

การก่อเกิดและการควบคุมไบโอฟิล์มของ *Vibrio parahaemolyticus* บนผิวเหล็กกล้าไร้สนิม

นางสาวณัฐนิษฐ์ ศรีมังกรแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

FORMATION AND CONTROL OF *Vibrio parahaemolyticus* BIOFILM ON  
STAINLESS STEEL SURFACES

Miss Nattanit Srimangkornkaew

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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การก่อเกิดและการควบคุมไบโอฟิล์มของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> บนผิวเหล็กกล้าไร้สนิม
โดย	นางสาวณัฐฐินิษฐ์ ศรีมังกรแก้ว
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมนี สงวนดีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเจียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ)

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

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณี สินชัยพานิช)

ณัฐฐินิษฐ์ ศรีมังกรแก้ว : การก่อเกิดและการควบคุมไบโอฟิล์มของ *Vibrio parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม. (FORMATION AND CONTROL OF *Vibrio parahaemolyticus* BIOFILM ON STAINLESS STEEL SURFACES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. รมณี สงวนดีกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร. สุเมธ ตันตระเรีเยียร, ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิตชัย วัฒนา, 141 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากาการเกาะติด การเกิดไบโอฟิล์ม และการควบคุมไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นของ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 DMST 21243 บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีเกรดและพื้นผิวแตกต่างกัน โดยเลือกใช้เหล็กกล้าไร้สนิม 3 เกรด (304, 316L และ 430) และ พื้นผิว 2 ชนิด (2B และ BA) พบว่า เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L มีความขรุขระมากที่สุด รองลงมาคือ เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และ 430 ตามลำดับ และ เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B มีความขรุขระมากกว่าพื้นผิว BA และในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  เพียงแค่สัมผัส (0 นาที) ก็สามารถทำให้ *V. parahaemolyticus* เกาะติดบนแผ่น เหล็กกล้าไร้สนิมได้ โดยพบว่า *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L ได้มากกว่าเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และ 430 ตามลำดับ และ *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B ได้มากกว่า พื้นผิว BA ในขณะที่เมื่อพิจารณาการเพิ่มจำนวนและเกิดเป็นไบโอฟิล์ม พบว่า *V. parahaemolyticus* สามารถเพิ่มจำนวนบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 ได้ดีกว่าเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และ 316L ตามลำดับ และ *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดและเพิ่มจำนวนบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B ได้มากกว่าพื้นผิว BA และภายใต้สภาวะที่ไม่ให้สารอาหารเพิ่ม *V. parahaemolyticus* ก็ยังสามารถอยู่รอด เจริญ และเพิ่มจำนวนบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้ ส่วนในการศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของ benzalkonium chloride พบว่า ในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  นั้น benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดในทันทีที่สัมผัส และในการทดสอบประสิทธิภาพของ benzalkonium chloride ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีเกรดและพื้นผิวแตกต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน benzalkonium chloride สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 ได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และ 316L ตามลำดับ และสามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว BA ได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....  
ปีการศึกษา.....2555..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5372450223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD : BIOFILM / *Vibrio parahaemolyticus* / STAINLESS STEEL

NATTANIT SRIMANGKORNKAEW : FORMATION AND CONTROL OF *Vibrio parahaemolyticus* BIOFILM ON STAINLESS STEEL SURFACES. ASVISOR : ASST. PROF. ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D. CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D., ASST. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., 141 pp.

This research studied the attachment, biofilm formation and control of biofilm formed by *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 DMST 21243 on different grades and finishes of stainless steel. Three grades (304, 316L and 430) and 2 finishes (2B and BA) were used. It was found that stainless steel grade 316L was the most roughness follow by 304 and 430 and 2B finish was rougher than BA finish. The results showed that at initial cells suspension of 9 log CFU/ml, at 0 minute bacterial cells can attach on coupons. The number of cells attached on coupons grade 316L was higher than other grades and 2B finish was higher than BA finish. The bacterial cells can form biofilm on coupons. The number of cells on coupon grade 430 was higher than 304 and 316L respect and 2B finish was higher than BA finish. *V. parahaemolyticus* can survive and grow on coupons under condition that no additional of nutrients. The efficacy of benzalkonium chloride was investigated. In planktonic state, the results showed that benzalkonium chloride 0.02% completely eliminated all cells at sudden contact at initial cells suspension of 9 log CFU/ml. The efficacy of benzalkonium chloride on *V. parahaemolyticus* biofilm on different grades and finish of stainless steel were studied. At same concentration of benzalkonium chloride the time to eliminated bacterial cells on stainless steel grade 430 was shortest follow by 304 and 316L and BA finish was than 2B finish.

Field of Study : .....Biotechnology.....  
Academic Year : .....2012.....

Student's Signature.....  
Advisor's Signature.....  
Co-advisor's Signature.....  
Co-advisor's Signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นไปได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์.ดร. สุเมธ ตันตระเขียร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรวรรณ์ สิ้นชัยพานิช ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบริษัท โพลโค-ไทยน็อคซ์ จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์เหล็กกล้าไร้สนิม และบริษัท แอ็ดวานซ์ฟาร์มา จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ สำหรับความช่วยเหลือที่ดีจากนางสาวกนกวรรณ สีเหนียง นางสาวราตรี ผูกขอบ และนางสาวกฤษณา ไกรสมดี รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกๆ ท่าน และเพื่อนๆ ทุกคนในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชายและสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้ความอบอุ่น และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	๗
บทที่	
1    บทนำ.....	1
2    ทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	4
ไบโอฟิล์ม.....	9
การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ.....	14
เหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel).....	18
Quaternary ammonium compound.....	24
3    ระเบียบวิธีวิจัย.....	28
จุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ในการวิจัย.....	28
พื้นผิวทดสอบที่ใช้ในการวิจัย.....	28
สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย.....	29
ขั้นตอน และวิธีดำเนินการวิจัย.....	30
4    ผลการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย.....	35
5    สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	84
รายการอ้างอิง.....	86

	หน้า
ภาคผนวก.....	99
ภาคผนวก ก    การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย.....	100
ภาคผนวก ข    การเตรียมพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม.....	103
ภาคผนวก ค    การเตรียมเซลล์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	105
ภาคผนวก ง    การเตรียมสารฆ่าเชื้อ.....	107
ภาคผนวก จ    ตารางแสดงข้อมูล.....	109
ภาคผนวก ฉ    การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	128
ภาคผนวก ช    การทดสอบเพื่อยืนยัน <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	138
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	141



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ลักษณะทางชีวเคมีของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ..... 6
2.2	วัสดุพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และข้อจำกัดเพื่อใช้พิจารณา เลือกสารทำความสะอาดที่เหมาะสม..... 17
2.3	ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบทางเคมีโดยทั่วไปของ เหล็กกล้าไร้สนิม..... 21
2.4	ลักษณะของพื้นผิว ความเรียบ และความสามารถในการสะท้อนแสงของ เหล็กกล้าไร้สนิม..... 21
2.5	การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ..... 23
2.6	ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมกับพื้นผิวในโรงงาน อุตสาหกรรมอาหาร..... 26
4.1	ตรวจวัดความขรุขระของเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 316L และ 430 ด้วยวิธี Atomic Force Microscopy (AFM)..... 35
4.2	ตรวจวัดความขรุขระของเหล็กกล้าไร้สนิม พื้นผิว 2B และ BA ด้วยวิธี Atomic Force Microscopy (AFM)..... 36
จ.1	จำนวนของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด 304, 316L และ 430 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ..... 110
จ.2	จำนวนของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม พื้นผิว 2B และ BA เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ..... 111
จ.3	การเกิดไบโอฟิล์มของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด 304, 316L และ 430 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ..... 112
จ.4	การเกิดไบโอฟิล์มของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม พื้นผิว 2B และ BA เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ..... 113

ตารางที่	หน้า
จ.5	การเจริญของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ใน Nutrient Broth ที่มีแผ่น เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 จุ่มอยู่ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ..... 114
จ.6	การเจริญของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ใน Nutrient Broth ที่มีแผ่น เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA จุ่มอยู่ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ..... 115
จ.7	จำนวนของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 ในสภาวะที่ไม่ให้สารอาหาร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ..... 116
จ.8	จำนวนของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ในสภาวะที่ไม่ให้สารอาหาร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ..... 117
จ.9	จำนวนของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> หลังสัมผัสสารละลาย Benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ..... 118
จ.10	จำนวนของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย Benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่เวลาต่างๆ..... 120
จ.11	จำนวนของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย Benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่เวลาต่างๆ..... 122

ตารางที่	หน้า
๑.12 จำนวนของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย Benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ.....	124
๑.13 จำนวนของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย Benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ.....	126
๑.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ.....	129
๑.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ.....	129
๑.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่เกิดไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ.....	130
๑.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่เกิดไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ.....	130
๑.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ใน Nutrient Broth ที่มีแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 จุ่มอยู่ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ.....	131

- ๑.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* ใน Nutrient Broth ที่มีแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA จุ่มอยู่ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ..... 131
- ๑.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 ในสภาวะที่ไม่มีอาหาร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ..... 132
- ๑.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ในสภาวะที่ไม่มีอาหาร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ..... 132
- ๑.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ..... 133
- ๑.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ..... 134
- ๑.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ..... 135
- ๑.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ..... 136

ตารางที่

หน้า

- ๑.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่น  
เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium  
chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml  
สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ..... 137

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์.....	13
2.2 การเกิด <b>passive layer</b> ของเหล็กกล้าไร้สนิม.....	19
2.3 สูตรโครงสร้างของ <b>Benzalkonium chloride</b> .....	25
4.1 ลักษณะพื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วย <b>AFM</b> .....	37
4.2 ลักษณะพื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว <b>2B</b> และ <b>BA</b> จากการวิเคราะห์ด้วย <b>AFM</b> .....	38
4.3 ลักษณะพื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วย <b>SEM</b> .....	38
4.4 ลักษณะพื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว <b>2B</b> และ <b>BA</b> จากการวิเคราะห์ด้วย <b>SEM</b> .....	39
4.5 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด <b>304, 316L</b> และ <b>430</b> ในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น <b>9 log CFU/ml</b> ณ เวลาต่างๆ กัน.....	41
4.6 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว <b>2B</b> และ <b>BA</b> ในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น <b>9 log CFU/ml</b> ณ เวลาต่างๆ กัน.....	43
4.7 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด <b>304, 316L</b> และ <b>430</b> .....	47
4.8 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม พื้นผิว <b>2B</b> และ <b>BA</b> .....	49
4.9 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด <b>304</b> และจำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ <b>Nutrient broth</b> ที่มีส่วนผสมของ <b>NaCl 3%</b> .....	51

ภาพที่	หน้า
4.10 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด 316L และจำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญในอาหาร เลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3%.....	51
4.11 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด 430 และจำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญในอาหาร เลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3%.....	52
4.12 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม พื้นผิว BA และจำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญในอาหาร เลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3%.....	53
4.13 ลักษณะการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ <i>V. parahaemolyticus</i> บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว 2B จากการวิเคราะห์ด้วย SEM.....	56
4.14 ลักษณะการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ <i>V. parahaemolyticus</i> บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L พื้นผิว 2B จากการวิเคราะห์ด้วย SEM.....	57
4.15 ลักษณะการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ <i>V. parahaemolyticus</i> บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พื้นผิว 2B จากการวิเคราะห์ด้วย SEM.....	57
4.16 ลักษณะการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ <i>V. parahaemolyticus</i> บนเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว BA จากการวิเคราะห์ด้วย SEM.....	58
4.17 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด 304, 430 และ 316L เมื่อไม่ให้อาหารเพิ่ม.....	61
4.18 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม พื้นผิว 2B และ BA เมื่อไม่ให้อาหารเพิ่ม.....	62
4.19 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%, 0.01% และ 0.02%.....	64

ภาพที่

หน้า

4.20	จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%.....	68
4.21	จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%.....	69
4.22	จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.01%.....	70
4.23	จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.01%.....	71
4.24	จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02%.....	72
4.25	จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02%.....	73
4.26	จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%.....	76
4.27	จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%.....	77



ภาพที่	หน้า
4.28 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.01%.....	78
4.29 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.01%.....	79
4.30 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02%.....	80
4.31 จำนวนของ <i>V. parahaemolyticus</i> ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02%.....	81

# บทที่ 1

## บทนำ

อุตสาหกรรมอาหารเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญของประเทศไทย ผู้ผลิตอาหารจึงต้องมีความระมัดระวังถึงคุณภาพ ไม่ว่าจะเป็น คุณภาพวัตถุดิบ กระบวนการผลิต ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป มาตรฐานด้านสุขอนามัย และความปลอดภัยของผู้บริโภค เป็นต้น ซึ่งในการผลิตอาหารที่มีคุณภาพ จะต้องมีการนำมาตรการที่เข้มงวดมาใช้ในกระบวนการผลิต โดยเฉพาะการนำหลักการวิเคราะห์อันตราย เพื่อเป็นมาตรการป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตอาหาร หรือ **Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)** มาประยุกต์ใช้ แต่อัตราความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก็ยังคงมีอยู่ ส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากพื้นผิวสัมผัสในระบบการผลิต ไม่ว่าจะเป็นการปนเปื้อนจากสายพานการผลิตอาหาร หรือการรักษาความสะอาดในระบบการผลิต เครื่องจักรอุปกรณ์ต่างๆ ที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และพื้นผิวในระบบการผลิตที่ไม่เหมาะสมก็เป็นหนึ่งในสาเหตุที่ก่อให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจปนเปื้อนลงสู่อาหารได้ คราบของเศษอาหารที่ตกค้างอยู่ในระบบการผลิตนั้น หากการทำความสะอาดไม่ถูกต้องตามสุขลักษณะและสารฆ่าเชื้อที่ใช้ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ก็อาจจะไม่สามารถขจัดคราบอาหารเหล่านั้นออกไปได้หมด คราบอาหารที่ตกค้างเหล่านี้จะเป็นแหล่งในการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วจนเกิดเป็นไบโอฟิล์ม (**biofilm**) มีผลต่อการผลิตในครั้งถัดไป จุลินทรีย์ที่เจริญบนพื้นผิวในลักษณะไบโอฟิล์มนั้นมีโอกาสที่จะปนเปื้อนติดไปกับอาหารได้มากขึ้น

ไบโอฟิล์มเป็นปัญหาสำคัญของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์หลายชนิด พบได้บนพื้นผิวต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เช่น พื้นผิวของอุปกรณ์ ห้องเก็บอุปกรณ์การผลิต สายพานการผลิต เครื่องมือ ท่อน้ำ และพนักงานที่อยู่ภายในสายการผลิต เป็นต้น กำจัดได้ยากแม้จะทำความสะอาดและฆ่าเชื้อแล้ว เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนทั้งในส่วน of วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารทั้งในระหว่างและหลังกระบวนการผลิต ซึ่งการปนเปื้อนดังกล่าวมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และยังส่งผล

กระทบให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรม เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจได้ ไบโอฟิล์มอาจเกิดจากการรวมตัวของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* และ *Vibrio spp.* เป็นต้น สำหรับ *Vibrio parahaemolyticus* นั้นเป็นแบคทีเรียก่อโรคชนิดหนึ่งในอาหารทะเลที่มีความสำคัญ มีรายงานว่าโรคทางเดินอาหารอักเสบมีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus* มากกว่าร้อยละ 50 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2550) การควบคุมความสะอาดของพื้นผิวที่สัมผัสอาหารโดยตรงมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการผลิต ถ้าพื้นผิวที่สัมผัสมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่มาก ก็ทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสปนเปื้อนไปกับอาหารได้มาก การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* รวมทั้งการป้องกันและควบคุมการเกิดไบโอฟิล์ม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยเพื่อพัฒนาด้านสุขลักษณะของการผลิตอาหาร และจะช่วยลดความเสี่ยงของผู้บริโภคจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารได้ โดยผู้ประกอบการอุตสาหกรรมอาหารสามารถนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในการเลือกชนิดของพื้นผิวที่จะสัมผัสกับอาหารให้เหมาะสม และทำความสะอาดพื้นผิวสัมผัสอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาปัจจัยของเกรดและพื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีผลต่อการเกาะติด การพัฒนาเป็นไบโอฟิล์ม และการควบคุมไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้น โดยได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่ง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเกาะติดและการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวสัมผัสอาหารที่เป็นเหล็กกล้าไร้สนิม และส่วนที่สอง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในกลุ่ม **Quaternary ammonium compound** คือ **benzalkonium chloride** หรือ **alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride** ในการทำลาย หรือลดปริมาณเซลล์บนพื้นผิวสัมผัสอาหารนั้น

## บทที่ 2

### ทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หลักเกณฑ์และกระบวนการผลิตอาหารให้ได้คุณภาพที่ดี (Good Manufacturing Practice; G.M.P.) ให้เป็นที่ยอมรับทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ มีความจำเป็นที่จะต้องระมัดระวังเรื่องคุณภาพ มาตรฐานด้านสุขอนามัยและความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นอย่างมาก ดังนั้น การป้องกันปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร การตรวจสอบคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาโดยเฉพาะจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total bacterial count) จะเป็นข้อมูลที่บ่งชี้ให้เห็นถึงการสุขาภิบาลที่ดีของโรงงาน และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ไม่ว่าจะเป็น ความสะอาดของผลิตภัณฑ์ การดูแลผลิตภัณฑ์ในกระบวนการผลิต การดูแลผลิตภัณฑ์ระหว่างการขนส่ง รวมไปถึงการเก็บรักษาระหว่างรอจำหน่าย

ในกระบวนการผลิตอาหารทะเล มีจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดที่สามารถปนเปื้อนลงในอาหาร โดยอาจปนเปื้อนจากน้ำทะเล หรือปนเปื้อนจากกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะตามธรรมชาตินั้นสัตว์ทะเลที่ถูกจับมาเพื่อเป็นอาหาร ในระยะแรกนั้นจะมีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาปริมาณไม่สูงมากและไม่เป็นอันตรายต่อการบริโภค แต่เมื่อถูกทิ้งไว้ระยะหนึ่งจุลินทรีย์จะเพิ่มปริมาณมากขึ้นทั้งจากการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่ติดมาจากน้ำทะเล และจุลินทรีย์ที่เกิดจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยการสัมผัสกับพื้นผิวที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (พูลศักดิ์ พุ่มวิเศษ, 2552) ดังนั้น การผลิตอาหารทะเลที่มีคุณภาพดี ลดการเน่าเสียของอาหารทะเลให้น้อยที่สุดและที่สำคัญเพื่อลดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค คือ การป้องกันและลดปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากพื้นผิวสัมผัสต่างๆ ในกระบวนการผลิต การปฏิบัติเพื่อให้ได้อาหารทะเลที่มีคุณภาพและได้มาตรฐานมีสิ่งที่จะต้องดำเนินการ ดังนี้

1. อาหารทะเลที่ถูกจับขึ้นมาจากทะเลต้องรักษาให้สดที่สุดด้วยการแช่เย็น หรือแช่แข็ง ในที่สะอาดปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

2. ต้องใช้เวลาในการขนส่งให้น้อยที่สุด โดยภายในตู้เก็บอาหารทะเลจะต้องมีการรักษาอุณหภูมิให้ไม่สูงเกิน 4 องศาเซลเซียส และสะอาดปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์
3. เมื่ออาหารทะเลขนส่งมาถึงโรงงานต้องนำเข้าสู่กระบวนการผลิตทันทีเพื่อให้ได้อาหารทะเลที่มีความสดที่สุด
4. ภาชนะบรรจุ เครื่องมือ อุปกรณ์ และพื้นผิวต่างๆ ภายในโรงงานต้องมีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออย่างสม่ำเสมอ  
(พูลศักดิ์ พุ่มวิเศษ, 2552)

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคกับผู้บริโภคมีหลายชนิด หนึ่งในจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในอาหารทะเลที่มีความสำคัญ คือ *Vibrio parahaemolyticus* เมื่อมีการตกค้างบนพื้นผิวสัมผัสอาหาร จะทำให้เกิดการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์อาหารนั้นไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

Genus *Vibrio* นั้นประกอบด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 69 species และ 1 Biovar (Vuddhakul, 2007) แต่ species ที่ทำให้เกิดโรคในคนมีเพียง 10 species คือ *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio cholera*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio parahaemolyticus* (Balows et al., 1992) ไม่เพียงแต่ก่อโรคในคนเท่านั้น *Vibrio* หลาย species สามารถก่อโรคในสัตว์ทะเลทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง (Maugeri et al., 2000) ซึ่งในแต่ละ species การก่อโรคจะมีความรุนแรงแตกต่างกัน ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค เช่น enterotoxin, cytotoxin, protease, lipase, phospholipase, siderophore, adhesive factor, haemagglutinin และ haemolysin เป็นต้น (Austin and Austin, 1999; Shinoda, 1999)

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง โค้งเล็กน้อย (curved rod-shaped) มีขนาดความยาว 1.4  $\mu\text{m}$  ถึง 2.6  $\mu\text{m}$  และกว้าง 0.5  $\mu\text{m}$  ถึง 0.8  $\mu\text{m}$  ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) หรือ ไมโครซิส (microcyst) เคลื่อนที่ในอาหารเหลวโดยใช้แฟลกเจลลาเส้น

เดี่ยวที่ขั้ว (single polar flagella) เจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ NaCl ในช่วงกว้าง แต่ความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมคือ 2 ถึง 3% (Lee, 1990) และต้องการโซเดียมไอออนในการกระตุ้นการเจริญเติบโต (Oliver et al., 1983) *Vibrio* สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถึง 37 องศาเซลเซียส ช่วง pH เป็นกลาง และเป็นต่างได้มากถึง pH 9.0 ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่า 0.1% (pH 5.1) ดังนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับคัดเลือกเชื้อ (selective media) และเพิ่มจำนวนของเชื้อ (enrichment media) ใน Genus *Vibrio* จึงมี pH อยู่ระหว่าง 8.0 ถึง 8.6 (Colwell et al., 1994) ปริมาณน้ำที่อยู่ในอาหารที่สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ (water activity; aw) อยู่ในช่วง 0.940 ถึง 0.996 แต่ค่าที่เหมาะสมที่สุด คือ 0.980 (Lake, Hudson and Cressey, 2003) สามารถสร้างพลังงานได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) และเกิดเมแทบอลิซึม (metabolism) ได้ทั้งแบบการหายใจ (respiration) และการหมัก (fermentation) ใช้เวลา 9 ถึง 10 นาทีในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (generation time) *Vibrio* ส่วนใหญ่มีเอนไซม์ oxidase สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (ยกเว้น *Vibrio metschnikovi*) ใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งของไนโตรเจน *Vibrio* หลายชนิดมีความสามารถผลิตเอนไซม์แล้วหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เช่น gelatinase, chitinase, amylase และ DNase เป็นต้น (Joseph, Colwell and Kaper, 1982) ซึ่งลักษณะทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางชีวเคมีของ *Vibrio parahaemolyticus*

Test	Result
TCBS	Green colony
MacConkey medium	Growth
ONPG	Negative
Arginine dihydrolase	Negative
Lysine decarboxylase	Positive
Ornithine decarboxylase	Positive
Citrate utilization	Positive
H <sub>2</sub> S production	Negative
Urease	Negative
Tryptophane deaminase	Negative
Indole production	Positive
Voges proskauer	Negative
Gelatinase	Positive
Cytochrome oxidase	Positive
Nitrate reaction	Positive
Sugar fermentation	
Glucose	Positive
Mannitol	Positive
Inositol	Negative
Sorbitol	Negative
Rhamnose	Negative
Saccharose	Negative
Melibiose	Negative
Amygdalin	Negative
Arabinose	Positive

## Salt tolerance

0% NaCl	No growth
3% NaCl	Positive growth
6% NaCl	Positive growth
8% NaCl	No growth
10% NaCl	No growth

ที่มา: ดัดแปลงจาก Poda (1997) และ Lam et al. (1974)

*Vibrio parahaemolyticus* มีแหล่งธรรมชาติอยู่ในน้ำทะเล น้ำกร่อย และผิวด้านนอกตลอดจนลำไส้ของสัตว์ทะเล (Fouz et al., 1990) สามารถดำรงชีวิตได้ในลักษณะล่องลอยอิสระ เกาะกับสัตว์น้ำจำพวกหอยแบบพึ่งพาอาศัยกัน หรืออาศัยอยู่บนพื้นผิวต่างๆในระบบนิเวศน์ทะเล (Makino et al., 2003) ตรวจพบได้จากน้ำทะเลทั่วโลกทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (Joseph et al., 1982) ฤดูกาลมีอิทธิพลต่อ *V. parahaemolyticus* ที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเล คือ ในช่วงฤดูหนาว *V. parahaemolyticus* จะอาศัยอยู่ในตะกอนใต้น้ำ อาจอยู่ในสภาพที่ยังมีชีวิต แต่มีเมแทบอลิซึมต่ำ และไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งได้ เรียกว่า **viable but non culturable (VBNC) state** การตอบสนองของ *V. parahaemolyticus* ในสภาวะนี้เป็นการตอบสนองเพื่อให้อยู่รอดได้ในสภาวะกดดัน (stress) เช่น อุณหภูมิไม่เหมาะสม ปริมาณอาหารน้อย หรือแรงดันออสโมติกสูง เป็นต้น (James, 2005) มีการทดลอง พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในอาหาร **minimum salt medium (MMS)** และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อจะเข้าสู่ **viable but non culturable state** แต่เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 4 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส เชื้อจะสามารถกลับมาเจริญบนอาหารแข็งได้อีก (Wong and Wang, 2004) และมีรายงานการเพาะเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ที่อยู่ใน **viable but non culturable state** บนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ **catalase** หรือ **sodium pyruvate** พบว่า *V. parahaemolyticus* สามารถกลับมาเจริญได้ เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลส (**catalase**) ไปย่อยสลาย  $H_2O_2$  ซึ่งมีความเป็นพิษ ที่อยู่รอบๆเซลล์ (Mizunoe et al., 2000) นอกจากนี้เมื่อ *V. parahaemolyticus* อยู่ใน **viable but non culturable state** จะมีความสามารถทนทานต่อ



อุณหภูมิได้สูงถึง 47 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเกลือต่ำ (0% NaCl) และสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดได้มากขึ้น (Wong and Wang, 2004) เมื่อถึงฤดูร้อน น้ำทะเลมีอุณหภูมิสูงขึ้นจนเหมาะสมกับการเจริญ *V. parahaemolyticus* จะมีการเพิ่มจำนวนและปนเปื้อนในน้ำทะเล แต่ *V. parahaemolyticus* ที่ตรวจพบในน้ำทะเลมากกว่าร้อยละ 99 ไม่ได้เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในคน เนื่องจากตรวจไม่พบยีนสร้างพิษ (Cook et al., 2002) พบ *V. parahaemolyticus* ได้ทั่วไปใน กุ้ง ปู ปลาและหอย พบมากในสัตว์จำพวกหอยซึ่งกินอาหารโดยวิธีการกรองจากน้ำ เช่น หอยนางรม หอยกาบ และหอยแมลงภู่ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบ *V. parahaemolyticus* ใน แพลงตอน (plankton) สัตว์ โดยเชื้อจะดูดซับสารโคตินบนแพลงตอน เมื่อมีสภาวะแวดล้อมเหมาะสมจะย่อยผนังเซลล์ของแพลงตอน และเพิ่มจำนวนมากขึ้น (Kaneko and Colwell, 1975)

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารเป็นพิษที่มีความสำคัญ (Su and Liu, 2007) พบระบาดครั้งแรกที่เมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น ในปีพ.ศ. 2493 *V. parahaemolyticus* ที่ตรวจพบในผู้ป่วยเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษชนิดทนความร้อน เรียกว่า thermostable direct hemolysin (TDH) หรือ TDH-related hemolysin (TRH) มีรายงานจากประเทศญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน อินเดีย และอีกหลายประเทศในแถบเอเชีย รวมไปถึงอเมริกา พบว่ามากกว่าร้อยละ 50 ของโรคอาหารเป็นพิษมีสาเหตุจาก *V. parahaemolyticus* ในปีค.ศ. 1973 ถึง 1998 มีรายงานการติดเชื้อที่เกิดจาก *V. parahaemolyticus* ใน 15 รัฐ ของประเทศสหรัฐอเมริกา และเขต Guam ซึ่งพบผู้ป่วยมากกว่า 1,000 ราย จากการระบาดทั้งหมด 40 ครั้ง (Daniels et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางบาดแผลร้อยละ 34 และการติดเชื้อทางกระแสโลหิตร้อยละ 5 (Daniels et al., 2000) การระบาดของ *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่พบในฤดูร้อน มีสาเหตุมาจากการบริโภคอาหารทะเลพวกกุ้ง หอย ปู และปลาบางชนิด โดยเฉพาะสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง โดยข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยาของประเทศไทยระบุว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในปีพ.ศ.2540-2545 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) มีการศึกษาพบว่าปริมาณ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลที่จะสามารถก่อให้เกิดโรคได้ (infective dose) เท่ากับ  $10^6$  ถึง  $10^9$  CFU/ml (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) โดยผู้ป่วยจะมีอาการปวดเกร็งที่ท้อง ท้องเสียอย่างรุนแรง มี

อุจจาระเหลวมีกลิ่นเหม็นกึ่งเน่า ปวดศีรษะ และมีไข้ ครั้งหนึ่งของผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนร่วมด้วย มักปรากฏอาการหลังจากได้รับเชื้อภายใน 4 ถึง 96 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ได้รับ ภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย และความเป็นกรด-ด่างในระบบทางเดินอาหาร (Barker and Gangarosa, 1974) *V. parahaemolyticus* จะเพิ่มจำนวนและเกาะติดอยู่ที่ผนังลำไส้ (FDA, 2005) โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าทุกๆ เวลา 10 ถึง 15 นาที อาการเหล่านี้จะคงอยู่นานถึง 10 วัน แต่ส่วนใหญ่อาการจะทุเลาลงภายใน 3 วัน โดยไม่ต้องรักษา มีอัตราการตายต่ำ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550)

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่อยู่โดยการรวมตัวกันเป็นชุมชนในโครงสร้าง ที่เรียกว่า ไบโอฟิล์ม (Costeron et al., 1995) อาจประกอบด้วยจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิด ซึ่งสามารถรวมตัวกับบนพื้นผิวที่มีชีวิต (biotic surface) และไม่มีชีวิต (abiotic surface) ไบโอฟิล์มเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวและฝังตัวอยู่ภายใต้สารกลุ่มพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์นั้นสร้างขึ้นแล้วหลังจากออกมาปกคลุมกลุ่มเซลล์ เรียกว่า Extracellular polymeric substances (EPS) (Surdeau, Bouthors and Gelle, 2006; Oulahal et al., 2008) ซึ่งประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และโปรตีน (Sutherland, 2001) ช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ไม่ว่าจะเป็น ความแห้งแล้ง และสารเคมีฆ่าเชื้อต่างๆ ทำให้กลุ่มเซลล์มีความสามารถในการต้านทานสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่อยู่ในลักษณะแขวนลอย (planktonic) การทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่ในไบโอฟิล์มทำได้ยาก การทำความสะอาดด้วยวิธีทั่วไปไม่สามารถกำจัดได้หมดจะต้องใช้แรงทางกายภาพช่วย เช่น การขัดถูร่วมกับสารทำความสะอาด เป็นต้น

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถเกาะติดบนพื้นผิวและสร้างไบโอฟิล์มได้ (Wong, Chung and Yu, 2002; Shikongo, Kachigunda and Venter, 2010) มีงานวิจัยศึกษาโครงสร้างไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* พบว่า ไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* มีความหนาแน่นของเซลล์มากที่สุดในบริเวณรอบนอกของไบโอฟิล์ม และมีช่องว่างขนาดใหญ่อยู่ด้านใน ซึ่งอาจมีหน้าที่เก็บรักษาก๊าซและแลกเปลี่ยนสารอาหารภายใน

ไบโอฟิล์ม (Lawrence et al., 1991) ต่อมาทีมงานวิจัยที่ศึกษาการพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ที่มีโคโลนี 2 ลักษณะ คือ ทึบแสงและโปร่งแสง พบว่าเซลล์ที่มีโคโลนีทั้ง 2 ลักษณะมีความคงตัวในการสร้าง ไบโอฟิล์มเหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่รูปแบบของการเกาะติดกับพื้นผิว (Enos-Berlage et al., 2005) โดยโคโลนีที่ทึบแสงจะสร้าง extracellular polymeric substances (EPS) ได้มากกว่าโคโลนีที่มีลักษณะโปร่งแสงถึง 10 เท่า (Enos-Berlage and McCarter, 2000)

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเกาะติด และสร้างเป็นไบโอฟิล์มของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิวที่สัมผัสมีหลายปัจจัย ได้แก่

1. ชนิดและโครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์ เซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่จะแสดงถึงความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ของเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเกาะติดบนพื้นผิว ไม่ว่าจะเป็น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) โปรตีนแอดฮีซิน (adhesin) และโปรตีนชนิดอื่นๆ เป็นต้น มีรายงานที่ *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* ใช้แฟลกเจลลา (flagella), พิลไล (pili) และโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ในการเกาะติด (Kumar and Anand, 1998) และมีการศึกษาพบว่าแคปซูลของ *V. parahaemolyticus* ประกอบด้วยกรดยูโรนิก (uronic acid) ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการรวมกลุ่มและเกาะติดกับเซลล์ในลำไส้เล็ก (Pace, Rossi and Jiang, 1997) เมื่อมีการสูญเสียโครงสร้างเหล่านี้ จะมีผลทำให้ความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวลดลงได้ (Kumar and Anand, 1998)
2. สภาพแวดล้อมและองค์ประกอบของสารอาหารที่อยู่ล้อมรอบ เมื่อมีการสะสมของสารอาหารบนพื้นผิวจนเกิดเป็น conditioning film จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของพื้นผิว ไม่ว่าจะเป็น ความเป็นไฮโดรโฟบิกซึ่ง

(hydrophobicity) ค่าพลังงานอิสระ (surface free energy) และประจุของพื้นผิว เป็นต้น ซึ่งอาจส่งผลต่อความสามารถในการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์ (Garrett, Bhakoo and Zhang, 2008)

3. ลักษณะและคุณสมบัติทางกายภาพของพื้นผิว เช่น ความเรียบ (roughness) ความเป็นไฮโดรโฟบิกซี้ดี (hydrophobicity) ค่าพลังงานอิสระ (surface free energy) และประจุของพื้นผิว มีการรวบรวมงานวิจัยและสรุปว่า เซลล์จุลินทรีย์ จะเกาะติดบนพื้นผิวที่มีค่าพลังงานอิสระสูงหรือมีความเป็น hydrophilic ได้ดีกว่า พื้นผิวที่มีลักษณะเป็น hydrophobic (Chmielewski and Frank, 2003)

การสร้างไบโอฟิล์มของเซลล์จุลินทรีย์ จะเริ่มขึ้นเมื่อเซลล์จุลินทรีย์ได้รับสัญญาณจากสิ่งแวดล้อม กระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงการดำรงชีวิตแบบล่องลอยอิสระมาอยู่บนพื้นผิว โดยเซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมที่ความแตกต่างกัน เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas fluorescens* จะสร้างไบโอฟิล์มในสภาวะที่ส่งเสริมให้เชื่อมีการเจริญเติบโต (O'Toole and Kolter, 1998b) ในขณะที่ *Escherichia coli* จะสร้างไบโอฟิล์มในสภาวะที่มีสารอาหารน้อย (Danwanti and Wong, 1995) เป็นต้น กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มเป็นกระบวนการที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (dynamic process) มี 3 ขั้นตอน (Trachoo, 2003; Surdeau et al, 2006; Rode et al, 2007)

ขั้นตอนแรก เซลล์จุลินทรีย์จะเกาะติดบนพื้นผิวอาหาร หรือพื้นผิวที่สัมผัสกับอาหาร (attachment) ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากตัวเซลล์หรือการกระทำจากภายนอก (Chmielewski and Frank, 2003) ซึ่งขั้นตอนการเกาะติดแบ่งได้เป็น 2 แบบ การเกาะติดแบบแรก คือ การเกาะติดแบบ passive เกิดขึ้นเนื่องจากแรงโน้มถ่วงของโลก และแรงที่เกิดขึ้นจากของไหลที่อยู่รอบๆ บริเวณเซลล์จุลินทรีย์ ได้แก่ แรงขับเคลื่อนของของไหล (fluid dynamic force) และแรงขับเคลื่อนจากการแพร่ (diffusion dynamic force) และการเกาะติดแบบที่สอง คือ การเกาะติดแบบ active เกิดขึ้นเนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะของผิวเซลล์จุลินทรีย์ที่มีส่วนประกอบที่จำเพาะต่อ

การเกาะติด เช่น แฟลกเจลลา, พิล, แอดฮีชันโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะ (**adhesion protein**), แคปซูล (**capsule**) และประจุที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ (**Kumar and Anand, 1998**) เป็นต้น การเกาะติดแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

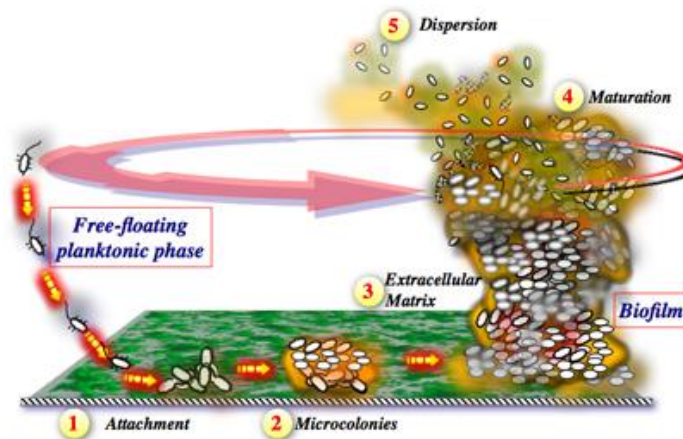
ระยะที่ 1 เป็นการเกาะติดแบบผันกลับ (**reversible adhesion**) จะเกิดพันธะอย่างอ่อนระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับพื้นผิว ได้แก่ แรงแวนเดอร์วาลส์ (**Van der Waals forces**), **electrostatic forces** และ **hydrophobic interaction** ในระยะนี้เซลล์จุลินทรีย์ยังคงมีการเคลื่อนที่ได้โดยเป็นการเคลื่อนที่แบบบราวน์เนียน (**Brownian movement**) ทำให้ไบโอฟิล์มถูกทำลายได้ง่ายโดยการชะล้างด้วยน้ำหรือสารฆ่าเชื้อ (**Kumar and Anand, 1998; Bower, McGuire and Daeschel, 1996**)

ระยะที่ 2 เป็นการเกาะติดแบบไม่ผันกลับ (**irreversible adhesion**) เซลล์จุลินทรีย์จะสร้างพันธะที่แข็งแรงมากขึ้น เช่น **dipole-dipole interaction** พันธะไฮโดรเจน (**hydrogen bonding**) พันธะโควาเลนต์ (**covalent bonding**) และ **hydrophobic interaction** กับพื้นผิวโดยอาศัยโครงสร้างของเซลล์ไม่ว่าจะเป็นแฟลกเจลลาหรือพิล นอกจากนี้เซลล์จุลินทรีย์จะมีการสร้างไฟบริล (**fibril**) เพื่อเชื่อมระหว่างเซลล์กับพื้นผิวอีกด้วย ทำให้เกิดการยึดเกาะที่เหนียวแน่นกว่าในระยะที่ 1 (การเกาะติดแบบผันกลับ) การกำจัดเซลล์จุลินทรีย์ในระยะนี้ต้องใช้แรงกล เช่น การขัดถู (**scrubbing**) เป็นต้น หรือใช้เอนไซม์ สารทำความสะอาด สารฆ่าเชื้อ หรือความร้อน เพื่อช่วยทำลายแรงที่ใช้ในการเกาะติด การเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ในเวลาเพียง 5 ถึง 30 วินาทีเท่านั้น (**Chmielewski and Frank, 2003**)

ขั้นตอนที่ 2 เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ (**colonization**) หลังจากการเกาะติดระยะที่ 2 หรือการเกาะติดแบบไม่ผันกลับแล้ว เซลล์จุลินทรีย์จะเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปโดยใช้สารอาหารที่มีอยู่รอบๆ ในสิ่งแวดล้อมและเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นกลุ่มของเซลล์จุลินทรีย์ขนาดเล็ก (**microcolony**) กลุ่มเซลล์จุลินทรีย์นี้จะขยายใหญ่ขึ้นและเกาะรวมตัวกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ปกคลุมบริเวณพื้นผิว (**Poulsen, 1999**) โดยเซลล์จุลินทรีย์จะผลิตสารกลุ่มพอลิเมอร์ (**polymer**) แล้วหลั่งออกมา

ภายนอกปกคลุมที่ผิวของกลุ่มเซลล์ ช่วยให้เซลล์ยึดเกาะพื้นผิวได้ดีขึ้น เรียกสารกลุ่มนี้ว่า **extracellular polymeric substances (EPS)** (Kumar and Anand, 1998; Chmielewski and Frank, 2003)

ขั้นตอนที่ 3 เจริญเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (**maturation**) กลุ่มเซลล์จุลินทรีย์จะเพิ่มจำนวนซ้อนทับกัน มีโครงสร้างคล้ายรูปเห็ด (**mushroom-like shape**) และเกิดเป็นชั้นของเซลล์จุลินทรีย์ภายใต้ **extracellular polymeric substances (EPS)** ซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุน (**porous**) เพื่อใช้เป็นช่องทางสำหรับลำเลียงน้ำ (**water channel**) กระจายอยู่ (Chmielewski and Frank, 2003) เมื่อโครงสร้างมีการพัฒนาขึ้น จุลินทรีย์บางเซลล์ภายใต้ **extracellular polymeric substances (EPS)** บางเซลล์จะถูกลอยออกไป ทำให้ไบโอฟิล์มแพร่ออกไป (Lasa, 2006)



ภาพที่ 2.1 การเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์

ที่มา: <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2006/Ggb-en.html> (2012)

เนื่องจากไบโอฟิล์มเป็นแหล่งสะสมของเซลล์จุลินทรีย์ ดังนั้น ไบโอฟิล์มจึงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร โดยอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคไปสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร ส่งผลให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับการตรวจพบจุลินทรีย์บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค (Kumar and

Anand, 1998) เช่น *Listeria monocytogenes* (Gram et al., 2007; Oulahal et al., 2008), *Staphylococcus aureus* (Valle et al., 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (Ishikawa and Horii, 2005; Landry et al., 2006), *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. (Joseph, Otta and Karunasagar, 2001; Oliveira et al., 2007; Rode et al., 2007; Oulahal et al., 2008) และ *Vibrio parahaemolyticus* (Wong et al., 2002; Shikongo, Kachigunda and Venter, 2010) จากรายงานวิจัยต่างๆ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้สามารถเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ และยังพบว่าเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้ไบโอฟิล์มจะมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ส่งผลให้สามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้มากขึ้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาเจริญของเซลล์ ชนิดและสมบัติของพื้นผิว ปริมาณสารอินทรีย์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกาะติดและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์บนพื้นผิว (Oulahal et al., 2008) ส่งผลให้เกิดเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมอาหาร หากมีการปนเปื้อนในกระบวนการผลิต

การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารจำเป็นต้องดำเนินการไปด้วยกันอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งการทำความสะอาดเพียงอย่างเดียวสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 90 เท่านั้น (พูลศักดิ์ พุ่มวิเศษ, 2552) ดังนั้นกระบวนการฆ่าเชื้อหลังจากทำความสะอาดเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่คงเหลืออยู่จึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ การเลือกใช้สารเคมีในการทำความสะอาด (chemical detergent) และสารฆ่าเชื้อ (chemical disinfectants) ให้เหมาะสมกับบริเวณต่างๆ เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อแต่ละชนิดนั้นมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งคุณสมบัติของสารฆ่าเชื้อที่ดีควรจะไม่เป็นพิษหรือทำให้เกิดความระคายเคืองต่อร่างกาย ไม่กัดกร่อนพื้นผิว มีคุณสมบัติของสารทำความสะอาด ล้างออกได้ง่ายด้วยน้ำ ไม่มีผลต่อกลิ่น สี และรสชาติของอาหาร มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้หลายชนิด โดยประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้น เวลาในการสัมผัส ปริมาณของสารอินทรีย์ ความกระด้างของน้ำ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และความสามารถของสารในการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ (Marriott, 1994)

การทำมาความสะอาดและฆ่าเชื้อประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก คือ การทำมาความสะอาด 3 ขั้นตอน และการฆ่าเชื้อ 2 ขั้นตอน ดังนี้

การทำมาความสะอาด 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย

1. การกำจัดสิ่งสกปรกขนาดใหญ่ (soil or dirt) บนพื้นผิว ด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น การกวาด ปัด ถู หรือฉีดล้างด้วยน้ำสะอาด แรงดันสูงเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกในบริเวณพื้นผิวที่มีความขรุขระ เป็นต้น
2. การกำจัดสิ่งสกปรกที่เหลือจากขั้นตอนแรกด้วยสารทำมาความสะอาด (detergent)
3. การล้างด้วยน้ำสะอาด (rinsing)

การฆ่าเชื้อ 2 ขั้นตอน ประกอบด้วย

1. การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือสารฆ่าเชื้อ (disinfectants)
2. การล้าง (rinsing) สารฆ่าเชื้อออกจากบริเวณที่ทำการฆ่าเชื้อ

(Marriott and Gravani, 2006)

เซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้ไบโอฟิล์มมีความสามารถในการต้านทานสารฆ่าเชื้อได้มากกว่าเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในสารละลาย (planktonic) เนื่องจาก เซลล์จะสร้างสารกลุ่มโพลีเมอร์ เรียกว่า **extracellular polymeric substances (EPS)** ขึ้นปกคลุมไว้ ทำให้ลักษณะทางกายภาพของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป มีผลให้ประสิทธิภาพในการแทรกซึมของสารฆ่าเชื้อลดลง และความจำกัดของสารอาหารจะชักนำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะเครียด ซึ่งการตอบสนองต่อสารฆ่าเชื้อของเซลล์ภายใต้ไบโอฟิล์มจะมีความแตกต่างกัน

ดังนั้น การทำมาความสะอาดและการฆ่าเชื้อด้วยวิธีโดยทั่วไป อาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะทำลายและกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวในรูปของไบโอฟิล์มได้ มีงานวิจัย



รายงานว่าการทำความสะอาดพื้นผิวด้วยสารทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยสารประกอบคลอรีน หรือสารผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับกรดอะซิติกแล้ว ยังตรวจพบเซลล์จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตได้มากถึง  $3-4 \log \text{CFU/cm}^2$  ซึ่งการรอดชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นดังกล่าวถือเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Jessen and Lammert, 2003)

การกำจัดและการควบคุม (control and removal) ไบโอฟิล์ม ประกอบด้วย ขั้นตอนการทำความสะอาด (cleaning) และ การฆ่าเชื้อ (sanitizing) เริ่มจากการใช้น้ำร้อนหรือน้ำเย็นร่วมกับสารทำความสะอาด และใช้วิธีการทางกายภาพ เช่น การขัดถู เป็นต้น ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ต่างๆ ออกจากพื้นผิว จากนั้นทำลายเซลล์จุลินทรีย์ โดยใช้สารฆ่าเชื้อ ถ้าสารทำความสะอาดไม่สามารถล้างสารอินทรีย์บนพื้นผิวออกได้หมด สารฆ่าเชื้อก็จะไม่สามารถซึมผ่านสารอินทรีย์ที่ตกค้างเหล่านั้นเข้าไปทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ (Hilbert et al., 2003) ดังนั้น ในการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ การเลือกวิธี ชนิด และความเข้มข้นของสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อ รวมถึงระยะเวลาให้เหมาะสมมีความสำคัญอย่างมากเพื่อให้การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพมากที่สุด ซึ่งสามารถแบ่งวิธีการกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มออกเป็น 3 วิธี คือ วิธีการทางกายภาพ วิธีการทางเคมี และวิธีการทางชีวภาพ ดังนี้

## 1. วิธีการทางกายภาพ (Physical methods)

การใช้แรงกลขัดลอกแผ่นไบโอฟิล์ม เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และค่าใช้จ่ายต่ำ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดเมื่อพื้นผิวมีลักษณะขรุขระ ปัจจุบันจึงได้มีการนำวิธีอื่นๆ มาประยุกต์ใช้ร่วมด้วย เช่น การใช้แรงดันสูง (high pressure) และการใช้คลื่นเสียง (sonication) เป็นต้น นอกจากนี้ การใช้น้ำที่มีอุณหภูมิสูงก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการกำจัดและทำลายไบโอฟิล์มได้ มีรายงานว่าการผลิตน้ำดื่ม เมื่อใช้น้ำที่มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 100 นาที หรือ ใช้ระบบหมุนเวียนน้ำที่มีอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จะสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้ นอกจากนี้วิธีดังกล่าว ยังมีวิธีอื่นๆ ที่ใช้ในการกำจัดและทำลาย

ไบโอฟิล์ม เช่น **Ultrasound treatment, Super-high magnetic field, High pulsed electrical field** และ **Low electrical field** เป็นต้น (Kumar and Anand, 1998)

## 2. วิธีการทางเคมี (Chemical methods)

ในขั้นตอนของการทำความสะอาดเป็นขั้นตอนที่ต้องกำจัดเศษอาหารและสารอินทรีย์ต่างๆ ที่เป็นส่วนช่วยในการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ออกไป ดังนั้น การใช้สารเคมีที่เหมาะสมเข้าช่วยในขั้นตอนนี้จะทำให้การทำความสะอาดมีประสิทธิภาพดีขึ้น ซึ่งสารทำความสะอาดที่ดีจะต้องมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวสามารถทำให้ไขมันกระจายตัวออกและย่อยสลายโปรตีนเพื่อกำจัด **extracellular polymeric substances (EPS)** ที่ปกคลุมเซลล์จุลินทรีย์ สารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาด แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารทำความสะอาดชนิดเบสและชนิดกรด ซึ่งสารทำความสะอาดชนิดเบส จะมีความสามารถในการกำจัดไขมันและโปรตีน จึงที่นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร แต่เนื่องจากพื้นผิวภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมีความหลากหลาย การเลือกใช้สารทำความสะอาดจึงต้องคำนึงถึงความเหมาะสมเป็นสำคัญ เช่น ควรเลือกใช้สารทำความสะอาดชนิดเบส (**alkaline detergent**) หรือสารไม่มีประจุ (**nonionic detergent**) กับพื้นผิวประเภทแก้ว เซรามิก เหล็กกล้าไร้สนิม และพลาสติก เป็นต้น (Marriott, 1994) การเลือกใช้สารทำความสะอาดให้เหมาะสมกับวัสดุพื้นผิวชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 วัสดุพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และข้อจำกัดเพื่อใช้พิจารณาเลือกสารทำความสะอาดที่เหมาะสม

วัสดุ	ข้อจำกัด
ไม้	ถูกทำลายด้วยสารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อน ดูดซับความชื้นและไขมัน ทำความสะอาดและดูแลรักษายาก

โลหะ	เกิดสนิมได้เมื่อสัมผัสกับสารที่มีความกรด
แก้ว	ถูกกัดกร่อนเมื่อใช้กับสารที่มีความเป็นเบสมาก
ยาง	เสื่อมสภาพเมื่อใช้กับตัวทำละลายอินทรีย์และกรดเข้มข้น เกิดรูพรุนเมื่อใช้กับสารที่มีความเป็นเบส เกิดการโค้งงอเมื่อใช้งานไประยะหนึ่ง
เหล็กกล้าไร้สนิม	ราคาแพง บางชนิดถูกทำลายด้วยสารกลุ่มฮาโลเจน (คลอรีน ไอโอดีน โบรมีน และ ฟลูออรีน)

ที่มา: ดัดแปลงจาก **Marriott (1994)**

เหล็กกล้าไร้สนิม หรือ **stainless steel** เป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติเหนือวัสดุประเภทอื่นๆ อาทิ ทนทานต่อการกัดกร่อน แข็งแรง สวยงาม และสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย เป็นต้น โลหะประเภทนี้ถูกค้นพบเมื่อปีค.ศ. **1821** โดยนักโลหะวิทยาชาวฝรั่งเศสพบว่าโลหะที่มีส่วนผสมของโครเมียมจะทำให้เหล็กกล้าคาร์บอน (**carbon steel**) มีคุณสมบัติในการต่อต้านการเกิดสนิมได้ดีขึ้น ซึ่งโลหะทุกชนิดโดยทั่วไปเมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศ (ปฏิกิริยา **oxidation**) จะเกิดเป็นฟิล์มออกไซด์เคลือบบนพื้นผิวทำให้พื้นผิวผุกร่อนหรือที่เรียกโดยทั่วไปว่าเกิดสนิม แต่สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมมีส่วนประกอบของโครเมียมมากกว่า **10.5%** ทำให้คุณสมบัติของฟิล์มออกไซด์เปลี่ยนแปลงไป เกิดเป็นฟิล์มโครเมียมออกไซด์ หรือฟิล์มปกป้อง (**passive layer**) ซึ่งมีลักษณะบาง ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันการกัดกร่อนอย่างมีประสิทธิภาพ โดยแผ่นฟิล์มนี้จะสร้างตัวขึ้นใหม่เองทันทีที่พื้นผิวถูกขีดข่วน (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 การเกิด **passive layer** ของเหล็กกล้าไร้สนิม

- 1) เมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศแผ่นฟิล์มโครเมียมออกไซด์ หรือฟิล์มปกป้อง (**passive layer**) จะถูกสร้างขึ้นเคลือบพื้นผิวโดยอัตโนมัติ
- 2) เมื่อแผ่นฟิล์มพื้นผิวถูกทำลาย เนื้อเหล็กจะเผยออกมาและสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ
- 3) ฟิล์มโครเมียมออกไซด์ หรือฟิล์มปกป้อง (**passive layer**) จะสร้างตัวขึ้นใหม่อย่างรวดเร็ว

ที่มา: ดัดแปลงจาก [http://www.poscothainox/steelfacts\\_what\\_thai.html](http://www.poscothainox/steelfacts_what_thai.html) (2012)

เหล็กกล้าไร้สนิม เป็นวัสดุสำหรับใช้ในครัวเรือนและอุตสาหกรรมอาหารที่มีความสมบูรณ์แบบมาก เนื่องจากมีความทนทานต่อการกัดกร่อน มีพื้นผิวเรียบ ทำความสะอาดง่าย ไม่ทำปฏิกิริยากับกรดและเกลือในอาหาร ความเป็นกลางจึงไม่มีผลต่อรสชาติของอาหาร และทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยฉับพลันได้เป็นอย่างดี (Oliveira et al, 2007; Rossoni and Gaylarde, 2000)

เหล็กกล้าไร้สนิม มีอยู่หลายชนิด โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 เกรดหลัก คือ ออสเทนิติก (Austenitic) เฟอริติก (Ferritic) มาร์เทนซิติค (Martensitic) และดูเพล็กซ์ (Duplex) ซึ่งแต่ละประเภทจะมีคุณสมบัติในการต้านทานการกัดกร่อนได้แตกต่าง

1. ออสเทนิติก ประกอบด้วยโครเมียม 18% และนิกเกิล 8% แม่เหล็กดูดไม่ติด ขึ้นรูปได้ง่าย จึงเป็นที่นิยมใช้แพร่หลายมากที่สุด

2. เฟอร์ริติก ประกอบด้วยโครเมียม **10.5-27%** และคาร์บอนปริมาณต่ำ แม่เหล็กดูดติด
3. มาร์เทนซิติก ประกอบด้วยโครเมียม **12-14%** โมลิบดีนัม **0.2-1%** และมีปริมาณคาร์บอนระดับปานกลาง และแม่เหล็กดูดติด นิยมใช้ทำเครื่องมือบนโต๊ะอาหาร เครื่องมือตัด และเครื่องมือวิศวกร เนื่องจากมีความแข็งแรง ทนทานและมีคุณสมบัติในการต้านทานการกัดกร่อนสูงมากเป็นพิเศษ
4. ดิวเพิลท์ซ์ ประกอบด้วยโครเมียม **19-28%** โมลิบดีนัมมากกว่า **5%** และนิกเกิล **4.5-8%** มีโครงสร้างผสมระหว่างเฟอร์ไรต์ (Ferrite) และออสเทนไนต์ (Austenite) แม่เหล็กดูดติด นิยมใช้กับงานที่มีคลอไรด์สูงเพื่อป้องกันการกัดกร่อนแบบรูเข็ม (pitting corrosion) และการแตกร้าวเนื่องจากการกัดกร่อนภายใต้แรงเค้น (stress corrosion cracking)  
(บริษัท โพลโค-ไทยน็อกซ์ จำกัด (มหาชน), 2555)

เหล็กกล้าไร้สนิมที่นิยมใช้ทั่วไปในปัจจุบัน คือ เกรดออสเทนนิติก และเกรดเฟอร์ริติก ซึ่งคิดเป็นร้อยละ **95** ของเหล็กกล้าไร้สนิมที่ใช้งานอยู่ในปัจจุบัน (บริษัท โพลโค-ไทยน็อกซ์ จำกัด (มหาชน), 2555)

ส่วนผสมของโลหะที่เป็นองค์ประกอบจะเป็นตัวกำหนดเกรดของเหล็กกล้าไร้สนิมสามารถจำแนกประเภทได้จากเลขรหัสที่กำหนดขึ้นตามมาตรฐาน **AISI** ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบทางเคมีโดยทั่วไปของเหล็กกล้าไร้สนิม แสดงในตารางที่ **2.3**

ตารางที่ 2.3 ชื่อมาตรฐานสากลและส่วนประกอบทางเคมีโดยทั่วไปของเหล็กกล้าไร้สนิม

ประเภทของเหล็กกล้าไร้สนิม					
ชนิด	ชื่อมาตรฐานสากล	ส่วนประกอบเคมีโดยทั่วไป			
	AISI USA	คาร์บอน	โคบอล	นิกเกิล	โมลิบดีนัม
ออสเทนิติก	304	0.04	18.5	8.5	-
เฟอร์ริติก	430	0.05	16.5	-	-
ออสเทนิติกผสมโมลิบดีนัม	316L	0.025	17.5	11.5	2.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก บริษัท ไทยน็อคซ์สตีล จำกัด (2549)

พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมมีหลายแบบ ไม่ว่าจะเป็น เงานเหมือนกระจก ด้านเรียบ หรือขัดผิว ให้ความสวยงาม และภาพลักษณ์ที่ทันสมัย ซึ่งจะใช้ลักษณะ ความเรียบ และความสามารถในการสะท้อนแสง เป็นตัวกำหนดชนิดของพื้นผิว แสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ลักษณะของพื้นผิว ความเรียบ และความสามารถในการสะท้อนแสงของเหล็กกล้าไร้สนิม

ชนิด	กระบวนการ	ลักษณะ	ความเรียบ* (ไมครอน)	การสะท้อนแสง (%)
2D	รีดเย็น อบอ่อน และกัดกรด	ผิวด้าน	0.1-0.03	13
2B	รีดเย็น อบอ่อน และกัดกรด	ผิวเงาเล็กน้อย	0.03-0.02	22**
BA	รีดเย็น และอบด้วยความร้อน	ผิวมันเงา	0.02-0.06	-
No.4	ขัดด้วยกระดาษทราย#120-220	-	< 1.0	-
No.8	ขัดด้วยกระดาษทราย#1000	ผิวเงาเหมือนกระจก	-	85
HL	ขัดแต่งผิว	ผิวมีลายเส้น	0.1-0.03	-

\* ความเรียบของพื้นผิวที่วัดด้วยโปรไฟล์ โลมิเตอร์

\*\*46% สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดเฟอร์ริติก

ที่มา: ดัดแปลงจาก บริษัท ไทยน็อคซ์สตีล จำกัด (2549)

กระบวนการผลิตเหล็กกล้าไร้สนิมแต่ละเกรดและแต่ละพื้นผิวมีความแตกต่างกัน ทำให้ได้ส่วนประกอบทางเคมีและลักษณะของพื้นผิวที่แตกต่างกันซึ่งจะผ่านกระบวนการผลิต ดังนี้

1. กระบวนการหลอมโลหะ (melting) คือ การหลอมแร่ธาตุและเศษเหล็กกล้าไร้สนิม ในเตาหลอมจนเป็นของเหลว และทำการปรับปรุงส่วนผสมทางเคมี
2. กระบวนการหล่อ (casting) คือ การนำโลหะหลอมเหลวที่มีส่วนผสมตามต้องการไปทำให้เย็นตัวจนกลายเป็นของแข็ง เรียกว่า slab
3. กระบวนการรีดร้อน (hot rolling) คือ การรีดโลหะขณะที่อุณหภูมิของเนื้อโลหะสูงกว่าอุณหภูมิของการเกิดผลึกใหม่เพื่อลดความหนาและควบคุมความกว้างซึ่งโลหะแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิการเกิดผลึกใหม่แตกต่างกัน เช่น เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 มีอุณหภูมิการเกิดผลึกใหม่เท่ากับ 1,050 องศาเซลเซียส และเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 มีอุณหภูมิการเกิดผลึกใหม่เท่ากับ 860 องศาเซลเซียส
4. กระบวนการรีดเย็น (cold rolling) คือ การรีดโลหะขณะที่อุณหภูมิของเนื้อโลหะต่ำกว่าอุณหภูมิของการเกิดผลึกใหม่ ในขั้นตอนนี้จะเป็นตัวกำหนดชนิดพื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมประกอบด้วย 3 ขั้นตอน
  - 4.1 การอบอ่อน (annealing) การอบอ่อนในบรรยากาศทั่วไปจะได้พื้นผิว 2B หากอบอ่อนในบรรยากาศที่ปกคลุมด้วยไฮโดรเจนจะได้พื้นผิว BA
  - 4.2 การกัดกรด (pickling) เพื่อกำจัดสเกลดำจากการอบอ่อนเพื่อให้ได้เหล็กกล้าไร้สนิมผิวสีขาว เรียกว่า white coil
  - 4.3 การปรับผิว (skin pass) เพื่อปรับคุณสมบัติเชิงกลให้ได้ตามที่ต้องการ (สแตนเลสเพื่อคนไทย, 2554)

แม้ว่าในขั้นตอนของการทำความสะอาด จะสามารถกำจัดไบโอฟิล์มได้ แต่ก็เพียงบางส่วนเท่านั้น เซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้ไบโอฟิล์มนั้นอาจไม่ถูกทำลายไปด้วย (Surdeau et al., 2006) ซึ่งหลังจากทำการทำความสะอาด ขั้นตอนการฆ่าเชื้อจึงมีความสำคัญมาก

ขั้นตอนการฆ่าเชื้อหลังจากการทำความสะอาด มีจุดประสงค์เพื่อทำลายกลุ่มเซลล์จุลินทรีย์ที่เกิดเป็นไบโอฟิล์มอยู่ภายใต้ **extracellular polymeric substances (EPS)** ที่เซลล์จุลินทรีย์นั้นสร้างขึ้น สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่มฮาโลเจน กรดอินทรีย์ สารประกอบเปอร์ออกไซด์ และสารประกอบแอมโมเนีย (**Quaternary ammonium compound**) คุณสมบัติของสารฆ่าเชื้อที่ดีควรมีความสามารถในการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้หลายชนิด (**broad spectrum**) ได้อย่างรวดเร็ว ละลายน้ำได้ดี ใช้งานง่าย คงความสามารถในการฆ่าเชื้อเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น มีปริมาณสารอินทรีย์สูง ความกระด้างของน้ำสูง และค่าความเป็นกรด-เบสไม่แน่นอน เป็นต้น ราคาไม่แพง ตรวจสอบประสิทธิภาพได้ง่าย และที่สำคัญต้องไม่เป็นพิษหรือทำให้เกิดความระคายเคืองต่อร่างกาย ซึ่งประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้น เวลาในการสัมผัส ปริมาณของสารอินทรีย์ ความกระด้างของน้ำ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และความสามารถของสารในการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ (**Marriott, 1994**) การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ

สารฆ่าเชื้อ	การประยุกต์ใช้
คลอรีน	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด การทำความสะอาดในระบบ <b>clean-in-place (CIP)</b> และการฉีดพ่น
ไอโอดีน	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด โดยวิธีการใช้มือจุ่ม ( <b>hand dip</b> )
กรดเปอร์อะซิติก	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด การทำความสะอาดในระบบ <b>clean-in-place (CIP)</b> ในสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิต่ำ และมีคาร์บอนไดออกไซด์



<b>Acid anionics</b>	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด การทำความสะอาดในระบบ <b>clean-in-place (CIP)</b>
<b>Quaternary ammonium compound</b>	ใช้กับพื้นผิวสัมผัสอาหารทุกชนิด ส่วนใหญ่ใช้ในการควบคุมสิ่งแวดล้อม

ที่มา: ดัดแปลงจาก **Marriott (1994)**

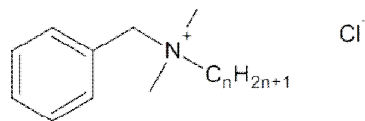
**Quaternary ammonium compound** หรือที่รู้จักกันโดยทั่วไป คือ **Quat** หรือ **QACs** เป็นสารฆ่าเชื้อ (**sanitizer**) และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (**disinfectants**) ที่นิยมใช้กันแพร่หลายในกระบวนการการผลิตอาหาร (**Mustapha and Liewen, 1989**) สารในกลุ่มนี้ที่นิยมนำมาใช้ คือ **benzalkonium chloride** หรือ **alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (ADBAC)** เป็นสารที่มีคุณสมบัติทั้งการเป็นสารทำความสะอาด (**detergent**) และสารฆ่าเชื้อ (**sanitizer**) ซึ่งในปีค.ศ.1996 กฎหมายควบคุมคุณภาพอาหารของประเทศสหรัฐอเมริกา (**Food Quality Protection Act ; FQPA**) ระบุว่ามีความปลอดภัยสามารถใช้กับอาหาร น้ำดื่ม ยา และเครื่องสำอางได้ (**United states Environmental Protection Agency, 2006**)

**Benzalkonium chloride** มีชื่อเรียกแตกต่างกันในระบบต่างๆ ดังนี้

Common name : **ADBAC**  
 Chemical name : **n- alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride**  
 IUPAC name : **benzyl-dimethyl-tridecyl-azanium chloride**  
 Chemical family : **quaternary amines**

**Benzalkonium chloride** มีคุณสมบัติเป็นประจุบวก สูตรโครงสร้างแสดงในภาพที่ 2.3 มีความคงตัว มีอันตรายต่อผู้ใช้น้อยไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนัง ไม่กัดกร่อนพื้นผิวโลหะและมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์แบคทีเรียได้หลายชนิด รวมไปถึงยีสต์และราแต่ไม่

สามารถทำลายเชื้อวัณโรค และเชื้อไวรัสที่ไม่มีเยื่อหุ้มได้ โดยประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ จุลินทรีย์ของ **benzalkonium chloride** จะขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ระยะเวลาในการสัมผัส (**exposure time**) กับเซลล์จุลินทรีย์ และปริมาณสารเจือปน กล่าวคือ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและเวลาในการสัมผัสกับเซลล์จุลินทรีย์นานขึ้น **benzalkonium chloride** จะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ จุลินทรีย์ได้ดีขึ้น และเมื่อมีปริมาณสารอินทรีย์เจือปนในน้ำมาก สารเหล่านี้จะห่อหุ้มเซลล์ของ จุลินทรีย์ไว้ทำให้ประสิทธิภาพการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ของ **benzalkonium chloride** ลดลง ซึ่ง อาจทำให้เกิดปัญหาในการใช้ **benzalkonium chloride** เพื่อลดปริมาณหรือทำลายเซลล์จุลินทรีย์ ได้ (**United states Environmental Protection Agency, 2006**) ซึ่งชนิดและความเข้มข้นของสาร ซ้ำเชื้อที่เหมาะสมกับพื้นผิวชนิดต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.6



$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$

ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของ **benzalkonium chloride**

ที่มา: [http://en.wikipedia.org/wiki/benzalkonium\\_chloride](http://en.wikipedia.org/wiki/benzalkonium_chloride) (2012)

เนื่องจากสมบัติความเป็นประจุบวกทำให้ **benzalkonium chloride** มีความสามารถในการจับกับประจุลบบนผนังเซลล์จุลินทรีย์ โดยมีกลไกการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ที่ ตำแหน่งต่างๆ ดังนี้

1. ตำแหน่งเยื่อหุ้มเซลล์ (**cell membrane**) : ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ **benzalkonium chloride** สามารถทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้โดย ทำปฏิกิริยากับ ประจุลบที่ผนังของเซลล์จุลินทรีย์ มีผลให้เกิดการแตกตัวของไขมันบริเวณเยื่อหุ้ม เซลล์ ทำให้ผนังของเซลล์จุลินทรีย์สูญเสียความสามารถในการผ่านเข้าออกของ สารและทำให้เกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์เป็นสาเหตุให้เกิดการรั่วไหลของของเหลวภายใน เซลล์ (To et al., 2002)

2. ตำแหน่งของเหลวภายในเซลล์ (cytoplasm) : ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ **benzalkonium chloride** สามารถทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้โดย ทำปฏิกิริยากับ **carboxylic group** เป็นสาเหตุให้เกิดการตกตะกอนของ **cytoplasm** ภายในเซลล์ จุลินทรีย์ (To et al., 2002)

ตารางที่ 2.6 ชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมกับพื้นผิวในโรงงานอุตสาหกรรม  
อาหาร

พื้นผิว	สารฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้น (ppm)
อะลูมิเนียม	Iodophor	25
	Quat <sup>a</sup>	200
คอนกรีต	Active chlorine	1,000-2,000
	Quat	500-800
พลาสติก	Iodophor	25
เหล็กกล้าไร้สนิม	Acid sanitizer	130
	Acid-quat	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
	Active chlorine	200
	Iodophor	25
ยาง	Iodophor	25
ไม้	Active chlorine	1,000
พื้นผิวที่มีรูพรุน	Active chlorine	200
ไบโอฟิล์ม	Quat	200
	Acid-quat	ตามปริมาณที่ผู้ผลิตกำหนด
	Acid anionic	100

หมายเหตุ Quat<sup>a</sup> คือ Quaternary ammonium compound

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marriott (1994)

### 3. วิธีการทางชีวภาพ (Biological methods)

ในปัจจุบันผู้บริโภคส่วนมากให้ความสนใจเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารมากขึ้น การนำแบคทีริโอซิน (**bacteriocin**) ซึ่งเป็นสารชีวภาพที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ มาเคลือบบนพื้นผิวสัมผัสอาหารเพื่อยับยั้งการเกาะติดของจุลินทรีย์ จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับคามสนใจมากในปัจจุบัน สารชีวภาพที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้กันแพร่หลาย คือ ไนซิน (**nisin**) ซึ่งในปี ค.ศ.1988 ได้รับการรับรองจาก **Food and Drug Administration (FDA)** ประเทศสหรัฐอเมริกาว่าสามารถใช้กับอาหารได้ (**Generally Recognized As Safe; GRAS**) มีรายงานว่าไนซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสียได้ นอกจากสารในกลุ่มแบคทีริโอซินแล้ว เอนไซม์ยังเป็นสารชีวภาพอีกกลุ่มหนึ่งที่ใช้ในการทำลายไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ เนื่องจาก เอนไซม์มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ รวมถึงเซลล์จุลินทรีย์ได้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัด **extracellular polymeric substances (EPS)** และไบโอฟิล์มได้ แต่เอนไซม์มีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะต่อสารอินทรีย์และจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องเลือกใช้ให้เหมาะสม (กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล, 2549)

### บทที่ 3

#### ระเบียบวิธีวิจัย

จุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อบริสุทธิ์ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 DMST 21243 จากสถาบันวิจัย  
วิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

พื้นผิวทดสอบที่ใช้ในการวิจัย

เหล็กกล้าไร้สนิมชนิด 304 พื้นผิว 2B

เหล็กกล้าไร้สนิมชนิด 316L พื้นผิว 2B

เหล็กกล้าไร้สนิมชนิด 430 พื้นผิว 2B

เหล็กกล้าไร้สนิมชนิด 304 พื้นผิว BA

ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท โพลโค-ไทยน็อคซ์ จำกัด (มหาชน)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient broth (Merck Laboratory, Germany)

Nutrient agar (Merck Laboratory, Germany)

Alkaline peptone water (Merck Laboratory, Germany)

Lethen broth (Merck Laboratory, Germany)

## สารเคมี

Sodium chloride (Carlo Erba Reagents, France)

Acetone (Vidhyasom, Thailand)

Glycerol (Merck Laboratory, Germany)

Gram's stain (Difco, USA)

1% Tetramethyl-p-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, USA)

## ชุดทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test kit)

ชุดทดสอบ API 20E (bioMerieux<sup>®</sup>)

## สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

Benzalkonium chloride (Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride; ADBAC)

ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท แอ็ดวานซ์ฟาร์มา จำกัด

## เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตู้อบเพาะเชื้อ Incubator (Memmert รุ่น 500, Germany)

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

เครื่อง Autoclave (TOMY Autoclave รุ่น ES-315, Japan)

เครื่อง Vortex (Scientific Industries รุ่น G650E, USA)

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

เครื่อง Spectrophotometer (JAS.CO รุ่น V-530, Japan)

เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BT2202S, Germany)

เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น ED, Germany)

เครื่อง Centrifuge (Hettich รุ่น EBA20, USA)

ตู้ Laminar flow carbinet (Asian Chemical, Thailand)

ตู้ Laminar flow carbinet (BVT-123, Thailand)

เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ที่จำเป็น

ขั้นตอน และวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 การตรวจวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิว

#### 3.1.1 การตรวจวัดค่าความขรุขระของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมด้วย AFM

เตรียมพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว 2B, 316L พื้นผิว 2B, 430 พื้นผิว 2B และเกรด 304 พื้นผิว BA (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) และนำไปตรวจวัดค่าความขรุขระด้วย Atomic Force Microscopy (AFM) โดยใช้เครื่อง Scanning probe microscope รุ่น Nanoscope IV ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.1.2 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมด้วย AFM

เตรียมพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว 2B, 316L พื้นผิว 2B, 430 พื้นผิว 2B และเกรด 304 พื้นผิว BA (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) และนำไปถ่ายภาพเพื่อวิเคราะห์ความขรุขระด้วย Atomic Force Microscopy (AFM) โดยใช้เครื่อง Scanning probe microscope รุ่น Nanoscope IV ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.1.3 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมด้วย SEM

เตรียมพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว 2B, 316L พื้นผิว 2B, 430 พื้นผิว 2B และเกรด 304 พื้นผิว BA (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข) และนำไปถ่ายภาพเพื่อวิเคราะห์ความขรุขระด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) โดยใช้เครื่อง Scanning microscope รุ่น JSM-5800 LV ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.2 การทดสอบการเกาะติด (Attachment) ของ *V. parahaemolyticus*

กลุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 316L และ 430 พื้นผิว 2B และเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว BA ในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ค) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 60 และ 120 นาที เมื่อครบเวลาดังเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมด้วย Alkaline Peptone Water ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมโดยนำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ดังเซลล์ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมออกด้วย Alkaline Peptone Water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วย Alkaline Peptone Water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยวิธี Serial dilution จากนั้นนำสารละลายที่ระดับการเจือจางต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบน Nutrient Agar ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ระดับการเจือจางที่สามารถนับจำนวนเชื้อได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ สำหรับสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $3 \log \text{CFU/ml}$  ทำเช่นเดียวกับข้างต้น

### 3.3 การสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm formation) ของ *V. parahaemolyticus*

กลุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 316L และ 430 พื้นผิว 2B และเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว BA ในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  (วิธีเตรียมแสดงใน



ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อครบเวลาด้านเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทั้งหมดด้วย Alkaline Peptone Water ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองที่มี Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% ปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมมาล้างด้วย Alkaline Peptone Water ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นับจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม โดยนำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมใส่ในถุงพลาสติก ปลอดเชื้อ ล้างเซลล์ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมออกด้วย Alkaline Peptone Water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วย Alkaline Peptone Water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยวิธี Serial dilution จากนั้นนำสารละลายที่ระดับการเจือจางต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบน Nutrient Agar ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ระดับการเจือจางที่สามารถนับจำนวนเชื้อได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ

### 3.4 การประเมินผลการเกิดไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม ด้วย Scanning Electron Microscope (SEM)

สร้างไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* วิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.3 ด้วยสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น 9 log CFU/ml (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ค) บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 316L และ 430 พื้นผิว 2B และเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว BA เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาด้านเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทั้งหมดด้วย Alkaline Peptone Water ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ก่อนนำไปแช่ในน้ำยาตรึงเซลล์ และนำไปประเมินผลการเกิดไบโอฟิล์มด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) โดยใช้เครื่อง Scanning microscope รุ่น JSM-5410 LV ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.5 การศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม

สร้างไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* วิธีเช่นเดียวกับกับข้อ 3.3 ด้วยสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ค) บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 316L และ 430 พื้นผิว 2B และเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว BA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทั้งหมดด้วย Alkaline Peptone Water ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ก่อนนำมาใส่ในหลอดปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่รอดชีวิตบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม โดยนำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ล้างเซลล์ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมออกด้วย Alkaline Peptone Water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วย Alkaline Peptone Water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยวิธี serial dilution จากนั้นนำสารละลายที่ระดับการเจือจางต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบน Nutrient Agar ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ระดับการเจือจางที่สามารถนับจำนวนเชื้อได้ในช่วง 25-250 โคโลนี ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ

### 3.6 การศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์ของ *V. parahaemolyticus*

นำสารแขวนลอยเซลล์ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ค) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารฆ่าเชื้อ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ง) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0, 1, 5, 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม Letheen Broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อ neutralize คลอรีนที่เป็นองค์ประกอบของ benzalkonium chloride เป็นการหยุดปฏิกิริยาของสารฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนับจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่รอดชีวิต โดยนำสารละลายที่ได้ปริมาตร 1

มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย **Alkaline Peptone Water** ปริมาตร **9** มิลลิลิตร โดยวิธี **serial dilution** แล้วนำสารละลายที่ระดับการเจือจางต่างๆ ปริมาตร **0.1** มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบน **Nutrient Agar** ที่มีส่วนผสมของ **NaCl 3%** ด้วยวิธี **spread plate** บ่มที่อุณหภูมิ **37** องศาเซลเซียส เป็นเวลา **24** ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ระดับการเจือจางที่สามารถนับจำนวนเชื้อได้ในช่วง **25-250** โคโลนี ทำการทดลองทั้งหมด **5** ซ้ำ

### 3.7 การศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus*

สร้างไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* วิธีเช่นเดียวกับกับข้อ 3.3 ด้วยสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น **9 log CFU/ml** (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ค) บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด **304 316L** และ **430** พื้นผิว **2B** และเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด **304** พื้นผิว **BA** เป็นเวลา **24**, และ **72** ชั่วโมง เมื่อครบเวลาด้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทั้งหมดด้วย **Alkaline Peptone Water** ปลอดเชื้อ **2** ครั้ง ก่อนนำมาใส่ในหลอดทดลองที่มีสารฆ่าเชื้อ **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น **0.005, 0.01** และ **0.02%** (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ง) ปริมาตร **10** มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ **22** องศาเซลเซียส) เป็นเวลา **0, 1, 5, 10, 20** และ **30** นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไปแช่ใน **Lethen Broth** เพื่อ **neutralize** คลอรีนที่เป็นองค์ประกอบของ **benzalkonium chloride** เป็นการหยุดปฏิกิริยาของสารฆ่าเชื้อ เป็นเวลา **3** นาที จากนั้นนับจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่รอดชีวิตบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม โดยนำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ด้างเซลล์ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมออกด้วย **Alkaline Peptone Water** ปริมาตร **1** มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วย **Alkaline Peptone Water** ปริมาตร **9** มิลลิลิตร โดยวิธี **serial dilution** แล้วนำสารละลายที่ระดับการเจือจางต่างๆ ปริมาตร **0.1** มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบน **Nutrient Agar** ที่มีส่วนผสมของ **NaCl 3%** ด้วยวิธี **spread plate** บ่มที่อุณหภูมิ **37** องศาเซลเซียส เป็นเวลา **24** ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ระดับการเจือจางที่สามารถนับจำนวนเชื้อได้ในช่วง **25-250** โคโลนี ทำการทดลองทั้งหมด **5** ซ้ำ

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิว

##### 4.1.1 การตรวจวัดค่าความขรุขระของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม ด้วย Atomic Force Microscopy (AFM)

การตรวจวัดค่าความขรุขระของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม ด้วย AFM โดยเครื่อง Scanning probe microscope รุ่น Nanoscope IV จะได้ค่าต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 ตรวจวัดค่าความขรุขระของเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 316L และ 430 ด้วยวิธี Atomic Force Microscopy (AFM)

Type of stainless steel	Parameter (nm)			Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )
	$R_{ms}$ ( $R_q$ )*	$R_a$ **	$R_{max}$ ***	
304/2B	52.382	35.649	486.08	108.86
316L/2B	83.034	67.592	808.97	114.63
430/2B	14.976	11.481	184.74	103.38

\* $R_{ms}$  ( $R_q$ ) คือ ค่าเฉลี่ยความขรุขระของพื้นผิวทั้งหมดที่วัดได้

\*\* $R_a$  คือ ค่าเฉลี่ยความขรุขระของพื้นผิวที่วัดได้จากยอดที่สูงที่สุด ถึงจุดที่ลึกที่สุด

\*\*\* $R_{max}$  คือ ผลรวมของค่าความขรุขระของพื้นผิวที่วัดได้จากยอดที่สูงที่สุด ถึงจุดที่ลึกที่สุด

จากตารางที่ 4.1 เมื่อใช้ค่า  $R_{ms}$ ,  $R_a$  และ  $R_{max}$  เป็นตัวระบุความขรุขระของพื้นผิว เหล็กกล้าไร้สนิม พบว่า เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L มีความขรุขระมากที่สุด รองลงมาคือ เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และ 430 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ตรวจสอบวัดความขรุขระของเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ด้วยวิธี Atomic Force Microscopy (AFM)

Finish of stainless steel	Parameter (nm)			Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )
	$R_{ms}$ ( $R_q$ )	$R_a$	$R_{max}$	
2B	52.382	35.649	486.08	108.86
BA	14.417	11.337	153.85	102.29

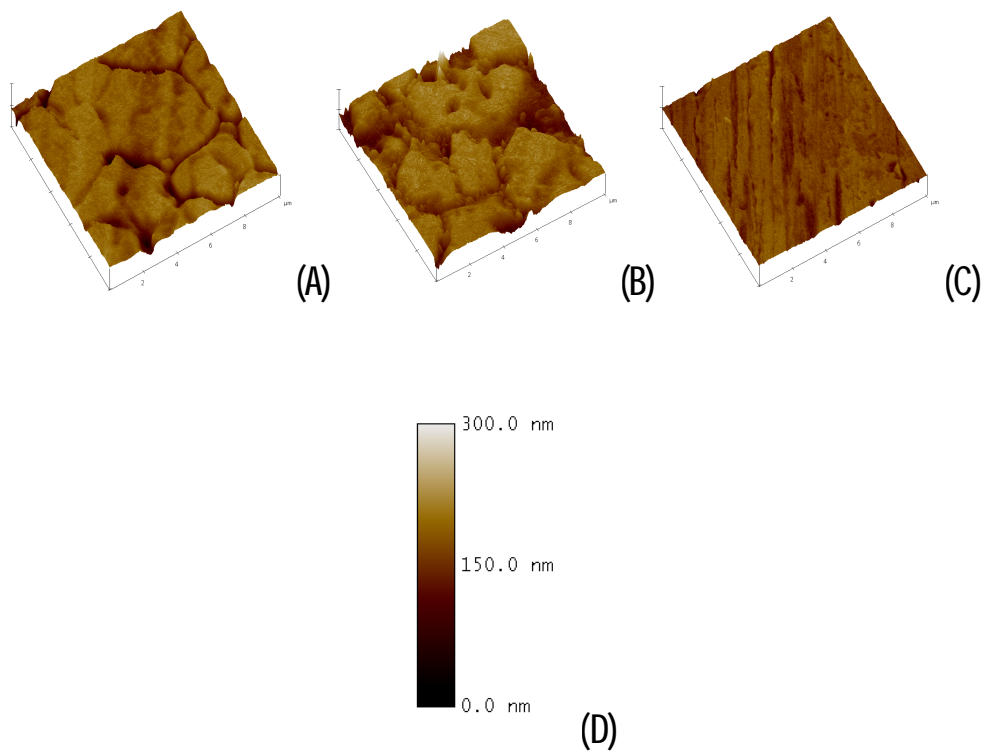
จากตารางที่ 4.2 เมื่อใช้ค่า  $R_{ms}$ ,  $R_a$  และ  $R_{max}$  เป็นตัวระบุความขรุขระของพื้นผิว เหล็กกล้าไร้สนิม พบว่า เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B มีความขรุขระมากกว่าพื้นผิว BA

ความขรุขระของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกิดจากขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่แรกจนถึงกระบวนการรีดออกมาเป็นแผ่น ไม่ว่าจะเป็นการรีดร้อน หรือรีดเย็น ในบางครั้งอาจต้องมีการปรับแต่งพื้นผิวหน้าให้เหมาะสมกับลักษณะงานที่จะนำไปใช้ ซึ่งทำให้ไม่สามารถกำหนดค่าความขรุขระได้ในแต่ละครั้งของการผลิตค่าความขรุขระก็อาจจะไม่เท่ากัน แม้ว่าจะเป็นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด หรือพื้นผิวเดียวกัน ดังนั้นการซื้อขายเหล็กกล้าไร้สนิมจึงไม่นิยมระบุเป็นค่าความขรุขระ จะใช้การระบุเป็นเกรด และพื้นผิว (บริษัท ไทยน็อคสตีล จำกัด, 2549)

#### 4.1.2 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม ด้วย AFM

การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม ด้วย AFM โดยเครื่อง Scanning probe microscope รุ่น Nanoscope IV นอกจากค่าความขรุขระที่แสดงในตารางที่

4.1 และ 4.2 แล้ว Atomic Force Microscopy ยังสามารถวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวออกมาเป็นรูปได้ (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) รูปภาพที่วิเคราะห์ออกมาได้นั้น จะเป็นภาพสามมิติ (3-D) ซึ่งสามารถใช้พิจารณาความแตกต่างของพื้นผิวได้ โดยการเปรียบเทียบกับสเกลสีมาตรฐานที่มีค่าความลึกระบุไว้ (แสดงในภาพที่ 4.1 D)

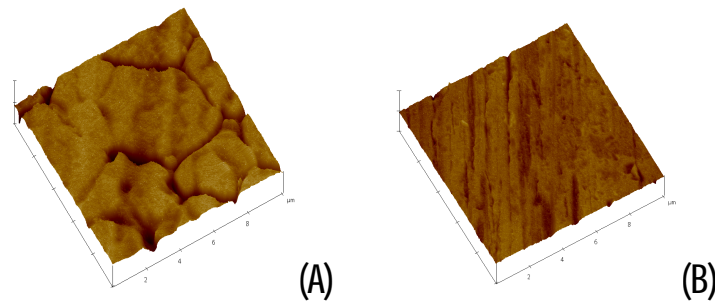


ภาพที่ 4.1 ลักษณะพื้นผิวของเหล็กลำไ้สนิมเกรดต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วย AFM

A) เหล็กลำไ้สนิมเกรด 304    B) เหล็กลำไ้สนิมเกรด 316L

C) เหล็กลำไ้สนิมเกรด 430    และ D) สเกลสีมาตรฐานแสดงค่าความลึกพื้นผิว

จากภาพที่ 4.1 เมื่อเทียบกับสเกลสีมาตรฐาน จะเห็นได้ว่าเหล็กลำไ้สนิมเกรด 304 พื้นผิวค่อนข้างเรียบ แต่มีหลุมเป็นจำนวนมาก ในขณะที่เหล็กลำไ้สนิมเกรด 316L พื้นผิวมีความขรุขระ และมีหลุมที่ลึก และเหล็กลำไ้สนิมเกรด 430 พื้นผิวค่อนข้างเรียบ มีหลุมอยู่เล็กน้อยและไม่ลึก

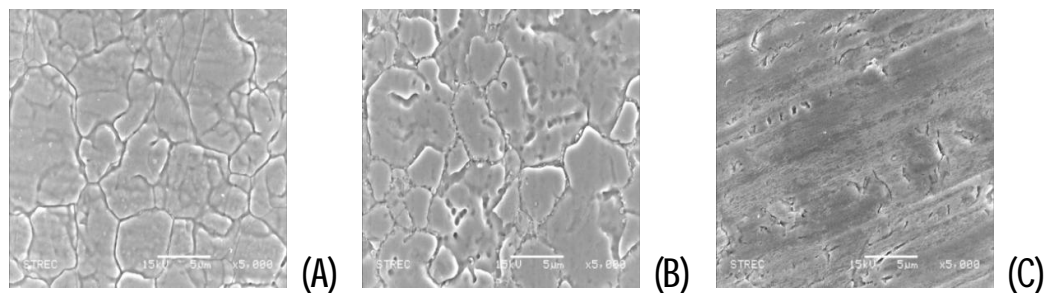


ภาพที่ 4.2 ลักษณะพื้นผิวของเส้นใยเซลลูโลสชนิด 2B และ BA จากการวิเคราะห์ด้วย AFM  
 A) เส้นใยเซลลูโลสชนิด 2B B) เส้นใยเซลลูโลสชนิด BA

จากภาพที่ 4.2 เมื่อเทียบกับสเกลมาตรฐาน (ภาพที่ 4.1D) จะเห็นได้ว่าเส้นใยเซลลูโลสชนิด 2B มีความขรุขระมากกว่าเส้นใยเซลลูโลสชนิด BA อย่างชัดเจน

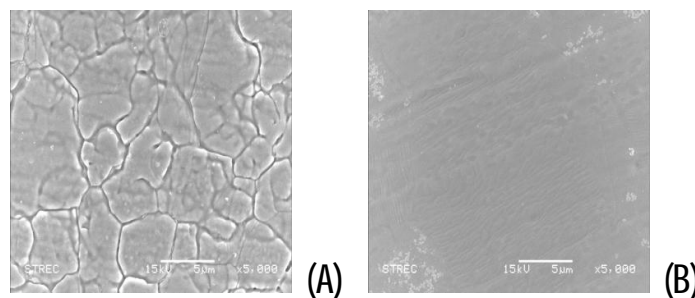
#### 4.1.3 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิวเส้นใยเซลลูโลส ด้วย SEM

การวิเคราะห์ภาพถ่ายความขรุขระของพื้นผิวเส้นใยเซลลูโลส ด้วย Scanning electron Microscopy (SEM) โดยเครื่อง Scanning microscope รุ่น JSM-5800LV (แสดงในภาพที่ 4.3 และ 4.4)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะพื้นผิวของเส้นใยเซลลูโลสเกรดต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วย SEM  
 A) เส้นใยเซลลูโลสเกรด 304 B) เส้นใยเซลลูโลสเกรด 316L  
 และ C) เส้นใยเซลลูโลสเกรด 430

จากภาพที่ 4.3 พบว่า ลักษณะพื้นผิวจากการวิเคราะห์ด้วย SEM มีผลสอดคล้องกันกับการวิเคราะห์ด้วย AFM คือ เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิวมีความขรุขระ มีร่องและหลุมเป็นจำนวนมาก ในขณะที่เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L พื้นผิวขรุขระ มีหลุมที่ลึกเป็นจำนวนมาก และเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พื้นผิวค่อนข้างเรียบ มีหลุมอยู่บ้างเล็กน้อย



ภาพที่ 4.4 ลักษณะพื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA จากการวิเคราะห์ด้วย SEM

A) เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ B) เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA

จากภาพที่ 4.4 พบว่า ลักษณะพื้นผิวจากการวิเคราะห์ด้วย SEM มีผลสอดคล้องกันกับการวิเคราะห์ด้วย AFM คือ เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B มีความขรุขระมากกว่าเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA อย่างชัดเจน ซึ่งมีความสอดคล้องกับข้อมูล คือ พื้นผิว BA มีความเรียบจนสามารถสะท้อนแสงได้ 54% คือ สามารถมองเห็นวัตถุบนพื้นผิวได้เมื่อนำวัตถุวางบนเหล็กกล้าไร้สนิม ในขณะที่พื้นผิว 2B สามารถสะท้อนแสงได้เพียง 13% จาก (บริษัท ไทยน็อคสตีล จำกัด, 2549)

#### 4.2 ผลการศึกษาการเกาะติด (Attachment) ของ *V. parahaemolyticus*

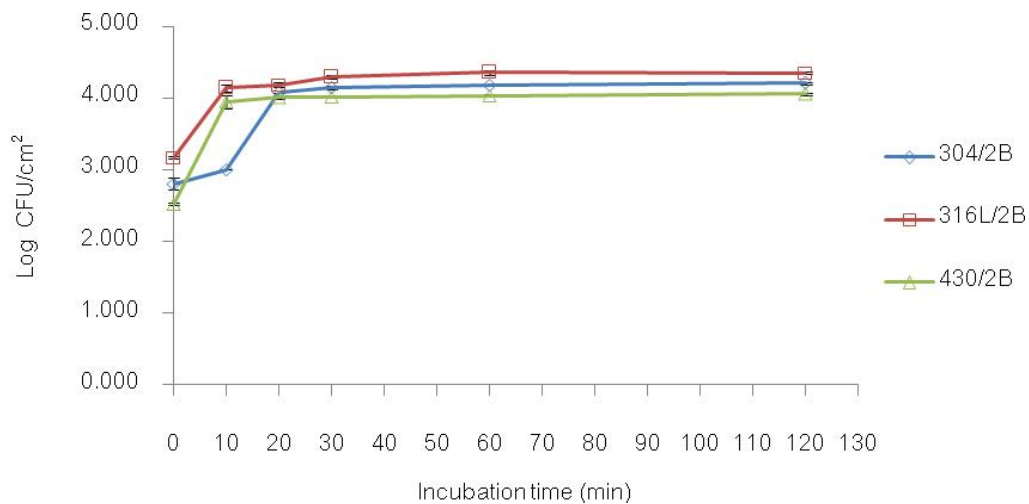
ระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่จุลินทรีย์สามารถเกาะติดและปนเปื้อนไปสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นข้อมูลสำคัญสำหรับผู้ประกอบการผลิตอาหาร จึงเป็นปัจจัยที่ควรต้องมีการศึกษาเพื่อศึกษาความสามารถในการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร คือ เหล็กกล้าไร้สนิม 3 เกรด (304, 316L และ 430) และ 2 พื้นผิว (2B และ BA) และได้เลือก



ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองตั้งแต่ 0 นาที (จุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมแล้วยกขึ้นทันที) เป็นต้นไป จนถึง 120 นาที โดยทำการจุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารแขวนลอยเซลล์ ที่งัวให้เกิดการเกาะติดที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0 นาที เป็นต้นไปจนถึง 120 นาที แล้วตรวจสอบการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* โดยการนับจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยวิธี spread plate

#### 4.2.1 การศึกษาผลของเกรดเหล็กกล้าไร้สนิม (304, 316L และ 430) ต่อการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus*

ผลการศึกษาผลของเกรดเหล็กกล้าไร้สนิม (เกรด 304, 316L และ 430) ต่อการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* พบว่า เมื่อจุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในสารแขวนลอยเซลล์ ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/mL}$  ที่เวลา 0 นาที ตรวจพบเชื้อบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B เกรด 304, 316L และ 430 ประมาณ  $2.808 \pm 0.078$ ,  $3.171 \pm 0.021$  และ  $2.522 \pm 0.016 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ และหลังจาก 0 นาที เชื้อสามารถเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้มากขึ้น โดยจำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L และ 430 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก  $3.171 \pm 0.021$  และ  $2.522 \pm 0.016 \log \text{CFU/cm}^2$  เป็น  $4.143 \pm 0.052$  และ  $3.949 \pm 0.086 \log \text{CFU/cm}^2$  คือเพิ่มขึ้นประมาณ 0.972 และ  $1.427 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 เพิ่มขึ้นเพียง  $0.199 \log \text{CFU/cm}^2$  แต่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก  $3.007 \pm 0.007 \log \text{CFU/cm}^2$  เป็น  $4.086 \pm 0.013 \log \text{CFU/cm}^2$  คือเพิ่มขึ้นประมาณ  $1.079 \log \text{CFU/cm}^2$  ในช่วงเวลา 10 ถึง 20 นาที และที่เวลา 120 นาที สามารถตรวจพบเชื้อประมาณ  $4.205 \pm 0.019$ ,  $4.354 \pm 0.022$  และ  $4.058 \pm 0.019 \log \text{CFU/cm}^2$  บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 ตามลำดับ (แสดงในภาพที่ 4.5)

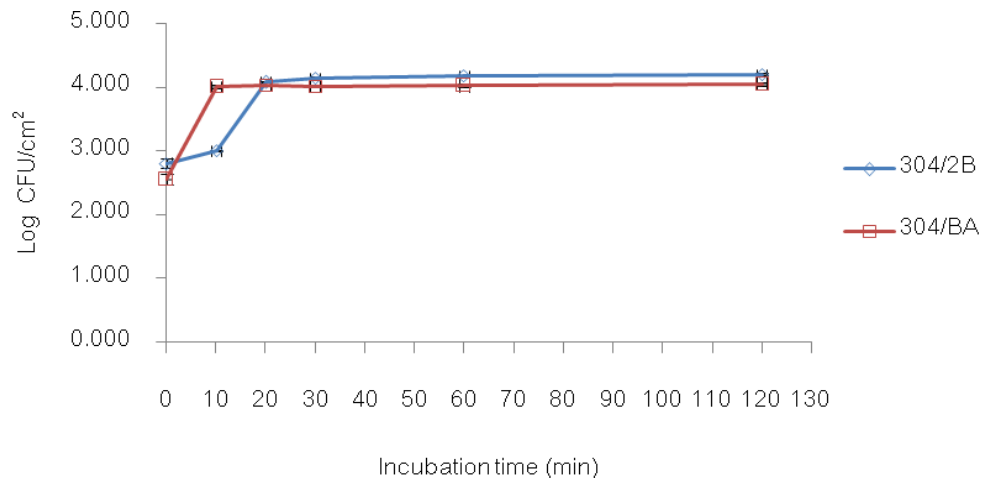


ภาพที่ 4.5 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 ในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น 9 log CFU/ml ณ เวลาต่างๆ กัน

ที่เวลา 0 นาที *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดบนเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และ 316L ตามลำดับ โดยจำนวนเซลล์ที่เกาะติดได้บนเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 3 เกรด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L และ 430 จำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0 ถึง 10 นาที ในขณะที่เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 จำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 10 ถึง 20 นาที แต่เมื่อทิ้งแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไว้ในสารแขวนลอยเซลล์เป็นเวลานานขึ้น จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 3 เกรด จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.2.2 การศึกษาผลของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม (2B และ BA) ต่อการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus*

ผลการศึกษาผลของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม (พื้นผิว 2B และ BA) ต่อการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* พบว่า เมื่อจุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  ที่เวลา 0 นาที ตรวจพบเชื้อบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ประมาณ  $2.808 \pm 0.078$  และ  $2.555 \pm 0.078 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ และหลังจาก 0 นาที เชื้อสามารถเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้มากขึ้น โดยจำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก  $2.555 \pm 0.078 \log \text{CFU/cm}^2$  เป็น  $4.006 \pm 0.024 \log \text{CFU/cm}^2$  คือเพิ่มขึ้นประมาณ  $1.451 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B เพิ่มขึ้นเพียง  $0.199 \log \text{CFU/cm}^2$  แต่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก  $3.007 \pm 0.007 \log \text{CFU/cm}^2$  เป็น  $4.086 \pm 0.013 \log \text{CFU/cm}^2$  คือเพิ่มขึ้นประมาณ  $1.079 \log \text{CFU/cm}^2$  ในช่วงเวลา 10 ถึง 20 นาที เมื่อทิ้งแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไว้ในสารแขวนลอยเซลล์เป็นเวลานานขึ้น จำนวนเชื้อที่เกาะติดและเจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมก็เพิ่มมากขึ้น และที่เวลา 120 นาที สามารถตรวจพบเชื้อประมาณ  $4.205 \pm 0.019$  และ  $4.043 \pm 0.032 \log \text{CFU/cm}^2$  บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ตามลำดับ (แสดงในภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น 9 log CFU/ml ณ เวลาต่างๆ กัน

ที่เวลา 0 นาที *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดบนเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B ได้ดีกว่าเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA จำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0 ถึง 10 นาที ในขณะที่เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B จำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 10 ถึง 20 นาที เมื่อทิ้งแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไว้ในสารแขวนลอยเซลล์เป็นเวลานานขึ้น จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 2 พื้นผิว จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น 3 log CFU/ml พบว่าที่เวลา 0 ถึง 120 นาที ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้ ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่าไม่มีการเกาะติดของเชื้อบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม แต่อาจเกิดจากข้อจำกัดของวิธีการตรวจสอบ ปริมาณเชื้อที่เลือกใช้ ซึ่งไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อที่มีปริมาณน้อยบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม นอกจากนี้เป็นไปได้ว่าระยะนี้เซลล์กับพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกาะติดกันแบบ passive อาจทำให้เชื้อที่มีปริมาณน้อยหลุดออกจากพื้นผิวสัมผัสได้ ไม่ว่าจะเป็นอย่างนี้หรือการเคลื่อนย้าย

พื้นผิว หรือชั้นตอนการล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดบนพื้นผิวออก ทำให้การตรวจเชื้อบนแผ่นเหล็กกล้า ไร้นิมทำได้ยาก ซึ่งแตกต่างกันกับในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  แม้เซลล์กับพื้นผิวเหล็กกล้าไร้นิมจะเกิดการเกาะติดกันแบบ **passive** ถึงจะผ่านชั้นตอนที่ทำให้เซลล์หลุดออกไป แต่ปริมาณเชื้อที่มีมากกว่า ทำให้ยังคงสามารถตรวจสอบได้

นอกจากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม (**conventional cultivating method**) แล้ว การตรวจการเกาะติดของเชื้อบนพื้นผิวยังมีอีกหลายวิธีด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็นการตรวจวัดเพื่อให้ได้ค่าออกมาในเชิงปริมาณ (**quantitative**) เช่น **epifluorescence microscopy** หรือ การตรวจวัดเชิงคุณภาพ เช่น **scanning electron microscopy, ATP bioluminescence** และการตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วย **spectrophotometer** เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังที่กล่าวนี้ อาจมีประสิทธิภาพในการตรวจการเกาะติดของเชื้อบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้นิมที่มีปริมาณเซลล์น้อยได้ดีกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิวที่สัมผัส มีหลายปัจจัย คือ ชนิดและโครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์ เซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่จะแสดงถึงความเป็นไฮโดรโฟบิก (**hydrophobic**) ของเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเกาะติดบนพื้นผิว ไม่ว่าจะเป็น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (**lipopolysaccharide, LPS**) โปรตีนแอดฮีซิน (**adhesin**) และโปรตีนชนิดอื่น ๆ เป็นต้น มีรายงานว่า *E. coli* และ *L. monocytogenes* ใช้แฟลกเจลลา (**flagella**), พิลไล (**pilli**) และโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ในการเกาะติด (**Kumar and Anand, 1998**) และมีการศึกษาพบว่าแคปซูลของ *V. parahaemolyticus* ประกอบด้วยกรดยูโรนิก (**uronic acid**) ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการรวมกลุ่มและเกาะติดกับเซลล์ในลำไส้เล็ก (**Pace et al., 1997**) เมื่อมีการสูญเสียโครงสร้างเหล่านี้ จะมีผลทำให้ความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวดลดลงได้ (**Kumar and Anand, 1998**)

ในปีค.ศ. 2004 มีการศึกษาสัดส่วนของโลหะที่ผสมอยู่ในแผ่นเหล็กกล้าไร้นิม ชนิดออสเทนนิติก เกรด 304 พบว่า เมื่อมีอัตราส่วนของทองแดงในเนื้อเหล็กกล้าไร้นิมเพิ่มขึ้น

ความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวของเซลล์จุลินทรีย์จะลดลง (Hong and Koo, 2004) เมื่อมีการสะสมของสารอาหารบนพื้นผิวจนเกิดเป็น **conditioning film** จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของพื้นผิว ไม่ว่าจะเป็น ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิตี (**hydrophobicity**) ค่าพลังงานอิสระ (**surface free energy**) และประจุของพื้นผิว ซึ่งอาจส่งผลต่อความสามารถในการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์ (Garrett et al., 2008) และมีการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของยีนต่อการเกาะติดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวของวัสดุ พบว่า ระยะเวลาที่จุลินทรีย์สัมผัสกับพื้นผิว ส่วนประกอบทางเคมีของพื้นผิว และลักษณะทางเคมีกายภาพของสิ่งแวดล้อม มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของยีน ทำให้มีการสร้างโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะระหว่างเซลล์จุลินทรีย์ และพื้นผิว (ณฐนนท์ ตราชู, 2551)

ลักษณะและคุณสมบัติทางกายภาพของพื้นผิว เช่น ความเรียบ (**roughness**) ความเป็นไฮโดรโฟบิกซิตี (**hydrophobicity**) ค่าพลังงานอิสระ (**surface free energy**) และประจุของพื้นผิว มีการศึกษาการเกาะติดของ *Listeria monocytogenes* บนพื้นผิวหลายชนิดด้วย **Scanning Electron Microscope** พบว่า เซลล์จุลินทรีย์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวของยางได้มากกว่าพื้นผิวโพลีโพรพิลีน เหล็กกล้าไร้สนิม และแก้ว ตามลำดับ เนื่องจากพื้นผิวยางมีร่องและรอยแยกขนาดใหญ่ ส่วนพื้นผิวแก้วมีความเรียบมากที่สุด ทำให้จุลินทรีย์เกาะติดได้น้อยที่สุด (Mufu et al., 1990) และมีการรวบรวมงานวิจัยและสรุปว่า การเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์เกิดขึ้นบนพื้นผิวที่มีค่าพลังงานอิสระสูง หรือมีความเป็น **hydrophilic** ได้ดีกว่าพื้นผิวที่มีลักษณะเป็น **hydrophobic** (Chmielewski and Frank, 2003)

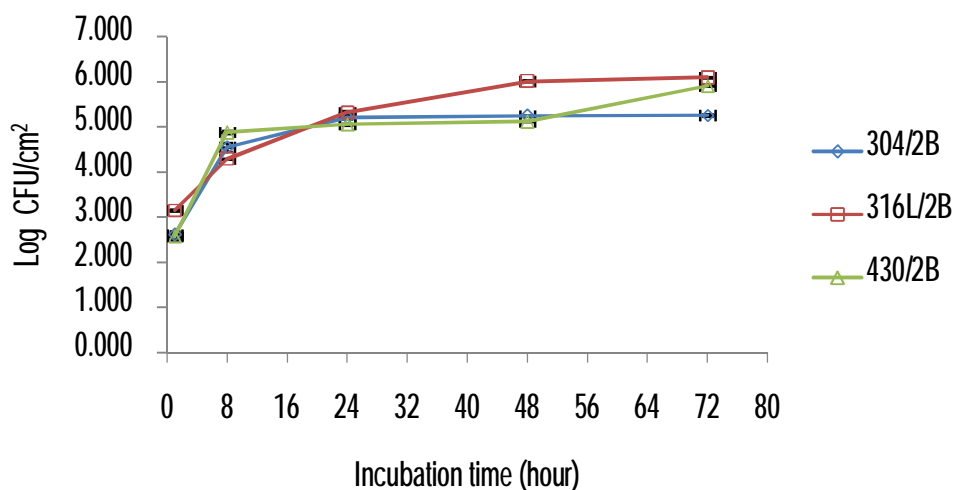
#### 4.3 ผลการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm formation) ของ *V. parahaemolyticus*

การสะสมและการเกิดเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร เป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับผู้ประกอบการผลิตอาหาร งานวิจัยนี้จึงศึกษาการเกิดไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร คือ เหล็กกล้าไร้สนิม 3 เกรด (304, 316L และ 430) และ 2 พื้นผิว (2B และ BA) โดยทำการทดสอบการเกิดไบโอฟิล์มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

โดยจากการทดสอบการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* ทำให้ทราบว่าเวลา 0 นาทีก็เพียงพอที่จะทำให้ *V. parahaemolyticus* เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้ ดังนั้นการทดสอบในขั้นตอนนี้ จึงจุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อยืนยันให้แน่ใจว่าเชื้อเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมแน่นอน จากนั้นย้ายแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไปใส่ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และนับจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม ด้วยวิธี spread plate

#### 4.3.1 การศึกษาผลของเกรดเหล็กกล้าไร้สนิม (304, 316L และ 430) ต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus*

ผลการศึกษาผลของเกรดเหล็กกล้าไร้สนิม (304, 316L และ 430) ต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* พบว่า ที่เวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก สามารถตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม เกรด 304 ได้  $2.603 \pm 0.080$  ถึง  $4.548 \pm 0.098 \log \text{CFU/ml}$  หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็น  $5.207 \pm 0.039 \log \text{CFU/ml}$  และมีจำนวนเซลล์มากที่สุด คือ  $5.255 \pm 0.032 \log \text{CFU/ml}$  หลังจากบ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L ที่เวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก ตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ได้  $3.147 \pm 0.023$  ถึง  $4.285 \pm 0.013 \log \text{CFU/ml}$  หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็น  $5.321 \pm 0.027 \log \text{CFU/ml}$  และมีจำนวนเซลล์มากที่สุด คือ  $6.093 \pm 0.014 \log \text{CFU/ml}$  หลังจากบ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และสำหรับแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 ที่เวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก ตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ได้  $2.565 \pm 0.076$  ถึง  $4.878 \pm 0.032 \log \text{CFU/ml}$  หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็น  $5.050 \pm 0.020 \log \text{CFU/ml}$  และหลังจากบ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถตรวจนับจำนวนเซลล์ได้มากที่สุด คือ  $5.907 \pm 0.019 \log \text{CFU/ml}$  (แสดงในภาพที่ 4.7)



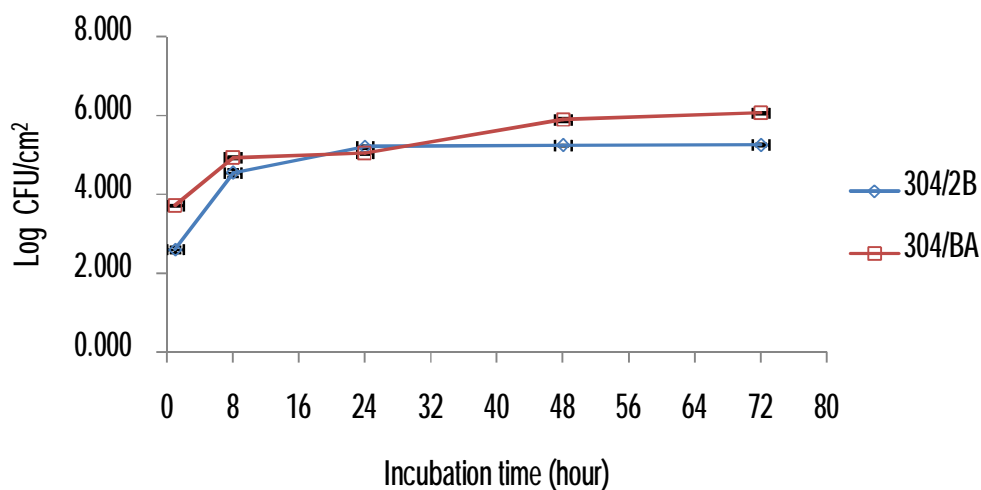
ภาพที่ 4.7 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430

จากผลการศึกษาความขรุขระของเหล็กกล้าไร้สนิมแต่ละเกรด พบว่า เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L มีความขรุขระมากที่สุด รองลงมา คือ เกรด 304 และ 430 ตามลำดับ ซึ่งที่เวลา 1 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่ตรวจนับได้บนเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีพื้นผิวขรุขระ (316L) มีค่ามากกว่าบนเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีพื้นผิวเรียบกว่า (430 และ 304) อย่างมีนัยสำคัญ ดังที่แสดงในภาพที่ 4.7 และเมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของ *V. parahaemolyticus* บนเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 3 เกรด โดยพิจารณาจาก slope ของกราฟในช่วง 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก จะเห็นได้ว่า *V. parahaemolyticus* สามารถเพิ่มจำนวนบนเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 และ 304 ได้ดีกว่าบนเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L แต่เมื่อเวลานานขึ้น พบว่า จำนวนของ *V. parahaemolyticus* บนเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 3 เกรด จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



### 4.3.2 การศึกษาผลของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม (2B และ BA) ต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus*

สำหรับการศึกษาผลของพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม (2B และ BA) ต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* จะทำการทดสอบการเกิดไบโอฟิล์ม โดยจุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้น  $9 \log \text{CFU/ml}$  เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อยืนยันให้แน่ใจว่าเชื้อเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมแน่นอน จากนั้นย้ายแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไปใส่ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และนับจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยวิธี spread plate ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า ที่เวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก สามารถตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B ได้  $2.603 \pm 0.080$  ถึง  $4.548 \pm 0.098 \log \text{CFU/ml}$  หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็น  $5.207 \pm 0.039 \log \text{CFU/ml}$  และมีจำนวนเซลล์มากที่สุด คือ  $5.255 \pm 0.032 \log \text{CFU/ml}$  หลังจากบ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และสำหรับแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA ที่เวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก สามารถตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้  $3.714 \pm 0.021$  ถึง  $4.903 \pm 0.030 \log \text{CFU/ml}$  หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็น  $5.042 \pm 0.027 \log \text{CFU/ml}$  และมีจำนวนเซลล์มากที่สุดหลังจากบ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมงคือ  $6.063 \pm 0.021 \log \text{CFU/ml}$  (แสดงในภาพที่ 4.8)

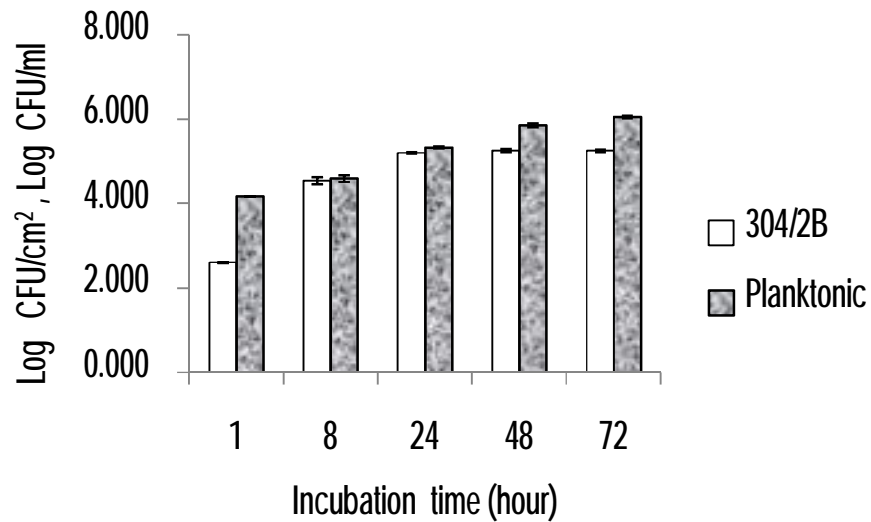


ภาพที่ 4.8 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA

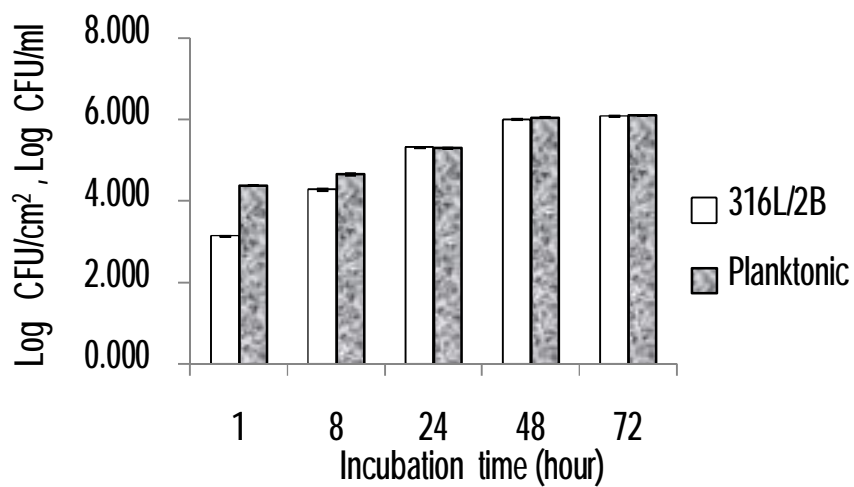
จากผลการศึกษาความขรุขระของพื้นผิวทั้ง 2 ชนิดของเหล็กกล้าไร้สนิม พบว่าเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B มีความขรุขระมากกว่า พื้นผิว BA ซึ่งที่เวลา 1 ชั่วโมงจำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่ตรวจนับได้บนเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีพื้นผิวเรียบ (BA) มีค่ามากกว่าบนเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีพื้นผิวขรุขระ (2B) อย่างมีนัยสำคัญ ดังที่แสดงในภาพที่ 4.8 แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 2 พื้นผิว โดยพิจารณาจาก slope ของกราฟในช่วง 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก จะเห็นได้ว่า *V. parahaemolyticus* สามารถเพิ่มจำนวนได้บนเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B ได้ดีกว่าบนเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA แต่เมื่อเวลานานขึ้น พบว่า จำนวนของ *V. parahaemolyticus* บนเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 2 พื้นผิว จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากข้อมูลดังกล่าว อาจสรุปได้ว่า ความขรุขระของเกรดและลักษณะพื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมมีผลต่อการเกาะติด ของ *V. parahaemolyticus* แต่ไม่ได้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นไบโอฟิล์ม

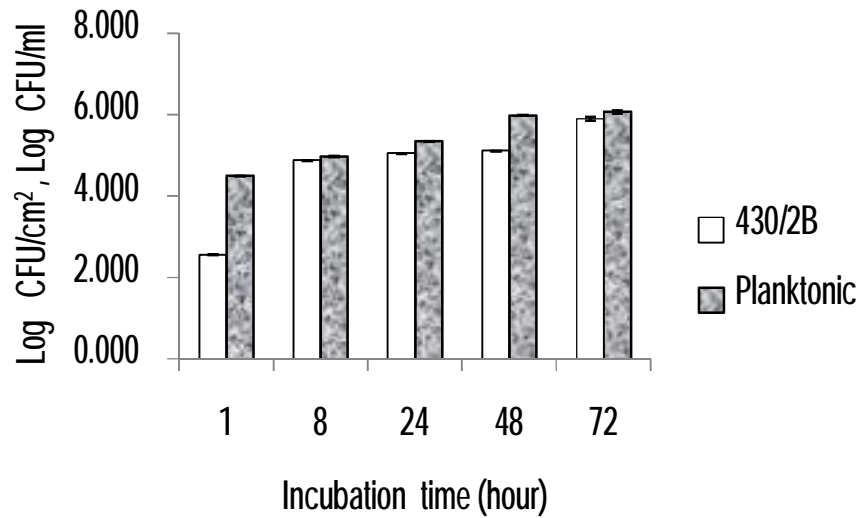
เมื่อทำการศึกษาปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้า ไร้สนิมและปริมาณเซลล์อิสระที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% พบว่า ที่เวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก ตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* บนเหล็กกล้า ไร้สนิมเกรด 304 ได้  $2.603 \pm 0.080$  ถึง  $4.548 \pm 0.098$  log CFU/ml และปริมาณเซลล์อิสระที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% มีค่า  $4.175 \pm 0.005$  ถึง  $4.594 \pm 0.078$  log CFU/ml และเมื่อทำการบ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมไว้เป็นเวลานานขึ้น ก็ยังคงสามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์อิสระที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% (แสดงในภาพที่ 4.9) และเป็นเช่นเดียวกันสำหรับแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L และ 430 คือเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L ที่เวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก ตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้  $3.147 \pm 0.023$  ถึง  $4.285 \pm 0.013$  log CFU/ml และปริมาณเซลล์อิสระที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% มีค่า  $4.390 \pm 0.002$  ถึง  $4.664 \pm 0.025$  log CFU/ml (แสดงในภาพที่ 4.10) สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 ที่เวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก ตรวจนับปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้  $2.565 \pm 0.076$  ถึง  $4.878 \pm 0.032$  log CFU/ml และปริมาณเซลล์อิสระที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% มีค่า  $4.503 \pm 0.006$  ถึง  $4.980 \pm 0.015$  log CFU/ml (แสดงในภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.9 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และจำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3%

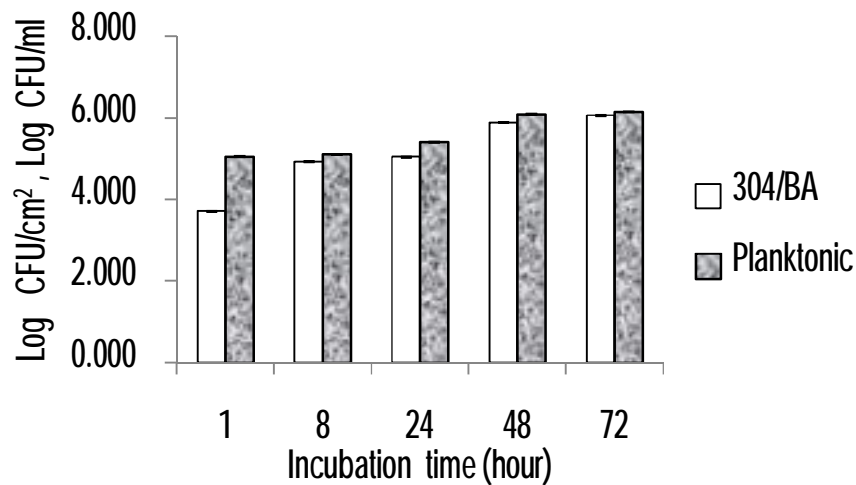


ภาพที่ 4.10 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L และจำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3%



ภาพที่ 4.11 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 และจำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3%

สำหรับแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA คือ ที่เวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก ตรวจนับ ปริมาณเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้  $3.714 \pm 0.021$  ถึง  $4.903 \pm 0.030$  log CFU/ml และปริมาณเซลล์อิสระที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% มีค่า  $5.051 \pm 0.007$  ถึง  $5.109 \pm 0.004$  log CFU/ml (แสดงในภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA และจำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3%

จากการศึกษาจำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 3 เกรด (304, 316L และ 430) และ 2 พื้นผิว (2B และ BA) กับจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% แสดงให้เห็นว่า เซลล์ *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% และสามารถเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้ ทั้งนี้เนื่องจาก ในช่วงเวลา 1 ถึง 8 ชั่วโมงแรก เซลล์แบคทีเรียจะเกาะติดบนพื้นผิวแบบผันกลับ เซลล์ที่เกาะติดแล้วจะแบ่งตัว เพิ่มจำนวนมากขึ้น และอาจหลุดออกมาเป็นเซลล์อิสระ (planktonic cell) ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Kumar and Anand, 1998)

กลไกการเกิดไบโอฟิล์ม เริ่มต้นเมื่อเกิดการแบ่งตัวของเซลล์จุลินทรีย์ที่เกาะติดและกระจายตัวบนพื้นผิว (Tolker et al., 2000) โดยเมื่อเซลล์แบ่งตัวจะแผ่ขยายจากจุดที่เกาะติดบนพื้นผิวไปทางด้านนอกและด้านบน เพื่อสร้างกลุ่มเซลล์ เช่นเดียวกันกับการสร้างโคโลนีบน

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และพบว่ากลไกการสร้างไบโอฟิล์มขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต คุณสมบัติของพื้นผิว และสภาพแวดล้อมของน้ำ (Geesey, 2001)

ในปีค.ศ. 1998 มีการศึกษาการเคลื่อนที่ของ *P. aeruginosa* พบว่า แฟลกเจลลา และ พิล type IV มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่และรวมตัวบนพื้นผิว (O' Toole and Kolter, 1998a) สำหรับ *V. cholera* แฟลกเจลลามีส่วนช่วยในการเกาะติดกับพื้นผิว (Watnick et al., 2001) นอกจากนั้นในปีค.ศ. 2002 มีรายงานว่าแฟลกเจลลา พิล type I และ flimbriae มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* (Jackson et al., 2002) และในปีค.ศ. 2006 มีการศึกษา *V. parahaemolyticus* พบว่า mannose-sensitive hemagglutinin pilus และ chitin-regulated pilus มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวแก้วในวิธีที่แตกต่างกัน คือ mannose-sensitive hemagglutinin pilus ช่วยในการเกาะติดของเซลล์บนพื้นผิว ในขณะที่ chitin-regulated pilus มีบทบาทเกี่ยวกับการรวมกลุ่มของเซลล์ (Shime-Hattori et al., 2006)

ในปีค.ศ. 2003 Stepanovic และคณะรายงานผลของอิทธิพลของอุณหภูมิ ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *Salmonella* spp. โดยเลือกใช้ 3 อุณหภูมิ คือ 37, 30 และ 22 องศาเซลเซียส พบว่า หลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง *Salmonella* spp. สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง *Salmonella* spp. จะสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (Stepanovic et al., 2003)

นอกจากนี้ มีรายงานการตรวจเอกสารงานวิจัยที่แสดงกลไกการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่างๆ โดยแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างแรงยึดเกาะกับระยะห่างของเซลล์กับพื้นผิวสัมผัส คือ เมื่อมีสารอาหารหลงเหลือบนพื้นผิวจนเกิดเป็นฟิล์มของอาหาร (conditioning film) เซลล์จุลินทรีย์อิสระ (planktonic cell) ที่อยู่โดยรอบ จะเคลื่อนที่เข้าหาพื้นผิว เซลล์จะเกิดการเกาะติดกับพื้นผิวด้วยแรงอย่างอ่อน เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waal forces) ระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวมีค่า 50 นาโนเมตร และเมื่อเวลาผ่านไปแรงที่ยึดเกาะจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเซลล์เข้าไปใกล้กับพื้นผิวมากขึ้นจนระยะห่างมีค่า 10 ถึง 20 นาโนเมตร การ

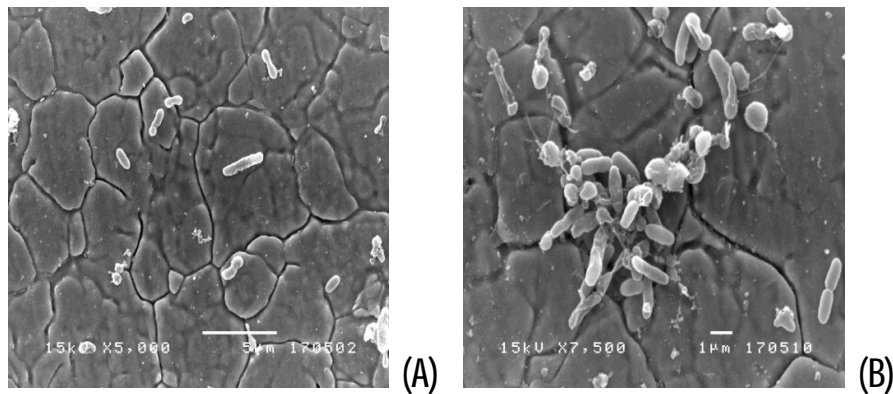
เกาะติดทั้ง 2 ระยะนี้ เป็นขั้นตอนการเกาะติดแบบผันกลับได้ (**reversible adhesion**) จนเมื่อระยะห่างระหว่างเซลล์กับพื้นผิวน้อยกว่า 15 นาโนเมตร เซลล์จุลินทรีย์จะเกิดการสร้างพันธะพิเศษ เช่น พันธะโควาเลนต์ (**covalent bonding**) เป็นต้น เกิดเป็นการเกาะติดแบบไม่ผันกลับ (**irreversible adhesion**) เซลล์จุลินทรีย์เหล่านั้นจะมีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นไบโอฟิล์มต่อไป (กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล, 2549)

ในปีพ.ศ. 2551 มีการศึกษาปัจจัยในการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มของ *Salmonella Anatum* พบว่า ในสภาวะที่มีเชื้อจำนวนมาก *S. Anatum* สามารถเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้ในทันทีที่สัมผัส (จีระเดช มาลา, 2551)

#### 4.4 ผลการประเมินการเกิดไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม ด้วย SEM

การประเมินผลการเกิดไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม ด้วย SEM ทำโดยการจุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม 3 เกรด (304, 316L และ 430) และ 2 พื้นผิว (2B และ BA) ลงในสารละลายเชื้อความเข้มข้น 9 log CFU/ml แล้วนำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทั้งหมด ไปบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% หลอดใหม่ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจลักษณะการเกิดไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม ด้วย SEM โดยเครื่อง Scanning microscope รุ่น JSM-5410LV ผลการทดสอบ พบว่า เซลล์ *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดและกระจายไปทั่วพื้นผิว และพบได้ทุกส่วน บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 ไม่ได้เกาะโดยอาศัยช่องว่างหรือรอยแตกบนพื้นผิว ที่เวลา 24 ชั่วโมง เกิดเป็น monolayer biofilm เซลล์เกาะบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และเมื่อบ่มเป็นระยะเวลาเพิ่มขึ้น (72 ชั่วโมง) เซลล์เริ่มมีการเกาะกันเป็นกลุ่ม เกิดเป็น multilayer biofilm มีการสร้างเส้นใยเพื่อยึดเหนี่ยวกัน (แสดงในภาพที่ 4.13)



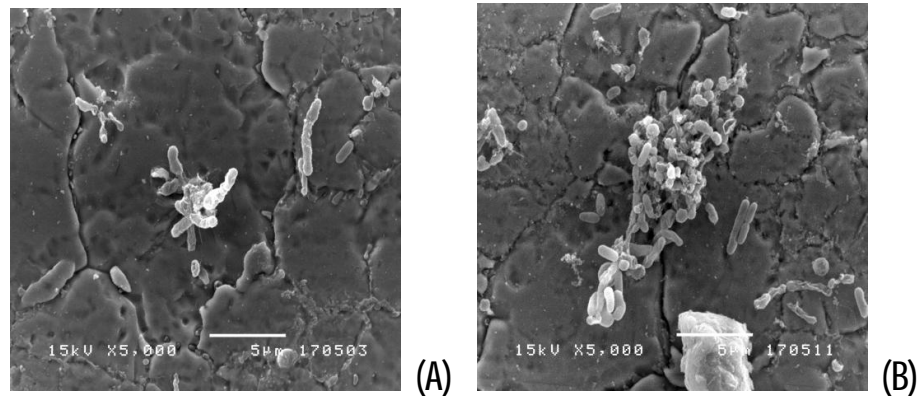


ภาพที่ 4.13 ลักษณะการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว 2B จากการวิเคราะห์ด้วย SEM

A) เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 ที่เวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 5000x

B) เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 ที่เวลา 72 ชั่วโมง กำลังขยาย 7500x

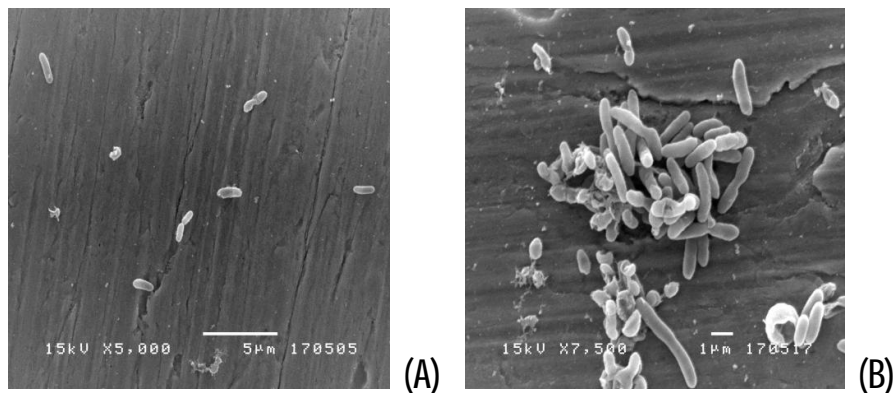
สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L พื้นผิวมีลักษณะขรุขระ มีหลุมที่ลึกเป็นจำนวนมาก (แสดงในภาพที่ 4.14) และเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พื้นผิวค่อนข้างเรียบ มีหลุมอยู่บ้างเล็กน้อย (แสดงในภาพที่ 4.15) ผลการทดสอบ พบว่า เป็นเช่นเดียวกันกับเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 คือ เซลล์ *V. parahaemolyticus* ก็สามารถเกาะติดและกระจายไปทั่วพื้นผิว และพบได้ทุกส่วน ไม่ได้เกาะโดยอาศัยช่องว่างหรือรอยแตกบนพื้นผิว ที่เวลา 24 ชั่วโมง เกิดเป็น **monolayer biofilm** เซลล์เกาะบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และเมื่อบ่มเป็นระยะเวลาเพิ่มขึ้น (72 ชั่วโมง) เซลล์เริ่มมีการเกาะกันเป็นกลุ่ม เกิดเป็น **multilayer biofilm**



ภาพที่ 4.14 ลักษณะการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L พื้นผิว 2B จากการวิเคราะห์ด้วย SEM

A) เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L ที่เวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 5000x

B) เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L ที่เวลา 72 ชั่วโมง กำลังขยาย 5000x



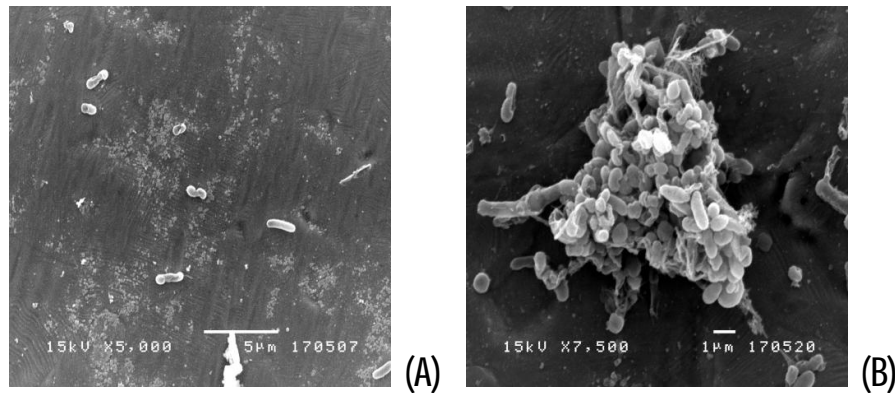
ภาพที่ 4.15 ลักษณะการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พื้นผิว 2B จากการวิเคราะห์ด้วย SEM

A) เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 ที่เวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 5000x

B) เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 ที่เวลา 72 ชั่วโมง กำลังขยาย 7500x

สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA ผลการทดสอบ พบว่า เซลล์ *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดและกระจายไปทั่วพื้นผิว และพบได้ทุกส่วน ไม่ได้เกาะโดยอาศัยช่องว่างหรือรอยแตกบนพื้นผิว เป็นเช่นเดียวกันกับข้างต้น คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เกิดเป็น

**monolayer biofilm** เซลล์เกาะบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และเมื่อปมเป็นระยะเวลา นานขึ้น (72 ชั่วโมง) เซลล์เริ่มมีการเกาะกันเป็นกลุ่ม เกิดเป็น **multilayer biofilm** และมีการ สร้างเส้นใยเพื่อยึดเหนี่ยวกัน (แสดงในภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.16 ลักษณะการเกาะติดและเกิดเป็นไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บน เหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว BA จากการวิเคราะห์ด้วย SEM  
 A) เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA ที่เวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 5000x  
 B) เหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA ที่เวลา 72 ชั่วโมง กำลังขยาย 7500x

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดบน แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่เวลา 24 ชั่วโมง และรวมกลุ่ม เกิดเป็น **multilayer biofilm** อย่างชัดเจนที่ เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งการรวมกลุ่มที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการส่งสัญญาณทางเคมีของเซลล์จุลินทรีย์ (**Quorum sensing**) ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ใกล้กัน สามารถมารวมกลุ่มกัน และแบ่งตัวเพิ่ม จำนวนเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ (Jefferson, 2004; Bower et al. 1996)

#### 4.5 ผลการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม

สารอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้สารอาหารสำหรับการทำกิจกรรมภายในเซลล์เพื่อการเจริญ เพิ่มจำนวน และการอยู่รอดของเซลล์ ปริมาณของสารอาหารที่แตกต่างกันจึงเป็นสิ่งที่จะต้องทำการศึกษา ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% ได้ที่ระยะเวลา 1-72 ชั่วโมง ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงได้ทำการสร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม 3 เกรด (304, 316L และ 430) และ 2 พื้นผิว (2B และ BA) จากนั้นนำไปบ่มไว้ในหลอดปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาว่า *V. parahaemolyticus* ภายใตไบโอฟิล์มจะสามารถอยู่รอดเมื่อไม่ให้สารอาหารเพิ่มได้หรือไม่

##### 4.5.1 การศึกษาการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* ภายใตไบโอฟิล์มบนเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 เมื่อไม่ให้สารอาหารเพิ่ม

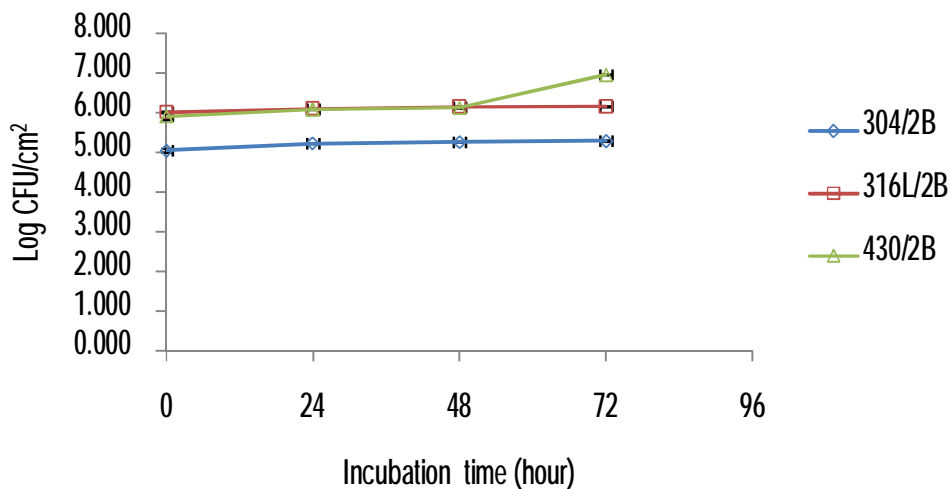
การศึกษากการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* ภายใตไบโอฟิล์มบนเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 ในสภาวะที่ไม่ให้สารอาหารเพิ่มเติม พบว่า ที่เวลา 0 ชั่วโมง (ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง) มีจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 เริ่มต้น  $5.049 \pm 0.044 \log \text{CFU/cm}^2$  หลังจากบ่มไว้ในที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเพิ่มขึ้นเป็น  $5.225 \pm 0.006 \log \text{CFU/cm}^2$  และเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมถึง  $5.291 \pm 0.012 \log \text{CFU/cm}^2$  ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L พบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง (ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง) มีจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเริ่มต้น  $6.012 \pm 0.011 \log \text{CFU/cm}^2$  หลังจากบ่มไว้

ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเพิ่มขึ้นเป็น  $6.120 \pm 0.008 \log \text{CFU/cm}^2$  และเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม  $6.154 \pm 0.006 \log \text{CFU/cm}^2$  ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง (ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง) มีจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเริ่มต้น  $5.907 \pm 0.093 \log \text{CFU/cm}^2$  หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเพิ่มขึ้นเป็น  $6.080 \pm 0.008 \log \text{CFU/cm}^2$  และเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมมากถึง  $6.957 \pm 0.006 \log \text{CFU/cm}^2$  ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากข้อมูล (แสดงในภาพที่ 4.17) จะเห็นได้ว่า เมื่อเกิดการเกาะติดและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มแล้ว *V. parahaemolyticus* มีความสามารถในการอยู่รอดบนเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 3 เกรดได้ แม้ไม่ให้อาหารเพิ่ม

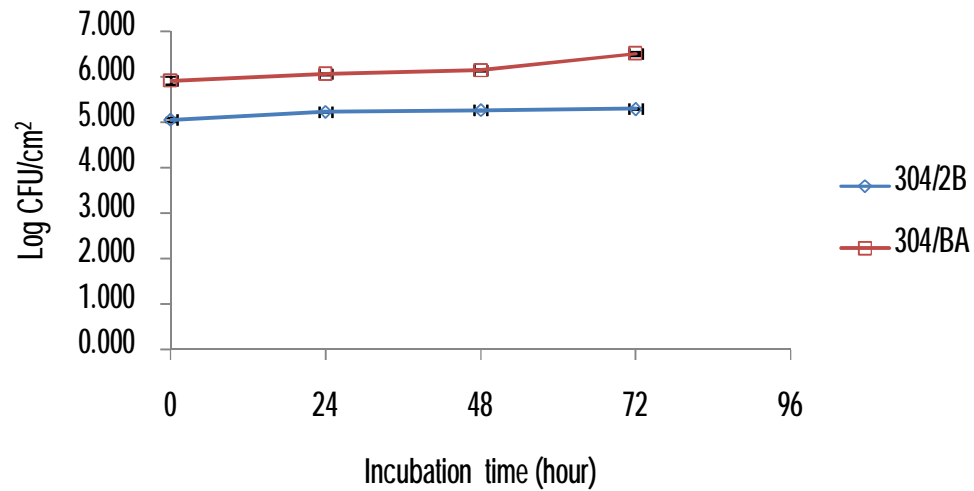


ภาพที่ 4.17 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 430 และ 316L พื้นผิว 2B เมื่อไม่ให้อาหารเพิ่ม

#### 4.5.2 การศึกษาการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มบนเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA เมื่อไม่ให้อาหาร

สำหรับเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว BA พบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง (ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง) มีจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเริ่มต้น  $5.911 \pm 0.091 \log \text{CFU/cm}^2$  หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเพิ่มขึ้นเป็น  $6.059 \pm 0.018 \log \text{CFU/cm}^2$  และเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมมากถึง  $6.503 \pm 0.047 \log \text{CFU/cm}^2$  ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากข้อมูล (แสดงในภาพที่ 4.18) พบว่า เมื่อเกิดการเกาะติดและพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มแล้ว *V. parahaemolyticus* มีความสามารถในการอยู่รอดบนเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 2 พื้นผิวได้ แม้ไม่ให้อาหารเพิ่ม



ภาพที่ 4.18 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่เจริญบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA เมื่อไม่ให้สารอาหารเพิ่ม

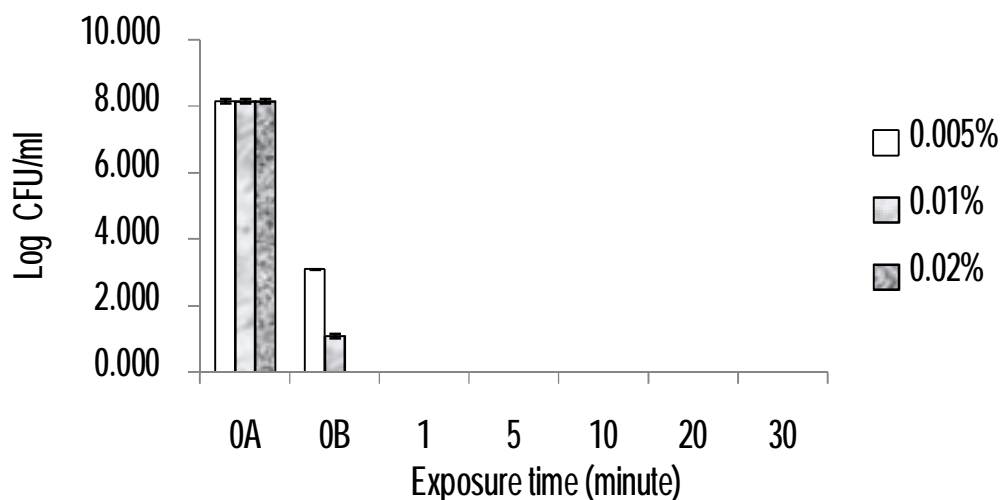
จากผลการทดลองพบว่า แม้จะไม่ให้สารอาหารเพิ่ม *V. parahaemolyticus* ก็ยังสามารถอยู่รอด เจริญ และเพิ่มจำนวนบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ *V. parahaemolyticus* ที่นำมาใช้ในการทดสอบมีความพร้อมสำหรับการเจริญและเพิ่มจำนวนเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่ให้สารอาหารเพิ่ม จึงสามารถอยู่รอด เจริญ และเพิ่มจำนวนได้

ในปีค.ศ. 2003 Kusumaningrum และคณะได้ศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม พบว่า สามารถตรวจพบ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enteridis* ที่มีชีวิตรอดหลังเกิดการปนเปื้อนแล้วเป็นเวลา 4 วัน (Kusumaningrum et al., 2003) และในปีพ.ศ. 2551 มีงานวิจัยรายงานว่า *S. Anatum* สามารถมีชีวิตรอดอยู่บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมได้หลังการเกาะติด และที่เวลา 72 ชั่วโมงยังคงตรวจพบจำนวนเซลล์มากพอที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามไปสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้ (จีระเดช มาลา, 2551)

#### 4.6 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์ของ *V. parahaemolyticus*

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ คือ Benzalkonium chloride (alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride; ADBAC) ซึ่งเป็นสารประเภท quaternary ammonium compound ในการทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* โดยกำหนดความเข้มข้นของ benzalkonium chloride 3 ระดับ คือ 0.005, 0.01 และ 0.02% (พิจารณาจากตารางที่ 2.6) ทดสอบกับสารแขวนลอยเซลล์ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้นเริ่มต้น 9 log CFU/ml เมื่อเซลล์ในสารแขวนลอยสัมผัสกับ benzalkonium chloride ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0, 1, 5, 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการหยุดปฏิกิริยาของสารฆ่าเชื้อด้วย Letheen Broth และทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% จากผลการทดลอง พบว่า benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ใน Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที หลังจากสัมผัสสารฆ่าเชื้อ และ benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมด ในทันที (0<sub>p</sub>) ที่สัมผัส (แสดงในภาพที่ 4.19)





ภาพที่ 4.19 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%, 0.01% และ 0.02%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้เติมสารละลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ทำการเติมสารละลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลงในสารฆ่าเชื้อ แล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

#### 4.7 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus*

##### 4.7.1 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430

การทดสอบประสิทธิภาพของ benzalkonium chloride ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ที่มีอายุ 24 และ 72 ชั่วโมง บนเหล็กกล้าไร้สนิม 3 เกรด (304, 316L และ 430) กำหนดความเข้มข้นของ benzalkonium chloride 3 ระดับ คือ 0.005, 0.01 และ 0.02% โดยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับ benzalkonium chloride ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22

องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0, 1, 5, 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการหยุดปฏิบัติการของสารฆ่าเชื้อด้วย **Lethen Broth** และตรวจนับจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* จากแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม บนอาหารเลี้ยงเชื้อ **Nutrient Agar** ที่มีส่วนผสมของ **NaCl 3%** ผลการทดลอง พบว่า **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น **0.005%** สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ **24** ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด **304** พื้นผิว **2B** ลงได้ **83.97%** โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $0.837 \pm 0.097 \log \text{CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.223 \pm 0.032 \log \text{CFU/cm}^2$  ภายในระยะเวลา **5** นาที และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่วเวลา **10** นาที ในขณะที่ **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น **0.01%** และ **0.02%** ในทันที ( $0_p$ ) ที่สัมผัสปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลงมากถึง **79.40%** และ **84.61%** ตามลำดับ โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตเพียง  $1.076 \pm 0.058 \log \text{CFU/cm}^2$  และ  $0.804 \pm 0.172 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ จากเริ่มต้น  $5.223 \pm 0.032 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่วเวลา **1** นาที

สำหรับไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ที่มีอายุ **72** ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด **304** พื้นผิว **2B** หลังสัมผัสกับ **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น **0.005%** เป็นเวลา **5** นาที สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลงได้ **80.09%** มีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.050 \pm 0.084 \log \text{CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.275 \pm 0.022 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่วเวลา **10** นาที ในขณะที่ความเข้มข้น **0.01%** และ **0.02%** ในทันที ( $0_p$ ) ที่สัมผัส ปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลง **78.01%** และ **82.94%** ตามลำดับ โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.160 \pm 0.068 \log \text{CFU/cm}^2$  และ  $0.900 \pm 0.174 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ จากเริ่มต้น  $5.275 \pm 0.022 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่วเวลา **1** นาที

การทดสอบประสิทธิภาพของ **benzalkonium chloride** ในการทำลายไบโอฟิล์มอายุ **24** ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด **316L** พื้นผิว **2B** ผลการทดลอง พบว่า **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น **0.005%** สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus*

ลงได้ 78.16% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.162 \pm 0.052 \log \text{CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.321 \pm 0.011 \log \text{CFU/cm}^2$  ภายในระยะเวลา 5 นาที และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 10 นาที ในขณะที่ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.01% และ 0.02% ในทันที ( $0_p$ ) ที่สัมผัส ปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลงมากถึง 77.52% และ 82.94% ตามลำดับ โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตเพียง  $1.196 \pm 0.050 \log \text{CFU/cm}^2$  และ  $0.908 \pm 0.843 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ จากเริ่มต้น  $5.321 \pm 0.011 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที

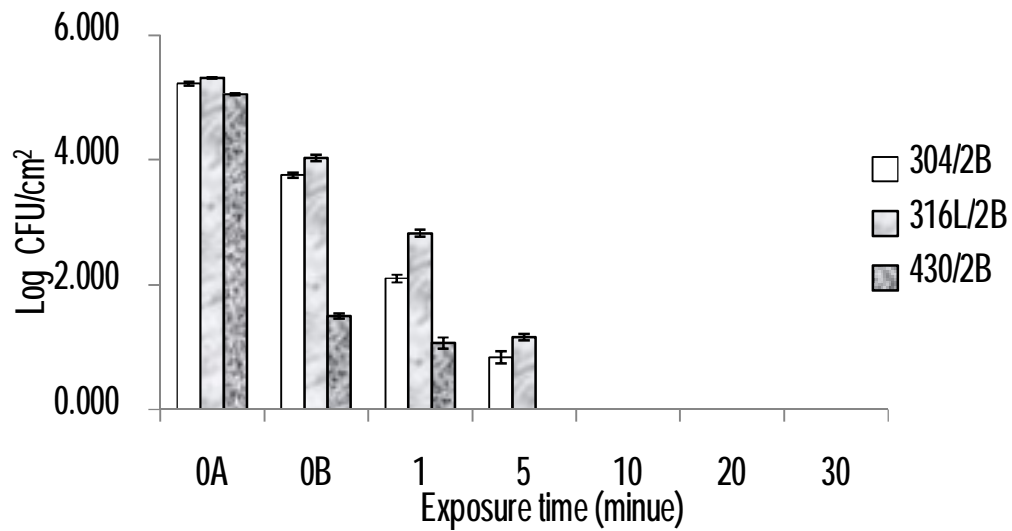
สำหรับไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316L พื้นผิว 2B หลังสัมผัสกับ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.005% เป็นเวลา 5 นาที สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลงได้ 79.19% มีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.268 \pm 0.039 \log \text{CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $6.094 \pm 0.012 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 10 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 0.01% และ 0.02% ในทันที ( $0_p$ ) ที่สัมผัส ปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลง 79.57% และ 86.17% ตามลำดับ โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.245 \pm 0.056 \log \text{CFU/cm}^2$  และ  $0.843 \pm 0.051 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ จากเริ่มต้น  $6.094 \pm 0.012 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของ benzalkonium chloride ในการทำลายไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พื้นผิว 2B ผลการทดลอง พบว่า benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.005% สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลงได้ 78.97% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.063 \pm 0.092 \log \text{CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.055 \pm 0.017 \log \text{CFU/cm}^2$  ภายในระยะเวลา 1 นาที และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 5 นาที และที่ความเข้มข้น 0.01% ในทันที ( $0_p$ ) ที่สัมผัส ปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลงมากถึง 81.19% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตเพียง  $0.951 \pm 0.119 \log \text{CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.055 \pm 0.017 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้

ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที ในขณะที่ **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น 0.02% ทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดในทันที (0<sub>p</sub>) ที่สัมผัส

ไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พื้นผิว 2B หลังสัมผัสกับ **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น 0.005% เป็นเวลา 1 นาที สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลงได้ 78.96% มีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.248 \pm 0.033 \log \text{ CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.931 \pm 0.025 \log \text{ CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 5 นาที และที่ความเข้มข้น 0.01% ในทันที (0<sub>p</sub>) ที่สัมผัส ปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลง 83.04% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.006 \pm 0.054 \log \text{ CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.931 \pm 0.025 \log \text{ CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที ในขณะที่ **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น 0.02% ทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดในทันที (0<sub>p</sub>) ที่สัมผัส

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ **benzalkonium chloride** ในการทำลายไบโอฟิล์มบนเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 3 เกรด พบว่า ที่ความเข้มข้นของ **benzalkonium chloride** 0.005% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และ 316L พื้นผิว 2B ได้ทั้งหมดที่เวลาตั้งแต่ 10 นาที ในขณะที่สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พื้นผิว 2B ซึ่งมีความเรียบมากที่สุดได้ทั้งหมดที่เวลาตั้งแต่ 5 นาที (แสดงในภาพที่ 4.20)

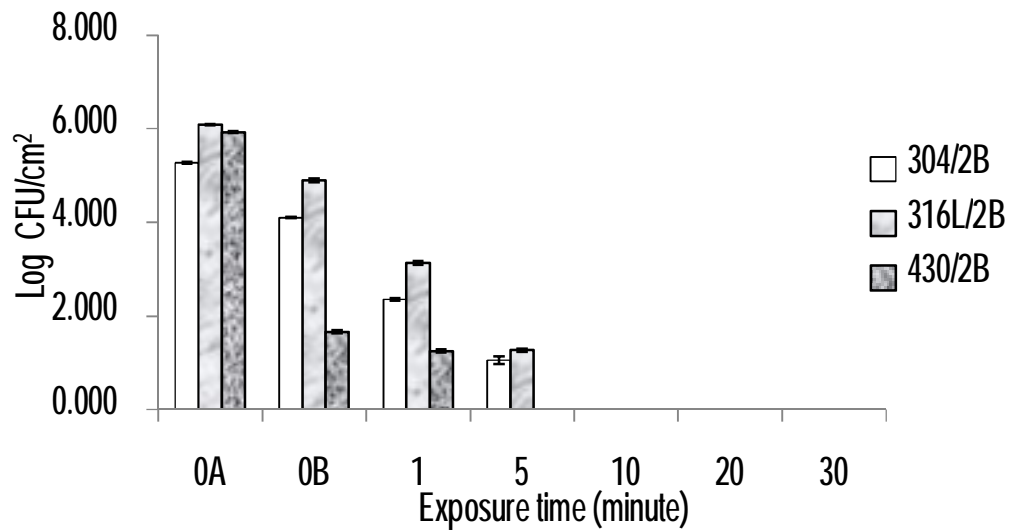


ภาพที่ 4.20 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง ผลการทดสอบ พบว่า เป็นไปในทิศทางเดียวกับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง คือ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.005% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และ 316L พื้นผิว 2B ได้ทั้งหมดที่เวลาดั้งแต่ 10 นาที ในขณะที่สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พื้นผิว 2B ซึ่งมีความเรียบมากที่สุดได้ทั้งหมดที่เวลาดั้งแต่ 5 นาที (แสดงในภาพที่ 4.21)

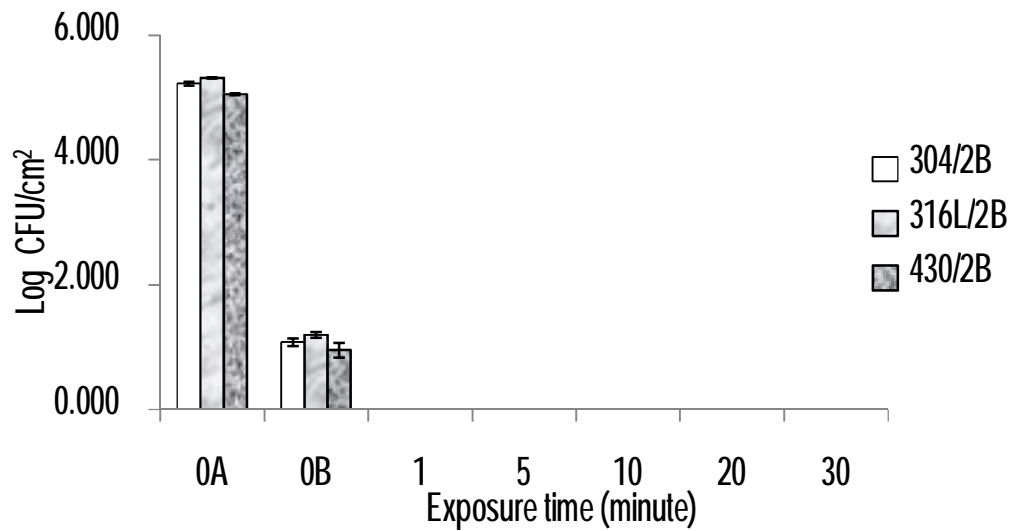


ภาพที่ 4.21 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

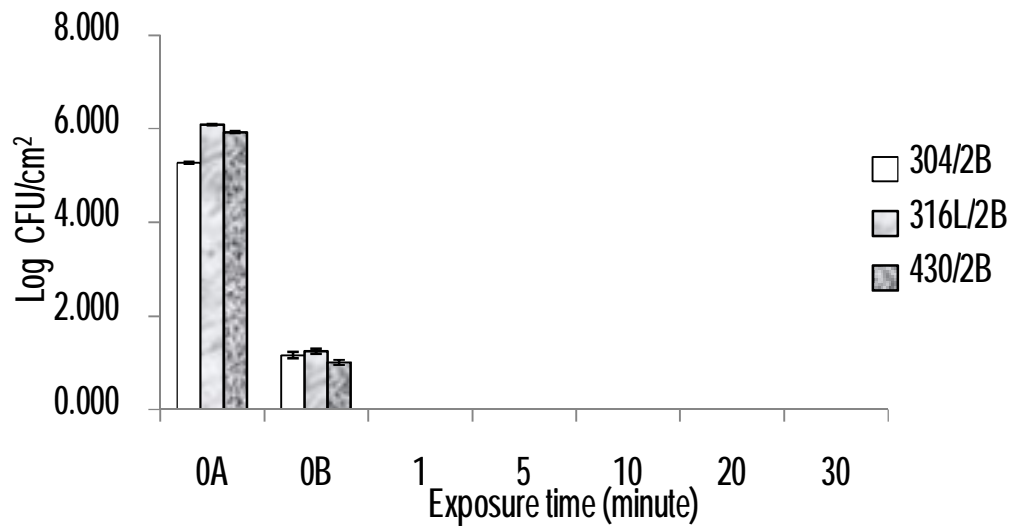
และเมื่อเปรียบเทียบเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 3 เกรด พบว่า ที่ความเข้มข้นของ benzalkonium chloride 0.01% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 และ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 3 เกรด ได้ทั้งหมดที่เวลาดั้งแต่ 1 นาที (แสดงในภาพที่ 4.22 และ 4.23)



ภาพที่ 4.22 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.01%

**0<sub>A</sub>** คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

**0<sub>B</sub>** คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



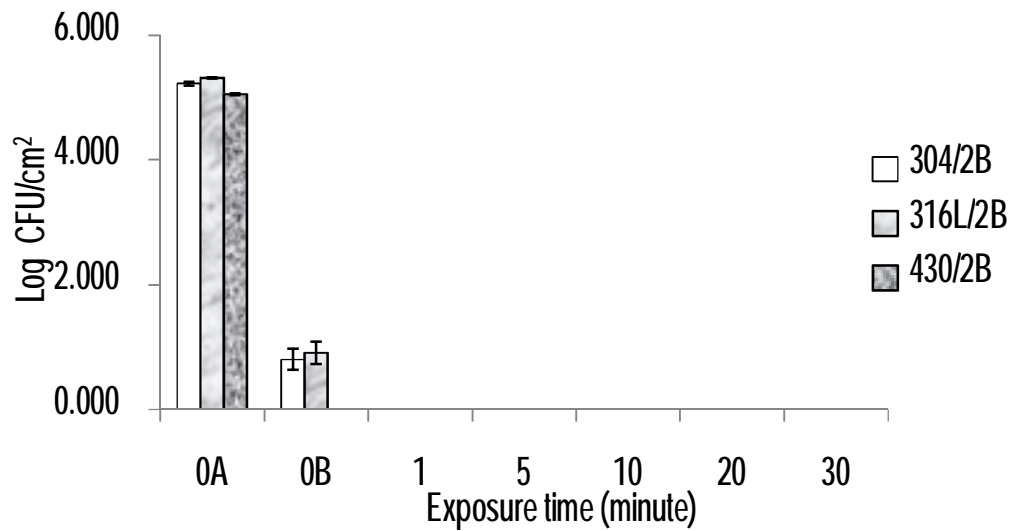
ภาพที่ 4.23 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.01%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

และที่ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.02% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 และ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 และ 316L พื้นผิว 2B ได้ทั้งหมดที่เวลาตั้งแต่ 1 นาที ในขณะที่สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 และ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 430 พื้นผิว 2B ซึ่งมีความเรียบมากที่สุดได้ทั้งหมดในทันที (0<sub>B</sub>) ที่สัมผัส (แสดงในภาพที่ 4.24 และ 4.25)

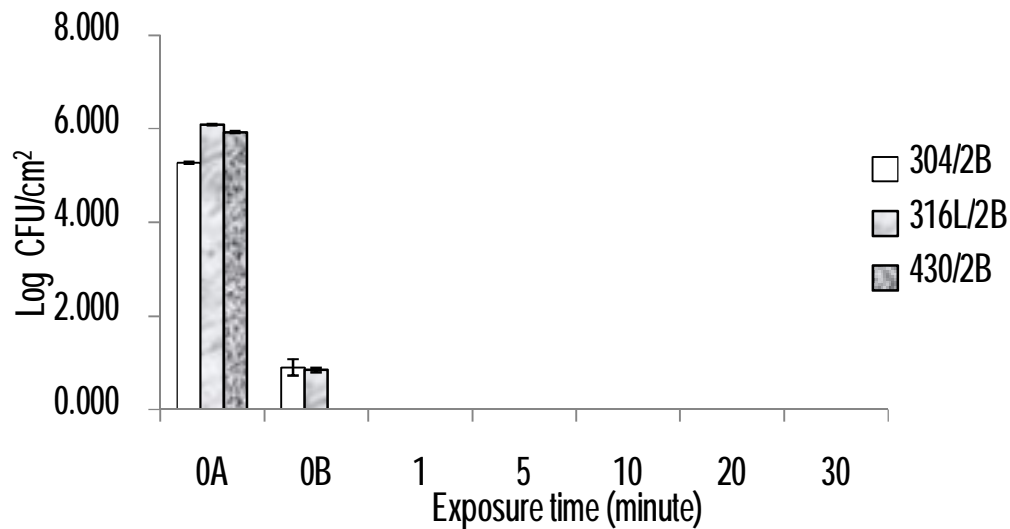




ภาพที่ 4.24 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02%

**0<sub>A</sub>** คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

**0<sub>B</sub>** คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



ภาพที่ 4.25 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรดต่างๆ ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

#### 4.7.2 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* บนเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA

การทดสอบประสิทธิภาพของ benzalkonium chloride ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ที่มีอายุ 24 และ 72 ชั่วโมง บนเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA โดยกำหนดความเข้มข้นของ benzalkonium chloride 3 ระดับ คือ 0.005, 0.01 และ 0.02% ให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับ benzalkonium chloride ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0, 1, 5, 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการหยุดปฏิบัติการของสารฆ่าเชื้อด้วย Lethen Broth และตรวจนับจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* จากแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% ผลการทดลอง พบว่า benzalkonium

chloride ความเข้มข้น 0.005% สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์ม อายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B ลงได้ 83.97% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $0.837 \pm 0.097 \log \text{CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.223 \pm 0.032 \log \text{CFU/cm}^2$  ภายในระยะเวลา 5 นาที และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 10 นาที ในขณะที่ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.01% และ 0.02% ในทันที ( $0_B$ ) ที่สัมผัส ปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลงมากถึง 79.40% และ 84.61% ตามลำดับ โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตเพียง  $1.076 \pm 0.058 \log \text{CFU/cm}^2$  และ  $0.804 \pm 0.172 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ จากเริ่มต้น  $5.223 \pm 0.032 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที

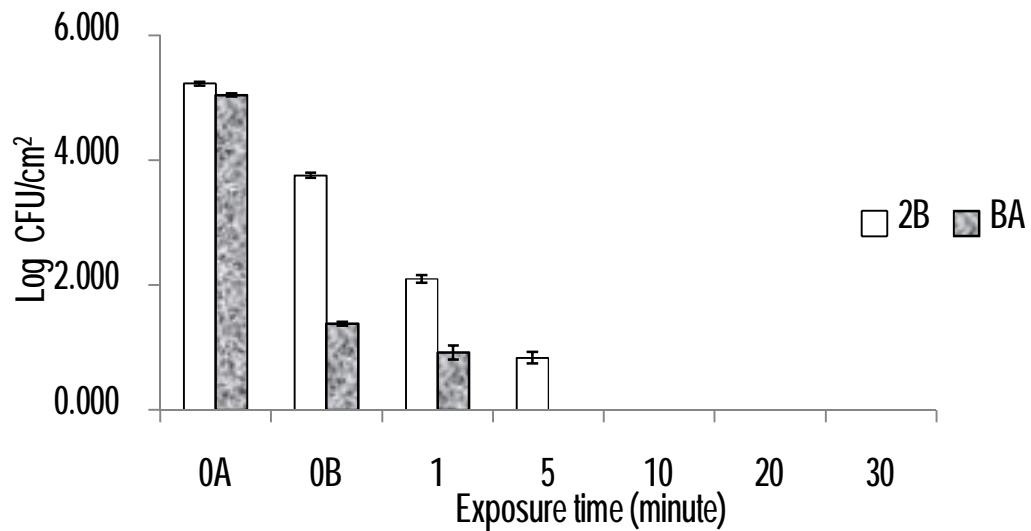
สำหรับไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B หลังสัมผัสกับ benzalkonium chloride เป็นเวลา 5 นาที สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลงได้ 80.09% มีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.050 \pm 0.084 \log \text{CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.275 \pm 0.022 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 10 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 0.01% และ 0.02% ในทันที ( $0_B$ ) ที่สัมผัส ปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลง 78.01% และ 82.94% ตามลำดับ โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $1.160 \pm 0.068 \log \text{CFU/cm}^2$  และ  $0.900 \pm 0.174 \log \text{CFU/cm}^2$  ตามลำดับ จากเริ่มต้น  $5.275 \pm 0.022 \log \text{CFU/cm}^2$  และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที

สำหรับแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA พบว่า benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.005% สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง ลงได้ 81.77% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต  $0.919 \pm 0.110 \log \text{CFU/cm}^2$  จากเริ่มต้น  $5.042 \pm 0.027 \log \text{CFU/cm}^2$  ภายในระยะเวลา 1 นาที และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 5 นาที ในขณะที่ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.01% ในทันที ( $0_B$ ) ที่สัมผัส ปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลงมากถึง 83.90% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตเพียง

0.812±0.153 log CFU/cm<sup>2</sup> จากเริ่มต้น 5.042±0.027 log CFU/cm<sup>2</sup> และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที ในขณะที่ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.02% ทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดในทันที (0<sub>p</sub>) ที่สัมผัส

และไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้า ไร้สนิมพื้นผิว BA หลังสัมผัสกับ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.005% เป็นเวลา 1 นาที สามารถลดจำนวนเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลงได้ 79.15% มีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต 1.265±0.049 log CFU/cm<sup>2</sup> จากเริ่มต้น 6.067±0.008 log CFU/cm<sup>2</sup> และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 5 นาที และที่ความเข้มข้น 0.01% ในทันที (0<sub>p</sub>) ที่สัมผัส ปริมาณเซลล์ *V. parahaemolyticus* ลดลง 87.23% โดยมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต 0.775±0.060 log CFU/cm<sup>2</sup> จากเริ่มต้น 6.067±0.008 log CFU/cm<sup>2</sup> และทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดตั้งแต่เวลา 1 นาที ในขณะที่ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.02% ทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดในทันที (0<sub>p</sub>) ที่สัมผัส

เมื่อเปรียบเทียบเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 2 พื้นผิว พบว่า ที่ความเข้มข้นของ benzalkonium chloride 0.005% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์ม อายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B ได้ทั้งหมดที่เวลาตั้งแต่ 10 นาที ในขณะที่สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA ซึ่งมีความเรียบมากกว่าได้ทั้งหมดที่เวลาตั้งแต่ 5 นาที (แสดงในภาพที่ 4.26)

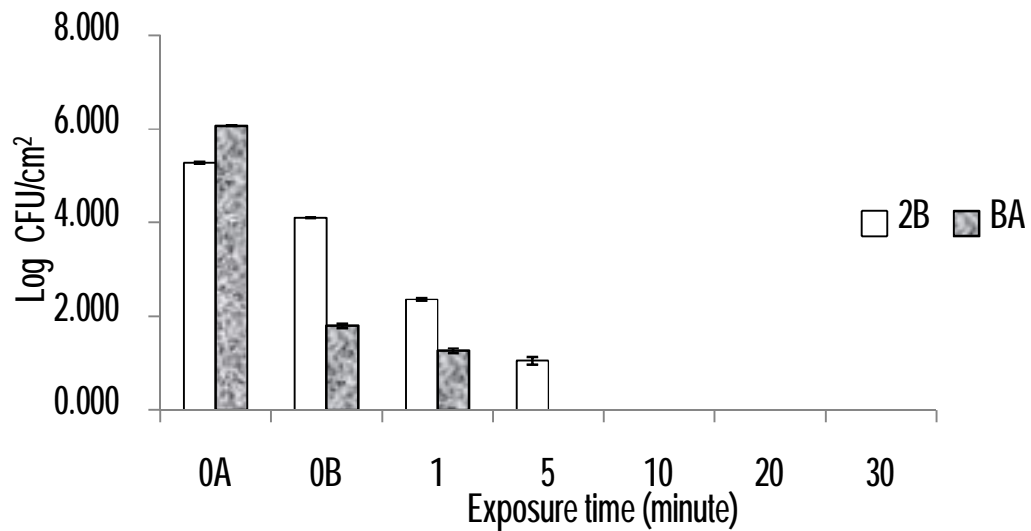


ภาพที่ 4.26 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

สำหรับไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง ผลการทดสอบ พบว่า เป็นไปในทิศทางเดียวกับไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง คือ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.005% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B ได้ทั้งหมดที่เวลาดั้งแต่ 10 นาที ในขณะที่สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA ซึ่งมีความเรียบมากกว่าได้ทั้งหมดที่เวลาดั้งแต่ 5 นาที (แสดงในภาพที่ 4.27)

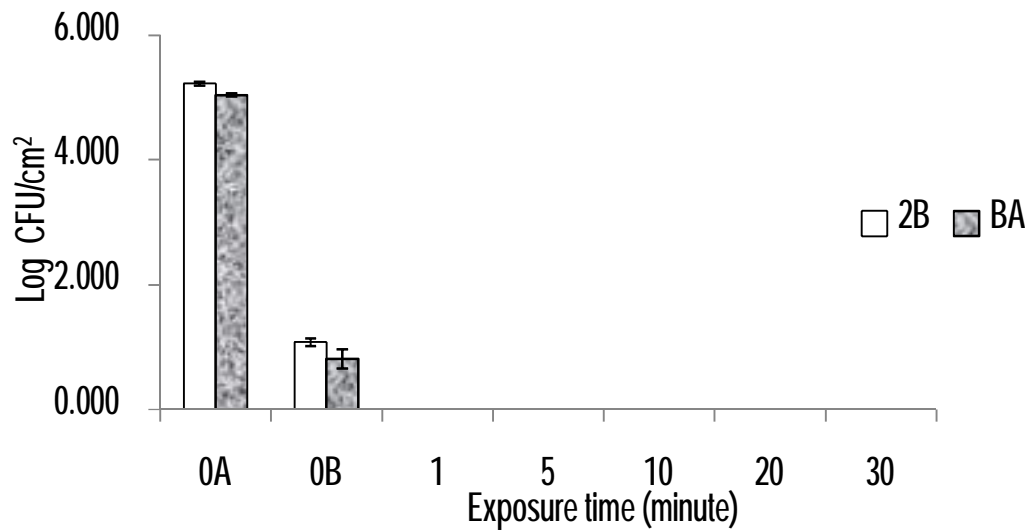


ภาพที่ 4.27 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

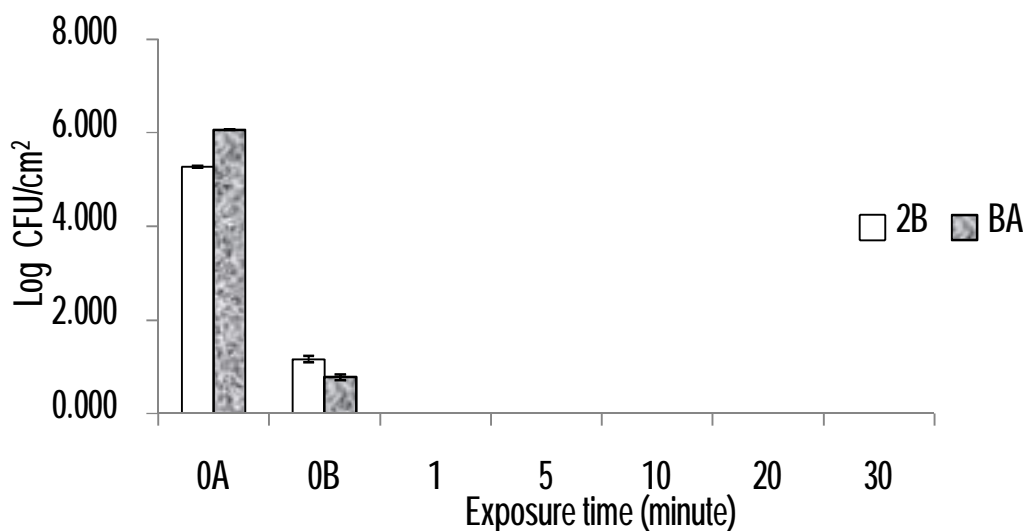
เมื่อเปรียบเทียบเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 2 พื้นผิว พบว่า ที่ความเข้มข้นของ benzalkonium chloride 0.01% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 และ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมทั้ง 2 พื้นผิว ได้ทั้งหมดที่เวลาดั้งแต่ 1 นาที (แสดงในภาพที่ 4.28 และ 4.29)



ภาพที่ 4.28 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.01%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



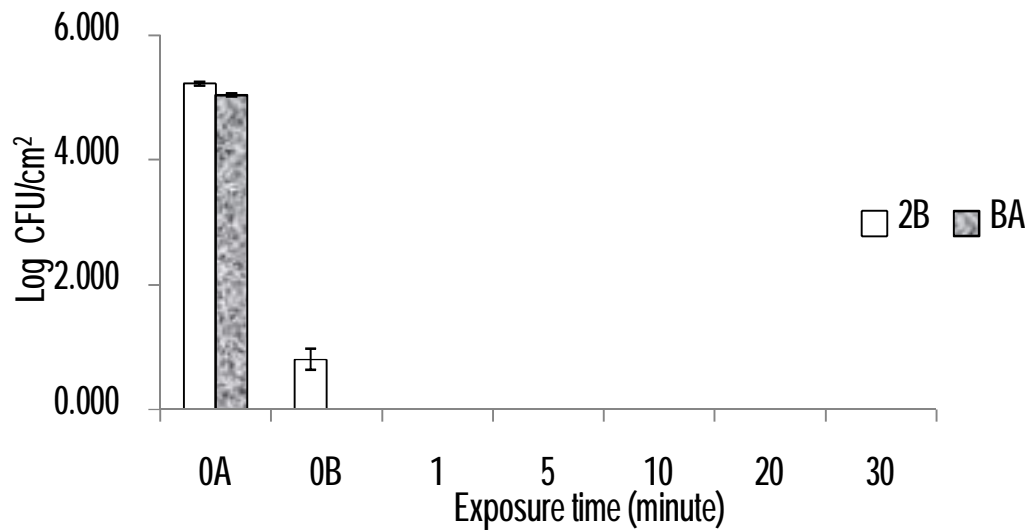
ภาพที่ 4.29 เปรียบเทียบจำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.01%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

ที่ benzalkonium chloride ความเข้มข้น 0.02% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 และ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B ได้ทั้งหมดที่เวลาตั้งแต่ 1 นาที ในขณะที่สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 และ 72 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว BA ซึ่งมีความเรียบมากกว่าได้ทั้งหมดในทันที (0<sub>B</sub>) ที่สัมผัส (แสดงในภาพที่ 4.30 และ 4.31)

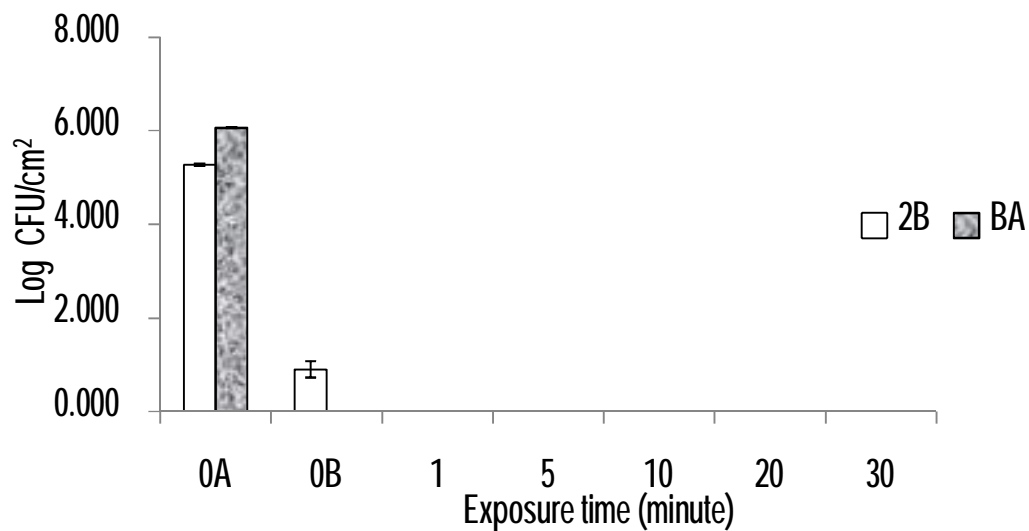




ภาพที่ 4.30 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 24 ชั่วโมง บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)



ภาพที่ 4.31 จำนวนของ *V. parahaemolyticus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง บนแผ่นพื้นผิว 2B และ BA ที่รอดชีวิตหลังสัมผัส benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02%

0<sub>A</sub> คือ เวลาที่ยังไม่ได้ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อ

0<sub>B</sub> คือ เวลาที่ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที (ประมาณ 10 วินาที)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการทำลายเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเซลล์ภายใต้ไบโอฟิล์มบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม พบว่า benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.02% สามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมด ในทันทีที่สัมผัส แต่ไม่สามารถทำลายเซลล์ภายใต้ไบโอฟิล์มได้ทั้งหมด การที่เซลล์ภายใต้ไบโอฟิล์มสามารถต้านทานสารฆ่าเชื้อได้ดีกว่าเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเพราะเซลล์ภายใต้ไบโอฟิล์มมีการสร้าง extracellular polymeric substances ทำหน้าที่ดูดซับสารฆ่าเชื้อเอาไว้ก่อน และมีช่องทางให้สารฆ่าเชื้อผ่านเข้าไปได้น้อย เป็นตัวช่วยลดอัตราการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อ หรือลักษณะทางกายภาพของไบโอฟิล์ม ซึ่งมีการรวมกลุ่มของเซลล์เป็นก้อนใหญ่ ทำให้ลักษณะทางโครงสร้างเป็นตัวกีดขวางการซึมผ่านของสารฆ่าเชื้อ และประกอบกับมีการสร้างเอนไซม์ออกมาเพื่อลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ (Kumar and Anand, 1998) โดยในปีค.ศ. 2002 มีการวิจัยรายงาน

ว่า ที่ความเข้มข้น 25 ppm สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ สามารถทำลายเซลล์ *B. cereus* ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายได้ทั้งหมด ภายในเวลา 5 นาที แต่ยังคงตรวจพบเซลล์มีชีวิตรอดภายใต้ไบโอฟิล์มได้ (Peng, Wei-Chong and Cheng, 2002) ในปีพ.ศ. 2550 มีการรวบรวมงานวิจัยซึ่งมีรายงานว่า มีหลายสาเหตุที่ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ภายใต้ไบโอฟิล์มสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น คือ **extracellular polymeric substances** ที่เซลล์สร้างปกคลุมกลุ่มเซลล์ไว้ ความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์ และการเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ ชักนำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะเครียดเนื่องจากความจำกัดของอาหารและสภาพแวดล้อม (กนกทิพย์ทรัพย์เจริญกุล, 2550) และในปีค.ศ. 2005 มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนของ *S. aureus* ภายใต้ไบโอฟิล์มอายุ 48 ชั่วโมง พบว่า มียีนที่เกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อความเครียด ส่งผลให้เซลล์ภายใต้ไบโอฟิล์มมีความสามารถในการต้านทานสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น (Resch et al., 2005) นอกจากนี้ในปีค.ศ. 2007 Takashi และคณะ ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ **benzalkonium chloride** ในการทำลาย *S. aureus* และ *E. coli* พบว่า ในสภาวะที่ไม่มีสารอาหาร **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น 0.5 mg/ml สามารถลดจำนวนเซลล์จาก 6 log CFU/dish ให้เหลือเพียง 2 log CFU/dish ได้ในเวลา 10 นาที ในขณะที่ต้องใช้ **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 mg/ml ในการลดปริมาณเซลล์ในสภาวะที่มีสารอาหารปกคลุมอยู่ (Takashi et al., 2007) ซึ่งประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์ที่เจือปนอยู่ โดยมีรายงานว่าสารฆ่าเชื้อที่มีคลอรีนเป็นส่วนประกอบจะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้ลดลง เมื่อมีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์สูง เนื่องจาก คลอรีนจะทำปฏิกิริยาคลอรีเนชัน (Chlorination) และออกซิเดชัน (Oxidation) กับหมู่อะมิโนของสารอินทรีย์ (Wei, Cook and Kirk, 1995)

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อและค่าความขรุขระ ทำให้อาจสรุปได้ว่า ความขรุขระของพื้นผิวมีผลต่อประสิทธิภาพของ **benzalkonium chloride** ในการทำลายไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* เนื่องจาก ที่ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่เท่ากัน สารฆ่าเชื้อสามารถทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีค่าความขรุขระน้อย

ได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าการทำลายเซลล์ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีค่าความขรุขระมากอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ดังนั้น เพื่อให้การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพดีที่สุด การทำลายเซลล์ที่เกิดการรวมกลุ่มบนพื้นผิว อาจจำเป็นต้องใช้วิธีการทางกายภาพเข้าช่วย เมื่อทำความสะอาดล้างสิ่งสกปรกออกแล้ว จะต้องใช้ การขัด ถู เพื่อลดการสะสมของจุลินทรีย์ควบคู่ไปกับการใช้สารฆ่าเชื้อ ทำให้การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพมากที่สุด (จิระเดช มาลา, 2551)

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

1. *V. parahaemolyticus* สามารถเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีเกรดและพื้นผิวแตกต่างกันได้ โดยในสภาวะที่ *V. parahaemolyticus* มีปริมาณมาก ( $9 \log \text{CFU/ml}$ ) จะสามารถเกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้ ตั้งแต่เวลา 0 นาที และ จะพบการเกาะติดของ *V. parahaemolyticus* บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมได้มากขึ้นเมื่อเวลานานขึ้น แต่สำหรับในสภาวะที่ *V. parahaemolyticus* มีปริมาณน้อย ( $3 \log \text{CFU/ml}$ ) ที่เวลา 0 ถึง 120 นาที ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมได้ ซึ่งอาจต้องอาศัยเวลานานขึ้นเพื่อให้เซลล์ *V. parahaemolyticus* มีการเพิ่มจำนวนถึงจะสามารถตรวจพบได้
2. *V. parahaemolyticus* สามารถเกิดไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีเกรดและพื้นผิวแตกต่างกันได้ ดังนั้น จึงควรเลือกใช้วัสดุพื้นผิวสัมผัสให้ถูกต้องและเหมาะสมกับลักษณะของงาน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนไปสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร
3. *V. parahaemolyticus* สามารถอยู่รอดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีเกรดและพื้นผิวแตกต่างกันได้ในสภาวะที่ไม่มีสารอาหารที่ใช้ในการเจริญ โดยมีจำนวนมากเพียงพอที่จะปนเปื้อนไปสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้
4. Benzalkonium chloride เป็นสารฆ่าเชื้อและสารทำความสะอาดที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* แต่ต้องใช้เวลาเวลานานมากขึ้น สำหรับการทำลาย

ไบโอฟิล์มของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งทั้งนี้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ระยะเวลาในการสัมผัสกับเชื้อ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการเกาะติด และการเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวสัมผัสที่เป็นวัสดุชนิดอื่นๆ เช่น ยาง พลาสติก ไม้ และซีเมนต์ เป็นต้น เพื่อเป็นการเลียนแบบวัสดุพื้นผิวภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร
2. ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของสารทำความสะอาด และสารฆ่าเชื้อในการทำลายไบโอฟิล์มที่เกิดจากจุลินทรีย์หลายชนิด (**mix biofilm**) เนื่องจากบนพื้นผิวสัมผัสภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งอาจต้านทานสารฆ่าเชื้อได้แตกต่างจากไบโอฟิล์มที่เกิดจากจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว (**single biofilm**)

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

กนกทิพย์ ทรัพย์เจริญกุล. 2549. ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์และน้ำอเล็กโทรไลต์ ในการทำลายฟิล์มชีวภาพของบาคิลลัส ซีเรียส สแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส และสปอร์เกาะติดของบาคิลลัส ซีเรียส บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จีระเดช มาลา. 2551. การเกิดและการควบคุมไบโอฟิล์มของ *Salmonella* บนพื้นผิวสแตนเลส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณัฐนนท์ ตราชู. 2551. จุลินทรีย์ในแผ่นชีวะ (Microbes in Biofilm) พิมพ์ครั้งที่ 1. หจก. อภิชาติ การพิมพ์.

บริษัท ไทยน็อกซ์สตีล จำกัด. 2549. ข้อมูลเหล็กกล้าไร้สนิม. เอกสารเผยแพร่.

บริษัท โปสโค-ไทยน็อกซ์ จำกัด (มหาชน). Stainless steel. [ออนไลน์]. 2555. แหล่งที่มา: [http://www.poscothainox/steelfacts\\_what\\_thai.html](http://www.poscothainox/steelfacts_what_thai.html) [19 มกราคม 2555]

พลศักดิ์ พุ่มวิเศษ. 2552. การเลือกใช้สารฆ่าเชื้อโรคที่ถูกต้องเพื่อสุขภาพลักษณะที่เหมาะสมและได้มาตรฐานสำหรับอุตสาหกรรมอาหารทะเล. เอกสารเผยแพร่.

สแตนเลสเพื่อคนไทย. กระบวนการผลิตสแตนเลส. [ออนไลน์]. 2554. แหล่งที่มา: <http://www.siamstainless.com> [9 กุมภาพันธ์ 2555]

สาธารณสุข, กระทรวง. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ข้อมูลโรคติดต่อและพาหะนำโรค.  
[ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา: [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_nih/a\\_nih\\_1\\_001c.asp?info\\_id=89](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=89) [9 ตุลาคม 2554]

ภาษาอังกฤษ

Austin, B. and Austin, D.A. 1999. Bacterial fish pathogen: disease of farmed and wild fish. 3<sup>rd</sup> ed. Springer-Praxis. Godalming.

Balows, A., Truper, H.G., Harder, W. and Schleifer, K.H. 1992. The Prokaryotes. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag New York Inc: New York.

Barker, J.W.H. and Gangarosa, E.J. 1974. Food poisoning due to *Vibrio parahaemolyticus*. Annual Review of Medicine 25 : 75-81.

Bower, C.K., McGuire, J. and Daeschel, M.A. 1996. The adhesion and detachment of bacteria and spore on food-contact surfaces: review. Trends in Food Science & Technology 7 : 152-157.

Chmielewski, R.A.N. and Frank, J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2 : 22-32.



- Colwell, R.R., Johnson, R., Wan, L., Lovelace, T.E. and Brenner, D.D. 1994. Numerical taxonomy and deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of some gram-negative fermentation bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 24 : 422-423.
- Cook, D.W. et al. 2002. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. retail shell oysters. A nation survey from June 1998 to July 1999. Journal of Food Protection 65 : 79-87.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Kolber, D.R. and Lappin-scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. Annual Review of Microbiology 49 : 711-745.
- Daniels, N.A. et al. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infection in the United States 1973-1998. The Journal of Infectious Diseases 181 : 1661-1666.
- Danwanti, R. and Wong, A.C.L. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. International Journal of Food Microbiology 26 : 147-164.
- Enos-Berlage, J.L. and McCarter, L.L. 2000. Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology 182 : 5513-5520.
- Enos-Berlage, J.L., Guvener, Z.T., Keenan, C.E. and McCarter, L.L. 2005. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. Molecular Microbiology 55 : 1160-1182.

Fazlara, A. and Ekhtelat, M. 2012. The Disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 12 : 23-29.

Food and Drug Administration (FDA). Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. [online]. 2005. Available from : <http://www.foodsafety.gov/~dms/vpra-toc.html>. [2011, December 24].

Fouz, B., Conchas, R.F., Bolinches, J., Romalde, J.L. and Toranzo, A. 1990. Relationship among pathogenic *V. anguillarum* and *V. tubiashii* with environmental vibrios. In Perkins, F.O. and Cheng, T.C. (ed.) Pathology in Marine Science, pp 77-79. San Diego : Academic Press

Garret, T.R. , Bhakoo, M. and Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science 18 : 1049-1056.

Geesey, G.G. 2001. Bacterial behavior at surfaces. Current Opinion in Microbiology 4: 296-300.

Gram, L., Bagge, R.D., Ng, Y.Y., Gyomose, P. and Vogel, B.F. 2007 Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. Food Control 18 : 1165-1171.

- Hibert, L.R., Bagge-Rave, D., Kold, J. and Gram, L. 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. International Biodeterioration & Biodegradation 52 : 175-185.
- Hong, I.T. and Koo, C.H. 2004. Antibacterial properties, corrosion resistance and mechanical properties of Cu-modified SUS 304 stainless steel. Materials Science and Engineering A 393 : 213-222.
- Ishikawa, J. and Horii, T. 2005. Effects of mupirocin at subinhibitory concentrations on biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Chemotherapy 51 : 361-362.
- Jackson, D., Suzuki, K., Oakford, L., Simeck, J.W., Hart, M.A. and Romeo, T. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global carbon regulator CsrA of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 184 : 290-301.
- James, D. 2005. The viable but non culturable state in bacteria. Journal of Microbiology 43 : 93-100.
- Jefferson, K.K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. FEMS Microbiology Letter 26 : 163-173.
- Jessen, B. and Lammert, L. 2003. Biofilm and disinfection in meat processing plants. International Biodeterioration & Biodegradation 51 : 265-269.

- Joseph, B., Ota, S.K. and Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. International Journal of Food Microbiology 64 : 367-372.
- Joseph, S.W., Colwell, R.R. and Kaper, J.B. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. Critical Reviews in Microbiology 10 : 77-124.
- Kaneko, T. and Colwell, R.R. 1975. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. Applied Microbiology 29 : 269-292.
- Kumar, G.C. and Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology 42 : 9-27.
- Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C. and Beumer, R.R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to food. International Journal of Food Microbiology 85 : 227-236.
- Lam, S., Yu, M., Sng, E.H. and Doraisingham, S. 1974. First isolations of *Vibrio parahaemolyticus* in Singapore. Singapore Medical Journal 15 :184-187.
- Lake, R., Hudson, A. and Cressey, P. 2003. Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood, prepared as part of a New Zealand Food Safety Authority contract for scientific services. Institute of Environmental Science and Research Limited.

- Landry, M.R., An, D., Hupp, T.J., Singh, K.P. and Parsek, R. 2006. Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. Molecular Microbiology 59 : 142-151.
- Lasa, I. 2006. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. International Microbiology 9 : 21-28.
- Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W. and Caldwell, D.E. 1991. Optical sectioning of microbial biofilm. Journal of Bacteriology 173 : 6558-6567.
- Lee, J.V. 1990. *Vibrio, Aeromonas and Plesiomonas*. In Paker, M.T. and Duerden, B.I. (ed.) Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 2 : 514-527. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia. B.C. Decker
- Makino, K. et al. 2003. Genome sequence of *V. parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholera*. The Lancet 361 : 743-749.
- Marriott, N.G. 1994. Principles of Food Sanitation. 3<sup>rd</sup> ed. An Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Marriott, N.G. and Gravani, R.B. 2006. Principles of Food Sanitation. 5<sup>th</sup> ed. Springer Science Business Media, Inc.
- Maugeri, T.L., Caccamo, D. and Gugliandolo, C. 2000. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. Journal of Applied Microbiology 89 : 261-266.

- Mizunoe, Y., Wai, S.N., Ishikawa, T., Takeda, A. and Yoshida, S. 2000. Resuscitation of viable but nonculturable ceels of *V. parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. FEMS Microbiology Letters 186 : 115-120.
- Mufu, A.A., Roy, D., Goulet, J. and Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact time. Journal of Food Protection 53 : 742-746
- Mustapha, A. and Liewen, M.B. 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. Journal of Food Protection 52 : 306-311.
- Oliver, J.D., Waener, R.A. and Cleland, D.R. 1983. Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. Applied and Environmental Microbiology 45 : 985-998.
- Oliveira, K., Olivera, T., Teixeira, P., Azerdo, J. and Olivera, R. 2007. Adhesion of *Salmonella enteridis* to stainless steel surfaces. Brazilian Journal of Microbiology 38 : 318-323.
- Omidbakhsh, N. and Sattar, S.A. 2006. Broad-spectrum microbicidal activity, toxicologic assessment, and materials compatibility of a new generation of accelerated hydrogen peroxide-based environmental surface disinfectant. American Journal of Infection Control Major Articles 34 : 251-257.

- O' Toole, G.A. and Kolter, R. 1998b. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signal pathway. A genetic analysis. Molecular Microbiology 28 : 449-461.
- O' Toole, G.A. and Kolter, R. 1998a. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Molecular Microbiology 30 : 295-304.
- Oulahal, N., Brice, W., Martial, A. and Degraeve, P. 2008. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. Food Control 19 : 178-185.
- Pace, J.L., Rossi, H.A. and Jiang, X. 1997. Effect of bile on *V. parahaemolyticus*. Applied and Environmental Microbiology 63 : 2372-2377.
- Peng, J.S., Wei-Chong, T. and Cheng, C.C. 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. International Journal of Food Microbiology 77 : 11-88.
- Poda, G. 1997. *Vibrio*. In Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari Dossier del Centro di documentazione per la salute della Regione Emilia-Romagna.
- Poulsen, L.V. 1999. Microbial biofilm in food processing: review article. LWT 32 : 321-326.

- Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C. and Gotz, F. 2005. Differential Gene Expression Profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic condition. Applied and Environmental Microbiology 71 : 2663-2676.
- Rivas, L., Dykes, G.A. and Fegan, N. 2007. A comparative study of biofilm formation by shiga toxinogenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. Journal of Microbiological Methods 69 : 44-51.
- Rode, T.M., Langsrud, S., Holck, A. and Moretro, T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. International Journal of Food Microbiology 116 : 372-383.
- Rossoni, E.M.M. and Gaylarde, C.C. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. International Journal of Microbiology 61 : 81-85.
- Shikongo, N.M., Kachigunda, B. and Venter, S.N. 2010. Evaluation of oxidizing disinfectants to control *Vibrio* biofilms in treated seawater used for fish processing. Water SA 36 : 215-220.
- Shime-Hattori, A., Lida, T., Arita, M., Park, K.S., Kodama, T. and Honda, T. 2006. Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. FEMS Microbiology Letter 264 : 89-97.
- Shinoda, S. 1999. Protein toxins produced by pathogenic *Vibrio*. Journal of Natural Toxins 8 : 259-269.



- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Mijac, V. and Svabic-Volhovic, M. 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic condition on biofilm formation by *Salmonella* spp. Food Microbiology 20 : 339-343.
- Su, Y.C. and Liu, C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. Food Microbiology 24 : 549-558.
- Sutherland, I.W. 2001. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology 9 : 222-227.
- Surdeau, N., Bouthors, S. and Gelle, M.P. 2006. Sensitivity of bacterial biofilms and planktonic cells to a new antimicrobial agent, Oxsil<sup>®</sup> 320N. Journal of Hospital Infection 62 : 487-493.
- Takashi, K., Toshihiro, Y. and Mayumi T., K. 2007. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. LWT 41 : 988-993.
- To, S.M., Favrin, S., Romanova, N., Mansel, W. and Griffiths, W.M. 2002. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 68 : 5258-5264.
- Tolker, NT., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S. and Molin, S. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilm. Journal of Bacteriology 182 : 6482-6489.

- Trachoo, N. 2003. Biofilms and the food industry: review article. Journal Science Technology 25 : 807-815.
- United States Environmental Protection Agency. 2006. Reregistration eligibility decision for alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (ADBAC).
- Valle, J. et al. 2003. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology 48 : 1075-1087.
- Vuddhakul, V., Bhoopong, P., Hayeebilan, F. and Subhadhirasakul, S. 2007. Inhibitory activity of Thai condiment on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. Food Microbiology 24 : 413-418.
- Watnick, P.L., Lauriano, C.M., Klose, L. and Kolter. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholera* O139. Molecular Microbiology 39 : 223-235.
- Wei, C. Cook, D.L. and Kirk, R. 1995. Growth and survival of *Salmonella* Montevideo on tomatoes and disinfections with chlorinated water. Journal Food Protection 58 : 829-836.
- Wong, H.C., Chung, Y.C. and Yu, J.A. 2002. Attachment and inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface. Food Microbiology 19 : 341-350.

Wong, H.C. and Wang, P. 2004. Induction of viable but non culturable state in *V. parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. Journal of Applied Microbiology 96 : 359-366.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย

### 1. Nutrient Agar (NA, Merck Laboratory, Germany) ผสม 3% sodium chloride

Peptone from meat	5.0	กรัม
Meat extract	3.0	กรัม
Agar-agar	12.0	กรัม
Sodium chloride	30.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ **Nutrient Agar** สำเร็จรูป 20 กรัม แล้วเติม **sodium chloride** ร้อยละ 3 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับ **pH** ให้มีค่าเท่ากับ 7 ต้ม ให้เดือด และนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 2. Nutrient Broth (NB, Merck Laboratory, Germany) ผสม 3% sodium chloride

Peptone from meat	5.0	กรัม
Meat extract	3.0	กรัม
Sodium chloride	30.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ **Nutrient Broth** สำเร็จรูป 8 กรัม แล้วเติม **sodium chloride** ร้อยละ 3 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับ **pH** ให้มีค่าเท่ากับ 7 ต้ม ให้เดือด แบ่งใส่หลอดทดลองตามปริมาตรที่ต้องการและนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3. Alkaline Peptone Water (APW, Merck Laboratory, Germany)

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่ง Alkaline Peptone Water สำเร็จรูป 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มให้เดือด ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 8.5 แบ่งใส่หลอดทดลองตามปริมาตรที่ต้องการ และนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 4. Lethen Broth (Merck Laboratory, Germany)

Peptone from meat	20.0	กรัม
Peptone from casein	5.0	กรัม
Meat extract	5.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Soy lecithin	0.7	กรัม
Sodium hydrogen sulfite	0.1	กรัม
polysorbate (Tween 80)	5.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่ง Lethen-Broth สำเร็จรูป 37.8 กรัม เติม polysorbate (Tween 80) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มให้เดือด ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.2 แบ่งใส่หลอดทดลองตามปริมาตรที่ต้องการและนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม



การเตรียมพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม

เตรียมพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 พื้นผิว 2B, 316L พื้นผิว 2B, 430 พื้นผิว 2B และเกรด 304 พื้นผิว BA ให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร (ความหนาประมาณ 0.6 มิลลิเมตร) นำมาทำความสะอาดด้วยการดัดแปลงวิธีของ Rivas, Dykes และ Fegan (2007) โดยการนำไปแช่ใน acetone เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาด้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำไปแช่ใน alkaline detergent ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง และนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

การเตรียมเซลล์ *Vibrio parahaemolyticus*

การเตรียมเซลล์ *Vibrio parahaemolyticus*

เตรียมจากเซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์ (*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 DMST 21243) ที่เก็บรักษาในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% และ glycerol 5% อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยการถ่ายเชื้อ 1 loop ลงใน Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% pH 7 ด้วย aseptic techniques บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ทำการเจือจางด้วย Alkaline Peptone Water (APW) pH 7 เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ประมาณ 0.3 จะได้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ 9 log CFU/ml และทำการเจือจางโดยวิธี serial dilution เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 3 log CFU/ml

ภาคผนวก ง

การเตรียมสารฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารฆ่าเชื้อ

สารละลาย **benzalkonium chloride (Alkyl Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride; ADBAC)**  
**80%**

เตรียมสารละลาย **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น **0.005, 0.01 และ 0.02%** โดยใช้สารละลาย **benzalkonium chloride 80%** 1 ส่วน ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ **1,250** ส่วน จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น **10%** จากนั้นปรับสัดส่วนตามความเข้มข้นที่ต้องการด้วยการเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้สารละลาย **benzalkonium chloride** ความเข้มข้น **0.005, 0.01 และ 0.02%**

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงข้อมูล

ตารางที่ ๑.1 จำนวนของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

เกรดของเหล็กกล้าไร้สนิม	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm <sup>2</sup> )
304/2B	0	2.808±0.078 <sup>d</sup>
	10	3.007±0.007 <sup>bc</sup>
	20	4.086±0.013 <sup>ab</sup>
	30	4.148±0.020 <sup>a</sup>
	60	4.181±0.008 <sup>a</sup>
	120	4.205±0.019 <sup>a</sup>
316L/2B	0	3.171±0.021 <sup>bc</sup>
	10	4.143±0.052 <sup>a</sup>
	20	4.187±0.028 <sup>a</sup>
	30	4.292±0.029 <sup>a</sup>
	60	4.356±0.030 <sup>a</sup>
	120	4.354±0.022 <sup>a</sup>
430/2B	0	2.522±0.016 <sup>d</sup>
	10	3.949±0.086 <sup>ab</sup>
	20	4.008±0.022 <sup>ab</sup>
	30	4.020±0.014 <sup>ab</sup>
	60	4.034±0.014 <sup>ab</sup>
	120	4.058±0.019 <sup>ab</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl  
อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.2 จำนวนของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิม	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm <sup>2</sup> )
2B	0	2.808±0.078 <sup>bc</sup>
	10	3.007±0.007 <sup>bc</sup>
	20	4.086±0.013 <sup>a</sup>
	30	4.148±0.020 <sup>a</sup>
	60	4.181±0.008 <sup>a</sup>
	120	4.205±0.019 <sup>a</sup>
BA	0	2.555±0.078 <sup>d</sup>
	10	4.006±0.024 <sup>ab</sup>
	20	4.039±0.004 <sup>ab</sup>
	30	4.026±0.017 <sup>ab</sup>
	60	4.028±0.028 <sup>ab</sup>
	120	4.043±0.032 <sup>ab</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม ตรวจสอบโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl  
อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )



ตารางที่ ๑.3 การเกิดไบโอฟิล์มของ *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

เกรดของเหล็กกล้าไร้สนิม	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm <sup>2</sup> )
304/2B	1	2.603±0.080 <sup>f</sup>
	8	4.548±0.098 <sup>cd</sup>
	24	5.207±0.039 <sup>c</sup>
	48	5.246±0.014 <sup>c</sup>
	72	5.255±0.032 <sup>c</sup>
316L/2B	1	3.147±0.023 <sup>de</sup>
	8	4.285±0.013 <sup>cd</sup>
	24	5.321±0.027 <sup>c</sup>
	48	6.009±0.022 <sup>a</sup>
	72	6.093±0.014 <sup>a</sup>
430/2B	1	2.565±0.076 <sup>f</sup>
	8	4.878±0.032 <sup>cd</sup>
	24	5.050±0.020 <sup>cd</sup>
	48	5.117±0.006 <sup>cd</sup>
	72	5.907±0.019 <sup>a</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหาร

เลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl

อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.4 การเกิดไบโอฟิล์มของ *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิม	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์* (log CFU/cm <sup>2</sup> )
2B	1	2.603±0.080 <sup>e</sup>
	8	4.548±0.098 <sup>cd</sup>
	24	5.207±0.039 <sup>ab</sup>
	48	5.246±0.014 <sup>ab</sup>
	72	5.255±0.032 <sup>ab</sup>
BA	1	3.714±0.021 <sup>cd</sup>
	8	4.930±0.030 <sup>bc</sup>
	24	5.042±0.027 <sup>bc</sup>
	48	5.892±0.044 <sup>a</sup>
	72	6.063±0.021 <sup>a</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl  
อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.5 การเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* ใน Nutrient Broth ที่มีแผ่นเหล็กกล้า ไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 จุ่มอยู่ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

เกรดของเหล็กกล้าไร้สนิม	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์* (log CFU/ml)
304/2B	1	4.175±0.005 <sup>f</sup>
	8	4.594±0.078 <sup>de</sup>
	24	5.334±0.022 <sup>c</sup>
	48	5.857±0.042 <sup>bc</sup>
	72	6.050±0.031 <sup>ab</sup>
316L/2B	1	4.390±0.002 <sup>de</sup>
	8	4.664±0.025 <sup>cd</sup>
	24	5.310±0.010 <sup>cd</sup>
	48	6.045±0.009 <sup>ab</sup>
	72	6.110±0.003 <sup>a</sup>
430/2B	1	4.503±0.006 <sup>de</sup>
	8	4.980±0.015 <sup>cd</sup>
	24	5.350±0.012 <sup>bc</sup>
	48	5.992±0.005 <sup>b</sup>
	72	6.075±0.045 <sup>ab</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ผสม 3% NaCl ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl  
อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.6 การเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* ใน Nutrient Broth ที่มีแผ่นเหล็กกล้า ไรสนิมพื้นผิว 2B และ BA จุ่มอยู่ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

พื้นผิวของเหล็กกล้าไรสนิม	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์* (log CFU/ml)
2B	1	4.175±0.005 <sup>e</sup>
	8	4.594±0.078 <sup>e</sup>
	24	5.334±0.022 <sup>bc</sup>
	48	5.857±0.042 <sup>ab</sup>
	72	6.050±0.031 <sup>a</sup>
BA	1	5.015±0.007 <sup>bc</sup>
	8	5.109±0.004 <sup>bc</sup>
	24	5.408±0.006 <sup>ab</sup>
	48	6.089±0.004 <sup>a</sup>
	72	6.147±0.007 <sup>a</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ผสม 3% NaCl ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl  
อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.7 จำนวนของ *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 ในสภาวะที่ไม่ให้สารอาหาร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

เกรดของเหล็กกล้าไร้สนิม	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm <sup>2</sup> )
304/2B	0	5.049±0.044 <sup>c</sup>
	24	5.225±0.006 <sup>c</sup>
	48	5.259±0.011 <sup>c</sup>
	72	5.291±0.012 <sup>c</sup>
316L/2B	0	6.012±0.011 <sup>ab</sup>
	24	6.120±0.008 <sup>ab</sup>
	48	6.148±0.008 <sup>ab</sup>
	72	6.154±0.006 <sup>ab</sup>
430/2B	0	5.907±0.094 <sup>ab</sup>
	24	6.080±0.008 <sup>ab</sup>
	48	6.128±0.017 <sup>ab</sup>
	72	6.957±0.006 <sup>a</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 ในสภาวะที่ไม่ให้สารอาหาร ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl

0 คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น หรือไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง

อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.8 จำนวนของ *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ในสถานะที่ไม่ให้สารอาหาร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

พื้นผิวของเหล็กกล้าไร้สนิม	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm <sup>2</sup> )
2B	0	5.049±0.044 <sup>b</sup>
	24	5.225±0.006 <sup>b</sup>
	48	5.259±0.011 <sup>b</sup>
	72	5.291±0.012 <sup>b</sup>
BA	0	5.911±0.091 <sup>a</sup>
	24	6.059±0.018 <sup>a</sup>
	48	6.138±0.020 <sup>a</sup>
	72	6.503±0.047 <sup>a</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ในสถานะที่ไม่ให้สารอาหาร ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl  
0 คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น หรือไบโอฟิล์มอายุ 72 ชั่วโมง  
อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.9 จำนวนของ *Vibrio parahaemolyticus* หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

ความเข้มข้น (%)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (log CFU/ml)
0.005	0 <sub>A</sub>	8.150±0.062 <sup>a</sup>
	0 <sub>B</sub>	3.091±0.015 <sup>ab</sup>
	1	<10 <sup>c</sup>
	5	<10 <sup>c</sup>
	10	<10 <sup>c</sup>
	20	<10 <sup>c</sup>
	30	<10 <sup>c</sup>
0.01	0 <sub>A</sub>	8.150±0.062 <sup>a</sup>
	0 <sub>B</sub>	1.083±0.062 <sup>bc</sup>
	1	<10 <sup>c</sup>
	5	<10 <sup>c</sup>
	10	<10 <sup>c</sup>
	20	<10 <sup>c</sup>
	30	<10 <sup>c</sup>
0.02	0 <sub>A</sub>	8.150±0.062 <sup>a</sup>
	0 <sub>B</sub>	<10 <sup>c</sup>
	1	<10 <sup>c</sup>
	5	<10 <sup>c</sup>
	10	<10 <sup>c</sup>
	20	<10 <sup>c</sup>
	30	<10 <sup>c</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ **Nutrient Broth** ผสม **3% NaCl** หลังสัมผัสสารละลาย **benzalkonium chloride** ที่ความเข้มข้น **0.005, 0.01 และ 0.02%** ตรวจโดยวิธี **spread plate** บนอาหารเลี้ยงเชื้อ **Nutrient Agar** ผสม **3% NaCl**

**0<sub>A</sub>** คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

**0<sub>B</sub>** คือ ใส่สารละลายเชื้อลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที

อักษรกำกับ (**a, b, c, ...**) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (**p≤0.05**)



ตารางที่ ๑.10 จำนวนของ *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

ความเข้มข้น (%)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm <sup>2</sup> )		
		304/2B	316L/2B	430/2B
0.005	0 <sub>A</sub>	5.223±0.032 <sup>a</sup>	5.312±0.011 <sup>a</sup>	5.055±0.017 <sup>ab</sup>
	0 <sub>B</sub>	3.758±0.039 <sup>ab</sup>	4.035±0.049 <sup>ab</sup>	1.498±0.041 <sup>bc</sup>
	1	2.099±0.061 <sup>ab</sup>	2.826±0.057 <sup>ab</sup>	1.063±0.092 <sup>bc</sup>
	5	0.837±0.097 <sup>bc</sup>	1.162±0.052 <sup>bc</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
0.01	0 <sub>A</sub>	5.223±0.032 <sup>a</sup>	5.312±0.011 <sup>a</sup>	5.055±0.017 <sup>ab</sup>
	0 <sub>B</sub>	1.076±0.058 <sup>bc</sup>	1.196±0.050 <sup>bc</sup>	0.951±0.119 <sup>bc</sup>
	1	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	5	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
0.02	0 <sub>A</sub>	5.223±0.032 <sup>a</sup>	5.312±0.011 <sup>a</sup>	5.055±0.017 <sup>ab</sup>
	0 <sub>B</sub>	0.804±0.172 <sup>bc</sup>	0.908±0.182 <sup>bc</sup>	<10 <sup>d</sup>
	1	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	5	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl

$0_A$  คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

$0_B$  คือ ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที

อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.11 จำนวนของ *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

ความเข้มข้น (%)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm <sup>2</sup> )		
		304/2B	316L/2B	430/2B
0.005	0 <sub>A</sub>	5.275±0.022 <sup>ab</sup>	6.094±0.012 <sup>a</sup>	5.913±0.025 <sup>a</sup>
	0 <sub>B</sub>	4.103±0.013 <sup>ab</sup>	4.898±0.043 <sup>ab</sup>	1.662±0.030 <sup>bc</sup>
	1	2.358±0.029 <sup>ab</sup>	3.133±0.038 <sup>ab</sup>	1.248±0.033 <sup>bc</sup>
	5	1.050±0.084 <sup>bc</sup>	1.268±0.039 <sup>bc</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
0.01	0 <sub>A</sub>	5.275±0.022 <sup>ab</sup>	6.094±0.012 <sup>a</sup>	5.913±0.025 <sup>a</sup>
	0 <sub>B</sub>	1.160±0.068 <sup>bc</sup>	1.245±0.056 <sup>bc</sup>	1.006±0.055 <sup>bc</sup>
	1	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	5	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
0.02	0 <sub>A</sub>	5.275±0.022 <sup>ab</sup>	6.094±0.012 <sup>a</sup>	5.913±0.025 <sup>a</sup>
	0 <sub>B</sub>	0.900±0.174 <sup>bc</sup>	0.843±0.051 <sup>bc</sup>	<10 <sup>d</sup>
	1	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	5	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl

$0_A$  คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

$0_B$  คือ ใส่แผ่นลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที

อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.12 จำนวนของ *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

ความเข้มข้น (%)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm <sup>2</sup> )	
		2B	BA
0.005	0 <sub>A</sub>	5.223±0.032 <sup>a</sup>	5.042±0.027 <sup>ab</sup>
	0 <sub>B</sub>	3.758±0.039 <sup>bc</sup>	1.376±0.032 <sup>bc</sup>
	1	2.099±0.061 <sup>bc</sup>	0.919±0.110 <sup>cd</sup>
	5	0.837±0.097 <sup>cd</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
0.01	0 <sub>A</sub>	5.223±0.032 <sup>a</sup>	5.042±0.027 <sup>ab</sup>
	0 <sub>B</sub>	1.076±0.058 <sup>cd</sup>	0.812±0.153 <sup>cd</sup>
	1	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	5	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
0.02	0 <sub>A</sub>	5.223±0.032 <sup>a</sup>	5.042±0.027 <sup>ab</sup>
	0 <sub>B</sub>	0.804±0.172 <sup>cd</sup>	<10 <sup>d</sup>
	1	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	5	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl

$0_A$  คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

$0_B$  คือ ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที

อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ๑.13 จำนวนของ *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ส่องไปโอบฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

ความเข้มข้น (%)	เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ (log CFU/cm <sup>2</sup> )	
		2B	BA
0.005	0 <sub>A</sub>	5.275±0.022 <sup>ab</sup>	6.067±0.008 <sup>a</sup>
	0 <sub>B</sub>	4.103±0.013 <sup>ab</sup>	1.795±0.047 <sup>ab</sup>
	1	2.358±0.029 <sup>ab</sup>	1.265±0.049 <sup>bc</sup>
	5	1.050±0.084 <sup>bc</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
0.01	0 <sub>A</sub>	5.275±0.022 <sup>ab</sup>	6.067±0.008 <sup>a</sup>
	0 <sub>B</sub>	1.160±0.068 <sup>bc</sup>	0.775±0.060 <sup>bc</sup>
	1	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	5	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
0.02	0 <sub>A</sub>	5.275±0.022 <sup>ab</sup>	6.067±0.008 <sup>a</sup>
	0 <sub>B</sub>	0.900±0.174 <sup>bc</sup>	<10 <sup>d</sup>
	1	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	5	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	10	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	20	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>
	30	<10 <sup>d</sup>	<10 <sup>d</sup>

หมายเหตุ \*จำนวนเซลล์บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% ตรวจโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ผสม 3% NaCl

$0_A$  คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

$0_B$  คือ ใส่แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมลงในสารฆ่าเชื้อแล้วเก็บตัวอย่างทันที

อักษรกำกับ (a, b, c, ...) แสดงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )



ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ๑.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	20.938 <sup>a</sup>	7	2.991	67.755	.000
Intercept	1138.109	1	1138.109	2.578E4	.000
Grade	1.864	2	.932	21.115	.000
Time	19.016	5	3.803	86.153	.000
Error	3.046	69	.044		
Total	1165.316	77			
Corrected Total	23.984	76			

a. R Squared = .873 (Adjusted R Squared = .860)

ตารางที่ ๑.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* ที่เกาะติดบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13.702 <sup>a</sup>	6	2.284	39.274	.000
Intercept	725.432	1	725.432	1.248E4	.000
Grade	.043	1	.043	.732	.397
Time	13.537	5	2.707	46.561	.000
Error	2.617	45	.058		
Total	758.235	52			
Corrected Total	16.319	51			

a. R Squared = .840 (Adjusted R Squared = .818)

ตารางที่ ๓.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* ที่เกิด  
ไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9  
log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	81.194 <sup>a</sup>	6	13.532	202.025	.000
Intercept	1529.408	1	1529.408	2.283E4	.000
Grade	1.684	2	.842	12.571	.000
Time	79.594	4	19.898	297.065	.000
Error	4.153	62	.067		
Total	1592.525	69			
Corrected Total	85.347	68			

a. R Squared = .951 (Adjusted R Squared = .947)

ตารางที่ ๓.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* ที่เกิด  
ไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log  
CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	40.920 <sup>a</sup>	5	8.184	141.692	.000
Intercept	1036.565	1	1036.565	1.795E4	.000
Grade	3.166	1	3.166	54.816	.000
Time	36.810	4	9.202	159.323	.000
Error	2.253	39	.058		
Total	1082.691	45			
Corrected Total	43.173	44			

a. R Squared = .948 (Adjusted R Squared = .941)

ตารางที่ ๕.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* ใน Nutrient Broth ที่มีแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 จุ่มอยู่ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	28.485 <sup>a</sup>	6	4.747	672.873	.000
Intercept	1791.381	1	1791.381	2.539E5	.000
Grade	.305	2	.152	21.585	.000
Time	28.342	4	7.085	1.004E3	.000
Error	.402	57	.007		
Total	1852.209	64			
Corrected Total	28.887	63			

a. R Squared = .986 (Adjusted R Squared = .985)

ตารางที่ ๕.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* ใน Nutrient Broth ที่มีแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA จุ่มอยู่ เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15.954 <sup>a</sup>	5	3.191	122.635	.000
Intercept	1264.970	1	1264.970	4.862E4	.000
Grade	1.223	1	1.223	47.006	.000
Time	14.887	4	3.722	143.042	.000
Error	.989	38	.026		
Total	1319.409	44			
Corrected Total	16.942	43			

a. R Squared = .942 (Adjusted R Squared = .934)

ตารางที่ ๗.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 ในสภาวะที่ไม่ให้สารอาหาร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	17.620 <sup>a</sup>	5	3.524	13.450	.000
Intercept	1805.369	1	1805.369	6.891E3	.000
Grade	14.635	2	7.317	27.930	.000
Time	3.595	3	1.198	4.573	.007
Error	12.052	46	.262		
Total	1842.601	52			
Corrected Total	29.671	51			

a. R Squared = .594 (Adjusted R Squared = .550)

ตารางที่ ๗.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA ในสภาวะที่ไม่ให้สารอาหาร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8.428 <sup>a</sup>	4	2.107	252.188	.000
Intercept	1123.861	1	1123.861	1.345E5	.000
Grade	7.805	1	7.805	934.236	.000
Time	.699	3	.233	27.902	.000
Error	.251	30	.008		
Total	1133.187	35			
Corrected Total	8.679	34			

a. R Squared = .971 (Adjusted R Squared = .967)

ตารางที่ ๑.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	691.575 <sup>a</sup>	8	86.447	382.272	.000
Intercept	188.325	1	188.325	832.782	.000
Conc	3.617	2	1.809	7.998	.001
Time	687.958	6	114.660	507.031	.000
Error	21.031	93	.226		
Total	850.649	102			
Corrected Total	712.606	101			

a. R Squared = .970 (Adjusted R Squared = .968)

ตารางที่ ๑.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml ส่องไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1014.519 <sup>a</sup>	10	101.452	339.439	.000
Intercept	370.075	1	370.075	1.238E3	.000
Conc	32.777	2	16.389	54.833	.000
Time	973.307	6	162.218	542.751	.000
Grade	7.178	2	3.589	12.008	.000
Error	89.963	301	.299		
Total	1473.741	312			
Corrected Total	1104.482	311			

a. R Squared = .919 (Adjusted R Squared = .916)

ตารางที่ ๑.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304, 316L และ 430 หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1240.169 <sup>a</sup>	10	124.017	304.661	.000
Intercept	459.654	1	459.654	1.129E3	.000
Conc	43.870	2	21.935	53.885	.000
Time	1190.048	6	198.341	487.247	.000
Grade	6.906	2	3.453	8.482	.000
Error	122.934	302	.407		
Total	1819.121	313			
Corrected Total	1363.103	312			

a. R Squared = .910 (Adjusted R Squared = .907)



ตารางที่ ๑.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	653.312 <sup>a</sup>	9	72.590	327.721	.000
Intercept	208.791	1	208.791	942.625	.000
Grade	3.852	1	3.852	17.390	.000
Conc	12.500	2	6.250	28.217	.000
Time	635.367	6	105.895	478.079	.000
Error	43.636	197	.222		
Total	907.570	207			
Corrected Total	696.948	206			

a. R Squared = .937 (Adjusted R Squared = .935)

ตารางที่ ๑.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน *Vibrio parahaemolyticus* บนแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมพื้นผิว 2B และ BA หลังสัมผัสสารละลาย benzalkonium chloride ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.02% เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml สร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: LogCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	720.579 <sup>a</sup>	9	80.064	240.539	.000
Intercept	257.458	1	257.458	773.489	.000
Conc	19.837	2	9.918	29.798	.000
Time	695.242	6	115.874	348.122	.000
Grade	1.793	1	1.793	5.387	.021
Error	65.239	196	.333		
Total	1014.897	206			
Corrected Total	785.818	205			

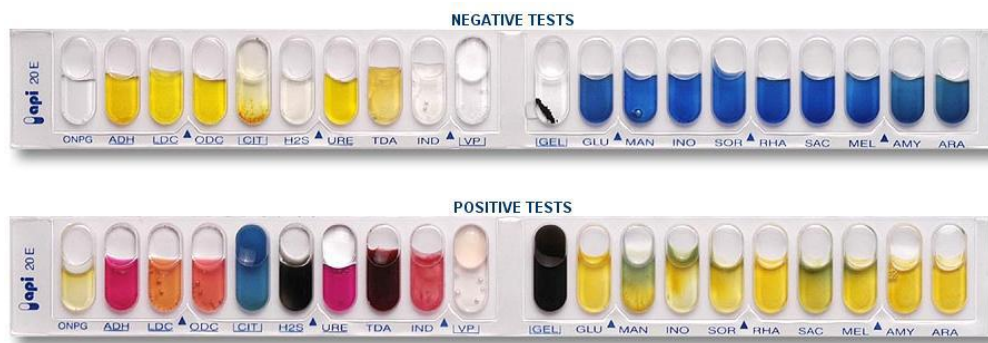
a. R Squared = .917 (Adjusted R Squared = .913)

ภาคผนวก ซ

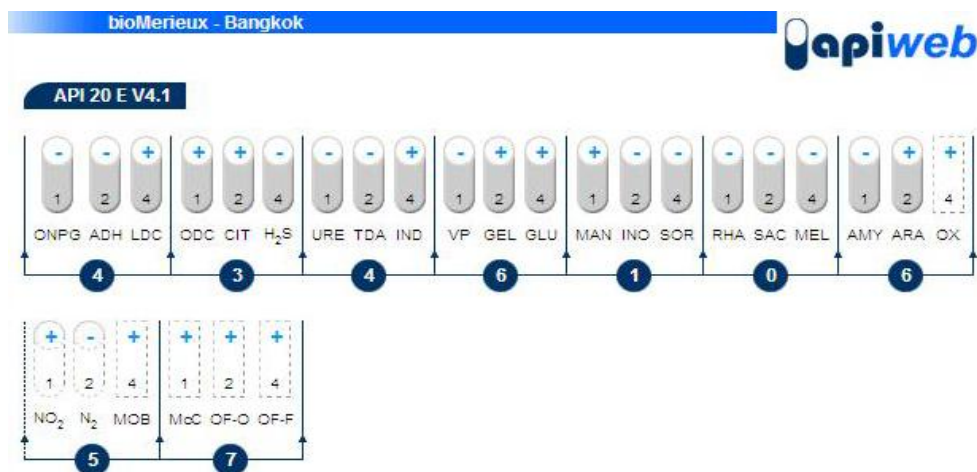
การทดสอบเพื่อยืนยัน *Vibrio parahaemolyticus*

## การทดสอบเพื่อยืนยัน *Vibrio parahaemolyticus*

ทำการทดสอบเพื่อยืนยัน *V. parahaemolyticus* โดยเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์ (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802 DMST 21243) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีส่วนผสมของ NaCl 3% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการย้อมสี (Gram's stain) และนำไปตรวจรูปร่างและการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อเป็นการทดสอบเบื้องต้น จากนั้นทดสอบ oxidase ด้วย 1% tetramethyl-p-phenylenediamine และยืนยันผลทางชีวเคมีโดยนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ API 20 E (Biochemical test kit)



(A)



(B)

REFERENCE                      DATE  
 ATCC 17802 DMST 21243      12/4/7  
 COMMENT

EXCELLENT IDENTIFICATION			
Strip	API 20 E V4.1		
Profile	4 3 4 6 1 0 6 5 7		
Note			
Significant taxa	% ID	T	Tests against
Vibrio parahaemolyticus	99.9	1.0	
Next taxon	% ID	T	Tests against
Vibrio alginolyticus	0.1	0.33	SAC 100% ARA 1%

(C)

- (A),(B) ตารางอ่านผลการทดสอบโดยวิธีเทียบสี หรือ Bio code  
 (C) การแปลผลการทดสอบใช้ Software APILAB Plus

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ณัฐนิษฐ์ ศรีมังกรแก้ว เกิดวันจันทร์ที่ 6 สิงหาคม พ.ศ. 2527 เข้ารับการศึกษา ระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ บดินทรเดชา กรุงเทพมหานคร ศึกษาต่อในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร สำเร็จการศึกษาและเข้ารับพระราชทานปริญญาบัตรในปีการศึกษา 2548 และเข้าทำงานที่สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็นศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ) ในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ตั้งแต่ เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 จนถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2553 หลังจากนั้นสอบเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

## การเผยแพร่ผลงาน

ณัฐนิษฐ์ ศรีมังกรแก้ว, รมนิ สงวนดีกุล, สุเมธ ตันตระเธียร และชัชวาล ประกิตชัยวัฒนา. 2555.

การเกิดไบโอฟิล์มของ *Vibrio parahaemolyticus* บนพื้นผิว stainless steel. การประชุม  
หาดใหญ่วิชาการ ครั้งที่ 3. 10 พฤษภาคม 2555. มหาวิทยาลัยหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา.