การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวสแตนเลส

Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* inoculated on stainless surfaces

นางสาวกัลยาณิน ศรีสิริรัตนกุล

นางสาวจิราวรรณ โชติประเสริฐ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวสแตนเลส

Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* inoculated on stainless surfaces

จัดทำโดย

นางสาวกัลยาณิน ศรีสิริรัตนกุล 59080060

นางสาวจิราวรรณ โชติประเสริฐ 59080067

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 29 / มิถุนายน / 2563

(ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวสแตนเลส
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกัลยาณิน ศรีสิริรัตนกุล รหัสนักศึกษา 59080060
	นางสาวจิราวรรณ โชติประเสริฐ รหัสนักศึกษา 59080067
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ในผลิตภัณฑ์นมยังคงตรวจพบ ถึงแม้ว่าจะมีวิธีการฆ่าเชื้อหลากหลายวิธี โดยเฉพาะเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ที่สร้างปัญหากับอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้จึงศึกษาเกี่ยวกับวิธีการยับยั้งเชื้อ *G. stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส ซึ่งรวมถึงการศึกษาการเจริญของเชื้อ *G. stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส และการเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่นสแตนเลส พบว่า ผลการเจริญของเชื้อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *G. stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส ด้วยสารเคมีประกอบด้วย Ethanol 70%, Acetic acid, Per-acetic acid ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันและใช้ระยะเวลาในการยับยั้งที่แตกต่างกัน เพื่อหาความเข้มข้นและระยะเวลาในการยับยั้งเชื้อที่เหมาะสมที่สุด ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า Per-acetic acid ที่มีความเข้มข้น 1% สามารถที่จะยับยั้งเชื้อ *G. stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส ได้ และใช้เวลาในการยับยั้งเพียง 30 วินาที ก็สามารถทำการยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* inoculated on stainless surfaces
Student name	Kanlayanin Srisiriratanakul Student ID 59080060
	Jirawan Chotpraseart Student ID 59080067
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2020
Advisor	Prof.Dr. warawut Krusong

ABSTRACT

Microbial contamination in milk is one of the major problems in dairy industries, both direct and indirect contamination, especially *Geobacillus stearothermophilus,* even though the dairy industries use various prevention treatments. The presence of *G. stearothermophilus* in milk constitutes an important quality problem for the milk industry, therefore, this study aimed to inhibit growth but also the biofilm formation of *G. Stearothermophilus* on stainless surfaces. The optimum temperature for growth of *G. stearothermophilus* was at 60 °C. Using different concentration of chemical agents consisting of ethanol 70%, acetic acid and peracetic acid, the effective treatment was found after high concentration used within a short duration. G.*stearothermophilus* was completely inhibition on stainless surface after 30 s by 1% peracetic acid.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้จะสำเร็จลุล่วงมิได้ หากไม่ได้รับความกรุณาจาก ศาสตราจารย์ วราวุฒิ ครูส่ง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในการให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆ มาโดยตลอด จนเป็นผลให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าจึงกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง และขอขอบคุณ คุณ อัสนี วิจิตระกะ ที่คอยให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือทำให้สามารถดำเนินงานจนเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ ที่กรุณาให้เกียรติเป็นกรรมการในการประเมินปัญหาพิเศษ เพื่อให้ปัญหาพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว สำหรับกำลังใจและการสนับสนุนในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้มาโดยตลอด

รวมถึงขอบคุณ คุณจิดาภา เตชาธาราทิพย์ พี่ปริญญาเอก และเพื่อนในคณะ อุตสาหกรรมเกษตร ที่คอยให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษ ทำให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในการสนันสนุนในการทำปัญหาพิเศษ ทั้งด้านการเอื้ออำนวยสถานที่ และอุปกรณ์เสมอมา

ทั้งนี้ผู้วิจัย หวังว่างานวิจัยจะมีส่วนทำให้เกิดประโยชน์และคุณค่า ผู้วิจัยจึงขอมอบคุณประโยชน์แก่คณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

กัลยาณิน ศรีสิริรัตนกุล

จิราวรรณ โชติประเสริฐ

19 พฤษภาคม 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VI

สารบัญภาพ VII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 1

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 1

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2

2.1 ความรู้เกี่ยวกับ Geobacillus stearothermophilus 2

2.2 หลักการพื้นฐานการเกิดไบโอฟิล์ม (biofilms formation) 4

2.3 ความรู้เกี่ยวกับปัญหาในโรงงานอุตสาหกรรมนม 5

2.4 คุณภาพและความปลอดภัยในนมพาสเจอร์ไรซ์ และสเตอร์รีไรซ์ 7

2.5 ความปลอดภัยของสารเคมีที่ใช้และหลักเกณฑ์ที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม 8

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 14

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 14

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 14

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 20

4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* 20

4.2 ผลการเจริญของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ในอุณหภูมิที่ 35 และ 60 องศาเซลเซียส 21

4.3 ผลการหาความเข้มข้นของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* เริ่มต้น 22

4.4 ผลการฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นแผ่นสแตนเลส ด้วยวิธีทางเคมี (Chemical means) 22

4.5 ผลการเจริญของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนแผ่นสแตนเลส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 25

4.6 ผลการยับยั้งเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส 25

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 27

5.1 สรุปผลการทดลอง 27

5.2 ข้อเสนอแนะ 28

บรรณานุกรม 29

ภาคผนวก 32

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 33

ภาคผนวก ข การเตรียมสีย้อม 36

ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย 39

ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์แผ่นโลหะ 42

ภาคผนวก จ 44

ประวัติผู้เขียน 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 4.1 การเปรียบเทียบการฆ่าเชื้อแผ่นสแตนเลส โดยใช้วิธีการใช้สารเคมี หาจำนวนรอดชีวิต และเปอร์เซ็นการยับยั้งเชื้อปนเปื้อนบนแผ่นสแตนเลส 23

ตารางที่ 4.2 การยับยั้งเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส โดยใช้สารเคมี Peracetic acid 1% 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1.1 ลักษณะเชื้อ Geobacillus stearothermophilus 3
ภาพที่ 2.1.2 ลักษณะสปอร์ *Geobacillus stearothermophilus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนสี (SEM).....3
ภาพที่ 2.2.3 ลักษณะของการเกิดไบโอฟิล์ม (b.....4
ภาพที่ 2.5.1 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเอทานอล (Ethanol) 11
ภาพที่ 2.5.2 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดน้ำส้ม (Acetic acid)..... 11
ภาพที่ 2.5.3 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดเปอร์อะซิติก(Peracetic acid) 12
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*: (a) ลักษณะโครงสร้างของเชื้อ *G.stearothermophilus* โดยการย้อมสีแบบแกรม (gram staining); (b) ลักษณะสปอร์และการสร้างสปอร์ของเชื้อ โดยการย้อมสปอร์ (Spore Stain); (C) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *G.stearothermophilus* บนอาหาร TSA..... 21
ภาพที่ 4.2 โคโลนีเริ่มต้นของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* โดยวิธี Spread plate ... 22
ภาพที่ 4.3 ที่จะแสดงผลการเจริญของเชื้อ *G. stearothermophilus* บนแผ่นสแตนเลส 25
ภาพที่ 4.4 ผลการยับยั้งเชื้อ G. Stearothermophilus บริเวณพื้นผิวแผ่นสแตนเลส 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ

เชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* เป็นที่ทนความร้อนและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง และกำจัดได้ยาก ซึ่งถือว่าเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างมาก ในกระบวนการผลิต โดยเฉพาะโรงงานอุตสาหกรรมนม เนื่องจากเชื้อ *G. stearothermophilus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และมีความสามารถในการสร้าง biofilm บนพื้นผิวของอุปกรณ์และเครื่องมือในกระบวนการผลิต ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และเกิดปัญหาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อหาวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. stearothermophilus* ที่เหมาะสม

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* สภาพที่เหมาะสม

1.2.2 ศึกษาการสร้าง biofilm ของเชื้อ *G. stearothermophilus* บนพื้นผิว

1.2.3 ศึกษาวิธีการยับยั้งเชื้อ *G. stearothermophilus* ที่เหมาะสม

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถหาวิธีฆ่าเชื้อ *G. stearothermophilus* เป็นปัญหาในโรงงานอุตสาหกรรมได้

1.3.2 สามารถหาความเข้มข้นของสารเคมีและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อ *G. stearothermophilus* เพื่อการประยุกต์ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้เกี่ยวกับ Geobacillus stearothermophilus

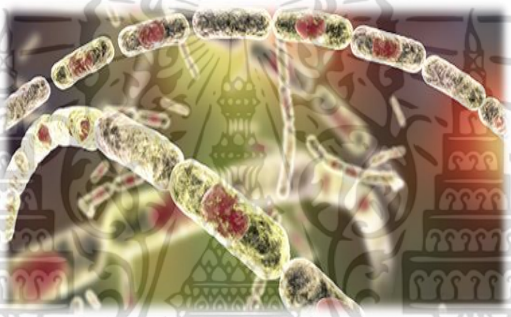
G. stearothermophilus เป็นเชื้อที่ปนเปื้อนที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมที่มีอุณหภูมิสูงในระหว่างกระบวนการผลิตหรือในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เช่น การบรรจุกระป๋องและการพาสเจอร์ไรซ์น้ำ การกลั่นน้ำตาล การผลิตเจลาติน และการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากนม เช่น นมผง นมพาสเจอร์ไรซ์ buttermilk และ whey เป็นต้น ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากนม เชื้อ *G. stearothermophilus* เป็นปัญหาในกระบวนการผลิตเป็นอย่างมาก เนื่องมาจากเชื้อ *G. stearothermophilus* สามารถสร้าง biofilm บนพื้นผิวของเครื่องมือในกระบวนผลิตได้ และ เป็น 65% ของสายพันธุ์ thermophilic ที่พบในนมผง เนื่องจากสปอร์สามารถอยู่รอดได้ที่มีค่า a_w ต่ำ และมีอุณหภูมิสูงของกระบวนการอบแห้ง และระบบทำความสะอาดในสถานที่ และการเก็บรักษาระยะยาวของผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้ *G. stearothermophilus* ยังผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสที่มีความเสถียร และไลเปสที่ทนความร้อนได้ในระหว่างกระบวนการผลิตนมผง เอนไซม์ยังคงทำงานอยู่ในนมผง ในระหว่างการเก็บรักษาได้

Timko (2010) กล่าวว่า *G. stearothermophilus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ทนความร้อนสูง โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์ภายในและผนังเซลล์ที่หนา *G. stearothermophilus* มีลักษณะเป็นแท่ง เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกลุ่ม thermophilic anaerobes เช่น ช่องระบายความร้อน เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า และไม่ต้องการการใช้ออกซิเจน (O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้วสำหรับการเจริญ *G.stearothermophilus* มีเอนโดสปอร์ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความต้านทานสูง ด้านนอกของสปอร์ประกอบด้วย peptidoglycan ที่เชื่อมโยงอย่างอิสระซึ่งป้องกันไม่ให้ความชุ่มชื้นและทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันการซึมผ่านของสารเคมี เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) (Isaac D Wagner และ Juergen Wiegel (2008)

ซึ่งสอดคล้องกับ Wickham labs (2017)ที่กล่าวว่า *G. stearothermophilus* เป็นแบคทีเรียที่มีภาพร่างแท่ง แกรมบวก และเป็นสมาชิกของ Firmicutes อยู่ในกลุ่มของ thermophile ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophile) อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญ (optimum

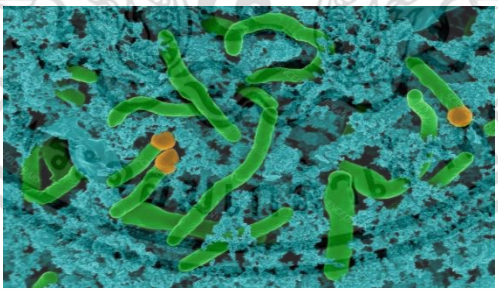
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

temperature) อยู่ในช่วงระหว่าง 45-80 องศาเซลเซียส ซึ่งแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* มีอุณหภูมิการเจริญที่เหมาะสมที่สุดที่ 55 องศาเซลเซียส และอาจจะมีความสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 130 องศาเซลเซียส เชื้อมีความสามารถทนร้อน และมีการกระจายอย่างกว้างขวางในดินน้ำพุร้อน ตะกอนทะเล และเป็นสาเหตุของการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งการแปรรูปอาหารด้วยความร้อน (thermal processing) ระดับการพาสเจอไรซ์อาจไม่เพียงพอที่จะทำลายเชื้อกลุ่มนี้ ดังนั้นจึงต้องเก็บอาหารที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ เช่น น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (cold storage) เพื่อควบคุมไม่ให้แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ ดร.นิธิยา รัตนาปนนท์. 2560) อนึ่งลักษณะเซลล์และสปอร์แสดงในภาพที่ 2.1.1 และ 2.1.2 ตามลำดับ



ภาพที่ 2.1.1 ลักษณะเชื้อ Geobacillus stearothermophilus

ที่มา : Wickham Laboratories (2017)



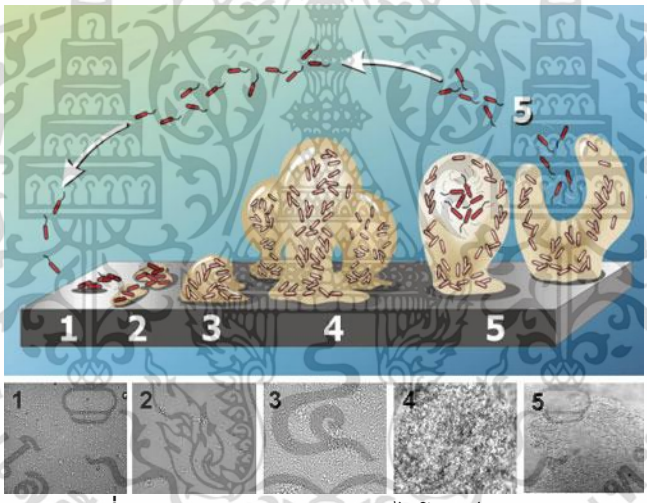
ภาพที่ 2.1.2 ลักษณะสปอร์ *Geobacillus stearothermophilus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนสี (SEM)

ที่มา : Dennis Kunkel Microoscopy (2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 หลักการพื้นฐานการเกิดไบโอฟิล์ม (biofilms formation)

ไบโอฟิล์ม (biofilms) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เกาะติดอยู่กับพื้นผิวที่เปียกชื้นซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติจากเซลล์อิสระ (Planktonic cells) ของแบคทีเรียที่อยู่ในส่วนผสม เมื่อแบคทีเรียนี้ไปเกาะอยู่กับพื้นผิววัตถุ จะสร้างฟิล์มบางๆ ที่มีลักษณะลื่นๆ มีโครงสร้างจากสารพอลิเมอร์ เช่น แคปซูล (capsule) สารเมือก (slime) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกมานอกเซลล์ ยึดเกาะที่ผิวเพื่อทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใน รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ภายใน มีลักษณะเป็นเมือกลื่น พบบริเวณพื้นผิวของภาชนะ เครื่องจักรและอุปกรณ์แปรรูปอาหาร ความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) ได้ดี ทำล้างทำความสะอาด (cleaning) ได้ยาก มักทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์.2559) ลักษณะการสร้างไบโอฟิล์มแสดงในภาพที่ 2.2.3



ภาพที่ 2.2.3 ลักษณะของการเกิดไบโอฟิล์ม (biofilms)
ที่มา: พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ ดร.นิธิยา รัตนาปนนท์.2559

ไบโอฟิล์ม คือโครงสร้างยึดเกาะกับพื้นผิว เช่น เมือกหรือคราบสกปรกที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น ระบบน้ำในแทงค์น้ำ ท่อน้ำ หรือคลูลิ่งแพด ไบโอฟิล์มเกิดขึ้นเมื่อมีเชื้อแบคทีเรียเข้าไปเกาะพื้นผิวในระบบน้ำ และสร้างโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆหลายชนิด ทำหน้าที่เป็นเกราะปกป้องแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใน รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม การเกาะยึดแน่นขึ้นเมื่อเวลานานขึ้น ไบโอฟิล์มจะแบ่งเป็น 2 ชั้นคือ ชั้นที่ติดแน่นกับพื้นผิว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งกำจัดออกยาก (Hard biofilm layer) และชั้นเมือกอ่อนนุ่มชะล้างออกง่าย (Thin biofilm layer) เมื่อมีไบโอฟิล์มเกิดขึ้นสิ่งที่ตามมาก็คือ ท่อน้ำสกปรก อุดตัน ที่สำคัญคือเป็นแหล่งสะสมของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีโอกาสที่จะหลุดออกมากับน้ำ เมื่อไรก็ที่คนหรือสัตว์ดื่มน้ำนั้นเข้าไป ก็มีโอกาสป่วยหรือได้รับอันตรายจากเชื้อโรคนั้น (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ ดร.นิธิยา รัตนาปนนท์.2559)

ไบโอฟิล์ม คือ คราบที่เกาะแน่นติดอยู่บนพื้นผิวของเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการ ผลิตอาหาร ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการล้างทำความสะอาดแบคทีเรียและสารอินทรีย์ นำไปสู่ การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารและการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ ในประเทศไทยองค์ความรู้เกี่ยวกับการแพร่และความหลากหลายของเชื้อก่อโรคในโรงงานอาหารที่มีสาเหตุมาจากไบโอฟิล์มยังมีน้อย ทำให้ผู้ประกอบการโรงงานอุตสาหกรรมอาหารไม่มี ข้อมูลเพียงพอสำหรับนำไปใช้เพื่อควบคุมและลดปริมาณเชื้อในอาหารที่มีสาเหตุมาจากไบโอฟิล์มอย่างมีประสิทธิภาพ (ปุณณาณ สัทภวะผล และดุสิดา ถิระวัฒน์, 2559)

2.3 ความรู้เกี่ยวกับปัญหาในโรงงานอุตสาหกรรมนม

Geobacillus stearothermophilus มีบทบาทสำคัญในการเน่าเสียของอาหารโดยเฉพาะนม และผลิตภัณฑ์จากนม เนื่องจากแบคทีเรียสามารถอยู่รอดในกระบวนการฆ่าเชื้อพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) และอาจจะอยู่รอดในกระบวนการฆ่าเชื้อสเตอริไลซ์ (Sterilization) เพราะแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์ที่สามารถทนความร้อนสูงได้ (Wickham Laboratories, 2017) ซึ่งกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) เป็นกระบวนการให้ความร้อนที่ไม่รุนแรง มักจะฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เพื่อยืดอายุของผลิตภัณฑ์อาหารให้นาน เช่น นม ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้ในการถนอมอาหารได้โดยการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เชื้อจุลินทรีย์ไม่สร้างสปอร์ คุณภาพของอาหารจะแตกต่างจากวัตถุดิบไม่มาก แต่การฆ่าเชื้อในระดับพาสเจอไรซ์จะไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และไม่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูงได้ เช่น เชื้อแบคที่เรียที่ไม่สร้างสปอร์ ยีสต์และรา ดังนั้นจะต้องเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิตู้เย็น เพราะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ ปริมาณเชื้อที่ยังคงมีอยู่ในอาหารจึงไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2560) การฆ่าเชื้อจะเกิดการเปลี่ยนแปลงด้านประสาทสัมผัสและคุณค่าของอาหารน้อยที่สุด ความรุนแรงของการให้ความร้อนกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการยืดอายุผลิตภัณฑ์กำหนดได้โดย pH ของอาหาร วัตถุประสงค์หลักสำหรับอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ (pH > 4.6 คือการทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ส่วนวัตถุประสงค์หลักสำหรับอาหารที่มีความเป็นกรดสูง (pH < 4.6 คือการทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย และยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ (วาสิฎฐี เนียมสุวรรณ์ และคณะ, 2561) ส่วนกระบวนการสเตอริไลซ์ (Sterilization) เป็นการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายจุลินทรีย์ รวมทั้งสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และสปอร์ส่วนใหญ่ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หลักการของการฆ่าเชื้อ คือ การให้ความร้อนแก่อาหารในปริมาณเพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และยับยั้งไม่ให้จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียเจริญได้ภายใต้ความดัน ในกรณีของเครื่องฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่ใช้ไอน้ำเป็นตัวกลางในการให้ความร้อนที่ 121.1 องศาเซลเซียส มีค่าความดันประมาณ 15 psi (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และ จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย ซึ่งโดยทั่วไปการใช้อุณหภูมิสูง เป็นเวลานาน ย่อมสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้มาก แต่ถ้าอาหารนั้นไม่สามารถผ่านความร้อนปริมาณสูงมากได้ เนื่องจากจะทำให้สูญเสียคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ ในการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลซ์ (Sterilization) จะใช้เครื่องฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (Retort) คืออุปกรณ์ปิดที่ใช้ฆ่าเชื้ออาหารที่บรรจุในภาชนะปิดสนิทโดยทำงานภายใต้ความดันเพื่อทำให้อุณหภูมิขึ้นสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส มีหลายระบบแต่มีคุณลักษณะร่วมกัน ดังนี้

1. ระบบทำงานภายใต้ความดันและมีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิน้ำเดือดมาก

2. ระบบใช้ตัวกลางเพื่อถ่ายเทความร้อนให้กับผลิตภัณฑ์ ตัวกลางที่ใช้มีทั้งไอน้ำ น้ำร้อน (โดยให้บรรจุภัณฑ์อยู่ใต้น้ำร้อน หรือสเปรย์ด้วยน้ำร้อน เป็นต้น) และไอน้ำผสมกับอากาศ

3. ระบบใช้ความดันเพิ่ม (Overpressure) ระหว่างการฆ่าเชื้อและการหล่อเย็น เพื่อคงความสมบูรณ์ของภาชนะบรรจุไว้ และเพื่อให้เกิดสมดุลกับความดันที่เกิดขึ้นในภาชนะบรรจุ ระบบนี้จำเป็นสาหรับภาชนะบรรจุบางประเภทที่มีความทนทานที่จำกัดต่อความดันที่เกิดขึ้นภายในภาชนะบรรจุ ตัวอย่างเช่นบรรจุภัณฑ์อ่อนตัว บรรจุภัณฑ์กึ่งแข็งตัว ถาดสแตนเลส (Metal trays) กล่องกระดาษ (Paperboard containers) และขวดแก้ว (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 คุณภาพและความปลอดภัยในนมพาสเจอร์ไรซ์ และสเตอร์รีไรซ์

น้ำนมพาสเจอไรซ์ (pasteurized milk) คือ ผลิตภัณฑ์นม (dairy product) ชนิดหนึ่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนระดับการพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) ซึ่งเป็นความร้อนที่ใช้เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในคน (pathogen) ทำให้น้ำนมปลอดภัยในการบริโภคและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้น้ำนมเสื่อมเสีย เช่น เอนไซม์ไลเพส (lipase) ซึ่งไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ในไขมันนมได้เป็นกรดไขมันอิสระ เช่น กรดบิวทิริก ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นหืน แต่ความร้อนที่ใช้ไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของน้ำนมทุกชนิด ดังนั้นภายหลังการพาสเจอร์ไรซ์ ต้องเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 5$\pm$2 องศาเซลเซียส (cold storage) เพื่อควบคุมการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่ยังเหลือรอดอยู่ เช่น แบคทีเรียที่ทนความร้อน (thermophilic bacteria) สปอร์ของแบคทีเรีย (bacterial spore) น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ มีอายุการเก็บรักษาได้ไม่เกิน 10 วัน นับจากวันที่บรรจุในภาชนะบรรจุพร้อมจำหน่าย คุณภาพและมาตรฐานของนมพาสเจอไรซ์ มีกลิ่น รส ตามลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ของน้ำนมนั้น จะมีเนื้อของแข็งทั้งหมดไม่น้อยกว่าร้อยละ 8 ของน้ำหนัก สำหรับผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลว เมื่อทำการฆ่าเชื้อแล้วจะไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และไม่มีสารที่อาจเป็นพิษ เช่น สารพิษจากจุลินทรีย์ และสารปนเปื้อนในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ได้แก่ สารตกค้างจากยาฆ่าแมลง สารปฏิชีวนะ และอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นต้น จะต้องตรวจพบแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ของน้ำนมชนิดเหลวที่ผ่านกรรมวิธีการพาสเจอร์ไรซ์ 1 มิลลิลิตร ได้ไม่เกิน 10,000 ณ แหล่งผลิต และไม่เกิน 50,000 ตลอดระยะเวลาเมื่อออกจากแหล่งผลิตจนถึงวันหมดอายุการบริโภคที่ระบุบนฉลาก และตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม (coliform) ได้ไม่เกิน 100 ในผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลวที่ผ่านกรรมวิธีการพาสเจอร์ไรซ์ 1 มิลลิลิตร ณ แหล่งผลิต (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์.2559)

น้ำนมสเตอริไรซ์ (Sterilized Milk) คือ นมสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูงเป็นเวลานาน ต้องผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานเพียงพอ ซึ่งจากกระบวนการขั้นตอนการผลิตและการบรรจุของนมสเตอริไรซ์นี้ จะทำให้วิตามินที่สำคัญบางตัวอย่างเช่น วิตามิน บี 1 วิตามินบี 2 และวิตามินซี สูญเสียไปด้วย ดังนั้นนมสเตอริไรซ์จึงไม่เหมาะกับเด็ก ๆ ที่กำลังเจริญเติบโต และห้ามใช้เลี้ยงเด็กทารก เพราะจะทำให้เด็กเป็นโรคขาดอาหารได้ โดยทั่วไปนมชนิดนี้มักบรรจุในกระป๋องสแตนเลส ที่ปิดสนิท จึงสามารถเก็บได้นาน 1-2 ปี ประเภทนมของนมสเตอริไรซ์มีหลักๆ 3 ชนิด ได้แก่

ชนิดที่ 1 ได้แก่ นมสดพร้อมดื่ม ซึ่งเป็นนมสด 100 % และที่ข้างกล่องหรือกระป๋องจะเขียนว่า “นมสดสเตอร์ริไรซ์” ดื่มได้ทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดที่ 2 คือ นมข้นไม่หวาน ซึ่งเป็นนมสดที่ระเหยเอาน้ำออกไปบางส่วน จึงทำให้นมข้นขึ้น และไม่ได้เติมน้ำตาลลงไป นมชนิดนี้นิยมใช้สำหรับเติมใส่เครื่องดื่มพวกน้ำชาหรือกาแฟ ซึ่งหากผสมน้ำลงไป 1 เท่าตัวก็จะได้นมสดที่ดื่มได้ทันทีเช่นกัน ในบางยี่ห้อจะมีการเติมน้ำมันปาล์มลงไปเรียกว่า “นมข้นแปลงไขมันชนิดไม่หวาน” ดังนั้นก่อนเลือกซื้อ อย่าลืมดูที่ฉลากข้างกระป๋องด้วยนะคะ และแนะนำว่าท่านควรซื้อชนิดที่เติมไขมันจะดีกว่าค่ะ เพราะจะมีคุณค่าทางโภชนาการดีกว่านมที่ไม่เติมไขมัน

ชนิดที่ 3 ได้แก่นมข้นหวาน ซึ่งจะมีรายละเอียดต่างหาก

เวลาซื้อควรสังเกตดูวันที่ผลิตและวันหมดอายุของนมที่ก้นกระป๋อง และหลังจากที่เปิดใช้แล้วควรเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อนมจะได้ไม่เสื่อมคุณภาพเร็ว ปัจจุบันนมสเตอริไรซ์ที่ขายอยู่ในท้องตลาดจะมีหลายชนิด ที่สำคัญไม่ว่าจะเป็นนมพาสเจอร์ไรซ์ นมยูเอชที หรือนมสเตอริไรซ์ ผู้บริโภคต้องตรวจสอบฉลาก สังเกตวัน เดือน ปีที่ผลิต หรือวันหมดอายุ ชื่อ และที่ตั้งของผู้ผลิต เลขสารบบอาหาร ในกรอบเครื่องหมาย อย. เป็นอันดับต้นๆ ก่อนการตัดสินใจซื้อนม เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค การเน่าเสียของนมพร้อมดื่ม อาจเกิดได้หลายกรณี ทั้งทางด้านกระบวนการผลิต ที่อาจใช้ความร้อนสูงไม่เพียงพอ หรือใช้เวลาฆ่าเชื้อน้อยเกินไป การบรรจุที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ทำให้มีการปนเปื้อนหรือการบรรจุถุง ขวดที่ไม่สะอาด เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม รวมถึงลักษณะการขนส่งที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม ก็อาจเป็นสาเหตุให้ภาชนะบรรจุนมมีการรั่วซึม ทำให้จุลินทรีย์จากภายนอกปนเปื้อนเข้าไปเป็นสาเหตุให้นมเสียได้

2.5 ความปลอดภัยของสารเคมีที่ใช้และหลักเกณฑ์ที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม

สารฆ่าเชื้อ (sanitizer) อาจเรียกว่า sanitizing agent หรือ disinfectant หมายถึง สารที่ใช้เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ แบคทีเรีย โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) รวมถึงสปอร์ของรา และสปอร์ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนที่พื้นผิว เช่น เครื่องจักรอุปกรณ์แปรรูปอาหาร และพื้นผิวสัมผัสอาหาร ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ sanitizer ได้แก่

1. ความเข้มข้นของสารเคมี โดยทั่วไปพบว่าที่สารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงกว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ได้ดีกว่าและประสิทธิภาพของสารเคมีจะมีความแตกต่างกันไปตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มของจุลินทรีย์ เช่น คลอรีนจะมีผลในการยับยั้งหรือทำลายไวรัสแ ละสปอร์ของแบคทีเรียเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงเท่านั้น

2. เวลาที่สารเคมีสัมผัสกับจุลินทรีย์ (contact time) เมื่อปล่อยให้เวลาที่สารเคมีสัมผัสกับจุลินทรีย์นานขึ้น จะทำให้จุลินทรีย์ถูกยับยั้งหรือถูกทำลายมากขึ้นไปด้วย

3. ค่า pH ของ sanitizer ของสภาพแวดล้อมจะมีผลต่อประสิทธิภาพของ sanitizer เช่น ประสิทธิภาพของไฮโพคลอไรต์ (hypochlorites) จะขึ้นอยู่กับปริมาณของสัดส่วนในรูปที่เป็นกรดไฮโพคลอรัส (hypochlorous) ที่ไม่แตกตัวในสารละลาย ซึ่งจะขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลายกรดไฮโพคลอรัสในรูปที่ไม่แตกตัว จะเข้าสู่ภายในเซลล์ทำลายเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยการออกซิไดส์สารต่างๆ ถ้าความเป็นกรด (acidity) ของสารละลายเพิ่มขึ้น ปริมาณของกรดในรูปที่ไม่แตกตัวจะสูงขึ้นไปด้วย ตัวอย่างเช่น ค่า D ของสปอร์ *Bacillus cereus* ในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 25 ส่วนในล้านส่วน คือ 2.5 นาที ที่ pH 6.0 แต่จะเพิ่มขึ้นเป็น 20 นาที ที่ pH 9.0 เป็นต้น

4. ความกระด้างของน้ำ (hardness of water) มีผลต่อ sanitizer บางชนิด เนื่องจากผลของแคลเซียมและแมกนีเซียมไอออนอาจช่วยป้องกันไม่ให้สารประกอบควอเตอร์นารีแอมโมเนียมไปทำลายเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย เป็นต้น

5. ปริมาณของจุลินทรีย์ ถ้ามีปริมาณจุลินทรีย์มากจะทำให้การฆ่าเชื้อยากขึ้น ถ้าใช้ sanitizer ที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่า ถ้ามีจุลินทรีย์มากกว่าจะใช้เวลาในการสัมผัสจุลินทรีย์ เพื่อทำลายเชื้อนานมากขึ้น

6. ชนิดของจุลินทรีย์ ความทนต่อ sanitizer ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะแตกต่างกัน เช่น สารประกอบควอเตอร์นารีแอมโมเนียม ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่มีผลทำลายสปอร์แบคทีเรีย ส่วนคลอรีนมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียและสปอร์ ยีสต์ เชื้อรา และไวรัส โดยจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้

7. ปริมาณของสารอินทรีย์ที่มีอยู่ ซึ่งอาจมีผลปกป้องจุลินทรีย์จาก sanitizer สารเคมีที่มีสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรงจะสามารถทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ได้หลายชนิดและมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง ตัวอย่างเช่น คลอรีน ซึ่งสามารถออกซิไดส์สารอินทรีย์ต่างๆ ในน้ำได้ แต่ปริมาณที่เติมลงไปในน้ำจะต้องมีการคำนวณเพื่อให้มีปริมาณของคลอรีนในรูปคลอรีนที่เหลืออยู่ (residual chlorine) ที่สามารถให้ผลในการทำลายจุลินทรีย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. อุณหภูมิขณะที่ใช้สาร sanitizer จากการที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น sanitizer (ที่มีประสิทธิภาพเฉพาะในช่วงอุณหภูมิหนึ่งๆ) จะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์

การฆ่าเชื้อโรค (disinfectant หรือ sanitizing) เป็นการทำลายหรือลดจำนวนจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ซึ่งไม่จำเป็นต้องกำจัดหรือทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ก็ได้ ต่างจากการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ (sterilization) ที่เป็นการกำจัดหรือทำลายจุลินทรีย์รวมทั้งสปอร์ของจุลินทรีย์อย่างสมบูรณ์ ในการทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องมือเครื่องใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารนั้นมีการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อทั้งชนิดความร้อนชื้น ที่ช่วยทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์สูญเสียสภาพหรือจับตัวกันเป็นก้อน ส่วนความร้อนแห้งทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์แห้งตายและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

สารชะล้างหรือสารทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมักเป็น สารผสมของสารที่มีคุณสมบัติต่างๆกัน เพื่อให้ใช้ได้หลากหลาย ดังนั้นควรพิจารณาเลือกใช้ให้ เหมาะสมกับประเภทของสิ่งสกปรก ลักษณะพื้นผิวของเครื่องมือ เครื่องจักร อุปกรณ์และวิธีการทำความสะอาด ควรศึกษาข้อมูลและข้อควรระวังในการใช้สารเหล่านี้ โดยมีข้อมูลความปลอดภัยในการใช้สารเหล่านี้

ดังนั้น สารประกอบประเภทกรด (acid sanitizers) กรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ เช่น กรดน้ำส้ม (acetic acid) กรดแลคติก (lactic acid) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) กรดเปอร์อะซิติก (peracetic acid) รวมกับสารลดแรงตึงผิวประจุลบ (anionic surfactant) ช่วยในการฆ่าเชื้อพื้นผิวที่ทำด้วยเหล็กปลอดสนิมมีประสิทธิภาพในการทำลายซัลโมเนลล่า และลิสทีเรียได้ดี

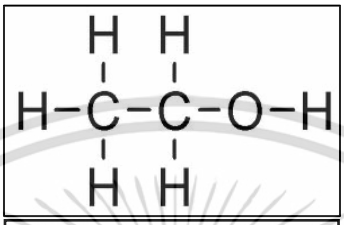
เอทานอล (Ethanol) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล Hydroxyl (-OH) ทำพันธะกับอะตอมคาร์บอนของหมู่แอลคิล (R-) โดยโครงสร้างของแอลกอฮอล์ทั่วไปนั้น มีสูตรทั่วไปอย่างง่ายคือ CnH2n+1OH เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสายตรง เมื่อทำปฏิกิริยากับโลหะ เช่น โซเดียม (Na) จะเกิดปฏิกิริยาแทนที่และให้ก๊าซไฮโดรเจน (H2) ออกมา ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติทางเคมีที่ใช้บ่งบอกความเป็นแอลกอฮอล์ได้

ตัวอย่างสมการเคมีเมื่อทำปฏิกิริยากับโลหะ

$$2CH_3OH + 2Na \longrightarrow 2CH_3ONa + H_2$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

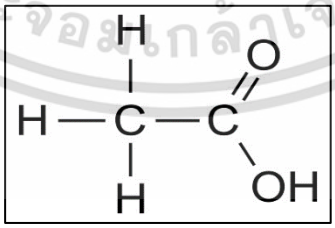
ลักษณะทั่วไปที่สำคัญของแอลกอฮอล์ คือ เป็นสารที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟได้ และสามารถละลายน้ำได้ดีเพราะแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแบบมีขั้ว (Dipole Interactions) ซึ่งทำให้แอลกอฮอล์สามารถละลายน้ำได้ดีเนื่องจากเป็นสารละลายมีขั้วเหมือนกันกับน้ำ



เอทานอล (Ethanol)

ภาพที่ 2.5.1 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเอทานอล (Ethanol)
ที่มา : สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา(2551)

กรดอะซิติก (Acetic Acid) หรือ กรดน้ำส้ม คือ กรดอินทรีย์หรือสารประกอบเคมีอินทรีย์ที่พบได้ในธรรมชาติมีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน มีลักษณใส ไม่มีสี มีกลิ่นฉุนที่เป็นเอกลักษณ์ มีรสเปรี้ยว ระเหยง่าย ละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ กลีเซอรีน มีความเสถียร มีสูตรทางเคมี CH3COOH ในอุตสาหกรรมจะใช้กรดอะซิติกที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ได้เป็นกรดอะซิติกซึ่งมีความบริสุทธิ์ต่ำ มีการเจือปนของโลหะหนัก กรดอะซิตกิกแบบนี้จะมีราคาถูกจึงนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตพลาสติก การผลิตสีย้อมผ้า การผลิตเส้นใยโพลิเมอร์ ผลิตกาว อุตสาหกรรมสิ่งพิมพ์และใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เป็นต้น

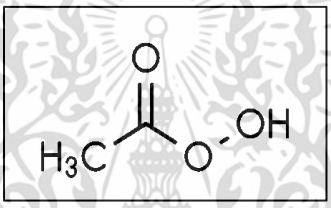


กรดน้ำส้ม (Acetic acid)

ภาพที่ 2.5.2 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดน้ำส้ม (Acetic acid)
ที่มา : สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา(2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดเปอร์อะซิติก (Peracetic acid) คือสารเคมีที่มีความสามารถทำลายสปอร์อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับรูปแบบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ หรือไม่สมบูรณ์ทำลายเพียงรูปแบบการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต พวกเขามีความแตกต่าง ไปจากการฆ่าเชื้อ ซึ่งเป็นสารต้านการติดเชื้อ ใช้กับมนุษย์และสัตว์อื่น ๆ ควรใช้งานได้ทันที ก่อนที่จะปิดฝาและเริ่มต้นใช้งาน ต้องผสมกรดเปอร์อะซิติกเข้มข้นเจือจาง 0.2% กับน้ำกรอง (0.2 ไมครอน) เจือจางกรดเปอร์อะซิติก และผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 12 นาที กลไกการออกฤทธิ์ของกรดเปอร์อะซิติก เป็นสารออกซิไดซ์ ซึ่งโปรตีน denatures จะรบกวนเซลล์ ซึมผ่านผนัง (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2551)



กรดเปอร์อะซิติก(Peracetic acid)

ภาพที่ 2.5.3 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดเปอร์อะซิติก(Peracetic acid)
ที่มา : สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา(2551)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทดลองของ (Altenhofen และคณะ, 2015) กล่าวว่า ระบบทั้งหมดต้องได้รับการฆ่าเชื้อโดยการหมุนเวียน สารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้น 70% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นแผ่น สแตนเลส จะถูกส่งไปยังที่ sterile support และเลื่อนเข้าไปใน sterilization chamber อย่างระมัดระวัง หมุนปิด ฝาครอบ ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อและการตั้งค่าทั้งหมดทำให้ร้อนโดยความต้านทานไฟฟ้าจนถึงค่าที่ตั้งไว้ เมื่ออุณหภูมิถึงค่าที่กำหนดแล้วเปิดปั๊ม CO_2 แล้วจะทำให้วาล์วท่อทางเข้าและวาล์วท่อของ ทางออกปิด เพื่อปล่อย CO_2 ลงในท่อ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการฆ่าเชื้อวาล์วท่อของทางออกจะเปิดขึ้น เพื่อให้สามารถทำการปรับระบบได้เก็บแผ่น สแตนเลสสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Altenhofen และคณะ (2015) ได้ศึกษาการฆ่าเชื้อ ด้วยวิเคราะห์ผลของอุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียส และเวลาในการฆ่าเชื้อ (1, 2 และ 3 ชั่วโมง) ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *G. stearothermophilus* ที่ความดันคงที่ ที่ 30 MPa พบว่า การลดจำนวนสปอร์ของ *G. stearothermophilus* หลังจากการฆ่าเชื้อลดลง เพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 1 log cycle) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สปอร์ของเชื้อมีความต้านทานสูงต่อการฆ่าเชื้อ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อ ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับ การทดลองที่เกี่ยวกับกลไกการยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรีย ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งของแบคทีเรีย และการฆ่าเชื้อด้วย SC-CO_2 ที่ความดัน 30 MPa และอุณหภูมิปานกลาง สามารถยับยั้งเซลล์แบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่การฆ่าเชื้อ SC-CO_2 เพียงอย่างเดียว ไม่เพียงพอที่จะยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรีย เนื่องจากโครงสร้างที่ซับซ้อน แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ มีบทบาทสำคัญในกระบวนการยับยั้งสปอร์ อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ยับยั้งสปอร์ โดยการทำงานร่วมกันของ SC - CO_2 และ nisin สามารถนำมาประกอบกับกลไก หลายอย่างที่เกิดขึ้นพร้อมกันผ่านขั้นตอนที่ซับซ้อนและสัมพันธ์กัน จึงให้เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรีย

Maria และคณะ (2019) ได้รายงานว่า สารเคมีจะช่วยลดแรงตึงผิว และสามารถทำลายองค์ประกอบของนม (ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต) ได้ ในขณะเดียวกันสารเคมี จำพวกกรดยังมีความสามารถในการฆ่าเชื้อองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยายาระหว่างไบโอฟิล์มกับผนังเซลล์ได้

Dlugokenski และคณะ (1997) ได้รายงานว่า TSA ได้รับการพิจารณาว่าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะกับการเจริญที่ดีที่สุด ซึ่งให้ผลการตรวจนับโคโลนีที่ชัดเจนและนับได้ง่ายต่อเจริญของสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ นอกจากแคลเซียม ซึ่งได้รับการรายงาน ว่าจะเพิ่มการฟื้นตัวของเชื้อ *G. stearothermophilus* สรุปได้ว่าจากการศึกษาครั้งนี้จะให้ข้อมูลในการปรับปรุงการเปลี่ยนแปลงของ *G. stearothermophilus* โดยการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส *G. stearothermophilus* เป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) และอุณหภูมิที่สูงสุดในการเจริญ 65 - 75 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิที่ต่ำที่สุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ 40 องศาเซลเซียส และทนต่อกรดได้เล็กน้อย แบคทีเรียไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญที่สุด คือ 55 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเจริญที่รวดเร็ว (เวลาในการแบ่งตัวแบบทวิภาค (binary fission) 15-20 นาที) ค่า pH ต่ำสุดสำหรับการเจริญของ *G.cstearothermophilus* คือ 5.2 และค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเจริญที่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 0.93 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Plate count agar (PCA)	HIMEDIA, India
Trypticase soy agar (TSA)	HIMEDIA, India
Trypticase soy broth (TSB)	HIMEDIA, India

3.1.2 สารเคมี

Acetic acid 99.8%	Merck K GaA, Germany
Ethanol 95%	Excise Department, Thailand
Peptone	(Himedia,India)

Peracetic acid

สีคริสตัลไวโอเลต Gram Crystal violet

สีซาฟรานิน (Gram safranin o)

สารละลายไอโอดีน (Gram iodine)

สีย้อมสปอร์ มาลาไคท์ กรีน (Malachite green)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 อุปกรณ์

กระบอกตวง (Cylinder)

กระจกสไลด์ (Microscope slide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดดูเรน (Laboratory bottle)

ขวดแยมและฝาเจาะรู

ไม้พันสำลีก้าวยาว

จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร

จานเพาะเชื้อพลาสติก (Plastic petri dish)

ช้อนตักสาร (Spatula)

ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ (Steriled plastic bag)

แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)

บีกเกอร์ (Beaker)

ปากคีบ (Forcep)

ปิเปต (Graduated pipette)

ปิเปตทิป (Pipette tips)

แผ่นสแตนเลส (Metal)

ลูกยางดูดปิเปต (Rubber bulb)

หลอดทดลอง (Test tube)

หลอดหยด (Dropper)

ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.2.2 เครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright field Microscope)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) Tommy, Japan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครปิเปต (Micropipette)	Eppendorf, Germany
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)	Ohaus Corp.Pine Brock, U.S.A
เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vortex Mixer)	Scientific Industries , U.S.A
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Eppendorf, Germany
ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker)	Eppendorf, Germany
ตู้ลามิน่า (Lamina air flow cabinet)	
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

3.3.1.1 การศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ

ทำการสังเกตลักษณะโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร TSA โดยทำการสังเกตลักษณะของโคโลนี ต่อไปนี้ ขนาด (Size) รูปร่าง (Form) ลักษณะการนูน (Elevation) ขอบโคโลนี (Margin) และผิวโคโลนี

3.3.1.2 การศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อ โดยการย้อมสีแบบแกรม

นำเชื้อ *G. stearothermophilus* ที่ทำการเลี้ยงเชื้อใน TSA slant บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อ โดยการย้อมสีแบบแกรม (นารีรัตน์ คงเพชร, 2557)

3.3.1.3 การศึกษาลักษณะสปอร์และการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*

นำเชื้อ *G. stearothermophilus* ที่ทำการเลี้ยงเชื้อใน TSA slant บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทำการศึกษาลักษณะสปอร์และการสร้างสปอร์ของเชื้อ โดยการย้อมสปอร์ (Spore Stain) (นารีรัตน์ คงเพชร, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*

ทำการเตรียมอาหาร TSA ที่ปราศจากเชื้อลงในเพลตที่ใช้บ่มเชื้อ แล้วทำการฆ่าเชื้อโดยการนำเข้าเครื่องยูวี ในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) จากนั้นนำห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลนไฟให้ร้อนแดง ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเอียงที่มีเชื้อ *G. stearothermophilus* ลงบนเพลตอาหาร TSA 1 ลูป โดยใช้วิธี Streak plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณเชื้อที่เจริญทั้งหมด

3.3.3 การฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นแผ่นสแตนเลส

ทำการล้างแผ่นสแตนเลส เพื่อให้แผ่นสแตนเลส ทุกแผ่นมีสภาวะที่ใกล้เคียงกันก่อนนำมาทำการศึกษาในการฆ่าเชื้อปนเปื้อน โดยการฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส นั่นจะใช้วิธีทางเคมี (Chemical means) ใช้สารเคมีในการฆ่าเชื้อ โดยการนำแผ่นสแตนเลส แช่ในสารเคมี ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มี 3 ชนิด สารเคมีแต่ละชนิดจะที่มีความเข้มข้นและเวลาในการฆ่าเชื้อแผ่นสแตนเลส ที่แตกต่างกัน ดังนี้

1. Acetic acid ความเข้นข้นที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 10%, 20%, 30% ที่เวลา 30, 60 นาที
2. Ethanol 70% ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5, 15, 30 และ 60 นาที
3. Peracetic acid ความเข้นข้นที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 1%, 2%, 3%, 5% ที่เวลา0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, และ 60 นาที

แผ่นสแตนเลส ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปนเปื้อนแล้ว นำไปวางบนอาหาร TSA และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีและทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อปนเปื้อนบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส

3.3.4 การหาเชื้อเริ่มต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ ต้องการเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *G. stearothermophilus* ที่ 10^{-3} - 10^{-6} ก่อนทำการเลี้ยงเชื้อบนพื้นผิวสแตนเลส ทำการถ่ายเชื้อ *G. stearothermophilus* โดยการเขี่ยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จาก TSA slant ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) ลงในหลอดอาหาร TSB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการ Swab test เจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นตามลำดับ (Serial dilution)) โดยการเขี่ยเชื้อจาก TSA slant ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) ลงในหลอด Peptone water 0.1 % 9 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อทำให้ผสมเข้ากัน ด้วยวิธีการใช้เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vortex Mixer) จะได้ตัวอย่างที่มีระดับเจือจางที่ 10^{-1} แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดระดับเจือจางที่ 10^{-1} 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด Peptone water 0.1 % 9 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อทำให้ผสมเข้ากัน ด้วยใช้เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vortex Mixer) จะได้ตัวอย่างตัวอย่างที่มีระดับเจือจางที่ 10^{-2} แล้วนำการเจือจางต่อที่ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} จนได้ระดับการเจือจางที่ต้องการ 10^{-1} ถึง 10^{-6} แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เจริญทั้งหมดโดยวิธี Spread plate บน TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนโคโลนี ซึ่งช่วงโคโลนีอยู่ระหว่าง 30- 300 โคโลนี แล้วคำนวณปริมาณเชื้อที่เจริญใน TSA โดยใช้วิธีการคำนวณเป็น CFU/ml

3.3.5 การเลี้ยงเชื้อบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส

ก่อนทำการเลี้ยงเชื้อบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส ต้องทำการถ่ายเชื้อจาก TSA slant ลงในหลอดอาหาร TSB ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) 1 ลูป บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อต้องมีเชื้อเริ่มต้น อยู่ระหว่าง 10^{3} - 10^{6}และทำการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส ข้อ 3.3.3) ก่อนทำการเลี้ยงเชื้อบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส โดยการเลี้ยงเชื้อจะแบ่งออกเป็น 2 วิธี ดังนี้

3.3.5.1 การเลี้ยงเชื้อบนพื้นผิวสแตนเลส ด้วยตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker)

ทำการถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร TSB 5 มิลลิลิตร และนำแผ่นสแตนเลส ปลอดเชื้อ ใส่ลงในขวดแยมที่มีอาหาร TSB 50 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มด้วยตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลอย่างน้อย 5 วัน เพื่อหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นบนหน้าพื้นผิวแผ่นสแตนเลส

3.3.5.2 การเลี้ยงเชื้อบนพื้นผิวสแตนเลส ด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) และมีการให้อากาศ ด้วยตัวปั้มอากาศ

ทำการถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร TSB 10 มิลลิลิตร และนำแผ่นสแตนเลส ปลอดเชื้อ ใส่ลงในขวดที่มีอาหาร TSB 100 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลอย่างน้อย 5 วัน เพื่อหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นบนหน้าพื้นผิวแผ่นสแตนเลส

3.3.6 การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นบนพื้นผิวหน้าแผ่นสแตนเลส

ในการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นบนพื้นผิวหน้าแผ่นสแตนเลส ใช้วิธีการ Swab test บนพื้นผิวหน้าแผ่นสแตนเลส โดยนำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาชุบกับ Peptone water 0.1 % ในหลอด ก่อนทำการ Swab บนพื้นผิวหน้าแผ่นสแตนเลส ให้ทั่ว แล้วทำการหักไม้พันสำลี ลงในหลอด Peptone water 0.1 % แล้วทำเขย่าด้วยใช้เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vortex Mixer) จะได้ตัวอย่างที่มีระดับเจือจางที่ 10^{-1} แล้วทำการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นตามลำดับ (Serial dilution) ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เจริญทั้งหมดโดยวิธี Spread plate บน TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณปริมาณเชื้อเริ่มต้นบนพื้นผิวหน้าแผ่นสแตนเลส

3.3.7 การยับยั้งเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวหน้าแผ่นสแตนเลส

ในการยับยั้งเชื้อ *G. stearothermophilus* จะใช้วิธีทางเคมี (Chemical means) โดยการแช่สารเคมีตาม ข้อ 3.3.3 การฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส แล้วใช้วิธีหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นบนพื้นผิวหน้าแผ่นสแตนเลส (ข้อ 3.3.6) แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณปริมาณเชื้อที่เจริญได้ เพื่อดูประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ *G. stearothermophilus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

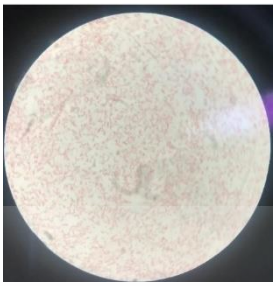
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษางานวิจัยเรื่องการยับยั้งเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส เนื่องจาก เชื้อ *G.stearothermophilus* เป็นเชื้อสร้างปัญหาให้กับโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เช่น โรงงานงานนม ซึ่งเชื้อจะก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มในท่อสแตนเลส ที่ใช้ในการขนส่งนมพาสเจอร์ไรซ์ และเชื้อจะมีการสร้างสปอร์ ทำให้เชื้อมีสามารถทนความร้อนในอุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ได้

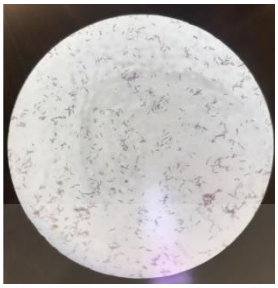
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อ *G. stearothermophilus* โดยการย้อมสีแบบแกรม (gram staining) (ภาพที่ 4.1 a) พบว่า เชื้อ *G. stearothermophilus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) โดยมีความสามารถติดสีย้อมแกรมทั้งสองสี เรียกว่า Gram variable ซึ่งเกี่ยวข้องกับผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย รูปทรงของเชื้อแบคทีเรียเป็นแท่ง (rod shape) และ ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ โดยการสังเกตลักษณะโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร TSA (ภาพที่ 4.1 c) พบว่า ลักษณะของเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยวสีขาวขุ่น รูปร่างกลม (Circular) ขอบของโคโลนีเป็นขอบเรียบไม่มีรอยหักเว้า (Entire) ลักษณะความนูนของโคโลนีค่อนข้างหนา ส่วนบนเรียบ มีขอบทำมุมลาดเอียงกับผิวอาหาร (Raised) ผิวโคโลนี เป็นผิวหน้าเรียบและเยิ้มคล้ายเมือก (mucoid) ในการศึกษาลักษณะสปอร์และการสร้างสปอร์ของเชื้อโดยทำการศึกษาด้วยวิธีการย้อมสปอร์ (Spore Stain) (ภาพที่ 4.1b) พบว่า เชื้อมีการสร้างสปอร์ได้ดี ในช่วง 24-48 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วง Stationery phase ของช่วงการเจริญเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(a)



(b)

(c)

ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*: (a) ลักษณะโครงสร้างของเชื้อ *G.stearothermophilus* โดยการย้อมสี แบบแกรม (gram staining); (b) ลักษณะสปอร์และการสร้างสปอร์ของเชื้อ โดยการย้อมสปอร์ (Spore Stain); (C) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *G.stearothermophilus* บนอาหาร TSA

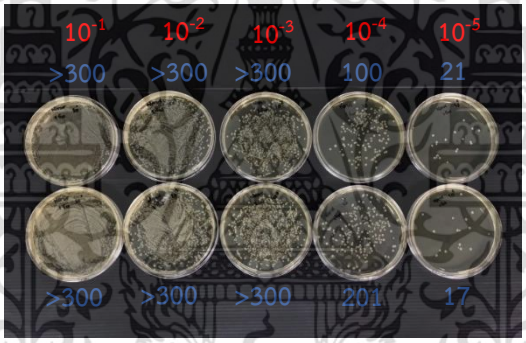
4.2 ผลการเจริญของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ในอุณหภูมิที่ 35 และ 60 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *G. stearothermophilus* ทั้งสองอุณหภูมิ ทำการทดสอบโดยการถ่ายหัวเชื้อ *G. stearothermophilus* ลงบนหลอดอาหารเอียง TSA Slant และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate ซึ่งอาศัยหลักการของ Aseptic technique แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อที่เจริญ พบว่า เชื้อ *G. stearothermophilus* มีอัตราการเจริญมากที่สุด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.1C) จากอุณหภูมิที่ได้ทำการทดลองไว้ข้างต้น จะเห็นได้ว่าการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Timko (2010) และ Wickhamlab (2017) ได้ทำการวิจัยหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการหาความเข้มข้นของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* เริ่มต้น

จากการศึกษาข้างต้น ในการหาอุณภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญได้ จึงได้มีการหาความเข้มข้นของเชื้อ *G. stearothermophilus* เริ่มต้น โดยนำเชื้อที่หลอดทดลองอาหารเอียงถ่ายลงอาหารเหลว TSB 1 ลูป เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อเจริญทั้งหมดโดยวิธี Spread plate โดยการทำเจือจางตามลำดับ (serial dilution) ซึ่งมีระดับการเจือจางที่ 10^{-4} ถึง 10^{-5} เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น (ภาพที่ 4.2) และนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์และคำนวณความเข้มข้นของเชื้อจะพบว่า เชื้อมีความเข้มข้นในระดับการเจือจางอยู่ระหว่าง 10^{-6} ถึง 10^{-7} ซึ่งได้จากการนับโคโลนีที่มีการเจริญอยู่ในช่วง 30 – 300 โคโลนี อนึ่งแสดงผลดังภาพที่ 4.2 ที่จะแสดงโคโลนีของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* แต่ละความเข้มข้ม



ภาพที่ 4.2 โคโลนีเริ่มต้นของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* โดยวิธี Spread plate

4.4 ผลการฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นแผ่นสแตนเลส ด้วยวิธีทางเคมี (Chemical means)

จากการศึกษาการฆ่าเชื้อปนเปื้อนแผ่นสแตนเลสด้วยวิธีทางเคมี โดยการใช้สารเคมีในการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสด้วยการนำแผ่นสแตนเลสแช่ในสารเคมี ตามเวลาที่กำหนดของแต่ละชนิดของสารเคมีและความเข้มข้นที่แตกต่างกันของแต่ละชนิดของสารเคมี เพื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส (ตารางที่ 4.1) พบว่า เอทานอล (Ethanol) ที่มีความเข้มข้น 70 % สามารถฆ่าเชื้อปนเปื้อนได้เพียงเล็กน้อยและใช้เวลา 30 นาทีขึ้น ถึงจะสามารถฆ่าเชื้อปนเปื้อนได้ กรดแอซีติก (Acetic acid) ที่มีความเข้มข้น 20% และ 30% สามารถฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสได้ดี แต่ต้องใช้ระยะเวลาที่ 30 นาทีขึ้น จึงจะสามารถยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อปนเปื้อนได้ กรดเปอร์อะซิติก (Peracetic Acid) ที่มีความเข้มข้น 1 % ขึ้นไป สามารถยับยั้งเชื้อปนเปื้อนได้ดีที่สุดและใช้ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อได้เร็วที่สุด ถือได้ว่า กรดเปอร์อะซิติกมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสได้มากที่สุด

ตาราง 4.1 การเปรียบเทียบการฆ่าเชื้อแผ่นสแตนเลส โดยใช้วิธีการใช้สารเคมี หาจำนวนรอดชีวิตและเปอร์เซ็นการยับยั้งเชื้อปนเปื้อนบนแผ่นสแตนเลส

สารเคมี	ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ (นาที)	การรอดชีวิต (%)	การยับยั้ง (%)
Ethanol 70%	1	100	0
	2	100	0
	3	100	0
	4	100	0
	5	100	0
	15	100	0
	30	100	50
	60	100	50
Acetic acid 10%	5	100	0
	15	100	0
	30	100	50
	60	100	75
Acetic acid 20%	5	100	75
	15	100	75
	30	100	100
	60	100	100
Acetic acid 30%	5	100	75
	15	100	75
	30	100	100
	60	100	100
Peracetic acid 1%	0.5	100	100

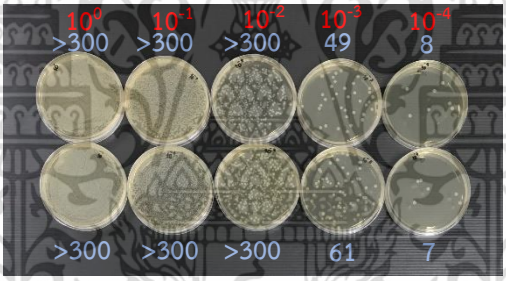
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	1	100	100
	2	100	100
	3	100	100
	4	100	100
	5	100	100
	10	100	100
	30	100	100
	60	100	100
Peracetic acid 2%	0.5	100	100
	1	100	100
	2	100	100
	3	100	100
	4	100	100
	5	100	100
	10	100	100
	20	100	100
	30	100	100
Peracetic acid 3%	0.5	100	100
	1	100	100
	2	100	100
	3	100	100
	4	100	100
	5	100	100
	10	100	100
	30	100	100
	60	100	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการเจริญของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนแผ่นสแตนเลส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *G. stearothermophilus* บนแผ่นสแตนเลส ด้วยการหาปริมาณของเชื้อเริ่มต้น โดยใช้วิธีการ Swab test บนพื้นผิวหน้าแผ่นสแตนเลส แล้วทำการเจือจางตามลำดับ (serial dilution) ระดับการเจือจางที่ต้องการ 10^{-1} ถึง 10^{-6} แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เจริญทั้งหมดโดยวิธี Spread plate บน TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่ม 2 วิธี ได้แก่ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker) และบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) และมีการให้อากาศ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 10^{-4} ถึง 10^{-5} ซึ่งถือว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ต้องการในขั้นตอนการยับยั้งเชื้อ บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส อนึ่งแสดงผลดังภาพ 4.3 ที่จะแสดงผลการเจริญของเชื้อ *G. stearothermophilus* บนแผ่นสแตนเลส



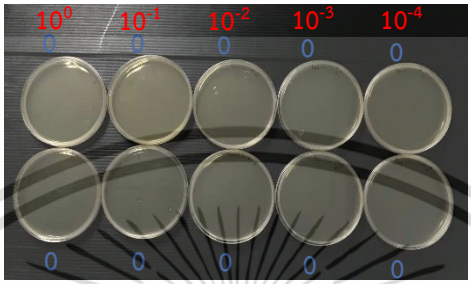
ภาพที่ 4.3 ที่จะแสดงผลการเจริญของเชื้อ *G. stearothermophilus* บนแผ่นสแตนเลส

4.6 ผลการยับยั้งเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส

จากการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *G. stearothermophilus* ที่มีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^{5} บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสด้วยวิธีทางเคมี โดยมีการใช้สารเคมีในการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส ด้วยการนำแผ่นสแตนเลสแช่ในสารเคมีในระยะเวลาที่กำหนด แล้วนำแผ่นสแตนเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไปวางบนอาหาร TSA แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีเชื้อ เพื่อดูประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ (ตารางที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2) พบว่า กรดเปอร์อะซิติก (Peracetic Acid) ที่มีความเข้มข้นที่ 1 % สามารถฆ่าเชื้อ *G. stearothermophilus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อนึ่งแสดงผลดังภาพ 4.4 ที่แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *G. Stearothermophilus* บริเวณพื้นผิวแผ่นสแตนเลส



ภาพที่ 4.4 ผลการยับยั้งเชื้อ G. Stearothermophilus บริเวณพื้นผิวแผ่นสแตนเลส บนอาหาร TSA

ตารางที่ 4.2 การยับยั้งเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส โดยใช้สารเคมี Peracetic acid 1%

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml)	วิธีการฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้นของ Peracetic acid (%)	ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ (วินาที)	จำนวนการรอดชีวิต (CFU/ml)	การยับยั้ง (%)
10^5	สารเคมี	1	30	0	100
		1	60	0	100
		1	90	0	100
		1	120	0	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

สามารถสรุปผลการทดลองตามหัวข้อดังนี้

5.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ ของเชื้อ *Geobacillus tearothermophilus*

เชื้อ G. stearothermophilus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) รูปทรงเป็นแท่ง (rod shape) และ ลักษณะของเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยว สีขาวขุ่น รูปร่างกลม (Circular) ขอบของโคโลนีเป็นขอบเรียบไม่มีรอยหักเว้า (Entire) ลักษณะความนูนของโคโลนีค่อนข้างหนา ส่วนบนเรียบ มีขอบทำมุมลาดเอียงกับผิวอาหาร (Raised) ผิวโคโลนี เป็นผิวหน้าเรียบและเยิ้มคล้ายเมือก (mucoid) เชื้อมีการสร้างสปอร์ได้ดี ในช่วง 24-48 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วง Station-ery phase ของช่วงการเจริญเชื้อ เชื้อนั่นจะเจริญได้ดีที่สุดในอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส

5.1.2 การฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นแผ่นสแตนเลส ด้วยวิธีทางเคมี (Chemical means)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง โดยการนำแผ่นสแตนเลสแช่ในสารเคมี ตามเวลาที่กำหนดของแต่ละชนิดของสารเคมีและความเข้มข้นที่แตกต่างกันของแต่ละชนิดของสารเคมี เพื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส

ทำให้ทราบว่า กรดเปอร์อะซิติก (Peracetic Acid) ที่มีความเข้มข้นที่ 1 % ขึ้นไป ใช้เวลาอย่างน้อย 30 วินาที สามารถยับยั้งเชื้อปนเปื้อนได้ดีที่สุดและใช้ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อได้เร็วที่สุด ถือได้ว่า กรดเปอร์อะซิติก (Peracetic Acid) มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสได้มากที่สุด

5.1.3 การยับยั้งเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลส

ในการยับยั้งเชื้อ จะใช้วิธีทางเคมีในการยับยั้ง โดยจะใช้กรดเปอร์อะซิติก (Peracetic Acid) ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดเดียวกับการฆ่าเชื้อปนเปื้อนบนพื้นแผ่นสแตนเลส ทำให้พบว่า กรดเปอร์อะซิติก ที่มีความเข้มข้น 1% สามารถที่จะยับยั้งเชื้อ G.*stearothermophilus* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสได้ และใช้เวลาในการยับยั้ง เพียง 30 วินาที ก็ทำการยับยั้งเชื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษา หาข้อมูลเกี่ยวข้องกับอาหารเลี้ยงเชื้อให้สอดคล้อง และเหมาะสมกับเชื้อที่ทำการศึกษา และควรทำการเปรียบเทียบสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ เพื่อลดข้อผิดพลาดในการทำการวิจัย

5.2.2 ก่อนทำงานวิจัยต้องทำความเข้าใจ และวางแผนงานก่อนทำการวิจัย เพื่อลดข้อผิดพลาดในระหว่างการทำงานวิจัย

5.2.3 ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี ต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้สารเคมี และอันตรายในการใช้สารเคมี ก่อนทำงานวิจัย เนื่องจากสารเคมีบางชนิดมีความสามารถในการกัดกร่อนค่อนข้างรุนแรง ส่งผลต่อผิวหนังมนุษย์ได้ และขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรทำให้ปลอดเชื้อทุกครั้ง เพื่อลดการปนเปื้อน โดยการยึดหลักการ Aseptic technique

5.2.4 มีการทดสอบประสิทธิภาพการทำงาน ของเครื่องมือที่ใช้ในการทำงานวิจัย ก่อนใช้งานทุกครั้ง และเครื่องมือที่ใช้ในการควบคุมอุณหภูมิต้องมีการตรวจสอบ และทดสอบอุณหภูมิให้คงที่อย่างน้อย 1 ชั่วโมง

5.2.5 งานวิจัยส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และบางครั้งเป็นขั้นตอนการแยกเชื้อบริสุทธิ์อาจทำให้ปนเปื้อนได้ง่าย ดังนั้นต้องใช้หลักการ Aseptic technique ทุกขั้นตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2560. การใช้ความร้อนการฆ่าเชื้อในอาหาร. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 12 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://bsc.dip.go.th/th/category/production2/qs-heatinfoods

ไทยไบโอ อ็อกซีน. ไบโอฟิล์ม. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 13 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://www.visittbo.com/what-is-biofilm-th.html#:~:text

นารีรัตน์ คงเพชร. 2557. การศึกษาแบคทีเรียโดยการย้อมสีแบบต่างๆ. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://sites.google.com/site/yxmsiba-ekhthireiy/system/app/pages/recentChanges

ปุณณาณ สัทภาวะผล และดุสิดา ถิระวัฒน์. 2559. ไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรม. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่13 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://firinpsu.org/files/com_news/20160615_yaqlmsty.pdf

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2559.คุณภาพนมพาสเจอร์ไรซ์และสเตอร์รีไรซ์. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: http://www.food-networksolution.com/wiki/word/0942/sanitizer-%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%86%E0%B9%88%E0%B8%B2%E0%B9%80%E0%B8%8A%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%AD

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2560. Geobacillus stearothermophilus [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: http://www.food-networksolution.com/wiki/word/2673/ geobacillus-stearothermophilus.

วาสิฏฐี เนียมสุวรรณ์, กีรญา สินธุไพร,ชนากานต์ พลาพิริยกิจ, ประกายแก้ว พงษ์สูงเนิน, ชลิดา มาลัยลอย. 2561 การพาสเจอร์ไรส์. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://sites.google.com/site/khorngnganthnxmxahar/kar-thnxm-xahar/kar-phas-ce-xr-ris

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาขาวิชาคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. 2551. ผลิตภัณฑ์อาหาร. หน่วยที่ 8-15. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2551. คู่มือ GMP ผลิตภัณฑ์นมพร้อมบริโภคชนิดเหลวที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อโดยวิธีพาสเจอร์ไรส์สำหรับผู้ประกอบการ. นนทบุรี

Angela W., David B., and Tim WC. 2006. Effective terminal sterilization usingsupercritical carbon dioxide. Biotechnol, Vol123: 504–515.

Andre, S., Andre, and F., Zuber, NA. 2013. RemizeThermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey Int. J. Food Microbiol, Vol24: 134-143.

Coorevits, A., Dinsdale, AE., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., and Logan, NA .2012. Taxonomic revision of the genus Geobacillus emendation of Geobacillus, *G. stearothermophilus, G. jurassicus, G. toebii, G. thermodenitrificans and G. thermoglucosidans* transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of Caldibacillus debilis gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to Anoxybacillus as A. tepidamans comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus sp.* nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol62(7): 1470–85.

Heidy M. W., Marjon H. J., and Marcel, H. 2018. Natural diversity in heat resistance of bacteria and bacterial spores: impact on food safety and quality Annu. Rev. Food Sci. Vol: 383-410

Isaac, D. W. and Juergen W. 2008. Diversity of Thermophilic Anaerobes. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://www.researchgate.net/publication/5473257_Diversity_of_Thermophilic_Anaerobes

Maria, R. 2019. Influence of different cleaning and sanitization procedures on the removal of adhered Bacillus cereus spores. International Dairy Journal Vol: 22-28.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mariana A., Amanda P., Juliana d., and Theo G. K. 2016. Inactivation of Bacillus subtilis and Geobacillus stearothermophilus inoculated over metal surfaces using supercritical CO2process and nisin. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/ S0896844615301868.

Juergen, W. 2014. Geobacillus stearothermophilus (Formerly Bacillus stearothermophilus). [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://books.google.co.th/books?hl=th&lr=&id=1b1CAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA129&dq=Geobacillus+stearothermophilus+(Formerly+Bacillus+stearothermophilus).&ots=mzMYhlPC29&sig=dsV2c_OO7UYwmeUSOrE0DqrJYec&redir_esc=y#v=onepage&q=Geobacillus%20stearothermophilus%20(Formerly%20Bacillus%20stearothermophilus).&f=false.

Timko, S. 2015. Microbiology 5E. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Geobacillus_ stearothermophilus

Wickhamlap. 2017. Geobacillus stearothermophilus. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563. เข้าถึงได้จาก: https://wickhamlabs.co.uk/about-wickham-laboratories/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1.Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5	g
Yeast extract	2.5	g
Dextrose	1	g
Agar	15	g
Final pH	7.3 + 0.2	

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายใส่ขวดที่มีฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.2.Trypticase(Tryptic) Soy Broth

Trypticase peptone	17	g
Phytone peptone	3	g
NaCl	5	g
K2HPO4	2.5	g
Glucose	2.5	g
น้ำกลั่น	1	L
Final pH	7.3 + 0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ลงในฟลาสก์หรือขวดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3.Trypticase(Tryptic) Soy Agar

Trypticase peptone(Tryptone)	15	g
Phytone peptone(Soytone)	5	g
NaCl	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L
Final pH	7.3 + 0.2	

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอช ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.4.Peptone water 0.1%

Peptone	1	g
น้ำกลั่น.	1	L

ละลายให้เข้ากัน และเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสีย้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสีย้อม

ข.1.Gram Crystal violet

Solution A (Stock)

Crystal violet (90% day content)	2	g
95 % Ethanol	20	g

Solution B

Ammonium oxalate	0.8	g

เจือจาง Solution A ลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นแล้วผสมกับสาร Solution B ตั้งไว้ 24 ชม. แล้วกรองก่อนใช้

ข.2.Gram iodine

Iodine.	2	g
Potassium iodide (KI)	4	g
น้ำกลั่น	300	ml

ละลาย KI ในน้ำกลั่น บด iodine แล้วละลายในสารละลาย KI กวนจนละลายหมด เก็บในขวดสีชา

ข.3.Gram Safranin o

Safranin o	0.25	g
95 % Ethanol	10	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น	90	ml

ละลายสีใน ethanol (กวนด้วยแท่งแก้วหรือ magnetic bar)แล้วเติมน้ำกลั่น กรองก่อนใช้

สารเคมีสำหรับการย้อมสปอร์ Spore stain

ข.1.Malachite green

Malachite green	0.5	g
น้ำกลั่น	30	ml

ข.2. 0.5% Safranin O spore stain (counter stain)

Safranin O	0.5	g
น้ำกลั่น	30	ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

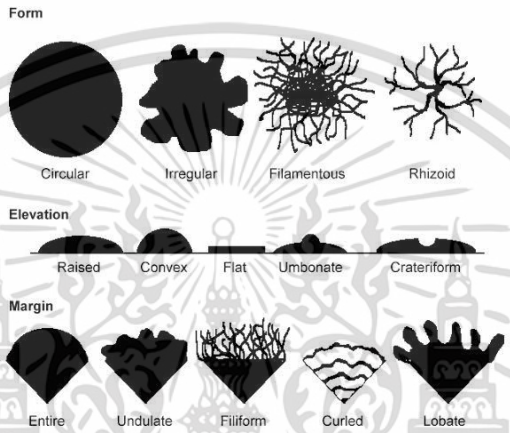
ผลการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย

ค.1 ลักษณะและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย (Colony characteristics)



ที่มา : Acharya (2013)

https://images.app.goo.gl/QyPifd15xw4brMRa8

ค.2 ลักษณะของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ที่เจริญในหลอดอาหารเหลว TSB

ภาพที่ ค.2 การเจริญของเชื้อ ***G. stearothermophilus*** ในอาหารเหลว TSB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.3 ลักษณะของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ที่เจริญบนแผ่นสแตนเลส ในอาหารเหลว TSB

ภาพที่ ค.3 การเจริญของเชื้อ *G. Stearothermophilus* บนแผ่นสแตนเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

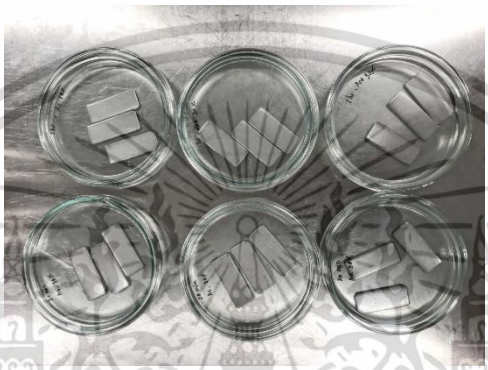
ผลการวิเคราะห์แผ่นสแตนเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

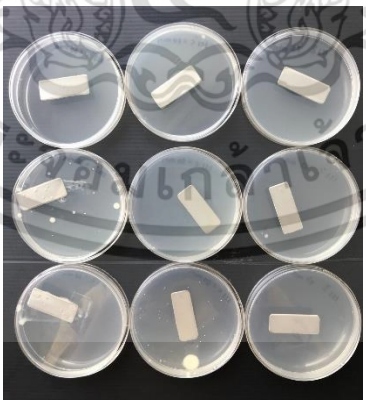
ผลการวิเคราะห์แผ่นสแตนเลส

ง.1 ชุดทำความสะอาดที่ใช้ฆ่าเชื้อแผ่นสแตนเลส



ภาพที่ ง.1 อุปกรณ์ใช้ฆ่าเชื้อแผ่นสแตนเลส

ง.2 ผลการตรวจวิเคราะห์การฆ่าเชื้อแผ่นสแตนเลส โดยใช้สารเคมี



ภาพที่ ง.2 การตรวจวิเคราะห์แผ่นสแตนเลส บนอาหาร PCA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

วิธีการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของเชื้อ โดยการย้อมสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

วิธีการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของเชื้อ โดยการย้อมสีแบบแกรม

จ.1 ขั้นตอนการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อ โดยการย้อมสีแบบแกรม

1) หยดสี crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ของเชื้อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
2) ล้างสีออกด้วยน้ำ จากกระบอกฉีดน้ำ ที่เปิดให้ไหลเบาๆ แล้วหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ทั่วรอยสเมียร์ของเชื้อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
3) ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนออกด้วยน้ำและล้างอีกครั้งด้วย 95 % Ethanol ซึ่งทำได้โดยการจับสไลด์ในลักษณะทำมุม 45 องศา หยด 95 % Ethanol ที่ปลายด้านบนสไลด์ โดยให้ Ethanol ไหลผ่านผิวหน้ารอยสเมียร์ จนกระทั่ง Ethanol ที่ไหลลงมาไม่มีสี ไม่ควรใช้เวลานานเกิน 2 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำทันที
4) ย้อมทับด้วยสีซาฟรานิน ซึ่งทำได้โดยหยดสี ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที

จ.2 ขั้นตอนการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อ โดยการย้อมสีสปอร์

1) หยดสี มาลาไคท์ กรีน (Malachite green) ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ของเชื้อ แล้วนำไปวางเหนือไอน้ำเดือด เป็นเวลา 5-10 นาที หากสีมาลาไคท์ กรีน (Malachite green) แห้งต้องเติมให้ท่วม
2) ล้างสีออกด้วยน้ำ จากกระบอกฉีดน้ำ ที่เปิดให้ไหลเบาๆ แล้วปล่อยให้สไลด์แห้งในอากาศหรือซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ
3) ย้อมทับด้วยสีซาฟรานิน ซึ่งทำได้โดยหยดสี ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 30 วินาที
4) ล้างสีออกด้วยน้ำ จากกระบอกฉีดน้ำ ที่เปิดให้ไหลเบาๆ แล้วปล่อยให้สไลด์แห้งในอากาศหรือซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ
5) ตรวจผลโดยนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกัลยาณิน ศรีสิริรัตนกุล	
วัน เดือน ปี เกิด	15 มกราคม พ.ศ.2540	
ประวัติการศึกษา	ระดับประถมศึกษา	โรงเรียนบ้านบางกะปิ
	ระดับมัธยมปลาย	โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ บดินทรเดชา (วิทย์-คณิต)
	ระดับปริญญาตรี	คณะอุตสาหกรรมอาหาร (วิทยาศาสตร์บัณฑิต) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	นักศึกษาฝึกงานที่ สถาบันรับรองมาตรฐาน ไอ.เอส.โอ (MASCI)	
	นักศึกษาทำงานวิจัย เรื่องการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นสแตนเลส	

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวจิราวรรณ โชติประเสริฐ	
วัน เดือน ปี เกิด	23 ธันวาคม พ.ศ.2540	
ประวัติการศึกษา	ระดับประถมศึกษา	โรงเรียนสวนรัฐวิทยา
	ระดับมัธยมปลาย	โรงเรียนศรีพฤฒา (วิทย์-คณิต)
	ระดับปริญญาตรี	คณะอุตสาหกรรมอาหาร (วิทยาศาสตร์บัณฑิต) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	นักศึกษาฝึกงานที่ บริษัท ปทุมธานี บริวเวอรี่ จำกัด	
	นักศึกษาทำงานวิจัย เรื่องการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* บนพื้นผิวสแตนเลส	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้