojonnier tube
3. Rotary evaporator (Eyela, SB 651, Japan)
4. ขวดกั่นกลม

สารเคมี

1. สารละลายแอมโมเนีย 26 % w/v
2. เอทานอล 95 % v/v
3. Diethyl ether b.p. 34-35 °C
4. Petroleum ether b.p. 40-60 °C

วิธีวิเคราะห์

1. บีบตัวอย่างน้ำหนึ่งไป 10 มิลลิลิตรใส่ลงใน Mojonnier tube
2. เติมสารละลายแอมโมเนีย 26 % w/v 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันอีกครั้ง
3. เติมเอทานอล 95 % v/v 10 มิลลิลิตรเขย่าผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Diethyl ether 25 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงเป็นเวลานาน 1 นาที
4. เติม Petroleum ether 25 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงเป็นเวลานาน 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 20 นาที
5. รินชั้น ether ใส่ขวดกั่นกลมที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว
6. สกัดตัวอย่างซ้ำอีก 2 ครั้งตามข้อ 3-6 แต่ใช้ เอทานอล 95 % v/v จาก 10 มิลลิลิตรเหลือ 5 มิลลิลิตร
7. นำไปกลั่นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60-65 °C จนกระทั่งน้ำระเหยออกหมด
8. นำขวดกั่นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 100 ± 2 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator นาน 30 นาที และนำขวดกั่นกลมมาชั่งน้ำหนัก

$$\% \text{ Fat (sample)} = \frac{W_{2S} - W_3}{W_{1S}} \times 100$$

เมื่อ	W_{1S}	คือ	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
	W_{2S}	คือ	น้ำหนักขูดก้นกลม+ ไขมันที่สกัดได้ (กรัม)
	W_{2b}	คือ	น้ำหนักขูดก้นกลม + น้ำหนัก Blank (กรัม)
	W_3	คือ	น้ำหนักขูดก้นกลม (กรัม)

ง3. การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธีฟินอล – ซัลฟูริก

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, USA)
2. Vortex mixer (CTL, CTL-107, Germany)
3. Water bath (Memmert, USA)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 95.5 %
2. สารละลายฟินอล 5 %
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (D-glucose)

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำหนึ่งไปประมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟินอล 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2-3 นาที
2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที
3. เขย่าและนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ค่าแปลงคือใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ปริมาณ Available chloride

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ปริมาณ Available chloride

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Available chloride (กนกทิพย์, 2549)

1. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ซังโซเดียมไธโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ปริมาณ 6.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มให้เดือดใหม่ ๆ แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาณครบ 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ 2 อาทิตย์แล้ว standardize กับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เก็บสารละลายที่ได้โดยการเติมคลอโรฟอร์มลงไป 2-3 มิลลิลิตร

2. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium dichromate) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ซังโพแทสเซียมไดโครเมต 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 ปิเปิดสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.1 นอร์มัล 10 มิลลิลิตร ลงไป แล้วจึงเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) ปริมาณ 1 กรัม ปิดจุกยางเขย่า แล้วเก็บไว้ในที่มืด 6 นาที นำมาไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต เข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้แป้งเป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

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

(นอร์มัล)

มิลลิลิตรของโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการไต

เตรต

4. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate) ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล

เตรียมโดยปิเปตสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วทำปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ

4. สารละลายแป้ง

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



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก จ
ตารางแสดงข้อมูล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ
ตารางแสดงข้อมูล

ตารางที่ ๑1 จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่สามารถเกาะติดบน stainless steel ที่ระยะเวลาต่างๆ

ชนิดของพื้นผิว	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่ตรวจพบ* (logCFU/cm ²)
304/2B	0	2.49±0.39** ^h
	5	3.07±0.11 ^g
	15	3.59±0.26 ^f
	30	3.64±0.23 ^{ef}
	60	3.82±0.15 ^{de}
	120	4.21±0.24 ^b
	304/BA	0
5		3.95±0.11 ^{c^d}
15		4.02±0.11 ^{bcd}
30		4.08±0.13 ^{bc}
60		4.02±0.22 ^{bcd}
120		4.59±0.07 ^a

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ ตรวจนับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังจากให้เชื้อยึดเกาะเป็นระยะเวลา 0-120 นาที ที่อุณหภูมิ 28±1 °C
** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3
ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑2 จำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่สามารถเกาะได้บน Stainless steel 304/2B ที่

ระยะเวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่ตรวจพบ* (log RLU/cm ²)
0	1.30±0.08** ^a
5	2.00±0.04 ^b
15	2.15±0.04 ^c
30	2.23±0.15 ^c
60	2.96±0.05 ^d
120	3.84±0.03 ^e

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ หลังจากตรวจวัด ATP ด้วยเครื่อง Hy-lite[®] 2 ที่
ระยะเวลา 0-120 นาที อุณหภูมิ 28±1 °C
**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3
ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑3 การเกิดไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²) [*] และ เวลา (ชั่วโมง)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72	
15	2.83±0.31 ^{**mn}	2.95±0.18 ^{klmn}	2.88±0.11 ^{mn}	2.77±0.34 ^{mn}	3.45±0.23 ^{ghi}	3.16±0.45 ^{hijklm}	3.32±0.26 ^{ghijkl}	3.36±0.31 ^{ghijk}	3.50±0.35 ^{fghi}	5.13±0.52 ^{cd}	5.22±0.22 ^{cd}	
20	2.88±0.17 ^{mn}	2.99±0.37 ^{iklmn}	3.40±0.28 ^{ghij}	3.13±0.45 ^{ijklm}	2.92±v.25 ^{lmn}	2.67±0.30 ⁿ	3.61±0.18 ^{fg}	3.57±0.06 ^{fgh}	5.45±0.39 ^c	6.08±0.16 ^b	5.87±0.51 ^b	
30	1.91±0.27 ^o	2.80±0.52 ^{ijklm}	3.04±0.51 ^{ijklmn}	3.42±0.37 ^{ghijkl}	3.65±0.45 ^{ghi}	3.91±0.43 ^f	4.47±0.51 ^e	4.98±0.18 ^d	6.08±0.35 ^b	6.84±0.31 ^a	6.72±0.31 ^a	

หมายเหตุ ^{*}จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ ตรวจจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

^{**}ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑4 การเกิดไบโอฟิล์มของ *S. Anatum* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 logCFU/mL) ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ(°C)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²) [*] และ เวลา (ชั่วโมง)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72	
15	0.00±0.00 ^{**h}	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	2.98±0.21 ^g	3.59±0.43 ^f	5.07±0.15 ^d
20	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	4.30±0.25 ^e	5.44±0.08 ^c	6.23±0.29 ^b
30	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	0.00±0.00 ^h	6.24±0.27 ^b	6.35±0.16 ^b	6.58±0.26 ^a

