

การเกิดไบโอฟิล์มของซูดอโมแนสบนเหล็กกล้าไร้สนิมและการถ่ายโอนของซูดอโมแนส
ระหว่างการหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

นางสาวปาริชาติ แสงสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FORMATION OF *Pseudomonas* BIOFILM ON STAINLESS STEEL AND TRANSFER OF
Pseudomonas DURING MEAT PRODUCT SLICING

Miss Parichart Sangsuwan

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

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเกิดไบโอฟิล์มของซูลโฟไมแนสบนเหล็กกล้าไร้สนิมและการถ่ายโอนของซูลโฟไมแนสระหว่างการหันผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์
โดย	นางสาวปาริชาติ แสงสุวรรณ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

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

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศศิกันต์ กู้พงษ์ศักดิ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์)

ปาริชาติ แสงสุวรรณ : การเกิดไบโอฟิล์มของซูดอโมแนสบนเหล็กกล้าไร้สนิมและการถ่ายโอนของซูดอโมแนสระหว่างการหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์. (FORMATION OF *Pseudomonas* BIOFILM ON STAINLESS STEEL AND TRANSFER OF *Pseudomonas* DURING MEAT PRODUCT SLICING) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร.รมณี สงวนดีกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร.สุเมธ ตันตระเจียร, 146 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยในการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร ได้แก่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในตัวอย่าง อุณหภูมิและชนิดของอาหาร พบว่าในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/mL) เพียงสัมผัส (0 นาที) ก็เพียงพอให้ *Pseudomonas fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีลเกรด 304 ชนิด 2B และตรวจพบเชื้อได้ ส่วนสภาวะที่มีเชื่อน้อย (3 log CFU/mL) ตรวจพบแบคทีเรียหลังจากทิ้งไว้ให้เพิ่มจำนวนเป็นเวลา 10 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถเกาะติดบนพื้นผิวสแตนเลสสตีลและเกิดไบโอฟิล์มได้ โดยพบว่า *P. fluorescens* สามารถเกาะติดและเพิ่มจำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์ $3.72 \pm 0.34 \log \text{CFU/cm}^2$ และจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมากที่สุดหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบได้ 48 ชั่วโมงโดยมีค่า $5.05 \pm 0.18 \log \text{CFU/cm}^2$ สำหรับในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/mL) *P. fluorescens* สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้บนพื้นผิวสแตนเลสสตีลที่อุณหภูมิ 28 °C ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 20 °C และ 15 °C โดยมีจำนวนเท่ากับ 4.97 ± 0.22 , 4.85 ± 0.18 และ $4.22 \pm 0.20 \log \text{CFU/cm}^2$ ที่ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงชนิดอาหารตัวกลาง ได้แก่ สารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5% w/v) พบว่า เมื่อบ่มแผ่นทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนของเซลล์บนแผ่นทดสอบในน้ำเกลือปลอดเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5% w/v) เพิ่มขึ้น โดยเซลล์สามารถเกาะติดและเกิดไบโอฟิล์มได้ใกล้เคียงกัน จากนั้นศึกษาการถ่ายโอนของเซลล์ของ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อสุกผลิตภัณฑ์อาหาร ในกรณีที่มีปริมาณเชื้อปนเปื้อนในตัวกลางเริ่มต้น 8 log CFU/mL พบว่าใบมีดที่มีการปนเปื้อน *P. fluorescens* Biofilm มีการถ่ายโอนเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์อาหารสูงกว่าการปนเปื้อนพื้นผิวด้วยเซลล์ *P. fluorescens* โดยสามารถตรวจพบจำนวนเซลล์ในผลิตภัณฑ์ชิ้นที่ 20 เป็นจำนวน $4.15 \pm 0.08 \log \text{CFU/g}$ และ $2.39 \pm 0.17 \log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ สำหรับการทดสอบที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/ml) พบว่าเมื่อใบมีดที่มีการปนเปื้อน *P. fluorescens* Biofilm สามารถตรวจพบเซลล์ในผลิตภัณฑ์ชิ้นที่ 20 เป็นจำนวน $1.83 \pm 0.12 \log \text{CFU/g}$ ในกรณีของการปนเปื้อนด้วยเซลล์ *P. fluorescens* สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์จากชิ้นเนื้อสไลซ์ เพียง 11 ชิ้น โดยชิ้นสุดท้ายมีจำนวนเซลล์ $1.09 \pm 0.04 \log \text{CFU/g}$ ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และกรดเปอร์รอกซีแอซิติก ในการลดปริมาณ *P. fluorescens* เมื่อแขวนลอยอยู่ในตัวกลางชนิดเหลว พบว่า เมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และกรดเปอร์รอกซีแอซิติกความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายเซลล์ *P. fluorescens* ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้ทั้งหมดภายในระยะเวลา 1 นาที แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากันในการลดปริมาณเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent พบว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลง ส่วนในกรณีของกรดเปอร์รอกซีแอซิติก พบว่าสารอาหารในตัวกลางไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณเซลล์ในไบโอฟิล์ม เมื่อสร้างสภาวะให้เกิดไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบ ใน TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 °C และทดสอบกับสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิด พบว่าเซลล์ของ *P. fluorescens* ในไบโอฟิล์มทนทานต่อสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดเพิ่มมากขึ้น โดยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 400 ppm ไม่สามารถทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้ทั้งหมดเมื่อครบเวลา 30 นาที ส่วนกรดเปอร์รอกซีแอซิติกความเข้มข้น 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้ทั้งหมดภายใน 30 นาที

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิติ.....
 สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.....2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072649623 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : BIOFILM/ *PSEUDOMONAS*/ SANITIZER/ TRANSFER

PARICHART SANGSUWAN: FORMATION OF *Pseudomonas* BIOFILM ON STAINLESS STEEL AND TRANSFER OF *Pseudomonas* DURING MEAT PRODUCT SLICING. ADVISOR: ASST. PROF. ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph. D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUMATE TANTRATIAN, M. Sc., 146 pp.

Factors affecting attachment and biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 on food contact surface made of stainless steel grade 304/2B were studied, namely initial load of bacterial contamination in the medium, temperature and type of contaminated medium. The studies were done by following the attachment and biofilm formation on the stainless steel coupons for 48 hours under three different treatments: (i) initial inoculums in the medium (8 log and 3 log CFU/mL), (ii) incubation temperature (15, 20 and 30 °C), (iii) type of medium (0.85% NaCl, TSB, soiling agent (beef meat 5% w/v)). It was found that at 0 minute (immediately contact) bacterial cell in the contaminated medium can attach and grow on coupons. The influence of incubation temperature and initial cells of inoculums were studied together. The results showed that at initial contamination load of 3 log CFU/mL, no cell can be detected up to 9 hours but at 24 and 48 hours the number of the bacterial cells were 3.72 ± 0.34 and 5.05 ± 0.18 log CFU/cm², respectively. The experiment using 8 log CFU/mL gave similar results. The number of the bacterial cells on coupons at 28 °C was higher than at 20 and 15 °C, respectively. Whereas, cells could attach and form biofilm nearly the same in different medium (0.85% NaCl, TSB, soiling agent) at 24 hour. The transfer of *P. fluorescens* cells and *P. fluorescens* Biofilm from a contaminated domestic slicing machine to a cooked meat product during slicing were studied. The results showed that the number of cells transferred per slice during slicing by blade contaminated with *P. fluorescens* Biofilm was higher than blade contaminated with *P. fluorescens* cells. For the high contaminated medium of 8 log CFU/mL, the number of cells in the last slice (20 slices) of meat in the case of blade contaminated with *P. fluorescens* Biofilm and contaminated with *P. fluorescens* cells were 4.15 ± 0.08 and 2.39 ± 0.17 log CFU/g, respectively. While for the low contaminated medium of 3 log CFU/mL, the number of cells in the last slice (20 and 11 slices in contaminated with *P. fluorescens* Biofilm and with *P. fluorescens* cells, respectively.) of meat in the case of blade contaminated with *P. fluorescens* Biofilm and with *P. fluorescens* cells were 1.83 ± 0.12 log CFU/g and 1.09 ± 0.04 log CFU/g, respectively. The efficacy of sodium hypochlorite (NaOCl) and peroxyacetic acid (POA) were investigated. In planktonic cells, the results showed that NaOCl and POA 100 ppm completely eliminated cells within 1 minute in high contaminated (8 log CFU/mL) 0.85% NaCl. However, the same concentration of NaOCl showed less effective in eliminating cells when tested in both TSB or soiling agent. The efficacies of both sanitizers on *Pseudomonas* biofilm were test at 30 minutes. The results showed that at NaOCl 400 ppm couldn't completely eliminate cells in biofilm but POA 50 ppm could completely eliminate cells in biofilm.

Department : Food Technology Student's Signature

Field of Study : Food Technology Advisor's Signature

Academic Year : 2010 Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษา และความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง คำแนะนำ ข้อคิด ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ซึ่งประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒน์ (ประธานกรรมการสอบ) อาจารย์ ดร. ศศิกานต์ กุ้พงษ์ศักดิ์ (กรรมการ) และรองศาสตราจารย์ ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์ (กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย) ผู้ให้ความกรุณาสละเวลามาร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และได้ให้ความรู้ พร้อมทั้งมอบคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ทั้งในด้านวิชาการ คุณธรรม และจริยธรรม ซึ่งเป็นรากฐานในการศึกษาค้นคว้างานวิจัยและการดำเนินชีวิต

วิทยานิพนธ์เรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๒ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ และขอขอบคุณบริษัทไทยน็อคซ์สตีล จำกัด ที่อนุเคราะห์เหล็กกล้าไร้สนิมสำหรับใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณรุ่นพี่และเพื่อนนิสิตปริญญาโทในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจตลอดการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการวิจัย

ท้ายสุดนี้งานวิจัยฉบับนี้คงไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้หากผู้วิจัยไม่ได้รับการสนับสนุนจากบิดา มารดา คุณยาย พี่สาว น้องชาย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ศศิรินทร์ แลบัว และบุคคลอันเป็นที่รักของผู้วิจัยทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ความห่วงใยตลอดจนมอบกำลังใจอันมีค่ายิ่งเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณยิ่ง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 กลไกการเกิดไบโอฟิล์ม.....	4
2.1.1 การเกาะติดบนพื้นผิวของจุลินทรีย์ (Attachment)	4
2.1.2 การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ (Colonization)	7
2.1.3 การเจริญเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (Maturation)	8
2.2 การเกิดไบโอฟิล์มและผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหาร	9
2.3 การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์ม.....	11
2.3.1 วิธีทางกายภาพ	11
2.3.2 วิธีการทางเคมี.....	12
2.3.3 วิธีการทางชีวภาพ.....	16
2.4 ความสำคัญและการปนเปื้อนของ <i>Pseudomonas</i> spp. ในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	17
2.4.1 <i>Pseudomonas</i> spp. กับการเน่าเสียของอาหาร	18
2.5 เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel).....	20
2.5.1 ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม.....	21
2.5.2 พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิม.....	22
2.5.3 ความต้านทานการกัดกร่อน	23
2.5.4 เหล็กกล้าไร้สนิมในอุตสาหกรรมอาหารเนื้อและสัตว์ปีก	24
2.6 คลอรีนและสารประกอบคลอรีน	25
2.6.1 การใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนในอุตสาหกรรมอาหาร.....	26
2.6.1.1 คุณสมบัติและกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน	26
2.6.1.2 การใช้สารประกอบคลอรีนในการลดปริมาณจุลินทรีย์.....	29
2.6.1.3 ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของโซเดียมไฮโปคลอไรท์.....	29

บทที่	หน้า
2.6.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีน และสารประกอบคลอรีน.....	31
2.6.1.5 การใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนในอุตสาหกรรมอาหาร.....	33
2.6.1.6 ข้อจำกัดในการใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีน.....	33
2.6.2 กรดเปอร์รอกซีแอสติก.....	35
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	36
3.1 จุลินทรีย์ทดสอบ.....	36
3.2 พื้นผิวทดสอบ.....	36
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	36
3.4 สารเคมี.....	37
3.5 สารฆ่าเชื้อ.....	37
3.6 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	37
3.7 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย.....	38
3.7.1 การเตรียมเซลล์ <i>P. fluorescens</i> และการนับจำนวนเซลล์.....	38
3.7.1.1 การเตรียมพื้นผิวทดสอบ.....	38
3.7.1.2 การนับปริมาณเซลล์ <i>P. fluorescens</i>	38
3.7.2 ศึกษาการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์ม.....	39
3.7.2.1 การเตรียมพื้นผิวทดสอบ.....	39
3.7.2.2 การทดสอบการเกาะติด (Attachment) ของ <i>P. fluorescens</i>	39
3.7.2.3 การเกิดไบโอฟิล์ม (Biofilm formation).....	39
3.7.2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดไบโอฟิล์ม.....	40
3.7.2.5 การตรวจวิเคราะห์การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวทดสอบ.....	40
3.7.3 การประเมินผลการเกิดไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> บนพื้นผิวทดสอบด้วย Scanning Electron Microscope (SEM).....	41
3.7.4 การถ่ายโอนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> จากเครื่องสไลซ์เนื้อสุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร.....	41
3.7.4.1 การเตรียมเครื่องสไลซ์เนื้อ (Slicing machine).....	41
3.7.4.2 การเตรียมไบโอดิสเท็นเลสสตีลที่มีเซลล์ <i>P. fluorescens</i> และ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว.....	42
3.7.4.3 การถ่ายโอนของเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอดิสเท็นเลสสตีลเนื้อสุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร.....	42
3.7.4.3.1 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย ของ <i>P. fluorescens</i> บนพื้นผิวไบโอดิสเท็นเลสสตีล.....	43

บทที่	หน้า
3.7.4.3.2 การตรวจหาปริมาณการถ่ายโอนของเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อสุผลิตภัณฑอาหาร	44
3.7.5 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์ และไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i>	44
3.7.5.1 สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....	44
3.7.5.2 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในตัวกลางอาหารชนิดเหลว.....	44
3.7.5.3 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร.....	45
3.7.5.4 การตรวจนับปริมาณเซลล์ <i>P. fluorescens</i> ที่เหลือรอดชีวิตด้วยวิธี Spread plate technique.....	46
3.7.5.4.1 การตรวจนับปริมาณเซลล์ <i>P. fluorescens</i> ในตัวกลางอาหารชนิดเหลวที่เหลือรอดชีวิต	46
3.7.5.4.2 การตรวจนับปริมาณเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวสัมผัสอาหารที่เหลือรอดชีวิต	46
3.7.5.5 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์ม <i>P. fluorescens</i> ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อ.....	47
3.7.5.5.1 การตรวจนับปริมาณเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อ	47
3.7.6 การวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine	48
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	49
4.1 ศึกษาการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์ม	49
4.1.1 การเกาะติดของ <i>P. fluorescens</i> บนแผ่นสแตนเลสสตีล.....	49
4.1.2 การเกิด <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนแผ่นสแตนเลสสตีล	51
4.1.3 อุณหภูมิและปริมาณเชื้อที่มีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์ม.....	55
4.1.4 การเปลี่ยนแปลงสารอาหารของตัวกลางชนิดเหลวต่อการเกิดไบโอฟิล์ม	58
4.2 ลักษณะไบโอฟิล์มบนแผ่นพื้นผิวทดสอบเมื่อตรวจด้วย Scanning Electron Microscope (SEM).....	63
4.3 การเกาะติดของเซลล์ <i>P. fluorescens</i> และ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อ.....	66
4.3.1 การถ่ายโอนของเซลล์ <i>P. fluorescens</i> และ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อสุผลิตภัณฑอาหาร.....	68

บทที่	หน้า
4.3.1.1 การถ่ายโอนของเซลล์ <i>P. fluorescens</i> ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อสุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร	68
4.3.1.2 การถ่ายโอนของเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อสุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร	71
4.4 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์ <i>P. fluorescens</i>	75
4.4.1 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการทำลายเซลล์ในตัวอย่างชนิดเหลวที่เซลล์แขวนลอยอยู่	76
4.4.2 ประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก 5% ในการทำลายเซลล์ในตัวอย่างชนิดเหลวที่เซลล์แขวนลอยอยู่	85
4.5 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ <i>Pseudomonas fluorescen</i> บนพื้นผิวทดสอบ	92
4.5.1 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการทำลายไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> บนแผ่นทดสอบ	92
4.5.2 ประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก 5% ในการทำลายไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> บนแผ่นทดสอบ	94
4.6 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อ	96
4.6.1 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการทำลายไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อ	97
4.6.2 ประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก 5% ในการทำลายไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อ	99
5 สรุปผลการทดลอง	105
รายการอ้างอิง	108
ภาคผนวก	116
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง	117
ภาคผนวก ข สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	120
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์หาปริมาณ Available chlorine	121
ภาคผนวก ง ตารางแสดงข้อมูล	123
ภาคผนวก จ การคำนวณการถ่ายโอนเซลล์ของ <i>P. florescens</i>	145
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	146

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและการเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสม	13
2.2 การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ	
พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร	14
2.3 ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่แนะนำให้ใช้ในการฆ่าเชื้อ	
พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร	15
2.4 ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบทางเคมีของเหล็กกล้าไร้สนิม	22
2.5 ชนิดของเหล็กกล้าไร้สนิม	23
2.6 ตัวอย่างการเลือกใช้เหล็กกล้าไร้สนิมในอุตสาหกรรมอาหารประเภทสัตว์ปีก	25
2.7 สารประกอบคลอรีนที่นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อจลินทรีย์	28
2.8 สารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรม	28
2.9 ข้อกำหนดการใช้สารประกอบคลอรีนและไฮโปคลอไรท์ใน	
อุตสาหกรรมอาหารของ U.S. FDA	34
4.1 จำนวนเซลล์ <i>P. fluorescens</i> และ <i>P. fluorescens</i> Biofilm	
ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อ	67
4.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณสารอินทรีย์ในตัวอย่างชนิดเหลวทั้ง 3 ชนิด	76
4.3 ค่า pH และปริมาณของ available chlorine ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์	
ที่ใช้ในการทำลายเซลล์ <i>P. fluorescens</i> ที่อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส	83
4.4 ค่า pH หลังจากสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์สัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์	
ในตัวอย่างชนิดเหลว 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส	84
4.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของกรดเปอร์รอกซีแอซิดิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ	90
4.6 ค่า pH หลังจากกรดเปอร์รอกซีแอซิดิกสัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์	
ในตัวอย่างชนิดเหลว 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส	91

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 กระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม.....	8
2.2 การเกิด Passive layer ของ stainless steel.....	24
4.1 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> บนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่จุ่ม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/ mL ณ เวลาต่างๆ กัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส	50
4.2 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B เมื่อจุ่มใน อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหาร TSB หลอดใหม่ (B) จำนวนเซลล์อิสระของ <i>P. fluorescens</i> ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส	52
4.3 (A) จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B เมื่อจุ่มใน อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 3 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหาร TSB หลอดใหม่ (B) จำนวนเซลล์อิสระของ <i>P. fluorescens</i> ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส	53
4.4 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> บนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่จุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/ mL ณ เวลาต่างๆ กัน โดยบ่ม ที่อุณหภูมิ 28± 2, 20± 2, 15± 2 องศาเซลเซียส.....	56
4.5 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มอยู่ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส.	59
4.6 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มอยู่ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส	60
4.7 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งของ สารอาหารชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส	60
4.8 การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> บนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL)	64
4.9 การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> บนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL)	65
4.10 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์ จากไบโอดิสเทนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโบลอนาสไลซ์ จากไบโอดิสเทนเลสสตีลที่มีเซลล์ <i>P. fluorescens</i> ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	69
4.11 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์ จากไบโอดิสเทนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโบลอนาสไลซ์ จากไบโอดิสเทนเลสสตีลที่มีเซลล์ <i>P. fluorescens</i> ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 3 log CFU/mL)	70

รูปที่	หน้า
4.12 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์ จากไบโอมัดเดนเลสสตีลสูงขึ้นไปในน้ำไลซ์ จากไบโอมัดเดนเลสสตีลที่มีเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	72
4.13 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์ จากไบโอมัดเดนเลสสตีลสูงขึ้นไปในน้ำไลซ์ จากไบโอมัดเดนเลสสตีลที่มีเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	73
4.14 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	77
4.15 ร้อยละการลดลงของเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ภายหลังจากสัมผัส สารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 30 นาที.....	78
4.16 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	79
4.17 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ภายหลังจากสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	80
4.18 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในสารละลาย soiling agent ที่รอดชีวิต หลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	80
4.19 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในสารละลาย soiling agent ภายหลังจากสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	81
4.20 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอสติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	86
4.21 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ภายหลังจากสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอสติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	86
4.22 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่รอดชีวิต หลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอสติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	87

รูปที่	หน้า
4.23 เปรียบเทียบบร้ยลดการลดลงของเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ TSB ภายหลังสัมผัสผัสดูดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	88
4.24 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในสารละลาย soiling agent ที่รอดชีวิต หลังสัมผัสผัสดูดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	89
4.25 เปรียบเทียบบร้ยลดการลดลงของเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ในสารละลาย soiling agent ภายหลังสัมผัสผัสดูดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	89
4.26 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิต หลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL)	93
4.27 เปรียบเทียบบร้ยลดการลดลงของเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/mL).....	93
4.28 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิต หลังสัมผัสผัสดูดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที	95
4.29 เปรียบเทียบบร้ยลดการลดลงของเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสผัสดูดเปอรร์อกซีแอซีติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 30 นาที.....	95
4.30 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวใบมีดสแตนเลสตีล ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 30 นาที.....	98
4.31 เปรียบเทียบบร้ยลดการลดลงของเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิว ใบมีดสแตนเลสตีล ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที.....	98
4.32 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวใบมีดสแตนเลสตีล ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสผัสดูดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 30 นาที.....	100
4.33 เปรียบเทียบบร้ยลดการลดลงของเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิว ใบมีดสแตนเลสตีล ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสผัสดูดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที.....	100

รูปที่	หน้า
ง 1 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่สามารถเกาะติดบนพื้นผิว stainless steel เกรด 304 ชนิด 2B ที่ระยะเวลาต่างๆ	123
ง 2 การเกิดไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> บนพื้นผิวทดสอบ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิต่างๆ	124
ง 3 การเกิดไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> บนพื้นผิวทดสอบ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิต่างๆ	125
ง 4 การเจริญของเซลล์ <i>P. fluorescens</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีแผ่นทดสอบชนิดต่างๆ จุ่มอยู่ใน เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) และเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL).....	126
ง 5 การเกิดไบโอฟิล์มของ <i>P. fluorescens</i> บนพื้นผิวทดสอบ เมื่อเปลี่ยนตัวกลางอาหารชนิดเหลวต่างๆ ที่อุณหภูมิ	127
ง 6 จำนวนเซลล์ <i>P. fluorescens</i> และ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อ โดยทดสอบปริมาณ เซลล์ตั้งต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) และระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส	128
ง 7 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากโม่มีดสแตนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโม่โลน่าสไลซ์ จากโม่มีดสแตนเลสสตีลที่มีเซลล์ <i>P. fluorescens</i> ปนเปื้อนบนพื้นผิว ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง (8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส	129
ง 8 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากโม่มีดสแตนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโม่โลน่าสไลซ์ จากโม่มีดสแตนเลสสตีลที่มีเซลล์ <i>P. fluorescens</i> ปนเปื้อนบนพื้นผิว ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส	130
ง 9 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากโม่มีดสแตนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโม่โลน่าสไลซ์ จากโม่มีดสแตนเลสสตีลที่มีเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง (8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส	131
ง 10 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากโม่มีดสแตนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโม่โลน่าสไลซ์ จากโม่มีดสแตนเลสสตีลที่มีเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส	132
ง 11 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนแผ่นทดสอบที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	133

รูปที่	หน้า
ง 12 ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนแผ่นทดสอบที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	134
ง 13 ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนแผ่นทดสอบที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ	135
ง 14 ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนแผ่นทดสอบที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ	136
ง 15 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวโพลีเมทิลเมทาคริลที่รอดชีวิตหลังสัมผัส สารละลายไฮโดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	137
ง 16 ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวโพลีเมทิลเมทาคริลที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรอกไซด์ที่ ความเข้มข้นต่างๆ	138
ง 17 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวโพลีเมทิลเมทาคริล ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ	139
ง 18 ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm บนพื้นผิวโพลีเมทิลเมทาคริลที่รอดชีวิตหลังสัมผัส กรดเปอร์ออกซีแอซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ	140
ง 19 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	141
ง 20 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	142
ง 21 จำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอซิติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ	143
ง 22 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ <i>P. fluorescens</i> (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอซิติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ	144

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันผู้บริโภคตื่นตัวในเรื่องความปลอดภัยของอาหารเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นความปลอดภัยทั้งทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ ทำให้ผู้ผลิตอาหารต้องดำเนินกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวกับระบบการจัดการด้านความปลอดภัยอย่างเคร่งครัด ซึ่งระบบพื้นฐานที่ต้องจัดทำ ได้แก่ ระบบ GMP (Good Manufacturing Practices) ที่ว่าด้วยการจัดการและควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัย และ ระบบ HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) ซึ่งเป็นระบบประกันคุณภาพด้านความปลอดภัยของอาหาร (Shia and Zhu, 2009) ในการผลิตอาหารให้ปลอดภัยนั้นการทำความสะอาดมีความสำคัญอย่างมาก หากการทำความสะอาดไม่เพียงพอ จะทำให้มีการสะสมของแบคทีเรียและเกิดการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิตได้

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

ในการผลิตอาหารที่มีวัตถุดิบเป็นเนื้อสัตว์นั้น มีจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและทำให้เกิดโรคกับผู้บริโภคได้อยู่หลายชนิด ในกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ ชูโดโมแนสเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สำคัญในการทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดี (Wiedmann et al., 2000; Olofsson, Ahrne and Molin, 2007) ไบโอฟิล์มอาจจะจับหรือปกป้องจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคให้รอดชีวิตอยู่ภายในฟิล์มได้ ในแง่ความปลอดภัยของอาหาร

มีความสำคัญอย่างยิ่งถ้าไบโอฟิล์มเกิดขึ้นจากการรวมตัวของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารเป็นพาหะ เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น Oulahal และคณะ (2007) รายงานว่า ไบโอฟิล์มของแบคทีเรียทำให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพจึงให้ความสำคัญเกี่ยวกับการศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มและการกำจัดไบโอฟิล์ม หากจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารก็จะทำให้อาหารไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ด้วยเหตุนี้การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยการเกิดไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas* และการส่งผ่านของซูโดโมแนสไบโอฟิล์มจากเครื่องสไลซ์เนื้อซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารรวมทั้งการป้องกันและควบคุมไบโอฟิล์มเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยเพื่อพัฒนาสุขภาพลักษณะของกระบวนการผลิตอาหาร และจะเป็นแนวทางหนึ่งในการวิเคราะห์ปัญหาการเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อควบคุมแหล่งสะสมของจุลินทรีย์ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพและช่วยให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารน้อยลง ผู้ประกอบการในอุตสาหกรรมอาหารและผู้ให้บริการอาหารสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการเกิดไบโอฟิล์ม วิธีการควบคุมไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นและ ศึกษาการถ่ายโอนของซูโดโมแนสระหว่างการหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จากเครื่องสไลซ์เนื้อสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร โดยได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกาะติดของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร และการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มภายใต้สภาวะต่างๆ ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ปริมาณเชื้อ ชนิดของอาหาร ส่วนที่สองมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายหรือลดปริมาณเซลล์อิสระและ *Pseudomonas* biofilm บนพื้นผิวสัมผัสนั้น ส่วนที่สามศึกษาการถ่ายโอนเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* และไบโอฟิล์มของแบคทีเรียชนิดนี้ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อระหว่างการหั่นสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ในโรงงานผลิตอาหารอาจมีการปนเปื้อนข้ามจากวัตถุดิบ พื้นผิวที่มีการสัมผัสอาหาร พนักงานการผลิต เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องมีการสุขาภิบาลโรงงานอาหารที่ดี การทำความสะอาด และการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวชนิดต่างๆ โดยเฉพาะพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับอาหารโดยตรง เช่น พื้นผิวอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต ท่อ สายพานการผลิต เป็นต้น หากพื้นผิวดังกล่าว มีการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อที่ไม่เพียงพอ จะทำให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์และ เจริญเป็นไบโอฟิล์มได้

ในกระบวนการผลิตอาหารที่มีวัตถุดิบเป็นเนื้อสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นสัตว์ปีกหรือเนื้อ ต่างๆนั้นอาจมีจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและทำให้เกิดโรคปนเปื้อนอยู่หลายชนิด ในกระบวนการตัดหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เหล่านี้ หากมีการสะสมของจุลินทรีย์ที่ส่วนของใบมีด จะทำให้เกิดการส่งผ่านเชื้อจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์ได้ ชูโดโมแนสเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สำคัญ ทำให้เกิดการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (Wiedmann et al., 2000; Olofsson et al., 2007) การเกิดชูโดโมแนสไบโอฟิล์มที่พื้นผิวสัมผัสอาหารจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตนั้นมีปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูง อายุการเก็บสั้น ทำให้อาหารเสื่อมเสียและไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ไบโอฟิล์ม คือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวและฝังตัวอยู่ภายใต้สารกลุ่มพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์นั้นสร้างขึ้นแล้วหลั่งออกมาออกเซลล์ เรียกสารกลุ่มนี้ว่า Extracellular Polymeric Substances (EPS) (Costerton and Lewandowski, 1995; Garrett et al., 2008) เกิดขึ้นเมื่อมีการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวดังกล่าวไม่เพียงพอ ทำให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์และเจริญกลายเป็นไบโอฟิล์ม (Marshall, 1994; Flint, Bremer and Brooks, 1997) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้บนพื้นผิวชนิดต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะพื้นผิวสัมผัสอาหาร เช่นพื้นผิวอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต ท่อ สายพานการผลิต เป็นต้น ดังนั้นการเกาะติดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารของจุลินทรีย์และเจริญเป็นไบโอฟิล์มมีความสำคัญต่อโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมจุลินทรีย์และเป็นสาเหตุหนึ่งของการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตและหลังกระบวนการผลิต

ทำให้อาหารอาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและส่งผลกระทบต่อทำให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมอาหารได้ มักพบไบโอฟิล์มในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานผลิตอาหาร , โรงงานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม, โรงพยาบาล, ระบบน้ำ, เป็นต้น

ไบโอฟิล์มเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านการสุขาภิบาลในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากการเกาะติดของแบคทีเรียและเกิดไบโอฟิล์มจะทำให้ถูกกำจัดได้ยากเพราะสามารถทนทานต่อสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อ แบคทีเรียสร้างไบโอฟิล์มเพื่อป้องกันตัวเองต่อสารฆ่าเชื้อหรือสารทำความสะอาด และเพื่อให้ทนภาวะแวดล้อมต่างๆ (Garrett et al.,2008) ดังนั้นการทำความสะอาดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการผลิตอาหารเนื่องจากเป็นส่วนที่มีการสัมผัสกับอาหารโดยตรง ถ้าพื้นผิวสัมผัสมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่มากก็จะมีส่วนในการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ให้กับอาหาร Jessen และ Lammert (2003) รายงานว่า หลังจากการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิตแฮมด้วยสารทำความสะอาดร่วมกับสารประกอบคลอรีนหรือสารผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับกรดเปอร์แอสติก แล้วยังคงพบแบคทีเรียมากถึง 3-4 log CFU/cm² ซึ่งการที่มีจุลินทรีย์หลงเหลืออยู่นี้ถือเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้

2.1 กลไกการเกิดไบโอฟิล์ม

กลไกเชิงลึก (molecular-based mechanisms) ของการเกิดไบโอฟิล์มจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มนั้นเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นและเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (dynamic process) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การเกาะติดบนพื้นผิวของจุลินทรีย์ การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์และการเจริญเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (Poulsen, 1999)

2.1.1 การเกาะติด (Attachment) บนพื้นผิวของจุลินทรีย์

การเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิวของอาหารหรือวัสดุที่สัมผัสกับอาหารอาจเกิดขึ้นได้จากตัวเซลล์หรือการกระทำจากภายนอก โดยจะมีการเกาะติดแบบพาสซีฟ (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 การเกาะติดของเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ (กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล, 2550)

ระยะที่ 1 การเกาะติดแบบผันกลับ (reversible adhesion) เซลล์แบคทีเรียจะเกิดพันธะอย่างอ่อนกับพื้นผิว ได้แก่ แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waals forces) electrostatic forces และ hydrophobic interaction ในระยะนี้เซลล์แบคทีเรียยังมีการเคลื่อนที่แบบบราวน์เนียน (brownian movement)

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) เชื่อมต่อระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับพื้นผิวทำให้มีการยึดเกาะที่เหนียวแน่นกว่าในระยะแรก ทำให้การกำจัดเซลล์แบคทีเรียในระยะนี้ออกไปทำได้ยากขึ้น

Zottola (1994) รวบรวมข้อมูลเพื่ออธิบายกลไกการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่างๆ โดยแสดงความสัมพันธ์ของแรงยึดเกาะกับระยะห่างของเซลล์กับพื้นผิว เมื่อมีสารอาหารหลงเหลือบนพื้นผิวจนเกิดเป็นฟิล์มของอาหาร (conditioning film) เซลล์จุลินทรีย์อิสระที่อยู่ในสภาพแวดล้อมจะเคลื่อนที่เข้าหาพื้นผิว เซลล์จะเกิดการเกาะติดกับพื้นผิวด้วยพันธะอย่างอ่อน เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์จะเข้าไปใกล้ผิวมากขึ้น แรงยึดเกาะนั้นจะเพิ่มขึ้น ทั้งสองระยะนี้จะเป็นขั้นตอนของการเกาะติดแบบผันกลับได้ จนในที่สุดเซลล์จุลินทรีย์เหล่านั้นจะเกิดการสร้างพันธะพิเศษเกิดเป็นการเกาะติดแบบไม่ผันกลับ เซลล์ต่างๆ เหล่านี้จะมีการเจริญเพิ่มจำนวนและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มต่อไป

กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล (2550) รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิว พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิว ได้แก่

1. ชนิดและโครงสร้างของเซลล์ คุณลักษณะทางเคมีกายภาพส่งผลต่อการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียบนผิววัสดุ อัตราการเจริญ สารอาหาร อุณหภูมิและเวลาในการเจริญเติบโต มีผลต่อคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ เซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้างบนเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) หรือ LPS โปรตีนแอดฮีซินและโปรตีนชนิดอื่น กรดไทโคอิก (teichoic acid) เป็นต้น โครงสร้างเหล่านี้จะแสดงถึงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ของเซลล์ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเกาะติดบนพื้นผิว

2. สภาพแวดล้อมและองค์ประกอบของสารอาหารที่อยู่ล้อมรอบ เมื่อมีการสะสมของสารอาหารบนพื้นผิวจนเป็นลักษณะของฟิล์ม เรียกว่า conditioning film จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีและกายภาพของพื้นผิว เช่น ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว (surface free energy) ความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity) และประจุของพื้นผิว เป็นต้น ซึ่งอาจส่งผลถึงการเกาะติดของจุลินทรีย์ (Garrett et al., 2008) มีงานวิจัยรายงานว่า สารอินทรีย์บนพื้นผิวนั้นสนับสนุนให้จุลินทรีย์เกาะติดบนพื้นผิวได้ดีขึ้น (Zottola, 1994; Poulsen, 1999) แต่อย่างไรก็ตาม บางงานวิจัยรายงานว่า สารอินทรีย์ เช่น นมและโปรตีนนมมีผลในการลดการเกาะติดของ *Salmonella Typhimurium* และ *L. monocytogenes* ได้ (Hood and Zottola, 1997) นอกจากนี้ปัจจัยของสารอินทรีย์แล้ว อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบสของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมยังส่งผลต่อการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มด้วย

3. ลักษณะและคุณสมบัติของพื้นผิว อัตราการเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นกับลักษณะทางกายภาพของพื้นผิว ได้แก่ ความขรุขระของผิววัสดุ (roughness) ค่าพลังงานอิสระของพื้นผิว ความเป็นไฮโดรโฟบิกที่ดีและประจุบนพื้นผิว ความสามารถในการเปียกน้ำ (wettability) หรือพลังงานอิสระ (free surface energy) มีอิทธิพลต่อการเกาะติดของเชื้อแบคทีเรีย พื้นผิววัสดุที่มีพลังงานอิสระสูงมากได้แก่ สเตนเลสสตีลและแก้ว มักจะมีความไม่ชอบน้ำต่ำ (more hydrophilic) แบคทีเรียสามารถเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวได้ง่ายกว่าวัสดุที่มีความเปียกน้ำได้ง่าย (hydrophobic)

เช่น เทฟลอน (Teflon) ไนลอน (nylon) ยาง (buna-N rubber) เป็นต้น (Blackman and Frank, 1996) มีบางงานวิจัยพบว่า แบคทีเรียบางชนิดสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกมากกว่าพื้นผิวไฮโดรฟิลิก การทำความสะอาดพื้นผิวอาจเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีกายภาพของพื้นผิววัสดุได้ เช่นการทำความสะอาดด้วยกรดหรือด่างอย่างแรงทำให้ผิววัสดุมีความไม่ชอบน้ำต่ำลง นอกจากนี้ยังมีรายงานที่พื้นผิวลักษณะเป็นรูพรุน ไม่สม่ำเสมอ มีรอยแยก จะทำให้เกิดการเกาะติดได้ดีกว่าพื้นผิวเรียบ Oulahal และคณะ (2007) รายงานว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกาะติดบนพื้นผิวของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับระยะเวลาเจริญของเซลล์ ชนิด และคุณสมบัติของพื้นผิว ปริมาณสารอินทรีย์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และคุณสมบัติ เช่นเดียวกับ Stanga (2010) สรุปว่าชนิดและคุณสมบัติของพื้นผิว สภาพแวดล้อมทั้งทางเคมีและทางกายภาพต่างๆ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการเกาะติดและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มได้

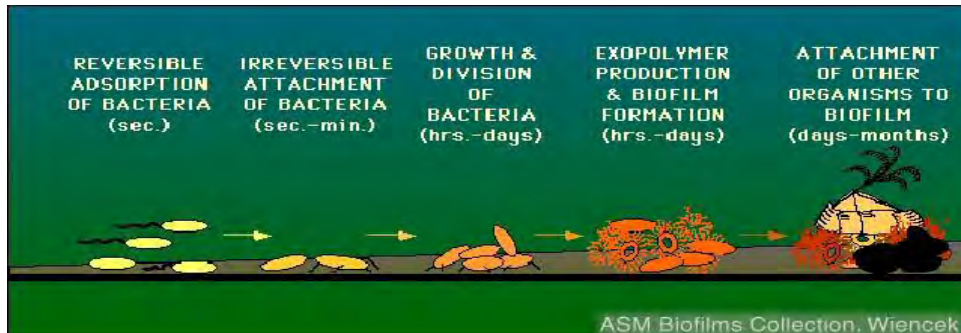
2.1.2 การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ (Colonization)

หลังจากเซลล์มีการเกาะติดในระยะที่ 2 การเกาะติดแบบไม่ผันกลับแล้ว เซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บและอดอาหารจะมาพักรักษาตัวเริ่มมีการสังเคราะห์กรดไขมันและโปรตีน จากนั้นเซลล์จะมีการเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปโดยใช้สารอาหารที่มีอยู่รอบ ๆ ในสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็ก (microcolony) ซึ่งกลุ่มของเซลล์นี้จะขยายใหญ่และเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) ปกคลุมบริเวณพื้นผิว microcolony อาจประกอบด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวหรือหลายๆสายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ล้อมรอบกลุ่มเซลล์ กลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กจะมีเซลล์อยู่ 10-25% และมีสาร Extracellular Polymeric Substances (EPS) ซึ่งเป็นสารกลุ่มพอลิเมอร์ที่เซลล์หลั่งออกมา และปกคลุมอยู่ที่ผิวของเซลล์ 75-90 % (Poulsen, 1999) EPS นี้จะช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

2.1.3. การเจริญเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (Maturation)

กลุ่มเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นทับกันและเกิดเป็นชั้นของเซลล์ภายใต้สาร EPS จะเกิดการพัฒนเป็นไบโอฟิล์มและมีโครงสร้างรูปเห็ด (mushroom-like shape) (Jessen and Lammert, 2003) โครงสร้างของไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่อาจเป็นชั้นของเซลล์เพียงชั้นเดียวภายใต้โครงข่ายของ EPS ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (porous) หรือเป็นชั้นของเซลล์หลายชั้นซ้อน

กันโดยมีการเชื่อมกันด้วย EPS และมีช่องสำหรับลำเลียงน้ำ (water channel) กระจายอยู่ทั่วไป



