รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี UV/Ozone ในการกำจัดเชื้อ E. Coli/Coliforms ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารและสินค้าระหว่างผลิตเพื่อลดน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตอาหารและนำวัตถุดิบระหว่างผลิตกลับมาใช้ใหม่

(Application of UV/Ozone technology to reduce *E. coli*/Coliforms contamination in food processing and intermediate products in minimizing wastewater and promoting more raw material recycling in the process)

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802119

สัญญาเลขที่ 114/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี UV/Ozone ในการกำจัดเชื้อ E. Coli/Coliforms ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารและสินค้าระหว่างผลิตเพื่อลดน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตอาหารและนำวัตถุดิบระหว่างผลิตกลับมาใช้ใหม่

(Application of UV/Ozone technology to reduce *E. coli*/Coliforms contamination in food processing and intermediate products in minimizing wastewater and promoting more raw material recycling in the process)

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

ธันวาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 114/2560

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี UV/Ozone ในการกำจัดเชื้อ *E. Coli*/Coliforms ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารและสินค้าระหว่างผลิตเพื่อลดน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตอาหารและนำวัตถุดิบระหว่างผลิตกลับมาใช้ใหม่ (ภาษาอังกฤษ) Application of UV/Ozone technology to reduce *E. coli*/Coliforms contamination in food processing and intermediate products in minimizing wastewater and promoting more raw material recycling in the process รหัสโครงการ 2560A10802119 สัญญาเลขที่ 114/2560 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 1,125,000 บาท (หนึ่งล้านหนึ่งแสนสองหมื่นห้าพันบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2559 – วันที่ 30 กันยายน 2560) โดยงานวิจัยเป็นการศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของการใช้โอโซน (O_3) ยูวี-ซี (UV-C) และโอโซนร่วมกับยูวี-ซี (O_3 - UV) ในแบบจำลองของเหลวที่มีสีคาราเมลและเกลือเป็นองค์ประกอบ โดยเบื้องต้นใช้ตัวอย่างน้ำปราศจากเชื้อที่เป็นน้ำ DI โปร่งแสงเป็นตัวอย่างควบคุม จากผลการศึกษาพบว่าการใช้โอโซนร่วมกับยูวี-ซีช่วยลดจำนวนของ *E. coli* ได้มากที่สุด UV-C มีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *E. coli* ได้ดีกว่าการใช้ O_3 เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เทคโนโลยี O_3 ร่วมกับ UV-C มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และยิ่งมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาสัมผัสระหว่าง UV-C และ O_3 กับตัวอย่างของเหลว สำหรับการกระบวนการออกซิเดชั่นขั้นสูงที่เป็นการประยุกต์นำ UV/O_3 ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อผลิตหมอกหรือละอองลอยที่ประกอบไปด้วยอนุมูลอิสระต่างๆ จากคลื่นอัลตร้าโซนิคพลังงานสูงซึ่งผลิตจากตัวแปลงสัญญาณ piezoelectric โดยการกระจายตัวของละอองให้ฤทธิ์ในการเกิดออกซิเดชั่นชั้นสูง สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* / coliform และเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญบนผิวหน้าหรือบริเวณที่ยากแก่การทำความสะอาดฆ่าเชื้อ เช่น ช่องระหว่างรอยแยกหรือรอยแตก จากผลการทดลองพบว่า การใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว และการทำงานร่วมกันกับสารละลาย O_3 และแสง UV สามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่ทำให้จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง แต่การใช้สารละลาย O_3 หรือ UV เพียงอย่างเดียวไม่มีประสิทธิภาพ การพ่นละอองด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างที่มีความเป็นพิษอันตราย เพราะอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรสามารถแตกตัวและสลายหายไปได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของการใช้โอโซน ยูวี-ซี และโอโซนร่วมกับยูวี-ซี ในแบบจำลองของเหลวที่มีสีคาราเมลและเกลือเป็นองค์ประกอบ โดยใช้เครื่องต้นแบบหมุนเวียนของเหลวที่อัตราการไหล 5 ลิตรต่อนาที ติดตั้งเครื่องกำเนิดโอโซนและควบคุมอัตราการไหลของโอโซนที่ 2 ลิตรต่อนาที และหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 4 หลอด ทั้งนี้สามารถปรับปริมาณแสงยูวีที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างของเหลวได้ที่ระดับ 1.44 และ 2.88 กิโลจูลต่อตารางเมตร ทำการจำลองการปนเปื้อนในสารละลายเกลือและสารละลายสีคาราเมลด้วย *E. coli* โดยปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายเกลือเป็น 1, 10 และ 20% (w/v) และความเข้มข้นของสารละลายสีคาราเมลที่ระดับ 0.03, 0.06 และ 0.13% (w/v) เพื่อเปลี่ยนค่าการดูดซับยูวี-ซีในช่วงความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรให้เป็น 0.25, 0.50 และ 1.00 ตามลำดับ ทั้งนี้ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวอย่างควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้ในกรณีของสารละลายสีคาราเมลและสารละลายเกลือ จากผลการศึกษาพบว่ายูวี-ซีมีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *E. coli* ได้ 7.0 log CFU/mL ในเวลา 2.5 นาที ในทางตรงกันข้ามพบว่าโอโซนสามารถลดจำนวน *E. coli* ได้ 4.7 log CFU/mL ในเวลา 30 นาที และการใช้โอโซนร่วมกับยูวี-ซีช่วยเพิ่มอัตราการลดลงของปริมาณ *E. coli* ในระยะเริ่มต้นให้เร็วขึ้น เนื่องจากประสิทธิภาพของยูวี-ซี อย่างไรก็ตาม พบว่าฟองของโอโซนเป็นอุปสรรคขัดขวางการส่งผ่านของยูวี-ซี ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัด *E. coli* ของโอโซนร่วมกับยูวี-ซีน้อยกว่าการใช้ยูวี-ซีแต่เพียงอย่างเดียว การเพิ่มปริมาณเกลือในตัวอย่างของเหลวทำให้มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เพิ่มขึ้น และส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ของยูวี-ซี โอโซน และโอโซนร่วมกับยูวี-ซี ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ด้วยยูวี-ซีนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างของเหลว เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นเกลือในตัวอย่างของเหลวมีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในตัวอย่าง จึงส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ในทางตรงกันข้าม การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือส่งผลต่อการละลายของโอโซนและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของสีคาราเมลส่งผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และยังเปลี่ยนแปลงค่าการส่งผ่านแสงของยูวี-ซี จากการใช้พื้นผิวตอบสนองในการวิเคราะห์และประเมินอิทธิพลร่วมของสีคาราเมลและเกลือ พบว่าการใช้โอโซนร่วมกับยูวี-ซีช่วยลดจำนวนของ *E. coli* ได้มากที่สุด ในขณะที่การใช้โอโซนลดจำนวน *E. coli* ได้น้อยที่สุด การใช้ยูวี-ซีลดจำนวน *E. coli* ได้ในระดับปานกลาง นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เทคโนโลยีโอโซนร่วมกับยูวี-ซีมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และยิ่งมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาสัมผัสระหว่างยูวี-ซีและโอโซนกับ

ตัวอย่างของเหลว ในการทดลองใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว และการทำงานร่วมกันกับสารละลายโอโซนและแสงยูวีสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่ทำให้จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง แต่การใช้สารละลายโอโซนหรือยูวีเพียงอย่างเดียวไม่มีประสิทธิภาพ การพ่นละอองด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวสามารถลดจำนวนของ *E. coli*/coliform ได้จากปริมาณเริ่มต้น และทำให้จำนวนเชื้อ *A. niger* ลดลงด้วย โดยได้ให้ผลดีกว่ากรณีของ *E. coli*/coliform ปฏิกิริยาโฟโตแคทาลิติกด้วยการใช้แสงยูวีไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเชื้อ *E. coli*/coliform อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับละอองไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามสามารถยับยั้งเชื้อ *A. niger* ได้ด้วยการพ่นละอองของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 10 นาที แต่เวลา 2 นาทีไม่เพียงพอในการยับยั้งเชื้อ *A. niger* งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นด้วยแสงยูวีร่วมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่มีศักย์ออกซิเดชันสูง โดยการทำงานของสารละลายโอโซนร่วมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเชื้อ *E. coli*/coliform ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น การใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโอโซนสามารถทำลายเชื้อ *E. coli*/coliform ได้ภายในเวลา 8 นาที และสามารถทำลายเชื้อ *A. niger* ได้ดีเช่นกัน เมื่อใช้ทั้งสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารละลายโอโซน และแสงยูวีร่วมกัน ยิ่งสามารถลดเวลาในการทำลายเชื้อ *E. coli*/coliform ที่ทุกความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแม้ว่าเวลาในการพ่นละลองลอยจะลดลง 4 เท่า ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก็ยังคงอยู่ โดยที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดเวลาในการพ่นละอองลงได้จาก 8 เป็น 2 นาที การประยุกต์การทำงานร่วมกันของโอโซนและยูวีในการพ่นละอองที่ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียง 1 เปอร์เซ็นต์สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียและรา ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำเพื่อลดการตกค้างของสารเคมีและลดความเป็นพิษ เพราะอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรสามารถแตกตัวและสลายหายไปได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ : *Escherichia coli*/coliform / กระบวนการแอดวานซ์ออกซิเดชัน / รังสียูวี-ซี / โอโซน / สารละลายเกลือและสารละลายสีคาราเมล / สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Abstract

The effect of combined ozonation and UV-C treatment as well as their individual effects were investigated to compare their microbial inactivation efficacies on a model liquid food containing caramel color and salt. A batch-type prototype of the O_3-UV combination treatment was constructed with a circulation flow rate of 5 L/min and equipped with an O_3 gas generator (with a constant flow rate of 2.0 L/min) and a 4 UV-C lamp pasteurizer at the wavelength of 254 nm capable of adjusting two UV-C fluencies (i.e., 1.44 and 2.88 kJ/m^2). The selected model microorganism was *Escherichia coli* DMST 4609. Salt concentration was varied at 1, 10 and 20% (w/v) and caramel color was used to adjust the absorbance of the model solution (at 0.03, 0.06 and 0.13% caramel, which are equivalent to the absorbance for 0.25, 0.50, 1.00 OD_{405nm}, respectively). DI water was used as a control sample. In the case of DI water treatment, UV-C pasteurization was the most effective treatment as evidenced from the fast *E. coli* reduction, achieving more than 7 log reduction within 2.5 min. *E. coli* inactivation by ozonation was rather steady and slow comparing to the UV treatment; only 4.7 log reduction in 30 min. The combined treatment was able to improve the slow initial microbial reduction via UV but the O_3 fine gas bubbles nevertheless hindered the UV-C light penetration ability, resulting in significantly sluggish microbial reduction than the UV-C treatment alone. Salt content in the model solution increased the level of soluble solids and affected the efficacy of the UV-C, O_3 and the combined systems. While the effectiveness of the UV-C treatment depends on the transmittance of UV-C in the model solution, the ozonation was very sensitive to the salt concentration, which highly affected the ozone solubility and microbial inactivation. The effect of caramel color addition was two-fold. White it clearly altered the UV-C light transmission in the opaque solution, the caramel dissolution also changed the total soluble solids content of the solution; the effectiveness of UV-C treatment was significantly compromised and the high soluble solids also had a negative impact on the O_3 solubility, rendering ozonation less effective. A response surface analysis was performed to evaluate the interaction of caramel color and salt. When both interferences were present, the benefits of combined ozonation and UV-C treatment became apparent. The combined treatment outperformed the individual treatment where the ozonation was the least effective and the UV-C treatment offered only mediocre microbial reduction. The combined treatment utilizing beneficial characteristics of the two technologies

would improve the *E. coli* inactivation by increasing the contact time. The individual and combined effects of these AOPs set the generated OH• level and consequently the degree of microbial destruction. Both O_3or UV-C alone were ineffective. The H_2O_2 mist resulted in some *E. coli*/coliform inactivation that was varied with concentration. *A. niger* was more susceptible to H_2O_2 mist than *E. coli*/coliform. Photocatalyzing with UV-C light did not significantly improve the *E. coli*/coliform inactivation with the H_2O_2 mist. Substantial inactivation of *A. niger* was achieved with 1% H_2O_2 concentration. Complete annihilation of *A. niger* was achieved with 10-min fumigation of H_2O_2; however, 2-min fumigation was adequate with the addition of UV-C photocatalysis. This result illustrated that UV-C activation of H_2O_2 mists (combined UV-C activation and H_2O_2 mists) generates powerful oxidation of OH•. O_3 of H_2O_2 mists most improved its efficacy for *E. coli*/coliform inactivation compared to the other treatments. Adding O_3 to the 5% H_2O_2 mists applied for 8 min was able to completely destroy *E. coli*/coliform. O_3 also enhanced the destruction of *A. niger*. When H_2O_2/ UV-C/O_3 activations were combined, the reduction of *E. coli*/coliform was accelerated at all concentrations of H_2O_2. A 4-fold reduction in the fumigation time was still effective for bacterial disinfection. At 5% H_2O_2 treatment, the fumigation time was reduced from 8 to less than 2 min. The application of combined O_3 and UV-C treatment totally disinfected both bacteria and mold with just 1% H_2O_2 mist. Hence, it is possible to use a minimal H_2O_2 concentration, making residual chemical from this combined scheme minimally toxic due to rapid disappearance of the highly unstable free radicals.

Key words: *Escherichia coli*/coliform, Advanced oxidation processes, UV radiation, Ozone, Brine solution and caramel color / Hydrogen peroxide solution

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	III
สารบัญเรื่อง	VII
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	10
3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย	32
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	44
5 สรุปผลการทดลอง	76
เอกสารอ้างอิง	80
ผลผลิต (output)	86
ประวัติคณะผู้วิจัย	87
ภาคผนวก	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณรังสี UV ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อโรคต่างๆ	18
4.1	การออกแบบการทดลองแนะนำโดย Minitab software เวอร์ชั่นที่ 16	54
4.2	ANOVA สำหรับอัตราส่วนการมีชีวิตของการยับยั้งด้วย UV ที่ความเข้มของการส่งผ่าน 2.88 kJ/m^2	55
4.3	ANOVA สำหรับอัตราส่วนการมีชีวิตของการยับยั้งด้วย O_3	56
4.4	ANOVA สำหรับอัตราส่วนการมีชีวิตของการบำบัดด้วยทำงานร่วมกันระหว่าง O_3-UV	56
4.5a	ผลของการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ปริมาณ 4 log CFU/cm^2 ของ a) *E. coli*/coliform และ b) *A. niger* ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่างๆ กันในการทำงานร่วมกับ UV และ O_3	69
4.5b	ผลของการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ปริมาณ 4 log CFU/cm^2 ของ a) *E. coli*/coliform และ b) *A. niger* ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่างๆ กันในการทำงานร่วมกับ UV และ O_3	70
4.6	สถิติของการทดลองของอัตรา *E. coli*/coliform ของทุกการทดลองที่ด้านบนของพื้นผิว	73
4.7	สถิติของการทดลองของอัตรา *E. coli*/coliform ของทุกการทดลองที่ด้านข้างของพื้นผิว	74
4.8	สถิติของการทดลองของอัตรา *A. niger* ของทุกการทดลองที่ด้านบนของพื้นผิว	75

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร	2
1.2	แสดงกลไกการเข้าทำลายแบคทีเรียของ UV โดยโครงสร้างเซลล์จะดูดซับแสง UV รังสี UV จะเข้าทำลายส่วนของกรดนิวคลีอิกภายใน cell โดยตรง จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมและเซลล์ตาย	4
1.3	แสดงการฟอร์มตัวของแก๊สโอโซน	4
1.4	แสดงกลไกการเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียของโอโซนโดยโมเลกุลของโอโซนเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารเคมีที่มีอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์แล้วเกิดการจับตัวเป็นก้อนโปรตีนแล้วทำให้เซลล์แตก	4
2.1	ลักษณะสัณฐานของ *Escherichia coli*	15
2.2	ช่วงความยาวคลื่นของรังสีอัลตร้าไวโอเลตที่มีผลต่อการทำลายเชื้อจุลินทรีย์	16
2.3	ปฏิกิริยาในการเกิดโอโซน	21
2.4	การสลายตัวของโอโซน	23
2.5	ภาพถ่าย Transmission electron microscope (TEM) แสดงระดับการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากผลของ O_3 (c) เปรียบเทียบกับสารเคมี chlorine (b), chlorine dioxide (d), UV irradiation (e), และกลุ่มควบคุม (a)	27
2.6	แผนภาพแสดงกระบวนการสร้าง O_3 ด้วยวิธี Corona Discharge	30
3.1	แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA	34
3.2	แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA	35
3.3	Schematic diagram แสดงรายละเอียดของระบบโอโซน-ยูวี ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์	36
4.1	การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ในน้ำ DI ที่ถูกบำบัดด้วย UV, O_3 และ O_3 – UV	45
4.2	ไคเนติกการลดลงของ *E. coli* โดยการใช้ UV, O_3 และการทำงานร่วมกันในสารละลายสีคาราเมล	48
4.3	กราฟการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในสารละลายน้ำเกลือที่มีการบำบัดฆ่าเชื้อด้วย UV, O_3 และ O_3- UV	51
4.4	กราฟ contour plots 2 มิติและ 3 มิติ ที่อัตราการมีชีวิตที่น้อย การใช้พื้นผิวตอบสนองถูกดำเนินการโดยการใช้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 1 ใส่ข้อมูลเป็น 15 การทดลองในการ	60

รูปที่ หน้า

ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ถูก run ภายใต้เงื่อนไขที่สร้างโดย Box–Behnken design (a) อัตราการมีชีวิตเป็นฟังก์ชั่นเกลือและค่าการดูดกลืนแสง (b) อัตราการมีชีวิตเป็นฟังก์ชั่นของเวลาและความเข้มข้นของเกลือ (c) อัตราการมีชีวิตเป็นฟังก์ชั่นของเวลาและค่าการดูดกลืนของแสง

4.5 การใช้พื้นผิวตอบสนองในการวิเคราะห์ 3D contour plot ชี้ให้ผลของ (a) ความเข้มข้นของสารละลายเกลือและค่าการดูดกลืนแสง (b) เวลาและความเข้มข้นของเกลือ (c) เวลาและค่าการดูดกลืนแสงในสารละลายที่มีการ inoculation ของเชื้อในสารละลาย 61

4.6 พื้นผิวตอบสนองในการวิเคราะห์และ contour plots บรรยายผลของการไม่ใช้อุณหภูมิ (เกลือ, ค่าการดูดกลืนแสงและเวลา) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่ inoculated อยู่ในสารละลาย 62

4.7 การยับยั้งการเจริญเติบโตของ (a) *E. coli*/coliform (b) *A. niger* (ที่ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 4 log CFU/cm^2) บนพื้นผิวของ chamber ที่ทำการทดสอบขนาด (34*34*34 cm^3) หลังจากการ fumigation ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1, 3, และ 5 % 64

4.8 การยับยั้งการเจริญเติบโตของ (a) *E. coli*/coliform (b) *A. niger* (ที่ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 4 log CFU/cm^2) บนพื้นผิวของ chamber ขนาด (34*34*34 cm^3) ที่ได้มีการ inoculation เชื้อ หลังจากการ fumigation ด้วยเงื่อนไขต่างๆ (1% H_2O_2 เพียงอย่างเดียว, 1% H_2O_2/UV, 1% H_2O_2/O_3 และ 1% H_2O_2/UV/O_3) โดยเส้น 1% H_2O_2/UV, 1% H_2O_2/O_3 และ 1% H_2O_2/UV/O_3 มีการซ้อนทับกัน 67

4.9 สมการทางเคมีของกลไกปฏิกริยาโฟโตคาทาไลติกของ H_2O_2/UV-C/O_3 72

บทที่ 1

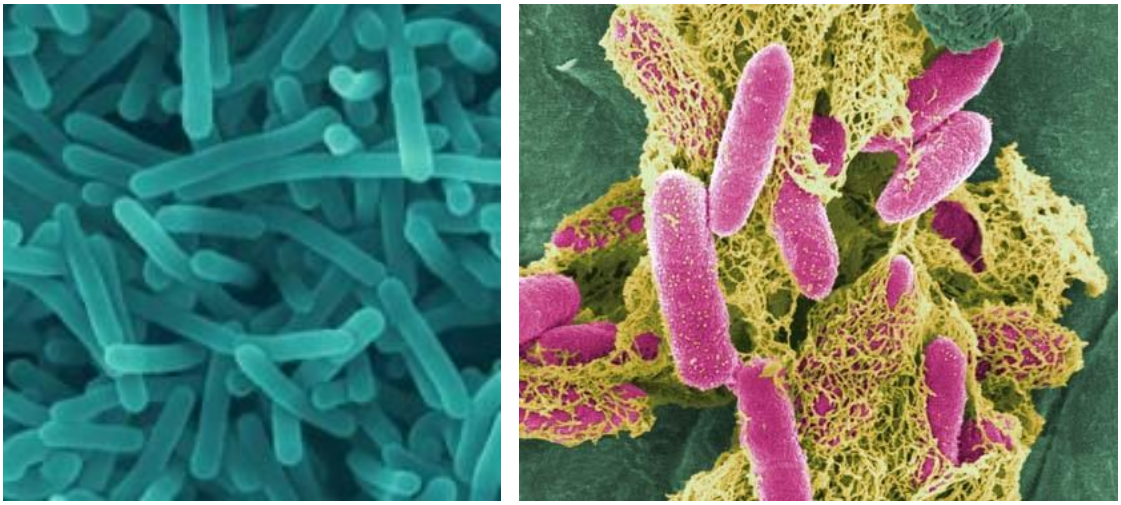
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

อุตสาหกรรมอาหารของไทย เป็นกลุ่มอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าการส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ทั่วโลก กว่า 9 แสนล้านบาทในปี พ.ศ. 2556 และคาดว่าภายในปี พ.ศ. 2557 จะมีมูลค่าการส่งออกไม่ต่ำกว่า 9.7 แสนล้านบาท ซึ่งเป็นผลจากแนวโน้มการฟื้นตัวของระบบเศรษฐกิจโลก ที่กองทุนการเงินระหว่างประเทศ (International Monetary Fund : IMF) ได้คาดการณ์ว่า ในปี พ.ศ. 2557 จะเป็นปีที่ประเทศและกลุ่มเศรษฐกิจสำคัญของโลกมีอัตราการเติบโตทางเศรษฐกิจทั่วกัน เช่น สหรัฐอเมริกา จะมีการขยายตัวทางเศรษฐกิจ ร้อยละ 2.8 ขณะที่สหภาพยุโรป (European Union : EU) ซึ่งขับเคลื่อนโดยประเทศเยอรมัน อังกฤษ ฝรั่งเศส เป็นหลัก จะมีการขยายตัวทางเศรษฐกิจโดยรวมได้มากกว่าร้อยละ 1 และในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งได้รับการกระตุ้นเศรษฐกิจด้วยนโยบายการเงินและการคลังจากรัฐบาลคาดว่าจะมีการเติบโตทางเศรษฐกิจ ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 1.7 จากแนวโน้มข้างต้นส่งผลให้การส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารจากไทยไปยังตลาดสหรัฐอเมริกา EU และญี่ปุ่น มีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในกลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารทะเล และเนื้อสัตว์ เช่น ไก่แช่แข็งและแปรรูป อาหารทะเลแช่แข็งและบรรจุกระป๋อง รวมถึง ผลไม้กระป๋องและแปรรูป ซึ่งสอดคล้องกับ CEO Food Index หรือดัชนีความเชื่อมั่นทางธุรกิจของผู้ประกอบการในกลุ่มอุตสาหกรรมอาหาร ที่จัดทำโดยสถาบันอาหาร และเปิดเผยเมื่อมิถุนายน พ.ศ. 2557 ได้แสดงดัชนีความเชื่อมั่นของผู้ประกอบการที่ระดับ 55.0 และคาดการณ์ว่าระดับความเชื่อมั่นจะอยู่ในระดับ 57.7 ในอีก 3 เดือนต่อไป ซึ่งถือเป็นเกณฑ์ที่ดี แม้สถานการณ์ทางเศรษฐกิจโลกจะมีแนวโน้มและทิศทางการฟื้นตัว จึงได้สร้างความต้องการผลิตภัณฑ์อาหารเพิ่มขึ้น และส่งผลสะท้อนเชิงบวกแก่อุตสาหกรรมอาหารกลุ่มต่างๆ ของไทย ให้สามารถเพิ่มปริมาณและมูลค่าการส่งออกได้เพิ่มขึ้น

หากแต่ผลประโยชน์ดังกล่าว จะเกิดและตกแก่ผู้ประกอบการในอุตสาหกรรมอาหารของไทยได้อย่างเต็มที่และนำพาให้อุตสาหกรรมอาหารสร้างมูลค่าการส่งออกได้ถึงระดับล้านล้านบาทในปี พ.ศ 2558 จำเป็นที่ผู้ประกอบการ และทุกภาคส่วนที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหาร จะต้องเร่งลดจุดอ่อนและอุปสรรคต่างๆ ของอุตสาหกรรมอาหารในปัจจุบัน เช่น ข้อจำกัดด้านอุปทานของวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหาร การปรับเพิ่มขึ้นของค่าแรง และภาพลักษณ์ของประเทศไทยต่อปัญหาการค้ามนุษย์หรือใช้แรงงานเด็กในอุตสาหกรรมอาหารทะเล ปัจจัยต่างๆ ข้างต้น ล้วนส่งผลต่อความสามารถด้านการแข่งขันในอุตสาหกรรม

อาหารของไทยที่ควรได้รับการปรับปรุงแก้ไขอย่างเป็นระบบจากทุกภาคส่วนที่เกี่ยวข้อง พร้อมกับการพัฒนาระบบมาตรฐานในคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล ตามโครงการครัวไทยสู่ครัวโลก ที่จะสร้างมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารนับล้านล้านบาทต่อปีแก่ประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการควบคุมคุณภาพความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับ ทั้งนี้กลุ่มตลาดต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น อเมริกา สิงคโปร์ ฮ่องกง จีน และยุโรป ประเทศเหล่านี้เป็นประเทศที่ให้ความสำคัญเรื่องความปลอดภัย สุขอนามัยและคุณภาพของสินค้าที่นำเข้าเป็นอย่างมาก ดังนั้นกฎระเบียบการนำเข้าของผลิตภัณฑ์ในประเทศดังกล่าวจึงค่อนข้างที่จะเข้มงวดโดยสินค้าส่งออกเหล่านี้ก่อนที่จะส่งถึงมือผู้บริโภค จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาเพื่อเป็นการประกันคุณภาพอาหารให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (สุวิมล, 2543) และเป็นไปตามกฎระเบียบขององค์การค้าโลกหรือ WHO (World Trade Organization) ซึ่งประเทศสมาชิกผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกที่ผลิตได้จะต้องดำเนินการให้เป็นไปตามมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ โดยอันตรายในอาหารที่โรงงานอุตสาหกรรมให้ความสำคัญเป็นอย่างมากคือ อันตรายทางชีวภาพโดยเฉพาะแบคทีเรียที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ เนื่องจากถ้ามีการปนเปื้อนจะสามารถเพิ่มจำนวนและอาจทำให้เกิดโรคระบาด



ก) ลิสทีเรีย ข) อีโคไล

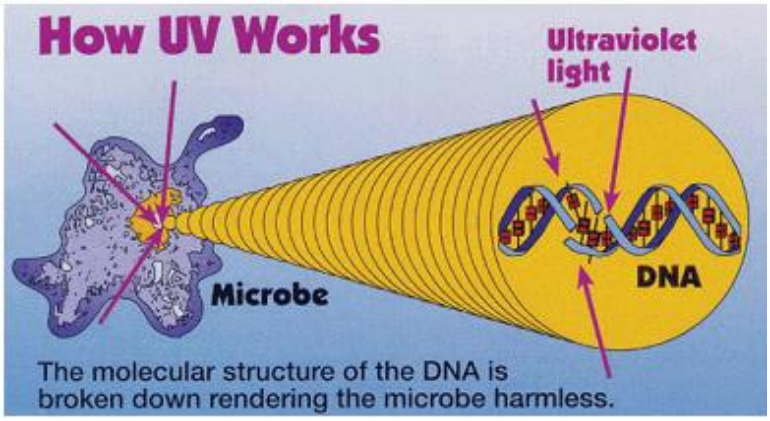
รูปที่ 1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร

เช่นที่มีข่าวเมื่อ ปี ค.ศ. 2013 CDC (Centers for Disease Control, USA) ได้เกิดการระบาดของโรค Listeriosis (รูปที่ 1.1ก) ในประเทศสหรัฐอเมริกา การระบาดครั้งนี้ทำให้มีผู้ป่วยที่ต้องเข้ารักษาในโรงพยาบาล 2,298 ราย และสุดท้ายมีผู้เสียชีวิต 499 ราย ส่งผลกระทบทางเศรษฐศาสตร์ประมาณ 2.3 พันล้านดอลลาร์สหรัฐต่อ

ปีและจากล่าสุดการที่ประเทศเยอรมันนีเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อ *E. coli* (รูปที่ 1ข) ในถั่วงอกที่ก่อสารพิษ Shiga-Toxin ทำให้ปัจจุบันมีผู้เสียชีวิต 212 คน และ อีกกว่า 2,200 คน ที่ยังคงเจ็บป่วยอยู่ จากเหตุการณ์ดังกล่าวโรงงานอุตสาหกรรมจึงต้องหาแนวทางการป้องกันโดยการควบคุมสุขลักษณะการผลิตที่ดีตั้งแต่ขั้นตอนการรับวัตถุดิบ ระหว่างกระบวนการผลิตจนได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยการนำแนวทางการประยุกต์ใช้หลักการใช้วิธีการผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practice) การใช้พลังงานด้วยเทคโนโลยีสะอาด (Green Technology) และการลดของเสียในกระบวนการผลิต (Holistic Approach to Waste Minimalization) มาบูรณาการภาพรวมในการผลิตที่มีประสิทธิภาพจะทำให้ผลิตภัณฑ์ปลอดจากการปนเปื้อน ทำให้ยอดการคืนหรือยกเลิกสินค้าจากลูกค้าเป็นศูนย์ มุ่งเน้นที่จะผลิตสินค้าที่มีคุณภาพสูงปลอดจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

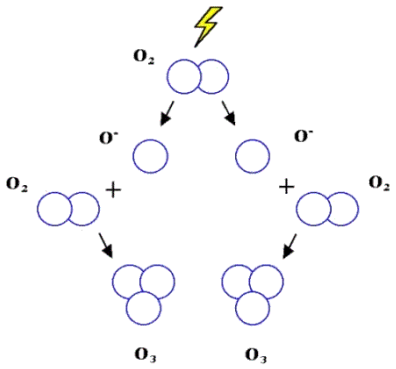
ทั้งนี้เมื่อพิจารณาขั้นตอนการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารด้วยความร้อน เพื่อทำลายเอนไซม์ต่างๆ และทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้เก็บไว้ได้นานขึ้น ส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการพาสเจอร์ไรส์ (Pasteurization) และการสเตอริไรซ์ (Sterilization) โดยการพาสเจอร์ไรส์เป็นการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิระหว่าง 60 - 80°c ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บางส่วนและยับยั้งการทำงานที่ไม่พึงประสงค์ของเอนไซม์ ส่วนการสเตอริไรซ์เป็นการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 100°c ในเวลาที่เหมาะสม อาหารที่ผ่านการสเตอริไรซ์แล้วจะสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่า 45°c (วิไล, 2547) จากวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วนั้นจะเห็นว่า ระบบที่ใช้ความร้อนเป็นตัวกลางในการฆ่าเชื้อ ซึ่งหากใช้ความร้อนในกระบวนการสูงเกินไป ความร้อนจะไปทำลายวิตามินหรือคุณค่าทางโภชนาการและนอกจากนี้ระบบดังกล่าวยังประกอบไปด้วยส่วนประกอบต่างๆ มากมาย ทั้งในส่วนการเก็บ การลำเลียงและการฆ่าเชื้ออาหาร ทั้งยังมีขั้นตอนการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อน เป็นเหตุให้สิ้นเปลืองเวลาที่ใช้ในกระบวนการฆ่าเชื้อและพลังงานที่ใช้ในการทำงานของระบบ ไม่ว่าจะเป็นพลังงานจากไฟฟ้าหรือจากน้ำมันเชื้อเพลิง รวมทั้งอุปกรณ์บางชิ้นส่วนที่ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อให้ระบบการฆ่าเชื้อมีคุณภาพและตรงตามมาตรฐานสากล ซึ่งเป็นที่แน่นอนการนำเข้าของอุปกรณ์แต่ละชนิดต้องมีราคาสูง ตลอดจนมีความยุ่งยากในเรื่องการบำรุงรักษา ในกรณีที่การทำงานของเครื่องจักรหรือชิ้นส่วนเกิดการชำรุด ดังนั้นระบบการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์โดยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสะอาดด้วยการใช้ UV/Ozone จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหาร โดยกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของ UV จะเป็นการใช้รังสียูวีชนิด C (UV - C) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 254 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่มีพลังงานสูงและมีความสามารถในการทะลุทะลวงผ่าน

ผนังเซลล์ไซโตพลาสซึม และเยื่อบุนิวเครียสของสิ่งมีชีวิต เซลล์ของสารพันธุกรรมจะดูดซับแสงยูวีไว้ และยุติกิจกรรมการสร้างเซลล์ใหม่ มีผลทำให้กิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ถูกยับยั้ง อาทิเช่น กระบวนการเมตาบอลิซึมและกระบวนการสืบพันธุ์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถทำให้อาหารเน่าเสียหรือเป็นพิษได้ (ดังแสดงในรูปที่ 2) (Demirci and Ngadi, 2012)

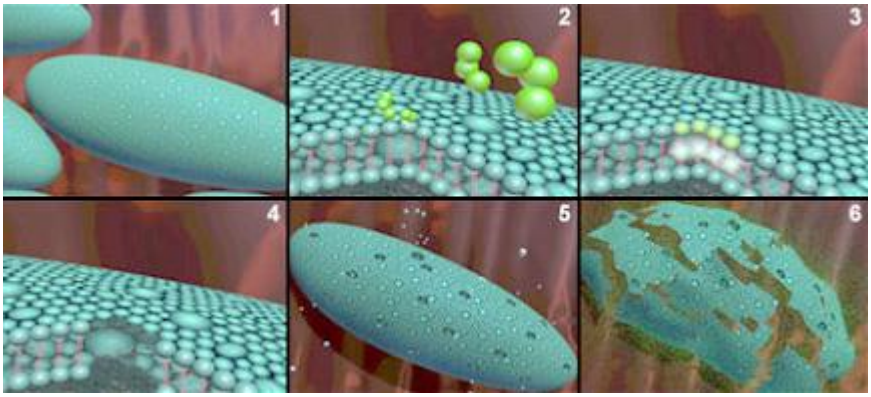


รูปที่ 1.2 แสดงกลไกการเข้าทำลายแบคทีเรียของ UV โดยโครงสร้างเซลล์จะดูดซับแสง UV รังสี UV จะเข้าทำลายส่วนของกรดนิวคลีอิกภายใน cell โดยตรง จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมและเซลล์ตาย

ในขณะที่การฆ่าเชื้อด้วยโอโซน โอโซนเป็นโมเลกุลที่ประกอบจากออกซิเจน 3 อะตอม ปรากฏอยู่ในชั้นบรรยากาศของโลก และมีการใช้งานในทางอุตสาหกรรมและเครื่องใช้ตามบ้านทั่วไป โอโซนสามารถผลิตขึ้นได้จากเครื่องผลิตโอโซน (Ozone generator) โดยการนำกระแสไฟฟ้าผ่านอากาศทำให้ก๊าซออกซิเจนเปลี่ยนรูปเป็นโอโซนได้เป็นก๊าซที่ไม่มีสี แต่มีกลิ่น โอโซนจะลอยอยู่อย่างอิสระในอากาศ โดยโมเลกุลของออกซิเจนเมื่อได้รับพลังงานสูง จะแตกออกเป็น 2 อะตอมออกซิเจนและหลังจากนั้น แต่ละอะตอมของออกซิเจนจะเข้าทำปฏิกิริยา หรือเข้าไปจับกับโมเลกุลของออกซิเจนอีกทีหนึ่ง ทำให้เกิดเป็นโมเลกุลของโอโซน ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 แสดงการฟอร์มตัวของแก๊สโอโซน



รูปที่ 1.4 แสดงกลไกการเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียของโอโซนโดยโมเลกุลของโอโซนเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารเคมีที่มีอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์แล้วเกิดการจับตัวเป็นก้อนโปรตีนแล้วทำให้เซลล์แตก **(แหล่งที่มาข้อมูล: www.ozone applications.com/using ozone to destroy bacteria-cell lysing.htm)**

โดยกลไกการทำงานของโอโซนในการยับยั้งจุลินทรีย์ (รูปที่ 1.4) อาจเกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ คือโมเลกุลของโอโซนเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารเคมีที่มีอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยอนุมูลตัวกลางอิสระเป็นตัวเข้าทำลายเซลล์เมมเบรน ไซโตพลาสซึม โปรตีนและชั้นของไขมันในเซลล์จุลินทรีย์แล้วเกิดการจับตัวเป็นก้อนโปรตีนแล้วทำให้เซลล์แตก หรือการเข้าทำลายระบบหายใจของเซลล์จุลินทรีย์ กับโมเลกุลของโอโซนสามารถเข้าทำลายเอนไซม์ DNA และ RNA ของจุลินทรีย์ได้ (Hunt and Marinas, 1997)

จากความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย UV/Ozone ดังที่ได้กล่าวมา จึงมีความเป็นไปได้ในการนำเทคโนโลยี UV/Ozone มาประยุกต์ใช้ในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*/coliforms ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารและสินค้าระหว่างผลิต นอกจากนี้แล้วภายหลังจากดำเนินกระบวนการผลิตจนได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายแล้ว ทางโรงงานจำเป็นต้องมีการทำความสะอาด line การผลิต ซึ่งปกติวิธีการโดยทั่วไปเป็นการนำคลอรีนในรูปของเกลือไฮโปคลอไรท์มาใช้อย่างแพร่หลายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อฆ่าเชื้อที่ติดมากับเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ ซึ่งคลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอำนาจการออกซิไดซ์ (Oxidizing Power) สูงมาก ทำให้สามารถหยุดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้ แต่คลอรีนมีข้อเสียที่สำคัญคือคลอรีนและผลิตภัณฑ์พลอยได้ (By product) เช่น Chloramines และ Chloroorganic compounds เป็นสารที่มีพิษต่อผู้บริโภคโดยเป็นสารก่อมะเร็ง และมีข่าวจากองค์การอนามัยโลกว่ามีการตรวจพบสารก่อมะเร็ง trihalomethane (THM) ในน้ำดื่มซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของคลอรีนอิสระ ($HOCl$, OCl^-) กับอินทรีย์สารและ

สภาวะแวดล้อม (Severine *et. al*., 1985) ดังนั้นการประยุกต์วิธีการฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพด้วยการใช้ UV/Ozone ในการ sanitize สายการผลิตอาหารจะทำให้พนักงานมีความปลอดภัยในการทำงาน สามารถลดน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตอาหารและสามารถนำวัตถุดิบระหว่างผลิตกลับมาใช้ใหม่เพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเมื่อพิจารณารูปแบบการใช้งานของ UV/Ozone นอกเหนือจากใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สามารถนำไปประยุกต์ใช้บำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้อีกด้วย จะเห็นได้ว่าการใช้ UV/Ozone มีคุณประโยชน์นานัปประการ สามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัยและมีประสิทธิภาพที่ดีในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ไม่ก่อปัญหาในเรื่องของสารเคมีตกค้าง (Borup and Adams, 1985; Sung et. al., 2014) ที่ก่อให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อม การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย UV/Ozone เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง สำหรับอุตสาหกรรมผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร แต่อย่างไรก็ตามองค์ความรู้ดังกล่าวมีค่อนข้างจำกัด ยังคงต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อนำข้อมูลมาสนับสนุนเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำมาใช้ ซึ่งจะเป็นผลดีอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมอาหารในอนาคตเพื่อการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพและความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์อาหารตลอดห่วงโซ่อุปทาน (Supply Chain) ให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล ตามโครงการครัวไทยสู่ครัวโลก

จากเหตุผลและความจำเป็นจึงเป็นที่มาของโครงการวิจัยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*/coliforms ด้วยการฆ่าเชื้อด้วย UV/Ozone เพื่อพัฒนาระบบให้ได้สภาวะการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในโรงงาน ลดการสูญเสียจากการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli*/coliforms ส่งผลให้สินค้าคงคลังมีปริมาณน้อยลง ทำให้สามารถบริหารพื้นที่ผลิตของทางโรงงานอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อรองรับกำลังการผลิตที่เพิ่มมากขึ้น โดยในงานวิจัยจะมีการออกแบบระบบและเครื่องมืออุปกรณ์ที่เหมาะสมเพื่อเป็นต้นแบบอุปกรณ์สำหรับการทดลองที่ถูกสุขลักษณะการผลิตที่ดี โดยทั้งนี้งานวิจัยดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของวิชา Special Topics in Environmental Engineering 1,2 ที่จะสามารถผลิตบุลคลากรในระดับปริญญาโทอย่างน้อย 2 คน ให้มีความรู้ความสามารถในการนำองค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยในห้องปฏิบัติการนำไปใช้ประยุกต์ใช้จริงในโรงงานนอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยมีความร่วมมือทางวิชาการกับโรงงานอุตสากรรมอาหารต่าง ๆ อาทิเช่น บริษัท ไทยเอเซียไรซ์ โปรดักส์ จำกัด โดยทางบริษัทฯมีความต้องการใช้เทคโนโลยีการลดการเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย UV/Ozone ในขั้นตอนการล้างน้ำแป้งซึ่งวิธีการดั้งเดิมของทางโรงงานเป็นการล้างด้วยน้ำปกติ ทั้งนี้น้ำทิ้งที่เกิดจากการล้างยังคงมีวัตถุดิบแป้งข้าวติดไปบางส่วน ซึ่งแป้งข้าวดังกล่าวจะเป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ ก่อให้เกิดการเน่าเสียของน้ำไม่สามารถนำวัตถุดิบระหว่างผลิตกลับมาใช้ใหม่ได้ น้ำเสียดังกล่าวเมื่อมีการปล่อยทิ้งยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเขตชุมชนรอบโรงงาน ซึ่งทางบริษัทตระหนักเห็นถึงปัญหาดังกล่าวที่จะต้องหาแนว