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ ตรวจจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑5 การเกิดไบโอฟิล์มของ S. Anatum บนแผ่นทดสอบ ที่มีแหล่งของสารอาหารที่แตกต่างกัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 30 °C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดของ อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²)* และ เวลา (ชั่วโมง)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72	
ไม่มีอาหาร	2.10±0.16 ^{**w}	2.65±0.19 ^v	2.17±0.35 ^w	3.26±0.26 ^{rst}	2.96±0.37 ^{tuv}	3.11±0.05 st	3.23±0.13 ^{rst}	3.55±0.05 ^{pqr}	4.08±0.46 ^{mno}	4.57±0.17 ^{jk}	4.63±0.38 ^{ij}	
0.85% NaCl	4.05±0.19 ^{mn}	3.95±0.18 ^{mno}	4.20±0.18 ^{lmn}	4.27±0.18 ^{klm}	4.75±0.12 ^{hij}	4.63±0.15 ^{ij}	4.96±0.13 ^{ghi}	5.27±0.17 ^{fg}	5.94±0.17 ^e	6.23±0.16 ^{de}	6.50±0.12 ^{cd}	
TSB	1.91±0.27 ^w	2.80±0.52 ^{uv}	3.04±0.51 ^{stu}	3.42±0.37 ^{qrs}	3.65±0.45 ^{opq}	3.91±0.43 ^{nop}	4.47±0.51 ^{kl}	4.98±0.18 ^{gh}	6.08±0.35 ^e	6.84±0.31 ^{ab}	6.72±0.31 ^{bc}	
TSB+1%glucose	3.12±0.17 st	3.49±0.29 ^{qr}	3.53±0.14 ^{qr}	3.89±0.11 ^{no}	4.45±0.23 ^{kl}	5.56±0.15 ^f	5.01±0.43 ^{gh}	5.58±0.16 ^f	6.22±0.23 ^{de}	6.71±0.45 ^{bc}	7.06±0.35 ^a	

หมายเหตุ

*จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ ตรวจจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑๖ การเกิดไบโอฟิล์มของ S. Anatum บนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ที่มีเกรด (Grades) แตกต่างกัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 30 °C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกรดของ Stainless steel	จำนวนเซลล์(log CFU/cm ²)* และ เวลา (ชั่วโมง)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72
304/2B	1.91±0.27 ^{**n}	2.80±0.52 ^m	3.04±0.51 ^{lm}	3.42±0.37 ^{kl}	3.65±0.45 ^{jk}	3.91±0.43 ^{ij}	4.47±0.51 ^f	4.98±0.18 ^e	6.08±0.35 ^c	6.84±0.31 ^{ab}	6.72±0.31 ^{ab}
316L/2B	3.37±0.29 ^{kl}	3.09±0.46 ^{kl}	3.65±0.22 ^{jk}	4.05±0.36 ^{hi}	4.24±0.13 ^{fgh}	4.38±0.58 ^{fgh}	4.95±0.11 ^e	4.36±0.18 ^{fgh}	5.89±0.44 ^{cd}	5.77±0.19 ^{cd}	6.58±0.47 ^b
430/2B	2.83±0.31 ^m	3.24±0.14 ^{kl}	3.36±0.17 ^{kl}	4.06±0.27 ^{ghi}	4.42±0.13 ^{fg}	4.29±0.21 ^{fgh}	5.13±0.19 ^e	5.61±0.01 ^d	6.75±0.41 ^{ab}	6.85±0.17 ^{ab}	7.11±0.18 ^a

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ ตรวจจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑๗ การเกิดไบโอฟิล์มของ S. Anatum บนแผ่นพื้นผิวทดสอบที่มีพื้นผิว (finish) แตกต่างกัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 30 °C

Finish ของ	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²)* และ เวลา (ชั่วโมง)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72	
Stainless steel												
304/2B	1.91±0.27 ^{***}	2.80±0.52 ^k	3.04±0.51 ^{jk}	3.42±0.37 ^{ij}	3.65±0.45 ^{hi}	3.91±0.43 ^h	4.47±0.51 ^g	4.98±0.18 ^f	6.08±0.35 ^d	6.84±0.31 ^b	6.72±0.31 ^{bc}	
304/BA	3.10±0.30 ^{jk}	3.80±0.39 ^h	4.41±0.24 ^g	4.91±0.22 ^f	5.18±0.49 ^{ef}	5.24±0.20 ^{ef}	5.13±0.26 ^{ef}	5.45±0.31 ^e	6.41±0.22 ^c	7.19±0.21 ^a	7.35±0.22 ^a	

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ ตรวจจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑๘ การเจริญของเซลล์ *S. Anatum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีแผ่นทดสอบชนิดต่างๆ จุ่มอยู่ภายใน ที่อุณหภูมิ 30 °C ณ เวลาต่างๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกรดของ	จำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (log CFU/mL) [*] และ เวลา (ชั่วโมง)										
Stainless steel	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72
304/2B	3.93±0.27 ^{**s}	3.99±0.34 ^{rs}	4.12±0.01 ^{pqrs}	4.29±0.04 ^{opqr}	4.52±0.09 ^{no}	4.40±0.11 ^{op}	4.18±0.08 ^{pqrs}	4.33±0.08 ^{opq}	9.25±0.20 ^b	9.18±0.40 ^{bc}	9.95±0.01 ^a
316L/2B	4.03±0.04 ^{qrs}	4.10±0.15 ^{pqrs}	4.73±0.01 ⁿ	5.09±0.21 ^m	5.99±0.45 ^j	5.64±0.01 ^{kl}	6.71±0.11 ^{hi}	6.96±0.53 ^{gh}	8.61±0.44 ^e	8.73±0.25 ^{de}	8.94±0.14 ^{cd}
430/2B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
304/BA	3.97±0.08 ^s	4.27±0.05 ^{opq}	5.22±0.34 ^m	5.49±0.03 ^l	5.47±0.34 ^{jk}	6.45±0.04 ⁱ	7.18±0.04 ^g	7.74±0.22 ^f	8.90±0.30 ^{cd}	8.94±0.28 ^{cd}	9.16±0.19 ^{bc}

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ตรวจจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ND- ไม่ได้ทำการทดลอง

ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑๑ จำนวนเซลล์ใน *Salmonella* Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสสารละลาย sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NaOCl (ppm)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²)* และ เวลา (นาที)						
	0 _A	0 _B	1	5	10	20	30
100	7.36±0.11 ^{**b}	7.26±0.31 ^{bc}	6.30±0.17 ^{cde}	6.79±0.36 ^{de}	6.35±0.04 ^{gh}	6.05±0.13 ^{hi}	5.94±0.14 ⁱ
200	7.25±0.08 ^{bc}	7.07±0.01 ^{bcd}	6.71±0.01 ^{def}	6.66±0.31 ^{efg}	6.30±0.17 ^h	5.83±0.04 ⁱ	5.44±0.18 ⁱ
400	7.97±0.02 ^a	6.83±0.21 ^{de}	6.74±0.09 ^{def}	6.66±0.01 ^{efg}	6.40±0.15 ^{fgh}	5.88±0.06 ⁱ	7.79±0.18 ⁱ