รูปที่ 2.1 กระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม

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

นอกจากสาร EPS จะมีหน้าที่สำคัญในการเชื่อมโยงเซลล์ภายในไบโอฟิล์มและยึดเหนี่ยวเซลล์กับพื้นผิวแล้ว ยังมีความสำคัญในการอยู่รอดของไบโอฟิล์มด้วย EPS มีหน้าที่ห่อหุ้มและกักเก็บสารอาหารไว้เก็บกักเซลล์ภายในฟิล์มชีวภาพช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้ง สารเคมีต่างๆ เป็นต้น จากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์มสามารถทนต่อสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อหลายชนิดได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลาย (planktonic cell) เนื่องจากการซึมผ่านเข้าอย่างจำกัดของสารฆ่าเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์มถูกปกคลุมด้วย exopolymer matrix ซึ่งเป็นสารจำพวกโพลีเมอร์ของคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนมากที่ไบโอฟิล์มสร้างขึ้นมา หรือที่เรียกว่าสาร Extracellular Polymeric Substances (EPS)

สาร EPS นี้ทำให้สารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อซึมเข้าไปทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้น้อยลงและอาจทำหน้าที่จับกับสารฆ่าเชื้อ โดยสารที่มีขนาดใหญ่เช่น โปรตีน ไลโซไซม์และคอมพลีเมนต์จะไม่สามารถซึมผ่านได้ Lewis (2005) รายงานว่า กลไกการซึมผ่านของสาร EPS ในไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas aeruginosa* จะทำให้ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่เข้ามาในไบโอฟิล์มต่ำ โดยมีการปล่อย β -lactamase ออกมาทำลายสารฆ่าเชื้อและเป็นสาเหตุให้ไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะมาก

2.2 การเกิดไบโอฟิล์มและผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหาร

การเกาะติดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารของจุลินทรีย์และเจริญเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm formation) มีผลกระทบต่อโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตและหลังกระบวนการผลิต อาจจะทำให้เกิดการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพส่งผลให้อาหารคุณภาพลดต่ำลงและไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ส่งผลกระทบต่อให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมอาหารได้ ไบโอฟิล์มสามารถเกิดขึ้นได้บนพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเมื่อพื้นผิวดังกล่าวผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อไม่ดีพอ โดยเฉพาะพื้นผิวที่สัมผัสอาหาร เช่น ผงแป้ง ท่อน้ำทิ้ง พื้นผิววัสดุยาง สายพานการผลิตและเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิต เป็นต้น (Kumar and Anand, 1998)

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

Frank (2001) รายงานว่า ในระบบของโรงงานอาหารที่มีการใช้น้ำมาก พื้นผิวที่เปียกมักเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์ โดยพบว่าจุลินทรีย์บางชนิดที่แยกมาจากไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Yersinia enterocolitica* เป็นต้น สามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่ไม่ได้อยู่รูปของไบโอฟิล์ม

นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของอาหารเองได้ เช่น *Escherichia coli* บนหนังไก่, *Listeria monocytogenes* บนผักผลไม้ และ *Pseudomonas spp.*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* บนเนื้อสัตว์ชนิดอื่น เป็นต้น ซึ่งหากปล่อยให้กลายเป็นไบโอฟิล์มจะไม่สามารถกำจัดได้หมดโดยการล้างด้วยน้ำสะอาด เช่นเดียวกับ Garrett และคณะ (2008) รายงานว่าตรวจพบจุลินทรีย์ในโรงงานการผลิตเนื้อสัตว์ โดยตรวจพบบริเวณพื้นที่การผลิต อุปกรณ์ และเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและสัมผัสกับอาหาร จากรายงานการวิจัยต่างๆ จะเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์มากมายถูกตรวจพบบนพื้นผิวสัมผัสอาหารและเกิดการสร้างเป็นไบโอฟิล์มได้ ซึ่งเซลล์ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์มจะมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จนทำให้มีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมอาหารถ้ามีการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต

การที่เซลล์จุลินทรีย์ภายใต้ไบโอฟิล์มสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น เกิดจาก (Poulsen, 1999)

1. สารพอลิเมอร์ที่เซลล์สร้างขึ้นปกคลุมไว้มีผลในการลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ
2. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์
3. ความจำกัดของสารอาหารทำให้เซลล์เกิดการปรับตัวและชักนำเข้าสู่สภาวะเครียด
4. ความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ภายใต้ไบโอฟิล์มที่มีการตอบสนองต่อสารฆ่าเชื้อได้แตกต่างกัน

ดังนั้นการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อด้วยวิธีปกติอาจไม่เพียงพอในการทำลายและการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนผิวได้ ซึ่งการหลงเหลือของจุลินทรีย์ถือเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้ การพบเชื้อบนพื้นผิวที่สามารถปนเปื้อนสู่อาหารได้

2.3 การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์ม

การกำจัดไบโอฟิล์มในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเป็นเรื่องที่มีความสำคัญทางการจัดการด้านการทำความสะอาด เริ่มจากผู้ที่มีส่วนรับผิดชอบเรื่องการทำความสะอาดตั้งแต่เริ่มก่อสร้าง รวมไปถึงวิธีการและความถี่ในการทำความสะอาด สารเคมีที่ใช้ การเก็บรักษา สารเคมี แหล่งของสารและวัสดุอุปกรณ์ การอบรมพนักงาน ดังนั้นอาจเรียกว่าโปรแกรมหรือแผนการทำความสะอาดและสุขาภิบาล (cleaning and sanitation program) การกำหนด

โปรแกรมการทำความสะอาดและสุขาภิบาลที่ดี มีประสิทธิภาพจะช่วยลดการสะสมของไบโอฟิล์มได้ อย่างไรก็ตามการกำจัดไบโอฟิล์มเป็นเรื่องยากมาก การกำหนดโปรแกรมการทำ ความสะอาดจะต้องเลือกวิธีที่มีประสิทธิภาพและประหยัดค่าใช้จ่าย

ขั้นตอนในการกำจัดและการทำลายไบโอฟิล์มรวมทั้งการควบคุมไม่ให้เกิดไบโอฟิล์ม ประกอบด้วย การทำความสะอาด (cleaning) และการฆ่าเชื้อ (sanitizing) ส่วนใหญ่เริ่มจากการใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็นล้างสิ่งสกปรกต่างๆออกจากพื้นผิว และใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การขัดถูร่วมกับสารทำความสะอาด เป็นต้น เพื่อล้างส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ที่ฝังแน่นออกไป จากนั้นจะใช้สารฆ่าเชื้อเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์ หากการใช้สารทำความสะอาดล้างสารอินทรีย์ได้ไม่หมด สารฆ่าเชื้อจะไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นการเลือกวิธีการทำลาย ชนิดและความเข้มข้นของสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสม รวมถึงระยะเวลาในการทำความสะอาดจึงมีความสำคัญอย่างมากในการทำความสะอาดและสุขาภิบาลที่ดี (ณฐนนท์ ตราชู, 2551; Marriott and Gravani 2006)

การกำจัดและการทำลายไบโอฟิล์มสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่ (Marriott and Gravani, 2006; Stanga, 2010)

2.3.1 วิธีทางกายภาพ

การทำลายไบโอฟิล์มด้วยวิธีทางกายภาพสามารถทำได้หลายวิธี การใช้แรงกลในการขัดลอกไบโอฟิล์มเป็นวิธีที่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรมแต่ไม่เหมาะกับพื้นผิวขรุขระ ปัจจุบันจึงมีการประยุกต์ใช้วิธีอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น การใช้แรงดันสูง (high pressure) การใช้คลื่นเสียง (sonication) เป็นต้น นอกจากนี้การใช้น้ำที่อุณหภูมิสูงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มได้ Kumar และ Anand (1998) พบว่า ในระบบน้ำดื่มจะต้องใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 100 นาทีหรืออาจจะใช้ระบบหมุนเวียนของน้ำที่มีอุณหภูมิ 80 °C จึงจะทำลายไบโอฟิล์มได้ เช่นเดียวกับ Orth (1998) รายงานว่า การใช้สารทำความสะอาดที่อุณหภูมิสูง (70-80°C) จะทำให้สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และลดปริมาณเชื้อได้เพิ่ม 99.99 % นอกจากนี้วิธีที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการใช้วิธีอื่น ๆ ได้แก่ Super-high magnetic field, Ultrasound treatment, High pulsed electrical field และ Low electrical field เป็นต้น (Kumar and Anand, 1998)

2.3.2 วิธีการทางเคมี

การกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มประกอบด้วย การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ ในการทำความสะอาดจำเป็นต้องกำจัดเศษอาหารและสารอินทรีย์ต่างๆ ที่ช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์และล้างส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ที่ฝังแน่นออกไป สารทำความสะอาดที่ดีจึงต้องมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว ทำให้ไขมันกระจายตัวออกและย่อยสลายโปรตีนได้ เพื่อกำจัด EPS ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปกคลุมเซลล์ออกไป สารทำความสะอาดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือสารทำความสะอาดชนิดเบสและชนิดกรด ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่นิยมใช้ เป็นสารประกอบชนิดเบสที่มีฤทธิ์ในการกำจัดไขมันและโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมีความหลากหลายและมีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้ สารทำความสะอาดที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ Marriott และ Gravani (2006) แนะนำการเลือกใช้สารทำความสะอาดสำหรับพื้นผิว ชนิดต่างๆ (ตารางที่ 2.1) โดยพื้นผิวประเภทแก้ว เซรามิก สแตนเลสสตีลและพลาสติก ควรใช้สารทำความสะอาดชนิดเบส (alkaline detergent) หรือสารไม่มีประจุ (nonionic detergent) ถึงแม้ว่าการทำความสะอาดจะสามารถ ทำลายไบโอฟิล์มบางส่วนได้ แต่จุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้ไบโอฟิล์มนั้นอาจไม่ถูกทำลายไปด้วย หากการใช้สารทำความสะอาดล้างสารอินทรีย์ได้ไม่หมด สารฆ่าเชื้อจะไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นขั้นตอนการฆ่าเชื้อหลังจากทำความสะอาด จึงมีความสำคัญอย่างมากในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 2.1 พื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและการเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสม

วัสดุ	ลักษณะ	ข้อควรระวัง
ไม้	ดูดซับความชื้นและไขมันได้ ยากต่อการดูแลรักษา ถูกทำลายด้วยสารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อน	ไม่ควรนำมาใช้เพราะยากต่อการทำความสะอาดควรเลือกใช้วัสดุอื่นแทน เช่น โพลีเอทิลีนและยาง
โลหะ	สามารถเกิดสนิมได้เมื่อสัมผัสกับสารทำความสะอาดที่มีกรดหรือคลอรีนเป็นส่วนประกอบ สารที่เหมาะสมคือ พวกที่มีฤทธิ์เป็นกลาง	โลหะมีโอกาสในการเกิดสนิมได้จึงควรเคลือบด้วยดีบุกหรือสังกะสี
คอนกรีต	อาจถูกกัดกร่อนจากสารทำความสะอาด สารที่เหมาะสมคือพวกที่มีฤทธิ์เป็นกรด	คอนกรีตควรแข็งแรงทนต่อกรด
แก้ว	พื้นผิวเรียบและสามารถกันน้ำได้ อาจถูกกัดกร่อนได้เมื่อใช้สารทำความสะอาดที่มีความเป็นเบสมาก	แก้วควรทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาดที่มีความเป็นกลางหรือเบส
ยาง	ยางที่เลือกใช้ไม่ควรเป็นรูปทรงแบบเปิดเปลี่ยนแปลงเมื่อล้างด้วยสารทำความสะอาดชนิดเบส แต่อาจเสื่อมสภาพได้ถ้าใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และกรดเข้มข้น	แผ่นยางที่นำมาใช้งานไประยะหนึ่งอาจจะเกิดการโค้งงอ
สแตนเลสสตีล	ต้านทานต่อการกัดกร่อน พื้นผิวเรียบและกันน้ำได้ ต้านทานการ oxidation ที่อุณหภูมิสูงทำความสะอาดได้ง่าย	ราคาแพง บางชนิดถูกทำลายด้วยสารในกลุ่มฮาโลเจน (คลอรีน ไอโอดีน โบรมีนและฟลูออรีน)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriott และ Gravani (2006)

การฆ่าเชื้อมีจุดประสงค์เพื่อทำลายกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นไบโอฟิล์มซึ่งถูกปกคลุมด้วยสาร EPS สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ ได้แก่ สารในกลุ่มฮาโลเจน เช่น คลอรีนและไอโอดีน เป็นต้น สารประกอบเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ และสารประกอบแอมโมเนีย ดังแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ

สารฆ่าเชื้อ	การประยุกต์ใช้
คลอรีน	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยการฉีดพ่นแบบ clean-in-place (CIP) และฉีดพ่น
ไฮโอไดน	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด ใช้ในการฆ่าเชื้อที่มือโดยการจุ่ม (hand dip)
กรดเปอร์แอกซิดิก	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิดโดยวิธี CIP โดยเฉพาะในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำและมีคาร์บอนไดออกไซด์
Acid anionics	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยการสเปรย์การใช้ร่วมกับสารฆ่าเชื้อและกรด
Quaternary ammonium	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด ส่วนใหญ่ใช้ในควบคุมสิ่งแวดล้อม เช่น ผงซักฟอก เป็นต้น

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriott และ Gravani (2006)

ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อมีความสำคัญอย่างมากในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร เวลาในการสัมผัส ปริมาณสารอินทรีย์ ความกระด้างของน้ำ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และความสามารถของสารในการเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์ สมบัติของสารฆ่าเชื้อที่ดีควรมีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิดอย่างรวดเร็ว ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา และมีประสิทธิภาพดีเมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาพที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง ความกระด้างของน้ำสูง ค่าความเป็นกรด-เบสไม่คงที่ เป็นต้น สารฆ่าเชื้อที่ดียังควรละลายน้ำได้ดี ใช้งานง่าย ราคาไม่แพง ตรวจจับง่าย และที่สำคัญต้องไม่เป็นพิษหรือระคายเคืองต่อร่างกาย การเลือกใช้สารฆ่าเชื้อความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำทำความสะอาดพื้นผิวชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ที่แนะนำให้ใช้ในการฆ่าเชื้อพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

บริเวณหรือพื้นผิว	สารฆ่าเชื้อที่แนะนำให้ใช้	ความเข้มข้น (ppm)
เครื่องมือที่มีพื้นผิวของอะลูมิเนียม	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	1000-2000
	Quat	500-800
ถังพลาสติก	Iodophor	25
พื้นผิวที่มีรูพรุน	Active chlorine	200
เครื่องมือที่ใช้ผลิต (อะลูมิเนียม)	Quat	200
	Iodophor	25
เครื่องมือที่ใช้ผลิต (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	1000

หมายเหตุ Quat^a = Quaternary ammonium compound

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriott และ Gravani (2006)

2.3.3 วิธีการทางชีวภาพ

การใช้วิธีทางชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากผู้บริโภคอาหารส่วนใหญ่ให้ความสำคัญเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารมากขึ้น ดังนั้นจึงมีการนำสารชีวภาพ เช่น แบคทีริโอซิน (bacteriocin) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ มาใช้เคลือบบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารเพื่อยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย การใช้ประโยชน์จากสาร nisin ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างโดยเชื้อจุลินทรีย์ สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเสื่อมเสียบางชนิดได้ โดยนำ nisin ผสมกับวัสดุขึ้นรูปพลาสติกเป็นภาชนะบรรจุชนิดต่างๆ ทำให้ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ เป็นต้น นอกจากนี้สารในกลุ่มแบคทีริโอซินแล้ว เอนไซม์เป็นสารชีวภาพกลุ่มหนึ่งที่ถูกเลือกใช้ในการทำลายไบโอฟิล์ม เพราะเอนไซม์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และจุลินทรีย์ต่างๆได้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัด EPS และไบโอฟิล์มได้ แต่เอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์แตกต่างกัน จึงมีข้อจำกัดในการเลือกใช้ ดังนั้นจึงต้องเลือกชนิดของเอนไซม์ให้จำเพาะกับชนิดของสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์ที่สร้างไบโอฟิล์มชนิดนั้น เช่น การใช้เอนไซม์ protease amylase และ glucanase ผสมรวมกัน พบว่าสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้ดี นอกจากนี้ยังมีการคิดค้นเอนไซม์ endoglycosidases ที่ใช้ทำลายเมือกของไบโอฟิล์มได้ ซึ่งจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อได้ (กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล, 2550)

ดังนั้นการกำหนดโปรแกรมการทำความสะอาดที่ดีจะช่วยลดการสะสมของจุลินทรีย์ได้ วิธีการที่ใช้ได้ผลและประหยัดคือการใช้แปรงธรรมดาๆขัดไบโอฟิล์มออก แต่เครื่องจักรบางตัวใช้วิธีนี้ได้ยาก (Kumar and Anand, 1998 ; Marriott and Gravani , 2006 ; Shia and Zhu, 2009) ณฐนนท์ ตราชู (2551) รายงานว่า การใช้สารฆ่าเชื้อ เช่น คลอรีน เป็นต้น เพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถทำลายเซลล์ไบโอฟิล์มได้หมด แต่อาจเป็นการกระตุ้นการเจริญหรือการแพร่ขยายของเซลล์จุลินทรีย์ ในขั้นตอนการทำความสะอาดคลอรีนจะไปทำลายไบโอฟิล์มส่วนนอกซึ่งเป็นเซลล์ที่แก่แล้วออกไป จะทำให้ไบโอฟิล์มที่เหลือซึ่งเกาะติดอย่างแน่นในชั้นที่ใกล้กับพื้นผิวและที่ทนต่อสารฆ่าเชื้อ สามารถได้รับทั้งน้ำและอาหารได้ดีขึ้น ทำให้เซลล์สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนี้การใช้สารฆ่าเชื้อไม่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้หมดและกระตุ้นให้เชื้อจุลินทรีย์สร้าง EPS เพิ่มมากขึ้น (Marshall, 1994; Costerton and Lewandowski, 1995) ดังนั้นการกำจัดไบโอฟิล์มจึงต้องอาศัยการขัดถูร่วมด้วยและมีการเลือกใช้สารฆ่าเชื้อที่เหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ อายุของไบโอฟิล์ม การกระจายตัว และวัสดุของพื้นผิว จะสามารถทนต่อการกัดกร่อนของสารเคมีที่ใช้และเป็นระบบที่ต้องสัมผัส

กับอาหารหรือไม่ เพราะสารเคมีบางอย่าง เช่น Quaternary Ammonium Compounds เป็นต้น จะเหลือคราบไว้บนผิว จึงเหมาะสำหรับการล้างพื้น ฝาผนัง เพราะสามารถออกฤทธิ์ได้นาน ปัจจุบันได้มีการนำสารจำพวก peracids เช่น peracetic acid และ peroctanoic acids เป็นต้น ซึ่งแตกตัวให้กรดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจน จัดเป็นสารในกลุ่ม oxidizing agent เช่นเดียวกับคลอรีน มีงานวิจัยรายงานว่า กรดเหล่านี้สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ดี และปริมาณของสารอินทรีย์ในน้ำไม่ได้มีผลต่อประสิทธิภาพมากนัก ไม่มีผลกีดกักร่อนต่อเหล็กกล้าไร้สนิมเท่ากับคลอรีนและกรดสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้ (ณฐนนท์ ตราชู, 2551; Kunigk and Almeida, 2001)

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

2.4 ความสำคัญและการปนเปื้อนของ *Pseudomonas* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ซูโดโมแนสเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ พบได้ทั่วไปในดิน น้ำและสิ่งแวดล้อมในโรงงานอุตสาหกรรม มีรูปร่างเป็นแท่ง มีแฟลกเจลลา ติดสี่แกรมลอบ ไม่สร้างสปอร์ ต้องการอากาศ ขนาดตั้งแต่ 0.5-0.7×2 ไมโครเมตร อยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ทนความเย็นได้ (Psychrotrophs) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในเนื้อสัตว์ที่อุณหภูมิ 2 – 15 °C (Gill and Newton, 1997) อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 25-30 °C ส่วนใหญ่พบมากในอาหารสด เนื้อสัตว์ต่าง ๆ พวกพืชผักและผลไม้โดยเฉพาะอาหารแช่เย็น เนื่องจากหลายสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียประเภททนความเย็นและสามารถสร้างเอนไซม์ได้ เป็นแบคทีเรียที่ทำให้อาหารหลายชนิดเน่าเสียมีผลกระทบต่อความปลอดภัยของอาหาร เช่น เกิด

การเปลี่ยนแปลงกลีโคลิค สี หรือเกิดเมือก และเนื้อสัมผัสเปลี่ยนไป เป็นต้น (Sillankorva et al., 2004)

นอกจากนี้ยังพบว่าซูดอโมแนสบางสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ในการก่อให้เกิดโรคปอดบวมและทำให้ติดเชื้อซ้ำซ้อนในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง แผลไฟไหม้ ระบบทางเดินปัสสาวะ รวมทั้งในกระแสเลือดด้วย จัดเป็นจุลินทรีย์เชื้อโรคที่มักพบได้บ่อยในโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และพบได้ทั่วไปในโรงงานอาหาร เช่น ทางระบายน้ำเสีย พื้นในวัตถุดิบที่เป็นผักผลไม้ และเนื้อสัตว์หรือแม้แต่ในน้ำนมดิบ เป็นต้น เชื้อชนิดนี้สามารถสร้างสารกลุ่มพอลิเมอร์ได้ (EPS) ออกมาได้เป็นจำนวนมาก มีงานวิจัยรายงานว่าซูดอโมแนสเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีในหลายสภาวะ Hood and Zottola (1997) ศึกษาการเกาะติดบนพื้นผิวสเตนเลสสตีลของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรค พบว่า *P. fragi* และ *P. fluorescens* สามารถเกาะติดบนพื้นผิวสเตนเลสสตีลได้ดีในขณะที่เซลล์เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซูดอโมแนสเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ตรวจพบได้ทั่วไปในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร จึงถูกนำมาวิจัยเกี่ยวกับไบโอฟิล์มเป็นอย่างมาก (Wiedmann et al., 2000; Olofsson et al., 2007)

2.4.1 *Pseudomonas* spp.กับการเน่าเสียของอาหาร

ผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นอาหารของมนุษย์ประมาณร้อยละ 30 ต้องเสื่อมคุณภาพไปจนไม่สามารถนำมาใช้เป็นอาหารบริโภคได้ ประมาณว่าร้อยละ 70 ของอาหารที่มนุษย์บริโภคเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ (สุมนทนา วัฒนสินธุ์, 2549) ดังนั้นการมีความรู้ในเรื่องธรรมชาติของอาหาร การดูแลคุณภาพของอาหารหลังการเก็บเกี่ยวและการควบคุมจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องจะลดการเน่าเสียของอาหารได้ และสามารถนำอาหารเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารได้

การเน่าเสียของอาหารที่เกี่ยวข้องกับ *Pseudomonas* spp. ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังนี้ (สุมนทนา วัฒนสินธุ์, 2549)

1. นมและผลิตภัณฑ์ ในกรณีแม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ตรวจพบมากในน้ำนม น้ำนมที่รีดได้จะมีจำนวน

จุลินทรีย์สูงไม่สามารถใช้เป็นอาหารได้ ก่อให้เกิดความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมนํ้านมได้ นอกจากโรคเต้านมอักเสบแล้วการติดเชื้อของแม่โคก็สามารถแพร่เชื้อผ่านมาทางนํ้านมเป็นผลให้ปริมาณจุลินทรีย์ในนํ้านมดิบสูงขึ้น

2. การเน่าเสียของเนื้อสัตว์ เนื้อสัตว์มี pH, a_w และสารอาหารเหมาะสมกับการเจริญและการขยายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทุกชนิด จึงเน่าเสียได้ง่าย (perishable food) โดยเฉพาะที่บริเวณผิวหนังของเนื้อจะเน่าเสียก่อนส่วนอื่น เนื่องจากแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ จินส์ที่พบมาก คือ *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella* และ *Aeromona* สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2549) รายงานว่าการเน่าเสียของเนือบด มักเกิดจากแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ ก่อนที่เนื้อจะเน่าเสียจะพบจุลินทรีย์ที่สร้างเม็ดสี (pigment) เป็นจำนวนมาก ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ ราและแบคทีเรียสร้างสปอร์ แต่หลังจากเนื้อเน่าเสียแล้วจะพบแบคทีเรียที่ไม่สร้างเม็ดสี แบคทีเรียท่อนสั้น ติดสีแกรมลบและเจริญที่อุณหภูมิต่ำ แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการ จะเจริญสู่แบคทีเรียจำพวก *Pseudomonas*, *Acinetobacter* และ *Moraxella* ไม่ได้ จากการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อสัตว์เน่าเสีย ปรากฏผลตรงกันว่า เกิดจากแบคทีเรียจำพวกซูโดโมแนสเป็นส่วนใหญ่ Barnes และ Impey (1968) ศึกษาแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อไก่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเน่าเสีย พบว่าในช่วงแรกก่อนที่เนื้อจะมีกลิ่นผิดปกติ แบคทีเรียจำพวก *Pseudomonas* type I ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างเม็ดสี (pigments) เช่น *Pseudomonas fluorescens* จะพบมากในเนื้อไก่ เมื่อเนื้อไก่อมีกลิ่นเหม็น แบคทีเรียที่ให้เม็ดสีจะลดลงเปลี่ยนเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างเม็ดสี เช่น *Pseudomonas* type II ซึ่งให้ก๊าซไนโตรเจนเป็นแบคทีเรียที่พบมาก

3. อาหารทะเล ได้แก่ กุ้ง หอย ปู ปลา กุ้ง และปลาหมึก เนื้อเยื่อภายในของสัตว์เหล่านี้ตามปกติจะปลอดเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกับเนื้อสัตว์แต่จุลินทรีย์จากภายนอกอาจปนเปื้อนเข้าไป มีผลทำให้อาหารทะเลเน่าเสียเร็วขึ้น จุลินทรีย์ในปลาปนเปื้อนได้ 3 ทาง คือ ทางผิวหนัง ทางเหงือก และระบบทางเดินอาหาร ส่วนมากเป็นแบคทีเรียแกรมลบจินส์ *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium* และ *Cytophaga* เป็นต้น

4. ไข่ ปกติไข่สดจะปราศจากเชื้อ แต่เปลือกภายนอกของไข่อาจมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดปนเปื้อน เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่มีความชื้นสูงไข่จะเก็บไว้ได้ไม่นาน เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญได้ดีและสามารถผ่านรูเปลือกไข่เข้าไปสู่ภายในเนื้อไข่ได้ แบคทีเรียจะใช้ไข่แดงเป็นอาหารเกิดการย่อยสลายโปรตีนและกรดอะมิโน ได้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์และสารที่มีกลิ่นเหม็น *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่พบบ่อยในไข่เน่า ซึ่งจะทำให้ไข่มีลักษณะการเน่าเสียของต่างๆ กัน เช่น Green rots, Colorless rots, Black rots และ Pink rots เป็นต้น (สุมนธนา วัฒนสินธุ์, 2549)

นอกจากชูดิเมเนสเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารหลายชนิดเน่าเสียแล้ว นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร *P. fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนได้ เนื่องจากสร้างเอนไซม์หรือน้ำย่อยโปรตีน ออกมาย่อยสลายโปรตีนในเนื้อสัตว์และสัตว์น้ำที่นำมาแปรรูปโดยอาศัยกระบวนการหมัก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสชาติและกลิ่นรสเฉพาะแต่ละผลิตภัณฑ์ มีรายงานการวิจัยพบว่า แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* จะสร้างเอนไซม์โปรตีนเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงมีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์ประมงที่แปรรูปโดยอาศัยกระบวนการหมัก เช่น ปลาร้า นูดู กะปิ น้ำปลา เป็นต้น (Gram, 2010)

2.5 เหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel)

เหล็กกล้าไร้สนิมหรือสแตนเลสสตีลนั้น ในทางโลหกรรมถือว่าเป็นโลหะผสมเหล็กที่มีโครเมียมอย่างน้อยที่สุด 10.5% เนื่องจากโลหะผสมดังกล่าวไม่เป็นสนิมอันเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างออกซิเจนในอากาศกับโครเมียมในเนื้อสแตนเลสเกิดเป็นฟิล์มบางๆ เคลือบผิวไว้ ทำให้เหล็กสามารถต้านทานการเกิดการเกิดสนิมจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ได้ โดยทำหน้าที่ปกป้องการเกิดความเสียหายให้กับตัวเนื้อสแตนเลสได้เป็นอย่างดี ปกป้องการเกิดการกัดกร่อน (corrosion) และไม่ชำรุดหรือสึกกร่อนง่ายอย่างโลหะทั่วไปหรือการเป็นสนิมที่เป็นผลมาจากปริมาณโครเมียมในเนื้อเหล็ก เหล็กกล้าไร้สนิมจึงแตกต่างจากเหล็กธรรมดาทั่วไปที่มีการป้องกันการกัดกร่อนด้วยการชุบหรือเคลือบผิว เช่น การเคลือบสี เป็นต้น (บริษัทไทยน็อคซ์สตีล จำกัด, 2008)

เหล็กกล้าไร้สนิม เป็นวัสดุที่สมบูรณ์แบบสำหรับใช้ในครัวเรือนและอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีความต้านทานต่อการกัดกร่อนสูง จึงไม่เป็นสนิมและไม่ทำปฏิกิริยากับกรด และเกลือที่มีอยู่ในอาหาร มีพื้นผิวเรียบและมีความเป็นกลางจึงไม่ดูดซับกลิ่นใดๆ ทำความสะอาดได้ง่ายและถูกหลักอนามัยในทุกขั้นตอนการใช้ ทนความร้อน ความเย็น และการเปลี่ยนอุณหภูมิโดยฉับพลันได้ดี

2.5.1 ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม (บริษัทไทยน็อกซ์สตีล จำกัด, 2008)

เหล็กกล้าไร้สนิมแบ่งออกเป็น 4 ชนิดหลัก คือ

1. เกรดออสเทนิติก (Austenitic) แม่เหล็กดูดไม่ติด นอกจากส่วนผสมของโครเมียม 18 % แล้วยังมีนิกเกิลที่ช่วยเพิ่มความต้านทานการกัดกร่อน เหล็กชนิดนี้ผลิตได้ง่ายจึงเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง; 304, 316L, 321, 347

2. เกรดเฟอร์ริติก (Ferritic) แม่เหล็กดูดติด มีส่วนผสมของคาร์บอนต่ำ และมีโครเมียมเป็นส่วนผสมหลัก คือ ประมาณ 13 % หรือ 17%; 430, 409, 444

3. เกรดมาร์เทนซิติค (Martensitic) แม่เหล็กดูดติด โดยทั่วไปจะเป็นโครเมียมผสมอยู่ 12 % และมีส่วนผสมของคาร์บอนในระดับปานกลาง มักนำไปใช้ทำส้อม มีด เครื่องมือผ่าตัด และเครื่องจักรอื่น ๆ มีคุณสมบัติเด่นในการต้านทานการสึกกร่อนและความแข็งแรงทนทาน; 410, 420

4. เกรดดูเพล็กซ์ (Duplex) แม่เหล็กดูดติด มีโครงสร้างผสมระหว่างเฟอร์ไรต์และออสเทนไนต์ มีโครเมียมผสมอยู่ประมาณ 18-28 % และนิกเกิล 4.5-8% เหล็กชนิดนี้มักถูกนำไปใช้งานที่มีคลอรินสูง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการกัดกร่อนแบบรูเข็ม (pitting corrosion) และช่วยเพิ่มความต้านทานการกัดกร่อนที่เป็นรอยร้าว อันเนื่องมาจากแรงกดดัน (stress corrosion cracking resistance); 2205, 2507

เหล็กกล้าไร้สนิมโดยทั่วไป แบ่งตามชนิดและปริมาณโลหะที่ผสมลงไป ซึ่งเป็นตัวกำหนดโครงสร้างทางโลหะวิทยา คุณสมบัติเชิงกลคุณสมบัติทางฟิสิกส์และความต้านทานการกัดกร่อน โดยมีชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไปของเหล็กกล้าไร้สนิม ดังแสดงในตารางที่ 2.4 (บริษัทไทยน็อกซ์ สเตนเลส จำกัด, 2008)

ตารางที่ 2.4 ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบทางเคมีของเหล็กกล้าไร้สนิม

ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม	ชื่อมาตรฐานสากล					ส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไป			
	ไทยน็อกซ์	ไทย	USA	ญี่ปุ่น	ยุโรป	คาร์บอน	โคบอล	นิกเกิล	โมลิบดีนัม
1.เฟอร์ริติก	TNX SC17	SST 430	430	430	1.4016	0.05	16.5	-	-
2.ออสเทนนิติก	TNX S189	SST 304	430	430	1.4016	0.04	18.5	-	-
3.ออสเทนนิติกผสมโมลิบดีนัม	TNX LM 1811	SST 316L	316L	316L	1.4404	0.025	17.5	11.5	2.0

ที่มา: บริษัทไทยน็อกซ์สตีล จำกัด (2008)

2.5.2 พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิม

พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมมีหลายชนิด โดยมีทั้งชนิดเงาเหมือนกระจก แบบด้านแบบเรียบหรือขัดผิว ซึ่งแต่ละพื้นผิวสามารถใช้ร่วมกับวัสดุอื่นหรือใช้พื้นผิวชนิดต่าง ๆ ได้ดีและไม่แตกหัก ซึ่งตารางที่ 2.5 ได้แสดงชนิดของพื้นผิว ลักษณะ ความเรียบ และความสะท้อนแสงของเหล็กกล้าไร้สนิม

ตารางที่ 2.5 ชนิดของเหล็กกล้าไร้สนิม

ชนิด	ลักษณะ	ความเรียบ (ไมครอน)	ความสะท้อนแสง %
2D	รีดเย็น, อบอ่อนและพิคคลิง: ผิวด้าน	0.10 - 0.03	13
2B	รีดเย็น, อบอ่อนและพิคคลิง: ผิวเงาขึ้นเล็กน้อยจากการรีดเย็นออก เป็นสีเทา	0.03 - 0.02	22**
BA	หลังรีดเย็นและอบด้วยความร้อน: ผิวมันเงา	0.02 - 0.06	-
No.4	ขัดด้วยกระดาษทราย *80	<1.0 -	
HL	มีลายเส้นยาวจากการขัดแต่งผิว (Hair Line)	0.10 - 0.03 -	
No.8	ขัดผิว buffering: ผิวเงาเหมือนกระจก (mirror finish)	-	85

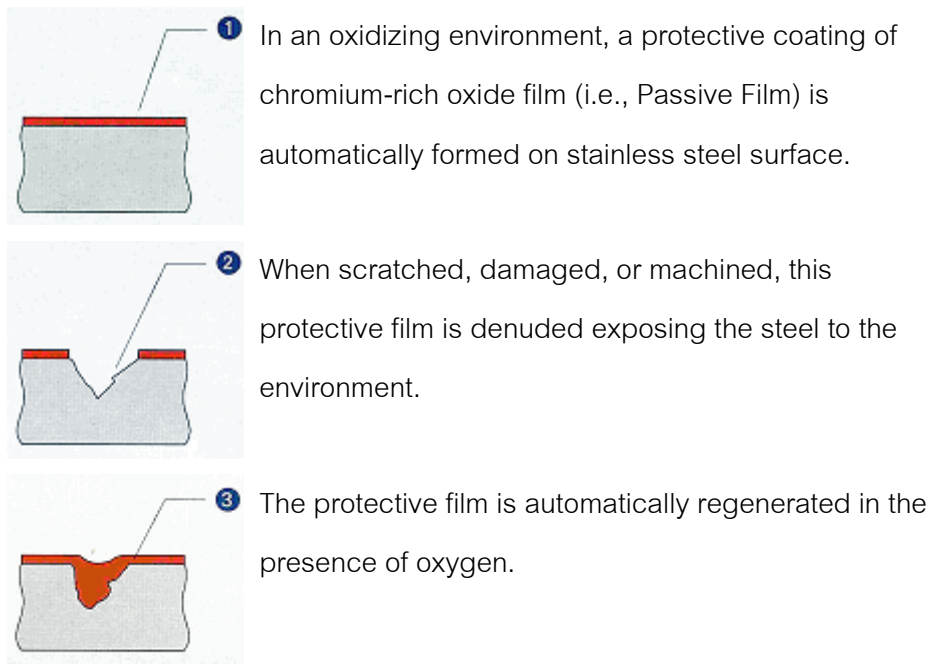
*ความเรียบ หมายถึง ความเรียบของพื้นผิวซึ่งวัดด้วยโปรไฟล์โลมิเตอร์

**46% สำหรับเฟอริติก

ที่มา: บริษัทไทยน็อคซ์สตีล จำกัด (2008)

2.5.3 ความต้านทานการกัดกร่อน

โลหะทุกชนิดโดยทั่วไปจะทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์กับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นฟิล์มออกไซด์บนผิวโลหะหรือออกไซด์ที่เกิดบนผิวเหล็กทั่วไปเกิดเป็นสนิม ทำให้สภาพพื้นผิวเหล็กผุกร่อน แต่เหล็กกล้าไร้สนิมมีโครเมียมผสมอยู่ 10.5% ขึ้นไป ทำให้คุณสมบัติของฟิล์มออกไซด์บนพื้นผิวเปลี่ยนแปลงกลายเป็นฟิล์มปกป้องหรือพาสซีฟเลเยอร์ (passivity) ฟิล์มปกป้องจะมีความบางมาก และมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ฟิล์มจะมีการเกาะติดแน่นและทำหน้าที่ปกป้องเหล็กจากสารกัดกร่อน หากนำไปผลิตแปรรูปหรือใช้งานในสภาพเหมาะสม เมื่อเกิดการขีดข่วน ฟิล์มปกป้องนี้จะสร้างขึ้นใหม่ได้เองตลอดเวลา ดังรูปที่ 2.2 แสดงการเกิดพาสซีฟเลเยอร์ของเหล็กกล้าไร้สนิม



รูปที่ 2.2 การเกิด Passive layer ของ stainless steel

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

2.5.4 เหล็กกล้าไร้สนิมในอุตสาหกรรมอาหารเนื้อและสัตว์ปีก

เหล็กกล้าไร้สนิม เป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับใช้ในครัวเรือนและอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจาก

1. เป็นวัสดุที่มีพื้นผิวเรียบทำความสะอาดได้ง่าย ลดการปนเปื้อนและเชื้อแบคทีเรียจากกระบวนการผลิต
2. ทนต่อการกัดกร่อนสูง จึงไม่เป็นสนิม และไม่ทำปฏิกิริยากับกรดและเกลือที่มีอยู่ในอาหาร
3. เป็นพิษและมีความเป็นกลางสูงจึงไม่ดูดซึมรสใดๆ
4. ทนความร้อน ความเย็นและการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยฉับพลันได้ดี

เกรดของเหล็กกล้าไร้สนิมที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม คือ เกรด 304 นิยมใช้สำหรับงานทั่วไปและเกรด 316 นิยมใช้สำหรับงานที่ต้องสัมผัสกับ chlorides (บริษัทไทยน็อคส์ สเตนเลส จำกัด, 2008) เนื่องจากพื้นผิวและเกรดของเหล็กกล้าไร้สนิมมีหลายชนิด ดังนั้นจึง

ต้องเลือกใช้ตามคุณสมบัติเพื่อให้เหมาะสมสำหรับการใช้งานในครัวเรือนและอุตสาหกรรมอาหาร ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างการเลือกใช้เหล็กกล้าไร้สนิมในอุตสาหกรรมอาหารประเภทสัตว์ปีก

ชนิดของเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิต	ชนิดของเหล็กกล้าไร้สนิม
อ่างล้างมือสำหรับพนักงาน	เกรด 304 ความหนาประมาณ 0.4-0.6 mm.
ชิ้นส่วนของเครื่องถอนขนไก่	เกรด 316/316L เนื่องจากทนทานต่อการกัดกร่อนและง่ายต่อการทำความสะอาด
สายพานลำเลียงไก่ ขอกเที่ยว	เกรด 304/316 เนื่องจากมีความแข็งแรงง่ายต่อการทำความสะอาดและไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่ใช้ทำความสะอาด
เครื่องทอดไก่	เกรด 304 เนื่องจากทนทานต่อการใช้งานที่อุณหภูมิสูงและนำความร้อนได้ดี
เครื่องแช่แข็งไก่	เกรด Duplex 2205 ต้องการทำความสะอาดและสามารถใช้งานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ

ที่มา: ดัดแปลงจาก บริษัทไทยน็อคส์สตีล จำกัด (2008)

2.6 การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ

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

ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจะมี 5 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการทำ
 ความสะอาด 3 ขั้นตอนและขั้นตอนการฆ่าเชื้ออีก 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. กำจัดสิ่งสกปรก (soil or dirt) ขนาดใหญ่ด้วยวิธีการ เช่น การปัด กวาด ถู ขัดหรือ
 ชะล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นต้น
2. การกำจัดสิ่งสกปรกที่เหลืออยู่ด้วยสารชะล้าง (detergent)
3. การล้างด้วยน้ำ (rinsing) เพื่อล้างสารชะล้างและสิ่งสกปรก
4. การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือสารฆ่าเชื้อ
5. การล้าง (rinsing) สารฆ่าเชื้อออกจากพื้นผิวเครื่องจักรและอุปกรณ์