ทางแก้ไขอย่างเร่งด่วน นอกจากนี้ บจก. น้ำปลารุ่งโรจน์ เป็นอีกหนึ่งบริษัทที่มีความสนใจเทคโนโลยีดังกล่าว ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ภาพรวมกระบวนการผลิตน้ำปลาของทางโรงงานพบว่าทางโรงงานยังขาดต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตน้ำปลาที่มีมาตรฐานความปลอดภัยทางด้านจุลชีววิทยา ดังนั้นทางโรงงานจึงมีความสนใจจะนำนวัตกรรมเทคโนโลยีการลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วย UV/Ozone มาประยุกต์ใช้ในโรงงานเพื่อยกระดับมาตรฐานการส่งออกสู่ตลาดโลก นอกเหนือจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ทางคณะผู้วิจัยยังมีพันธมิตรเป็น บจก. โมเดอร์น ไดสต์ฟส์ ซึ่งเป็นบริษัทเกี่ยวกับการทำสีย้อมผ้า โดยทางบริษัทมีน้ำเสียที่เกิดขึ้นในระหว่าง process เช่น น้ำเสียจากการซักล้าง น้ำเสียจากขั้นตอนการย้อมสีผ้าซึ่งมีสีเข้มและไม่เป็นที่พึงปรารถนา ทั้งนี้กฎหมายควบคุมมลพิษระบุให้น้ำที่ระบายทิ้งนั้นจะต้องผ่านกระบวนการบำบัดเสียก่อน และจากปัญหาภาวะเรือนกระจกทั่วโลก (Green house effect) ที่เกิดขึ้นทั่วโลก ส่งผลทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนแหล่งน้ำสะอาด สำหรับการอุปโภคและบริโภค เพื่อให้เกิดการใช้น้ำได้อย่างคุ้มค่าทางบริษัทเห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำเสียดังกล่าวมาผ่านกระบวนการบำบัดด้วยเทคโนโลยีที่เหมาะสมก่อนหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าแนวทางการวิจัยดังกล่าวจะสามารถแก้และตอบโจทย์ให้กับอุตสาหกรรมในทุกๆด้าน และที่สำคัญที่สุด คือการประยุกต์ใช้วิธีการนี้จะเป็นการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีปริมาณสูงเกินมาตรฐานเชิงป้องกัน (Preventive measures) แทนการแก้ไขปัญหา (Corrective approach) ที่ปลายเหตุดังพบเห็นได้ในสื่อทั่วไปเมื่อเกิดการแพร่ระบาดที่บานปลายแล้ว และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งระหว่างกระบวนการผลิตให้สามารถนำวัตถุดิบระหว่างผลิตกลับมาใช้ใหม่เพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นการลดต้นทุนของทางโรงงาน เทคโนโลยีใหม่นี้จะเป็นอีกตัวอย่างหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงที่มีผลกระทบต่อเทคโนโลยีการผลิตและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต้นทุนการผลิต เสริมสร้างศักยภาพให้กับอุตสาหกรรมในประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้ UV, Ozone และ การใช้ UV ร่วมกับ Ozone ในการลดการปนเปื้อน *E. coli*/coliforms ในสารละลายต่างๆ เช่น น้ำเกลือ น้ำแป้ง น้ำที่มีการปนเปื้อนสี เป็นต้น

1.2.2 เพื่อออกแบบระบบการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli*/coliforms ด้วย UV/Ozone ที่มีประสิทธิภาพสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

1.2.3 เพื่อศึกษากลไกการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli*/coliforms ด้วย UV/Ozone ในสารละลายที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.2.4 นำผลงานวิจัยที่ได้มาเป็นแหล่งอ้างอิงเพื่อประยุกต์ใช้จริงในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อการส่งออกผลิตภัณฑ์ทั้งในและส่งออกต่างประเทศ

1.2.5 ได้นวัตกรรมเทคโนโลยีใหม่ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ความร้อน ที่สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้เทียบเท่ากับวิธีการใช้ความร้อน เพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทย

ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาผลของการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*/coliforms ด้วยการใช้ UV, Ozone และ UV ร่วมกับ Ozone ในสารละลายน้ำสี, น้ำเกลือ และสารละลายน้ำสีผสมเกลือที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.3.2 ประยุกต์นำเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (microplate reader) เพื่อใช้วัดค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ เพื่อควบคุมคุณลักษณะเริ่มต้นให้ใกล้เคียงกัน เพิ่มความแม่นยำและถูกต้องในการดำเนินงาน

1.3.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อ เช่น ความเข้มข้นของสารละลาย ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อด้วย UV, Ozone หรือ UV ร่วมกับ Ozone เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการลดการปนเปื้อน

1.3.4 ปรับระดับของปัจจัยที่มีผลต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*/coliforms ในการฆ่าเชื้อด้วย UV/Ozone ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม

1.3.5 อัตราการผลิตโอโซนโดยเครื่องกำเนิดโอโซนที่ใช้ในการทดลองเป็น 2 ลิตร/นาที

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ข้อมูลในงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการลดการปนเปื้อนของ *E. coli*/coliforms ด้วยการใช้ UV/Ozone ในการฆ่าเชื้อ

1.4.2 ได้กรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่าได้กับการใช้ความร้อน

1.4.3 ลดการนำเข้าอุปกรณ์ที่มีราคาแพง ในกรณีที่การทำงานของเครื่องจักรหรือชิ้นส่วนบางชิ้นเกิดการชำรุด

1.4.4 ผลงานวิชาการตีพิมพ์จากการพัฒนาระบบการลดการปนเปื้อน *E. coli*/coliforms โดยการใช้ UV/Ozone ในการฆ่าเชื้อ

1.4.5 มูลค่าเชิงเศรษฐศาสตร์จากการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสู่ตลาดโลก

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

2.1 อันตรายของความปลอดภัยในอาหาร (Food Safety Hazard)

2.2 จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์อาหาร

2.3 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์

2.4 การตรวจหาแบคทีเรีย *E. coli*/ coliforms

2.5 แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet Light)

2.6 โอโซน (O_3)

2.7 ข้อดีของการทำงานร่วมกันระหว่างยูวีและโอโซน

2.1 อันตรายของความปลอดภัยในอาหาร (Food Safety Hazard) (บุศกร, 2545)

คำว่า “อันตราย” หรือ “Hazard” หมายถึง สิ่งที่มีคุณลักษณะทางชีวภาพ เคมี หรือ ฟิสิกส์ที่มีอยู่ในอาหาร หรือสภาวะของอาการที่มีศักยภาพในการก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพ อันตรายที่มีผลต่อความปลอดภัยของอาหารแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

2.1.1 อันตรายชีวภาพ (Biological Hazard)

อันตรายชีวภาพหมายถึง อันตรายที่เกิดจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ไวรัส พยาธิ และอื่น ๆ ในอาหาร ปัญหาอันเนื่องจากอันตรายชีวภาพในอาหารที่บริโภคกัน ส่วนใหญ่มักเกิดจากจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เกิดโรค หรือเกิดอาหารเป็นพิษ จึงแบ่งลักษณะการเกิดปัญหาอันเนื่องจากจุลินทรีย์ในอาหารนี้ได้เป็น 2 ลักษณะ คือ

- Infection เกิดจากการบริโภคจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค จุลินทรีย์ เช่น *Salmonella* , *Shigella* เมื่อบริโภคเข้าไปจะแทรกตัวเข้าไปในผนังลำไส้ แล้วจะแบ่งตัวเจริญเติบโต ณ บริเวณนั้น ส่วนไวรัส Hepatitis และ Parasite Trichinella spiralis เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะผ่านลำไส้เข้าไปเจริญเติบโตอยู่ในเนื้อเยื่ออื่น เมื่อ จุลินทรีย์เหล่านี้เข้าไปในร่างกาย ร่างกายก็จะมีปฏิกิริยาเกิดเป็นอาการต่าง ๆ อีกลักษณะหนึ่งของการเกิด infection คือ จุลินทรีย์ เช่น *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae* เมื่อเข้าสู่ลำไส้จะเจริญเติบโตและสร้างสารพิษ enterotoxins ทำให้เกิดเป็นพิษต่อร่างกาย

- Intoxication เกิดจากการบริโภคสารพิษ (toxin) ที่จุลินทรีย์สร้างไว้ในอาหาร เช่น botulinum toxin, Staph. toxin, mycotoxin เป็นต้น หรือสารพิษที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ ซึ่งพบในพืชและสัตว์บางชนิด เช่น สารพิษในเห็ดบางชนิด, สารพิษจากหอยและปลาทะเลบางชนิด เป็นต้น ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าการเกิดอาหารเป็นพิษมักมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย

ต้นเหตุ	สัดส่วนของการทำให้เกิดโรค (%)	ปริมาณผู้ป่วย (%)
แบคทีเรีย	66	87
ไวรัส	5	9
ปาราสิต	5	1
สารเคมี	25	4

ในส่วนของปัญหาที่เกิดจากแบคทีเรียนั้น ส่วนใหญ่เกิดจาก *Salmonella, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens* , รองลงมาได้แก่ *Bacillus cereus, Shigella, Campylobacter* และ *Clostridium botulinum* แม้ว่าปัญหาที่เกิดจาก *Campylobacter, Escherichia coli* 0157:H7 และ *Listeria monocytogenes* จะเกิดขึ้นในระยะหลัง ๆ ก็ตาม แต่ก็พบว่าปัญหาจาก *Campylobacter* จะเกิดขึ้นปีละประมาณ 6% ของปัญหาโรคจากอาหาร ส่วนของปัญหาจากเชื้อไวรัสส่วนใหญ่เกิดจาก Hepatitis A และ Norwalk virus ส่วนของ parasites ปัญหามักเกิดจาก Trichinella spiralis และ Giardia lamblia

2.1.2 อันตรายเคมี (Chemical Hazard)

อันตรายชีวภาพมักจะเกิดการแพร่กระจายของโรคไปกับอาหารอย่างรวดเร็วในหมู่คนค่อนข้างมาก แต่อันตรายเคมีนั้น จะไม่มีการแพร่กระจายมากนัก ดังนั้น ในการตรวจเช็คจึงจำเป็นต้องทำให้เพียงพอที่จะสามารถตรวจพบได้หากมีอันตรายเคมีในอาหารที่ผลิต

ในกระบวนการผลิตอาหารนั้น มีการใช้สารเคมีกันอย่างหลากหลาย ตั้งแต่การใช้ยาฆ่าแมลงในการเพาะปลูก การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ การใช้สารเคมีเพื่อช่วยในการผลิต (เช่น สี สารกันหืน ยากันบูด เป็นต้น) การใช้ทำยาทำความสะอาด และสารฆ่าเชื้อเพื่อการสุขาภิบาลในโรงงาน การใช้น้ำมันหล่อลื่นเพื่อการบำรุงรักษาเครื่องจักรต่าง ๆ เป็นต้น

สารเคมีเหล่านี้มีโอกาสที่จะก่อปัญหาการปนเปื้อนลงในอาหารที่ผลิตได้ หากไม่ได้รับการเอาใจใส่ดูแลการใช้อย่างถูกต้อง

สารเคมีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตอาหารจำแนกตามแหล่งที่มาได้เป็น 4 ประเภท ดังนี้

ใช้สารเคมีที่ใช้ทางการเกษตร เช่น ยาฆ่าแมลง ปุ๋ย ฮอร์โมน ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

สารเคมี หรือสารพิษที่เกิดโดยธรรมชาติ เช่น Aflatoxin, Staph, toxin, Botulinum toxin เป็นต้น

สารเคมีที่เติมในอาหาร เช่น กรด , preservatives, additives, sulfting agents เป็นต้น

สารเคมีที่ใช้ในโรงงานหรือในอาคารการผลิต เช่น น้ำยาทำความสะอาด , น้ำยาฆ่าเชื้อ, น้ำมันหล่อลื่น (lubricants), น้ำมันเชื้อเพลิง, ยาฆ่าแมลง/ มด เป็นต้น

ในการใช้สารเคมีนั้น ควรจะปรึกษาหารือกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรมวิชาการเกษตร กรมปศุสัตว์ หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ว่าสารเคมีนั้น ๆ ได้รับอนุญาตให้ใช้ได้หรือไม่ และหากได้รับอนุญาตก็ต้องดูว่าระดับหรือปริมาณที่อนุญาตให้ใช้เป็นเท่าไร

2.1.3 อันตรายกายภาพ (Physical Hazard)

อันตรายกายภาพ หมายถึง การปนเปื้อนของวัตถุ หรือวัสดุที่ไม่ใช่องค์ประกอบของอาหาร และเป็นสิ่งแปลกปลอมในอาหารที่เป็นโทษต่อสุขภาพของผู้บริโภค ได้แก่ เศษแก้ว หิน เศษไม้ โลหะ ตัวอย่างของอันตรายกายภาพและแหล่งของอันตราย จากสิ่งแปลกปลอมนี้จะไม่แพร่กระจายมากเท่ากับ biological และ chemical hazards สิ่งแปลกปลอมที่พบและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคนี้เกิดขึ้นจากสาเหตุ และแหล่งต่าง ๆ ต่อไปนี้

- เกิดการปนเปื้อนมาในวัตถุดิบ
- การออกแบบเครื่องมือ, เครื่องจักรไม่ดี ตลอดจนการใช้เครื่องมือ, เครื่องจักรอย่างไม่ถูกวิธี
- การบำรุงรักษาเครื่องมือ, เครื่องจักรไม่เพียงพอ
- วิธีการปฏิบัติงานของพนักงาน (การฝึกอบรมผู้ปฏิบัติงานไม่เพียงพอ)

ในการควบคุมอันตรายชนิดต่าง ๆ นั้น ต้องควบคุมตั้งแต่วัตถุดิบ องค์ประกอบต่าง ๆ วัตถุดิบจะต้องมี specifications, จดหมายรับรองคุณภาพ และทางโรงงานต้องมีวิธีการตรวจรับที่ถูกต้องในกระบวนการผลิตก็ต้องจัดการในเรื่องหลักและวิธีการผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practices) สรรหาวิธีการและเครื่องมือที่เหมาะสมในการผลิตและในการกำจัดอันตรายต่าง ๆ อาจต้องมีเครื่องมือที่ใช้ช่วยกำจัดอันตรายกายภาพจากแหล่งของอันตราย

2.2 จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์อาหาร

2.2.1 จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชอบเย็น (Psychrophiles) ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* เมื่อเจริญในอาหารเกิดสารในกระบวนการสร้างและสลาย (metabolite) กรดอะมิโนในอาหาร แล้วให้สารประกอบพวกมาโลโดรัส (Malodorus) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรสไม่ดีในอาหาร โดยปกติถ้าควบคุมอุณหภูมิในการแช่เยือกแข็งอย่างมีประสิทธิภาพแล้วเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ไม่สามารถเจริญได้ แต่ถ้าอุณหภูมิการเก็บผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน จุลินทรีย์ดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเสื่อมเสียได้

2.2.2 จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

การตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้แสดงให้เห็นว่า วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต มีคุณภาพไม่ดี หรือสุขลักษณะของแหล่งผลิตไม่ดี เชื้อในกลุ่มนี้ถ้าเจริญในผลิตภัณฑ์เป็นปริมาณมาก และผู้บริโภคใช้ความร้อนในการอุ่นไม่เพียงพอ อาจก่อให้เกิดอันตรายได้ เชื้อที่สำคัญได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Salmonellae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*

2.2.3 จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงสุขลักษณะ

โดยทั่วไปการตรวจหาจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ตามมาตรฐานสากล คือการตรวจหา Coliforms bacterial และ Escherichia coli ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีแหล่งสะสมอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น การปนเปื้อนของเชื้อกลุ่มนี้ในอาหารแสดงถึง สุขลักษณะของการผลิตที่ไม่ดี เนื่องจากเป็นเชื้อที่ไม่ทนความร้อน ดังนั้นเมื่อตรวจพบเชื้อกลุ่มนี้ในอาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนภายหลังการให้ความร้อนหรือความร้อนที่ใช้ในกระบวนการผลิตไม่เพียงพอที่ทำลายเชื้อในกลุ่มดังกล่าวได้

2.3 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์

2.3.1 แบคทีเรีย Coliform

แบคทีเรีย Coliform หมายถึงกลุ่มของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่มีรูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศ หรือ Facultative anaerobe สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสให้กรด

และแก๊สได้ภายใน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Escherichia coli* ซึ่งโดยปกติมักพบอยู่ในทางเดินอาหารสัตว์เลือดอุ่น และของคน

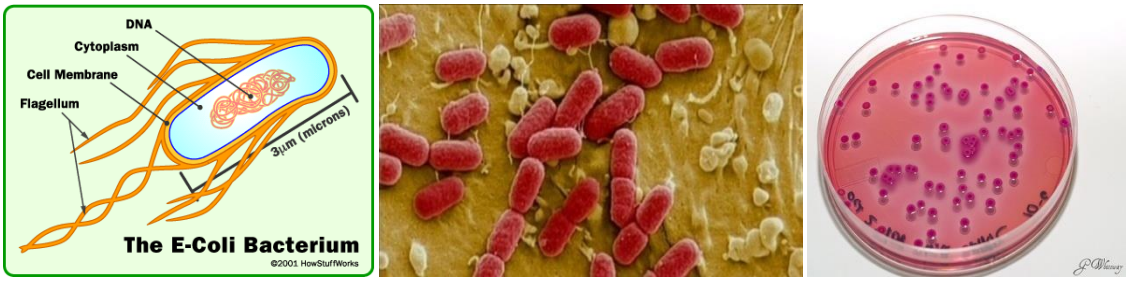
ฉะนั้นจะพบมากในอุจจาระ และ แบคทีเรียจีนัส Enterobacter ซึ่งนอกจากในอุจจาระ แล้วยังสามารถพบได้ในดิน และปนเปื้อนมากับพืชผักต่างๆ หรืออยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่มีสุขลักษณะในการผลิต ดังนั้นการตรวจพบจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จึงถือได้ว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระ อาจนำซึ่งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ แต่โดยปกติคนสามารถต้านทานจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้ดี ยกเว้นมีการกระตุ้นเชื้อปกติในทางเดินอาหารให้สามารถก่อโรคได้ เช่น พวกไวรัส ดังนั้น การผลิตอาหาร หรือ น้ำดื่ม จึงต้องมีการตรวจสอบจุลินทรีย์ ว่ามีอยู่ในปริมาณเท่าใด มีอันตรายหรือไม่ และบางประเทศจะไม่รับซื้อสินค้าหากตรวจพบ

2.3.2 แบคทีเรีย *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือ *E. coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุด ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลว หรือเป็นน้ำ แต่อาการมักไม่รุนแรง เพราะทั้งเด็กและผู้ใหญ่มักมีภูมิต้านทานอยู่บ้างแล้ว เนื่องจากได้รับเชื้อนี้เข้าไปทีละน้อยอยู่เรื่อยๆ เชื้อนี้มักปนเปื้อนมากับอาหาร น้ำ หรือมือของผู้ประกอบอาหาร ปกติเชื้อเหล่านี้อาจพบในอุจจาระได้อยู่แล้วแม้จะไม่มีอาการอะไร

2.4 การตรวจหาแบคทีเรีย *E. coli*/ coliforms

Coliform bacteria นิยมใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขาภิบาลของอาหารและน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำดื่ม เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้คือ *E. coli* มีแหล่งอาศัยในลำไส้ของคน และสัตว์เลือดอุ่น ดังนั้นการตรวจพบ *E. coli* ในอาหารและน้ำดื่มจึงแสดงว่ามีการปนเปื้อนอุจจาระซึ่งบอกถึงลักษณะสุขาภิบาลการผลิตของอาหารและน้ำนั้นไม่สะอาดพอ และมีแนวโน้มที่จะมีแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหาร เช่น *Salmonella* และ *Shigella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกัน ปนเปื้อนอยู่ในอาหารและน้ำนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้ประกอบด้วยแบคทีเรียรูปแท่งสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งสภาพ aerobe และ facultative anaerobe คุณสมบัติที่แตกต่างและนิยมใช้แยกแบคทีเรียกลุ่มนี้จากแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ คือความสามารถรีดิวซ์น้ำตาลแลคโทสให้กรดและก๊าซใน 24-48 ชม. ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และสามารถแยก *E. coli* ออกจากกลุ่ม Coliform bacteria โดยอาศัยความสามารถในการผลิตกรดและแก๊สภายใน 24 ชม. ที่ 44.5 องศาเซลเซียส และการทดสอบ IMViC เป็น ++-- หรือ -+--



รูปที่ 2.1 ลักษณะสัณฐานของ *Escherichia coli*

(Source: http://allwomenstalk.com/10-facts-about-organic-food)

ในงานวิจัยดังกล่าว ในการเลือก *E. coli* มาศึกษาวิจัย เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่รู้จักกันแพร่หลายมากที่สุดที่พบได้ในน้ำทั่วๆ ไป และเป็นแบคทีเรียที่มีความต้านทานเริ่มต้น (Initial Resistant Schoulder) ต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต อีกประการหนึ่งคือ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่ในอุจจาระของคนและสัตว์มากถึง 95% ถ้าหากตรวจพบว่าในน้ำนั้นมี *E. coli* อยู่มาก ก็แสดงว่าน้ำนั้นสกปรกถูกปนเปื้อน (contaminated) จากอุจจาระของคนและสัตว์มาแล้ว จึงไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Venosa, 1986) แต่ถ้าสามารถควบคุม *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มีในน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อโรคทางเดินอาหารได้แล้ว แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ก็จะควบคุมได้ง่ายด้วย โดยการปรับความเข้มแสง หรือเวลาสัมผัสแสง UV

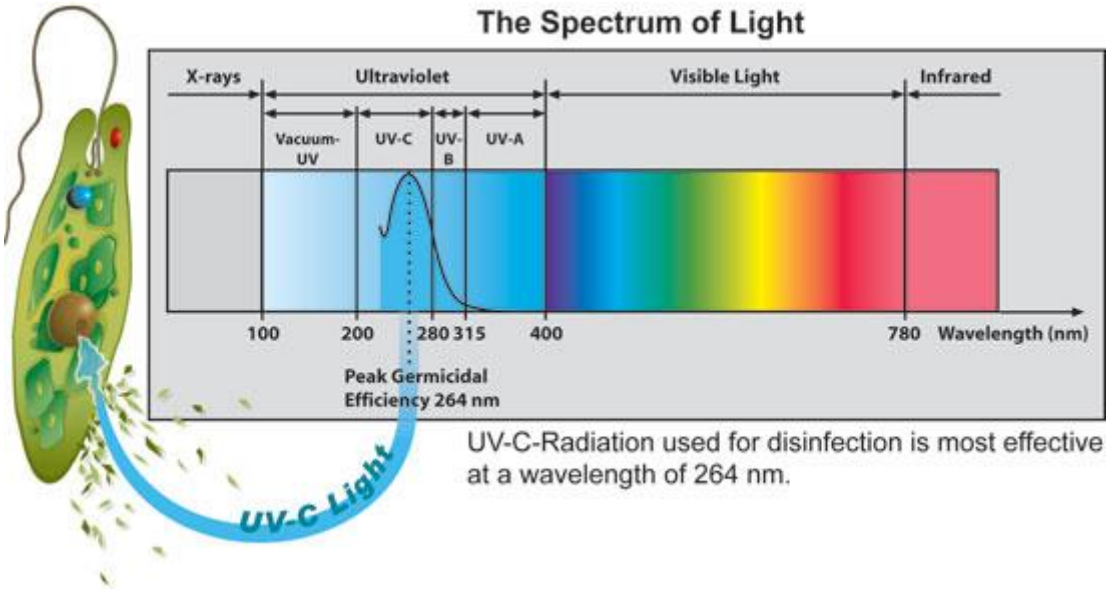
2.5 แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet Light)

แหล่งกำเนิดของรังสี UV นั้น มีทั้งจากธรรมชาติและจากสิ่งที่มนุษย์ประดิษฐ์ขึ้น แต่แหล่งกำเนิดรังสี UV ที่สำคัญ คือ ดวงอาทิตย์ และคนส่วนใหญ่จะได้รับ UV จากแสงแดด แต่เนื่องจากชั้นของบรรยากาศได้ลดลง มนุษย์และสิ่งแวดล้อมจึงได้รับรังสี UV เพิ่มมากขึ้น สำหรับสุขภาพของมนุษย์ รังสี UV มีทั้งข้อดีและข้อเสีย คือ หากได้รับรังสีในขนาดต่ำจะเป็นประโยชน์ต่อการสร้างวิตามินดี แต่ถ้าได้รับมากเกินไปเป็นเวลานานจะมีผลในการทำลายระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย รวมถึง ผิวหนัง ตา และก่อให้เกิดมะเร็ง ไบโอโมเลกุลในร่างกายซึ่งดูดซึมรังสี UV จะเกิดปฏิกิริยาขั้นปฐมภูมิ คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลเล็กน้อย หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลโดยสิ้นเชิง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วแต่มีผลต่อเนื่องในระยะยาว DNA เป็นโมเลกุลสำคัญที่ถูกทำลายได้ด้วย รังสี UVB (280 – 315 nm) และ UVC (100 – 280 nm) จากการเฝ้าสังเกตการณ์ พบว่า เมื่อเซลล์ prokaryotic และ eukaryotic ได้รับรังสี UV จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เช่น เซลล์ตาย โครโมโซมเปลี่ยนแปลง เกิดการกลายพันธุ์ และการเปลี่ยนแปลงของ

โครงสร้างเซลล์ นอกจากนี้ยัง พบว่า ยีนส์หลายตัว และไวรัสหลายชนิด ก็ถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยรังสี UV เช่นกัน (Bank et. al., 1990; Bintsis et. al., 2000)

แสงอัลตราไวโอเลตเป็นแสงสีม่วงน้ำเงินที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 nm ถึง 390 nm ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 3 ช่วง

1. ช่วงคลื่นยาว (3250 – 3900 angstrom) รังสีช่วงนี้มีอำนาจในการฆ่าเชื้อโรคต่ำและสามารถพบได้ในแสงแดด
2. ช่วงคลื่นปานกลาง (2950 – 3250 angstrom) รังสีช่วงนี้มีอำนาจฆ่าเชื้อโรคได้ถ้าเวลาสัมผัสเพียงพอ
3. ช่วงคลื่นสั้น (2000 - 2950) รังสีช่วงนี้ใช้ในการฆ่าเชื้อโรคในน้ำได้ดีที่สุด



รูปที่ 2.2 ช่วงความยาวคลื่นของรังสีอัลตร้าไวโอเลตที่มีผลต่อการทำลายเชื้อจุลินทรีย์

(แหล่งข้อมูล: http://www.radiantuv.com/uv-edu/)

โดยปกติแล้วหลอด UV จะมีความยาวตั้งแต่ 12 – 48 นิ้ว มักจะมีอายุการใช้งานไม่น้อยกว่า 7,500 ชั่วโมง

2.5.1 หลักการทำงานของการฉายรังสียูวี

รังสียูวีถูกจัดเป็นส่วนหนึ่งของสนามแม่เหล็ก ไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นในช่วง 100-400 nm โดยทั่วไป รังสียูวีสามารถแบ่งประเภทออกได้ 4 ประเภทตาม ความยาวคลื่นคือ รังสียูวีเอ (UV-A) รังสียูวีบี (UV-B) รังสียูวีซี (UV-C) และรังสียูวีสุญญากาศ (vacuum-UV) รังสียูวีเอซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 315-400 นาโนเมตร เป็นรังสีที่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของผิวหนังของคน รังสียูวีบีซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 280-315 nm เป็นรังสีที่มีผลต่อการไหม้และการเป็นมะเร็งผิวหนังของคน ในขณะที่ รังสียูวีซี ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 200-280 nm เป็นรังสีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และรังสียูวี สุญญากาศ ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่น 100-200 nm เป็นรังสีที่สามารถถูกดูดซับได้ด้วยวัตถุเกือบทุกชนิด โดย รังสียูวีสุญญากาศจำเป็นต้องเคลื่อนที่ในสภ าวะสุญญากาศเท่านั้น รังสียูวีจากแสงแดดจากดวงอาทิตย์ เป็นรังสีที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 300 นาโนเมตร เนื่องจากความสามารถในการดูดซับของชั้นโอโซนที่ สามารถดูดซับรังสียูวีที่มีความยาวคลื่นต่ำ

2.5.2 กลไกการสร้างรังสียูวี (UV light generation) และ แหล่งกำเนิดรังสียูวี

อะตอมและอิออนสามารถปลดปล่อยโฟตอน (photon) จากแสงเมื่ออิเล็กตรอนเปลี่ยนสภาวะจาก สภาวะพลังงานสูง (high energy state, E2) ไปยัง ส ภ า ว ะพ ลังงาน ต่ (low energy state, E1) โด ย โฟตอนแต่ละตัวมีพลังงาน (E) ตามสมการที่ 1 E (J) = E2-E1 = hc/λ สมการที่ 1 โดยที่ h = ค่าคงที่แพลงค์ (Planck's constant) = 6.23x10-34 J.s c = ความเร็วแสง = 2.998x108 m/s λ = ความยาวคลื่นของรังสี(nm) ระดับพลังงานของอะตอมหรืออิออนนั้นเป็น ลักษณะเฉพาะขึ้นอยู่กับจำนวนโปรตอน อิเล็กตรอน และนิวตรอนในอะตอมหรืออิออนนั้นๆ ในธาตุบางชนิด ค วามแตกต่างระหว่างสภาวะพลังงาน สามารถปลดปล่อยโฟตอนที่มีความยาวคลื่นในช่วงของรังสียูวีได้ รังสีสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลัก คือ รังสีชนิดก่ออิออน (ionizing radiation) และรังสีชนิดไม่ก่ออิออน (non-ionizing radiation) โดยรังสีชนิดก่ออิออน คือ รังสีใดๆ ก็ตามที่เมื่อเดินทางผ่านตัวกลาง หรืออากาศแล้วสามารถทำให้ตัวกลางเกิดการแตกตัวเป็นอิออน เช่น รังสีแกมมา รังสีบีตา และรังสีแอลฟา เป็นต้น ในขณะที่รังสีใดๆ ก็ตามที่เมื่อผ่านตัวกลางแล้ว ไม่ทำให้ตัวกลางแตกตัว คือรังสีชนิดไม่ก่ออิออน เช่น รังสียูวี รังสีอินฟราเรด และคลื่นวิทยุ เป็นต้น หลอดกำเนิดรังสียูวี (UV lamp) ในอุตสาหกรรมอาหารโดยทั่วไปสามารถแบ่งตามความดัน ไอของปรอทระหว่างหลอดกำเนิดรังสียูวีทำงานออกเป็น หลักๆ 3 ประเภทคือ 1. ความดันต่ำ (low pressure) 2. ความดันต่ำ; ความเข้มแสงสูง (low pressure; high output) และ 3. ความดันปานกลาง (medium pressure) หลอดกำเนิดรังสียูวีประกอบด้วยหลอดที่ทำมาจากแก้วซิลิกา ซึ่งห่อหุ้มชั้น (envelope) อีกชั้นหนึ่ง ที่บรรจุปรอทและแก๊สเฉื่อย (ปิดผนึกทั้ง

ต้นและปลาย) มีอิเล็กโทรดบริเวณปลายของแต่ละด้านของ envelope (Figure 1) โดยแหล่งพลังงานของหลอดกำเนิดรังสียูวี โดยทั่วไปคือพลังงานจากกระแสไฟฟ้า เครื่องฉายรังสียูวี ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นประกอบด้วยท่อที่บรรจุหลอดกำเนิดรังสียูวีโดยแยกออกจากตัวอย่างอาหารที่จะมาสัมผัสกับรังสียูวี โดยเครื่องฉายรังสียูวีส่วนใหญ่ ประกอบด้วยจอควบคุมซึ่งจะแสดงผลของปริมาณความเข้มของรังสียูวี (UV intensity) และอัตราการไหลของอาหารเหลว (flow rate)

2.5.3 การวัดปริมาณของรังสีอัตราไวโอเลต

ปริมาณการใช้รังสี UV จะวัดโดยใช้หน่วย ไมโครวัตต์-วินาที/ตร.ซม. ซึ่งเกิดจากผลคูณระหว่างความเข้มของรังสีในหนึ่งหน่วยพื้นที่ (ไมโครวัตต์/ตร.ซม.) กับเวลาสัมผัสระหว่างรังสีกับน้ำ (วินาที) การวัดอาจจะใช้หน่วย Ultrad เชื้อโรคต่างๆ มีความต้านทานต่อรังสีไม่เท่ากันดังตารางที่ 1 แต่อย่างไรก็ตามเพื่อความแน่ใจว่าการฆ่าเชื้อโรคจะได้ผลตามที่ต้องการ ก็ไม่ควรจะน้อยกว่า 20,000 Ultrads แต่โดยทั่วๆ ไป หลอด UV มีปริมาณรังสี 30,000 Ultrads เพราะว่าต้องมีการเผื่อความสูญเสียของรังสีด้วย (Koutchma et. al., 2009)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณรังสี UV ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อโรคต่างๆ

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สาเหตุของโรค	Ultrads*
Salmonella typhosa	โรคไทฟอยด์	4,100
Salmonella paratyphi	โรคลำไส้	6,100
Shigella disenterica	โรคบิด	4,200
Shigella flexneri	โรคบิด	3,400
Vibrio comma	โรคอหิวาตกโรค	6,500
Lebtospira spp.	โรคดีซ่าน	6,000
Poliovius	โรคสันหลังอักเสบ	6,000
Unidentified	โรคตับอักเสบ	8,000

* Ultrads = 1 ไมโครวัตต์ - วินาที/ตารางเซนติเมตร

2.5.4 กลไกของรังสีต่อจุลินทรีย์ (Krishnamurthy et. al., 2008)

กลไกในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ของรังสีแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

1. Target Theory รังสีจะเข้าทำลายส่วนของกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์โดยตรงทำให้เกิดการตายและฆ่าเหล่าได้ รังสีนี้ได้แก่ แสง UV

2. Indirect Theory การทำลายเซลล์เกิดขึ้นโดยอ้อม เนื่องจากรังสีนี้จะทำให้น้ำในเซลล์แตกตัวเป็น H^+ และ OH^- เพื่อรบกวนการทำงานของเอนไซม์ จนทำให้ขบวนการเมตาบอลิซึมและสารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมจนกระทั่งเซลล์ตาย รังสีพวกนี้ได้แก่ X-ray, Gamma Ray เป็นต้น

2.5.5 ผลของแสงอัลตราไวโอเล็ตต่อจุลินทรีย์

แสงอัลตราไวโอเล็ตจะมีผลต่อโครงสร้างของเซลล์ที่สามารถดูดกลืนแสงนี้ไว้ได้ (Demirci and Ngadi, 2012) เช่น โปรตีน และ DNA โปรตีนจะดูดกลืนได้ดีที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยเป็นการดูดกลืนของกรดอะมิโนที่เป็น Aromatic Ring ส่วน DNA จะถูกดูดกลืนแสง UV ได้สูงสุดใกล้เคียงความยาวคลื่น 254 nm ผลกระทบของแสง UV ที่เกิดกับ DNA จะมีความสำคัญต่อเซลล์มากที่สุด เนื่องจาก DNA เป็นสารพันธุกรรมจึงมีหน้าที่ควบคุมกลไกการดำรงชีวิต และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของเซลล์ DNA มีโครงสร้างเป็นลักษณะ 2 สายพันธุ์เป็นเกลียว แต่ละสายของ DNA จะประกอบไปด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose), ฟอสเฟต และเบสชนิดต่างๆ มายึดเกาะกัน แล้วทั้งสองสายของ DNA จะมาเชื่อมต่อกันด้วย Hydrogen bond ของเบสแต่ละคู่ คือ Adenine จับกับ Thymine และ Guanine จับกับ Cytosine

โครงสร้างสำคัญในการดูดกลืนแสง UV ของ DNA คือเบสชนิดต่างๆ โดยที่เบส Pyrimidine (คือ Thymine และ Cytosine) จะมีความไวต่อแสง UV มากกว่าเบส Purine (คือ Adenine และ Guanine) เมื่อได้รับแสง UV จะทำให้เบส Cyclobutane Ring ในที่สุด Dimer ที่เกิดเป็นชนิดแรกได้แก่ Thymine Dimer แต่อาจจะพบว่าเกิด Dimer ของเบสคู่อื่นๆ เช่น Thymine – Cytosine และ Cytosine Dimer ได้อีกด้วย ในขณะที่เบสเชื่อมกันเป็น Dimer นี้ Hydrogen bond ที่ยึดระหว่างสายของ DNA จะถูกทำลายเองทำให้ลักษณะเกลียวของ DNA เปลี่ยนไป การยึดเกาะกันของเบสที่เข้าคู่กันในแต่ละสายของ DNA ไม่เกิดขึ้น ทำให้การทำงานและการแบ่งตัวของ DNA มีการสับสน ไม่สามารถจำลองตัวเองหรือจำลองเป็น RNA ขึ้นมาได้ มีผลทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัว การหายใจและการเจริญเติบโตถูกยับยั้ง จนกระทั่งเซลล์ตายไปในที่สุด แสง UV ยังมีผลทางอ้อมต่อจุลินทรีย์อีกด้วย กล่าวคือ แสง UV ที่มีความยาวคลื่นสั้นๆ จะกระตุ้นให้ออกซิเจนที่ละลายน้ำเกิดการรวมตัวกับน้ำเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งสารที่ได้นี้คุณสมบัติทำลายจุลินทรีย์อีกด้วย

เซลล์แบคทีเรียที่ใกล้ตายด้วยอิทธิพลของแสง UV อาจฟื้นคืนชีพขึ้นมาได้ ถ้าเชื้อได้รับแสงที่มีความยาวคลื่น 300 – 400 nm การฟื้นคืนชีพด้วยแสงนี้ เรียกว่า Photoreactivation แสงที่ช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวจะไปกระตุ้นเอนไซม์ทำให้ Dimer ของเบสหลุดออกจากกัน ทำให้ DNA กลับคืนสู่สภาพปกติจนสามารถ

ทำงานได้ อย่างไรก็ตามบางเซลล์ที่ได้รับความเสียหายจากแสง UV เป็นอย่างมากก็จะตาย ไม่สามารถซ่อมแซมให้ฟื้นขึ้นมาได้ด้วยขบวนการของ Photoreactivation

2.5.6 รังสีอัลตร้าไวโอเลตต่อการทำลายจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับ

ความสามารถของรังสีอัลตร้าไวโอเลตต่อการทำลายจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับ

2.5.6.1 ความเข้ม (dose) ของรังสีเมื่อสัมผัสเซลล์

2.5.6.2 ระยะเวลาที่รังสีสัมผัสเซลล์

2.5.6.3 ระยะห่างระหว่างจุดกำเนิดรังสีและเซลล์

2.5.6.4 ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ เช่น ราจะทนต่อรังสี UV มากกว่าแบคทีเรีย

2.5.6.5 สถานภาพของจุลินทรีย์ในสภาวะแวดล้อมขณะฉายรังสี เช่น ในช่วงระยะ lag phase, ในช่วงระยะ log phase, ระยะการสร้างสปอร์, เซลล์ (vegetative cells), ความต้องการออกซิเจน (aerobe, facultive anaerobe, anaerobe), อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (thermophiles, psycrophiles, mesophiles)

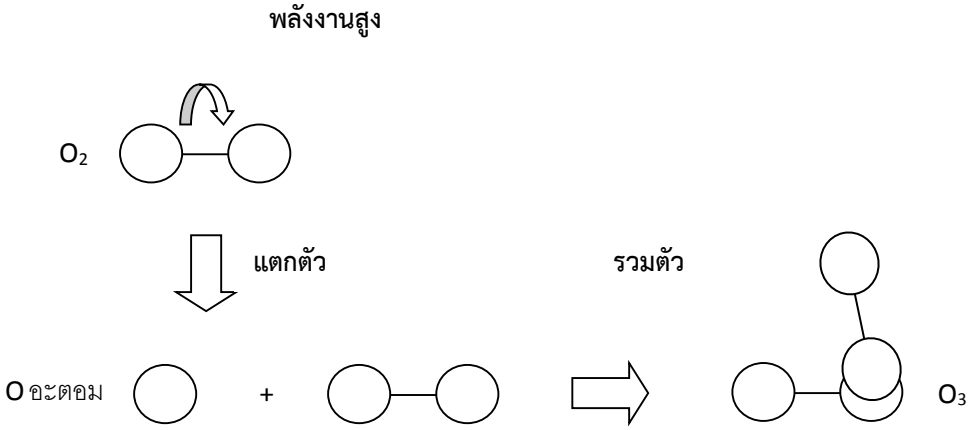
2.5.6.6 องค์ประกอบของอาหารที่นำมาฉายรังสีและปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน (intrinsic – extrinsic parameter) ของอาหาร

แสงยูวีใช้เป็นวิธีการฆ่าเชื้อโรคในน้ำตั้งแต่กลางคริสต์ศตวรรษที่ 20 แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรจะทำให้แบคทีเรียไวรัสและโปรโตซัวลดลงเช่น Cryptosporidium โดยการทำลายพันธะโมเลกุลของอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอเพื่อให้เกิด dimers ซึ่งทำให้เชื้อโรคไม่สามารถสืบพันธุ์และเจริญเติบโตได้

ความไวของรังสียูวีต่อเชื้อจุลินทรีย์วัดจากความเข้มของรังสียูวีครั้งที่สัมผัสกับเวลา ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มและเวลาสัมพันธ์กับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้นของคลอรีน เช่น *E. coli* และโปรโตซัว เช่น Cryptosporidium มีความไวสูงและต้องใช้รังสียูวีประมาณ 10 mJ ต่อตารางเซนติเมตรสำหรับฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว 99.99% ในทางกลับกันไวรัสส่วนใหญ่ (เช่น โปลิโอ) มีความไวต่อรังสียูวีน้อยลงโดยมีขนาด 30 มม. ต่อตารางเซนติเมตรสำหรับฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว 99.99% Adenovirus เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญน้อยที่สุดโดยต้องใช้รังสียูวีประมาณ 180 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตรสำหรับการระงับการใช้งาน 99.99% ดังนั้นการรักษาด้วยรังสียูวีเพียงอย่างเดียวไม่สามารถคาดว่าจะช่วยป้องกันเชื้อโรคต่างๆได้

2.6 โอโซน (O_3)

ก๊าซโอโซน (Ozone or Activated Oxygen) ประกอบด้วยธาตุออกซิเจน 3 อะตอมรวมกัน มีสูตรโมเลกุล O_3 ก๊าซโอโซนสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติในบรรยากาศชั้นสตราโทสเฟียร์และบนพื้นผิวโลก ลักษณะการเกิดเป็นผลมาจากการเกิดฟ้าแลบและฟ้าคะนองซึ่งจะมีประจุไฟฟ้ามากมายเกิดขึ้นและมีความต่างศักย์ทางไฟฟ้าสูงมาก ซึ่งทำให้ก๊าซออกซิเจนแตกตัวแล้วรวมตัวกันใหม่เป็นก๊าซโอโซนได้นั่นเอง ก๊าซโอโซนที่เกิดตามธรรมชาตินี้ ทำหน้าที่กรองรังสีและแสงอาทิตย์ นอกจากนั้นมนุษย์ยังสามารถผลิตโอโซนได้ โดยเลียนแบบปฏิกิริยาการเกิดโอโซนจากธรรมชาติ (Yanco Industries, 1998) จากการให้พลังงานสูงแก่โมเลกุลออกซิเจน ทำให้โมเลกุลออกซิเจนนั้นแตกตัวออกเป็นอะตอมออกซิเจนอิสระ ซึ่งต่อมาจะรวมตัวกับโมเลกุลอื่นของออกซิเจนเกิดเป็นโอโซน (สุเมธ, 2541) การเกิดปฏิกริยาสามารถแสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาในการเกิดโอโซน (Munter, 2001)

โอโซนเป็นสารอยู่ในสถานะก๊าซประกอบด้วยโมเลกุลของออกซิเจน 3 โมเลกุล ก๊าซโอโซนพบมากที่ระดับความสูงประมาณ 10-50 กิโลเมตรเหนือผิวโลกในชั้นบรรยากาศสตราโตสเฟียร์ (Stratospheres) ช่วยลดอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตจากดวงอาทิตย์ ก๊าซโอโซนเกิดได้เองในธรรมชาติจากกระแสไฟฟ้าแรงสูงในอากาศเนื่องจากฟ้าผ่าหรือฟ้าแลบทำให้ก๊าซออกซิเจนซึ่งปกติประกอบด้วยออกซิเจน 2 อะตอม รวมกันเป็น 1 โมเลกุล (O_2) แตกตัวเป็นออกซิเจนอะตอม (O) อิสระแล้วรวมกับก๊าซออกซิเจนโมเลกุลอื่น เกิดเป็นโอโซนโมเลกุล (O_3) นอกจากนี้รังสีอัลตราไวโอเล็ตจากดวงอาทิตย์ก็ทำให้ออกซิเจนโมเลกุลแตกตัว เกิดก๊าซโอโซนได้เช่นกัน O_3 ที่เกิดโดยวิธีนี้มีความปริมาณเพียง 0.02-0.2 ppm เท่านั้น (Horvath et al., 1985)

แม้จะเกิดจากโมเลกุลของออกซิเจนเหมือนกันแต่ O_2 และ O_3 กลับมีคุณสมบัติต่างกันมาก กล่าวคือ O_2 สามารถคงสภาพอยู่ได้ดีกว่า เนื่องจากพันธะที่ยึดอะตอมของออกซิเซน 2 อะตอมไว้ด้วยกัน มีความแข็งแรง

นั่นคือมีความเสถียรสูง ในขณะที่ O_3 มีการเติมอะตอมของออกซิเจนเพิ่มเข้ามาอีก 1 อะตอม ทำให้โมเลกุลใหม่ที่ได้มีพลังงานสูง มีความเสถียรต่ำ ทำให้เสียสภาพได้ง่ายจากปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความร้อน ความดันและการเกิดปฏิกิริยากับสารที่มีพลังงานต่ำกว่านั่นเอง จะเกิดการออกซิเดชั่น (Oxidation) อย่างรวดเร็วด้วยการให้อะตอมของออกซิเจน 1 อะตอม และได้ผลิตผลกลับเป็น O_2 ที่มีพลังงานต่ำกว่านั่นเอง พบว่า O_3 มีความแรงปฏิกิริยา (Oxidation potential) สูงถึง 2.07 Electron Volt (eV) ในขณะที่อนุพันธ์ของออกซิเจน (Reactive oxygen species) ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาล้างแผลคือ Hydrogen peroxide มีค่า Oxidation potential เท่ากับ 1.78 eV ตลอดจนน้ำยาเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่สำคัญได้แก่ Sodium hypochlorite และ Chlorine dioxide มีค่าเท่ากับ 1.36 eV และ 0.95 eV ตามลำดับ (Horvath et al., 1985)

การผลิตโอโซนในโรงงานอุตสาหกรรมจะเป็นระบบปิด (Tap และ Rice, 2012) มีการสร้างและปล่อยโอโซนในจุดที่ต้องการใช้งาน ในปัจจุบันมีวิธีการผลิตอยู่ 2 วิธีคือ

1. วิธี Photozone หลักการคือ การแตกตัวของก๊าซออกซิเจน จากพลังงานคลื่นอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 200 นาโนเมตร แล้วรวมตัวกันใหม่ในรูปของก๊าซออกซิเจนที่ผ่านหลอดอัลตราไวโอเลต กล่าวคือ ถ้าแหล่งกำเนิดออกซิเจน ปั๊มลม (อากาศในธรรมชาติ) ก๊าซโอโซนที่ผลิตได้จะมีปริมาณ 66.7 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณก๊าซทั้งหมด แต่ถ้าใช้ก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ในการผลิตออกซิเจนจะเปลี่ยนเป็นก๊าซโอโซน 100 เปอร์เซ็นต์ วิธี Photozone เป็นวิธีที่ให้ความแรงของการออกซิไดซ์สูง อีกทั้งยังใช้พลังงานในการผลิตโอโซนน้อยกว่าวิธีอื่น
2. วิธี Corona Type คือการถ่ายประจุไฟฟ้าแบบ Silent Spark (corona) ความต่างศักย์ (5,000 – 10,000 โวลท์) ผ่านก๊าซออกซิเจนหรืออากาศที่มีความชื้นต่ำ การผลิตโอโซนด้วยวิธีนี้จะให้ปริมาณโอโซนสูงถึง 96.4% ซึ่งมากกว่าวิธี Photozone อีกทั้งยังให้องค์ประกอบอื่นๆ เพียง 3.6 เปอร์เซ็นต์ แต่อากาศที่ใช้ต้องปราศจากความชื้น เนื่องจากความชื้น อาจมีผลในการลดปริมาณโอโซนที่ควรผลิตได้และเป็นสาเหตุให้เกิดไอน้ำเกาะอยู่ภายในเครื่อง ซึ่งก่อให้เกิดสนิมได้

2.6.1 คุณสมบัติของก๊าซโอโซน

โอโซนเป็นก๊าซสีฟ้า กลิ่นค่อนข้างฉุนคล้ายคาวปลา น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 48 กรัม/โมเลกุล มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ - 111.9 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่ – 192.5 องศาเซลเซียส (ที่ 1 บรรยากาศ) โอโซนมีน้ำหนักประมาณ 0.135 ปอนด์/ตารางฟุต ออกซิเดชั่นโพเทนเชียลของโอโซนมีค่าประมาณ – 2.07 โวลท์ โอโซนมีความหนาแน่นมากกว่าออกซิเจน 1.5 เท่า และละลายน้ำได้ดีกว่าออกซิเจน 12.5 เท่า (Towles,

1998) โอโซนสามารถละลายน้ำได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอ็น-เพนเทน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ฯลฯ และละลายในน้ำได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โอโซนสามารถละลายในน้ำได้ 0.57 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร มีความสเถียรต่ำ ค่าครึ่งชีวิตประมาณ 36 นาทีถึงสองชั่วโมงในสภาวะก๊าซ และประมาณ 18 – 20 นาที เมื่อละลายในน้ำ จะเห็นได้ว่าความไม่เสถียรของก๊าซโอโซน มีสาเหตุจากการสลายตัวอย่างรวดเร็วของโอโซน

2.6.2 การสลายตัวของโอโซน (Guzel-Seydim et al., 2004)

เมื่อโอโซนละลายน้ำ จะทำปฏิกริยากับไฮดรอกไซด์ไอออนของน้ำ เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่างๆ และสุดท้ายก๊าซโอโซนจะสลายตัวกลายเป็นก๊าซออกซิเจน อัตราการสลายตัวของโอโซนขึ้นอยู่กับสารประกอบตัวก่อ (Initiatoe) และ/หรือตัวสนับสนุน (Promotor) ที่เป็นทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในน้ำ รวมทั้งสารยับยั้ง เช่น คาร์บอเนต

$$O_3 + H_2O \rightarrow HO_3^+ + OH^-$$

$$HO_3^+ + OH^- \rightarrow 2HO_2$$

$$O_3 + HO_2 \rightarrow HO + 2O_2$$

$$OH + HO_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

รูปที่ 2.4 การสลายตัวของโอโซน

จากรูปที่ 4.4 มี 2 ปรากฏการณ์ที่มีผลต่อวัฏจักรดังกล่าวคือ การสนับสนุน (Promotion) และการยับยั้ง (Inhibition) โดยสารที่สนับสนุน (Promoting Agent) คือก๊าซโอโซนซึ่งเกิดปฏิกิริยากับก๊าซออกซิเจนอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่สารยับยั้ง (Inhibiting Agent) จะทำปฏิกิริยากับ OH^- เกิดผลิตภัณฑ์อื่น สารยับยั้งนั้นรวมไปถึงคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต ด้วยเหตุนี้เองทำให้ระดับคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนตที่มีอยู่ปริมาณสูงจะช่วยให้โอโซนที่เหลืออยู่ คงสภาพต่อไปอีก

ปัจจัยของการสลายตัวมี 2 ประการ คือ

2.6.2.1 การทำปฏิกิริยากับสารปนเปื้อนในน้ำ

โอโซนทำปฏิกิริยาทันทีที่สัมผัสกับสารแขวนลอยต่างๆ ในน้ำ อาทิเช่น สารอินทรีย์และสารอินทรีย์ รวมถึงความหนาแน่นของเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำ โอโซนจะสลายตัวอย่างรวดเร็ว และแตกตัวให้อนุมูลอิสระ ได้แก่ Hydroxyl radical และ HO_3 ซึ่งมีความไวในการทำปฏิกิริยากับสารปนเปื้อนต่างๆ ในน้ำ ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นปริมาณ ชนิดของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่อยู่ในน้ำด้วย จากสาเหตุดังกล่าว ทำให้การสลายตัวของโอโซนในน้ำธรรมชาติ มีความซับซ้อนกว่าในน้ำบริสุทธิ์

2.6.2.2 การกระจายตัวสู่บรรยากาศ

เนื่องจากโอโซนมีความเสถียรต่ำ สลายตัวได้ง่ายในสภาวะที่ละลายน้ำ ดังนั้นก๊าซโอโซนที่ผลิตได้จะกระจายตัวขึ้นสู่บรรยากาศเหนือสารละลายในรูปก๊าซมากกว่าทำให้การตรวจวัดค่าความเข้มข้นของโอโซนในน้ำไม่แน่นอน ก๊าซโอโซนที่ยังคงเหลือในรูปสารละลายจะมีค่าลดลงตามเวลา

2.6.3 ประสิทธิภาพในการละลายน้ำของโอโซน (Wickramanayake, 1984)

ประสิทธิภาพในการละลายน้ำของโอโซน จะมีผลต่อความเข้มข้นของโอโซนที่ละลายในน้ำ ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายน้ำของโอโซน สามารถสรุปได้ดังนี้คือ

2.6.3.1 อุณหภูมิ

เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณโอโซนละลายลดลง เนื่องจากโอโซนสลายตัวได้เร็วขึ้น ความคงตัวของโอโซนรวมทั้งความเข้มข้นเริ่มต้นของโอโซน ขึ้นกับอัตราการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความสั่นสะเทือน

2.6.3.2 ค่าความเป็นกรด – ด่าง ของสารละลาย (pH)

ค่า pH มีความสำคัญในการทำปฏิกิริยาของโอโซนต่ออินทรีย์สารต่างๆ โดยในสภาวะที่ pH น้อยกว่า 7 โอโซนจะทำปฏิกิริยากับอินทรียสารต่างๆ ได้ช้า แต่ในสภาวะที่ pH มากกว่า 8 ปฏิกิริยาก็จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากโอโซนสลายตัวให้ไฮดรอกซี่แรดดิเคิล ($^{\circ}OH$) ที่ออกซิไดส์ที่รุนแรง อย่างไรก็ตามจะไม่พบความแตกต่างของความสามารถในการละลายของโอโซนที่ pH ของน้ำเท่ากับ 5 – 9 เมื่อความเข้มข้นของโอโซนตกค้าง (ROC) อยู่ในช่วง 0.60 – 0.70 ส่วนในล้านส่วน

2.6.3.3 ความเค็มของน้ำ

เมื่อน้ำทะเลมีค่าความเค็มเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้โอโซนละลายลดน้อยลง ถ้าตัวแปรอื่นๆ ได้แก่ อุณหภูมิ และค่า pH ของน้ำทะเลคงที่

2.6.3.4 คุณสมบัติของสารละลาย

ปริมาณสารประกอบและอนุภาคแขวนลอยต่างๆ ในน้ำมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการลลายของก๊าซโอโซน กล่าวคือถ้ามีสารประกอบและอนุภาคต่างๆ ในปริมาณมาก จะทำให้ปริมาณโอโซนละลายได้ลดลง

2.6.3.5 ขนาดของฟองก๊าซโอโซน

จำนวนและขนาดช่องของหัวทรายที่พ่นก๊าซโอโซนมีผลต่อขนาดของฟองก๊าซ

2.6.3.6 วิธีการที่โอโซนสัมผัสกับสารละลาย

การเป่าพ่นก๊าซโอโซนและน้ำไปพร้อม ๆ กัน ทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่างก๊าซและของเหลวอย่างชัดเจน ปริมาณโอโซนละลายได้จึงมีค่าน้อย แต่การเป่าพ่นโอโซนลงไปในน้ำที่ตั้งอยู่ในคอลัมน์จะทำให้โอโซนผสมกับของเหลวได้ดีกว่า

2.6.4 การใช้ประโยชน์จากโอโซน

โอโซนเป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง เนื่องจากมีค่าออกซิเดชั่นโพเทนเชียลสูงถึง 2.07 โวลท์ เมื่อเปรียบเทียบค่ากำลังออกซิเดชั่นกับสารออกซิไดส์อื่นๆ ได้แก่ คลอรีน 1.36 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1.77 โบรมีน 1.90 และไอโอดีน 0.54 ดังนั้นจึงทำให้โอโซนถูกนำไปใช้งานด้านการบำบัดอินทรีย์สาร และอนินทรีย์สารต่างๆ อย่างแพร่หลายซึ่งพอที่จะนำมากล่าวได้ดังนี้

2.6.4.1 การใช้โอโซนบำบัดน้ำดื่ม น้ำในสระว่ายน้ำ บ่อน้ำแร่ และน้ำในกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม ทำโดยการฉีดพ่นก๊าซโอโซนโดยตรงเพื่อแยกโลหะหนักและก๊าซพิษที่มีมาในน้ำดิบให้สลายตัวก่อนเข้าระบบกรองน้ำ นอกจากนี้โอโซนที่ฉีดจะไปละลายกับน้ำเพื่อกำจัดสาหร่ายและเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ในน้ำดิบก่อนเข้าระบบเช่นกัน และยังใช้โอโซนเป็นสารฆ่าเชื้อโรคแทนคลอรีนก่อนที่จะนำน้ำไปใช้งานอีกด้วย

2.6.4.2 การนำโอโซนมาบำบัดน้ำสำหรับการทำน้ำประปา จะใช้ก๊าซโอโซนในการฆ่าเชื้อโรคในน้ำแทนคลอรีน แล้วจึงส่งเข้าสู่ในถังเก็บ (Storage tank)

2.6.4.3 การนำโอโซนมาใช้ในกิจการแพทย์ เพื่อทำลายจุลินทรีย์ในน้ำ และในอากาศชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรียและไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคระบบทางเดินอาหาร โรคหวัด เป็นต้น ทำการฉีดพ่นในห้องพยาบาลนาน 4 ชั่วโมง แทนการใช้ด่างทับทิมในสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งการใช้โอโซน

สามารถฆ่าเชื้อโรคอย่างได้ผล หรือการใช้ ROC ความเข้มข้นน้อยกว่า 1 มก./ลิตร เพื่อออกซิไดซ์เชื้อโรคต่างๆ ที่อยู่ในเลือด เช่น HIV Cytomegalo Virus และ *Staphylococcus*

2.6.4.4 การใช้โอโซนบำบัดน้ำในฟาร์มเลี้ยงปลาและกุ้งทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยใช้การผสมก๊าซโอโซนลงในน้ำ ก๊าซโอโซนจะไปทำลายก๊าซพิษที่อยู่ที่ก้นบ่อ เช่น ก๊าซแอมโมเนีย ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟต์ เป็นต้น และยังสามารถกำจัดเชื้อโรคต่างๆ ได้ด้วย ทั้งยังเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายให้กับแหล่งน้ำ แต่ต้องใช้กับสัตว์น้ำที่มีขนาดตั้งแต่ 1 เดือนขึ้นไป ถ้านำไปใช้กับสัตว์น้ำที่อายุน้อยกว่านี้จะทำให้สัตว์เหล่านี้เป็นโรคขาดอาหาร ทำลายพวกสาหร่าย แพลงก์ตอน ซึ่งเป็นอาหารของสัตว์น้ำเล็กๆ (Strong et al.,1999) การติดตั้งเครื่องผลิตโอโซน เป็นที่นิยมมากในฟาร์มเพาะเลี้ยงหอยนางรมในประเทศฝรั่งเศสเพื่อกำจัดเชื้อ *Vibrio vulnificus* โดยในปี ค.ศ. 1972 มีความประสบความสำเร็จในการใช้โอโซนกำจัดเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภค ส่งผลให้ฝรั่งเศสผลิตหอยนางรมได้ถึง 1,400 กิโลกรัม/วัน (Forchtman et al., 1977) ส่วนในประเทศเอกวาดอร์ การใช้โอโซนเป่าพ่นลงในน้ำที่มีเชื้อไวรัส Taura Syndrome Virus (TSV) ที่เป็นสาเหตุให้ผลผลิตกุ้งทั่วประเทศลดลง 80% ทำให้อัตรารอดของกุ้งสูงขึ้นกว่า 60%

2.6.4.5 การใช้โอโซนกำจัดสาหร่ายใน Cooling Tower สำหรับเครื่องปรับอากาศขนาดใหญ่เมื่อใช้งานไปนานๆ จะเกิดสาหร่ายบริเวณส่วนประกอบต่างๆ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ประสิทธิภาพในการระบายความร้อนต่ำลง เกิดการสูญเสียประสิทธิภาพในการปรับอากาศ

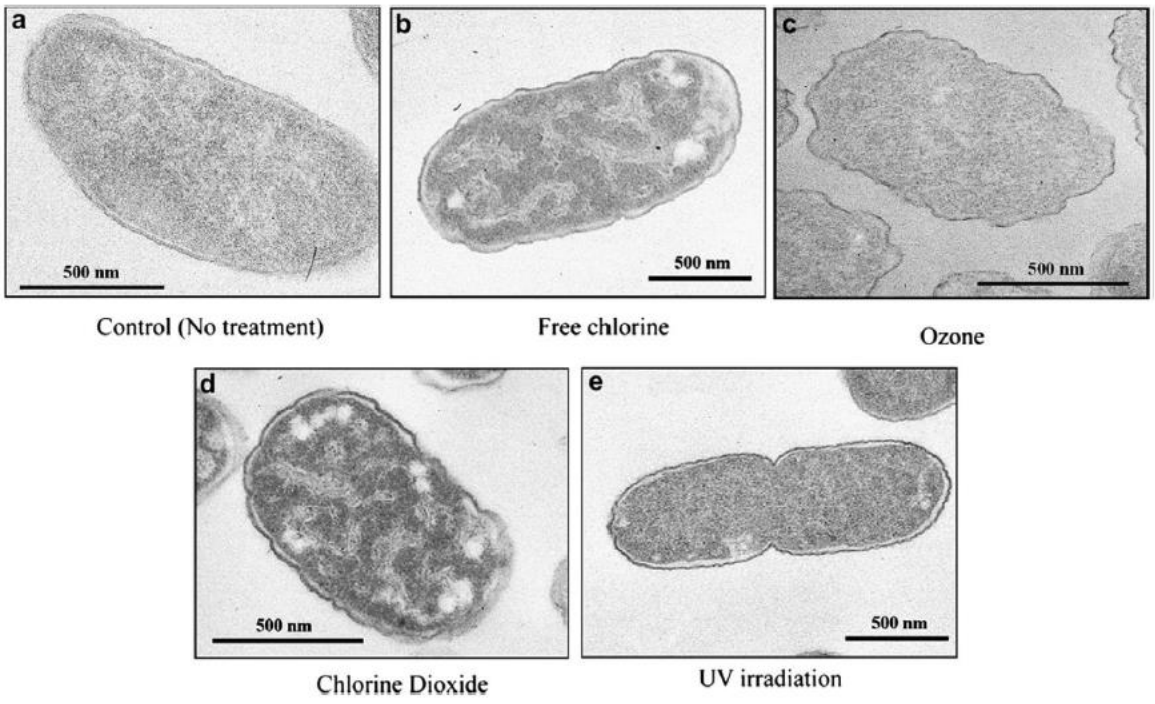
2.6.4.6 การใช้โอโซนกำจัดกลิ่น ก๊าซพิษและโลหะหนัก ที่ได้จากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น โรงงานผลิตสุรา โรงงานผลิตอาหารกระป๋อง และโรงงานฟอกย้อม เป็นต้น มีวิธีการคือ ฉีดพ่นโอโซนลงไปในน้ำเสีย แล้วปล่อยให้ตกตะกอน หรือการขจัดสีในน้ำเสียที่มาจากสารอินทรีย์ที่สะสมในน้ำและสารแขวนลอย

2.6.5 กลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์ของโอโซน

ในปี 1976 องค์กรปกป้องสิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental Protection Agency, U.S.EPA) พบว่า O_3 สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรียได้ (Antimicrobial agent) และรับรองความปลอดภัยในการใช้O_3 ฆ่าเชื้อจุลินทรียในน้ำได้ (U.S.EPA, 1999) เช่นเดียวกับองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (United states food and drug administration U.S.FDA) ยอมรับการใช้ O_3 ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และมีความปลอดภัยในการใช้กับอาหาร 2 อาหาร (Food additive agent) (U.S.FDA, 2001) ตลอดจนรายงานการศึกษาโดย U.S.EPA ในปี 2007 พบว่าน้ำโอโซน (Ozonated water) ที่ระดับความเข้มข้น 6-10 ppm มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ

แบคทีเรีย *Bacillus atrophaeus*, *Staphylococcus epidermidis* และเชื้อรา *Rhodotorula mucilaginosa*, *Penicillium brevicompactum* ทั้งชนิดที่สร้างสปอร์ได้และไม่สร้างสปอร์ได้ 99.99% ในเวลา 24 ชั่วโมง (U.S.EPA, 2007)

การศึกษาเปรียบเทียบผลของ O_3 ต่อความอยู่รอดของแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยเปรียบเทียบกับสารเคมีที่มีสมบัติฆ่าเชื้อ (Disinfectant) ที่นิยมใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย พบว่าน้ำโอโซนทำลายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีกว่าคลอรีน (Chlorine) และรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet radiation) ด้วยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย มีฤทธิ์โดยซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน เสียสมดุลย์สารน้ำและส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียแตกในที่สุด (Osmotic bursting) ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (Cho et al., 2010)



รูปที่ 2.5 ภาพถ่าย Transmission electron microscope (TEM) แสดงระดับการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากผลของ O_3 (c) เปรียบเทียบกับสารเคมี chlorine (b), chlorine dioxide (d), UV irradiation (e), และกลุ่มควบคุม (a)

Murray และคณะ (2008) พบว่าน้ำโอโซนสามารถทำลายไวรัสได้หลายชนิด ทั้งชนิดที่มีถุงหุ้ม (Enveloped viruses) และชนิดที่ไม่มีถุงหุ้ม (Non-enveloped viruses) ได้แก่ herpes simplex virus type-1, vaccinia virus,

adenovirus type-2, และ influenza A virus นอกจากนั้น Thabet และคณะ (2007) ยังพบว่า O_3 สามารถทำลายไข่ของพยาธิ Schistosomiasis mansoni ในหนูได้

การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อื่นๆ นั้น Oizumi และคณะ (1998) ทำการศึกษาในหลอดทดลอง (In vitro) แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการใช้น้ำโอโซนทำความสะอาดฟัน Celiberti และคณะ (2006) พบว่าการใช้น้ำโอโซนทำความสะอาดฟันไม่ส่งผลใดๆ ต่อสารเคลือบฟัน (Enamel) ตลอดจนคุณภาพของชิ้นส่วน denture alloy ที่ใช้ในช่องปาก (Suzuki et al., 1999) การทดลองในห้องปฏิบัติการยังพบว่าน้ำโอโซนมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย Streptococcus. mutans, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), และ Candida albicans และกำจัด Biofilms ของเชื้อแบคทีเรีย *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, และ *Candida* spp. ได้ (Arita et al., 2005; Murakami et al., 2002; Estrela et al., 2006) โดยไม่ส่งผลต่อเซลล์ Epithelial ในช่องปากของมนุษย์ (Huth et al., 2006) Baysan และคณะ (2000) ใช้น้ำโอโซนในการหัตถกรรมทางทันตกรรมพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียบริเวณบาดแผลทำให้เชื่อว่า ลดการติดเชื้อแบคทีเรียของเนื้อฟันภายหลังได้ (Rickard et al., 2004)

โดยกลไกการทำลายอาจเกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ อย่างแรกคือโมเลกุลของโอโซนเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารเคมีที่อยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ (Hunt และ Marinas, 1997) และอีกลักษณะคือ อนุมูลตัวกลางอิสระ (free radical-mediated) เป็นตัวเข้าทำลาย จากงานวิจัยโดยทั่วๆ ไปพบว่า โอโซนมีผลต่อเซลล์เมมเบรน ไซโตพลาสซึม โปรตีน และชั้นของไขมันในเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้โปรตีนในเซลล์เกิดการจับตัวเป็นก้อน เซลล์แตก บางครั้งพบว่าโอโซนจะเข้าทำลายระบบหายใจ (Respiratory system) ของเซลล์ ตลอดจนทำลายเอ็นไซม์ที่สำคัญในการดำรงชีพของเซลล์ และในบางกรณีโอโซนจะทำลาย DNA และ RNA ของเซลล์จุลินทรีย์ด้วย

โอโซนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Restaino et al., 1995) รวมทั้งสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ด้วย ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของโอโซนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโอโซน ระยะเวลาที่สัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียและสภาพ pH ที่เป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้โอโซนฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น (Kim et al., 1999a; Khadre et al., 2001)

2.6.6 อิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของโอโซน

ทั้งนี้ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของโอโซนขึ้นอยู่กับ

2.6.6.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลงมีผลทำให้โอโซนละลายได้ดี ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจะสูงขึ้น ในขณะเดียวกันโอโซนจะสลายตัวได้ง่ายเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

2.6.6.2 ความเป็นกรดด่าง

โอโซนจะมีความคงตัวเพิ่มมากขึ้น เมื่อ pH ลดลง ที่ pH เป็นด่างจะเกิดการสลายตัวของโอโซนได้ง่ายขึ้น ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของโอโซนจะสูงขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกรด

2.6.6.3 ความชื้นสัมพัทธ์

ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของโอโซนจะสูงขึ้นถ้าอาหารนั้นมีความชื้นสัมพัทธ์สูง ดังนั้นอาหารที่มี A_w สูงจะมีความไวกับโอโซนมากกว่าอาหารที่มี A_w ต่ำ

2.6.6.4 ความต้องการของโอโซนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในสภาพที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีอินทรีย์สารสูง ความต้องการโอโซน (ozone demand) จะสูงตามไปด้วย ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของโอโซนจะลดลง แต่ในสภาพที่ไม่มีความต้องการของโอโซน (ozone demand - free) โอโซนจะสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้มากขึ้น

2.6.6.5 ความสามารถของโอโซนในการเข้าถึงเชื้อจุลินทรีย์

ถ้าเชื้อจุลินทรีย์จับตัวเป็นกลุ่มก้อนประสิทธิภาพของโอโซนในการฆ่าเชื้อจะลดลง แต่ถ้าเชื้อจุลินทรีย์มีการกระจายตัวออกมา เช่น การทำ Ultrasonic treatment โอโซนจะฆ่าเชื้อเหล่านั้นได้ง่ายขึ้น

2.6.7 วิธีการที่ นิยมใช้ในการผลิตโอโซน

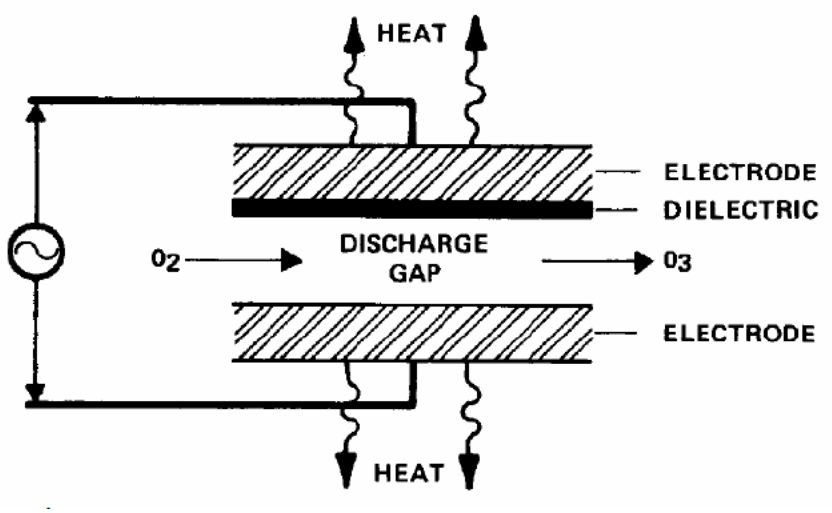
เนื่องจาก O_3 เสถียรจึงมีแนวโน้มที่จะสลายตัวกลับเป็นก๊าซออกซิเจนได้ง่าย มีครึ่งชีวิต (Half-life) 12 ชั่วโมง ในบรรยากาศ (Horvath et al., 1985) และเพียง 20-30 นาทีหากละลายอยู่ในน้ำ (Kim et al., 2003) หรือกล่าวได้ว่าการใช้ O_3 ไม่มีการตกค้างที่จะเป็นอันตรายใด ๆ เลย กระนั้นก็ตามพบว่าหากมนุษย์หายใจรับ O_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (>0.1 ppm) ทำให้ระบบทางเดินหายใจระคายเคือง, ปวดศีรษะ, คลื่นไส้, และอาเจียนได้ หรือหากได้รับที่ระดับความเข้มข้นสูง (> 6 ppm) จะเกิดภาวะปอดบวมน้ำ (Pulmonary edema) ได้ (Horvath et al., 1985) ส่งผลให้การสร้าง O_3 และเก็บไว้จะไม่สามารถทำได้ จึงต้องสร้างขึ้น ณ แหล่งที่จะใช้งานเลย วิธีการที่นิยมใช้ในการผลิตโอโซนในปัจจุบันมี 4 วิธี (Barlow, 1994)

2.6.7.1 Corona Discharge

เป็นวิธีจำลองการเกิด O_3 ตามปรากฏการฟ้าผ่าในธรรมชาติโดยใช้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์สูงทำลายโมเลกุลของ O_2 แล้วจึงลดพลังงานโมเลกุลลงเพื่อเอื้อให้เกิดการจับตัวกันของ โมเลกุลอ๊อกซิเจนอิสระได้เป็น O_3 ในที่สุด วิธีนี้นิยมใช้มากที่สุดเนื่องจากต้นทุนต่ำและสร้าง O_3 ได้มากพอในการใช้ประโยชน์เชิงการค้า

2.6.7.2. UV radiation

เป็นวิธีจำลองการเกิด O_3 ในธรรมชาติกล่าวคือใช้รังสี UV ความยาวคลื่นสั้นโดย เฉพาะที่ 254 nm ซึ่งจะมีพลังงานมากพอที่จะทำให้โมเลกุลของ O_2 ไม่เสถียรได้เป็นโมเลกุลอ๊อกซิเจนอิสระแล้วจึงสร้าง O_3 ได้ใหม่ วิธีนี้มีต้นทุนสูงและผลิต O_3 ได้น้อยกว่า



รูปที่ 2.6 แผนภาพแสดงกระบวนการสร้าง O_3 ด้วยวิธี Corona Discharge

2.6.7.3. Electrolysis

วิธีนี้ทำโดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งในตัวนำไฟฟ้าที่มีสถานะเป็นของเหลว (Electrolyte) เช่น น้ำ หรือ H_2SO_4 วิธีนี้ประสิทธิภาพในการผลิต O_3 ไม่ดียังต้องการการพัฒนาต่อไป

2.6.7.4. Radiochemical

ใช้สารกัมมันตรังสี (Radioactive) เป็นแหล่งพลังงานเพื่อแยกโมเลกุล O_2 เป็นวิธีที่ผลิต O_3 ได้ปริมาณมากต้นทุนต่ำแต่ต้องมีการควบคุมความปลอดภัยที่ดีพอ

2.7 ข้อดีของการทำงานร่วมกันระหว่างยูวีและโอโซน

ในการทำงานร่วมกันระหว่างยูวีและโอโซนส่งผลให้เสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

2.7.1 ประสิทธิภาพการกำจัดของกระบวนการ O_3 / UV ร่วมกันมักจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการกำจัดสารเติมแต่งของโอโซนและรังสียูวีเดียว (Prado and Esplugas, 1999) ขนาดของผล synergistic นี้แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสารปนเปื้อนที่น่าสนใจ (Prado และ Esplugas, 1999)

2.7.2 กระบวนการ O_3 / UV รวมกันมีประสิทธิภาพมากขึ้นในการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลมากกว่ากระบวนการ H_2O_2 / UV ที่รวมกันเพื่อให้ความเข้มข้นของออกซิเจนเท่ากัน เนื่องจากสัมประสิทธิ์การลิดรอนของโมเลกุลของ O_3 ที่ 254 นาโนเมตร มีค่ามากกว่าสองเท่าของ H_2O_2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องมีความเข้มของรังสียูวีต่ำกว่าหรือปริมาณ H_2O_2 ที่สูงกว่าเพื่อสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลเดียวกันสำหรับกระบวนการทั้งสองนี้ (Glaze et al., 1987)

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

วิธีการทดลองของงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

1. การศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของการใช้โอโซน (O_3) ยูวี-ซี (UV-C) และโอโซนร่วมกับยูวี-ซี (O_3 with UV-C) ในแบบจำลองของเหลวที่มีสีคาราเมลและเกลือเป็นองค์ประกอบ โดยใช้เครื่องต้นแบบหมุนเวียนของเหลวที่อัตราการไหล 5 ลิตรต่อนาที
2. การศึกษาและเปรียบเทียบการผลิตละอองอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและรา โดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โอโซน (O_3) และหลอดยูวี (UV-C) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ในแต่ละส่วนแสดงดังต่อไปนี้

1. การศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของการใช้โอโซน (O_3) ยูวี-ซี (UV-C) และโอโซนร่วมกับยูวี-ซี (O_3 with UV-C) ในแบบจำลองของเหลวที่มีสีคาราเมลและเกลือเป็นองค์ประกอบ

งานวิจัยดังกล่าวใช้เครื่องต้นแบบหมุนเวียนของเหลวที่อัตราการไหล 5 ลิตรต่อนาที ติดตั้งเครื่องกำเนิดโอโซนและควบคุมอัตราการไหลของโอโซนที่ 2 ลิตรต่อนาที และหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 4 หลอด ทั้งนี้ปริมาณแสงยูวีที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างของเหลวที่จะทำการศึกษามี 2 ระดับคือ 1.44 และ 2.88 กิโลจูลต่อตารางเมตร ทำการจำลองการปนเปื้อนในสารละลายเกลือและสารละลายสีคาราเมลด้วย *E. coli* โดยปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายเกลือเป็น 1, 10 และ 20% (w/v) และความเข้มข้นของสารละลายสีคาราเมลที่ระดับ 0.03, 0.06, และ 0.13% (w/v) เพื่อเปลี่ยนค่าการดูดซับยูวี-ซีในช่วงความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรให้เป็น 0.25, 0.50, และ 1.00 ตามลำดับ ทั้งนี้ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวอย่างควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้ในกรณีของสารละลายสีคาราเมลและสารละลายเกลือ โดยรายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังต่อไปนี้

1.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

- *Escherichia coli* DMST 4609

1.2 เครื่องมืออุปกรณ์

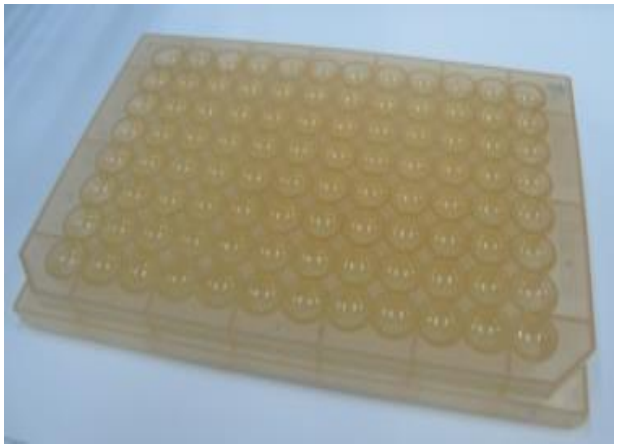
- เครื่องชั่ง 0.0001 g (Metter Toledo Model AG204, Switzerland)
- เครื่องชั่ง 0.01 g (Metter Toledo Model GG4002 - S, Switzerland)
- ตู้ปลอดเชื้อ (DWYER Series 0325, USA)
- ตู้เขย่าเชื้อ (New Brunwick Scientific, Enfield, CT)
- ตู้เย็น 4°C (Hitachi 35S I, Japan)
- ตู้บ่ม (Memmert Model ULM500, Japan)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Becthai and Hirayama Model HA300D, Japan)
- Microplate reader (M965, Metertech, Taiwan)
- 96 – well flat bottom microplate (Corning, Tewksbury, MA)
- 96-well U-bottomed polypropylene plate (Nunc, Rochester, NY, USA)
- Multichannel pipette (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Mechanical stepper (Biohit, Bohemia, NY, USA)

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Trypticase soy broth (TSB, Lab M, UK)
- Trypticase soy agar (TSA, Lab M, UK)
- เกลือ NaCl

1.4 การตรียมอาหารแข็ง

อาหารแข็งที่ใช้ในการทดลองถูกเตรียมจากผง agar โดยการนำไปให้ความร้อนเพื่อละลายผง และทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45 ถึง 50°C จากนั้นใช้ Mechanical stepper เพื่อปิเปต agar ที่ประมาณ 500 μl ลงใน 96 – well flat bottom microplate ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ปล่อยให้ agar อุณหภูมิปกติ เมื่อยังไม่ใช้งานเก็บที่อุณหภูมิประมาณ 4 °C



รูปที่ 3.1 แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA

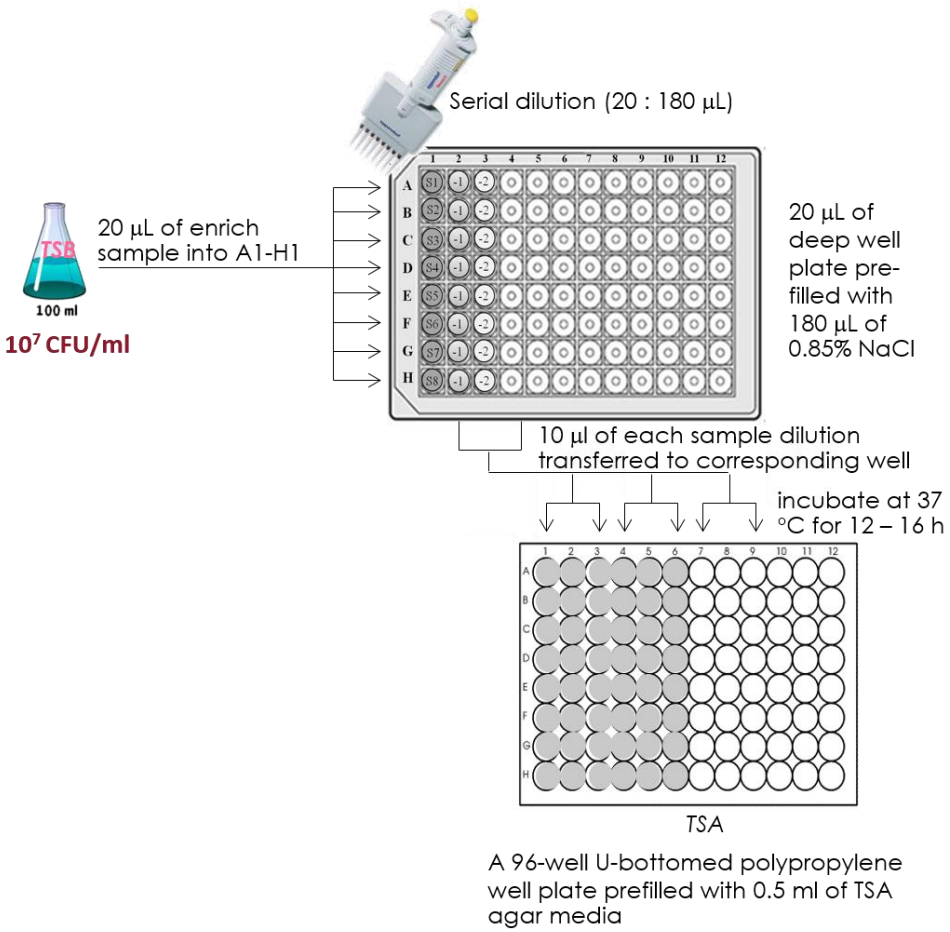
1.5 การตรียมเซลล์และ media ที่ใช้ในการทดลอง

1.5.1 การเตรียมเซลล์

เชื้อ *E. coli* DMST 4609 บริสุทธิ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Sciences Thailand) ถูก streak ลงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA, Lab M, UK) เพื่อให้ได้เชื้อเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นเชื้อเดี่ยวดังกล่าวจะถูกเขี่ยด้วย loop ลงในอาหาร TSB ปริมาณ 100 ml และนำเข้าเครื่องเขย่าที่ 200 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ประมาณ 10^7 CFU/ml (Hayashi และ Yamasaki, 1998; Karoonuthaisiri et al., 2009)

1.5.2 การเตรียม media ที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างสารละลายสีคาราเมลและน้ำเกลือถูกเตรียมด้วยการ spiked เชื้อลงไปในสารละลายที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU/ml และตัวอย่างมีการประเมินปริมาณเซลล์ *E. coli* ทุก ๆ 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 และ 25 นาที โดยปริมาณเซลล์ที่นับได้ (CFU/ml) ของ *E. coli* ถูกประเมินโดยการใช้เทคนิคการเพาะเชื้อระดับจุลภาค (MIC) ด้วยวิธีการของ Supanivatin et al., 2010; Khueankhancharoen et al., 2011 ดังแสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA

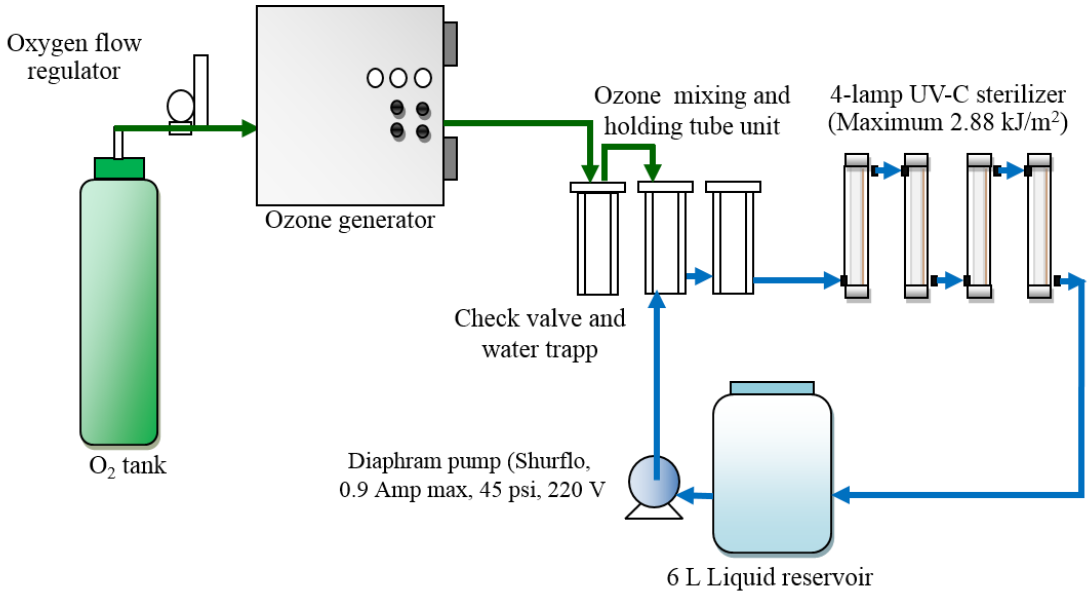
สำหรับเทคนิค spread plate เชื้อ *E. coli* ที่ปริมาณเชื้อ 7 log CFU/ml ถูกทำการเจือจางให้อยู่ที่ประมาณ 10^2 – 10^5 CFU/ml ปริมาตรเชื้อที่ 0.1 ml ของแต่ละความเข้มข้นถูก spread โดยตรงลงบนเพลทอาหาร TSA (รูปที่ 3.1) สำหรับเทคนิค MDPT ที่ปริมาณเชื้อ 7 CFU/ml ถูกทำการเจือจาง (10^{-1} – 10^{-5}) ดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยปิเปตตัวอย่าง 20 µl ลงใน 96 – well flat bottom microplate ที่ในแต่ละ well มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% จำนวน 180 µl จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างด้วย Multichannel pipette สำหรับการเตรียมเพลทอาหาร TSA โดย แผ่น 96 – well flat bottom microplate ที่ได้มีการฆ่าเชื้อแล้ว ถูกเติมด้วยอาหาร TSA ซึ่งในแต่ละ well ของเพลทมีปริมาตรของ TSA ประมาณ 0.5 ml (รูปที่ 3.1) ปริมาตรเชื้อของแต่ละ dilution ที่ 10 µl ถูก drop ลงบนอาหาร TSA ทั้ง 2 เทคนิคถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนโคโลนีในรูปแบบ log CFU/ml ถูกนับที่เวลาในการบ่มต่างๆ

1.6 การเตรียมสารละลายที่จะใช้ทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการฆ่าเชื้อด้วยยูวีหรือโอโซน

สารละลายสีคาราเมลถูกเตรียมที่ 5 ความเข้มของการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน (i.e., 0.25, 0.50 และ 1 OD_{405}) โดยการใช้ปริมาณของสารละลายคาราเมล 2, 4, 8, 18, 32 กรัมในน้ำ DI 6 ลิตร ตามลำดับ การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคาราเมลถูกวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรโดยการใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ 405 นาโนเมตร (M965, Metertech, Taiwan) สารละลายน้ำเกลือถูกเตรียมโดยการปรับความเข้มข้นที่ 1, 10 และ 20% (w/v) โดยการใช้เกลือ NaCl การศึกษาผลของการทำงานร่วมกันของสารละลายสีคาราเมลและน้ำเกลือใน aqueous solution ถูกนำมาประเมิน investigated

1.7 การบำบัดฆ่าเชื้อด้วยระบบ O_3, UV-C และ O_3- UV

ระบบบำบัดฆ่าเชื้อด้วย O_3, UV, and O_3-UV ที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วยส่วนประกอบและรายละเอียดต่างๆ ดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.3 Schematic diagram แสดงรายละเอียดของระบบโอโซน-ยูวี ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ระบบถังโอโซน-ยูวี ถูกพัฒนาและถูกใช้ในการดำเนินการทดลองเพื่อบำบัดยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในน้ำ DI, น้ำที่มีการปรับสีคาราเมลเพื่อเป็นตัวแทนของอาหารที่มีของแข็งที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายน้ำเกลือ ระบบถังโอโซน-ยูวีเป็นระบบปิดที่มีการ circulating เป็น batch การทดลอง โอโซนถูก generated

จากเครื่องกำเนิดโอโซนโดยโอโซนดังกล่าวถูกผสมเข้าไปในของเหลวจาก liquid reservoir โดยปั๊มไดอะแฟรม (2088-564-144 model, Shurflo, Maxico) ที่ 5 ลิตร/นาที อัตราการป้อนของโอโซนแก๊สถูกฟิกส์ที่ 2 ลิตรต่อนาที แก๊สโอโซน (O_3) ถูกละลายในของเหลว (liquid stream) โดยผ่านอุปกรณ์ sparging ที่ตำแหน่งด้านก้นของชุดคอลัมน์โอโซน ของเหลวที่มีโอโซนผสมอยู่ (ozonated liquid) ไหลผ่านระบบการฆ่าเชื้อด้วย UV – C sterilizer ซึ่งประกอบด้วยหลอด UV จำนวน 4 หลอด (หลอดมีขนาดความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรที่ 16 วัตต์ ประสิทธิภาพในแต่ละอันที่ 2.88 kJ/m^2) การวัดอันที่ 2 ของความเข้มข้นของโอโซนเป็นที่ 450 – 550 mV เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าระดับความเข้มข้นของโอโซนยังคงคงที่โดยการใช้ oxidation reduction potential (ORP) เซนเซอร์ เพื่อที่จะทำการฆ่าเชื้อสารละลายที่เตรียม (aqueous solution) สารละลาย 6 ลิตรที่จะดำเนินการทดสอบถูกหมุนเวียนในระบบการฆ่าเชื้อด้วย O_3-UV prototype เป็นเวลา 30 นาที (รูปที่ 3.3) โดยในระหว่างการหมุนเวียนของ aqueous solution จะถูกฆ่าเชื้อด้วย O_3, UV และ O_3-UV ตัวอย่างใน reservoir และที่ discharge ของการฆ่าเชื้อด้วย UV ถูกเก็บด้วยสภาวะปราศจากเชื้อที่เวลา 5 นาที การลดลงของเซลล์ *E. coli* ถูกประมวลผลด้วยอัตราส่วนของ log (N/N_0) ซึ่ง

N = ปริมาณของเซลล์ *E. coli* หลังจากการฆ่าเชื้อด้วย O_3, UV และ O_3-UV

N_0 = ปริมาณของเซลล์ *E. coli* เริ่มต้น

1.8 การวิเคราะห์สีและการส่งผ่าน

ตัวอย่างสารละลายคาราเมลแต่ละความเข้มข้นถูกนำไปบรรจุลงใน 96-well flat bottom microplate (Corning, Tewksbury, MA, USA) ที่ปริมาณ 200 µl โดยการใช้ multi-channel pipette ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายคาราเมลที่ wavelength ต่างๆ (340, 405, 450, 490, 550, 590, 600, และ 650 nm) ถูกวัดด้วยเครื่อง microplate reader (M965, Metertech, Taiwan) สารละลายสีคาราเมลแสดงให้เห็น peak ของการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดที่ 405 นาโนเมตร ที่ pH เป็นกลาง โดยที่ wavelength ดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการวัดตัวอย่างตลอดการทดลอง

1.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทุกการทดลอง แยกตามเวลาโดยถูกนำไปทำการบำบัดฆ่าเชื้อที่เงื่อนไขต่างๆ โดยดำเนินการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง ผลการทดลองถูกนำไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Minitab 16 และข้อมูลถูกแสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM (standard error of mean) ข้อมูลจากผลการทดลองทั้งหมดถูกนำมา processed โดยการใช้

general full factorial กับเวลา และการดำเนินการทดลองเป็น factors สำหรับการรายงานการมีชีวิตของ *E. coli* อยู่ในรูปแบบอัตราส่วนการมีชีวิต

1.10 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

รูปแบบทางสถิติ 3^k factorial Box-Behnken ถูกนำมาใช้ในการทดลองเพื่อ optimize พารามิเตอร์ที่สำคัญสำหรับการปรับปรุงให้ดีขึ้นของการผลิตไฮโดรเจนสำหรับ 3 factor, Box-Behnken ได้ดีไซน์เพื่อนำเสนอประโยชน์บางอย่างที่เป็นประโยชน์ในความต้องการเพื่อดำเนินการทดลอง และเป็น rotatable ถ้า variance ได้ทำนายผลกระทบที่จุดต่างๆ ของ χ ขึ้นกับระยะทางของ χ จากการ design ที่จุดตรงกลาง (Box และ Behnken, 1960) การออกแบบการทดลองแบบ 3^k factorial อนุญาตให้เกิดการประมาณประสิทธิภาพของระดับที่ 2 ของ quadratic polynomials และให้การทำงานร่วมกันของค่าที่มีความเหมาะสมภายในส่วนของ 3 dimensional observation space ในการพัฒนาสมการ regression ความสัมพันธ์ระหว่าง codes values และค่าจริงได้ถูกบรรยายตามสมการข้างล่าง

$$\chi_i = (X_i - X^*_i)/\Delta X_i$$

โดย χ_i เป็นค่า code ของ *i*th ไม่ขึ้นกับ variable

X_i เป็นค่า uncoded ของ *i*th ไม่ขึ้นกับ variable

X^*_i เป็นค่า uncoded ของ *i*th ไม่ขึ้นกับ variable ที่ center point

ΔX_i เป็น step การเปลี่ยนค่าระดับของ variables และการออกแบบการทดลอง อัตราส่วนการมีชีวิตถูกเชื่อมโยงกับการเปลี่ยนแปลงที่เป็นเนื้อเดียวกันของความเข้มข้นของเกลือต่าง ๆ (1, 20 และ 20% w/v) สำหรับสารละลายสีคาราเมลถูกวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.25, 0.5 และ 1 โดยใช้ wavelength ที่ 405 นาโนเมตร และเวลาที่ใช้ในการบำบัดเป็นที่ 5, 15 และ 25 นาที ของสารละลาย aqueous solution การทดลองทั้งหมด 12 การทดลองถูกดำเนินการโดยการใช้สถิติ 3^k factorial Box-Behnken design และ center point ถูกทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อประมาณความคลาดเคลื่อนของการทดลอง สำหรับการทำนายเงื่อนไขที่เหมาะสม สมการ quadratic polynomial ถูกนำมา fit กับความสัมพันธ์ของค่าการตอบสนอง variable response (i.e., survival ratio) และประมาณค่าตามสมการ

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^{3} \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{3} \sum_{i<j=2}^{3} \alpha_{ij} X_i X_j$$

โดยที่ X_i เป็นค่า input variable ซึ่งมีอิทธิพลกับการตอบสนองของค่า Y

α_0 เป็น *i*th linear coefficient

α_{ij} เป็น *ij*th interaction coefficient

การใส่ข้อมูลค่าของ X_i, X_i และ X_i สอดคล้องกับค่าสูงสุดของค่า Y ถูก solved โดยการ setting partial derivatives ของฟังก์ชัน กับที่ 0

2. การศึกษาและเปรียบเทียบการผลิตละอองอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและรา โดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารละลายโอโซนและหลอดยูวีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

คลื่นอัลตร้าโซนิคพลังงานสูงซึ่งผลิตจากตัวแปลงสัญญาณ piezoelectric ถูกนำมาใช้ในการผลิตหมอกหรือละอองลอยที่ประกอบไปด้วยอนุมูลอิสระต่างๆ ทั้งนี้ใช้กระบวนการออกซิเดชันขั้นสูงที่แตกต่างกันในหลายรูปแบบในการสร้างอนุมูลอิสระโดยการกระจายตัวของละอองให้ฤทธิ์ในการเกิดออกซิเดชันสูง สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* / coliform และเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญบนผิวหน้า กระบวนการออกซิเดชันขั้นสูงนี้ประกอบด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) สารละลายโอโซนโดยใช้ (เครื่องกำเนิดโอโซนขนาด 7 กรัม/ชั่วโมงที่อัตราการไหลก๊าซออกซิเจน 2 ลิตร/นาที) และหลอดยูวี (4 หลอด แต่ละหลอดมีขนาด 15 วัตต์ ความเข้มแสงรวม 2.88 กิโลจูล/ตารางเมตร)

โดยรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงดังต่อไปนี้

2.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

- *Escherichia coli* DMST 4609
- *Aspergillus niger* ATCC 44310

2.2 เครื่องมืออุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 0.0001 g (Metter Toledo Model AG204, Switzerland)

- เครื่องชั่ง 0.01 g (Metter Toledo Model GG4002 - S, Switzerland)
- ตู้ปลอดเชื้อ (DWYER Series 0325, USA)
- ตู้เขย่าเชื้อ (New Brunwick Scientific, Enfield, CT)
- ตู้เย็น 4°C (Hitachi 35S I, Japan)
- ตู้บ่ม (Memmert Model ULM500, Japan)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Becthai and Hirayama Model HA300D, Japan)
- Microplate reader (M965, Metertech, Taiwan)
- 6-microwel plate, Costar, USA
- 96 – well flat bottom microplate (Corning, Tewksbury, MA)
- 96-well U-bottomed polypropylene plate (Nunc, Rochester, NY, USA)
- Multichannel pipette (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Mechanical stepper (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Auto pipette volume 10 microliter, Autopipette, USA
- Auto pipette volume 200 microliter, Autopipette, USA
- Auto pipette volume 1000 microliter, Autopipette, USA
- Digital camera, Olympus SP 570 UZ, Indonesia
- Plastic petri dishes
- ชุดการผลิตละอองลอยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.3 อาหารและสารเคมีที่ใช้

2.3.1 อาหารแข็งไม่จำเพาะ (Non-selective media)

- Trypticase Soy Broth (TSB), HIMEDIA (Ref M011-500G), USA
- Plate Count Agar (PCA), Difco, USA

2.3.2 อาหารแข็งจำเพาะ (Selective media)

- Potato Dextrose Broth (PDB), HIMEDIA (Ref M403-500G), India
- Potato Dextrose Agar (PDA), HIMEDIA (Ref M096-500G), India
- Chromocult coliform agar (CCA)

2.3.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2), Merk, Germany

2.4 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

2.4.1 Escherichia coli

เชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์จะถูก streak ลงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA, Lab M, UK) เพื่อให้ได้เชื้อเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นเชื้อเดี่ยวดังกล่าวจะถูกเขี่ยด้วย loop ลงในอาหาร TSB ปริมาณ 100 ml และนำเข้าเครื่องเขย่าที่ 200 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ประมาณ 10^7 CFU/ml (Hayashi และ Yamasaki, 1998; Karoonuthaisiri et al., 2009)

2.4.2 Aspergillus niger

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองจะถูก resuscitated ในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB, Lab M, UK) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน

2.5 การเตรียมอาหาร media ต่างๆ

2.5.1 Tryptic Soy Broth (Soybean-casein digest medium)

อาหาร TSB ถูกเตรียมโดยการชั่งสารจำนวน 3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีด้วย autoclave

2.5.2 Plate count agar (PCA)

การเตรียม PCA ถูกเตรียมโดยการชั่งสารจำนวน 4.7 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 200 ml จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีด้วย autoclave

2.5.3 Potato dextrose agar/broth (PDA/PDB)

- การเตรียมอาหารแข็ง

การเตรียม PDA ถูกเตรียมโดยการชั่งสารจำนวน 7.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 200 ml จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีด้วย autoclave

- การเตรียมอาหารเหลว

การเตรียม PDB ถูกเตรียมโดยการชั่งสารจำนวน 4.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 200 ml จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีด้วย autoclave

2.5.4 การเตรียม Chromocult coliform agar (CCA)

การเตรียม CCA ถูกเตรียมโดยการชั่งสารจำนวน 2.65 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml จากนั้นนำไปทำการให้ความร้อนด้วยอุณหภูมิระดับน้ำเดือด

2.6 การเตรียมสารเคมี

สารยับยั้งการเจริญเติบโตถูกเตรียมจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50% (Merck) สารละลายบัฟเฟอร์ถูกเตรียมจาก 0.1 โมลาร์ ของกรดซิตริกโมโนไฮเดรต (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ).

2.7 สภาวะการเจริญเติบโตและการนับจำนวนเซลล์

ในแต่ละ strain ที่ใช้ในการทดสอบถูกถ่ายโอนไปยังพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar media) ในรูปแบบจาน Petri ขนาดเล็ก อาหาร Potato dextrose agar (PDA, Lab M, UK) และอาหาร Plate count Agar (PCA, Difco, USA) ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* / *coliform* และโคโลนีของ *A. Niger*, ตามลำดับ ปริมาตรของตัวอย่างที่จะทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 30 ไมโครลิตรของตัวอย่างปริมาณ 25 กรัม โดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^4 CFU / cm^2 ถูกแพร่กระจายบนพื้นผิวของ agar ด้วยการใช้ลูกแก้ว เพลทที่ใช้ในการ inoculated ถูกติดตั้งอยู่ในห้องที่ใช้ในการทดสอบการ fume ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งมีขนาด (34 * 34 * 34 cm^3) ปริมาณเซลล์ที่นับหลังจากการ fumigation ถูกดำเนินการโดยการบ่มไว้ที่ด้านบนและด้านข้าง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C สำหรับการนับเซล์แบคทีเรีย แต่ถ้าเป็นการนับราเป็นการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 – 7 วัน (Du J et al., 2003)

2.8 การผลิตละอองลอยของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การเกิดการ fume ของไฮดรอกซิลเรดิคอล โดยเกิดจากการผสมโอโซนและสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยการใช้ venture mixer (Rano tech, Thailand) โอโซนถูกผลิตโดยการป้อนก๊าซออกซิเจน (ที่สามารถปรับอัตราจาก 0 ถึง 2 ลิตรต่อนาที) ผ่านท่อโอโซน (7 กรัม/ลิตรระบายความร้อนด้วยอากาศ หลอดโอโซนเซรามิค, อาริน, ประเทศไทย) การไหลเวียนของอนุมูลไฮดรอกซิลและ H_2O_2 ถูกโฟโตคาตาไลท์ด้วยหลอดยูวีจำนวน 4 หลอด ที่กำลังการผลิต 15 วัตต์ต่อหน่วย ติดตั้งอยู่หลังปั๊มที่ใช้ในการหมุนเวียนเพื่อกระตุ้นอนุมูลอิสระเพิ่มเติมในระบบ ปริมาตรที่ใช้ในการทำงานทั้งหมดในระบบนี้คือ 10 ลิตร เครื่องแปลงสัญญาณ piezoelectric จำนวน 3 เครื่อง (อัตราการระเหยไอเป็น 133 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง) ถูกติดตั้งภายในเพื่อสร้างควันไฮดรอกซิลอิสระ การพ่นละอองด้วยความเร่งโดยพัดลม ขนาด 5 วัตต์ สำหรับ

ดำเนินสร้างควันผ่านท่อระบายเข้าสู่ช่องด้านล่าง การกระจายตัวของควันภายในห้องถูกตรวจสอบโดยการเปลี่ยน %RH โดยใช้ data logger จำนวน 2 เครื่อง (ด้านบนและด้านล่างของ datalogger) ควันส่วนเกินหลุดออกจากห้องผ่านที่บริเวณทางออกของระบบ

2.9 การวิเคราะห์สถิติ

การนับจำนวนเซลล์ CFU ต่อมิลลิลิตรถูกแปลงเป็นค่า log 10 ของจำนวนเซลล์ที่นับได้ ข้อมูลทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$ โดยออกแบบการทดลองแบบ Full Factorial Design

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

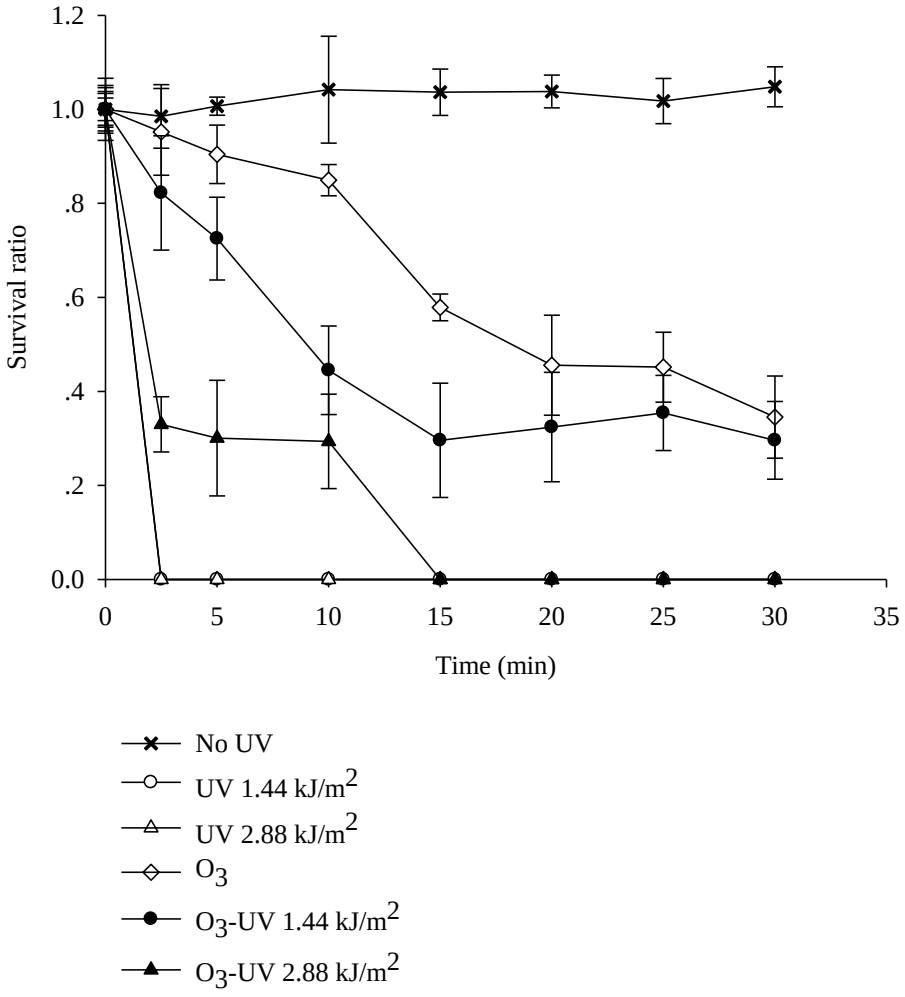
งานวิจัยได้ทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของการใช้ O_3 UV-C และ O_3 – UV ในแบบจำลองของเหลวที่มีสีคาราเมลและเกลือเป็นองค์ประกอบ โดยใช้เครื่องต้นแบบหมุนเวียนของเหลวที่อัตราการไหล 5 ลิตรต่อนาที และนอกจากนี้คณะทีมงานวิจัยยังได้มีการนำ O_3 UV-C ไปประยุกต์ใช้กับการยับยั้งการเจริญเติบของเชื้อแบคทีเรียและราด้วยละอองลอยของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยในงานวิจัยดังกล่าวมีการศึกษาและเปรียบเทียบการผลิตละอองอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและรา โดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารละลายโอโซนและหลอดยูวีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยรายละเอียดผลการทดลองและวิจารณ์ในแต่ละส่วนแสดงดังต่อไปนี้

4.1 การศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของการใช้โอโซน (O_3) ยูวี-ซี (UV-C) และโอโซนร่วมกับยูวี (O_3 - UV) ในแบบจำลองของเหลวที่มีสีคาราเมลและเกลือเป็นองค์ประกอบ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในแบบจำลองอาหารเหลวที่เป็นสารละลายสีคาราเมลและสารละลายน้ำเกลือ โดยในการทดลองการนับปริมาณเชื้อถูกดำเนินการโดยการใช้อาหาร TSA ซึ่งถูกบรรจุอยู่ใน 96-well เพลท การเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวเป็นเทคนิคการเพาะเชื้อขนาดเล็กเพื่อทำให้ง่ายขึ้นและให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ซึ่งเทคนิคดังกล่าวถูกพัฒนาโดยเขื่อนขันธ์เจริญและทิพยรัตน์ (2011) การใช้ร่วมกันระหว่าง O_3 , UV ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและการวัดประชากรควบคุมสำหรับเชื้อ *E. coli* ในสารละลายด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันถูกจำกัดที่เวลา 30 นาทีสำหรับเวลาในการฆ่าเชื้อในระบบปิด (closed-loop reactor) ซึ่งเป็นเครื่องต้นแบบระบบหมุนเวียน เป้าหมายหลักของงานวิจัยต้องการศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้ O_3 , UV การใช้ร่วมกันระหว่าง O_3 - UV ซึ่งเป็นกระบวนการแอดวานซ์ออกซิเดชั่นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* อิทธิพลของพารามิเตอร์คุณสมบัติทางฟิสิกส์ที่มีต่อการปนเปื้อนถูกทำการประเมินด้วยเหมือนกัน

4.1.1 UV, O_3 และการใช้ O_3- UV ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ในสารละลายน้ำปราศจากไอออน (DI)

สำหรับกระบวนการที่ไม่มีการใช้ UV และ O_3 เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ในน้ำปราศจากไอออน DI ถูกเก็บหมุนวนในเครื่องต้นแบบหมุนเวียนของเหลวของระบบการบำบัดฆ่าเชื้อด้วย O_3 - UV และยังคงมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยประมาณที่ 10^7 CFU/ml ในระหว่างเวลามากกว่า 30 นาที ที่อัตราการไหลหมุนวนของสารละลายเป็น 5 ลิตรต่อนาที การใช้ UV - O_3 เพียงลำพังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในสารละลาย medium ที่โปร่งแสง จำนวนของเซลล์ *E. coli* ถูกลดลงโดย 7-log ไปยังเงื่อนไขที่ปราศจากเชื้อใช้เวลาน้อยกว่า 2.5 นาที สำหรับที่ความเข้มของ UV-C 1.44 และ 2.88 kJ/m^2 ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ผลของการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ด้วยการใช้ O_3 เพียงอย่างเดียวให้แนวโน้มความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้น้อยกว่าที่การใช้ปริมาณแสง UV-C ที่ 1.44 และ 2.88 kJ/m^2 การใช้ O_3 สามารถที่จะลดปริมาณเชื้อลงได้ 4-5 log ภายในเวลา 30 นาที โดยโปรไฟล์การลดลงของ *E. coli* ค่อนข้างที่จะเชื่องช้าในระหว่างเวลา 10 นาทีแรก ตามด้วยที่ช่วง slope ที่ 2 ที่เป็นการตัดสินใจอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli*



รูปที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ในน้ำ DI ที่ถูกบำบัดด้วย UV, O_3 และ O_3- UV

การทำงานร่วมกันระหว่าง UV-C กับ O_3 สามารถที่จะยับยั้งเชื้อในระดับที่อัตราการลดลงของเชื้อที่น้อยกว่าการบำบัดฆ่าเชื้อด้วย O_3 และพัฒนาผลของการยับยั้งโดยรวม ที่ความเข้มของ UV-C เพิ่มขึ้นจาก 1.44 ถึง 2.88 สามารถที่จะพัฒนาประสิทธิภาพโดยรวมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ดี ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อด้วย O_3 - UV โดยโปรไฟล์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ด้วย O_3 ปริมาณ 1.44 kJ/m^2 ร่วมกับการใช้ UV แสดงให้เห็นประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เฉพาะ O_3 เพียงอย่างดียวในการฆ่าเชื้อ อย่างไรก็ตาม O_3 ที่ปริมาณ 2.88 kJ/m^2 ร่วมกับการใช้ UV สามารถที่จะลดปริมาณเชื้อได้ช้า *E. coli* (slow initial slope) ในการบำบัดด้วย O_3 ในระหว่างช่วง 10 นาทีแรก และพัฒนาการลดลงของเชื้อสุดท้ายเพื่อให้ได้ระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ ถึงแม้ว่า O_3 ที่ความเข้มข้น 2.88 kJ/m^2 ร่วมกับ UV มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ต่ำกว่าการบำบัดด้วย UV-C เพียงอย่างเดียว การลดลงที่ 7 log ถูกสังเกตได้ภายใน 15 นาที

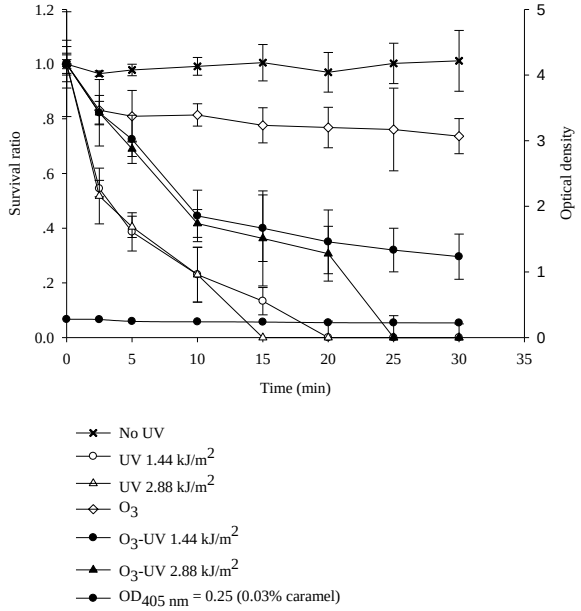
การใช้ UV ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ถูกพบว่ามีประสิทธิภาพในหลายๆ งานวิจัย (Falguere et al., 2011) มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการใช้ UV ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำหรืออาหารเหลว โดยประสิทธิภาพของ UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สามารถที่จะทำลายเชื้อได้เนื่องจากมันเป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายของ DNA/RNA ในเซลล์ และยังขึ้นอยู่กับปริมาณของ UV ที่ได้รับ เมื่อมีการปรากฏของฟองอากาศของก๊าซ O_3 ปริมาณ O_3 ที่มากในน้ำปราศจากไอออนสามารถที่จะขัดขวางการส่งผ่านของ UV-C สำหรับใช้ในการฆ่าเชื้อ โดยที่ปริมาณการส่งผ่านของ UV-C ที่น้อยเป็นผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *E. coli* น้อย Murakami et al. (2006) ได้รายงานความเข้มและเวลาที่ใช้ในการสัมผัสของการใช้ UV ร่วมกับการดูดกลืนแสงและการที่อาหารมีของแข็งปนอยู่ใน medium มีผลอย่างมากต่อการตัดสินใจในประสิทธิภาพของการใช้ UV ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ถึงแม้ความจริงที่ O_3 ได้มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับการล้าง/ทำความสะอาด และฆ่าเชื้อ (Pascual et al., 2007) มันตอบสนองโดยตัวมันเองในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* โดยถูกพบว่าช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการบำบัดฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคอื่นๆ ในการทดลอง ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อด้วย O_3 ถูกจำกัดด้วยความเข้มข้นของปริมาณ O_3 ที่ยังคงหลงเหลืออยู่ใน medium มันไม่ได้เป็นความเข้มข้นของ O_3 ที่ใช้แต่เป็น O_3 ที่ยังคงอยู่ที่จำเป็นสำหรับการฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ (Patil et al., 2009)

มันถูกสมติฐานที่ว่าทั้งโมเลกุลของ O_3 และ free radical (ไฮดรอกซิลแรดิคอล) ที่ผลิตได้โดย sequential ของกระบวนการ O_3 – UV มีความสำคัญในกลไกการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของการทำความสะอาด (Jung et al.,

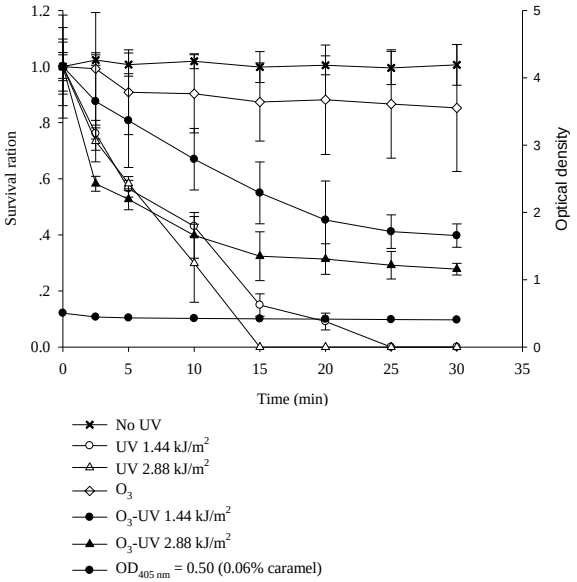
2008) การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ถูกเป็นสาเหตุมาจากการที่เซลล์ที่ห่อหุ้มและเมมเบรนเกิดการหยุดชะงักหรือเกิดการแตกสลายนำไปสู่การรั่วไหลของสิ่งที่อยู่ภายในเซลล์ (Kumar et al., 2016) เหมือนกับการยับยั้งสปอร์ของ *B. subtilis* ถูกจำลองในกระบวนการใช้งานร่วมกันระหว่าง O_3/UV ซึ่งมีปริมาณของ reactive OH radicals ที่สูงถูก assumed ว่าเป็นการเพิ่มให้เกิดขึ้น ตามที่การค้นพบของเราในการทำงานอย่างต่อเนื่องกันหรือการทำงานร่วมกันของการใช้ O_3 และ UV รายงานโดย Jung และอื่นๆ (2008) ที่ได้กล่าวไว้ว่าคุณสมบัติในการยับยั้งสปอร์ของ subtilis จากการสังเกตการณ์ในการใช้ UV - O_3 เหมือนกับการสังเกตในการทดลองอื่นๆ ที่มีการใช้ O_3 เพียงอย่างเดียว, ซึ่งไม่คำนึงถึงการใช้ UV ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์ *E. coli* ที่ยังมีชีวิต การยับยั้ง *E. coli* ของกระบวนการ O_3 – UV ถูกพัฒนาเป็นอย่างมากโดยความเข้มข้นของ UV – C ในการประยุกต์ใช้

4.1.2 การเปรียบเทียบผลของ UV, O_3 และ O_3 - UV ในสารละลายสีคาราเมล

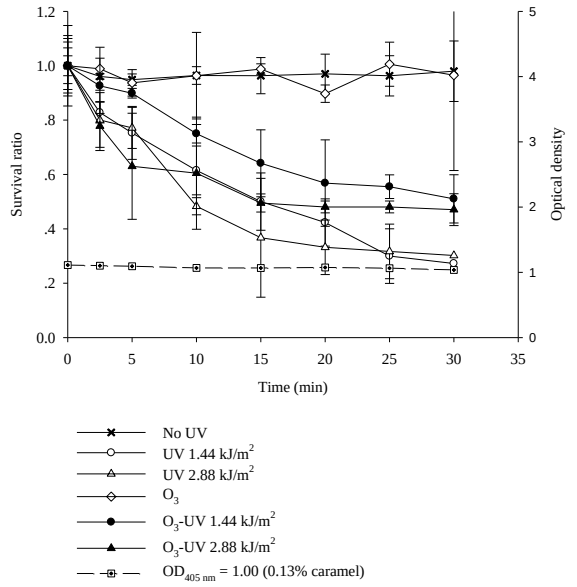
เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของน้ำ DI ถูกเลือกเพื่อใช้ในการจำลองอาหารเหลวที่หลากหลายชนิดด้วยสี (e.g. น้ำแอปเปิ้ล, soy sauce, น้ำปลา เป็นต้น) การแทรกแซงของสีในสารละลายมีผลกระทบกับ profile การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในทุกการทดลอง ผลของการใช้ O_3 และหรือ UV-C ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสงของสีคาราเมลไม่มีผลในระหว่าง 30 นาที (ดังแสดงในรูปที่ 4.2)



(a) สารละลายสีคาราเมลความเข้มข้น 0.03%



(b) สารละลายสีคาราเมลความเข้มข้น 0.06%



(c) สารละลายสีคาราเมลความเข้มข้น 0.13%

รูปที่ 4.2 ไคเนติกการลดลงของ *E. coli* โดยการใช้ UV, O_3 และการทำงานร่วมกันในสารละลายสีคาราเมล

เหมือนกับค่าของการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจาก 0.25 ถึง 1 ของการวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร สีคาราเมลในน้ำ DI เกิดการถูกทำลายเนื่องจากการละลายของ O_3 และประสิทธิภาพการทำลายของ O_3 ในการยับยั้ง *E. coli* ที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสีคาราเมล โดยโปรไฟล์ของการมีชีวิตของเชื้อ *E. coli* ที่ยังไม่ได้มีการบำบัดด้วยการทดลองใดๆ (รูปที่ 4.2c) ประสิทธิภาพของ UV-C มีผลต่อความทึบแสงของสีคารา

เมลของน้ำเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของน้ำ DI water ในรูปที่ 4.2a, เวลาที่ใช้ในการทำให้ถึงการลดลงของปริมาณ *E. coli* เป็น 7 log ของ *E. coli* ถูกขยับไปจากน้อยกว่า 2.5 นาทีในน้ำ DI ของการทดลองเป็น 20 และ 15 นาที สำหรับ 1.44 และ 2.88 kJ/m^2 ของการแผ่รังสีด้วย UV-C ตามลำดับ ค่าการดูดกลืนแสงถูกเพิ่มจาก 0.03 ถึง 0.13% ของสีคาราเมล ทั้งคู่ของ UV-C intensities สามารถยับยั้งเชื้อลดลงได้ 5 log ของ *E. coli* ที่ยังมีชีวิต (รูปที่ 4.2a และ 4.2c) จากการสังเกตโปรไฟล์การมีชีวิตของ *E. coli* มันสามารถที่จะถูกตีความการเพิ่มของสีคาราเมลมีผลต่อประสิทธิภาพความสามารถในการฆ่าเชื้อด้วย O_3 มากกว่าการฆ่าเชื้อด้วย UV-C โดยโปรไฟล์ของ O_3 ที่ 1.44 kJ/m^2 และ UV ที่ 2.88 kJ/m^2 มีความคล้ายคลึงกับที่สภาวะ 1.44 และ 2.88 kJ/m^2 ของการบำบัดฆ่าเชื้อด้วย UV-C กว่าการบำบัดด้วยการใช้ O_3 โดยเฉพาะที่การทดลองที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า

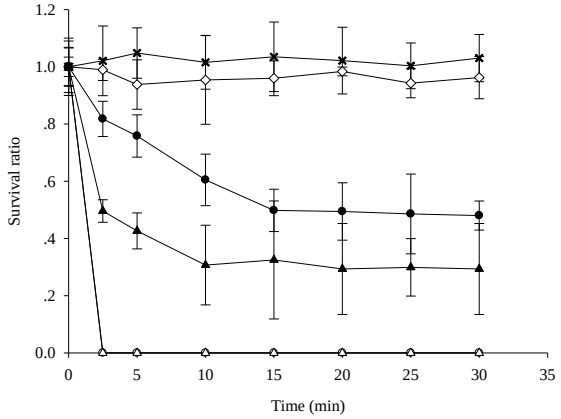
ได้มีเอกสารที่ดีที่แสดงให้เห็นว่าทั้งคู่ของ opacity ของผลิตภัณฑ์อาหารและเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายมีผลต่อประสิทธิภาพของทั้งการใช้ O_3 และการใช้ UV-C ในการฆ่าเชื้อในอาหารเหลว (Choudhary และ Bandla, 2012; Koutchma, 2008; Koutchma และ Parisi, 2004) ในการปรากฏขององค์ประกอบของสี สารเคมีออร์แกนิกส์ และของแข็งแขวนลอย การใช้ UV-C ที่ปริมาณแสงน้อยสามารถที่จะส่งผ่านไปในความขุ่นและสีของอาหารเหลวและการลดของประสิทธิภาพความสามารถในการฆ่าเชื้อด้วย UV-C ในการลดลงของระดับการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมือนกับการศึกษาโดยการใช้โมเดลของสารละลายคาราเมลและน้ำแอปเปิ้ลสังเกตจากการ deterioration ของประสิทธิภาพของ UV-C สำหรับการยับยั้งเชื้อ *E. coli* (Koutchma et al., 2004) อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้ลดความสำคัญผลของปริมาณซูโครส (ช่วงระหว่างจาก 5 ถึง 25°Brix) ในโมเดลของสารละลายสีคาราเมลเป็นการลดประสิทธิภาพของความสามารถในการฆ่าเชื้อของ UV-C อย่างมีนัยสำคัญ ตรงกันข้ามกับซูโครส การศึกษาการใช้เกลือโซเดียมและการแยกผลของปริมาณของแข็งทั้งหมดจากค่าการดูดกลืนแสง ผลการทดลองที่ชัดเจนนี้แสดงให้เห็นว่าทั้งคู่มีผลที่ strong ต่อประสิทธิภาพความสามารถในการฆ่าเชื้อด้วย UV-C

น้ำ DI มีปริมาณของ O_3 ที่น้อยที่สุดและมีปริมาณ O_3 หลงเหลืออยู่มากที่สุดสำหรับการฆ่าเชื้อ *E. coli* ในอาหารที่หลากหลาย รวมถึงสีคาราเมลในเคสที่ทำปฏิกริยาและการทำให้เป็นกลางของการละลาย O_3 (Pascual et al., 2007) ดังนั้นที่ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่สูงเพิ่มปริมาณระดับ O_3 และลดประสิทธิภาพของ O_3 การศึกษาการแยกแสดงให้เห็นว่าการละลายโปรตีน (bovine serum albumin) ที่ 20 ppm ลดระดับของปริมาณ O_3 ที่ยังหลงเหลืออยู่น้อยกว่าในน้ำ DI หรือน้ำที่บรรจุอยู่ใน insoluble solids อื่นๆ ตามที่ผลการ

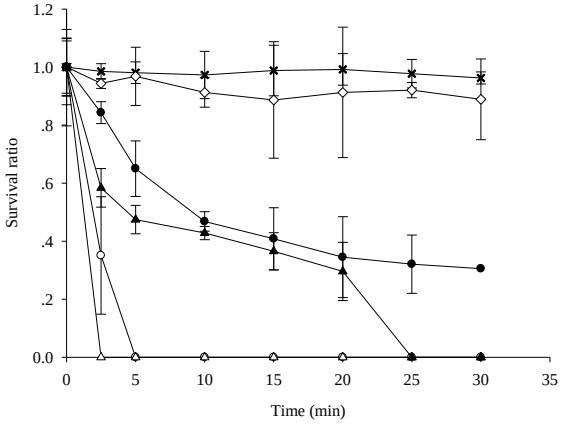
ทดลองประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อด้วย O_3 น้อยในน้ำ DI ด้วยปริมาณของแข็งที่สูง ด้วยปริมาณของ O_3 ที่ยังคงเหลือในน้ำ การฆ่าเชื้อด้วย O_3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งพวก mesophiles และปริมาณของโคลิฟอร์มในน้ำล้างที่สามารถลดปริมาณเซลล์จาก 4 เป็น 1 log หลังจาก 20 นาที ของการทดลอง (Selma et al., 2008) กลไกการยับยั้งเชื้อถูกสมมติฐานจากการออกซิเดชั่นของไขมันไม่อิ่มตัวของผนังเซลล์ การละลายของ O_3 ทำปฏิกริยากับไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่อยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เอนไซม์และวัสดุเจเนติกเป็นผลให้จุลินทรีย์ตายได้ ในขณะที่ประสิทธิภาพความสามารถในการยับยั้งของทั้งการใช้ O_3 และหรือการฆ่าเชื้อด้วย UV - C เป็นการเพิ่มความทึบของสารละลายและปริมาณของแข็งที่สามารถละลายได้ทั้งหมด ซึ่งการทำงานร่วมกันระหว่าง O_3 และ UV - C สามารถเพื่อที่จะ decouple การแทรกซ้อนจากการดูดกลืนแสงที่สูงในอาหารเหลวได้เป็นอย่างดี

4.1.3 การใช้ UV O_3 และ O_3– UV ในสารละลายน้ำเกลือ

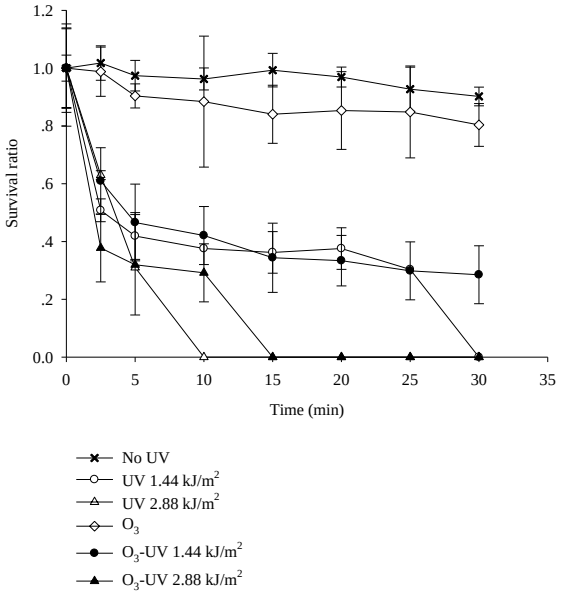
การใช้ความเข้มข้นของเกลือในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ในกระบวนการที่มีการใช้ O_3– UV โดยที่ปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่ต่ำประมาณ 1 % เหมือนกับมาตรฐานความเข้มข้นของเกลือทั่วไป ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือดังกล่าวทำให้เกิดความเสียหายกับประสิทธิภาพของ O_3 และ O_3 – UV ดังแสดงในรูปที่ 4.3a ประสิทธิภาพของการใช้ O_3 ถูกขัดขวางและการลดของ *E. coli* เกือบที่จะน้อยมากหรือไม่เป็นผลตามที่การทดลองการยับยั้งเชื้อในน้ำ DI ก่อนหน้านี้ การลดลงของเชื้อ 4-5 log ภายใน 30 นาที ถูกลดลงน้อยกว่า 1 log ด้วยการใช้ที่เวลาเดียวกัน การพัฒนาการใช้ UV-C ในการยับยั้งเชื้อด้วยระบบบำบัดการฆ่าเชื้อด้วย O_3– UV ถูกพบว่ามีผลกระทบด้วยเหมือนกันสำหรับตัวอย่างเช่น O_3 ที่ความเข้มข้น 2.88 kJ/m^2 ร่วมกับการใช้ UV ในการบำบัดยับยั้งเชื้อในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 1 % ไม่สามารถที่จะยับยั้งเชื้อและมีเพียงการลดลงของเชื้อที่ 5.20 – log reduction ถูกสังเกตภายใน 30 นาทีของเวลาที่ใช้ในการทดลอง การเติมเกลือ 1% ในน้ำ DI ไม่มีผลกับโปรไฟล์การลดลงของการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในการบำบัดยับยั้งเชื้อด้วย UV-C เหมือนกับการทดลองที่ใช้น้ำ DI อัตราการการมีชีวิตอยู่ของ *E. coli* ที่ปริมาณความเข้มข้นของเกลือ 1% NaCl ถูกนำไปสู่ที่ 0 ภายใน 2.5 นาที



(a) 1% NaCl



(b) 10% NaCl



(c) 20% NaCl

รูปที่ 4.3 กราฟการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในสารละลายน้ำเกลือที่มีการบำบัดฆ่าเชื้อด้วย UV, O_3 และ O_3 - UV

ตามที่ปริมาณเกลือในน้ำ DI ถูกเพิ่มความเข้มข้นจาก 1ไปเป็น 10% ที่ปริมาณเกลือที่ค่อนข้างสูงเริ่มที่จะมีผลกระทบกับการส่งผ่านของ UV – C ในการบำบัดยับยั้งเชื้อใน chambers (รูปที่ 4.3b) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 10% เพียงที่ความเข้มของ UV – C ที่สูง (2.88 kJ/m^2) ถูกพบว่าสามารถที่จะฆ่าเชื้อในตัวอย่างน้ำที่มีการ spiked เชื้อลงไปได้ภายใน 2.5 นาที เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ปริมาณการส่งผ่านของ UV – C ที่ปริมาณ 1.44 kJ/m^2ต้องการเป็น 2 เท่าเป็นเวลาที่ขยายออกไปเป็นที่ 5 นาที ที่ปริมาณของเกลือที่สูงให้ผลเป็นลบกับประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อด้วย O_3 ที่เห็นได้จากการใช้เกลือ 1 % ในการดำเนินการทดลอง อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงมีผลกระทบกับการมีชีวิตอยู่ของ *E .coli* ที่ความเข้มข้นของเกลือที่สูง produced การลดลงของ *E. coli* ที่สูงในทั้งคู่ของ O_3 - 2.88 kJ/m^2 UV และ O_3-1.44 kJ/m^2 UV แสดงให้เห็น steeper slope ของ profile การยับยั้งของ *E. coli* และให้ปริมาณการนับของ *E. coli* ที่น้อย

ที่ปริมาณความเข้มข้นของเกลือเป็น 2 เท่า และที่ระดับของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น intensified เงื่อนไขการโตที่ 20% ของเกลือ โดยตัวมันเองไม่เหมาะสมสำหรับ *E. coli* ในรูปที่ 4.3c การนับปริมาณเซลล์ของ *E. coli* ที่ไม่มี UV-C และหรือการบำบัดด้วย O_3 แสดงให้เห็นว่าการลดลงของการโตมากกว่า 30 นาที ที่ระดับเกลือดังกล่าวมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของ O_3ในปริมาณน้อย ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อด้วย UV-C เป็นที่สังเกตว่า profile การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของ UV-C และการบำบัดด้วย O_3- UV การใช้ O_3 ที่ 2.88 kJ/m^2 UV เกือบจะสามารถที่จะฆ่าเชื้อได้ใกล้เคียงกับ 2.88 kJ/m^2 UV ที่ไม่ต้องใช้ O_3 ผลการทดลองที่เหมือนกันถูกแสดงดำเนินการที่ O_3 - 1.44 kJ/m^2 UV มันเป็นที่น่าสังเกตว่าที่ปริมาณของความเข้มข้นของเกลือที่สูงมันจะไปเสริมการทำงานกับการบำบัดด้วย UV ในการฆ่าเชื้อ *E. coli*

ตามที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ ผลของการละลายของแข็งมี predominant กระทบต่อทั้งการฆ่าเชื้อด้วย O_3และ UV-C ที่ปริมาณของเกลือเป็น 1% ถูกพบว่าสามารถที่จะประนีประนอมประสิทธิภาพของการใช้ O_3 แต่มันไม่สามารถใช้ทดแทนประสิทธิภาพของ UV-C ไม่เพียงแต่ความเข้มข้นของ NaCl ที่มากกว่า 10% ที่เกลือมีผลกระทบกับประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อด้วย UV-C สามารถที่จะถูกสังเกตได้ ความหมายโดยนัยของการเติมเกลือเป็น 2 เท่า หนึ่งคือ NaCl ที่สามารถเปลี่ยนปริมาณของแข็งที่สามารถละลายได้ทั้งหมดในน้ำ DI อย่างที่ 2 ที่ปริมาณความเข้มข้นของ NaCl ทำให้ส่งผลกระทบเกิดความเสียหายด้วยระดับของออสโมติกที่สูงบน intracellular แอกทิวิตี้ที่สูง ในการ enhance ผลของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นผลมาจาก UV และระบบ O_3 Glass และคณะ (1992) ได้รายงานว่า NaCl ใน TSB ที่ความเข้มข้นมากกว่า 8.5% สามารถที่จะ

ยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ปริมาณเซลล์ทั้งหมดของ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งการเจริญถูกรายงานหลังจาก 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอรไรด์ประมาณ 20% ใน media ที่มีสารอาหาร การเจริญของ *E. coli* ในอาหารที่มีเกลือ 3.5% ของ NaCl และที่สูงกว่า สำคัญมากไปกว่านั้น *E. coli* เซลล์สามารถที่จะมีชีวิตในช่วงเวลานานถึงแม้ความเข้มข้นจะเป็นที่ 20 และ 30%

ถึงแม้ว่าในสารละลายที่สามารถส่องผ่านได้ดีของสารละลายน้ำเกลือ NaCl ในการยับยั้งเชื้อด้วย UV – C มีประสิทธิภาพในการลดลงของ *E. coli* การทำงานร่วมกันระหว่างระบบ O_3 และ UV – C สามารถที่จะลดปริมาณเซลล์ 2.7 ถึง 7 log ซึ่งการใช้ O_3 ในการฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียวพบว่ามีประสิทธิภาพที่ต่ำ ด้วยกิจกรรมของ O_3 มีผลต่อการออกซิเดชั่นโฟโตพลาสมิก และประสิทธิภาพของ UV – C เป็นสาเหตุให้เกิดการทำลายของ disrupt transcription และการทำซ้ำของ DNA ที่

4.1.4 การเปรียบเทียบผลของ UV O_3 และการใช้ O_3- UV ในการยับยั้ง *E. coli* ในสารละลายสีคาราเมล

เมื่อผลของสิ่งรบกวนทั้งคู่ถูกนำมาศึกษาร่วมกัน (การดูดกลืนแสงและปริมาณของแข็งทั้งหมด) การใช้พื้นผิวตอบสนองในการวิเคราะห์พื้นที่และ plots depicts ของสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะเงื่อนไขที่มีประสิทธิภาพต่ำจากการทดลอง ดังนั้นในการทดลอง 12 การทดลองถูกนำมา run โปรแกรม ตามที่ได้มีการบรรยายในวิธีการทดลองและวิธีที่ค่าพารามิเตอร์ต่างกัน ชี้ให้เห็นถึงการดีไซน์และผลของไฮโดรเจนที่วัดได้ (ตารางที่ 4.1) สถิติของการทดลองของค่าที่วัดได้ตามที่ผล response ที่วัดได้ อธิบายได้ว่าไฮโดรเจน yield สอดคล้องกับการทำงานร่วมกันในแต่ละอันซึ่งถูกสรุปไว้ในตาราง การใช้พื้นผิวตอบสนองในการวิเคราะห์ผลที่ได้ในสมการเอมไพริคัลแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการมีชีวิตของ *E. coli* และผลของสิ่งรบกวนทั้ง 2 แสดงดังต่อไปนี้

ที่การทดลองโดยใช้ 2.88 kJ/m^2 UV

$$Y_{CODE} = -0.125X_1 + 0.2775X_2 - 0.18X_3 + 0.025X_1X_3 - 0.1X_2X_3 + 0.775X_1^2 + 0.1475X_2^2 + 0.1825X_3^2 \quad (4.1)$$

$$Y_{ACTUAL} = 0.463157 - 0.0229444X_1 + 0.463404X_2 - 0.064532X_3 + 0.000372X_1X_2 + 0.000212X_1X_3 - 0.01848X_2X_3 + 0.000868X_1^2 + 0.44X_2^2 + 0.001825X_3^2 \quad (4.2)$$

การใช้ O_3

$$Y_{CODE} = 0.985117 + 0.00671955X_1 - 0.119618X_2 - 0.014899X_3 - 0.0107397X_1X_2$$

$$-0.00008X_1X_3 - 0.00296447X_2X_3 - 0.000005X_1^2 - 0.243333X_2^2 + 0.000513311X_3^2 \quad (4.3)$$

$$Y_{ACTUAL} = 0.985117 - 0.00671955X_1 - 0.119618X_2 - 0.014899X_3 - 0.0107397X_1X_2 - 0.00008X_1X_3 - 0.00296447X_2X_3 + 0.0000056X_1^2 + 0.243333X_2^2 + 0.0005133X_3^2 \quad (4.4)$$

การทำงานร่วมกันระหว่างการใช้ O_3 และ UV-C ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

$$Y_{CODE} = 0.456987 - 0.00306501X_1 + 0.791167X_2 - 0.0246957X_3 + 0.0182062X_1X_3 - 0.00629645X_2X_3 + 0.0001X_1^2 - 0.613333X_2^2 + 0.0005098X_3^2 \quad (4.5)$$

$$Y_{ACTUAL} = 0.456987 - 0.00306501X_1 + 0.791167X_2 - 0.0246957X_3 + 0.0182062X_1X_2 - 0.0009X_1X_3 - 0.006296X_2X_3 + 0.000137 + 0.613333X_2^2 + 0.000509X_3^2 \quad (4.6)$$

การทดลองที่ 4.1 การออกแบบการทดลองแนะนำโดย Minitab software เวอร์ชั่นที่ 16

Trial	X_1	X_2	X_3	Survival ratio		
				UV-C (2.88 kJ/m^2)	O_3	O_3-UV (2.88 kJ/m^2)
1	10	0.50	15	0.00	0.87	0.31
2	10	0.25	25	0.00	0.91	0.00
3	10	0.50	15	0.00	0.85	0.30
4	20	0.25	15	0.00	0.89	0.00
5	10	1.00	25	0.46	0.94	0.00
6	10	1.00	5	0.86	1.00	0.59
7	1	0.25	15	0.00	0.90	0.28
8	10	0.25	5	0.00	0.92	0.59
9	20	0.50	5	0.47	0.96	0.48
10	10	0.50	15	0.00	0.85	0.31
11	20	0.50	25	0.00	0.90	0.00
12	20	1.00	15	0.45	0.82	0.30
13[a]	1	0.50	25	0.00	0.87	0.38
14[a]	1	1.00	15	0.45	0.95	0.33

15[a]	1	0.50	5	0.57	0.9	0.50

โดยที่: X_1 = ความเข้มข้นของเกลือ (w/v%), X_2 = ค่าการดูดกลืนแสง (w/v%) และ X_3 = เวลา (นาที)

[a] ที่จุดตรงกลางถูกทำซ้ำเป็น 3 เท่า

ตารางที่ 4.2 ANOVA สำหรับอัตราส่วนการมีชีวิตของการยับยั้งด้วย UV ที่ความเข้มของการส่งผ่าน 2.88 kJ/m^2

Factors	Statistics				
	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	*F*-value	*P*-value
Model	1.09851	9	0.122056	6.42	0.027
X_1	0.00100	1	0.018411	0.97	0.370
X_2	0.67337	1	0.005752	0.30	0.606
X_3	0.25920	1	0.122736	6.46	0.052
X_1X_2	0.00001	1	0.000007	0.00	0.985
X_1X_3	0.00173	1	0.001627	0.09	0.782
X_2X_3	0.02028	1	0.020279	1.07	0.349
X_1^2	0.01402	1	0.022526	1.19	0.326
X_2^2	0.00593	1	0.010624	0.56	0.488
X_3^2	0.12298	1	0.122984	6.47	0.052
Residual	0.09499	5	0.018997	-	-
Lack of fit	0.09499	3	0.031662	*	*
Pure error	0.00000	2	0.000000	-	-
Total	1.19349	14			

R^2 = 92.04%

ตารางที่ 4.3 ANOVA สำหรับอัตราส่วนการมีชีวิตของการยับยั้งด้วย O_3

Factors	Statistics				
	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	*F*-value	*P*-value
Model	9	0.024891	0.002766	2.11	0.212
X_1	1	0.000329	0.001579	1.21	0.322
X_2	1	0.001946	0.000383	0.29	0.612
X_3	1	0.003200	0.006542	5.00	0.076
X_1X_2	1	0.006189	0.006189	4.73	0.082
X_1X_3	1	0.000233	0.000239	0.18	0.687
X_2X_3	1	0.000522	0.000522	0.40	0.556
X_1^2	1	0.000147	0.000001	0.00	0.980
X_2^2	1	0.002470	0.003249	2.48	0.176
X_3^2	1	0.009856	0.009728	7.43	0.042
Residual	5	0.006549	0.001310	-	-
Lack of fit	3	0.006282	0.002094	15.70	0.060
Pure error	2	0.000267	0.000133	-	-
Total	14	0.031440	-	-	-

R^2 = 79.17%

ตารางที่ 4.4 ANOVA สำหรับอัตราส่วนการมีชีวิตของการบำบัดด้วยทำงานร่วมกันระหว่าง O_3- UV

Factors	Statistics				
	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	*F*-value	*P*-value
Model	9	0.550715	0.061191	5.40	0.039
X_1	1	0.063498	0.000329	0.03	0.871
X_2	1	0.008622	0.016767	1.48	0.278
X_3	1	0.396050	0.017975	1.59	0.400
X_1X_2	1	0.017785	0.017785	1.57	0.330
X_1X_3	1	0.029670	0.029810	2.63	0.266
X_2X_3	1	0.002354	0.002354	0.21	0.668
X_1^2	1	0.000436	0.000568	0.05	0.832

X_2^2	1	0.022914	0.020644	1.82	0.235
X_3^2	1	0.009385	0.009598	0.85	0.400
Residual	5	0.056658	0.011332	-	-
Lack of fit	3	0.056591	0.018864	565.91	0.002
Pure error	2	0.000067	0.000033	-	-
Total	14	0.607373	-	-	-

R^2 = 90.67%

ดังนั้น 12 การทดลองในการยับยั้งถูกนำมาดำเนินการทดลองตามที่ได้บรรยายในวัสดุและวิธีการทดลองที่ค่าพารามิเตอร์ที่แตกต่างกันชี้ให้เห็นโดยการออกแบบและผลของการมีชีวิตอยู่ของ *E. coli* ถูกวัดลงในตารางที่ 4.1 ตามสถิติของการทดลองของการทดสอบค่า variable ตลอดค่าตอบสนองที่วัดได้ อธิบายอัตราการมีชีวิตอยู่ของ *E. coli* สอดคล้องกับในแต่ละการทำงานร่วมกัน ถูกสรุปไว้ในตารางสรุปผลการวิเคราะห์ด้วย Analysis of variance (ANOVA) ของการทดลองของรูปแบบ quadratic model fitting ที่แสดงในตารางที่ 4.2 ANOVA เป็นสิ่งจำเป็นในการทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและเพียงพอในรูปแบบของแบบจำลอง สมการความสัมพันธ์เหล่านี้ของการทดลอง UV-C เพียงอย่างเดียว (สมการ 4.1 – 4.2) แสดงให้เห็นที่ 2.88 kJ/m^2 UV มีประสิทธิภาพสูงที่ระดับของค่าการดูดกลืนแสงน้อย (รูปที่ 4.4a) และยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยของ *E. coli* ที่มีความขุ่นทึบสูง การเติมเกลือดูเหมือนจะ enhance ผลของ UV-C ในการยับยั้ง *E. coli* แต่มีช่วง range ที่เหมาะสมเกิดขึ้นในระหว่าง 5 ถึง 18% ของ NaCl เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของการส่งผ่านของปริมาณ UV ที่ปริมาณของแข็งที่สูง (รูปที่ 4.4b) ผลกระทบที่เป็นลบจากปริมาณของแข็งทั้งหมดและการส่งผ่านของ UV-C ที่ต่ำเอาชนะผลประโยชน์ของการเติม osmotic stress ในการทำลายผนังเซลล์ เกี่ยวกับปริมาณเกลือ มีเวลาที่เหมาะสมสำหรับ UV-C ระหว่างเวลา 15 และ 25 นาที อย่างไรก็ตามสำหรับผลของการเติมสีคาราเมล การให้เวลาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่นานขึ้นมีผลอย่างมากในการยับยั้ง *E. coli* การเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อด้วย UV-C การใช้ O_3ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่น้อย (รูปที่ 4.4 a-c) ตามที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีคาราเมลและสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ประสิทธิภาพของการใช้ O_3 ลดลง บางทีเกิดจากการจำกัดของความสามารถในการละลาย O_3 ที่เริ่มที่จะเลวร้ายและให้ negatively affected โดยการปรากฏของ water – soluble สีคาราเมลในน้ำ DI water (รูปที่ 4.4a) อย่างไรก็ตามที่ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงจากการเติมเกลือสามารถที่จะ enhance ประสิทธิภาพของการใช้ O_3 เนื่องจากเป็นการเติม hypertonic stress อย่างหนึ่ง การใช้ O_3 ค่อนข้างที่จะ sensitive กับการเติมเกลือและไม่ sensitive กับความเข้มข้นของเกลือ (รูปที่ 4.4b) การบำบัดยับยั้งเชื้อด้วยการใช้ O_3 ที่นานขึ้น ต้องการเพื่อ

ชักนำให้นานขึ้นในการยับยั้ง *E. coli* ตามที่การดูดกลืนแสงดูเหมือนจะมีข้อจำกัดในเรื่องของความเข้มข้นของสารละลายสีคาราเมล และเวลาที่ใช้ในการบำบัดซึ่งการใช้ O_3 สามารถที่จะถูกใช้ในการยับยั้ง *E. coli* (รูปที่ 4.4c) นอกช่วงที่เหมาะสม การใช้ O_3 ดูเหมือนจะมีประสิทธิภาพต่ำ

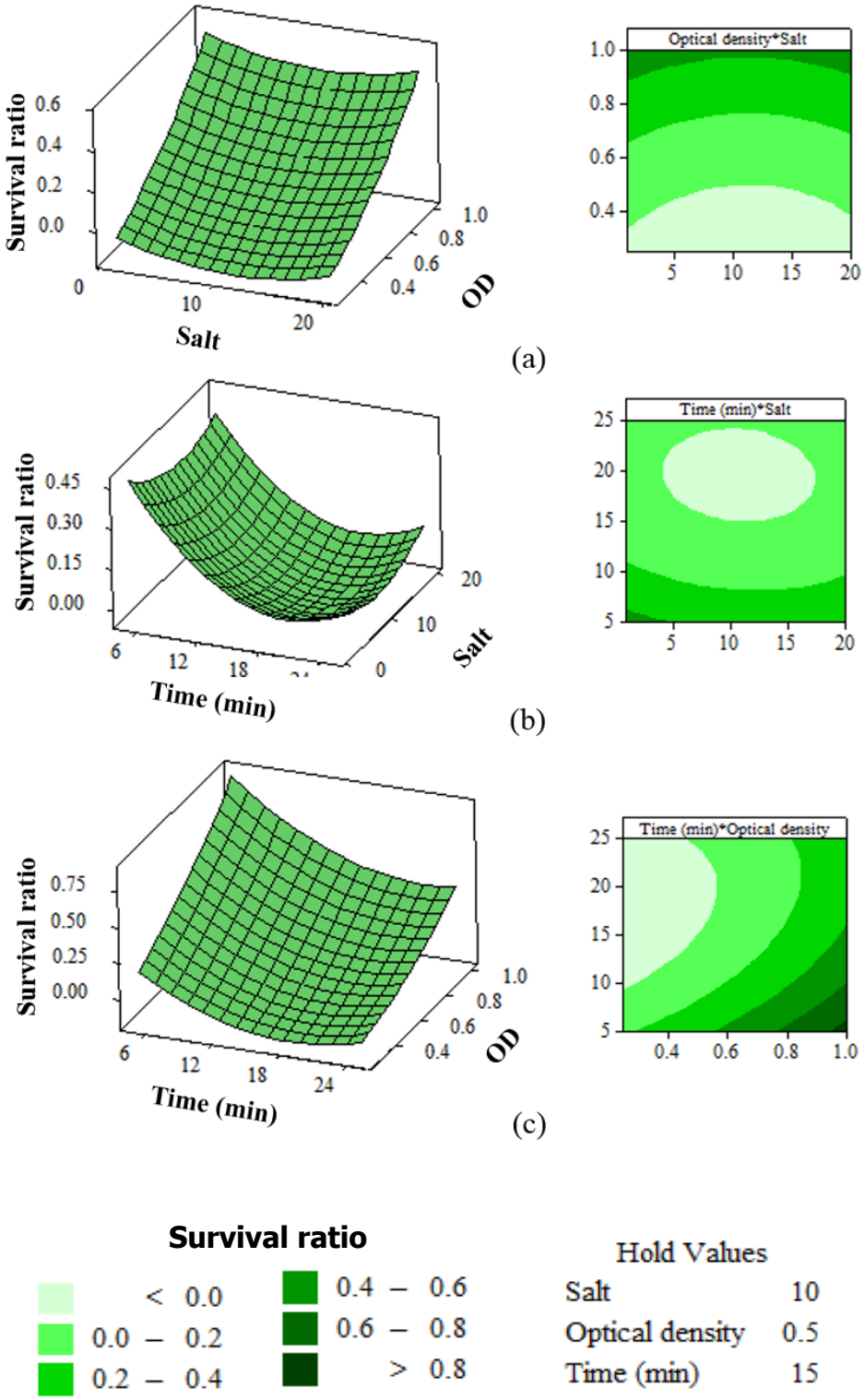
เมื่อเปรียบเทียบการทำงานร่วมกันของการใช้ O_3 และ UV – C ที่ความเข้มข้น 2.88 kJ/m^2 ในเรื่องของประสิทธิภาพโดยรวมของการยับยั้ง *E. coli* ในรูปแบบของสารละลายคาราเมลและสารละลายเกลือ การบำบัดยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยการทำงานร่วมกันไม่มีประสิทธิภาพในสารละลายสีคาราเมลที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำที่ได้มีการบำบัดยับยั้งเชื้อด้วย UV – C (รูปที่ 4.4a and 4.6a) การมีปริมาณเกลือที่มากในการบำบัดทำงานร่วมกันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* (Fig. 4.6a) เมื่อมีเกลือในระบบ การบำบัดทำงานร่วมกันมีความ sensitive กับเกลือในการฆ่าเชื้อด้วย O_3 การปรากฏของ UV-C ที่มีความเข้มสูงมีอิทธิพลกับการยับยั้ง *E. coli* (Fig 4.5b and 4.6b) ถึงแม้ว่าการยับยั้ง *E. coli* ค่อนข้างที่จะไม่ sensitive กับปริมาณของเกลือที่ปรากฏ การขยายเวลาในการบำบัดยับยั้งเชื้อด้วยเทคนิคการทำงานร่วมกันสามารถที่จะพัฒนาประสิทธิภาพในการบำบัด มีการพัฒนาการยับยั้ง *E. coli* อย่างมีนัยสำคัญในแบบจำลองสารละลายสีคาราเมลที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงและมีความเข้มข้นของเกลือสูง (รูปที่ 4.6c) ด้วยการทำงานร่วมกัน การขยายเวลาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*

ข้อจำกัดของการส่งผ่านของ UV-C ในประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคและรูปแบบโมเดลเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ถูกรายงานในหลากหลายอาหารเหลวและประสิทธิภาพที่สูงขึ้นกับคุณสมบัติทางด้านการดูดกลืนแสงของอาหาร (Choudhary และ Bandla, 2012; Guerrero-Beltran และ Barbosa-Canovas, 2004; Char et al., 2010; Donahue et al., 2004) ตามที่ความจุความสามารถในการส่งผ่านของแสงยูวีลด เป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารใน medium สูงขึ้น อาหารที่มีความขุ่นทึบเหมือนกับโมเดลของสารละลายสีคาราเมลเป็นปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมากในการลดลงของประสิทธิภาพของ UV-C และได้มีการแนะนำเพื่อเป็นกระบวนการในระบบเป็นแผ่นเลเยอร์ของ UV-C มันเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเข้าใจข้อจำกัดของการส่งผ่านของ UV-C สำหรับความสำเร็จในการใช้ UV-C ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่สูง Caminiti et al. (2012) ศึกษาประสิทธิภาพของ UV ในน้ำผลไม้ที่มีความขุ่นทึบและรายงานโดยประมาณว่าแสง UV 90% สามารถที่จะส่งผ่านเข้าไปที่ชั้นผิวได้น้อยที่ 1 มิลลิเมตรในแบบจำลองของอาหารเหลวที่มีความขุ่น ในสารละลายเกลือ เหมือนกับน้ำทะเล อิทธิพลของ UV-C เป็นปัจจัยหลักในการ

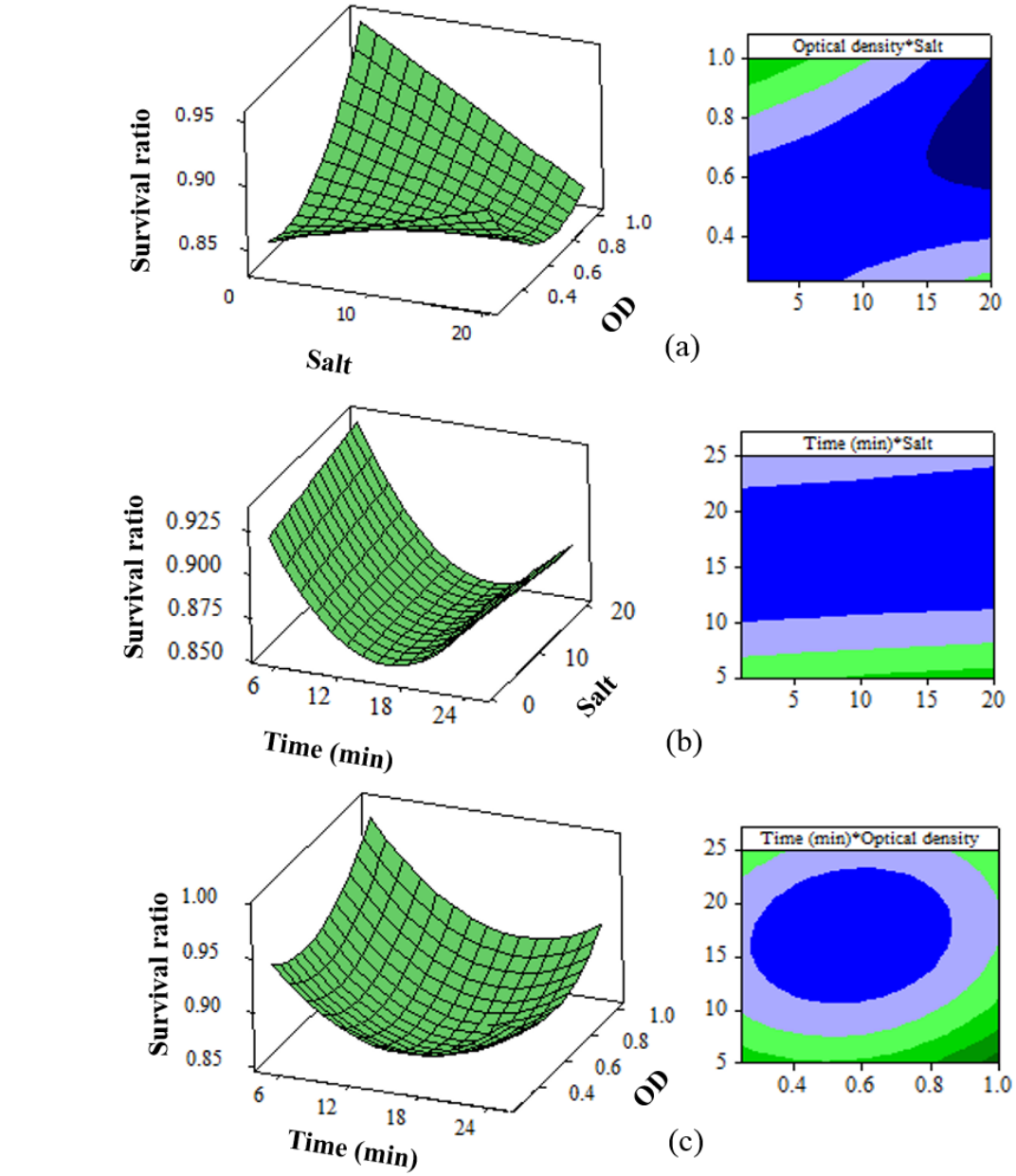
ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับตัวอย่างการลดลง 30% ของ UV-C สามารถที่จะฆ่าเชื้อที่ความลึก 40 เซนติเมตร ในน้ำกลั่นตรงกันข้ามกับที่ความลึกของน้ำทะเลที่ 10 เซนติเมตร

ในขณะที่ประสิทธิภาพของการใช้ O_3 ถูกลดลงโดยการปรากฏของสารที่สามารถละลายได้อื่นๆในน้ำ การใช้ O_3 ควบคู่กับการใช้ UV-C ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Jung et al., 2008) Ngadi et al. (2004) รายงานว่าเซลล์ *E. coli* ในน้ำ chilled water จากกระบวนการอุตสาหกรรมสัตว์ปีกมี high resiliency เมื่อใช้ O_3 เพียงอย่างเดียวในการบำบัดยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ การลดลงเพียง 0.6 log ถูกใช้เวลา 30 วินาที หลังจากการใช้ O_3 ที่ระดับ O_3 ความเข้มข้น 1 mg/ml เหมือนกับงานวิจัยที่เราศึกษา การใช้ UV-C ถูกพบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่า UV-C ทั้งนี้การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ UV-C เป็นเวลา 1 นาที ที่ปริมาณแสง UV ที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างของเหลวได้ที่ระดับ 2.34 kJ/m^2s สามารถที่จะยับยั้งเชื้อ *E. coli* เซลล์โดยสามารถลดเซลล์ลงได้ 3.5 log การทำงานร่วมกันของการใช้ O_3 และการใช้ UV-C ที่ปริมาณแสง UV ที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างของเหลวได้ที่ระดับ 2.34 kJ/m^2s ให้ผลที่เหมือนกันโดยสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ 3.4 log และพบว่าการทดลองเหล่านี้ การเพิ่มของความเข้มของการส่งผ่านของ UV ไม่มีผลมากกับการพัฒนาประสิทธิภาพของการใช้ O_3

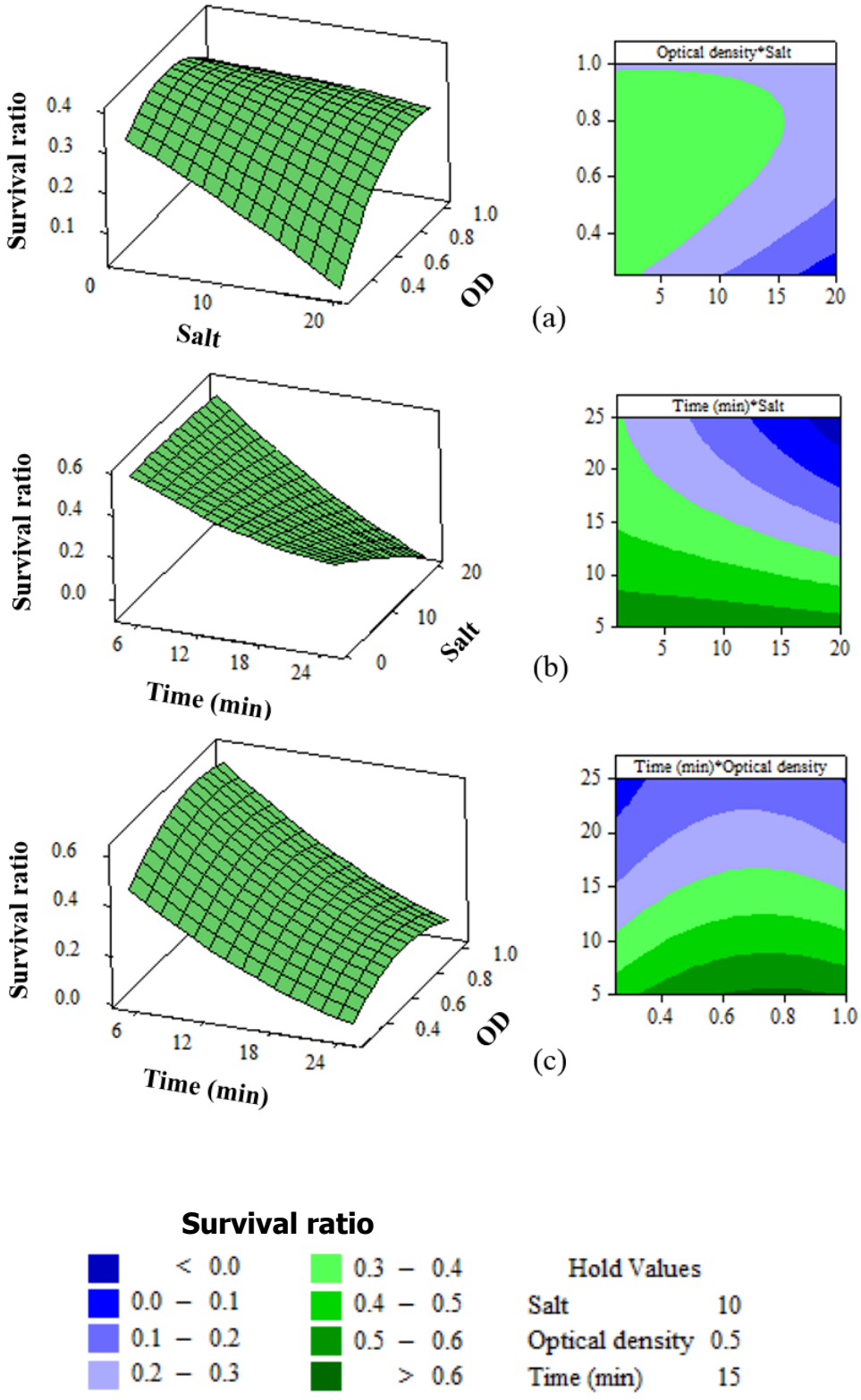
บางทีผลการทดลองที่เหมือนกัน ที่ปริมาณอนุภาคสูงและปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ปรากฏในน้ำล้าง chilled ของอุตสาหกรรมสัตว์ปีกอาจจะจำกัดประสิทธิภาพในการทำงานของ O_3 และการใช้ UV ในการบำบัดยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ บางงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้ O_3 และ UV ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแบคทีเรียในระบบ aquatic (Jung et al., 2008) ด้วยงานวิจัยที่เหมือนกันของสารละลายสีคาราเมลและแบบจำลองเกลือ Kumar et al. (2016) ประยุกต์ใช้ O_3 และ UV – C ในการยับยั้งเซลล์ *Listeria monocytogenes* ในน้ำเกลือบริสุทธ์และน้ำเกลือที่ใช้แล้วใน chill brines เขาทั้งหลายรายงานการยับยั้งการเจริญของเชื้อในน้ำเกลือ โดยการบำบัดร่วมกันระหว่างการใช้ O_3 และการใช้ UV มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ 9 log CFU/ml ของเชื้อ *L. monocytogenes* ในน้ำเกลือ (fresh chill) หลังจาก 10 นาทีของการใช้ O_3 และ 5 และ 10 นาที ของการใช้ UV ในการฆ่าเชื้อ การไม่มีปรากฏเชื้อที่บาดเจ็บหรือการมีชีวิตของเซลล์ *L. monocytogenes* ถูกยืนยันโดยการบ่มตัวอย่าง (treated brine) เพาะเชื้อลงในอาหาร agar เขาทั้งหลายเห็นว่าการใช้ UV ที่มีความสามารถในการส่งในน้ำเกลือต่ำอาจจะ hampered ประสิทธิภาพของการบำบัดด้วย UV



รูปที่ 4.4 กราฟ contour plots 2 มิติและ 3 มิติ ที่อัตราการมีชีวิตที่น้อย การใช้พื้นผิวตอบสนองถูกดำเนินการโดยการใช้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4.1 ใส่ข้อมูลเป็น 15 การทดลองในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ถูก run ภายใต้เงื่อนไขที่สร้างโดย Box–Behnken design (a) อัตราการมีชีวิตเป็นฟังก์ชั่นเกลือและค่าการดูดกลืนแสง (b) อัตราการมีชีวิตเป็นฟังก์ชั่นของเวลาและความเข้มข้นของเกลือ (c) อัตราการมีชีวิตเป็นฟังก์ชั่นของเวลาและค่าการดูดกลืนของแสง



รูปที่ 4.5 การใช้พื้นผิวตอบสนองในการวิเคราะห์ 3D contour plot ชี้ให้ผลของ (a) ความเข้มข้นของสารละลายเกลือและค่าการดูดกลืนแสง (b) เวลาและความเข้มข้นของเกลือ (c) เวลาและค่าการดูดกลืนแสงในสารละลายที่มีการ inoculation ของเชื้อในสารละลาย



รูปที่ 4.6 พื้นผิวตอบสนองในการวิเคราะห์และ contour plots บรรยายผลของการไม่ใช้อุณหภูมิ (เกลือ, ค่าการดูดกลืนแสงและเวลา) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่ inoculated อยู่ในสารละลาย

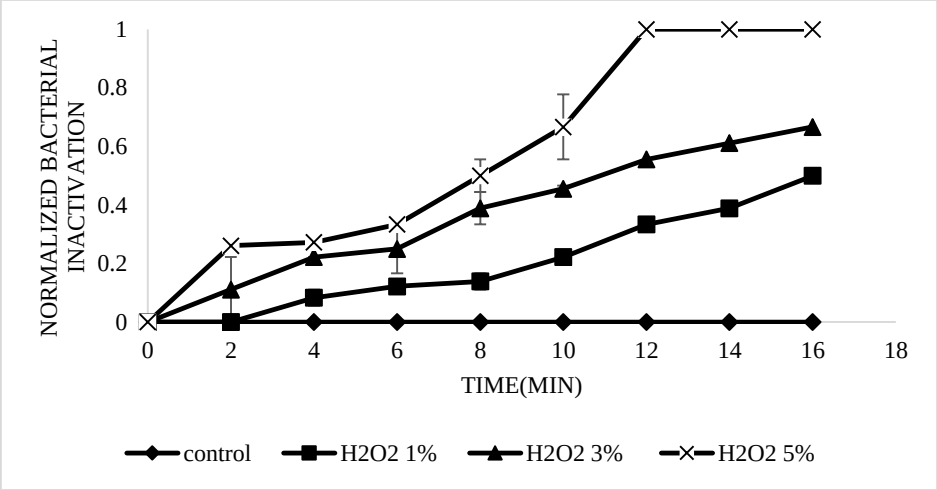
4.2 การศึกษาและเปรียบเทียบการผลิตละอองอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและรา โดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โอโซน (O_3) และยูวี (UV-C) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

การใช้ O_3- UV ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*/coliform และเชื้อรา *A. niger* ที่อยู่บนพื้นผิวของวัสดุอุปกรณ์ โดยการฆ่าเชื้อดังกล่าวจะอยู่ในรูปแบบการพ่นละออง (Fumigation application) จากสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การยับยั้งโดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5% ได้ถูกนำมาใช้ จำนวนของคุณสมบัติทางกายภาพได้ถูกนำเสนอ คุณภาพที่ได้หลังจากการ fumigation เป็นที่ยอมรับว่าผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยด้วยประสิทธิภาพการใช้งานที่ไม่เป็นอันตรายกับผู้ใช้งาน

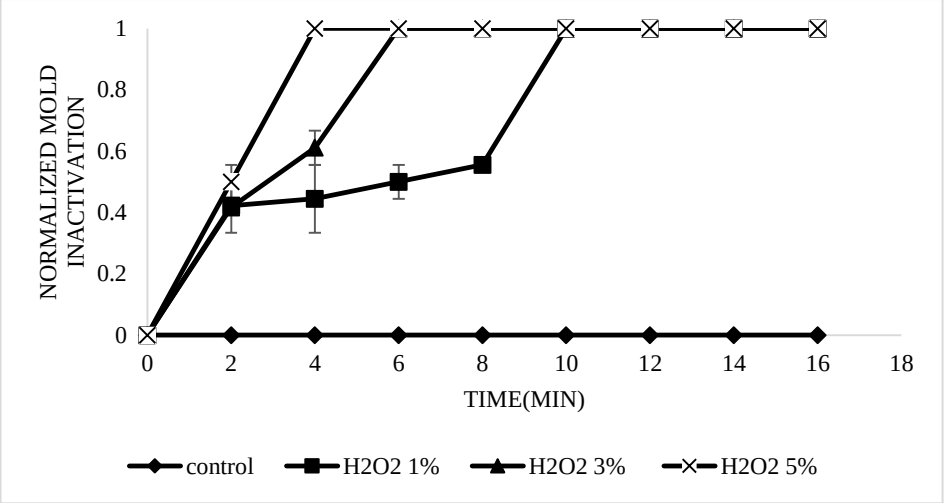
4.2.1 ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการ fumigation

คุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีต่อสารละลายไฮโดรเจนเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น การประยุกต์นำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาทำการผลิตละอองลอย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นพิเศษไอของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (VHP) ที่มีการใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (มากกว่า 35%) ได้แสดงให้เห็นประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดการปนเปื้อนที่พื้นผิว (Kimura, 2012) ในงานนี้เป็นทางเลือกที่มีการใช้ไฮโดรเจนในการผลิตละอองลอย (เทคนิคอัลตร้าโซนิกโดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่ำ) ได้ถูกจำลองขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนโดยการ spiked เชื้อลงบนพื้นผิว ซึ่งในการทดลองได้มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์จำนวน 2 ชนิดที่เป็น (*E. coli* และ coliform) และรา (*A. niger*) ขนาดละอองลอยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีขนาดเล็กถูกผลิตโดยอัลตร้าโซนิคทรานดิวเซอร์และถูกทำให้พ่นละอองด้วยแรงลม ส่งผลให้เกิดการกระจายที่ดีใน chamber ที่ทำการทดสอบ แบคทีเรียและราถูก inoculated บนพื้นผิวของ chamber ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml และรูปที่ 4.7a และ 4.7b แสดงดีกรีความแตกต่างของการยับยั้งเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการใช้ละอองลอยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการยับยั้งตัวอย่างแบคทีเรียและรา โดยการใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่แตกต่างกัน เช่น ที่ 1, 3 และ 5 % ถึงแม้ว่าการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงผ่านกระบวนการ VHP แสดงให้เห็นว่ามีประสิทธิภาพอย่างกว้างขวางในการยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (เช่น แบคทีเรีย, ยีสต์, รา, ไวรัส, และสปอร์ของแบคทีเรีย) (Heckert et al., 1997; Kahnert et al., 2005) ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียด้วยการใช้ละอองไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่ำพบว่ายังไม่เป็นที่เข้าใจมากนักในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นพิเศษการใช้

ความถี่อัลตร้าโซนิคในการผลิตละอองลอยอนุภาคขนาดเล็ก (Unger-Bimczok et al., 2008; KaČer et al., 2012)



(a)



(b)

รูปที่ 4.7 การยับยั้งการเจริญเติบโตของ (a) *E.coli*/coliform (b) *A. niger* (ที่ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 4 log CFU/cm^2) บนพื้นผิวของ chamber ที่ทำการทดสอบขนาด (34*34*34 cm^3) หลังจากการ fumigation ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1, 3, และ 5 %

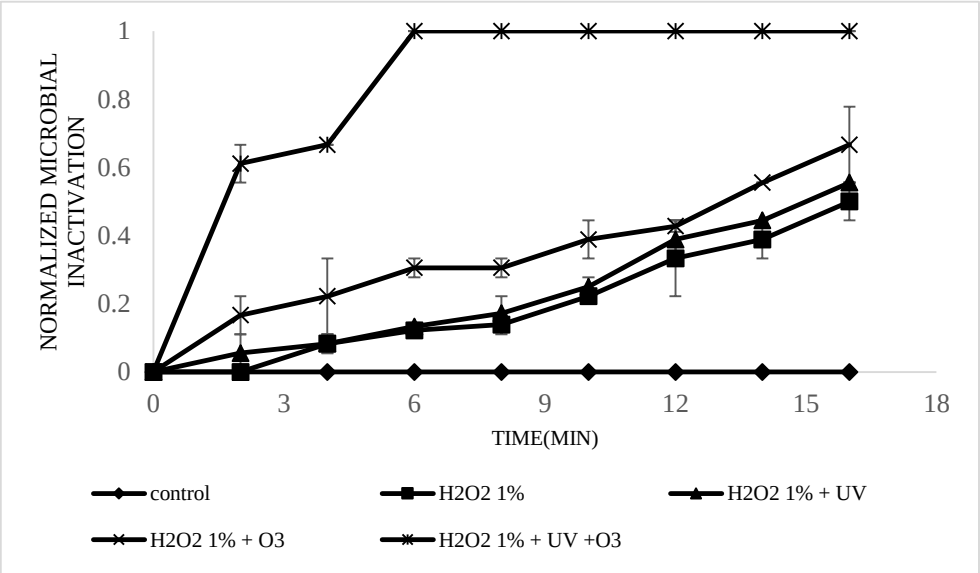
คลื่นเสียงอัลตร้าโซนิคสามารถที่จะส่งพลังงานถึงสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และประสบความสำเร็จในการผลิตละอองลอยของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ให้ลดลงภายใน 15 นาที มันชี้ให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูงมีผลให้การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป็นไปอย่างรวดเร็ว (Raffellini et al., 2008) การเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการ

ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยทั่วไปพัฒนาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ โดยปริมาณเชื้อถูกลดลงที่ 4 log CFU/cm^2 ของการปนเปื้อนเชื้อเริ่มต้นของ *E. coli*/coliform เพียง 5 % ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ fume สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ spiked บนพื้นผิวภายในเวลา 12 นาที ในขณะที่ที่ความเข้มข้นต่ำ (ที่ 3% และ 1% ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) ไม่สามารถที่จะ produce การฆ่าเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 4.7a) จากผลการทดลองของการมีชีวิตอยู่ของ *A. niger* การใช้ละอองลอยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรามากกว่าเชื้อแบคทีเรีย สำหรับรา การ fume ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ต่ำประมาณ 1% สามารถที่จะกำจัดการปนเปื้อนของ *A. niger* ที่ spiked ลงบนพื้นผิวที่ใช้ในการทดสอบได้ภายใน 10 นาที ซึ่งเหมือนกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*/coliform ได้ 20 – 25% ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูง ประมาณ 5% ใช้เวลาในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เพียง 4 นาที ดูเหมือนว่ารามีความไวที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่น้อยกว่าแบคทีเรีย เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้มีการรายงานในระบบ VHP ในระดับอุตสาหกรรมซึ่งเทคโนโลยีนี้มีประสิทธิภาพในการ oxidize ในรูปของ fungal vegetative และสปอร์ได้เร็ว ถึงแม้ว่าสปอร์ของแบคทีเรียมีความต้านมากกว่าสปอร์ของรา (Technical Data Monograph, 2003).

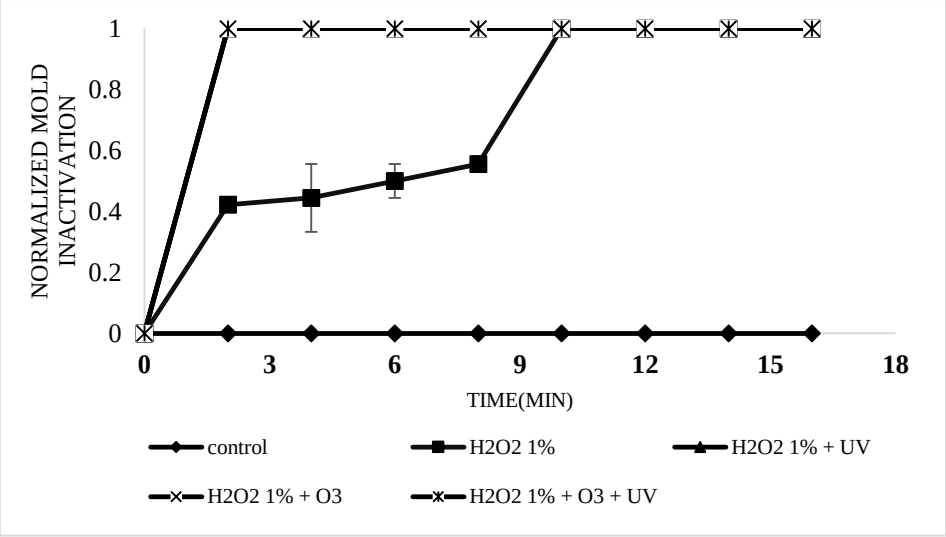
ในการทดลองเป็นการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียและราด้วยด้วยละอองไอของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เหมือนกับการเกิดในของเหลวเฟส Kačer et al., (2012) ได้ทำการสรุปผลงานวิจัยการจำลองประสิทธิภาพของไอไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้ vegetable bacteria และแบคทีเรียที่มีความต้านทานสูง (Block, 1991; French et al., 2004; Hall et al., 2007; Johnston et al., 2005; Kahnert et al., 2005; Klapes และ Vesley, 1990; Rogers et al., 2005; Sapers et al., 2003; Unger-Bimczok et al., 2008) ไวรัส (Heckert et al., 1997) ฟังก์ไจ (Forney et al., 1991), ยีสต์, อะมีบา, infective โปรตีน และเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ (Fichet et al., 2004; Klapes และ Vesley, 1990; Vassal et al., 1998) มันถูก assumed กิจกรรมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเหมือนเป็น mechanism ของการออกซิเดชั่น เมื่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ฟูมมาสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะ produce ผลิตไฮดรอกซิลเรดิคอลอิสระในการออกซิไดซ์ซิงก์เยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นไลปิด DNA และองค์ประกอบเซลล์อื่นๆ (Rutala และ Weber, 2010)

4.2.2 การพัฒนาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับวิธีการอื่น

งานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่การฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้การรมควันที่ต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลายดังกล่าวที่สูง เพื่อกำจัดและทำลายเชื้อแบคทีเรียในสถานที่ปฏิบัติงานหรืออุปกรณ์ต่างๆ เช่น laminar flow cabinets, isolators, ระบบ air-handling, ระบบการรมควันทั้งอาคาร (Otter et al., 2006) ในงานวิจัยนี้ ประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกนำมาทำงานร่วมกับปฏิกิริยาโฟโตแคททาไลติคจากแสงอัลตร้าไวโอเลตและโอโซนเนชั่นเพื่อผลิตอนุมูลอิสระต่างๆ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีว่าอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเป็นอนุมูลอิสระที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียและราโดยการใช้ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ต่ำ



(a)



(b)

รูปที่ 4.8 การยับยั้งการเจริญเติบโตของ (a) *E. coli*/coliform (b) *A. niger* (ที่ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 4 log CFU/cm^2) บนพื้นผิวของ chamber ขนาด (34*34*34 cm^3) ที่ได้มีการ inoculation เชื้อหลังจากการ fumigation ด้วยเงื่อนไขต่างๆ (1% H_2O_2 เพียงอย่างเดียว, 1% H_2O_2/UV, 1% H_2O_2/O_3 และ 1% H_2O_2/UV/O_3) โดยเส้น 1% H_2O_2/UV, 1% H_2O_2/O_3 และ 1% H_2O_2/UV/O_3 มีการซ้อนทับกัน

จากภาพที่ 4.8 แสดงผลความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและราอีกครั้ง ซึ่งได้มีการแสดงผลไปก่อนหน้านี้ในรูปที่ 4.7 แต่เลือกเพียงเงื่อนไข 1% H_2O_2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีประสิทธิภาพน้อยที่สุดท่ามกลางการฆ่าเชื้อทั้ง 3 วิธี เพื่อที่จะชี้แจงผลของอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ การทำงานร่วมกันของฏิกิริยา เช่น โฟโตแคททาไลติคจาก UV และหรือการใช้ O_3 พบว่าให้ผลประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี (กราฟรูปที่ 4.8a) การใช้โฟโตแคททาไลติคหรือการใช้ O_3 เพียงอย่างเดียวสามารถที่จะพัฒนาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่การฟูมของ 1% H_2O_2 ถึงแม้ว่าการฆ่าเชื้อที่สมบูรณ์ไม่ได้รับภายในช่วงเวลาที่ฆ่าเชื้อ เมื่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมีการทำงานร่วมกันของ 2 กระบวนการออกซิเดชั่นขั้นสูงซึ่งเป็นการ fume ของ 1% H_2O_2/UV – C/O_3 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทำงานร่วมกันของทั้ง 2 ชนิดให้ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ดีและเร็วกว่าการใช้ 1% H_2O_2 หรือที่สภาวะ 5% H_2O_2 (แสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.7) การใช้ 1% H_2O_2/UV/O_3 สามารถลดเวลาใน

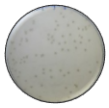
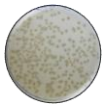
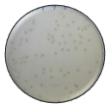
การฆ่าเชื้อในห้อง chamber ที่ทำการทดสอบจาก 12 นาที ที่เป็นการใช้ 5% H_2O_2 เป็น 6 นาที ในการใช้ 1% H_2O_2 กับโฟโตคาทาไลติกและการใช้ O_3

ผลของการ fumigation ของ H_2O_2 เพื่อผลิตอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเรดิคอลพบว่ามีผลกระทบที่ดีกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา เมื่อเปรียบเทียบกับการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ซึ่งถูก produced โดย 1% H_2O_2 ในรูปที่ 4.8 ระบบการฆ่าเชื้ออย่างใดอย่างหนึ่งสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยทำงานร่วมกับ photocatalysis หรือ ozonation ได้ทำการยับยั้ง *A. niger* อย่างรวดเร็วและใช้ระยะเวลาสั้น (หรือประมาณ 2 นาที) พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยใช้ photocatalysis และ O_3 ร่วมดีกว่าการบำบัดด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง และสร้างการทำลายการปนเปื้อนเชื้อรา *A. niger* ได้อย่างฉับพลัน การทำงานร่วมกันนี้ของเทคโนโลยี AOP สามารถที่จะเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยปราศจากการที่ต้องเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เทคโนโลยีนี้ช่วยให้การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เกิดประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นต่ำมาก (ต่ำกว่า 3% H_2O_2 มาตรฐานที่ใช้ในการฆ่าเชื้อทั่วไป) เพื่อลดความเป็นพิษของสารตกค้าง และลดระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ

4.3 ผลกระทบของอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล

การเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราโดยการใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่ำ เห็นได้จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการเพิ่มปริมาณของอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลใช้กระบวนการออกซิเดชันขั้นสูง ตารางที่ 4.5 และ 4.6 แสดงภาพถ่ายของจานเพาะเชื้อที่มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น 4 log CFU / cm^2 โดยเปรียบเทียบก่อนและหลังของการฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 4.5 ผลของการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ปริมาณ 4 log CFU/cm^2 ของ a) *E. coli*/coliform และ b) *A. niger* ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่างๆ กัน ในการทำงานร่วมกับ UV และ O_3

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์					
	5%	3%	1%	1% + UV	1% + O_3	1% + UV + O_3
0						
5						
10						
15						

(a) *E. coli*/coliform

ตารางที่ 4.5 ผลของการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ปริมาณ 4 log CFU/cm^2 ของ a) *E. coli*/coliform และ b) *A. niger* ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่างๆ กัน ในการทำงานร่วมกับ UV และ O_3

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์					
	5%	3%	1%	1% + UV	1% + O_3	1% + UV + O_3
0						
5						
10						
15						

(b) *A. niger*

จากตารางที่ 4.5a และ 4.5b ภาพดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการทำงานร่วมกันของปฏิกิริยา photocatlysis ของ UV-C และการใช้ O_3 ในการฆ่าเชื้อด้วย 1% H_2O_2 / UV-C / O_3 ที่เวลาฆ่าเชื้อภายใน 5 นาที ผลการทดลองจากรูปแสดงให้เห็นว่าให้ผลเหมือนกับการใช้เงื่อนไขการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อระหว่าง 5% H_2O_2 และ 1% H_2O_2 / UV-C / O_3 อย่างไรก็ตามจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นจริงที่เวลา 2 นาทีแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น (รูปที่ 4.5a และ 4.5b) การฆ่าเชื้อด้วย 1% H_2O_2 / UV-C / O_3 มีประสิทธิภาพดีกว่าการฆ่าเชื้อโดยใช้ 3% H_2O_2 เพียงอย่างเดียว ด้วยอัตราส่วนเดียวกันเพื่อฆ่าเชื้อโรค เวลาในทางทฤษฎีที่ใช้ในการยับยั้งการเจิญเติบโตของเซลล์ *E.coli* / coliform มีค่าน้อยกว่า 10 นาที (หรือ 6 นาทีขึ้นอยู่กับผลการนับเซลล์) การใช้ 1% H_2O_2 / UV-C / O_3 ของการ fumigation แม้ว่าการใช้วิธีการฆ่าเชื้อเพียงแบบหรือวิธีเดียว (photocatlysis โดยใช้ UV-C หรือ O_3 เพียงอย่างเดียว) ช่วยให้ฆ่าเชื้อได้ดีขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2 มีประสิทธิภาพและมีความสามารถในการออกซิไดซ์สิ่งสกปรกได้ดีกว่าการใช้อนุมูล

อิสระไฮดรอกซิลเรดิคอล ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นขั้นสูง ภาพถ่ายการยับยั้งของการเจริญเติบโตของ *A. niger* แสดงให้เห็นว่าการฆ่าเชื้อด้วย 1% H_2O_2 มีความเหมาะสมเล็กน้อยสำหรับการฆ่าเชื้อราชนิดนี้ การทำงานร่วมกันของแสงอัลตร้าไวโอเลตโดยปฏิกิริยาโฟโตแคททาไลติกกับโอโซนเนชั่นสามารถให้ประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งที่การ fume ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่ำให้ความเป็นพิษที่น้อยมาก ไอของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ยังคงเหลืออยู่และคอนเดนเซทที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติจะถูก catalyzed ไปเป็นน้ำและออกซิเจน (Kimura, 2012)

มีความเป็นไปได้ในการทำงานร่วมกันของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสงอัลตร้าไวโอเลตและโอโซนเนชั่น (H_2O_2/UV-C/O_3) ในการ fumigation สามารถให้ปริมาณของอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการฆ่าเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (Andreozzi et al., 1999) ในการประยุกต์การใช้งานนี้ การทำงานร่วมกันสามารถแสดงให้เห็นถึงอัตราการผลิตไฮดรอกซิลเรดิคัลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ (Glaze et al., 1987; Kommineni et al., 2000) น้ำที่มีส่วนผสมของ O_3 และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดูดซับการส่งผ่านของรังสี UV-C ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะผลิต intermediates ในช่วงที่กว้าง รวมถึงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เรดิคัล (Munter, 2001) กลไกในการสลายโมเลกุลของ H_2O_2 คือการแตกตัวของโมเลกุลกลายเป็นอนุมูลอิสระต่างๆ อาทิเช่น อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล O_3 สามารถใช้ร่วมกับสารละลาย H_2O_2 เพื่อเพิ่มการเปลี่ยน O_3 และ H_2O_2 เป็น OH •ใน OH •หมอก ในสารละลายกรดที่อ่อนแอ H_2O_2 จะแตกตัวออกจากไอออนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (HO^{2-}) ในขณะที่ H_2O_2 ทำปฏิกิริยาอย่างช้าๆกับ O_3 โดย O_3 สามารถเปลี่ยน HO^{2-} ไอออนเป็นรูปแบบ OH ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการรวมกันของ photocatalysis ของ UV-C และ ozonation ในการ fumigation ของ H_2O_2 จะทำให้เกิดสภาวะออกซิเดชั่นสูง (พลังงานกระตุ้นสูง) และรวมถึงสามารถการผลิตอนุมูลอิสระหลายชนิด (เช่น H_2O_2, hydroxyl (OH •) และ Perhydroxyl (HO2 •) (Kommineni et al., 2000; Munter, 2001) ตามที่ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.6

Initiation:

$$H_2O_2 \xrightarrow{hv} 2 \bullet OH$$

$$2O_3 + H_2O_2 \xrightarrow{hv} 2 \bullet OH + 3O_2$$

$$O + H_2O \xrightarrow{hv} H_2O_2 \rightarrow 2 \bullet OH$$

$$H_2O_2 + HO_2^{\bullet} \xrightarrow{hv} \bullet OH + H_2O + O_2$$

$$2 \bullet OH \xrightarrow{hv} H_2O_2$$

Propagation:

$$H_2O_2 + \bullet OH \overset{hv}{\rightarrow} HO_2^{\bullet} + H_2O$$

Termination:

$$2HO_2^{\bullet} \overset{hv}{\rightarrow} H_2O_2 + O_2$$
$$\bullet OH + HO_2^{\bullet} \overset{hv}{\rightarrow} H_2O + O_2$$

รูปที่ 4.9 สมการทางเคมีของกลไกปฏิกริยาโฟโตคาทาไลติกของ H_2O_2/UV-C/O_3

กิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการใช้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ในปริมาณความเข้มข้นต่ำร่วมกับ AOPs ที่ผลิตอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรแต่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจะเข้าไปแย่งจำนวนอิเล็กตรอนจากผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ การทำงานร่วมกันของ photocatlysis ของ UV-C และ ozonation ช่วยให้เกิดอนุมูลอิสระได้จากความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ต่ำที่ผลิตละอองลอยขนาดเล็ก (micro-size aerosols) โดยเครื่องอัลตราโซนิคทรานดิวเซอร์ที่มีพลังงานสูง เมื่อทั้งละอองของ H_2O_2 ที่ผลิตอนุภาคอนุมูลอิสระมาสัมผัสกับทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (หรือเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีนี้) การเกิดออกซิเดชั่นอย่างรุนแรง OH • มันเป็นที่รู้กันอย่างดีว่าอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเรดิคอลสามารถที่จะทำปฏิกริยาได้อย่างแข็งแรงกับสารประกอบอินทรีย์ได้หลากหลาย เหมือนกับผลของการออกซิเดชั่นที่ถูกสังเกตจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและรา สนับสนุนบทบาทของอนุมูลอิสระเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากมีความเป็น oxidation ที่สูงแก่องค์ประกอบของเซลล์ Rossi et al. 2013 ได้ศึกษาความเสียหายของ cellular ของ DNA ที่เชื่อมโยงกับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเรดิคอลโดยการใช้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ต่ำกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล

ในบรรดาสารออกซิแดนท์ที่มีศักยภาพในการเกิดออกซิเดชั่นสูง เช่น ฟลูออรีน, ไฮดรอกซิลแรดิคอล, โอโซน, และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารออกซิแดนท์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดที่มีศักยภาพในการเกิดออกซิเดชั่นเท่ากับ 2.85, 2.70, 2.07 และ 1.78 อิเล็กตรอนโวลต์ตามลำดับ (Dorfman และ Adams, 1973; Carey, 1992; Techcommentary, 1996; Zhou และ Smith, 2002; Metcalf และ Eddy, 1991) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และน้ำ (H_2O) เช่นเดียวกับ VHP ที่มีรายงานว่าสารที่ยังคงตกค้างหลังจากการ fumigation มีความปลอดภัยต่อผู้ที่ได้สัมผัสหรือผู้ที่เกี่ยวข้องกับการฆ่าเชื้อนี้ (McDonnell et al., 2007)

4.2.4 การเปรียบเทียบผลของการ fumigation

เมื่อผลของ H_2O_2 UV และ O_3 ถูกทำงานร่วมกัน พื้นผิวบนเพลท agar แสดงให้เห็นผลของการบำบัดยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม และสภาวะเงื่อนไขที่มีประสิทธิภาพ มี 12 การทดลองของการ fumigation ที่ถูกนำมา run โปรแกรมตามที่ได้มีการบรรยายในวัสดุและวิธีการทดลองที่พารามิเตอร์ที่แตกต่างกัน สถิติของการทดลองของค่า variable ที่ทดสอบตามค่าที่วัดได้ ถูกสรุปไว้ในตารางที่ X การใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในผลสมการเอมไพริคัลแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการมีชีวิตของ *E. coli* และการ fumigation ตามสมการดังข้างล่างนี้

สถิติของการทดลองของอัตรา *E. coli*/coliform ของทุกการทดลองที่ด้านบนของพื้นผิว

$$Y = 5.680 – 1.103A – 0.048B – 1.090C – 0.229D + 0.698AB + 0.825BC + 0.068BD + 0.102CD – 0.587ABC – 0.115BCD – 0.118ACD + 0.104ABCD \quad (4.7)$$

สถิติของการทดลองของอัตรา *E. coli*/coliform ของทุกการทดลองที่ด้านข้างของพื้นผิว

$$Y = 3.078 + 0.120A + 2.166B + 1.612C – 0.269D - 0.332AB – 0.260AC – 0.004AD – 2.148BC – 0.194BD – 0.176CD + 0.248ABC + 0.175BCD + 0.004ABCD \quad (4.8)$$

สถิติของการทดลองของอัตรา *A. niger* ของทุกการทดลองที่ด้านบนของพื้นผิว

$$Y = 8.549 – 1.025A – 3.386B – 3.386C – 1.021D + 0.512AB + 0.512AC + 0.101AD + 1.693BC + 0.377BD + 0.377CD – 0.256ABC – 0.050ABD – 0.188BCD – 0.050ACD + 0.025ABCD \quad (4.9)$$

ตารางที่ 4.6 สถิติของการทดลองของอัตรา *E. coli*/coliform ของทุกการทดลองที่ด้านบนของพื้นผิว

Source	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
A	32.913	2	16.457	105.768	.000
B	17.255	1	17.255	110.900	.000
C	59.063	1	59.063	379.607	.000
D	253.260	8	31.658	203.466	.000
AB	2.204	2	1.102	7.084	.001
AC	2.781	2	1.391	8.937	.000
AD	7.027	16	.439	2.823	.001

BC	16.528	1	16.528	106.228	.000
BD	5.889	8	.736	.4731	.000
CD	16.447	8	2.056	13.213	.000
ABC	3.377	2	1.689	10.852	.000
BCD	19.828	8	2.478	15.929	.000
ABCD	11.361	48	.237	1.521	.038
Error	16.804	108	.156	-	-
Total	1003.929	216	-	-	-

R^2 = .964

ตารางที่ 4.7 สถิติของการทดลองของอัตรา *E. coli*/coliform ของทุกการทดลองที่ด้านข้างของพื้นผิว

Source	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
A	19.865	2	9.933	70.252	.000
B	13.702	1	13.702	96.911	.000
C	30.254	1	30.254	213.980	.000
D	303.218	8	37.902	268.077	.000
AB	.726	2	.363	2.568	.001
AC	3.532	2	1.766	12.491	.081
AD	8.903	16	.556	3.936	.001
BC	2.959	1	2.959	20.930	.000
BD	10.871	8	1.359	9.611	.000
CD	18.432	8	2.304	16.296	.000
ABC	2.793	2	1.396	9.877	.000
ABD	1.788	16	.112	.790	.693
ACD	3.070	16	.192	1.357	.177
BCD	8.709	8	1.089	7.700	000
ABCD	5.555	16	.347	2.456	.003
Error	15.270	108	.141	-	-
Total	762.519	216	-	-	-

R^2 = .966

ตารางที่ 4.8 สถิติของการทดลองของอัตรา *A. niger* ของทุกการทดลองที่ด้านบนของพื้นผิว

Source	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
A	.699	2	.349	70.252	.000
B	1.755	1	1.755	164.610	.000
C	1.755	1	1.755	164.610	.000
D	327.412	8	40.926	3.8390E3	.000
AB	.699	2	.349	32.759	.000
AC	.699	2	.349	32.759	.000
AD	1.227	16	.077	7.191	.000
BC	1.755	1	1.755	164.610	.000
BD	3.385	8	.423	39.686	.000
CD	3.385	8	.423	39.686	.000
ABC	.699	2	.349	32.759	.000
ABD	1.227	16	.077	7.191	.000
ACD	1.227	16	.077	7.191	.000
BCD	3.385	8	.423	39.686	000
ABCD	1.227	16	.077	7.191	.000
Error	1.151	108	.011	-	-
Total	413.412	216	-	-	-

R^2 = .997

ดังนั้น 12 การทดลองในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อถูกดำเนินการทดลองตามที่ได้บรรยายในวัสดุและวิธีการทดลองที่พารามิเตอร์ที่แตกต่างกันชี้ให้เห็นโดยการออกแบบและผลของการมีชีวิตของ *E. coli* ที่วัดได้ สถิติของการทดลองของค่าที่วัดได้กับค่าตอบสนองอธิบายอัตราการมีชีวิตของ *E. coli* สอดคล้องกับในแต่ละ treatment ที่นำมาทำงานร่วมกัน ซึ่งได้ถูกสรุปไว้ในตารางที่ 4.6, 4.7, และ 4.8 ความสัมพันธ์ของสมการเหล่านี้ในทุกการทดลอง (สมการ 4.7 – 4.9) แสดงให้เห็นประสิทธิภาพและการ generated น้อยของ *E. coli*/coliform และการทำลายราเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามมีการพบเส้นทางสำหรับการประยุกต์สเกลขนาดใหญ่เนื่องจากมีความ practically มีประสิทธิภาพและมีความเป็นไปได้

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การ interaction ของความเข้มข้นของเกลือ, สีคาราเมลและความเข้มข้นของการส่งผ่าน UV-C ถูกจำลองเพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในสารละลายเนื้อเดียวกัน สารละลายที่ใสปราศจากไอออน (น้ำ DI) ที่มีการเติมเกลือ ในการทดลองพบว่ามีผลอย่างมากต่อคุณสมบัติการดูดกลืนแสง และคุณสมบัติทางกายภาพของการดูดกลืนแสงของ UV-C absorbance ซึ่งจะไปมีผลทำให้ปริมาณเชื้อ *E. coli* ลดลงจากความสามารถในการยับยั้งด้วยสภาวะดังกล่าว สำหรับสารละลายทึบแสง (สารละลายสีคาราเมลที่วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 1 ที่ wavelength 405 นาโนเมตร) ที่สภาวะดังกล่าวการส่งผ่านของ UV-C มีความจำกัด การเติมเกลือสามารถที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* บางทีเนื่องจากการเกิดความแตกต่างของน้ำภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์ส่งผลทำให้เกิดสภาวะ hypertonic stress ซึ่งจะทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและเซลล์แตก ที่ปริมาณแสงของ UV-C เปลี่ยนแปลงจาก 1.44 ถึง 2.88 kJ/m^2 ดูเหมือนจะสามารถที่จะยับยั้ง *E. coli* ยกเว้นสำหรับเงื่อนไขที่ความเข้มข้นของสารละลายสีคาราเมลมีค่าสูงเช่น ที่การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ซึ่งการส่งผ่านของแสง UV-C จะถูกบังโดยของแข็งที่สามารถละลายได้ในสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

ในเทอมของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ด้วย O_3 โดยตรงในสารละลายปราศจากไอออนและในน้ำเกลือที่ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่าง ผลการทดลองในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการจำลองผลของความเข้มข้นของ O_3 และเวลาที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ประสิทธิภาพของ O_3 ถูกพบว่าเป็นฟังก์ชันกับเมื่อไม่มีสีคาราเมล ($OD_{405nm} = 0$) ไม่มีการเติมเกลือ และไม่มีการยับยั้งเชื้อด้วย UV เวลาในการยับยั้งเชื้อลดลงเป็น 4.67 log cycle ใช้เวลาระหว่าง 2.5 ถึง 30 นาที ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นมีแนวโน้มของการใช้ O_3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเพื่อลดระดับของปริมาณเซลล์ก่อนที่จะถึงมือลูกค้า การยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยการใช้ O_3 และ UV ในสารละลายน้ำเกลือที่สารละลายสีคาราเมลที่แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ประสิทธิภาพของกระบวนการขึ้นกับความทึบของสารละลายสีคาราเมลและความเข้มข้นของน้ำเกลือที่ใช้ ช่วงระยะเวลาที่สัมผัสกับ O_3 หรือ UV และความเข้มข้นของ UV และความสามารถในการส่งผ่านของ UV ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสารละลายสีคาราเมลและสารละลายน้ำเกลือต้องการเวลาที่นานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ที่ความสามารถในการส่งผ่านต่ำของ aqueous liquid ที่เกิดจากปริมาณของแข็งในสารละลายส่งผลกระทบต่อ

ประสิทธิภาพของ UV การทำงานร่วมกันระหว่างการใช้ O_3 ร่วมกับการใช้ UV มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในสารละลายน้ำเกลือที่สารละลายสีคาราเมลที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน

สำหรับการทำงานร่วมกันของกระบวนการออกซิเดชั่นขั้นสูง (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับแสงอัลตร้าไวโอเลตและโอโซนเนชั่น) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พื้นผิวของกระบวนการผลิตอาหารรวมไปถึงในบริเวณพื้นที่ที่ยากแก่การเข้าถึง โดยเฉพาะที่บริเวณ overhead surfaces ส่วนบริเวณที่แตกและรอยแยกของวัสดุอุปกรณ์อาหารและอื่นๆ สำหรับพื้นผิวที่ทำการฆ่าเชื้อ ละอองลอยสามารถที่จะมีประสิทธิภาพเพียงพอถ้ามีปริมาณของอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่เป็นสารฆ่าเชื้ออยู่บนพื้นผิวที่จะทำการฆ่าเชื้อด้วยปริมาณที่เพียงพอในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตกระบวนการแอดวานซ์ออกซิเดชั่นอื่น (AOPs) ที่เหมือนกับ O_3 และ UV-C ถูกติดตั้งเพื่อปรับปรุงให้ดีขึ้นของการผลิตระบบ OH•. H_2O_2/ O_3 ที่ปรากฏและประยุกต์ใช้ AOP ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในสารฆ่าเชื้อหลากหลายชนิดสัมพันธ์กับ AOPs อื่นๆ ความรู้ของอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเรดิคอลเหล่านี้ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพของการ fumigation ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่อย่างจำกัด

การทำงานของโอโซนเนชั่นหรือแสงอัลตร้าไวโอเลตเพียงอย่างเดียวในการฆ่าเชื้อ แสดงผลให้เห็นว่าไม่สามารถลดปริมาณของเชื้อ *E. coli*/coliform หรือรา การทำงานร่วมกันของทั้ง 2 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถที่จะเพิ่มอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเรดิคอลและพัฒนาประสิทธิภาพของการ fumigation ของ AOP โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและรา ที่ความเข้มข้นเดียวกัน *A. niger* มีความไวต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากกว่า *E. coli*/coliforms การทำงานร่วมกันของ UV หรือ O_3 เพื่อผลิตและสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลสามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้รวดเร็วทั้งด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว การประยุกต์ใช้ O_3 ร่วมกับ H_2O_2 ในการ fumigation สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว บางทีสามารถที่จะให้อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่มาก ที่ความเข้มข้นของ H_2O_2 เช่นเดียวกับการทำงานร่วมกันของทั้ง 3 องค์ประกอบ (UV-C หรือ O_3 และ UV-C) ให้ประสิทธิภาพที่สูงในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและรา ดังนั้นการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และความเป็นพิษที่ยังคงเหลืออยู่หลังจากการบำบัดสามารถที่จะถูกลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญในการใช้เทคโนโลยีนี้ได้อย่างเหมาะสมกับอุตสาหกรรมอาหารและโรงงานยา

อย่างไรก็ตาม ในอนาคตการลดความเข้มข้นของ H_2O_2 100% สามารถลดการใช้ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปได้มากกว่า 50% ซึ่งเป็นข้อมูลที่ค่อนข้างเป็นที่น่าพอใจและให้ผลที่ดีเกินคาด กระบวนการ AOP ไม่เพียงแต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแต่ยังมีผลต่อการลดลงของราได้เป็นอย่างดี โดยให้ผลการลดลงของราเช่นเดียวกับแบคทีเรีย การทำงานร่วมกันของทั้ง 3 เทคนิคในการใช้ H_2O_2 , O_3 , และ UV-C สามารถที่จะพัฒนาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเปรียบเทียบกับเมื่อมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว การปรับปรุงพัฒนาเป็น 73.33% สำหรับ 1 และ 3 % ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ 80 % สำหรับ 5 % ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่พื้นผิวด้านข้าง

5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นโอกาสความเป็นไปได้ในการลดการใช้เวลาและลดปริมาณเชื้อที่ยังมีชีวิต นอกเหนือจากนี้ผลที่ได้ยังแสดงให้เห็นโอกาสที่สูงในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในสารละลายน้ำตัวอย่าง เวลาที่ใช้ในการลดการปนเปื้อนของ *E. coli* สามารถถูกพัฒนาโดยการใช้การส่งผ่านของ UV การศึกษานี้ทดสอบความเข้มของ dose ที่ถูกต้องแม่นยำและช่วงเวลาของการใช้ O_3 ที่ต้องการในการลดปริมาณเซลล์ *E. coli* ที่ปรากฏในน้ำปราศจากไอออนอย่างสมบูรณ์และลดปริมาณเซลล์ *E. coli* ในสารละลายน้ำเกลือที่เตรียมด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันไป สำหรับการละลายของแก๊ส O_3 สามารถที่จะประยุกต์เพื่อการฆ่าเชื้อสารละลายของเหลวตัวอย่างอาหาร การค้นพบเพิ่มเติมถูกได้รับมอบอำนาจเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของคุณภาพที่เกิดขึ้นหรือผลิตขึ้นมาเนื่องจากกระบวนการ O_3

นอกจากนี้ในส่วนของกระบวนการแอดวานซ์ออกซิเดชั่นจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นโอกาสเพื่อลดเวลาในการตรวจพบเชื้อและลดปริมาณเซลล์ของ *E. coli*/coliform และ *A. niger* ที่ยังคงมีอยู่ ผลที่มากไปกว่านั้นแสดงให้เห็นแนวโน้มความเป็นไปได้ที่สูงในการลดแบคทีเรียและราที่ปนเปื้อนในกระบวนการหรือปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย การตรวจพบการปนเปื้อนของ *E. coli* สามารถที่จะพัฒนาโดยการทำงานร่วมกันของ UV-C หรือ O_3 หรือการทำงานร่วมกันของทั้ง 3 เทคนิค การศึกษานี้ทดสอบให้เห็นถึงความเข้มข้นที่น่าเชื่อถือและช่วงของ O_3 ที่ต้องการเพื่อที่จะมีความสมบูรณ์ในการลดลงของแบคทีเรียและราที่ปรากฏในหลาย ๆ treatment เพื่อที่จะให้ผลการทดลองที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้โดยทางปฏิบัติ ผู้ใช้หรือโรงงานสามารถที่จะเลือกเพื่อประยุกต์ในหลายๆโรงงาน เพิ่มความหลากหลายในการนำไปใช้ประโยชน์

เป็นทางเลือกใหม่ให้กับอุตสาหกรรมต่างๆ ไม่เพียงแต่โรงงานที่มีความจำเพาะ มันยังขึ้นอยู่กับแนวทางการปฏิบัติ ประสิทธิภาพและความเป็นไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. นพดล เจียมสวัสดิ์, การวิเคราะห์การออกแบบเครื่องปฏิกรณ์แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์, วารสารวิจัยและพัฒนา สจ.ธ., สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, เล่มที่ 2, 65 – 75, 2528
2. บุษกร อุตรภิชาติ, 2545, จุลชีววิทยาทางอาหาร, โครงการส่งเสริมการผลิตเอกสารวิชาการ ภาควิชาชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา, หน้า 322-325.
3. สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545. ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ กรุงเทพฯ, หน้า 127 – 133.
4. สุเมธ ชวเดช, 2541, การพัฒนากระบวนการออกซิเดชั่นโอโซนสำหรับการบำบัดน้ำเสีย: รายงานฉบับสมบูรณ์, กรุงเทพฯ วิทยาลัยปิโตเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 44 หน้า
5. วิไลรัง สาดทอง, 2545, เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร, กรุงเทพฯ
6. Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A. and Marotta, R. 1999, “Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery”, **Catalysis today**, Vol. 53, pp. 51-59.
7. Arita, M., Nagayoshi, M., Fukuizumi, T., Okinaga, T., Masumi, S., Morikawa, M., 2005, Microbicidal efficacy of ozonated water against Candida albicans adhering to acrylic denture plates. Oral Microbiology & Immunology; 20:206.
8. Bank H. L., Schmehl, J. L. and Dratch, R. J., 1990, “Bacteriocidal Effectiveness of Modulated UV Light”, **Applied Environmental Microbiology**, Vol. 56, pp. 3888-3889.
9. Barlow PJ. 1994. An introduction to ozone generation.
10. Baysan, A., Whiley, RA., Lynch, E., 2000, Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on microorganisms associated with primary root carious lesions in vitro. Caries Research; 34: 498–501.
11. Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Robinson, R. K., 2000, “Existing and Potential Applications of Ultraviolet light in the Food Industry ea critical review”, **Science of Food and Agriculture**, Vol. 80, No. 6, pp.637-645.
12. Borup, MB., and V.D. Adams, Upgrading Wastewater Lagoon Effluents with the UV/Sedimentation Process, JWPCF, 57(3), 196 – 200, 1985.
13. Carey, J.H., 1992, “An Introduction to advanced oxidation process (AOP) for Destruction of Organics in Wastewater”, **Water Pollution Research Journal of Canada,** Vol. 27, No. 4, pp. 1–21.

14. CDC., 2013, **Trends in Foodborne Illness in the United States, 2012**. [Online], Available: http://www.cdc.gov/features/dsfoodnet2012/ [2013, September 13]

15. Celiberti, P., Pazera, P., Lussi, A., 2006, The impact of ozone treatment on enamel physical properties, American Journal of Dentistry; 19: 67–72.

16. Cho, M., Kim, J., Kim, JY., Yoon, J., Kim, JH., 2010, Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. Water Res;44: 3410-3418

17. Demirci, A. and Ngadi, M.O., 2012, **Microbial Decontamination in the Food Industry: Novel Methods and Applications**, Woodhead Publishing , Philadelphia, pp. 495-531.

18. Dorfman, L.M. and Adams, G.E., 1973, "Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions", **National Standard Reference Data System**, No. NSRDS-NBS-46.

19. Estrela, C., Estrela, CR., Decurcio, Dde A., Silva, JA., Bammann, LL., 2006, Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against Staphylococcus aureus. Brazilian Dental Journal; 17:134–138.

20. Fichet, G., Comoy, E., Duval, C., Antloga, K., Dehen, C., Charbonnier, A. and Deslys, J. P., 2004, "Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices", **The Lancet**, Vol. 364, No. 9433, pp. 521-526.

21. Forney, C.F., Rij, R.E., Denis-Arrue, R. and Smilanick, J.L., 1991, "Vapor phase hydrogen peroxide inhibits postharvest decay of table grapes", **HortScience**, Vol. 26, No. 12, pp. 1512-1514.

22. French, G.L., Otter, J.A., Shannon, K.P., Adams, N.M.T., Watling, D. and Parks, M. J., 2004, "Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination", **Journal of Hospital Infection**, Vol. 57, pp. 31-37.

23. Glaze, W.H., 1987, "Drinking-water treatment with ozone", **Environmental science & technology**, Vol. 21, No. 3, pp. 224-230.

24. Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K. and Seydim, A. C., 2004, "Use of Ozone in the Food Industry", **LWT-Food Science and Technology**, Vol. 37, No. 4, pp. 453-460.

25. Hall, L., Otter, J.A., Chewins, J. and Wengenack, N.L., 2007, "Use of hydrogen peroxide vapor for deactivation of Mycobacterium tuberculosis in a biological safety cabinet and a room", **Journal of clinical microbiology**, Vol .45, No. 3, pp. 810-815.

26. Heckert, R.A., Best, M., Jordan, L.T., Dulac, G.C., Eddington, D.L. and Sterritt, W.G., 1997, "Efficacy of vaporized hydrogen peroxide against exotic animal viruses", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 63, No. 10, pp. 3916-3918.

27. Horvath, M., Bilitzky, L., Huttner, J., 1985, Ozone. Budapest: Elsevier.

28. Hunt, N.K. and Marinas, B.J. (1997) Kinetics of Escherichia coli inactivation with ozone. Res.31 : 1355 - 1362

29. Huth, KC., Jakob, FM., Saugel, B., Cappello, C., Paschos, E., Hollweck, R., 2006, Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. European Journal of Oral Sciences; 114: 435–440.

50. Johnston, M.D., Lawson, S. and Otter, J.A., 2005, "Evaluation of hydrogen peroxide vapour as a method for the decontamination of surfaces contaminated with Clostridium botulinum spores", **Journal of Microbiological Methods**, Vol. 60, No. 3, pp. 403-411.

51. Kahnert, A., Seiler, P., Stein, M., Aze, B., McDonnell, G. and Kaufmann, S.H., 2005, "Decontamination with vaporized hydrogen peroxide is effective against Mycobacterium tuberculosis", **Letters in applied microbiology**, Vol. 40, No. 6, pp. 448-452.

52. Kačer, P., Švrček, J., Syslová, K., Václavík, J., Pavlík, D., Červený, J. and Kuzma, M., 2012, "Vapour phase hydrogen peroxide-method for decontamination of surfaces and working areas from organic pollutants", In **Organic Pollutants Ten Years after the Stockholm Convention-Environmental and Analytical Update**. pp. 400-30.

53. Kahnert, A., Seiler, P., Stein, M., Aze, B., McDonnell, G. and Kaufmann, S.H., 2005, "Decontamination with vaporized hydrogen peroxide is effective against Mycobacterium tuberculosis", **Letters in applied microbiology**, Vol. 40, No. 6, pp. 448-452.

54. Kaspar, C., Hartman, P. and Benson, A., 1987, "Coagglutination and enzyme capture test for detection of *E. coli* beta-glucuronidase D-glutamate carboxylase", **Applied Environmental Microbiology**, Vol. 53, pp. 1073-1077.

55. Khadre, M. A., Yousef, A. E., and Kim, J. G., 2001, "Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: a Review. **Journal of Food Science**, Vol. 66, No. 9, pp. 1242-1252.

56. Kim, J-G., Yousef, A.E. and Chism, G.W., 1999a, "Use of Ozone to Inactivate Microorganisms on Lettuce", **Journal of Food Safety**, Vol.19, pp. 17-34.

57. Kim, JG., Yousef, AE., Khadre, MA., 2003, Ozone and its current and future application in the food industry, Adv. Food Nutr, Res; 45: 167–218.

58. Kimura, T., 2012, “Effective Decontamination of Laboratory Animal Rooms with Vapour-phase (â€ œVaporizedâ€) Hydrogen Peroxide and Peracetic Acid”, **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences**, Vol. 39, No. 1, pp. 17-23.

59. Klapes, N.A. and Vesley, D.O.N.A.L.D., 1990, “Vapor-phase hydrogen peroxide as a surface decontaminant and sterilant”, **Applied and environmental microbiology**, Vol. 56, No. 2, pp. 503-506.

60. Kommineni, S., Zoeckler, J., Stocking, A., Liang, P.S., Flores, A., Rodriguez, R. and Brown, A., 2000, “3.0 Advanced Oxidation Processes. Treatment Technologies for removal of Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) from drinking water: air stripping, Advanced Oxidation Process, Granular Actived carbon, Sinthetic resin sorbents”, Vol. 2, pp. 109-208.

61. Koutchma, T.N., Forney, L.J. and Moraru, C.I,, 2009, **Ultraviolet Light in Food Technology**, CRC Press, London, pp.53-67.

62. Krishnamurthy, K., Irudayaraj, J., Demirci, A. and Yang, W., 2008, **Food Processing Operations Modeling: Design and Analysis**, 2nd ed., CRC Press, NW, pp. 281-299.

63. Liltved, H., Hektoen, H. and Efraimsen, H., 1995, “Inactivation of Bacterial and Viral Fish Pathogens by Ozonation or UV Irradiation in Water of Different Salinity”, Vol. 171, pp. 147-153.

64. McDonnell, G., Bonfield, P. and Hernandez, V.D., 2007, “The safe and effective fumigation of hospital areas with a new fumigation method based on vaporized hydrogen peroxide”, **American Journal of Infection Control**, Vol. 35, No. 5, pp. E33-E34.

65. Metcalf, E. E. and Eddy, H., 1991, **Wastewater engineer treatment disposal, reuse**, 3rd ed., McGraw-Hill, Singapore, pp. 3-24

66. Murakami, H., Mizuguchi, M., Hattori, M., Ito, Y., Kawai, T., Hasegawa, J., 2002, Effect of denture cleaner using ozone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *E. coli* T1 phage. Dental Materials Journal; 21:53–60.

67. Murray, BK., Ohmine, S., Tomer, DP., Jensen, KJ., Johnson, FB., Kirsi, JJ., Robison, RA., O'Neill KL, 2008, Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. J Virol Methods; 153: 74-77.

68. Munter, R., 2001, “Advanced Oxidation Processes-Current Status and Prospects”, **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry**, Vol. 50, No. 2, pp. 59-80.

69. Oizumi, M., Suzuki, T., Uchida, M., Furuya, J., Okamoto, Y., 1998, In vitro testing of a denture cleaning method using ozone. Journal of Medical and Dental Sciences; 45:135–139.

70. Otter, J.A., French, G.L., Adams, N.M.T., Watling, D. and Parks, M.J., 2006, "Hydrogen peroxide vapour decontamination in an overcrowded tertiary care referral centre: some practical answers", **Journal of Hospital Infection**, Vol. 62, No. 3, pp. 384-385.

71. Raffellini, S., Guerrero, S. and ALZAMORA, S., 2008, "Effect of hydrogen peroxide concentration and pH on inactivation kinetics of *Escherichia coli*", **Journal of food safety**, Vol. 28, No. 4, pp. 514-533.

72. Restainno, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B. and Palnikar, P., 1995, "Efficiacy of ozonated water against various food – Environ. Microbiol 61: 3471 - 3475

73. Rice, G., Bollyky, L. and Lacy, J. 1991. Analytical aspects of ozone treatment of water and wastewater, Cheiseas Lewis Publishes. 723p.

74. Rickard, GD., Richardson, R., Johnson, T., McColl, D., Hooper, L., 2004, Ozone therapy for the treatment of dental caries. Cochrane Database of Systematic Reviews; CD004153.

75. Rogers, J.V., Sabourin, C.L.K., Choi,Y.W., Richter, W.R., Rudnicki, D.C., Riggs, K.B. and Chang, J., 2005, "Decontamination assessment of Bacillus anthracis, Bacillus subtilis, and Geobacillus stearothermophilus spores on indoor surfaces using a hydrogen peroxide gas generator", **Journal of applied microbiology**, Vol. 99, No. 4, pp. 739-748.

76. Rutala, W.A. and Weber, D.J., 2010, "Guideline for disinfection and sterilization of prion-contaminated medical instruments", **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Vol. 31, No. 2, pp. 107-117.

77. Sapers, G.M., Walker, P.N., Sites, J.E., Annous, B.A. and Eblen, D.R., 2003, "Vapor‐phase Decontamination of Apples Inoculated with *Escherichia coli*", **Journal of Food Science**, Vol. 68, No. 3, pp. 1003-1007.

78. Severin, B.F., and M.T. Suidan, Ultraviolet Disinfection for Municipal Wastewater, CEP, 81(4), 37 – 44, 1985

79. Sung, H.J., Song, W.J., Kim, K.P., Ryu, S. and Kang, D.H., 2014, "Combination Effect of Ozone and Heat Treatments for the Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in Apple Juice", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 171, pp. 147-153.

80. Suzuki, T., Oizumi, M., Furuya, J., Okamoto, Y., Rosenstiel, SF., 1999, Influence of ozone on oxidation of dental alloys. The International Journal of Prosthodontics; 12:179–183.

81. Tap, C. and Rice, R. G., 2012, "Generation and Control of Ozone", **Ozone in Food Processing**, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 33-54

82. TECHCOMMENTARY, 1966, "Advanced Oxidation Processes for Treatment of Industrial Wastewater", **An EPRI Community Environmental Center Publ**. No. 1, 1996.

83. Technical Data Monograph, 2003, **VHP (Vaporized Hydrogen Peroxide) and Bio-decontamination Technology**, Available at:

https://www.bandvtesting.com/uploads/images/pdf/B&V_VHP_Tech_Info_Corrected [22th June, 2017].

84. Thabet, SS., Thabet, HS., Atalla, SS., 2007, Efficacy of medical ozone in attenuation of murine Schistosomiasis mansoni infection morbidity. J Egypt Soc Parasitol; 37:915-944.

85. Unger-Bimczok, B., Kottke, V., Hertel, C. and Rauschnabel, J., 2008, "The influence of humidity, hydrogen peroxide concentration, and condensation on the inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores with hydrogen peroxide vapor", **Journal of Pharmaceutical Innovation**, Vol. 3, No. 2, pp. 123-133.

86. Vassal, S., Favennec, L., Ballet, J.J. and Brasseur, P., 1998, "Hydrogen peroxide gas plasma sterilization is effective against Cryptosporidium parvum oocysts", **American journal of infection control**, Vol. 26, No. 2, pp. 136-138.

87. Wickramanayake, G.B. and Rubin, AJ, Sproul, O.J., 1984, " Inactivation of *Giardia lamblia* Cysts with Ozone", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol.48, pp.671-672.

88. Venosa, A.D., Disinfection, JWPCF, 58(6), 518 – 524, 1986.

Zhou, H. and Smith, D.W., 2002, "Advanced technologies in water and wastewater treatment", **Journal of Environmental Engineering and Science**, Vol. 1, No. 4, pp. 247-264.

89. http://allwomenstalk.com/10-facts-about-organic-food

90. www.ozone **applications.com/using ozone to destroy bacteria-cell lysing.htm**

91. http://www.radiantuv.com/uv-edu/

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

Sangadkit, W, Deepatana, A, and Thipayarat, A., 2017, "Combined Ozonation and UV-C Treatment to Inactivate *E. coli* Contaminants in Model Fish Sauce", Proceedings of the International Food Research Conference, pp. 77 - 80, July 25 – 27, Vanue:Complex of the Deputy Vice Chancellor (Research and Innovation), University Putra, Malaysia.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป

มีการนำผลงานวิจัยไปประยุกต์ใช้ที่ บริษัท ไทยเอเซียไรซ์ โปรดักส์ จำกัด เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*/coliform และเชื้อรา *A. niger* ที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตก๋วยเตี๋ยวของโรงงาน โดยผู้วิจัยได้นำเทคโนโลยีดังกล่าวไปทำการทำความสะอาดยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่จะเริ่มกระบวนการผลิตและหลังการผลิตเพื่อเป็นการ sanitize ระบบ ช่วยควบคุมสุขลักษณะการผลิตที่ดี ยกระดับมาตรฐานการผลิตของโรงงานและเพื่อเป็นแนวทางเลือกใหม่ของการยั้บยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อภายในโรงงาน

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัย สามารถเป็นแนวทางต่อยอดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคโนโลยีที่สะอาด ไม่มีสารตกค้างที่จะเป็นอันตรายกับคนและสิ่งแวดล้อม ช่วยลดการสูญเสียจากการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli*/coliforms ส่งผลให้สินค้าคงคลังมีปริมาณน้อยลง ทำให้สามารถบริหารพื้นที่ผลิตของทางโรงงานอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อรองรับกำลังการผลิตที่เพิ่มมากขึ้น โดยในงานวิจัยจะมีการออกแบบระบบและเครื่องมืออุปกรณ์ที่เหมาะสมเพื่อเป็นต้นแบบอุปกรณ์สำหรับการทดลองที่ถูกสุขลักษณะการผลิตที่ดี

ภาคผนวก

(ข้อมูลผลการทดลอง)

ตาราง A.1 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในน้ำ DI

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV No salt No caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 No salt No caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 No salt No caramel	SE	O_3 No salt No caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 No salt No caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 No salt No caramel	SE
0	1.00	0.02	1.00	0.05	1.00	0.05	1.00	0.07	1.00	0.03	1.00	0.04
2.5	0.98	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.95	0.09	0.82	0.12	0.33	0.06
5	1.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	0.06	0.72	0.09	0.30	0.12
10	1.04	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85	0.03	0.44	0.09	0.29	0.10
15	1.04	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.58	0.03	0.30	0.12	0.00	0.00
20	1.04	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.11	0.32	0.12	0.00	0.00
25	1.02	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45	0.07	0.35	0.08	0.00	0.00
30	1.05	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.09	0.30	0.08	0.00	0.00

ตาราง A.2 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายสีคาราเมลความเข้มข้น 0.03% (OD_{405nm} 0.25)

เวลา	อัตราการมีชีวิต											
(นาที)	No UV	SE	UV	SE	UV	SE	O_3	SE	O_3-UV	SE	O_3-UV	SE
			1.44 kJ/m2		2.88 kJ/m^2				1.44 kJ/m^2		2.88 kJ/m^2	
	No salt		No salt		No salt		No salt		No salt		No salt	
	No caramel		No caramel		No caramel		No caramel		No caramel		No caramel	
0	1.00	0.09	1.00	0.04	1.00	0.19	1.00	0.06	1.00	0.03	1.00	0.02
2.5	0.97	0.01	0.54	0.03	0.52	0.10	0.83	0.05	0.82	0.12	0.82	0.04
5	0.98	0.02	0.39	0.07	0.40	0.04	0.81	0.09	0.72	0.09	0.69	0.03
10	0.99	0.03	0.23	0.1	0.23	0.10	0.81	0.04	0.44	0.09	0.42	0.05
15	1.01	0.07	0.13	0.05	0.00	0.00	0.78	0.06	0.40	0.12	0.36	0.17
20	0.97	0.07	0.00	0.06	0.00	0.00	0.77	0.07	0.35	0.12	0.31	0.10
25	1.00	0.07	0.00	0.08	0.00	0.00	0.76	0.15	0.32	0.08	0.00	0.00
30	1.01	0.11	0.00	0.05	0.00	0.00	0.74	0.06	0.30	0.08	0.00	0.00

ตาราง A.3 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายสีคาราเมลความเข้มข้น 0.06% (OD_{405nm} 0.50)

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV No salt No caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 No salt No caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 No salt No caramel	SE	O_3 No salt No caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 No salt No caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 No salt No caramel	SE
0	1.00	0.05	1.00		1.00	0.14	1.00	0.09	1.00	0.18	1.00	0.10
2.5	1.02	0.02	0.76		0.73	0.07	0.99	0.20	0.88	0.17	0.58	0.03
5	1.01	0.04	0.56		0.58	0.02	0.91	0.15	0.81	0.17	0.53	0.04
10	1.02	0.03	0.43		0.30	0.14	0.90	0.14	0.67	0.11	0.40	0.08
15	1.00	0.06	0.15		0.00	0.00	0.87	0.14	0.55	0.11	0.32	0.09
20	1.00	0.03	0.09		0.00	0.00	0.88	0.20	0.45	0.14	0.31	0.05
25	1.00	0.06	0.00		0.00	0.00	0.87	0.19	0.41	0.06	0.29	0.05
30	1.01	0.07	0.00		0.00	0.00	0.85	0.23	0.40	0.04	0.28	0.02

ตาราง A.4 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายสีคาราเมลความเข้มข้น 0.13% (OD_{405nm} 1.00)

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV No salt No caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 No salt No caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 No salt No caramel	SE	O_3 No salt No caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 No salt No caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 No salt No caramel	SE
0	1.00	0.09	1.00	0.11	1.00	0.04	1.00	0.10	1.00	0.07	1.00	0.15
2.5	0.96	0.01	0.83	0.04	0.80	0.10	0.99	0.08	0.93	0.10	0.78	0.09
5	0.95	0.02	0.75	0.10	0.77	0.08	0.94	0.05	0.90	0.02	0.63	0.20
10	0.96	0.03	0.61	0.09	0.48	0.03	0.96	0.16	0.75	0.03	0.60	0.21
15	0.96	0.07	0.50	0.11	0.37	0.22	0.99	0.02	0.64	0.12	0.50	0.03
20	0.97	0.07	0.42	0.09	0.33	0.10	0.90	0.03	0.57	0.16	0.48	0.02
25	0.96	0.07	0.30	0.10	0.32	0.10	1.01	0.08	0.56	0.04	0.48	0.02
30	0.98	0.11	0.27	0.00	0.30	0.00	0.97	0.35	0.51	0.09	0.47	0.06

ตาราง A.5 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 1% (w/v)

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV 1% salt No caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 1% salt No caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 1% salt No caramel	SE	O_3 1% salt No caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 1% salt No caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 1% salt No caramel	SE
0	1.00	0.03	1.00	0.09	1.00	0.01	1.00	0.10	1.00	0.07	1.00	0.07
2.5	1.02	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99	0.04	0.82	0.06	0.50	0.04
5	1.05	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.94	0.09	0.76	0.07	0.43	0.06
10	1.02	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.95	0.16	0.60	0.09	0.31	0.14
15	1.03	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.96	0.06	0.50	0.07	0.33	0.21
20	1.02	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.98	0.02	0.49	0.10	0.29	0.16
25	1.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.94	0.05	0.49	0.14	0.30	0.10
30	1.03	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.96	0.07	0.48	0.05	0.29	0.16

ตาราง A.6 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 1% (w/v) ที่มีการปรับสีคาราเมลความเข้มข้น 0.03% (OD_{405nm} 0.50)

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV 1% salt 0.03% caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 1% salt 0.03% caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 1% salt 0.03% caramel	SE	O_3 1% salt 0.03% caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 1% salt 0.03% caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 1% salt 0.03% caramel	SE
0	1.00	0.04	1.00	0.16	1.00	0.16	1.00	0.10	1.00	0.03	1.00	0.09
2.5	0.98	0.09	0.60	0.03	0.42	0.03	0.90	0.09	0.84	0.12	0.87	0.16
5	0.97	0.08	0.44	0.18	0.33	0.18	0.93	0.07	0.72	0.09	0.52	0.02
10	0.96	0.03	0.25	0.16	0.00	0.00	0.90	0.19	0.56	0.09	0.29	0.10
15	0.97	0.05	0.15	0.00	0.00	0.00	0.90	0.10	0.38	0.12	0.28	0.10
20	0.99	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99	0.05	0.33	0.12	0.27	0.00
25	0.96	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.96	0.06	0.33	0.08	0.29	0.10
30	0.97	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.93	0.06	0.31	0.08	0.27	0.00

ตาราง A.7 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 1% (w/v) ที่มีการปรับสีคาราเมลความเข้มข้น 0.06% (OD_{405nm} 0.50)

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV 1% salt 0.06% caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 1% salt 0.06% caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 1% salt 0.06% caramel	SE	O_3 1% salt 0.06% caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 1% salt 0.06% caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 1% salt 0.06% caramel	SE
0	1.00	0.06	1.00	0.11	1.00	0.21	1.00	0.10	1.00	0.10	1.00	0.10
2.5	1.02	0.12	0.87	0.05	0.67	0.07	0.89	0.17	0.86	0.10	0.74	0.03
5	1.01	0.06	0.65	0.03	0.57	0.10	0.90	0.18	0.79	0.14	0.50	0.04
10	1.04	0.10	0.60	0.04	0.55	0.09	0.89	0.20	0.64	0.04	0.47	0.08
15	1.04	0.05	0.45	0.07	0.41	0.04	0.86	0.10	0.48	0.04	0.45	0.09
20	1.02	0.05	0.32	0.07	0.00	0.00	0.86	0.10	0.50	0.08	0.38	0.05
25	1.04	0.14	0.12	0.08	0.00	0.00	0.87	0.20	0.47	0.16	0.38	0.05
30	1.02	0.09	0.00	0.04	0.00	0.00	0.89	0.20	0.36	0.20	0.31	0.02

ตาราง A.8 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 1% (w/v) ที่มีการปรับสีคาราเมลความเข้มข้น 0.13% (OD_{405nm} 1.00)

เวลา	อัตราการมีชีวิต											
(นาที)	No UV	SE	UV	SE	UV	SE	O_3	SE	O_3-UV	SE	O_3-UV	SE
			1.44 kJ/m2		2.88 kJ/m^2				1.44 kJ/m^2		2.88 kJ/m^2	
	1% salt 0.13% caramel		1% salt 0.13% caramel		1% salt 0.13% caramel		1% salt 0.13% caramel		1% salt 0.13% caramel		1% salt 0.13% caramel	
0	1.00	0.04	1.00	0.06	1.00	0.06	1.00	0.02	1.00	0.03	1.00	0.14
2.5	0.98	0.09	0.87	0.09	0.91	0.10	1.00	0.07	0.95	0.13	0.80	0.10
5	0.99	0.08	0.82	0.13	0.77	0.19	0.95	0.09	0.80	0.03	0.69	0.07
10	1.04	0.03	0.75	0.20	0.51	0.12	0.94	0.06	0.74	0.12	0.51	0.06
15	1.05	0.05	0.48	0.17	0.45	0.06	0.95	0.04	0.61	0.14	0.33	0.04
20	0.98	0.05	0.37	0.07	0.35	0.09	0.97	0.05	0.47	0.09	0.29	0.10
25	0.98	0.08	0.35	0.12	0.33	0.10	0.96	0.05	0.41	0.03	0.25	0.10
30	0.99	0.06	0.33	0.06	0.31	0.17	0.98	0.04	0.37	0.24	0.00	0.00

ตาราง A.9 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 10% (w/v)

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV 10% salt No caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 10% salt No caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 10% salt No caramel	SE	O_3 10% salt No caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 10% salt No caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 10% salt No caramel	SE
0	1.00	0.10	1.00	0.09	1.00	0.01	1.00	0.20	1.00	0.13	1.00	0.10
2.5	0.99	0.03	0.35	0.20	0.00	0.00	0.94	0.02	0.84	0.04	0.58	0.07
5	0.98	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.97	0.10	0.65	0.10	0.47	0.05
10	0.97	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91	0.05	0.47	0.03	0.43	0.02
15	0.99	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89	0.20	0.41	0.11	0.37	0.06
20	0.99	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91	0.22	0.35	0.14	0.30	0.10
25	0.98	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.92	0.03	0.32	0.10	0.00	0.00
30	0.96	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89	0.14	0.31	0.00	0.00	0.00

ตาราง A.10 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 10% (w/v) ที่มีการปรับสีคาราเมลความเข้มข้น 0.03% (OD_{405nm} 0.25)

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV 10% salt 0.03% caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 10% salt 0.03% caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 10% salt 0.03% caramel	SE	O_3 10% salt 0.03% caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 10% salt 0.03% caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 10% salt 0.03% caramel	SE
0	1.00	0.11	1.00	0.07	1.00	0.00	1.00	0.10	1.00	0.03	1.00	0.07
2.5	1.05	0.04	0.74	0.05	0.48	0.10	0.95	0.08	0.78	0.12	0.74	0.25
5	1.05	0.07	0.45	0.05	0.00	0.00	0.92	0.04	0.68	0.09	0.59	0.05
10	1.03	0.06	0.20	0.09	0.00	0.00	0.92	0.06	0.46	0.09	0.44	0.09
15	1.01	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91	0.12	0.43	0.12	0.39	0.15
20	1.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	0.06	0.38	0.12	0.31	0.10
25	0.98	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91	0.12	0.33	0.08	0.00	0.00
30	0.98	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91	0.09	0.32	0.08	0.00	0.00

ตาราง A.11 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 10% (w/v) ที่มีการปรับสีคาราเมลความเข้มข้น 0.06% (OD_{405nm} 0.50)

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV 10% salt 0.06% caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 10% salt 0.06% caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 10% salt 0.06% caramel	SE	O_3 10% salt 0.06% caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 10% salt 0.06% caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 10% salt 0.06% caramel	SE
0	1.00	0.11	1	0.15	1.00	0.26	1.00	0.06	1.00	0.14	1.00	0.10
2.5	1.01	0.06	0.65	0.11	0.58	0.07	0.89	0.04	0.99	0.12	0.68	0.03
5	0.98	0.02	0.43	0.1	0.39	0.12	0.86	0.20	0.80	0.06	0.60	0.04
10	1.01	0.05	0.31	0.09	0.00	0.00	0.87	0.08	0.72	0.07	0.50	0.08
15	1.01	0.06	0.12	0.1	0.00	0.00	0.86	0.16	0.55	0.03	0.31	0.09
20	1.02	0.08	0.00	0	0.00	0.00	0.85	0.14	0.43	0.04	0.32	0.05
25	1.00	0.05	0.00	0	0.00	0.00	0.84	0.16	0.39	0.14	0.30	0.05
30	1.01	0.09	0.00	0	0.00	0.00	0.87	0.21	0.36	0.18	0.31	0.02

ตาราง A.12 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 10% (w/v) ที่มีการปรับสีคาราเมลความเข้มข้น 0.13% (OD_{405nm} 1.00)

เวลา	อัตราการมีชีวิต											
(นาที)	No UV 10% salt 0.13% caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 10% salt 0.13% caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 10% salt 0.13% caramel	SE	O_3 10% salt 0.13% caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 10% salt 0.13% caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 10% salt 0.13% caramel	SE
0	1.00	0.11	1.00	0.04	1.00	0.30	1.00	0.10	1.00	0.02	1.00	0.04
2.5	1.05	0.04	0.98	0.05	0.93	0.09	0.95	0.04	0.97	0.07	0.87	0.03
5	1.05	0.07	0.97	0.13	0.86	0.02	1.00	0.02	0.83	0.03	0.59	0.02
10	1.03	0.06	0.88	0.08	0.70	0.12	0.99	0.01	0.69	0.02	0.39	0.09
15	1.01	0.09	0.83	0.03	0.72	0.12	0.96	0.09	0.57	0.11	0.30	0.10
20	1.00	0.07	0.72	0.02	0.53	0.08	0.85	0.04	0.50	0.14	0.00	0.00
25	0.98	0.11	0.55	0.05	0.46	0.10	0.94	0.11	0.37	0.09	0.00	0.00
30	0.98	0.04	0.53	0.03	0.44	0.20	0.95	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00

ตาราง A.13 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 20% (w/v)

เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV 20% salt No caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 20% salt No caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 20% salt No caramel	SE	O_3 20% salt No caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 20% salt No caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 20% salt No caramel	SE
0	1.00	0.01	1.00	0.05	1.00	0.14	1.00	0.14	1.00	0.15	1.00	0.20
2.5	1.02	0.06	0.51	0.04	0.63	0.02	0.99	0.09	0.61	0.12	0.38	0.12
5	0.97	0.05	0.42	0.08	0.31	0.00	0.90	0.04	0.47	0.13	0.32	0.17
10	0.96	0.04	0.38	0.00	0.00	0.00	0.88	0.23	0.42	0.10	0.29	0.10
15	0.99	0.06	0.36	0.07	0.00	0.00	0.84	0.10	0.34	0.12	0.00	0.00
20	0.97	0.03	0.38	0.07	0.00	0.00	0.85	0.13	0.33	0.09	0.00	0.00
25	0.93	0.08	0.30	0.00	0.00	0.00	0.85	0.16	0.30	0.10	0.00	0.00
30	0.90	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.80	0.07	0.28	0.10	0.00	0.00

ตาราง A.14 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 20% (w/v) ที่มีการปรับสีคาราเมลความเข้มข้น 0.03% (OD_{405nm} 0.25)

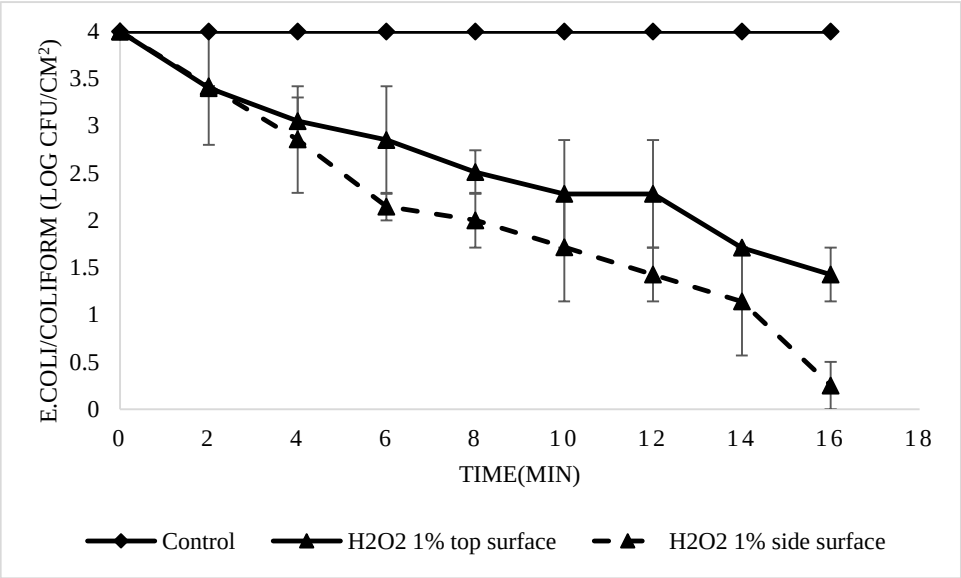
เวลา	อัตราการมีชีวิต											
(นาที)	No UV 20% salt 0.03% caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 20% salt 0.03% caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 20% salt 0.03% caramel	SE	O_3 20% salt 0.03% caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 20% salt 0.03% caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 20% salt 0.03% caramel	SE
0	1.00	0.29	1.00	0.07	1.00	0.02	1.00	0.10	1.00	0.03	1.00	0.10
2.5	0.93	0.05	0.55	0.05	0.45	0.04	0.88	0.06	0.80	0.12	0.73	0.10
5	0.94	0.08	0.43	0.10	0.00	0.00	0.92	0.14	0.61	0.09	0.59	0.09
10	0.94	0.00	0.33	0.08	0.00	0.00	0.96	0.07	0.44	0.09	0.46	0.06
15	0.96	0.08	0.15	0.04	0.00	0.00	0.89	0.00	0.35	0.12	0.00	0.00
20	0.95	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.87	0.11	0.34	0.12	0.00	0.00
25	0.91	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89	0.13	0.31	0.08	0.00	0.00
30	0.93	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	0.06	0.30	0.08	0.00	0.00

ตาราง A.15 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 20% (w/v) ที่มีการปรับสีคาราเมลความเข้มข้น 0.06% (OD_{405nm} 0.50)

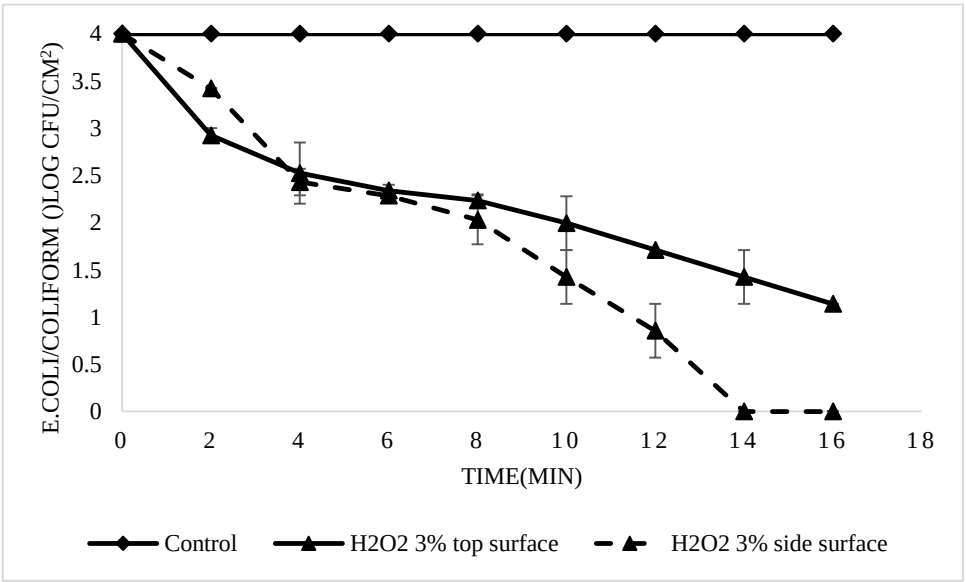
เวลา (นาที)	อัตราการมีชีวิต											
	No UV 20% salt 0.06% caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 20% salt 0.06% caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 20% salt 0.06% caramel	SE	O_3 20% salt 0.06% caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 20% salt 0.06% caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 20% salt 0.06% caramel	SE
0	1.00	0.07	1.00	0.05	1.00	0.07	1.00	0.02	1.00	0.09	1.00	0.10
2.5	0.96	0.03	0.80	0.04	0.76	0.10	0.93	0.09	0.81	0.06	0.60	0.03
5	0.90	0.05	0.60	0.07	0.47	0.05	0.96	0.11	0.63	0.08	0.48	0.04
10	0.92	0.02	0.45	0.09	0.29	0.00	0.96	0.02	0.51	0.07	0.38	0.08
15	0.91	0.03	0.31	0.10	0.00	0.00	0.89	0.16	0.47	0.05	0.30	0.09
20	0.87	0.04	0.17	0.03	0.00	0.00	0.88	0.10	0.41	0.03	0.28	0.05
25	0.91	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	0.14	0.34	0.14	0.00	0.05
30	0.87	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.92	0.21	0.33	0.10	0.00	0.02

ตาราง A.16 ผลของ UV, O_3 และ O_3-UV ต่ออัตราการมีชีวิตของ *E. coli* ในสารละลายเกลือความเข้มข้น 20% (w/v) ที่มีการปรับสีคาราเมลความเข้มข้น 0.13% (OD_{405nm} 1.00)

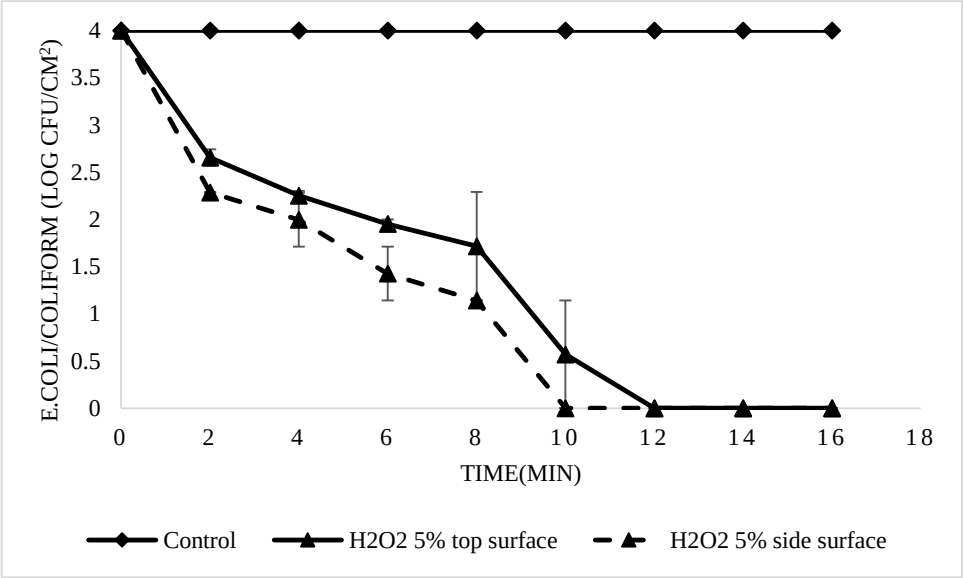
เวลา	อัตราการมีชีวิต											
(นาที)	No UV 20% salt 0.13% caramel	SE	UV 1.44 kJ/m2 20% salt 0.13% caramel	SE	UV 2.88 kJ/m^2 20% salt 0.13% caramel	SE	O_3 20% salt 0.13% caramel	SE	O_3-UV 1.44 kJ/m^2 20% salt 0.13% caramel	SE	O_3-UV 2.88 kJ/m^2 20% salt 0.13% caramel	SE
0	1.00	0.09	1.00	0.04	1.00	0.12	1.00	0.06	1.00	0.03	1.00	0.03
2.5	0.97	0.05	0.94	0.01	0.78	0.04	0.94	0.11	0.81	0.15	0.77	0.12
5	0.89	0.11	0.90	0.03	0.69	0.06	0.87	0.03	0.60	0.04	0.49	0.09
10	0.88	0.04	0.80	0.08	0.55	0.10	0.87	0.03	0.59	0.11	0.40	0.06
15	0.86	0.08	0.62	0.06	0.45	0.10	0.82	0.08	0.38	0.21	0.30	0.10
20	0.91	0.07	0.54	0.20	0.44	0.05	0.81	0.09	0.28	0.00	0.00	0.00
25	0.85	0.02	0.46	0.01	0.41	0.07	0.72	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0.80	0.04	0.48	0.14	0.39	0.00	0.76	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00



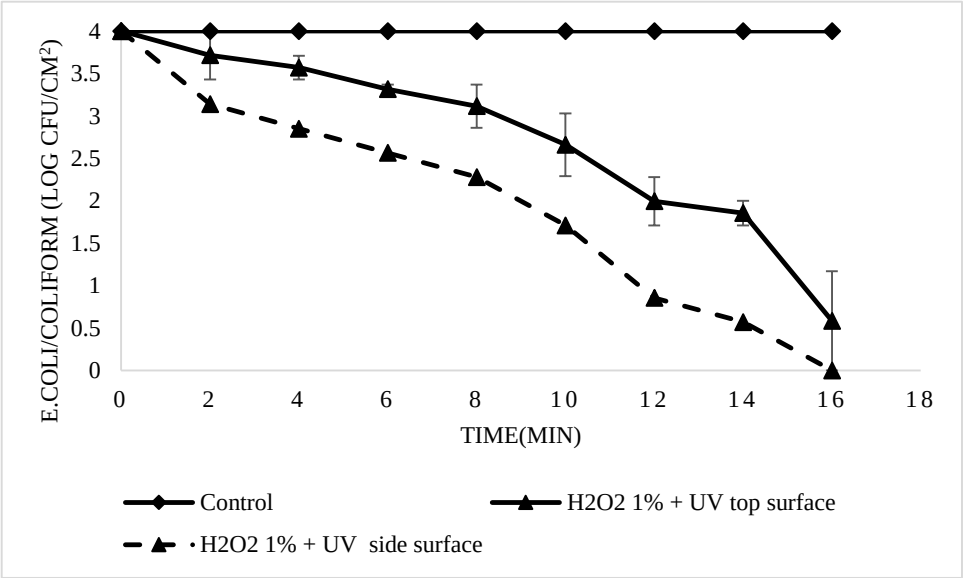
รูปที่ B.1 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 1% ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



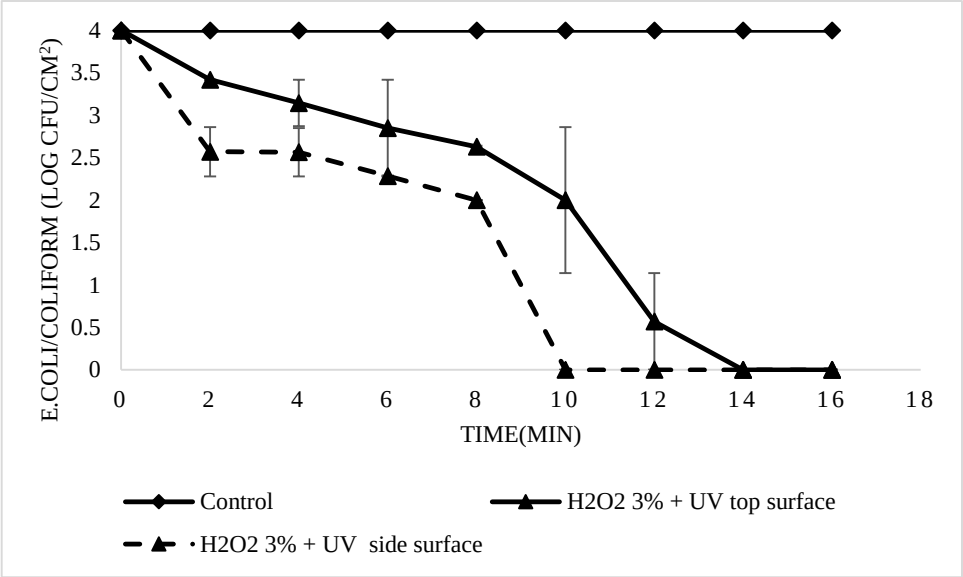
รูปที่ B.2 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



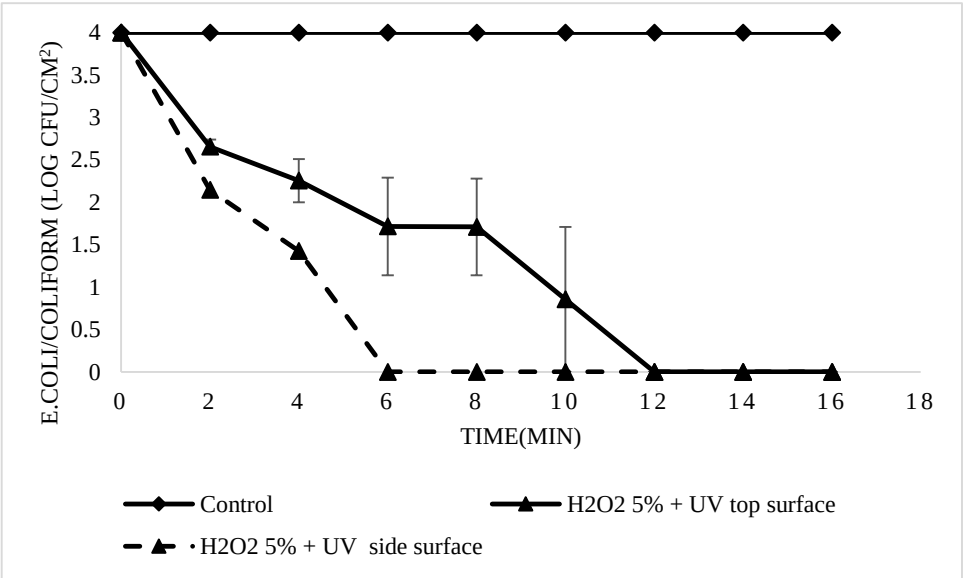
รูปที่ B.3 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 5% ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



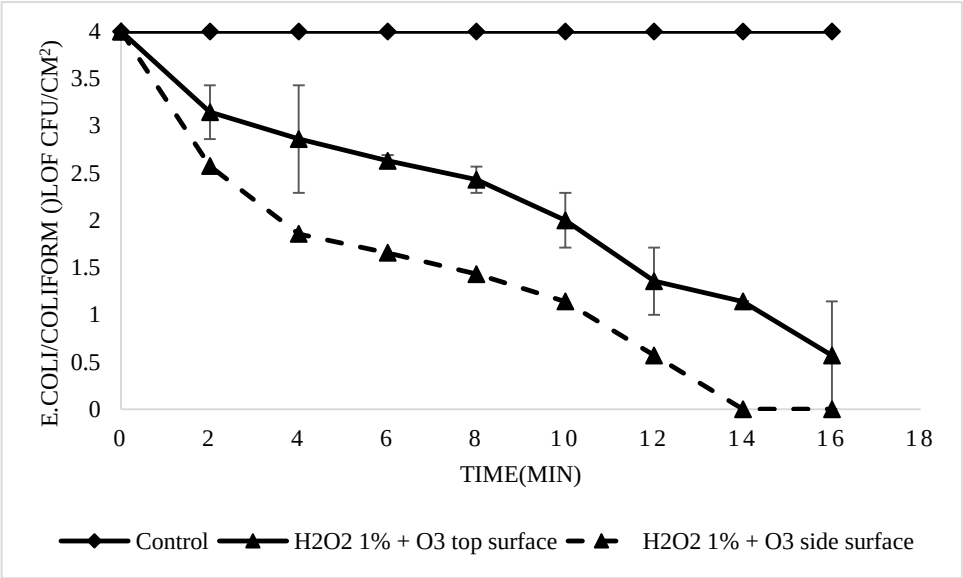
รูปที่ B.4 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 1% ร่วมกับการใช้ UV-C ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



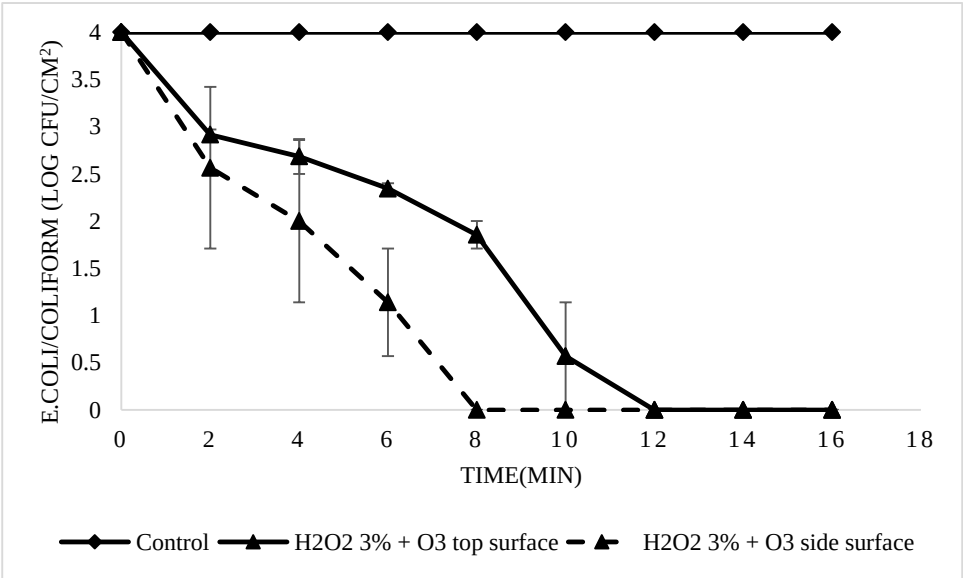
รูปที่ B.5 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ร่วมกับการใช้ UV-C ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



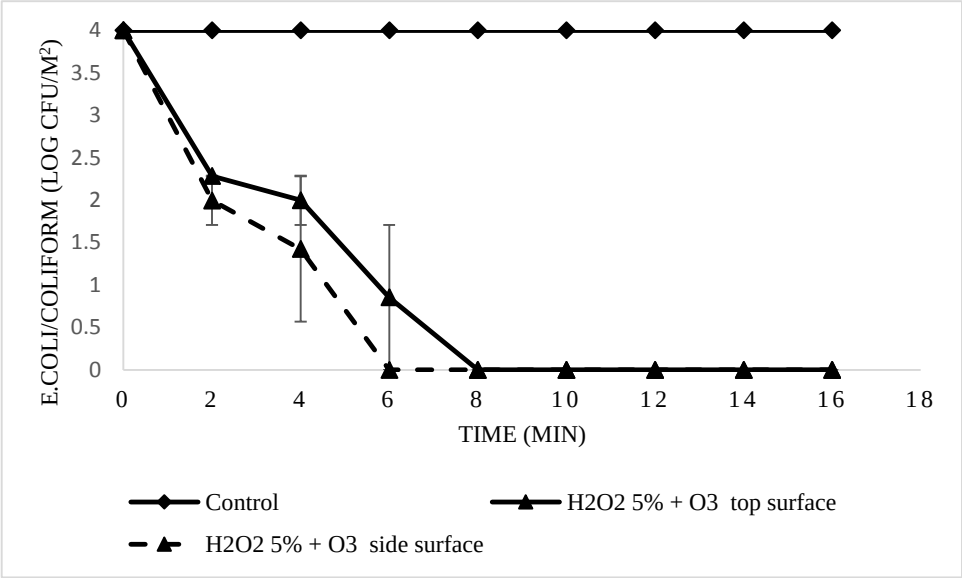
รูปที่ B.6 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 5% ร่วมกับการใช้ UV-C ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



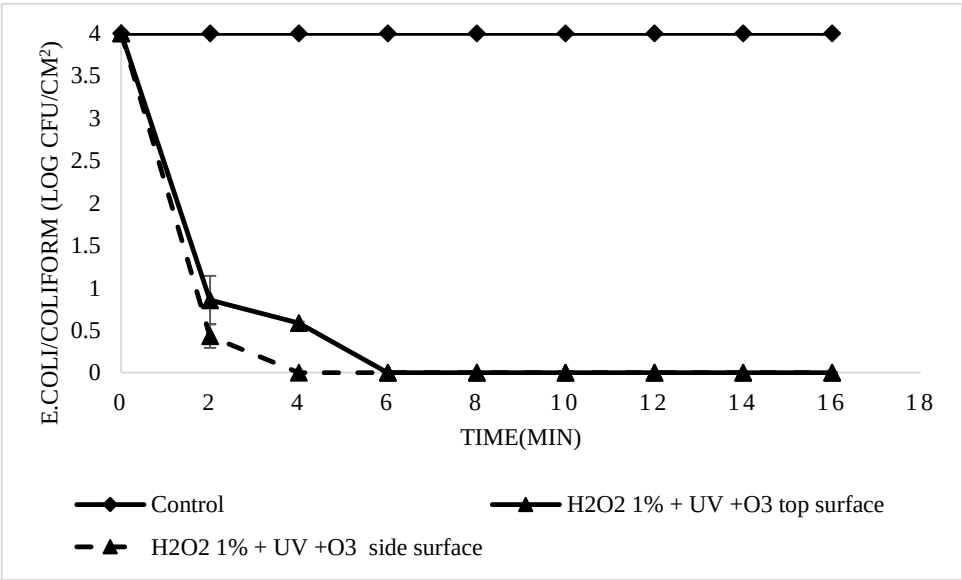
รูปที่ B.7 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 1% ร่วมกับการใช้ O_3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



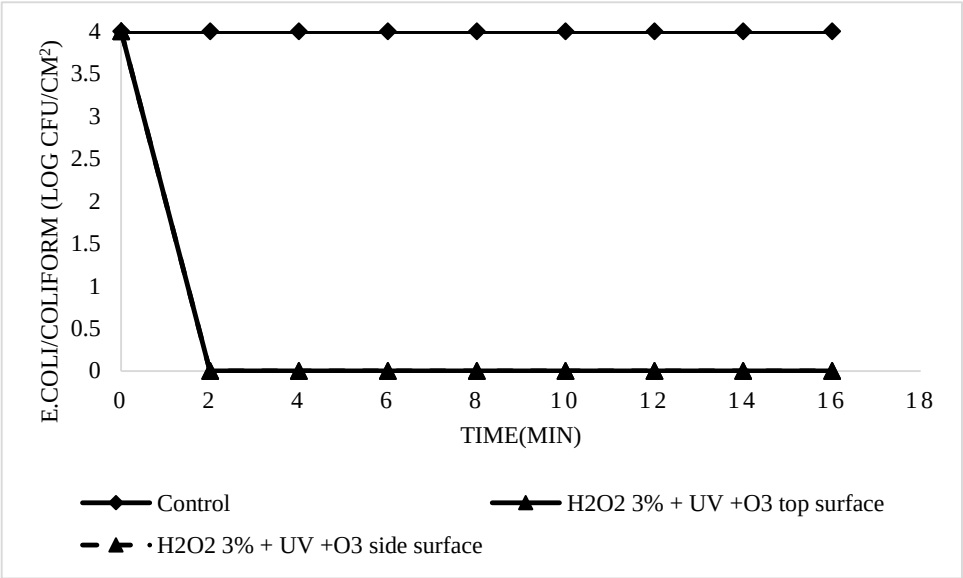
รูปที่ B.8 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ร่วมกับการใช้ O_3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



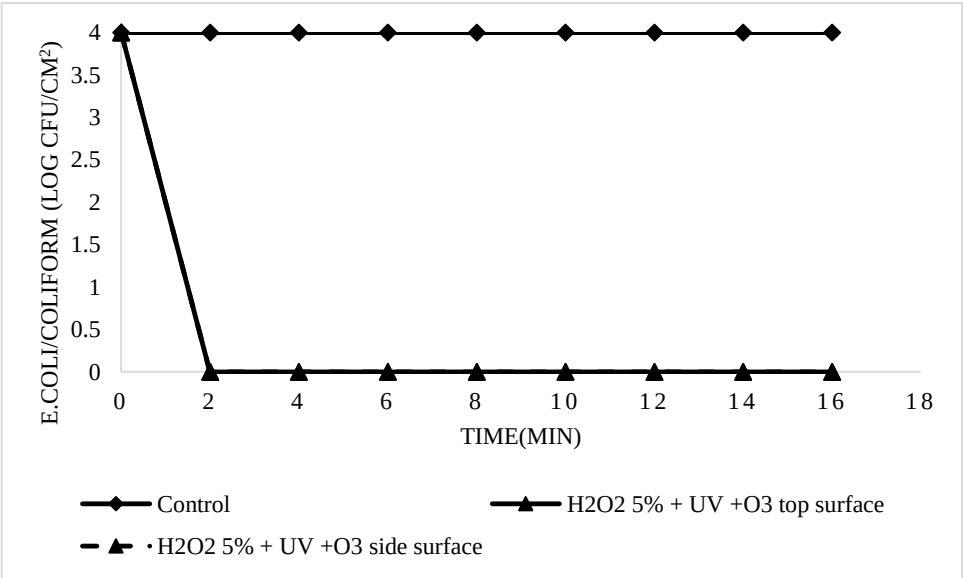
รูปที่ B.9 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 5% ร่วมกับการใช้ O_3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



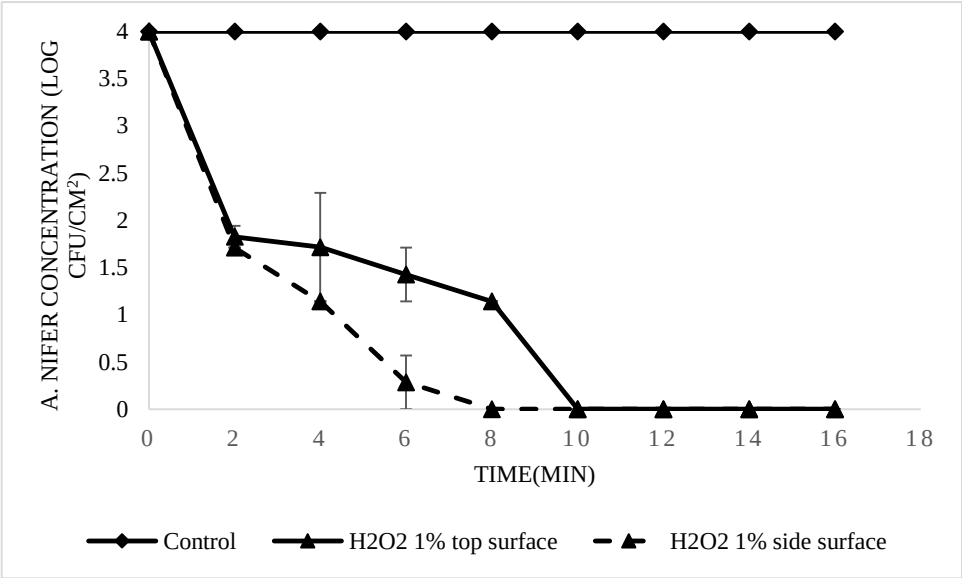
รูปที่ B.10 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 1% ร่วมกับการใช้ UV-C/O_3 ที่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



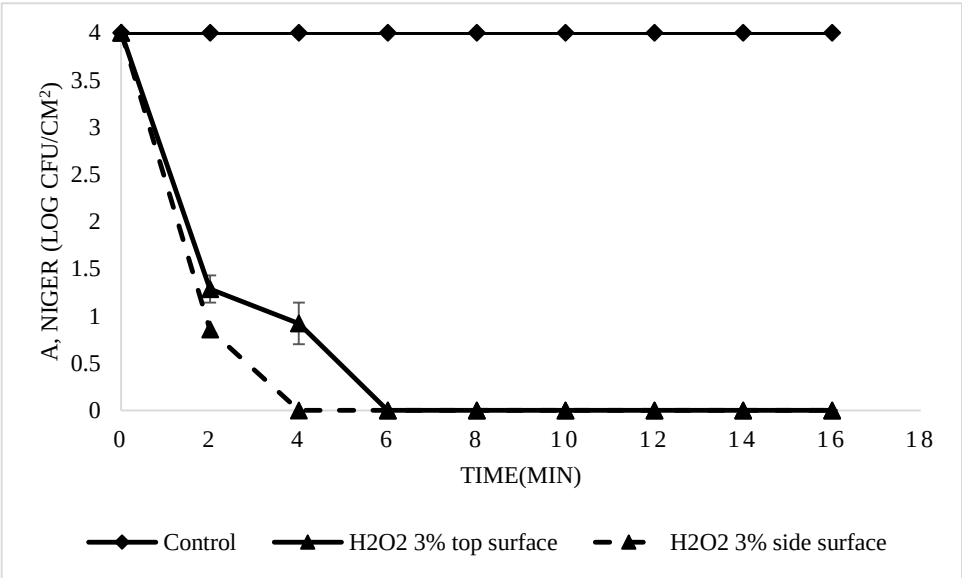
รูปที่ B.11 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ร่วมกับการใช้ UV-C/O_3 ที่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



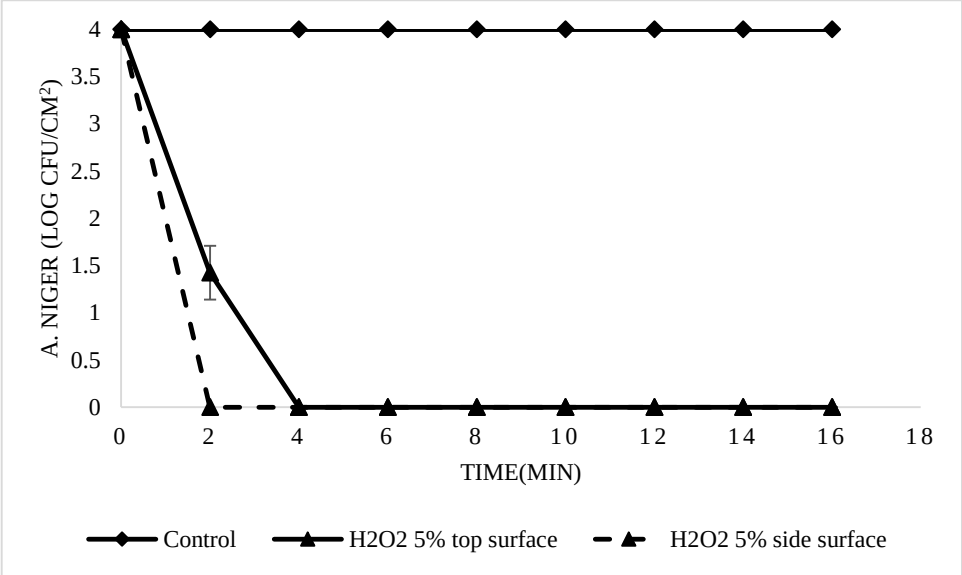
รูปที่ B.12 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 5% ร่วมกับการใช้ UV-C/O_3 ที่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *E.coli*/coliform 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



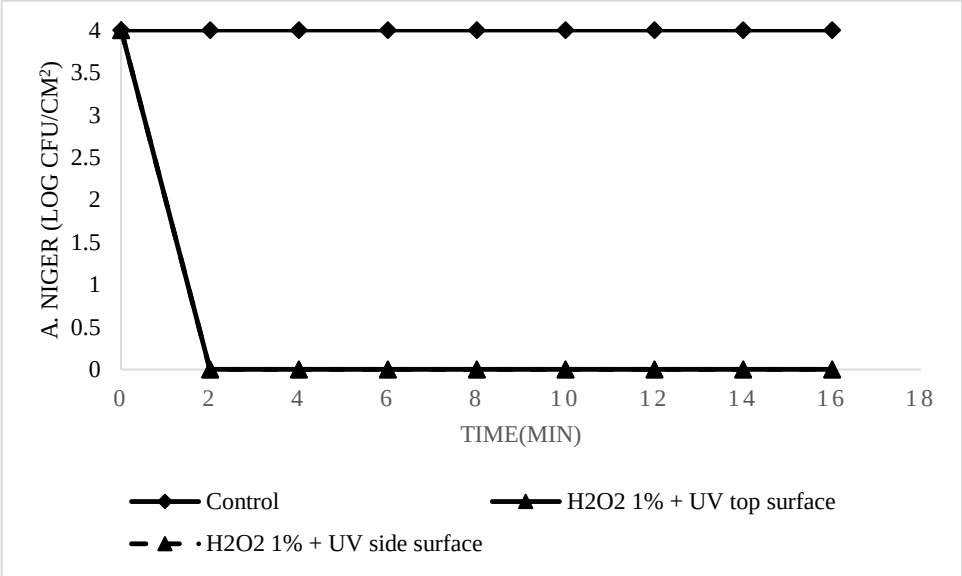
รูปที่ B.13 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 1% ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



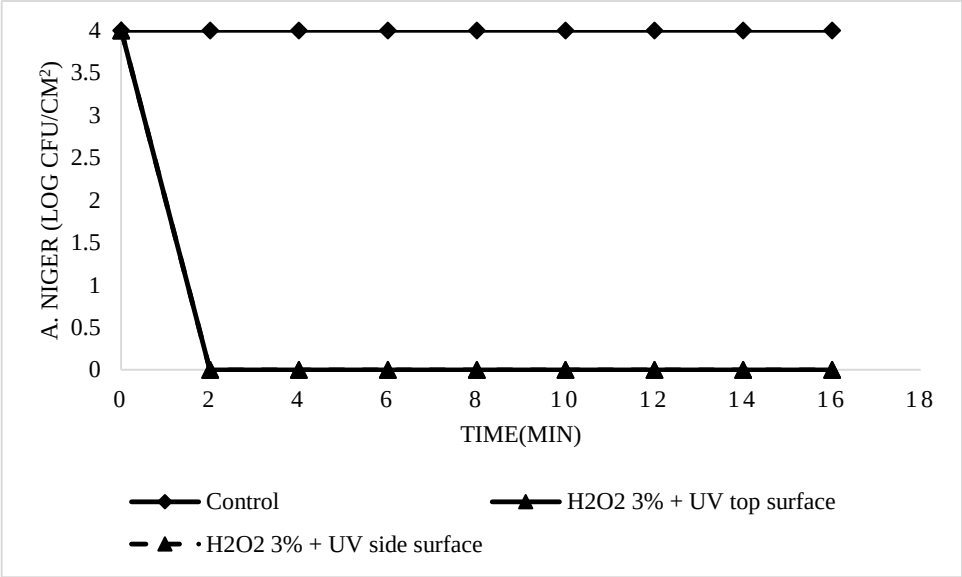
รูปที่ B.14 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ที่ปริมาณเชื้อ เริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



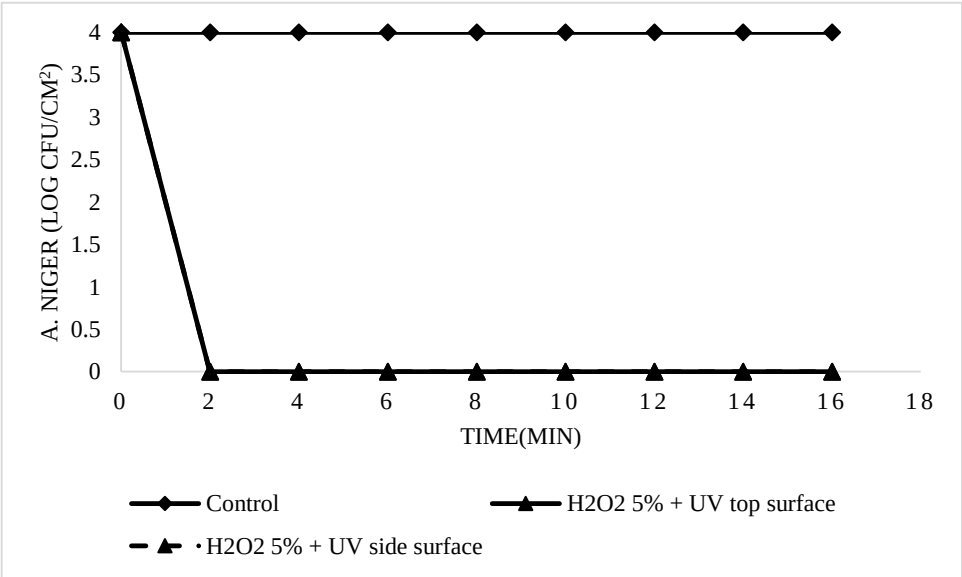
รูปที่ B.15 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 5% ที่ปริมาณเชื้อ เริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



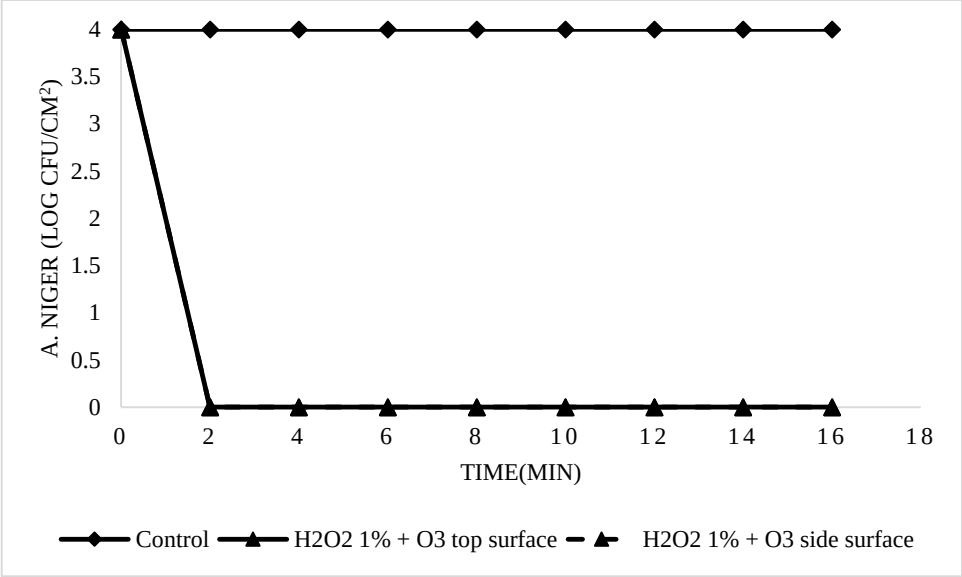
รูปที่ B.16 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 1% ร่วมกับการใช้ UV-C ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



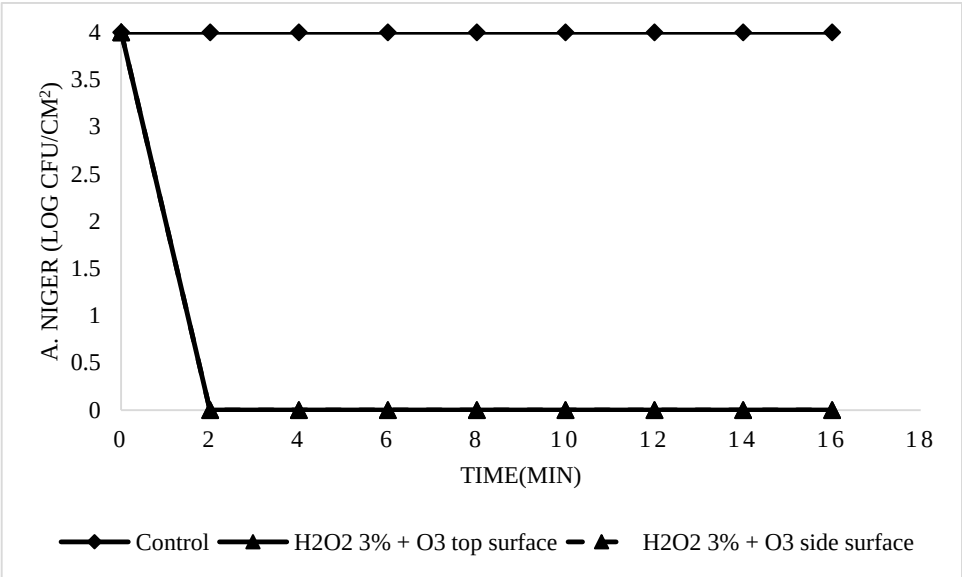
รูปที่ B.17 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ร่วมกับการใช้ UV-C ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



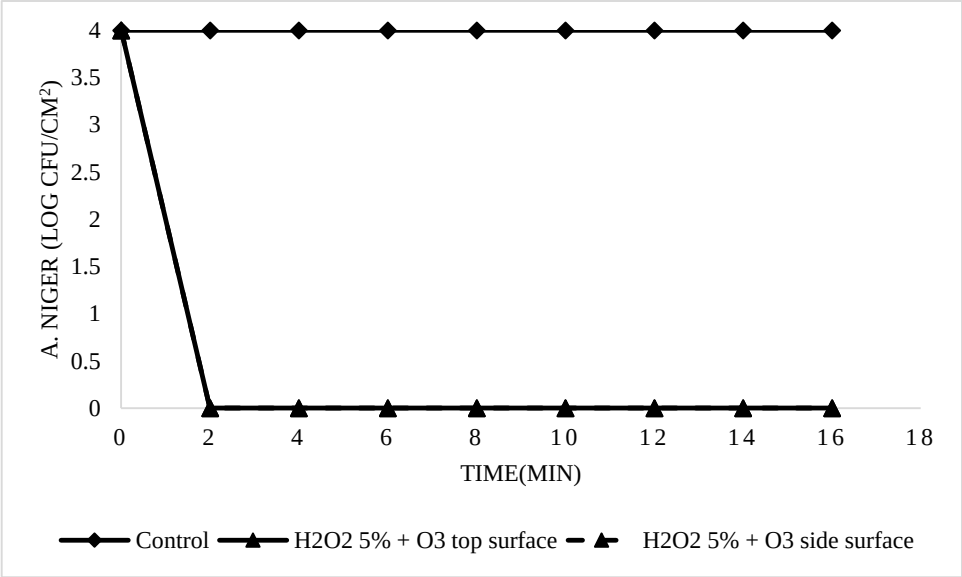
รูปที่ B.18 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 5% ร่วมกับการใช้ UV-C ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



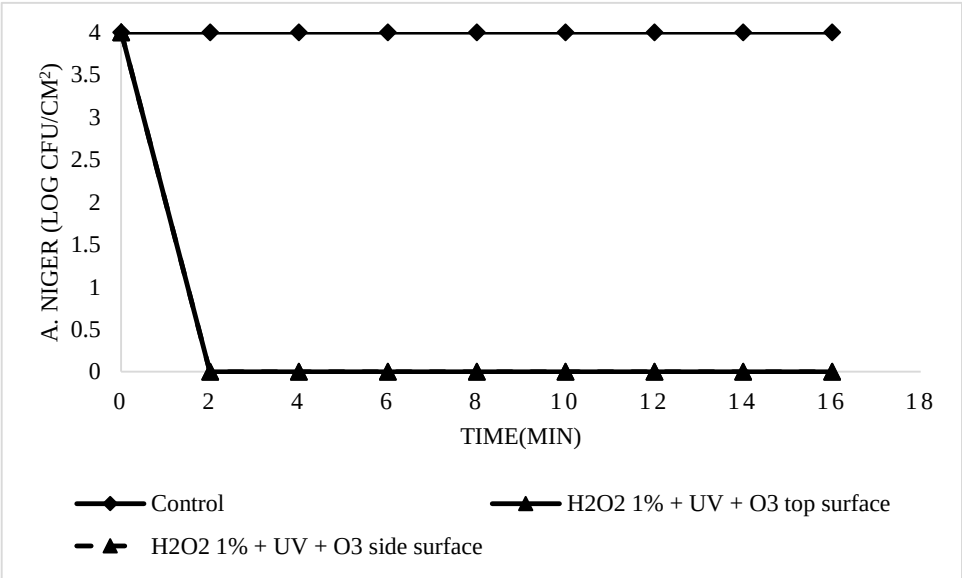
รูปที่ B.19 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 1% ร่วมกับการใช้ O_3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



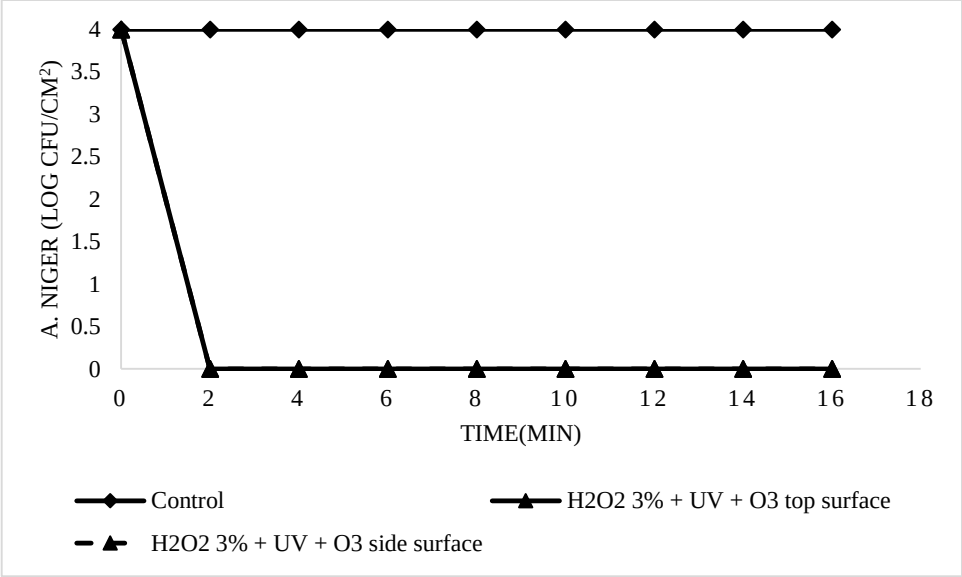
รูปที่ B.20 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ร่วมกับการใช้ O_3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



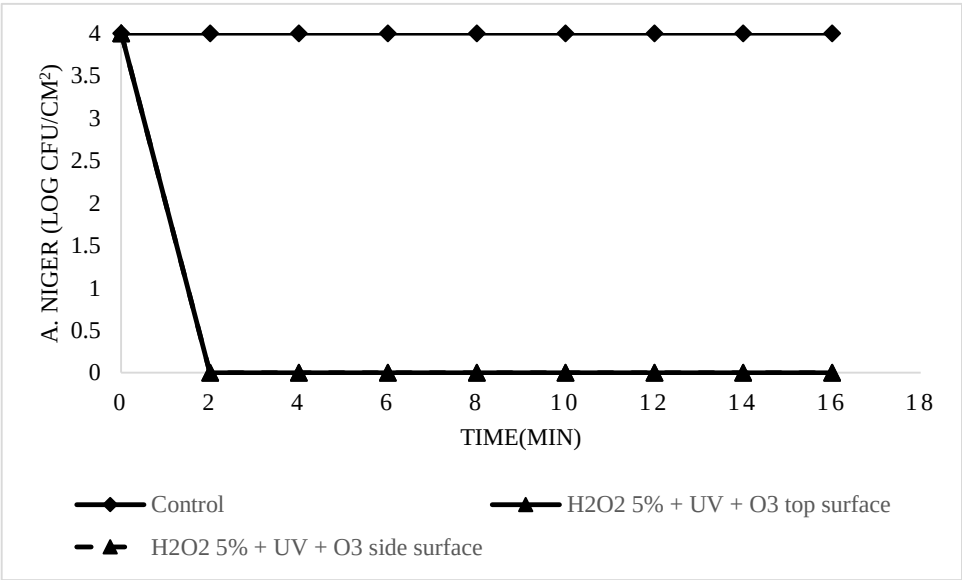
รูปที่ B.21 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 5% ร่วมกับการใช้ O_3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



รูปที่ B.22 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 1% ร่วมกับการใช้ UV-C/O_3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



รูปที่ B.23 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ร่วมกับการใช้ UV-C/O_3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว



รูปที่ B.23 ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 5% ร่วมกับการใช้ UV-C/O_3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *A. niger* 4 log CFU/cm^2 บริเวณด้านบนและด้านข้างของพื้นผิว