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสสารละลาย Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28±1 °C โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อบนแผ่นทดสอบเริ่มต้น 0_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑๑

ของการ

10 ร้อยละ

ลดลงของ

จำนวนเซลล์ใน *Salmonella* Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสสารละลาย sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ

NaOCl (ppm)	ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²)* และ เวลา (นาที)						
	0 _A	0 _B	1	5	10	20	30
100	0.00 **	1.36	5.30	7.74	13.72	17.80	19.29
200	0.00	2.48	7.45	8.14	13.10	19.59	24.97
400	0.00	14.30	15.43	16.44	19.70	26.22	27.35

หมายเหตุ *ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสสารละลาย Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28±1 °C โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อบนแผ่นทดสอบเริ่มต้น
0_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)
** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑11 จำนวนเซลล์ใน *Salmonella* Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสสารละลาย Proxidane® ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

Proxidane® (ppm)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²)* และ เวลา (นาที)						
	0 _A	0 _B	1	5	10	20	30
25	7.25±0.10 ^{**a}	7.04±0.01 ^{ab}	5.07±0.01 ^{cd}	3.78±0.30 ^e	3.59±0.22 ^e	3.45±0.03 ^{ef}	3.41±0.15 ^{ef}
50	7.20±0.26 ^a	6.42±0.08 ^b	5.02±0.52 ^{cd}	4.49±0.68 ^d	4.44±0.28 ^d	2.79±0.44 ^{fg}	0.00±0.00 ^h
100	7.21±0.11 ^a	5.37±0.60 ^c	3.41±0.10 ^{ef}	3.18±0.04 ^{efg}	3.31±0.75 ^{efg}	2.63±0.21 ^g	0.00±0.00 ^h

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ หลังสัมผัสสารละลาย Proxidane® ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28±1 °C โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อบนแผ่นทดสอบเริ่มต้น 0_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑๒ ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ใน *Salmonella* Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสสารละลาย Proxidane[®] ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

Proxidane [®] (ppm)	ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²) [*] และ เวลา (นาทีก)						
	0 _A	0 _B	1	5	10	20	30
25	0.00 ^{**}	2.90	30.07	47.86	50.48	52.41	52.97
50	0.00	10.83	30.28	37.64	38.33	61.25	100.00
100	0.00	25.52	52.70	55.89	54.09	63.52	100.00

หมายเหตุ ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ หลังสัมผัสสารละลาย Proxidane[®] ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28±1 °C โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อบนแผ่นทดสอบเริ่มต้น 0_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)
^{**} ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตารางที่ ๑๓ จำนวนเซลล์ใน *Salmonella* Biofilm บนแผ่นทดสอบ หลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC

น้ำมันกานพลู	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²) [*] และ เวลา (นาที)						
	0 _A	0 _B	1	5	10	20	30
2.25 mg/mL	6.65±0.18 ^{**a}	6.44±0.22 ^{ab}	6.49±0.16 ^a	6.36±0.50 ^{abc}	6.44±0.05 ^{ab}	6.07±0.09 ^{bc}	6.02±0.28 ^c
ร้อยละของการลดลง	0.00	1.83	1.07	3.05	1.83	7.47	8.23

หมายเหตุ ^{*}จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้น MBC สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28±1 °C โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อบนแผ่นทดสอบเริ่มต้น 0_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อ แล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

^{**}ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันแถวแสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(p≤0.05)

ตารางที่ ๑๑14 จำนวนเซลล์ S. Anatum (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น(ppm)	เวลา(นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/mL)		
		สารละลายเกลือ	TSB	น้ำนิ่งไก่
100	0 _A	8.70±0.05 ^{**a}	8.23±0.42 ^{bc}	8.40±0.12 ^{ab}
	0 _B	5.32±0.05 ^e	7.46±0.35 ^{fg}	7.77±0.21 ^{def}
	1	0.00±0.00 ^f	7.38±0.27 ^{fgh}	7.75±0.24 ^{defg}
	5	0.00±0.00 ^f	7.52±0.20 ^{defg}	7.67±0.15 ^{defg}
	10	0.00±0.00 ^f	7.58±0.23 ^{defg}	7.55±0.24 ^{defg}
	20	0.00±0.00 ^f	7.37±0.26 ^{fgh}	7.55±0.11 ^{def}
	30	0.00±0.00 ^f	7.40±0.15 ^{fgh}	7.52±0.24 ^{def}
200	0 _A	ND	8.18±0.39 ^{bc}	8.28±0.40 ^b
	0 _B	ND	7.56±0.27 ^{defg}	7.89±0.18 ^{cd}
	1	ND	7.48±0.24 ^{defg}	7.88±0.06 ^{cde}
	5	ND	7.38±0.29 ^{fgh}	7.65±0.13 ^{def}
	10	ND	7.37±0.21 ^{fgh}	7.62±0.18 ^{def}
	20	ND	7.19±0.12 ^{gh}	7.55±0.22 ^{defg}
	30	ND	7.03±0.02 ^h	7.47±0.19 ^{efg}
400	0 _A	ND	8.35±0.40 ^{ab}	8.53±0.34 ^{ab}
	0 _B	ND	7.66±0.23 ^{def}	7.76±0.17 ^{def}
	1	ND	7.44±0.13 ^{fg}	7.70±0.11 ^{def}
	5	ND	7.35±0.32 ^{fgh}	7.69±0.19 ^{def}
	10	ND	7.36±0.10 ^{fgh}	7.69±0.19 ^{def}
	20	ND	7.37±0.23 ^{fgh}	7.47±0.26 ^{efg}
	30	ND	7.38±0.16 ^{fgh}	7.44±0.48 ^{fg}

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 28±1°C โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อบนแผ่นทดสอบ เริ่มต้น 0_B คือ ทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที

** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3, ND=not determined (ไม่ได้ทำการทดลอง)
ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑๕ ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ S. Anatum (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส
สารละลาย sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น(ppm)	เวลา(นาที)	ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์*		
		สารละลายเกลือ	TSB	น้ำนิ่งไก่
100	0 _A	0.00**	0.00	0.00
	0 _B	38.85	9.36	7.50
	1	100.00	10.33	7.74
	5	100.00	8.63	8.69
	10	100.00	7.90	10.12
	20	100.00	10.45	10.12
	30	100.00	10.09	10.48
200	0 _A	ND	0.00	0.00
	0 _B	ND	7.58	6.07
	1	ND	8.56	6.19
	5	ND	9.78	8.93
	10	ND	9.90	9.29
	20	ND	12.10	10.12
	30	ND	14.06	11.07
400	0 _A	ND	0.00	0.00
	0 _B	ND	8.26	7.62
	1	ND	10.90	8.33
	5	ND	11.98	8.45
	10	ND	11.86	8.45
	20	ND	11.74	11.07
	30	ND	11.62	11.43

หมายเหตุ ร้อยละของการลดลงจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm ที่อุณหภูมิ $28\pm 1^{\circ}\text{C}$

** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน $n=3$, °ND= not determined (ไม่ได้ทำการทดลอง)

ตารางที่ ๑๖ จำนวนเซลล์ *S. Anatum* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย Proxitane® ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต* (log CFU/mL)		
		สารละลายเกลือ	TSB	น้ำนิ่งไก่
25	0 _A	8.57±0.02 ^{**a}	8.68±0.07 ^a	8.62±0.28 ^a
	0 _B	7.40±0.03 ^b	7.19±0.56 ^b	7.28±0.41 ^b
	1	3.33±0.89 ^{gh}	5.35±0.21 ^{fgh}	3.35±0.49 ^{ghi}
	5	2.58±0.62 ^{ij}	4.50±0.11 ^d	2.51±0.20 ^j
	10	3.32±0.06 ^{gh}	4.14±0.51 ^{ef}	3.08±0.77 ^{ghij}
	20	3.01±0.15 ^{ghij}	3.55±0.91 ^e	0.00±0.00 ^k
	30	2.57±0.38 ^{ij}	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k
50	0 _A	8.64±0.08 ^a	8.57±0.02 ^a	8.54±0.26 ^a
	0 _B	4.44±0.57 ^e	6.44±0.25 ^c	6.55±0.73 ^c
	1	3.15±0.21 ^{ghi}	2.97±0.10 ^{hij}	3.74±0.06 ^{fg}
	5	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k
	10	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k
	20	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k
	30	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k
100	0 _A	8.56±0.03 ^a	8.75±0.12 ^a	8.57±0.02 ^a
	0 _B	3.44±0.25 ^{gh}	6.26±0.23 ^c	4.25±0.82 ^e
	1	2.39±0.12 ^j	2.45±0.21 ^{ij}	0.00±0.00 ^k
	5	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k
	10	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k
	20	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k
	30	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k	0.00±0.00 ^k

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลาย

Proxitane[®] ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm ที่อุณหภูมิ 28±1°C

**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3, ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๑๗ ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ S. Anatum (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย Proxitane[®] ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	ร้อยละของการลดลง (log CFU/mL)		
		สารละลายเกลือ	TSB	น้ำนิ่งไก่
25	0 _A	0.00**	0.00	0.00
	0 _B	13.65	17.17	15.55
	1	61.14	38.36	61.14
	5	69.89	48.16	70.88
	10	61.26	52.30	64.27
	20	64.88	59.10	100.00
	30	70.01	100.00	100.00
	50	0 _A	0.00	0.00
0 _B		48.61	24.85	23.30
1		63.54	65.34	56.21
5		100.00	100.00	100.00
10		100.00	100.00	100.00
20		100.00	100.00	100.00
30		100.00	100.00	100.00
100	0 _A	0.00	0.00	0.00
	0 _B	59.81	28.46	50.41
	1	72.08	72.00	100.00
	5	100.00	100.00	100.00
	10	100.00	100.00	100.00
	20	100.00	100.00	100.00
	30	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลาย Proxidane® ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm ที่อุณหภูมิ $28\pm 1^{\circ}\text{C}$
 ** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

ตารางที่ ๑18 จำนวนเซลล์ *S. Anatum* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC

น้ำมันกานพลู	เวลา(นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log CFU/mL)		
		สารละลายเกลือ	TSB	น้ำนิ่งไก่
MBC (2.25 mg/mL)	0 _A	8.71±0.16 ^{**a}	8.55±0.14 ^a	8.70±0.24 ^a
	0 _B	7.57±0.24 ^b	6.66±0.25 ^{cde}	7.04±0.43 ^c
	1	6.87±0.03 ^{cd}	6.57±0.37 ^{cde}	6.94±0.19 ^c
	5	6.52±0.42 ^{cde}	6.37±0.20 ^{de}	6.65±0.08 ^{cde}
	10	6.30±0.52 ^e	6.33±0.52 ^{de}	6.57±0.17 ^{cde}
	20	6.33±0.07 ^{de}	4.28±0.23 ^{fg}	6.56±0.08 ^{cde}
	30	4.33±0.09 ^f	3.79±0.58 ^g	4.15±0.16 ^{fg}

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับ MBC อุณหภูมิ $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในน้ำมันกานพลูแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3, ตัวอักษรกำกับ (a, b, c, ...) ที่ต่างกันในแต่ละแถวและคอลัมน์ แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑19 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ S. Anatum (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมัน
กานพลูที่ระดับ MBC

	น้ำมันกานพลู	เวลา(นาที)	ร้อยละของการลดลง (log CFU/mL)		
			สารละลายเกลือ	TSB	น้ำนิ่งไก่
MBC	(2.25 mg/mL)	0 _A	0.00 ^{**}	0.00	0.00
		0 _B	13.09	22.11	19.08
		1	21.13	23.16	20.23
		5	25.14	25.50	23.56
		10	27.67	25.96	24.48
		20	27.32	49.94	24.60
		30	50.29	55.67	52.30

หมายเหตุ ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA
หลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ ระดับ MBC อุณหภูมิ 28±1°C โดย
0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ทำการเติมเชื้อลงในน้ำมันกานพลูแล้วเก็บตัวอย่าง
ทันที (ประมาณ 10 วินาที)

^{**}ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ช
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ช1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่สามารถเกาะติดบน stainless steel 304/2B และ 304/BA ที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธี spread plate technique

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: logCFU					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	36.431 ^a	11	3.312	69.950	.000
Intercept	1288.610	1	1288.610	2.722E4	.000
grade	3.799	1	3.799	80.239	.000
hr	30.697	5	6.139	129.668	.000
grade * hr	1.327	5	.265	5.605	.000
Error	4.309	91	.047		
Total	1419.023	103			
Corrected Total	40.740	102			

a. R Squared = .894 (Adjusted R Squared = .881)

ตารางที่ ช2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่สามารถเกาะติดบน stainless steel 304/2B และ 304/BA ที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธี Hy-lite[®] 2

ANOVA					
logCFU					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.936	5	3.387	594.387	.000
Within Groups	.114	20	.006		
Total	17.050	25			

ตารางที่ ๓3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่สามารถเกาะติดบน stainless steel 304/2B ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	619.798 ^a	32	19.369	160.520	.000
Intercept	3995.914	1	3995.914	3.312E4	.000
media	33.681	2	16.840	139.567	.000
hr	381.473	10	38.147	316.150	.000
media * hr	60.838	20	3.042	25.210	.000
Error	32.941	273	.121		
Total	5844.269	306			
Corrected Total	652.739	305			

a. R Squared = .950 (Adjusted R Squared = .944)