(Marriott and Gravani, 2006)

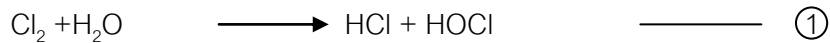
2.6.1 คลอรีนและสารประกอบคลอรีน

2.6.1.1 คุณสมบัติและกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของคลอรีนและ สารประกอบคลอรีน

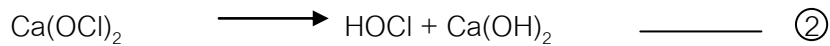
คลอรีนเป็นธาตุตัวหนึ่งในกลุ่มของฮาโลเจน (Halogen) อยู่ในรูปของแก๊ส
 คลอรีน มีสีเขียวแกมเหลือง (greenish yellow) มีกลิ่น คลอรีนได้จากการทำปฏิกิริยาของ
 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และแมงกานีสไดออกไซด์ (MnO_2) ก๊าซคลอรีนมีความถ่วงจำเพาะ
 เท่ากับ 2.48 เมื่อเปรียบเทียบกับอากาศมีเลขอะตอมเท่ากับ 17 มวลอะตอมเท่ากับ 35.457
 และค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 70.914 คลอรีนมีสถานะเป็นของเหลวที่สภาวะ 0 องศาเซลเซียสได้
 4.6 ลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสละลายได้น้อยกว่า คือ 2.3 ลิตรต่อ
 น้ำ 1 ลิตร (บุษกร ปาละกุล, 2536)

สารประกอบคลอรีนหรือสารประกอบไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite) เกิดจาก
 แก๊สของคลอรีน ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์
 $(Ca(OCl)_2)$ ซึ่งเป็นสารประกอบคลอรีนที่สามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้
 $(Ca(OCl)_2)$ มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว เรียกว่า bleaching powder หรือ chlorinated lime
 ซึ่งจะมีปริมาณคลอรีนอิสระ (free available chlorine : FAC) อยู่ประมาณร้อยละ 39 ส่วน
 NaOCl เป็นของเหลวที่มี FAC ประมาณร้อยละ 7-20 ซึ่งทั้งก๊าซคลอรีนโซเดียมไฮโปคลอไรท์
 และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ มีความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยเกิดการแตกตัวให้
 กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) (รุ่งทิพา อิศรางพร, 2541; ศิวาพร ศิวเวช, 2536)

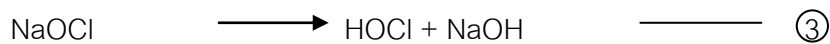
ก๊าซคลอรีน



แคลเซียมไฮโปคลอไรท์



โซเดียมไฮโปคลอไรท์



ศิวาพร ศิวเวช (2536) รายงานว่า ประสิทธิภาพของสารเหล่านี้จะดีที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่าง 4-5 และมีการกักคร่อนเพิ่มขึ้นและมากที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่าง 5 ดังนั้นการนำไปใช้จึงมักเตรียมสารนี้ให้มีความเป็นกรด-ด่างสูงคือ 10-11 และควบคุมอุณหภูมิต่ำเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเพิ่มการกักคร่อน โดยทั่วไปจะใช้ความเข้มข้นประมาณ 50-200 ppm ของคลอรีนอิสระ และให้มีเวลาสัมผัสตั้งแต่ 3-30 วินาที การลดปริมาณความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ลงจะช่วยป้องกันการกักคร่อนที่อาจเกิดขึ้นได้

ปฏิกิริยาของ hypochlorous (HOCl) ที่เกิดขึ้นนั้น จะเป็นแบบ electrophilic เป็นโมเลกุลที่ชอบออกซิเจนอะตอมและคลอรีนอะตอม โดยเฉพาะคลอรีนอะตอมมีคุณสมบัติเป็น electropositive มากกว่า ดังนั้นปฏิกิริยา electrophilic จะเกิดขึ้นที่คลอรีนอะตอม โดยคลอรีนอะตอมนี้จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ในน้ำได้ เช่น organic carbon หรือ amino nitrogen เป็นต้น ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาจะทำให้สารประกอบไฮโปคลอไรท์มีคุณสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ได้ อย่างไรก็ตามถ้ากรดไฮโปคลอรัส (HOCl) เกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโปคลอไรท์อิออน (OCl⁻) จะทำให้สารประกอบไฮโปคลอไรท์นี้มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์หรือมีความสามารถในการจับสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ลดลง (รุ่งทิวา อิศรางพ, 2541)

ปัจจุบันมีการนำคลอรีนและสารประกอบคลอรีนมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้ในการสุขาภิบาลโรงงาน ใช้เพื่อฆ่าเชื้อในแหล่งน้ำ ใช้ฆ่าเชื้อเครื่องมือ หรืออุปกรณ์ที่มีพื้นผิวสัมผัสอาหาร ใช้ฉีดพ่นเครื่องมือระหว่างกระบวนการผลิตอาหารเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหาร แสดงดังตาราง 2.7 และ 2.8

ตารางที่ 2.7 สารประกอบคลอรีนที่นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

สารประกอบคลอรีน	ปริมาณคลอรีนอิสระ (%)
Gaseous chlorine	100
Sodium hypochlorite	1-7
Calcium hypochlorite	35
Chloramine-T	25
Chlorine dioxide	-
Cyanurate	70

ที่มา: ถกฉรรรณ พิรุณสาร (2547)

ตารางที่ 2.8 สารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรม

ชนิดของสาร	สูตรทางเคมี	Chemical Abstracts Registry no.	คุณสมบัติ การละลายน้ำ ที่อุณหภูมิ 70 °F
Gaseous chlorine	Cl ₂	7782-50-5	0.7%
Hypochlorous acid	HOCl	7709-92-3	ละลายได้ดีมาก
Sodium hypochlorite	NaOCl	56802-99-4	ละลายได้ดีมาก
Calcium hypochlorite	Ca(OCl) ₂	7778-54-3	ละลายได้ปานกลาง
Chloramine-T	H ₃ C-C ₆ H ₄ SO ₂ -N-NaCl	473-34-7	15%
Dichlorodiethyl-hydantoin	C ₅ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₂	1118-52-5	1.2%
Trichlorocyanuric acid	Cl ₃ (NCO) ₃	87-90-1	1.2%
Dichlorocyanuric acid	Cl ₂ H(NCO) ₃	2782-57-2	2.6%
Chlorine dioxide	ClO ₂	11049-04-4	2.0%

ที่มา: ถกฉรรรณ พิรุณสาร (2547)

2.6.1.2 การใช้สารประกอบคลอรีนในการลดปริมาณจุลินทรีย์

การใช้สารประกอบคลอรีนในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีการใช้น้ำในกระบวนการเตรียมสารฆ่าเชื้อ โดยได้แบ่งคลอรีนเป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ คือคลอรีนเหลว สารประกอบไฮโปคลอไรต์ (hypochlorite) สารอนินทรีย์คลอรามิน (inorganic chloramines) สารอินทรีย์คลอรามิน (organic chloramines) และคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) ซึ่งคลอรีนแต่ละกลุ่มจะมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน

ประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ของคลอรีน เกิดจากคลอรีนทำปฏิกิริยารวมตัวกับโปรตีนพลาสมาของเซลล์จุลินทรีย์ โดยเข้าไปแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมในกลุ่มอะมิโน จะเกิดเป็นสารประกอบขึ้นใหม่ คือ คลอรามิน ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ คลอรีนจะทำให้เกิดการตกตะกอน ชัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญภายในเซลล์และยับยั้งการใช้กลูโคสของจุลินทรีย์ (กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล, 2549)

2.6.1.3 ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (สุดาพร เทียบจตุรัส, 2545)

ในทางการค้าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นของคลอรีนที่ใช้ได้ 10 % หรือ 100,000 ppm (part per million หรือส่วนในล้านส่วน) เตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และคลอรีนในน้ำ ซึ่งเป็นกลุ่มของคลอรีนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุด เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ เกิดปฏิกิริยาได้เร็ว ทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิดและราคาถูก มีสมบัติฟอกสี (Marriott and Gravani, 2006) แต่มีข้อเสีย คือ กัดกร่อนโลหะบางชนิดและประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ลดลงเมื่อมีสารอินทรีย์ปะปนในสารละลาย แต่ในการทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการ เครื่องจักร และอุปกรณ์ต่างๆ จะนิยมใช้ความเข้มข้นประมาณ 100-200 ppm แต่บริเวณที่สกปรกมากหรือในโรงพยาบาลอาจใช้ถึง 1,000 ppm หรือมากกว่าก็ได้ ที่ระดับความเข้มข้น 50-300 ppm มี pH อยู่ในช่วง 7-9 ที่ pH 5 จะมีความคงตัวน้อยลง สารไฮโปคลอไรท์เป็นสารประกอบที่มีประจุลบ จึงไม่ควรใช้ร่วมกับสารชะล้างหรือสารทำความสะอาด (detergent) ที่มีประจุบวก นอกจากนี้ไม่ควรผสมสารไฮโปคลอไรท์ในสารทำความสะอาดที่มีฤทธิ์เป็นกรด เพราะจะทำให้เกิดก๊าซคลอรีนซึ่งเป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจของผู้

ปฏิบัติงาน ปัจจุบันใช้ในอุตสาหกรรมฟอกสี สารฆ่าเชื้อโรคในแหล่งน้ำ และใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมนมและอาหารอย่างกว้างขวาง

โซเดียมไฮโปคลอไรท์ซึ่งเป็นสารประกอบคลอรีนมีสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้ (สุดาพร เทียบจัตุรัส, 2545)

1. ส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มสปอร์ สารประกอบคลอรีนสามารถทำลายแบคทีเรียได้โดยการเกิดปฏิกิริยาของคลอรีนกับโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการสร้างสารประกอบ N-chloro ซึ่งไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ทำให้สมบัติการควบคุมการผ่านเข้าออกของเซลล์สูญเสียไปและสารประกอบคลอรีนมีคุณสมบัติทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารอาหารได้ ดังนั้นเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจะทำให้สารอาหารไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ เช่น กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต หรือสารอาหารที่จำเป็นในการดำรงชีพ เป็นต้น เมื่อเซลล์ขาดสารอาหาร จะทำให้การเจริญของจุลินทรีย์หยุดลงและตายในที่สุด

2. ส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ (protoplast) สารประกอบคลอรีนสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยคลอรีนจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับส่วนโปรโตพลาสซึมของเซลล์ โดยเฉพาะส่วนที่เป็นโปรตีน ทำให้ส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์ตกตะกอน สารประกอบคลอรีนจะไปทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลไฟดริล (sulhydryl) ของโปรตีน เกิดการรบกวนการทำงานของเซลล์

3. ส่วนที่เป็นเอนไซม์ เอนไซม์เป็นโปรตีนสารประกอบคลอรีนที่เข้าไปในเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือเกิดการรวมตัวของเอนไซม์ ดังนั้นสารประกอบคลอรีนรบกวนระบบการทำงานของเอนไซม์และยังสามารถทำลายเอนไซม์ได้อีกด้วย ทำให้ระบบการทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนไป เอนไซม์หลายชนิดที่ได้รับผลกระทบจากคลอรีน เช่น glucose oxidase, transaminase, succinic oxidase เป็นต้น การรบกวนเอนไซม์และระบบเอนไซม์ของกรดไฮโปคลอริสนี้จะไปมีผลต่อการออกซิเดชันของกลูโคส (glucose oxidation) ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำกลูโคสมาใช้ได้ ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ขาดอาหาร การเจริญของเซลล์หยุดลงและตายในที่สุด (สุดาพร เทียบจัตุรัส, 2545; ถกวรรณ พิรุณสาร, 2547)

2.6.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน

คลอรีนและสารประกอบคลอรีนจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้ดี อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่

1. ชนิดและรูปแบบของจุลินทรีย์ ประสิทธิภาพของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนในการทำลายจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน เช่น แบคทีเรียชนิดที่สร้างสปอร์ได้จะทนต่อคลอรีนและสารประกอบคลอรีนได้มากกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณเชื้อจะนานกว่า 10 ถึง 100 เท่า และความเข้มข้นของปริมาณคลอรีนอิสระที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจะสูงกว่า (Ito and Seegar, 1980) ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ชนิดต่างกันเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลาที่สัมผัสกับคลอรีน อุณหภูมิ และความเข้มข้นของคลอรีน

2. ปริมาณเริ่มต้นของจุลินทรีย์ ประสิทธิภาพการทำลายจุลินทรีย์ของสารละลายคลอรีนขึ้นอยู่กับปริมาณของจุลินทรีย์ เมื่อปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นเพิ่มขึ้น จะต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายคลอรีนและเวลาในการทำลายจุลินทรีย์มากขึ้น (Ito and Seegar, 1980)

3. ความเข้มข้น การเพิ่มความเข้มข้นของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อคลอรีนได้ดีขึ้น

4. อุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะพบว่า ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนจะเพิ่มขึ้นด้วย (Ito and Seegar, 1980)

5. ความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความคงตัวของ hypochlorous acid ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน โดยทั่วไปเมื่อนำคลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนนี้มาละลายน้ำ จะทำให้เกิดการแตกตัวเป็นคลอรีนอิสระ ซึ่งจะอยู่ในรูปของ Cl_2 , hypochlorous acid และ hypochlorite ion ซึ่งการแตกตัวให้ hypochlorous acid นั้น จะอยู่ในช่วง pH 4-5 แต่สำหรับสารไฮเดียม

ไฮโปคลอไรท์นั้น มักถูกนำมาใช้ในช่วง pH 7-9 ทั้งนี้เนื่องจากในช่วง pH 4-5 จะมีความคงตัวน้อย ดังนั้นค่าความเป็นกรดไฮโปคลอรัสจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Macrae, Robinson and Sadler, 1993 ; ถกวรรณ พิรุณสาร, 2547)

6. ปริมาณสารเจือปน การมีสารเจือปนต่างๆ กระจายตัวอยู่ในน้ำ การเติมคลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนลงในน้ำที่มีสารเจือปนจะทำให้ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีนลดลง โดยสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์เหล่านี้จะช่วยป้องกันจุลินทรีย์ให้พ้นจากปฏิกิริยาของคลอรีน โดยพบว่า การเติมคลอรีนลงในน้ำที่มีตะกอนจะพบจำนวนแบคทีเรียรอดชีวิตมากกว่าน้ำที่ไม่มีตะกอน แอมโมเนีย (NH_3) จะทำปฏิกิริยากับคลอรีนเกิดเป็นพวกคลอรามิน ซึ่งให้คุณสมบัติในการฆ่าเชื้อต่ำกว่ากรดไฮโปคลอรัส (ถกวรรณ พิรุณสาร, 2547)

7. ความกระด้างของน้ำ ความกระด้างของน้ำไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียของไฮโปคลอไรท์ ถ้าน้ำกระด้างมากจะเกิดการตกตะกอนได้ แต่ความกระด้างของน้ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างจะทำให้ประสิทธิภาพของคลอรีนเปลี่ยนแปลง (Macrae et al., 1993)

8. เวลา เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อประสิทธิภาพของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อทุกชนิดจะมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไปขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการสัมผัสกับสิ่งที่ต้องการฆ่าเชื้อ โดยระยะเวลาและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่สารฆ่าเชื้อบางชนิดเกิดการสลายตัวหรือไม่คงตัวเกิดขึ้นได้เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ จะสลายตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น (Marriott and Gravani, 2006)

9. ความคงตัว คลอรีนและสารประกอบคลอรีนนั้นควรเตรียมในภาชนะที่สะอาดและเตรียมใหม่ๆ ก่อนใช้งาน สารละลายที่เหลือจากการใช้งานหรือการเตรียมล่วงหน้าเป็นเวลานานอาจเสื่อมประสิทธิภาพ อาจเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์ที่ทนทานต่อสารฆ่าเชื้อชนิดนี้แล้ว และสารฆ่าเชื้ออาจไม่มีประสิทธิภาพหากผสมกับสารซักฟอกหรือสารฆ่าเชื้ออื่น จึงควรทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้ออย่างสม่ำเสมอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำให้เชื้ออาจ (ถกวรรณ พิรุณสาร, 2547)

2.6.1.5 การใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนในอุตสาหกรรมอาหาร

คลอรีนและสารประกอบคลอรีนทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์มีสมบัติในการทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ FDA จึงได้กำหนดให้คลอรีนเป็นสารประเภทที่เรียกว่า GRAS (Generally Recognized as Safe) (Marriott and Gravani, 2006; Stanga, 2010) ดังนั้นการใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนจึงมีความปลอดภัยในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ ซึ่งมักใช้คลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ถกฉนวน พืชสวน (2547) รายงานว่า มีการใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนตั้งแต่ปี ค.ศ. 1958 โดยใช้ในการควบคุมผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก (Poultry Products Inspection Act) และผลิตภัณฑ์เนื้อ (Meat Inspection Act) และได้รับอนุญาตในหลายประเทศให้ใช้เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำดื่ม

เนื่องจากคลอรีนและสารประกอบคลอรีน มีคุณสมบัติที่ดีในการทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค จึงมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ มีรายงานว่าคลอรีนสามารถใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในน้ำดื่มและยังใช้ในน้ำที่ใช้ล้างวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรมที่เป็นอาหารดิบ เช่น เนื้อสัตว์ และใช้ในการล้างอาหารในสายการผลิต เช่นเดียวกับ Wei และคณะ (1985) รวบรวมข้อมูลการใช้คลอรีนในอุตสาหกรรม ดังนี้ คือ ใช้ล้างผักผลไม้ดิบ ใช้ในน้ำหล่อเย็นหลังการฆ่าเชื้ออาหารกระป๋อง ใช้ในการทำความสะดวกอุปกรณ์ภาชนะบรรจุอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมแปงเป็นสารปรับปรุงคุณภาพประเภท bleaching agent และ oxidizing agent ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในโรงฆ่าสัตว์ ใช้สารละลายคลอรีนเจือจางฉีดพ่นฝอยในระหว่างการล้างและการทำงานเย็นแก่วัตถุดิบ นอกจากนี้ยังมีการใช้คลอรีนในอุตสาหกรรมประเภทอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมผลิตยา เป็นต้น

2.6.1.6 ข้อจำกัดในการใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีน (ถกฉนวน พืชสวน, 2547)

สารละลายคลอรีนและสารประกอบคลอรีน ได้แก่ กรดไฮโปคลอรัสและไฮโปคลอไรท์มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่รับกลิ่น (odor threshold) และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่รับรสได้ (Taste threshold) ต่ำ แม้ที่ความเข้มข้นในสารละลายต่ำมากโดยเฉพาะไฮโปคลอไรท์มีค่าร้อยละความเข้มข้นต่ำสุดที่รับกลิ่นและรส เท่ากับ 0.28 และ 0.24 ตามลำดับ

ส่วนไฮโปคลอไรท์ไอออน มีค่าร้อยละความเข้มข้นต่ำที่สุดที่รับกลิ่นและรสเท่ากับ 0.36 และ 0.30 โดยทั้งคู่ให้กลิ่นระเหยของคลอรีนเช่นกัน

เนื่องจากคลอรีนเป็นสารประเภทที่เรียกว่า GRAS มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค FDA ได้กำหนดปริมาณการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการล้างทำความสะอาด เครื่องมือและพื้นผิวสัมผัสอาหารที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร โดยกำหนดให้มีคลอรีนอิสระไม่เกิน 200 ppm (Wei, Cook and Kirk ,1985) การล้างทำความสะอาดสายพานลำเลียงผักและผลไม้สด ควรใช้คลอรีนความเข้มข้น 1-5 ppm ความเข้มข้นที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์หรือใช้สารประกอบคลอรีนในรูปของแคลเซียมไฮโปคลอไรท์และโซเดียมไฮโปคลอไรท์เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ในผักผลไม้สด ส่วนน้ำดื่มควรมีปริมาณคลอรีนเหลือเพียง 0.025-0.2 ppm ทั้งนี้ขึ้นกับการปนเปื้อนของน้ำและปริมาณอินทรีย์วัตถุที่มีในน้ำ การใช้คลอรีนในน้ำหล่อเย็น กระทบหลังจากผ่านกระบวนการให้ความร้อนแล้ว เข้มข้นของคลอรีนไม่เกิน 0.2 ppm (ถกวรรณ พิรุณสาร, 2547)

องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration; U.S.FDA) ได้ออกกฎควบคุมการใช้คลอรีนและสารประกอบไฮโปคลอไรท์ ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 ข้อกำหนดการใช้สารประกอบคลอรีนและไฮโปคลอไรท์ในอุตสาหกรรมอาหารของ U.S.FDA

การใช้งาน	ระดับการใช้งาน
ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์เพื่อล้างทำความสะอาด หรือใช้ในการลอกเปลือกผักและผลไม้	ไม่เกินร้อยละ 0.2
ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์เพื่อเป็นสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ในอุปกรณ์การผลิตอาหาร เครื่องมือ และส่วนที่สัมผัสอาหาร	คลอรีนอิสระความเข้มข้น ไม่เกิน 200 ppm

ที่มา: ดัดแปลงจาก Wei และคณะ (1985)

2.6.2 กรดเปอร์ออกซีแอซีติก (Peroxyacetic acid)

กรดเปอร์ออกซีแอซีติก คือ เปอร์ออกไซด์ของกรดแอซีติก มีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง ละลายน้ำได้ดี และที่ความเข้มข้นสูงมีกลิ่นฉุน โดยทั่วไปมีสารให้ความคงตัวผสมอยู่ด้วย ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง และเมื่อมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้ว สารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อดีกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีสารอินทรีย์ปะปนอยู่ นอกจากนี้สารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกไม่ทำปฏิกิริยากับคະຕະເລສ และ เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แตกต่างจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Kunigk and Almeida, 2001)

กรดเปอร์ออกซีแอซีติก สามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้โดยการรบกวนพันธะชั้นไฮดริลและซัลเฟอร์ไนโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ โดยทำหน้าที่เป็นสารออกซิไดซ์ และยังสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ นอกจากนี้กรดเปอร์ออกซีแอซีติกยังสามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพ ขัดขวางการขนส่งของผนังเซลล์ ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ สามารถรบกวนการเข้าออกที่เยื่อหุ้มเซลล์จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด (Rossini and Gaylarde, 2000)

เมื่อสารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติกสลายตัว จะได้น้ำ ออกซิเจน และกรดแอซีติก ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษในอาหารและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดฟิโอมและสารประกอบฟอสเฟต สามารถเกิดปฏิกิริยาในน้ำกระด้าง และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ญฐนนท์ ตราชู (2551) รายงานว่า ปัจจุบันได้มีการนำสารจำพวก peracids เช่น peracetic acid และ peroctanoic acids ซึ่งแตกตัวให้กรดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจน จัดเป็นสารในกลุ่ม oxidizing agent เช่นเดียวกับคลอรีน มีหลายงานวิจัยรายงานว่า กรดเหล่านี้สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ดี และปริมาณของสารอินทรีย์ในน้ำไม่ได้มีผลต่อประสิทธิภาพมากนัก ไม่มีผลกัดกร่อนต่อ stainless steel เท่ากับคลอรีนและกรดสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้ (ญฐนนท์ ตราชู, 2551; Fatemi and Frank, 2003; Kunigk and Almeida, 2001) อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในกลุ่ม peracids ที่มีต่อเชื้อชนิดต่างๆมีน้อยกว่าคลอรีนมาก

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ทดสอบ

เชื้อบริสุทธิ์ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.2 พื้นผิวทดสอบ

Stainless steel ชนิด 304 No.2B ได้รับจากการอนุเคราะห์จากบริษัทไทยน็อคซ์สตีล จำกัด (มหาชน)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Trypticase Soy Broth (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Trypticase Soy Agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Pseudomonas Agar Base (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Nutrient Agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

3.4 สารเคมี

Sodium thiosulfate-pentahydrate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) AR grade

Sodium chloride (NaCl) AR grade

Potassium iodide (KI) AR grade

Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4) AR grade

Di-sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4) AR grade

Acetone ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$) AR grade

Absolute ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) AR grade

3.5 สารฆ่าเชื้อ

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

Peroxyacetic acid: POA (Peroxy Thai, Thailand)

3.6 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

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

เครื่อง Spectrophotometer (รุ่น Genesys 10 UV, USA)

เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP3100S, Germany)

เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น A2005, Germany)

เครื่อง pH meter (Eutech รุ่น Cyber Scan pH 1000 Bench, Singapore)

เครื่อง Vortex (Labnet รุ่น VX 100, USA)

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

ตู้อบเชื้อ Incubator (Heraeus instrument รุ่น B6)

ตู้อบเพาะเชื้อแบบเขย่า Incubation shaker (Magnet รุ่น LINE-LAB, Germany)

เครื่อง Centrifuge (Zentrifugen รุ่น 40G257, Germany)

เครื่อง Colony counters (Suntex, Taiwan)

ตู้ Laminar flow cabinet (BVT-123, Thailand)

เครื่องสไลซ์เนื้อสัตว์ Meat Slicing Machine (Model: Quarzo 300, Italy)

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็น

3.7 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.7.1 การเตรียมเซลล์ *P. fluorescens* และการนับจำนวนเซลล์

3.7.1.1 การเตรียมเซลล์ *P. fluorescens*

เตรียมเซลล์แบคทีเรียจากแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Agar (NA) เอียงในหลอดทดลอง (slant) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อ 1 หลอดลงในอาหารเหลว Trypticase Soy Broth (TSB) 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงโดยการเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นแยกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เก็บส่วนตะกอนทำให้แขวนลอยอีกด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และปรับให้ได้ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.3 จะได้เชื้อเริ่มต้นที่ $9 \log \text{CFU/mL}$ เตรียมความเข้มข้นของปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่ต้องการ โดยเจือจางตะกอนเซลล์ตั้งต้นใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้นของตะกอนเซลล์ $9 \log \text{CFU/mL}$ สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง ($8 \log \text{CFU/mL}$) สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ ($3 \log \text{CFU/mL}$) เจือจางให้มีความเข้มข้นของตะกอนเซลล์ $4 \log \text{CFU/mL}$ ตรวจนับปริมาณเซลล์ในอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 3.7.1.2 จากนั้นนำไปทดสอบการเกิดไบโอฟิล์มและประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อต่อไป

3.7.1.2 การนับปริมาณเซลล์ *P. fluorescens*

ตรวจนับปริมาณเซลล์เริ่มต้นของแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate technique โดยปิเปตเชื้อเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองซึ่งมี 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวณหาปริมาณ *P. fluorescens* ทั้งหมดในสารละลาย 1 มิลลิลิตร ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.7.2 การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์ม

3.7.2.1 การเตรียมพื้นผิวทดสอบ

เตรียมพื้นผิวที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ stainless steel เกรด 304 ชนิด 2B ความหนา ประมาณ 1 มิลลิเมตร โดยเตรียมพื้นผิวให้มีขนาด 1×7 เซนติเมตร ทำความสะอาดโดยแช่แผ่นสแตนเลสสตีลในอะซิโตน (acetone) เพื่อล้างคราบไขมันออก 30 นาที ล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์ (deionized water) 2 ครั้ง แช่ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 5 N เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์ (deionized water) 2 ครั้ง และแช่ในสารทำความสะอาด (น้ำยาทำความสะอาดจานอาหาร) 30 นาที ล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์ (deionized water) เพื่อกำจัดสารทำความสะอาดที่หลงเหลืออยู่และใส่ลงในภาชนะแก้วฝาปิดนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3.7.2.2 การทดสอบการเกาะติดของ *P. fluorescens*

ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลวที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.7.1.1 ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ 9 log CFU/mL ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นพื้นผิวทดสอบที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.7.2.1 ใส่ลงในหลอดดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C โดยแปรเวลาในการจุ่มแผ่นทดสอบ เป็นเวลา 0 ถึง 120 นาที เพื่อทดสอบการเกาะติดของ *P. fluorescens* เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำแผ่นผิวทดสอบมาล้างด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นผิวทดสอบออก แล้วนับปริมาณเซลล์ที่เกาะติดตามวิธีในข้อ 3.7.3 สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.7.2.3 การเกิดไบโอฟิล์ม

สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลวที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.7.1.1 ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ 9 log CFU/mL ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นพื้นผิวทดสอบที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ

3.7.2.1 ใส่ลงในหลอดดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 30 วินาที ล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นผิวทดสอบออกด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วจึงนำแผ่นสแตนเลสสตีลไปใส่ในหลอดปลอดเชื้อหลอดใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นผิวทดสอบมาล้างด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นผิวทดสอบออก แล้วตรวจนับปริมาณ *P. fluorescens* ที่อยู่บนแผ่นผิวทดสอบ ตามวิธีในข้อ 3.7.2.5 สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ ($3 \log$ CFU/mL) ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.7.2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดไบโอฟิล์ม

3.7.2.4.1 ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนแผ่น stainless steel เกรด 304 ชนิด 2B โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.2.3 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิจากอุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็น 15 ± 2 และ 20 ± 2 °C ตามลำดับ โดยใช้เชื้อเริ่มต้น $8 \log$ CFU/mL วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ RCBD วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple – range tests โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.2.4.2 ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนแผ่นทดสอบที่มีแหล่งของอาหารแตกต่างกัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.2.3 แต่เปลี่ยนชนิดของตัวกลางชนิดเหลวจาก TSB เป็น 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ และ soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยใช้เชื้อเริ่มต้น $8 \log$ CFU/mL วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ RCBD วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple – range tests โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.2.5 การตรวจวิเคราะห์การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวทดสอบ

ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่เกาะติดและเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนแผ่นทดสอบ โดยการใช้น้ำปั่นสำลีปลอดเชื้อกวาดบนพื้นผิวทดสอบที่เกิดการเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์ม ขนาดพื้นที่ 2 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำน้ำปั่นสำลีไปใส่ใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ แล้วปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 1 นาที นำสารละลายที่

ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ทำให้สามารถตรวจนับเชื้อได้ในช่วง 25 ถึง 250 โคโลนี และปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธี spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ คำนวณหาปริมาณเซลล์ต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น

3.7.3 ประเมินผลการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวทดสอบด้วย Scanning Electron Microscope (SEM)

ประเมินผลการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวทดสอบ โดยใช้พื้นผิวทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์ม ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นผิวทดสอบออก ด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดแช่ใน glutaraldehyde เพื่อตรึงเซลล์ให้หยุดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน ส่งตรวจที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) รุ่น JSM-5410 LV เพื่อตรวจลักษณะการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว

3.7.4 ศึกษาการถ่ายโอนเซลล์ของ *P. fluorescens* จากเครื่องสไลซ์เนื้อสู่ผลิตภัณฑ์อาหารโดยดัดแปลงวิธีของ Pérez-Rodríguez และคณะ (2007)

3.7.4.1 การเตรียมเครื่องสไลซ์เนื้อ

ทำความสะอาดเครื่องสไลซ์เนื้อและใบมีดสเตนเลสสตีลตามวิธีที่เหมาะสมสำหรับใบมีดสเตนเลสสตีลทำความสะอาดโดยแช่แผ่นสเตนเลสสตีลในอะซีโตน (acetone) เพื่อล้างคราบไขมันออก 30 นาที ล้างด้วยน้ำดีไอออไนซ์ (deionized water) 2 ครั้ง แช่ในเอทานอล 70 % (v/v) 10 นาที ล้างด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 80°C ส่วนเครื่องสไลซ์เนื้อ ทำความสะอาดโดยพ่นเอทานอล 70 % (v/v) บริเวณพื้นผิวเครื่องสไลซ์เนื้อ

3.7.4.2 การเตรียมไบโอมิตสเดนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว

3.7.4.2.1 การเตรียมไบโอมิตสเดนเลสสตีลที่มีเซลล์แบคทีเรีย *P. fluorescens* ปนเปื้อนบนพื้นผิว

สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง ($8 \log$ CFU/mL) ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลวที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.7.1.1 ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ $9 \log$ CFU/mL ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะฝาปิดปลอดเชื้อขนาด 5000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปลอดเชื้อ 900 มิลลิลิตร จากนั้นนำไบโอมิตสเดนเลสสตีลที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.7.4.1 ใส่ลงในภาชนะดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 30 วินาที ล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นผิวทดสอบออกด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำไบโอมิตสเดนเลสสตีลผึ่งแห้งในตู้ปลอดเชื้อ 30 นาที แล้วตรวจนับปริมาณ *P. fluorescens* ที่อยู่บนพื้นผิวไบโอมิตสเดนเลสสตีล ตามวิธีในข้อ 3.7.4.3.1 สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ ($3 \log$ CFU/mL) ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น จากนั้นนำไบโอมิตสเดนเลสสตีลที่เตรียมไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.7.4.2.2 การเตรียมไบโอมิตสเดนเลสสตีลที่มีการสร้างของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิว

สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง ($8 \log$ CFU/mL) ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลวที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.7.1.1 ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ $9 \log$ CFU/mL ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะฝาปิดปลอดเชื้อขนาด 5000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปลอดเชื้อ 900 มิลลิลิตร จากนั้นนำไบโอมิตสเดนเลสสตีลที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.7.5.1 ใส่ลงในภาชนะดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 30 วินาที ล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นผิวทดสอบออกด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วจึงนำไบโอมิตสเดนเลสสตีลไปใส่ในภาชนะปลอดเชื้อหลอดใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 1000 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไบโอมิตสเดนเลสสตีลมาล้างด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดออก แล้วตรวจนับปริมาณ *P. fluorescens* ที่อยู่บนพื้นผิวไบโอมิตสเดนเลสสตีล ตามวิธีในข้อ 3.7.4.3.1 สำหรับการทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับต่ำ ($3 \log$ CFU/mL) ทำเช่นเดียวกับที่กล่าว

ข้างต้น ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความเข้มข้น จากนั้นนำไปมีดสแตนเลสที่เตรียมไปใช้ในการ ทดลองขั้นต่อไป

3.7.4.3 ศึกษาการถ่ายโอนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอดี เครื่องสไลซ์เนื้อสุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร

เตรียมเครื่องสไลซ์เนื้อที่ทำความสะอาดตามวิธีในข้อ 3.7.4.1 จากนั้นประกอบ ไบโอดีสแตนเลสที่เคลือบด้วยเซลล์ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm ปนเปื้อนบน พื้นผิวที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 3.7.4.2 จากนั้นหั่นเนื้อสไลซ์ประมาณ 20 ชิ้นต่อเนื่องกัน ขนาด 3 มิลลิเมตร นำหนักประมาณ 10 กรัมต่อชิ้น ใช้ปากคีบปลอดเชื้อนำชิ้นเนื้อสไลซ์ที่ได้ใส่ถุง ตีบอาหารปลอดเชื้อ (stomacher bags) ที่มีสารละลายเปปโตน (peptone buffer 1%) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปตีบดด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไป วิเคราะห์จำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อไปเพื่อหาปริมาณการถ่ายโอนเซลล์ของ *P. fluorescens* จากเครื่องสไลซ์เนื้อสุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร ตามวิธีในข้อ 3.7.4.3.2 ทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งความ เข้มข้น

3.7.4.3.1 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรียของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลส

ตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่เกาะติดและเกิดไบโอฟิล์ม บนพื้นผิว ไบโอดีสแตนเลส ทำการสุ่มตรวจบริเวณด้านหน้าของไบโอดีสแตนเลส 4 จุด และ ด้านหลังของไบโอดีสแตนเลส 4 จุด ที่เกิดการเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์ม โดยการใช้ไม้ พันสำลีปลอดเชื้อกวาดบนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลส ขนาดพื้นที่ 2 ตารางเซนติเมตร จากนั้น นำไม้พันสำลีไปใส่ใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ แล้วปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่ ความเร็วสูงสุดประมาณ 1 นาที นำสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ต้องการ ปิเปตสารละลายเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Agar Base ด้วยวิธี swab และ spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับ จำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี และคำนวณหา ปริมาณเซลล์ต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.4.3.2 การตรวจหาปริมาณการถ่ายโอนของเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อสุผลิตภัณฑอาหาร

ตรวจนับปริมาณการถ่ายโอนของเซลล์ *P. fluorescens* โดยใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบชิ้นเนื้อแต่ละชิ้นตามลำดับที่ได้จากการสไลซ์ ใส่ถุงตึบอาหารปลอดเชื้อ ที่มีสารละลาย เปปโตน (peptone buffer 1%) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปตึบด้วยเครื่อง stomacher เป็น เวลา 2 นาที จากนั้นตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี pour plate technique โดยปิเปต สารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ ได้ระดับการเจือจางที่ทำให้สามารถตรวจนับเชื้อได้ในช่วง 25 ถึง 250 โคโลนี ปิเปตสารละลาย เชื้อเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Agar Base บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจาน เพาะเชื้อ คำนวณหาปริมาณ *P. fluorescens* ทั้งหมดในสารละลาย 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ ข้อมูลการถ่ายโอนของเซลล์แบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และ Duncan's multiple – range tests โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.5 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์และไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens*

3.7.5.1 สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) โดยมี active chlorine 6-14% และกรดเปอร์ออกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) หรือชื่อทางการค้าว่า Proxitane® ความเข้มข้น 5 % วิธีการเตรียม แสดงตามภาคผนวก ข และทำการวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine ของสารฆ่าเชื้อก่อน ทำการทดลองทุกครั้ง

3.7.5.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* ในตัวกลางอาหารชนิดเหลว

ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) โดยมี active chlorine 6-14% และกรดเปอร์ออกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ความเข้มข้น 5 % เพื่อลดปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* เมื่อ

แขวนลอยอยู่ในตัวกลางอาหารชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5% w/v) (วิธีการเตรียมแสดงตามภาคผนวก ก) โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/ml) การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ กำหนดความเข้มข้นที่ 100, 200 และ 400 ppm กรดเปอร์แอสติก กำหนดความเข้มข้นที่ 25 50 และ 100 ppm

การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดปริมาณเชื้อ โดยนำสารละลายฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ ปริมาตร 9 mL ใส่ในหลอดปลอดเชื้อ ขนาด 50 mL ปิดเตตสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลว 9 log CFU/mL ที่เตรียมขึ้นตามวิธีข้างต้น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นลดลง 10 เท่า คือ 8 log CFU/mL ที่ทำให้สารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางอาหารชนิดเหลวสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 0, 5, 10, 20, 30 นาที สุ่มตัวอย่างแต่ละเวลานั้น 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจนับเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต ยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อก่อนด้วยโดยการปิเปตสารแขวนลอยเชื้อ 1 มิลลิลิตร แล้วใส่ในสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ที่ละลายอยู่ใน PBS บัฟเฟอร์ (0.5 % sodium thiosulfate in phosphate buffer) (ส่วนกรดเปอร์รอกซีแอซิดิกจะหยุดปฏิกิริยาด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ก่อนที่จะทำ serial dilution และตรวจนับจำนวนเซลล์ *P. fluorescens* ตามวิธีในข้อ 3.7.5.4.1 ทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.5.3 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

สร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ชนิด 304/2B ตามวิธีในข้อ 3.7.2.3 โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/ml) นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อโดยปิเปตสารฆ่าเชื้อตามความเข้มข้นเช่นเดียวกับข้อ 3.7.5.2 จำนวน 30 มิลลิลิตร ใส่ลงไป ในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นพื้นผิวทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แขนในสารฆ่าเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ทดสอบที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เมื่อครบเวลาที่กำหนดใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบแผ่นทดสอบออกจากหลอดสารฆ่าเชื้อ จุ่มในสารละลาย 0.5 % sodium thiosulfate เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อ ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

ส่วนในกรณีกรดเปอร์รอกซีแอซีติกจะหยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มใน phosphate buffer saline (PBS pH 7.2) 2 ครั้งๆละ 10 วินาที จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อเช็ดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว และตรวจนับปริมาณเซลล์ *P. fluorescens* ที่เหลือรอดบนแผ่นผิวทดสอบตามวิธีในข้อ 3.7.5.4.2 ทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.5.4 การตรวจนับปริมาณเซลล์ *P. fluorescens* ที่เหลือรอดชีวิต

3.7.5.4.1 การตรวจนับปริมาณเซลล์ *P. fluorescens* ในตัวกลางอาหารชนิดเหลวที่เหลือรอดชีวิต

ตรวจนับปริมาณเซลล์ *P. fluorescens* ที่เหลือรอดชีวิต โดยทำการเจือจางสารแขวนลอยเชื้อที่กระจายตัวในสารฆ่าเชื้อและหยุดปฏิกิริยาในการทำลายเซลล์ของสารฆ่าเชื้อในข้อ 3.7.5.2 ให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธี spread plate technique บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25 - 250 โคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่เหลือรอดชีวิต

3.7.5.4.2 การตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวสัมผัสอาหารที่เหลือรอดชีวิต

ส่วนกรณีของไบโอฟิล์มใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อกวาดเช็ดลงบนพื้นผิวทดสอบพื้นที่ประมาณ 2 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำไม้พันสำลีไปใส่ใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ แล้วปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 1 นาที นำสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ทำให้สามารถตรวจนับเชื้อได้ในช่วง 25 ถึง 250 โคโลนี และปิเปตสารละลายเชื้อเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ต้องการมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธี swab และ spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25 - 250 โคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่เหลือรอดชีวิตทั้งหมดต่อพื้นที่ของพื้นผิว 1 ตารางเซนติเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.5.5 ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอมัดเครื่องสไลซ์เนื้อ

ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) และกรดเปอร์ออกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ความเข้มข้น 5 % เพื่อลดปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอมัด สเตนเลสสตีล การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ กำหนดความเข้มข้นที่ 100, 200 และ 400 ppm กรดเปอร์แอซีติก กำหนดความเข้มข้นที่ 25 50 และ 100 ppm

เตรียมไบโอมัดสเตนเลสสตีลที่มีการสร้างของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวตามวิธีในข้อ 3.7.4.2.2 นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ โดยเปิดสารฆ่าเชื้อตามความเข้มข้นเช่นเดียวกับข้อ 3.7.5.2 จำนวน 1000 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะปลอดเชื้อขนาด 5000 มิลลิลิตร โดยใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบไบโอมัดสเตนเลสสตีลที่เกิดไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แช่ในสารฆ่าเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบไบโอมัดสเตนเลสสตีลออกจากสารฆ่าเชื้อ จากนั้นจุ่มไบโอมัดสเตนเลสสตีลในสารละลาย 0.5 % sodium thiosulfate เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีน ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนในกรณีกรดเปอร์ออกซีแอซีติกจะหยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มใน phosphate buffer saline (PBS pH 7.2) 2 ครั้งๆ ละ 10 วินาที จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อเช็ดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว และตรวจนับปริมาณ *P. fluorescens* ที่เหลือรอดบนแผ่นผิวทดสอบ ตามวิธีในข้อ 3.7.5.5.1 ทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.5.5.1 การตรวจนับปริมาณเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวไบโอมัดเครื่องสไลซ์เนื้อที่เหลือรอดชีวิต

ตรวจนับปริมาณเซลล์ *P. fluorescens* ที่เหลือรอดชีวิตบนพื้นผิวไบโอมัดสเตนเลสสตีล โดยใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อกวาดเช็ดลงบนพื้นผิวทดสอบพื้นที่ประมาณ 2 ตารางเซนติเมตร นำไม้พันสำลีไปใส่ในสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ที่ละลายอยู่ใน PBS บัฟเฟอร์ (กรณีสารฆ่าเชื้อเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนกรณีสารฆ่าเชื้อเป็นกรดเปอร์ออกซีแอซีติก ใช้ PBS (pH 7.2) บั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 1 นาที นำสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ

ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ต้องการ ปิเปตสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Agar Base ด้วยวิธี spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่เหลือรอดชีวิตทั้งหมดต่อพื้นที่ของพื้นผิว 1 ตารางเซนติเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.6 การวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine (Iodometric Method) (APHA.1975)

นำตัวอย่างสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 100, 200 และ 400 ppm ที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณคลอรีน ประมาณ 150 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid เพื่อให้สารละลายมีค่า pH อยู่ระหว่าง 3-4 แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ประมาณ 1 กรัมทันที ถ้าสารละลายมีสีเหลืองให้ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.01 นอร์มัล ทันที ในที่ไม่มีแสงจ้า จนเป็นสีเหลืองจาง จึงเติมน้ำแป้งลงไป 1 มิลลิลิตร สารละลายจะมีสีน้ำเงินจางหายไป จดบันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต

สำหรับสารละลายที่เป็น Blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง คำนวณหา available chlorine ได้จาก

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

V_1 = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรต Blank

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มัลของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต

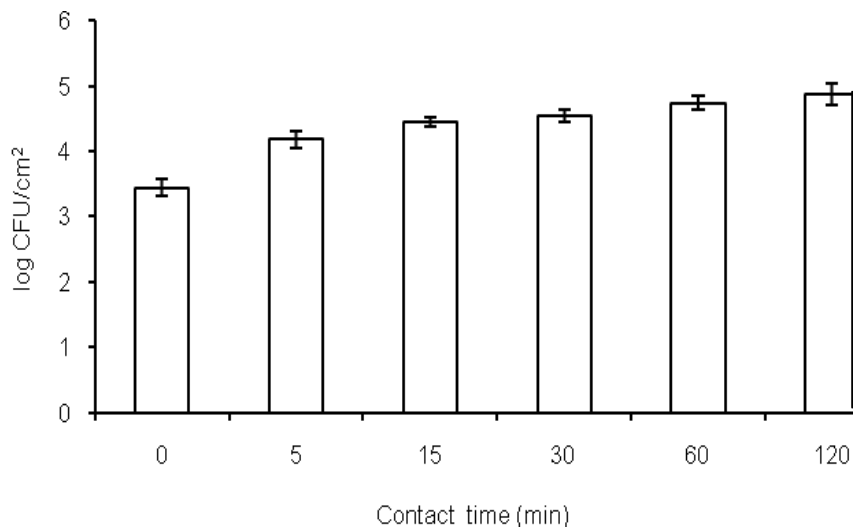
บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์ม

4.1.1 การเกาะติดของ *P. fluorescens* บนแผ่นสแตนเลสสตีล

การเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวชนิดต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะพื้นผิวสัมผัสอาหาร เมื่อพื้นผิวดังกล่าวผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อไม่ดีพอจะทำให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์และเจริญกลายเป็นไบโอฟิล์ม ระยะเวลาในการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องศึกษา (Marshall, 1994; Flint, Bremer and Brooks, 1997) เนื่องจากสามารถใช้เป็นตัวชี้บ่งระยะเวลาในการเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิต จากจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารดังกล่าว ซึ่งมีความสำคัญต่อผู้ประกอบการในอุตสาหกรรมอาหารและผู้ให้บริการอาหารเป็นอย่างมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองตั้งแต่ 0 นาที (จุ่มแผ่นทดสอบแล้วยกขึ้นทันที) เป็นต้นไป เพื่อศึกษาการเกาะติดของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร คือ แผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 surface finish 2B ซึ่งเป็นตัวแทนของสแตนเลสสตีลที่ใช้เป็นส่วนใหญ่ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร (บริษัทไทยน็อคซ์สแตนเลส จำกัด, 2008) โดยทำการจุ่มแผ่นทดสอบลงในสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว ทิ้งไว้ให้เกิดการเกาะติดที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0 นาที เป็นต้นไป แล้วตรวจสอบการเกาะติดของ *P. fluorescens* บนแผ่นสแตนเลสสตีล ที่ระยะเวลา 0 ถึง 120 นาที โดยตรวจสอบจำนวนเซลล์บนแผ่นสแตนเลสสตีล ด้วยวิธี swab และ spread plate technique พบว่าเมื่อจุ่มแผ่นทดสอบในสารละลาย Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มีปริมาณเชื้อ $8 \log \text{CFU/mL}$ ที่เวลา 0 นาที (จุ่มแผ่นทดสอบแล้วยกขึ้นทันที) สามารถตรวจพบเชื้อบนแผ่นสแตนเลสสตีล ประมาณ $3.44 \pm 0.13 \log \text{CFU/cm}^2$ และหลังจาก 0 นาที เชื้อสามารถเกาะบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้มากขึ้น สังเกตได้จากกราฟในรูป 4.1 ในช่วงเวลา 0 – 15 นาที มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และถ้าทิ้งแผ่นสแตนเลสสตีลไว้ในอาหารเป็นเวลานานก็จะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เกาะติดและเจริญบนแผ่นสแตนเลสสตีลเพิ่มมากขึ้นด้วย และที่เวลา 120 นาที ตรวจพบจำนวนเซลล์มีค่า $4.87 \pm 0.17 \log \text{CFU/cm}^2$ (รูปที่ 4.1)



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

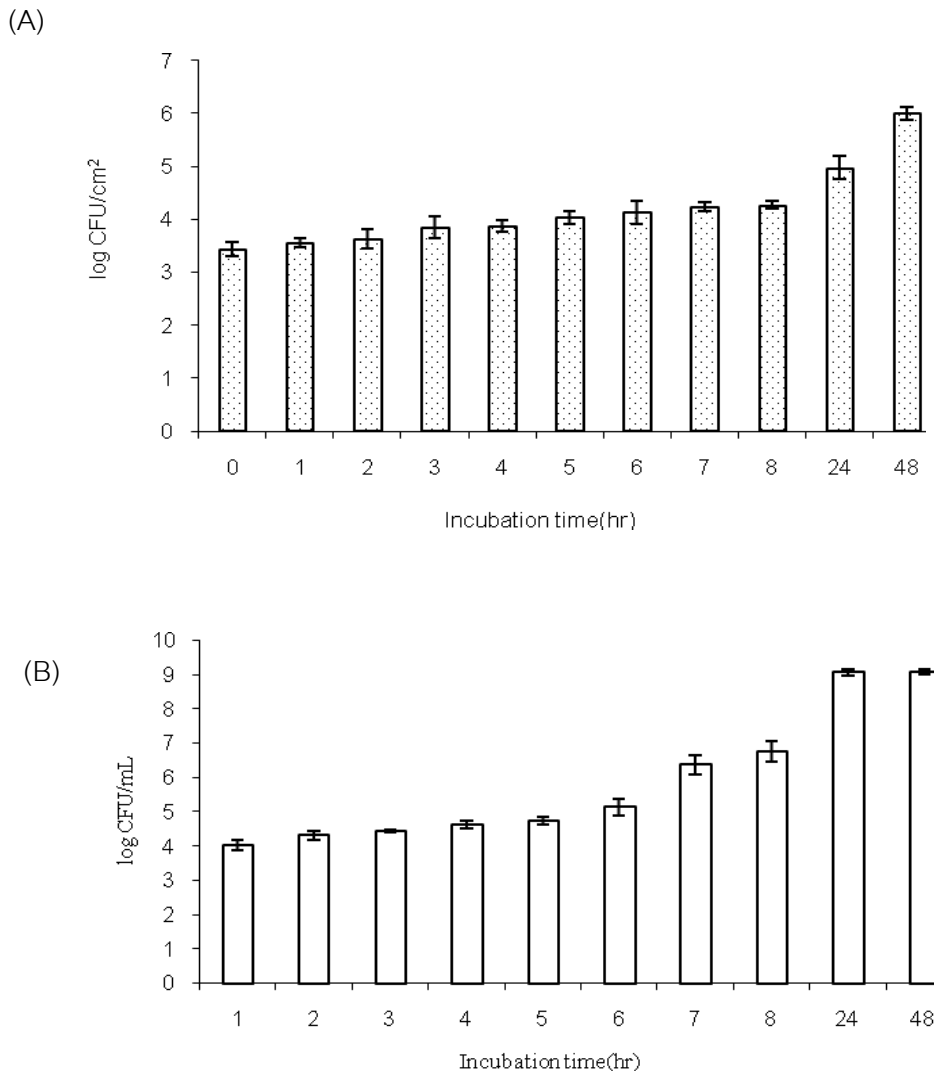
สำหรับการทดสอบเมื่อจุ่มแผ่นทดสอบในสารละลาย TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 3 log CFU/mL พบว่าที่เวลา 0 ถึง 120 นาที ไม่สามารถตรวจพบเชื้อบนพื้นผิวทดสอบด้วยวิธี swab และ spread plate technique ทั้งนี้ไม่ได้แสดงว่าไม่มีเซลล์ของ *P. fluorescens* เกาะบนแผ่นสแตนเลสสตีล โดยพบโคโลนีของ *P. fluorescens* บนจานเพาะเชื้อ แต่มีจำนวนเซลล์น้อยมาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเป็นข้อจำกัดทางเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อบนแผ่นทดสอบ เนื่องจากเซลล์เริ่มต้นมีปริมาณน้อยการเกาะติดของเชื้อบนแผ่นสแตนเลสสตีลในช่วงระยะนี้ 0 ถึง 120 นาที มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยและอาจมีการเกาะติดแบบหลวมๆ ระหว่างตัวเซลล์กับพื้นผิวสัมผัสเซลล์ ดังนั้นเซลล์แบคทีเรียจะต้องใช้เวลาในการสร้างเซลล์และเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งแตกต่างกับการทดสอบปริมาณเชื้อระดับสูง (8 log CFU/ mL) ถึงแม้ว่ามีการเกาะติดแบบหลวมๆ และเซลล์หลุดไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่มีปริมาณเชื้อมากกว่าจึงสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี swab และ spread plate technique

ปัจจุบันมีวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบการเกาะติดของแบคทีเรียและไบโอฟิล์มบนพื้นผิว ซึ่งค่าที่ตรวจวัดได้ออกมาในรูปแบบเชิงคุณภาพ (qualitative) เช่น scanning electron microscopy และ optical microscopy ซึ่งจะเป็นวิธีที่สามารถแสดงการเกาะติดของไบโอฟิล์มเป็นรูปภาพ (Costerton and Lewandowski, 1995; Garrett et al., 2008) แต่ก็ไม่

สามารถวัดค่าออกมาในเชิงปริมาณ(quantitative)ได้ การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของไบโอฟิล์มด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์แบบธรรมดาจะทราบข้อมูลเฉพาะผิวหน้าของตัวอย่างเท่านั้น อย่างเช่นวิธี epifluorescence microscopy, atomic force microscopy ภาพที่เห็นจะเป็นสองมิติ ปัจจุบันมีกล้องฟลูออเรสเซนซ์ที่มีระบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ที่สามารถรับภาพที่มีความลึกได้ผิวหน้าได้ กล้องชนิดนี้เรียกว่า confocal laser scanning microscopy สามารถวัดค่าออกมาในเชิงปริมาณได้ ด้วยการย้อมสีเซลล์ แล้วนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ณฐนนท์ ตราชู, 2551; Garrett et al., 2008) ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะเหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อได้ดีกว่า conventional cultivating method

4.1.2 การเกิด *P. fluorescens* Biofilm บนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B

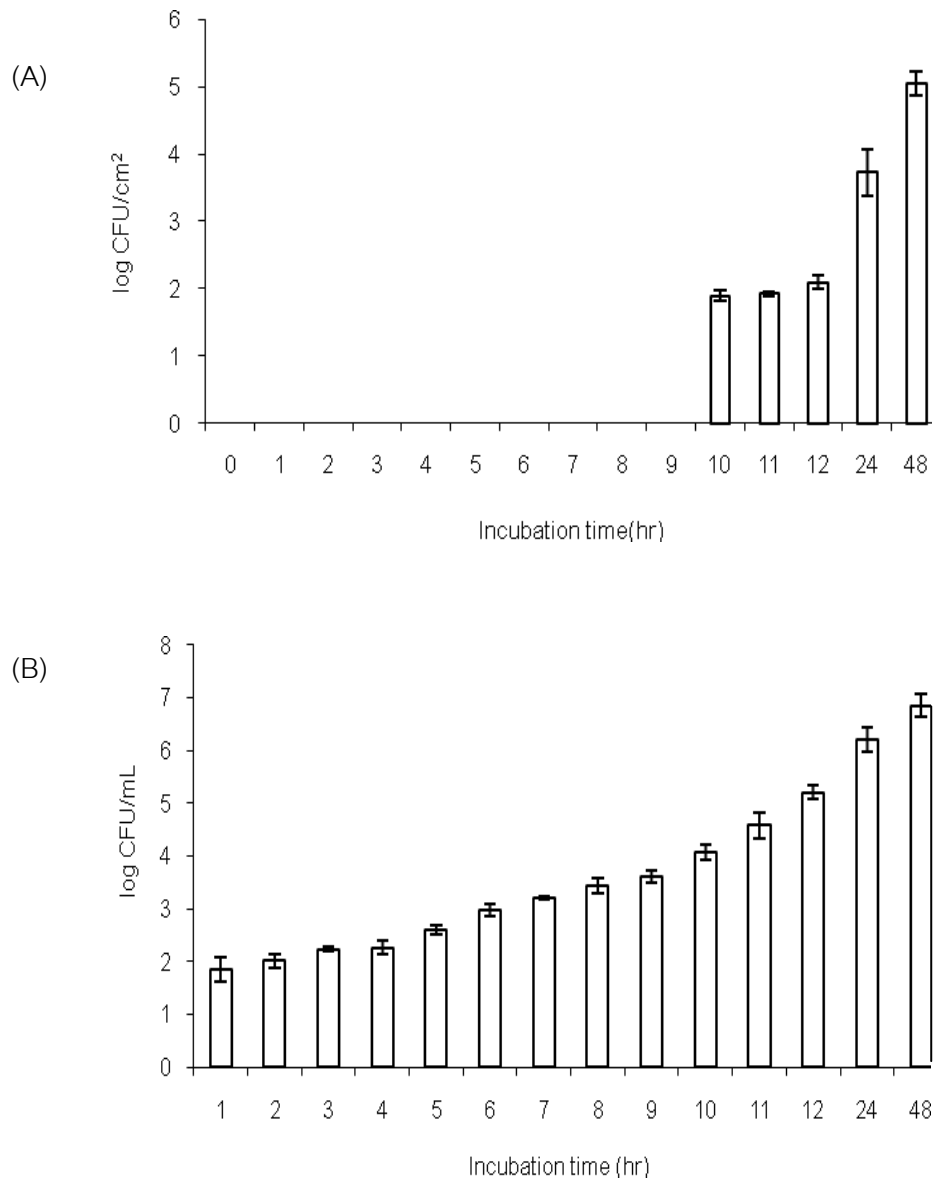
จากการทดลองข้างต้น ทำให้พบว่าที่เวลา 0 นาที ก็เพียงพอที่จะทำให้ *P. fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้ทันที ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงจุ่มแผ่นทดสอบในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL เนื่องจากการเกาะติดของเซลล์บนแผ่นสแตนเลสสตีลที่เวลา 0 ถึง 5 นาที ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก จึงเลือกจุ่มสารแขวนลอยเซลล์ 30 วินาที เพื่อความสะดวกของความต่อเนื่องในการทำการทดลอง จากนั้นย้ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ทิ้งไว้ตามระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลอง พบว่าการตรวจปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* บนแผ่นสแตนเลสสตีล โดยวิธี swab และ spread plate technique ในช่วงเวลา 1-8 ชั่วโมงแรก พบว่า สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ มีค่า 3.56 ± 0.09 ถึง 4.27 ± 0.07 log CFU/cm² หลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์ 4.97 ± 0.22 log CFU/cm² และมีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมากที่สุดหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบได้ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาสูงสุดที่ทำการศึกษา พบว่ามีค่า 6.00 ± 0.12 log CFU/cm² (รูปที่ 4.2)



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

ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 log CFU/mL ที่เวลา 1 ถึง 9 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อบนแผ่นสแตนเลสสตีล ด้วยวิธี spread plate technique ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าเชื้อที่ติดมาบนแผ่นสแตนเลสสตีล น้อยมากเซลล์มีการเกาะติดแบบหลวมๆ มีผลทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวสัมผัสได้ง่ายและหลุดไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงต้องอาศัยระยะเวลาพอสมควรที่เชื้อเพิ่มจำนวน จึงจะตรวจพบได้แต่เมื่อตรวจเชื้อบนแผ่นสแตนเลสสตีล ในช่วงเวลา 10 ชั่วโมง สามารถตรวจพบ *P. fluorescens* ที่เกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้ 2.09 ± 0.10 log CFU/cm²

หลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเซลล์ 3.72 ± 0.34 log CFU/cm² และมีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมากที่สุดหลังจากการบ่มแผ่นทดสอบได้ 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่า 5.05 ± 0.18 log CFU/cm² (รูปที่ 4.3)



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

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบ หลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง ($8 \log \text{ CFU/mL}$) มีจำนวนเซลล์ $4.97 \pm 0.22 \log \text{ CFU/cm}^2$ ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ ($3 \log \text{ CFU/mL}$) ถึงแม้ว่าที่เวลา 1 – 9 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อบนแผ่นสแตนเลสสตีล เนื่องจากมีเชื้อมีปริมาณน้อย แต่พบว่าเมื่อบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลานานขึ้น ณ เวลาที่ 10 ชั่วโมง มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ และหลังจากบ่มแผ่นทดสอบไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ $3.72 \pm 0.34 \log \text{ CFU/cm}^2$

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

Zottola (1994) รวบรวมข้อมูลจากนักวิจัยหลายท่านเพื่ออธิบายกลไกการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่างๆ โดยแสดงความสัมพันธ์ของแรงยึดเกาะกับระยะห่างของเซลล์กับพื้นผิว กล่าวคือ เมื่อมีสารอาหารหลงเหลือบนพื้นผิวจนเกิดเป็นฟิล์มของอาหาร (conditioning film) เซลล์จุลินทรีย์อิสระที่อยู่ในสภาพแวดล้อมจะเคลื่อนที่เข้าหาพื้นผิว จนเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวมากกว่า 50 นาโนเมตร เซลล์จะเกิดการเกาะติดกับพื้นผิวด้วยแรงอย่างอ่อน เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์จะเข้าไปใกล้ผิวมากขึ้นจนระยะห่างมีค่า 10-20 นาโนเมตร แรงยึดเกาะนั้นจะเพิ่มขึ้น ทั้งสองระยะนี้จะเป็นขั้นตอนของการเกาะติดแบบผันกลับได้ จนในที่สุดเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวลดลงต่ำกว่า 15 นาโนเมตร เซลล์จุลินทรีย์เหล่านั้นจะเกิดการสร้างพันธะพิเศษเกิดเป็นการเกาะติดแบบไม่ผันกลับ เซลล์ต่างๆ เหล่านี้จะมีการเจริญเพิ่มจำนวนและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มต่อไป

ณฐนนท์ ตราชู (2551) รายงานว่าการเกาะติดของจุลินทรีย์ต้องอาศัยระยะเวลาที่จุลินทรีย์สัมผัสกับพื้นผิวของวัสดุ ลักษณะทางเคมีกายภาพของของเหลวรอบข้างและผิววัสดุ อาจกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงถึงระดับยีนภายในเซลล์และทำให้เซลล์สร้าง cell surface proteins ที่จะช่วยในการเกาะติดได้ ซึ่งจะต้องอาศัยเวลาหรือ contact time

ดังนั้นความสามารถในการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิววัสดุหลายชนิดในระยะเวลาอันสั้น ระยะเวลาที่เชื้อใช้ในการเกาะติดบนพื้นผิววัสดุต่างๆ นั้นเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญอย่างมากในการเฝ้าระวังเรื่องความสะอาดและการสุขาภิบาลในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และมีผลต่อการออกแบบเครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อลดการสะสมของเศษอาหารและจุลินทรีย์

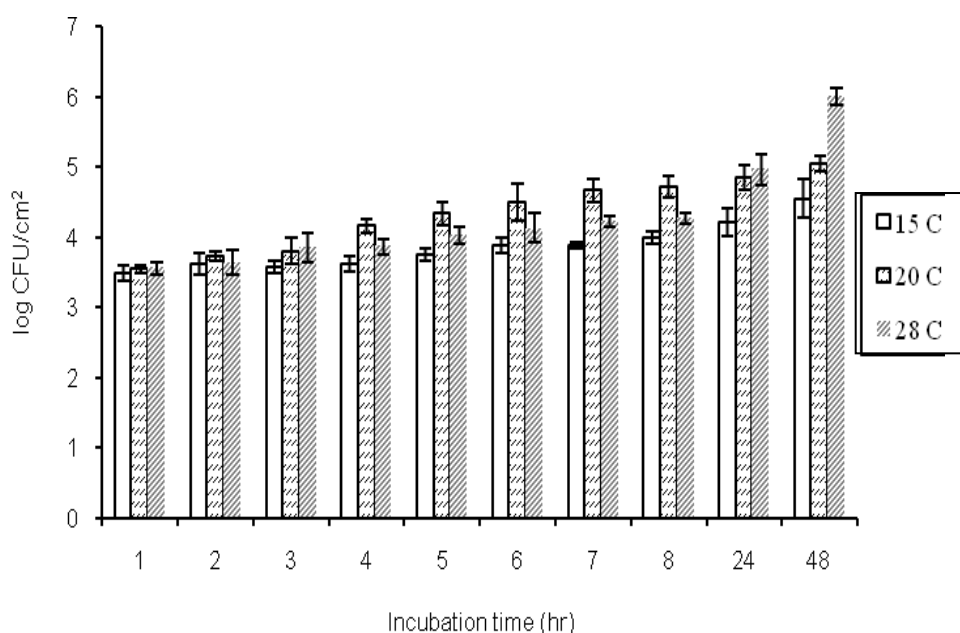
4.1.3 อุณหภูมิและปริมาณเชื้อที่มีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์มีการเกาะติดบนพื้นผิวแล้วและอยู่ในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์สามารถพัฒนาเจริญเป็นไบโอฟิล์มได้ จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังนั้นอิทธิพลของอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จะต้องทำการศึกษา (Oulahal et al., 2007) ประกอบกับจำนวนเชื้อในธรรมชาติที่ไม่เท่ากันจึงมีความสามารถในการเกิดไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน การทดลองในครั้งนี้ได้เลือกอุณหภูมิที่ครอบคลุมกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์ในขั้นตอนการตัดชิ้นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น แฮม เป็นต้น คือเลือกอุณหภูมิ 15 20 และ 28 องศาเซลเซียส

จากการทดลองข้างต้น ข้อ 4.1.1 ทำให้ทราบว่าที่เวลา 0 นาที (จุ่มแผ่นทดสอบแล้วยกขึ้นทันที) *P. fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้ทันที ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงจุ่มแผ่นทดสอบในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อ เพียง 30 วินาที แล้วย้ายไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ทิ้งไว้ตามระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของเชื้อ $8 \log \text{ CFU/ml}$ ในช่วงเวลา 1-8 ชั่วโมงแรก พบว่า สามารถตรวจพบ *Pseudomonas fluorescens* ที่เกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้และสามารถตรวจพบได้มากในช่วงเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $3 \log \text{ CFU/mL}$ พบว่าที่เวลา 1-9 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อบนแผ่นสแตนเลสสตีล ด้วยวิธี swab และ spread plate technique ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเชื้อที่ติดมาบนแผ่นสแตนเลสสตีลน้อยมากเซลล์มีการเกาะติดแบบหลวมๆ มีผลทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวสัมผัสได้ง่ายและหลุดไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงต้องอาศัยระยะเวลาพอสมควรที่เชื้อเพิ่มจำนวน จึงจะตรวจพบได้ในช่วงเวลา 10 ชั่วโมง สามารถตรวจพบ *P. fluorescens* ที่เกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้และสามารถตรวจพบได้มากในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง จึงอาจกล่าวได้ว่า มีเชื้อเกาะติดบนแผ่นทดสอบแต่

เชื้อที่เกาะติดมีจำนวนน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดด้วยวิธี spread plate technique ที่ใช้กันโดยทั่วไปได้

เมื่อพิจารณาถึงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *P. fluorescens* บนแผ่นทดสอบ โดยจุ่มแผ่นทดสอบในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อความเข้มข้น 8 log CFU/mL ก่อนจะย้ายไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส *P. fluorescens* สามารถเจริญได้ดีและรวดเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมีค่า 4.97 ± 0.22 , 4.85 ± 0.18 และ 4.22 ± 0.20 log CFU/cm² ตามลำดับ ซึ่งแต่ละอุณหภูมิจะแตกต่างกันและพบว่าที่ เวลา 48 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อมากที่สุด มีค่า 6.00 ± 0.12 , 5.05 ± 0.12 และ 4.55 ± 0.28 log CFU/cm² ที่อุณหภูมิ 28 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อจุ่มแผ่นทดสอบในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อความเข้มข้น 3 log CFU/mL ก่อนจะย้ายไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ 3.72 ± 0.06 , 3.44 ± 0.12 และ 3.28 ± 0.06 log CFU/cm² ที่อุณหภูมิ 28 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* บนแผ่นสแตนเลสตีลเกรด 304 ชนิด 2B เมื่อจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้วย้ายไปใส่ในอาหาร TSB หลอดใหม่ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2, 20 ± 2, 15 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการตรวจนับโดยวิธี swab และ spread plate technique

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นเริ่มต้นของ *P. fluorescens* พบว่าถ้ามีปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *P. fluorescens* ระดับสูง (8 log CFU/mL) จะทำให้ *P. fluorescens* สามารถติดมากับแผ่นสแตนเลสสตีลได้ง่ายและสามารถเจริญเพิ่มจำนวนบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้ดี ในขณะที่เชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) โอกาสในการเกาะติดมาบนแผ่นทดสอบน้อย จึงต้องอาศัยระยะเวลาในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนนาน จึงสามารถตรวจสอบได้

จีระเดช มาลา (2551) ศึกษาปัจจัยในการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *Salmonella* Anatum DMST17362 บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร พบว่าในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/mL) เพียงแค่สัมผัส (0 นาที) ก็เพียงพอที่จะทำให้ *S. Anatum* สามารถเกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีล ส่วนในสภาวะที่มีเชื้อน้อย (3 log CFU/mL) จะต้องอาศัยระยะเวลาให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนจึงจะตรวจพบเชื้อได้ และพบว่า *S. Anatum* สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์บนพื้นผิวสแตนเลสสตีลที่อุณหภูมิ 30 °C ได้ดีกว่าอุณหภูมิ 20 และ 15 °C โดยมีค่าเท่ากับ ค่า 6.08 ± 0.35 , 5.45 ± 0.39 และ 3.50 ± 0.22 log CFU/cm² ที่ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

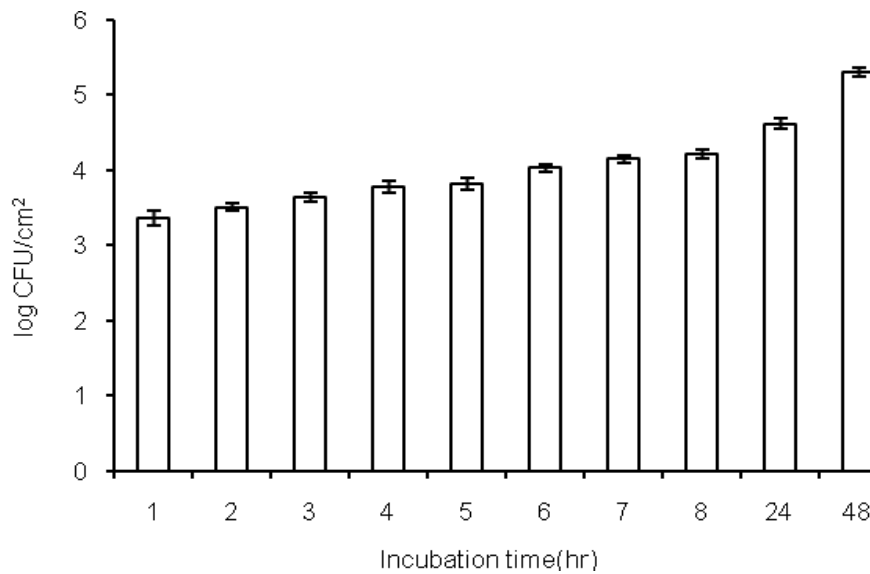
Rod และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (incubation temperature) ที่อุณหภูมิ 20 และ 25 °C ต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *Staphylococcus aureus* โดยบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 30 °C 37°C 42°C 46°C และ 48°C ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าไบโอฟิล์มของ *S. aureus* จากการบ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25 °C ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เกิดได้น้อยกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 46°C และ 48°C ซึ่งใช้ระยะเวลาในการบ่มเพียง 24 ชั่วโมง

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเกิดไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญที่แตกต่างกัน อุณหภูมิที่จุลินทรีย์เจริญได้จะอยู่ระหว่างอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) และอุณหภูมิต่ำสุด (minimum temperature) ซึ่งถ้าอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่านี้ จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ (optimum temperature) จึงแตกต่างกันออกไปตามแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *P. fluorescens* อยู่ระหว่าง 26 - 30.5 °C (Sillankorva et al., 2004) การทดลองในครั้งนี้ได้เลือกอุณหภูมิที่ครอบคลุมกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์ในขั้นตอนการตัดชิ้นผลิตภัณฑ์

เนื้อสัตว์ เช่น แฮม เป็นต้น คือเลือกอุณหภูมิ 15 20 และ 28 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่า การเจริญของ *P. fluorescens* biofilm บนแผ่นสแตนเลสสตีล ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส *P. fluorescens* สามารถเจริญได้ดีและรวดเร็วกว่า 20 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากสภาวะในการบ่มแผ่นทดสอบอยู่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *P. fluorescens* แต่อย่างไรก็ตาม ในอุตสาหกรรมอาหาร กระบวนการเริ่มต้นจนกระทั่งถึงปลายทางมีความต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ โดยผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้าจะใช้เป็นวัตถุดิบ (raw material) สำหรับขั้นตอนต่อมา การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนของการผลิตจึงส่งผลกระทบต่อโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดไบโอฟิล์มขึ้นได้ในกระบวนการผลิต (สุเมธธา วัฒนสินธุ์, 2549)

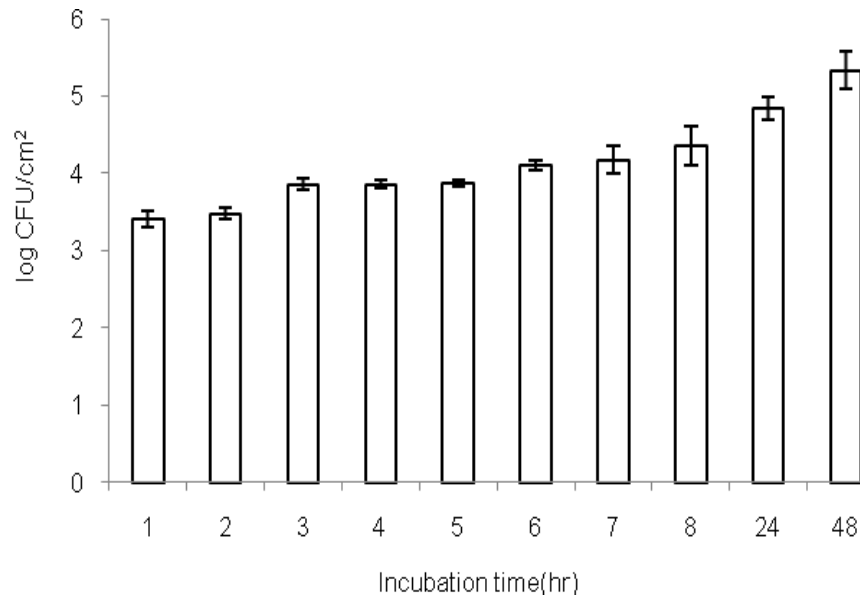
4.1.4 การเปลี่ยนแปลงสารอาหารของตัวกลางชนิดเหลวต่อการเกิดไบโอฟิล์ม

สารอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์เจริญและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน โดยจุลินทรีย์ต่างชนิดกันมีความต้องการสารอาหารที่ต่างกัน การที่มีสารอาหารมากหรือน้อยแตกต่างกัน จะมีผลต่อการเจริญเป็นไบโอฟิล์ม ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารต่อการเจริญของไบโอฟิล์มเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องทำการศึกษา (Costerton and Lewandowski, 1995; Garrett et al., 2008) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า *P. fluorescens* สามารถเกาะติดและเจริญเป็นไบโอฟิล์มบนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ได้ที่ระยะเวลา 1-48 ชั่วโมง ด้วยการตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยวิธี swab และ spread plate technique บนอาหาร TSB ดังนั้นขั้นตอนต่อไปจึงทำการเปลี่ยนชนิดสารอาหารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งเป็นอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นสารอาหารจากตัวกลางชนิดเหลวชนิดอื่น ๆ โดยการทดลองครั้งนี้ ได้เลือกใช้สารอาหารที่มีองค์ประกอบต่าง ๆ กันไป ตั้งแต่ สารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85, อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) จากการทดลองพบว่า เมื่อเปลี่ยนตัวกลางอาหารหรือตัวกลางชนิดเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85 % NaCl) พบว่า ยังมีการเจริญของ *P. fluorescens* และพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถตรวจนับเซลล์ *P. fluorescens* ได้ $4.62 \pm 0.07 \log \text{ CFU/cm}^2$ และมีจำนวน $5.31 \pm 0.06 \log \text{ CFU/cm}^2$ เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.5)

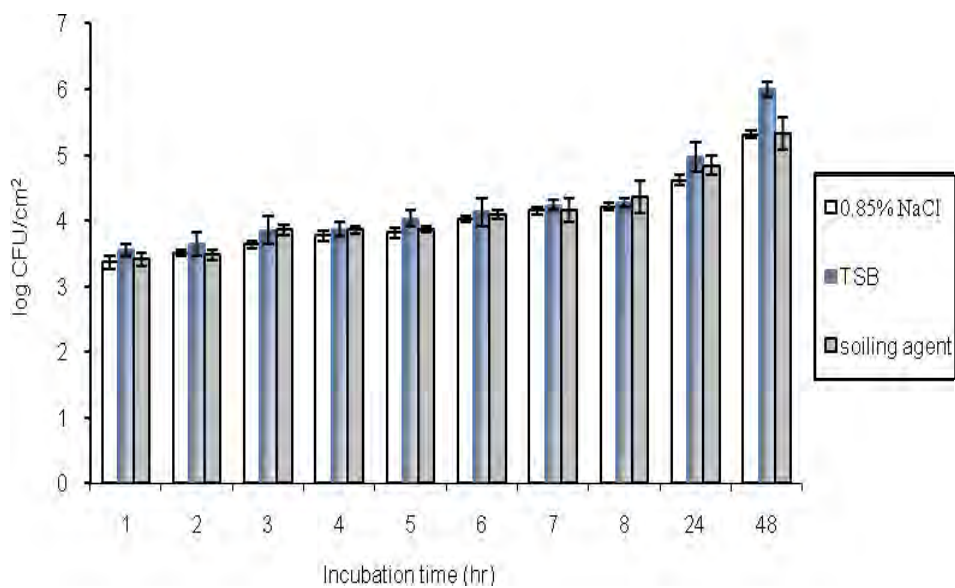


รูปที่ 4.5 จำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อจุ่มอยู่ในสารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 % ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

เมื่อเปลี่ยนแหล่งของตัวกลางอาหารชนิดเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็น soiling agent (beef meat 5%w/v) เนื่องจากต้องการจำลองการปนเปื้อนสารอินทรีย์ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยการนำเนื้อสันในสุกร 50 กรัม หั่นเป็นชิ้นขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นเนื้อและน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ลิตร ไปใส่ใน stomacher bag นำไปคลุกให้เข้ากันด้วยเครื่อง food mixer ในน้ำดีไอโอไนซ์ปลอดเชื้อ จากนั้นกำจัดเชื้อจุลินทรีย์โดยกรองผ่านเครื่องกรอง Millipore โดยกรองผ่าน membrane filter ซึ่งมีรูขนาด 0.45 ไมครอนนำไปใช้เป็นตัวกลางอาหารชนิดเหลว ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าน่าจะทำให้เซลล์ *P. fluorescens* มีการเกาะติดและเจริญเป็นไบโอฟิล์มได้ดียิ่งขึ้น ผลการทดลอง พบว่า เมื่อบ่มแผ่นทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ มีค่า 4.84 ± 0.15 log CFU/cm² และเมื่อบ่มแผ่นทดสอบนานมากขึ้น ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบ มีค่า 5.33 ± 0.24 log CFU/cm² ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)



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



รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญบนแผ่นทดสอบ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหารชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหารที่มีองค์ประกอบต่างกันทั้ง 3 ชนิด คือ สารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85, อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 4.7) จะเห็นได้ว่าช่วงแรกแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของตัวกลางอาหารชนิดเหลว แต่จำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบก็ยังคงมีการเจริญ พร้อมทั้งมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้และไม่มีการแตกต่างกันมากนัก เมื่อเปลี่ยนแหล่งของตัวกลางอาหารชนิดเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นสารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85 % NaCl) พบว่า ยังมีการเจริญของ *P. fluorescens* เนื่องจากอาจมีสารอาหารติดมา เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ดีกว่าสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) และ 0.85 % NaCl ตามลำดับ โดยมีจำนวนเซลล์บนแผ่นทดสอบมีค่า 4.97 ± 0.22 , 4.84 ± 0.15 และ 4.62 ± 0.07 log CFU/cm² ตามลำดับ และพบว่าที่ เวลา 48 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อมากที่สุด มีค่า 6.00 ± 0.12 , 5.33 ± 0.24 และ 5.31 ± 0.06 log CFU/cm² ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่หลังจากบ่มแผ่นทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในสารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85 % NaCl) และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) เริ่มช้าลง แต่การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ เนื่องจาก TSB มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นปริมาณสารอาหารที่สมบูรณ์จึงมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดลองพบว่า เซลล์ของ *P. fluorescens* สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่ไม่มีอาหาร และยังสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนบนแผ่นทดสอบได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่นำมาใช้ในการทดลองได้มีการเตรียมความพร้อมสำหรับการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมาแล้ว เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีอาหารจึงสามารถเพิ่มจำนวนได้และประกอบกับมีน้ำเป็นองค์ประกอบหรือมีสารอาหารติดมากับแผ่นทดสอบ เซลล์อาจใช้น้ำหรือสารอาหารดังกล่าวนี้ในการเพิ่มจำนวน และอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์สามารถใช้ค่า a_w (water activity) หรือปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหารหรือความชื้น นำมาใช้เพื่อแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน ดังนั้นจากการทดลองเป็นที่น่าสังเกตว่าแม้ไม่มีสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ แต่ *P. fluorescens* ก็ยังสามารถรอดชีวิตและแบ่งเซลล์บนแผ่นทดสอบได้ เนื่องจากซูโดโมแนสเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมในโรงงานอุตสาหกรรม จึงมีความสามารถในการปรับตัวได้ดีและทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยได้ (Gill and Newton, 1997) หลายงานวิจัยรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถมีชีวิตรอดอยู่รอดได้บน

