



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพของบาซิลลัส ซีเรียส สแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส และสปอร์เกาะติดของบาซิลลัส ซีเรียส บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

Efficacy of Chlorine Dioxide and Acidic Electrolyzed Water to Eliminate Biofilms of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and Attached *Bacillus cereus* Spores on Food Contact Surfaces

นามผู้วิจัย นางสาวกนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์ยรรภา มหากาญจนกุล, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุดสาย ตริวานิช, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มรณิ ดุ้ยเต็มวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญย์ สัจจานันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉรหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ
บาซิลลัส ซีเรียส สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส และสปอร์เกาะติดของบาซิลลัส ซีเรียส
บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

Efficacy of Chlorine Dioxide and Acidic Electrolyzed Water to Eliminate Biofilms of
Bacillus cereus, *Staphylococcus aureus* and Attached *Bacillus cereus* Spores
on Food Contact Surfaces

โดย

นางสาวกนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรจารย์การอาหาร)

พ.ศ. 2550

กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล 2550: ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอ็อกโทโรไลซ์ชนิดกรด ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของบาซิลลัส ซีเรียส สเตฟฟีโลคอกคัส ออเรียส และสปอร์เกาต์ของ บาซิลลัส ซีเรียส บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร) สาขาวิทยาศาสตรการอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตรและเทคโนโลยีการอาหาร ปรธานกรรมการ ที่ปรึกษา: อาจารย์วรภา มหากาญจนกุล, Ph.D. 127 หน้า

การศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อในกลุ่มออกซิไดส์ซึ่ง ได้แก่ คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) และน้ำ อ็อกโทโรไลซ์ชนิดกรด (AcEW) ในการลดปริมาณ *B. cereus* และ *S. aureus* และสปอร์ของ *B. cereus* เมื่อ แวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อและสร้างเป็นฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวสัมผัสอาหาร พบว่า การใช้ ClO_2 (5 ppm) และ AcEW (total available chlorine 30 ppm) สามารถทำลาย *B. cereus* และ *S. aureus* ในสารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ได้ทั้งหมดภายใน 5 นาทีเมื่อปริมาณตั้งต้นระดับต่ำ ($3.3 \log \text{CFU/ml}$) และระดับสูง ($6.3 \log \text{CFU/ml}$) ส่วนสปอร์นั้นต้องเพิ่มความเข้มข้นของ ClO_2 เป็น 30 ppm 5 นาทีและ AcEW 30 ppm 20 นาทีจึง จะทำลายสปอร์ปริมาณตั้งต้นระดับต่ำได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อที่ความ เข้มข้นเท่ากันในการลดปริมาณเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Typticase Soy Broth (TSB) และ Chicken broth พบว่า สารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ได้ด้อยลง ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อบนฟิล์มชีวภาพ เมื่อสร้างฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวทดสอบได้แก่ สเตนเลสสตีล ยาง และพลาสติก ใน TSB เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^\circ \text{C}$) และทดสอบกับสารฆ่า เชื้อ พบว่า ฟิล์มชีวภาพบนแผ่นยางสามารถทำลายได้ยากที่สุด การใช้ ClO_2 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที และ AcEW 30 ppm 30 นาที หรือ 52 ppm 10 นาที เหมาะสมในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* และ *S. aureus* บนแผ่นยางได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ร้อยละ 99.83-99.95) สำหรับสปอร์เกาต์บนพื้นผิว การใช้ ClO_2 15 ppm 30 นาที สามารถลดได้เพียงร้อยละ 83.40 ขณะที่การใช้ AcEW 30 ppm สามารถทำลายได้ภายในเวลา 30 นาที และการสร้างการปนเปื้อน chicken broth บนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาต์มีผลทำให้ประสิทธิภาพของสารฆ่า เชื้อลดลงได้ เมื่อสร้างฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิต่ำ ($15 \pm 1^\circ \text{C}$) เซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพไม่มีความต้านทานต่อสาร ฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น และการใช้น้ำอ็อกโทโรไลซ์ชนิดเบสมีผลเพิ่มประสิทธิภาพของ AcEW ได้ จากผล การทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์ในฟิล์มชีวภาพและสปอร์เกาต์บนพื้นผิวนั้นถูกทำลายโดยสารฆ่าเชื้อได้ยาก กว่าเซลล์และสปอร์ที่แวนลอยในอาหาร และปริมาณสารอินทรีย์ในอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพของสารฆ่า เชื้อทั้งสองชนิด

Kanokthip Sapcharoenkul 2007: Efficacy of Chlorine Dioxide and Acidic Electrolyzed Water to Eliminate Biofilms of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and Attached *Bacillus cereus* Spores on Food Contact Surfaces. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Mrs. Warapa Mahakarnchanakul, Ph.D. 127 pages.

The objective of this research was to investigate the efficacy of chlorine dioxide (ClO_2) and acidic electrolyzed water (AcEW) in inactivating of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and spore of *B. cereus* in planktonic state and biofilms on food contact surfaces. In the planktonic state, the results showed that ClO_2 (5 ppm) and AcEW (total available chlorine 30 ppm) completely eliminated *B. cereus* and *S. aureus* cells in 0.1% peptone water within 5 min (both low inoculums; 3.3 log CFU/ml and high inoculums; 6.3 log CFU/ml), whereas spores (initial load 3.2 log CFU/ml) were eliminated by 30 ppm ClO_2 for 5 min and AcEW 30 ppm for 20 min. However, the same concentration of both sanitizers tested in the peptone solution showed less effective in eliminating cells when tested in either Trypticase Soy Broth (TSB) or chicken broth. To determine the effect of both sanitizers on biofilms, then biofilms were grown on stainless steel, rubber and plastic coupons ($2 \times 5 \text{ cm}^2$) immersed in TSB for 48 hours at ambient temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). The rubber was the most difficult to eliminate by sanitizer compare to other surfaces. Using of ClO_2 10 ppm 30 min and AcEW 30 ppm 30 min or 52 ppm 10 min could effectively reduce *B. cereus* and *S. aureus* biofilms on rubber (99.83-99.95%). Spores of *B. cereus* attached on rubber were reduced by ClO_2 15 ppm for 30 min only 83.40%, however they could be eliminated by AcEW in 30 min. Efficacy of both sanitizers decreased when washed the biofilms and attached spores coated with chicken broth. The resistant to sanitizers of biofilms at low temperature ($15 \pm 1^\circ\text{C}$) were not increased. Alkaline electrolyzed water enhanced the bactericidal effect of AcEW on biofilms. The results showed that biofilm cells and attached spores on surface were hard to eliminate compared to planktonic state. Organic matters also affected to the efficacy of both sanitizers.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. วราภา มหากาญจนกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธาสัย ตรีวานิช กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฌรณี ดุ้ยเต็มวงศ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วลัยรัตน์ จันทรพานนท์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบริษัท โพรมิเนนท์ ฟลูอิด คอนโทรลส์ (ประเทศไทย) จำกัด สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องผลิตสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ และบริษัท ไบโอเซฟเฟอร์ จำกัด สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องผลิตน้ำอิเล็กโทรไลซ์ งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์วารสารนานาชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คุณทิพย์ฤทัย ปอน้อย เพื่อนสนิทที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในทุกเรื่องตลอดการทดลองด้วยความเต็มใจ ขอขอบคุณเพื่อนๆ และสมาชิกในห้อง 2414 (Food Microbiology) ทุกคน ที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ที่ให้โอกาสและสนับสนุนทางการศึกษา และขอขอบคุณพี่และน้องของข้าพเจ้าที่ให้กำลังใจและสนับสนุนข้าพเจ้าตลอดมา

กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล

มีนาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
ฟิล์มชีวภาพ	4
ความสำคัญของ <i>Bacillus cereus</i>	17
ความสำคัญของ <i>Staphylococcus aureus</i>	20
สารฆ่าเชื้อในกลุ่มออกซิไดส์ซิง	23
อุปกรณ์และวิธีการ	32
อุปกรณ์	32
วิธีการ	34
ผลและวิจารณ์	42
สรุปและข้อเสนอแนะ	80
สรุป	80
ข้อเสนอแนะ	81
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	82
ภาคผนวก	97
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	127

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและการเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสม	11
2	การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ	12
3	ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่แนะนำให้ใช้ในการฆ่าเชื้อพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร	13
4	การใช้สารฆ่าเชื้อในการทำลายฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวสัมผัสอาหาร	14
5	ลักษณะของโรคที่เกิดเนื่องจาก <i>B. cereus</i> สองสายพันธุ์	18
6	การปนเปื้อน <i>B. cereus</i> ในอาหาร	20
7	การปนเปื้อน <i>S. aureus</i> ในอาหาร	22
8	ปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ (available chlorine) ของสารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆ	24
9	ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการลดจุลินทรีย์ในอาหาร	27
10	สมบัติของน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดเบสและน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด	29
11	ประสิทธิภาพของน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการลดจุลินทรีย์ในอาหาร	31
12	ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรด-เบสของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่ใช้ในการทดลอง	38
13	ค่าความเป็นกรด-เบสและปริมาณสารอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	42
14	ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์และสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว	61
15	จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$	63
16	จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	66
17	จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว เมื่อมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพและสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวหลังสัมผัสน้ำอเล็กโทโรไลซ์ชนิดกรด	71
19	จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพและสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว เมื่อมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทโรไลซ์ชนิดกรด	72
20	จำนวนเซลล์ <i>S. aureus</i> ในฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิว เมื่อไม่มีและมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทโรไลซ์ชนิดกรด	74
 ตารางผนวกที่		
ก1	จำนวนเซลล์ <i>B. cereus</i> (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	108
ก2	จำนวนเซลล์ <i>B. cereus</i> (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	109
ก3	จำนวนเซลล์ <i>S. aureus</i> (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	110
ก4	จำนวนเซลล์ <i>S. aureus</i> (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	111
ก5	จำนวนสปอร์ของ <i>B. cereus</i> (ปริมาณสปอร์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	112
ก6	จำนวนสปอร์ของ <i>B. cereus</i> (ปริมาณสปอร์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	113
ก7	การลดลงของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (ปริมาณเชื้อตั้งต้นต่ำ) หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	114
ก8	การลดลงของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (ปริมาณเชื้อตั้งต้นสูง) หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	115

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค9 จำนวนเซลล์ <i>B. cereus</i> ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำและระดับสูง	116
ค10 จำนวนเซลล์ <i>S. aureus</i> ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำและระดับสูง	117
ค11 จำนวนสปอร์ของ <i>B. cereus</i> ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด เมื่อปริมาณสปอร์ตั้งต้นระดับต่ำและระดับสูง	118
ค12 การลดลงของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด	119
ค13 การลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว เมื่อไม่มีและมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์	120
ค14 การลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว เมื่อไม่มีและมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด	122
ค15 จำนวนเซลล์ <i>S. aureus</i> ในฟิล์มชีวภาพที่รอดชีวิตบนแผ่นยางหลังสัมผัสสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C	124

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไกการเกิดฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์บนพื้นผิว	6
2	การผลิตน้ำอิเล็กโทรไลต์	26
3	จำนวนเซลล์ <i>B. cereus</i> (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 10 และ 15 ppm	44
4	จำนวนเซลล์ <i>B. cereus</i> (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 10 และ 15 ppm	45
5	จำนวนเซลล์ <i>S. aureus</i> (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 10 และ 15 ppm	47
6	จำนวนเซลล์ <i>S. aureus</i> (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 10 และ 15 ppm	48
7	จำนวนสปอร์ของ <i>B. cereus</i> (ปริมาณสปอร์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 15 30 และ 50 ppm	51
8	จำนวนสปอร์ของ <i>B. cereus</i> (ปริมาณสปอร์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 15 30 และ 50 ppm	52
9	จำนวน <i>B. cereus</i> ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำและระดับสูง	56
10	จำนวน <i>S. aureus</i> ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำและระดับสูง	57
11	จำนวนสปอร์ของ <i>B. cereus</i> ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำและระดับสูง	59
12	จำนวนเซลล์ <i>S. aureus</i> ในฟิล์มชีวภาพที่รอดชีวิตบนแผ่นยางหลังสัมผัสสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C	78

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CFU	=	Colony Forming Unit
ml	=	mililitre
g	=	gram
ng	=	nanogram
ppm	=	part per million
min	=	minute
°C	=	degree Celsius
cm ²	=	square centimeter

**ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลาย
ฟิล์มชีวภาพของบาซิลลัส ซีเรียส สแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส และสปอร์เกาะติดของ
บาซิลลัส ซีเรียสบนพื้นผิวสัมผัสอาหาร**

**Efficacy of Chlorine Dioxide and Acidic Electrolyzed Water to Eliminate
Biofilms of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and Attached *Bacillus cereus*
Spores on Food Contact Surfaces**

คำนำ

ฟิล์มชีวภาพ (biofilms) เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร สามารถกำจัดได้ยากแม้ว่าจะทำความสะอาดและฆ่าเชื้อแล้ว เนื่องจากสารที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์จะกั้นมิให้สารฆ่าเชื้อสัมผัสและทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ ฟิล์มชีวภาพจึงเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์หลายชนิดและพบได้บนพื้นผิวต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น พื้นผิวของอุปกรณ์และเครื่องมือท่อ และสายพานการผลิต เป็นต้น ฟิล์มชีวภาพเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์อาหารในระหว่างและหลังกระบวนการผลิต การปนเปื้อนดังกล่าวส่งผลกระทบต่อคุณภาพทำให้อายุการเก็บลดลง ในแง่ความปลอดภัยของอาหารมีความสำคัญอย่างยิ่งถ้าฟิล์มชีวภาพที่เกิดขึ้นเกิดจากการรวมตัวของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารเป็นพาหะ เช่น *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และมีรายงานว่า เซลล์แบคทีเรียที่อยู่ภายใต้ฟิล์มชีวภาพสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้มากกว่าเซลล์ปกติ (Luppens, 2002) ด้วยเหตุนี้การใช้สารฆ่าเชื้อจึงมีประสิทธิภาพด้อยลงในการทำลายจุลินทรีย์ หากจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารก็จะทำให้อาหารมีความไม่ปลอดภัย เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเพิ่มขึ้น

สารฆ่าเชื้อที่นิยมนำมาใช้กำจัดฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวสัมผัสอาหารในปัจจุบัน ได้แก่ สารประกอบคลอรีน สารประกอบไฮโอดีน สารประกอบของกรดเข้มข้น และ Quaternary ammonium compounds (Chemielewski and Frank, 2003) สารฆ่าเชื้อบางชนิดที่มีสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ และ น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดถูกนำมาใช้ในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์และเครื่องมือเครื่องใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการใช้สารทั้งสองชนิดนี้ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น *Escherichia coli* 0157:H7

(Venkitanarayanan *et al.*, 1999) *Pseudomonas fluorescens* (Lindsay *et al.*, 2002) และ *Listeria monocytogenes* (Venkitanarayanan *et al.*, 1999) บนพื้นผิว เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ไรก็ดี รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารฆ่าเชื้อเหล่านี้ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* และ *S. aureus* ยังคงมีอยู่น้อย ทั้งที่แบคทีเรียทั้งสองชนิดมีความสำคัญในแง่สุขลักษณะของอาหารโดยเฉพาะในประเทศไทยอย่างมาก

ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อในกลุ่มออกซิไดส์ซึ่ง 2 ชนิด ได้แก่ คลอรีนไดออกไซด์ และ น้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการลดปริมาณ *B. cereus* และ *S. aureus* และสปอร์ของ *B. cereus* เมื่อแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและเมื่อเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพบนแผ่นพื้นผิวทดสอบโดยศึกษาภายใต้ปัจจัยของชนิดพื้นผิวและการปนเปื้อนสารอินทรีย์ ทั้งนี้ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดและทำลายฟิล์มชีวภาพในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรีนไดออกไซด์ และน้ำอเล็กโทไรส์ ชนิดกรดในการลดปริมาณ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และสปอร์ของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดคือ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1, Trypticase soy broth และ Chicken broth
2. ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus*, *S. aureus* และ สปอร์เกาะติดของ *B. cereus* บนพื้นผิวสัมผัสอาหารภายใต้ปัจจัยของชนิดพื้นผิวและการปนเปื้อนสารอินทรีย์
3. ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวสัมผัสอาหารเมื่อสร้างฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C

การตรวจเอกสาร

ฟิล์มชีวภาพ

ฟิล์มชีวภาพ (Biofilms) คือ กลุ่มสังคมของจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวและฝังตัวอยู่ภายใต้สารกลุ่มพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์นั้นสร้างขึ้นแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ (Costerton *et al.*, 1987) ฟิล์มชีวภาพสามารถเกิดขึ้นได้บนพื้นผิวชนิดต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะพื้นผิวสัมผัสอาหารเช่น พื้นผิวอุปกรณ์และเครื่องมือ ท่อ สายพานการผลิต เป็นต้น เมื่อพื้นผิวดังกล่าวมีการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อที่ไม่ดีพอ จุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่อาจเกิดการสะสมและเจริญกลายเป็นฟิล์มชีวภาพต่อไป ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตและหลังกระบวนการผลิตทำให้อาหารอาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและส่งผลกระทบต่อสุขภาพในอุตสาหกรรมอาหารได้

กลไกการเกิดฟิล์มชีวภาพ

กระบวนการสร้างฟิล์มชีวภาพนั้นจัดเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (dynamic process) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (Davey and O'Toole, 2000) ได้แก่ การเกาะติดบนพื้นผิวของจุลินทรีย์ การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ และการเจริญเป็นฟิล์มชีวภาพที่สมบูรณ์

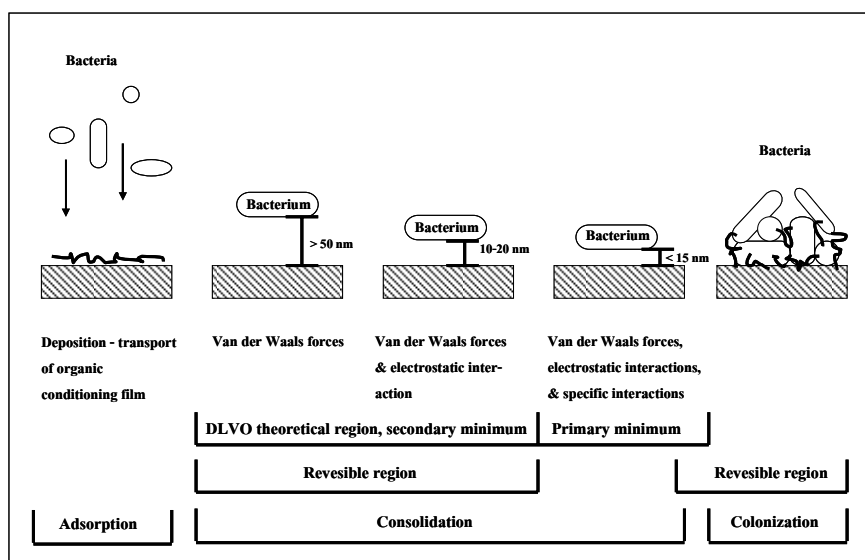
1. การเกาะติดบนพื้นผิวของจุลินทรีย์ (Attachment)

การเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิวของอาหารหรือวัสดุที่สัมผัสกับอาหารอาจเกิดขึ้นได้จากตัวเซลล์หรือการกระทำจากภายนอก ถ้าเป็นการเกาะติดแบบพาสซีฟ (passive) จะเกิดขึ้นจากแรงโน้มถ่วงของโลก และแรงที่เกิดขึ้นจากของไหลที่อยู่รอบๆบริเวณเซลล์ ได้แก่ แรงขับเคลื่อนของของไหล (fluid dynamic force) และแรงขับเคลื่อนจากการแพร่ (diffusion dynamic force) ส่วนการเกาะติดแบบแอคทีฟ (active) เกิดขึ้นเนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะของผิวเซลล์ที่มีส่วนประกอบที่จำเพาะต่อการเกาะติด เช่น แฟลกเจลลา (flagella) พิล (pili) โปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะแอดฮีซิน (adhesin protein) แคปซูล (capsule) และประจุที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ (Kumar and Anand, 1998) การเกาะติดของเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ระยะ (Marshall *et al.*, 1971) คือ

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

ระยะที่ 2 การเกาะติดแบบไม่ผันกลับ (irreversible adhesion) เซลล์แบคทีเรียจะมีการสร้างพันธะที่แข็งแรง ได้แก่ dipole-dipole interaction พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) พันธะโควาเลนต์ (covalent bonding) และ hydrophobic interaction กับพื้นผิวโดยอาศัยโครงสร้างของเซลล์ เช่น แฟลกเจลลา (flagella) ฟิมเบรีย (fimbriae) พิล (pili) เป็นต้น นอกจากนี้เซลล์จะมีการสร้างไฟบริล (fibril) เพื่อเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับพื้นผิวอีกด้วยทำให้มีการยึดเกาะที่เหนียวแน่นกว่าในระยะแรก ซึ่งการกำจัดเซลล์แบคทีเรียในระยะนี้ออกไปทำได้ยากขึ้น ต้องใช้แรงเช่น การขัดถู (scrubbing) หรือการขูดลอก (scraping) เข้าช่วยเพื่อให้เซลล์หลุดออกไป หรือการประยุกต์ใช้เอนไซม์ สารทำความสะอาด (detergent) สารฆ่าเชื้อ และ/หรือความร้อนเพื่อช่วยทำลายแรงที่ใช้ในการเกาะติดของเซลล์กับพื้นผิว (Chmielewski and Frank, 2003) การเกาะติดของจุลินทรีย์เกิดขึ้นในเวลาไม่นานเพียง 5 ถึง 30 วินาทีเท่านั้น โดยเซลล์จะมีการเกาะติดแบบระยะที่ 1 ก่อนแล้วตามด้วยระยะที่ 2 (Mittelman, 1998)

Zottola (1994) ทำการรวบรวมข้อมูลจากนักวิจัยหลายท่านเพื่ออธิบายถึงกลไกของการเกาะติดและการสร้างฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่างๆ โดยแสดงความสัมพันธ์ของแรงยึดเกาะกับระยะห่างของเซลล์กับพื้นผิวดังภาพที่ 1 กล่าวคือ เมื่อมีสารอาหารหลงเหลือบนพื้นผิวจนเกิดเป็นฟิล์มของอาหาร (conditioning film) เซลล์จุลินทรีย์อิสระที่อยู่ในสภาพแวดล้อมจะเคลื่อนที่เข้าหาพื้นผิว จนเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวมากกว่า 50 นาโนเมตร เซลล์จะเกิดการเกาะติดกับพื้นผิวด้วยแรงอย่างอ่อน เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์เข้าใกล้พื้นผิวมากขึ้นจนระยะห่างมีค่า 10-20 นาโนเมตร แรงที่ยึดเกาะนั้นจะเพิ่มขึ้น ทั้งสองระยะนี้เป็นขั้นตอนของการเกาะติดแบบผันกลับได้ จนในที่สุดเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวลดลงต่ำกว่า 15 นาโนเมตร เซลล์จุลินทรีย์เหล่านั้นจะเกิดการสร้างพันธะพิเศษเกิดเป็นการเกาะติดแบบไม่ผันกลับ เซลล์ต่างๆ เหล่านี้จะมีการเจริญเพิ่มจำนวนและพัฒนาเป็นฟิล์มชีวภาพต่อไป



ภาพที่ 1 กลไกการเกิดฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์บนพื้นผิว

ที่มา: Zottola (1994)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิว ได้แก่

(1) ชนิดและโครงสร้างของเซลล์ เซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้างบนเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) หรือ LPS โปรตีนแอคตินและโปรตีนชนิดอื่น กรดไทโคอิก (teichoic acid) เป็นต้น โครงสร้างเหล่านี้จะแสดงถึงความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ของเซลล์ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเกาะติดบนพื้นผิว (Chmielewski and Frank, 2003) มีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* ใช้แฟลกเจลลา ฟิไล และโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ในการเกาะติดขั้นต้น (Davey and O'Toole, 2000; Vatanyoopaisarn *et al.*, 2000) การสูญเสียโครงสร้างเหล่านี้มีผลในการลดความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวบางชนิดได้ (Gilbert *et al.*, 1991) Bower *et al.* (1996) รายงานว่า สปอร์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้ดีกว่าเซลล์เนื่องจากมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงและผิวของสปอร์มีลักษณะเป็นขน (hairy surface)

(2) สภาพแวดล้อมและองค์ประกอบของสารอาหารที่อยู่ล้อมรอบ เมื่อเกิดการสะสมของสารอาหารบนพื้นผิวจนเป็นลักษณะของฟิล์มที่เรียกว่า conditioning film ฟิล์มดังกล่าวจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพของพื้นผิว เช่น ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว (surface

free energy) ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิตี (hydrophobicity) และ ประจุของพื้นผิว ซึ่งอาจส่งผลถึง การเกาะติดของจุลินทรีย์ (Dickson and Koohmarine, 1989) มีหลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า สารอินทรีย์บนพื้นผิวนั้นสนับสนุนให้จุลินทรีย์เกาะติดบนพื้นผิวได้ดีขึ้น (Chmielewski and Frank, 2003) แต่อย่างไรก็ตาม บางงานวิจัยรายงานว่า สารอินทรีย์ เช่น นมและโปรตีนนมมีผลในการลด การเกาะติดของ *Salmonella Typhimurium* และ *L. monocytogenes* ได้ (Helke *et al.*, 1993) นอกจากนี้ปัจจัยของสารอินทรีย์แล้ว อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบสของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ยังส่งผลต่อการเกาะติดและการเกิดฟิล์มชีวภาพด้วย

(3) ลักษณะและคุณสมบัติของพื้นผิว อัตราการเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวแต่ละ ชนิดแตกต่างกันขึ้นกับลักษณะทางกายภาพของพื้นผิว ได้แก่ ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิตี ความเรียบผิว (roughness) และประจุบนพื้นผิว Chmielewski and Frank (2003) ได้รวบรวมงานวิจัยและสรุปว่า การเกาะติดของจุลินทรีย์เกิดขึ้นบนพื้นผิวที่มีพลังงานอิสระ สูงหรือมีความเปียกน้ำได้ง่าย (เช่น สเตนเลสสตีลและแก้วที่มีลักษณะเป็นไฮโดรฟิลิกหรือสมบัติ ชอบน้ำ) ได้ดีกว่าพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิกหรือสมบัติไม่ชอบน้ำ (เช่น เทฟลอน (teflon) ไนลอน (nylon) ยาง (buna-N rubber) เป็นต้น) แต่จากข้อสรุปดังกล่าวอาจให้ผลที่ไม่เป็นจริงเสมอ ไป มีบางงานวิจัย พบว่า แบคทีเรียบางชนิดสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิก มากกว่าพื้นผิวไฮโดรฟิลิก (Sinde and Carballo, 2000; Bayoudh *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมี รายงานว่า พื้นผิวที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ไม่สม่ำเสมอ มีรอยแยก จะทำให้เกิดการเกาะติดได้ดีกว่า พื้นผิวเรียบ (Mafu *et al.*, 1990)

2. การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ (Colonization)

หลังจากเซลล์มีการเกาะติดในระยะที่ 2 การเกาะติดแบบไม่ผันกลับแล้ว เซลล์จะมีการเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปโดยการใช้สารอาหารที่มีอยู่รอบๆ ในสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กขึ้น (microcolony) ซึ่งกลุ่มของเซลล์นี้จะขยายใหญ่และเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) ปกคลุมบริเวณพื้นผิว ในขั้นนี้เซลล์ที่เกาะติดอยู่เริ่มมีการผลิตสารกลุ่มพอลิเมอร์แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์คลุมอยู่ที่ผิวของกลุ่มเซลล์ เรียกสารกลุ่มนี้ว่า Extracellular Polymeric Substances (EPS) อาจประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ฟอสโฟไลพิด กรดไทโคอิก กรดนิวคลีอิก และสารพอลิเมอร์อื่นๆ (Costerton *et al.*, 1987) สารเหล่านี้จะช่วยให้เซลล์ยึดเกาะพื้นผิวได้ดีและมีความเสถียรมากขึ้นจากสภาพแวดล้อมรอบๆ ที่มีการแปรปรวนอยู่ตลอดเวลา (Kumar and Anand, 1998)

3. การเจริญเป็นฟิล์มชีวภาพที่สมบูรณ์ (Maturation)

จากกลุ่มของเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนซ้อนทับกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ภายใต้สาร EPS จะเกิดการพัฒนามาเป็นฟิล์มชีวภาพต่อไป โครงสร้างของฟิล์มชีวภาพที่เจริญเต็มที่อาจเป็นชั้นของเซลล์เพียงชั้นเดียวภายใต้โครงข่ายของ EPS ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (porous) หรือเป็นชั้นของเซลล์หลายชั้นซ้อนกัน โดยมีการเชื่อมกันด้วย EPS และมีช่องสำหรับลำเลียงน้ำ (water channel) กระจายอยู่ทั่วไป (Chmielewski and Frank, 2003) นอกจากสาร EPS จะมีหน้าที่สำคัญในการเชื่อมโยงเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพและยึดเหนี่ยวเซลล์กับพื้นผิวแล้ว ยังมีความสำคัญในการอยู่รอดของฟิล์มชีวภาพด้วย EPS มีหน้าที่ห่อหุ้มและกักเก็บสารอาหารไว้สำหรับเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพ ช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้ง สารเคมีต่างๆ เป็นต้น (Carpentier and Cerf, 2000)

การเกิดฟิล์มชีวภาพในอุตสาหกรรมอาหาร

ฟิล์มชีวภาพเป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารส่งผลให้คุณภาพของอาหารลดต่ำลงและไม่เป็นที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค การสะสมฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวพบได้ในหลายบริเวณของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ พื้น ท่อ ซีลยาง (rubber seal) สายพาน (conveyor belt) สเตนเลสสตีล เป็นต้น มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการตรวจพบจุลินทรีย์บนพื้นผิว โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค Chalton *et al.* (1990) ตรวจพบเชื้อ *Listeria* sp. ในโรงงานผลิตกัมมันตัมบริเวณส่วนของการผลิตและการบรรจุ โดยเฉพาะบริเวณที่มีความเปียกชื้นและทำความสะอาดยาก เช่น สายพาน และ ท่อระบายน้ำ ในปี ค.ศ. 2001 Sharma and Anand ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งชนิดก่อให้เกิดโรค เช่น *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Shigella* และชนิดที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย เช่น *Enterobacter aerogenes*, *B. subtilis*, *Citrobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* ในสายการผลิตของโรงงานผลิตกัมมันตัม และเมื่อไม่นานมานี้ Guðbjörnsdóttir *et al.* (2005) พบว่า ในสายการผลิตอาหารทะเลแปรรูป (ปลาแล่ชิ้น และ กุ้งต้มสุก) มีการปนเปื้อนแบคทีเรียแกรมลบ เช่น เชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* เป็นต้น มากกว่าร้อยละ 70 ของแบคทีเรียทั้งหมดโดยตรวจพบบริเวณพื้นที่การผลิต อุปกรณ์และเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและสัมผัสกับอาหาร จากรายงานวิจัยต่างๆ จะเห็นว่า เชื้อจุลินทรีย์มากมายถูกตรวจพบบนพื้นผิวสัมผัสอาหารและเกิดการสร้างเป็นฟิล์มชีวภาพได้ ซึ่งเซลล์ที่อยู่ภายในฟิล์มชีวภาพจะมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จนทำให้มีความต้านทานต่อ

สารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมอาหารถ้ามีการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต

การที่เซลล์จุลินทรีย์ภายใต้ฟิล์มชีวภาพสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น เกิดจาก (1) สารพอลิเมอร์ที่เซลล์สร้างขึ้นปกคลุมไว้มีผลในการลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ (2) การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ (3) ความจำคัของสารอาหารมีผลให้เซลล์เกิดการปรับตัวและชักนำเข้าสู่สภาวะเครียด และ (4) ความหนาแน่นของเซลล์ภายใต้ฟิล์มชีวภาพที่มีการตอบสนองต่อสารฆ่าเชื้อได้แตกต่างกัน (Luppens, 2002) ดังนั้นการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการปกติอาจไม่เพียงพอในการทำลายและกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวได้ Jessen and Lammert (2003) รายงานว่า หลังจากการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวด้วยสารทำความสะอาดร่วมกับสารประกอบคลอรีนหรือสารผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับกรดเปอร์แอสติก พบว่า แบคทีเรียยังคงรอดชีวิตอยู่มากถึง $3-4 \log \text{CFU/cm}^2$ ซึ่งการหลงเหลือของจุลินทรีย์ถือเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้ Kusumaningrum *et al.* (2003) แสดงให้เห็นถึงการอยู่รอดของเชื้อก่อโรคหลายชนิดได้แก่ *S. Enteritidis*, *Campylobacter jejuni* และ *S. aureus* บนพื้นผิวสแตนเลสสตีลและพบว่าเชื้อเหล่านี้สามารถปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหารเช่น แดงกวา และซันไท์สไลด์ได้

การกำจัดและทำลายฟิล์มชีวภาพ

ขั้นตอนในการกำจัดและทำลายฟิล์มชีวภาพประกอบด้วย การทำความสะอาด (cleaning) และ การฆ่าเชื้อ (sanitizing) ส่วนใหญ่เริ่มจากการใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็นล้างสิ่งสกปรกต่างๆ ออกจากพื้นผิว และใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การขัดถู ร่วมกับสารทำความสะอาดล้างส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ต่างๆ ที่ฝังแน่นออกไป จากนั้นจะใช้สารฆ่าเชื้อเข้าทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ ถ้าสารทำความสะอาดไม่สามารถล้างสารอินทรีย์ได้หมด สารฆ่าเชื้อจะไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ได้ (Poulsen, 1999) ดังนั้นการเลือกวิธีการทำลาย ชนิดและความเข้มข้นของสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างมาก (Augustin and Vehnmas, 2004) การกำจัดและทำลายฟิล์มชีวภาพสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

1. วิธีการทางกายภาพ (Physical methods)

การทำลายฟิล์มชีวภาพด้วยวิธีทางกายภาพสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม คือ การใช้แรงกลในการขจัดลอกแผ่นฟิล์มชีวภาพ การขจัดลอกนั้นถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีที่ง่ายและราคาไม่แพง แต่มีข้อจำกัด คือ ไม่เหมาะสมเมื่อใช้กับพื้นผิวขรุขระ ปัจจุบันจึงได้มีการประยุกต์ใช้วิธีอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น การใช้คลื่นเสียง (sonication) การใช้แรงดันสูง (high pressure) เป็นต้น (ณฐนนท์, 2547) นอกจากนี้ การใช้น้ำที่มีอุณหภูมิสูงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้ผลในการกำจัดและทำลายฟิล์มชีวภาพได้ พบว่า ในระบบการผลิตน้ำดื่มจะต้องใช้น้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 100 นาที หรืออาจใช้ระบบหมุนเวียนของน้ำที่มีอุณหภูมิ 80 °C จึงจะทำลายฟิล์มชีวภาพได้ นอกจากวิธีที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการใช้วิธีการอื่นๆ ได้แก่ Super-high magnetic field, Ultrasound treatment, High pulsed electrical field และ Low electrical field เป็นต้น (Kumar and Anand, 1998)

2. วิธีการทางเคมี (Chemical methods)