ตารางที่ ๓4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่สามารถเกาะติดบน stainless steel 304/2B ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	135.224 ^a	8	16.903	269.464	.000
Intercept	2396.268	1	2396.268	3.820E4	.000
media	98.424	2	49.212	784.533	.000
hr	28.687	2	14.343	228.660	.000
media * hr	10.697	4	2.674	42.631	.000
Error	5.520	88	.063		
Total	2967.644	97			
Corrected Total	140.744	96			

a. R Squared = .961 (Adjusted R Squared = .957)

ตารางที่ ๕5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่สามารถเกาะติดบน stainless steel 304/2B ที่มีแหล่งของสารอาหารที่แตกต่างกัน อุณหภูมิ 30 °C

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	747.023 ^a	43	17.373	205.497	.000
Intercept	5949.309	1	5949.309	7.037E4	.000
media	123.846	3	41.282	488.315	.000
hr	448.361	10	44.836	530.356	.000
media * hr	52.969	30	1.766	20.885	.000
Error	26.376	312	.085		
Total	8506.297	356			
Corrected Total	773.399	355			

a. R Squared = .966 (Adjusted R Squared = .961)

ตารางที่ ๕6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่สามารถเกาะติดบน เกรดของ stainless steel ต่าง ๆ กัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 30°C

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	667.822 ^a	32	20.869	181.788	.000
Intercept	5169.566	1	5169.566	4.503E4	.000
grade	12.724	2	6.362	55.419	.000
hr	561.460	10	56.146	489.072	.000
grade * hr	20.577	20	1.029	8.962	.000
Error	30.078	262	.115		
Total	7682.508	295			
Corrected Total	697.900	294			

a. R Squared = .957 (Adjusted R Squared = .952)

ตารางที่ ๕7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* ที่สามารถเกาะติดบน พื้นผิวของ stainless steel ชนิดต่าง ๆ กัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 30°C

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	519.071 ^a	21	24.718	218.481	.000
Intercept	4203.784	1	4203.784	3.716E4	.000
finish	42.131	1	42.131	372.401	.000
hr	452.798	10	45.280	400.231	.000
finish * hr	12.092	10	1.209	10.688	.000
Error	23.079	204	.113		
Total	6142.162	226			
Corrected Total	542.151	225			

a. R Squared = .957 (Adjusted R Squared = .953)

ตารางที่ ข8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแผ่นทดสอบชนิดต่างๆ จุ่มอยู่ภายใน ที่อุณหภูมิ 30°C ณ เวลาต่าง ๆ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	492.185 ^a	32	15.381	574.411	.000
Intercept	3708.347	1	3708.347	1.385E5	.000
growth	15.318	2	7.659	286.035	.000
hr	408.516	10	40.852	1.526E3	.000
growth * hr	31.488	20	1.574	58.797	.000
Error	2.142	80	.027		
Total	5344.668	113			
Corrected Total	494.328	112			

a. R Squared = .996 (Adjusted R Squared = .994)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่สามารถเกิดเป็นไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบ 304/2B หลังสัมผัสสารละลาย sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	20.628 ^a	20	1.031	35.574	.000
Intercept	2155.375	1	2155.375	7.434E4	.000
bioNaOCl	.381	2	.191	6.577	.004
hr	17.828	6	2.971	102.485	.000
bioNaOCl * hr	1.113	12	.093	3.199	.004
Error	.957	33	.029		
Total	2355.644	54			
Corrected Total	21.584	53			

a. R Squared = .956 (Adjusted R Squared = .929)

ตารางที่ ๑10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่สามารถเกิดเป็นไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบ 304/2B หลังสัมผัสสารละลาย Proxitan[®] ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	268.931 ^a	20	13.447	99.207	.000
Intercept	979.200	1	979.200	7.224E3	.000
concen	12.688	2	6.344	46.805	.000
min	207.741	6	34.623	255.449	.000
concen * min	19.768	12	1.647	12.154	.000
Error	5.557	41	.136		
Total	1508.557	62			
Corrected Total	274.488	61			

a. R Squared = .980 (Adjusted R Squared = .970)

ตารางที่ ๑11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ S. Anatum ที่สามารถเกิดเป็นไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบ 304/2B หลังสัมผัสน้ำมันการพลูที่ระดับความเข้มข้น MBC (2.25mg/mL)

ANOVA

logCFU					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.128	6	.188	2.813	.029
Within Groups	1.804	27	.067		
Total	2.932	33			

ตารางที่ ข12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1087.947 ^a	48	22.666	448.037	.000
Intercept	8439.704	1	8439.704	1.668E5	.000
concentration	274.031	2	137.015	2.708E3	.000
solution	308.473	2	154.237	3.049E3	.000
min	43.673	6	7.279	143.882	.000
concentration * solution	239.187	2	119.594	2.364E3	.000
concentration * min	86.339	12	7.195	142.224	.000
solution * min	81.324	12	6.777	133.964	.000
concentration * solution * min	86.545	12	7.212	142.563	.000
Error	7.335	145	.051		
Total	10275.216	194			
Corrected Total	1095.283	193			

a. R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย Proxitane[®] ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2026.860 ^a	62	32.691	238.655	.000
Intercept	1515.171	1	1515.171	1.106E4	.000
concentrate	145.041	2	72.520	529.419	.000
solution	10.838	2	5.419	39.559	.000
min	1417.701	6	236.283	1.725E3	.000
concentrate * solution	10.464	4	2.616	19.097	.000
concentrate * min	68.299	12	5.692	41.550	.000
solution * min	20.271	12	1.689	12.332	.000
concentrate * solution * min	46.433	24	1.935	14.124	.000
Error	17.945	131	.137		
Total	3958.067	194			
Corrected Total	2044.804	193			

a. R Squared = .991 (Adjusted R Squared = .987)

ตารางที่ ข14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ของ *S. Anatum* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นที่ MBC (2.25 mg/mL)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	161.088 ^a	20	8.054	78.838	.000
Intercept	3343.482	1	3343.482	3.273E4	.000
solution	6.618	2	3.309	32.389	.000
min	128.120	6	21.353	209.011	.000
solution * min	13.498	12	1.125	11.010	.000
Error	7.458	73	.102		
Total	4168.630	94			
Corrected Total	168.546	93			

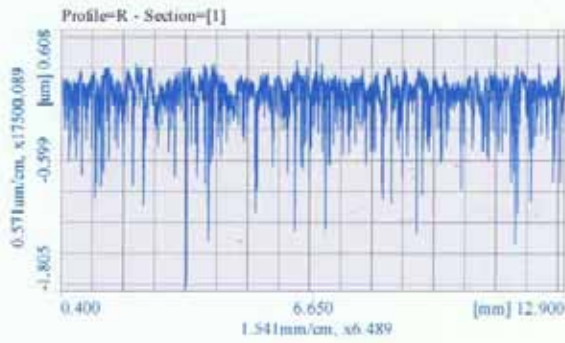
a. R Squared = .956 (Adjusted R Squared = .944)