เสื้อผ้าหรือพื้นผิวสัมผัสอาหาร Kusumaningrum และคณะ (2003) ศึกษาการรอดชีวิตของ จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารบนพื้นผิวสเตนเลสสตีล พบว่าหลังจากการปนเปื้อนเชื้อเป็นเวลา 4 วัน สามารถตรวจพบเซลล์ของ *staphylococcus aureus* และ *Salmonella enteritidis* ได้ 10^5 และ 10^3 CFU/cm² ตามลำดับ

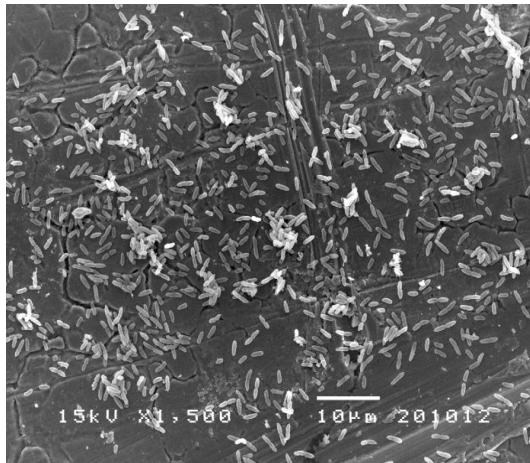
Hood และ Zottola (1997) ศึกษาการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มก่อโรคบนพื้นผิว สเตนเลสสตีล รายงานว่าการเกาะติดของแบคทีเรียคนละชนิดอาจขึ้นอยู่กับความไม่ชอบน้ำ บนผิวเซลล์หรือประจุโดยรวมที่ผิวเซลล์ โดยพบว่าการเกาะติดบนพื้นผิวสเตนเลสสตีลของ *Escherichia coli* จะขึ้นอยู่กับประจุโดยรวมบนผิวเซลล์ โดยจะเกาะติดได้ดีขึ้นเมื่อประจุลบ ลดลง และพบว่าประจุโดยรวมของเซลล์ *Listeria monocytogenes* จะมีความเป็นลบลดลง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดกรดแลคติกและกลูโคสและพบว่าจะสามารถเกาะติดได้ดียิ่งขึ้นถ้า อยู่ในอาหารที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจะเห็นว่าความเป็นกรดต่างของสารอาหาร ส่งผลต่อประจุโดยรวมบนผิวเซลล์ นอกจากนี้คุณสมบัติยังเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกาะติด พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *L. monocytogenes* จะไม่สร้าง flagella และประจุลบบน พื้นผิวเซลล์ลดลง แต่เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส จะมีความเป็นประจุลบสูงขึ้น พร้อมกับมี flagella ทำให้มีการเกาะติดบนพื้นผิวมากขึ้น

Skandamis และคณะ (2009) ศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มและความต้านทานต่อกรด ของ *Escherichia coli* O157:H7 บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เลียนแบบสภาวะโรงฆ่าสัตว์ โดย นำแผ่นทดสอบจุ่มลงในน้ำล้างซากสัตว์ที่ไม่ได้สเตอริไรส์ และในสารละลายกรดแลคติกที่ใช้ ล้างซากสัตว์ ซึ่งมีเชื้อ *E. coli* O157:H7 (10^3 - 10^4 CFU/ml) จากนั้นทำความสะอาดและทำ แห้งแผ่นทดสอบ ทำการบ่มแผ่นทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อเกาะติดบนแผ่น ทดสอบในสภาวะแห้งและพบว่าไบโอฟิล์มที่เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบในสภาวะแห้งมีความ ต้านทานต่อกรดมากขึ้น ดังนั้นการที่จะกำจัดไบโอฟิล์มอย่างไม่สมบูรณ์จะทำให้เซลล์ที่เคย ผ่านสภาวะกรดฟื้นกลับมาและทนความเป็นกรดเพิ่มขึ้น

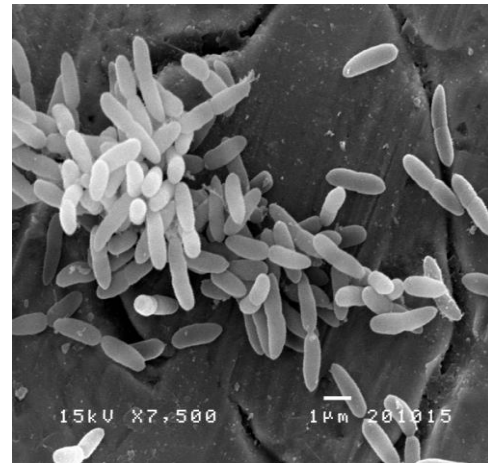
Kim, Ryu และ Beuchat (2006) ศึกษาปัจจัยการเกิดไบโอฟิล์มของ *Enterobacter sakazakii* บนพื้นผิวสแตนเลสสตีล ซึ่งบ่มแผ่นทดสอบที่อุณหภูมิ 12 และ 25°C พบว่าจำนวนเซลล์ที่เกาะติดบนพื้นผิวทดสอบเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C มากกว่าบ่มที่อุณหภูมิ 12 °C และศึกษาการเจริญในตัวกลางอาหารเหลวที่แตกต่างกัน โดยนำแผ่นทดสอบจุ่มในสารแขวนลอยเซลล์ บ่มเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นทดสอบบ่มในตัวกลางอาหารเหลว คือ tryptic soy broth (TSB), infant formula broth (IFB), lettuce juice broth (LJB) บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 10 วัน พบว่าเมื่อบ่มแผ่นทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด IFB ทำให้มีจำนวนเซลล์บนแผ่นสแตนเลสสตีลเพิ่มขึ้น 1.42 - 1.67 log CFU/cm² แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB และ LJB จำนวนเซลล์ไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบไม่เพิ่มขึ้น โดยสรุปพบว่าอุณหภูมิและสารอาหารมีผลต่อการเจริญเป็นไบโอฟิล์มของ *E. sakazakii*

4.2 ลักษณะไบโอฟิล์มบนแผ่นพื้นผิวทดสอบเมื่อตรวจด้วย Scanning Electron Microscope (SEM)

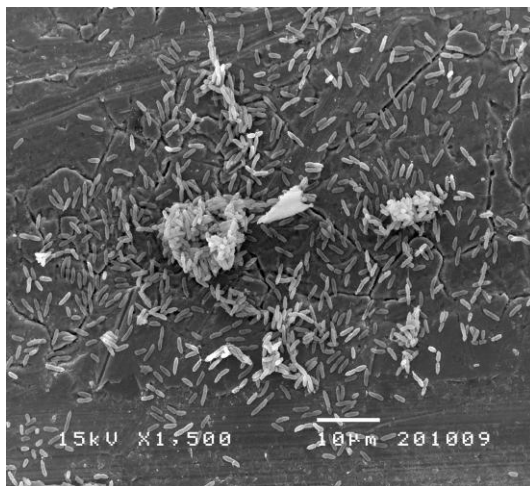
เมื่อจุ่มแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL แล้ว นำแผ่นทดสอบดังกล่าวที่มีการเกาะติดของเชื้อ ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส แล้วตรวจลักษณะการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) รุ่น JSM-5410 LV ทำการทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากรูป 4.8 พบว่าเซลล์จะมีการเกาะติดพื้นผิวทดสอบและกระจายไปทั่วพื้นผิวของแผ่นทดสอบ เกิดเป็น monolayer biofilm (รูปที่ 4.8 A) ซึ่งลักษณะการเกาะของเซลล์กับพื้นผิวของแผ่นทดสอบนั้น จากรูปพบว่าเซลล์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้เลย ไม่ได้เกาะติดโดยอาศัยช่องว่างหรือรอยแตกของพื้นผิว (รูปที่ 4.8 B) นอกจากนี้จะพบได้ว่า ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง เซลล์จะมีลักษณะการเกาะติดบนแผ่นทดสอบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เมื่อระยะเวลาเวลานานมากขึ้น พบว่าเซลล์เริ่มมีการเกาะกลุ่มกลายเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็ก (microcolony) และเมื่อเวลาในการบ่มแผ่นทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะพบว่าเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* มีการเพิ่มจำนวน เกิดการเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) อย่างชัดเจนและสามารถสังเกตเห็นของจุลินทรีย์หลายๆ ชั้น (multilayer biofilm) โดยมีการสร้างเส้นใยออกมาเพื่อยึดเหนี่ยว (รูปที่ 4.8 C, D)



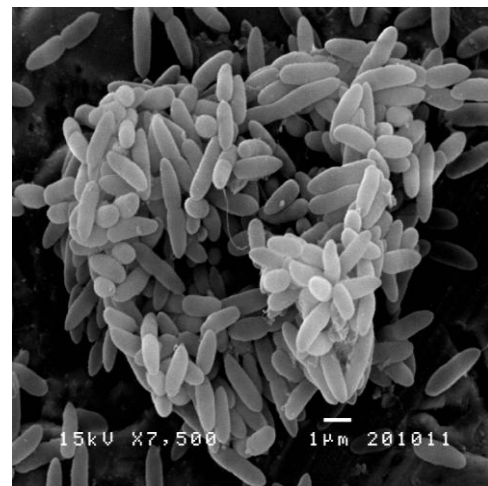
(A)



(B)



(C)



(D)

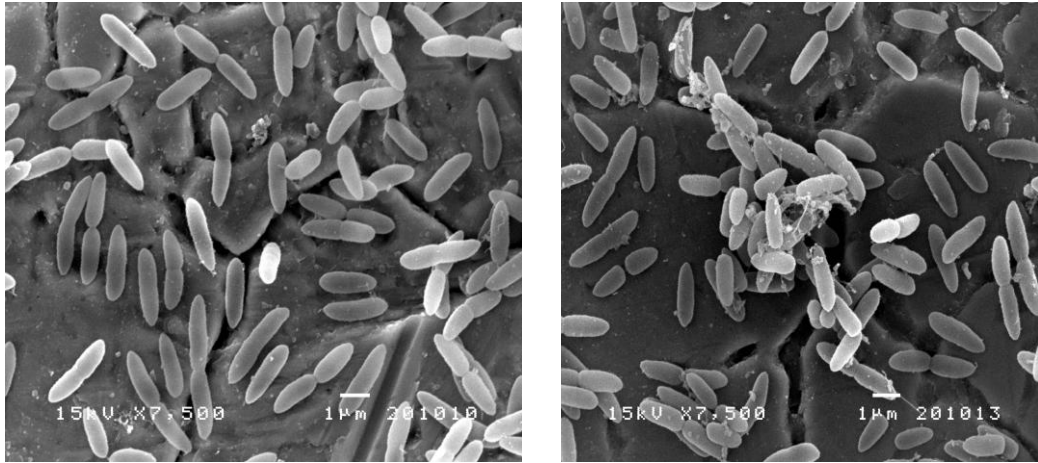
รูปที่ 4.8 การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนแผ่นสแตนเลสสตีลเกรด 304 ชนิด 2B ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL)

(A) กำลังขยาย 1500X (B) กำลังขยาย 7500X ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(C) กำลังขยาย 1500X (D) กำลังขยาย 7500X ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ส่วนการทดสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) โดยนำแผ่นทดสอบดังกล่าวที่มีการเกาะติดของเชื้อ ย้ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ทิ้งไว้ตามระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ตรวจลักษณะการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว จากรูป 4.9 เซลล์ของ *P. fluorescens* ก็สามารถเกาะติดบนพื้นผิวทดสอบนี้ได้ โดยจะเห็นการเกาะติดของเซลล์ได้หลังจากเซลล์มีการ

เกาะติดบนพื้นผิวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์เกาะบนแผ่นทดสอบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่ไม่กระจายทั่วพื้นผิวของแผ่นทดสอบ (รูปที่ 4.9 A) เนื่องจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณน้อย การเกาะติดบนแผ่นทดสอบน้อย จึงต้องอาศัยระยะเวลาในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน เมื่อให้เวลาในการบ่มแผ่นทดสอบนานมากขึ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะเห็นว่าเซลล์ของ *P. fluorescens* มีการเพิ่มจำนวน เซลล์เริ่มมีการเกาะกลุ่มเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็ก (microcolony) (รูปที่ 4.9 B)



(A)

(B)

รูปที่ 4.9 การเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนแผ่นสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL)

(A) กำลังขยาย 7500X ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(B) กำลังขยาย 7500X ที่เวลา 48 ชั่วโมง

การเกาะของเซลล์กับพื้นผิวของแผ่นทดสอบ ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง จะมีลักษณะการเกาะติดเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เมื่อระยะเวลาผ่านไปนานมากขึ้น พบว่าเซลล์เริ่มมีการเกาะกลุ่มกลายเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็ก (microcolony) และเมื่อเวลาในการบ่มแผ่นทดสอบมากขึ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะพบว่าเซลล์ของ *P. fluorescens* มีการเพิ่มจำนวนเกิดการเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) ซึ่งการรวมกลุ่มที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการส่งสัญญาณทางเคมีของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เซลล์ที่เกาะติดอยู่ใกล้ ๆ กัน สามารถรวมกลุ่มกันเป็นกลุ่มเล็กๆ แล้วจึงมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็น ไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (Poulsen, 1999)

4.3 การเกาะติดของเซลล์ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อ

จากการทดลองข้างต้นตามข้อ 4.1 และ 4.2 ได้ศึกษาการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร คือ แผ่นสแตนเลสสตีล ชนิด 304/2B ซึ่งเป็นตัวแทนของสแตนเลสสตีล ที่ใช้เป็นส่วนใหญ่ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ได้ข้อมูลว่าที่เวลา 0 นาที (จุ่มแผ่นทดสอบแล้วยกขึ้นทันที) *P. fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้ทันที ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงศึกษาการเกาะติดของ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีลและการถ่ายโอนเซลล์ของซูโดโมแนสจากเครื่องสไลซ์เนื้อซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งจะ เป็นแนวทางหนึ่งในการวิเคราะห์ปัญหาการเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อควบคุมแหล่งสะสมของจุลินทรีย์ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนข้ามจากอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการผลิตสู่ผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพและช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหาร

ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาการเกาะติดของเซลล์ *P. fluorescens* บนพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีลของเครื่องสไลซ์เนื้อ ที่ใช้ในกระบวนการการหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (โบลาน่าหมู) โดยทำการจุ่มใบมีดสแตนเลสสตีลลงในสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลวปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *P. fluorescens* ระดับสูง ($8 \log \text{CFU/mL}$) โดยจุ่มใบมีดสแตนเลสสตีลในสารแขวนลอยเซลล์ ที่งัวให้เกิดการเกาะติด 30 วินาที จากนั้นนำใบมีดสแตนเลสสตีลผึ่งแห้งในตู้ปลอดเชื้อ 30 นาที ตรวจสอบจำนวนเซลล์บนใบมีดสแตนเลสสตีล ด้วยวิธี swab และ spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Agar Base พบว่า สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวด้านหน้าของใบมีดสแตนเลสสตีล $4.62 \pm 0.48 \log \text{CFU/cm}^2$ และด้านหลังของพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีล $4.42 \pm 0.78 \log \text{CFU/cm}^2$ ส่วนในสภาวะที่มีเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณน้อย ($3 \log \text{CFU/ml}$) พบว่า สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์บนพื้นผิวด้านหน้าของใบมีดสแตนเลสสตีล $1.79 \pm 0.16 \log \text{CFU/cm}^2$ และด้านหลังของพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีล $1.81 \pm 0.20 \log \text{CFU/cm}^2$ (ตารางที่ 4.1)

จากการทดลองข้างต้นข้อ 4.3 ทำให้พบว่าที่เวลา 0 นาที ก็เพียงพอที่จะทำให้ *P. fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้ทันที จึงสร้างการปนเปื้อนของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีล โดยจุ่มใบมีดสแตนเลสสตีลในสาร

แขวนลอยเซลล์ของเชื้อปริมาณเชื้อ 8 log CFU/mL (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง) ในสารแขวนลอยเซลล์ 30 วินาที แล้วนำไปมีดสแตนเลสสตีลใส่ลงในภาชนะฝาปิดปลอดเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ทิ้งไว้ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ที่มีการเกาะติดบนพื้นผิวแล้วมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นและเกิดเป็นไบโอฟิล์ม ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 เมื่อตรวจปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีลโดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Agar Base พบว่าสามารถตรวจพบจำนวนเซลล์บนพื้นผิวด้านหน้าของใบมีดสแตนเลสสตีล 4.55 ± 0.23 log CFU/cm² และด้านหลังของพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีล 4.58 ± 0.35 log CFU/cm² สำหรับในสภาวะที่มีเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณน้อย (3 log CFU/ml) พบว่าสามารถตรวจพบจำนวนเซลล์บนพื้นผิวด้านหน้าของใบมีดสแตนเลสสตีล 3.20 ± 0.41 log CFU/cm² และด้านหลังของพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีล 3.39 ± 0.45 log CFU/cm²

ตารางที่ 4.1 จำนวนเซลล์ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อ ที่จุ่มในสารแขวนลอยเซลล์ 8 log CFU/mL และ 3 log CFU/mL ใน TSB ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

ปริมาณเซลล์ ในสารแขวนลอย (log CFU/cm ²)	จำนวนเซลล์ <i>P. fluorescens</i> บนใบมีด (log CFU/cm ²)		จำนวนเซลล์ <i>P. fluorescens</i> Biofilm หลังบ่ม 24 ชั่วโมง (log CFU/cm ²)	
	ผิวด้านหน้า	ผิวด้านหลัง	ผิวด้านหน้า	ผิวด้านหลัง
8	4.62 ± 0.48	4.42 ± 0.78	4.55 ± 0.23	4.58 ± 0.35
3	1.79 ± 0.16	1.81 ± 0.20	3.20 ± 0.41	3.39 ± 0.45

จากตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าเมื่อจุ่มใบมีดสแตนเลสสตีลลงในสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว สามารถตรวจพบเซลล์ของ *P. fluorescens* เกาะติดบนพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีล

เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ที่ตรวจพบบนพื้นผิวโม่มีดสเตนเลสสตีล พบว่าการสร้างการปนเปื้อนโดยนำโม่มีดสัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ สามารถตรวจพบเซลล์บนพื้นผิวโม่มีดไม่แตกต่างกับโม่มีดที่มีจำนวนเซลล์เกาะติดบนพื้นผิวหลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการวิธีการทดลองในการสร้างการปนเปื้อนเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวโม่มีด จะล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนพื้นผิวออก จากนั้นบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นเซลล์ที่เกาะติดบนพื้นผิวโม่มีดจะมีการเจริญและเพิ่มจำนวน ส่วนโม่มีดที่มีเซลล์ปนเปื้อนบนพื้นผิว พบว่ามีปริมาณเซลล์บนพื้นผิวมาก เนื่องจากโม่มีดสัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ โดยไม่ได้ล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดออก ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบปริมาณเซลล์บนพื้นผิวมาก

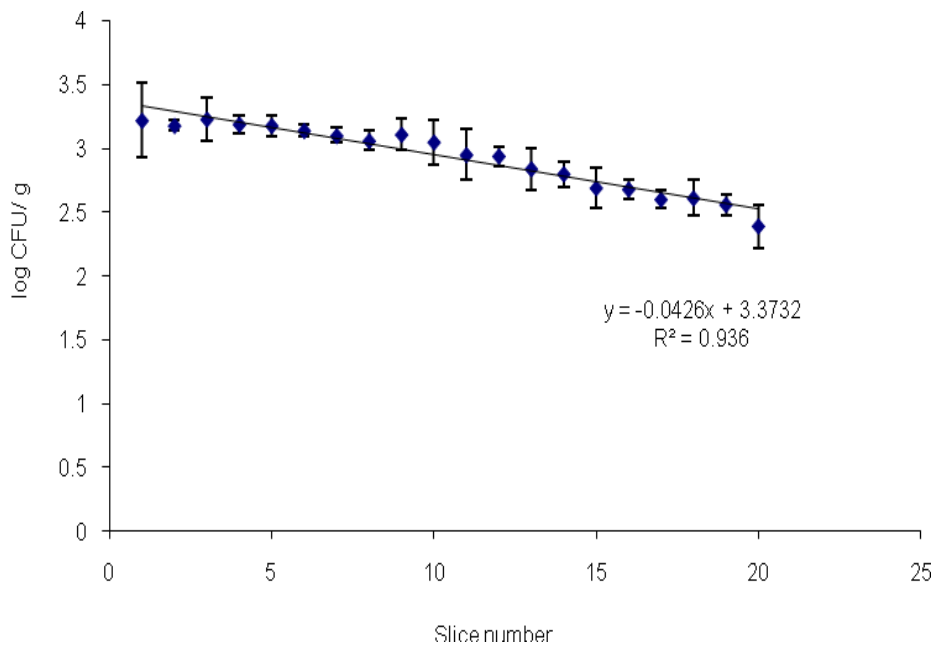
4.3.1 การถ่ายโอนของเซลล์ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อสัตว์ผลิตภัณฑ์อาหาร

จากการทดลองข้างต้น พบว่าเซลล์ *P. fluorescens* สามารถเกาะติดและเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวโม่มีดสเตนเลสสตีลได้ ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร ในกระบวนการตัดหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เหล่านี้ หากมีการสะสมของจุลินทรีย์ที่ส่วนของโม่มีดจะทำให้เกิดการส่งผ่านเชื้อจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพและทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหาร ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงศึกษาการถ่ายโอนเซลล์ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อสัตว์ระหว่างการหั่นผลิตภัณฑ์อาหาร จะเป็นแนวทางหนึ่งในการวิเคราะห์ปัญหาการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร

4.3.1.1 การถ่ายโอนของเซลล์ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อสัตว์ผลิตภัณฑ์อาหาร

การศึกษากการถ่ายโอนเซลล์ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อสัตว์ระหว่างการหั่นผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเตรียมเครื่องสไลซ์เนื้อที่ทำตามสะอาดตามวิธีที่เหมาะสม มาประกอบกับโม่มีดสเตนเลสสตีลที่มีการสร้างการปนเปื้อนบนพื้นผิวโม่มีดเครื่องสไลซ์เนื้อ โดยทำการจุ่มโม่มีดสเตนเลสสตีลลงในสารแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 และ 3 log CFU/mL จากนั้นหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสไลซ์ (โม่โลน่าหมู) ประมาณ 20 ชิ้นต่อเนื่องกัน นำชิ้นเนื้อสไลซ์แต่ละชิ้นไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่ถ่ายโอนจากเครื่องสไลซ์เนื้อสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร โดยวิธี Standard plate

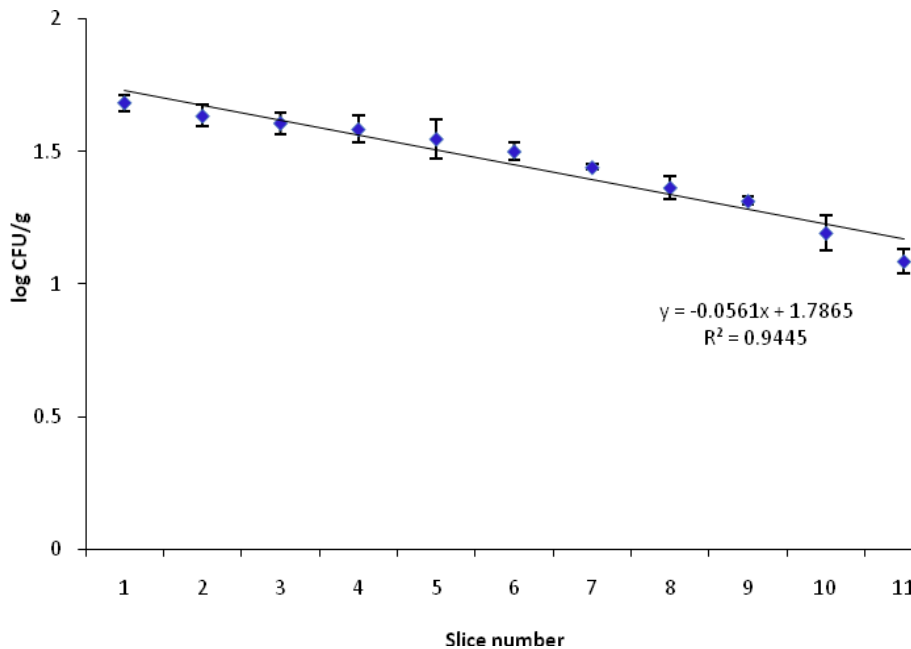
count technique และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Agar Base จากการทดลองข้างต้น พบว่าการทดสอบการปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีลปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL มีจำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวด้านหน้าของใบมีดสแตนเลสสตีล 4.62 ± 0.48 log CFU/cm² และด้านหลังของพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีล 4.42 ± 0.78 log CFU/cm² เมื่อนำใบมีดสแตนเลสสตีลที่มีการปนเปื้อนมาหั่นผลิตภัณฑ์ พบว่าการถ่ายโอนเซลล์ *P. fluorescens* สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นแรก 3.22 ± 0.29 log CFU/g และลดลงตามลำดับ มีการถ่ายโอนเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นสุดท้าย (ชิ้นที่ 20) 2.39 ± 0.17 log CFU/g เมื่อคำนวณค่าการถ่ายโอนเซลล์ (% Transfer) จากใบมีดสแตนเลสสตีลที่ปนเปื้อนเซลล์ของ *P. fluorescens* สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นสุดท้าย มีค่าร้อยละ 26.43 ดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากใบมีดสแตนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโบลอน่าสไลซ์ จำนวน 20 ชิ้น ตามลำดับ จากใบมีดสแตนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 4.62 ± 0.48 log CFU/cm²) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

ส่วนใบมีดสแตนเลสสตีลที่มีการสร้างการปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อในสภาวะที่มีเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณน้อย (3 log CFU/ml) จากการทดลองข้างต้น พบว่าสามารถตรวจพบจำนวนเซลล์บนพื้นผิวด้านหน้าของใบมีดสแตนเลสสตีล 1.79 ± 0.16 log CFU/cm²

และด้านหลังของพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีล $1.81 \pm 0.20 \log \text{ CFU/cm}^2$ เมื่อนำใบมีดสแตนเลสสตีลที่มีการปนเปื้อนมาหั่นผลิตภัณฑ์ พบว่ามีการถ่ายโอนเซลล์ *P. fluorescens* ผู้ผลิตภัณฑ์ชิ้นแรก $1.68 \pm 0.03 \log \text{ CFU/g}$ และลดลงตามลำดับ สามารถตรวจพบการถ่ายโอนเซลล์ผู้ผลิตภัณฑ์ชิ้นสุดท้ายจากเนื้อชิ้นสไลซ์ ชั้นที่ 11 โดยมีจำนวนเซลล์ $1.09 \pm 0.04 \log \text{ CFU/g}$ เมื่อคำนวณการถ่ายโอนเซลล์ (% Transfer) จากใบมีดสแตนเลสสตีลที่ปนเปื้อนเซลล์ของ *P. fluorescens* ผู้ผลิตภัณฑ์ชิ้นสุดท้าย มีค่าร้อยละ 30.27 (รูปที่ 4.11) สำหรับชั้นที่ 12 สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์ *P. fluorescens* ในผลิตภัณฑ์น้อยมาก จนกระทั่งชั้นที่ 20 ไม่สามารถตรวจพบเซลล์ *P. fluorescens* ในผลิตภัณฑ์ได้



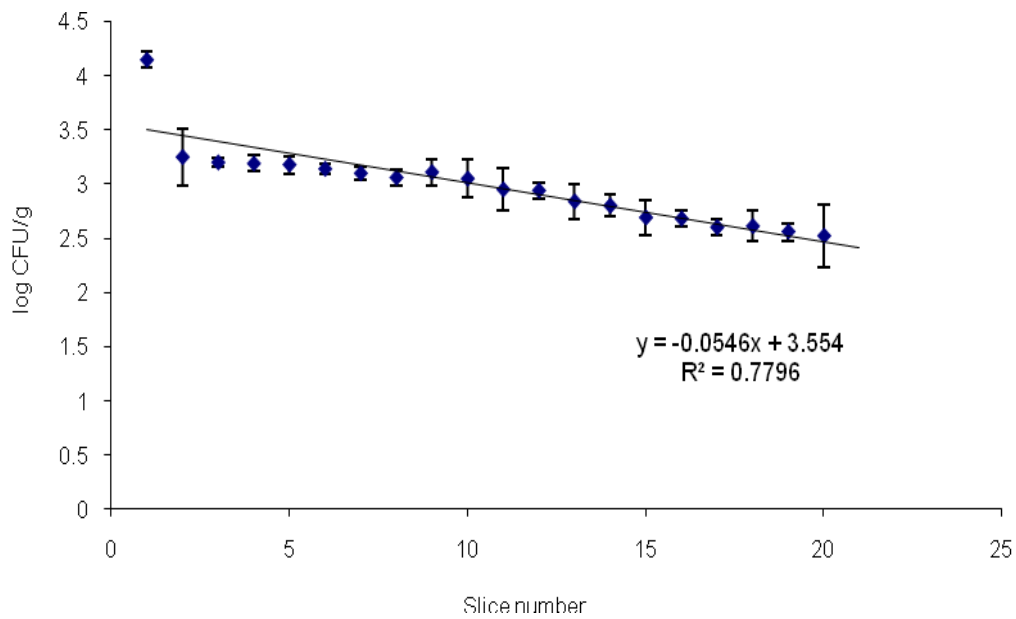
รูปที่ 4.11 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากใบมีดสแตนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโบลินาสไลซ์ จำนวน 20 ชิ้น ตามลำดับ จากใบมีดสแตนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.79 \pm 0.16 \log \text{ CFU/cm}^2$) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

เมื่อเปรียบเทียบการถ่ายโอนเซลล์ *P. fluorescens* จากใบมีดสแตนเลสสตีลระหว่างกระบวนการหั่นเนื้อสไลซ์จำนวน 20 ชิ้นต่อเนื่องกัน ใบมีดสแตนเลสสตีลที่มีการปนเปื้อนเชื้อเริ่มต้นในระดับสูง ($8 \log \text{ CFU/mL}$) พบว่ามีการถ่ายโอนเซลล์ *P. fluorescens* ผู้ผลิตภัณฑ์ชิ้นแรกจนผลิตภัณฑ์ชิ้นสุดท้ายที่ผ่านกระบวนการหั่น (ชั้นที่ 20) $2.39 \pm 0.17 \log$

CFU/g จะเห็นได้ว่าเซลล์ที่เกาะติดบนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีลสามารถจะถ่ายโอนเซลล์สู่เนื้อสไลซ์ได้อีกหากมีการหั่นผลิตภัณฑ์ขึ้นไป ส่วนไบโอดีสแตนเลสสตีลที่มีการปนเปื้อนเชื้อเริ่มต้นในระดับต่ำ ($3 \log \text{ CFU/mL}$) พบว่าสามารถตรวจพบเซลล์ *P. fluorescens* ในกระบวนการหั่นเนื้อสไลซ์ได้จากเนื้อชิ้นสไลซ์ ชิ้นที่ 11 โดยมีจำนวนเซลล์ $1.09 \pm 0.04 \log \text{ CFU/g}$ จนกระทั่งชิ้นที่ 12 พบว่าตรวจพบโคโลนีบนจานเพาะเชื้อน้อยมาก เนื่องจากเซลล์เริ่มต้นที่มีการเกาะติดบนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีลน้อยมากจึงมีการถ่ายโอนของเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์น้อยลง

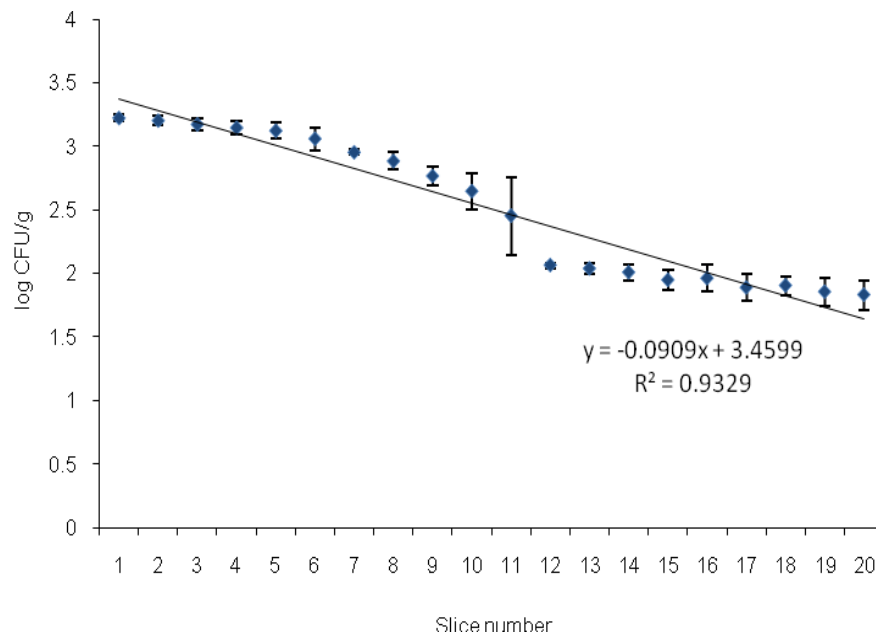
4.3.1.2 การถ่ายโอนของเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีลเนื้อสุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร

ส่วนในกรณีของการถ่ายโอนเซลล์เซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอดี โดยสร้างสภาวะให้เกิดไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีล ที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^\circ \text{C}$ ประกอบไบโอดีสแตนเลสสตีลเข้ากับเครื่องสไลซ์เนื้อที่ทำความสะอาดตามวิธีที่เหมาะสม จากนั้นหั่นเนื้อสไลซ์ (ไบโอดิน่าหมู) ประมาณ 20 ชิ้นต่อเนื้อก้อน นำชิ้นเนื้อสไลซ์ที่ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์เพื่อหาปริมาณการถ่ายโอนของเชื้อชุกโตเมเนสจากเครื่องสไลซ์เนื้อสุ่มผลิตภัณฑ์อาหาร โดยวิธี Standard plate count technique และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Agar Base จากการทดลองข้างต้น พบว่าไบโอดีสแตนเลสสตีลที่มีการสร้างการปนเปื้อน *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวในปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง ($8 \log \text{ CFU/mL}$) มีจำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวด้านหน้าของไบโอดีสแตนเลสสตีล $4.55 \pm 0.23 \log \text{ CFU/cm}^2$ และด้านหลังของพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีล $4.58 \pm 0.35 \log \text{ CFU/cm}^2$ เมื่อนำไบโอดีสแตนเลสสตีลที่มีการปนเปื้อนมาหั่นผลิตภัณฑ์ พบว่าปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* มีการถ่ายโอนเซลล์ *P. fluorescens* biofilm สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นแรก $4.15 \pm 0.08 \log \text{ CFU/g}$ และมีการถ่ายโอนเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นสุดท้าย $2.52 \pm 0.29 \log \text{ CFU/g}$ (ชิ้นที่ 20) เมื่อคำนวณการถ่ายโอนเซลล์ (% Transfer) จากไบโอดีสแตนเลสสตีลที่ปนเปื้อนเซลล์ของ *P. fluorescens* สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นสุดท้าย มีค่าร้อยละ 27.60 (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.12 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสแตนเลสสตีลสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร จากไบโอดีสแตนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนเบื่อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $4.55 \pm 0.23 \log \text{CFU/cm}^2$) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

ส่วนไบโอดีสแตนเลสสตีลที่มีการสร้างการปนเปื้อน *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวในสถานะที่มีเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ ($3 \log \text{CFU/ml}$) จากการทดลองข้างต้น พบว่าสามารถตรวจพบจำนวนเซลล์บนพื้นผิวด้านหน้าของไบโอดีสแตนเลสสตีล $3.20 \pm 0.41 \log \text{CFU/cm}^2$ และด้านหลังของพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีล $3.39 \pm 0.45 \log \text{CFU/cm}^2$ เมื่อนำไบโอดีสแตนเลสสตีลที่มีการปนเปื้อนมาหั่นผลิตภัณฑ์ พบว่าปริมาณเซลล์ของ *P. fluorescens* มีการถ่ายโอนเซลล์ *P. fluorescens* biofilm สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นแรก $3.22 \pm 0.03 \log \text{CFU/g}$ และมีการถ่ายโอนเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นสุดท้าย (ชิ้นที่ 20) $1.83 \pm 0.12 \log \text{CFU/g}$ เมื่อคำนวณค่าการถ่ายโอนเซลล์ (% Transfer) จากไบโอดีสแตนเลสสตีลที่ปนเปื้อนเซลล์ของ *P. fluorescens* สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นสุดท้าย มีค่าร้อยละ 27.76 (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอมัดสเดนเลส สติลล์ผู้ผลิตภัณฑอาหาร จากไบโอมัดสเดนเลสสติลล์ที่มีเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 3.39 ± 0.45 log CFU/cm²) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลอง พบว่าการถ่ายโอนเซลล์ผู้ผลิตภัณฑที่สิ้นสุดท้ายของเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอมัดสเดนเลสสติลล์ การทดสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) มีการถ่ายโอนเซลล์ 2.52 ± 0.29 log CFU/g ส่วนปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/ml) มีการถ่ายโอนเซลล์ 1.83 ± 0.12 log CFU/g

จากผลศึกษาการถ่ายโอนของเซลล์ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอมัดเครื่องสไลซ์เนื้อผู้ผลิตภัณฑอาหาร เมื่อพิจารณาถึงการโอนถ่ายเซลล์ของ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิว ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) พบว่าไบโอมัดที่มีการปนเปื้อน *P. fluorescens* Biofilm มีการโอนถ่ายเซลล์ผู้ผลิตภัณฑอาหารสูงกว่าเซลล์ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิว โดยสามารถตรวจพบจำนวนเซลล์ในผลิตภัณฑที่สิ้นสุดท้าย (ชิ้นที่ 20) 4.15 ± 0.08 log CFU/g และ 2.39 ± 0.17 log CFU/g ตามลำดับ หากมีการหันผลิตภัณฑต่อเซลล์ที่หลงเหลือบนพื้นผิวทดสอบสามารถถ่ายโอนผู้ผลิตภัณฑได้อีก เช่นเดียวกับการทดสอบที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/ml) พบว่าไบโอมัดที่มีการปนเปื้อน *P. fluorescens* Biofilm มีการถ่ายโอนเซลล์ผู้ผลิตภัณฑที่สิ้นสุดท้าย (ชิ้นที่ 20) 1.83 ± 0.12 log CFU/g แต่การถ่ายโอนของเซลล์

P. fluorescens สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์จากชิ้นเนื้อสไลซ์ เพียง 11 ชิ้น โดยชิ้นสุดท้ายมีจำนวนเซลล์ $1.09 \pm 0.04 \log \text{CFU/g}$

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของใบมีดสแตนเลสสตีล ซึ่งใช้ในกระบวนการตัดหั่นผลิตภัณฑ์อาหาร สามารถเกิดการโอนถ่ายเซลล์จากพื้นผิวใบมีดสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้มากกว่าใบมีดสแตนเลสสตีลที่มีการปนเปื้อนเซลล์ เนื่องจากการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของใบมีดสแตนเลสสตีล เซลล์จุลินทรีย์จะมีการเกาะติดบนพื้นผิวและเพิ่มจำนวนจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ภายใต้สาร EPS ซึ่งสารนี้มีหน้าที่สำคัญในการเชื่อมโยงเซลล์ภายในไบโอฟิล์มและสร้างพันธะพิเศษเพื่อยึดเหนี่ยวเซลล์กับพื้นผิว (Zottola, 1994) ทำให้จุลินทรีย์ในไบโอฟิล์มสามารถโอนถ่ายเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้ดีกว่าพื้นผิวที่มีการปนเปื้อนเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaarina และคณะ (2007) ที่ศึกษาโมเดลการถ่ายโอนเซลล์ของ *Listeria monocytogenes* ระหว่างกระบวนการหั่นเนื้อปลาแชลมน พบว่าการถ่ายโอนเซลล์ของ *L. monocytogenes* เกิดได้ดีเมื่อใบมีดสแตนเลสสตีลมีการปนเปื้อนเชื้อสูงในสภาวะอุณหภูมิต่ำและระยะเวลาที่ใช้ในการเกาะติดของเซลล์ที่ยาวนาน (contact time) พบว่าใบมีดที่มีการปนเปื้อนเซลล์ *L. monocytogenes* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $8 \log \text{CFU/ml}$ ที่อุณหภูมิ 20°C เวลา 10 นาที พบเซลล์บนพื้นผิวใบมีด $8.40 \pm 0.40 \log \text{CFU/blade}$ มีการโอนถ่ายเซลล์สู่เนื้อสไลซ์ชิ้นที่สอง $5.30 \pm 0.30 \log \text{CFU/g}$ สามารถตรวจพบเซลล์หลังจากเนื้อสไลซ์ชิ้นที่ 39 มีจำนวนเซลล์น้อยกว่า $1 \log \text{CFU/g}$ และการทดสอบที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $5 \log \text{CFU/ml}$ อุณหภูมิ 10°C เวลา 10 นาที พบเซลล์บนพื้นผิวใบมีด $3.20 \pm 0.40 \log \text{CFU/blade}$ สามารถตรวจพบเซลล์ได้จากเนื้อสไลซ์ 10 ชิ้น เพียง 3 โคโลนี หลังจากนั้นไม่พบโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ

Pérez-Rodríguez และคณะ (2007) ศึกษาโมเดลการถ่ายโอนเซลล์ของ *Escherichia coli* O157: H7 และ *Staphylococcus aureus* จากกระบวนการตัดหั่นสู่ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ พบว่า มีการถ่ายโอนเซลล์จากใบมีดสแตนเลสสตีลที่ปนเปื้อนเชื้อ $8 \log \text{CFU/blade}$ มีการถ่ายโอนเซลล์จาก *Escherichia coli* O157: H7 สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นแรก $3.43 \pm 0.83 \log \text{CFU/cm}^2$ และลดลงตามลำดับ ส่วน *Staphylococcus aureus* มีการถ่ายโอนเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์ชิ้นแรก $5.34 \pm 0.58 \log \text{CFU/cm}^2$ และลดลงตามลำดับ

Sheen และ Hwang (2010) ศึกษาโมเดลการปนเปื้อนข้ามของเซลล์ *Escherichia coli* O157: H7 บนพื้นผิวใบมีดในกระบวนการหั่นสุ่มผลิตภัณฑ์แฮม พบว่า มีการถ่ายโอนเซลล์จากใบมีดสเตนเลสสตีลที่ปนเปื้อนเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/blade มีการถ่ายโอนเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์สองชิ้นแรก 2-3 log CFU/cm² และสามารถตรวจพบเซลล์จนถึงผลิตภัณฑ์ 100 ชิ้น ซึ่งการศึกษากการถ่ายโอนเซลล์ระหว่างกระบวนการตัดหั่นสุ่มผลิตภัณฑ์สามารถใช้เป็นตัวชี้บ่งความเสี่ยงของการปนเปื้อนข้ามจากกระบวนการผลิตสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้

ดังนั้นในกระบวนการตัดหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เหล่านี้ หากมีการสะสมของจุลินทรีย์ที่ส่วนของใบมีดจะทำให้เกิดการโอนถ่ายเชื้อจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์ได้ ซูดอโมแนสเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สำคัญ ทำให้เกิดการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Sillankorva et al., 2004) และมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม การเกิดซูดอโมแนสไบโอฟิล์มที่พื้นผิวสัมผัสอาหารจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตนั้นมีปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูงขึ้น อายุการเก็บสั้น ทำให้อาหารเสื่อมเสียและไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

4.4 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์ *P. fluorescens*

การเกิดไบโอฟิล์มทำให้การกำจัดเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในฟิล์มทำได้ยากมาก การทำความสะอาดตามปกติไม่สามารถกำจัดได้หมด นอกจากนี้แบคทีเรียที่เจริญในไบโอฟิล์มยังมีความสามารถในการต้านทานสารทำความสะอาด (Costerton, 2005) และสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลาย (planktonic cell) (Chavant, Gaillard-Martinie and Hébraud, 2004) การทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด คือ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) โดยมี active chlorine 6-14 % และกรดเปอร์ออกซีแอซิติก (peroxyacetic acid: POA) หรือชื่อทางการค้าว่า Proxitan[®] ความเข้มข้น 5 % ในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* เมื่อแขวนลอยอยู่ในตัวกลางชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/ml) เนื่องจาก Marriott และ Gravani (2006) แนะนำให้ใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการฆ่าเชื้อเครื่องมือที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม (สเตนเลสสตีล) ที่ความเข้มข้น 200 ppm ดังนั้นผู้วิจัยจึงกำหนดความเข้มข้นในการทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ 100 200 และ 400 ppm ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอซิติกกำหนด

ความเข้มข้นที่ 25 50 และ 100 ppm ตามคำแนะนำของ Marriott และ Gravani (2006) ตัวกลางชนิดเหลวที่นำมาทดสอบทั้ง 3 ชนิด มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในปริมาณต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.2

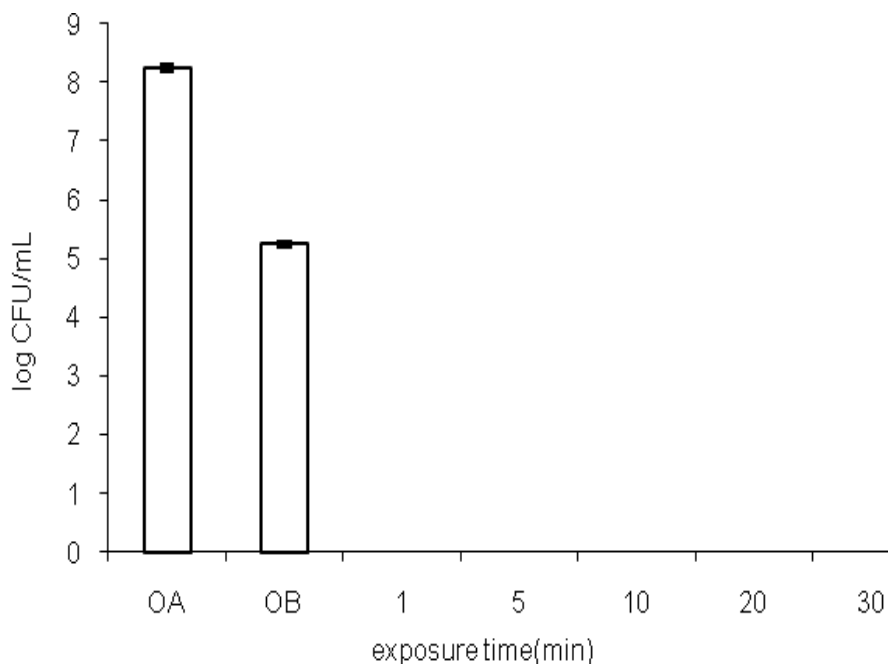
ตารางที่ 4.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณสารอินทรีย์ในตัวกลางชนิดเหลวทั้ง 3 ชนิด

ชนิดของตัวกลาง	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	องค์ประกอบและปริมาณสารอินทรีย์ (% w/w)	
สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl)	7.38 ± 0.04	NaCl	0.85
TSB	7.32 ± 0.08	โปรตีน	17.037
		ไขมัน	0.108
		คาร์โบไฮเดรต	2.508
soiling agent (beef meat 5% w/v)	6.69 ± 0.12	โปรตีน	0.250

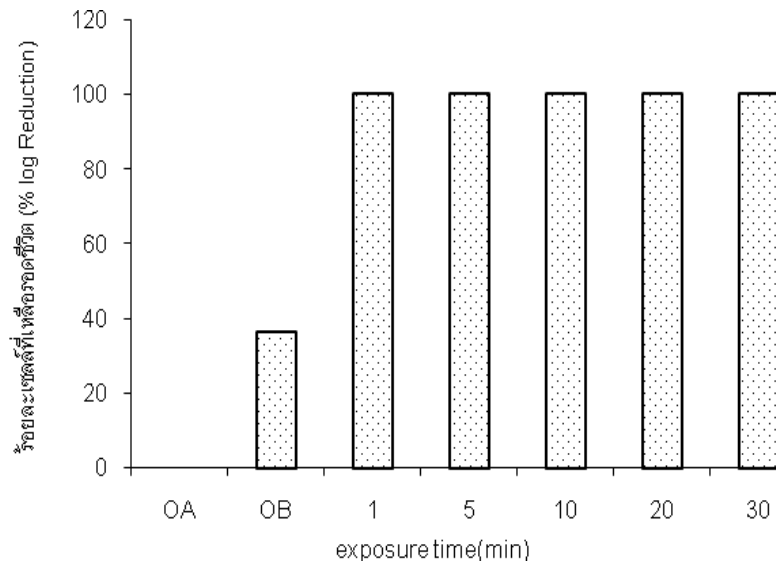
4.4.1 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการทำลายเซลล์ *P. fluorescens* ในตัวกลางชนิดเหลวที่เซลล์แขวนลอยอยู่

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการทำลายสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยกำหนดความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ 100 200 และ 400 ppm สำหรับการทดสอบกับสารแขวนลอยเซลล์ *P. fluorescens* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) เมื่อนำสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลวมาสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 5 10 20 และ 30 นาที โดยสุ่มตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลวในแต่ละเวลาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในสารละลาย

โซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ที่ละลายอยู่ใน PBS บัฟเฟอร์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อก่อนที่จะทำการ เจือจาง นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือรอดด้วยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA ผลการทดลอง พบว่า เมื่อเซลล์ *P. fluorescens* แขนงลอยอยู่ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 ppm เซลล์ของ *P. fluorescens* จะถูกทำลายในสารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อ ดังรูปที่ 4.14 และรูปที่ 4.15



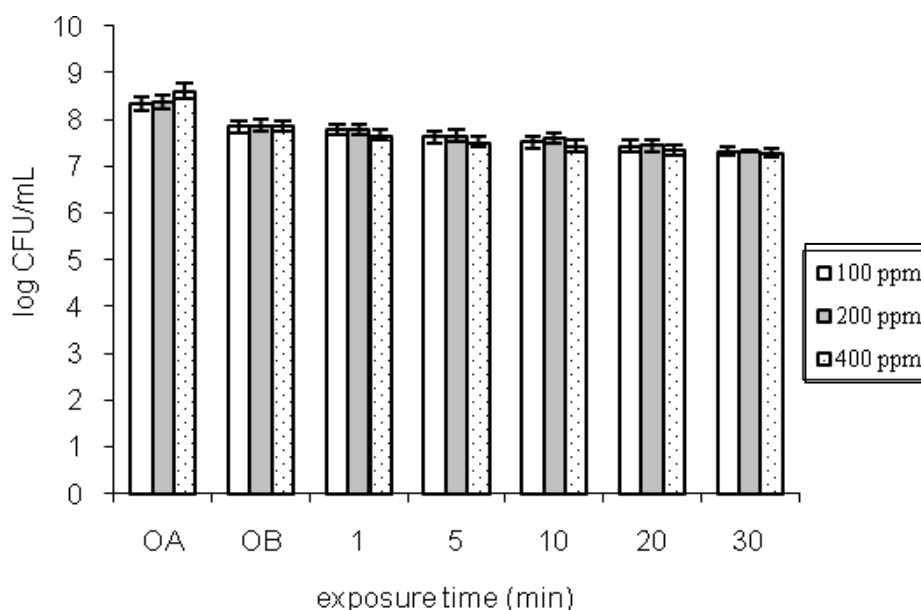
รูปที่ 4.14 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในสารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที



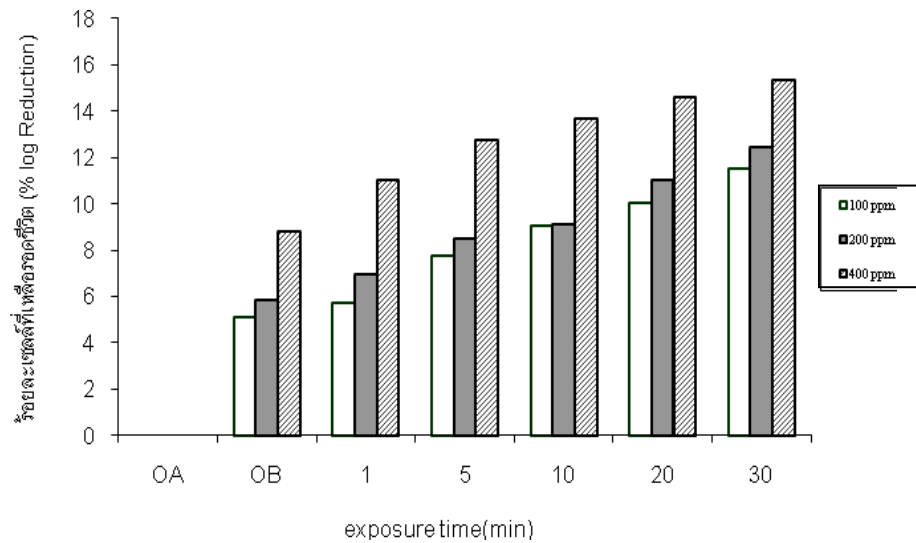
รูปที่ 4.15 ร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ภายหลังจากสัมผัสสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อมันที่

เมื่อเซลล์ *P. fluorescens* แขนงลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จากรูปที่ 4.16 จะเห็นได้ว่าที่เวลา 0 นาที สามารถแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรก จะเป็นเวลาที่ไม่ได้เติมสารแขวนลอยเชื้อ *P. fluorescens* ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ คือปริมาณเชื้อเริ่มต้น ส่วนช่วงที่สอง คือ เมื่อเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อมันที่ หลังผลพบว่าเชื้อมีปริมาณลดลงทันทีเมื่อสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เมื่อพิจารณาปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อแล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อมันที่ ที่ความเข้มข้น 100 200 และ 400ppm พบว่าประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ *P. fluorescens* ลดลงเพียงร้อยละ 5.08 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น (8.33 ± 0.14 log CFU/mL) ลดลงเพียงร้อยละ 5.86 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น (8.36 ± 0.14 log CFU/mL) และลดลงเพียงร้อยละ 8.83 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น (8.61 ± 0.17 log CFU/mL) ตามลำดับ

จากการทดลองข้างต้น พบว่าสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* ในสารละลายเกลือทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาทีหลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อ แต่เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายไฮโปคลอไรท์ในการทำลายเซลล์ *P. fluorescens* ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (รูปที่ 4.17) พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลง คือสารละลายไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppm ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมด ภายในระยะเวลา 30 นาที แต่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ *P. fluorescens* เพียงร้อยละ 11.50 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น ($8.33 \pm 0.14 \log \text{ CFU/mL}$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฮโปคลอไรท์ เป็น 200 ppm พบว่าที่เวลา 30 นาที หลังจากเซลล์ *P. fluorescens* สัมผัสกับสารละลายไฮโปคลอไรท์ ก็ยังไม่สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด โดยเซลล์ลดลงร้อยละ 12.44 และเช่นเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฮโปคลอไรท์ เป็น 400 ppm ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที สามารถทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ลดลงจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นเพียงร้อยละ 15.33 ดังรูปที่ 4.17

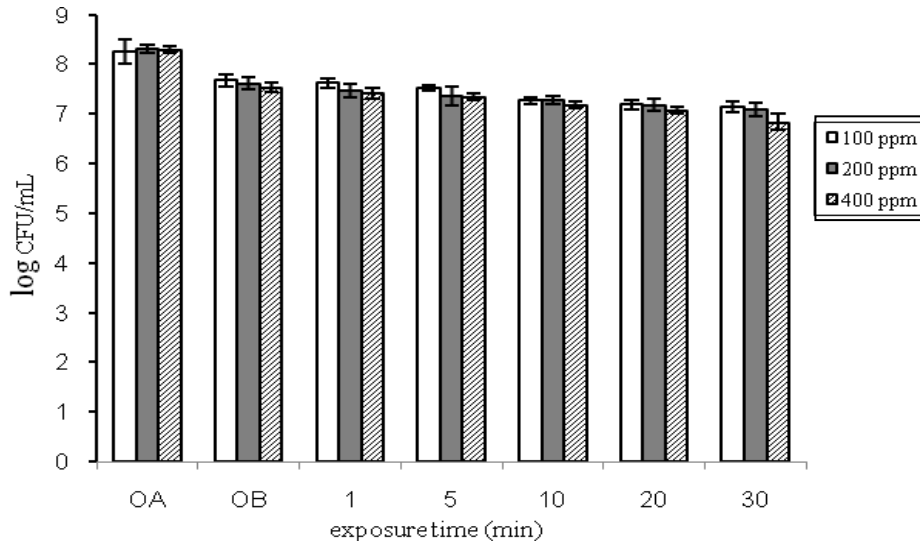


รูปที่ 4.16 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* $8 \log \text{ CFU/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

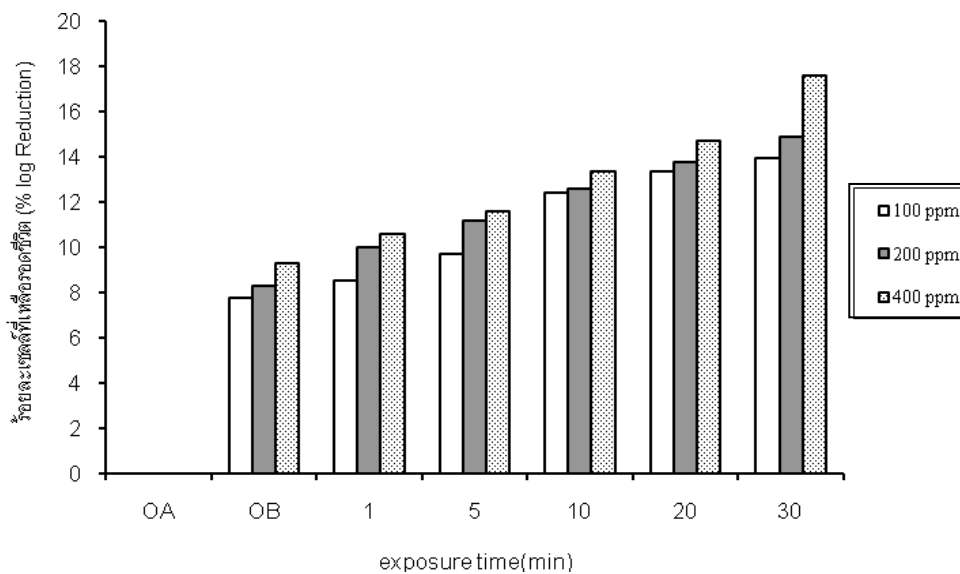


รูปที่ 4.17 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ภายหลังจากสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

ส่วนการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* เมื่อแขวนลอยในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm (รูปที่ 4.18) พบว่าประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลาย soiling agent ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เพราะว่าหลังจากเซลล์ *P. fluorescens* สัมผัสกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 30 นาที ไม่สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด ร้อยละการลดลงของเซลล์เมื่อสัมผัสกับสารฆ่าเชื้อมีมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB โดยในการทำลายเซลล์ *P. fluorescens* ที่แขวนลอยในสารละลาย soiling agent (รูปที่ 4.19) พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 100 ppm ระยะเวลา 30 นาที มีประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ *P. fluorescens* เพียงร้อยละ 13.98 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น (8.26 ± 0.24 log CFU/mL) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 200 ppm พบว่าหลังจากเซลล์ *P. fluorescens* สัมผัสกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด โดยเซลล์ลดลงร้อยละ 14.89 และเช่นเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็น 400 ppm ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที โดยสามารถทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* ลดลงจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นเพียงร้อยละ 17.59



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



รูปที่ 4.19 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ภายหลังจากสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยสารฆ่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ในสารละลายเกลือได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) จีระเดช มาลา(2551) รายงานว่า การใช้สารประกอบคลอรีน เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์สูงนั้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากคลอรีนบางส่วนจะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของสารอินทรีย์ ทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลง ดังนั้นการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent จึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลง เพราะสารอาหารต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยสนับสนุนให้เซลล์จุลินทรีย์รอดชีวิตและเจริญได้ ดังนั้นการใช้สารประกอบคลอรีนซึ่งมีกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) เป็นองค์ประกอบสำคัญ จึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายน้ำเกลือได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent สอดคล้องกับงานวิจัยของสุภาวดี ตังจิต (2543) ซึ่งรายงานข้อจำกัดในการใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนที่เกิดขึ้นกับสารประกอบอินทรีย์ในน้ำและอาหาร

นอกจากนี้การสลายตัวอย่างรวดเร็วของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ซึ่งมีผลทำให้การแตกตัวได้เป็นกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ซึ่งสามารถวัดได้จากปริมาณ available chlorine ที่มีอยู่ในน้ำ เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อการสลายตัว คือค่า pH จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ (Rossini and Gaylarde, 2000) ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณ available chlorine พร้อมทั้งตรวจวัด pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่า pH และปริมาณของ available chlorine ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ในการทำลายเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

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

สารละลายไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 100 ppm มีค่า pH เท่ากับ 7.38 ± 0.06 และปริมาณคลอรีนที่วิเคราะห์ได้มีค่า 5.27 ± 0.06 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฮโปคลอไรท์เป็น 200 ppm มีค่า pH 7.57 ± 0.08 และปริมาณคลอรีนที่ตรวจวัดได้มีค่า 8.46 ± 0.08 และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฮโปคลอไรท์เป็น 400 ppm พบว่ามีค่า pH อยู่ที่ 8.72 ± 0.05 และปริมาณคลอรีนที่วิเคราะห์ได้มีค่า 20.85 ± 0.02 ซึ่งมีปริมาณคลอรีนเพิ่มขึ้นจากความเข้มข้น 100 ppm จากค่า pH และปริมาณคลอรีนที่วิเคราะห์ได้นี้มีความสัมพันธ์ในการฆ่าเชื้อ

นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อความคงตัวของ hypochlorous acid (ถกวรรณ พิรุณสาร, 2547; Rossini and Gaylarde, 2000) ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีน ดังนั้นจึงทำการตรวจวัด pH หลังจากสารละลายไฮโปคลอไรท์สัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ในตัวอย่างชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5%w/v) ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่า pH หลังจากสารละลายไฮโปคลอไรท์สัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ในตัวอย่างชนิดเหลว 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

ชนิดของตัวอย่าง	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)		
	ความเข้มข้นของสารละลายไฮโปคลอไรท์ (ppm)		
	100	200	400
สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl)	7.34 ± 0.04	7.47 ± 0.06	7.98 ± 0.12
TSB	7.38 ± 0.08	7.52 ± 0.11	8.48 ± 0.60
soiling agent (beef meat 5%w/v)	7.36 ± 0.11	7.48 ± 0.08	8.56 ± 0.06

จากตารางที่ 4.4 เมื่อสารละลายไฮโปคลอไรต์สัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลวที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ทำให้มีการค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงซึ่งอาจมีผลต่อปฏิกิริยาของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนที่เกิดขึ้นกับสารอินทรีย์ในน้ำและอาหาร

ถกลวรรณ พิรุณสาร (2547) รายงานว่าโดยทั่วไปเมื่อนำคลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนนี้มาละลายน้ำ จะทำให้เกิดการแตกตัวเป็นคลอรีนอิสระ ซึ่งจะอยู่ในรูปของ Cl_2 , hypochlorous acid และ hypochlorite ion ซึ่งการแตกตัวให้ hypochlorous acid นั้น จะอยู่ในช่วง pH 4-5 แต่สำหรับสารไฮโปคลอไรต์นั้น มักถูกนำมาใช้ในช่วง pH 7-9 ดังนั้นค่าความเป็นกรดไฮโปคลอไรต์จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์

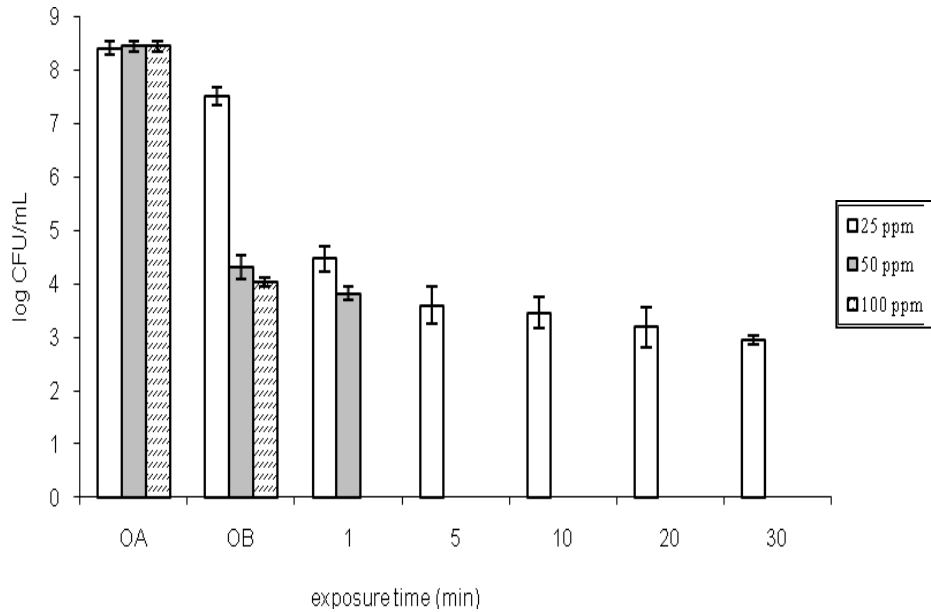
คลอรีนและไฮโปคลอไรต์ในรูปของ sodium และ potassium hypochlorite มีประสิทธิภาพดีในการฆ่าสปอร์ เชื้อรา และแบคทีเรียที่ติดมากับวัตถุเปียก รวมทั้งใช้ล้างทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการผลิต เช่น ผสมในน้ำล้างสายพานและเครื่องคัดขนาด, การฆ่าเชื้อขวดบรรจุเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ เป็นต้น (Wei et al., 1985) สำหรับประเทศไทยนิยมใช้สารประกอบคลอรีนประเภทไฮโปคลอไรต์ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวพืชผลทางการเกษตรและในการเตรียมวัตถุเปียก เพื่อลดปัญหาในขั้นตอนการแปรรูปเนื่องจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ (สุดาพร เทียบจตุรัส, 2545)

4.4.2 ประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอสिटิก 5% ในการทำลายเซลล์ *P. fluorescens* ในตัวกลางชนิดเหลวที่เซลล์แขวนลอยอยู่

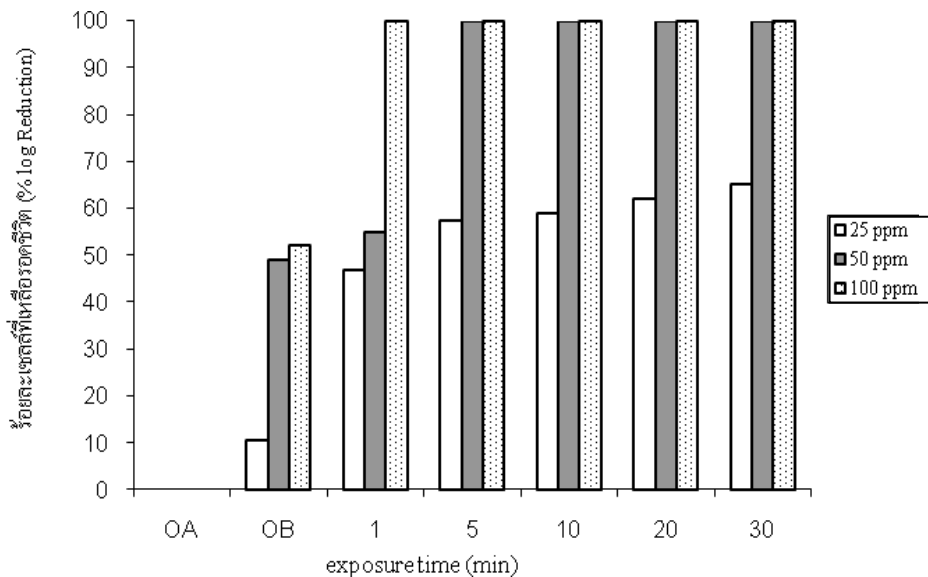
การทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอสिटิก 5% ในการทำลายสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5%w/v) โดยกำหนดความเข้มข้นของกรดเปอร์ออกซีแอสिटิกที่ 25 50 และ 100 ppm สำหรับการทดสอบกับสารแขวนลอยเซลล์ *P. fluorescens* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง ($8 \log \text{ CFU/ml}$) เมื่อนำสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลวมาสัมผัสกับกรดเปอร์ออกซีแอสिटิก ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 5 10 20 และ 30 นาที แล้วทำการตรวจนับจำนวน *Pseudomonas fluorescens* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA

ผลการทดลองพบว่า เมื่อเซลล์ *P. fluorescens* แขนงลอยอยู่ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และใช้กรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้น 25 ppm ไม่สามารถทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* ในสารละลายเกลือทั้งหมดภายในระยะเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา 30 นาทีหลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อ พบว่าร้อยละของการลดลงมีค่า 65.04 (รูปที่ 4.21) แต่เมื่อความเข้มข้นกรดเปอร์รอกซีแอซีติกเป็น 50 ppm เวลา 5 นาที ก็เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายน้ำเกลือได้หมด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติกเป็น 100 ppm สามารถทำลายเซลล์ได้หมดตั้งแต่นาทีแรก

เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 ppm ถึงแม้ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ภายในระยะเวลา 30 นาที แต่พบว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที สามารถทำลายเชื้อให้ลดลงได้ถึง 46.85 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตที่เวลา 1 นาที $4.47 \pm 0.24 \log \text{ CFU/mL}$ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $8.41 \pm 0.12 \log \text{ CFU/mL}$ ในขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที เมื่อพิจารณาที่เวลา 1 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 54.79 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต $3.82 \pm 0.12 \log \text{ CFU/mL}$ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $8.45 \pm 0.10 \log \text{ CFU/mL}$ และที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายเซลล์ได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที เมื่อเซลล์สัมผัสสารฆ่าเชื้อ ที่เวลา 0_B (ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที) สามารถลดปริมาณเซลล์ได้ถึง 52.31% ดังรูปที่ 4.20 และ 4.21

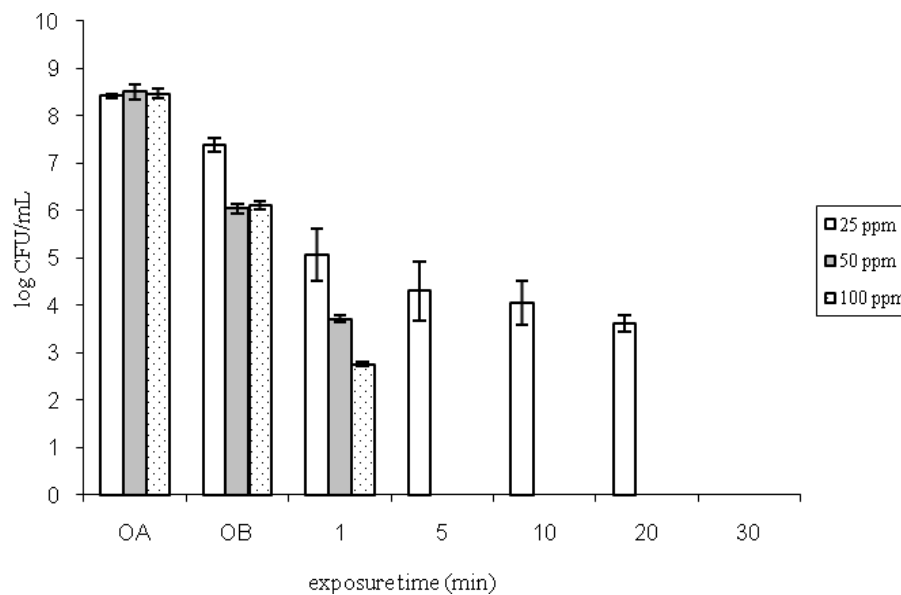


รูปที่ 4.20 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซิดิก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที



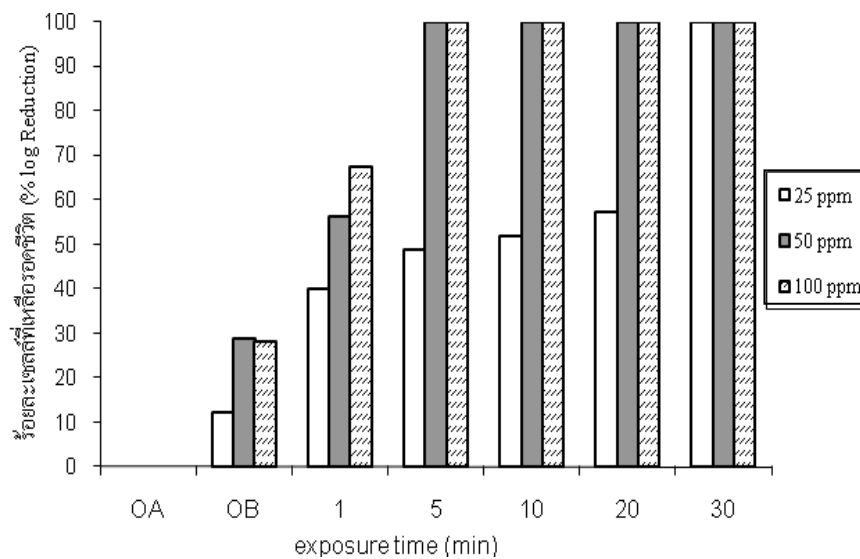
รูปที่ 4.21 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ภายหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซิดิก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB พบว่าที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด 100 % ภายในระยะเวลา 30 นาที จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.42 ± 0.04 log CFU/mL เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก เป็น 50 ppm และ 100 ppm พบว่าสามารถทำลายเซลล์ได้หมด 100 % ในเวลา 5 นาที ดังรูปที่ 4.22



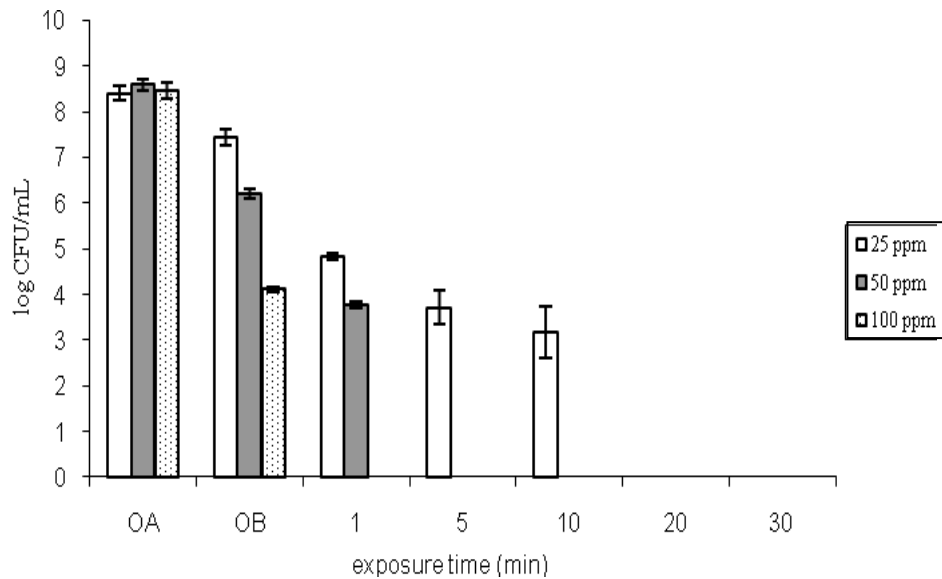
รูปที่ 4.22 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น (รูปที่ 4.23) พบว่า ความเข้มข้นที่ 25 ppm ถึงแม้จะสามารถทำลายเชื้อได้ภายในเวลา 30 นาที แต่พบว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที สามารถทำลายเชื้อให้ลดลงได้ถึง 48.81% ในขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อได้ภายในระยะเวลา 5 นาที แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่ 1 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 56.08% มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 3.72 ± 0.06 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.50 ± 0.17 log CFU/mL และที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 67.41 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต 2.77 ± 0.05 log CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.47 ± 0.11 log CFU/ml

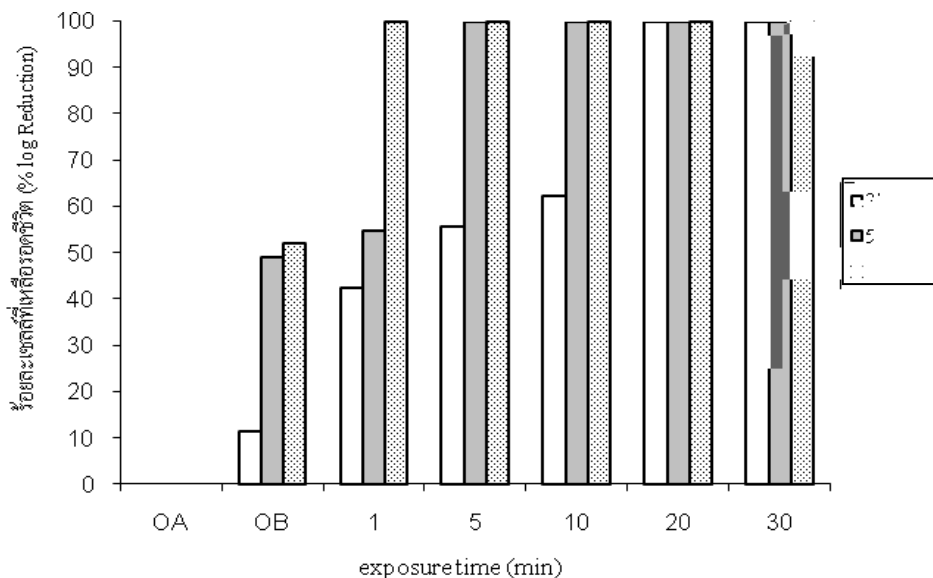


รูปที่ 4.23 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB ภายหลังจากสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ในการทำลายเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5% w/v) พบว่าที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถทำลายเซลล์ทั้งหมด 100 % ภายในระยะเวลา 20 นาที จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.41 ± 0.17 log CFU/mL เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก เป็น 50 ppm พบว่าสามารถทำลายเซลล์ได้หมด 100 % ในเวลา 5 นาทีและ เมื่อเพิ่มความเข้มข้น 100 ppm ก็สามารถทำลายเซลล์ได้หมด 100 % ในเวลา 1 นาที ดังรูปที่ 4.24 และ 4.25



รูปที่ 4.24 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสักรดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุมตัวอย่างเชื้อทันที



รูปที่ 4.25 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ของ *P. fluorescens* 8 log CFU/mL ในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ภายหลังจากสัมผัสสักรดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุมตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นที่ 25 ppm ถึงแม้จะสามารถทำลายเชื้อได้ 100 % ภายในเวลา 20 นาที แต่พบว่า เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที สามารถทำลายเชื้อให้ลดลงได้ถึง 62.19 % ในขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อที่แขวนลอยในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อได้ภายในระยะเวลา 5 นาที แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่ 1 นาที พบว่าที่ความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงได้ 54.79 % มีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิต $3.76 \pm 0.07 \log$ CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $8.59 \pm 0.12 \log$ CFU/mL และที่ความเข้มข้น 100 ppm ถึงแม้ว่าสามารถทำลายเชื้อที่แขวนลอยในสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v) ได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที เมื่อพิจารณาที่เวลา t_0 (เวลาที่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อแล้วทำการสูบล้างตัวอย่างเชื้อทันที) สามารถลดปริมาณเซลล์ได้ถึง 52.31 % มีปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต $4.10 \pm 0.06 \log$ CFU/mL จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $8.46 \pm 0.17 \log$ CFU/mL

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก พบว่ามีค่า pH เป็นกรด ซึ่งแต่ละความเข้มข้นมีค่า pH ตามที่แสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการวัดที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

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

ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการแตกตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ดังนั้นจึงทำการตรวจวัด pH หลังจากกรดเปอร์รอกซีแอซีติกสัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ในตัวอย่างชนิดเหลว 3 ชนิด ที่มี

ปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl), Tryptic Soy Broth (TSB), soiling agent (beef meat 5%w/v) ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงใน ตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่า pH หลังจากกรดเปอร์รอกซีแอซีติกสัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลาง ชนิดเหลว 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

ชนิดของตัวกลาง	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)		
	ความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (ppm) .		
	25	50	100
สารละลายเกลือ (0.85 % NaCl)	5.06 ± 0.04	4.45 ± 0.08	3.84 ± 0.06
TSB	5.24 ± 0.08	4.68 ± 0.11	4.32 ± 0.08
soiling agent (beef meat 5%w/v)	3.98 ± 0.06	3.84 ± 0.08	3.56 ± 0.10

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างหลังจากกรดเปอร์รอกซีแอซีติก สัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลวที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ทำให้มีการค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการแตกตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (Fatemi and Frank, 2003; Kunigk and Almeida, 2001)

จากตารางที่ 4.5 จะเห็นว่าความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นสูงจะมีค่า pH น้อยกว่าค่าความเข้มข้นต่ำกว่า ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าอิทธิพลของ pH ที่มีความเป็นกรดอาจจะมีผลในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* ได้ดีกว่าสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีค่า pH เป็นเบส (Fatemi and Frank, 2003)

4.5 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

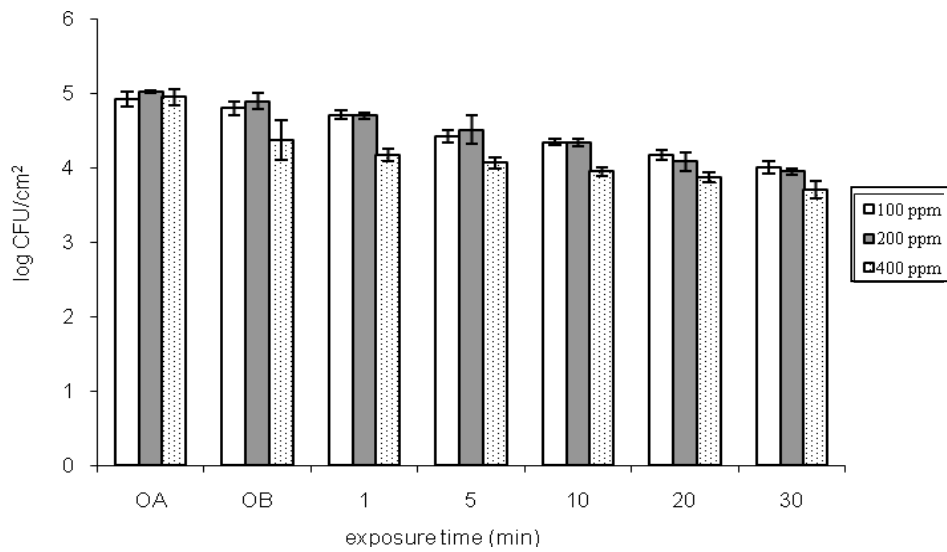
ในการศึกษาในขั้นตอนนี้ได้สร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นพื้นผิวทดสอบ ชนิด 304/2B นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ โดยเปิดสารฆ่าเชื้อตามความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 30 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นพื้นผิวทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แขนในสารฆ่าเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ทดสอบที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เมื่อครบเวลาที่กำหนด ใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบแผ่นทดสอบออกจากหลอดสารฆ่าเชื้อ จุ่มในสารละลาย 0.5% sodium thiosulfate (NaOCl) เพื่อเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อ ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนกรดเปอร์รอกซีแอซิดิกจะหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ phosphate buffer saline (PBS pH 7.2) 2 ครั้ง จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อเช็ดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว และตรวจนับเชื้อที่เหลือรอดบนพื้นผิวทดสอบ ด้วยวิธี swab และ spread plate technique เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่เหลือรอดชีวิตทั้งหมดต่อพื้นที่ของพื้นผิว 1 ตารางเซนติเมตร

4.5.1 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens*

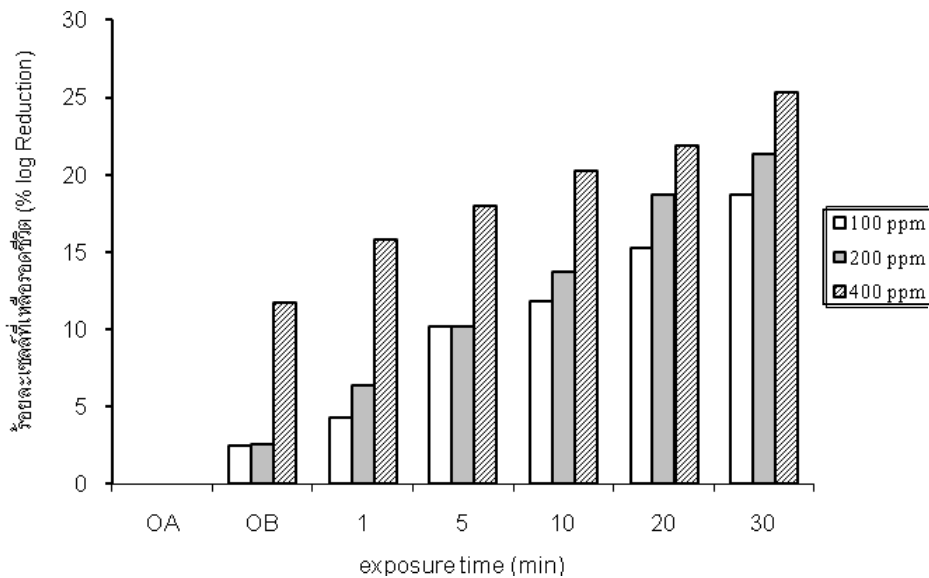
การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวสแตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่มีการสร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดความเข้มข้นที่ 100 200 และ 400 ppm โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* ที่เวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที

ผลการทดลอง พบว่าประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 18.70 % ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีเซลล์เหลือรอดชีวิต $4.0 \pm 0.08 \log \text{CFU/cm}^2$ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $4.92 \pm 0.10 \log \text{CFU/cm}^2$ ในขณะที่ความเข้มข้น 200 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 21.31 % ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีเซลล์เหลือรอดชีวิต $3.95 \pm 0.04 \log \text{CFU/cm}^2$ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $5.02 \pm 0.02 \log \text{CFU/cm}^2$ และที่ความเข้มข้น 400 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 25.25% ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีเซลล์เหลือรอดชีวิต $3.70 \pm 0.12 \log \text{CFU/cm}^2$ จากปริมาณ

เชื้อเริ่มต้น $4.95 \pm 0.11 \log \text{ CFU/cm}^2$ หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 30 นาที ดังรูปที่ 4.26 และ 4.27



รูปที่ 4.26 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสูมตัวอย่างเชื้อทันที

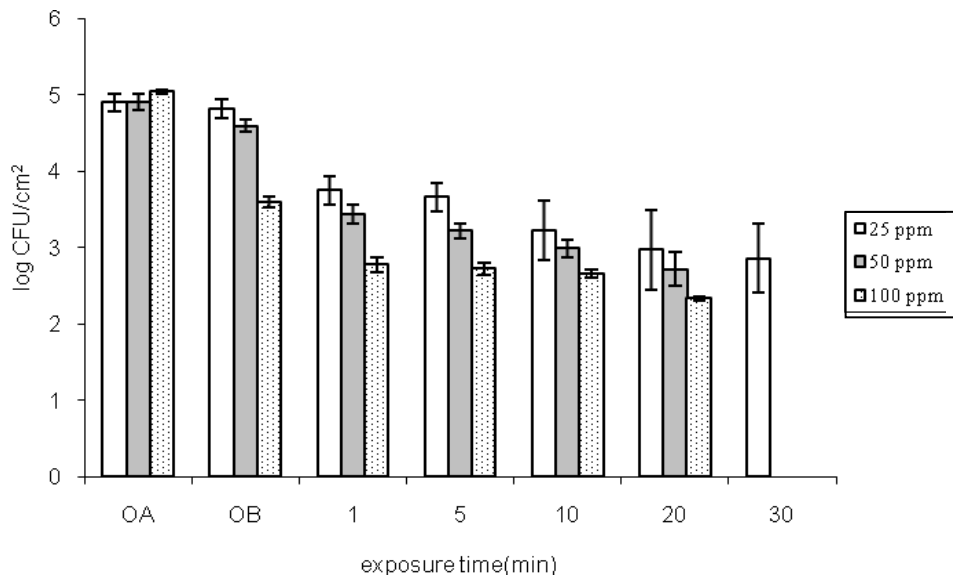


รูปที่ 4.27 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสูมตัวอย่างเชื้อทันที

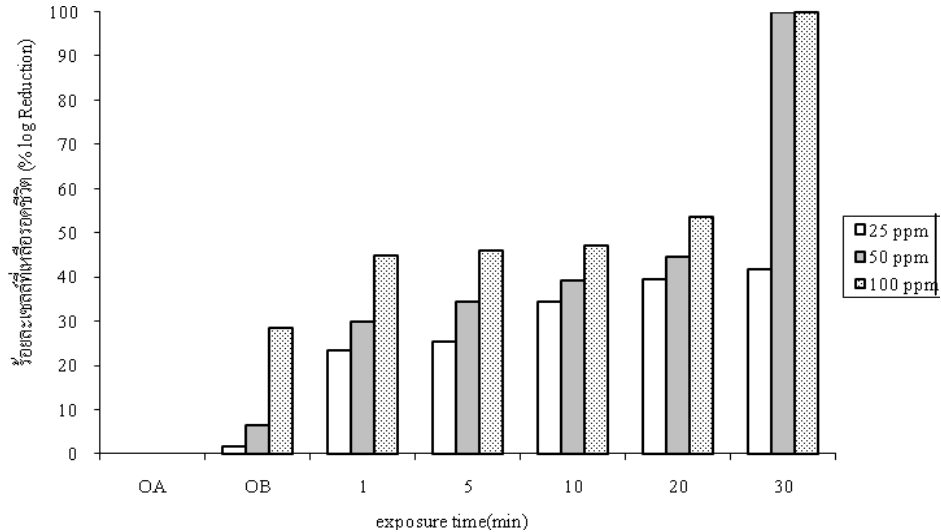
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายไฮโปคลอไรท์ ในการทำลายเซลล์ *P. fluorescens* ที่แขวนลอยอยู่ในตัวกลางชนิดเหลวและเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม อายุ 24 ชั่วโมง บนพื้นผิวสเตนเลสสตีล จะเห็นได้ว่า เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น 400 ppm ในระยะเวลา 30 นาที สามารถลดจำนวนเซลล์ ไบโอฟิล์มบนพื้นผิวทดสอบได้มากกว่าเซลล์ *P. fluorescens* ที่แขวนลอยอยู่ในตัวกลางชนิดเหลว TSB ทั้งนี้อาจเนื่องจากคลอรีนบางส่วนจะทำปฏิกิริยากลอรีนซันและออกซิเดชันกับหมู่อะมิโนของสารอินทรีย์ (Wei et al., 1985) ดังนั้นการใช้สารละลายไฮโปคลอไรท์ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์สูงนั้น จะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* ลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Frank และคณะ (2003) รายงานว่าเมื่อทำการปนเปื้อน chicken serum albumin และ chicken fat บนไบโอฟิล์มของ *L. monocytogenes* บนแผ่นสเตนเลสสตีล ส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารละลายไฮโปคลอไรท์ลดลงเช่นกัน

4.5.2 ประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens*

การทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวสเตนเลสสตีล เกรด 304 ชนิด 2B ที่มีการสร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดความเข้มข้นที่ 25 50 และ 100 ppm โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับกรดเปอร์ออกซีแอซีติก ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* ที่เวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ผลการทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 41.63 % ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ $2.86 \pm 0.45 \log \text{ CFU/cm}^2$ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $4.90 \pm 0.12 \log \text{ CFU/cm}^2$ แต่ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที (รูปที่ 4.28)



รูปที่ 4.28 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที



รูปที่ 4.29 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวทดสอบ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดเปอรร์อกซีแอสีติกที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 3 ความเข้มข้น พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 ppm ไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมด 100 % ภายในระยะเวลา 30 นาที ที่ระยะเวลาเท่ากัน ดังนั้นจึงพิจารณาที่เวลา 20 นาที พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 44.60% โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ $2.72 \pm 0.22 \log \text{ CFU/cm}^2$ จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $4.91 \pm 0.10 \log \text{ CFU/cm}^2$ และ ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 53.77 % โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ $2.33 \pm 0.03 \log \text{ CFU/cm}^2$ จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $5.04 \pm 0.03 \log \text{ CFU/cm}^2$ ซึ่งจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของกรดเปอรร์อกซีแอสีติกที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ที่เวลา 20 นาที แทบไม่มีความแตกต่างกันเลย ดังนั้นหากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารจะเลือกนำกรดเปอรร์อกซีแอสีติกไปใช้ในการทำลายไบโอฟิล์มจาก *P. fluorescens* จึงควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 50 ppm เพราะจะช่วยประหยัดการใช้สารฆ่าเชื้อและลดต้นทุนในการผลิต แต่ถ้าต้องการเวลาในการฆ่าเชื้อน้อยๆ ควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 100 ppm เพราะสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ 45.04 % ภายในเวลา 1 นาที หรืออาจเพิ่มความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm ก็ได้

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดเปอรร์อกซีแอสีติกในการเซลล์ทำลาย *P. fluorescens* ที่แขวนลอยอยู่ในตัวกลางชนิดเหลว TSB และเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม อายุ 24 ชั่วโมง บนพื้นผิวสแตนเลสสตีล พบว่ากรดเปอรร์อกซีแอสีติกที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถทำลายเซลล์ได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที แต่สามารถลดจำนวนเซลล์ไบโอฟิล์มบนพื้นผิวทดสอบได้เพียง 41.63 % แสดงให้เห็นว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มสามารถทนทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลาย (Kumar และ Anand, 1998)

4.6 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโอบีตเครื่องสไลซ์เนื้อ

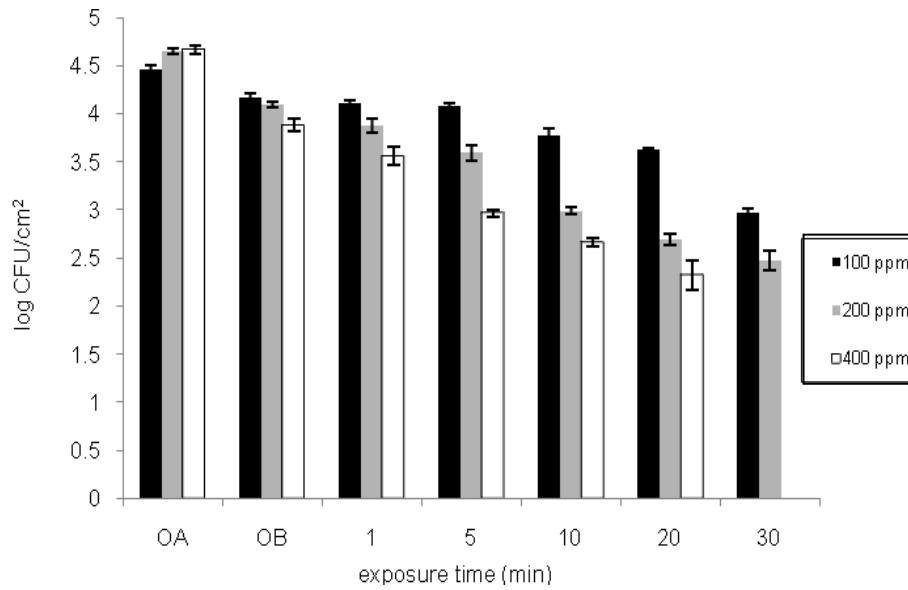
สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และกรดเปอรร์อกซีแอสีติก ความเข้มข้น 5 %

สร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวโอบีตสแตนเลสสตีลของเครื่องสไลซ์เนื้อที่ใช้ในกระบวนการหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยจุ่มโอบีตสแตนเลสสตีลในสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อปริมาณ

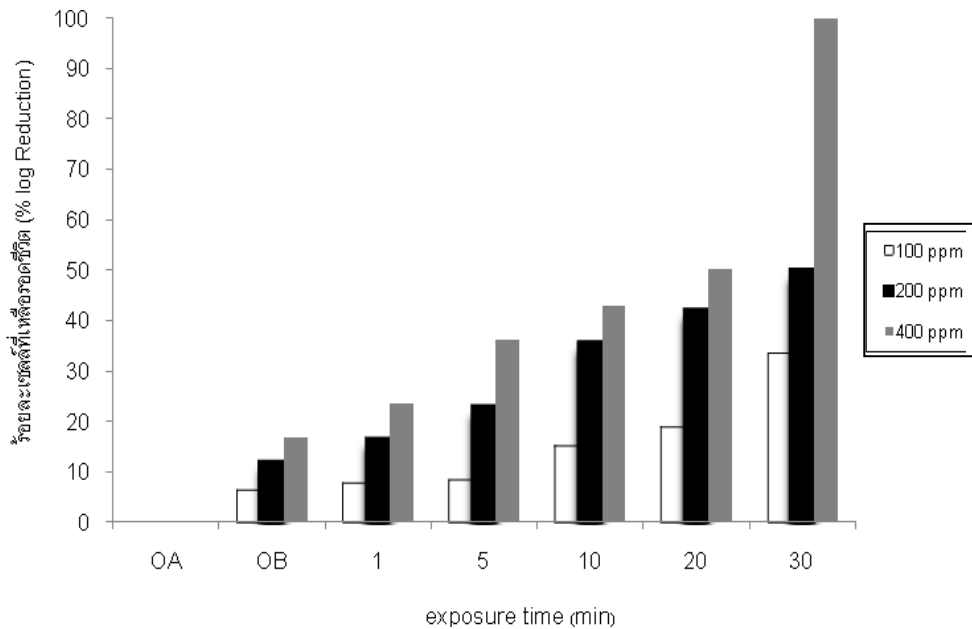
เชื้อ 8 log CFU/mL (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง) 30 วินาที แล้วจึงนำไปมีดสแตนเลสสตีลใส่ลงในภาชนะที่มีฝาปิดปลอดเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 °C) ทิ้งไว้ระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ โดยเปิดสารฆ่าเชื้อตามความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1000 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะฝาปิดปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบใบมีดสแตนเลสสตีลที่เกิดไบโอฟิล์มแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แขนในสารฆ่าเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ทดสอบที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เมื่อครบเวลาที่กำหนดใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบใบมีดสแตนเลสสตีลออกจากหลอดสารฆ่าเชื้อ จุ่มในสารละลาย 0.5 % sodium thiosulfate (NaOCl) เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอรีนที่จะไปมีผลในการทำลายเชื้อ ในกรณีสารฆ่าเชื้อเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนกรดเปอร์ออกซีแอกซิดิกจะหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ phosphate buffer saline (PBS pH 7.2) 2 ครั้ง จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อเช็ดบนแผ่นพื้นผิวทดสอบดังกล่าว วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดโดยวิธี Standard plate count technique และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas Agar Base และตรวจนับเชื้อที่เหลือรอดบนพื้นผิวทดสอบ

4.6.1 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวใบมีดเครื่องสไลซ์เนื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) ในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวใบมีดสแตนเลสสตีล ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดความเข้มข้นที่ 100 200 และ 400 ppm โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่เวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ผลการทดลอง พบว่าที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้เพียง 33.41 % ภายในระยะเวลา 30 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 200 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 50 % ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีเซลล์เหลือรอดชีวิต 2.47 ± 0.10 log CFU/cm² จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.66 ± 0.06 log CFU/cm² และที่ความเข้มข้น 400 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 30 นาที ดังรูปที่ 4.30 และ 4.31



รูปที่ 4.30 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวไบเมทัลสเตนเลสสตีล ที่รอดชีวิต หลังสัมผัสสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

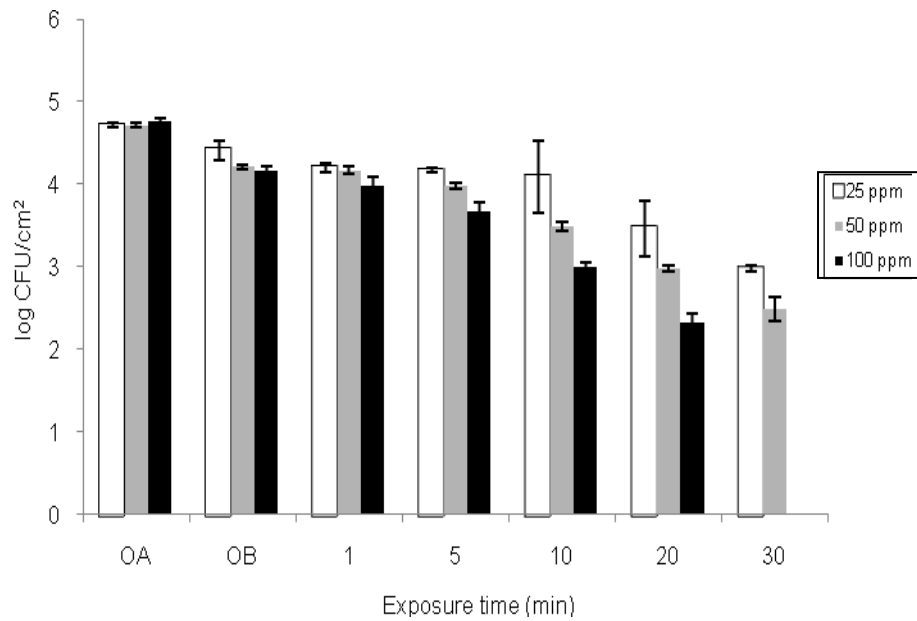


รูปที่ 4.31 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวไบเมทัลสเตนเลสสตีล ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

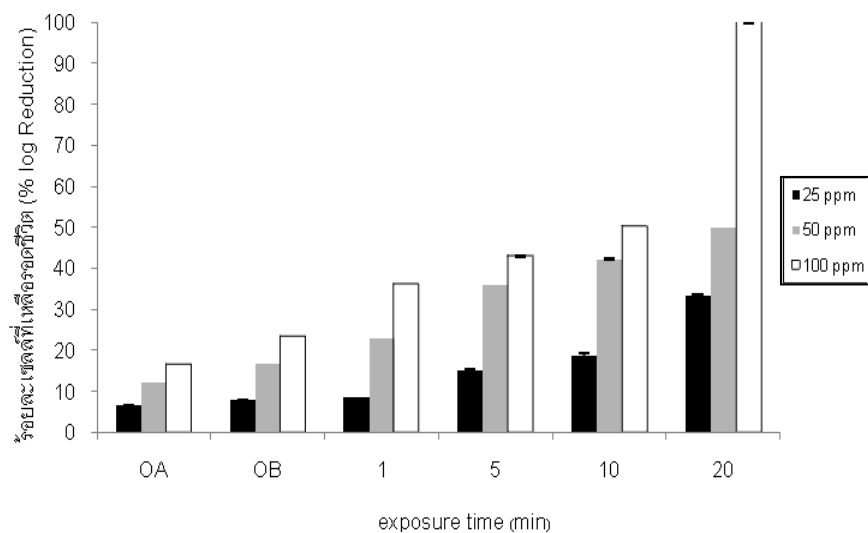
เมื่อพิจารณาถึงเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้น (รูปที่ 4.30) พบว่าที่ความเข้มข้น 400 ppm ถึงแม้จะทำลายเชื้อได้ 100 % หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อได้ภายในระยะเวลา 30 นาที แต่เมื่อพิจารณาเวลาที่ 1 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงเพียง 7.85, 16.23 และ 23.61% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* ของสารละลายไฮโดรเจนไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆกัน เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสเชื้อและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เพิ่มมากขึ้น

4.6.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอบีโอมครีเอตสไลซ์เนื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) ในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวไบโอบีโอมสแตนเลสสตีล ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดความเข้มข้นที่ 25 50 และ 100 ppm โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับกรดเปอร์ออกซีแอซีติก ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่เวลา 0 1 5 10 20 และ 30 นาที ผลการทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้เพียง 36.73 % ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ $2.98 \pm 0.14 \log \text{ CFU/cm}^2$ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $4.71 \pm 0.26 \log \text{ CFU/cm}^2$ ส่วนที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 47.13 % โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ $2.49 \pm 0.05 \log \text{ CFU/cm}^2$ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น $4.71 \pm 0.03 \log \text{ CFU/cm}^2$ แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที เมื่อเพิ่มความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายไบโอฟิล์มได้หมด 100 % ดังรูปที่ 4.32 และ 4.33



รูปที่ 4.32 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีล ที่รอดชีวิต หลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที



รูปที่ 4.33 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีล ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย 0_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดเปอร์ออกซีแอสติกที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 3 ความเข้มข้น พบว่าเมื่อพิจารณาที่เวลา 20 นาที พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 36.73% โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ $2.98 \pm 0.04 \log \text{ CFU/cm}^2$ จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $4.71 \pm 0.03 \log \text{ CFU/cm}^2$ และ ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถลดจำนวนเซลล์ได้ 50.94 % โดยมีปริมาณเซลล์เหลือรอดชีวิตอยู่ $2.33 \pm 0.11 \log \text{ CFU/cm}^2$ จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $4.77 \pm 0.03 \log \text{ CFU/cm}^2$ ซึ่งจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของกรดเปอร์ออกซีแอสติกที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ที่เวลา 20 นาที มีความแตกต่างกันในการทำละลายเซลล์ไบโอฟิล์มบนพื้นผิวโพลีเอทิลีนแลสสตีล ดังนั้นหากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารจะเลือกนำกรดเปอร์ออกซีแอสติกไปใช้ในการทำลายไบโอฟิล์มจาก *P. fluorescens* จึงควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 100 ppm เพราะมีประสิทธิภาพในการทำละลายไบโอฟิล์มได้หมดภายในระยะเวลา 30 นาที

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำละลายเซลล์จุลินทรีย์ที่แขวนลอยในสารละลายน้ำเกลือและเซลล์ภายในไบโอฟิล์มบนพื้นผิว จะเห็นได้ว่าสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้ทั้งหมดภายในเวลา 5 นาที แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์มได้ทั้งหมด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Peng และคณะ (2002) รายงานว่าการใช้สารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 25 ppm เป็นเวลา 5 นาที สามารถทำลายเซลล์ของ *B. cereus* ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายได้ทั้งหมด แต่เซลล์ภายในไบโอฟิล์มยังคงรอดชีวิตได้ กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล (2550) รายงานว่า การที่เซลล์จุลินทรีย์ภายในไบโอฟิล์มสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น มีสาเหตุหลายปัจจัยดังนี้ EPS ที่เซลล์สร้างขึ้นปกคลุมไว้เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของสารฆ่าเชื้อและจำกัดการแพร่ของโมเลกุลสารฆ่าเชื้อที่จะเข้ามาทำลายเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม ความหนาแน่นของเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม และความจำกัดของอาหารและสภาวะแวดล้อมมีผลให้เซลล์ภายในไบโอฟิล์มเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ ทำให้เกิดการชักนำสู่สภาวะเครียดได้ เช่นเดียวกับ Resch และคณะ (2005) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนของเซลล์ *S. aureus* ภายในไบโอฟิล์ม อายุ 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ต่างๆ แสดงให้เห็นว่าการที่เซลล์เกิดการเกาะติดบนพื้นผิวและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มส่งผลให้เซลล์ภายในไบโอฟิล์มนั้นมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด คือ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* พบว่าเมื่อสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์สัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลวที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์สูงนั้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากคลอรีนบางส่วนจะทำปฏิกิริยากลอรีเนชันและออกซิเดชันกับหมู่อะมิโนของสารอินทรีย์ (รุ่งทิวา อิศรางพชร, 2541; กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล, 2550) ดังนั้นการใช้ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent จึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลง เพราะสารอาหารต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยสนับสนุนให้เซลล์จุลินทรีย์รอดชีวิตและเจริญได้ ดังนั้นการใช้สารประกอบคลอไรด์ ซึ่งมีกรดไฮโปคลอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญ จึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายน้ำเกลือได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent ส่วนกรดเปอร์รอกซีแอซีติกจะเห็นว่าความเข้มข้นของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นสูงจะมีค่า pH น้อยกว่าค่าความเข้มข้นต่ำกว่าและหลังจากกรดเปอร์รอกซีแอซีติกสัมผัสกับสารแขวนลอยเซลล์ในตัวกลางชนิดเหลวที่มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ต่างกัน ทำให้มีการค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการแตกตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของกรดเปอร์รอกซีแอซีติก (Fatemi and Frank, 2003; Kunigk and Almeida, 2001) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าอิทธิพลของ pH อาจจะมีผลในการทำลายเซลล์ของ *P. fluorescens* ได้ดีกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีค่า pH เป็นเบสสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fatemi และ Frank (2003) ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อไฮโปคลอไรท์และกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ในการทำลายไบโอฟิล์มที่เกิดจากเชื้อ *L. monocytogenes* และ *Pseudomonas* บนพื้นผิวสเตนเลสสตีล โดยจุ่มแผ่นทดสอบที่เกิดไบโอฟิล์ม 48 ชั่วโมง ในสารฆ่าเชื้อทั้งสองชนิด พบว่ากรดเปอร์รอกซีแอซีติกมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมากกว่าไฮโปคลอไรท์ ซึ่งลดจำนวนเซลล์ลงได้มากกว่า $3 \log \text{CFU/cm}^2$ ที่ความเข้มข้น 160 ppm หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 นาที

Rossini และ Gaylarde (2000) ศึกษาประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์และกรดเปอร์รอกซีแอซีติกต่อเซลล์ของ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ที่เกาะบนพื้นผิวสเตนเลสสตีล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้กรดเปอร์รอกซีแอซีติกเข้มข้น 250 และ 1000 mg/l และใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 100 และ 200 mg/l เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบเซลล์ที่รอดชีวิตภายใต้กล้อง epifluorescence microscopy พบว่า *P. aeruginosa* มีความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวสเตนเลสสตีลได้ดีกว่า *E. coli* ในขณะที่ *S. aureus*

เกาะติดได้น้อยที่สุดและโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ได้ดีกว่ากรดเปอร์ออกซีแอซิติก

Jeyasekaran และคณะ (2000) ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อต่อไบโอฟิล์มของ *Listeria monocytogenes* สามารถเจริญบนพื้นผิวสแตนเลสสตีลได้มากกว่าพื้นผิวพลาสติก จากนั้นนำไปทดสอบกับไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 100 ppm และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 5 นาที พบว่าสารทั้งสองชนิดสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์บนแผ่นทดสอบได้ 3-4 log CFU/cm² และสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์บนพลาสติกได้ 1-2 log CFU/cm² โดยไฮโปคลอไรท์ ที่มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนจุลินทรีย์บนพื้นผิวทั้งสองชนิดมากกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 200 ppm สามารถทำลายเซลล์บนพื้นผิวสแตนเลสสตีลได้ทั้งหมด ภายในเวลา 5 นาที ส่วนประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลาย (Planktonic cell) ของ *L. monocytogenes* สามารถทำลายเซลล์ได้ทั้งหมด โดยใช้ไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 10 ppm และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1 ppm เป็นเวลา 5 นาที

Dosti และคณะ (2005) ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของไอโซน คลอรีนและความร้อนในการกำจัดไบโอฟิล์มบนแผ่นสแตนเลสสตีลที่แช่ในน้ำนมโดยใช้ไอโซนที่ความเข้มข้น 0.6 ppm เป็นเวลา 1 นาที คลอรีนความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 2 นาที โดยทำการปลูกถ่ายเชื้อ *P. fluorescens*, *P. fragi* และ *P. putida* ลงในน้ำนมบนแผ่นสแตนเลสสตีลขนาด 2.54×2.54 cm² ที่แช่ในน้ำนม บ่มเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง หลังจากมีการเกาะติดและเจริญเป็นไบโอฟิล์มแล้ว นำแผ่นทดสอบล้างด้วย phosphate buffered saline เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพของการกำจัดไบโอฟิล์ม พบว่าไอโซนและคลอรีนสามารถลดจำนวน *P. fluorescens*, *P. fragi* ไบโอฟิล์มบนพื้นผิวได้เท่ากัน และพบว่าไอโซนมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเซลล์ *P. Putida* ได้ดีกว่าคลอรีน แต่ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมด

Kim และคณะ (2007) ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในโรงพยาบาลในการฆ่าเชื้อ *Enterobacter sakazaki* ที่แขวนลอยอยู่ในช่องเหลว เกาะบนพื้นผิวที่แห้งของเหล็กกล้าไร้สนิม และอยู่ในไบโอฟิล์ม พบว่า *E. sakazaki* มีความทนทานต่อสารฆ่าเชื้อหลายระดับขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของสารฆ่าเชื้อและชนิดของสารอินทรีย์ และระยะเวลาที่สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อพบว่าปริมาณสารแขวนลอยเซลล์ (planktonic cell) ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ (7.22-7.40 log CFU/ml) ลดปริมาณลงจนไม่สามารถนับได้ (<0.30 log CFU/ml) หลังได้รับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1-5 นาที เมื่อเซลล์แขวนลอยอยู่ในอาหารสำหรับทารกจะมีความทนต่อสารฆ่าเชื้อมากขึ้นโดยสามารถลดปริมาณเซลล์ได้เพียง 0.02-3.69 log CFU/ml หลังจาก

ได้รับสารฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที ส่วนเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในไบโอฟิล์มที่มีอายุ 6 วันและ 12 วัน บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมมีความทนทานต่อสารฆ่าเชื้อไม่แตกต่างกัน ดังนั้นประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการฆ่าเชื้อ *E. sakazaki* เรียงลำดับตามความไวต่อสารฆ่าเชื้อได้ดังนี้ planktonic cell มากกว่าเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม และมากกว่าเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารฆ่าเชื้อที่ใช้เป็นประจำในโรงพยาบาลไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ของ *E. sakazaki* ที่ฝังตัวอยู่ในสารอินทรีย์และเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในไบโอฟิล์มบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมทนทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลาย

จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่าเซลล์ *P. fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่นทดสอบและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ซึ่งการสะสมของจุลินทรีย์ภายในไบโอฟิล์มสามารถทนทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลาย (Planktonic) เนื่องจากการพัฒนาทางพันธุกรรมขึ้นกับการเกาะติดบนพื้นผิวและการแบ่งตัวในภาวะที่เป็นไบโอฟิล์ม และเกิดการปรับตัวทางด้านลักษณะปรากฏ Kumar และ Anand (1998) ได้อธิบายว่า การที่เซลล์ภายในไบโอฟิล์มสามารถทนทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในสารละลายนั้น เพราะกลุ่มเซลล์นี้จะขยายใหญ่และเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) ปกคลุมบริเวณพื้นผิว เซลล์จะผลิตสารกลุ่มพอลิเมอร์แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ปกคลุมที่ผิวของกลุ่มเซลล์ เรียกสารกลุ่มนี้ว่า Extracellular Polymeric Substances (EPS) ซึ่งจะช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ความแห้งสารเคมีต่างๆ และสารทำความสะอาด เป็นต้น ลักษณะทางโครงสร้างจากการรวมกลุ่มกันของจุลินทรีย์อาจจะเป็นตัวขัดขวางการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อและการสร้างเอนไซม์ออกมาลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ

นอกจากนี้การแทรกซึมของสารฆ่าเชื้อเข้าไปในไบโอฟิล์มยังเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งขึ้นกับชนิดของสารที่ใช้ การเกาะติดบนพื้นผิวที่สัมผัสอาหารของจุลินทรีย์และเจริญเป็นไบโอฟิล์มมีความสำคัญต่อโรงงานอุตสาหกรรมอาหารดังนั้นการวิธีการกำจัดเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในฟิล์มทำได้ยากมากการทำความสะอาดตามปกติไม่สามารถกำจัดได้หมดจะต้องใช้แรงทางกายภาพช่วยในการกำจัด เช่น การขัดถูร่วมกับสารทำความสะอาด เป็นต้น ล้างส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ที่ฝังแน่นออกไป จากนั้นจะใช้สารฆ่าเชื้อเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์จึงทำให้สารทำความสะอาดมีประสิทธิภาพมากที่สุด

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. ในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก (8 log CFU/ml) เวลา 0 นาทีก็เพียงพอที่จะทำให้ *Pseudomonas fluorescens* สามารถเกาะติดบนแผ่น stainless steel ได้และเมื่อเวลานานมากขึ้น ก็สามารถตรวจพบ *P. fluorescens* ได้มากยิ่งขึ้นสำหรับ ในสภาวะที่มีปริมาณเชื้อน้อย (3 log CFU/ml) พบว่าที่เวลา 0 - 120 นาที ไม่สามารถตรวจพบเชื้อบนพื้นผิวทดสอบด้วยวิธี spread plate technique ทั้งนี้ไม่ได้แสดงว่าไม่มีเซลล์ของ *P. fluorescens* เกาะบนแผ่นสแตนเลสสตีล โดยพบว่ามีโคโลนีของ *P. fluorescens* บนจานเพาะเชื้อ แต่มีจำนวนเซลล์น้อยมาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อบนแผ่นทดสอบที่มีปริมาณเชื้อระดับต่ำ เนื่องจากเซลล์เริ่มต้นมีปริมาณน้อย จะต้องอาศัยเวลาให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนถึงจะมีการตรวจพบได้ โดยอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *P. fluorescens* จากการทดลอง พบว่าอุณหภูมิ 28°C *P. fluorescens* สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 20 และ 15 °C ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงแหล่งของสารอาหาร (น้ำเกลือปลอดเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และสารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v)) พบว่า เมื่อเปลี่ยนแหล่งของตัวกลางอาหารชนิดเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85 % NaCl) พบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ที่เวลา 24 ชั่วโมง การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ดีกว่าสารละลาย soiling agent และ 0.85 % NaCl ตามลำดับ หลังจากบ่มแผ่นทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และสารละลาย soiling agent เริ่มช้าลง แต่การเจริญของเซลล์บนแผ่นทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ เนื่องจากมีสารอาหารที่สมบูรณ์

2. ในกระบวนการตัดหั่นผลิตภัณฑ์อาหารสามารถเกิดการโอนถ่ายเซลล์จากพื้นผิวใบมีดสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้ หากมีเชื้อจุลินทรีย์สะสมอยู่บนเครื่องมือเครื่องใช้ในกระบวนการผลิต และเมื่อการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของใบมีดสแตนเลสสตีล พบว่ามีการโอนถ่ายเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์อาหารสูงกว่าเซลล์ *P. fluorescens* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิว ดังนั้นในกระบวนการตัดหั่นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ หากมีการสะสมของจุลินทรีย์ที่ส่วนของใบมีดจะทำให้เกิดการโอนถ่ายเชื้อจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์ได้ และเมื่อเกิดชุดโคมแพสไบโอฟิล์มที่พื้นผิวสัมผัสอาหารจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตนั้นมีปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูงขึ้น

3. การเลือกชนิดของสารฆ่าเชื้อเพื่อใช้ในการทำความสะอาดพื้นผิวสัมผัสอาหารมีความจำเป็นมาก ต้องเลือกให้มีความเหมาะสมกับลักษณะของงานที่จะใช้ทำความสะอาด จากการทดลองพบว่า สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีประสิทธิภาพดีเมื่อไม่มีสารอินทรีย์เข้ามาปะปน แต่เมื่อมีสารอินทรีย์ปะปนอยู่ด้วยจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำละลายเซลล์ลดลง การฆ่าเชื้อต้องใช้เวลาานมากขึ้น ส่วนการทำลายไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* ระยะเวลา 30 นาที ก็ยังไม่เพียงพอในการทำลายไบโอฟิล์ม ส่วนกรดเปอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 50 ppm มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้เป็นอย่างดี สารอินทรีย์ไม่มีผลในการลดประสิทธิภาพในการทำละลายเซลล์ของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก แต่ทั้งนี้ต้องเลือกความเข้มข้นและระยะเวลาในการสัมผัสเชื้อให้เหมาะสม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรหาวิธีที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อบนแผ่นทดสอบการเกาะติดและเกิดไบโอฟิล์มในสถานะที่มีเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณน้อย (3 log CFU/ml) เนื่องจากการใช้วิธี swab และ spread plate technique ไม่สามารถตรวจพบเชื้อบนพื้นผิวทดสอบซึ่งมีปริมาณเซลล์น้อย จึงต้องอาศัยระยะเวลาพอสมควรเพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวน จึงจะสามารถตรวจพบเชื้อบนแผ่นสแตนเลสสตีลได้

2. ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์ม เช่น ชนิดของพื้นผิวสัมผัสอาหาร เช่น ยาง พลาสติก และซีเมนต์ เป็นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ประเภทอื่นๆ ซึ่งสามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมชนิดอื่นอีกด้วย รวมทั้งชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นปัญหาในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

3. ควรมีการทดลองสร้างไบโอฟิล์มที่มีจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน เพื่อให้มีลักษณะใกล้เคียงกับไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นจริงในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากไบโอฟิล์มที่มีการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ผสมหลายชนิด (Mix biofilms)

4. การศึกษาการถ่ายโอนเซลล์สู่ผลิตภัณฑ์ ควรมีการตรวจหาปริมาณเซลล์ที่หลงเหลืออยู่บนพื้นผิวใบมีดในระหว่างกระบวนการตัดหั่นผลิตภัณฑ์ เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการวิเคราะห์การปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร

5. ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อและเวลาในการสัมผัสสารของไบโอฟิล์มบนแผ่นทดสอบที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวสัมผัสอาหารต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมได้ แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ภายในไบโอฟิล์มด้วย เนื่องจากไบโอฟิล์มที่มีการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ผสมหลายชนิด (Mix biofilms) ซึ่งอาจมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อแตกต่างจากไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว (Single biofilm)

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล. 2550. ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอเล็กโทรไลต์ชนิดกรดในการทำลายฟิล์มชีวภาพของบาซิลลัส ซีเรียส สแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส และสปอร์เกาะติดของบาซิลลัส ซีเรียส บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จีระเดช มาลา.2551. การเกิดและการควบคุมไบโอฟิล์มของ Salmonella บนพื้นผิวเหล็กสแตนเลส วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณฐนนท์ ตราชู.2551. จุลินทรีย์ในแผ่นชีวะ (Microbes in Biofilm) พิมพ์ครั้งที่1. หจก.อภิชาติ การพิมพ์.

ถกลวรรณ พิรุณสาร.2547.การศึกษาเวลาในการลดเชื้อจุลินทรีย์บนเปลือกไข่โดยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษกร ปาละกุล. 2536. ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการลดปริมาณ Salmonella typhimurum ในกุ้งก่อน กระบวนการแช่เยือกแข็ง วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บริษัทไทยน็อกซ์สตีล จำกัด (มหาชน).2010.ข้อมูลเหล็กกล้าไร้สนิม เอกสารเผยแพร่บริษัทไทยน็อกซ์สตีล.

บริษัทไทยน็อกซ์สตีล จำกัด (มหาชน). Stainless Steel. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา http://www.thainox.co.th/steelfacts_what.htm [2553, ธันวาคม 12]

รุ่งทิภา อิศรางพร. 2541. การเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อ Salmonella Typhimurum วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

สุภาวดี ตั้งจิต.2543. ผลของสารฆ่าเชื้อคลอรีนต่อการบาดเจ็บของ Salmonella Typhimurium วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. จุลชีววิทยาทางอาหาร พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ศิวาพร ศิวเวช. 2536. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร พิมพ์ครั้งที่ 4. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร.

ภาษาอังกฤษ

APHA. 1975. Standard Methods for the Examination of Water and Waste water 14 th ed. American Punlic Health Association, New York. p.1193.

Blackman, I.C. and Frank, J.F. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surface. Journal of Food Protection 59: 827-831.

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

- Costerton, J.W. 2005. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. Clinical Orthopaedics and Related Research 437: 7- 11.
- Costerton, J.W. and Lewandowski, Z. 1995. Microbial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322.
- Dosti, B., Guzel-Seydim, Z. and Greene, A.K. 2005. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilm. International Journal of Dairy Technology 58: 19-24.
- Fatemi, P. and Frank, J.F. 2003. Inactivation of *Listeria monocytogenes* / *Pseudomonas* biofilm by peracid sanitizers. Journal of Food Protection 62: 761-765.
- Flint, S.H., Bremer, P.J. and Brooks, J.D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant description, current concerns and methods of control. Biofouling The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research 11: 81-97.
- Frank, J.F. 2001. Microbial attachment to food and food contact surfaces. Advances in Food and Nutrition Research 43: 319-369.
- Frank, J.F., Ehlers, J. and Wicker, L. 2003. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil containing biofilm using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. Food Protection Trends 23: 654-663.
- Garrett, T. R., Bhakoo, M. and Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science 18: 1049-1056.

- Gill, C.O. and Newton, K.G. 1997. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. Journal of Applied Bacteriology 43:189 -195.
- Gram, L. 2010. Food Microbiology and Food Safety. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Pages 87-119.
- Hood, S.K. and Zottola, E.A. 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. International Journal of Food Microbiology 145-153.
- Ito, K.A. and Seeger, M.L. 1980. Effect of germicides on microorganisms in can cooling waters. Journal of Food Protection 43: 484-487.
- Jessen, B. and Lammert, L. 2003. Biofilm and disinfection in meat processing plants. International Biodeterioration & Biodegradation 51: 265-269.
- Jeyasekaran, G., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2000. Effect of sanitizers on *Listeria* biofilm on contact surfaces. Asian Fisheries Science 13: 209-213.
- Joseph, B., Otta, S. K. and Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. International Journal of Food Microbiology 64: 367-372.
- Kaarina, A., Shiowshuh, S., Laura, R. and Mark, T. 2007. Modelling transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of 'gravad' salmon. International Journal of Food Microbiology 118: 69-78.
- Karen, S., Kim, S.H., Martin, L.Y. and Cheng-I, W. 2009. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. Food Microbiology 26:514-519.

- Kim, H., Ryu, J.H. and Beuchat, L.R. 2007. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension dried on the surface of stainless steel and in a biofilm. Applied Environment Microbiology 73: 1256-1265.
- Kim, S.H. and Wei, C.I. 2007. Biofilm formation by multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Phage Type DT104 and other pathogens. Journal of Food Protection 70: 22-29.
- Kumar, C.G., and Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: A review. International Journal of Food Microbiology 42: 9-27.
- Kunigk,L. and Almeida, M.C.B.2001. Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. Brazilian Journal of Microbiology 32:38-41.
- Kusumaningrum, H.D., Riboldi,.G., Hazeleger, W.C. and Beumer, R.R. 2003. Survival of foodborn pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to food. International of Food Microbiology 85: 227-236.
- Lebert, I., Robles-Olvera, V. and Lebert, A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. International Journal of Food Microbiology 61: 27-39.
- Lewis, K. 2001. Persister cells and the riddle of biofilm survival. Biochemistry (Moscow) 70: 267- 274.
- Macrae,R., Robinson, R.K. and Sadler, M.J. 1993. Encyclopedia of Food Science Food Technology and Nutrition Academic press Ltd., New York. p. 42.
- Marriott, N.G. and Gravani R.B. 2006. Principles of Food Sanitation 5th ed. Springer Science Business Media, Inc.

- Marshall, K.C. 1994. Microbial adhesion in biotechnological processes. Current Opinion in Biotechnology. 5:296-301.
- Olofsson, T.C., Ahrne, S. and Molin, G. 2007. Composition of the bacterial population of refrigerated beef, identified with direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. International Journal of Food Microbiology 118: 233-240.
- Orth, R. 1998. The importance of disinfection for the hygiene in the dairy and beverage product. International Biodeterioration and Biodegradation 41: 201-208.
- Oulahal, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M. and Blum, L.J. 2007. Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent. Innovative Food Science and Emerging Technologies 8:192-196.
- Pamela Lyon. Bacterial Cognition [Online]. 2007. Available from http://img.photobucket.com/albums/v159/skdevitt/biofilm_formation.gif.html [2007, August 8]
- Peng, J.S., Wei-Chong, T. and Cheng, C.C. 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. International Journal of Food Microbiology 77: 11-18.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Todd, E.C.D., Carrasco, E., García-Gimeno, R.M. and Zurera, G. 2007. Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. Meat Science 76: 692-699.

- Poulsen, L. V. 1999. Microbial biofilm in food processing. Lebensm.-Wiss.u.-Technol 32: 321-326.
- Resch, A. Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F. 2005. Differential Gene Expression Profiling of *Staphylococcus aureus* Cultivated under Biofilm and Planktonic Conditions. Applied and Environmental Microbiology 71: 2663-2676.
- Rod, T.M., Langsrud, S., Holck, A., and Moretro, T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. International Journal of Food Microbiology 116: 372-383.
- Rossini, E.M.M. and Gaylarde, C.C. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. International Journal of Microbiology 61: 81-85.
- Shia, X. and Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in Food Science & Technology Review: 1-7.
- Sheen, S. and Hwang, C. 2010. Mathematical modeling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. Food Microbiology 27: 37-43.
- Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M.J., Sutherland, I. and Azeredo, J. 2004. *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage Φ S1: the influence of temperature, host growth phase and media FEMS Microbiology Letters 241:13-20.

- Skandamis, P.N., Stopforth, Ashton, L.V., Geonaras, I., Kendall, P.A. and Sofos, J.N. 2009. *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry condition. Food Microbiology 26: 112-119.
- Stanga, M. 2010. Cleaning and Disinfection in the Food Industry WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Wei, C.I., Cook, D.L. and Kirk, L.R. 1985. Use of chlorine compound in the food industry. Food Technology 39 (1): 107-115.
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S.S., Malyea, R. and Boor, K.J. 2000. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. Applied and Environmental Microbiology 66: 2085-2095.
- Zottola, E.A. 1994. Microbial attachment and biofilm formation: A new problem for the food industry. Food Technology 48(7): 107-114.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. Trypticase Soy Broth (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	17.0 %
Peptone from soy meal	3.0 %
D (+) glucose	5.0 %
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5 %
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

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

2. Trypticase Soy Agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Pancreatic digest of casein	15.0 %
Papaic digest of soybean meal	5.0 %
Sodium chloride (NaCl)	5.0 %
Agar	15.0 %
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 40 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Nutrient Agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

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

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 20 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลองและขวดตามปริมาณที่ต้องการ ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Pseudomonas Agar Base (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	10.0 %
peptone from meat	10.0 %
magnesium sulfate	1.5 %
di-potassium hydrogen phosphate	1.5 %
agar-agar	12.0 %
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 38 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. Phosphate Buffer Saline (PBS,pH 7.2)

Sodium chloride (NaCl)	0.650 กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	0.210 กรัม
di- Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4)	0.724 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น หลังจากส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรจนสารละลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น แบ่งใส่ขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ปิดฝาแล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6. สารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (Normal saline)

Sodium chloride (NaCl)	8.50 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ละลาย Sodium chloride (NaCl) ในน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลองและขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ปิดฝาแล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. สารละลาย soiling agent (beef meat 5%w/v)

นำเนื้อสันในสุกร 50 กรัม หั่นเป็นชิ้นขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นเนื้อและน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ลิตร ไปใส่ใน stomacher bag นำไปคลุกให้เข้ากันด้วยเครื่อง food mixer กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายด้วยเครื่องกรอง Millipore โดยกรองผ่าน membrane filter ซึ่งมีรูขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายใส่ในขวดแก้วปลอดเชื้อด้วยวิธี aseptic technique แล้วนำไปใช้งานต่อไป

ภาคผนวก ข
สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

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

สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) เตรียมจากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ชนิดเหลว โดยละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เช่น ถ้าต้องการโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 100 ppm ทำได้โดยการนำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์นั้นมา 0.1000 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นต้น ความเข้มข้นอื่นๆก็ใช้วิธีเดียวกัน

2. Peroxyacetic acid: POA (Peroxy Thai, Thailand)

สารละลายกรดเปอร์ออกซีแอซีติก (peroxyacetic acid: POA) เตรียมจากสารผสมกรดเปอร์ออกซีแอซีติกทางการค้า (Proxitan 5 %, Peroxythai Ltd., Thailand) โดยเจือจางจากคำแนะนำของบริษัท ใช้ Proxitan® 5 % 1 ส่วนละลายน้ำ 125 ส่วน จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 400 ppm จากนั้นปรับสัดส่วนตามความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นของกรดเปอร์ออกซีแอซีติก 25, 50 และ 100 ppm

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Available chlorine (จีระเดช มาลา, 2551)

1. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต(Sodium thiosulfate) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

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

2. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต(Potassium dichromate) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ชั่งโพแทสเซียมไดโครเมต ปริมาณ 0.4904 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. การ standardize สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล 10 มิลลิลิตร ลงไป แล้วจึงเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) ปริมาณ 1 กรัม ปิดจุกยางเขย่า แล้วเก็บไว้ในที่มืด 6 นาที นำมาไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์

การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

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

4. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต(Sodium thiosulfate) ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล

เตรียมโดยบีเปิดสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ

5. สารละลายแป้ง

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

ภาคผนวก ง
ตารางแสดงข้อมูล

ตารางที่ ง1 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่สามารถเกาะติดบนพื้นผิว stainless steel เกรด 304 ชนิด 2B ที่ระยะเวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่ตรวจพบ* (log CFU/cm ²)
0	3.44 ± 0.13 ^f
5	4.18 ± 0.15 ^e
15	4.45 ± 0.07 ^{cd}
30	4.54 ± 0.09 ^{cd}
60	4.78 ± 0.11 ^b
120	4.87 ± 0.17 ^{**a}

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ ตรวจนับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังจากให้เชื้อเกาะติดบนพื้นผิวเป็นระยะเวลา 0-120 นาที สำหรับการทดสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/ml) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C

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

ตารางที่ ง2 การเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวทดสอบ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	จำนวนเซลล์* (log CFU/cm ²) และเวลา (ชั่วโมง)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48
15	3.48 ± 0.11 ^{Ah}	3.62 ± 0.15 ^{Bfg}	3.58 ± 0.09 ^{Bfg}	3.62 ± 0.10 ^{Cf}	3.75 ± 0.08 ^{Ce}	3.89 ± 0.11 ^{Cd}	3.88 ± 0.04 ^{Cd}	4.00 ± 0.09 ^{Cc}	4.22 ± 0.20 ^{Cb}	4.55 ± 0.28 ^{Ca}
20	3.54 ± 0.06 ^{Ai}	3.73 ± 0.06 ^{Ah}	3.80 ± 0.19 ^{Ag}	4.16 ± 0.13 ^{Af}	4.33 ± 0.16 ^{Ae}	4.50 ± 0.27 ^{Ad}	4.66 ± 0.17 ^{Ac}	4.72 ± 0.15 ^{Ac}	4.85 ± 0.18 ^{Bb}	5.05 ± 0.12 ^{Ba}
28	3.56 ± 0.09 ^{Ai}	3.64 ± 0.18 ^{Bh}	3.85 ± 0.21 ^{Ag}	3.87 ± 0.11 ^{Bg}	4.03 ± 0.12 ^{Bf}	4.13 ± 0.21 ^{Be}	4.23 ± 0.08 ^{Bcd}	4.27 ± 0.07 ^{Bc}	4.97 ± 0.22 ^{Ab}	6.00 ± 0.12 ^{**Aa}

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี swab และ spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

A, B, C,... หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 3 การเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวทดสอบ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C

อุณหภูมิ (°C)	จำนวนเซลล์ * (log CFU/cm ²) และเวลา (ชั่วโมง)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	
15	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^C	1.86 ± 0.10 ^{Bc}	1.89 ± 0.04 ^{Bc}	3.28 ± 0.06 ^{Cb}	4.27 ± 0.16 ^{Ca}	
20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.84 ± 0.14 ^{Ad}	1.89 ± 0.06 ^{Bd}	2.00 ± 0.08 ^{Ac}	3.44 ± 0.12 ^{Bb}	4.56 ± 0.13 ^{**Ba}	
28	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.89 ± 0.08 ^{Ad}	1.92 ± 0.03 ^{Ad}	2.09 ± 0.10 ^{Ac}	3.72 ± 0.34 ^{Ab}	5.05 ± 0.18 ^{Aa}	

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี swab และ spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA
 A, B, C,... หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
 **ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง4 การเจริญของเซลล์ *P. fluorescens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีแผ่นทดสอบชนิดต่างๆ จุ่มอยู่ภายใน เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) และเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำ (3 log CFU/mL)

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/mL)	จำนวนเซลล์ * (log CFU/cm ²) และเวลา (ชั่วโมง)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48
3	1.86 ± 0.23 ^j	2.10 ± 0.14 ⁱ	2.23 ± 0.04 ^{gh}	2.26 ± 0.13 ^g	2.60 ± 0.09 ^f	2.97 ± 0.11 ^e	3.21 ± 0.04 ^d	3.44 ± 0.15 ^c	6.21 ± 0.22 ^b	6.85 ± 0.22 ^{**a}
8	4.03 ± 0.016 ⁱ	4.32 ± 0.13 ^{gh}	4.44 ± 0.04 ^{gh}	4.61 ± 0.11 ^{fg}	4.74 ± 0.11 ^{fg}	5.12 ± 0.25 ^e	6.38 ± 0.28 ^d	6.75 ± 0.30 ^c	9.06 ± 0.08 ^{ab}	9.08 ± 0.09 ^{**a}

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA
 **ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 5 การเกิดไบโอฟิล์มของ *P. fluorescens* บนพื้นผิวทดสอบ เมื่อเปลี่ยนตัวกลางอาหารชนิดเหลวต่างๆ ที่อุณหภูมิ

ชนิดของตัวกลาง	จำนวนเซลล์ * (log CFU/cm ²) และเวลา (ชั่วโมง)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	
0.85 % NaCl	3.37 ± 0.10 ^{Ci}	3.51 ± 0.05 ^{Bh}	3.64 ± 0.06 ^{Cg}	3.77 ± 0.08 ^{Bfg}	3.82 ± 0.08 ^{Bf}	4.03 ± 0.05 ^{Be}	4.15 ± 0.05 ^{Bcd}	4.21 ± 0.06 ^{Cc}	4.62 ± 0.07 ^{Cb}	5.31 ± 0.06 ^{Ba}	
TSB	3.56 ± 0.09 ^{Ai}	3.64 ± 0.18 ^{Ah}	3.85 ± 0.21 ^{Afg}	3.87 ± 0.11 ^{Af}	4.03 ± 0.12 ^{Ae}	4.13 ± 0.21 ^{Ad}	4.23 ± 0.08 ^{Ac}	4.27 ± 0.07 ^{Bc}	4.97 ± 0.22 ^{Bb}	6.00 ± 0.12 ^{**Aa}	
soiling agent	3.41 ± 0.10 ^{Bh}	3.48 ± 0.08 ^{Bg}	3.86 ± 0.08 ^{Af}	3.86 ± 0.05 ^{Af}	3.87 ± 0.04 ^{Bf}	4.10 ± 0.07 ^{Ade}	4.17 ± 0.18 ^{Bd}	4.36 ± 0.25 ^{Ac}	4.84 ± 0.15 ^{Ab}	5.33 ± 0.24 ^{Ba}	

หมายเหตุ

*จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี swab และ spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

A, B, C,... หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน $n=3$ ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๖6 จำนวนเซลล์ *P. fluorescens* และ *P. fluorescens* Biofilm ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวโพลีเอทิลีนไครดเครื่องสไลซ์เนื้อ โดยทดสอบปริมาณเซลล์ตั้งต้นระดับสูง (8 log CFU/mL) และระดับต่ำ (3 log CFU/mL) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

ปริมาณเซลล์ตั้งต้น (log CFU/mL)	Inoculated <i>P. fluorescens</i> *(log CFU/cm ²)		<i>P. fluorescens</i> Biofilm 24 h. *(log CFU/cm ²)	
	พื้นผิวด้านหน้า	พื้นผิวด้านหลัง	พื้นผิวด้านหน้า	พื้นผิวด้านหลัง
8	4.62 ± 0.48 ^{**a}	4.42 ± 0.78 ^d	4.55 ± 0.23 ^c	4.58 ± 0.35 ^b
3	1.79 ± 0.16 ^{cd}	1.81 ± 0.20 ^{cd}	3.20 ± 0.41 ^b	3.39 ± 0.45 ^a

หมายเหตุ *หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบ ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี swab และ spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA A, B, C,... หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) **ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ๗7 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสเทนเลส สตีลสู่ชิ้นเนื้อโบลินาสไลซ์ จากไบโอดีสเทนเลส สตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* ปนเปื้อนบน พื้นผิว ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส

จำนวนชิ้นเนื้อโบลินาสไลซ์ (ชิ้น)	จำนวนเซลล์ที่มีการถ่ายโอนสู่เนื้อโบลินาสไลซ์ *(log CFU/g)
1	3.22 ± 0.03 ^{**a}
2	3.18 ± 0.04 ^b
3	3.23 ± 0.17 ^{ab}
4	3.19 ± 0.07 ^{bc}
5	3.18 ± 0.08 ^{bc}
6	3.14 ± 0.05 ^d
7	3.10 ± 0.06 ^{df}
8	3.06 ± 0.08 ^g
9	3.11 ± 0.12 ^{df}
10	3.05 ± 0.17 ^g
11	2.95 ± 0.17 ^{gh}
12	2.94 ± 0.08 ^{gh}
13	2.84 ± 0.17 ⁱ
14	2.80 ± 0.10 ^{ji}
15	2.69 ± 0.10 ^k
16	2.68 ± 0.08 ^k
17	2.60 ± 0.07 ^{kl}
18	2.61 ± 0.14 ^{kl}
19	2.56 ± 0.08 ^l
20	2.39 ± 0.17 ^m

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสเทนเลส สตีลสู่ชิ้นเนื้อโบลินาสไลซ์ จำนวน 20 ชิ้น
 **ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ใน สดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)

ตารางที่ 8 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากใบมีดสแตนเลสที่ล้างด้วยน้ำไฮโปคลอไรต์ จากใบมีดสแตนเลสที่ล้างด้วยน้ำไฮโปคลอไรต์ ปนเปื้อนบนพื้นผิว ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับต่ำ 3 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส

จำนวนชิ้นเนื้อสไลซ์ (ชิ้น)	จำนวนเซลล์ที่มีการถ่ายโอนสู่เนื้อไฮโปคลอไรต์ * (log CFU/g)
1	1.68 ± 0.03 ^{a**}
2	1.63 ± 0.04 ^b
3	1.61 ± 0.04 ^b
4	1.58 ± 0.05 ^{bc}
5	1.55 ± 0.07 ^{bcd}
6	1.50 ± 0.03 ^{cd}
7	1.44 ± 0.01 ^f
8	1.36 ± 0.04 ^{gh}
9	1.31 ± 0.02 ^{gh}
10	1.19 ± 0.07 ⁱ
11	1.09 ± 0.04 ^{ij}
12	0.00 ± 0.00 ^k
13	0.00 ± 0.00 ^k
14	0.00 ± 0.00 ^k
15	0.00 ± 0.00 ^k
16	0.00 ± 0.00 ^k
14	0.00 ± 0.00 ^k
18	0.00 ± 0.00 ^k
19	0.00 ± 0.00 ^k
20	0.00 ± 0.00 ^k

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากใบมีดสแตนเลสที่ล้างด้วยน้ำไฮโปคลอไรต์ จำนวน 20 ชิ้น

**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสมมติฐานเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)

ตารางที่ 9 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสเทนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโบลินาสไลซ์ จากไบโอดีสเทนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

จำนวนชิ้นเนื้อโบลินาสไลซ์ (ชิ้น)	จำนวนเซลล์ที่มีการถ่ายโอนสู่เนื้อโบลินาสไลซ์ * (log CFU/g)
1	4.15 ± 0.08 ^{a**}
2	3.25 ± 0.27 ^b
3	3.20 ± 0.04 ^{bc}
4	3.19 ± 0.07 ^{bc}
5	3.18 ± 0.08 ^{bc}
6	3.14 ± 0.05 ^c
7	3.10 ± 0.06 ^{cd}
8	3.06 ± 0.08 ^e
9	3.11 ± 0.12 ^{cd}
10	3.05 ± 0.17 ^e
11	2.95 ± 0.20 ^{ef}
12	2.94 ± 0.08 ^{ef}
13	2.84 ± 0.17 ^{fgh}
14	2.80 ± 0.10 ^{fgh}
15	2.69 ± 0.16 ^{gh}
16	2.68 ± 0.08 ^{gh}
14	2.60 ± 0.07 ^{hi}
18	2.61 ± 0.14 ^{hi}
19	2.56 ± 0.08 ^{ji}
20	2.52 ± 0.29 ^{ji}

หมายเหตุ **จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสเทนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโบลินาสไลซ์ จำนวน 20 ชิ้น

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

ตารางที่ 10 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสแตนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโพลีเอทิลีน จากไบโอดีสแตนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนแป้นบนพื้นผิว ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 3 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

จำนวนชิ้นเนื้อโพลีเอทิลีน (ชิ้น)	จำนวนเซลล์ที่มีการถ่ายโอนสู่เนื้อโพลีเอทิลีน * (log CFU/g)
1	3.22 ± 0.03 ^{a**}
2	3.20 ± 0.04 ^a
3	3.17 ± 0.05 ^b
4	3.15 ± 0.06 ^{bc}
5	3.12 ± 0.07 ^{bc}
6	3.06 ± 0.09 ^d
7	2.95 ± 0.02 ^e
8	2.88 ± 0.07 ^f
9	2.77 ± 0.08 ^g
10	2.65 ± 0.14 ^h
11	2.45 ± 0.31 ^h
12	2.06 ± 0.02 ^j
13	2.04 ± 0.04 ^{jk}
14	2.01 ± 0.06 ^{kl}
15	1.95 ± 0.08 ^{kl}
16	1.96 ± 0.10 ^{kl}
14	1.89 ± 0.11 ^{mno}
18	1.90 ± 0.76 ^m
19	1.85 ± 0.11 ^{no}
20	1.83 ± 0.12 ^{no}

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* ที่มีการถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสแตนเลสสตีลสู่ชิ้นเนื้อโพลีเอทิลีน จำนวน 20 ชิ้น
**ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสมมุติเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)

ตารางที่ ง11 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

NaOCl (ppm)	จำนวนเซลล์ *(log CFU/cm ²) และเวลา (นาที)						
	O _A	O _B	1	5	10	20	30
100	4.92 ± 0.10 ^{**Ba}	4.80 ± 0.09 ^{Bb}	4.71 ± 0.06 ^{Bc}	4.42 ± 0.08 ^{Bd}	4.34 ± 0.04 ^{Ad}	4.17 ± 0.07 ^{Ae}	4.00 ± 0.08 ^{Af}
200	5.02 ± 0.02 ^{Aa}	4.89 ± 0.11 ^{Ab}	4.70 ± 0.04 ^{Bb}	4.51 ± 0.19 ^{Ac}	4.33 ± 0.05 ^{Ad}	4.08 ± 0.12 ^{Be}	3.95 ± 0.04 ^{Bf}
400	4.95 ± 0.11 ^{Ba}	4.37 ± 0.27 ^{Cb}	4.17 ± 0.09 ^{Ac}	4.06 ± 0.08 ^{Cd}	3.95 ± 0.06 ^{Bde}	3.87 ± 0.07 ^{Cf}	3.70 ± 0.12 ^{Cg}

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที A, B, C,... หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)
 **ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)

ตารางที่ ง12 ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

NaOCl (ppm)	ร้อยละการลดลงของเซลล์* (% log Reduction) และเวลา (นาที)						
	O _A	O _B	1	5	10	20	30
100	0	2.44	4.27	10.16	11.79	15.24	18.70
200	0	2.59	6.37	10.16	13.75	18.73	21.31
400	0	11.72	15.76	17.98	20.20	21.82	25.25

หมายเหตุ *ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

ตารางที่ ง13 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบที่รอดชีวิตหลังสัมผัสผัดกรดเปอริวออกซีแอซีติกที่ความเข้มข้นต่างๆ

POA (ppm)	จำนวนเซลล์ *(log CFU/cm ²) และเวลา (นาที)						
	O _A	O _B	1	5	10	20	30
25	4.90 ± 0.12 ^{**Aa}	4.82 ± 0.13 ^{Ab}	3.75 ± 0.18 ^{Ac}	3.66 ± 0.19 ^{Ad}	3.22 ± 0.39 ^{Ae}	2.97 ± 0.52 ^{Af}	2.86 ± 0.45 ^{Ag}
50	4.91 ± 0.10 ^{Aa}	4.59 ± 0.08 ^{Bb}	3.44 ± 0.12 ^{Bc}	3.22 ± 0.10 ^{Bd}	2.99 ± 0.12 ^{Bd}	2.72 ± 0.22 ^{Be}	0.00 ± 0.00 ^B
100	5.04 ± 0.03 ^{Aa}	3.60 ± 0.07 ^{Cb}	2.77 ± 0.10 ^{Ccd}	2.72 ± 0.08 ^{Ccd}	2.66 ± 0.06 ^{Ce}	2.33 ± 0.03 ^{Cf}	0.00 ± 0.00 ^C

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสผัดกรดเปอริวออกซีแอซีติกความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที A, B, C,... หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05) **ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c,...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)

ตารางที่ ง14 ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนแผ่นทดสอบที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอสติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

POA (ppm)	ร้อยละการลดลงของเซลล์ *(% log Reduction) และเวลา (นาที)						
	O _A	O _B	1	5	10	20	30
25	0	1.63	23.47	25.31	34.29	39.39	41.63
50	0	6.52	29.94	34.42	39.10	44.60	100
100	0	28.57	45.04	46.03	47.22	53.77	100

หมายเหตุ *ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์บนพื้นผิวทดสอบหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอสติก ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อมันที่

ตารางที่ 15 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวโพลีเมทิลสไตรีนแลคติกที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

NaOCl (ppm)	จำนวนเซลล์ *(log CFU/cm ²) และเวลา (นาที)						
	O _A	O _B	1	5	10	20	30
100	4.46 ± 0.05 ^{**Ba}	4.17 ± 0.04 ^{Ab}	4.11 ± 0.03 ^{Ac}	4.08 ± 0.02 ^{Ac^d}	3.78 ± 0.06 ^{Ae}	3.62 ± 0.02 ^{Af}	2.97 ± 0.05 ^{Ag}
200	4.66 ± 0.60 ^{Aa}	4.09 ± 0.03 ^{Bb}	3.88 ± 0.08 ^{Bc}	3.59 ± 0.08 ^{Bd}	2.99 ± 0.04 ^{Be}	2.69 ± 0.06 ^{Bf}	2.47 ± 0.10 ^{Bg}
400	4.66 ± 0.04 ^{Aa}	3.88 ± 0.07 ^{Cb}	3.56 ± 0.10 ^{Cc}	2.97 ± 0.04 ^{Cd}	2.66 ± 0.04 ^{Ce}	2.32 ± 0.16 ^{Cf}	0.00 ± 0.00 ^C

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวโพลีเมทิลสไตรีนแลคติกหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm สำหรับโพลีฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสูมตัวอย่างเชื้อทันที A, B, C,... หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) **ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c,...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง16 ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีลที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

NaOCl (ppm)	ร้อยละการลดลงของเซลล์ *(% log Reduction) และเวลา (นาที)						
	O _A	O _B	1	5	10	20	30
100	0	6.5	7.85	8.52	15.25	18.83	33.41
200	0	12.23	16.74	22.96	35.84	42.27	50.00
400	0	16.74	23.61	36.27	42.92	50.21	100

หมายเหตุ *ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์บนพื้นผิวไบโอดีสแตนเลสสตีลหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

ตารางที่ 17 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวโพลีเมทิลสไตรีนเลสที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ

POA (ppm)	จำนวนเซลล์ *(log CFU/cm ²) และเวลา (นาที)						
	O _A	O _B	1	5	10	20	30
25	4.71 ± 0.26 ^{Ba}	4.41 ± 0.12 ^{Ab}	4.20 ± 0.06 ^{Ac}	4.17 ± 0.03 ^{Ac}	4.09 ± 0.44 ^{Ad}	3.46 ± 0.34 ^{Ae}	2.98 ± 0.14 ^{Af}
50	4.74 ± 0.30 ^{Ba}	4.21 ± 0.03 ^{Bb}	4.17 ± 0.05 ^{Bb}	3.98 ± 0.04 ^{Bc}	3.49 ± 0.05 ^{Bd}	2.98 ± 0.04 ^{Be}	2.49 ± 0.14 ^{Bf}
100	4.77 ± 0.03 ^{Aa}	4.17 ± 0.05 ^{Bb}	3.99 ± 0.10 ^{Cc}	3.67 ± 0.11 ^{Cd}	3.00 ± 0.05 ^{Be}	2.33 ± 0.11 ^{Cd}	0.00 ± 0.00 ^{Ce}

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์บนพื้นผิวบนพื้นผิวโพลีเมทิลสไตรีนเลสที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอซิติกที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ppm สำหรับโพลีฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสูมตัวอย่างเชื้อทันที A, B, C, ... หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05) **ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน n=3 ตัวอักษร (a,b,c...) หมายถึงค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)

ตารางที่ 18 ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm บนพื้นผิวไบโอดีสเทนเลสสตีลที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอสติกที่ความเข้มข้นต่างๆ

POA (ppm)	ร้อยละการลดลงของเซลล์ *(% log Reduction) และเวลา (นาที)						
	O _A	O _B	1	5	10	20	30
25	0	6.37	10.83	11.46	13.16	26.54	36.73
50	0	10.62	11.46	15.50	25.90	36.73	47.13
100	0	12.58	16.35	23.06	36.97	50.94	100

หมายเหตุ *ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์บนพื้นผิวไบโอดีสเทนเลสสตีลหลังสัมผัสกรดเปอร์ออกซีแอสติก ความเข้มข้น 100 200 และ 400 ppm สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง 8 log CFU/mL ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

ตารางที่ ง19 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น(ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต*(log CFU/mL)		
		สารละลายเกลือ	TSB	soiling agent
100	O _A	8.25 ± 0.06 ^{Ac}	8.33 ± 0.14 ^{Aa}	8.26 ± 0.24 ^{Ab}
	O _B	5.24 ± 0.06 ^{Ac}	7.84 ± 0.13 ^{Ba}	7.68 ± 0.12 ^{Bb}
	1	0.00 ± 0.00 ^c	7.79 ± 0.11 ^{Ca}	7.62 ± 0.09 ^{BCb}
	5	0.00 ± 0.00 ^c	7.62 ± 0.14 ^{CDa}	7.52 ± 0.05 ^{Cb}
	10	0.00 ± 0.00 ^c	7.51 ± 0.13 ^{Ea}	7.27 ± 0.06 ^{Db}
	20	0.00 ± 0.00 ^c	7.43 ± 0.13 ^{EFa}	7.19 ± 0.09 ^{DEb}
	30	0.00 ± 0.00 ^c	7.31 ± 0.09 ^{EFa}	7.14 ± 0.10 ^{DEb}
200	O _A	ND	8.36 ± 0.14 ^{Aa}	8.30 ± 0.08 ^{Ab}
	O _B	ND	7.87 ± 0.12 ^{Ba}	7.61 ± 0.12 ^{Bb}
	1	ND	7.78 ± 0.10 ^{BCa}	7.47 ± 0.13 ^{Cb}
	5	ND	7.65 ± 0.13 ^{BCa}	7.37 ± 0.19 ^{CDb}
	10	ND	7.60 ± 0.12 ^{BCa}	7.28 ± 0.07 ^{CDb}
	20	ND	7.44 ± 0.14 ^{Da}	7.18 ± 0.13 ^{Eb}
	30	ND	7.32 ± 0.02 ^{Ea}	7.09 ± 0.14 ^{Fb}
400	O _A	ND	8.61 ± 0.17 ^{Aa}	8.30 ± 0.06 ^{Ab}
	O _B	ND	8.65 ± 0.10 ^{Aa}	7.53 ± 0.10 ^{Bb}
	1	ND	7.66 ± 0.11 ^{Ba}	7.42 ± 0.11 ^{Cb}
	5	ND	7.51 ± 0.11 ^{BCa}	7.34 ± 0.07 ^{CDb}
	10	ND	7.43 ± 0.14 ^{BCa}	7.19 ± 0.06 ^{Eb}
	20	ND	7.35 ± 0.11 ^{BCa}	7.08 ± 0.06 ^{Fb}
	30	ND	7.29 ± 0.10 ^{Da}	6.84 ± 0.16 ^{Gb}

หมายเหตุ จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อ แล้วทำการผสมตัวอย่างเชื้อทันที ND คือ not determined (ไม่ได้ทำการทดลอง)

ตารางที่ 20 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์* (% log Reduction)		
		สารละลายเกลือ	TSB	soiling agent
100	O _A	0.00	0.00	0.00
	O _B	36.48	5.08	7.80
	1	0.00	5.69	8.52
	5	0.00	7.75	9.72
	10	0.00	9.08	12.41
	20	0.00	10.05	13.37
	30	0.00	11.50	13.98
200	O _A	ND	0	0
	O _B	ND	5.86	8.31
	1	ND	6.94	10.00
	5	ND	8.49	11.20
	10	ND	9.09	12.61
	20	ND	11.00	13.81
	30	ND	12.44	14.89
400	O _A	ND	0	0
	O _B	ND	8.83	9.28
	1	ND	11.03	10.60
	5	ND	12.78	11.57
	10	ND	13.70	13.37
	20	ND	14.63	14.70
	30	ND	15.33	17.59

หมายเหตุ ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ *P. fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสารละลายไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิใน สารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที ND คือ not determined (ไม่ได้ทำการทดลอง)

ตารางที่ ง21 จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต*(log CFU/mL)		
		สารละลายเกลือ	TSB	soiling agent
25	O _A	8.41 ± 0.12 ^{Aa}	8.42 ± 0.04 ^{Aa}	8.41 ± 0.17 ^{Aa}
	O _B	7.52 ± 0.17 ^{Ba}	7.39 ± 0.14 ^{Bc}	7.44 ± 0.19 ^{Bb}
	1	4.47 ± 0.24 ^{Cc}	5.07 ± 0.56 ^{Ca}	4.84 ± 0.07 ^{Cb}
	5	3.59 ± 0.35 ^{Dc}	4.31 ± 0.62 ^{Da}	3.72 ± 0.36 ^{Db}
	10	3.46 ± 0.29 ^{DEb}	4.05 ± 0.46 ^{Ea}	3.18 ± 0.57 ^{Ec}
	20	3.19 ± 0.38 ^{Fb}	3.61 ± 0.17 ^{Fa}	0.00 ± 0.00 ^{Fc}
	30	2.94 ± 0.09 ^{Ga}	0.00 ± 0.00 ^{Gb}	0.00 ± 0.00 ^{Fc}
50	O _A	8.45 ± 0.10 ^{Ab}	8.50 ± 0.17 ^{Ab}	8.59 ± 0.12 ^{Aa}
	O _B	4.31 ± 0.21 ^{Bc}	6.04 ± 0.11 ^{Bb}	6.21 ± 0.10 ^{Ba}
	1	3.82 ± 0.12 ^{Ca}	3.72 ± 0.06 ^{Cb}	3.76 ± 0.07 ^{Cb}
	5	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^D
	10	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^D
	20	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^D
	30	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^D
100	O _A	8.45 ± 0.10 ^{Aa}	8.47 ± 0.11 ^{Aa}	8.46 ± 0.17 ^{Aa}
	O _B	4.03 ± 0.09 ^{Bc}	6.11 ± 0.09 ^{Ba}	4.10 ± 0.06 ^{Bb}
	1	0.00 ± 0.00 ^C	2.77 ± 0.05 ^C	0.00 ± 0.00 ^C
	5	0.00 ± 0.00 ^C	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^C
	10	0.00 ± 0.00 ^C	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^C
	20	0.00 ± 0.00 ^C	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^C
	30	0.00 ± 0.00 ^C	0.00 ± 0.00 ^D	0.00 ± 0.00 ^C

หมายเหตุ *จำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสกรดเปอร์รอกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ในสารฆ่าเชื้อแล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

ตารางที่ ง22 ร้อยละของการลดลงของจำนวนเซลล์ของ *P. fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสักรดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (นาที)	ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์* (% log Reduction)		
		สารละลายเกลือ	TSB	soiling agent
25	O _A	0	0	0
	O _B	10.58	12.23	11.53
	1	46.85	39.79	42.45
	5	57.31	48.81	55.77
	10	58.86	51.90	62.19
	20	62.07	57.13	100
	30	65.04	100	100
50	O _A	0	0	0
	O _B	48.99	28.69	48.99
	1	54.79	56.08	54.79
	5	100	100	100
	10	100	100	100
	20	100	100	100
	30	100	100	100
100	O _A	0	0	0
	O _B	52.31	28.12	52.31
	1	100	67.41	100
	5	100	100	100
	10	100	100	100
	20	100	100	100
	30	100	100	100

หมายเหตุ *ร้อยละการลดลงของจำนวนเซลล์ *P. fluorescens* (planktonic cell) ที่รอดชีวิตบนอาหาร TSA หลังสัมผัสสักรดเปอรร์อกซีแอซีติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียส โดย O_A คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น O_B คือ ปริมาณเชื้อเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ใน สารฆ่าเชื้อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อทันที

ภาคผนวก จ

การคำนวณการถ่ายโอนเซลล์ของ *P. fluorescens* จากไบโอดีสเทนเลสสตีลสู่ผลิตภัณฑ์

$$\text{การถ่ายโอนเซลล์ (\% Transfer)} = \frac{\text{ปริมาณเซลล์ผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย}}{\text{ปริมาณเซลล์ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวไบโอดีสเทนเลสสตีล}} \times 100$$

การถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสเทนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $4.62 \pm 0.48 \log \text{CFU/cm}^2$)

$$\text{การถ่ายโอนเซลล์ (\% Transfer)} = \frac{2.39}{(4.62 \pm 4.42)} \times 100 = 26.43 \%$$

การถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสเทนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.79 \pm 0.16 \log \text{CFU/cm}^2$)

$$\text{การถ่ายโอนเซลล์ (\% Transfer)} = \frac{1.09}{(1.79 \pm 1.81)} \times 100 = 30.27 \%$$

การถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสเทนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $4.55 \pm 0.23 \log \text{CFU/cm}^2$)

$$\text{การถ่ายโอนเซลล์ (\% Transfer)} = \frac{2.52}{(4.55 \pm 4.58)} \times 100 = 27.60 \%$$

การถ่ายโอนของเซลล์จากไบโอดีสเทนเลสสตีลที่มีเซลล์ *P. fluorescens* Biofilm ปนเปื้อนบนพื้นผิว (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $3.39 \pm 0.45 \log \text{CFU/cm}^2$)

$$\text{การถ่ายโอนเซลล์ (\% Transfer)} = \frac{1.83}{(3.39 \pm 3.20)} \times 100 = 27.76 \%$$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปาริชาติ แสงสุวรรณ เกิดเมื่อวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการอาหาร จากมหาวิทยาลัยรังสิต เมื่อปีการศึกษา 2549 จากนั้นเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550

รายการสิ่งตีพิมพ์และเผยแพร่

ปาริชาติ แสงสุวรรณ, รมณี สงวนดีกุล, สุเมธ ตันตระเธียร. 2553. ปัจจัยการเกิดไบโอฟิล์มของชูโดโมแนสบนเหล็กกล้าไร้สนิม. ในการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 3 ณ ศูนย์ประชุมสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพฯ วันที่ 24-26 พฤศจิกายน 2553.