การกำจัดและทำลายฟิล์มชีวภาพประกอบด้วย การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ ซึ่งการทำให้ทั้งสองขั้นตอนมีประสิทธิภาพมากขึ้น จำเป็นต้องมีการเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสมเข้าช่วย ขั้นตอนของการทำความสะอาดจำเป็นต้องกำจัดเศษอาหารและสารอินทรีย์ต่างๆ ที่ช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ออกไป สารทำความสะอาดที่ดีจึงต้องมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว ทำให้ไขมันกระจายตัวออก และ ย่อยสลายโปรตีนได้ เพื่อกำจัด EPS ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปกคลุมเซลล์ออกไปได้ สารทำความสะอาดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารทำความสะอาดชนิดเบส และชนิดกรด ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นสารประกอบชนิดเบสที่มีฤทธิ์ในการกำจัดไขมันและโปรตีน (Chmielewski and Frank, 2003) แต่อย่างไรก็ตาม พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมมีความหลากหลายและมีลักษณะแตกต่างกัน ดังนั้น การเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ (ตารางที่ 1) Lewis (1980) แนะนำการเลือกใช้สารทำความสะอาดสำหรับพื้นผิว เช่น แก้ว เซรามิก สแตนเลสสตีล และ พลาสติก ควรใช้สารทำความสะอาดชนิดเบส (alkaline detergent) หรือชนิดไม่มีประจุ (nonionic detergent) จึงจะเหมาะสม ถึงแม้ว่าสารทำความสะอาดจะสามารถกำจัดฟิล์มชีวภาพบางส่วนได้ แต่จุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้ฟิล์มชีวภาพนั้นอาจไม่ถูกทำลายไปด้วย ขั้นตอนการฆ่าเชื้อหลังจากการทำความสะอาด จึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้น

ตารางที่ 1 พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและการเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสม

วัสดุพื้นผิว	ลักษณะ	ข้อควรระวัง
ไม้	ดูดซับความชื้น และไขมันได้ ยากแก่การดูแลรักษา ถูกทำลายด้วยสารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อน	ไม่ควรนำมาใช้เพราะทำความสะอาดได้ยาก ควรเลือกใช้วัสดุชนิดอื่น เช่น โพลีเอทิลีน สแตนเลสสตีล และยางแทน
โลหะ	สามารถเกิดสนิมได้เมื่อสัมผัสกับสารทำ ความสะอาดที่ความเป็นกรดหรือมีคลอรีน เป็นส่วนประกอบ	โลหะมีโอกาสในการเกิดสนิมได้ จึงควร เคลือบด้วยดีบุกหรือสังกะสี สารที่เหมาะสมคือพวกที่มีฤทธิ์เป็นกลาง
แก้ว	มีความเรียบและสามารถกันน้ำได้ อาจถูกกัดกร่อนได้เมื่อใช้สารทำความสะอาด สะอาดที่มีความเป็นเบสมาก	แก้วควรทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาดที่ความเป็นกลางหรือเบสปานกลาง
ยาง	ยางที่เลือกใช้ไม่ควรเป็นรูปพรุน ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อล้างด้วยสารทำ ความสะอาดชนิดเบส แต่อาจเสื่อมสภาพได้ ถ้าใช้ตัวทำลายอินทรีย์และกรดเข้มข้น	แผ่นยางที่นำมาใช้เมื่อใช้งานไประยะหนึ่ง อาจเกิดการโค้งงอได้
สแตนเลสสตีล	ต้านทานต่อการกัดกร่อน มีความเรียบและกันน้ำได้ ต้านทานต่อการออกซิเดชันที่อุณหภูมิสูง ทำความสะอาดได้ง่าย ไม่มีคุณสมบัติความเป็นแม่เหล็ก	ราคาแพง บางชนิดถูกทำลายด้วยสารในกลุ่มฮาโลเจน (คลอรีน ไอโอดีน โบรมีน และ ฟลูออรีน)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriott (1999)

การฆ่าเชื้อมีจุดประสงค์เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้ฟิล์มชีวภาพซึ่งถูกปกคลุมด้วยสาร EPS สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ ได้แก่ สารในกลุ่มฮาโลเจน เช่น คลอรีนและไอโอดีน สารประกอบเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ และ สารประกอบแอมโมเนียม (Quaternary ammonium compound, Quat) (ตารางที่ 2) ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร เวลาในการสัมผัส ปริมาณของสารอินทรีย์ ความกระด้างของน้ำ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และความสามารถของสารในการเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์ (Marriott, 1999) สมบัติของสารฆ่าเชื้อที่ดีควรมีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (broad spectrum) ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และราอย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพดีเมื่ออยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสม (เช่น สถานะที่มีสารอินทรีย์ปริมาณสูง ความกระด้างของน้ำสูง และค่าความเป็นกรด-เบสไม่แน่นอน) สารฆ่าเชื้อ

ที่ยังควรละลายน้ำได้ดี ง่ายต่อการใช้งาน ราคาไม่แพง ตรวจจับง่าย และที่สำคัญต้องไม่เป็นพิษ หรือระคายเคืองต่อร่างกาย การเลือกใช้สารฆ่าเชื้อความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำมาสะอาดพื้นผิวชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ

สารฆ่าเชื้อ	การประยุกต์ใช้
คลอรีน	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยการสเปรย์ Clean-in-place (CIP) และฉีดพ่น
ไฮโอดีน	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยการใช้มือจุ่ม (hand dip)
กรดเปอร์แอซิก	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยวิธี CIP โดยเฉพาะในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำและมีคาร์บอนไดออกไซด์
Acid anionics	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยการสเปรย์ การใช้ร่วมกับสารฆ่าเชื้อและกรด
Quaternary ammonium compound	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด ส่วนใหญ่ใช้ในการควบคุมสิ่งแวดล้อม เช่น ผงซักฟอก น้ำยาทำความสะอาด

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriot (1999)

สารฆ่าเชื้อต่างๆ ได้ถูกนำมาใช้ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดบนพื้นผิวสัมผัสอาหาร เช่น สเตนเลสสตีล พลาสติก ขาง เป็นต้น รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4 การใช้สารทำความสะอาดร่วมกับสารฆ่าเชื้อสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายฟิล์มชีวภาพมากขึ้น จากรายงานการวิจัยพบว่า การใช้สารทำความสะอาดร่วมกับสารฆ่าเชื้อในกลุ่มเปอร์แอซิก (2,600 ppm) หรือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (200 ppm) สามารถทำลายฟิล์มชีวภาพของ *L. monocytogenes* บนพื้นผิวบางชนิดได้ในระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ (Somers and Wong, 2004) แต่อย่างไรก็ตาม สารทำความสะอาดบางชนิดมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรีย และสารฆ่าเชื้อบางชนิดก็มีความสามารถในการสลายสารพอลิเมอร์ (EPS) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นได้เช่นกัน (Kumar and Anand, 1998)

ตารางที่ 3 ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่แนะนำให้ใช้ในการฆ่าเชื้อพื้นผิวใน
โรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

บริเวณหรือพื้นผิว	สารฆ่าเชื้อที่แนะนำให้ใช้	ความเข้มข้น (ppm)
เครื่องมือที่มีพื้นผิวเป็นอะลูมิเนียม	Iodophor	25
ฟิล์มของแบคทีเรีย	Quat ^a	200
	Acid-quat	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
	Acid-anionic	100
การทำความสะอาดแบบ CIP	Acid sanitizer	130
	Active chlorine	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
	Iodophor	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
พื้นคอนกรีต	Active chlorine	1,000-2,000
	Quat	500-800
ถังพลาสติก	Iodophor	25
พื้นผิวที่มีรูพรุน	Active chlorine	200
เครื่องมือที่ใช้การผลิต (อะลูมิเนียม)	Quat	200
	Iodophor	25
เครื่องมือที่ใช้การผลิต (สแตนเลสสตีล)	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: คัดแปลงจาก Marriot (1999)

ตารางที่ 4 การใช้สารฆ่าเชื้อในการทำลายฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

สารฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	ฟิล์มชีวภาพ (อายุ)	พื้นผิว	จำนวน (log CFU/cm ²)		อุณหภูมิ (°C)	อ้างอิง
					ก่อนล้าง	หลังล้าง		
NaOCl ^a	86	1	<i>L. monocytogenes</i> 2 วัน	สแตนเลสสตีล	7.6	0.2	24±2	Ayebah <i>et al.</i> (2006)
AcEW ^b	85	1	<i>L. monocytogenes</i> 2 วัน	สแตนเลสสตีล	7.6	<1.0	24±2	Ayebah <i>et al.</i> (2006)
ClO ₂ ^c	100	5	<i>B. cereus</i> 2 วัน ^d	สแตนเลสสตีล	5.0	1.3	22±1	Kreske <i>et al.</i> (2006)
NaOCl	200	5	<i>B. cereus</i> 2 วัน ^d	สแตนเลสสตีล	5.1	0.6	22±1	Kreske <i>et al.</i> (2006)
Acidic sanitizer	5000	5	<i>B. cereus</i> 2 วัน ^d	สแตนเลสสตีล	5.1	4.7	22±1	Kreske <i>et al.</i> (2006)
ClO ₂	50	5	<i>B. cereus</i> 2 วัน ^c	สแตนเลสสตีล	4.6	2.8	22±1	Ryu and Beuchat (2005)
NaOCl	200	5	<i>B. cereus</i> 2 วัน ^c	สแตนเลสสตีล	5.0	0.6	22±1	Ryu and Beuchat (2005)
Peroxyacetic acid	80	5	<i>B. cereus</i> 2 วัน ^c	สแตนเลสสตีล	4.1	3.9	22±1	Ryu and Beuchat (2005)
NaOCl	100	3	<i>E. coli</i> O157:H7 2 วัน	สแตนเลสสตีล	6.7	1.5	4	Sharma <i>et al.</i> (2005)
Hypochlorite	20	25	<i>Salmonella</i> Weltevreden 2 วัน	พลาสติก	7.5	4.9	-	Jeseph <i>et al.</i> (2001)
Hypochlorite	20	25	<i>Salmonella</i> Weltevreden 2 วัน	ซีเมนต์	6.2	3.8	-	Jeseph <i>et al.</i> (2001)
Hypochlorite	20	25	<i>Salmonella</i> Weltevreden 2 วัน	สแตนเลสสตีล	5.5	4.0	-	Jeseph <i>et al.</i> (2001)
Iodophor	20	25	<i>Salmonella</i> Weltevreden 2 วัน	พลาสติก	7.1	3.2	-	Jeseph <i>et al.</i> (2001)
Iodophor	20	25	<i>Salmonella</i> Weltevreden 2 วัน	ซีเมนต์	6.7	3.4	-	Jeseph <i>et al.</i> (2001)
Iodophor	20	25	<i>Salmonella</i> Weltevreden 2 วัน	สแตนเลสสตีล	5.4	3.4	-	Jeseph <i>et al.</i> (2001)
NaOCl	50	5	<i>B. cereus</i> 8 วัน	สแตนเลสสตีล	4.9	2.6	-	Peng <i>et al.</i> (2002)
Quat	200	5	<i>B. cereus</i> 8 วัน	สแตนเลสสตีล	4.9	2.8	-	Peng <i>et al.</i> (2002)

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สารฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	ฟิล์มชีวภาพ (อายุ)	พื้นผิว	จำนวน (log CFU/cm ²)		อุณหภูมิ (°C)	อ้างอิง
					ก่อนล้าง	หลังล้าง		
NaOCl	100	20	mixed biofilm (dairy plant) 1 วัน	สแตนเลสสตีล	6.5	4.4	4	Sharma and Anand (2001)
Iodophor	10	20	Mixed biofilm (dairy plant) 1 วัน	สแตนเลสสตีล	9.4	6.1	4	Sharma and Anand (2001)

หมายเหตุ ^a NaOCl = Sodium hypochlorite

^b AcEW = Acidic electrolyzed water

^c ClO₂ = Chlorine dioxide

^d ฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* อายุ 2 วัน และวางในอากาศที่มีความชื้น 100% 3 วัน

^e ฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* อายุ 2 วัน และวางในอากาศที่มีความชื้น 100% 4 วัน

การใช้วิธีทางเคมีร่วมกับวิธีทางกายภาพ เช่น ความร้อน เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายฟิล์มชีวภาพได้ดี Peng *et al.* (2002) ศึกษาประสิทธิภาพของ 1.5% Spec-Tak 1000 (alkaline detergent) ในการทำความสะอาดแบบ CIP เพื่อทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* บนแผ่นสแตนเลสสตีล พบว่า ในเวลา 10 นาที สามารถลดฟิล์มชีวภาพลงได้ 2.21 log CFU/chip แต่เมื่อใช้ 1.5% Spec-Tak 1000 ที่มีอุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาทีเท่ากัน พบว่าลดลงได้ถึง 5.97 log CFU/chip สอดคล้องกับการทดลองของ Antoniou and Frank (2005) ซึ่งรายงานว่า การใช้สารประกอบโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 2.5 (66 °C) หรือ NaOH ร้อยละ 2.0 (68 °C) เป็นเวลา 3 นาที สามารถกำจัด EPS และ ทำลายฟิล์มชีวภาพของ *Pseudomonas putida* ได้ แสดงว่า ความร้อนมีผลในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายฟิล์มชีวภาพได้มากขึ้น

3. วิธีการทางชีวภาพ (Biological methods)

การใช้วิธีการทางชีวภาพเป็นแนวทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันเนื่องจากผู้บริโภคอาหารส่วนใหญ่ให้ความสนใจเกี่ยวกับด้านความปลอดภัยของอาหารมากขึ้น ในทางด้านอุตสาหกรรมอาหารมีการนำสารชีวภาพ เช่น แบคทีริโอซิน (bacteriocin) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์มาเคลือบบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารเพื่อยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย (Kumar and Anand, 1998) แบคทีริโอซินที่ใช้อย่างแพร่หลายคือ นิสิน (nisin) ซึ่งได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration (FDA) ในปี 1988 ว่าสามารถใช้ในอาหารได้ (Generally Recognized As Safe; GRAS) มีรายงานพบว่า นิสิน สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ (spore former) ได้ นอกจากสารในกลุ่มแบคทีริโอซินแล้ว เอนไซม์เป็นสารชีวภาพอีกกลุ่มหนึ่งที่ถูกเลือกใช้ในการทำลายฟิล์มชีวภาพเพราะเอนไซม์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ และจุลินทรีย์ได้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัด EPS และฟิล์มชีวภาพได้ แต่เอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์แตกต่างกัน จึงมีข้อจำกัดในการเลือกใช้ที่จำเป็นต้องเลือกให้จำเพาะกับชนิดของสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์ที่สร้างฟิล์มชีวภาพนั้น Augustin and Vehnmas (2004) ศึกษาผลของเอนไซม์ในการลดฟิล์มชีวภาพพบว่า สารทำความสะอาดที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ (enzymatic cleaning agent) ในทางการค้าหลายชนิด ได้แก่ Pandion, Resinase A2X, Spezyme GA300 และ Paradigm สามารถทำลายฟิล์มชีวภาพของ *P. aeruginosa* ให้เหลือน้อยกว่า 3 log CFU/ml ได้ในเวลา 30 นาที ส่วนการใช้เอนไซม์ในกลุ่มโปรติเนส (protease) ได้แก่ alkalase chemotrypsin cryotin และ krilltrypsin มีประสิทธิภาพที่ดีในการลดฟิล์มชีวภาพได้ดีเช่นกัน แต่พบว่าเอนไซม์กลุ่มนี้จะมีประสิทธิภาพในการทำลายลดลงเมื่อมีสารอาหารเช่น น้ำนมตกค้าง และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการทดลองใช้แบคทีริโอฟาจ

(bacteriophage) KH1 ในการทำลาย *E. coli* O157:H7 พบว่า สามารถลดเซลล์เกาะติด (attached cell) บนแผ่นสแตนเลสสตีลได้ แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของ *E. coli* O157:H7 ในฟิล์มชีวภาพได้ (Sharma *et al.*, 2005)

ความสำคัญของ *Bacillus cereus*

สมบัติของแบคทีเรียและการก่อโรค

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนขนาดประมาณ 1.0-1.2 ไมโครเมตร สร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ในช่วง pH 4.3-9.3 และ a_w มากกว่า 0.92 ระหว่างอุณหภูมิ 10-50 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28-37 °C ส่วนสายพันธุ์ไซโครโทรปสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 °C บางชนิดเจริญช้าๆได้ที่ 4-5 °C และไม่เจริญที่ 43 °C (van Netten *et al.*, 1990)

B. cereus ก่อให้เกิดโรค *B. cereus* gastroenteritis แบ่งเป็น 2 ประเภทตามอาการของโรค คือ อาการท้องร่วง (diarrhea type) และ อาการอาเจียน (emetic type) สาเหตุของโรคเกิดจากสารพิษที่สร้างขึ้นระหว่างเชื้อเจริญในอาหาร ลักษณะของโรคที่เกิดเนื่องจาก *B. cereus* ทั้งสองสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 5

B. cereus ชนิดก่อให้เกิดอาการท้องร่วง (diarrhea type) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เนื่องจากการสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ชนิดไม่ทนร้อน (heat-labile toxins) พบได้ในทั้งทางเดินอาหารและอาหารที่เป็นพาหะ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงรุนแรง เวียนศีรษะและปวดท้อง อาการของโรคคล้ายกับการติดเชื้อเนื่องจาก *Clostridium perfringens* ส่วน *B. cereus* ชนิดก่อให้เกิดอาการอาเจียน (emetic type) ทำให้เกิดโรคโดยสร้างสารพิษชนิดทนร้อน (heat-stable toxins) ในอาหาร เมื่อได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อชนิดนี้เพียงไม่เกิน 5 ชั่วโมงจะเกิดอาการอาเจียนรุนแรง เวียนศีรษะ อาจมีอาการท้องเสียร่วมด้วย คล้ายกับการติดเชื้อจาก *S. aureus* หายได้เองภายในเวลา 6-24 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ลักษณะของโรคที่เกิดเนื่องจาก *B. cereus* สองสายพันธุ์

คุณลักษณะ	อาการท้องร่วง (diarrheal)	อาการอาเจียน (emetic)
ปริมาณติดเชื้อ (infective dose)	10^5 - 10^7 (เซลล์)	10^5 - 10^8 (ต่อกรัม)
แหล่งผลิตสารพิษ (toxin produced)	ในลำไส้เล็กของโฮสต์	ในอาหาร
ชนิดของสารพิษ (type of toxin)	โปรตีน	ไซคลิกเปปไทด์
ระยะฟักตัว (incubation period)	8-16 ชม. (อาจมากกว่า 24 ชม.)	0.5-5 ชม.
ระยะเวลาป่วย (duration of illness)	12-24 ชม. (อาจหลายวัน)	6-24 ชม.
อาการ (symptoms)	ถ่ายเป็นน้ำ ปวดท้อง อาจเกิดอาการคลื่นไส้	คลื่นไส้ อาเจียน เวียนศีรษะ
อาหารที่มักพบการปนเปื้อน	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ชุป ผัก ซอส นมและผลิตภัณฑ์นม	ข้าวผัด พาสต้า พาสตรี (pastry) ก๋วยเตี๋ยว

ที่มา: ดัดแปลงจาก Granum (1997)

การปนเปื้อนในอาหารและการระบาดของโรค

มีรายงานว่า *B. cereus* มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด ได้แก่ ข้าว เครื่องเทศ นม และผลิตภัณฑ์ อาหารพร้อมบริโภค เป็นต้น (ตารางที่ 6) จากการสำรวจการปนเปื้อน *B. cereus* ในอาหารพร้อมบริโภคในประเทศเดนมาร์กระหว่างปี ค.ศ. 2000-2003 โดยแยกเป็นอาหารพร้อมบริโภค 3 ประเภท ได้แก่ อาหารสด (ผักและผลไม้ รวม 991 ตัวอย่าง) อาหารที่ผ่านความร้อน (เช่น ขนมอบี พาสต้า ไข่กรอก ซอส ชุป เป็นต้น รวม 30,581 ตัวอย่าง) และ อาหารที่ผ่านความร้อนบางส่วน (เช่น แชนวิช สลัด เค้ก คัสตาร์ด ไอศกรีม เป็นต้น รวม 13,873 ตัวอย่าง) พบว่า มีการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ (not acceptable) หรือมากกว่า 10^4 CFU/g เป็นจำนวน 2(0.2%) 122(0.4%) และ 83(0.6%) ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่ง *B. cereus* ที่แยกได้นั้น ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินและพบสายพันธุ์ที่สร้าง emetic toxin เพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น (Rosenquist *et al.*, 2005) เมื่อเร็วๆ นี้ ในปี 2006 Meldrum *et al.* สำรวจการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในอาหารพร้อมบริโภคในประเทศเวลส์ระหว่างปี ค.ศ. 2003-2005 ตรวจพบการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ ($\geq 10^5$ CFU/g) ในอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ เค้กครีมและพาสตรีเนื้อ โดยตรวจพบเป็นจำนวน 2(0.5%) และ 2(0.4%) ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งหมด 433 และ 515 ตัวอย่าง ตามลำดับ และในเวลาใกล้เคียงกัน Wijnands *et al.*

(2006) ทำการตรวจสอบ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดในประเทศเนเธอร์แลนด์ พบว่ามีอาหารที่มีการปนเปื้อน *B. cereus* ในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ ($\geq 10^5$ CFU/g) หลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ให้กลิ่นรส นมและผลิตภัณฑ์นม อาหารพร้อมบริโภค ผักและผลิตภัณฑ์ ผัก และพาสตริ์ คิดเป็นร้อยละ 0.14 0.19 0.29 0.16 และ 0.04 จากจำนวนทั้งหมด 1,384 5,943 22,744 637 และ 2,637 ตัวอย่าง

การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *B. cereus* เกิดขึ้นหลายครั้งในหลายประเทศ มีรายงานว่า ในช่วงปี ค.ศ. 1973-1987 เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *B. cereus* ในประเทศสหรัฐอเมริกา รวม 58 ครั้ง จากอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหารจีน อาหารเม็กซิกัน เนื้อวัว ผักผลไม้ และ สัตว์น้ำจำพวกมีเปลือก (shellfish) เป็นจำนวน 24 5 3 3 และ 2 ครั้ง ตามลำดับ ในเนื้อไก่ ปลากระดุกแข็ง ไอศกรีม และ โกงว่ง พบการระบาดอย่างละ 1 ครั้ง ส่วนการระบาดอีก 17 ครั้ง พบในอาหารอื่นๆ และไม่ทราบสาเหตุชัดเจน (Schultz and Smith, 1994) ในประเทศเนเธอร์แลนด์ระหว่างปี ค.ศ. 1991-1994 พบว่า *B. cereus* เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษคิดเป็นร้อยละ 19 ของการระบาดทั้งหมด (Simone *et al.*, 1997) ในประเทศไต้หวันในปี ค.ศ. 1986-1995 พบว่า การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อชนิดนี้จัดเป็นอันดับสามรองจากการระบาดเนื่องจาก *Vibrio parahaemolyticus* และ *S. aureus* (Schoeni and Wong, 2005) ส่วนในประเทศอื่นๆ Kotiranta *et al.* (2000) ได้รวบรวมการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *B. cereus* ระหว่างปี ค.ศ. 1973-1985 พบการระบาดเกิดขึ้นในประเทศฟินแลนด์ เนเธอร์แลนด์ แคนาดา สกอตแลนด์ อังกฤษและเวลส์ รวมถึงประเทศญี่ปุ่น คิดเป็นร้อยละ 17.8 11.5 2.2 0.8 0.7 และ 0.7 ของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากแบคทีเรียทั้งหมด

นอกจากการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในอาหารแล้ว เซลล์ *B. cereus* ยังสามารถเกาะติดบนพื้นผิวต่างๆ เช่น สเตนเลสสตีล ซึ่งเป็นวัสดุหลักของอุปกรณ์และเครื่องมือในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้ (Peng *et al.*, 2001) เมื่อเซลล์นั้นเกิดการเกาะติดบนพื้นผิวในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เซลล์เหล่านั้นอาจพัฒนาเป็นฟิล์มชีวภาพได้ Peng *et al.* (2002) พบว่าการเกิดฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* มีผลทำให้เซลล์ของ *B. cereus* ภายในฟิล์มชีวภาพนั้นต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้มากกว่า เซลล์แขวนลอย (planktonic cells) และเซลล์เกาะติด (attached cells) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกาะติดของเซลล์และสปอร์ พบว่า สปอร์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้ดีกว่าเซลล์หลายเท่า เนื่องจากมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง (Peng *et al.*, 2001) และสปอร์ของ *B. cereus* ที่เกาะติดบนแผ่นสเตนเลสสตีล จะมีผลทำให้ความสามารถในการต้านทานความร้อนของสปอร์นั้นเพิ่มขึ้นด้วย (Simmonds *et al.*, 2003)

ตารางที่ 6 การปนเปื้อน *B. cereus* ในอาหารชนิดต่างๆ

อาหาร	ประเทศ	จำนวนตัวอย่างที่พบ/ จำนวนทั้งหมด (%)	อ้างอิง
น้ำผึ้ง	อาร์เจนตินา	16/70 (23%)	Iurlina <i>et al.</i> (2006)
ชีส	อาร์เจนตินา	15/50 (30%)	Iurlina <i>et al.</i> (2006)
อาหารริมบาทวิถี	บอสวานา	96/148 (65%)	Murindamombe <i>et al.</i> (2005)
เนื้อไก่และผลิตภัณฑ์	สหรัฐอเมริกา	27/60 (45%)	Smith <i>et al.</i> (2004)
อาหารหมัก(iru และ ogiri)	ไนจีเรีย	50/50 (100%)	Oguntoyinbo and Oni (2004)
อาหารพร้อมบริโภค	ไต้หวัน	81/164 (49.3%)	Fang <i>et al.</i> (2003)
ไอศกรีม	อินเดีย	10/30 (33.3%)	Warke <i>et al.</i> (2000)
อาหารมังสวิรัต	จีน	11/320 (3.4%)	Fang <i>et al.</i> (1999)
ผักสดและผลิตภัณฑ์	ญี่ปุ่น	25/168 (14.9%)	Kaneko <i>et al.</i> (1999)
ผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ	เนเธอร์แลนด์	109/229 (48%)	Giffel <i>et al.</i> (1996)
อาหารทารก	เยอรมัน	141/261(54%)	Becker <i>et al.</i> (1994)

ความสำคัญของ *Staphylococcus aureus*

สมบัติของแบคทีเรียและการก่อโรค

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาดประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ การจัดเรียงตัวของเซลล์อาจเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ เป็นสายสั้นๆ ไม่เกิน 4 เซลล์ หรืออาจอยู่กันเป็นกลุ่มก้อนคล้ายพวงองุ่น (cluster-forming coccus) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 7-48 °C pH ระหว่าง 4.0-9.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 35-37 °C ส่วน pH ที่เหมาะสมคือ 6.0-7.0 สามารถเจริญในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 7-10 และพบว่าบางสายพันธุ์เจริญได้ที่ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 20 (Jay *et al.*, 2005)

S. aureus สามารถสร้างสารพิษชนิดเอนเทอโรทอกซิน ชื่อว่า Staphylococcal enterotoxins (SEs) ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning) ซึ่งมีอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงและอาเจียนเมื่อได้รับอาหารเข้าไป สารพิษชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นในช่วง 10-46 °C และช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40-45 °C เอนเทอโรทอกซินเป็นทอกซินที่ทนต่อความร้อนได้ดี ไม่ถูก

ทำลายด้วยความร้อนในการทำอาหารปกติและสามารถทนต่อน้ำย่อยในทางเดินอาหาร เช่น เปปซิน ได้ อาการของโรคจะเกิดภายใน 2-6 ชั่วโมงหลังจากที่กินอาหารเข้าไป โดยสารพิษจะไปออกฤทธิ์ที่เยื่อของลำไส้เล็ก ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง เป็นตะคริวรุนแรง และท้องร่วง (Jay *et al.*, 2005) ปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้คือมากกว่า 10^5 เซลล์ต่อกรัมของอาหาร และความเข้มข้นของเอนเทอโรทอกซินเพียง 1 ng ต่อกรัมของอาหารที่ปนเปื้อนสามารถทำให้เกิดโรคได้เช่นกัน (Jablonski and Bohach, 1997)

การปนเปื้อนในอาหารและการระบาดของโรค

การปนเปื้อนจาก *S. aureus* ในอาหารเกิดขึ้นได้ทั้งในระหว่างการผลิตและหลังจากการผลิต แหล่งของแบคทีเรียชนิดนี้มาจากมือของผู้ประกอบอาหาร อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่สัมผัสอาหาร เช่น มีด เขียง และเครื่องบดเนื้อ เป็นต้น (Jablonski and Bohach, 1997) ดังนั้นอาหารที่มักมีการปนเปื้อน *S. aureus* ได้แก่ อาหารพร้อมบริโภค ผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น (ตารางที่ 7) จากการศึกษาการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในอาหารทะเลผ่านความร้อนแช่เยือกแข็งส่งออกของประเทศไทยจำนวน 1,112 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนของ *S. aureus* 39 ตัวอย่าง (3.51%) ในปริมาณระหว่าง 3.0-43 MPN/กรัม โดยแยกชนิดของอาหารเป็น 4 ชนิด ได้แก่ กุ้งผ่านความร้อนแช่เยือกแข็ง ปลาสดปรุงรสผ่านความร้อนแช่เยือกแข็ง ปลาหมึกผ่านความร้อนแช่เยือกแข็ง และอาหารทะเลรวมผ่านความร้อนแช่เยือกแข็ง พบการปนเปื้อนของ *S. aureus* คิดเป็นร้อยละ 3.26 3.13 1.62 และ 7.63 ของอาหารแต่ละชนิดตามลำดับ (เนาวรัตน์, 2540) Eleftheriadou *et al.* (2002) ได้ทำการสำรวจการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในสาธารณรัฐไซปรัสระหว่างปี ค.ศ. 1991-2000 พบว่า *S. aureus* มีการปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด รวม 90 ตัวอย่าง ได้แก่ ชีส พาสต้า แซนวิช ของหวาน ไอศกรีม และอาหารพร้อมบริโภค จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 12,415 ตัวอย่าง ซึ่งอาหารเหล่านี้พบปริมาณการปนเปื้อนมากกว่า 10^4 CFU/g และเมื่อไม่นานมานี้ Meldrum *et al.* (2006) ทำการสำรวจการปนเปื้อน *S. aureus* ในอาหารพร้อมบริโภคจำนวน 3,391 ตัวอย่าง พบว่า เค้กครีม คัสตาร์ด แซนวิชไข่ และพาสตริเนื้อ มีการปนเปื้อน *S. aureus* ในระดับที่ยอมรับไม่ได้ ($\geq 10^4$ CFU/g) คิดเป็นร้อยละ 0.2 0.8 0.8 และ 0.4 ตามลำดับ และมีรายงานว่าในประเทศบอสเนียมีการตรวจพบ *Staphylococcus* sp. ในผลิตภัณฑ์ผักแช่เยือกแข็ง โดยพบว่าเป็น *S. aureus* ทั้งหมด 24 ไอโซเลต (14.4%) จากเชื้อ *Staphylococcus* sp. ทั้งหมด 167 ไอโซเลต (Manani *et al.*, 2006)

การเกิดโรคระบาดเนื่องจากอาหารที่มีการปนเปื้อน *S. aureus* พบในหลายประเทศ ในประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1988-1992 พบว่า *S. aureus* เป็นสาเหตุให้เกิดโรคคิดเป็น

ร้อยละ 1.8 2.8 2.4 1.7 และ 1.5 ของโรคที่มีอาหารเป็นพาหะทั้งหมดในแต่ละปี ตามลำดับ (Bean *et al.*, 1997) Tirado and Schimdt (2001) รายงานว่า ในช่วงระยะเวลา 5 ปี (ค.ศ. 1988-1992) พบการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *S. aureus* ในยุโรป คิดเป็นร้อยละ 5.1 ของโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมด

ตารางที่ 7 การปนเปื้อน *S. aureus* ในอาหารชนิดต่างๆ

อาหาร	ประเทศ	จำนวนตัวอย่างที่พบ/จำนวนทั้งหมด (%)	อ้างอิง
อาหารพร้อมบริโภค	ตุรกี	48/512 (9.4%)	Aycicek <i>et al.</i> (2005)
นมและผลิตภัณฑ์	นอร์เวย์	401/515 (77.9%)	Jorgensen <i>et al.</i> (2005)
เนื้อไก่สด	ญี่ปุ่น	292/444 (65.8%)	Kitai <i>et al.</i> (2005)
เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์	อิตาลี	1,245/5,369 (23.2%)	Normanno <i>et al.</i> (2005)
นมและผลิตภัณฑ์	อิตาลี	641/3,097 (20.7%)	Normanno <i>et al.</i> (2005)
พาสตรี	อิตาลี	6/173 (3.5%)	Normanno <i>et al.</i> (2005)
ผลิตภัณฑ์ไข่	อิตาลี	1/29 (3.4%)	Normanno <i>et al.</i> (2005)
พาสต้า	อิตาลี	9/119 (7.6%)	Normanno <i>et al.</i> (2005)
อาหารสำเร็จรูป	อิตาลี	22/345 (6.4%)	Normanno <i>et al.</i> (2005)
ผลิตภัณฑ์ปลา	อิตาลี	22/737 (3.0%)	Normanno <i>et al.</i> (2005)
เนื้อสัตว์	สเปน	33/137 (24.1%)	Rivas Palá and Sevilla (2004)
อาหารพร้อมบริโภค	ไต้หวัน	29/164 (17.7%)	Fang <i>et al.</i> (2003)
เนื้อหมูและแฮม	เยอรมัน	35/135 (25.9%)	Atanassova <i>et al.</i> (2001)
ไอศกรีม	อินเดีย	30/30 (100%)	Warke <i>et al.</i> (2000)
อาหารมังสวิรัต	จีน	58/320 (18.1%)	Fang <i>et al.</i> (1999)
ผลิตภัณฑ์นม	อิตาลี	22/135 (16.3%)	Luca <i>et al.</i> (1997)
อาหารทะเลผ่านความร้อน	ไทย	39/1,112 (3.51%)	เนาวรัตน์ (2540)
แซ่แซ่			

นอกจากการปนเปื้อนในอาหารแล้ว *S. aureus* สามารถตรวจพบได้บนพื้นผิวทั่วไปรวมถึงพื้นผิวของอุปกรณ์และเครื่องมือที่สัมผัสอาหารด้วย ในปี 2004 Rivas Palá and Sevilla ตรวจพบ *S. aureus* บนอุปกรณ์สำหรับการฆ่าและเนื้อหมูคิดเป็นร้อยละ 15.50 จากจำนวนอุปกรณ์ทั้งหมด 77 ตัวอย่าง มีรายงานว่า *S. aureus* สามารถเกาะติดได้ดีบนพื้นผิวหลายชนิด เช่น แก้ว สแตนเลส สตีล เซรามิก เซลล์ดังกล่าวจะมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้มากกว่าเซลล์แขวนลอย (Park *et*

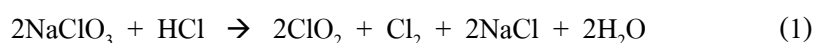
al., 2002) และเมื่อเซลล์มีโอกาสรอดบนพื้นผิวต่างๆ นั้นต่อมาเซลล์จะเจริญและพัฒนาเป็นฟิล์มชีวภาพได้เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม ซึ่งฟิล์มชีวภาพที่เกิดขึ้นจะมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการทำลายที่ยากขึ้น (Luppens, 2002)

สารฆ่าเชื้อในกลุ่มออกซิไดส์ซิง

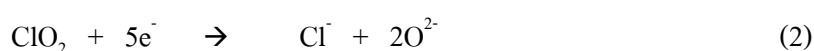
คลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine dioxide)

สมบัติทางเคมีและกลไกการทำลายจุลินทรีย์

คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) เป็นแก๊สที่ได้จากการเตรียมครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Humphrey Davy ในปี 1814 จากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) กับโพแทสเซียมคลอเรต (KClO_3) ต่อมามีการเปลี่ยนโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ทำปฏิกิริยากับโซเดียมคลอเรต (NaOCl_3) แทนดังสมการ 1 ซึ่งยังคงมีการใช้อยู่ในอุตสาหกรรมจนถึงปัจจุบัน



คลอรีนไดออกไซด์เป็นแก๊สที่มีสีเขียวแกมเหลือง (greenish-yellow) มีกลิ่นคล้ายคลอรีน แต่มีผลทำให้เกิดการระคายเคืองและเป็นพิษมากกว่า ไม่เสถียร สามารถระเหยได้ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 67.5 มีจุดเดือดที่ 11°C และจุดหลอมเหลวที่ -59°C ที่ 1 atm สามารถละลายน้ำได้ดีกว่าแก๊สคลอรีนประมาณ 10 เท่า ที่สำคัญคลอรีนไดออกไซด์เป็นสารออกซิไดส์ซิงที่สูงกว่าคลอรีน โดยคิดจากปริมาณคลอรีนอะตอมที่เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) เป็นคลอไรด์จะต้องใช้ถึง 5 อิเล็กตรอน ขณะที่คลอรีนใช้เพียง 2 อิเล็กตรอน ดังสมการ 2 และ 3 ตามลำดับ



จากปฏิกิริยาในสมการข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ClO_2 เป็นตัวออกซิไดส์ซิงที่แรงกว่า Cl_2 ถึง 2.5 เท่า และเมื่อคิดค่าความสามารถในการออกซิไดส์ (oxidizing power) ของ ClO_2 จากปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ (available chlorine) ClO_2 จะมีค่าความสามารถในการออกซิไดส์เท่ากับ 263% หรือคิดเป็น 2.63 เท่าของคลอรีน (White, 1992) เมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบคลอรีน

ชนิดอื่นๆ ClO_2 จะมีปริมาณคลอรีนที่สามารถใช้ประโยชน์ได้มากที่สุด (ตารางที่ 8) ทำให้มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์สูงกว่าสารประกอบคลอรีนชนิดอื่น

ตารางที่ 8 ปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้(available chlorine)ของสารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆ

ชนิดของสารประกอบคลอรีน	ปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ (%)
คลอรีน (Cl_2)	100.0
แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$)	99.2
โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl)	95.2
คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2)	263.0
โมโนคลอรามิน (NH_2Cl)	137.9

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sheltmire (1971)

คลอรีนไดออกไซด์มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ในรูปไม่แตกตัวและเกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนเป็นคลอไรต์ (ClO^-) สามารถทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรด-เบสกว้างและมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าความเป็นกรด-เบสมากกว่า 6 (Benarde, 1965) ClO_2 ทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ได้ในอัตราเร็วที่ต่ำกว่ากรดไฮโปคลอรัส จึงยังมีประสิทธิภาพการทำลายจุลินทรีย์ที่สูงแม้อยู่ในสถานะที่มีสารอินทรีย์ปนเปื้อนสูง ไม่ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียและกรดฮิวมิก และไม่ก่อให้เกิดสารประกอบไตรฮาโลมีเทน (Trihalomethane) ที่จัดเป็นสารก่อมะเร็งตกค้างเหมือนสารประกอบคลอรีนประเภทอื่น (White, 1992)

กลไกการทำลายจุลินทรีย์เกิดขึ้นโดยโมเลกุลของคลอรีนไดออกไซด์จะออกซิไดส์โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ สามารถออกซิไดส์กรดอะมิโน (ซิสเทอีน, ทรีปโตเฟน และไทโรซีน) และกรดไขมันอิสระได้หลายชนิด (Fukayama *et al.*, 1986) รบกวนความสามารถในการผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์และยับยั้งกระบวนการหายใจของเซลล์เนื่องจาก ClO_2 เข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Berg *et al.*, 1986) มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และมีผลในการทำลายสปอร์ของแบคทีเรียได้โดยการทำให้เยื่อหุ้มสปอร์เสียหาย (Young and Setlow, 2003)

การนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

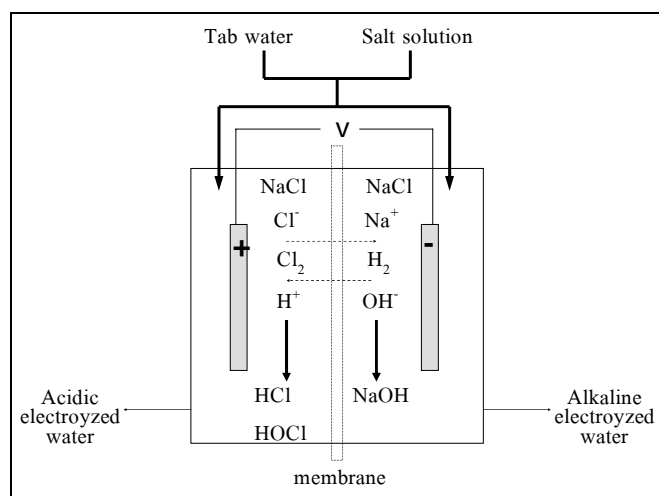
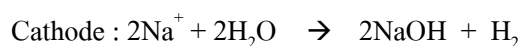
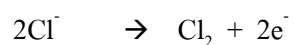
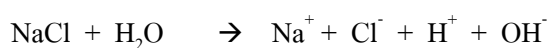
ในอุตสาหกรรมไม่นิยมใช้คลอรีนไดออกไซด์ในรูปของแก๊ส เนื่องจากสลายตัวง่ายและควบคุมได้ยาก จึงนิยมนำมาละลายในน้ำใช้ในรูปของเหลว แต่เนื่องจาก ClO_2 มีความคงตัวต่ำ สลายตัวได้ง่ายเมื่อได้รับรังสีอุตราไวโอเลต จึงควรเก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วปิดสนิทในสถานที่มืดและเย็นหรือทำการผลิต ณ จุดที่ใช้งาน ClO_2 จัดเป็นสารในกลุ่ม GRAS ที่สามารถใช้ในอาหารได้อย่างปลอดภัย ในปี 1988 มีการอนุญาตให้ใช้ ClO_2 ในน้ำสำหรับ red meat carcasses โดยกำหนดความเข้มข้นที่ 0.05-5 ppm ต่อมาในปี 1995 USFDA อนุญาตให้ใช้ ClO_2 เข้มข้น 3 ppm ในน้ำสำหรับการแช่เย็น (cooling water) ในกระบวนการชำแหละสัตว์ปีก (Kim *et al.*, 1999) และในปี 1998 Food and Drug Administration (FDA) มีการอนุญาตให้ใช้ ClO_2 เป็นสารฆ่าเชื้อโดยให้มีความเข้มข้น 5 ppm ในการล้างผักและผลไม้ได้ (Singh *et al.*, 2002) การใช้ ClO_2 ในอุตสาหกรรมอาจใช้ในรูปแบบของการสเปรย์ จุ่ม แช่ หรือร่วมกับวิธีการอื่นๆ เช่น แรงดันสูง (Andrews *et al.*, 2002) สารลดแรงตึงผิวทวิน 80 (สุดาพร, 2545) หรือร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) (Huang *et al.*, 2006) เป็นต้น มีรายงานวิจัยมากมายเกี่ยวกับการใช้ ClO_2 ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ และอาหารทะเล (ตารางที่ 9)

คลอรีนไดออกไซด์ถูกนำมาใช้ในการทำลายจุลินทรีย์บนพื้นผิวสัมผัสอาหารในโรงงานอุตสาหกรรมค่อนข้างแพร่หลาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและไม่ก่อให้เกิดสารพิษที่เป็นอันตราย ในปี 2002 Lindsay *et al.* ศึกษาการใช้สารฆ่าเชื้อที่มีส่วนผสมของ ClO_2 เข้มข้น 100 ppm ในการลดปริมาณฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโรงงานนม ได้แก่ *B. cereus* และ *P. fluorescens* พบว่า สารฆ่าเชืวดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* และ *P. fluorescens* บนแผ่นสเตนเลสสตีลได้มากกว่าร้อยละ 94 และ 99.9 ภายในเวลา 5 นาที แต่เมื่อเลี้ยงฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* และ *P. fluorescens* ร่วมกัน (binary biofilms) พบว่า ClO_2 มีประสิทธิภาพในการทำลาย binary biofilms ของเชื้อ *B. cereus* และ *P. fluorescens* ได้น้อยกว่า single biofilms ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว และเมื่อไม่นานมานี้ Ryu and Beuchat (2005) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ ClO_2 ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* บนแผ่นสเตนเลสสตีล พบว่าเมื่อใช้ ClO_2 เข้มข้น 50 ppm เป็นเวลา 5 นาที สามารถลดปริมาณ *B. cereus* ได้ 3.0 log CFU/coupon จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.0 log CFU/coupon

น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด (Acidic electrolyzed water)

สมบัติทางเคมีและกลไกการทำลายจุลินทรีย์

Electrolyzed water หรือ Electrolyzed Oxidizing water ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เตรียมได้จากการนำสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เจือจางใส่ในอ่าง (chamber) ที่มีขั้วไฟฟ้า (electrode) บวกและลบ ขั้วไฟฟ้าทั้งสองถูกกั้นให้แยกจากกันด้วยเมมเบรน จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปยังขั้วทั้งสอง (ภาพที่ 2) ทำให้เกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิส (electrolysis) ของสารละลายเกลือขึ้น ดังสมการ



ภาพที่ 2 การผลิตน้ำอิเล็กโทรไลซ์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kim *et al.* (2000b)

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการลดจุลินทรีย์ในอาหาร

ความเข้มข้น (ppm)	ชนิดจุลินทรีย์	จำนวนจุลินทรีย์ (log CFU/g)		อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ชนิดอาหาร	อ้างอิง
		เริ่มต้น	ลดลง				
10	Salmonellae	5.7	2.7	30±2	15	มะม่วงตัดแต่ง	นันทิดา (2548)
10	Salmonellae	5.6	2.3	30±2	15	เห็ดฟาง	สุธาวัลย์ (2548)
10	Salmonellae	7.2	2.3	30±2	15	กระเจียบเขียว	สุธาวัลย์ (2548)
10	<i>E. coli</i>	5.1	2.4	30±2	30	ข้าวโพดฝักอ่อน	สุดาพร (2545)
10	<i>Salmonella</i> Typhimurium	5.4	3.5	30±2	30	ข้าวโพดฝักอ่อน	สุดาพร (2545)
10	<i>E. coli</i>	5.1	0.2	30±2	30	หน่อไม้ฝรั่ง	สุดาพร (2545)
10	<i>Salmonella</i> Typhimurium	5.4	3.0	30±2	30	หน่อไม้ฝรั่ง	สุดาพร (2545)
4.1	<i>Salmonella</i> Agona	6.7	4.4	22±1	30	กะหล่ำปลี	Sy et al. (2005)
4.1	<i>S. Agona</i>	7.0	5.2	22±1	30	แครอท	Sy et al. (2005)
4.1	<i>S. Agona</i>	6.8	1.6	22±1	30	ผักกาดแก้ว	Sy et al. (2005)
4.1	<i>E. coli</i> 0157:H7	6.8	3.1	22±1	20	กะหล่ำปลี	Sy et al. (2005)
4.1	<i>E. coli</i> 0157:H7	6.8	5.6	22±1	20	แครอท	Sy et al. (2005)
4.1	<i>E. coli</i> 0157:H7	6.7	1.6	22±1	20	ผักกาดแก้ว	Sy et al. (2005)
4.1	<i>L. monocytogenes</i>	6.7	3.6	22±1	30	กะหล่ำปลี	Sy et al. (2005)
4.1	<i>L. monocytogenes</i>	6.5	5.9	22±1	30	แครอท	Sy et al. (2005)

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ความเข้มข้น (ppm)	ชนิดจุลินทรีย์	จำนวนจุลินทรีย์ (log CFU/g)		อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ชนิดอาหาร	อ้างอิง
		เริ่มต้น	ลดลง				
4.1	<i>L. monocytogenes</i>	6.4	1.5	22±1	30	ผักกาดแก้ว	Sy <i>et al.</i> (2005)
5	<i>L. monocytogenes</i>	6.0	5.6	22±1	5	แคนตาลูป	Rodgers <i>et al.</i> (2004)
3	<i>E. coli</i> O157:H7	6.0	4.9	22±1	5	สตรอเบอรี่	Rodgers <i>et al.</i> (2004)
20	Aerobic bacteria	3 - 4	< 1	15	2	เนื้อกุ้ง	Andrews <i>et al.</i> (2002)
10	<i>E. coli</i> O157:H7	8.1	1.7	22±2	10	กะหล่ำปลี	Singh <i>et al.</i> (2002)
10	<i>E. coli</i> O157:H7	7.9	1.7	22±2	20	Baby carrot	Singh <i>et al.</i> (2002)
40	Aerobic bacteria	4.4	< 1	-	5	ปลาแซลมอน	Kim <i>et al.</i> (1999)
40	<i>L. monocytogenes</i>	3.4	< 1	4	5	ปลาแซลมอน	Lin <i>et al.</i> (1996)

จากปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิสที่เกิดขึ้น ทำให้ได้น้ำอิเล็กโทรไลซ์ 2 ชนิดที่มีสมบัติต่างกัน (ตารางที่ 10) คือ น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดเบส (alkaline electrolyzed water, AIEW) และ น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด (acidic electrolyzed water, AcEW)

ตารางที่ 10 สมบัติของน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดเบสและน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด

Electrolyzed water	Electrode	pH	ORP ^a (mv)	concentration ^b (ppm)	function
AIEW	Cathode	11.4	-795	-	antioxidant
AcEW	Anode	≤ 2.7	1,150	20-40	antimicrobial

หมายเหตุ ^a Oxidation-reduction potential

^b Available chlorine concentration

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kim *et al.* (2000b)

น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดเบส (AIEW) ผลิตจากขั้วลบหรือแคโทด มีสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตได้ แต่ไม่มีสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ Koseki *et al.* (2004b) รายงานว่า AIEW มีผลในการต่อต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมันชนิดไม่อิ่มตัว และน้ำมันได้ และเนื่องจากสมบัติเป็นเบสจึงนิยมใช้ในขั้นตอนล้าง (washing) เพื่อกำจัดโปรตีนและไขมันบนผิวภาชนะหรืออาหาร

ส่วนน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด (AcEW) ผลิตจากขั้วบวกหรือแอโนดมีสมบัติในการทำลายแบคทีเรีย รา และ ไวรัส เนื่องจากมีกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) และมีค่าออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียล (Oxidation-reduction potential, ORP) สูงมาก กลไกการทำลายจุลินทรีย์ของ AcEW คล้ายคลึงกับสารประกอบคลอรีน โดยมีผลต่อส่วนห่อหุ้มของเซลล์จุลินทรีย์ ได้แก่ ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เยื่อหุ้มสปอร์ (spore coat) โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างคลอรีนและโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดสารประกอบ N-chloro ซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของการทำงานของเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ทำลายระบบการควบคุมสารเข้าออกเซลล์ ทำปฏิกิริยากับโปรตีนพลาสมาของเซลล์ เกิดการตกตะกอนโปรตีน และทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลไฟด์ของโปรตีนเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผันกลับ มีผลรบกวนการทำงานของเอนไซม์ ทำให้การทำงานของเอนไซม์หรือสูญเสียการทำงานได้ (Wei *et al.*, 1985) นอกจากนี้ปัจจัยของกรดไฮโปคลอรัสที่

เป็นองค์ประกอบในน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดกรดแล้ว ค่า ORP ที่สูงมากกว่า 1,100 mV ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสนับสนุนให้ประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น (Kim *et al.*, 2000b) Kim *et al.* (2000a) ศึกษาผลของค่า ORP ของ AcEW ที่มีต่อการทำลายจุลินทรีย์ โดยการเติมสารละลายเหล็กเจือจาง 100 ppm ลงในเพื่อลดค่า ORP จาก 1,123 เป็น 322 mv เมื่อนำไปทดสอบกับ *E. coli* O157:H7 พบว่า AcEW ที่เติมสารละลายเหล็กเจือจางลงไปไม่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ จะเห็นได้ว่า AcEW มีปัจจัยที่มีผลในการทำลายจุลินทรีย์หลายปัจจัยทั้งปริมาณกรดไฮโปคลอรัส ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่ต่ำ และที่สำคัญคือ ค่า ORP ที่สูงมากกว่า 1,100 mv ปัจจัยทั้งสามจะมีผลช่วยสนับสนุนให้เซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลายได้ (Venkitanarayanan *et al.*, 1999)

การนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

น้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดกรดมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis และ *Listeria monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ ผัก ผลไม้ อาหารทะเล เป็นต้น (ตารางที่ 11) ในประเทศญี่ปุ่นมีการนำ AcEW มาใช้ในทางการแพทย์ตั้งแต่ปี 1997 และต่อมาในปี 2002 จึงได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

นอกจากการใช้ในอาหารแล้ว น้ำอิเล็กโทรไลต์ยังถูกนำไปใช้ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดการปนเปื้อนบนพื้นผิวสัมผัสอาหารด้วย (Venkitanarayanan *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002; Ayebah *et al.*, 2005; Ayebah *et al.*, 2006) Ayebah *et al.* (2005) ได้ศึกษาการใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์ในการลดปริมาณฟิล์มชีวภาพของ *L. monocytogenes* บนแผ่นสเตนเลสสตีล พบว่า เมื่อใช้ AcEW ที่มีปริมาณคลอรีน 48 ppm (กระแสไฟฟ้า 14 แอมแปร์) เป็นเวลาเพียง 30-120 วินาที สามารถลดปริมาณฟิล์มชีวภาพได้ถึง 4.3-5.2 log CFU/coupon ขณะที่ AIEW ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายฟิล์มชีวภาพได้ และเมื่อใช้ AIEW ติดตามด้วย AcEW พบว่า สามารถลดปริมาณฟิล์มชีวภาพได้เพิ่มขึ้น 0.3-1.2 log CFU/coupon แสดงว่า AIEW มีส่วนในการส่งเสริมให้ AcEW มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการลดจุลินทรีย์ในอาหาร

คลอรีนอิสระ (ppm)	ชนิดจุลินทรีย์	จำนวนจุลินทรีย์ (log CFU)		อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	อาหาร	อ้างอิง
		เริ่มต้น	ลดลง				
120	<i>E. coli</i>	7.0/cm ²	1.7/cm ²	23±2	10	ปลานิล	Huang <i>et al.</i> (2006)
120	<i>V. parahaemolyticus</i>	5.7/cm ²	3.8/cm ²	23±2	10	ปลานิล	Huang <i>et al.</i> (2006)
76-90	<i>E. coli</i> 0157:H7	7.0/g	1.1/g	35	64	ปลาแซลมอน	Ozer and Demirci (2006)
76-90	<i>L. monocytogenes</i>	7.0/g	1.1/g	35	64	ปลาแซลมอน	Ozer and Demirci (2006)
30	<i>V. parahaemolyticus</i>	6.2 MPN/g	0.9 MPN/g	-	180	หอยนางรม	Ren and Su (2006)
30	<i>V. vulnificus</i>	6.5 MPN/g	0.7 MPN/g	-	180	หอยนางรม	Ren and Su (2006)
50	<i>L. monocytogenes</i>	5.0/g	1.5/g	25	15	ไส้กรอก	Fabrizio and Cutter (2005)
40	<i>E. coli</i> 0157:H7	7.1/g	1.4/g	20	5	กะหล่ำปลี	Koseki <i>et al.</i> (2004a)
40	<i>Salmonella</i>	7.1/g	1.3/g	20	5	กะหล่ำปลี	Koseki <i>et al.</i> (2004a)
32.1	Aerobic bacteria	7.1/ผล	1.4/ผล	-	10	แตงกวา	Koseki <i>et al.</i> (2004)
32.1	Aerobic bacteria	4.9/ผล	0.9/ผล	-	10	สตรอเบอรี่	Koseki <i>et al.</i> (2004)
20-40	Total bacteria	3-6/g	1-3/g	-	0.5	ผักสลัด	Nobuo <i>et al.</i> (2004)
16.8	Total aerobic bacteria	6.7/g	0.66/g	-	5	ผักชี	Wang <i>et al.</i> (2004)
30.3	Aerobic bacteria	5.9/g	2.0/g	-	10	กะหล่ำปลี	Koseki <i>et al.</i> (2001)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ทดสอบ
 - 1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 11778 (enterotoxin positive)
 - 1.2 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (enterotoxin positive)

จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
2. วัสดุทดสอบ
 - 2.1 สแตนเลสสตีลชนิด 304 no. 2B (O.H.K. Marketing Co.,Ltd., Thailand)
 - 2.2 พลาสติกชนิดโพลีโพรพิลีน (Material Past Co.,Ltd., Thailand)
 - 2.3 ยางชนิด food grade (Feihsin Enterprise Co.,Ltd., Thailand)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 3.1 Trypticase Soy Agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
 - 3.2 Trypticase Soy Broth (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
 - 3.3 สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
 - 3.4 Nutrient Agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
 - 3.5 Chicken broth (Campbell soup company, Campden, U.S.A)
 - 3.6 Dey/Engley (D/E) neutralizing broth (Difco, France)
4. สารเคมี
 - 4.1 สารละลายคลอรีนไดออกไซด์
 - 4.2 น้ำอเล็กโทรไลต์
 - 4.3 โซเดียมไฮโอซัลเฟต (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
 - 4.4 น้ำแป้ง (Ajex Finechem, Australia)
 - 4.5 โปแตสเซียมไอโอไดด์ (Ajex Finechem, Australia)
 - 4.6 โซเดียมคลอไรด์ (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

- 4.7 สารละลายกรดแอสซิติคเข้มข้น (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
- 4.8 แมงกานีสซัลเฟต (Carlo Erba, U.S.A.)
- 4.9 สารละลายกรดฟอสฟอริก (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)
- 4.10 น้ำดีไอออนซ์

5. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 5.1 เครื่องผลิตสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ (Prominent Fluid Controls (Thailand) Co.,Ltd., Thailand)
- 5.2 เครื่องผลิตน้ำอิเล็กโทรไลซ์ (Rox Hoshizaki electric Co.,Ltd., Japan)
- 5.3 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Mettler model 700D06063, Germany)
- 5.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Hirayama model HA-300MII, Japan)
- 5.5 เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Genie II model, U.S.A.)
- 5.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (Ohaus model GT 4100, U.S.A.)
- 5.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Labnet model SWB 505, U.S.A)
- 5.8 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Biofuge primo model D-37520 osterode, Germany)
- 5.9 ตู้ Laminar flow cabinet (Gelman Science model no. CF43S, United Kingdom)
- 5.10 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (model KD-LS 2123, Japan)
- 5.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (Jenco model 6071, Taiwan)
- 5.12 เม็ดแก้วขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 425-600 ไมโครเมตร (Sigma, St Louis, Germany)

6. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ที่จำเป็น

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

1.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

เซลล์แบคทีเรียทุกตัวอย่างเตรียมจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) เอียงในหลอดทดลอง (slant) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการถ่ายเชื้อ 1 หลอด ลงใน Trypticase soy broth (TSB) 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิเหมาะสมคือ 37 °C สำหรับ *S. aureus* และ 30 °C สำหรับ *B. cereus* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันที่สองจึงทำการถ่ายเชื้อ 1 หลอดจาก TSB หลอดแรกลงใน TSB 10 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกันกับ TSB หลอดแรก และวันที่สามจึงถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงใน TSB 100 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเหมาะสมเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้เซลล์แบคทีเรียในช่วง late log phase จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่มีอายุได้ 16 ชั่วโมงมาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมดังวิธีการในข้อ 1.3 เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการทดลองต่อไป ทำการตรวจนับปริมาณเซลล์ดังวิธีการในข้อ 1.4

1.2 การเตรียมสปอร์ของ *B. cereus* (สวรณมณฑ์, 2546)

ปิเปตสารละลายเซลล์ *B. cereus* อายุ 16 ชั่วโมงจากข้อ 1.1 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72-76 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (4 °C) 5-7 มิลลิลิตร เกลี่ยเบาๆ ด้วยแท่งแก้วปราศจากเชื้อ นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านใยแก้ว (glass wool) ที่ปราศจากเชื้อ รองรับสารละลายที่กรองได้ในหลอดทดลองฆ่าเชื้อขนาด 16 × 180 มิลลิลิตร รวบรวมสารละลายที่ได้จากการกรองมาเหวี่ยงแยกเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 × g ที่ 5 °C เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์และสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (4 °C) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เซลล์จะแตกส่วนสปอร์ที่เหลืกลงอีกครั้งด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 × g อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนของสปอร์ที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (4 °C) 10 มิลลิลิตร จะได้ spore suspension stock นำเก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ทำการตรวจนับปริมาณสปอร์ตามวิธีข้อ 1.4

1.3 การเตรียมสารละลายเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเหลว

อาหารเหลวที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1, Trypticase soy broth (TSB) และ chicken broth เตรียมสารละลายเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเหลว โดยนำเซลล์หรือสปอร์ที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 1.1 และ 1.2 มาหมุนเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว $5,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำตะกอนเซลล์หรือสปอร์ดังกล่าวมาละลายในอาหารเหลวตามความเข้มข้นของปริมาณเซลล์หรือสปอร์ดั้งเดิมที่ต้องการ โดยเจือจางเซลล์หรือสปอร์ในอาหารให้มีความเข้มข้นประมาณ $7 \log \text{CFU/ml}$ สำหรับการทดสอบปริมาณดั้งเดิมระดับสูง ($6 \log \text{CFU/ml}$) ส่วนในการทดสอบปริมาณดั้งเดิมระดับต่ำ ($3 \log \text{CFU/ml}$) เจือจางให้มีความเข้มข้นของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเหลวประมาณ $4 \log \text{CFU/ml}$ ตรวจสอบปริมาณเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเหลวตามวิธีข้อ 1.4 จากนั้นนำไปทดสอบกับสารฆ่าเชื้อต่อไป

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรียและสปอร์

ตรวจนับปริมาณเซลล์เริ่มต้นของแบคทีเรียด้วยวิธี surface plate โดยปิเปตเชื้อเริ่มต้น 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองซึ่งมีสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยง TSA ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวน้ำอาหาร นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิเหมาะสม (37°C สำหรับ *S. aureus* และ 30°C สำหรับ *B. cereus*) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนิบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวณหาปริมาณเชื้อทั้งหมดในสารละลาย 1 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

ตรวจนับจำนวนสปอร์ โดยปิเปตสารละลายของสปอร์ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งปรับอุณหภูมิไว้ที่ 80°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จับเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเจือจางสารละลายดังกล่าวด้วยสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ให้ได้ระดับเจือจางที่ต้องการ ปิเปตสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การเตรียมฟิล์มชีวภาพ

2.1 การเตรียมพื้นผิว

เตรียมพื้นผิวที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สแตนเลสสตีล ชนิด 304 no. 2B, พลาสติก ชนิดโพลิโพรพิลีน และยางชนิด food grade โดยตัดพื้นผิวแต่ละชนิดให้มีขนาด 2×5 เซนติเมตร (ความหนาของแผ่นพื้นผิวทดสอบ 1 มิลลิเมตรโดยประมาณ) และนำมาทำความสะอาดตามวิธีที่เหมาะสม แผ่นสแตนเลสสตีล ทำความสะอาดตามวิธีของ Frank *et al.* (2003) โดยการแช่แผ่นสแตนเลสสตีลในน้ำสบู่ที่มีอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์ (deionized water) และแช่ลงในกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ที่มีอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์อีกครั้ง จากนั้นนำเข้ามาเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที ส่วนพลาสติก และยาง เมื่อตัดตามขนาดที่ต้องการแล้ว ทำความสะอาดโดยการด้วยแซในสารทำความสะอาด (Linear alkyl benzene sulfonate) ที่มีอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์ ก่อนนำเข้าเชื้อด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (ดัดแปลงจาก Somers and Wong, 2004)

2.2 การเตรียมฟิล์มชีวภาพ (ดัดแปลงจาก Ryu and Beuchat, 2005)

นำสารละลายของเซลล์ที่เตรียมขึ้นตามวิธีข้อ 1.1 มาหมุนเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ $2,300 \times \text{g}$ เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรด-เบส 7.4 ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ $7 \log \text{CFU/ml}$ ปิเปตสารละลายที่เตรียมขึ้น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นพื้นผิวทดสอบ แต่ละแผ่นที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 2.1 ใส่ลงในหลอดดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเกาะติดของจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อครบเวลาจึงนำแผ่นพื้นผิวทดสอบ แกว่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อทำการล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบออกก่อน จากนั้นทำการสร้างฟิล์มชีวภาพ ต่อไปโดยนำไปแช่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เพื่อให้เซลล์เจริญจนเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงนำแผ่นพื้นผิวทดสอบที่สร้างฟิล์มชีวภาพแกว่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้ออีกครั้งเพื่อล้างจุลินทรีย์ส่วนเกิน แล้วนำไปผึ่งให้แห้งในตู้ Laminar flow cabinet (ความเร็วอากาศไหลผ่าน 220 ฟุตต่อนาที) นาน 30 นาที ทำการตรวจนับปริมาณของฟิล์มชีวภาพตามวิธีการข้อ 2.5

2.3 การสร้างสปอร์เกาะติด (attached spore) บนพื้นผิว

การสร้างฟิล์มชีวภาพของสปอร์ทำได้ยาก ในการทดลองจึงนำสปอร์มาเกาะติดบนพื้นผิวทดสอบเพื่อให้เกิดเป็นสปอร์เกาะติด โดยนำสารละลายสปอร์ความเข้มข้น $7 \log \text{CFU/ml}$ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นพื้นผิวทดสอบแต่ละแผ่นที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 2.1 ใส่ลงในหลอดดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^\circ \text{C}$) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นพื้นผิวทดสอบแฉ่งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อทำการล้างสปอร์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบออก นำไปผึ่งให้แห้งในตู้ Laminar flow cabinet และตรวจนับปริมาณตามวิธีการข้อ 2.5

2.4 การสร้างการปนเปื้อนสารอินทรีย์บนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว (ดัดแปลงจาก Frank *et al.*, 2003)

ทำการสร้างการปนเปื้อนสารอินทรีย์บนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวเพื่อสร้างสภาพเศษอาหารที่อาจหลงเหลือบนผิววัสดุ ในการทดลองนี้ใช้ chicken broth เป็นตัวแทนของสารอินทรีย์ โดยนำแผ่นพื้นผิวที่สร้างฟิล์มชีวภาพหรือสร้างการเกาะติดของสปอร์ตามวิธีการข้อ 2.2 และ 2.3 แช่ในสารละลาย chicken broth เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปผึ่งให้แห้งในตู้ Laminar flow cabinet 1 ชั่วโมงก่อนทดสอบกับสารฆ่าเชื้อต่อไป

2.5 การตรวจนับปริมาณฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว

ตรวจนับปริมาณของฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบ โดยนำแผ่นพื้นผิวทดสอบที่สร้างฟิล์มชีวภาพหรือเกาะติดสปอร์แล้วใส่ลงในหลอดหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร และเม็ดแก้วปลอดเชื้อ (sterile glass beads) ขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 425-600 ไมโครเมตร จำนวน 3 กรัม นำไปปั่นด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายจากหลอดดังกล่าว 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ได้ระดับเจือจางที่ต้องการ และปิเปตสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่อุณหภูมิเหมาะสม (ในกรณีการตรวจหาปริมาณเซลล์หรือสปอร์ของ *B. cereus* บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ส่วน *S. aureus* บ่มที่ 37°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อทั้งหมดต่อพื้นที่ของพื้นผิว 1 ตาราง

เซนติเมตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น วิธีการนี้เป็นการนับเชื้อในสารละลายฟอสเฟดบัฟเฟอร์ 30 มิลลิลิตร (ไม่ได้นับปริมาณเชื้อบนพื้นผิวได้โดยตรงได้) ในกรณีที่ตรวจไม่พบเชื้อในสารละลาย ($0.00 \log \text{CFU/ml}$) สามารถคำนวณค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (ค่า detection limit) บนพื้นผิวเท่ากับ $1.48 \log \text{CFU/coupon}$ หรือ $0.18 \log \text{CFU/cm}^2$ (จากพื้นผิวขนาด $2 \times 5 \text{ ตร.ซม.} \times 2$ ด้าน) ให้รายงานว่าน้อยกว่า $0.18 \log \text{CFU/cm}^2$ (Ryu and Beuchat, 2005; Kreske *et al.*, 2006) การคำนวณแสดงดังภาคผนวก ง

3. การเตรียมสารฆ่าเชื้อ

สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ และน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด การเตรียมสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ นิยมเตรียมจากการเจือจาง stock solution ของคลอรีนไดออกไซด์ซึ่งผลิตจากเครื่องผลิตสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ระบบเบลโลโซน (Bello Zon) รุ่น CDV 35 (ภาคผนวก ข) ด้วยน้ำประปาปลอดเชื้อให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ ส่วนน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดผลิตจากเครื่องผลิตน้ำอเล็กโทรไลซ์รุ่น ROX-20TA เตรียมขึ้นใหม่ก่อนใช้ (ภาคผนวก ข) สารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดตรวจวัดปริมาณคลอรีนโดยการไตเตรทด้วยวิธีไอโอดิเมตริก (iodometric method) กับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (ภาคผนวก ข) และวัดค่าความเป็นกรด-เบสทุกครั้งก่อนทำการทดลอง สำหรับสมบัติของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอเล็กโทรไลซ์ที่ใช้ในการทดลองนี้แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรด-เบสของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่ใช้ในการทดลอง

คลอรีนไดออกไซด์		น้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด		
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าความเป็นกรด-เบส	ความเข้มข้น (ppm)	กระแสไฟฟ้า (แอมแปร์)	ค่าความเป็นกรด-เบส
5	5.79	30	7.2	3.10
10	2.96	52	10.6	2.97
15	2.85	76	13.4	2.79
30	2.62			
50	2.37			

4. ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณ *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์ของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ และ น้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด เพื่อลดปริมาณเซลล์ของ *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์ของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดที่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้น ร้อยละ 0.1, TSB และ Chicken broth และเปรียบเทียบปริมาณเชื้อตั้งต้น 2 ระดับ คือ ระดับต่ำ (3 log CFU/ml) และ ระดับสูง (6 log CFU/ml) ในการทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ กำหนดความเข้มข้นที่ 5 10 และ 15 ppm สำหรับการทดสอบกับสารละลายเชื้อ และความเข้มข้น 15 30 และ 50 ppm สำหรับการทดสอบกับสารละลายสปอร์ ส่วนน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดทดสอบที่ความเข้มข้นของคลอรีนที่ใช้งานได้ทั้งหมด (total available chlorine) 30 ppm

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ โดยนำสารละลายฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้น ที่ต้องการปริมาตร 90 มิลลิลิตร ใส่ในพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตร ในการทดสอบกับ ปริมาณเชื้อตั้งต้นระดับต่ำ ปิเปตสารละลายเซลล์หรือสปอร์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 1.3 ให้ได้กล้าเชื้อความเข้มข้น 4 log CFU/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติกที่มีสารละลายฆ่าเชื้อดังกล่าว จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นลดลง 10 เท่าเป็น 3 log CFU/ml นำไปเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 ± 1 °C ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างสารละลายผสมดังกล่าว นำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิต ในระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0, 5, 10, 20 และ 30 นาที โดยทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน เข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสม และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียตามวิธีการในข้อ 1.4 ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อเพื่อลดปริมาณของเชื้อตั้งต้นระดับสูงคือ 6 log CFU/ml ทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยใช้กล้าเชื้อที่มีความเข้มข้น 7 log CFU/ml มาทำการทดลอง

5. ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์เกาะติดของ *B. cereus* บนพื้นผิวสัมผัสอาหารภายใต้ปัจจัยของชนิดของวัสดุพื้นผิวและการปนเปื้อนสารอินทรีย์

5.1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์เกาะติดของ *B. cereus* บนพื้นผิวสัมผัสอาหารภายใต้ปัจจัยของชนิดของวัสดุพื้นผิว (ดัดแปลงจาก Ryu and Beuchat, 2005)

