ผลของแคลเซียมไฮโปคลอไรท์, โซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไนตริก ต่อการฆ่าเชื้อ *Enterobacter sakazakii* ที่พบในกระบวนการรับน้ำนม ของศูนย์รับน้ำนมดิบ

EFFECT OF CALCIUM HYPOCHLORITE, SODIUM HYDROXIDE AND NITRIC ACID AS SANITIZERS ON *Enterobacter sakazakii* FOUND IN MILK COLLECTING CENTRES

กรรณิกา คุณสมบัติ

KANNIKA KUNSOMBUT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AI-M-054-060

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ , โซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไนตริก ต่อการฆ่าเชื้อ *Enterobacter sakazakii* ที่พบในกระบวนการรับน้ำนม ของศูนย์รับน้ำนมดิบ

EFFECT OF CALCIUM HYPOCHLORITE , SODIUM HYDROXIDE AND NITRIC ACID AS SANITIZERS ON *Enterobacter sakazakii* FOUND IN MILK COLLECTING CENTRES

T105476

กรรณิกา คุณสมบัติ

KANNIKA KUNSOMBUT

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....105476
วัน,เดือน,ปี.....24 พ.ย. 2552

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AI-M-054-060

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF CALCIUM HYPOCHLORITE , SODIUM HYDROXIDE AND NITRIC ACID AS SANITIZERS ON *Enterobacter sakazakii* FOUND IN MILK COLLECTING CENTRES

KANNIKA KUNSOMBUT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2009

KMITL-2009-AI-M-054-060

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2009

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของแคลเซียมไฮโปคลอไรท์, โซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไนตริกต่อการฆ่าเชื้อ *Enterobacter sakazakii* ที่พบในกระบวนการรับน้ำนมของศูนย์รับน้ำนมดิบ

Effect of Calcium Hypochlorite, Sodium Hydroxide and Nitric Acid as Sanitizers on *Enterobacter sakazakii* found in Milk Collecting Centres

ชื่อนักศึกษา นางสาวกรรณิกา คุณสมบัติ

รหัสประจำตัว 48068771

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
ดร.ระจิตร สุวพานิช	
นายปรีชา จึงสมานกุล	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 19 ตุลาคม 2552 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รศ.ยาวลักษณ์ สุรพันธพิบูฐ์)

รักษาการแทนคณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 27 **เดือน** ตุลาคม **พ.ศ.** 2552

สำนักทะเบียนและประมวลผล สจล.
วันที่ส่งเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์
วันที่ 30 เดือน ต.ค. พ.ศ. 52
ลงชื่อ.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของแคลเซียมไฮโปคลอไรท์, โซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไนตริก ต่อการฆ่าเชื้อ *Enterobacter sakazakii* ที่พบในกระบวนการรับน้ำนมของศูนย์รับน้ำนมดิบ
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกรรณิกา คุณสมบัติ
รหัสประจำตัว	48068771
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาในกระบวนการรับน้ำนมของศูนย์รับนมแห่งหนึ่งในภาคกลาง เพื่อสำรวจปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม รวมถึงการปนเปื้อนของเชื้อ *Enterobacter sakazakii* พบว่าตัวอย่างน้ำนมดิบทุกตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มสูงเกินกว่าที่มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกำหนด แต่ตรวจไม่พบเชื้อ *E. sakazakii* และเมื่อศึกษาปริมาณการปนเปื้อนทางจุลชีววิทยาของเชื้อทั้งสามกลุ่มหลังการส่งน้ำนมดิบเข้าสู่รถบรรทุกน้ำนม โดยใช้วิธี swab อุปกรณ์ในจุดต่าง ๆ ก่อนทำความสะอาด พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด อยู่ในช่วง $1.5 \times 10^3 - 3.3 \times 10^5$ cfu/100 cm^2 และมีเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มอยู่ในช่วง $7 - 3.5 \times 10^3$ cfu/ 100 cm^2 โดยจุดที่พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดคือ ข้อต่อท่อน้ำนม และพื้นที่บริเวณคนเทนมอ่างรับนม ซึ่งพื้นที่บริเวณคนเทนมอ่างรับนมจะมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่สูงสุดด้วย การล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ในการรับนมของศูนย์ทั้งการทำความสะอาดภายนอกระบบ (Cleaning Out Place : COP) และการทำความสะอาดภายในระบบ (Cleaning In Place : CIP) สามารถลดปริมาณเชื้อทั้งสองกลุ่มได้ดี ยกเว้นบริเวณคนเทนมอ่างรับนม สำหรับการตรวจหาเชื้อ *E. sakazakii* พบว่าไส้กรองสแตนเลส แผงควบคุมทิศทางการไหลนม สายยางส่งนมด้านต่อรถบรรทุกน้ำนม ท่อรับน้ำนมของรถพบเชื้อ *E. sakazakii* 33.33% และพบเชื้อดังกล่าวในพื้นที่บริเวณคนเทนม สูงถึง 66.66% แต่ผลของตัวอย่าง swab หลังการทำความสะอาดอุปกรณ์ภายนอกระบบและการทำความสะอาดภายในระบบ พบว่าการทำความสะอาดอุปกรณ์ทั้งภายนอกและภายในระบบการรับน้ำนมดิบของศูนย์ส่วนมากสามารถลดจำนวนเชื้อ *E. sakazakii* ได้ทั้งหมด ยกเว้นบริเวณคนเทนมยังพบการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าว 33.33% เนื่องจากการทำความสะอาดเป็นเพียงการล้างด้วยน้ำ ดังนั้น การทำความสะอาดบริเวณดังกล่าวจึงควรมีการปรับปรุงโดยเพิ่มสารชะล้างให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปนเปื้อนของ *E. sakazakii* ในขั้นตอนการรับส่งน้ำนมดิบของศูนย์รับนมดิบ เมื่อศึกษาความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไนตริก ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ใน Tryptic Soy Broth (TSB) สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีที่สุด โดยสามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ได้ทั้งหมด ที่เวลาเพียง 1 นาทีเช่นเดียวกับกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 0.07 % ขึ้นไป สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ได้ทั้งหมดหลังจากใช้เวลา 1 นาที แต่ในความเข้มข้น 0.04, 0.05 และ 0.06 % ต้องใช้เวลา 5 นาที สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 2 % สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 2 log cfu/ml ได้โดยสามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ทั้งหมด ที่เวลา 1 นาที สามารถฆ่าเชื้อที่ระดับ 4 log cfu/ml ได้ทั้งหมด ที่เวลา 10 นาที และสามารถลดเชื้อที่ระดับ 6 log cfu/ml ได้ 5.37 log cfu/ml ที่เวลา 20 นาที เมื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไปโดยการศึกษาความเข้มข้นของสารดังกล่าว ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีนมอยู่ 1 % ที่ระดับ 6 log cfu/ml ใน TSB ซึ่งพบว่าสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนความเข้มข้น 100 ppm สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองได้ทั้งหมด ที่เวลา 1 นาที ความเข้มข้น 50 ppm สามารถฆ่าเชื้อดังกล่าวที่ระดับ 6 log cfu/ml ได้ทั้งหมดที่เวลา 15 นาที ส่วนสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 % สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ระดับ 6 log cfu/ml ที่ผสมกับน้ำนม 1 % ได้ลดลงเหลือ 1.42 log cfu/ml ที่เวลา 20 นาที และกรดไนตริก ที่ความเข้มข้น 0.06, 0.08 และ 0.1 % ต้องใช้เวลา 5 นาที จึงสามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองที่ระดับ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 % ได้ทั้งหมด จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรด ไนตริก จะลดน้อยลงเมื่อเศษน้ำนมตกค้างอยู่ แต่อย่างไรก็ตามสารทั้งหมดที่ใช้ในการทำความสะอาด CIP และ COP ภายในศูนย์รับนม ที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีกว่าในระดับที่มีความเข้มข้นต่ำและเวลาสัมผัสพื้นผิวในการฆ่าเชื้อนาน สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีกว่าการให้เวลาสัมผัสพื้นผิวในการฆ่าเชื้อสั้น ดังนั้นการล้างด้วยวิธี CIP ของศูนย์รับน้ำนมดิบซึ่งใช้สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 % นาน 20 นาที ตามด้วยการล้างกรดไนตริก ที่ความเข้มข้น 1 % นาน 20 นาที สามารถยืนยันประสิทธิภาพการทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ที่อาจติดมากับน้ำนมในระหว่างการรับน้ำนมดิบของศูนย์รับน้ำนมดิบนี้ได้อย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	EFFECT OF CALCIUM HYPOCLORITE , SODIUM HYDROXIDE AND NITRIC ACID AS SANITIZERS ON *Enterobacter sakazakii* FOUND IN MILK COLLECTING CENTRES
Student	Miss Kannika Kunsombut
Student ID.	48068771
Degree	Master of Science
Program	Food Sanitation
Year	2009
Thesis Advisor	Assist. Prof.Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

Microbiological quality of raw milk and raw milk contact appliances in various points of one milk collecting centres located in the central region of Thailand was determined for total bacterial count (TBC), coliforms count and *Enterobacter sakazakii* detection. It was revealed that total bacterial count and coliforms count from all drawn raw milk samples were found over the standard limit appointed by Natural Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards (ACFS), while *E. sakazakii* from all samples was not detected. Determination of TBC, coliforms count and *E. sakazakii* detection in all studied points of this milk collecting plant by using swab technique after finishing the milk receiving process and after finishing the cleaning process informed that, after finishing the milk receiving process, TBC was available from $1.5 \times 10^3 - 3.3 \times 10^5$ cfu/100 cm^2 and coliforms were $7 - 3.5 \times 10^3$ cfu/ 100 cm^2. The highest number of TBC was belonged to the bends of raw milk pipe and the tile of raw milk receiving area, while the highest coliforms count was belonged to the tile of raw milk receiving area. The cleaning process of all raw milk contact appliances of both Cleaning Out Place (COP) and Cleaning In Place (CIP) could effectively reduce the number of TBC and coliforms count, except the tile of raw milk receiving area. Determination of *E. sakazakii* detection by swab technique of various contact surfaces revealed that stainless filter, bypass control panel, hose for tanker and tanker inlet/outlet of raw milk transportation truck were the point of *E. sakazakii* reservoir (33.33%) of contamination, while the tile of raw milk receiving area was the point which showed highest reservoir of *E. sakazakii* (66.66%). The results from swab technique after cleaning process showed the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

effectiveness of the cleaning system for of *E. sakazakii* elimination from all milk contact appliances, except the tile of raw milk receiving area (33.33% of *E.* sakazakii positive results) which is normally cleaning without using sanitizer. Thus, the cleaning process of this tile of raw milk receiving area should be improved and validated. The effect of various concentrations of $CaOCl_2$, NaOH and HNO_3 was studied on 6 log cfu/ml of *E. sakazakii* in Tryptic Soy Broth (TSB). The results revealed that $CaOCl_2$ at 50 and 100 ppm could eliminate the whole number of *E.* sakazakii within 1 min of contacting time. The same results were shown when HNO_3 at the concentration of 0.07% or higher were use, to eliminate the same amount of *E. sakazakii* .But when the lower concentration of HNO_3 (0.04,0.05 and 0.06 %) were used, the longer time was consumed for 6 log cfu/ml of *E. sakazakii* elimination in TSB within 5 min. Using NaOH at 2% could eliminate 2 log cfu/ml of *E. sakazakii* in TSB within 5 min of contacting time , while this same concentration of NaOH could eliminate 4 log cfu/ml of *E. sakazakii* in TSB within 10 min and reduce 5.37 log cfu/ml from 6 log cfu/ml of *E. sakazakii* within 20 min respectively. The effect of using these sanitizing agents was further studied on 6 log cfu/ml *E. sakazakii* with 1% of milk in TSB. The results revealed that $CaOCl_2$ at 100 ppm could still eliminate the whole number of *E. sakazakii* within 1 min, while $CaOCl_2$ at 50 ppm could reduce 6 log cfu/ml of *E. sakazakii* in this same broth in a longer time (15 min of contacting time) when compared to TSB without 1% milk. These same slower reduction of 6 log cfu/ml of *E. sakazakii* results were exhibited in TSB + 1% milk applied with various concentration of NaOH and HNO_3 . It was found that 2% of NaOH could only reduce 1.42 log cfu/ml of *E. sakazakii* in TSB + 1% milk within 20 min, while 0.06, 0.08 and 0.1 % of HNO_3 could totally eliminate the same amount of *E. sakazakii* in TSB + 1% milk within 5 min of contacting time. These results implied that effect of all studied sanitizers was reduced when there was available of milk residue. It is, however, confirmed that the higher concentration of all sanitizers and longer contacting time could better reduce the amount of *E. sakazakii* than the lower concentration. Thus, using 1 % NaOH and 1% HNO_3 for 20 min in CIP system were verified to eliminate the high amout of *E. sakazakii* contamination for this raw milk receiving centres.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เนื่องจาก รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ได้กรุณาเป็นอย่างสูงในการให้ความรู้ คำแนะนำที่มีประโยชน์และคุณค่าเสมอมา ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ ดร.ระจิตร สุวพานิช และอาจารย์ปรีชา จึงสมานกุล ที่กรุณาให้ความรู้และให้การแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ สัตวแพทย์หญิงอรรถยา เกียรติสุนทร ผู้เชี่ยวชาญระดับชำนาญการ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่เป็นผู้เปิดโอกาสให้เข้าศึกษาในช่วงของการทำงาน รวมถึงได้กรุณาเป็นอย่างสูงในการให้ความรู้ คำแนะนำที่มีประโยชน์และคุณค่าเสมอมา ตลอดจนสนับสนุนทรัพยากรต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเพื่อนๆ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และเพื่อนๆปริญญาโท ที่ให้ความช่วยเหลือในงานวิจัยตลอดจนเป็นกำลังใจให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อประสาน คุณแม่บุญแนบ คุณสมบัติ คุณลุง Willy Beider-Nielsen และคุณป้ายุพา ปิ่นคล้าย ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญในการศึกษาครั้งนี้ รวมถึงญาติ พี่น้อง ที่คอยห่วงใยและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กรรณิกา คุณสมบัติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญภาพ.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 ลักษณะและการปนเปื้อนเชื้อ *Enterobacter sakazakii*.....3

2.2 การตรวจสอบคุณภาพของน้ำนม.....5

2.3 ศูนย์รวมน้ำนม.....7

2.4 การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ.....11

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง.....25

3. 1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์.....25

3.2 สถานที่ทำการทดลอง.....26

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง.....26

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....32

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

เอกสารอ้างอิง.....50

ภาคผนวก ก การตรวจวิเคราะห์เชื้อ..... 54

1. *Enterobacter sakazakii*
2. Standard plate count method
3. Coliform group enumeration

ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง.....63

ประวัติผู้เขียน.....69

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญใช้แยก *Enterobacter* speciese.....4

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้สารฆ่าเชื้อ.....14

2.3 ค่าคงที่ของกรดไฮโปคลอรัสที่อุณหภูมิต่างๆ.....16

2.4 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การแตกตัวของกรดไฮโปคลอรัส.....17

2.5 ปริมาณก๊าซคลอรีนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ.....19

3.1 แสดงกระบวนการรับน้ำนมและจุดเก็บตัวอย่าง.....27

4.1 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และเชื้อ *E. sakazakii* ในตัวอย่างน้ำนมดิบของกระบวนการรับน้ำนม จากการตรวจสอบ 3 ครั้ง.....32

4.2 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และเชื้อ *E. sakazakii* ในตัวอย่าง swab อุปกรณ์ของกระบวนการรับน้ำนม จากการตรวจสอบ 3 ครั้ง.....33

4.3 ผลของความเข้มข้นกรดไนตริก ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml เวลา 1 นาที.....39

4.4 ผลของความเข้มข้นสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml เวลา 1 นาที.....41

ก 1 ตารางการอ่านผลชุดทดสอบ API 20E.....58

ข 1 ผลของความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml.....64

ข 2 ผลของความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 4 log cfu/ml.....64

ข 3 ผลของความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 2 log cfu/ml.....65

ข 4 ผลของความเข้มข้นของกรดไนตริกและระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml.....65

ข 5 ผลของความเข้มข้นของกรดไนตริกและระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml.....66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ข 6 ผลของความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml.....66

ข 7 ผลของความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %.....67

ข 8 ผลของความเข้มข้นของกรดไนตริกและระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %.....67

ข 9 ผลของความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %.....68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะเชื้อ *E. sakazakii* 3

2.2 กระบวนการรับน้ำนมดิบ.....10

2.3 ลักษณะของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์.....12

2.4 ปฏิกิริยาการแตกตัวของสารประกอบคลอรีน.....15

2.5 ขั้นตอนการทำความสะอาดแบบ Cleaning In Place (CIP).....22

4.1 ประสิทธิภาพของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณ 6 log cfu/ml.....35

4.2 ประสิทธิภาพของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณ 4 log cfu/ml.....36

4.3 ประสิทธิภาพของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณ 2 log cfu/ml.....37

4.4 ประสิทธิภาพของกรดไนตริกในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณ 6 log cfu/ml.....38

4.5 ประสิทธิภาพของกรดไนตริกในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณ 6 log cfu/ml.....38

4.6 ประสิทธิภาพของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณ 6 log cfu/ml.....40

4.7 ประสิทธิภาพของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml และการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %.....44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.8 ประสิทธิภาพของกรดไนตริกในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml และการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %.....45

4.9 ประสิทธิภาพของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml และการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %.....47

ก.1 แสดงปฏิกิริยาของเชื้อ *E.sakazakii* ที่เกิดขึ้นบนชุดทดสอบ API 20E.....57

ก.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar.....60

ก.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile lactose agar.....62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Enterobacter sakazakii เป็นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในนมผงสำหรับเลี้ยงทารก (Powder Infant Milk Formula) ทำให้เกิดการเจ็บป่วยร้ายแรงถึงชีวิตได้ โดยทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต ลำไส้ติดเชื้อแบบชนิดเนื้อตาย (necrotizing enterocolitis) จึงเป็นเชื้อที่องค์การอนามัยโลกให้ความสนใจ และเรียกร้องให้อุตสาหกรรมนมผงเพิ่มความเข้มงวดเรื่องความสะอาดของสิ่งแวดล้อมเพื่อลดการปนเปื้อนของ *E. sakazakii* ในระหว่างกระบวนการผลิตนมผง เชื้อ *E. sakazakii* ที่ปนเปื้อนมากับนมผงใช้เลี้ยงทารก ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อน้อยแต่หากปนเปื้อนแล้วก็สามารถทำให้เกิดการเจ็บป่วยในทารกได้ ดังนั้นผู้ผลิตจึงควรควบคุมกระบวนการผลิตนมผงให้ปลอดภัย ปราศจากเชื้อทุกขั้นตอนโดยการใช้ระบบ GMP และ HACCP ซึ่งสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อในกระบวนการผลิตให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้

ปัจจัยสำคัญอีกประการคือ การปนเปื้อนเชื้อในวัตถุดิบนม หากมีมาตรการที่ดีในการควบคุมไม่ให้เชื้อมีการปนเปื้อนตั้งแต่วัตถุดิบเริ่มต้น โดยการเอาใจใส่ในเรื่องการทำความสะอาดอุปกรณ์ต่างๆ ที่ต้องสัมผัสกับน้ำนมโดยการทำความสะอาดอย่างถูกต้อง ใช้สารเคมีอย่างเหมาะสม เมื่อมีการปนเปื้อนของเชื้อที่ภาชนะก็สามารถลดหรือฆ่าเชื้อได้หมดก่อนการสัมผัสกับน้ำนม

ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาสารเคมีที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *E. sakazakii* ของอุปกรณ์สัมผัสกับน้ำนมในศูนย์รับน้ำนม และสามารถนำข้อมูลที่ได้แนะนำให้กับแหล่งรับน้ำนม แหล่งผลิตผลิตภัณฑ์นม หรือผู้ที่เกี่ยวข้อง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *E. sakazakii* ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาแหล่งปนเปื้อนเชื้อ *E. sakazakii* ในศูนย์รับน้ำนมทั้งก่อนและหลังการทำความสะอาดอุปกรณ์ของกระบวนการรับน้ำนม

1.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารเคมีที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ และในเวลาต่างกัน

1.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารเคมีจากข้อ 1.2.2 โดยเลือกความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมที่สุดของสารแต่ละชนิด ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปนเปื้อนคราบนม 1 % เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เพื่อหาแหล่งปนเปื้อนและจุดการสะสมของเชื้อ *E. sakazakii* บนพื้นผิวอุปกรณ์ต่างๆที่ทำความสะอาดไม่ทั่วถึงและนำผลของสารเคมีที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับความเข้มข้น และเวลาที่เหมาะสม นำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทำความสะอาดเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการรับน้ำนมของสหกรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะและการปนเปื้อนเชื้อ *Enterobacter sakazakii*

2.1.1 ลักษณะของเชื้อ

Enterobacter sakazakii เป็นเชื้อที่ปนเปื้อนในนมผงสำหรับเลี้ยงทารก (Powder Infant Milk Fomula) ซึ่งโรคที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวเป็นกรณีที่เกิดน้อยมาก เชื้อ *E. sakazakii* ทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารก (neonatal meningitis) ติดเชื้อในกระแสโลหิต (bacteriamia) ลำไส้ติดเชื้อชนิดเนื้อตาย (necrotizing enterocolitis) และ necrotizing meningencephalitis หลังการดูดซึมของร่างกาย (Ingestion) โดยสามารถทำให้เกิดการเจ็บป่วยร้ายแรงถึงชีวิตได้ (ดวงทิพย์, 2548)

E. sakazakii เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รูปร่างแท่ง ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่ข้างเซลล์ (ภาพที่ 2.1) เจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สามารถใช้น้ำตาลแล็กโทสซึ่งมีอยู่ในน้ำนม และน้ำตาลซอร์บิทอลเป็นอาหาร สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะแยกเชื้อกลุ่ม enteric เช่น MacConkey eosin methylene blue ซึ่งบน plate อาหารเลี้ยงเชื้อจะพบโคโลนี 2 ลักษณะ คือ แบบเงาวาว (glossy) และ แบบไม่เงาวาว (matt) ซึ่งลักษณะโคโลนีจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อและ strain ของเชื้อ เชื้อสามารถสร้าง D-Lactic acid และ muscatel negative และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 - 47 องศาเซลเซียส (Iversen and Forssythe, 2003) โดยมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้แยกเชื้อ *E. sakazakii* ออกจาก *Enterobacter* spp. สายพันธุ์อื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ภาพที่ 2.1 ลักษณะเชื้อ *Enterobacter sakazakii*

ที่มา : http://cathead.files.wordpress.com/2008/03/esaka129.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญใช้แยก *Enterobacter* speciese

Test	Reaction				
	E. sakazakii	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. agglomerans*	*E. gergoviae*
Lysine decarboxylase	-	-	+	-	+
Aginine dihydrolase	+	+	-	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+	+	-	+
KCN,growth in	+	+	+	v	-
Fermentation of					
Sucrose	+	+	+	(+)	+
Dulcitol	-	(-)	-	(-)	-
Adonitol	-	(-)	+	-	-
D-sorbitol	-	+	+	v	-
Raffinose	+	+	+	v	+
x-methyl-D-glucoside	-	(-)	+	-	-
Yellow Pigment	+	-	-	(+)	-