ภาคผนวก ซ

กราฟแสดงค่า Roughness ของ Stainless steel
ด้วยวิธี Surface roughness tester

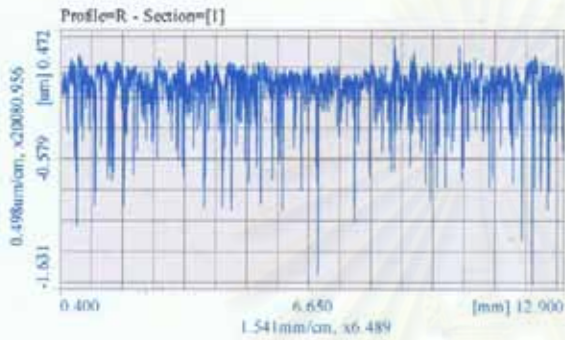
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



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

Parameter Sum Table

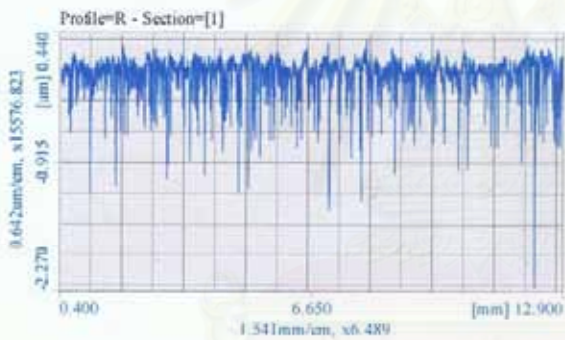
	Profile-R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.132	0.132
Ry (um)	1.663	1.663
Rz (um)	1.294	1.294



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

Parameter Sum Table

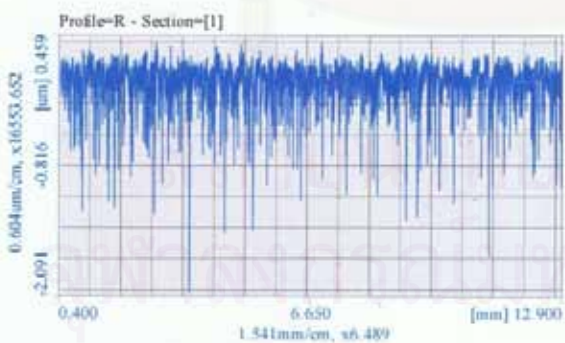
	Profile-R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.118	0.118
Ry (um)	1.494	1.494
Rz (um)	1.192	1.192



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

Parameter Sum Table

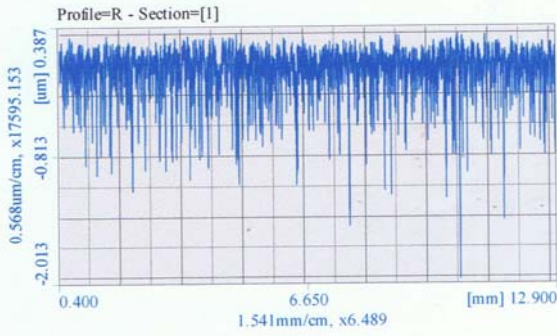
	Profile-R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.129	0.129
Ry (um)	1.727	1.727
Rz (um)	1.242	1.242



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

Parameter Sum Table

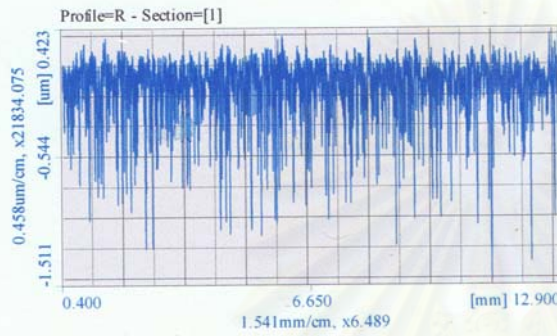
	Profile-R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.140	0.140
Ry (um)	1.838	1.838
Rz (um)	1.471	1.471



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

Parameter Sum Table

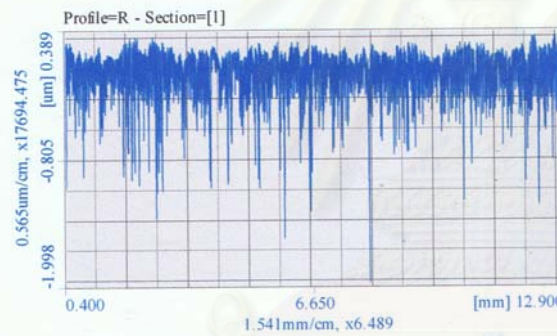
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.136	0.136
Ry (um)	1.669	1.669
Rz (um)	1.314	1.314



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

Parameter Sum Table

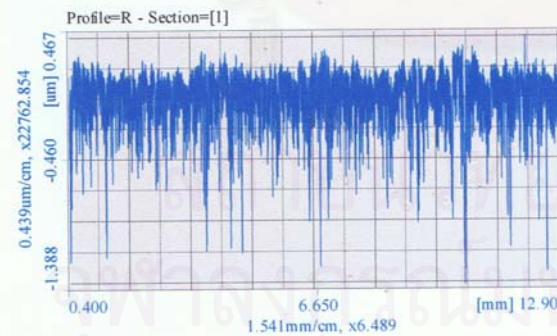
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.137	0.137
Ry (um)	1.559	1.559
Rz (um)	1.352	1.352



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

Parameter Sum Table

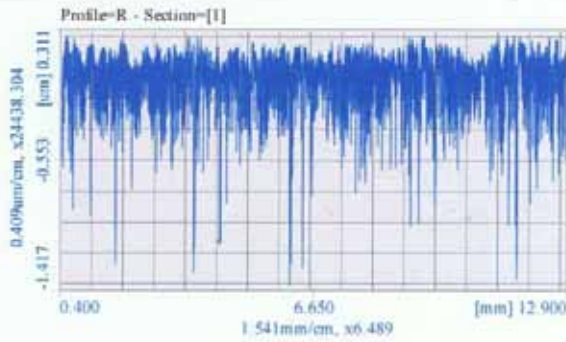
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.149	0.149
Ry (um)	1.714	1.714
Rz (um)	1.338	1.338



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

Parameter Sum Table

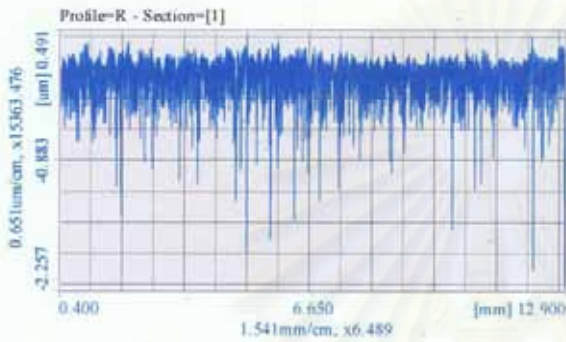
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.145	0.145
Ry (um)	1.564	1.564
Rz (um)	1.235	1.235



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

Parameter Sum Table

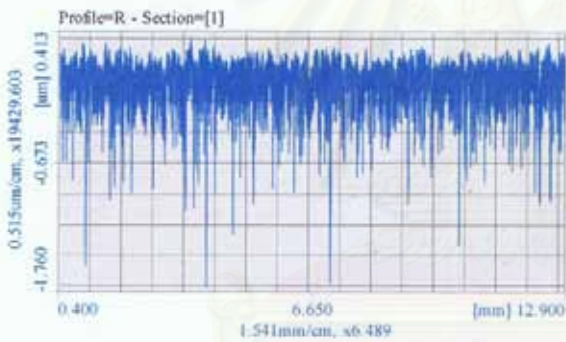
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.135	0.135
Ry (um)	1.498	1.498
Rz (um)	1.192	1.192



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

Parameter Sum Table

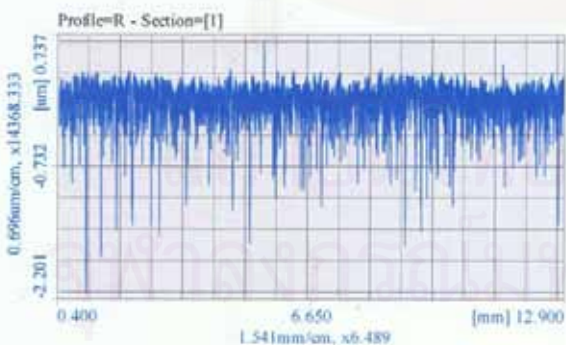
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.162	0.162
Ry (um)	2.116	2.116
Rz (um)	1.532	1.532



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

Parameter Sum Table

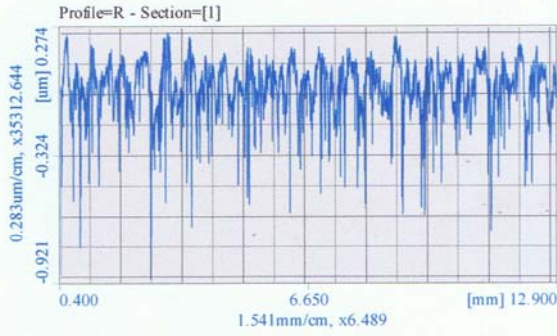
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.155	0.155
Ry (um)	1.770	1.770
Rz (um)	1.316	1.316



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

Parameter Sum Table

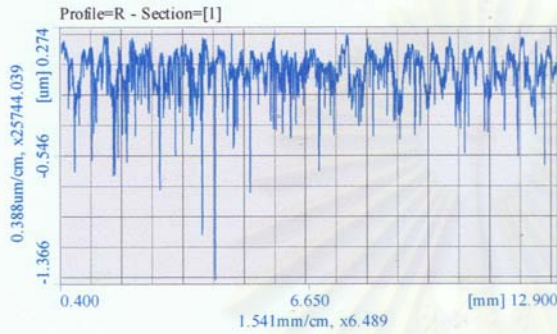
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.172	0.172
Ry (um)	1.994	1.994
Rz (um)	1.562	1.562



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

Parameter Sum Table

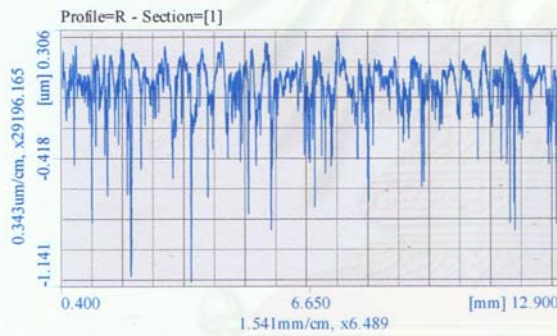
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.088	0.088
Ry (um)	0.893	0.893
Rz (um)	0.728	0.728



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

Parameter Sum Table

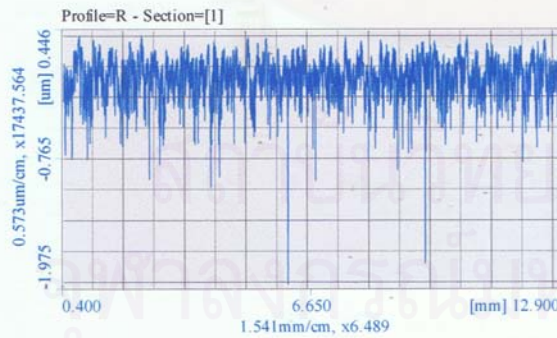
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.090	0.090
Ry (um)	0.970	0.970
Rz (um)	0.752	0.752



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

Parameter Sum Table

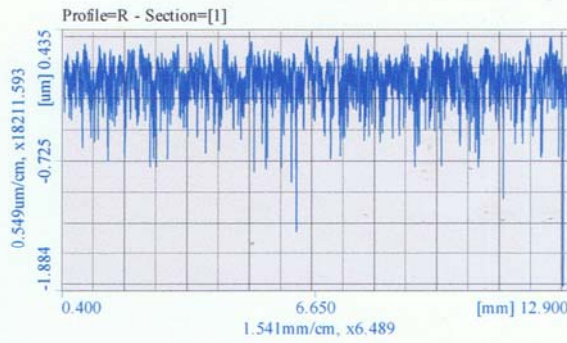
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.094	0.094
Ry (um)	1.113	1.113
Rz (um)	0.828	0.828



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

Parameter Sum Table

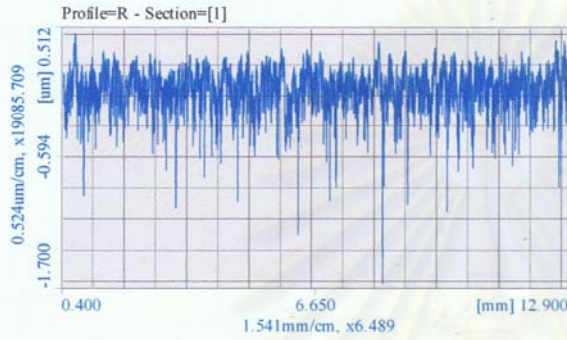
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.145	0.145
Ry (um)	1.647	1.647
Rz (um)	1.151	1.151



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

Parameter Sum Table

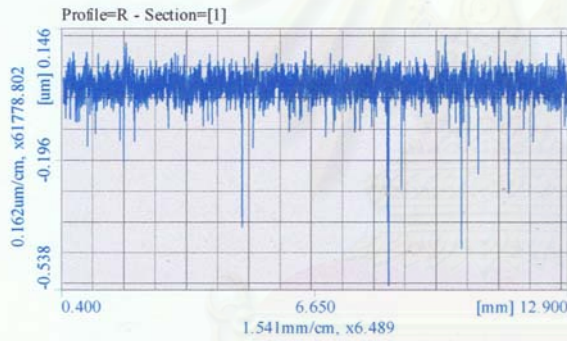
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.134	0.134
Ry (um)	1.446	1.446
Rz (um)	1.101	1.101



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

Parameter Sum Table

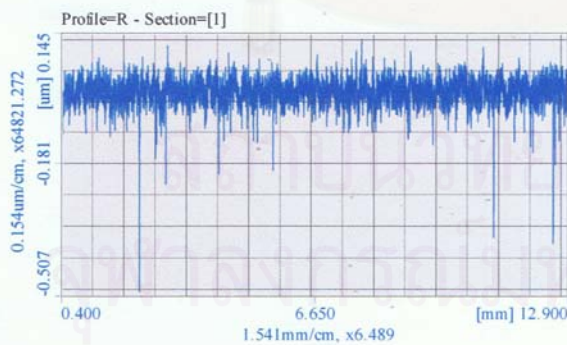
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.138	0.138
Ry (um)	1.509	1.509
Rz (um)	1.112	1.112



MTL/09/101
19. 304/BA Longitudinal

Parameter Sum Table

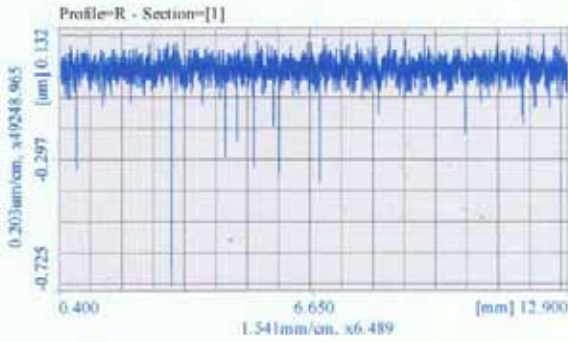
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.022	0.022
Ry (um)	0.401	0.401
Rz (um)	0.284	0.284



MTL/09/102
20. 304/BA Longitudinal

Parameter Sum Table

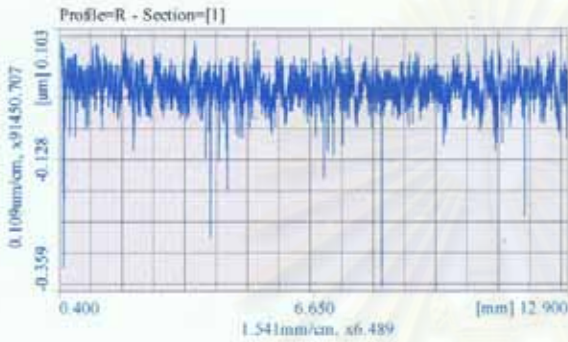
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.022	0.022
Ry (um)	0.393	0.393
Rz (um)	0.253	0.253



MTL/09/103
21. 304/BA Longitudinal

Parameter Sum Table

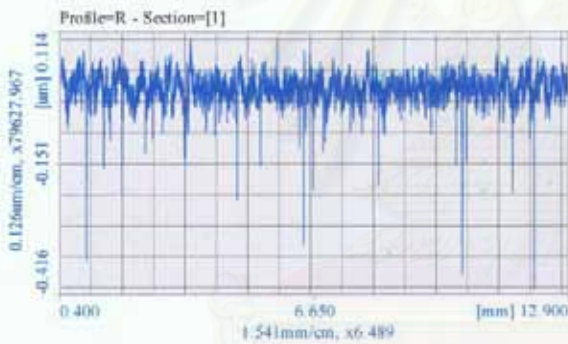
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.022	0.022
Ry (um)	0.457	0.457
Rz (um)	0.284	0.284



MTL/09/104
22. 304/BA Transverse

Parameter Sum Table

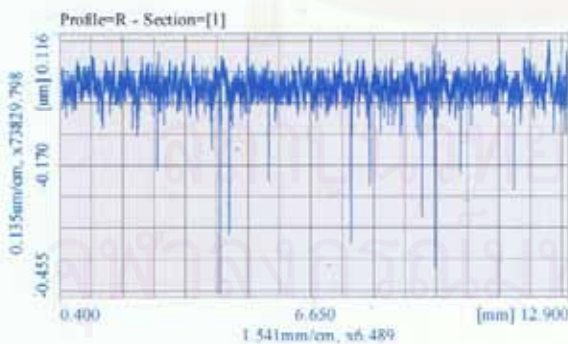
	Profile=R - Section=[1]	Average Value
Ra (um)	0.020	0.020
Ry (um)	0.342	0.342
Rz (um)	0.206	0.206



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(l)	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

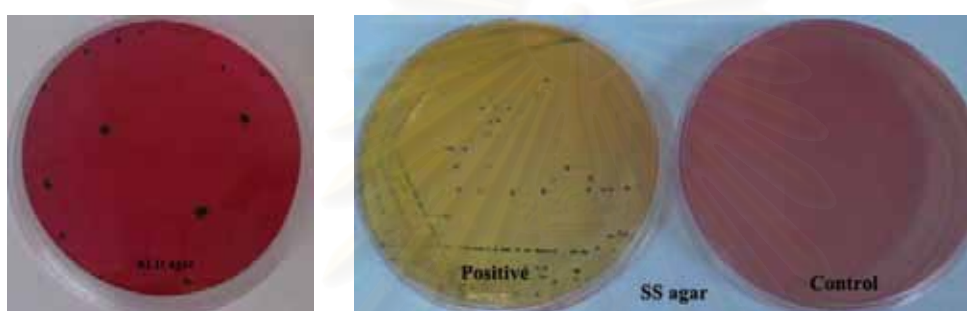


ภาคผนวก ฅ
การทดสอบยืนยัน *Salmonella*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ
การทดสอบยืนยัน *Salmonella*

ทำการทดสอบยืนยัน เซลล์ของ *Salmonella* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยทำการเขยื้อมมาย้อมสี (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

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายจีระเดช มาลา เกิดวันอังคารที่ 12 กรกฎาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี เข้ารับการศึกษา ระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายที่โรงเรียนพุนพินพิทยาคม จังหวัด สุราษฎร์ธานี และสอบเข้าศึกษา ต่อในระดับปริญญาตรี ในสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร สำเร็จการศึกษาและเข้ารับพระราชทานปริญญาบัตรในปีการศึกษา 2548 หลังจากนั้นสอบเข้าศึกษาต่อในระดับ ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย