

การเจริญและสร้างฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli*บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสโดยการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำนม[†]Growth and biofilm generation of bacteria strain *Escherichia coli* on stainless steel surface by cultivation with milkณัฐวุฒิ มีศิลป์¹Nutthawut Meesilp¹¹ สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน¹ Department of Applied Biology, Faculty of Science and Liberal Art, Rajamangala University of Technology Isan, Thailand

Corresponding author. E-mail : nutthawuth.ms@gmail.com

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *E. coli* พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและส่วนลำไส้ของมนุษย์ ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสและสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินอาหารทำให้เกิดอาการท้องร่วง สามารถรอดชีวิตจากกระบวนการทำความสะอาดด้วยวิธีต่าง ๆ จึงเป็นสาเหตุทำให้มีการปนเปื้อนบนวัสดุและเครื่องมือสำหรับกระบวนการผลิตอาหาร งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาลักษณะการเจริญและการเกิดฟิล์มชีวภาพจากแบคทีเรีย *E. coli* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสเกรด 316 แบคทีเรีย *E. coli* มีลักษณะการเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็วทำให้เข้าสู่ช่วงของการเจริญแบบทวีคูณ (Exponential phase) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ภายใน 2 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C (9 log cfu/mL) และมีลักษณะการเจริญทำนองเดียวกันเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยน้ำนม UHT ในขณะที่การทดสอบเก็บรักษาน้ำนมที่ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *E. coli* ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ยังพบการเพิ่มปริมาณภายใน 2 ชั่วโมง (8 log cfu/mL) เช่นเดียวกัน แต่มีปริมาณแบคทีเรียที่ต่ำกว่า การสร้างฟิล์มชีวภาพเกิดเป็นระยะโครงสร้างสมบูรณ์บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสที่มีแบคทีเรีย *E. coli* เจริญ ซึ่งเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วภายใน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และน้ำนม UHT แต่การเก็บรักษาน้ำนม UHT ที่ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *E. coli* ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C มีการเกิดฟิล์มชีวภาพระยะโครงสร้างสมบูรณ์ช้ากว่า (4-6 ชั่วโมง) ดังนั้น การเก็บรักษาน้ำนมด้วยอุณหภูมิต่ำจึงช่วยชะลอการเจริญและการสร้างฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรีย *E. coli* ในช่วงระยะแรก (2 ชั่วโมง) แต่ปริมาณแบคทีเรียไม่ลดปริมาณลงที่อุณหภูมิ 4 °C เนื่องจากมีโครงสร้างของฟิล์มชีวภาพช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

คำสำคัญ : ฟิล์มชีวภาพ, *Escherichia coli*, ผลิตภัณฑ์นม, สแตนเลส, การปนเปื้อน

ABSTRACT

Bacteria strain *E. coli* is generally detected in the environment and intestine of human which is opportunistic pathogenic bacteria, causing gastrointestinal tract infection with diarrhea symptoms. It can survive after the cleaning process with different methods causing its contamination on materials and equipment for food production. This research contains the aim to investigate the growth characteristic and biofilm construction of *E. coli* on stainless steel grade 316 surface. Exponential growth phase of *E. coli* cultivated with Nutrient broth (NB) was discovered within 2 hours at 37 °C (9 log cfu/mL). Similarly, the bacteria population in UHT milk was also increased within 2 hours. While, storage the contaminated UHT milk at 4 °C can be detected the exponential growth phase within 2 hours (8 log cfu/mL), but bacteria amount was lower. Biofilm generation of *E. coli* in mature stage on stainless steel surface was rapidly found within 2 hours at 37 °C cultivated with NB and UHT milk. On the other hand, storage the contaminated UHT milk with *E. coli* at 4 °C was slowly found the mature stage (4-6 hours). Thus, storage contaminated milk at low temperature could reduce the growth and biofilm generation of *E. coli* at initial period (2 hours), but bacteria population did not decrease due to its biofilm protecting their cell from inappropriate environments.

Key words : Biofilm, *Escherichia coli*, Dairy product, Stainless steel surface, Contamination

1. บทนำ

แบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* มีลักษณะเซลล์เป็นแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างแท่ง (Rod shape) ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจน (Aerobe) และมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Facultative anaerobe) จัดอยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในทางเดินอาหารของมนุษย์และมีปริมาณสูงในลำไส้ใหญ่ โดยปกติแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะไม่ก่อให้เกิดโรคได้โดยตรง เนื่องจากเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora bacteria) ของลำไส้ แต่ในบางครั้งสามารถกลายเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส (Opportunistic pathogenic bacteria) ก่อให้เกิดความผิดปกติในส่วนทางเดินอาหารได้ เช่น อาการ

ท้องร่วง (Diarrhea) เป็นต้น ส่วนใหญ่แบคทีเรีย *E. coli* จะถูกปลดปล่อยปนเปื้อนออกมาพร้อมกับอุจจาระของมนุษย์และสามารถกระจายไปสู่สิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ เช่น แหล่งน้ำที่จากชุมชน ขยะของเสียจากเทศบาล เป็นต้น การกระจายของแบคทีเรียไปยังบริเวณต่างๆ ต้องการอาศัยพาหะ เช่น แมลงวัน วัตถุติด การสุขาภิบาลที่ไม่ดี เป็นต้น [1]

โรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนมาก บางครั้งอาจเกิดจากเชื้อราหรือยีสต์ การติดเชื้อแบคทีเรียได้รับจาก 2 แหล่งสำคัญ ได้แก่ การรับเชื้อจากหัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบและจากสิ่งแวดล้อมโดยรอบ แบคทีเรียก่อโรคที่ติดต่อกันจากเต้านมสู่เต้านม (Contagious pathogen) ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ

Streptococcus agalactiae แหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญเป็นส่วนของเต้านมที่ติดเชื้อซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถปะปนออกมาพร้อมกับน้ำนมผ่านเครื่องรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และมือของผู้รีดนม ทำให้ติดต่อไปสู่เต้านมวัวตัวอื่น ๆ ในขณะรีดนม การดูแลสุขาภิบาลของสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ (Environment pathogen) ไม่ดีทำให้เป็นแหล่งสะสมของแบคทีเรียสาเหตุเต้านมอักเสบเช่นกันในบริเวณคอก โรงเรือนพื้น นอกจากนี้ในอุจจาระวัว ดิน และพืชอาหารสัตว์ ซึ่งแบคทีเรียสามารถติดต่อเข้าสู่เต้านมและทำให้เกิดอาการเต้านมอักเสบได้ เช่น *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Enterobacter* spp. นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อที่พบได้น้อยสาเหตุทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบที่รุนแรง (Rare cause pathogen) ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium pyogenes*, *Mycoplasma* spp. รวมถึงเชื้อรา และยีสต์ต่าง ๆ การรักษาอาการเต้านมอักเสบส่วนใหญ่จะใช้การรักษาด้วยสารปฏิชีวนะซึ่งอาจทำให้เกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในน้ำนมดิบและส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้ การลดปริมาณของแบคทีเรียสะสมบริเวณเต้านมวัวจึงอีกวิธีที่ช่วยลดการอักเสบจากแบคทีเรียได้ [2, 3]

โรคเต้านมอักเสบของวัววันที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (*Escherichia coli* mastitis) ทำให้น้ำนมดิบจากแม่วัวนั้นเป็นแหล่งสำคัญของการแพร่กระจายของแบคทีเรียต่าง ๆ ที่จะทำให้เกิดปนเปื้อนในวัตถุดิบการใช้น้ำนมดิบเป็นวัตถุดิบหลักหรือส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ อาหารต้องผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อตามมาตรฐานเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ซึ่งเริ่มตั้งแต่กระบวนการรีบัตถุดิบ น้ำนมดิบจากฟาร์มอาจถูก

ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียที่จัดอยู่กลุ่ม Enterobacteriaceae โดยเฉพาะ *E. coli* สามารถตรวจพบได้ในมูลสัตว์ [4, 5] นอกจากนี้วัสดุและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตอาหารมีความสำคัญอย่างมาก ได้แก่ ส่วนของท่อ อุปกรณ์และพื้นที่ทำงาน ส่วนใหญ่จะทำจากสแตนเลสเกรด 316 ซึ่งพื้นผิวของวัสดุชนิดนี้จะง่ายต่อการทำความสะอาดด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ ที่ได้มาตรฐานและมีความคงทนต่อการกัดกร่อนด้วยการทำความสะอาดแบบไม่ถอดชิ้นส่วน (Cleaning in place, CIP) เช่น การล้างด้วยกรดหรือด่าง และน้ำร้อนในกระบวนการเป็นต้น แบคทีเรีย *E. coli* ไม่ควรตรวจพบในผลิตภัณฑ์อาหารทุกประเภท ดังนั้นกระบวนการผลิตที่ประกอบด้วยวัตถุดิบ อุปกรณ์ต่าง ๆ ควรมีการควบคุมสุขลักษณะและทำความสะอาดให้ถูกวิธีเพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารที่จะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสื่อมเสียและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค [6]

ฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) เป็นโครงสร้างชีวภาพที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย โดยมีความสำคัญทำหน้าที่ช่วยให้แบคทีเรียอยู่รอดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี เช่น อุณหภูมิ สารเคมี ค่ากรด-ด่าง เป็นต้น [7] โดยทั่วไปฟิล์มชีวภาพจากแบคทีเรียประกอบขึ้นด้วยหลายขั้นตอน เริ่มต้นจากแบคทีเรียเข้ายึดเกาะติด (Attachment) บนพื้นผิววัสดุชนิดต่าง ๆ เช่น สแตนเลส พลาสติกยาง เป็นต้น แล้วจึงปลดปล่อยสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) หรือสารเมือกออกมาเป็นโครงสร้างปกคลุมเซลล์ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 10-25 ของเซลล์แบคทีเรียที่จะมีการปลดปล่อยสารดังกล่าวร้อยละ 75-90 ทำให้มีโครงสร้างภายนอกรูปร่างของคล้ายดอกเห็ด (Mushroom-like shape)

และภายในจะมีการแบ่งตัวของแบคทีเรียปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (Maturation) จนมีปริมาณมากส่งผลให้ความแข็งแรงของการยึดติดของโครงสร้างบนพื้นผิววัสดุลดลงจึงทำให้แบคทีเรียจำนวนมากถูกปลดปล่อยออกมาจากโครงสร้างฟิล์มชีวภาพ (Dispersion) เกิดเป็นเซลล์อิสระ (Planktonic bacteria) โดยที่วงจรฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นสลับไปมาในแต่ละขั้นตอนมีระยะเวลาการเกิดที่ยาวนานแตกต่างกัน [8]

ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการเจริญและการสร้างฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสเกรด 316 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำนม UHT รวมทั้งผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและสร้างฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรีย *E. coli* ในน้ำนม

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย

แบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* ได้มาจากสาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี นครราชสีมา นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar (NA) ด้วยการ Cross streak นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์จากลักษณะโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารซึ่งมีสีขาวนวล (Off-white) เป็นเมือกเล็กน้อย จากนั้นย้อมสีเซลล์ (Gram staining) และตรวจสอบลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x พบว่าแบคทีเรียมีรูปร่างแบบแท่ง (Rod-shaped) ติดสีแดงของสาร Safranin O

2.2 การเจริญของแบคทีเรีย *E. coli*

2.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่บริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว NB บ่มแบบเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 (10^8 cfu/mL) [9]

2.2.2 การตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรีย

นำกล้าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เตรียมไว้ปริมาณร้อยละ 10 (v/v) มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว NB และน้ำนม UHT บ่มแบบเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ศึกษาปริมาณแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA และรายงานค่าในหน่วย log cfu/mL

2.3 การสร้างฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรีย *E. coli*

2.3.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่บริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว NB นำบ่มแบบเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วปรับค่าความขุ่นของแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ให้มีค่าความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 cfu/mL [9]

2.3.2 การเตรียมแผ่นวัสดุสแตนเลส

ตัดแผ่นสแตนเลสเกรด 316 ให้มีขนาด 1.5 x 1.5 เซนติเมตร นำมาแช่ในสารละลาย Acetone เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างแผ่นสแตนเลสด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งด้วยไอน้ำความดันสูงที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15

ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และอบที่อุณหภูมิ 80 °C ก่อนนำมาใช้งาน [10, 11]

2.3.3 การตรวจวัดปริมาณฟิล์มชีวภาพ

ย้ายกล้าเชื้อแบคทีเรียปริมาตรร้อยละ 10 (v/v) มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว NB และน้ำนม UHT ที่มีแผ่นสแตนเลสเกรด 316 นำบ่มแบบเขย่าที่ 50 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ แล้วตรวจวัดปริมาณฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรีย *E. coli* บนแผ่นสแตนเลสที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยการย้อมสี Crystal violet และตรวจวัดปริมาณฟิล์มชีวภาพจากความเข้มของสีด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 530 nm [11]

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้จากผลการทดลองวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมทางสถิติด้วยวิธี Duncan test

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

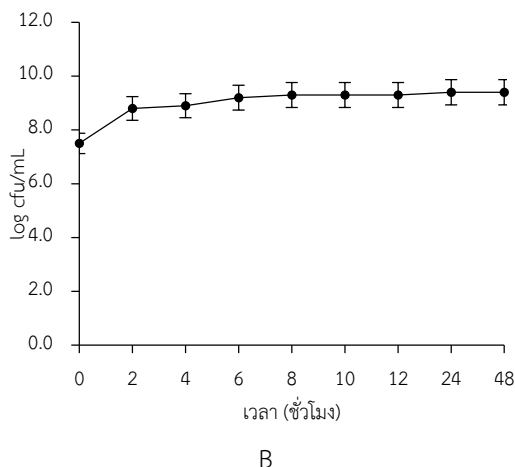
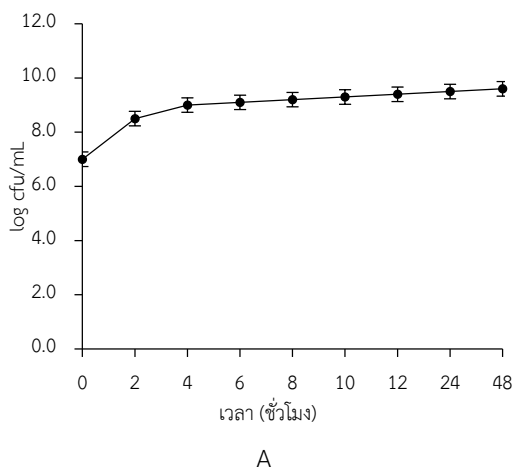
3.1 การเจริญของแบคทีเรีย *E. coli*

แบคทีเรีย *E. coli* มีการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว NB ได้อย่างรวดเร็วเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งพบระยะการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Exponential phase) ในช่วงเวลาที่ 2-4 (9 log cfu/mL) และหลังจากนั้นมีปริมาณของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยอย่างช้า ๆ จนถึง 48 ชั่วโมง (9.5 log cfu/mL) สำหรับการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ในน้ำนมพบการเจริญแบบทวีคูณใน 2 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน (8.5 log cfu/mL) แต่มีการเจริญที่ช้ากว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว NB ที่อุณหภูมิเดียวกัน (ภาพที่ 1A และ 1B) ในทางตรงกันข้าม การเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* เมื่อ

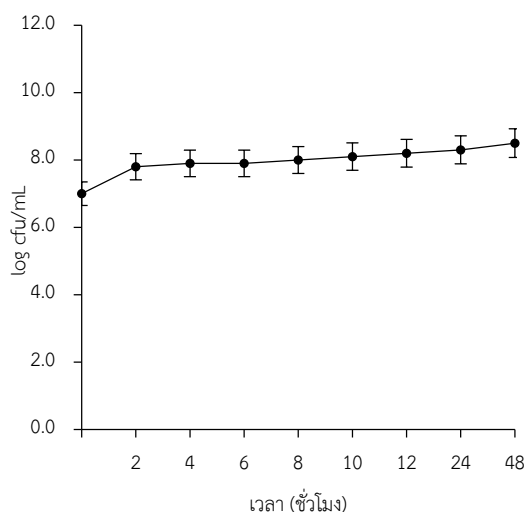
เพาะเลี้ยงด้วยน้ำนม UHT และถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จะพบปริมาณแบคทีเรียสูงสุด 8.5 log cfu/mL ที่ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2) ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณด้วยอัตราที่ช้าและคงที่กว่าเจริญในอุณหภูมิ 37 °C ดังนั้น ที่อุณหภูมิ 4 °C จึงเหมาะสมสำหรับการใช้เก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมและอาหารทั่วไป ซึ่งสามารถช่วยชะลอการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์สาเหตุของการเน่าเสียได้ [12]

3.2 การสร้างฟิล์มชีวภาพจากแบคทีเรีย *E. coli*

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยอาหารเหลว NB ที่มีแผ่นสแตนเลส ในระยะแรกตรวจไม่พบฟิล์มชีวภาพในช่วงเวลาที่ 0 (ระยะที่ 1) บนพื้นผิวแผ่นสแตนเลสด้วยการย้อมสีม่วงจากสาร Crystal violet หลังจากนั้นเมื่อแบคทีเรียเริ่มเจริญจึงสามารถตรวจพบฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวสแตนเลสปริมาณสูง (ระยะที่ 2) จากการติดสีม่วงของสาร Crystal violet ในช่วงเวลาที่ 2 หลังจากเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 °C (ภาพที่ 3A) ฟิล์มชีวภาพที่พบในระยะนี้ Maturation เกิดการหลุดออกจากพื้นผิววัสดุได้ง่าย ทำให้มีปริมาณฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิวสแตนเลสลดลงอย่างรวดเร็ว (ระยะที่ 3) ซึ่งพบในช่วงเวลาที่ 4-6 ต่อมาในช่วงเวลาที่ 6 เป็นการเริ่มวัฏจักรการสร้างฟิล์มชีวภาพของระยะที่ 1 อีกครั้ง หลังจากนั้นแบคทีเรียจะเกิดเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ในช่วงเวลาที่ 8 ทำนองเดียวกันการเกิดฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิววัสดุเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยน้ำนม UHT สามารถตรวจพบโครงสร้างที่สมบูรณ์ได้ใน 2 ชั่วโมงแรกเป็นต้นไป และพบปริมาณฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิววัสดุสูงสุดในช่วงเวลาที่ 8 ของวัฏจักร (ภาพที่ 3B) แต่มีปริมาณของความเข้มข้นที่ติดน้อยกว่า



ภาพที่ 1 การเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ในอาหารเหลว NB (A) และน้ำนม UHT (B) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลาต่าง ๆ



ภาพที่ 2 การเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ในน้ำนม UHT ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาต่าง ๆ

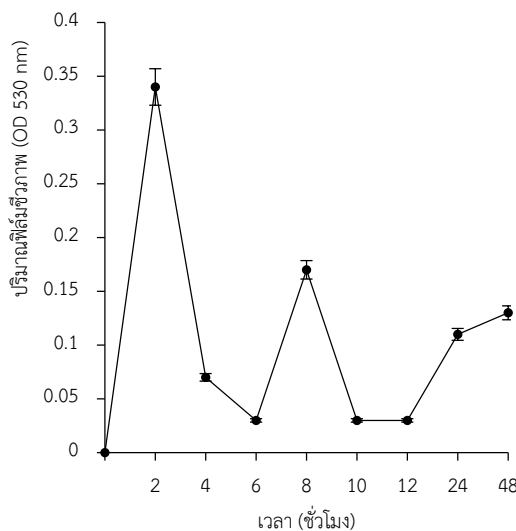
การเกิดฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรีย *E. coli* บนพื้นผิวสแตนเลสเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยน้ำนม UHT เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถเริ่มตรวจพบได้ใน 2 ชั่วโมงแรกหลังจากใส่เชื้อ แต่พบในปริมาณที่ต่ำกว่า

การเพาะเลี้ยงด้วยน้ำนม UHT ในอุณหภูมิ 37 °C (ภาพที่ 4) แต่อย่างไรก็ตามการสร้างฟิล์มชีวภาพจากแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนมีโครงสร้างสมบูรณ์และปริมาณมากที่สุดในชั่วโมงที่ 10

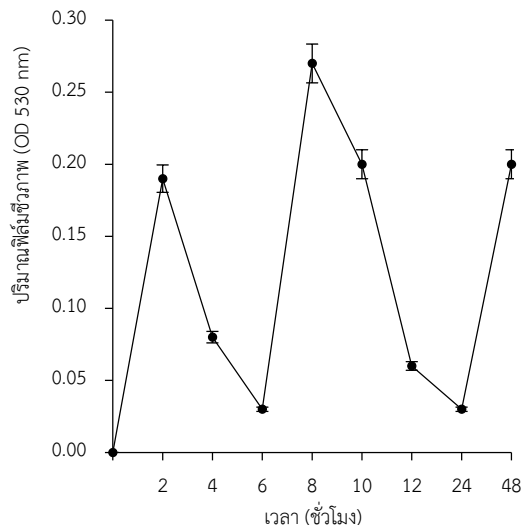
หลังจากแบคทีเรียเริ่มเกาะติดบนพื้นผิววัสดุจะยังไม่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตของฟิล์มชีวภาพออกมาจากเซลล์ เช่น เซลลูโลส (Cellulose) เมื่ออายุของแบคทีเรียมากขึ้นทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและปลดปล่อยสารที่ใช้สร้างฟิล์มชีวภาพออกมาสะสมบนพื้นผิววัสดุทำให้สามารถตรวจพบคราบสีม่วงที่เกิดจากการย้อมด้วยสาร Crystal violet ได้ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย โดยในระยะนี้จะเกิดเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ (Mature stage) ที่ภายในมีการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรีย *E. coli* อย่างมาก [8] แต่ด้วยโครงสร้างมีขนาดใหญ่และมีการเกาะกันอย่างหลวมๆ จึงทำให้ฟิล์มชีวภาพในระยะนี้หลุดออกจากพื้นผิววัสดุได้ง่ายทำให้มีปริมาณฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิว

สแตนด์เลสลดต่ำลงซึ่งพบในเวลาต่อมา วัฏจักรการสร้างฟิล์มชีวภาพจะเริ่มต้นขึ้นอีกครั้งด้วยเซลล์แบคทีเรียอิสระที่ถูกปลดปล่อยออกจากโครงสร้างฟิล์มชีวภาพเข้ายึดเกาะบนพื้นผิววัสดุบริเวณใหม่แล้วสร้างเป็นอาณานิคมของฟิล์มชีวภาพอีกครั้ง [13] กระบวนการสื่อสารที่เกิดจากแบคทีเรียสร้างสารโมเลกุลขนาดเล็ก (Autoinducer) ที่แตกต่างกันไป

แบคทีเรียแต่ละชนิด การสื่อสารที่เกิดขึ้นระหว่างแบคทีเรีย (Quorum sensing) เป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งที่แบคทีเรียใช้ควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมและควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการก่อโรค (Virulence gene) ในแบคทีเรียก่อโรค [14]



A



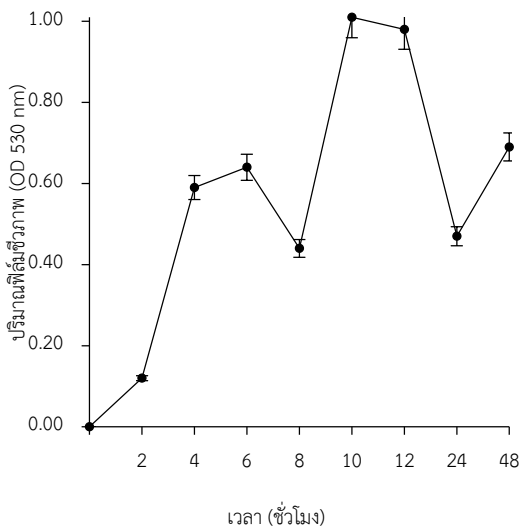
B

ภาพที่ 3 ฟิล์มชีวภาพที่สร้างจากแบคทีเรีย *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (A) และน้ำนม UHT (B) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ

จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรีย *E. coli* และฟิล์มชีวภาพ การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียอย่างอย่างรวดเร็วภายใน 2-4 ชั่วโมง จะมีการสร้างฟิล์มชีวภาพที่เป็นระยะโครงสร้างสมบูรณ์ได้รวดเร็วเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นฟิล์มชีวภาพจะมีปริมาณลดลงเนื่องจากโครงสร้างมีแรงการยึดกันแบบหลวม ๆ จึงหลุดออกจากพื้นผิววัสดุได้ง่ายพร้อมกับการปลดปล่อยแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญในโครงสร้างฟิล์มชีวภาพเป็นเซลล์อิสระจำนวนมากออกมาสู่

อาหารเลี้ยงเชื้อ NB หรือน้ำนม UHT จึงส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งพบเป็นระยะการเจริญแบบทวีคูณหรือมีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ โดยเฉพาะอาหารประเภทนมและเนื้อสัตว์เป็นแหล่งของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรีย *E. coli* [15] การคัดเลือกวัตถุดิบมีคุณภาพและการทำความสะอาดวัสดุ อุปกรณ์รวมทั้งในระบบท่อต่าง ๆ (CIP) ในอุตสาหกรรมจึงมี

ความสำคัญอย่างมาก ต้องมีการกำหนดระยะหรือรอบงานของการทำความสะอาดให้ถูกต้องตามลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดเพื่อช่วยลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียเข้าสู่ระบบการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ [16, 17]



ภาพที่ 4 ฟิล์มชีวภาพที่สร้างจากแบคทีเรีย *E. coli* เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยน้ำนม UHT ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาต่าง ๆ

ลักษณะของน้ำนม UHT จะมีคุณค่าทางสารบางชนิดหายไปเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำนมดิบเนื่องจากน้ำนมดิบนั้นได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูงถึง 130-160 °C แล้วทำให้เย็นลงทันที จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของไขมันเคซีน (Casein) และเวย์โปรตีน (Whey proteins) แต่วิธีนี้สามารถลดปริมาณแบคทีเรียและเอนไซม์บางชนิดลงอย่างมากโดยสามารถเก็บรักษาน้ำนมที่ผ่านกระบวนการ UHT แบบไม่ต้องแช่เย็นได้นานหลายเดือน ถ้าหากภาชนะบรรจุหรืออุปกรณ์การผลิตหลังกระบวนการให้ความร้อนมีการทำความสะอาดที่ไม่มี

ประสิทธิภาพอาจจะมีฟิล์มชีวภาพสะสมอยู่ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายหรือสาเหตุของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์สามารถส่งต่อยังผู้บริโภค [18]

4. สรุปผลการทดลอง

ฟิล์มชีวภาพเกิดจากแบคทีเรีย *E. coli* ที่ปนเปื้อนในอาหารต่าง ๆ เป็นโครงสร้างสำคัญที่ช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมได้อย่างมากทำให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดได้ในอุณหภูมิต่ำ น้ำนมที่ผ่านกระบวนการ UHT คุณค่าทางสารอาหารบางชนิดลดลงอย่างมากแต่แบคทีเรีย *E. coli* ยังสามารถเจริญได้แม้เก็บในอุณหภูมิต่ำ จากการทดลองทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานถึงลักษณะการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่สอดคล้องกับปริมาณฟิล์มชีวภาพที่ถูกสร้างขึ้นมาบนพื้นผิวสแตนเลสเกรด 316 ดังนั้น การทำลายวัฏจักรการเกิดฟิล์มชีวภาพในระยะเริ่มต้นของการเจริญด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ เช่น กรด หรือ ด่าง จึงเหมาะสมต่อการทำความสะอาดเพื่อกำจัดแบคทีเรียให้หมดไปอย่างมีประสิทธิภาพแต่อย่างไรก็ตามการคัดเลือกวัตถุดิบ การทำความสะอาดวัสดุ และอุปกรณ์สำหรับการผลิตอาหารเป็นกระบวนการที่สำคัญที่จะช่วยรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่ให้ปนเปื้อนและเน่าเสียระหว่างการเก็บรักษาและขนส่ง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการ Senior project 2018 ของสาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี นครราชสีมา

6. อ้างอิง

- [1] Katholm J, Andersen PH. Acute coliform mastitis in dairy cows: Endotoxin and biochemical changes in plasma and colony-forming units in milk. Vet Rec. 1992; 131:513-4.
- [2] Bleul U, Sacher K, Corti S, et al. Clinical findings in 56 cows with toxic mastitis. Vet Rec. 2006; 159:677-9.
- [3] Hagiwara S, Mori K, Okada H, et al. Acute *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle: Diagnostic parameters associated with poor prognosis. J Vet Med Sci. 2014; 76(11):1431-6.
- [4] Cebra CK, Garry FB, Dinsmore RP. Naturally occurring acute coliform mastitis in Holstein cattle. J Vet Intern Med. 1996; 10:252-7.
- [5] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. Trends Biotechnol 1996; 14:98-105.
- [6] Wenz JR., Barrington GM, Garry FB, et al. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. J Am Vet Med Assoc. 2001; 219:976-81.
- [7] Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* Biofilms. In: Romeo T, editors. bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology Volume 322. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer. 2008.
- [8] Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Prog Nat Sci-Mater. 2008; 18:1046-56.
- [9] ณัฐวดี มีศิลป์, ณัฐวดี สร้อยพิมาย, วรพงษ์ ครูสอนดี และคณะ. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus* ในการผลิตสารคล้ายแบคทีเรียโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค. วารสารวิจัย มทร.กรุงเทพ. 2561; 12(2):80-91.
- [10] Tseng KH, Wang NS. Research on bead width and penetration depth of multicomponent flux-aided arc welding of grade 316 L stainless steel. Powder Technol. 2017; 311:514-21.
- [11] Rossoni EMM, Gaylarde CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. Int J Food Microbiol. 2000; 61(1):81-5.
- [12] Kumar P, Libchaber A. Pressure and temperature dependence of growth and morphology of *Escherichia coli*: Experiments and stochastic model. Biophys J. 2013; 105:783-93.
- [13] White-Ziegler CA, Um S, Pérez NM, et al. Low temperature (23 °C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. Microbiol. 2008; 154:148-166.
- [14] Laganenka L, Sourjik V. Autoinducer 2-dependent *Escherichia coli* Biofilm

- formation is enhanced in a dual-Species coculture. *Appl Environ Microbiol.* 2017; 84(5):1-15.
- [15] Esbelin J, Santos T, Hébraud M. Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. *Food Microbiol.* 2018; 69:82-8.
- [16] Brackett RE. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. *J Food Protect.* 1992; 55:808-14.
- [17] Rühs PA, Böni L, Fuller GG, et al. In-Situ quantification of the interfacial rheological response of bacterial biofilms to environmental stimuli. *PLOS ONE.* 2013; 8(11):1-9.
- [18] Sozanska B. Raw cow's milk and its protective effect on allergies and asthma. *Nutrients.* 2019; 11(469):1-10.