Where + represents 90 100% positive; (+): 75-89% positive: v: 25-74% positive: (-): 10-24 % positive: -: 0-9 %

ที่มา : White และ Farber (1996)

2.1.2 แหล่งของเชื้อ *E. sakazakii*

การปนเปื้อนของ *E. sakazakii* มีหลากหลาย ในอาหารที่มีรายงานการตรวจพบ เช่น เนยแข็ง เนื้อวัวบด ไส้กรอก เต้าหู้ เนื้อเค็ม ส่วนแหล่งต่างๆที่เคยพบมีรายงาน เช่น อากาศในโรงพยาบาล อาคารผลิตอาหาร หูฟังของแพทย์ (stethoscope) ดิน ตะกอนดิน เป็นต้น (Iversen and Forssythe, 2003)

2.1.3 การก่ออันตรายของเชื้อ *E. sakazakii*

โดยทั่วไปไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ แต่อาจเกิดการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunist infection) ที่อันตรายร้ายแรงต่อชีวิตได้ ผู้ป่วยที่มีรายงานการติดเชื้อทุกรายเป็นผู้ที่มักมีโอกาสติดเชื้อง่าย หรือมีสภาพร่างกายไม่แข็งแรง การติดเชื้อในผู้ที่มีสุขภาพดี มีจำนวนน้อยมากและไม่พบการติดต่อของเชื้อจากคนสู่คน

ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วย ไม่มีหลักฐานที่แน่นอนทางระบาดวิทยา แต่ปริมาณเหมาะสมที่จะทำให้เกิดโรคอยู่ที่ 1,000 cells โดยประมาณ ซึ่งเป็นปริมาณทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* 0157:H7 และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น ซึ่งปริมาณเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ก่อโรคสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อมที่เชื้ออยู่ (stress response factors) สภาพร่างกายภูมิคุ้มกันของผู้ได้รับเชื้อและส่วนประกอบของอาหาร อย่างไรก็ตามข้อมูลจากรายงานต่างๆ พอจะชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อมีความเกี่ยวข้องกับนมผงที่ใช้เลี้ยงผู้ป่วย ผู้ป่วยที่มีรายงานการติดเชื้อส่วนมากเป็นผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ โดยกว่า 70 % เป็นเด็กอายุต่ำกว่า 4 สัปดาห์ รายงานการติดเชื้อในเด็กหรือผู้ใหญ่ที่แข็งแรงมีน้อยรายมาก อัตราการเสียชีวิต เดิมอยู่ที่ 50 % แต่ปัจจุบันลดลงเหลือเพียง 20-33 % การรักษาเป็นการรักษาตามอาการ โดยใช้ยาปฏิชีวนะแต่ต้องระวังการดื้อยาเนื่องจากเชื้อ *E. sakazakii* สามารถสร้าง lactamase และ cephalosporinase ได้ Iversen และ Forssythe (2003) รายงานว่าการติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดในสถานพยาบาลที่ดูแลทารกแรกคลอด ตั้งแต่รายงานการติดเชื้อฉบับแรกในปี พ.ศ. 2504 จนถึงปัจจุบัน พบว่ามีผู้ป่วยทั้งสิ้น 61 ราย เป็นเด็กแรกเกิดถึง 4 สัปดาห์ 42 รายที่เหลือพบในวัยอื่นๆ ผู้ป่วยทุกรายล้วนมีสภาวะการเจ็บป่วยรุนแรงอยู่ก่อนแล้ว อย่างไรก็ตามอาจมีผู้ป่วยจำนวนมากที่ไม่ได้รายงานหรือไม่มีการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (ดวงทิพย์, 2548)

จากรายงานของ White และ Ferber (1996) พบว่าค่า Decimal reduction time และ z-values ของเชื้อ *E. sakazakii* คือ D_{52} value 54.8 min , D_{60} value 2.5 min และ z-values 5.82 องศาเซลเซียส

2.2 การตรวจสอบคุณภาพของน้ำนม

2.2.1 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

Aerobic mesophilic plate count เป็นค่าที่แสดงคุณภาพทางสุขลักษณะของตัวอย่างน้ำนม จำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมดิบขึ้นอยู่กับสุขศาสตร์การทำความสะอาดของเครื่องรีดนม ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำนม หากพบปริมาณแบคทีเรียสูงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมแสดงว่าวัตถุดิบมีการปนเปื้อนหรือกรรมวิธีในการผลิตไม่ถูกสุขลักษณะ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมไม่เหมาะสม น้ำนมดิบคุณภาพดีควรมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ไม่มากกว่า 400,000 โคโลนี / มิลลิลิตร

2.2.2 การตรวจหาจุลินทรีย์กลุ่มโคลิฟอร์ม

โคลิฟอร์มแบ่งตามแหล่งที่มา ได้เป็น 2 ชนิด คือ Fecal Coliforms พวกนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ของคน และสัตว์เลือดอุ่น ถูกขับถ่ายออกมากับอุจจาระ เมื่อเกิดการระบาดของโรคระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *E. coli* และ Non-fecal coliform พวกนี้อาศัยอยู่ในดินและพืชมีอันตรายน้อยกว่าพวกแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อที่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม คือ Escherichia, Enterobacter และ Klebsiella แหล่งที่อยู่ของเชื้อคือทางเดินอาหารส่วนลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น เชื้อที่พบในน้ำนมดิบบ่งบอกถึงสุขลักษณะที่ไม่ถูกต้องขณะผลิตน้ำนมดิบ อาจมาจากการเช็ดเต้านมไม่สะอาด อุปกรณ์และเครื่องรีดนมไม่สะอาด น้ำใช้ไม่สะอาด แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ทนต่ออุณหภูมิพาสเจอไรส์เซชั่น หากตรวจสอบพบมีปริมาณเกินมาตรฐานหลังการพาสเจอไรส์เซชั่นบ่งบอกว่ามีการปนเปื้อนหลังการแปรรูปและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หลังการแปรรูปไม่ได้มาตรฐาน น้ำนมดิบคุณภาพดีควรมีปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มโคลีฟอร์ม ไม่มากกว่า 10,000 โคโลนี / มิลลิลิตร

2.2.3 การตรวจหาจุลินทรีย์กลุ่ม *E. coli*

น้ำนมดิบคุณภาพดีควรมีปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *E. coli* ไม่เกิน 10,000 โคโลนี/มิลลิลิตร กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้นมสดเป็นอาหารควบคุมเฉพาะและได้มาตรฐานสำหรับนมสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วว่าจะต้องไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ไม่พบเชื้อ *E. coli* ในนม 0.1 มิลลิลิตร และพบบักเตรีไม่เกิน 50,000 โคโลนี / มิลลิลิตร และ 10 โคโลนี / มิลลิลิตร ในนมพาสเจอร์ไรส์ และนมยูเอชที น้ำนมดิบคุณภาพดีควรมีปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *E. coli* ไม่เกิน10,000 โคโลนี / มิลลิลิตร (กรมปศุสัตว์, 2551)

นมที่จะมีคุณภาพที่ดีนั้นจะต้องเป็นนมที่สะอาดปราศจากสิ่งปลอมปน การที่จะได้นมที่สะอาดนั้นต้องยึดหลัก 3 ประการดังต่อไปนี้ (ภัทราวรรณ, 2548)

1) ความสะอาดเป็นหัวใจหลักของการผลิตนม ตามปกตินมที่อยู่ในเต้านมโคนั้นเป็นสิ่งที่สะอาด ซึ่งภายหลังการรีดและใส่ลงในถังรีดนมโดยที่นมสัมผัสสิ่งต่างๆ เช่น มือคนรีดนมหรือเครื่องรีดนม หัวนมของโค อากาศที่นมพุ่งผ่านและถังรีด จุลินทรีย์ที่ตามจุดต่างๆเหล่านี้จะปนเปื้อนลงสู่นมทันที จุลินทรีย์จะเข้าสู่นมมากน้อยเพียงใดย่อมขึ้นอยู่กับความสกปรกของสิ่งต่างๆที่สัมผัส

2) ความเร็วในการปฏิบัติงาน การปฏิบัติงานของผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับนมระหว่างการรีดนมและลดอุณหภูมิของน้ำนมจะต้องเป็นไปอย่างรวดเร็ว เพื่อไม่ทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสเพิ่มจำนวน ซึ่งจุลินทรีย์ในน้ำนมจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าเสมอทุก 30 นาที ซึ่งหมายถึงราคานมจะถูกตัดลงด้วย และยิ่งมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนมากขึ้นเท่าใดอายุของนมก็สั้นลงเท่านั้น ดังนั้นเมื่อมีการรีดนมเสร็จจะต้องรีบนำนมส่งไปที่ศูนย์รับนมทันที และเจ้าหน้าที่ศูนย์รวบรวมนมเมื่อรับนมจากเกษตรกรแล้วต้องลดอุณหภูมิให้อยู่ไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า ทันที

3) การทำนมให้เย็นนมโคดิบควรเก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่อเจ้าหน้าที่ของศูนย์รวบรวมนมรับซื้อจากเกษตรกรแล้วจึงต้องทำให้นมเย็นลงประมาณ 5 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า แล้วเก็บนมที่อุณหภูมินี้จนกว่าจะขนส่งไปโรงงานแปรรูปน้ำนม (ภัทราวรรณ, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ศูนย์รวมน้ำนม (Milk Collecting Centres) (วิพิชญ์, 2541)

2.3.1 ความสำคัญของศูนย์รวมน้ำนม

เป็นจุดศูนย์กลางที่สามารถรวบรวมน้ำนมจากฟาร์มต่างๆได้สะดวกรวดเร็ว (Quickly) เสียค่าใช้จ่ายต่ำที่สุด (Low cost) และเป็นสถานที่สำหรับตรวจสอบคุณภาพน้ำนม (Testing) เพื่อใช้เป็นเกณฑ์การตัดสินว่าน้ำนมนั้นมีคุณภาพดีหรือไม่ สมควรจะรับหรือไม่อย่างไร

2.3.2 หน้าที่ของศูนย์รับน้ำนมดิบ

ต้องพิจารณาว่าน้ำนมที่เกษตรกรนำส่งศูนย์รวมน้ำนมนั้น มีคุณภาพดีหรือไม่ ถ้าคุณภาพดีจะต้องรับน้ำนม (Receives) นั้นไว้ และจะต้องเก็บรักษาคุณภาพน้ำนมไว้ในสภาพที่ดี (Good condition) แล้วจึงส่งเข้าโรงงานผลิตภัณฑ์นมต่อไป (Dispatches) หน้าที่สำคัญของศูนย์รับน้ำนมดิบ คือ รับน้ำนมดิบที่มีคุณภาพ นอกจากนี้ศูนย์รวมน้ำนม ยังแบ่งย่อยลงเป็นจุดรับน้ำนม (Milk collecting point or Milk receival) ซึ่งตั้งอยู่ตามหมู่บ้านหรือจุดรวมน้ำนมที่สะดวกในระแวกนั้นๆ

2.3.2.1 จุดรับน้ำนม (Milk collecting point or Milk receival or MCP) เป็นจุดรับน้ำนมขนาดเล็กที่สามารถรับน้ำนมจากเกษตรกรที่เลี้ยงโคนมครอบครัวละไม่เกิน 4-5 ตัว และโคนมหนึ่งตัวจะรีดนมได้ไม่เกิน 10 ลิตรต่อวัน ในหมู่บ้านหนึ่งจะมีเกษตรกรเลี้ยงโคนมรวมทั้งหมดไม่เกิน 30 ฟาร์ม ณ จุดรับน้ำนมนี้จะมีอุปกรณ์เพียงถังรับน้ำนม (Cooling tank) ที่มีขนาดบรรจุไม่เกิน 1,500 ลิตรเท่านั้น เพื่อรอการนำส่งศูนย์รวมน้ำนมหรือโรงงานผลิตภัณฑ์นมต่อไป เกษตรกรจะรวบรวมน้ำนมที่รีดได้ใส่ถัง (Can) และนำส่งยังจุดรับน้ำนม (MCP) ณ จุดรับน้ำนมนี้จะมีเจ้าหน้าที่ซึ่งผ่านการฝึกอบรมทางด้านการตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้น (Organoleptic test) อยู่ประจำ และทำงานเกี่ยวกับการควบคุมการชั่งน้ำหนัก ดมกลิ่น ดูสีของน้ำนม และอาจจะกระทำการตรวจวัดความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity) ที่สำคัญคือ อุณหภูมิของน้ำนม จะต้องวัดด้วยเทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) ในกรณีที่สงสัย

2.3.2.2 ศูนย์รวมน้ำนม (Milk collecting centre or MCC) จะเป็นจุดรับน้ำนมที่มีขนาดใหญ่กว่าจุดรับน้ำนมที่กล่าวมาแล้ว ส่วนใหญ่จะมีถังเก็บน้ำนมที่มีขนาดบรรจุตั้งแต่ 2,000 ลิตรขึ้นไป และมีอุปกรณ์ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมพร้อมมูล โดยมากจะมีห้องปฏิบัติการไว้เฉพาะพร้อมที่จะให้บริการ

ศูนย์รับน้ำนมดิบของสหกรณ์โคนมโดยทั่วไปรวบรวมน้ำนมดิบจากเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมรายย่อยๆในช่วงเวลาของแต่ละวัน รายละประมาณ 1- 50 กิโลกรัม แล้วนำมารวมกันกลายเป็นน้ำนมจำนวนมาก ก่อนที่จะนำส่งโรงงานแปรรูป ซึ่งน้ำนมที่รวบรวมได้จากกลุ่มสมาชิกนั้นจะต้องคำนึงถึงคุณภาพของน้ำนมด้วยหากว่าน้ำนมมีคุณภาพดีจะได้ผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปดีไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วย แต่ถ้าคุณภาพไม่ดีผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปออกมาก็จะไม่ดีด้วยเช่นกันนอกจากนั้นจะส่งผลถึงราคาของน้ำนมดิบของเกษตรกร หรือโรงงานแปรรูปไม่ยอมรับซื้อน้ำนม อันเนื่องมาจากน้ำนมนั้นไม่มีคุณภาพพอที่จะนำเข้าไปสู่ขบวนการแปรรูปของโรงงานได้ เช่น มีจุลินทรีย์ปนเปื้อน มียาปฏิชีวนะ นมมีกลิ่นบูดเน่า ฯลฯ ซึ่งโดยปกติแล้วน้ำนมดิบที่เกษตรกรนำมาส่งที่ศูนย์รับน้ำนมดิบจะมีอุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส ศูนย์จะต้องทำการลดอุณหภูมิน้ำนมดิบดังกล่าวนั้นให้มีอุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส เพื่อชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับนมให้เร็วที่สุด (ศรายุทธ, 2547)

2.3.3 หน้าที่ของศูนย์รวมนม มีดังนี้ (วิพิชญ์, 2541)

- เก็บตัวอย่างน้ำนม เพื่อการตรวจสอบคุณภาพน้ำนม
- ทำการตรวจคุณภาพน้ำนมทางห้องปฏิบัติการ
- ชั่งน้ำหนักน้ำนมของแต่ละฟาร์ม
- จดน้ำหนัก
- จดรายงานผลการตรวจคุณภาพน้ำนมทางห้องปฏิบัติการของทุกฟาร์ม
- ในกรณีที่น้ำนมไม่มีคุณภาพให้ปฏิเสธการรับ (Reject)
- กรองน้ำนมที่ผ่านการตรวจ (Straining and filtering) น้ำนมจะผ่านเครื่องกรองลงสู่ Dump tank เพื่อกรองสิ่งสกปรกออก
- ปั๊มน้ำนมผ่านเครื่องกรอง (Filter) ไปยัง Cooling tank
- การลดอุณหภูมิของน้ำนมและเก็บรักษาคุณภาพน้ำนม (Cooling and storage) จะต้องเก็บในถัง Cooling ซึ่งมีใบพัด (Agitator) คอยคนน้ำนม เพื่อให้ความเย็นกระจายทั่วไปและป้องกันไม่ให้ Cream รวมตัวกันแยกเป็นชั้นระหว่าง Cream กับน้ำนม บางฟาร์มอาจจะใช้ Surface cooler โดยให้น้ำนมไหลลงผ่านเครื่องทำความเย็น ซึ่งน้ำนมที่อุ่นจะไหลผ่านเครื่องทำความเย็นลงสู่ถังเก็บน้ำนม (Cans) เพื่อนำส่งศูนย์รวมน้ำนมต่อไป
- Tanker trucks จะนำน้ำนมส่งต่อไปยังโรงงานผลิตภัณฑ์นม
- ศูนย์รวมน้ำนมอาจจะจำหน่ายน้ำนมโดยตรง นอกจากนั้นอาจจะให้บริการแก่สมาชิกโดยจัดหาอาหารข้น (Concentrate) ยาและสารเคมี (Chemicals) ตลอดจนเครื่องมือและอุปกรณ์จำเป็นอีกด้วย
- ศูนย์รวมน้ำนมจะเก็บสถิติ (Record and accounts) เพื่อส่งฝ่ายบัญชีจ่ายเงินค่าน้ำนมแก่เกษตรกรต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 ขบวนการรับน้ำนมดิบ (ศรายุทธ, 2547)

ในการรับน้ำนมดิบของศูนย์รับน้ำนม ใน 1 วัน จะมีการรับน้ำนม อยู่ 2 ช่วง คือ ช่วงเช้า 07.00 - 09.00 น. และช่วงบ่าย 16.00 - 18.00 น. ซึ่งพนักงานรับน้ำนมจะต้องจัดเตรียมอุปกรณ์รับน้ำนมให้พร้อม กล่าวคือ ระบบการรับน้ำนมจะต้องสะอาด น้ำเย็นที่จะมาลดอุณหภูมิน้ำนมจะต้องเย็น 0 – 4 องศาเซลเซียส ในการรับน้ำนมหรือการส่งน้ำนมขึ้นรถ หรือเวียนน้ำนมเพื่อลดอุณหภูมิให้ได้ตามกำหนด จะต้องเปิดปั้มน้ำเย็นพร้อมใบกวนน้ำเย็น ให้ทำงานก่อนทุกครั้ง เพื่อให้น้ำเย็นไหลเวียนผ่านเพลทลดอุณหภูมิ และจะต้องปิดปั้มน้ำเย็นพร้อมใบกวนน้ำเย็นทุกครั้งที่ไม่มีน้ำนมไหลผ่านเพลทลดอุณหภูมิในกรณีหยุดรับน้ำนม

ขบวนการรับน้ำนมดิบ (ภาพที่ 2.2) เมื่อรับน้ำนมจากถังรับน้ำนมรายย่อยของสมาชิกที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพแล้วเทน้ำนมดิบลงอ่างเทน้ำนม เพื่อชั่งน้ำหนักแล้วปล่อยน้ำนมดิบลงในอ่างรับน้ำนมดิบ น้ำนมดิบจากอ่างรับน้ำนมดิบจะถูกดูดและส่งโดยปั้มรับน้ำนมดิบ ผ่านวาล์ว ผ่านกรองหยาบ และกรองละเอียด ผ่านวาล์ว ผ่านเพลทลดอุณหภูมิ ผ่านหลอดแก้ว ผ่านแผงควบคุมการไหล ผ่านวาล์ว จากนั้นส่งน้ำนมลงถังเก็บน้ำนมดิบ ซึ่งทำงานจะต่อเนื่องไปเรื่อยๆ จนน้ำนมดิบหมด หรือเต็มถังเก็บน้ำนมดิบ ในระหว่างที่รับน้ำนมเมื่อน้ำนมมีปริมาณครึ่งถังเก็บน้ำนมดิบให้เปิดมอเตอร์ใบกวนน้ำนมดิบ เพื่อให้นมเกิดการไหลเวียนภายในถังเก็บน้ำนมดิบและให้ความเย็นกระจายได้ทั่วถึงภายในถังเก็บน้ำนมดิบ หลังจากที่รับน้ำนมดิบแล้วเสร็จ ให้พิจารณาอุณหภูมิของน้ำนมในถังรับน้ำนมว่าอุณหภูมิของน้ำนมดิบภายในถังเก็บน้ำนมดิบนั้นมีอุณหภูมิตามกำหนดหรือไม่ ซึ่งถ้าเกิน 4 องศาเซลเซียส ให้ดำเนินการนำน้ำนมเพื่อลดอุณหภูมิ โดยการสลับท่อทางเดินของน้ำนม หรือ เปิด-ปิด วาลว์ เพื่อกำหนดทิศทางการไหล ให้น้ำนมดิบไหลจากทางออกด้านล่างของถังเก็บน้ำนมดิบ ผ่านวาล์วและท่อต่างๆ ผ่านปั้มเวียนน้ำนมดิบ ผ่านแผงควบคุมการไหล ผ่านวาล์ว ผ่านเพลทลดอุณหภูมิ ผ่านหลอดแก้ว ผ่านแผงควบคุมการไหล ผ่านวาล์ว ส่งลงถังเก็บน้ำนมดิบ เช่นเดิม และทำงานต่อเนื่องไปเรื่อยๆ จนลดอุณหภูมิได้ตามกำหนด จึงหยุดการทำงาน

เมื่อต้องการส่งน้ำนมดิบ เพื่อขนส่งไปแปรรูปในขั้นตอนต่อไป โดยการจัดเตรียมอุปกรณ์สลับท่อส่งหรือเปิด- ปิดวาล์ว ให้น้ำนมดิบไหลผ่านวาล์ว ให้น้ำนมดิบไหลผ่านวาล์วและท่อใต้ถังเก็บน้ำนมดิบ ผ่านปั้มเวียนน้ำนมดิบ (ปั้มส่งนม) ผ่านเพลทลดอุณหภูมิ ส่งตามท่อส่งลงถังรับน้ำนมดิบของรถส่งนม จากนั้นดำเนินการเปิดปั้มน้ำเย็นไหลเวียนผ่านเพลทลดอุณหภูมิ พร้อมเปิดใบกวนน้ำเย็น เปิดปั้มเวียนนม น้ำนมไหลผ่าน ตามท่อ ผ่านเพลทลดอุณหภูมิส่งเข้าถังรับน้ำนมดิบของรถส่งนม ซึ่งจะทำงานไปเรื่อยๆ จนกว่าการทำงานจะแล้วเสร็จ จึงหยุดเครื่อง หรือถ้าน้ำนมดิบมีอุณหภูมิ ไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส ก็อาจจะไม่ต้องผ่านเพลทลดอุณหภูมิก็ได้ แล้วแต่กรณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

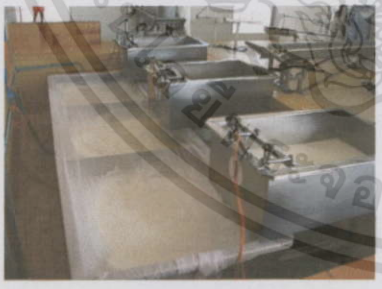
ขั้นตอนการรับน้ำนมดิบ

รับน้ำนมจากเกษตรกร

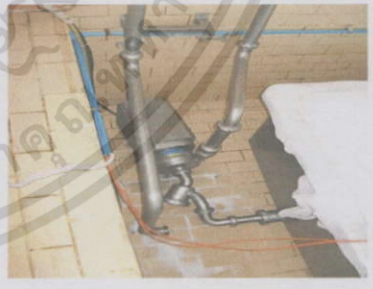
ส่งน้ำนมดิบมายังรถส่งนม

เจ้าหน้าที่เทน้ำนมดิบลงอ่างรับน้ำนมดิบ

น้ำนมดิบจากเพลทลดอุณหภูมิ
มายังแผงควบคุมทิศทางการไหล
และไปสู่แท็งก์



น้ำนมดิบไหลจากอ่างรับ
น้ำนมลงสู่อ่างพักน้ำนม



ปั๊มดูดน้ำนมดิบจากอ่างพักน้ำนม
ไปยังเพลทลดอุณหภูมิ

ภาพที่ 2.2 กระบวนการรับน้ำนมดิบ

ที่มา : ศูนย์รับน้ำนม จังหวัดสระบุรี (2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ

2.4.1 จุดประสงค์ของการล้างทำความสะอาด (สุวิมล, 2544)

2.4.1.1 การลดปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ การล้างเป็นการกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ และสามารถกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนไปได้เป็นสัดส่วนโดยตรง

2.4.1.2 การกำจัดแหล่งอาหาร ในโรงงานผลิตนมจะมีคราบโปรตีนซึ่งมักเป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์การกำจัดสิ่งปนเปื้อนเหล่านี้จากเครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ จะทำให้อาหารจุลินทรีย์หมดไป

2.4.1.3 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ หากจุลินทรีย์ที่ก่อโทษหลบซ่อนอยู่ในสิ่งสกปรก การฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่เป็นสารเคมีหรือฆ่าเชื้อด้วยความร้อน เช่น ไอน้ำ สิ่งสกปรกเป็นอุปสรรคทำให้ไม่สามารถฆ่าเชื้อที่อยู่ข้างในสิ่งสกปรกได้

2.4.1.4 การเพิ่มขีดความสามารถในการทำงานของเครื่องจักรอุปกรณ์เมื่อสิ่งสกปรกเกาะติดเครื่องจักร เนื่องจากการล้างทำความสะอาดไม่ดี จะทำให้การทำงานของเครื่องเริ่มผิดปรกติ

2.4.2 ประเภทของสิ่งสกปรก (สุวิมล, 2544)

สิ่งสกปรกที่ติดอยู่ในเครื่องมือ อุปกรณ์มีหลายรูปแบบ เช่น

2.4.2.1 สำหรับนมดิบจะมีคราบไขมันติดอยู่ที่ระดับผิวของนม คราบไขมันนี้อาจจะขยายต่ำลงมาจากผิวก็ได้ ถ้าใบพัดกวนนมหยุดหมุนและเมื่อระดับของนมในถังลดต่ำลง

2.4.2.2 คราบโปรตีนนมและแร่ธาตุในนม ซึ่งติดอยู่กับผิวของถังใต้ระดับไขมัน และคราบนมนี้จะหนาขึ้นเมื่อได้รับความร้อน เช่น การพาสเจอร์ไรส์ ซึ่งจะทำให้คราบนมติดผิวโลหะแน่นยิ่งขึ้น

2.4.2.3 คราบตะกรันนมหรือคราบนมที่ซ้อนกันหลายชั้นจนหนา (Milk stone) เกิดจากการสะสมของคราบนมผสมกับเกลือจากน้ำกระด้างและการใช้สารล้างทำความสะอาดไม่เหมาะสม เช่น สารทำความสะอาดคาร์บอเนต เมื่อละลายน้ำกระด้างจะกลายเป็นตะกอน เป็นต้น ซึ่งตะกรันนมที่ซ้อนกันเป็นชั้นๆในแต่ละชั้นจะมีแบคทีเรียฝังอยู่ แบคทีเรียที่ตรวจพบเป็นพวกที่ทนร้อน และตะกรันดังกล่าวยังทำ ให้การถ่ายเทความร้อนไม่ได้ตามที่กำหนด

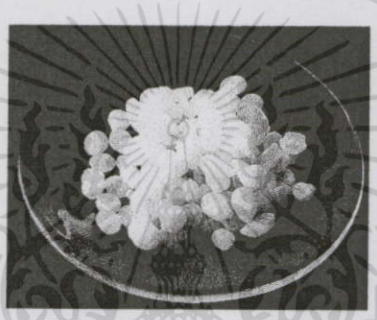
2.4.3 สารล้างทำความสะอาด (Detergents) (สุวิมล, 2544)

เมื่อเติมลงไปในน้ำจะช่วยในการทำความสะอาด โดยลดแรงตึงผิวของสิ่งสกปรก หรือทำให้เกิดเป็นสบู่ (saponify) หรือทำให้สิ่งสกปรกกระจายตัวหรือไป emulsify สิ่งสกปรกที่เป็นไขมันให้เกิดเป็น globules เล็กๆหรือทำปฏิกิริยาอื่นๆที่ทำให้เกิดความสะอาดมีประสิทธิภาพมากขึ้น สารทำความสะอาดไม่จำเป็นต้องมีคุณสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ แต่โดยทั่วไปมักมีสมบัติการฆ่าเชื้อด้วย ประเภทสารทำความสะอาดสามารถแบ่งได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3.1 ด่างประเภทอินทรีย์ (Inorganic Alkalis) สารชะล้างประเภทนี้มักจะมีด่างเป็นองค์ประกอบ ด่างที่นิยมใช้มีดังนี้ โซดาไฟหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

1) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือ Lye หรือ Caustic Soda เป็นของแข็งสีขาว (ภาพที่ 2.3) สูตรมวลโมเลกุล คือ NaOH น้ำหนักโมเลกุล 39.9971 g/mol ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด อุตสาหกรรมทำกระดาษ เป็นต้น เป็นด่างแก่และเป็นที่นิยมใช้ เนื่องจากราคาถูก มีความสามารถในการละลายสูง เป็นสารที่ทำให้เกิดสบู่ (Sponify) ที่ดี มีความสามารถในการฆ่าเชื้อ มีฤทธิ์ในการกัดกกร่อนโลหะ โดยเฉพาะอลูมิเนียมและเหล็กฉาบดีบุก (กองควบคุมวัตถุเสพติด, 2548)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์
ที่มา : กองควบคุมวัตถุเสพติด (2548)

2) โซเดียมเมตาซิลิเกต (Sodium Metasilicate) เป็นสารทำความสะอาดที่ดีไม่มีการกัดกร่อนโลหะแต่ไม่ควรใช้กับน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะเกิดการสลายตัว โซดาแอช หรือโซเดียมคาบอเนต (Sodium Carbonate) เป็นสารทำความสะอาดที่ไม่ดีนัก แต่มีราคาถูกมีฤทธิ์ใน การกัดกร่อนอะลูมิเนียมและเหล็ก

2.4.3.2 กรดประเภทสารอินทรีย์ (Inorganic Acid)

สารทำความสะอาดประเภทกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดเกลือ (Hydrochloric Acid) กรดกำมะถัน (Sulfuric Acid) และกรดไนตริก (Nitric Acid) ใช้สำหรับกำจัดตะกรันที่เกิดจากน้ำกระด้าง การจับตัวเป็นก้อนของเกลือแร่ต่างๆ เช่น Milk Stone ที่เกิดจากการจับตัวกันของโปรตีน แคลเซียมคาโบเนต และเกลืออื่นๆ เกิดเป็นคราบแข็งในเครื่องพาสเจอร์ไรส์ แต่กรดเหล่านี้มีฤทธิ์ในการกัดกร่อนสูงจึงมีการใช้กรดอื่นที่มีฤทธิ์ในการกัดกร่อนน้อยกว่า เช่น กรดซัลฟามิก (Sulphamic Acid) และกรดฟอสฟอริก (Phosphoric Acid) สารทำความสะอาดประเภทกรดเหล่านี้มีฤทธิ์ในการกัดกร่อน จึงมักจะมีการผสมสารที่ป้องกันการกัดกร่อนไว้ด้วยนิยมใช้ในการกำจัดคราบแข็งที่เกิดจากสารอินทรีย์ Milk stone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) กรดไนตริก (HNO_3) ชื่อตามระบบ IUPAC คือกรดไนตริก ชื่ออื่น เช่น อควาฟอร์ติส (aquafortis) หรือ สปิริตออฟไนเตอร์ (spirit of nitre) สูตรมวลโมเลกุล คือ HNO_3 เป็นของเหลวใสไม่มีสีจุดเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -42 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 83 องศาเซลเซียส เป็นสารมีฤทธิ์กัดกร่อนและ Strong Oxidizing Agent ถ้าสัมผัสกับวัตถุที่มีส่วนประกอบของCellulose จะทำให้เกิดการติดไฟเกิดควันของพวกออกไซด์ซึ่งเป็นพิษ

2) กรดฟอสฟอริก เป็นกรดชนิดหนึ่งที่ใช้กันในอุตสาหกรรมหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นผงซักฟอก สบู่หรือแม้แต่ในน้ำอัดลมฯลฯ กรดฟอสฟอริกมีสูตรโมเลกุลH_3PO_4 น้ำหนักโมเลกุล 98.0 ความถ่วงจำเพาะ 1.834 ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 42.35 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ละลายได้ในน้ำและแอลกอฮอล์ หรือเป็นผลึกใสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและอุณหภูมิ กรดฟอสฟอริกร้อยเปอร์เซ็นต์ จะอยู่ในรูปผลึกใส กระบวนการผลิตเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดซัลฟูริกหรือกรดเกลือกับหินฟอสเฟต (โศรดา, 2549)

2.4.3.3 สารลดแรงตึงผิว (Surface Active Agent)

สารชะล้างประเภทนี้จะทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวของสิ่งสกปรก น้ำจะเข้าไปทำให้สิ่งสกปรกเปียก สารชะล้างจึงจะสามารถแทรกตัวเข้าไปทำให้เกิดการรวมตัวเป็นอิมัลชั่น ทำให้สิ่งสกปรกถูกกำจัดออกโดยง่าย เหมาะสำหรับการทำความสะอาดคราบไขมัน ตัวอย่างสารประกอบประเภทนี้ ได้แก่ สบู่ น้ำยาล้างจาน เป็นต้น มักใช้ในการล้างทำความสะอาดด้วยมือ เนื่องจากมีฤทธิ์ในการกัดกร่อนต่ำสารชะล้างมีสมบัติ เป็นอิมัลชั่นที่ดี ไม่กัดกร่อน ไม่ระคายเคืองผิว ล้างออกด้วยน้ำได้ง่าย สารประเภทนี้ได้แก่ Sodium Alkyl Sulphonate, Sodium Lauryl Sulphate เป็นต้น

2.4.3.4 Sequestants หรือ Chelating Agents หรือ Sequestering Agents

Sequestering Agents มีคุณสมบัติในการจับตัวกับแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียม และแมกนีเซียมทำให้ละลายน้ำได้ดี จึงนิยมใช้สารประเภทนี้ทำความสะอาดเพื่อจับกับแคลเซียมและแมกนีเซียม ในน้ำป้องกันไม่ให้เกิดตะกรันในเครื่องจักรและอุปกรณ์ต่างๆ สารที่นิยมใช้ได้แก่ โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟส ไฟโลฟอสเฟต เตรตระคลอไรด์

2.4.4 การฆ่าเชื้อ

หมายถึง การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่ภายในระบบเครื่องจักร เครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อป้องกันไม่ให้ปนเปื้อนเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ โดยต้องทำการฆ่าเชื้อก่อนการผลิต ห้ามฆ่าเชื้อทิ้งไว้นานเกิน 4 ชั่วโมงก่อนการผลิต ถ้าเกิน 4 ชั่วโมงต้องทำการฆ่าเชื้อใหม่อีกครั้งก่อนการผลิต ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อ แสดงดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การฆ่าเชื้อนิยมทำก่อนการผลิต การฆ่าเชื้อควรใช้น้ำร้อนประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส เวลาหมุนเวียนอย่างน้อย 30 นาที และทำการผลิตทันทีที่ปล่อยน้ำร้อนออกหมดต้องให้ความร้อนจากจุดเริ่มต้นถึงปลายทางร้อนคงที่สม่ำเสมอหรือถ้าไม่สามารถทำให้อุณหภูมิร้อนตามต้องการได้ ควรเลือกใช้สารฆ่าเชื้อ เช่น คลอรีน 100 — 200 ppm และต้องล้างออกด้วยน้ำสะอาดที่ไม่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ หรือ ใช้สารฆ่าเชื้อที่ไม่ต้องล้างออก กลุ่ม Peroxy Acetic Acid เวลาหมุนเวียน 10 — 20 นาที (ศรายุทธ, 2547)

ตารางที่ 2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้สารฆ่าเชื้อ

ปัจจัย	ผล
อุณหภูมิ	จุลินทรีย์จะถูกทำลายได้มากขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียสขึ้นไป จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคจะเริ่มถูกทำลายอย่างรวดเร็ว
ความเข้มข้น	โดยปกติความเข้มข้นยิ่งสูงจะยิ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ แต่จะทำให้ผิวหนังระคายเคือง เป็นพิษ และทำให้พื้นผิวสึกกร่อน แต่ใช้ต่ำเกินไปอาจก่อให้เกิดปัญหาทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีความต้านทานมากขึ้น
ระยะเวลาในการสัมผัส	ระยะเวลานานจะทำลายจุลินทรีย์ได้มากขึ้น แต่เสียเวลาในการปฏิบัติงาน หากพื้นผิวมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์มาก และสารฆ่าเชื้อทำงานช้า จำเป็นต้องใช้เวลาในการสัมผัสนาน
ความสะอาด	สารฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพลดลง หากพื้นผิวที่ต้องการทำความสะอาดมีการปนเปื้อนสิ่งสกปรก (Soil) มาก ควรใช้สารฆ่าเชื้อกับพื้นผิวที่ทำความสะอาดแล้วเท่านั้น
ความเป็นกรดด่าง (pH)	การใช้สารฆ่าเชื้อที่ pH ไม่เหมาะสมจะทำให้ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อลดลง
ความกระด้างของน้ำ	โดยทั่วไปความกระด้างของน้ำยิ่งสูงจะยิ่งลดประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อทั้งนี้ขึ้นกับประเภทของสารฆ่าเชื้อนั้นๆ
การสร้างฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิว	ฟิล์มชีวภาพจะช่วยป้องกันตัวจุลินทรีย์ ทำให้สารฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพลดลงการป้องกันการสร้างฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวสามารถทำได้โดยออกแบบเครื่องจักรและอุปกรณ์ให้ล้างทำความสะอาดง่ายและมีการใช้สารฆ่าเชื้อที่เหมาะสม

ที่มา : สุวิมล (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4.1 ประเภทของสารฆ่าเชื้อ

1) คลอรีน และสารประกอบคลอรีน

คลอรีน (Cl_2) เป็นธาตุตัวหนึ่งในกลุ่มฮาโลเจน คลอรีนแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ คือ คลอรีนเหลว สารประกอบไฮโปคลอไรท์ (Hypochlorite) สารอนินทรีย์คลอรามีน (inorganic chloramines) สารอินทรีย์คลอรามีน (organic chloramines) และคลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine dioxide) ซึ่งมีความแตกต่างกัน โดยสารประกอบไฮโปคลอไรด์ (Hypochlorite) เกิดจากเกลือของคลอรีน ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) เป็นสารประกอบคลอรีนที่สามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้เช่นกัน โดยแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) จะเป็นของแข็งสีขาวที่เรียกว่า Bleaching Powder หรือ Chlorinated Lime ซึ่งจะมีคลอรีนอิสระ (free available chlorine : FAC) อยู่ประมาณ 39 % ส่วนโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เป็นของเหลวที่มีคลอรีนอิสระ ประมาณ 7 – 20 %

สารประกอบไฮโปคลอไรท์เป็นตัวที่นิยมนำมาใช้กันมากประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ของสารประกอบคลอรีนชนิดต่างๆ นั้น จะต้องนำมาละลายน้ำใช้ในรูปสารละลาย ซึ่งเมื่อละลายน้ำแล้วสารประกอบคลอรีนไม่ว่าจะเป็น ก๊าซคลอรีน สารประกอบไฮโปคลอไรท์ และสารประกอบคลอรามีน จะแตกตัวให้กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ดังสมการ (Wei et al., 1985)

ก๊าซคลอรีน

$$Cl_2 + H_2O \longrightarrow HCl + HOCl$$

แคลเซียมไฮโปคลอไรท์

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

โซเดียมไฮโปคลอไรท์

$$NaOCl + H_2O \longrightarrow HOCl + NaOCl$$

ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาการแตกตัวของสารประกอบคลอรีน

ที่มา : Wei และคณะ (1985)

ปฏิกิริยาคลอรีนในน้ำ คลอรีนที่ใส่ในน้ำจะเกิดปฏิกิริยากับสิ่งต่างๆ ในน้ำทั้งหมด เช่น เชื้อแบคทีเรีย Organic matters และ Inorganic matters เป็นต้น

- Residual chlorine คือ คลอรีนที่เหลือจากการทำลายเชื้อโรคในน้ำมี 2 ชนิดคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. Free available chlorine ได้แก่ HOCl และ OCl^- คลอรีนเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำจะได้ดังสมการ

$$Cl_2 + H_2O \longrightarrow HCl + HOCl$$

HOCl จะสลายตัวดังนี้ คือ

$$HOCl \longrightarrow OCl^- + H^+$$

HOCl จะสลายตัวมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ pH ของน้ำ จากการทดลองพบว่า

ที่ pH 7.00 จะเกิด H^+ และ OCl^- เท่านั้น

ที่ pH ต่ำกว่า 7.00 จะเกิด H^+ มากกว่า OCl^-

ที่ pH สูงกว่า 7.00 จะเกิด H^+ น้อยกว่า OCl^-

ที่ pH 9.5 จะเกิด OCl^- เกือบหมด

ข. Combine available chlorine หรือ Chloamine คือ คลอรีนที่ใส่ลงในน้ำแล้วไปรวมกับแอมโมเนีย หรือสารอินทรีย์ของสารประกอบไนโตรเจน เกิดเป็น Mono chloamine (NH_2Cl) Di chloamine ($NHCl_2$) หรือ Tri chloamine ($NHCl_3$) H^+ และ OCl^- มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียในน้ำ แต่ H^+ ทำลายได้ดีกว่า OCl^-

ปฏิกิริยาการแตกตัว (Hydrolysis) ของคลอรีนจะเกิดกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) และคลอไรท์อิออน (OCl^-) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ค่อนข้างสมบูรณ์และเกิดขึ้นเร็วมาก กรดไฮโปคลอรัสนี้เป็นสารฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์มีสมบัติเป็นกรดอ่อน และมีค่าคงที่การแตกตัวที่ 0 – 25 องศาเซลเซียส เป็น $1.6\text{-}3.2 \times 10^{-8}$ และมีค่า pKa 7.5 - 7.8 ค่าการแตกตัวที่อุณหภูมิต่ำ จะให้ค่าคงที่ของการแตกตัวต่ำกว่าที่อุณหภูมิสูง หรือที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส แสดงดังตารางที่ 2.3 (White, 1992)

ตารางที่ 2.3 ค่าคงที่ของกรดไฮโปคลอรัสที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (^0C)	0	5	10	15	20	25	30
$Ki \times 10^{-8(moles/liter)}$	1.488	1.753	2.032	2.320	2.621	2.898	3.175

ที่มา : ดัดแปลงจาก White (1992)

กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของคลอรีน (Microbial inhibition activity) ขึ้นกับปริมาณคลอรีนอิสระในรูปของกรดไฮโปคลอรัสในน้ำที่จะสัมผัสกับเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งกรดไฮโปคลอรัสจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากที่สุดเมื่อ pH สารละลายอยู่ที่ 4 – 5 แต่โดยทั่วไปในโรงงานอุตสาหกรรมจะนิยมปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.5 – 7.5 เนื่องจากหากใช้สารละลายที่มีสภาพเป็นกรดมากจะทำให้พื้นผิวของกระบวนการผลิตเกิดการกัดกร่อนโดยเฉพาะอุปกรณ์ที่ทำจากสแตนเลส สำหรับผลของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

pH และอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การแตกตัวของกรดไฮโปคลอรัส (Beuchat, 2000) แสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การแตกตัวของกรดไฮโปคลอรัส

pH	HOCl (%)	
	0 ^{0}C (32 ^{0}F)	20 ^{0}C (68 ^{0}F)
4.0	100	100
5.0	100	99.7
6.0	98.2	96.8
7.0	83.2	75.2
8.0	32.2	23.2
8.5	13.7	8.8
9.0	4.5	2.9
10.0	0.5	0.3

ที่มา : ดัดแปลงจาก Beuchat (2000)

กลไกการทำลายจุลินทรีย์ของคลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน

1) ส่วนห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์

ส่วนห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ ได้แก่ ผนังเซลล์ (Cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) และเยื่อหุ้มสปอร์ (Spore coat) คลอรีนจะมีผลต่อการทำลายผนังเซลล์ หรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แบ่งตัวผิดปกติ และคลอรีนสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้โดยการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่อยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ สร้างสารประกอบไนโตรคลอโร (N-chloro compounds) ซึ่งรบกวนเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้สมบัติการควบคุมการผ่านเข้าออกของเซลล์สูญเสียไปไม่สามารถรับสารอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน หรือสารอาหารที่จำเป็นในการดำรงชีวิตเข้าสู่เซลล์ได้ ทำให้เซลล์ขาดสารอาหารการเจริญของจุลินทรีย์หยุดชะงักและตายในที่สุด (Baker, 1926)

Rudolph และ Levine (1941) สรุปว่า คลอรีนมีความสามารถซึมเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อสร้างสารพิษในโปรโตพลาสม ได้แก่ สารประกอบไนโตรคลอโร (N-chloro compounds)

Cheremisinoff และ Trattner (1981) กล่าวว่าคลอรีนจะทำให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพจนไม่สามารถป้องกันการผ่านเข้าออกของสารได้ ทำให้กรดไฮโปคลอรัสสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ และเข้าทำปฏิกิริยาต่อส่วนอื่นๆของเซลล์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
105476

Camper และ McFerters (1979) รายงานว่าเมื่อใดที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย ทำให้ไม่สามารถรับอาหารได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโนที่จำเป็นในการดำรงชีพ เข้าไปในเซลล์ได้ ทำให้เซลล์ขาดอาหารตายหรือชะงักการเจริญเติบโต และหากคลอรีนทำลายเยื่อหุ้มสปอร์ทำให้สปอร์ถูกทำลายได้โดยง่ายโดยความร้อนหรือสารฆ่าเชื้อชนิดอื่นๆ

2) ส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ หรือโปรโตพลาสม (protoplasm) และเอนไซม์

คลอรีนจะไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Oxidation) กับโปรโตพลาสมของเซลล์ เป็นเหตุให้โปรตีนของเซลล์ตกตะกอน และทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลไฮดริล (Sulfhydryl radical) ของโปรตีน เกิดผลิตภัณฑ์แบบที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (Irreversible product) จึงรบกวนการทำงานของเซลล์ ในส่วนที่เป็นเอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ระบบการทำงานของเอนไซม์ชนิดที่จำเป็นต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ถูกรบกวนทำให้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ และคลอรีนยังสามารถทำลายเอนไซม์ได้โดยตรง คลอรีนจะไปทำลายทั้งเอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนซึ่งถูกคลอรีนเข้าไปเปลี่ยนโครงสร้าง อาจทำให้การรวมตัว (Coagulate) ของโปรตีนทำให้ระบบการทำงานเสียไป มีเอนไซม์หลายชนิดที่ถูกทำลายด้วยคลอรีน ได้แก่ Triosephosphate dehydrogenases, Glucose oxidase, d-amino acid oxidase transaminase, Succinic oxidase เป็นต้น เอนไซม์ที่ไวต่อการทำลายของคลอรีนส่วนมากเป็นเอนไซม์ในกลุ่มซัลไฮดริล ส่วนเอนไซม์ที่ไม่ใช่กลุ่มนี้ เช่น คะตะเลส (Catalase) คลอรีนจะยับยั้งเอนไซม์โดยจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับหมู่ซัลไฮดริล (Sulfhydryl group) ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับ ป้องกันการเกิดใหม่ของเอนไซม์ และยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการเผาผลาญกลูโคสของเซลล์ ทำให้เซลล์ขาดพลังงานที่จะนำไปใช้ในการดำรงชีวิต (The American Water Works Association Inc., 1971; Cheremisinoff และคณะ, 1981)

Knox และคณะ (1948) กล่าวว่าการยับยั้งเอนไซม์เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของคลอรีนและกลุ่ม sulfhydry ของเอนไซม์ ต่อมา Green และ Stumpf (1946) ได้ยืนยันว่าคลอรีนมีบทบาทในการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์บางชนิดภายในเซลล์ โดยคลอรีนจะไปมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกลูโคส ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้ได้ เซลล์จุลินทรีย์จึงขาดอาหารและตายในที่สุด (Wei et al., 1985)

3) ส่วนของสารพันธุกรรมของเซลล์

ส่วนของสารพันธุกรรมของเซลล์ สามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับ DNA ในส่วนเบสพิวรีน และไพริมิดีน ทำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) นอกจากนี้คลอรีนทำให้ DNA เกิดบาดแผล (Lesions) สูญเสียความสามารถในการ transforming ของ DNA ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งนอกจากนี้คลอรีนยังทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม (Chromosomal aerration) (Marriott, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอรีนเป็นสารเคมีที่นำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางที่พบกันมากได้แก่ การใช้ฆ่าเชื้อในน้ำประปา น้ำประปาที่ใส่คลอรีนมากเกินไปเมื่อเปิดก๊อกน้ำจะได้กลิ่นฉุนของคลอรีนออกมาพร้อมกับน้ำประปาด้วย เรื่องคลอรีนได้ปรากฏเป็นข่าวใหญ่ที่มีผลเป็นอันตรายต่อสุขภาพมากมาย โดยเฉพาะเหตุการณ์ที่เกิดในประเทศสหรัฐอเมริกาในเดือนเมษายน พ.ศ. 2539 เมื่อรถไฟบรรทุกคลอรีนเหลวได้เกิดอุบัติเหตุทำให้มีการรั่วของคลอรีนออกมา และคลอรีนเหลวจะเปลี่ยนสถานะเป็นก๊าซคลอรีน (คลอรีนเหลว 1 ลิตร จะเปลี่ยนเป็นก๊าซคลอรีนได้ประมาณ 434 ลิตร) จึงแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวางและรวดเร็ว ทำให้ประชาชนได้รับก๊าซคลอรีนจนมีอาการเจ็บป่วยเป็นจำนวนมาก ซึ่งก๊าซคลอรีนจะมีอันตรายแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณที่ได้รับ (บัญญัติ, 2543) ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ปริมาณก๊าซคลอรีนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ความเข้มข้นของก๊าซคลอรีน (ppm)	อาการที่เป็นอันตราย
0.002	ได้กลิ่นฉุน แต่ยังไม่เป็นอันตราย
1 – 3	เกิดการระคายเคืองขอเยื่อบุต่างๆ โดยเฉพาะเยื่อบุจมูกและนัยน์ตา
5 – 15	น้ำมูกและน้ำตาไหลมาก
30	แน่นหน้าอก ไอ จาม หายใจไม่สะดวก กล่องเสียงบวมทำให้เสียงแหบ
40 – 60	มีอาการน้ำท่วมปอด ระคายเคืองที่ผิวหนังลักษณะปวดแสบปวดร้อน
400	ทำให้เสียชีวิตภายใน 30 นาที
1,000	เสียชีวิตภายในเวลาไม่กี่นาที

ที่มา : บัญญัติ (2543)

2) Quaternary Ammonium Compound (QACs)

เป็น Disinfectant ที่มีการใช้กันมากอีกชนิดหนึ่ง เรียกโดยทั่วไปว่า Quats นิยมใช้กันมากอีกชนิดหนึ่งในวงการอุตสาหกรรมอาหาร สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดี ส่วนพวกแกรมลบนั้นจะทำลายได้ดีต่อเมื่อมีการเติมสารพวก Sequesterants ส่วนพวกสปอร์จะทำลายได้น้อย QACs จะมีราคาแพงกว่าพวกสารประกอบคลอรีน การฆ่าเชื้อจะทำให้โปรตีนเปลี่ยนสภาพและทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารละลายภายในเซลล์ละลายออกมา มีข้อดี คือ เป็นสารที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีความคงตัวในช่วงความเป็นกรด-ด่าง กว้าง ประสิทธิภาพไม่ลดลงถึงแม้จะมีสารประกอบอินทรีย์อยู่ไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังเว้นแต่ใช้ความเข้มข้นที่สูงมากๆ ไม่ทำเกิดการกัดกร่อนโลหะ ยกเว้นยางบางชนิด ส่วนข้อเสีย คือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับน้ำกระด้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการล้างโดยทั่วไปมักใช้สารนี้ที่ความเข้มข้น 50 – 500 ppm โดยควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส และมีเวลาสัมผัสประมาณ 1 – 30 นาที (ศิวาพร, 2536)

3) Iodophors

แม้จะมีราคาสูง แต่มีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียได้ดี เพราะมีไอโอดีนและ Non Ionic surfactant เป็นส่วนประกอบ Iodophors มีคุณสมบัติเป็นทั้ง Detergent และ Disinfectant และมีคุณสมบัติเป็นกรดจึงเหมาะเป็นอย่างยิ่งที่จะใช้กับโรงงานอุตสาหกรรมนม เบียร์ และเครื่องดื่มต่างๆ ข้อดีของสารนี้ คือสามารถทำลายแบคทีเรียได้ในช่วงกว้างไอโอโดฟอร์ประกอบด้วยสารชะล้างที่ไม่เป็นประจุ (Non-ionic Detergent) ไอโอดีนและสารละลายบัฟเฟอร์ของกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) เพื่อรักษาความเป็นกรดด่าง (pH) ของสารละลายให้มีค่า 3-5 ซึ่งเป็นสภาวะที่ไอโอโดฟอร์มมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้สูงที่สุด ในความเข้มข้น 10-100 ppm ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียลเซส ทั้งนี้ขึ้นกับความสกปรกของพื้นผิวที่จะฆ่าเชื้อ แต่ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อจะลดลงเมื่อเก็บในที่ที่มีอุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานานๆ และหากใช้สารชะล้างทำความสะอาดที่มีฤทธิ์เป็นด่างเพราะความเป็นด่างจะทำให้ไอโอโดฟอร์มี pH สูงขึ้น ดังนั้นต้องล้างด่างออกให้หมดก่อนใช้ ไอโอโดฟอร์ ไอโอดีนในไอโอโดฟอร์เป็นตัวการสำคัญในการทำลายฆ่าเชื้อได้หลายประเภท เช่นเดียวกับไฮโปคลอไรท์แต่มีคุณสมบัติในการทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์น้อยกว่าไฮโปคลอไรท์สิ่งสกปรกประเภทสารอินทรีย์มีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าทำลายเชื้อของไอโอโดฟอร์น้อยกว่าไฮโปคลอไรท์ และไม่กัดกร่อน ไม่เป็นพิษ ไม่ระคายเคืองผิว กลิ่นไม่ฉุน แต่อาจมีสีติดไปกับผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงต้องล้างออกหลังการใช้งาน และไม่ควรใช้ไอโอโดฟอร์ฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ทำจากพลาสติกบางชนิดอาจดูดซับไอโอดีน ทำให้สีพลาสติกจางลง รวมทั้งไม่ควรใช้ฆ่าเชื้อพื้นผิวโต๊ะและอุปกรณ์ที่ใช้กับผลิตภัณฑ์ประเภทแป้ง เพราะไอโอดีนจะทำปฏิกิริยากับแป้งเกิดเป็นสารสีม่วงจับบนพื้นผิว ทำให้ดูสกปรก (ภัทราวรรณ, 2548)

4) สารประกอบประเภทของกรด

ประกอบด้วยกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ เช่น กรดน้ำส้ม กรดแลกติก กรดโพรพิโอนิกและกรดเปอร์อะซิติก รวมกับสารลดแรงตึงผิว ประจุลบ (Anionic Surfactant) สารฆ่าเชื้อประเภทนี้สามารถใช้ได้ดีบนพื้นที่ผิวทำด้วยเหล็กปลอดสนิม (Stainless Steel) มีประสิทธิภาพในการฆ่าทำลายเชื้อ *Salmonella* และ *Listeria* ได้ดี

2.4.5 ขั้นตอนการทำความสะอาด (Cleaning)

ประกอบด้วยสามขั้นตอนดังนี้

2.4.5.1 การกำจัดสิ่งสกปรก (Soil or Dirt) ขนาดใหญ่ด้วยวิธีกล เช่น การปัดกวาด ถู หรือชะล้าง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5.2 การกำจัดสิ่งสกปรกที่เหลืออยู่ด้วยการใช้สารชะล้างหรือการทำความสะอาด (Detergent)

2.4.5.3 การล้างด้วยน้ำ (Rinsing) เพื่อชะล้างและกำจัดสิ่งสกปรกออก

2.4.6 วิธีการทำความสะอาด

2.4.6.1 การล้างทำความสะอาดด้วยมือ (Manual Cleaning)

เป็นการทำความสะอาดทั่วๆไปในโรงงาน ใช้อุปกรณ์ช่วยล้างที่เหมาะสม เช่น แปรงขนอ่อนเป็นต้น ข้อจำกัดคืออุปกรณ์เครื่องมือไม่สามารถใช้กับสารเคมีที่มีความเข้มข้นและอุณหภูมิสูงได้ เนื่องจากอาจเป็นอันตรายกับผู้ปฏิบัติงานได้ สำหรับอุปกรณ์ที่นิยมใช้การล้างด้วยมือ ได้แก่ ปั๊ม วาล์ว ข้อต่อ ไส้กรอง อ่างรับนมดิบ อ่างสำหรับชั่งนมดิบ ถังปรุงผสม ถังปรับระดับนม เครื่องบรรจุนม หัวบรรจุ

2.4.6.2 การล้างทำความสะอาดแบบ COP (Cleaning Out of Place)

การล้างทำความสะอาดวิธีนี้ คือ การถอดเครื่องจักรอุปกรณ์ออกเป็นชิ้นส่วน และนำมาล้างด้วยสารชะล้าง โดยการขัดถูด้วยแปรงหรืออุปกรณ์ที่เหมาะสม และการฆ่าเชื้อด้วยการแช่ในสารฆ่าเชื้อหรือน้ำร้อน ซึ่งมีขั้นตอนการล้าง 5 ขั้นตอน ซึ่งเป็นวิธีการทำความสะอาดที่ใช้กันโดยทั่วไป การล้างชิ้นส่วนเล็กๆอาจทำได้ด้วยแรงคนหรือใช้ COP Unit ทำด้วยเหล็กปลอดสนิม มีมอเตอร์ขับเคลื่อนแปรงทำความสะอาดภายในอ่าง และสามารถควบคุมอุณหภูมิได้

2.4.6.3 การล้างทำความสะอาดแบบ CIP (Cleaning In Place)

การทำความสะอาดแบบ CIP มักใช้กับระบบท่อ แท็งก์ขนาดใหญ่ เครื่องแลกเปลี่ยนความร้อนชนิดแผ่น และเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ การทำความสะอาดวิธีนี้จะทำให้อุปกรณ์สะอาดปราศจากเชื้อโรคที่เป็นอันตราย โดยการใช้สารเคมีที่เหมาะสม กำหนดระยะเวลาในการสัมผัส ให้เพียงพอต่อการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ กำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้สารเคมีแต่ละชนิด และกำหนดความเร็วในการไหลของน้ำและสารเคมีต่างๆ ความเร็วที่นิยมใช้ในการล้าง คือ ประมาณ 1.5 เมตร/ วินาที ในการล้างสำหรับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่นิยมใช้การล้างแบบ CIP ถังเก็บนมดิบ ท่อส่งนม ปั๊มนม เครื่องโฮโมจิไนส์ เครื่องพาสเจอร์ไรส์ ถังพักรอบรรจุ เครื่องบรรจุ

ปัจจัยที่มีผลต่อการ CIP

1) อัตราการไหลของน้ำและสารเคมี จะต้องมากกว่า 8,000 ลิตร/ชั่วโมง หรือ 1.5 เมตร/นาที ถ้าอัตราการไหลต่ำกว่า 8,000 ลิตร/ชั่วโมง จะมีผลทำให้ไม่สามารถชะล้างสิ่งสกปรกที่ติดค้างในท่อหรือถังได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ความเข้มข้นของสารเคมี สำหรับศูนย์รับนมดิบ

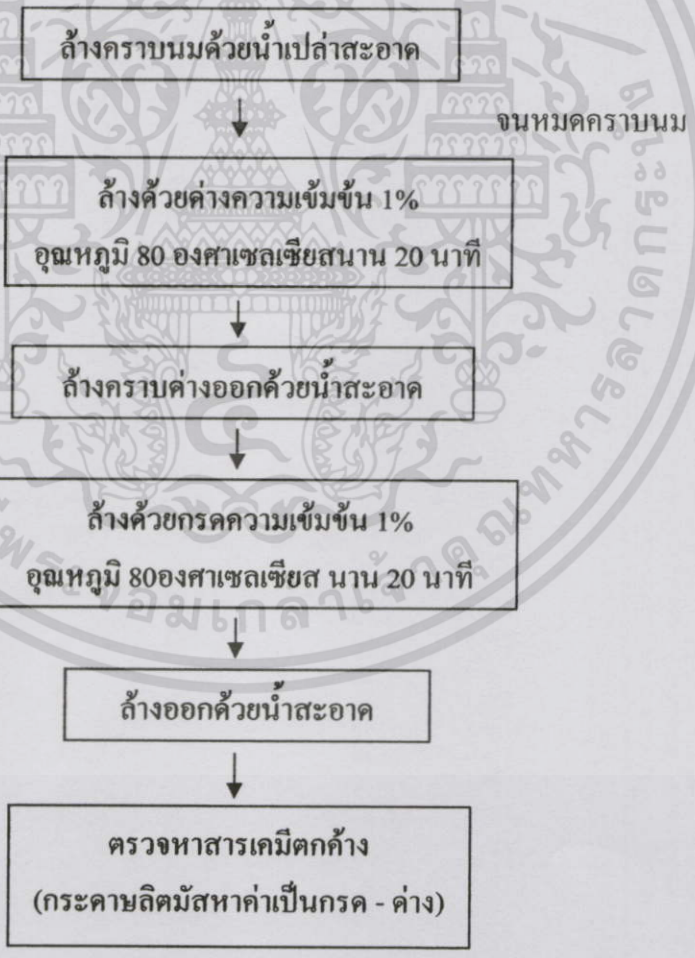
- สารละลายด่าง ความเข้มข้น 1 - 1.5%

- สารละลายกรด ความเข้มข้น 0.5 - 1.5%

ถ้าสารละลาย มีความเข้มข้นต่ำกว่าที่กำหนด จะทำให้ประสิทธิภาพในการล้างไม่ดีเท่าที่ควร อีกทั้งถ้าสารละลายมีความเข้มข้นสูงกว่าที่กำหนด จะทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และอุปกรณ์ ท่อถัง O-ring เสื่อมสภาพเร็ว

3) อุณหภูมิ อุณหภูมิที่ใช้ในการวนด่างไม่ต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ใช้ในการวนกรด ประมาณ 70 – 80 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าที่กำหนดทำให้ประสิทธิภาพในการทำความสะอาดไม่ดีเท่าที่ควร

4) เวลา เวลาที่ใช้การวนด่าง 20 นาที เวลาที่ใช้การวนกรด 10 นาที ถ้าเวลาที่ใช้ในการวนด่างและกรดน้อยกว่าที่กำหนดจะทำให้การชะล้างความสะอาดได้ไม่หมด แต่ถ้ามากไปจะทำให้สิ้นเปลืองเวลา



ภาพที่ 2.5 ขั้นตอนการทำความสะอาดแบบ Cleaning In Place (CIP)

ที่มา : ภัทราวรรณ (2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยว

Kim และคณะ (2006) ศึกษาการใช้ Chlorine , Chlorine dioxide และ Peroxyacetic acid base sanitizer (Tsunami 200 ^{R}) ในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* บนผิวของ แอปเปิ้ล มะเขือเทศ และผักกาด จากผลการศึกษาพบว่า Chlorine, Chlorine dioxide ที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 µg/ml ระยะเวลา 1 และ 5 นาที สามารถลดเชื้อได้ 3.38 และ 3.77 log CFU /Apple ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแอปเปิ้ลที่ล้างด้วยน้ำ และ Peroxyacetic acid- base sanitizer (Tsunami 200^{R}) เข้มข้น 40 µg/ml เวลา 1 นาทีสามารถลดเชื้อได้ *E. sakazakii* มากกว่า 4 log CFU /Apple ในมะเขือเทศ Chlorine, Chlorine dioxide ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml, Peroxyacetic acid- base sanitizer (Tsunami 200 ^{R}) เข้มข้น 40 µg/ml เวลา 5 นาที สามารถลดเชื้อได้ 3.70 log CFU /Tomato และในผักกาด Chlorine เข้มข้น 10 , 50, 100 µg/ml เวลา 1 นาที สามารถลดเชื้อได้ 1.61 – 2.50 log CFU /Sample, Peroxyacetic acid- base sanitizer (Tsunami 200 ^{R}) เข้มข้น 40 และ 80 µg/ml สามารถลดเชื้อได้มากกว่า 5.31 log CFU /Sample

กิตติกานต์ (2548) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenas* ในหลอดทดลองพบว่าโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenas* ในหลอดทดลองได้หมดภายในเวลา 1 นาที

Singh และคณะ (2002) ได้ศึกษา คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) ในการฆ่าเชื้อ *E. coli* O157:H7 บนผิวของผักกาดและแครอทขนาดเล็กโดยพบว่าการล้างผักกาดและแครอทด้วยสารละลาย คลอรีนไดออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 10 ppm สามารถลดเชื้อ *E.coli* O157:H7 ได้ถึง 1.48 -1.97 log cfu/g ภายในเวลา 10 นาที

Jui-Sen Peng และคณะ (2002) ได้ศึกษาความไวของเชื้อ *B. cereus* (cell, biofilm) ต่อการฆ่าเชื้อของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่าที่ความเข้มข้น 25 ppm ของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ สามารถลดเชื้อได้ 5 log cfu/ml ที่เวลา 15 วินาที

Bremer และคณะ (2005) ศึกษาประสิทธิภาพของโซดาไฟและกรดไนตริก ของการทำ CIP ในการฆ่าเชื้อและการขจัด Biofilm ในโรงนม จากการศึกษาพบว่า โซดาไฟและ กรดไนตริก สามารถขจัด Biofilm และสามารถลดเชื้อได้ 1.8 log reduction บนผิว Stainless steel การรวมกันของ โซดาไฟ กรดไนตริกกับสารประกอบอื่นๆ (Caustic additive + Nitric acid + Surfectant) สามารถลดเชื้อได้ 3.8 log reduction บนผิว Stainless steel

Kim และคณะ (2009) พบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่น (Water – soluble muscadine seed extracts) ซึ่งมีค่า pH อยู่ที่ 3.3 - 3.78 สามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ได้

Gill และคณะ (2004) พบว่ากรดแลคติก 4 % สามารถลดเชื้อ Coliforms และ *E.coli* ได้มากกว่า 1.5 log บนผิวเนื้อสดที่เวลา 60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Badoni และคณะ (2003) ได้ศึกษา การใช้กรดอะซิติกในการลดเชื้อบนเนื้อสัตว์ พบว่า กรดอะซิติก 1% สามารถลดเชื้อ *E.coli* ได้ 3.04 log cfu/cm^2 และ สามารถลดเชื้อ *Salmonella* ได้ 3.23 log cfu/cm^2

Capita และคณะ (2002) พบว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.175, 0.2 และ 0.220 % สามารถลดเชื้อ *Listeria monocytogenas* บนผิวเนื้อไก่ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นได้ 1.8, 1.84 และ1.96 log cfu/g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3. 1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1.1 แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$)	อาภากรเจริญ	ไทย
3.1.1.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Merck	เยอรมัน
3.1.1.3 กรดไนตริก (HNO_3)	Merck	เยอรมัน

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2.1 Buffered Peptone Water (ISO)	Oxiod	อังกฤษ
3.1.2.2 *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar	AES Laboratorie	อังกฤษ
3.1.2.3 Lauryl Sulfate Tryptose Broth	Oxiod	อังกฤษ
3.1.2.4 Standard Plate Count Agar	Oxiod	อังกฤษ
3.1.2.5 Tryptic Soy Agar	Oxiod	อังกฤษ
3.1.2.6 Tryptic Soy Broth	Oxiod	อังกฤษ
3.1.2.7 Violet Red Bile Agar	Oxiod	อังกฤษ
3.1.2.8 Yeast Extract	Oxiod	อังกฤษ

3.1.2.9 ชุดทดสอบ Oxidase

3.1.2.10 ชุดทดสอบทางชีวเคมี (API 20E)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.3.1 ตู้บ่ม (Incubator) อุณหภูมิ 44 ± 1 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sanyo ขนาดบรรจุ 126 ลิตร Model MIR – 153 S/N 60100282 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.3.2 ตู้บ่ม (Incubator) อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sanyo ขนาดบรรจุ 126 ลิตร Model MIR – 153 S/N 60100283 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.3.3 ตู้บ่ม (Incubator) อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sanyo ขนาดบรรจุ 126 ลิตร Model MIR – 153 S/N 60100284 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.3.4 เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ (Balance Electronic) ยี่ห้อ Mettler Toledo ช่วงการใช้งาน 0.001 – 600 g Model PG 603 – S Bala nce ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.1.3.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ยี่ห้อ Memmert ขนาดบรรจุ Model 760 Serial No. 1125341837 ประเทศเยอรมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH – Meter) ยี่ห้อ Radio Meter รุ่น PHM 8 L Serial. No. 38R84N163 ประเทศฝรั่งเศส

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

3.2.1 สหกรณ์รับน้ำนมดิบแห่งหนึ่งในจังหวัดสระบุรี

3.2.2 ห้องปฏิบัติการ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 ศึกษาหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มและตรวจหาเชื้อ *E. sakazakii* ในขั้นตอนต่างๆ ของการรับน้ำนม ทั้งก่อนและหลังการทำความสะอาดอุปกรณ์ของกระบวนการรับน้ำนม ตามตารางที่ 3.1 โดยทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 ครั้ง และตรวจวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ณ จุดต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

1) อ่างรับน้ำนม : swab บริเวณอ่างรับน้ำนมก่อนและหลังการทำความสะอาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร

2) อ่างพักน้ำนม : swab บริเวณอ่างพักน้ำนมก่อนและหลังการทำความสะอาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร

3) ท่อเชื่อมต่อระหว่างอ่างพักน้ำนมกับปั๊มส่งนมไปยังแท็งก์ : swab บริเวณท่อก่อนและหลังการทำความสะอาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร

4) ไส้กรองสแตนเลสของปั๊มส่งนม : swab บริเวณไส้กรองก่อนและหลังการทำความสะอาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร และสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ

5) แผงควบคุมการไหล : swab บริเวณท่อก่อนและหลังการทำความสะอาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร และสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ

6) ข้อต่อของท่อน้ำนมในส่วนแผงควบคุมการไหล: swab บริเวณข้อต่อของท่อก่อนและหลังการทำความสะอาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร

7) แท็งก์ : swab บริเวณช่องวาล์วเปิดแท็งก์และพื้นที่ส่วนบนแท็งก์ด้านในก่อนและหลังการทำความสะอาด และสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ

8) สายยางส่งนมจาก Cooling Tank กับรถบรรทุกน้ำนม : swab บริเวณสายยางก่อนและหลังการทำความสะอาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9) ท่อรับน้ำนมของรถ : swab บริเวณท่อรับน้ำนมของรถก่อนและหลังการทำความสะอาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร และสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ

ตารางที่ 3.1 แสดงกระบวนการรับน้ำนมและจุดเก็บตัวอย่าง

กระบวนการรับน้ำนม	จุดเก็บตัวอย่าง	ก่อนทำความสะอาด	หลังทำความสะอาด
1. เกษตรกรส่งนม	-	-	-
2. เทน้ำนมลงอ่างรับน้ำนม	swab อ่างรับน้ำนม	X	X
3. ปล่อยน้ำนมลงอ่างพักน้ำนม	swab อ่างพักน้ำนม	X	X
4. ปั๊มส่งนมจากอ่างพักน้ำนมไปยังแท็งก์	swab ท่อเชื่อมต่อระหว่างอ่างพักน้ำนมกับปั๊ม	X	X
	swab ไส้กรองสแตนเลส	X	X
	เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ	X	-
5. แผงควบคุมทิศทางการไหลนม	swab ท่อน้ำนม	X	X
	เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ	X	-
6. น้ำนมเข้า plate ฉดอุณหภูมิ	-	-	-
7. น้ำนมเข้าแท็งก์	swab แท็งก์ด้านบน	X	X
	เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ	X	-
8. ส่งน้ำนมขึ้นรถ	swab สายยางส่งนมจาก Cooling tank กับรถบรรทุก	X	X
	swab ท่อรับน้ำนมของรถน้ำนม	X	X
	เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ	X	-

<u>หมายเหตุ</u> : สัญลักษณ์ X หมายถึง จุดเก็บตัวอย่าง

\- หมายถึง ไม่เก็บตัวอย่าง

3.3.1.2 การตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (ภาคผนวก ก)

3.3.1.3 การตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (ภาคผนวก ก)

3.3.1.4 การตรวจหาเชื้อ *E. sakazakii* (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 ศึกษาผลของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไนตริก และสารแคลเซียมไฮโป-คลอไรท์ ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ตรวจพบจากการศึกษาในข้อ 3.2.1 โดยทำการศึกษาสารเคมีที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ และในระยะเวลาในใช้การฆ่าเชื้อ *E. sakazakii*

3.3.2.1 การเตรียมเชื้อ *E. sakazakii*

1) ถ่ายเชื้อจาก Stock Culture เขี่ยเชื้อลง TSA นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2) ใช้ loop เขี่ยโคโลนีเดี่ยวไป ลงเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 10 ml บ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-20 ชั่วโมง

3) ใช้ loop ถ่ายเชื้อจากข้อ 2) ลงใน TSB อีกครั้ง บ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-20 ชั่วโมง

4) ปิเปตสารละลายที่มีเซลล์เจริญจากข้อ 3) ปริมาตร 1 ml ลงใน TSB 100 ml ที่บรรจุในขวด 250 ml เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-20 ชั่วโมง เพื่อเป็นกล้าเชื้อ

5) ทำการตรวจหาปริมาณเชื้อในข้อ 4) แบบ Ten Fold Serial Dilution โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 0.1 % เป็นตัวเจือจาง เพาะเชื้อความเข้มข้นต่างๆ บน TSA โดยวิธี Pour Plate บ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-20 ชั่วโมง และทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ

3.3.2.2 ศึกษาผลของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii*

1) การเตรียมสารเคมี

เตรียมสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 %

2) ปิเปตสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลอดทดลองหลอดละ 10 ml ความเข้มข้นละ 3 หลอด

3) เติมเชื้อ *E. sakazakii* (จากข้อ 3.2.2.1) ที่ความเข้มข้น 4 log cfu/ml , 6 log cfu/ml และ 8 log cfu/ml ลงในหลอดสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ หลอดละ 0.1 ml เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น 2 log cfu/ml , 4 log cfu/ml และ 6 log cfu/ml ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมตัวอย่าง แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 5, 10, 15 และ 20 นาที เพื่อให้สารเคมีทำปฏิกิริยาในการฆ่าเชื้อ

4) ปิเปตสารละลายที่เติมเชื้อลงในเวลาต่างๆ ในแต่ละหลอดทดลองใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 ml แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่หลอมละลายแล้วมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส จานละ 15 ml โดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว (ประมาณ 5 นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35- 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง

- นับจำนวนโคโลนีที่เจริญในจานเพาะเชื้อ คำนวณเป็น cfu/ml แล้วบันทึกผล

3.3.2.3 ศึกษาผลของกรดไนตริก ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii*

1) การเตรียมสารเคมี

เตรียมกรดไนตริก ให้มีความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.5, 1 และ 1.5 %

2) ปิเปตกรดไนตริก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลอดทดลองหลอดละ 10 ml ความเข้มข้นละ 3 หลอด

3) เติมเชื้อ *E. sakazakii* (จากข้อ 3.2.2.1) ที่ความเข้มข้น 8 log cfu/ml ลงในหลอดสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ หลอดละ 0.1 ml เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น 6 log cfu/ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมตัวอย่าง แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 5, 10, 15 และ 20 นาที เพื่อให้สารเคมีทำปฏิกิริยาในการฆ่าเชื้อ

4) ปิเปตสารละลายที่เติมเชื้อลงในเวลาต่างๆ ในแต่ละหลอดทดลองใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 ml แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่หลอมละลายแล้วมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส จานละ 15 ml โดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว (ประมาณ 5 นาที)

5) นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35- 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง

6) นับจำนวนโคโลนีที่เจริญในจานเพาะเชื้อ คำนวณเป็น cfu/ml แล้วบันทึกผล

7) ศึกษาผลของกรดไนตริกที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของการนับเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

- ถ่ายเชื้อ 1 ml จากหลอด TSB ที่มีเชื้อ *E. sakazakii* 6 log cfu/ml และเติมกรดไนตริกที่ความเข้มข้น1 และ1.5 % (จากข้อ 3) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 100 ml เพื่อที่จะตรวจสอบว่าความเข้มข้นของกรดไนตริกสามารถทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ได้อย่างสมบูรณ์ใน 1 นาที (ซึ่งถ้าอาหารที่มีกรดไนตริก 1 และ1.5 % ไม่สามารถทำลาย *E. sakazakii* ที่ 6 log cfu/ml ได้หมดในเวลา 1 นาที จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB มีเชื้อ *E. sakazakii* เจริญจนเห็นความขุ่น)

- นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดูลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (TSB ขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ *E. sakazakii*)

3.3.2.4 ศึกษาผลของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii*

1) การเตรียมสารเคมี

- เตรียมสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ให้มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ100 ppm

2) ปิเปตสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลอดทดลองหลอดละ 10 ml ความเข้มข้นละ 3 หลอด

3) เติมเชื้อ *E. sakazakii* (จากข้อ 3.2.2.1) ที่ความเข้มข้น 8 log cfu/ml ลงในหลอดสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ หลอดละ 0.1 ml เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น 6 log cfu/ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมตัวอย่าง แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 5, 10, 15 และ 20 นาที เพื่อให้สารเคมีทำปฏิกิริยาในการฆ่าเชื้อ

4) ปิเปตสารละลายที่เติมเชื้อลงในเวลาต่างๆ ในแต่ละหลอดทดลองใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 ml แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่หลอมละลายแล้วมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส จานละ 15 ml โดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว (ประมาณ 5 นาที)

5) นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35- 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง

6) นับจำนวนโคโลนีที่เจริญในจานเพาะเชื้อ คำนวณเป็น cfu/ml แล้วบันทึกผล

7) ศึกษาผลสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของการนับเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

- ถ่ายเชื้อ 1 ml จากหลอด TSB ที่มีเชื้อ *E. sakazakii* 6 log cfu/ml และเติมสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm (จากข้อ 3) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 100 ml เพื่อที่จะตรวจสอบว่าความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์สามารถทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ได้อย่างสมบูรณ์ ใน 1 นาที (ซึ่งถ้าอาหารที่มีสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 100 และ 200 ppm ไม่สามารถทำลาย *E. sakazakii* ที่ 6 log cfu/ml ได้หมดในเวลา 1 นาที จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB มีเชื้อ *E. sakazakii* เจริญจนเห็นความขุ่น)

- นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

- ดูลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (TSB ขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ *E. sakazakii*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 ศึกษาผลของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไนตริก และสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีนมผสมอยู่ 1 %

หลังจากการศึกษาความเข้มข้นของสารเคมี (ข้อ 3.2.2) ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ทำการเลือกความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิด ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปนเปื้อนคราบนม 1 % เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารเคมี

3.3.3.1 การเตรียมสารเคมี

1) แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ให้มีความเข้มข้น 25, 50 และ100 ppm

2) โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 %

3) กรดไนตริก ให้มีความเข้มข้น 0.06 0.08 0.1 และ 0.2 %

3.3.3.2 การทดลอง

1) ปิเปตเชื้อ *E. sakazakii* (จากข้อ 3.2.2.1) ความเข้มข้น 8 log cfu/ml ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.1 ml เติมนม UHT ลงในสารละลายเชื้อ ลงในหลอด หลอดละ 0.1 ml เพื่อให้ได้เชื้อที่มีการปนเปื้อนคราบนม 1 %

2) ปิเปตสารเคมีที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 10 ml ความเข้มข้นละ 3 หลอด เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น 6 log cfu/ml

3) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมตัวอย่าง แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมให้สารเคมีทำปฏิกิริยาในการฆ่าเชื้อ

4) ปิเปตสารละลายที่เติมเชื้อลงในเวลาต่างๆ ในแต่ละหลอดทดลองใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 ml แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่หลอมละลายแล้วมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส จานละ 15 ml โดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว (ประมาณ 5 นาที)

5) นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35- 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง

6) นับจำนวนโคโลนีที่เจริญในจานเพาะเชื้อ คำนวณเป็น cfu/ml แล้วบันทึกผล

3.3.4 การวางแผนการทดลองและประเมินผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทุกการทดลอง มาวิเคราะห์หาความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (SPSS analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละวิธี ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม และตรวจหาเชื้อ *E. sakazakii* ในขั้นตอนต่างๆ ของการรับน้ำนมทั้งก่อนและหลังการทำความสะอาดอุปกรณ์ของกระบวนการรับน้ำนม

จากการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ ณ จุดต่างๆในกระบวนการรับน้ำนมภายหลังการรับน้ำนมจากเกษตรกรของสหกรณ์รับน้ำนมทำการตรวจหาเชื้อ *E. sakazakii* ควบคู่กับการตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งจากการตรวจพบว่า จากบริเวณปั๊มรับน้ำนมดิบ ท่อนมของแผงควบคุมทิศทางการไหลนม แท็งก์ และท่อรับน้ำนมของรถ ไม่พบเชื้อ *E. sakazakii* ส่วนปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.1 - 2.3 x 10^6 cfu/ml (ตารางที่ 4.1) โดยค่าดังกล่าวไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานน้ำนมดิบตามระเบียบมาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของกรมปศุสัตว์ พ.ศ. 2542 ซึ่งได้กำหนดค่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน 4.0 x 10^5 cfu/ml และค่ามาตรฐานน้ำนมดิบของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กำหนดค่าระดับชั้นมาตรฐานมีปริมาณเชื้อ 4.0 x 10^5 - 6.0 x 10^5 cfu/ml ซึ่งปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณสูงกว่าระดับมาตรฐาน ส่วนปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.6 x 10^3 – 1.8 x 10^4 cfu/ml ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานน้ำนมดิบตามระเบียบมาตรฐานฟาร์มกรมปศุสัตว์ โดยค่ามาตรฐานกำหนดไม่เกิน 1.0 x 10^3 cfu/ml

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และเชื้อ *E. sakazakii* ในตัวอย่างน้ำนมดิบของกระบวนการรับน้ำนม จากการตรวจสอบ 3 ครั้ง

จุดเก็บตัวอย่าง	แบคทีเรียทั้งหมด (cfu/ml)	แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (cfu/ml)	เชื้อ *E. sakazakii*
ปั๊มรับน้ำนมดิบ	2.3 x 10^6	1.6 x 10^4	ไม่พบ
แผงควบคุมทิศทางการไหลนม	1.8 x 10^6	1.8 x 10^4	ไม่พบ
แท็งก์	1.8 x 10^6	1.6 x 10^3	ไม่พบ
ท่อรับน้ำนมของรถ	1.1 x 10^6	1.1 x 10^4	ไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และเชื้อ *E. sakazakii* ในตัวอย่าง swab อุปกรณ์ของกระบวนการรับน้ำนม จากการตรวจสอบ 3 ครั้ง

จุดเก็บตัวอย่าง	แบคทีเรียทั้งหมด (cfu /100 cm^2)		แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (cfu /100 cm^2)		เชื้อ *E. sakazakii*	
	ก่อนทำความสะอาด	หลังทำความสะอาด	ก่อนทำความสะอาด	หลังทำความสะอาด	ก่อนทำความสะอาด	หลังทำความสะอาด
อ่างรับน้ำนม	7.5×10^4	3.5×10^3	1.4×10^2	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
อ่างพักน้ำนม	8.9×10^4	8.0×10^2	7.8×10^2	1	ไม่พบ	ไม่พบ
พื้นบริเวณคนเทนมอ่างรับนม	1.8×10^5	1.0×10^4	1.5×10^3	6.0×10	66.66%	33.33%
ท่อเชื่อมระหว่างอ่างพักน้ำนมกับปั๊ม	6×10^4	2.0×10^2	1.6×10^2	1.0×10	ไม่พบ	ไม่พบ
ไส้กรองสแตนเลส	6.9×10^4	5.0×10	5.5×10^2	ไม่พบ	33.33%	ไม่พบ
แผงควบคุมทิศทางการไหลนม	2.7×10^4	2.2×10^2	5.0×10	1	33.33%	ไม่พบ
ข้อต่อท่อน้ำนม	3.3×10^5	ไม่พบ	7.0×10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ช่องวาล์วเปิดแท็งก์	2.4×10^3	5	1.0×10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
พื้นที่ส่วนบนแท็งก์ด้านใน	1.5×10^3	8	7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
สายยางส่งนมด้านต่อกับแท็งก์	1.1×10^4	1.0×10	3.0×10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
สายยางส่งนมด้านต่อกับรถบรรทุกน้ำนม	3.2×10^4	3.0×10	4.7×10^2	ไม่พบ	33.33%	ไม่พบ
ท่อรับน้ำนมของรถ	1.8×10^4	2.0×10	2.0×10^2	1	66.66%	ไม่พบ

จากการเก็บตัวอย่าง swab ในอุปกรณ์รับน้ำนมก่อนการทำความสะอาด พบว่าส่วนใหญ่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด $1.5 \times 10^3 - 8.9 \times 10^4$ cfu/100 cm^2 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม $7 - 7.8 \times 10^2$ cfu/100 cm^2 และพบเชื้อ *E. sakazakii* หลายบริเวณ ซึ่งบริเวณที่ตรวจพบเชื้อดังกล่าวได้แก่ ไส้กรองสแตนเลส ท่อนมของแผงควบคุมทิศทางการไหลนม และสายยางส่งนมด้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อกับรถบรรทุกน้ำนม คิดเป็นบริเวณละ 33.33% นอกจากนี้พบเชื้อ *E. sakazakii* บริเวณท่อรับน้ำนมของรถบรรทุกน้ำนม และพื้นบริเวณคนเทนมของอ่างรับน้ำนม 66.66% ซึ่งในส่วนของไส้กรองที่มีการพบเชื้อ *E. sakazakii* อาจเป็นเพราะเป็นจุดกรองสิ่งสกปรก เช่น เศษหญ้า เศษดิน ใบไม้ ขนวัว ฯลฯ ที่ปะปนมากับน้ำนมหรือภาชนะใส่น้ำนม ทำให้เชื้อ *E. sakazakii* เหลือติดกับเศษสิ่งสกปรกเหล่านี้ได้ ส่วนสายยางส่งนมด้านต่อกับท่อรับน้ำนมของรถบรรทุกและท่อรับน้ำนมของรถบรรทุกน้ำนม เป็นจุดที่เชื่อมต่อกัน จึงทำให้เกิดการสะสมของเชื้อ *E. sakazakii* มากจนมีโอกาสตรวจพบได้ และบริเวณสองจุดนี้มีแรงดันของน้ำนมจากแท็งก์น้อยกว่าจุดอื่นๆ แต่หลังจากการทำความสะอาดในส่วนอ่างรับน้ำนม อ่างพักน้ำนม และท่อเชื่อมต่อระหว่างอ่างพักน้ำนมกับปั๊มส่งน้ำนม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลงเหลือ $2.0 \times 10^2 - 3.5 \times 10^3$ cfu/100 cm^2 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มพบ 1 – 10 cfu/100 cm^2 และไม่พบเชื้อ *E. sakazakii* ในส่วนของอุปกรณ์ที่ทำความสะอาดด้วยวิธี CIP (ตั้งแต่ไส้กรองสแตนเลส จนถึงท่อรับน้ำนมของรถ) จะมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลงเหลือ $5 – 2.2 \times 10^2$ cfu/100 cm^2 ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารในภาชนะสัมผัสอาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2536 กำหนดค่าแบคทีเรียทั้งหมดควรต่ำกว่า 1.0×10^3 cfu/100 cm^2 และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่เหลือพบบริเวณท่อนมของแผงควบคุมทิศทางการไหลนมและท่อรับน้ำนมของรถบรรทุกนม พบ 1 cfu/100 cm^2 ส่วนในบริเวณอื่นไม่พบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และเชื้อ *E. sakazakii* ทุกบริเวณของการ swab อุปกรณ์ในกระบวนการรับน้ำนมดิบ แสดงว่าการทำความสะอาดด้วยระบบ CIP ของสหกรณ์รับน้ำนมแห่งนี้สามารถลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มได้ รวมทั้งสามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ได้ทุกจุด มีเพียงบริเวณพื้นคนเทนมพบเชื้อ *E. sakazakii* ก่อนการทำความสะอาด 66.66 % หลังการทำความสะอาดยังตรวจพบเชื้อ 33.33% ซึ่งจากผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า บริเวณนี้ควรมีการปรับปรุงวิธีการทำความสะอาด โดยอาจต้องเพิ่มสารฆ่าเชื้อ เช่น แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อการฆ่าเชื้อและล้างตามด้วยน้ำสะอาด

จากการศึกษาข้างต้นเห็นได้ว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. sakazakii* ในบริเวณต่างๆ ของอุปกรณ์ในกระบวนการรับน้ำนมและเมื่อผ่านการทำความสะอาดด้วยสารชะล้างในส่วนของอ่างรับนม อ่างพักนม และผ่านการทำความสะอาดด้วยวิธี CIP ในส่วนปั๊มส่งนม ท่อส่งนม แท็งก์สายยางส่งนม และรถบรรทุกนม การทำความสะอาดดังกล่าวสามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ได้ แต่เนื่องด้วยวิธี ISO/TS22964 เป็นวิธีการตรวจในเชิงคุณภาพที่ให้ผลตรวจเป็นพบ/ไม่พบ ซึ่งปริมาณเชื้อที่ตรวจพบอาจมีปริมาณน้อย จึงทำให้การทำความสะอาดด้วยสารชะล้างและวิธี CIP สามารถลดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาในขั้นตอนต่อไปเป็นการศึกษาปริมาณของเชื้อ *E. sakazakii* ในระดับเชื้อต่างๆ เพื่อยืนยันประสิทธิภาพความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในสหกรณ์รับน้ำนมรวมทั้งการทำความสะอาดด้วยวิธี CIP ของสหกรณ์รับน้ำนมในการฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

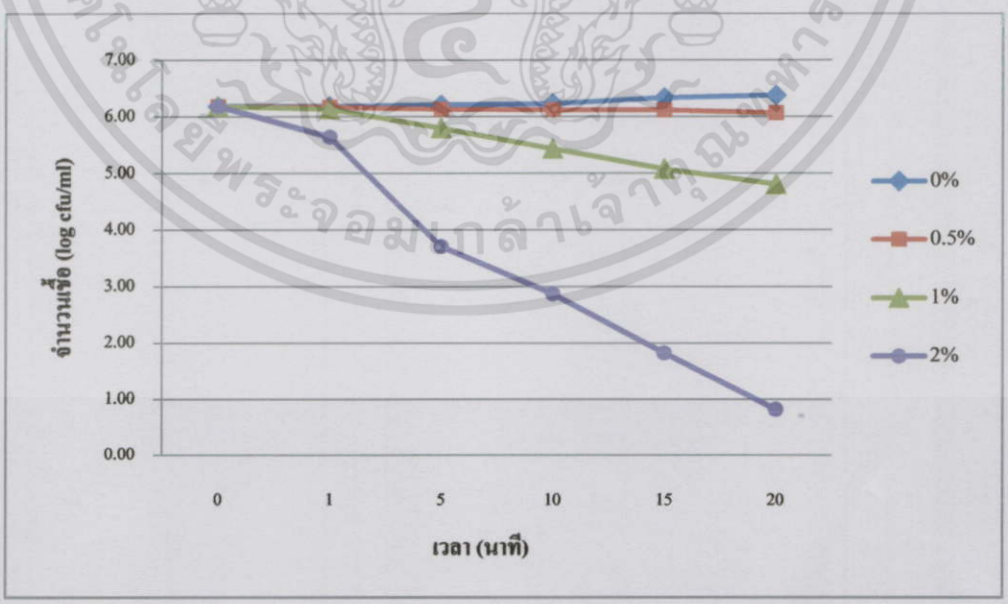
E. sakazakii ทั้งนี้เพื่อเป็นการทวนสอบยืนยันกระบวนการทำความสะอาดของศูนย์รับนมว่ามีประสิทธิภาพและปลอดภัย ไม่เป็นแหล่งสะสมของเชื้อ *E. sakazakii* ได้

4.2 ผลของความเข้มข้นสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไนตริก และสารแคลเซียมไฮโป-คลอไรท์ และเวลาที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ตรวจพบในศูนย์รับน้ำนม

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเคมี 3 ชนิด คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไนตริก และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาต่างกันในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลอง ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

4.2.1 สารโซเดียมไฮดรอกไซด์

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระดับ 0, 0.5, 1 และ 2 % ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ใช้เวลา 0, 1, 5, 10, 15 และ 20 นาที ในหลอดทดลอง โดยสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5, 1, และ2 % สามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ได้ 0.12, 1.38 และ5.37 log cfu/ml ตามลำดับ ที่เวลา 20 นาที (ภาพที่ 4.1 และภาคผนวกตารางที่ ข1) พบว่าความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีกว่าความเข้มข้นต่ำและที่เวลาเพิ่มขึ้นมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



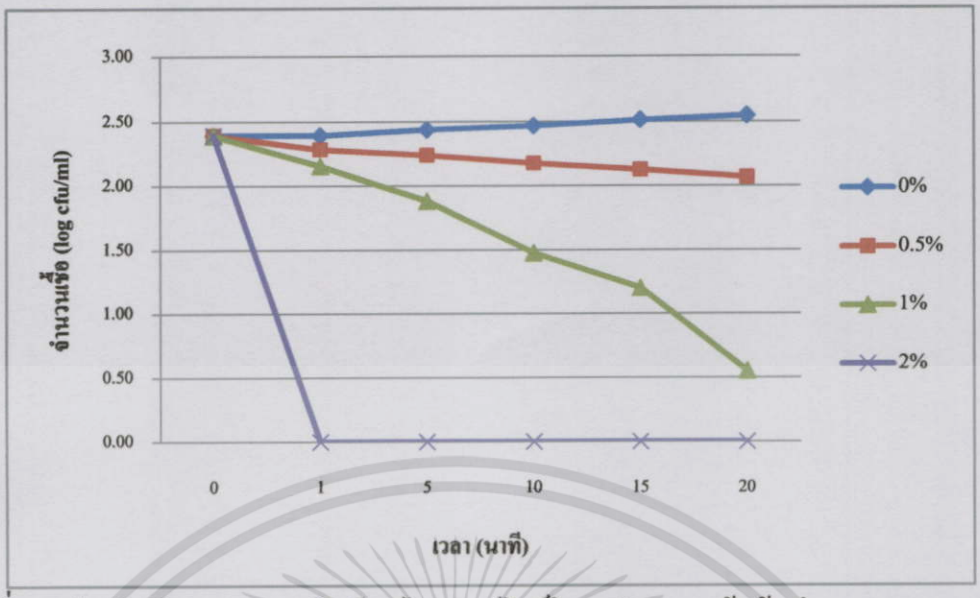
ภาพที่ 4.1 ประสิทธิภาพของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาพบว่าสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, และ 2 % ไม่สามารถทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ได้หมดที่เวลา 20 นาที จึงได้ทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไปโดยลดปริมาณเชื้อ *E. sakazakii* ลง 2 ระดับ คือ 2 log cfu/ml และ 4 log cfu/ml ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 และ 1 % สามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 4 log cfu/ml ได้ลดลงเหลือ 0.33 และ 1.67 log cfu/ml ส่วนความเข้มข้น 2 % สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 10 นาที (ภาพที่ 4.2 และภาคผนวกตารางที่ ข2) และสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 และ 1 % สามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 2 log cfu/ml ได้ลดลงเหลือ 0.32 และ 1.84 log cfu/ml ส่วนความเข้มข้น 2 % สามารถฆ่าเชื้อได้โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 1 นาที (ภาพที่4.3 และ ภาคผนวกตารางที่ ข3) ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเวลาที่ใช้และความเข้มข้นสารมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีส่วนสำคัญต่อระยะเวลาการฆ่าเชื้อและระดับความเข้มข้นของสารเคมี ซึ่งการศึกษาการลดปริมาณเชื้อ *E. sakazakii* โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งสอดคล้องกับ Capita และคณะ(2002) พบว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.175, 0.2, 0.220 % สามารถลดเชื้อ *Listeria monocytogenas* บนผิวเนื้อไก่ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นได้ 1.80, 3.0 และ 3.28 log

ภาพที่ 4.2 ประสิทธิภาพของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 4 log cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

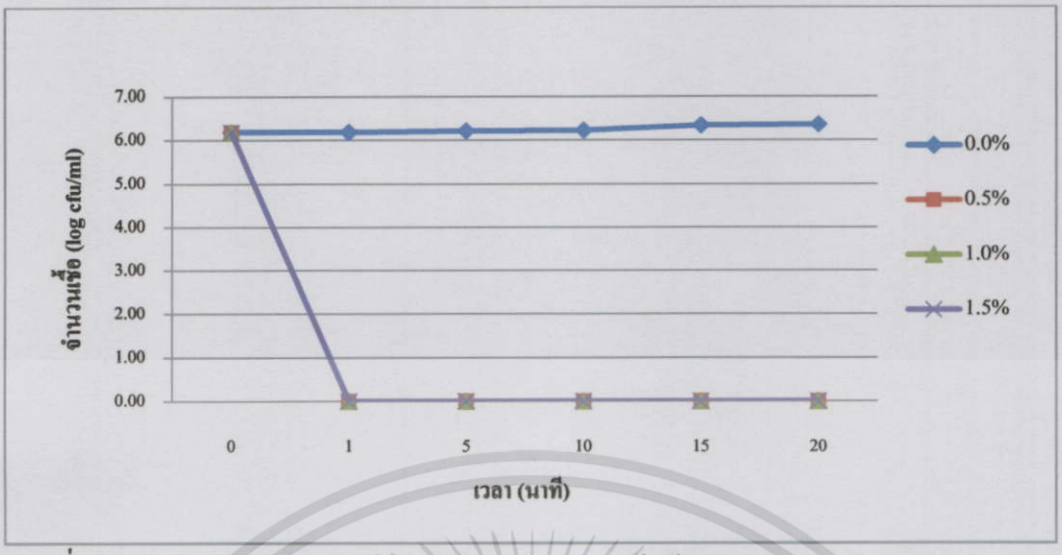


ภาพที่ 4.3 ประสิทธิภาพของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 2 log cfu/ml

4.2.2 กรดไนตริก

ศึกษาระดับความเข้มข้นของกรดไนตริก ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml โดยใช้ระดับความเข้มข้นตามที่ศูนย์รับน้ำนมใช้ล้างด้วยวิธี CIP คือ 0.5 - 1.5 % ที่เวลา 0, 1, 5, 10, 15 และ 20 นาที ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ากรดไนตริกความเข้มข้นดังกล่าวสามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ได้หมดภายในเวลา 1 นาที (ดังภาพที่ 4.4 ภาคผนวกตารางที่ ข4) จึงศึกษาระดับความเข้มข้นของกรดไนตริก ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าโดยใช้ระดับ 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.1 % เพื่อเป็นการยืนยันว่าที่ระดับความเข้มข้นใดสามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดี ซึ่งจากการศึกษาพบว่ากรดไนตริกความเข้มข้น 0.07 % ขึ้นไป สามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองที่ระดับ 6 log cfu/ml ได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใช้เวลา 1 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 0.04, 0.05 และ 0.06% ต้องใช้เวลา 5 นาที จึงไม่พบเชื้อ ส่วนความเข้มข้นที่ 0.01, 0.02 และ 0.03% สามารถฆ่าเชื้อได้ลดลงตามลำดับ เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม (ความเข้มข้น 0 % ไม่มีการเติมกรดไนตริก) จะเห็นได้ว่าเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อและความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้มีผลต่อจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. sakazakii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 4.5 และภาคผนวกตารางที่ข 5)โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีที่ใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ถ้ายิ่งใช้เวลานานขึ้นจะยิ่งเพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ประสิทธิภาพของกรดไนตริกในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml

ภาพที่ 4.5 ประสิทธิภาพของกรดไนตริกในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นกรดไนตริก ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml เวลา 1 นาที

ความเข้มข้น HNO_3	ผลของความเข้มข้นกรดไนตริก ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* เวลา 1 นาที
0%	+
1 %	-
1.5%	-

+ คือ มีการเจริญของเชื้อ *E. sakazakii* จน TSB ขุ่น เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

— คือ ไม่พบการเจริญของเชื้อ *E. sakazakii* จน TSB ขุ่น เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เนื่องจากความเข้มข้นของกรดไนตริกที่ทำการศึกษาทุกความเข้มข้นข้างต้น มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml หมดได้ภายใน 1 นาที เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของการนับเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ว่าความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อที่ศึกษาในอาหาร TSA ที่อาจจะมีความเข้มข้นของกรดไนตริกในปริมาณที่เพียงพอที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. sakazakii* ในอาหาร TSA (0.1-0.15 %) ดังนั้นจึงทำการถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองที่มีกรดไนตริกความเข้มข้น 1 และ 1.5 % หลังจากทำปฏิกริยาเป็นเวลา 1 นาที ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวด TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ไม่มีสารฆ่าเชื้อ (อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จะมีความเข้มข้นของกรดไนตริกเหลือ 0.01- 0.015 % ซึ่งไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *E. sakazakii*) และทำการบ่มดูการเจริญของเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อยืนยันว่ากรดไนตริก 1 และ1.5 % สามารถทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 1 นาที ซึ่งถ้าอาหารที่มีกรดไนตริก 1 และ 1.5 % ไม่สามารถทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml ให้หมดได้ในเวลา 1 นาที ซึ่งจะทำให้อาหารเลี้ยง TSB มีเชื้อเจริญจนเห็นความขุ่นที่ระยะเวลาและอุณหภูมิในการบ่มข้างต้น จากผลการศึกษาดังตารางที่ 4.3 พบว่าหลังการบ่ม 18 ชั่วโมง TSB ที่ถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองกรดไนตริก 1 และ 1.5 % ไม่พบการเจริญของเชื้อ *E. sakazakii* เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม ซึ่งแสดงว่าความเข้มข้นของกรดไนตริก 1 และ 1.5 % สามารถทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml ได้อย่างสมบูรณ์

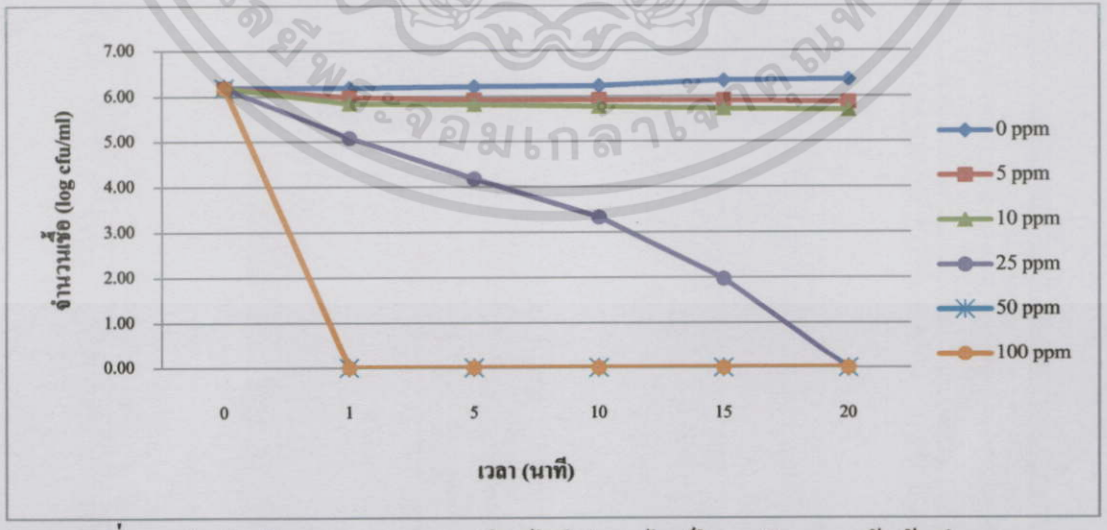
การยับยั้งและการทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ของกรดไนตริก มีผลเนื่องจากความสามารถในการแตกตัว (pK_a) และความเฉพาะเจาะจงของกรดในการทำลายจุลินทรีย์ กรดซึ่งอยู่ในรูปของกรดที่ไม่แตกตัวจะจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เป็นผลให้กรดในรูปที่แตกตัวสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ภายในของจุลินทรีย์ และเกิดการรวมตัวกับสารภายในเซลล์ เป็นผลให้ภายในเซลล์มีความเป็นกรดเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยจุลินทรีย์พยายามรักษาสมดุลของ pH ภายในเซลล์ แต่เมื่อค่า pH ของสภาวะแวดล้อมลดลง ทำให้เกิดการผ่านเข้าออกของสารอาหาร และเกิดการรั่วไหลของเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก มีผลไปยับยั้งการเมตาบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์หรือทำให้กิจกรรมภายในเซลล์ลดลง และทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้และตายในที่สุด ซึ่งรูปแบบการแตกตัวของกรดขึ้นอยู่กับค่า pK_a โดยกรดที่ค่า pK_a สูงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดี (จุฑารัตน์, 2545)

4.2.3 สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์

วัตถุประสงค์ในการศึกษาสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* สืบเนื่องมาจากศูนย์รับน้ำนม มีการใช้สารดังกล่าวในการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ อุปกรณ์ต่างๆที่สัมผัสกับน้ำนม เช่น ข้อต่อในส่วนแผงควบคุมทิศทางการไหล ไส้กรองสแตนเลส เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษาสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm ที่เวลา 0, 1, 5, 10, 15 และ 20 นาที ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลอง พบว่าสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับความเข้มข้น 5, 10 และ 25 ppm สามารถฆ่าเชื้อได้ลดลงตามลำดับ เมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (0 ppm) นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อและความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้มีผลต่อจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. sakazakii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ถ้ายิ่งใช้เวลานานจะยิ่งเพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อได้ดี โดยจากการทดลอง สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 และ 50 ppm พบว่าสามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ให้หมดไปได้ในเวลาเพียง 1 นาที (ดังภาพที่ 4.6 และภาคผนวกตารางที่ ข 6)



ภาพที่ 4.6 ประสิทธิภาพของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml เวลา 1 นาที

ความเข้มข้น $Ca(OCl)_2$	ผลของความเข้มข้นสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* เวลา 1 นาที
0 ppm	อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น
100 ppm	อาหารเลี้ยงเชื้อใส
200 ppm	อาหารเลี้ยงเชื้อใส

\+ คือ มีการเจริญของเชื้อ *E. sakazakii* จน TSB ขุ่น เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

— คือไม่พบการเจริญของเชื้อ *E. sakazakii* จน TSB ขุ่น เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เนื่องจากความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ทำการศึกษาทุกความเข้มข้นข้างต้น มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml หมดได้ภายใน 1 นาที เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของการนับเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ว่าความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อที่ศึกษาในอาหาร TSA ที่อาจจะมีความเข้มข้นของกรดไนตริกในปริมาณที่เพียงพอที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. sakazakii* ในอาหาร TSA (10 - 20 ppm) ดังนั้นจึงทำการถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองที่มีสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm หลังจากทำปฏิกริยาเป็นเวลา 1 นาที ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวด TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ไม่มีสารฆ่าเชื้อ (อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จะมีความเข้มข้นของกรดไนตริกเหลือ 1 - 2 ppm ซึ่งไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *E. sakazakii*) และทำการบ่มดูการเจริญของเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อยืนยันว่าสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 100 และ 200 ppm สามารถทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 1 นาที ซึ่งถ้าอาหารที่มีสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 100 และ 200 ppm ไม่สามารถทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml ให้หมดได้ในเวลา 1 นาที ซึ่งจะทำให้อาหารเลี้ยง TSB มีเชื้อเจริญจนเห็นความขุ่นที่ระยะเวลาและอุณหภูมิในการบ่มข้างต้น จากผลการศึกษาดังตารางที่ 4.4 พบว่าหลังการบ่ม 18 ชั่วโมง TSB ที่ถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 100 และ 200 ppmไม่พบการเจริญของเชื้อ *E. sakazakii* เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม ซึ่งแสดงว่าความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ดังกล่าวสามารถทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml ได้อย่างสมบูรณ์

ผลของคลอรีนในการทำลายเชื้อ *E. sakazakii* อาจเนื่องจากคลอรีนจะไปทำลายทั้งเอนไซม์และระบบการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์เป็นโปรตีนจึงถูกคลอรีนเข้าไปเปลี่ยนโครงสร้าง และทำให้การรวมตัว (coagulase) ของโปรตีนเสียไป (Bryan และคณะ, 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีเอนไซม์หลายชนิดที่ถูกทำลายด้วยคลอรีน ได้แก่ triosphosphate dehydrogenase, glucose oxidase, d-amino acid oxidase , transaminase, succinic oxidase เป็นต้น Chereminisnoff และ Trattner (1981) กล่าวว่า เอนไซม์ที่ไวต่อการทำลายของคลอรีนส่วนมากเป็นเอนไซม์กลุ่มซัลไฮดริล ส่วนเอนไซม์ที่ไม่ใช่กลุ่มนี้ เช่น คะตะเลส (catalase) แม้การทำงานของเอนไซม์ไม่ถูกรบกวนโดยคลอรีน แต่การรบกวนเอนไซม์และระบบเอนไซม์ของคลอรีนนี้มีผลต่อการเกิดออกซิเดชั่นของกลูโคส (glucose oxidation) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำกลูโคสมาใช้ได้ ทำให้เซลล์ขาดอาหารและทำให้เซลล์ตายลงได้ ซึ่งผลของการยับยั้งและทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ด้วยคลอรีนนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim และคณะ (2006) ซึ่งพบว่าการใช้ Chlorine และ Chlorine dioxide ในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* บนผิวของแอปเปิ้ล มะเขือเทศ และผักกาด โดยที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 µg/ml ระยะเวลา 1 และ 5 นาที สามารถลดเชื้อได้ 3.38 และ 3.77 log cfu/apple ตามลำดับ ในมะเขือเทศ Chlorine และ Chlorine dioxide ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เวลา 5 นาที สามารถลดเชื้อได้ 3.70 log cfu/tomato และในผักกาด Chlorine เข้มข้น 10 , 50 และ 100 µg/ml เวลา 1 นาที สามารถลดเชื้อได้ 1.61 – 2.50 log cfu/sample

นอกจากนี้ผลของการยับยั้งและทำลายเชื้อ *E. sakazakii* ด้วยคลอรีนยังสอดคล้องกับการศึกษาการใช้คลอรีนในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น กิตติกานต์ (2548) ได้ทำการศึกษาผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ในการฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenas* ในหลอดทดลองพบว่าโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenas* ในหลอดทดลองได้หมดภายในเวลา 1 นาที

Singh และคณะ (2002) ได้ศึกษาคลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) ในการฆ่าเชื้อ *E. coli* O157:H7 บนผิวของผักกาดและแครอทขนาดเล็ก โดยพบว่าการล้างผักกาดและแครอทด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 10 ppm สามารถลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ถึง 1.48 -1.97 log cfu/g ภายในเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

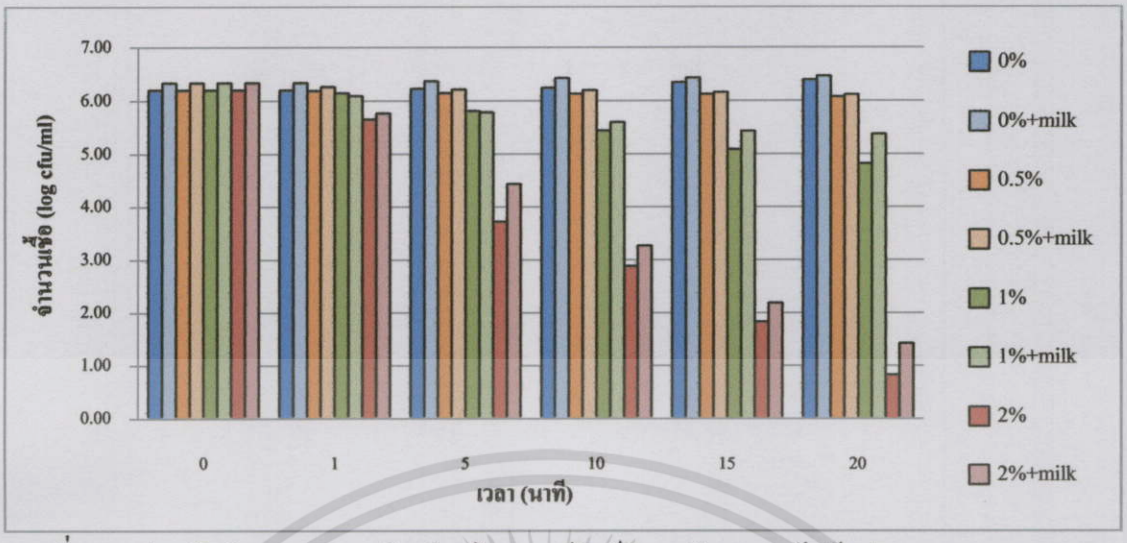
4.3 ศึกษาผลการฆ่าเชื้อของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไนตริกที่มีต่อเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีนมผสมอยู่ 1 %

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเคมี 3 ชนิด คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไนตริก และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาต่างกันในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลอง ทำการศึกษาในขั้นต่อไปโดยการศึกษาความเข้มข้นของสารดังกล่าวต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีนมผสมอยู่ 1 % เพื่อต้องการยืนยันประสิทธิภาพของสารเคมี เมื่อมีน้ำนมตกค้างอยู่ จะยังคงประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* หรือไม่ ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

4.3.1 สารโซเดียมไฮดรอกไซด์

ศึกษาสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 % ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 % ในหลอดทดลอง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารเคมีและระยะเวลาการใช้มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีนมผสมอยู่ 1 % อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยพบว่าความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีกว่าความเข้มข้นต่ำ (ภาพที่ 4.7) โดยสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 % สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ผสมกับน้ำนม 1 % ได้ลดลงเหลือ 1.42 log cfu/ml ที่เวลา 20 นาที ความเข้มข้น 1 % สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ผสมกับน้ำนม 1 % ได้ลดลงเหลือ 5.37 log cfu/ml ที่เวลา 20 นาที นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของแต่ละความเข้มข้นของสารเคมีที่มีผลต่อจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. sakazakii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีที่ใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ถ้ายิ่งใช้เวลานานขึ้น จะยิ่งเพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อได้ (ภาคผนวกตารางที่ ข7) และเมื่อเปรียบเทียบสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ไม่มีนมผสม พบว่าสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2% สามารถฆ่าเชื้อที่ระดับ 6 log cfu/ml ได้ลดเหลือ 0.82 log cfu/ml และความเข้มข้น 1% สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ลดลงเหลือ 4.81 log cfu/ml ที่ระยะเวลา 20 นาที แสดงว่าน้ำนมมีผลในการลดประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งสอดคล้องกับ Capita และคณะ(2002) พบว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.175, 0.2, 0.220 % สามารถลดเชื้อ *Listeria monocytogenas* บนผิวเนื้อไก่ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นได้ 1.80, 3.0 และ 3.28 log

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ประสิทธิภาพของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml และการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %

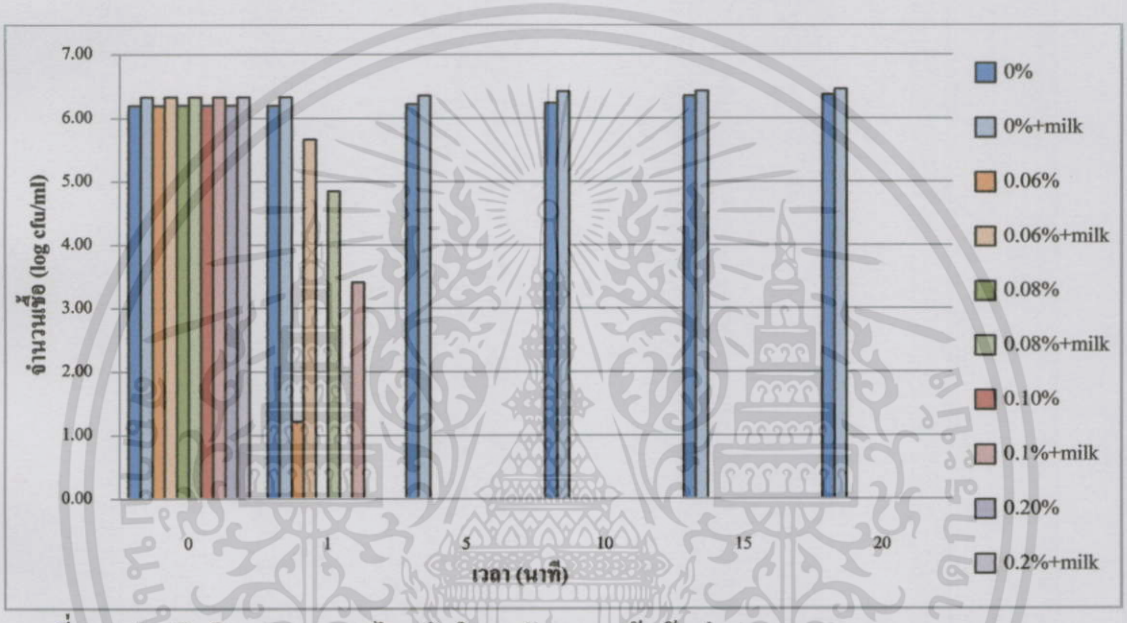
4.3.2 กรดไนตริก

จากการศึกษากรดไนตริกที่ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06 และ 0.07% ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลอง (ในข้อ 4.2.2) พบว่าความเข้มข้นของกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 0.07% ขึ้นไป สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 1 นาที สำหรับความเข้มข้น 0.04, 0.05 และ 0.06 % สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 5 นาที ทำการเลือกกรดไนตริกความเข้มข้นที่ 0.06, 0.08, 0.1 และ 0.2 % ศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ผสมกับน้ำนม 1 % ในหลอดทดลอง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารละลายกรดไนตริกที่ความเข้มข้นสูง มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีกว่าความเข้มข้นต่ำ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 4.8 และภาคผนวกตารางที่ ข8) โดยกรดไนตริกความเข้มข้น 0.2 % สามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองที่ระดับ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 % ได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใช้เวลา 1 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 0.1, 0.08 และ 0.06 % ต้องใช้เวลา 5 นาที จึงไม่พบเชื้อ เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม (ความเข้มข้น 0 % ไม่มีการเติมกรดไนตริก) นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของแต่ละความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้มีผลต่อจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. sakazakii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีที่ใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ถ้ายิ่งใช้เวลานานขึ้น จะยิ่งเพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อได้ดี แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกรดไนตริกในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ไม่มีนมผสมพบว่ากรดไนตริก ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.07 % เป็นต้นไป สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใช้เวลา 1 นาที แสดงว่าน้ำนมมีผลในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของกรดไนตริก ซึ่งการศึกษาการลดปริมาณเชื้อ *E. sakazakii* โดยใช้กรดไนตริกนี้สอดคล้องกับผู้วิจัยที่ใช้กรดไนตริกในการลดเชื้ออื่นๆ เช่น Gill และคณะ(2004) พบว่ากรดแลคติก 4 % สามารถลดเชื้อ Coliforms และ *E. coli* ได้มากกว่า 1.5 log บนผิวเนื้อสดที่เวลา 60 นาที

Badoni และคณะ (2003) ได้ศึกษาการใช้กรดอะซิติกในการลดเชื้อบนเนื้อสัตว์ พบว่ากรดอะซิติก 1% สามารถลดเชื้อ *E. coli* ได้ 3.04 log cfu/cm^2 และสามารถลดเชื้อ *Salmonella* ได้ 3.23 log cfu/cm^2



ภาพที่ 4.8 ประสิทธิภาพของกรดไนตริกในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml และการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %

จากผลการศึกษาการใช้สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* เห็นได้ว่าความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 % ไม่เพียงพอในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* บริเวณที่มีปริมาณเชื้อสูง แต่ในบริเวณที่มีเชื้อต่ำก็สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโซเดียมไฮดรอกไซด์มีคุณสมบัติในการเป็นสารชะล้างเพื่อทำความสะอาดคราบโปรตีนและไขมันมากกว่าการออกฤทธิ์เพื่อการฆ่าเชื้อ ส่วนกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 0.2 % ขึ้นไปสามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้แม้มีคราบนมอยู่ แสดงว่ากรดไนตริกมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดี ดังนั้น ถ้ามีการ *E. sakazakii* ในระบบรับน้ำนม การทำความสะอาดช่วง CIP สารที่สามารถทำลายเชื้อดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพ คือ กรดไนตริก ที่โดยมากจะใช้ที่ระดับความเข้มข้น 1 % ซึ่งเพียงพอที่จะทำลายเชื้อที่เวลา 20 นาทีได้

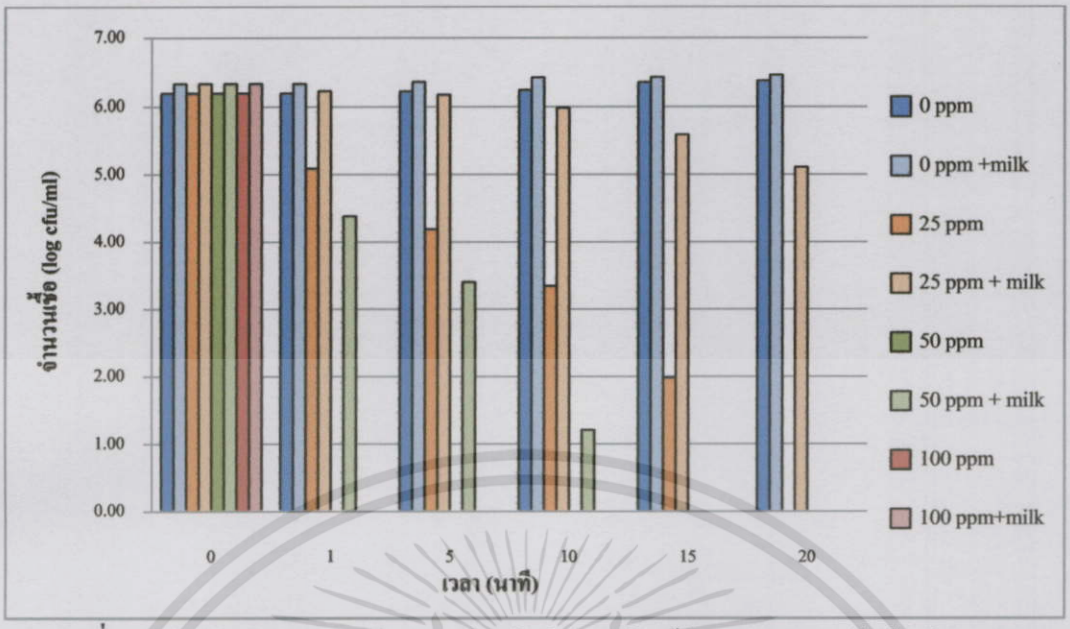
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์

จากการศึกษาสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลอง (ในข้อ 4.2.3) พบว่าความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถฆ่าเชื้อได้ลดลงตามลำดับ ทำการเลือกสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ppm จากนั้นนำมาศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ผสมกับน้ำนม 1 % ในหลอดทดลอง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีนมผสมอยู่ 1 % อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยพบว่าความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีกว่าความเข้มข้นต่ำ (ภาพที่4.9 และภาคผนวกตารางที่ ข9) สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 100 ppm สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองได้ดีโดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 1 นาที สำหรับความเข้มข้น 50 ppm สามารถฆ่าเชื้อได้โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 15 นาที นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของแต่ละความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้มีผลต่อจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. sakazakii* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ถ้ายิ่งใช้เวลานานจะยิ่งเพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อได้ดี โดยจากการทดลองสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppm พบว่าสามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ที่มีน้ำนมผสมอยู่ 1 % ให้หมดไปได้ในเวลาเพียง 1 นาที และที่ความเข้มข้น 50 ppm ต้องใช้เวลาในการฆ่าเชื้อนานถึง 15 นาที ในการลดเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ให้หมดไป แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ไม่มีนมผสม พบว่าความเข้มข้น 50 และ 100 ppm สามารถฆ่าเชื้อได้หมดที่เวลา 1 นาที และที่ความเข้มข้น 25 ppm สามารถฆ่าเชื้อได้โดยไม่พบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เวลา 20 นาที แสดงว่าน้ำนมมีผลในการลดประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์

จากผลการศึกษาการเลือกใช้สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เพื่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ควรเลือกที่ความเข้มข้น 100 ppm ขึ้นไป เพราะสามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้หมดภายในเวลา 1 นาที แต่บริเวณที่มีน้ำนมตกค้างอยู่ ควรล้างคราบนมให้หมด เพื่อป้องกันการลดลงประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของคลอรีนในกรณีที่มีคราบน้ำนมหลงเหลืออยู่ และจากการตรวจหาเชื้อ *E. sakazakii* ในศูนย์รับน้ำนมพบว่าในส่วนของพื้นบริเวณคนเทนมพบเชื้อ *E. sakazakii* ทั้งก่อนและหลังการทำความสะอาด ซึ่งในบริเวณนี้อาจมีการใช้ สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในการฆ่าเชื้อเพิ่มเติมภายหลังจากการล้างทำความสะอาดปกติและควรมีการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำตามอีกครั้งเพื่อลดการตกค้างของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 ประสิทธิภาพของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ในระดับความเข้มข้นต่างๆและระยะเวลาการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml และการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำนมดิบ ณ จุดต่างๆในกระบวนการรับน้ำนมภายหลังการรับน้ำนมจากเกษตรกรของสหกรณ์พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.1 - 2.3 x10^6 cfu/ml และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.1 x 10^3 – 1.8 x 10^4 cfu/ml ส่วนการตรวจหาเชื้อ *E. sakazakii* ไม่พบเชื้อ และจากการเก็บตัวอย่าง swab ในอุปกรณ์รับน้ำนมก่อนการทำความสะอาดพบว่าส่วนใหญ่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 1.5 x 10^3 – 8.9 x 10^4 cfu/100 cm^2 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม 1.0 x 10 – 7.8 x 10^2 cfu/100 cm^2 และพบเชื้อ *E. sakazakii* ซึ่งบริเวณที่ตรวจพบ ได้แก่ ไส้กรองสแตนเลส ท่อนมของแผงควบคุมทิศทางการไหลนม และสายยางส่งนมด้านต่อกับรถบรรทุกน้ำนม คิดเป็นบริเวณละ 33.33 % ท่อรับน้ำนมของรถบรรทุกน้ำนม 66.66%

ภายหลังการทำความสะอาดในส่วนอ่างรับน้ำนม อ่างพักน้ำนม และท่อเชื่อมต่อระหว่างอ่างพักน้ำนมกับปั๊ม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ลดลงเหลือ 2.0 x 10^2 - 3.5 x 10^3 cfu/100 cm^2 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มพบ 1 – 10 cfu/100 cm^2 และไม่พบเชื้อ *E. sakazakii* ส่วนของอุปกรณ์ที่ทำความสะอาดด้วยวิธี CIP (ตั้งแต่ไส้กรองสแตนเลสจนถึงท่อรับน้ำนมของรถ) จะมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลงเหลือ 5 – 2.2 x 10^2 cfu/100cm^2 และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม ที่เหลือพบบริเวณท่อนมของแผงควบคุมทิศทางการไหลนมและท่อรับน้ำนมของรถบรรทุกนมพบ 1 cfu/100 cm^2 ส่วนในบริเวณอื่นไม่พบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และเชื้อ *E. sakazakii* ไม่พบทุกบริเวณของการ swab อุปกรณ์ในกระบวนการรับน้ำนมดิบ จะเห็นได้ว่าการทำความสะอาดด้วยวิธี CIP ของศูนย์รับน้ำนมมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดี

การศึกษาความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไนตริก ที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีกว่าสารที่มีความเข้มข้นต่ำ และเวลาสัมผัสพื้นผิวในการฆ่าเชื้อนาน ก็สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีกว่าการให้เวลาสัมผัสพื้นผิวในการฆ่าเชื้อสั้น สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 100 และ 50 ppm มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ได้ดีที่สุด โดยไม่พบจำนวนโคโลนีของเชื้อบนอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อที่เวลาเพียง 1 นาที สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 2 % สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 2 log cfu/ml ได้โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 1 นาที และสามารถฆ่าเชื้อ ที่ระดับ 4 log cfu/ml ได้โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 10 นาที และสารละลายกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 0.07 % ขึ้นไป สามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใช้เวลา 1 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 0.04, 0.05 และ 0.06% ต้องใช้เวลา 5 นาที

ศึกษาความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไนตริก ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีนมผสมอยู่ 1% สารที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีนมผสมอยู่ 1% ได้ดีกว่าสารที่มีความเข้มข้นต่ำและเวลาสัมผัสพื้นผิวในการฆ่าเชื้อนาน สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่มีนมผสมอยู่ 1% ได้ดีกว่าการให้เวลาสัมผัสพื้นผิวในการฆ่าเชื้อสั้น โดยสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppm สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 1 นาที สำหรับความเข้มข้น 50 ppm สามารถฆ่าเชื้อได้โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 15 นาที สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 % สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ระดับ 6 log cfu/ml ที่ผสมกับน้ำนม 1 % ได้ลดลงเหลือ 1.42 log cfu/ml ที่เวลา 20 นาที สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 % สามารถฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ผสมกับน้ำนม 1 %ได้ลดลงเหลือ 5.37 log cfu/ml ที่เวลา 20 นาที และกรดไนตริก ระดับความเข้มข้น 0.2 % สามารถลดเชื้อ *E. sakazakii* ในหลอดทดลองที่ระดับ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 % ได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใช้เวลา 1 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 0.1, 0.08 และ 0.06 % ต้องใช้เวลา 5 นาที จึงไม่พบเชื้อ

ในการใช้สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการกำจัดเชื้อดังกล่าวได้ อาจต้องมีการใช้กรดไนตริกหรือสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ร่วมกันในการฆ่าเชื้อ ซึ่งในการปฏิบัติจริงของการล้างทำความสะอาดด้วยวิธี CIP มีการล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ด้วยน้ำเปล่า จากนั้นใช้สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตามด้วยกรดไนตริก และน้ำเปล่า จะเห็นได้ว่าวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อได้ดี อาจมีเพียงบริเวณพื้นที่ต้องมีการใช้สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เพิ่มเติมเพื่อเป็นการกำจัดเชื้อให้หมดจากบริเวณแหล่งรับน้ำนมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *E. sakazakii* สู่อุปกรณ์การรับน้ำนมได้

การปฏิบัติจริงในการเลือกใช้ความเข้มข้นของสารเคมีควรเลือกใช้ในระดับสูงไว้ก่อน เนื่องผลการทดลองดังกล่าวเป็นเพียงการทดลองในห้องปฏิบัติการเท่านั้นซึ่งในการปฏิบัติจริงอาจมีปัจจัยอื่นๆ เพิ่มเติมที่ไม่สามารถควบคุมได้เช่นเดียวกับห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2549. **การตรวจสอบคุณภาพของน้ำนม** [Online]. Available : http://www.dld.go.th /vrd_ep/method/sup_milk/micro_milk.htm.acc (1/8/52)

กองควบคุมวัตถุเสพติด. 2548. **โซเดียมไฮดรอกไซด์.**[Online]. Available : http://www.fda.moph .go.th/fdanet /html/product/addict/precursor/Sodiumhydroxide.htm

กิตติกานต์ บุญประสิทธิ์. 2548. **ผลของโซเดียมไฮโปคลอไรท์, สารประกอบควอตเทอร์นารี่แอมโมเนียมและเปอร์ซาเนีย 2505 สำหรับฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในโรงงานชำแหละไก่.**วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

คมแข พิลาสมบัติ. 2540. **การลดปริมาณการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนผิวซากสุกรที่ผ่านขบวนการฆ่ามาตรฐานและไม่มาตรฐานโดยการใช้สารละลายกรดแลกติกและคลอรีน.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.สาขาวิชาสัตวศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. 2548. **การตรวจ *Enterobacter sakazakii* ในนมและผลิตภัณฑ์.** [Online]. Available : http://www.dss.go.th/dssweb/productschampion/pdffiles /jun49 _ sep49_01sakazakii.pdf (27/1/50)

จุฑารัตน์ เลี่ยนกัตวา. 2545. **ผลของกรดกลูโคนิค กรดแอสคอร์บิก และสารไนซินต่อการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella derby* และ เชื้อ *E.coli* ในเนื้อสุกร.**วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ดวงทิพย์ หงส์สมุทร. 2548. ***Enterobacter sakazakii* และการปนเปื้อนในอาหารผงดัดแปลงสำหรับทารก.** [Online]. Available:http://www.fda.moph.go.th/depart/divinspc/html/ Enterobactersakazakii.htm.acc. (11/11/49)

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2543. **คลอรีนอิสระที่มีอยู่ FAC (Free Available Chlorine).** ภาควิชาจุชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เพ็ญนิภา แก้วอุไร. 2550.**ประสิทธิภาพโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนกรล้างปลาหมึกกระดอง.**วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภัทราวรรณ วัฒนศัพท์. 2548. **ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์ของโรงงานแปรรูปนมขนาดเล็ก.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ

เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะและผู้สัมผัสอาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2536

วิพิชญ์ ไชยศรีสงคราม. 2541. **การตรวจสอบคุณภาพน้ำนม.** กองสัตวแพทย์สาธารณสุข. กรมปศุสัตว์

ศรายุทธ ศรีภูมิพฤกษ์. 2547. **คู่มือการใช้และการบำรุงรักษาเครื่องจักรอุปกรณ์ศูนย์รับน้ำนมดิบ.** ศูนย์ถ่ายถอดเทคโนโลยีการผลิตและการบำรุงรักษาที่ 1 จังหวัดลพบุรี. กรมส่งเสริมสหกรณ์.

ศิวพร ศิวเวช. 2536. **การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 4. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารคณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. New Touch Media Coporation, กรุงเทพฯ, หน้า 367.

โศรดา ขุนโหร. 2549.**กรดฟอสฟอริก.** [Online].Available:http://www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/cp_1_ 2549_ortho-phosphoric-acid.pdf (25/3/50)

สุวิมล กีรติพิบูล. 2544. **ระบบการจัดการและควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัย (GMP).** สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). กรุงเทพฯ.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2548. **มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ น้ำนมดิบ มกอช. 6003-2548.** กระทรวงเกษตรกรและสหกรณ์.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ 2548. **มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ การปฏิบัติทางสุขลักษณะที่ดีสำหรับศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบ มกอช. 6401-2548.** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์. 2542. **มาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ.2542.** ส่วนมาตรฐานด้านการปศุสัตว์ สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์.

Baker, J.C. 1926. Chlorine in Sewage and Waste Disposal, p.107. Cite by C.I. Wei, D.L. Cook and J.R. Kirk. Use of Chlorine Compounds in the Food Industry. Food Technology. 39 : 107-115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beuchat. 2000. **Use of Sanitizers in Raw Fruit and Vegetable Processing**, pp. 64-67 In S.M. Alzamora, M. S. Tapia and A. Lo'pez-Malo(eds.). Minimally Processed Fruits and Vegetables. Aspen Publishers, Inc., Maryland

Bremer, J., S., Fillery. and Mc Quillan, A.J. 2005. **Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash step on the removal of dairy biofilms.** Food Microbiology. 106 (3) : 254-262.

Campers, A.K. and McFeters, G.A. 1979. **Chlorine injury and the enumeration of waterbone coliform bacteria**, Appl.Environ. Microbial,Vol.37, pp.633-641

Capita, R., Alonso-Calleja, C., del Camino Garcia-Fernandez, M. and Moreno, B. 2002. **Activity of trisodium phosphate compared with sodium hydroxide wash solutions against *Listeria monocytogenes* attached to chicken skin during regrigerated storage**. Food Microbiology. 19 : 57-63

Cheremisinoff, N.P. and Trattner, R.B. 1981. **Chemical and Nonchemical Disinfection**, Ann Arbor Science Publishers, Inc., Michigan, p.172

Chrinsten, G.L.1992.**Coliform and Other Indicator Bacteria**. In: Marshall,R.T. ed. Standard Methods for the Examination of Dairy Product. P.247-269

Gill, C.O. and Badoni, M. 2003. **Effect of Peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solution on the microflora of chilled beef carcasses**. Food Microbiology. 91:43-50

Green, D.E., and Stumpf, P.K. 1946. **The mode of action of chlorine**, p. 107, Cited by Wei, C.l., Cook, D.L.,and Kirk, J.R., Use of chlorine compounds in the food industry, Food Technology, Vol.39, No 1, pp. 107-115

Houghtby, G.A. 1992. **Microbiological Count Method**.In: Marshall,R.T. ed. Standard Methods for the Examination of Dairy Product. P.

ISO/TS22964:2006(E), **Milk and milk product Detection of *Enterobacter sakazakii***, pp. 1-13

Iversen, C. and Forsuthe, S. 2003. **Risk profile of *Enterobacter sakazakii* an emergent pathogen associated with infant milk formula**. Food Science and Technology. 14 (11) : 443-454.

Jui. Sen Peng, Wei Chong Tsai and Cheng Chun Chou. 2002. **Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent.** Food Microbiology. 77:11-18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim, H., Ryu, J.H. and Beuchat, L.R. 2006. **Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature and effectiveness of sanitizers for its eliminator.** Food Microbiology. 111 :134-143.

Kim, T.J., Silva, T.J., Weng, W.L., Chen, W.W., Corbitt, M., Jung. Y.S. and Chen, Y.S. 2009. **Inactivation of Enterobacter sakazakii by water-soluble muscadine seed extracts** .Food Microbiology.

Knox, W.E., P.K., Stumpf, D.E., Green and U.H., Anerbach. 1948. **The Inhibitin of sulfhydral enzymes as the basis of the bactericidal action of chlorine**, Journal of Bacteriology, Vol.55, p.451

Marriot, N.G. 1999. **Principles of Food Sanitation.** 4 th ed. Aspen Publishers, Inc.,Maryland. 364 pp.

Rudolph, D.S. and M., Levine. 1941. **Factors affecting the efficiency of hypochlorite solution**, p. 107, Cited by Wei, C.I., Cook, D.L.,and Kirk, J.R., Use of chlorine compounds in the food industry, Food Technology, Vol.39, No 1, pp. 107-115.

Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Stroshine, R.L. 2002, **Efficacy of Chlorine Dioxide, Ozone, and Thyme Essential Oil or a Sequential Washing in Killing *Escherichia coli* O157: H7 on Luttuce and Baby Carrots.** Food Science. 35 :720-729

The American Water Works Association, Inc. 1971. **Water Quality and Treatment**. McGrew – Hill Book Company, New York. 654 pp.

Wei, C.I., Cook, D.L., and Kirk, J.R., 1985, **Use of Chlorine Compounds in the Food Industry**, Food Technology, Vol.39, No.1, pp.107-115

White, G.C. 1992. **The Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants.** Van Nostrand Reinhold, New York . 888 pp.

White, M.N. and J.M. Farber 1996. ***Enterobacter sakazakii* : a review**. Food Microbiology. 34 :103-11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ

1. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Enterobacter sakazakii*

1.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมและตัวอย่าง swab ในกระบวนการรับน้ำนมของศูนย์รับน้ำนม

1.1.1 ตัวอย่างน้ำนม ใช้ตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร

1.1.2 ตัวอย่าง swab ใช้ตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร

1.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Enterobacter sakazakii*

1.2.1 ปีเปตตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร เติม Buffered Peptone Water (BPW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง

1.2.2 ถ่ายเชื้อจาก BPW (ข้อ1.2.1) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงใน Modified lauryl sulfate tryptone broth (mLST)/vancomycin medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

1.2.3 ถ่ายเชื้อจาก mLST/vancomycin medium (ข้อ 1.2.2) โดย streak ลงบน *E. sakazakii* isolation agar plate (ESIA) จากนั้นนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

1.2.4 อ่านผลลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. sakazakii* บน Chromogenic plate

Typical colonies ลักษณะโคโลนีสีเขียว – สีเขียวอมน้ำเงิน ขนาด 1 – 3 มิลลิเมตร

Non typical colonies ลักษณะโคโลนีสีอ่อนกว่า Typical colonies และสีม่วง

1.2.5 การตรวจยืนยันเชื้อ *E. sakazakii*

1.2.5.1 นำโคโลนีที่สงสัย Streak ลงบน Tryptone Soya Agar plate จากนั้นนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 44 ถึง 48 ชั่วโมง หลังจากการบ่มลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. sakazakii* เป็นสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.5.2 ทดสอบ Oxidase

เลือกโคโลนีบน TSA plate ลักษณะสีเหลือง streak ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นหยดน้ำยา Oxidase ลงบนโคโลนีของเชื้อ ใช้ loop เขี่ยผสมเชื้อกับน้ำยา Oxidase หลังจากนั้นดูปฏิกิริยาบนกระดาษกรองภายในเวลา 10 วินาที

ลักษณะปฏิกิริยาของทดสอบ Oxidase

- Positive : จะเกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงิน
- Negative : จะไม่เกิดสี ถือว่าเป็นเชื้อ *E. sakazakii* ให้ทดสอบในขั้นต่อไป

1.2.5.3 การทดสอบทางชีวเคมี โดยชุดทดสอบ API 20E

การเตรียม inoculum

1) เตรียม suspension medium โดยใช้ NaCl 0.85% sterile หรือน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ไม่มีสารอื่นเจือปน

2) ใช้ loop เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีอายุ 18-24 ชั่วโมง มา 1 โคโลนี ใส่ลงใน suspension medium

3) ค่อย ๆ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4) Suspension ของเชื้อที่เตรียมขึ้นจะต้องนำไปใช้ทดสอบทันที

การหยด inoculum ลง Strip

1) ใช้ปิเปตดูด suspension (inoculum) ของเชื้อเติมลงในหลุมของ strip ดังนี้

2) การทดสอบ CIT, VP และ GEL เติม suspension ของเชื้อเต็มหลุม (ดังภาพ)

3) การทดสอบที่เหลือให้เติม suspension ของเชื้อแค่ขอบหลุม (tube) (ดังภาพ)

4) สำหรับการทดสอบที่ขีดเส้นใต้ ได้แก่ ADH, LDC, ODC, H_2S และ URE ให้หยด Mineral Oil ลงไปให้เต็มหลุม เพื่อให้มีสภาวะ Anaerobe (ดังภาพ)

5) ปิดฝากล่อง สำหรับ incubate แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การอ่านและแปรผล

1) หลังจาก incubate ที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงแล้ว อ่านผลการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี โดยเปรียบเทียบกับตารางอ่านผล ถ้ามีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแถบ strip เป็นบวกจำนวน 3 การทดสอบ (glucose เป็นบวกหรือเป็นลบก็ได้) อ่านและบันทึกผลการทดสอบของหลุมการทดสอบที่ไม่ต้องเติม reagent บันทึกผลลงกระดาษบันทึกผล หลังจากนั้นให้หยด reagent ลงในหลุมการทดสอบที่ต้องหยด reagent ดังนี้

- หยด TDA reagent ลงไปในช่อง TDA 1 หยด ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเข้มทันที ให้บันทึกผลเป็นบวกลงในกระดาษบันทึกผล

- หยด JAMES reagent ลงไปในช่อง IND test 1 หยด ถ้าเปลี่ยนเป็นสีชมพูทั้งหลุมทันที ให้บันทึกผลเป็นบวกลงในกระดาษบันทึกผล

- หยด VP 1 และ VP 2 reagent อย่างละ 1 หยดลงในช่อง VP test รอเวลาอย่างน้อย 10 นาที ถ้ามีสีชมพูหรือแดงเกิดขึ้นให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพูอ่อนเกิดขึ้นหลังจาก 10 นาที ให้บันทึกผลเป็นลบ

2) การทดสอบการสร้าง Indole (IND test) จะต้องทำการทดสอบหลังสุด เนื่องจากช่องการทดสอบนี้เมื่อหยด reagent ลงไปแล้ว จะมีการผลิตแก๊สออกมาซึ่งจะไปมีผลกับช่องของการทดสอบอื่น ๆ และหลังจากที่หยด reagent ลงไปแล้วไม่ควรปิดฝากล่อง incubate

3) ถ้าจำนวนของการทดสอบก่อนการหยด reagent เป็นบวก (รวมทั้ง glucose) มีจำนวนน้อยกว่า 3 การทดสอบ ให้ incubate strip ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (± 2 ชั่วโมง) โดยที่ยังไม่ต้องหยด reagent ใดๆ เมื่อครบระยะเวลาทำการอ่านผล strip ตามรายละเอียดการอ่านผลข้างบนเพื่อให้การทดสอบสมบูรณ์ยิ่งขึ้น บางครั้งอาจจะต้องทำการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติม (Complementary test)

ภาพที่ ก 1 แสดงปฏิกิริยาของเชื้อ *E.sakazakii* ที่เกิดขึ้นบนชุดทดสอบ API 20E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก 1 ตารางการอ่านผลชุดทดสอบ API 20E

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-ßD-galactopyranoside	0.223	ß-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-ßD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
ADH	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
LDC	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
ODC	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
CIT	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
H_2S	sodium thiosulfate	0.075	H_2S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
URE	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	TDA / immediate	
				yellow	reddish brown
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	JAMES / immediate	
				colorless pale green / yellow	pink
VP	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				colorless	pink / red (5)
GEL	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARAbinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome-OXidase	(see oxidase test package insert)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด (Standard plate count method)

2.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมและตัวอย่าง swab ในกระบวนการรับน้ำนมของศูนย์รับน้ำนม

2.1.1 ตัวอย่างน้ำนม ใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.1.2 ตัวอย่าง swab ใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.1 Standard Plate Count Agar (PCA)

2.2.2 Buffered Peptone Water (BPW)

2.3 ขั้นตอนปฏิบัติงาน

2.3.1 ต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar ให้ละลายจากนั้นแบ่งใส่ขวดและนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเตรียมไว้ล่วงหน้าก่อนใช้งาน

2.3.2 เตรียมน้ำยาเจือจาง Buffered Peptone Water ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเตรียมล่วงหน้าก่อนใช้งาน

2.3.3 ก่อนใช้งานนำอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar ที่เตรียมไว้มาละลายแล้วรอในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44 – 46 องศาเซลเซียส ไม่ควรเกิน 3 ชั่วโมง

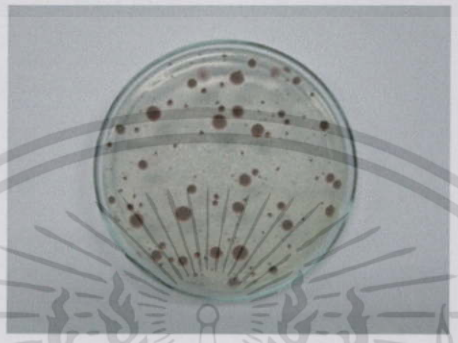
2.3.4 นำตัวอย่างผสมให้เข้ากัน โดยกลับขวดตัวอย่างไปมา ประมาณ 25 ครั้ง

2.3.5 เจือจางตัวอย่างในระดับที่เหมาะสมเพื่อให้ได้จำนวนโคโลนี ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานแรก อยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี เช่น ตัวอย่างมีจุลินทรีย์ประมาณ 24,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ควรเจือจางตัวอย่างที่ 1:100 และ 1:1,000

2.3.6 ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ 1 (1:10) ผสมตัวอย่างกับ BPW ให้เข้ากัน ใช้ปิเปตใหม่ดูดจากหลอดที่หนึ่ง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่สอง (1:100) ผสมตัวอย่างให้กับ BPW เข้ากัน ใช้ปิเปตอันใหม่ ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดต่อไป (1:1,000) ตามลำดับความเจือจางที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.7 ดูดตัวอย่างจากความเจือจางที่ต้องการ 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับโดยทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจาน ผสมให้เข้ากันทิ้งให้แข็งตัว จากนั้นบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 32±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง เมื่อได้เวลานำจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตู้บ่ม เพื่อนับจำนวนโคโลนี



ภาพที่ ก.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar

2.3.8 การคำนวณ

ใช้สูตร $N = \sum C / [(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)] d$

N = จำนวนจุลินทรีย์เป็นโคโลนีต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร

$\sum C$ = จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้

n_1 = จำนวนซ้ำของตัวอย่างที่นับได้ในความเจือจางแรก

n_2 = จำนวนซ้ำของตัวอย่างที่นับได้ในความเจือจางถัดไป

d = ความเจือจางแรกที่นับได้

ตัวอย่างเช่น จานอาหารที่ 1:100 นับได้ 232 และ 244

จานอาหารที่ 1:1000 นับได้ 33 และ 28

$N = (232+244+33+28)/ [(1 \times 2) + (0.1 \times 2)] 10^{-2}$

$= 537 \times 10^2 / 2.2$

$= 244.0909 \times 10^2$

$= 24409$

$= 24,000$

นั่นคือ มีจำนวนเชื้อ 24,000 โคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การตรวจนับจุลินทรีย์กลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliforms group enumeration)

3.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมและตัวอย่าง swab ในกระบวนการรับน้ำนมของศูนย์รับน้ำนม

3.1.1 ตัวอย่างน้ำนม ใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.1.2 ตัวอย่าง swab ใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 Violet red bile lactose agar

3.2.2 Buffered Peptone Water (BPW)

3.3 ขั้นตอนปฏิบัติงาน

3.3.1 ต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile lactose agar โดยเตรียมไว้ใช้วันต่อวัน เมื่อละลายแล้วรอในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44 – 46 องศาเซลเซียส ไม่ควรเกิน 3 ชั่วโมง

3.3.2 เตรียมน้ำยาเจือจาง Buffered Peptone Water ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเตรียมล่วงหน้าก่อนใช้งาน

3.3.3 นำตัวอย่างผสมให้เข้ากัน โดยกลับขวดตัวอย่างไปมาประมาณ 25 ครั้ง

3.3.4 เจือจางตัวอย่างในระดับที่เหมาะสมเพื่อให้ได้จำนวนโคโลนี ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานแรก อยู่ระหว่าง 15-150 โคโลนี เช่น ตัวอย่างมีจุลินทรีย์ประมาณ 15,000 โคโลนี ต่อมิลลิลิตร ควรเจือจางตัวอย่างที่ 1:100 และ 1:1,000

3.3.5 ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ 1 (1:10) ผสมตัวอย่างกับ BPW ให้เข้ากัน ใช้ปิเปตใหม่ดูดจากหลอดที่หนึ่ง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่สอง (1:100) ผสมตัวอย่างให้กับ BPW เข้ากัน ใช้ปิเปตอันใหม่ ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดต่อไป (1:1,000) ตามลำดับความเจือจางที่ต้องการ

3.3.6 ดูดตัวอย่างจากความเจือจางที่ต้องการ 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับโดยทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจาน ผสมให้เข้ากันทิ้งให้แข็งตัว จากนั้นบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง เมื่อได้เวลานำจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตู้บ่ม เพื่อนับจำนวนโคโลนี

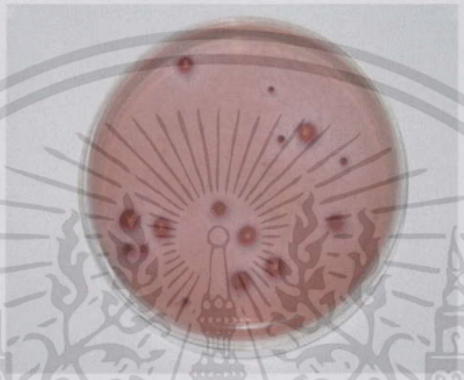
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 การคำนวณ

ใช้หลักการเดียวกับการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด จะนับโคโลนีจากจานที่มีเชื้อ 15 – 150 โคลิฟอร์มโคโลนี

3.4 การรายงานผล

เช่นเดียวกับการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด



ภาพที่ ก.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile lactose agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ข 1 ผลของความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml

NaOH (%)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml) ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0	6.19 ± 0.00^{cd}	6.19 ± 0.01^{cd}	6.21 ± 0.02^{cd}	6.23 ± 0.00^{c}	6.33 ± 0.05^{b}	6.38 ± 0.03^{a}
0.5	6.19 ± 0.00^{cd}	6.18 ± 0.00^{d}	6.13 ± 0.02^{e}	6.12 ± 0.00^{e}	6.11 ± 0.00^{e}	6.07 ± 0.0^{f}
1	6.19 ± 0.00^{cd}	6.14 ± 0.02^{e}	5.80 ± 0.04^{g}	5.43 ± 0.02^{i}	5.08 ± 0.00^{j}	4.81 ± 0.03^{k}
2	6.19 ± 0.00^{cd}	5.64 ± 0.06^{n}	3.70 ± 0.01^{l}	2.87 ± 0.02^{m}	1.82 ± 0.04^{n}	0.82 ± 0.04^{o}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ ข 2 ผลของความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 4 log cfu/ml

NaOH (%)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml) ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0	4.34 ± 0.00^{d}	4.34 ± 0.00^{d}	4.40 ± 0.00^{c}	4.44 ± 0.01^{c}	4.51 ± 0.02^{b}	4.56 ± 0.00^{a}
0.5	4.34 ± 0.00^{d}	4.24 ± 0.02^{e}	4.16 ± 0.02^{f}	4.15 ± 0.03^{f}	4.07 ± 0.00^{g}	4.01 ± 0.00^{h}
1	4.34 ± 0.00^{d}	3.99 ± 0.01^{n}	3.68 ± 0.04^{j}	3.3 ± 0.03^{k}	2.97 ± 0.02^{l}	2.67 ± 0.03^{m}
2	4.34 ± 0.00^{d}	3.73 ± 0.07^{i}	0.93 ± 0.07^{n}	0^{o}	0^{o}	0^{o}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 3 ผลของความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 2 log cfu/ml

NaOH (%)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml) ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0	2.39 ± 0.01^{c}	2.39 ± 0.01^{c}	2.44 ± 0.01^{bc}	2.46 ± 0.01^{abc}	2.51 ± 0.0^{ab}	2.55 ± 0.01^{a}
0.5	2.39 ± 0.01^{c}	2.29 ± 0.03^{d}	2.24 ± 0.03^{de}	2.18 ± 0.03^{ef}	2.13 ± 0.04^{fg}	2.07 ± 0.02^{g}
1	2.39 ± 0.01^{c}	2.15 ± 0.04^{f}	1.88 ± 0.06^{h}	1.48 ± 0.00^{i}	1.2 ± 0.17^{j}	0.55 ± 0.12^{k}
2	2.39 ± 0.01^{c}	0^{l}	0^{l}	0^{l}	0^{l}	0^{l}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ ข 4 ผลของความเข้มข้นของกรดไนตริก และระยะเวลาต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml

HNO_3 (%)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml) ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0	6.19 ± 0.00^{c}	6.19 ± 0.01^{c}	6.21 ± 0.02^{bc}	6.23 ± 0.00^{bc}	6.33 ± 0.05^{ab}	6.38 ± 0.03^{a}
0.1	6.19 ± 0.00^{c}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}
0.5	6.19 ± 0.00^{c}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}
1	6.19 ± 0.00^{c}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}
1.5	6.19 ± 0.00^{c}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 5 ผลของความเข้มข้นของกรดไนตริก และระยะเวลาต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml

HNO_3 (%)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml) ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0	6.19 ± 0.00^{c}	6.19 ± 0.01^{c}	6.21 ± 0.02^{bc}	6.23 ± 0.00^{bc}	6.33 ± 0.05^{ab}	6.38 ± 0.03^{a}
0.01	6.19 ± 0.00^{c}	6.13 ± 0.08^{c}	5.64 ± 0.05^{e}	5.21 ± 0.03^{g}	4.68 ± 0.31^{h}	3.43 ± 0.04^{j}
0.02	6.19 ± 0.00^{c}	6.09 ± 0.05^{c}	5.45 ± 0.07^{f}	2.82 ± 0.06^{k}	2.39 ± 0.02^{o}	2.09 ± 0.02^{n}
0.03	6.19 ± 0.00^{c}	5.86 ± 0.06^{d}	4.51 ± 0.06^{i}	2.67 ± 0.04^{l}	2.17 ± 0.16^{mn}	1.84 ± 0.06^{o}
0.04	6.19 ± 0.00^{c}	2.23 ± 0.17^{m}	0^{q}	0^{q}	0^{q}	0^{q}
0.05	6.19 ± 0.00^{c}	1.84 ± 0.06^{o}	0^{q}	0^{q}	0^{q}	0^{q}
0.06	6.19 ± 0.00^{c}	1.17 ± 0.15^{p}	0^{q}	0^{q}	0^{q}	0^{q}
0.07	6.19 ± 0.00^{c}	0^{q}	0^{q}	0^{q}	0^{q}	0^{q}
0.08	6.19 ± 0.00^{c}	0^{q}	0^{q}	0^{q}	0^{q}	0^{q}
0.09	6.19 ± 0.00^{c}	0^{q}	0^{q}	0^{q}	0^{q}	0^{q}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ ข 6 ผลของความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml

$Ca(OCl)_2$ (ppm)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml) ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0	6.19 ± 0.0^{b}	6.19 ± 0.01^{b}	6.21 ± 0.02^{b}	6.23 ± 0.00^{b}	6.33 ± 0.05^{a}	6.38 ± 0.03^{a}
5	6.19 ± 0.0^{b}	5.98 ± 0.03^{c}	5.92 ± 0.03^{cd}	5.92 ± 0.04^{cd}	5.90 ± 0.04^{bcd}	5.87 ± 0.03^{de}
10	6.19 ± 0.0^{b}	5.85 ± 0.04^{def}	5.82 ± 0.06^{ef}	5.77 ± 0.12^{fg}	5.72 ± 0.10^{g}	5.69 ± 0.12^{g}
25	6.19 ± 0.0^{b}	5.07 ± 0.03^{h}	4.18 ± 0.09^{i}	3.33 ± 0.07^{j}	1.97 ± 0.12^{k}	0^{l}
50	6.19 ± 0.0^{b}	0^{l}	0^{l}	0^{l}	0^{l}	0^{l}
100	6.19 ± 0.0^{b}	0^{l}	0^{l}	0^{l}	0^{l}	0^{l}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 7 ผลของความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %

NaOH (%)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml) ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0	6.32 ± 0.00^{b}	6.32 ± 0.00^{b}	6.35 ± 0.01^{b}	6.41 ± 0.04^{ab}	6.42 ± 0.01^{ab}	6.45 ± 0.03^{a}
0.5	6.32 ± 0.00^{b}	6.22 ± 0.06^{c}	6.17 ± 0.01^{cd}	6.06 ± 0.07^{de}	6.06 ± 0.07^{de}	6.01 ± 0.06^{e}
1	6.32 ± 0.00^{b}	6.08 ± 0.00^{de}	5.77 ± 0.05^{f}	5.59 ± 0.05^{g}	5.42 ± 0.01^{h}	5.37 ± 0.04^{i}
2	6.32 ± 0.00^{b}	5.75 ± 0.10^{f}	4.42 ± 0.2^{j}	3.25 ± 0.05^{k}	2.19 ± 0.04^{l}	1.42 ± 0.01^{m}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ ข 8 ผลของความเข้มข้นของกรดไนตริกและระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %

HNO_3 (%)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml) ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0	6.32 ± 0.00^{b}	6.32 ± 0.00^{b}	6.35 ± 0.01^{b}	6.41 ± 0.04^{ab}	6.42 ± 0.01^{ab}	6.45 ± 0.03^{a}
0.06	6.32 ± 0.00^{b}	5.65 ± 0.09^{c}	0^{f}	0^{f}	0^{f}	0^{f}
0.08	6.32 ± 0.00^{b}	4.84 ± 0.07^{d}	0^{f}	0^{f}	0^{f}	0^{f}
0.1	6.32 ± 0.00^{b}	3.40 ± 0.32^{e}	0^{f}	0^{f}	0^{f}	0^{f}
0.2	6.32 ± 0.00^{b}	0^{f}	0^{f}	0^{f}	0^{f}	0^{f}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 9 ผลของความเข้มข้นของสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์และระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *E. sakazakii* ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %

$Ca(OCl)_2$ (ppm)	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml) ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0	6.32 ± 0.00^{b}	6.32 ± 0.00^{b}	6.35 ± 0.01^{b}	6.41 ± 0.04^{ab}	6.42 ± 0.01^{ab}	6.45 ± 0.02^{a}
25	6.32 ± 0.00^{b}	6.22 ± 0.07^{c}	6.17 ± 0.02^{c}	5.98 ± 0.15^{d}	5.58 ± 0.01^{e}	5.1 ± 0.06^{f}
50	6.32 ± 0.00^{b}	4.37 ± 0.01^{g}	3.38 ± 0.06^{h}	1.2 ± 0.17^{i}	0^{j}	0^{j}
100	6.32 ± 0.00^{b}	0^{j}	0^{j}	0^{j}	0^{j}	0^{j}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกรรณิกา คุณสมบัติ เกิดเมื่อ 28 มีนาคม 2524 ที่จังหวัดฉะเชิงเทรา สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเกษตรศาสตร์บางพระ สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ จากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จังหวัดปทุมธานี ปีการศึกษา 2546 และศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาสุขาภิบาลอาหาร ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2548 และสำเร็จการศึกษาในปี 2552

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้