สร้างฟิล์มชีวภาพตามวิธีข้อ 2.2 หรือสปอร์เกาะติดตามวิธีข้อ 2.3 บนวัสดุพื้นผิวทดสอบชนิดต่างๆ ได้แก่ สแตนเลสสตีล พลาสติก และยาง นำมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ โดยเปิดสารฆ่าเชื้อตามความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นพื้นผิวทดสอบที่สร้างฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด แช่ในสารฆ่าเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 30 นาที ทดสอบที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) โดยสุ่มหยิบพื้นผิวทดสอบแต่ละแผ่นที่แช่ในสารฆ่าเชื้อตามเวลาที่กำหนดคือ 0 5 10 20 และ 30 นาที ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีสารละลาย Dey/Engley neutralizing broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และเม็ดแก้วปลอดเชื้อขนาดเล็กจำนวน 3 กรัม นำไปปั่นด้วยเครื่องผสมสารละลายที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำสารละลายจากหลอดดังกล่าวมาตรวจนับปริมาณเชื้อตามวิธี 2.5 ในแต่ละการทดลองทำทั้งหมด 2 ซ้ำ จากการทดลองนี้สามารถเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบในข้อ 6 ต่อไป

5.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์เกาะติดของ *B. cereus* บนพื้นผิวสัมผัสอาหารภายใต้ปัจจัยของการปนเปื้อนสารอินทรีย์

ศึกษาผลของการปนเปื้อนสารอินทรีย์บนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดที่มีต่อประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์เกาะติดของ *B. cereus* โดยนำพื้นผิวทดสอบที่สร้างฟิล์มชีวภาพหรือสร้างการเกาะติดของสปอร์และปนเปื้อน chicken broth ตามวิธีการข้อ 2.4 มาทดสอบกับสารฆ่าเชื้อและสุ่มหยิบที่เวลาต่างๆ ตามวิธีการเดียวกับการทดลองในข้อ 5.1

6. ศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวสัมผัสอาหารเมื่อทำการสร้างฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C

ทำการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 5.1 ได้แก่ ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ และระยะเวลาในการล้าง เพื่อใช้ในการทำลายฟิล์มชีวภาพบนแผ่นพื้นผิวทดสอบที่มีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อที่สุด (ดูจากผลการทดลองข้อ 5.1) ทำการทดลองโดยสร้างฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวเปรียบเทียบที่ 2 อุณหภูมิ คือ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C ทดสอบกับสารฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 5.1 และใช้น้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดเบสร่วมกับน้ำอิเล็กโทรไลต์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพโดยใช้ AIEW ที่มีค่า pH 11.04 เป็นเวลา 10 นาทีติดตามด้วยการใช้ AcEW ที่ความเข้มข้นและเวลาเหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 5.1 จากผลการทดลองได้สภาวะของสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสม ดังนี้ (a) ClO_2 ความเข้มข้น 5 ppm 30 นาที (b) ClO_2 ความเข้มข้น 10 ppm 30 นาที (c) AcEW ความเข้มข้น 30 ppm 30 นาที (d) AcEW ความเข้มข้น 52 ppm 10 นาที (e) AIEW 10 นาที ติดตามด้วย AcEW ความเข้มข้น 30 ppm 30 นาที และ (f) AIEW 10 นาที ติดตามด้วย AcEW ความเข้มข้น 52 ppm 10 นาที วิธีทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อทำตามวิธีการข้อ 5.1 ทุกทรีตเมนต์ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C แต่ละการทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

7. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ Food safety ตึกอุตสาหกรรมเกษตร 2 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

8. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มตั้งแต่ เมษายน 2548 สิ้นสุด มกราคม 2550

ผลและวิจารณ์

1. ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลาย *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์ของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในกลุ่มออกซิไดส์ซึ่ง 2 ชนิด คือ สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) และ น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด (AcEW) ในการทำลายเซลล์ของ *B. cereus* และ *S. aureus* รวมถึงสปอร์ของ *B. cereus* เมื่อแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 ชนิดที่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเปปโตเนอความเข้มข้นร้อยละ 0.1, chicken broth และ Trypticase Soy broth (TSB) โดยเปรียบเทียบในกรณีเมื่อมีปริมาณการปนเปื้อนระดับสูง ($6 \log \text{CFU/ml}$) และต่ำ ($3 \log \text{CFU/ml}$) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่นำมาทดสอบทั้ง 3 ชนิดมีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในปริมาณต่างกัน แสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณสารอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ชนิดอาหาร	pH	องค์ประกอบและปริมาณสารอินทรีย์ (%)
สารละลายเปปโตเนอ 0.1%	7.44	meat-peptone(0.1%)
Chicken broth ^a	5.65	ไขมันไก่(4.74%) เกลือ(1.85%)
TSB	7.00	trypticase peptone(1.5%) phytone peptone(0.5%) sodium chloride(0.5%)

หมายเหตุ ^a ปริมาณองค์ประกอบที่ระบุตามฉลากอาหาร

1.1 ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลาย *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์ของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

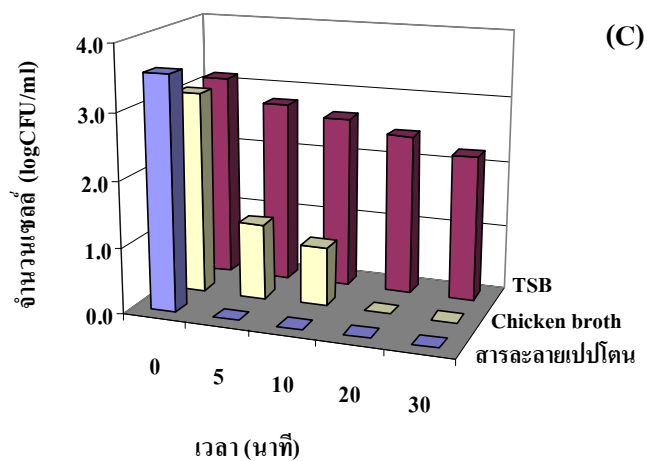
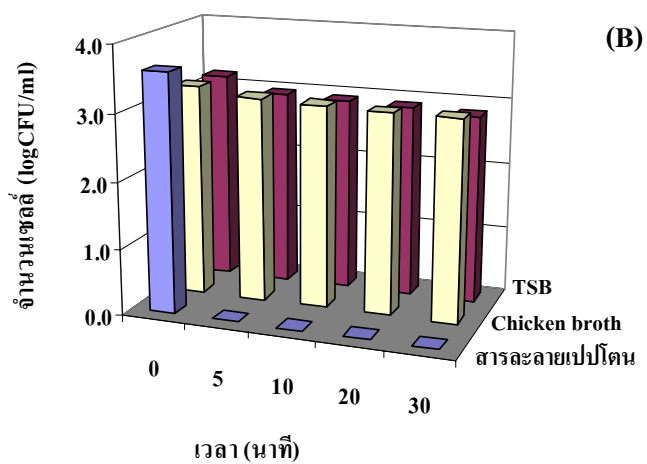
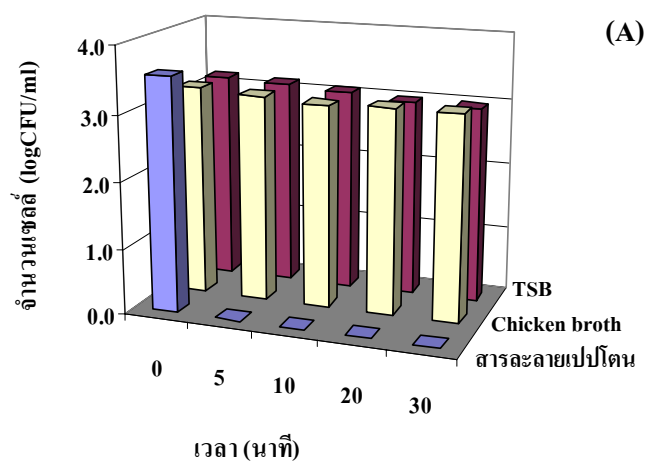
การทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลายเซลล์และสปอร์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 ชนิด กำหนดความเข้มข้นของสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ 3 ระดับคือ 5 10 และ 15 ppm สำหรับการทดสอบกับสารละลายเซลล์ *B. cereus* และ *S. aureus* ส่วนในการทดสอบกับสารละลายสปอร์กำหนดความเข้มข้น 3 ระดับเช่นกัน คือ 15 30

และ 50 ppm เมื่อนำเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเหลวสัมผัสกับคลอรีนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 20 และ 30 นาที ผลการทดลองพบว่า

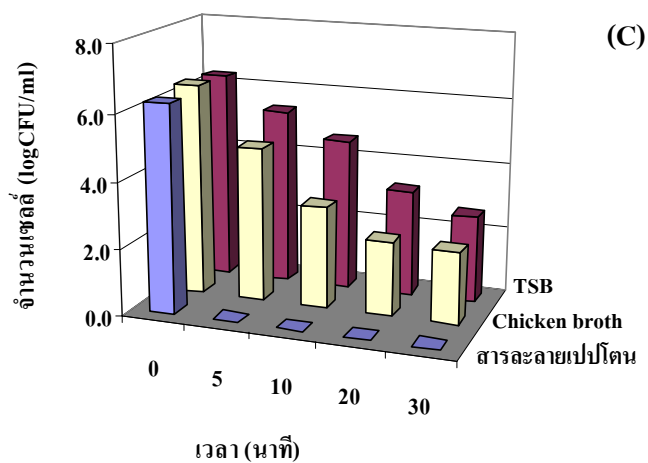
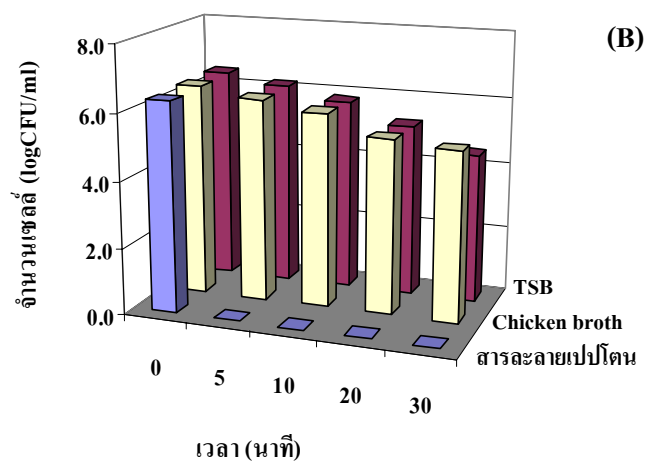
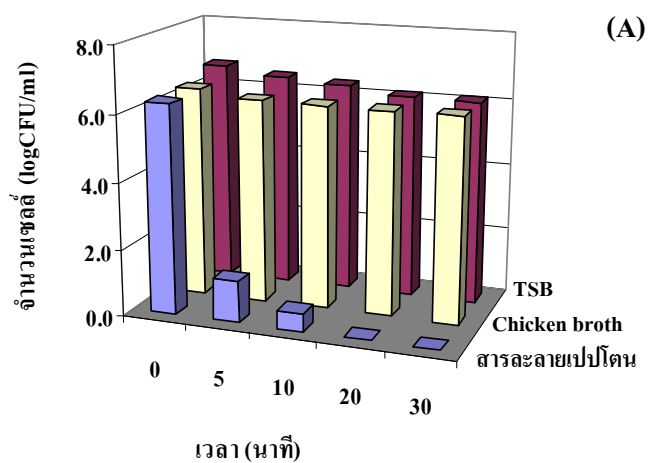
1.1.1 ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลาย *B. cereus*

จากการใช้สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 ppm ในการทำลายเซลล์ของ *B. cereus* ที่แขวนลอยในอาหารเหลวเมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ ($3.1-3.6$ log CFU/ml) พบว่า การใช้ ClO_2 เข้มข้นเพียง 5 ppm สามารถทำลายปริมาณของ *B. cereus* ในสารละลายเปปโตนได้ทั้งหมดภายในเวลา 5 นาที (ภาพที่ 3A) แต่เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของ ClO_2 ในการทำลาย *B. cereus* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB พบว่า ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์ลดลง กล่าวคือ ClO_2 ที่เข้มข้น 5 ppm ไม่สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมดได้ในเวลา 5 นาที จำนวนเซลล์ลดลงเพียง 0.05 log CFU/ml และเมื่อเพิ่มเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็น 30 นาที เซลล์จะถูกทำลายได้เพิ่มขึ้นเป็น 0.2 log CFU/ml เมื่อใช้ ClO_2 ความเข้มข้นมากขึ้นคือ 10 และ 15 ppm พบว่า ในเวลา 30 นาที จึงสามารถลดปริมาณเซลล์ของ *B. cereus* ใน TSB ได้เพิ่มขึ้นคือลดลงได้ 0.3 และ 0.9 log CFU/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 3B และ 3C) ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยใน chicken broth พบว่า การใช้ ClO_2 5 ppm ไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์เช่นกัน (ลดลงได้ 0.07 log CFU/ml ในเวลา 30 นาที) ต้องเพิ่มความเข้มข้นของ ClO_2 เป็น 10 ppm จึงสามารถลดปริมาณ *B. cereus* ใน chicken broth ได้ 0.2 log CFU/ml ในเวลา 30 นาที (ภาพที่ 3B) และหากต้องการทำลายเซลล์ทั้งหมดต้องใช้ความเข้มข้น 15 ppm เป็นเวลา 20 นาที (ภาพที่ 3C)

การทดสอบประสิทธิภาพของ ClO_2 ในการทำลายปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง ($6.3-6.7$ log CFU/ml) พบว่า เมื่อมีการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในสารละลายเปปโตนเพิ่มขึ้น การใช้ ClO_2 เข้มข้น 5 และ 10 ppm มีประสิทธิภาพในการทำลาย *B. cereus* ได้เช่นเดียวกับปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ แต่ต้องเพิ่มเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 5 ppm ให้นานขึ้นเป็น 20 นาทีจึงจะทำลายเซลล์ในสารละลายเปปโตนทั้งหมด (ภาพที่ 4A และ 4B) และ ClO_2 จะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ลดลงเมื่อเซลล์แขวนลอยใน TSB และ chicken broth อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของ ClO_2 เป็น 15 ppm นาน 30 นาที สามารถลดปริมาณ *B. cereus* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ chicken broth เพิ่มขึ้นถึง 3.7 และ 4.3 log CFU/ml (ภาพที่ 4C)



ภาพที่ 3 จำนวนเซลล์ *B. cereus* (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์ความเข้มข้น (A) 5 ppm (B) 10 ppm และ (C) 15 ppm

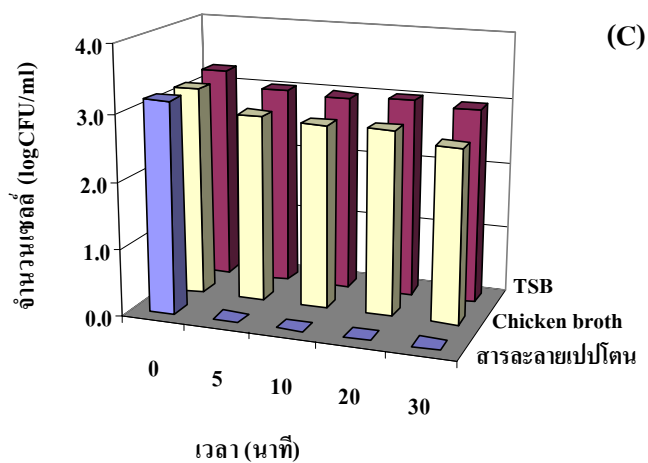
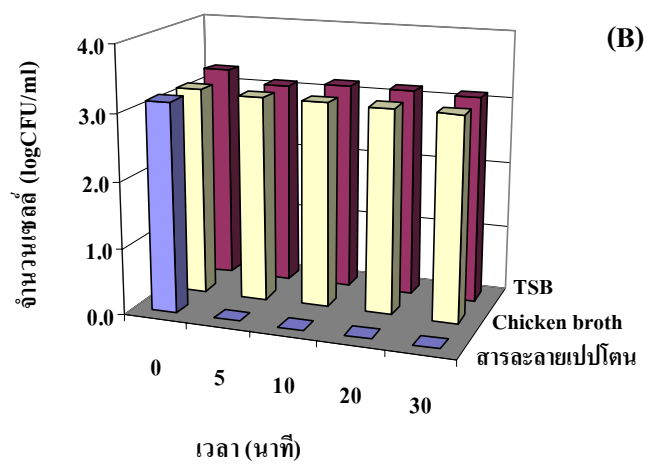
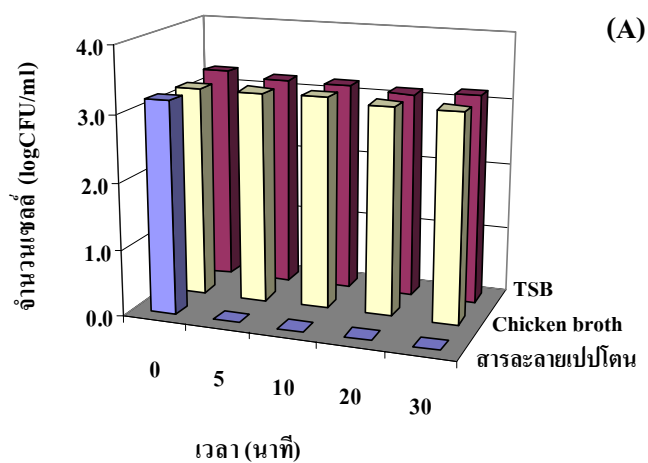


ภาพที่ 4 จำนวนเซลล์ *B. cereus* (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์ความเข้มข้น (A) 5 ppm (B) 10 ppm และ (C) 15 ppm

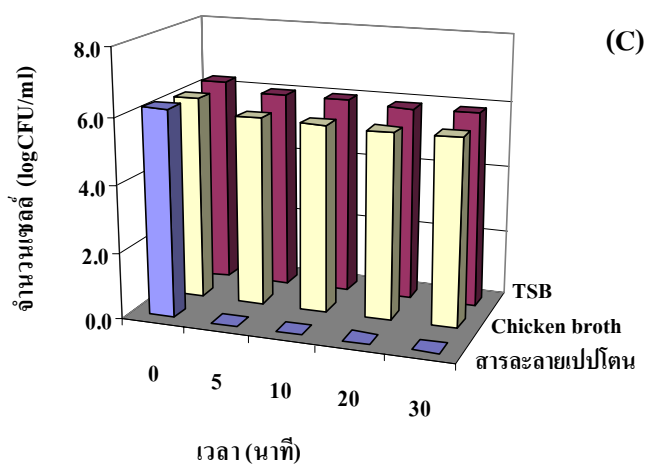
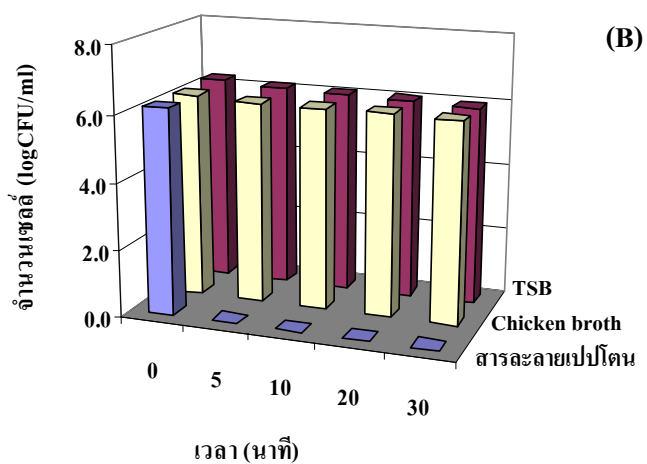
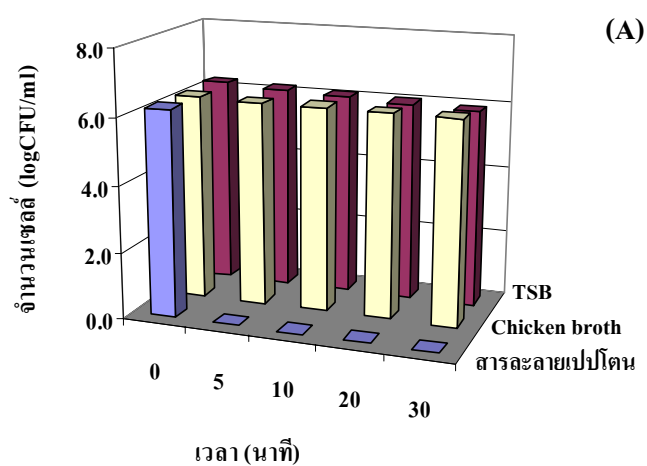
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลายเซลล์ *B. cereus* ในอาหารเหลวที่มีปริมาณเริ่มต้นของเซลล์แตกต่างกัน จะเห็นว่าในสถานะที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ในปริมาณน้อย เช่น สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 พบว่า เมื่อใช้สารฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดในการทดลองคือ 5 ppm เซลล์ *B. cereus* ที่ปริมาณตั้งต้นระดับต่ำ (3 log CFU/ml) สามารถถูกทำลายได้ทั้งหมดใน 5 นาที ในขณะที่ *B. cereus* ปริมาณตั้งต้นระดับสูง (6 log CFU/ml) ต้องใช้เวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 20 นาทีจึงจะทำลายเซลล์ได้ทั้งหมด ปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนในสารละลาย และ เวลาที่ให้สารสัมผัสเชื้อจึงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของคลอรีนไดออกไซด์นอกเหนือจากปริมาณสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในสารละลาย

1.1.2 ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลาย *S. aureus*

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลายแบคทีเรียรูปกลมแกรมบวก คือ *S. aureus* โดยทำการทดสอบในสถานะคล้ายคลึงกับข้างต้น พบว่า เมื่อ *S. aureus* ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวระดับต่ำ 3.1-3.3 log CFU/ml การใช้ ClO_2 เข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 5 นาที สามารถทำลายเซลล์ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลายเปปโตนได้ทั้งหมด เช่นเดียวกับกรณีของ *B. cereus* แต่ไม่สามารถลดเซลล์ *S. aureus* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ chicken broth ได้ทั้งหมด (ภาพที่ 5A) ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของ ClO_2 เป็น 10 และ 15 ppm และเพิ่มเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อนาน 30 นาที เซลล์ของ *S. aureus* ทั้งที่แขวนลอยใน TSB และ chicken broth ถูกทำลายไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (0.3-0.6 log CFU/ml) (ภาพที่ 5B และ 5C) ในทำนองเดียวกัน ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ ClO_2 ในการทำลาย *S. aureus* เมื่อมีปริมาณปนเปื้อนระดับสูง 6.1-6.3 log CFU/ml พบว่า เซลล์ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลายเปปโตนถูกทำลายได้ทั้งหมด เมื่อใช้ ClO_2 5 ppm เป็นเวลา 5 นาทีเช่นกัน (ภาพที่ 6A) และแม้ว่าเพิ่มความเข้มข้นของ ClO_2 มากถึง 15 ppm ก็ไม่สามารถลดเซลล์ *S. aureus* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ chicken broth ได้น้อยกว่า 0.5 log CFU/ml (ภาพที่ 6B และ 6C)



ภาพที่ 5 จำนวนเซลล์ *S. aureus* (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์ความเข้มข้น (A) 5 ppm (B) 10 ppm และ (C) 15 ppm



ภาพที่ 6 จำนวนเซลล์ *S. aureus* (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์ความเข้มข้น (A) 5 ppm (B) 10 ppm และ (C) 15 ppm

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ ClO_2 ในการทำลายเซลล์ทั้งสองชนิด คือ *B. cereus* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ClO_2 มีผลทำลายเซลล์ได้มากขึ้น ตรวจพบจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมีแนวโน้มลดลง และเมื่อระยะเวลาในการสัมผัสสาร (exposure time) เพิ่มขึ้น เซลล์ถูกทำลายเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al.* (2004) ซึ่งศึกษาผลของระยะเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อ โดยประยุกต์ใช้แก๊ส ClO_2 สัมผัสกับผักกาดหอมที่มีการปนเปื้อนของ *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* และ *S. Typhimurium* ที่ 22 °C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสามารถลดเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ 3.4 5.0 และ 4.3 log CFU/g ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาสัมผัสมากขึ้นเป็น 180 นาที ClO_2 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียต่างๆ ได้ดีขึ้น สามารถลดเชื้อได้เพิ่มขึ้นเป็น 6.9 5.4 และ 5.4 log CFU/g จะเห็นว่า เมื่อระยะเวลาในการสัมผัสสารเพิ่มขึ้น เชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลายมากขึ้น นอกจากปัจจัยของเวลาแล้ว ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์อย่างมาก Bernade *et al.* (1965) เปรียบเทียบ ClO_2 ที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 และ 2 ppm ในการทำลายเชื้อ *E. coli* จำนวน 4.2 log CFU/ml ที่อุณหภูมิ 24 °C พบว่า ที่ความเข้มข้น 2 ppm สามารถทำลายเชื้อได้ทั้งหมดภายในเวลา 30 วินาที ขณะที่ความเข้มข้นลดลงคือ 0.75 ppm ทำลายเชื้อได้เพียงร้อยละ 70 และต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นเป็น 300 วินาที เช่นเดียวกับการทดลองของ Han *et al.* (2001) ทำการเปรียบเทียบการใช้สารละลาย ClO_2 2 ระดับคือ 0.3 และ 3 ppm เพื่อลดปริมาณ *L. monocytogenes* บน green pepper ที่ 20 °C (จากจำนวนเริ่มต้น 7.3-7.4 log CFU/5 g) ในเวลา 10 นาที พบว่า เมื่อใช้เวลาในการล้างเท่ากัน ClO_2 3 ppm สามารถลดเชื้อดังกล่าวได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 0.3 ppm ถึง 1.8 log CFU/5 g จะเห็นว่า เวลาที่ใช้ในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นคือ เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ ClO_2 เวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์จะลดลง

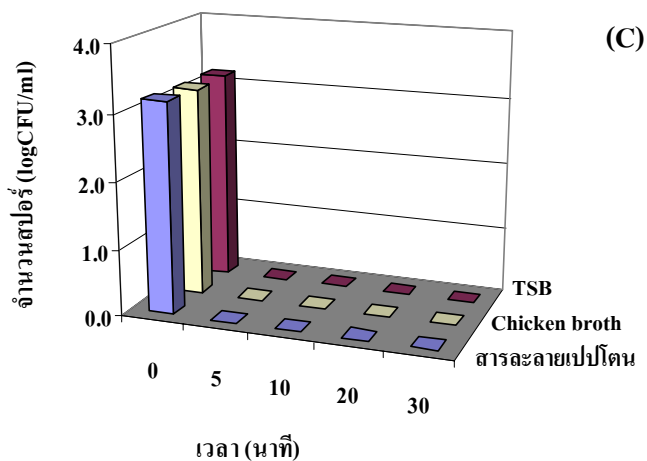
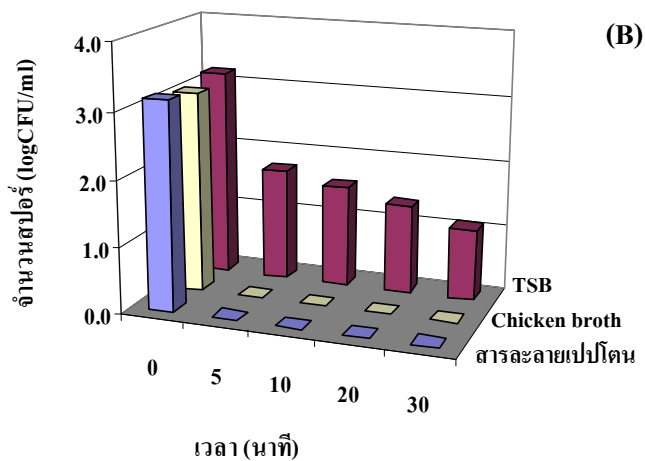
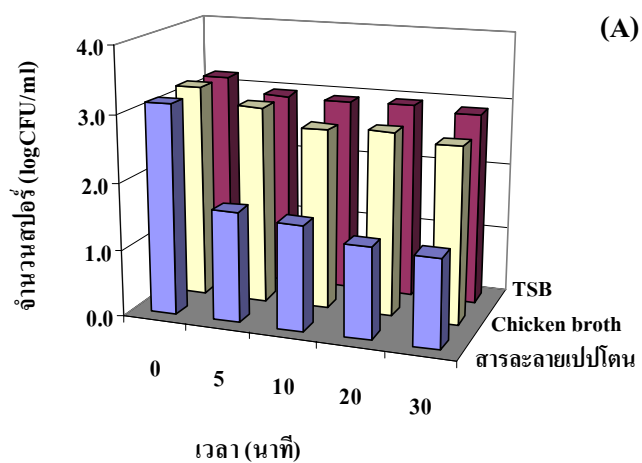
เมื่อเปรียบเทียบการทำลายเซลล์ *B. cereus* และ *S. aureus* ในอาหารเหลวเมื่อมีปริมาณเริ่มต้นของเชื้อต่างกัน พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (6 log CFU/ml) สามารถถูกทำลายด้วย ClO_2 ได้ต่ำกว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/ml) สอดคล้องกับการทดลองของสุธาวัลย์ (2548) พบว่า การใช้สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 5 ppm สามารถทำลายเชื้อ *Salmonella* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.7 log CFU/ml ได้ทั้งหมดในเวลา 20 นาที แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อเมื่อปริมาณเริ่มต้นสูง (9 log CFU/ml) ได้ จะเห็นว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเซลล์ของ ClO_2 ในสถานะที่มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียสูงจะต้องใช้ระดับความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเพิ่มมากขึ้น และใช้ระยะเวลาในการฆ่าเชือนานขึ้น (Jay, 2000) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ

นอกจากปัจจัยเรื่องความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ ระยะเวลาในการสัมผัสสารและปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ชนิดของจุลินทรีย์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้แตกต่างกัน จากการทดลองที่ผ่านมาทำการเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียสองชนิดที่มีรูปร่างแตกต่างกัน คือ *B. cereus* รูปร่างแท่ง และ *S. aureus* รูปร่างกลม พบว่า หลังจากสัมผัสสารละลาย ClO_2 เซลล์ของ *S. aureus* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถรอดชีวิตได้มากกว่า *B. cereus* อธิบายได้ว่า *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมจะมีพื้นผิวที่สามารถสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อได้น้อยกว่าเซลล์รูปร่างแท่ง และ *S. aureus* มีการจัดเรียงตัวที่เป็นกลุ่มมีผลทำให้การเข้าทำลายเซลล์ของสารฆ่าเชื้อทำได้ยากกว่า (Watve, 1997)

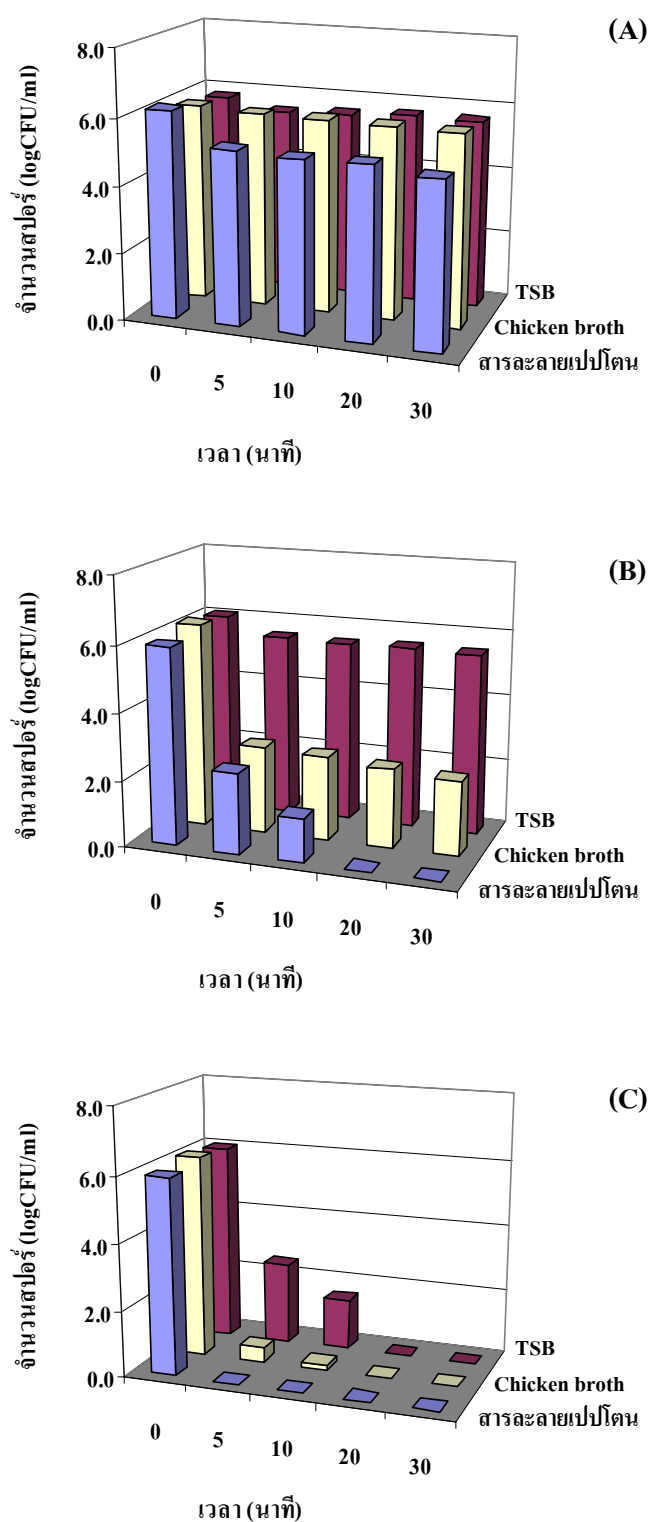
1.1.3 ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลายสปอร์ของ *B. cereus*

ในการทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ต่อสปอร์ได้เพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น กล่าวคือ 15 30 และ 50 ppm เพื่อลดปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ ($3.1-3.2 \log \text{CFU/ml}$) พบว่า การใช้ ClO_2 15 ppm ไม่สามารถทำลายสปอร์ในสารละลายเปปโตนได้ทั้งหมดถึงแม้ว่าจะเพิ่มเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็น 30 นาที (ลดลงได้ $1.8 \log \text{CFU/ml}$) (ภาพที่ 7A) แต่ต้องใช้ ClO_2 ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 30 ppm เป็นเวลา 5 นาที จึงจะทำลายสปอร์ได้หมด ส่วนในการทำลายสปอร์ที่แขวนลอยในอาหาร TSB พบว่า การใช้ ClO_2 15 และ 30 ppm เป็นเวลา 30 นาที ลดลงได้ 0.3 และ $2.1 \log \text{CFU/ml}$ ตามลำดับ (ภาพที่ 7B และ 7C) และต้องใช้ ClO_2 ที่มีความเข้มข้นสูงมากถึง 50 ppm เป็นเวลา 5 นาที จึงจะทำลายสปอร์ทั้งหมดได้ ขณะที่สปอร์ที่แขวนลอยใน chicken broth กลับพบว่าถูกทำลายได้ง่ายกว่าสปอร์ที่แขวนลอยใน TSB โดยถูกทำลายได้ทั้งหมดด้วยการใช้ ClO_2 30 ppm เป็นเวลา 5 นาที

ในการศึกษาปริมาณสปอร์ตั้งต้นระดับสูง ($5.8-6.2 \log \text{CFU/ml}$) พบว่า เมื่อปริมาณสปอร์ในสารละลายเปปโตนเพิ่มขึ้น การใช้ ClO_2 15 ppm เท่ากับในการศึกษาปริมาณสปอร์ตั้งต้นระดับต่ำนั้น ไม่เพียงพอในการทำลายสปอร์ทั้งหมดที่แขวนลอยในสารละลายเปปโตนได้ พบสปอร์ยังรอดชีวิตมากถึง $4.96 \log \text{CFU/ml}$ แม้จะให้สัมผัสสารฆ่าเชื้อนานถึง 30 นาที (ลดลงได้ $1.3 \log \text{CFU/ml}$) (ภาพที่ 8A) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 30 ppm สามารถทำลายสปอร์ได้ทั้งหมดในเวลา 20 นาที (ภาพที่ 8B) และหากต้องการทำลายสปอร์ทั้งหมดในอาหาร TSB และ chicken broth เมื่อมีปริมาณสปอร์ตั้งต้นเพิ่มขึ้น ต้องใช้ ClO_2 50 ppm เป็นเวลานาน 20 นาที จึงจะทำลายสปอร์ได้ทั้งหมด (ภาพที่ 8C)



ภาพที่ 7 จำนวนสปอร์ของ *B. cereus* (ปริมาณสปอร์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย คลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น (A) 15 ppm (B) 30 ppm และ (C) 50 ppm



ภาพที่ 8 จำนวนสปอร์ของ *B. cereus* (ปริมาณสปอร์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลัง สัมผัสสารละลาย คลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น (A) 15 ppm (B) 30 ppm และ (C) 50 ppm

การเปรียบเทียบระหว่างชนิดของแบคทีเรีย เชลล์และสปอร์ของ *B. cereus* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเมื่อมีปริมาณตั้งต้นระดับต่ำ หลังสัมผัสสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์ พบว่า สามารถทำลายเชลล์ของ *B. cereus* และ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลาย เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ซึ่งเป็นอาหารที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบในปริมาณน้อยได้อย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ ClO_2 ที่ความเข้มข้นต่ำเพียง 5 ppm ในเวลา 5 นาที แต่ในกรณีของสปอร์นั้น ต้องใช้ความเข้มข้นของ ClO_2 เพิ่มขึ้นเป็น 30 ppm จึงจะทำลายได้ทั้งหมด ส่วนในการทำลายเชลล์ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ในปริมาณสูง เช่น TSB พบว่า องค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่มีอยู่มากใน TSB ลดประสิทธิภาพของ ClO_2 ในการทำลายเชลล์และสปอร์ ต้องใช้ความเข้มข้นถึง 15 ppm เป็นเวลา 30 นาทีจึงจะสามารถลดปริมาณ *B. cereus* และ *S. aureus* ที่แขวนลอยใน TSB ได้บ้างเล็กน้อย (ลดลงเพียงร้อยละ 87.41 และ 51.02 ตามลำดับ) หากต้องการทำลายสปอร์ที่อยู่ใน TSB ต้องใช้ ClO_2 ที่มีความเข้มข้นสูงมากถึง 50 ppm จึงจะทำลายสปอร์ได้ทั้งหมด กรณีของ chicken broth (ที่มีปริมาณของไขมันร้อยละ 4.74 และค่า pH 5.65) พบว่า ClO_2 เข้มข้นเพียง 5 ppm มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอที่จะทำลายเชลล์และสปอร์เช่นเดียวกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารใน TSB คือ ต้องเพิ่มความเข้มข้นของ ClO_2 เป็น 15 ppm จึงจะสามารถลดปริมาณ *B. cereus* ใน chicken broth ได้ทั้งหมดในเวลา 20 นาทีและที่ความเข้มข้นระดับเดียวกันสามารถลดปริมาณของเชลล์ *S. aureus* ได้เพียงร้อยละ 59.26 ส่วนการทำลายสปอร์ทั้งหมดต้องเพิ่มความเข้มข้นของ ClO_2 เป็น 30 ppm เป็นเวลา 5 นาที (ตารางผนวกที่ ค7)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ ClO_2 ในการทำลายเชลล์หรือสปอร์ในอาหารเมื่อมีปริมาณตั้งต้นสูงมีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ การใช้ ClO_2 5 ppm เป็นเวลา 20 นาที สามารถทำลายเชลล์ *B. cereus* และ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลายเปปโตนได้ทั้งหมด แต่หากต้องการทำลายสปอร์ทั้งหมดต้องใช้ ClO_2 30 ppm เป็นเวลา 20 นาที ขณะที่การทำลายเชลล์หรือสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB การใช้ ClO_2 ที่ความเข้มข้น 15 ppm นาน 30 นาทีลดปริมาณ *B. cereus* *S. aureus* และสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ได้ร้อยละ 99.98 60.19 และ 32.39 ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ ค8) และหากต้องการทำลายสปอร์ที่แขวนลอยใน TSB ทั้งหมดต้องใช้ ClO_2 50 ppm ที่เวลานานขึ้นคือ 20 นาที ในกรณี chicken broth พบว่า การใช้ ClO_2 15 ppm นาน 30 นาที สามารถลดปริมาณเชลล์ *B. cereus* และ *S. aureus* ใน chicken broth ได้ร้อยละ 99.99 และ 68.38 ตามลำดับ และต้องใช้ ClO_2 50 ppm เป็นเวลา 20 นาที จึงจะทำลายสปอร์ได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบร้อยละการลดลง พบว่า เชลล์หรือสปอร์ที่แขวนลอยใน chicken broth ถูกทำลายได้ง่ายกว่าเมื่อแขวนลอยใน TSB เช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบการทำลายเซลล์ปกติ (vegetative cell) กับสปอร์ในสารละลาย เปปโตเน จะเห็นว่า ที่ปริมาณเซลล์หรือสปอร์เริ่มต้นระดับเดียวกัน การทำลายสปอร์ต้องใช้ความเข้มข้นของ ClO_2 สูงกว่าการทำลายเซลล์ทั้งสองชนิดไม่ว่าจะเป็น *B. cereus* หรือ *S. aureus* เนื่องจากสปอร์มีโครงสร้างของเยื่อหุ้มสปอร์ (spore coat) ที่ทำหน้าที่ตัวขวางกันสารเคมีต่างๆ รวมทั้งสารฆ่าเชื้อในกลุ่มออกซิไดส์ซิง เช่น คลอรีนไดออกไซด์ได้ (Setlow and Johnson, 2001) ในปี 2003 Young and Setlow ศึกษากลไกของไฮโดรเจนไฮโปคลอไรต์ (50 ppm) และ ClO_2 (10-14 ppm) ในการทำลายสปอร์ของ *B. subtilis* พบว่า เยื่อหุ้มสปอร์เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้สปอร์ด้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้ และสปอร์ที่ถูกทำลายด้วยสารทั้งสองไม่ได้เป็นผลจากการเสียหายของ DNA นอกจากนี้ยังพบว่า หลังจากสปอร์สัมผัส ClO_2 สปอร์บางส่วนยังสามารถงอกและเจริญเป็นเซลล์ได้

จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า เซลล์หรือสปอร์ที่แขวนลอยในสารละลาย เปปโตเน นั้นสามารถถูกทำลายด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ได้ง่ายที่สุด เนื่องจากสารละลาย เปปโตเน มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในปริมาณน้อยมาก ปริมาณของสารอินทรีย์ดังกล่าวจึงไม่มีผลในการลดประสิทธิภาพของ ClO_2 ทำให้สามารถเข้าทำลายจุลินทรีย์ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ แต่เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในสถานะที่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์ปริมาณสูง เช่น ในอาหาร TSB และ chicken broth พบว่า ClO_2 จะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ หรือสปอร์ลดลง เนื่องจากมีรายงานกล่าวว่า ClO_2 สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอินทรีย์ได้แก่ กรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน และกรดไขมันในอาหารได้ (Fukayama *et al.*, 1986) ทำให้สูญเสีย ClO_2 บางส่วนไปในการทำปฏิกิริยากับสารดังกล่าว ประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์จึงลดลง อย่างไรก็ตาม จากการทดลองจะเห็นว่า เมื่อมีการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์ต่างชนิดกัน (TSB และ chicken broth) ประสิทธิภาพของ ClO_2 ก็ให้ผลในการทำลายจุลินทรีย์ต่างกันด้วย ในสถานะที่มีการปนเปื้อน chicken broth จุลินทรีย์สามารถถูกทำลายได้ง่ายกว่า เนื่องจาก chicken broth มีค่า pH เป็นกรดอ่อนเล็กน้อย (pH 5.65) จึงมีผลทำให้เซลล์หรือสปอร์ที่แขวนลอยอยู่ใน chicken broth ถูกทำลายได้มากกว่าในอาหาร TSB สอดคล้องกับการทดลองของ Wei *et al.* (1995) ทำการเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และน้ำมะเขือเทศ (pH 4.2) ที่มีต่อประสิทธิภาพของสารละลายคลอรีนเข้มข้น 100 ppm ในการลดปริมาณ *S. Montevide* พบว่า เซลล์ *S. Montevide* ที่แขวนลอยในน้ำมะเขือเทศสามารถถูกทำลายได้มากกว่าร้อยละ 99.99 แต่เซลล์ใน TSB ลดลงได้เพียงร้อยละ 99.78 เท่านั้น แสดงว่า ความเป็นกรดของอาหารช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพของคลอรีนในการทำลายจุลินทรีย์ได้

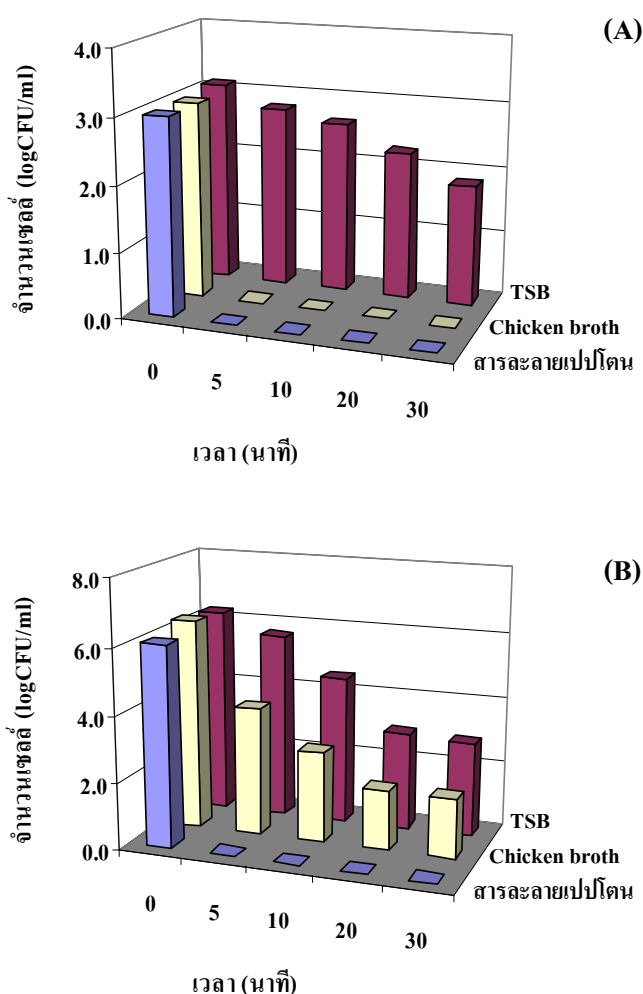
1.2 ประสิทธิภาพของน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลาย *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์ของ *B. cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่มีปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมดระดับเดียวคือ 30 ppm และค่าความเป็นกรด-เบส 3.1 ในการทำลายเซลล์และสปอร์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 3 ชนิด เมื่อนำเซลล์หรือสปอร์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวสัมผัสกับน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่อุณหภูมิ $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที โดยสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 20 และ 30 นาที พบว่า

1.2.1 ประสิทธิภาพของน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลาย *B. cereus*

เมื่อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหารมีปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ ($3.1 \log \text{CFU/ml}$) การใช้น้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่มีปริมาณคลอรีน 30 ppm สามารถทำลายเซลล์ของ *B. cereus* ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเปปโตเนและ chicken broth ได้ทั้งหมดภายในเวลาเพียง 5 นาที ในทำนองคล้ายคลึงกันกับกรณี ClO_2 คือ ไม่สามารถทำลายเซลล์ใน TSB ได้หมดแม้จะเพิ่มเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็น 30 นาที (ลดลงได้ $1.24 \log \text{CFU/ml}$) (ภาพที่ 9A) และเมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นในอาหารเพิ่มขึ้น ($6.3\text{-}6.4 \log \text{CFU/ml}$) เซลล์ *B. cereus* ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเปปโตเนถูกทำลายได้ทั้งหมดภายในเวลา 5 นาที ขณะที่ *B. cereus* ใน chicken broth ไม่สามารถถูกทำลายได้ทั้งหมดในเวลา 30 นาที แต่ปริมาณเซลล์ลดลงได้มากถึง $4.6 \log \text{CFU/ml}$ (จากเริ่มต้น 6.4 ลดลงเหลือ $1.8 \log \text{CFU/ml}$) ยังพบอีกว่าในการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เซลล์ *B. cereus* ยังคงรอดชีวิตได้มากถึง $5.5 \log \text{CFU/ml}$ (ลดลงได้ $0.7 \log \text{CFU/ml}$) ในเวลา 30 นาที (ภาพที่ 9B) เช่นเดียวกับการทดสอบในกรณีเซลล์ตั้งต้นต่ำ อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาในการสัมผัสสารเพิ่มขึ้น

จากผลการทดลอง จะเห็นว่า จำนวนเซลล์ตั้งต้นของ *B. cereus* ในอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพของน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดเห็นได้อย่างชัดเจนในกรณีเมื่อเซลล์แขวนลอยใน chicken broth พบว่าเมื่อเซลล์ตั้งต้นมีปริมาณต่ำ ($3 \log \text{CFU/ml}$) น้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดสามารถทำลายเซลล์ได้ทั้งหมดได้ภายในเวลา 5 นาที แต่เมื่อเซลล์ตั้งต้นมีปริมาณสูงขึ้น ($6 \log \text{CFU/ml}$) เวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อนาน 5 นาที ไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ทั้งหมดได้ ต้องยืดเวลาให้นานกว่า 30 นาที จึงจะมีโอกาสในการทำลายเซลล์ได้ทั้งหมด

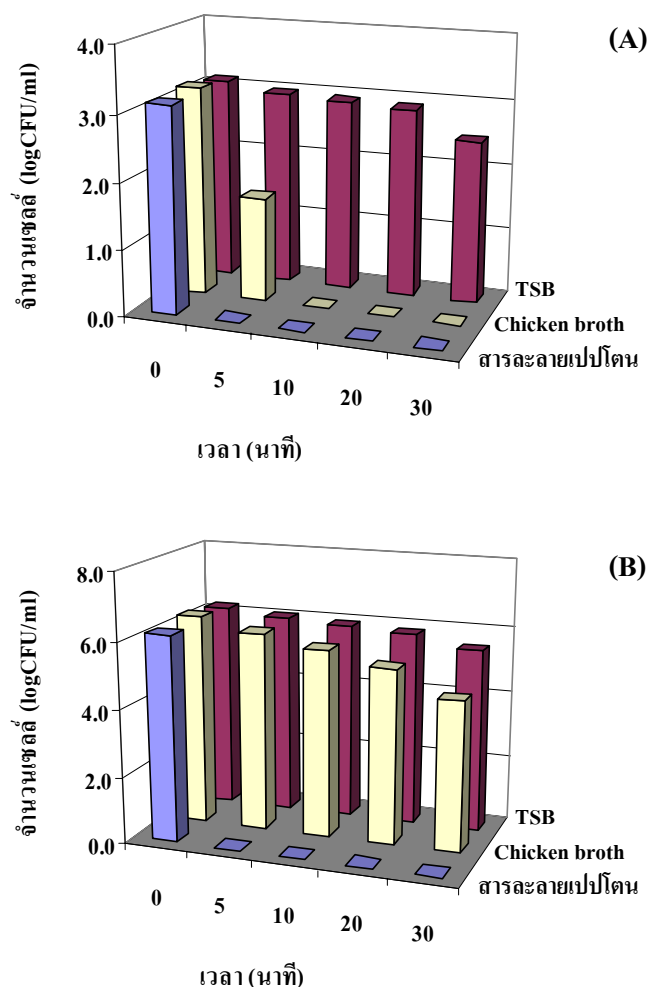


ภาพที่ 9 จำนวน *B. cereus* ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้น (A) ระดับต่ำและ (B) ระดับสูง

1.2.2 ประสิทธิภาพของน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลาย *S. aureus*

เมื่อทดสอบในเซลล์แบคทีเรียต่างชนิดกัน คือ *S. aureus* ที่ปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ (3.1-3.2 log CFU/ml) พบว่า น้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด สามารถทำลายเซลล์ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลายเปปโตนและ chicken broth ได้ทั้งหมดภายในเวลา 5 และ 10 นาทีตามลำดับ แต่สามารถลดจำนวน *S. aureus* ใน TSB ได้เพียง 0.63 log CFU/ml (ภาพที่ 10A) ส่วนการทดสอบเมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง (6.2-6.3 log CFU/ml) พบว่า AcEW ยังคงมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลายเปปโตนได้ทั้งหมดในเวลา 5 นาที แต่ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการทำลายเซลล์ *S. aureus* ที่แขวนลอยใน chicken broth

และ TSB ได้พบว่า หลังจากการสัมผัส AcEW นาน 30 นาที *S. aureus* ยังรอดชีวิตใน chicken broth และ TSB ได้มากถึง 4.5 log CFU/ml (ลดลงได้ 1.9 log CFU/ml) และ 5.5 log CFU/ml (ลดลงได้ 0.7 log CFU/ml) ตามลำดับ (ภาพที่ 10B)



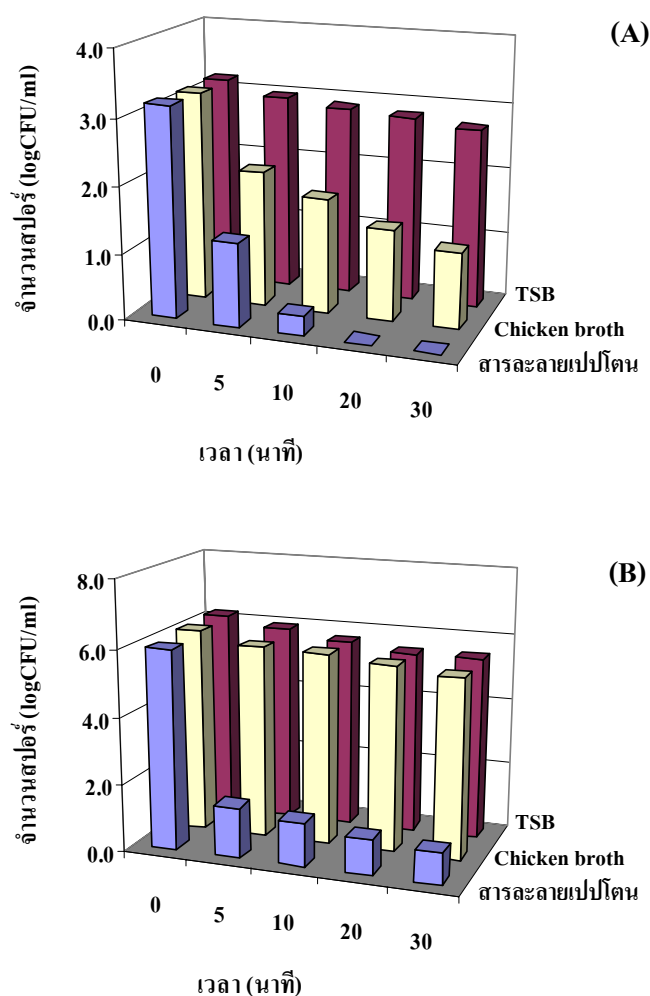
ภาพที่ 10 จำนวน *S. aureus* ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้น (A) ระดับต่ำและ (B) ระดับสูง

1.2.3 ประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายสปอร์ของ *B. cereus*

ในกรณีปริมาณสปอร์ตั้งต้นระดับต่ำ (3.1-3.2 log CFU/ml) น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่มีปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ 30 ppm สามารถทำลายสปอร์ในสารละลายเปปโตนได้หมดในเวลา 20 นาที และในเวลาเท่ากันสามารถลดปริมาณสปอร์ที่แขวนลอยใน chicken broth และ TSB ได้เพียง 2.0 และ 0.5 log CFU/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 11A) และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพ

ของ AcEW ในการทำลายสปอร์ของ *B. cereus* เมื่อมีสปอร์ตั้งต้นระดับสูง (6.0-6.2 log CFU/ml) พบว่าสปอร์ยังคงรอดชีวิตอยู่ได้ในอาหารทั้ง 3 ชนิดหลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อนาน 30 นาที แต่เหลือรอดในจำนวนต่างกัน คือ สปอร์ในสารละลายเปปโตเนเหลือรอดน้อยที่สุดเพียง 0.93 log CFU/ml ขณะที่ใน chicken broth และ TSB เหลือสปอร์รอดชีวิตมากถึง 5.37 log CFU/ml (ลดลงได้ 0.8 log CFU/ml) และ 5.48 log CFU/ml (ลดลงได้ 0.7 log CFU/ml) ตามลำดับ (ภาพที่ 11B)

เมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละการลดลงของเซลล์หรือสปอร์หลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่มีปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมด 30 ppm (ภาคผนวกที่ ก12) พบว่า AcEW สามารถทำลายเซลล์ของ *B. cereus* และ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลายเปปโตเนทั้งในกรณีเมื่อมีปริมาณตั้งต้นระดับสูง (6.3 log CFU/ml) และต่ำ (3.1 log CFU/ml) ได้ทั้งหมดภายในเวลา 5 นาที แม้ว่าที่ความเข้มข้นนี้สามารถทำลายสปอร์ในสารละลายเปปโตเนที่มีปริมาณตั้งต้นต่ำได้ทั้งหมดในเวลา 20 นาที แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ในสารละลายเปปโตเนที่มีปริมาณตั้งต้นสูงทั้งหมดได้ แม้เพิ่มเวลาในการสัมผัส AcEW เป็น 30 นาที ยังคงพบสปอร์ที่รอดชีวิต 0.93 log CFU/ml (ลดลงได้มากกว่าร้อยละ 99.99) ในกรณีอาหาร TSB พบว่า AcEW ไม่สามารถทำลายปริมาณ *B. cereus* และ *S. aureus* รวมทั้งสปอร์ได้ทั้งหมดภายในเวลากำหนด 30 นาที กล่าวคือ หากเซลล์และสปอร์ปริมาณตั้งต้นระดับต่ำจะลดลงร้อยละ 94.24, 76.56 และ 66.12 ตามลำดับ ส่วนปริมาณตั้งต้นระดับสูง การลดลงของ *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์เกิดขึ้นร้อยละ 99.96, 79.58 และ 80.50 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์และสปอร์ใน chicken broth พบว่ามีประสิทธิภาพลดลงเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม เซลล์หรือสปอร์ในอาหารชนิดนี้มีแนวโน้มถูกทำลายได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จึงมีค่าร้อยละการลดลงมากกว่า



ภาพที่ 11 จำนวนสปอร์ของ *B. cereus* ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำไอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้น (A) ระดับต่ำ และ (B) ระดับสูง

เมื่อเปรียบเทียบความต้านทานสารฆ่าเชื้อระหว่างสปอร์กับเซลล์ของ *B. cereus* ต่อ AcEW พบว่า หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อสปอร์สามารถอยู่รอดได้มากกว่าเซลล์ สอดคล้องกับการทดลองของ Kim *et al.* (2000a) ทดลองใช้ AcEW ที่มีคลอรีน 60 ppm ในการทำลายสปอร์และเซลล์ของ *B. cereus* พบว่าในเวลา 30 วินาทีสปอร์ลดลงเพียงร้อยละ 97.37 ขณะที่ทำลายเซลล์ได้ทั้งหมด (จากปริมาณสปอร์และเซลล์เริ่มต้น 8.0 และ 8.5 log CFU/ml ตามลำดับ) เนื่องจากดังที่กล่าวมาแล้วว่า สปอร์มีส่วนของสปอร์ไคท์ที่ทำหน้าที่ป้องกันการทำลายจากสารเคมีต่างๆ การซึมผ่านของโมเลกุลสารต่างๆ เข้าสู่ส่วนแกนกลาง (core) ของสปอร์นั้นเกิดขึ้นในอัตราช้ามาก จึงทำให้สปอร์มีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าเซลล์

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการลดปริมาณ *B. cereus* และ *S. aureus* ในอาหารเหลวชนิดต่างๆ พบว่า AcEW จะให้ผลในการทำลายเซลล์ได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลายเปปโตน รองลงมาคือ chicken broth และ TSB ตามลำดับ อธิบายได้ในทำนองเดียวกันกับ ClO_2 สารละลายเปปโตนมีปริมาณสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบน้อยที่สุด สารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ chicken broth จะมีผลในการลดประสิทธิภาพของ AcEW ได้ Oomori *et al.* (2000) ทดสอบประสิทธิภาพของ AcEW ในสถานะที่มีสารอินทรีย์สูง พบว่า สารอินทรีย์หลายชนิดได้แก่ เปปโตน ไกลซีน น้ำมันข้าวโพด อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth รวมถึงนม และ เนื้อสัตว์ มีผลในการลดปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ใน AcEW ทำให้ประสิทธิภาพลดลงได้ นอกจากนี้สารอินทรีย์ยังมีผลต่อค่า ORP ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการทำลายจุลินทรีย์ด้วย Stevenson *et al.* (2004) ศึกษาผลของสารอินทรีย์ที่มีต่อค่า ORP ของ AcEW โดยการเติมมูลสัตว์ลงไปให้น้ำสำหรับเลี้ยงสัตว์ แล้วทำการฆ่าเชื้อด้วย AcEW พบว่ามูลสัตว์มีผลทำให้ค่า ORP ของ AcEW ลดลงจนไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้

สรุปผลการทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดเปรียบเทียบระหว่างอาหาร 2 ชนิดคือใน TSB และ chicken broth แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของสารอินทรีย์ในอาหารมีผลอย่างยิ่งในการลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิด โดยสารฆ่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์หรือสปอร์ในสารละลายเปปโตนได้ดีกว่าใน TSB และ chicken broth มีรายงานว่า การใช้สารประกอบคลอรีน เช่น คลอรีนไดออกไซด์และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ที่มีการแตกตัวเป็นกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) เช่นเดียวกับน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดซึ่งมี HOCl เป็นองค์ประกอบสำคัญ จะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลดลงเมื่ออยู่ในสถานะที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์สูง เนื่องจากคลอรีนบางส่วนจะทำปฏิกิริยากับคลอรีนซันและออกซิเดชันกับหมู่อะมิโนของสารอินทรีย์ (Wei *et al.*, 1995)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายเซลล์และสปอร์เมื่อแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว จึงสามารถหาการเลือกความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไปได้ดังนี้ คือเลือกใช้สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 ppm สำหรับการทำลายฟิล์มชีวภาพ และ 15 ppm สำหรับการทำลายสปอร์เกาะติด ส่วนน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดนั้นในการทดลองที่ผ่านมาได้ทดลองที่ความเข้มข้นเดียว คือ 30 ppm พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการทำลายเซลล์และสปอร์จึง

เลือกความเข้มข้นนี้สำหรับการทำลายฟิล์มชีวภาพและสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวสัมผัสอาหารในการทดลองต่อไป (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์และสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ชนิด จุลินทรีย์	ปริมาณ เริ่มต้น	ความเข้มข้น และ เวลา (ร้อยละการลดลง)		
		สารละลายเปปโตเน	TSB	Chicken broth
คลอริเนไดออกไซด์				
<i>B. cereus</i>	ระดับต่ำ	5 ppm, 5 นาที (100%)	15 ppm, 30 นาที (87.41%)	15 ppm, 20 นาที (100%)
	ระดับสูง	5 ppm, 20 นาที (100%)	15 ppm, 30 นาที (99.98%)	15 ppm, 30 นาที (99.99%)
<i>S. aureus</i>	ระดับต่ำ	5 ppm, 5 นาที (100%)	15 ppm, 30 นาที (51.02%)	15 ppm, 30 นาที (72.46%)
	ระดับสูง	5 ppm, 5 นาที (100%)	15 ppm, 30 นาที (60.19%)	15 ppm, 20 นาที (68.38%)
สปอร์	ระดับต่ำ	30 ppm, 5 นาที (100%)	50 ppm, 5 นาที (100%)	30 ppm, 5 นาที (100%)
	ระดับสูง	30 ppm, 20 นาที (100%)	50 ppm, 20 นาที (100%)	50 ppm, 5 นาที (100%)
น้ำอเล็กโทโรไลซ์ชนิดกรด				
<i>B. cereus</i>	ระดับต่ำ	30 ppm, 5 นาที (100%)	30 ppm, 30 นาที (94.24%)	30 ppm, 5 นาที (100%)
	ระดับสูง	30 ppm, 5 นาที (100%)	30 ppm, 30 นาที (99.96%)	30 ppm, 20 นาที (100%)
<i>S. aureus</i>	ระดับต่ำ	30 ppm, 5 นาที (100%)	30 ppm, 30 นาที (76.56%)	30 ppm, 20 นาที (100%)
	ระดับสูง	30 ppm, 5 นาที (100%)	30 ppm, 30 นาที (79.58%)	30 ppm, 30 นาที (98.59%)
สปอร์	ระดับต่ำ	30 ppm, 20 นาที (100%)	30 ppm, 30 นาที (66.12%)	30 ppm, 30 นาที (99.02%)
	ระดับสูง	30 ppm, 30 นาที(89.53%)	30 ppm, 30 นาที (80.50%)	30 ppm, 30 นาที (83.02%)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ

จากการสร้างฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* และ *S. aureus* บนพื้นผิวทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ สเตนเลสสตีล ยาง และพลาสติก โดยนำแผ่นพื้นผิวที่ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อแล้วแช่ในสารละลายเซลล์ของ *B. cereus* หรือ *S. aureus* เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถเกาะติดบนพื้นผิวและเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 15) กล่าวคือ เซลล์ของ *B. cereus* ในฟิล์มชีวภาพบนแผ่นสเตนเลสสตีล ยาง และพลาสติกมีปริมาณ 1.4, 3.2 และ 2.8 log CFU/cm² ตามลำดับ ส่วน *S. aureus* มีการเกาะติดและเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพได้มากกว่าคือ 5.0, 6.2 และ 5.4 log CFU/cm² ตามลำดับ การที่ *S. aureus* สามารถสร้างฟิล์มชีวภาพได้มากกว่า *B. cereus* บนพื้นผิวทดสอบทุกชนิด พบว่า ปัจจัยหนึ่งที่สนับสนุนว่า *S. aureus* สามารถเกาะติดและเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพได้ดีกว่า *B. cereus* คือ เซลล์ *S. aureus* มีความเป็นไฮโดรโฟบิกซ์ติ่มากกว่า *B. cereus* ทำให้ยึดเกาะบนพื้นผิวได้ดี (Dickson and Koochmaraie, 1989) Cramton and Götz (2004) รายงานว่า ปัจจัยที่สนับสนุนให้ *S. aureus* สามารถเกาะติดพื้นผิวได้ว่าประกอบด้วยหลายปัจจัย เช่น ชนิดโปรตีนบนผิวเซลล์ที่แตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ SSP-1 และ SSP-2 สารประกอบ เช่น แอดฮีซิน (adhesin) และ กรดไทโคอิก (teichoic acids) เป็นต้น และกลุ่มของยีนที่ชื่อว่า *bap* ซึ่งสร้างโปรตีน Bap (Biofilm associated protein) บนผนังเซลล์พบว่าเกี่ยวข้องกับการสร้างฟิล์มชีวภาพด้วย (Cucarella *et al.*, 2001) นอกจากนี้ Jefferson (2004) ยังได้รวบรวมกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฟิล์มชีวภาพของ *S. aureus* เช่น กลุ่มยีน *icaADBC* (เกี่ยวกับการสร้างแอดฮีซินหรือ polysaccharide intracellular adhesin, PIA) ยีน *hla* (เกี่ยวกับการสร้าง hemolytic toxin) ยีน *clfA* (เกี่ยวกับการสร้าง clumping factor A) และ *dltA* (เกี่ยวกับการสร้างกรดไทโคอิก) ด้วยเหตุนี้ *S. aureus* จึงแสดงความสามารถในการเกาะติดและเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวได้ดี

ส่วนการเกาะติดของสปอร์บนพื้นผิวโดยแช่พื้นผิวในสารละลายสปอร์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า สปอร์สามารถเกาะติดบนแผ่นสเตนเลสสตีล ยาง และพลาสติกได้ 3.0, 3.7 และ 2.8 log CFU/cm² ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ *B. cereus* ระหว่างเซลล์และสปอร์บนพื้นผิวทดสอบกลับพบว่า การเกาะติดของสปอร์ของ *B. cereus* บนทุกชนิดพื้นผิวทดสอบมีปริมาณมากกว่าเซลล์ของ *B. cereus* มีรายงานว่าสปอร์มีสมบัติของความเป็นไฮโดรโฟบิกซ์ติ่มากกว่าเซลล์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้ดีกว่า (Doyle *et al.*, 1984) สอดคล้องกับการทดลองของ Peng *et al.* (2001) ซึ่งเปรียบเทียบการเกาะติดระหว่างเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* บนแผ่น

สแตนเลสสตีล พบว่า สปอร์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้มากถึง 6.4 log CFU/chip ขณะที่เซลล์สามารถเกาะติดได้ต่ำกว่าคือ 4.8 log CFU/chip

นอกจากโครงสร้างและชนิดของเซลล์ องค์ประกอบของอาหารที่ล้อมรอบ (composition of the surrounding medium) ชนิดของพื้นผิวเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเกาะติดบนพื้นผิวและเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพ (Chmielewski and Frank, 2003) ผลการทดลองในที่นี้พบว่า *B. cereus* และ *S. aureus* สามารถสร้างฟิล์มชีวภาพบนแผ่นยางได้มากที่สุด รองลงมาคือ พลาสติก และ สแตนเลสสตีล ขณะที่สปอร์ของ *B. cereus* นั้นก็สามารถเกาะติดบนแผ่นยางได้มากที่สุดเช่นกัน (ตารางที่ 15) สอดคล้องกับการทดลองของ Ronner and Wong (1993) พบว่า *L. monocytogenes* สามารถสร้างฟิล์มชีวภาพบนแผ่นยาง ($6.5 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) ได้ดีกว่าบนสแตนเลสสตีล ($5.2 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) เช่นเดียวกับ Beresford *et al.* (2001) พบว่า *L. monocytogenes* สามารถเกาะติดบนแผ่นยาง ($6.1 \log \text{CFU}/\text{coupon}$) ได้ดีกว่าแผ่นสแตนเลสสตีล ($5.9 \log \text{CFU}/\text{coupon}$) และ โพลีโพรพิลีน ($5.0 \log \text{CFU}/\text{coupon}$) เช่นกัน ก่อนหน้านี้ Mafu *et al.* (1990) ศึกษาการเกาะติดของ *L. monocytogenes* บนพื้นผิวหลายชนิด ได้แก่ สแตนเลสสตีล แก้ว โพลีโพรพิลีน และยาง จากการศึกษาด้านพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด (scanning electron microscope) พบว่าเนื่องจากแผ่นแก้วมีพื้นผิวที่เรียบกว่าพื้นผิวอื่น ส่วนยางมีลักษณะเป็นช่องลึกมีรอยแยกขนาดใหญ่กว่า ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเกาะติดพื้นผิวของยางได้มากกว่าพื้นผิวชนิดอื่น

ตารางที่ 15 จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^\circ \text{C}$

	จำนวนเซลล์หรือสปอร์บนพื้นผิว ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$)		
	สแตนเลสสตีล	ยาง	พลาสติก
ฟิล์มชีวภาพของ <i>B. cereus</i> ^a	$1.35(\pm 0.03)^d$	$3.23(\pm 0.09)$	$2.82(\pm 0.07)$
ฟิล์มชีวภาพของ <i>S. aureus</i> ^b	$5.01(\pm 0.03)$	$6.22(\pm 0.12)$	$5.43(\pm 0.14)$
สปอร์เกาะติด ^c	$2.95(\pm 0.09)$	$3.69(\pm 0.21)$	$2.81(\pm 0.06)$

หมายเหตุ ^a ฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* บนพื้นผิวอายุ 48 ชั่วโมง

^b ฟิล์มชีวภาพของ *S. aureus* บนพื้นผิวอายุ 48 ชั่วโมง

^c สปอร์เกาะติดบนพื้นผิวอายุ 4 ชั่วโมง

^d ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน $n = 3$

2.1 ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลายฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ

2.1.1 ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ภายใต้ปัจจัยของชนิดพื้นผิวทดสอบ

การทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์เกาะติดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ โดยเปรียบเทียบภายใต้ปัจจัยของชนิดพื้นผิวทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ สแตนเลสสตีล พลาสติก และ ยาง ทดสอบกับสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นเหมาะสมจากการทดลองที่ผ่านมาคือ 5 ppm สำหรับการทำลายฟิล์มชีวภาพอายุ 48 ชั่วโมงและ 15 ppm สำหรับการทำลายสปอร์เกาะติดอายุ 4 ชั่วโมง ในช่วงเวลา 0-30 นาที พบว่า การใช้ ClO_2 ความเข้มข้น 5 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ของ *B. cereus* ภายในฟิล์มชีวภาพบนแผ่นสแตนเลสสตีลและพลาสติกได้ต่ำกว่าระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (detection limit เท่ากับ $0.18 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) ภายในเวลา 5 และ 20 นาที ตามลำดับ แต่บนแผ่นยางพบว่าเซลล์ของ *B. cereus* บางส่วนยังคงรอดชีวิตหลังจากสัมผัส ClO_2 5 ppm เป็นเวลา 30 นาที อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้นนี้ก็สามารถทำลายเซลล์ได้ถึงร้อยละ 99.40 (จากจำนวนเริ่มต้น $3.3 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) (ตารางที่ 16)

ในกรณีของ *S. aureus* ในฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวทั้ง 3 ชนิด พบว่า เมื่อแช่ใน ClO_2 ความเข้มข้น 5 ppm เวลาผ่านไป 30 นาทีพบจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตแตกต่างกันในแต่ละพื้นผิว บนแผ่นยาง *S. aureus* สามารถอยู่รอดได้ถึง $5.8 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ (จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $6.4 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) หรือลดลงเพียงร้อยละ 76.01 ขณะที่ *S. aureus* บนแผ่นสแตนเลสสตีลและพลาสติกหลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อแล้วพบว่า จำนวนลดลงได้มากกว่า คือ ลดลงได้ $3.2 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ (ร้อยละ 99.93) และ $3.0 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ (ร้อยละ 99.90) ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

คลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 ppm จึงไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* (อายุ 48 ชั่วโมง) บนแผ่นยางภายในเวลาทดสอบ 30 นาทีและไม่สามารถทำลายฟิล์มชีวภาพของเซลล์ *S. aureus* (อายุ 48 ชั่วโมง) บนพื้นผิวทดสอบทุกชนิดได้ทั้งหมดเช่นกัน ต้องเพิ่มระดับความเข้มข้นของ ClO_2 เป็น 10 และ 15 ppm พบว่า ที่ ClO_2 เข้มข้น 10 ppm นาน 30 นาที สามารถทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* บนพื้นผิวทดสอบทั้งสามชนิดได้จนอยู่ในระดับต่ำกว่า detection limit ($0.18 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) ส่วน *S. aureus* ที่ ClO_2 เข้มข้น 10 ppm พบว่า เซลล์ *S. aureus* บนพื้นผิวสแตนเลสสตีลถูกทำลายจนอยู่ในระดับต่ำกว่า detection limit

ภายในเวลา 5 นาที แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์ *S. aureus* บนแผ่นพลาสติกและยางได้หมดในเวลา 30 นาที คือ ลดลงได้ 2.7 (ร้อยละ 99.81) และ 3.3 log CFU/cm² (ร้อยละ 99.95) ตามลำดับ และเมื่อทดสอบโดยใช้ ClO₂ ที่ความเข้มข้น 15 ppm และเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อนาน 30 นาที (ในการทดลองนี้ใช้เวลาในการสัมผัสสาร 30 นาที เพียงเวลาเดียว) พบว่า สามารถลดเซลล์ *S. aureus* บนแผ่นพลาสติกน้อยกว่าค่า detection limit แต่ยังสามารถตรวจพบ *S. aureus* บนแผ่นยางได้ 2.1 log CFU/cm² หรือลดลงร้อยละ 99.81 ส่วนการทำลายสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวด้วยการใช้ ClO₂ ที่เข้มข้น 15 ppm นั้น ไม่สามารถลดจำนวนสปอร์บนแผ่นยางได้ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ดี ไม่ได้ทำการทดลองที่ระดับความเข้มข้นสูงมากกว่านี้ เนื่องจากมีข้อจำกัดคือ ที่ความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ที่ระดับสูงกว่านี้มีกลิ่นฉุนมาก สร้างความระคายเคืองต่อผู้ปฏิบัติงานได้ ไม่เหมาะกับการใช้ในอุตสาหกรรม จึงไม่ได้ทำการทดลองต่อไป

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์เป็น 15 ppm ทดสอบการทำลายสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว พบว่า ClO₂ 15 ppm สามารถลดจำนวนสปอร์ที่เกาะติดบนแผ่นสเตนเลสสตีลและพลาสติกได้อยู่ในระดับต่ำกว่า 0.18 log CFU/cm² ภายในเวลา 30 และ 10 นาที ตามลำดับ ในขณะที่สปอร์บนแผ่นยางลดลงเพียงร้อยละ 83.40 (จากจำนวนเริ่มต้น 3.9 ลดลงเหลือ 3.1 log CFU/cm²) แม้จะให้สัมผัสสารฆ่าเชื้อ 15 ppm เป็นเวลา 30 นาที (ตารางที่ 16)

จากผลการทดลอง จะเห็นว่า फिल्मชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวที่แตกต่างกันมีผลทำให้เซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพนั้นมีด้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้แตกต่างกัน फिल्मชีวภาพหรือสปอร์ที่เกาะติดบนแผ่นยางจะถูกทำลายด้วยสารละลาย ClO₂ ได้ยากกว่าพื้นผิวชนิดอื่น เนื่องจากปัจจัยแรกจำนวนเซลล์หรือสปอร์บนแผ่นยางนั้นมีมากกว่าพื้นผิวชนิดอื่น และปัจจัยที่สองที่สำคัญลักษณะพื้นผิวของยางมีความขรุขระ ไม่สม่ำเสมอ คาดว่า ทำให้เซลล์หรือสปอร์บางส่วนไม่สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อ และเมื่อเปรียบเทียบความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อของเซลล์หรือสปอร์บนพื้นผิวกับเซลล์หรือสปอร์อิสระที่แขวนลอยในอาหารจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า เซลล์ภายใน फिल्मชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวนั้นมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าเซลล์ในสภาพสารละลาย จึงถูกทำลายด้วยสารฆ่าเชื้อได้ยากกว่าเซลล์หรือสปอร์อิสระ

ตารางที่ 16 จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว หลังสัมผัสสารละลาย
กลอรีนไดออกไซด์

ClO ₂ (ppm)	พื้นผิว	จำนวนเซลล์หรือสปอร์ (log CFU/cm ²) ^a และเวลา (นาที)				
		0	5	10	20	30
ฟิล์มชีวภาพของ <i>B. cereus</i>						
5	สแตนเลสสตีล	1.33(±0.03) ^b	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	2.77(±0.18)	1.93(±0.30)	0.38(±0.28)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	ยาง	3.32(±0.13)	1.93(±0.30)	1.73(±0.21)	1.79(±0.06)	1.10(±0.03)
10	สแตนเลสสตีล	1.85(±0.03)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	2.87(±0.05)	1.56(±0.06)	0.61(±0.15)	0.20(±0.03)	<0.18(±0.00)
	ยาง	3.57(±0.01)	1.68(±0.13)	0.52(±0.0.2)	0.42(±0.23)	<0.18(±0.00)
ฟิล์มชีวภาพของ <i>S. aureus</i>						
5	สแตนเลสสตีล	5.04(±0.06)	3.35(±0.21)	2.70(±0.05)	2.54(±0.20)	1.88(±0.10)
	พลาสติก	5.36(±0.25)	3.82(±0.18)	3.07(±0.06)	2.72(±0.20)	2.36(±0.11)
	ยาง	6.39(±0.40)	6.23(±0.49)	5.82(±0.08)	6.25(±0.40)	5.77(±0.15)
10	สแตนเลสสตีล	5.33(±0.04)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	5.34(±0.21)	4.57(±0.10)	3.93(±0.00)	2.92(±0.13)	2.62(±0.48)
	ยาง	5.89(±0.33)	4.43(±0.14)	4.31(±0.16)	3.52(±0.06)	2.56(±0.11)
สปอร์เกาะติด						
15	สแตนเลสสตีล	2.95(±0.12)	1.66(±0.13)	1.05(±0.24)	0.43(±0.35)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	2.87(±0.08)	1.20(±0.54)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	ยาง	3.87(±0.18)	3.72(±0.23)	3.56(±0.22)	3.36(±0.28)	3.09(±0.27)

หมายเหตุ ^a จำนวนเซลล์หรือสปอร์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสสารละลายกลอรีนไดออกไซด์
ความเข้มข้น 5 และ 10 ppm สำหรับฟิล์มชีวภาพและ 15 ppm สำหรับสปอร์เกาะติด
ที่อุณหภูมิ 25±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

2.1.2 ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ภายใต้ปัจจัยของการปนเปื้อนสารอินทรีย์บนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด

เมื่อสร้างการปนเปื้อนสารอินทรีย์บนฟิล์มชีวภาพและสปอร์เกาะติดโดยนำแผ่นพื้นผิวที่มีการสร้างฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวอายุ 48 ชั่วโมงหรือสปอร์เกาะติดอายุ 4 ชั่วโมงแช่ลงในอาหาร chicken broth เป็นเวลา 30 นาทีและผึ่งให้แห้งอีก 1 ชั่วโมงเพื่อเลียนแบบสภาพอาหารที่หลงเหลือบนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ระดับเดียวกับกรณีไม่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์ พบว่า การใช้ ClO_2 5 ppm สามารถทำลายเซลล์ *B. cereus* บนแผ่นสแตนเลสสตีลได้จนอยู่ในระดับต่ำกว่าค่า detection limit (ลดลงได้ $> 1.5 \log \text{CFU/cm}^2$) ในเวลา 5 นาที แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์บนแผ่นพลาสติกและยางได้หมดในเวลา 30 นาที ลดได้เพียง 2.5 และ $1.4 \log \text{CFU/cm}^2$ ตามลำดับ (ตารางที่ 17) ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ แม้เวลาทดสอบสูงสุดที่ใช้ 30 นาทีสามารถทำลายเซลล์ *S. aureus* ในฟิล์มชีวภาพบนแผ่นสแตนเลสสตีล พลาสติก และ ยางลดลงได้น้อยกว่าคือ 1.2 2.3 และ $0.9 \log \text{CFU/cm}^2$ ตามลำดับ แต่การใช้ ClO_2 เข้มข้น 15 ppm สามารถทำลายสปอร์เกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีลและพลาสติกจนอยู่ในระดับต่ำกว่าค่า detection limit ในเวลา 10 และ 5 นาที ตามลำดับ อย่างไรก็ตามลดจำนวนสปอร์เกาะติดบนแผ่นยางได้เพียง $0.5 \log \text{CFU/cm}^2$ หรือลดลงร้อยละ 64.52

การทำลายฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด หากไม่มีการปนเปื้อน chicken broth พบว่า การใช้คลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 5 และ 20 นาที ทำลายเซลล์ *B. cereus* บนสแตนเลสสตีล และพลาสติกได้ต่ำกว่าค่า detection limit แต่เมื่อสร้างการปนเปื้อน chicken broth บนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด แม้ว่า ClO_2 ความเข้มข้น 5 ppm มีประสิทธิภาพในการลดเซลล์ *B. cereus* บนแผ่นสแตนเลสสตีลใน 5 นาที แต่กลับพบว่าไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* บนแผ่นพลาสติกและยางได้ทั้งหมดภายในเวลา 30 นาที และไม่สามารถทำลายฟิล์มชีวภาพของ *S. aureus* บนพื้นผิวทดสอบทุกชนิดได้ทั้งหมดเช่นกัน เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ ClO_2 เป็น 10 ppm (ตารางที่ 17) จึงสามารถทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* บนแผ่นพลาสติกได้จนอยู่ในระดับต่ำกว่า detection limit ภายในเวลา 30 นาที แต่อย่างไรก็ตามยังคงเหลือเซลล์ *B. cereus* บนแผ่นยาง $0.5 \log \text{CFU/cm}^2$ (จากเซลล์เริ่มต้น $3.5 \log \text{CFU/cm}^2$) หรือลดลงร้อยละ 99.89

ในกรณี *S. aureus* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ClO_2 เป็น 10 ppm เท่ากัน พบว่าไม่สามารถทำลายเซลล์ *S. aureus* บนแผ่นสแตนเลสสตีล พลาสติก และยางให้อยู่ในระดับต่ำ

กว่า detection limit ได้ภายในเวลา 30 นาที แต่สามารถลดเซลล์ *S. aureus* บนพื้นผิวลงได้ 4.31 (> ร้อยละ 99.99) 3.2 (ร้อยละ 99.93) และ 2.9 log CFU/cm² (ร้อยละ 99.88) ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว เมื่อมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์

ClO ₂ (ppm)	พื้นผิว	จำนวนเซลล์หรือสปอร์ (log CFU/cm ²) ^a และเวลา (นาที)				
		0	5	10	20	30
ฟิล์มชีวภาพของ <i>B. cereus</i>						
5	สแตนเลสสตีล	1.67(±0.12) ^b	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	2.98(±0.57)	2.42(±0.16)	2.34(±0.36)	1.48(±0.00)	0.47(±0.40)
	ยาง	2.88(±0.04)	2.30(±0.23)	2.22(±0.06)	2.07(±0.06)	1.50(±0.16)
10	สแตนเลสสตีล	1.58(±0.07) ^b	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	3.20(±0.11)	1.87(±0.23)	1.02(±0.08)	0.32(±0.20)	<0.18(±0.00)
	ยาง	3.51(±0.12)	1.98(±0.18)	0.96(±0.04)	0.57(±0.10)	0.54(±0.06)
ฟิล์มชีวภาพของ <i>S. aureus</i>						
5	สแตนเลสสตีล	5.25(±0.08)	4.70(±0.11)	4.35(±0.04)	4.23(±0.11)	3.07(±0.25)
	พลาสติก	5.51(±0.03)	4.78(±0.17)	4.06(±0.09)	3.49(±0.01)	3.26(±0.17)
	ยาง	6.59(±0.12)	6.26(±0.25)	6.20(±0.07)	6.13(±0.18)	5.70(±0.40)
10	สแตนเลสสตีล	5.37(±0.33)	2.99(±0.07)	1.72(±0.33)	1.08(±0.20)	1.06(±0.15)
	พลาสติก	5.20(±0.12)	5.00(±0.01)	3.44(±0.01)	3.28(±0.11)	2.04(±0.08)
	ยาง	6.11(±0.16)	5.25(±0.00)	4.78(±0.01)	3.44(±0.16)	3.20(±0.18)
สปอร์เกาะติด						
15	สแตนเลสสตีล	2.54(±0.18)	0.65(±0.14)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	2.75(±0.06)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	ยาง	3.52(±0.01)	3.09(±0.08)	3.35(±0.16)	3.25(±0.19)	3.07(±0.40)

หมายเหตุ ^a จำนวนเซลล์หรือสปอร์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 5 และ 10 ppm สำหรับฟิล์มชีวภาพ และ 15 ppm สำหรับสปอร์เกาะติด ที่อุณหภูมิ 25±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

เมื่อทดสอบต่อไปพบว่าต้องใช้ ClO_2 เพิ่มความเข้มข้นเป็น 15 ppm และให้เวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อนาน 30 นาที จึงจะทำลายเซลล์ *B. cereus* ในฟิล์มชีวภาพบนแผ่นยางให้อยู่ในระดับต่ำกว่า detection limit แต่ยังสามารถตรวจพบ *S. aureus* บนแผ่นพลาสติกและยางได้ $1.1 \log \text{CFU/cm}^2$ (ลดลงได้ $4.1 \log \text{CFU/cm}^2$ หรือร้อยละ 99.99) และ $2.6 \log \text{CFU/cm}^2$ (ลดลงได้ $3.5 \log \text{CFU/cm}^2$ หรือร้อยละ 99.97) ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ ค13)

จากการเปรียบเทียบค่าร้อยละการลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบ เมื่อไม่มีและมีการปนเปื้อน chicken broth บนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด (ตารางผนวกที่ ค13) พบว่า อาหารที่สร้างการปนเปื้อนบนแผ่นฟิล์มชีวภาพจะสนับสนุนให้เซลล์ *B. cereus* และ *S. aureus* อยู่รอดบนแผ่นยางและพลาสติกได้เพิ่มขึ้น กล่าวคือ ความเข้มข้นของ ClO_2 และเวลาเท่ากันจะมีประสิทธิภาพในการทำลาย *B. cereus* บนแผ่นยางที่มีอาหารปนเปื้อนได้ ลดลงและไม่สามารถทำลาย *B. cereus* บนแผ่นพลาสติกได้หมด ส่วนการปนเปื้อน chicken broth บนฟิล์มชีวภาพของ *S. aureus* พบว่า ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อบนพื้นผิวจะลดลงทำนองเดียวกับกรณีฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* ด้วยเหตุนี้ อาหารที่หลงเหลือบนพื้นผิวสัมผัสและมีโอกาสปนเปื้อนบนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดจึงมีผลในการลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อได้ ดังเช่นการทดลองของ Frank *et al.* (2003) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อหลายชนิด ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ โซเดียมคลอไรท์ กรดเปอร์ออกซีแอซิติก และ Quaternary ammonium compound ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *L. monocytogenes* ที่มีการปนเปื้อนไขมัน (4 mg) และโปรตีน (365 mg) บนฟิล์มชีวภาพ พบว่า สารฆ่าเชื้อส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการทำลายฟิล์มชีวภาพที่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์ได้ลดลง

ในกรณีของสปอร์ *B. cereus* กลับพบว่า ClO_2 มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนสปอร์บนทุกพื้นผิวทดสอบดีขึ้น โดยสามารถทำลายสปอร์ทั้งหมดบนแผ่นสแตนเลสสตีลและพลาสติกได้เร็วขึ้นคือใช้เวลาเพียง 10 และ 5 นาที ตามลำดับ อธิบายได้ว่า ในระหว่างการปนเปื้อนสารอินทรีย์บนสปอร์เกาะติดโดยแช่ใน chicken broth เป็นเวลา 30 นาทีทำให้สปอร์เกาะติดบางส่วนหลุดออกจากพื้นผิวซึ่งส่งผลให้ปริมาณสปอร์เกาะติดเริ่มต้นลดลง จากปริมาณเริ่มต้นที่ลดลงนี้ทำให้สารฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการทำลายสปอร์บนพื้นผิวดีขึ้นและใช้เวลาในการฆ่าเชื้อลดลง

2.2 ประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์ เกาะติดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ

2.2.1 ประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดภายใต้ปัจจัยของชนิดพื้นผิว ทดสอบ

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่มีปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมด 30 ppm ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์เกาะติดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ โดยเปรียบเทียบภายใต้ปัจจัยของชนิดพื้นผิวทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ สแตนเลสสตีล พลาสติก และ ยาง ผลการทดสอบพบว่า

น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่มีปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมด 30 ppm มีประสิทธิภาพในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* ได้โดยสามารถลดปริมาณเซลล์ *B. cereus* บนแผ่นสแตนเลสสตีล (จำนวนเริ่มต้น $1.4 \log \text{CFU/cm}^2$) จนอยู่ในระดับต่ำกว่าค่า detection limit ได้ภายใน 5 นาที ส่วนฟิล์มชีวภาพบนแผ่นพลาสติก (จำนวนเริ่มต้น $2.8 \log \text{CFU/cm}^2$) และยาง (จำนวนเริ่มต้น $3.4 \log \text{CFU/cm}^2$) นั้นต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นเป็น 10 นาทีจึงจะทำลายเซลล์ให้อยู่ในระดับต่ำกว่าค่า detection limit ได้ ส่วนการทำลายเซลล์ *S. aureus* ภายในฟิล์มชีวภาพ จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นบนแผ่นสแตนเลสสตีล พลาสติก และ ยาง เท่ากับ 5.2 5.1 และ $6.2 \log \text{CFU/cm}^2$ พบว่า เซลล์บางส่วนสามารถอยู่รอดได้บนพื้นผิวทดสอบหลังจากสัมผัสกับน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดเป็นเวลา 30 นาที โดยพบว่า AcEW สามารถลดเซลล์ *S. aureus* บนแผ่นสแตนเลสสตีล พลาสติก และ ยาง ได้ใกล้เคียงกัน คือ ลดลงได้ 2.7 2.84 และ $2.64 \log \text{CFU/cm}^2$ ตามลำดับ (ลดลงร้อยละ 99.81 99.67 และ 99.77) กรณีของสปอร์พบว่า AcEW ความเข้มข้น 30 ppm สามารถทำลายสปอร์บนแผ่นสแตนเลสสตีล (จำนวนเริ่มต้น $3.03 \log \text{CFU/cm}^2$) พลาสติก (จำนวนเริ่มต้น $2.8 \log \text{CFU/cm}^2$) และ ยาง (จำนวนเริ่มต้น $3.87 \log \text{CFU/cm}^2$) จนอยู่ในระดับต่ำกว่าค่า detection limit ได้หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 10 และ 30 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพและสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด

พื้นผิว	จำนวนของเซลล์หรือสปอร์ (log CFU/cm ²) ^a และเวลา (นาทีก)				
	0	5	10	20	30
ฟิล์มชีวภาพของ <i>B. cereus</i>					
สแตนเลสสตีล	1.38(±0.04) ^b	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
พลาสติก	2.77(±0.18)	1.41(±0.06)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
ยาง	3.37(±0.06)	0.85(±0.19)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
ฟิล์มชีวภาพของ <i>S. aureus</i>					
สแตนเลสสตีล	5.20(±0.08)	4.70(±0.21)	3.80(±0.12)	3.76(±0.06)	2.47(±0.08)
พลาสติก	5.10(±0.12)	3.23(±0.15)	3.09(±0.21)	3.19(±0.07)	2.26(±0.21)
ยาง	6.19(±0.11)	4.28(±0.17)	4.21(±0.40)	4.40(±0.35)	3.55(±0.01)
สปอร์เกาะติด					
สแตนเลสสตีล	3.03(±0.01)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
พลาสติก	2.80(±0.18)	1.41(±0.32)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
ยาง	3.87(±0.18)	1.83(±0.16)	1.55(±0.14)	1.48(±0.04)	<0.18(±0.00)

หมายเหตุ ^a จำนวนเซลล์หรือสปอร์บนพื้นผิวทดสอบ หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm ที่อุณหภูมิ 25±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

2.2.2 ประสิทธิภาพของน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดภายใต้ปัจจัยของการปนเปื้อนสารอินทรีย์บนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* ที่มีการปนเปื้อน chicken broth บนฟิล์มชีวภาพ (จำนวนเซลล์เริ่มต้นบนแผ่นสแตนเลสสตีล พลาสติก และ ยาง เท่ากับ 1.6 2.8 และ 3.4 log CFU/cm² ตามลำดับ) พบว่าการใช้ AcEW เข้มข้น 30 ppm มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเซลล์ *B. cereus* บนแผ่นสแตนเลสสตีลให้อยู่ในระดับต่ำกว่า detection limit ได้ภายในเวลา 5 นาที ส่วนบนแผ่นพลาสติกและยางนั้นต้องใช้เวลานานขึ้นเป็น 30 นาทีจึงจะทำลายได้หมด ขณะที่การทำลายฟิล์มชีวภาพของ *S. aureus* บนพื้นผิว (จำนวนเซลล์เริ่มต้นบนแผ่นสแตนเลสสตีล พลาสติก และ ยาง เท่ากับ 5.6 5.5

และ 6.6 log CFU/cm² ตามลำดับ) พบว่า AcEW ที่ความเข้มข้น 30 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์บนแผ่นสแตนเลสสตีล พลาสติก และ ยางลงได้ 3.8 2.2 และ 2.8 log CFU/cm² (ลดลงร้อยละ 99.98 99.37 และ 99.85) ในกรณีสปอร์ AcEW สามารถทำลายสปอร์บนแผ่นสแตนเลสสตีล (จำนวนเริ่มต้น 2.7 log CFU/cm²) จนอยู่ในระดับต่ำกว่าค่า detection limit ได้ในเวลา 5 นาที แต่สปอร์เกาะติดบนแผ่นพลาสติก (จำนวนเริ่มต้น 2.8 log CFU/cm²) และ ยาง (จำนวนเริ่มต้น 3.5 log CFU/cm²) ลดลงได้เพียง 3.2 และ 1.3 log CFU/cm² ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 จำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพและสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว เมื่อมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด

พื้นผิว	จำนวนเซลล์หรือสปอร์ (log CFU/cm ²) ^a และเวลา (นาที)				
	0	5	10	20	30
ฟิล์มชีวภาพของ <i>B. cereus</i>					
สแตนเลสสตีล	1.64(±0.16) ^b	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
พลาสติก	2.48(±0.14)	1.12(±0.26)	0.82(±0.28)	0.28(±0.11)	<0.18(±0.00)
ยาง	3.24(±0.08)	1.40(±0.08)	0.97(±0.01)	0.52(±0.33)	<0.18(±0.00)
ฟิล์มชีวภาพของ <i>S. aureus</i>					
สแตนเลสสตีล	5.55(±0.08)	4.33(±0.11)	3.61(±0.21)	3.55(±0.04)	1.78(±0.16)
พลาสติก	5.51(±0.03)	4.60(±0.02)	3.76(±0.37)	3.44(±0.10)	3.31(±0.03)
ยาง	6.59(±0.12)	5.17(±0.45)	5.12(±0.40)	5.03(±0.34)	3.77(±0.29)
สปอร์เกาะติด					
สแตนเลสสตีล	2.69(±0.04)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
พลาสติก	2.76(±2.76)	1.20(±0.42)	0.96(±0.28)	0.80(±0.23)	0.59(±0.24)
ยาง	3.52(±0.01)	3.10(±0.10)	3.03(±0.07)	2.57(±0.14)	2.21(±0.31)

หมายเหตุ ^a จำนวนเซลล์หรือสปอร์บนพื้นผิวทดสอบ หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm ที่อุณหภูมิ 25±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

การใช้น้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm ในการทำลายฟิล์มชีวภาพและสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว พบว่า เซลล์ *S. aureus* ภายในฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวทดสอบทุกชนิดเพียงบางส่วนถูกทำลายได้หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อ แต่ยังคงพบเซลล์ที่รอดชีวิตได้ทั้งในกรณี

เมื่อไม่มีและมีการปนเปื้อน chicken broth จึงเพิ่มความเข้มข้นของคลอรีนเป็น 52 และ 76 ppm พบว่า ในกรณีไม่มีการปนเปื้อน chicken broth การใช้ AcEW เข้มข้น 52 ppm สามารถทำลายเซลล์ *S. aureus* ภายในฟิล์มชีวภาพบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้จนอยู่ในระดับต่ำกว่าค่า detection limit ในเวลา 30 นาที (ตารางที่ 20) แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์บนแผ่นพลาสติกและยางได้หมด ยังคงมีเซลล์เหลืออยู่ 2.3 และ 3.4 log CFU/cm² ตามลำดับ (ลดลงร้อยละ 99.92 และ 99.83) และเมื่อใช้ความเข้มข้น 76 ppm สามารถทำลายเซลล์ *S. aureus* บนแผ่นพลาสติกจนอยู่ในระดับต่ำกว่าค่า detection limit แต่ในกรณีแผ่นยางเซลล์ *S. aureus* ยังคงรอดชีวิตอยู่ได้ แต่มีจำนวนลดลงถึง 3.2 log CFU/cm² หรือลดลง 99.94

เมื่อสร้างการปนเปื้อน chicken broth บนฟิล์มชีวภาพให้ผลการทดลองในแนวทางเดียวกันคือ การใช้ AcEW เข้มข้น 52 ppm ทำลายเซลล์ *S. aureus* บนแผ่นสแตนเลสสตีลได้จนอยู่ในระดับต่ำกว่าค่า detection limit ในเวลา 30 นาที แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์บนแผ่นพลาสติกและยางได้ ยังคงมีเซลล์เหลืออยู่ 2.7 และ 3.3 log CFU/cm² ตามลำดับ (ลดลงร้อยละ 99.72 และ 99.91) และเมื่อใช้ความเข้มข้นเพิ่มเป็น 76 ppm เซลล์ *S. aureus* บนแผ่นพลาสติกจะถูกทำลาย ตรวจพบในระดับต่ำกว่าค่า detection limit ส่วนบนแผ่นยางเซลล์ *S. aureus* ยังคงรอดชีวิตอยู่ได้ แต่มีจำนวนลดลงถึง 4.3 log CFU/cm² หรือลดลง 99.99 (ตารางที่ 20)

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการลดลงเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพและสปอร์เกาะติดหลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด เมื่อไม่มีและมีการปนเปื้อน chicken broth พบว่า ให้ผลในแนวทางเดียวกับคลอรีนไดออกไซด์ คือ ค่าร้อยละการลดลงของเซลล์หรือสปอร์บนพื้นผิวที่ไม่มีการปนเปื้อน chicken broth มากกว่าในกรณีที่มีการปนเปื้อน (ตารางผนวกที่ ค14) แสดงว่า หากมีสารอาหารบนฟิล์มชีวภาพจะมีผลลดประสิทธิภาพของ AcEW ได้เช่นเดียวกับ ClO₂

ตารางที่ 20 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ในฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิว เมื่อไม่มีและมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นผิว	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm ²) ^a และเวลา (นาที)		
		0	10	30
เมื่อ ไม่มีการปนเปื้อน CB				
52	สแตนเลสสตีล	5.44(±0.27) ^b	2.61(±0.11)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	5.36(±0.25)	3.34(±0.18)	2.28(±0.48)
	ยาง	6.15(±0.18)	3.94(±0.11)	3.39(±0.40)
76	สแตนเลสสตีล	5.44(±0.27)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	5.36(±0.25)	2.49(±0.03)	<0.18(±0.00)
	ยาง	6.15(±0.18)	3.73(±0.07)	2.97(±0.47)
เมื่อมีการปนเปื้อน CB				
52	สแตนเลสสตีล	5.55(±0.08)	2.94(±0.04)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	5.29(±0.14)	3.42(±0.14)	2.73(±0.05)
	ยาง	6.35(±0.22)	4.54(±0.13)	3.33(±0.13)
76	สแตนเลสสตีล	5.55(±0.08)	<0.18(±0.00)	<0.18(±0.00)
	พลาสติก	5.36(±0.25)	2.09(±0.12)	<0.18(±0.00)
	ยาง	6.35(±0.22)	3.46(±0.20)	2.04(±0.49)

หมายเหตุ ^a จำนวนเซลล์ *S. aureus* บนพื้นผิวทดสอบ หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 52 และ 76 ppm ที่อุณหภูมิ 25±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

จากผลการทดลองเมื่อใช้คลอรีนไดออกไซด์และน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบ สรุปได้ว่า สารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถทำลายฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนแผ่นยางได้ยากที่สุด รองลงมาคือ พลาสติกและสแตนเลสสตีล สอดคล้องกับการทดลองของ Ronner and Wong (1993) แสดงให้เห็นว่า ฟิล์มชีวภาพของ *L. monocytogenes* และ *S. Typhimurium* บนแผ่นยาง Buna-n (gasket material) ถูกทำลายด้วยสารฆ่าเชื้อได้ยากกว่าฟิล์มชีวภาพบนสแตนเลสสตีลเช่นกัน กล่าวคือ เมื่อใช้คลอรีน (Dibac) เข้มข้น 100 ppm เวลา 2 นาที สามารถลดเซลล์ *L. monocytogenes* และ *S. Typhimurium* ภายในฟิล์มชีวภาพบนแผ่นยางได้ร้อยละ 87.4-99.2 ขณะที่เซลล์บนสแตนเลสสตีลลดลงมากกว่าร้อยละ 99.9 เช่นเดียวกับการทดลองของ Somers and Wong (2004) พบว่า เมื่อใช้สารทำความสะอาด

สะอาดร่วมกับสารฆ่าเชื้อในกลุ่มกรดเปอร์แอซิก (2,600 ppm) หรือร่วมกับไฮโปคลอไรท์ (200 ppm) เป็นเวลา 10 นาที สามารถลดฟิล์มชีวภาพของ *L. monocytogenes* บนสแตนเลสสตีลอายุ 48 ชั่วโมงได้ง่ายกว่าพื้นผิวชนิดอื่นๆ (โพลีเอสเตอร์ ยาง และซิลิโคน)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ที่แขวนลอยในสารละลายเปปโตนและเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิว จะเห็นได้ว่า สารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถทำลายเซลล์แขวนลอยในสารละลายเปปโตนได้ทั้งหมดในเวลา 5 นาที แต่การทำลายเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพนั้นไม่สามารถทำลายเชื้อได้ทั้งหมด สอดคล้องกับการทดลองของ Peng *et al.* (2002) รายงานว่า การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 25 ppm เป็นเวลา 5 นาที สามารถทำลายเซลล์ของ *B. cereus* ในสารละลายได้ทั้งหมด แต่เซลล์ในฟิล์มชีวภาพยังคงรอดชีวิตได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Park *et al.* (2002) พบว่า ในเวลา 30 วินาที น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่มีคลอรีน 25 ppm สามารถทำลาย *S. aureus* เมื่ออยู่ในสภาพแขวนลอยได้หมด แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวต่างๆ ได้ การที่เซลล์จุลินทรีย์ภายในฟิล์มชีวภาพสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น มีสาเหตุจากหลายปัจจัย ดังนี้ (1) สารพอลิเมอร์หรือ EPS ที่เซลล์สร้างขึ้นปกคลุมไว้ป้องกันการเข้าทำลายของสารฆ่าเชื้อและจำกัดการแพร่ของโมเลกุลของสารฆ่าเชื้อไม่ให้เข้าทำลายเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพได้ (2) ความหนาแน่นของเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพจะมีการตอบสนองต่อสารฆ่าเชื้อได้แตกต่างกัน และ (3) ความจำกัดของสารอาหารและออกซิเจนมีผลให้เซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพเกิดเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ เกิดการปรับตัวและชักนำเข้าสู่สภาวะเครียดได้

Resch *et al.* (2005) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนของเซลล์ *S. aureus* ภายในฟิล์มชีวภาพอายุ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่า เซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด (stress response gene) เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ต่างๆ และ alkaline shock protein รวมถึง general stress protein ด้วย แสดงว่า การที่เซลล์เกิดการเกาะติดบนพื้นผิวและพัฒนาเป็นฟิล์มชีวภาพส่งผลให้เซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพนั้นมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น และการปนเปื้อนสารอินทรีย์บางชนิด เช่น chicken broth ลงบนฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดมีผลในการลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดด้วย สอดคล้องกับการทดลองของ Frank *et al.* (2003) พบว่า เมื่อทำการปนเปื้อน chicken serum albumin และ chicken fat บนฟิล์มชีวภาพของ *L. monocytogenes* บนแผ่นสแตนเลสสตีล ส่งผลให้ประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์และโซเดียมคลอไรท์ลดลงเช่นกัน

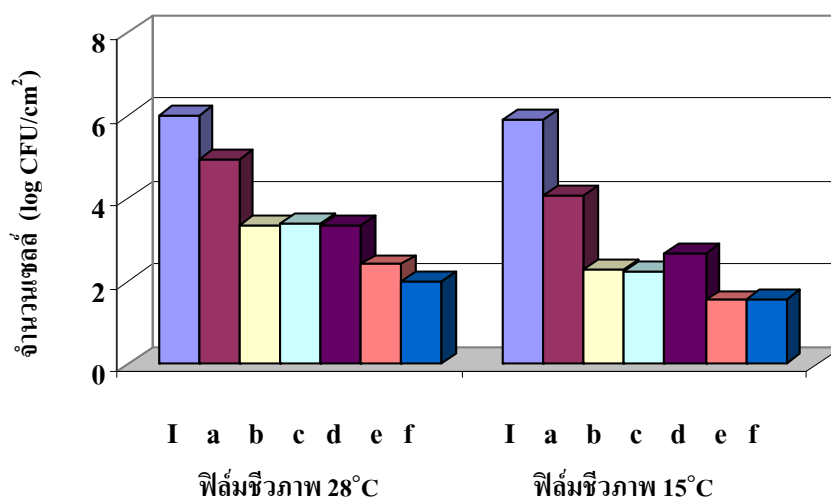
จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด สามารถสรุปความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อและเวลาที่เหมาะสมที่ควรใช้ในการทำลายฟิล์มชีวภาพได้ดังนี้ ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* และ *S. aureus* บนพื้นผิว ควรใช้ ClO_2 ความเข้มข้น 10 ppm เวลา 30 นาที และ AcEW ความเข้มข้น 30 ppm เวลา 30 นาที หรือ AcEW ความเข้มข้น 52 ppm เวลา 10 นาที เนื่องจากสามารถลดฟิล์มชีวภาพได้ประมาณ $3 \log \text{CFU/cm}^2$ ซึ่งถือว่าเป็นการทำลายฟิล์มชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ (Somer and Wong, 2004) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในรูปของปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมดโดยนำความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์คูณ 2.63 ซึ่งเป็นค่า oxidizing power จะได้ปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ของคลอรีนไดออกไซด์ได้เท่ากับ 26.3 ppm จะเห็นว่ามีค่าใกล้เคียงกับน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดมีความใกล้เคียงกัน

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายฟิล์มชีวภาพบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ เมื่อสร้างฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียบนพื้นผิว เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเป็นฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิต่างกัน 2 ระดับ คือ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C เนื่องจากคาดว่า อุณหภูมิต่ำอาจกระตุ้นให้เซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพเกิดการตอบสนองต่อความเครียดและส่งผลให้เซลล์เหล่านั้นมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นจึงทำการสร้างฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิต่ำเปรียบเทียบกับฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิห้องทดสอบกับสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสม ชนิดของแบคทีเรียที่เลือกทดลองคือ *S. aureus* และเลือกแผ่นยางเป็นตัวแทนของพื้นผิวทดสอบ เนื่องจากในการทดลองที่ผ่านมาฟิล์มชีวภาพของ *S. aureus* บนแผ่นยางสามารถถูกทำลายได้ด้วยสารฆ่าเชื้อยากที่สุด ทำการสร้างฟิล์มชีวภาพของ *S. aureus* บนแผ่นยางที่อุณหภูมิ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C เป็นเวลา 2 วัน นำมาทดสอบกับสารฆ่าเชื้อโดยเลือกความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อและเวลาที่เหมาะสมจากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อจากการทดลองในข้อ 2.1.1 และ 2.2.1 สภาวะของสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสม คือ (a) ClO_2 ความเข้มข้น 5 ppm 30 นาที (b) ClO_2 ความเข้มข้น 10 ppm 30 นาที (c) AcEW ความเข้มข้น 30 ppm 30 นาที (d) AcEW ความเข้มข้น 52 ppm 10 นาที และใช้น้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดเบส ซึ่งมีส่วนประกอบของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับ AcEW คือ (e) AIEW 10 นาที ติดตามด้วย AcEW ความเข้มข้น 30 ppm 30 นาที และ (f) AIEW 10 นาที ติดตามด้วย AcEW ความเข้มข้น 52 ppm 10 นาที ทุกทรีตเมนต์ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C ผลการทดลองพบว่า

เมื่อสร้างฟิล์มชีวภาพของ *S. aureus* บนแผ่นยางที่อุณหภูมิ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงได้เซลล์เริ่มต้นจำนวนเท่ากับ 6.2 และ 6.1 log CFU/cm² ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับสารฆ่าเชื้อพบว่า ฟิล์มชีวภาพอุณหภูมิ 15 ± 1 °C สามารถถูกทำลายได้มากกว่า ฟิล์มชีวภาพอุณหภูมิ 28 ± 2 °C ในทุกทริตเมนต์ของการทดสอบ (ภาพที่ 12) กล่าวคือ การใช้ ClO₂ ความเข้มข้น 5 และ 10 ppm เป็นเวลา 30 นาทีสามารถลดเซลล์ในฟิล์มชีวภาพอุณหภูมิ 28 ± 2 °C บนพื้นผิวได้ 1.1 และ 2.8 log CFU/cm² ตามลำดับ (ลดลงร้อยละ 91.68 และ 99.82) และลดเซลล์ในฟิล์มชีวภาพอุณหภูมิ 15 ± 1 °C ได้ 1.9 และ 3.8 log CFU/cm² ตามลำดับ (ลดลงร้อยละ 98.62 และ 99.98) ส่วนการใช้ AcEW ที่ความเข้มข้น 30 ppm 30 นาที และ 52 ppm 10 นาที พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ในฟิล์มชีวภาพอุณหภูมิ 28 ± 2 °C ได้ใกล้เคียงกัน คือ ลดลง 2.6 และ 2.7 log CFU/cm² ตามลำดับ (ลดลงร้อยละ 99.95 และ 99.80) ซึ่งการใช้ AcEW 2 ทริตเมนต์นี้ให้ผลการทำลายเซลล์ในฟิล์มชีวภาพอุณหภูมิ 15 ± 1 °C ได้ดีกว่า สามารถลดเซลล์ในฟิล์มชีวภาพอุณหภูมิต่ำได้ 3.7 และ 3.3 log CFU/cm² ตามลำดับ (ลดลงร้อยละ 99.98 และ 99.94) และจากผลการทดสอบประสิทธิภาพของ AcEW เมื่อใช้ร่วมกับ AIEW (pH 11.04) พบว่า การใช้ AIEW ล้างแผ่นยางที่มีการสร้างฟิล์มชีวภาพก่อนแล้วติดตามด้วยการล้างด้วย AcEW นั้นมีผลช่วยให้ประสิทธิภาพของ AcEW ดีขึ้นในทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น (ทริตเมนต์ e และ f) โดยสามารถลดจำนวนเซลล์ในฟิล์มชีวภาพอุณหภูมิ 28 ± 2 °C ได้ 3.6 และ 4.1 log CFU/cm² (ลดลงร้อยละ 99.98 และ 99.99) ขณะที่เซลล์ในฟิล์มชีวภาพอุณหภูมิ 15 ± 1 °C จะมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชือน้อยกว่า ทำให้เซลล์ลดลงมากกว่าร้อยละ 99.99 (ลดลงได้ 4.4 และ 4.3 log CFU/cm² ตามลำดับ) ในทั้งสองทริตเมนต์

จากการผลการทดลอง จะเห็นว่า เซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิที่ต่ำถูกทำลายด้วยสารฆ่าเชื้อได้ง่ายกว่า แสดงว่า เซลล์ในฟิล์มชีวภาพอาจไม่มีการปรับให้ต้านทานสารฆ่าเชื้อมากขึ้น คาดว่าที่อุณหภูมิ 15 °C ยังอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 7-48 °C ที่เซลล์ *S. aureus* สามารถเจริญได้ (Jay *et al.*, 2005) การชักนำให้เซลล์เกิดการตอบสนองต่อความเครียดอาจต้องใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าในการทดลองนี้ Anderson *et al.* (2006) สร้างความเครียดแก่เซลล์โดยนำเซลล์ *S. aureus* มาแช่ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 30 นาที พบว่า สามารถชักนำให้เซลล์สร้างโปรตีนชนิดพิเศษที่เรียกว่า cold shock protein ได้ และการสร้างฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมินี้จึงอาจมีผลกระตุ้นให้เซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้มากกว่าอุณหภูมิ 15 °C ที่ใช้ในการทดลอง จากการทดลองนี้พบว่า เซลล์ *S. aureus* ภายในฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิ 15 °C สามารถเจริญบนพื้นผิวได้ตามปกติ สร้างฟิล์มชีวภาพได้ในปริมาณใกล้เคียงกับฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิ 28 °C และ ที่สำคัญไม่แสดงความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นด้วย



ภาพที่ 12 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ในฟิล์มชีวภาพที่รอดชีวิตบนแผ่นยางหลังสัมผัสสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C

หมายเหตุ I = จำนวนเซลล์เริ่มต้น, a = ClO_2 5 ppm 30 นาที, b = ClO_2 10 ppm 30 นาที

c = AcEW 30 ppm 30 นาที, d = AcEW 52 ppm 10 นาที,

e = AIEW 10 นาที + AcEW 30 ppm 30 นาที,

f = AIEW 10 นาที + AcEW 52 ppm 10 นาที

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อโดยใช้น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดเบสรวมกับน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพ พบว่า AIEW สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ AcEW ในการทำลายเซลล์ในฟิล์มชีวภาพให้ดียิ่งขึ้น แม้ว่า AIEW จะไม่มีผลในการทำลายจุลินทรีย์โดยตรง แต่มีรายงานว่า สามารถกำจัดสาร EPS ที่เซลล์ในฟิล์มชีวภาพสร้างขึ้นมาปกคลุมเซลล์ให้ออกไปได้เช่นเดียวกับสารทำความสะอาดชนิดเบสอื่นๆ เนื่องจาก AIEW มีส่วนประกอบของ NaOH และเมื่อไม่นานมานี้ Antoniou and Frank (2005) แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้สารทำความสะอาดสะอาชนิดเบสทางการค้า (TFC Green II) ที่มีองค์ประกอบของโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 สามารถกำจัดสาร EPS ที่ปกคลุมเซลล์ *Pseudomonas putida* ในฟิล์มชีวภาพบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้มากถึงร้อยละ 90 เมื่อไม่มีสาร EPS แล้ว สารฆ่าเชื้อจะสามารถทำลายเซลล์ที่อยู่ภายในฟิล์มชีวภาพนั้นได้โดยตรง ไม่ต้องสูญเสียคลอรีนบางส่วนเพื่อทำปฏิกิริยากับสาร EPS สองคล้อยกับการทดลองของ Ayebah *et al.* (2005) ศึกษาการใช้น้ำอิเล็กโทรไลซ์เพื่อทำลายฟิล์มชีวภาพของ *L. monocytogenes* บนแผ่นสแตนเลสสตีล พบว่าเมื่อใช้ AIEW ติดตามด้วย AcEW (ปริมาณคลอรีนทั้งหมด 85 ppm) พบว่า สามารถลดปริมาณฟิล์มชีวภาพได้เพิ่มขึ้น 0.3-1.2 log CFU/coupon

ในปีต่อมา Ayebah *et al.* (2006) ทดสอบประสิทธิภาพของ AIEW และ AcEW เพื่อทำลายฟิล์มชีวภาพของ *L. monocytogenes* บนแผ่นสแตนเลสสตีลในสถานะที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ พบว่า แม้จะมีการปนเปื้อนของชีรั่มไก่อบนฟิล์มชีวภาพ การใช้ AIEW ติดตามด้วย AcEW (ปริมาณคลอรีนทั้งหมด 85 ppm) ยังสามารถทำลายฟิล์มชีวภาพได้ทั้งหมดในเวลาเพียง 1 นาที ขณะที่การใช้ AcEW เพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำลายได้หมด แสดงว่าน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดเบสมีส่วนเสริมให้น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในกลุ่มออกซิไดส์ซึ่ง 2 ชนิด คือ สารละลาย คลอรีนไดออกไซด์และน้ำอ็อกโทโรไลซ์ชนิดกรดในการทำลาย *B. cereus*, *S. aureus* และสปอร์ ของ *B. cereus* เมื่อแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและเมื่อเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิว สัมผัสอาหาร ผลการทดลองพบว่า

1. การใช้คลอรีนไดออกไซด์ (5 ppm) และน้ำอ็อกโทโรไลซ์ชนิดกรด (ปริมาณคลอรีนที่ใช้ ประโยชน์ได้ทั้งหมด 30 ppm) สามารถทำลายเซลล์ของ *B. cereus*, *S. aureus* และ สปอร์ของ *B. cereus* ได้ดีเมื่อเซลล์หรือสปอร์แขวนลอยอยู่ในสารละลายเปปโตนซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์น้อย แต่เมื่อเซลล์หรือสปอร์เหล่านี้อยู่ในอาหารที่มีปริมาณสารอินทรีย์มากขึ้น เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ chicken broth ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อจะลดลง โดยที่ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเท่ากัน สปอร์ถูกทำลายได้น้อยกว่าเซลล์ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับระยะเวลา ในการสัมผัสสารและปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วย พบว่า เมื่อเพิ่มเวลาในการสัมผัสสารฆ่าเชื้อ เพิ่มขึ้นและปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นอยู่ในระดับต่ำ จะส่งผลให้สารฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการ ทำลายจุลินทรีย์ดียิ่งขึ้น

2. การสร้างฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus*, *S. aureus* และ สปอร์เกาะติดของ *B. cereus* สามารถเกิดได้ดีที่สุดบนแผ่นยาง รองลงมาคือ พลาสติก และ สเตนเลสสตีล ตามลำดับ และ *S. aureus* สามารถเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพได้มากกว่า *B. cereus* ขณะที่สปอร์สามารถเกาะติดบนพื้นผิว ได้มากกว่าเซลล์ *B. cereus* เช่นกัน เมื่อเซลล์เกิดการสร้างเป็นฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบน พื้นผิว เซลล์หรือสปอร์เหล่านั้นจะถูกทำลายโดยสารฆ่าเชื้อได้ยากกว่าเซลล์หรือสปอร์ที่แขวนลอย ในอาหาร ทั้งนี้ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์หรือสปอร์ขึ้นกับชนิดของพื้นผิว ด้วย แผ่นยางซึ่งมีลักษณะพื้นผิวขรุขระกว่าพื้นผิวชนิดอื่นจะยากต่อการทำลายเชื้อมากที่สุด การ ใช้สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 10 ppm 30 นาที และน้ำอ็อกโทโรไลซ์ชนิดกรดความ เข้มข้น 30 ppm 30 นาที หรือ 52 ppm 10 นาที เหมาะสมในการทำลายฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* และ *S. aureus* บนแผ่นยางได้อย่างมีประสิทธิภาพ ($3 \log \text{CFU/cm}^2$) สำหรับสปอร์เกาะติดบน พื้นผิว การใช้ ClO_2 15 ppm 30 นาที สามารถลดได้เพียงร้อยละ 83.40 ขณะที่การใช้ AcEW 30

ppm สามารถทำลายได้ภายในเวลา 30 นาที นอกจากนี้ สารอินทรีย์ เช่น chicken broth ที่ปนเปื้อนบนฟิล์มชีวภาพมีผลต่อการลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดด้วย

3. *S. aureus* สามารถสร้างฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวที่อุณหภูมิต่ำ (15 ± 1 °C) ได้ และมีปริมาณใกล้เคียงกับฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 °C) เมื่อใช้สารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดทำลายฟิล์มชีวภาพดังกล่าว พบว่า เซลล์ในฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิต่ำสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้น้อยกว่าเซลล์ในฟิล์มชีวภาพที่อุณหภูมิห้อง การใช้น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดเบสเป็นเวลา 10 นาทีแล้วติดตามด้วยน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวทั้งที่อุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิห้องได้ดียิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการเพิ่มเติมปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อด้วย เช่น อุณหภูมิของสารฆ่าเชื้อ ค่าความเป็นกรด-เบส เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำลายจุลินทรีย์
2. สภาวะของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อและเวลาในการสัมผัสสารของฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการฆ่าเชื้อพื้นผิวสัมผัสอาหารต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมได้ แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ภายในฟิล์มชีวภาพด้วย เนื่องจากฟิล์มชีวภาพที่มีการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ผสมหลายชนิด (mix biofilms) ซึ่งอาจมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อแตกต่างจากฟิล์มชีวภาพของจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว (single biofilms) ดังที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้ จึงควรมีการทดลองฟิล์มชีวภาพที่มีจุลินทรีย์หลายชนิดเพื่อให้มีความใกล้เคียงกับฟิล์มชีวภาพในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- นันทิดา ทศพร. 2548. ผลของการแข่งขันของเชื้อราและซาลโมเนลลาและการลดการปนเปื้อนของเชื้อและซาลโมเนลลาในมะม่วง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เนาวรัตน์ สุพรรณภานัน. 2540. การปนเปื้อนของ *Staphylococcus aureus* ในอาหารทะเลผ่านความร้อนแช่เยือกแข็งเพื่อการส่งออก. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 39 (2): 95-103.
- ณฐนนท์ トラชู. 2547. การใช้ทรายในการลอกแผ่นชีวะเพื่อศึกษาการเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิว. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 26 (1): 109-115.
- สวรรณมนต์ เหล็กเพชร. 2546. การเจริญและอยู่รอดของสแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส และ บาซิลลัส ซีเรียส เซลล์และสปอร์ ในก๊วยเตี๋ยวแช่เย็นและแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุดาพร เทียบจตุรัส. 2545. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโซเดียมคลอไรท์และคลอรีนไดออกไซด์ในการทำลาย *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium* บนข้าวโพดฝักอ่อนและหน่อไม้ฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุธาวัลย์ สิริวิชชาพร. 2548. ผลของความร้อนและสารฆ่าเชื้อต่อซาลโมเนลลาสายพันธุ์ด้านทานและไม่ด้านทานสารต้านจุลชีพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Anderson, K.L., C. Roberts, T. Disz, V. Vonstein, K. Hwang, R. Overbeek, P.D. Olson, S. J. Projan and P.M. Dunman. 2006. Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and sos responses and their effects on log-phase mRNA turnover. **J. Bacteriol.** 188 (19): 6739–6756.

- Andrews, L.S., A.M. Key, R.L. Martin, R. Grodner, and D.L. Park. 2002. Chlorine dioxide wash of shrimp and crawfish an alternative to aqueous chlorine. **Food Microbiol.** 19: 261-267.
- Antoniou, K. and J.F. Frank. 2005. Removal of *Pseudomonas putida* biofilm and associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkaline cleaning. **J. Food Prot.** 68 (2): 277-281.
- APHA. 1976. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 14th ed. American Public Health Association, New York.
- Atanassova, V., A. Meindl and C. Ring. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **Int. J. of Food Microbiol.** 68 (1-2): 105-113.
- Augustin, M. and T.A.-Vehmas. 2004. Assessment of enzymatic agents and disinfectants against bacterial biofilms. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** 7 (1): 55-64.
- Aycicek, H., S. Cakiroglu and T.H. Stevenson. 2005. Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. **Food Control** 16 (6): 531-534.
- Ayebah, B., Y.C. Hung and J.F. Frank. 2005. Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. **J. Food Prot.** 68 (7): 1375-1380.
- _____, _____, C. Kim and J.F. Frank. 2006. Efficacy of electrolyzed water in the inactivation of planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* in the presence of organic matter. **J. Food Prot.** 69 (9): 2143-2150.

- Bayoudh, S., A. Othmane, F. Bettaieb, A. Bakhrouf, H. Ben Ouada and L. Ponsonnet. 2006. Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. **Material Science and Engineering C** 26: 300-305.
- Bean, N.H., J.S. Goulding, T.D. Matthew and F.J. Angulo. 1997. Surveillance for foodborne disease outbreaks United States, 1988-1992. **J. Food Prot.** 60: 1265-1286.
- Becker, H., G. Schaller, W. Wiese and G. Terplan. 1994. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **Int. J. Food Microbiol.** 23 (1): 1-15
- Beresford, M.R., P.W. Andrew and G. Sharma. 2001. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **J. Appl. Microbiol.** 90: 1000-1005.
- Berg, J.D., P.V. Roberts and A. Matin. 1986. Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of *Escherichia coli*. **J. Appl. Bacteriol.** 60: 213-220.
- Bernade, M.A., B.M. Israel, V.P. Olivieri and M.L. Granstrom. 1965. Efficiency of chlorine dioxide as a bactericide. **Appl. Microbiol.** 13 (5): 776-780.
- Bower, C.K., J. McGuire and M.A. Daeschel. 1996. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces. **Trends Food Sci. Technol.** 7: 152-157.
- Carpentier, B. and O. Cerf. 2000. Biofilms, pp. 252-259. In R.K. Robinson, C.A. Batt and P.D. Patel, eds. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Vol. 1. Academic press, London.
- Chalton, B.R., H. Kinde and L.H. Jensen. 1990. Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. **J. Food Prot.** 53 (3): 198-201.
- Chmielewski, R.A.N. and J.F. Frank. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 2: 22-32.

- Costerton, J.W., K.J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta and T.J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.** 41: 435-464.
- Cramton, S.E. and F. Götz. 2004. Biofilm development in *Staphylococcus*, pp. 64-84. In M. Grannoum and G. O'Toole, eds. **Microbial Biofilms**. ASM Press, Washington, D.C.
- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, Í. Lasa and J.R. Penadés. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **J. Bacteriol.** 183 (9): 2888-2896.
- Davey, M.E., G.A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64 (4): 847-867.
- Dickson, J.S., M. Koohmarine. 1989. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 832-836.
- Doyle, R.J., F. Nedjat-Haiem and J.S. Singh. 1984. Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores. **Current Microbiol.** 10: 329-332.
- Eleftheriadou, M., A.V. Tello, M.M. Loizidou, A.-S. Nikolaou and D. Akkelidou. 2002. The microbiological profile of foods in the Republic of Cyprus: 1991-2000. **Food Microbiol.** 19: 463-471.
- Fabrizio, K.A. and C.N. Cutter. 2005. Application of electrolyzed oxidizing water to reduce *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. **Meat Science** 71 (2): 327-333.
- Fang, T.J., C.Y. Chen and W.Y. Kuo. 1999. Microbiological quality and incidence of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in vegetarian food products. **Food Microbiol.** 16 (4): 385-391.

- Fang, T.J., Q.K. Wei, C.W. Liao, M.J. Hung and T.H. Wang. 2003. Microbiological quality of 18 °C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **Int. J. of Food Microbiol.** 80 (3): 241-250.
- Frank, J.F., J. Ehlers and L. Wicker. 2003. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. **Food Prot. Trends** 23 (8): 654-663.
- Fukayama, M.Y., H. Tan, W.B. Wheeler and C.-I. Wei. 1986. Reaction of aqueous chlorine and chlorine dioxide with model food compounds. **Environmental Health Perspectives** 69: 267-274.
- Giffel, M.C., R.R. Beumer, S. Leijendekkers and F.M. Rombouts. 1996. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. **Food Microbiol.** 13 (1): 53-58
- Gilbert, P., D.J. Evans, E. Evans, I.G. Duguid and M.R.W. Brown. 1991. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. **J. Appl. Bacteriol.** 71: 72-77.
- Granum, P.E. 1997. *Bacillus cereus*, pp. 327-336. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, eds. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington, D.C.
- Guðbjörnsdóttir, B., H. Einarsson and G. Thorkelsson. 2005. 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 Technol. Biotechnol.** 43 (1): 55-61.
- Han, Y., R.H. Linton, S.S. Nielsen, and P.E. Nelson. 2001. Reduction of *Listeria monocytogenes* on green peppers (*Capsicum annuum* L.) by gaseous and aqueous chlorine dioxide and water washing and its growth at 7 °C. **J. Food Prot.** 64 (11): 1730-1738.

- Helke, D.M., E.B. Somers and A.C.L. Wong. 1993. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium to stainless steel and buna-N in the presence of milk and individual milk components. **J. Food Prot.** 56 (6): 479-484.
- Huang, T.-S., C. Xu, K. Walker, P. West, S. Zhang and G. Weese. 2006. Decontamination efficacy of combined chlorine dioxide with ultrasonication on apples and lettuce. **J. Food Sci.** 74 (4): 134-139.
- Huang, Y.-R., H.-S. Hsieh, S.-Y. Lin, S.-J. Lin, Y.-C. Hung and D.-F. Hwang. 2006. Application of electrolyzed oxidizing water on the reduction of bacterial contamination for seafood. **Food Control** 17: 987-993.
- Iurlina, M.O., A.I. Saiz, S.R. Fuselli and R. Fritz. 2006. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. **Food Sci. Technol.** 39 (2): 105-110.
- Jablonski, L.M. and G.A. Bohach. 1997. *Staphylococcus aureus*, pp. 353-375. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, eds. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington, D.C.
- Jay, J.M. 2000. **Modern Food Microbiology**. 6th ed. Chapman & Hall, New York.
- _____, M.J. Loessner and D.A. Golden. 2005. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. Springer, U.S.A.
- Jefferson, K.K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters** 236: 163–173.
- Jessen, B. and L. Lammert. 2003. Biofilm and disinfectant in meat processing plants. **Int. Biodeterioration & Biodegradation** 51: 265-269.

- Jorgensen, H.J., T. Mork, H.R. Hogasen and L.M. Rorvik. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **J. Appl. Microbiol.** 99: 158-166.
- Joseph, B., S.K. Otta, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **Int. J. Food Microbiol.** 64: 367-372.
- Kaneko, K.-I., H. Hayashidani, Y. Ohtomo, J. Kosuge, M. Kato, K. Takahashi, Y. Shiraki and M. Ogawa. 1999. Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. **J. Food Prot.** 62 (6): 644-649.
- Kim, C., Y.-C. Hung and R.E. Brackett. 2000a. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. **Int. J. Food Microbiol.** 61: 199-207.
- _____. 2000b. Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. **J. Food Prot.** 63 (1): 19-24.
- Kim, J.M., T.S. Huang, M.R. Marshall, and C.-I. Wei. 1999. Chlorine dioxide (ClO₂) treatment of seafoods to reduce bacterial loads. **J. Food Sci.** 64 (6): 1089-1093.
- Kitai, S., A. Shimizu, J. Kawano, E. Sato, C. Nakano, H. Kitagawa, K. Fujio, K. Matsumura, R. Yasuda, T. Inamoto. 2005. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. **J. Vet. Med. Sci.** 67 (3): 269-74.
- Koseki, S., K. Yoshida, S. Isobe and K. Itoh. 2001. Decontamination of lettuce using acidic electrolyzed water. **J. Food Prot.** 64 (5): 652-658.

- Koseki, S., K. Yoshida, S. Isobe and K. Itoh. 2004. Efficacy of acidic electrolyzed water for microbial decontamination of cucumbers and strawberries. **J. Food Prot.** 67 (6): 1247-1251.
- Koseki, S., K. Yoshida, Y. Kamitani, S. Isobe and K. Itoh. 2004a. Effect of mild heat pre-treatment with alkaline electrolyzed water on the efficacy of acidic electrolyzed water against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on lettuce. **Food Microbiol.** 21: 559-566.
- _____. 2004b. Effect of mild heat pre-treatment with alkaline electrolyzed water on the efficacy of acidic electrolyzed water against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on lettuce. **Food Microbiol.** 21: 559-566. Cited K. Miyashita, M. Yasuda, T. Oda and T. Suzuki. 1999. Antioxidative activity of a cathodic solution produced by the electrolysis of a dilute NaCl solution. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 63: 421-423.
- Kotranta, A., K. Lounatmaa and M. Haapasalo. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes Infect.** 2: 189-198.
- Kreske, A.C., J.-H. Ryu, C.A. Pettigrew and L.R. Beuchat. 2006. Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial producer sanitizer to *Bacillus cereus* and *Pseudomonas* in a liquid detergent, on stainless steel, and in biofilm. **J. Food Prot.** 9 (11): 2621-2634.
- Kumar, C.G. and S.K. Anand. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: A review. **Int. J. Food Microbiol.** 42: 9-27.
- Kusumaningrum, H.D., G. Riboldi, W.C. Hazeleger and R.R. Beumer. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **Int. J. Food Microbiol.** 85: 227-236.
- Lee, S.Y., M. Costello and D.H. Kang. 2004. Efficacy of chlorine dioxide gas a sanitizer of lettuce leaves. **J. Food Prot.** 67 (7): 1371-1376.

- Lewis, K.H. 1980. Cleaning, disinfection and hygiene, pp 232-258. *In* J.H. Silliker, R.P. Elliot, A.C. Baird-Parker, F.L. Bryan, J.H.B. Christain, D.S. Clark, J.C. Olson and T.A. Roberts. **Microbial Ecology of Foods**. Vol. 1. Academic Press, New York.
- Lin, W.-F., T.-S. Huang, J. A. Cornell, C.-M. Lin and C.-I. Wei. 1996. Bactericidal activity of aqueous chlorine and chlorine dioxide solutions in fish model system. **J. Food Sci.** 61 (5): 1030-1034.
- Lindsay, D., V.S. Brozel, Mortert and A. voy Holy. 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. **J. Appl. Microbiol.** 92: 352-361.
- Luca, G.D., F. Zanetti and S. Stampi. 1997. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **Int. J. of Food Microbiol.** 35 (3): 267-270.
- Luppens, S.B.I. 2002. **Suspensions or Biofilms, and other Factors that Affect Disinfectant Testing on Pathogens**. Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Mafu, A.A., D. Roy, J. Goulet and P. Magny. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact time. **J. Food Prot.** 53 (9): 742-746.
- Manani, T.A., E.K. Collison and S. Mpuchane. 2006. Microflora of minimally processed frozen vegetables sold in Gaborone, Botswana. **J. Food Prot.** 69 (11): 2581-2586.
- Marriott, N.G. 1999. **Principles of Food Sanitation**. 4th ed. An Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg, Marryland.

- Marshall, K.C., R. Stout and R. Mitchell. 1971. Mechanism of the initial event in the sorption of marine bacteria to surfaces. **J. Gen. Microbiol.** 68: 337-348.
- Meldrum, R.J., R.M.M. Smith, P. Ellis and J. Garside. 2006. Microbiological quality of randomly selected ready-to-eat foods sampled between 2003 and 2005 in Wales, UK. **Int. J. of Food Microbiol.** 108: 397-400.
- Mittelman, M.W. 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **J. Dairy Sci.** 81: 2760-2764.
- Murindamombe, G.Y., E.K. Collison, S.F. mpuchane and B.A. Gashe. 2005. Presence of *Bacillus cereus* in street foods in Gaborone, Botswana. **J. Food Prot.** 68 (2): 342-346.
- Nobuo, A., K. Masahiko, Y. Kyoichiro, K. Shinichi and A. Kazuhiro. 2004. Viable bacterial counts on fresh-cut salads and bactericidal effect of electrolyzed acidic water. **J. Food Preservation Sci.** 30 (4): 185-190.
- Normanno, G., A. Firinu, S. Virgilio, G. Mula, A. Dambrosio, A. Poggiu, L. Decastelli, R. Mioni, S. Scuota, G. Bolzoni, E. Di Giannatale, A.P. Salinetti, G. La Salandra, M. Bartoli, F. Zuccon, T. Pirino, S. Sias, A. Parisi, N.C. Quaglia and G.V. Celano. 2005. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **Int. J. Food Microbiol.** 98 (1): 73-79.
- Oguntoyinbo, F.A. and O.M. Oni. 2004. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolated from traditional fermented meals in Nigeria. **J. Food Prot.** 67 (12): 2805-2808.
- Oomori, T., T. Oka, T. Inuta and Y. Arata. 2000. The efficiency of disinfectant of acidic electrolyzed water in the presence of organic materials. **Analytical Science** 16: 365-369.

- Ozer, N.P. and A. Demirci. 2006. Electrolyzed oxidizing water treatment for decontamination of raw salmon inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* Scott A and response surface modeling. **J. Food Engineering** 72 (3): 234-241.
- Park, H., Y.C. Hung and C. Kim. 2002. Effectiveness of electrolyzed water as a sanitizer for treating different surfaces. **J. Food Prot.** 65 (8): 1276-1280.
- Peng, J.-S., W.-C. Tsai and C.-C. Chou. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **Int. J. Food Microbiol.** 65: 105-111.
- _____. 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **Int. J. Food Microbiol.** 77: 11-18.
- Poulsen, L.V. 1999. Microbial biofilm in food processing: A review. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** 32: 321-326.
- Ren, T. and Y.-C. Su. 2006. Effect of electrolyzed oxidizing water treatment on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in raw oysters. **J. Food Prot.** 69 (8): 1829-1834.
- Resch, A., R. Rosenstein, C. Nerz and F. Götz. 2005. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. **Appl. Env. Microbiol.** 71 (5): 2663-2676.
- Rivas Palá, T. and A. Sevilla. 2004. Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iranian pork cutting plant. **J. Food Prot.** 67 (8): 1624-1629.
- Rodgers, S.L., J.N. Cash, M. Siddiq, E.T. Ryser. 2004. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. **J. Food Prot.** 67 (4): 721-31.

- Ronner, A.B. and A.C.L. Wong. 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **J. Food Prot.** 56 (9): 750-758.
- Rosenquist, H., L. Smidt, S.R. Andersen, G.B. Jensen and A. Wilcks. 2005. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. **FEMS Microbiology Letters** 250: 129-136.
- Ryu, J.-H. and L.R. Beuchat. 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. **J. Food Prot.** 68 (12): 2614-2622.
- Schoeni, J.L. and A.C.L. Wong. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins: A review. **J. Food Prot.** 68 (3): 636-648. Cited T.M. Pan, T.K. Wang, C.L. Lee, S.W. Chien and C.-B. Horng. 1997. Foodborne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986-1995. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1260-1262.
- Schultz, F.J. and J.L. Smith. 1994. *Bacillus*: Recent advances in *Bacillus cereus* food poisoning research, pp. 29-62. In Y.H. Hui, J.R. Gorham, K.D. Murrell and D.O. Cliver. **Foodborne Disease Handbook**. Vol. 1. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Setlow, P. and E.A. Johnson. 2001. Spores and their significance, pp. 33-70. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, eds. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM press, Washington, D.C.
- Sharma, M. and S.K. Anand. 2001. Efficacy of two disinfecting agents against mixed culture biofilms from dairy processing lines. **Dairy, Food and Environmental Sanitation** 21 (5): 370-379.

- Sharma, M., J.-H. Ryu and L.R. Beuchat. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. **J. Appl. Microbiol.** 99: 449-459.
- Shelton, W.H. 1971. Chlorinated bleaches and sanitizing agents, p. 192. Cited The American Water Works Association, Inc., ed. **Water Quality and Treatment**. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Simmonds, P., B.L. Mossel, T. Interaphan and H.C. Deeth. 2003. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. **J. Food Prot.** 66 (11): 2070-2075.
- Simone, E., M. Goosen, S.H.W. Notermans, and M.W. Bergdorff. 1997. Investigations of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991-1994. **J. Food Prot.** 60: 442-446.
- Sinde, E. and J. Carballo. 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 Microbiol.** 17: 439-447.
- Singh, N., R.K. Singh, A.K. Bhunia, and R.L. Strohshine. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **Ledensm.-Wiss. u.-Technol.** 35: 720-729.
- Smith, D.P., M.E. Berrang, P.W. Feldner, R.W. Phillips and R.J. Meinersmann. 2004. Detection of *Bacillus cereus* on selected retail chicken products. **J. Food Prot.** 67 (8): 1770-1773.
- Somers, E.B. and A.C.L. Wong. 2004. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **J. Food Prot.** 67 (10): 2218-2229.

- Stevenson, S.M.L., S.R. Cook, S.J. Bach and T.A. Mcallister. 2004. Effects of water source, dilution, storage, and bacterial and fecal loads on the efficacy of electrolyzed water for the control of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.** 67 (7): 1377-1383.
- Sy, K.V., M.B. Murray, D. Harrison and L.R. Beuchat. 2005. Evaluation of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and yeasts and molds on fresh and fresh-cut produce. **J. Food Prot.** 68 (6): 1176-1187.
- Tirado, C. and K. Schimdt. 2001. Who surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: Preliminary results and trends across greater europe. **J. Infect.** 43: 80-84.
- Van Netten, P., A. van de Moosdijk, P. van Hoensel, D.A.A. Mossel and L. Perales. 1990. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **J. Appl. Bacteriol.** 69: 73-79.
- Vatanyoopaisarn, S., A. Nazli, C. Dodd, C. Rees and W.M. Waites. 2000. Effect of flagella in initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(2): 860-863.
- Venkitanarayanan, K.S., G.O. Ezeike, Y.-C. Hung and M.P. Doyle. 1999. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, and *L. monocytogenes*. **Appl. Env. Microbiol.** 65 (9): 4276-4279.
- Wang, H. H. Feng and Y. Luo. 2004. Microbial reduction and storage quality of fresh-cut cilantro washed with acidic electrolyzed water and aqueous ozone. **Food Research International** 37: 949-956.

- Warke, R., A. Kamat, M. Kamat and P. Thomas. 2000. Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice creams sold in some retail outlets in Mumbai, India. **Food Control** 11 (2): 77-83.
- Watve, M. 1997. Why rods and cocci. **Resonance**. Available Source:
<http://www.iisc.ernet.in/academy/resonance/Mar1997/pdf/Mar1997ThinkItOver2.pdf>,
 March, 1997.
- Wei, C.-I., D.L. Cook and R. Kirk. 1985. Use of chlorine compounds in the food industry. **Food Technol.** 39 (1): 107-115.
- _____, T.S. Huang, J.M. Kim, W.F. Lin, M.L. Tamplin and J.A. Bartz. 1995. Growth and survival of *Salmonella* Montevideo on tomatoes and disinfections with chlorinated water. **J. Food Prot.** 58 (8): 829-836.
- White G.C., 1992. **Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants**. 3rd ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Wijnands, L.M., J.B. Dufrenne, F.M. Rombouts, P.H. in't Veld and F.M. van Leusden. 2006. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the Netherlands. **J. Food Prot.** 69 (11): 2587-2594.
- Young, S.B. and P. Setlow. 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. **J. Appl. Microbiol.** 95: 54-67.
- Zottola, E.A. 1994. Microbial attachment and biofilm formation: A new problem for the food industry. **Food Technol.** 48 (7): 107-114.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase Soy Agar (TSA, Merck Laboratories, Darmstat, Germany)

Casein peptone	1.50	กรัม
Soymeal peptone	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1.0	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อผง 40 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกรอง 1 ลิตร โดยการต้มให้เดือด ระหว่างการต้มควรใส่ magnetic stirrer เพื่อทำการกวนให้ส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากัน และป้องกันไม่ให้อากาศเข้าที่ผิวน้ำ หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Trypticase Soy Broth (TSB, Merck Laboratories, Darmstat, Germany)

Trypticase peptone	15.0	กรัม
Phytone peptone	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1.0	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อผง 30 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกรอง 1 ลิตร หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลองและขวดตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น 10 และ 100 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. สารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 (Merck Laboratories, Darmstat, Germany)

Meat-peptone	1.0	กรัม
น้ำกรอง	1.0	ลิตร

ละลายสารในน้ำกรองให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลองและขวดตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 9 และ 90 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. D/E (Dey/Engley) Neutralizing Broth (Difco, France)

Pancreatic digest of casein	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม
Sodium thioglycollate	1.0	กรัม
Sodium thiosulfate	6.0	กรัม
Sodium bisulfite	2.5	กรัม
Ploysorbate 80	5.0	กรัม
Lecithin	7.0	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อผง 39 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกรอง 1 ลิตร หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดตามปริมาณที่ต้องการปิดฝาแล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

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

Peptone from meat	5.0	กรัม
Meat extract	3.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม
น้ำกรอง	1.0	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อผง 20 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกรอง 1 ลิตร โดยการต้มให้เดือด ระหว่างการต้มควรใส่ magnetic stirrer เพื่อทำการกวนให้ส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากัน และป้องกันไม่ให้อายุกันภาชนะไหม้ หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6. Phosphate Buffer Saline (PBS, pH 7.4)

Sodium chloride	8.0	กรัม
Di-sodium hydrogen phosphate	1.44	กรัม
Potassium chloride	0.2	กรัม
Potassium di-hydrogen phosphate	0.24	กรัม

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น แบ่งใส่ขวดตามปริมาตรที่ต้องการปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ข

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายคลอรีนไดออกไซด์

1.1 การเตรียมสารละลายคลอรีนไดออกไซด์

เตรียมจากการป้อนสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นร้อยละ 9 และ สารละลายโซเดียมคลอไรต์ (NaClO_2) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ให้เข้าทำปฏิกิริยากันในถังปฏิกิริยาของเครื่องผลิตคลอรีนไดออกไซด์ด้วยระบบเบลโลโซน (Bello Zon) model CDV 35 เพื่อให้เกิด สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ แรงดันของสารละลายทั้งสองจากปั๊มจ่ายน้ำยา จะช่วยให้คลอรีนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นถูกฉีดออกไปใช้งานได้โดยผ่านไประดมกับน้ำประปา ปรับความเข้มข้นตามความต้องการ นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอรีนไดออกไซด์

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณคลอรีนไดออกไซด์

1.2.1 การเตรียมสารเคมี

ก. สารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยละลาย โซเดียมไฮโอซัลเฟต 6.25 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือด แล้วทำให้ปริมาตรของสารละลาย เป็น 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำมาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียม ไดโครเมตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต และเก็บรักษาโดยการเติมคลอโรฟอร์มลงไป 2-3 มิลลิลิตร

ข. สารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตเข้มข้น 0.01 นอร์มัล เตรียมโดยการเปิด สารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (จากข้อ ก.) 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือด

ค. สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียม โดยโปแตสเซียมไดโครเมตแอนไฮไดรต์ 0.1904 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

จ. น้ำแบ่งที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยผสมสตาร์ช 1.0 กรัมกับน้ำเล็กน้อย แล้วเทลงในน้ำเดือดประมาณ 200 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ค้างคืน รินเอาเฉพาะส่วนใส เก็บไว้ อาจเก็บรักษาโดยเติมกรดซาลิไซลิก 0.25 กรัม และซิงค์คลอไรด์ 0.8 กรัม

1.2.2 การไตเตรทเพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล

โดยเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในไอโอดีนฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.1 นอร์มัล 10 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป แล้วเติมโปแตสเซียมไอโอไดด์ประมาณ 1 กรัม ปิดจุกขวดแล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จึงนำมาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้น้ำแบ่งเป็นอินดิเคเตอร์

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล)

$$= \frac{10 \times \text{นอร์มัลของสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมต}}{\text{มล. ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท}}$$

1.2.3 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างสารละลาย (American Public Health Association [APHA], 1976)

นำตัวอย่างสารละลายคลอรีนไดออกไซด์อย่างน้อย 150 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดแอสคอร์บิก 5 มิลลิลิตร เพื่อให้สารละลายตัวอย่างมีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ระหว่าง 3-4 แล้วเติมโปแตสเซียมไอโอไดด์ประมาณ 1 กรัม เขย่า และเติมน้ำแบ่งลงไป 1 มิลลิลิตร สารละลายจะมีสีน้ำเงินนำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนสีน้ำเงินจางหายไป จดปริมาตรที่ใช้ในการไตเตรท (V_1) ส่วนการหา blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่างแล้วทำเช่นเดียวกัน จดปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ใน blank (V_2)

$$\text{ความเข้มข้น ClO}_2 \text{ (ppm)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 13490}{\text{ปริมาตรตัวอย่างสารละลาย}}$$

V_1 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มล.)

V_2 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรท blank (มล.)

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มัลของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟต

1.3 การเตรียมสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ตามความเข้มข้นที่ต้องการ

เตรียมจากสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่ผลิตจากเครื่องผลิตคลอรีนไดออกไซด์ด้วยระบบเบลโลโซน (Bello Zon) model CDV 35 (stock solution) หลังจากไตเตรททราบความเข้มข้นที่แน่นอนของคลอรีนไดออกไซด์ stock solution แล้ว สามารถเตรียมสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ตามความเข้มข้นที่ต้องการได้ โดยการเจือจางด้วยน้ำประปาตลอดเชื้อ

2. น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด

2.1 การเตรียมน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด

น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดเตรียมได้จากการนำสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ผ่านเข้าในเครื่องผลิตน้ำอิเล็กโทรไลซ์ที่มีขั้วไฟฟ้าบวกและลบ ขั้วไฟฟ้าทั้งสองถูกกั้นให้แยกจากกันด้วยเมมเบรน เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปยังขั้วทั้งสองจะเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิส (electrolysis) ของสารละลายเกลือขึ้น เกิดน้ำอิเล็กโทรไลซ์ 2 ชนิด คือ น้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดและเบส กำหนดความเข้มข้นของคลอรีนในน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดโดยการปรับกระแสไฟฟ้า

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมด (total available chlorine)

ปริมาณคลอรีนที่ใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมดในน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดหาโดยการไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณคลอรีนไดออกไซด์ ตามวิธีการข้อ 1.2.3 แต่คำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{ความเข้มข้น total available chlorine (ppm)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 35450}{\text{ปริมาตรตัวอย่างสารละลาย}}$$

V_1 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มล.)

V_2 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรท blank (มล.)

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มัลของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟต

ภาคผนวก ค
ตารางแสดงข้อมูล

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงข้อมูล

ตารางผนวกที่ ก1 จำนวนเซลล์ *B. cereus* (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/ml)		
		สารละลายเปปโตเน	Chicken broth	TSB
5	0	3.54(±0.06) ^b	3.20(±0.25)	3.17(±0.09)
	5	0.00(±0.00)	3.13(±0.26)	3.12(±0.11)
	10	0.00(±0.00)	3.07(±0.23)	3.06(±0.13)
	20	0.00(±0.00)	3.11(±0.16)	2.99(±0.17)
	30	0.00(±0.00)	3.10(±0.23)	2.97(±0.19)
10	0	3.60(±0.04)	3.21(±0.27)	3.17(±0.09)
	5	0.00(±0.00)	3.09(±0.23)	2.96(±0.19)
	10	0.00(±0.00)	3.06(±0.20)	2.93(±0.21)
	20	0.00(±0.00)	3.03(±0.14)	2.90(±0.18)
	30	0.00(±0.00)	3.03(±0.13)	2.84(±0.23)
15	0	3.56(±0.01)	3.27(±0.07)	3.12(±0.16)
	5	0.00(±0.00)	1.15(±0.10)	2.78(±0.23)
	10	0.00(±0.00)	0.91(±0.08)	2.64(±0.22)
	20	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	2.44(±0.13)
	30	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	2.22(±0.19)

หมายเหตุ^a จำนวนเซลล์ของ *B. cereus* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ppm ที่อุณหภูมิ 30±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค2 จำนวนเซลล์ *B. cereus* (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย คลอรีนไดออกไซด์

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/ml)		
		สารละลายเปปโตน	Chicken broth	TSB
5	0	6.33(±0.09) ^b	6.36(±0.08)	6.69(±0.05)
	5	1.25(±0.07)	6.14(±0.14)	6.49(±0.07)
	10	0.54(±0.34)	6.13(±0.17)	6.37(±0.22)
	20	0.00(±0.00)	6.13(±0.17)	6.13(±0.16)
	30	0.00(±0.00)	6.15(±0.13)	6.12(±0.17)
10	0	6.35(±0.08)	6.40(±0.13)	6.45(±0.13)
	5	0.00(±0.00)	6.14(±0.21)	6.18(±0.09)
	10	0.00(±0.00)	5.89(±0.05)	5.82(±0.08)
	20	0.00(±0.00)	5.28(±0.08)	5.22(±0.31)
	30	0.00(±0.00)	5.12(±0.10)	4.51(±0.05)
15	0	6.34(±0.03)	6.44(±0.09)	6.34(±0.17)
	5	0.00(±0.00)	4.69(±0.13)	5.36(±0.22)
	10	0.00(±0.00)	3.09(±0.13)	4.61(±0.04)
	20	0.00(±0.00)	2.26(±0.11)	3.22(±0.30)
	30	0.00(±0.00)	2.18(±0.40)	2.64(±0.08)

หมายเหตุ^a จำนวนเซลล์ของ *B. cereus* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ppm ที่อุณหภูมิ 30±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค3 จำนวนเซลล์ *S. aureus* (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย คลอรีนไดออกไซด์

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/ml)		
		สารละลายเปปโตเน	Chicken broth	TSB
5	0	3.19(±0.06) ^b	3.19(±0.09)	3.26(±0.06)
	5	0.00(±0.00)	3.19(±0.12)	3.18(±0.07)
	10	0.00(±0.00)	3.19(±0.10)	3.17(±0.04)
	20	0.00(±0.00)	3.13(±0.17)	3.11(±0.14)
	30	0.00(±0.00)	3.14(±0.18)	3.16(±0.07)
10	0	3.32(±0.02)	3.15(±0.09)	3.26(±0.06)
	5	0.00(±0.00)	3.10(±0.07)	3.09(±0.08)
	10	0.00(±0.00)	3.10(±0.06)	3.15(±0.09)
	20	0.00(±0.00)	3.09(±0.01)	3.16(±0.08)
	30	0.00(±0.00)	3.08(±0.06)	3.12(±0.11)
15	0	3.13(±0.03)	3.17(±0.13)	3.26(±0.06)
	5	0.00(±0.00)	2.83(±0.08)	3.03(±0.04)
	10	0.00(±0.00)	2.78(±0.05)	2.98(±0.13)
	20	0.00(±0.00)	2.78(±0.10)	3.01(±0.05)
	30	0.00(±0.00)	2.61(±0.16)	2.95(±0.17)

หมายเหตุ^a จำนวนเซลล์ของ *S. aureus* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ppm ที่อุณหภูมิ 30±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค4 จำนวนเซลล์ *S. aureus* (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลาย คลอรีนไดออกไซด์

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/ml)		
		สารละลายเปปโตน	Chicken broth	TSB
5	0	6.24(±0.04) ^b	6.21(±0.05)	6.27(±0.13)
	5	0.00(±0.00)	6.15(±0.06)	6.15(±0.13)
	10	0.00(±0.00)	6.18(±0.02)	6.10(±0.00)
	20	0.00(±0.00)	6.16(±0.08)	6.02(±0.03)
	30	0.00(±0.00)	6.15(±0.01)	5.95(±0.04)
10	0	6.20(±0.04)	6.16(±0.01)	6.27(±0.13)
	5	0.00(±0.00)	6.06(±0.10)	6.12(±0.04)
	10	0.00(±0.00)	6.06(±0.09)	6.08(±0.01)
	20	0.00(±0.00)	6.08(±0.04)	6.00(±0.04)
	30	0.00(±0.00)	6.02(±0.04)	5.96(±0.01)
15	0	6.22(±0.11)	6.11(±0.08)	6.27(±0.13)
	5	0.00(±0.00)	5.69(±0.13)	5.99(±0.04)
	10	0.00(±0.00)	5.63(±0.17)	5.96(±0.08)
	20	0.00(±0.00)	5.57(±0.09)	5.85(±0.07)
	30	0.00(±0.00)	5.61(±0.10)	5.87(±0.01)

หมายเหตุ^a จำนวนเซลล์ของ *S. aureus* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ppm ที่อุณหภูมิ 30±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค5 จำนวนสปอร์ของ *B. cereus* (ปริมาณสปอร์ตั้งต้นต่ำ) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนสปอร์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/ml)		
		สารละลายเปปโตन	Chicken broth	TSB
15	0	3.20(±0.06) ^b	3.15(±0.13)	3.18(±0.11)
	5	1.66(±0.17)	2.97(±0.14)	2.95(±0.12)
	10	1.58(±0.39)	2.72(±0.36)	2.92(±0.16)
	20	1.37(±0.27)	2.77(±0.16)	2.95(±0.08)
	30	1.33(±0.21)	2.65(±0.35)	2.89(±0.18)
30	0	3.17(±0.13)	3.07(±0.01)	3.19(±0.13)
	5	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	1.73(±0.12)
	10	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	1.55(±0.21)
	20	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	1.36(±0.06)
	30	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	1.09(±0.13)
50	0	3.18(±0.11)	3.15(±0.13)	3.18(±0.11)
	5	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)
	10	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)
	20	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)
	30	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)

หมายเหตุ^a จำนวนสปอร์ของ *B. cereus* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 15, 30 และ 50 ppm ที่อุณหภูมิ 30±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค6 จำนวนสปอร์ของ *B. cereus* (ปริมาณสปอร์ตั้งต้นสูง) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนสปอร์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/ml)		
		สารละลายเปปโตน	Chicken broth	TSB
15	0	5.94(±0.02) ^b	6.21(±0.04)	5.82(±0.11)
	5	5.22(±0.01)	5.84(±0.04)	5.48(±0.27)
	10	5.13(±0.04)	5.82(±0.06)	5.57(±0.01)
	20	5.17(±0.05)	5.78(±0.08)	5.71(±0.06)
	30	4.96(±0.30)	5.75(±0.17)	5.65(±0.01)
30	0	5.94(±0.02)	6.20(±0.05)	6.03(±0.13)
	5	2.43(±0.08)	2.63(±0.22)	5.54(±0.04)
	10	1.32(±0.03)	2.54(±0.00)	5.48(±0.02)
	20	0.00(±0.00)	2.38(±0.03)	5.51(±0.06)
	30	0.00(±0.00)	2.25(±0.08)	5.46(±0.13)
50	0	5.94(±0.02)	6.13(±0.04)	5.99(±0.07)
	5	0.00(±0.00)	0.45(±0.21)	2.47(±0.21)
	10	0.00(±0.00)	0.15(±0.21)	1.54(±0.17)
	20	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)
	30	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)

หมายเหตุ^a จำนวนสปอร์ของ *B. cereus* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 15, 30 และ 50 ppm ที่อุณหภูมิ 30±1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ๑๗ การลดลงของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (ปริมาณเชื้อตั้งต้นต่ำ) หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์

ความ เข้มข้น (ppm)	ร้อยละการลดลงของเซลล์หรือสปอร์ (%) ^a และเวลา (นาที)								
	สารละลายเปปโตน			TSB			Chicken broth		
	5	20	30	5	20	30	5	20	30
<i>B. cereus</i>									
5	100(±0.00) ^b	100(±0.00)	100(±0.00)	10.87(±0.11)	33.93(±0.17)	36.90(±0.19)	14.87(±0.26)	18.72(±0.16)	20.57(±0.23)
10	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	38.34(±0.19)	46.30(±0.18)	53.23(±0.23)	24.14(±0.23)	33.93(±0.14)	33.93(±0.13)
15	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	54.29(±0.23)	79.11(±0.13)	87.41(±0.19)	99.24(±0.10)	100(±0.00)	100(±0.00)
<i>S. aureus</i>									
5	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	16.82(±0.07)	29.20(±0.14)	20.57(±0.07)	0.00(±0.12)	12.90(±0.17)	10.87(±0.18)
10	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	32.39(±0.08)	20.57(±0.08)	27.56(±0.11)	10.87(±0.07)	12.90(±0.01)	14.89(±0.06)
15	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	41.12(±0.04)	43.77(±0.05)	51.02(±0.17)	54.29(±0.08)	59.26(±0.10)	72.46(±0.16)
สปอร์									
15	97.12(±0.17)	98.52(±0.27)	98.65(±0.21)	41.12(±0.12)	41.12(±0.08)	48.71(±0.18)	33.93(±0.14)	58.31(±0.16)	68.38(±0.35)
30	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	96.53(±0.12)	98.52(±0.06)	99.20(±0.13)	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)
50	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)

หมายเหตุ ^a ร้อยละการลดลงของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเหลวหลังสัมผัสคลอรีนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 30±1 °C เมื่อจำนวนเริ่มต้น 3.1-3.6 log CFU/ml

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ๑๘ การลดลงของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (ปริมาณเชื้อตั้งต้นสูง) หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์

ความเข้มข้น (ppm)	ร้อยละการลดลงของเซลล์หรือสปอร์ ^a (%) และเวลา (นาที)								
	สารละลายเปปโตน			TSB			Chicken broth		
	5	20	30	5	20	30	5	20	30
<i>B. cereus</i>									
5	>99.99(±0.07) ^b	100(±0.00)	100(±0.00)	36.90(±0.07)	72.46(±0.16)	73.08(±0.17)	39.74(±0.14)	41.12(±0.17)	38.34(±0.13)
10	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	46.30(±0.09)	94.11(±0.31)	98.85(±0.05)	45.04(±0.21)	92.41(±0.08)	94.75(±0.10)
15	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	89.53(±0.22)	99.92(±0.30)	99.98(±0.08)	98.22(±0.13)	99.99(±0.11)	99.99(±0.40)
<i>S. aureus</i>									
5	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	24.14(±0.13)	43.76(±0.03)	52.14(±0.04)	12.90(±0.06)	10.87(±0.08)	12.90(±0.01)
10	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	29.20(±0.04)	46.30(±0.04)	51.02(±0.01)	20.57(±0.10)	16.82(±0.04)	27.56(±0.04)
15	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	47.52(±0.04)	61.98(±0.07)	60.19(±0.01)	61.98(±0.13)	71.16(±0.09)	68.38(±0.10)
สปอร์									
15	80.95(±0.01)	83.05(±0.05)	89.53(±0.30)	54.29(±0.27)	27.56(±0.06)	32.39(±0.01)	57.34(±0.04)	62.85(±0.08)	65.33(±0.17)
30	99.97(±0.08)	100(±0.00)	100(±0.00)	67.64(±0.04)	69.80(±0.06)	73.08(±0.13)	99.97(±0.22)	99.98(±0.03)	99.99(±0.08)
50	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	99.97(±0.21)	100(±0.00)	100(±0.00)	>99.99(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)

หมายเหตุ ^a ร้อยละการลดลงของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเหลวหลังสัมผัสคลอรีนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 30±1 °C เมื่อจำนวนเริ่มต้น 5.8-6.7 log CFU/ml

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค9 จำนวนเซลล์ *B. cereus* ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำและระดับสูง

เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/ml)			
	สารละลายเปปโตน	Chicken broth	TSB	
ปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ				
0	3.13(±0.06) ^b	3.13(±0.06)	3.09(±0.05)	
5	0.00(±0.00)	1.59(±0.00)	2.78(±0.08)	
10	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	2.62(±0.10)	
20	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	2.25(±0.14)	
30	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	1.85(±0.04)	
ปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง				
0	6.33(±0.07)	6.40(±0.02)	6.27(±0.11)	
5	0.00(±0.00)	3.90(±0.14)	5.66(±0.33)	
10	0.00(±0.00)	2.75(±0.07)	4.51(±0.05)	
20	0.00(±0.00)	1.80(±0.14)	2.97(±0.48)	
30	0.00(±0.00)	1.78(±0.11)	2.87(±0.32)	

หมายเหตุ^a จำนวนเซลล์ของ *B. cereus* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm ที่อุณหภูมิ 30±1 °C เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ (3.1 log CFU/ml) และระดับสูง (6.3 log CFU/ml)

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค10 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำและระดับสูง

เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/ml)			
	สารละลายเปปโตน	Chicken broth	TSB	
ปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ				
0	3.14(±0.15) ^b	3.20(±0.04)	3.11(±0.11)	
5	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	2.97(±0.11)	
10	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	2.93(±0.11)	
20	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	2.88(±0.06)	
30	0.00(±0.00)	0.00(±0.00)	2.48(±0.45)	
ปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง				
0	6.17(±0.04)	6.34(±0.06)	6.18(±0.03)	
5	0.00(±0.00)	5.95(±0.01)	6.01(±0.17)	
10	0.00(±0.00)	5.62(±0.15)	5.93(±0.15)	
20	0.00(±0.00)	5.24(±0.21)	5.82(±0.18)	
30	0.00(±0.00)	4.49(±0.27)	5.49(±0.40)	

หมายเหตุ^a จำนวนเซลล์ของ *S. aureus* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm ที่อุณหภูมิ 30±1 °C เมื่อปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ (3.2 log CFU/ml) และระดับสูง (6.2 log CFU/ml)

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค11 จำนวนสปอร์ของ *B. cereus* ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด
เมื่อปริมาณสปอร์ตั้งต้นระดับต่ำและระดับสูง

เวลา (นาที)	จำนวนสปอร์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/ml)			
	สารละลายเปปโตน	Chicken broth	TSB	
ปริมาณสปอร์ตั้งต้นระดับต่ำ				
0	3.18(±0.12) ^b	3.16(±0.12)	3.17(±0.13)	
5	1.27(±0.10)	2.04(±0.08)	2.97(±0.08)	
10	0.30(±0.00)	1.73(±0.11)	2.87(±0.11)	
20	0.00(±0.00)	1.37(±0.24)	2.81(±0.19)	
30	0.00(±0.00)	1.15(±0.21)	2.70(±0.25)	
ปริมาณสปอร์ตั้งต้นระดับสูง				
0	5.99(±0.05)	6.14(±0.06)	6.19(±0.06)	
5	1.52(±0.52)	5.79(±0.21)	5.93(±0.25)	
10	1.32(±0.34)	5.73(±0.18)	5.70(±0.13)	
20	1.08(±0.00)	5.56(±0.11)	5.47(±0.14)	
30	0.93(±0.21)	5.37(±0.21)	5.48(±0.02)	

หมายเหตุ^a จำนวนสปอร์ของ *B. cereus* ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลซ์
ชนิดกรดความเข้มข้น 30 ppm ที่อุณหภูมิ 30±1 °C เมื่อปริมาณสปอร์ตั้งต้นระดับต่ำ
(3.2 log CFU/ml) และระดับสูง (6.1 log CFU/ml)

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค12 การลดลงของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด

	ร้อยละการลดลงของเซลล์หรือสปอร์ (%) ^a และเวลา (นาที)								
	สารละลายเปปโตน			TSB			Chicken broth		
	5	20	30	5	20	30	5	20	30
ปริมาณตั้งต้นระดับต่ำ									
<i>B. cereus</i>	100(±0.00) ^b	100(±0.00)	100(±0.00)	51.02(±0.08)	85.54(±0.14)	94.24(±0.04)	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)
<i>S. aureus</i>	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	27.56(±0.11)	41.12(±0.06)	76.56(±0.45)	97.54(±0.01)	100(±0.00)	100(±0.00)
สปอร์	98.77(±0.10)	100(±0.00)	100(±0.00)	36.90(±0.08)	56.35(±0.19)	66.12(±0.25)	92.41(±0.08)	98.38(±0.24)	99.02(±0.21)
ปริมาณตั้งต้นระดับสูง									
<i>B. cereus</i>	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	75.45(±0.33)	99.95(±0.48)	99.96(±0.32)	99.68(±0.14)	>99.99(±0.14)	>99.99 (±0.11)
<i>S. aureus</i>	100(±0.00)	100(±0.00)	100(±0.00)	32.39(±0.17)	56.35(±0.18)	79.58(±0.40)	59.26(±0.01)	92.06(±0.21)	98.59(±0.27)
สปอร์	>99.99(±0.52)	>99.99(±0.00)	>99.99(±0.21)	45.04(±0.25)	80.94(±0.14)	80.50(±0.02)	55.33(±0.21)	73.70(±0.11)	83.02(±0.21)

หมายเหตุ ^a ร้อยละการลดลงของเซลล์หรือสปอร์ในอาหารเหลวหลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรดที่อุณหภูมิ 30±1 °C เมื่อจำนวนเซลล์หรือสปอร์ตั้งต้นระดับต่ำ 3.09-3.20 log CFU/ml และจำนวนเซลล์หรือสปอร์ตั้งต้นระดับสูง 5.99-6.40 log CFU/ml

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 2

ตารางผนวกที่ ค13 การลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว เมื่อไม่มีและมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสคลอรีนไดออกไซด์

พื้นผิว	ความเข้มข้น (ppm)	ร้อยละการลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด (%) ^a และเวลา (นาท)									
		ฟิล์มชีวภาพของ <i>B. cereus</i>			ฟิล์มชีวภาพของ <i>S. aureus</i>			ความเข้มข้น (ppm)	สปอร์เกาะติด		
		5	10	30	5	10	30		5	10	30
เมื่อไม่มีการปนเปื้อน CB											
สแตนเลสสตีล	5	> 92.92	> 92.92	> 92.92	97.96	99.54	99.93	15	94.87	98.74	>99.83
	10	>97.86	>97.86	>97.86	>99.99	>99.99	>99.99				
ยาง	5	95.93	97.43	99.40	30.82	73.08	76.01	15	29.20	51.02	83.40
	10	99.87	99.91	>99.96	96.53	97.37	99.95				
	15	ND ^b	ND	ND	ND	ND	99.98				
พลาสติก	5	85.54	99.59	>99.74	97.12	99.49	99.90	15	97.86	>99.80	>99.80
	10	86.51	99.82	>99.80	54.29	96.11	99.81				
	15	ND	ND	ND	ND	ND	>99.99				
เมื่อมีการปนเปื้อน CB											
สแตนเลสสตีล	5	>96.76	>96.76	>96.76	71.82	87.41	93.39	15	98.71	>99.56	>99.56
	10	>96.02	>96.02	>96.02	99.58	99.98	>99.99				
ยาง	5	73.70	78.12	95.83	53.23	59.26	87.12	15	62.85	32.39	64.52
	10	99.70	99.72	99.89	86.20	95.32	99.88				
	15	>99.95	ND	ND	ND	ND	99.97				

ตารางผนวกที่ ค13 (ต่อ)

พื้นผิว	ความเข้มข้น	ร้อยละการลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด (%) ^a และเวลา (นาท)									
		ฟิล์มชีวภาพของ <i>B. cereus</i>			ฟิล์มชีวภาพของ <i>S. aureus</i>			ความเข้มข้น	สปอร์เกาะติด		
		5	10	30	5	10	30		5	10	30
พลาสติก	5	72.46	77.09	99.69	81.40	96.45	99.46	15	>99.73	>99.73	>99.73
	10	95.53	99.34	>99.90	76.56	98.26	99.93				
	15	ND	ND	ND	ND	ND	99.99				

หมายเหตุ ^a ค่าร้อยละการลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบ หลังสัมผัสสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 25±1 °C

^b ND, not determined (ไม่ได้ทำการทดลอง)

ตารางผนวกที่ ค14 การลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิว เมื่อไม่มีและมีการปนเปื้อน chicken broth หลังสัมผัสน้ำอเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด

พื้นผิว	ความเข้มข้น (ppm)	ร้อยละการลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด (%) ^a และเวลา (นาที)					
		ฟิล์มชีวภาพของ <i>B. cereus</i>		ฟิล์มชีวภาพของ <i>S. aureus</i>		สปอร์เกาะติด	
		10	30	10	30	10	30
เมื่อไม่มีการปนเปื้อน CB							
สแตนเลสสตีล	30	>93.69	>93.69	96.02	99.81	>99.86	>99.86
	52	ND	ND	99.85	>99.99	ND	ND
	76	ND	ND	>99.99	>99.99	ND	ND
ยาง	30	>99.94	>99.94	98.95	99.77	99.52	>99.97
	52	ND	ND	99.38	99.83	ND	ND
	76	ND	ND	99.62	99.94	ND	ND
พลาสติก	30	>99.74	>99.74	97.76	99.67	>99.76	>99.76
	52	ND	ND	99.04	99.92	ND	ND
	76	ND	ND	99.87	>99.99	ND	ND
เมื่อมีการปนเปื้อน CB							
สแตนเลสสตีล	30	>96.53	>96.53	98.85	99.98	>99.69	>99.69
	52	ND	ND	99.75	>99.99	ND	ND
	76	ND	ND	>99.99	>99.99	ND	ND

ตารางผนวกที่ ค14 (ต่อ)

พื้นผิว	ความเข้มข้น (ppm)	ร้อยละการลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติด (%) ^a และเวลา (นาที)					
		ฟิล์มชีวภาพของ <i>B. cereus</i>		ฟิล์มชีวภาพของ <i>S. aureus</i>		สปอร์เกาะติด	
		10	30	10	30	10	30
ยาง	30	99.46	>99.91	96.61	99.85	67.64	95.10
	52	ND	ND	98.45	99.91	ND	ND
	76	ND	ND	99.87	99.99	ND	>99.73
พลาสติก	30	97.81	>99.50	98.22	99.37	98.42	99.32
	52	ND	ND	98.65	99.72	ND	>99.97
	76	ND	ND	99.94	>99.99	ND	ND

หมายเหตุ ^a ค่าร้อยละการลดลงของเซลล์ในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบ หลังสัมผัสน้ำอิเล็กโทรไลซ์ชนิดกรด ที่อุณหภูมิ 25±1 °C

^b ND, not determined (ไม่ได้ทำการทดลอง)

ตารางผนวกที่ ค15 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ในฟิล์มชีวภาพที่รอดชีวิตบนแผ่นยางหลังสัมผัสสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 และ 15 ± 1 °C

สภาวะการล้าง	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ^a (log CFU/cm ²)	
	ฟิล์มชีวภาพที่ 28 °C	ฟิล์มชีวภาพที่ 15 °C
จำนวนเซลล์เริ่มต้น	6.02(± 0.13) ^b	5.91(± 0.17)
ClO ₂ 5 ppm, 30 นาที	4.94(± 0.24)	4.05(± 0.37)
ClO ₂ 10 ppm, 30 นาที	3.27(± 0.17)	2.11(± 0.12)
AcEW 30 ppm, 30 นาที	3.41(± 0.47)	2.24(± 0.12)
AcEW 52 ppm, 10 นาที	3.33(± 0.26)	2.66(± 0.06)
AIEW 10 นาที ติดตามด้วย AcEW 30 ppm, 30 นาที	2.41(± 0.20)	1.54(± 0.27)
AIEW 10 นาที ติดตามด้วย AcEW 52 ppm, 10 นาที	1.97(± 0.45)	1.57(± 0.10)

หมายเหตุ ^a จำนวนเซลล์ของ *S. aureus* ในฟิล์มชีวภาพที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C

^b ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n = 3

ภาคผนวก ง

การคำนวณปริมาณเซลล์หรือสปอร์บนพื้นผิว

ภาคผนวก ง

การคำนวณปริมาณเซลล์หรือสปอร์บนพื้นผิว

การตรวจหาปริมาณเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดบนพื้นผิวทำได้โดยการนำแผ่นพื้นผิวที่สร้างฟิล์มชีวภาพหรือสปอร์เกาะติดไว้ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์หรือสารละลาย D/E neutralizing broth 30 มิลลิลิตร และ เม็ดแก้วปัดลดเชื้อขนาดเล็กจำนวน 3 กรัม นำไปปั่นด้วยเครื่องผสมสารละลายด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำสารละลายดังกล่าว 1 มิลลิลิตรมาเจือจางและตรวจนับปริมาณเซลล์หรือสปอร์ วิธีการนี้เป็น การนับเชื้อในสารละลายไม่ได้นับปริมาณเชื้อบนพื้นผิวได้โดยตรง เพราะฉะนั้นเมื่อหาปริมาณเชื้อในสารละลายนี้แล้วต้องบวกค่าต่ำสุดของเชื้อที่สามารถตรวจวัดได้บนพื้นผิวด้วย สามารถคำนวณหาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ หรือ ค่า detection limit (Ryu and Beuchat, 2005; Kreske *et al.*, 2006) ได้ดังนี้

หลังจากการลอกเซลล์หรือสปอร์ออกจากพื้นผิวโดยใช้เม็ดแก้วขนาดเล็ก เชื้อเหล่านั้นจะอยู่ในสารละลาย 30 ml นำสารละลายดังกล่าว 1 ml มาตรวจนับปริมาณเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อตรวจไม่พบเชื้อในสารละลาย 1 ml สามารถคำนวณปริมาณเชื้อได้เท่ากับ 1 CFU/ml (0.00 log CFU/ml) แต่ในการหาปริมาณเชื้อบนพื้นผิวนั้นใช้สารละลาย 30 ml จึงต้องนำ 1 CFU/ml $\times$ 30 ได้เท่ากับ 30 CFU/ml เทียบเท่ากับ 1.48 log CFU/coupon และคิดเป็น log CFU/cm² โดยหารด้วยพื้นที่ของแผ่นพื้นผิวคือ 20 cm² (จากพื้นผิวนาขนาด 2 $\times$ 5 cm² $\times$ 2 ด้าน) ได้เท่ากับ 0.18 log CFU/cm² เพราะฉะนั้นเมื่อตรวจไม่พบเชื้อในสารละลายให้รายงานว่าปริมาณเชื้อบนพื้นผิวมีค่าน้อยกว่า 0.18 log CFU/cm²

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 19 พฤศจิกายน 2525
สถานที่เกิด	ปทุมธานี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ผลงานวิจัย	รวมเสนอผลงานวิชาการ เรื่อง “ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ และน้ำอเล็กโทรไลซ์ ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของบาซิลลัส ซีเรียส, สแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส และ สปอร์เกาะติดของบาซิลลัส ซีเรียส บน พื้นผิวสัมผัสอาหาร” ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา แห่งชาติ (Grad-Research) ครั้งที่ 6
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์วารสาร นานาชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์