Agricultural Sci. J. 38 : 5 (Suppl.) : 395-398 (2007) ว. วิทย. กษ. 38 : 5 (พิเศษ) : 395-398 (2550)

ประสิทธิภาพการลดเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. บนซากสุกรโดยการฉีดพ่นด้วยสารละลายโอโซน

Reduction of *Salmonella* spp. and *Listeria* sp. on swine carcasses using ozone water jet spray

สีบเนื่อง ชัยชนะ[1] ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์[1] ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์[2] และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์[3]

Seabneung Chaichana[1], Pravate Tuitemwong[1], Kooranee Tuitemwong[2] and Aroon Bangtrakulnonth[3]

Abstract

The efficacy of ozone water to reduce *Salmonella* spp. and *Listeria* sp. artificially contaminated on pork carcasses was studied. The initial number of *Salmonella* spp. was 4-5 Log CFU/g in each sample. The samples were sprayed with ozone water, in which water was pumped to mixed with ozone gas through a ventury tube at 0.8 liter/min 0.5 bar, at varied distances (X_1, 10, 20 and 30 cm) and spraying times (X_2, 10-120 sec.) followed by sample holding (X_3) for up to 30 minutes at room temperature (30±2 °C). The microbiological tests were performed thereafter. It was found that, of all distances of carcasses washing (0.8 L/min, 0.5 bar), 120 sec spraying is more efficient for the reductions of *Salmonella* spp. and *Listeria* sp. on pork skin than those of 60, 30 and 10 sec, respectively. The best holding time is at 15 min which was better than holding at 10 and 5 min ($p<0.05$). At the same condition, results showed that ozone was more effective on Gram negative *Salmonella* spp. than Gram positive *Listeria* sp. ($p<0.05$). The relationships between the reduction efficiencies of *Salmonella* spp. ($Y= 0.686-0.0134X_1+0.0068X_2-0.0247X_3$) and *Listeria* sp. ($Y= 0.2729-0.0052X_2+0.025X_3$) gave the correlation coefficients (R^2) of 0.82 and 0.69, respectively. The regression equations could be used to predict the effectiveness of ozone water on the reduction of the target organisms. SEM micrograph indicated that ozone spray effectively damaged cell membrane of the organisms on pork skins.

Keywords: Ozone, *Listeria* sp., *Salmonella* spp.

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพสารละลายโอโซนต่อการลดการปนเปื้อน *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. ที่มักปนเปื้อนบนหนังหมูที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4-5 log CFU/g เมื่อฉีดพ่นสารละลายโอโซนด้วยระบบผ่านท่อ ventury ที่ความเร็ว 0.8 L/min ความดัน 0.5 bar เป็นเวลานาน (X_1) 10-120 วินาที ที่ระยะห่าง (X_2) 10-30 ซม. และทิ้งให้มีเวลาสัมผัสโอโซนนาน (X_3) 5-15 นาที พบว่าเมื่อฉีดพ่นนานขึ้น และเวลาการสัมผัสนานขึ้น จะมีประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแกรมลบ *Salmonella* spp. และแกรมบวก *Listeria* sp. ได้เพิ่มขึ้นตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และที่สภาวะเดียวกันพบว่าโอโซนมีประสิทธิภาพลดเชื้อ *Salmonella* spp. และสูงกว่า *Listeria* sp. ($p<0.05$) ค่าความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการลดเชื้อ *Salmonella* spp. ($Y= 0.686-0.0134X_1+0.0068X_2-0.0247X_3$) และ *Listeria* sp. ($Y= 0.2729-0.0052X_2+0.025X_3$) กับระยะห่าง เวลาฉีดพ่น และเวลาสัมผัสารละลายโอโซน พบว่ามีค่าสัมประสิทธิความสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.82 และเท่ากับ 0.69 ตามลำดับ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสมการสหสัมพันธ์ดังกล่าว ประเมินประสิทธิภาพการลดการปนเปื้อน *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. ด้วยสารละลายโอโซนในอนาคต ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดแสดงว่าการฉีดพ่นด้วยน้ำโอโซนอิ่มตัวสามารถทำลายเมมเบรนของแบคทีเรียที่ทดสอบได้

คำสำคัญ: โอโซน ลีสทีเรีย ซัลโมเนลลา

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

[1] Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut 's University of Technology Thonburi

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2] Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University

[3] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

[3] National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

บทนำ

เป็นอันตรายอย่างมากต่อผู้บริโภค องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ได้กำหนดมาตรฐานเนื้อสุกรเพื่อการบริโภค ต้องปราศจากเชื้อซัลโมเนลลา (Rdfai, 1979) เนื่องจากเป็นสาเหตุสำคัญของโรคระบบทางเดินอาหารที่รุนแรงในคนและสัตว์ ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารนิยมป้องกันหรือทำลายเชื้อด้วยสารเคมีเช่น ก๊าซคลอรีน (Cl_2) คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) แคลเซียมไฮเปอร์คลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) และโซเดียมไฮโปคลอไรค์ (NaOCl) แต่พบว่าหากใช้ปริมาณมากทำให้เกิดสารสารประกอบฮาโลเจนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เทคโนโลยีสะอาดจึงได้รับความสนใจ เช่น โอโซน ซึ่งเป็นก๊าซธรรมชาติ ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรงกว่าคลอรีน 1.5 เท่าจึงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อที่ก่อโรคในอาหารและผักและผลไม้ได้ดีกว่าคลอรีนและสารฆ่าเชื้อตัวอื่น (Xu, 1999) ไม่ก่อปัญหาสารเคมีตกค้าง เนื่องจากโอโซนสามารถสลายตัวเป็นออกซิเจนได้อย่างอัตโนมัติเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ในปี คศ. 1997 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) ได้ประกาศให้โอโซนเป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างปลอดภัย (GRAS; Generally Recognized As Safe) (Graham, 1997)

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือการพัฒนาโมเดลการฉีดพ่นซากสุกรและศึกษาประสิทธิผลของโมเดลนี้ต่อการลดเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. บนหนังสุกร ทั้งเชิงปริมาณและกลไกการเข้าทำลายเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมสารละลายโอโซน ทำโดยปรับให้ก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ (99.9%) ไหลผ่านเครื่องผลิตโอโซนระบบ corona discharge ผสมกับน้ำ (อัตราเร็ว 0.8 L/min ที่ความดัน 0.5 bar) ผ่านท่อ Ventury ที่อุณหภูมิห้อง 30^{O}C ก่อนฉีดพ่นไปบนหนังหมูที่สร้างการปนเปื้อนเชื้อ

ศึกษาประสิทธิภาพการลดเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria sp.* ที่ปนเปื้อนบนหนังหมู (เชื้อเริ่มต้น 4-5 Log CFU/g) ด้วยระบบการฉีดโอโซนที่เตรียมด้วยวิธีที่กล่าวมาข้างต้น โดยศึกษาอิทธิพลของระยะห่าง (10, 20 และ 30 เซนติเมตร) เวลาฉีดพ่น (10, 30, 60 และ 120 วินาที) และเวลาสัมผัสสารละลายโอโซนที่อุณหภูมิห้อง (30±2 ^{o}C นาน 5, 10 และ 15 นาที) ต่อประสิทธิภาพการลดเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. ตรวจสอบจำนวนเชื้อที่เหลือรอดด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร XLD และอาหาร PALCAM ตามลำดับ นำตัวอย่างที่สัมผัสโอโซนไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) เพื่อศึกษากลไกการทำลายเชื้อของโอโซน

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการลดเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. ที่ปนเปื้อนบนหนังหมูกับระยะห่าง เวลาฉีดพ่น และเวลาสัมผัสสารสารละลายโอโซน โดยวิธี multiple regression

ผล

การฉีดพ่นสารละลายโอโซนด้วยระบบการฉีดผ่านท่อ ventury ที่ความเร็ว 0.8 L/min ความดัน 0.5 bar เป็นเวลา 120 วินาที ทุกระยะห่างมีประสิทธิภาพลดเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. สูงที่สุด รองลงมาคือที่เวลา 60, 30 และ 10 วินาที ตามลำดับ โดยที่ระยะเวลาสัมผัส 15 นาที มีประสิทธิภาพสูงกว่า 10 และ 15 นาที อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (Figures 1 และ 2) และการศึกษาภายใต้กล้องอิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ได้รับความเสียหายจากการสัมผัสโอโซน (Figure 3)

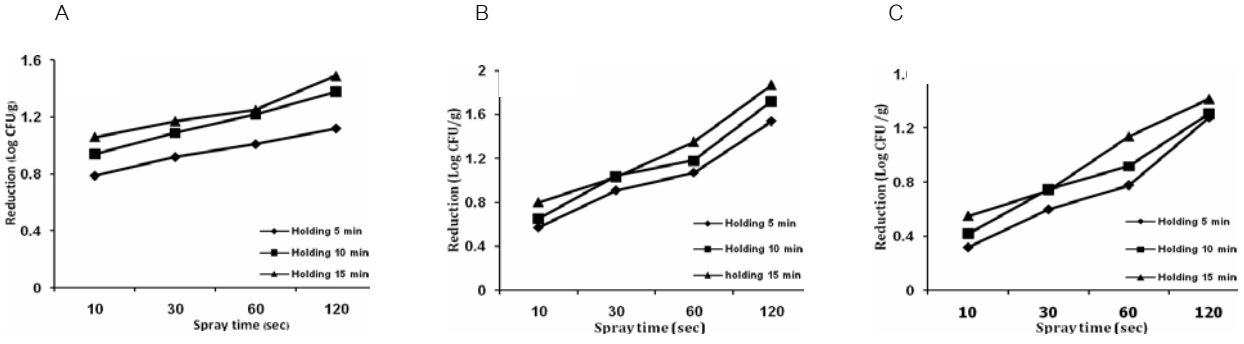

Figure 1 Reduction of *Salmonella* spp. on pork skin after spray washing with ozone for 10, 30, 60 and 120 sec followed by sample holding for 5, 10 and 15 min at various distances: 10cm (A), 20cm (B) and 30cm (C).

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการลดเชื้อ *Salmonella* spp. กับระยะห่าง ระยะเวลาฉีดพ่น และเวลาสัมผัสสารละลายโอโซน พบว่าประสิทธิภาพการลดเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นผลหรือได้รับอิทธิพลจากระยะห่าง เวลาฉีดพ่น และเวลาสัมผัสสารละลายโอโซน 84.2% ส่วนที่เหลือ 17.2 % มีสาเหตุจากปัจจัยอื่นที่ไม่ได้นำมาพิจารณา และได้สมการถดถอยเชิงเส้นของผลของโอโซนต่อการทำลายเชื้อดังนี้ $Y=0.686-0.0134(X_1)+0.0068(X_2)-0.0247(X_3)$ สำหรับเชื้อ *Listeria* sp. พบว่าประสิทธิภาพการลดเชื้อได้รับอิทธิพลจากเวลาฉีดพ่น และเวลาสัมผัสสารละลายโอโซนร้อยละ 66.7 โดยเวลาการฉีดไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($P>.05$) ส่วนที่เหลือร้อยละ 33.3 มีสาเหตุจากปัจจัยอื่นที่ไม่ได้นำมาพิจารณา มีสมการเป็น $Y=0.2729+0.0052(X_2)+0.025(X_3)$

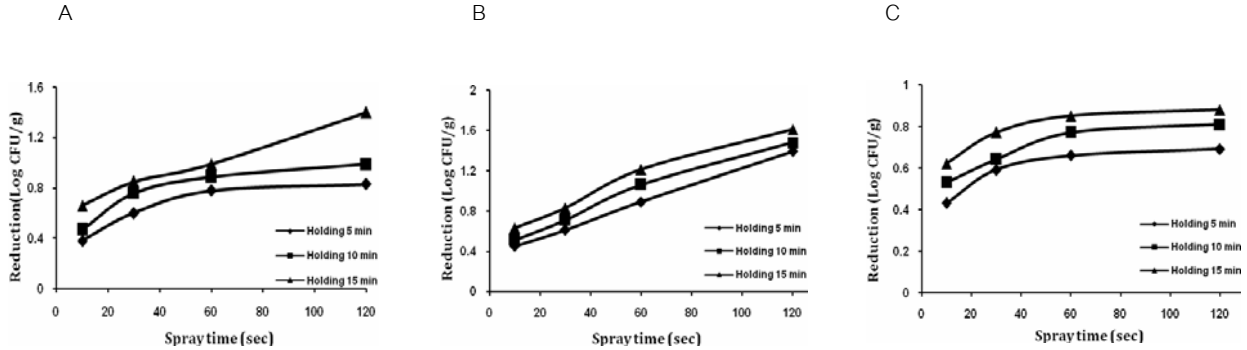

Figure 2 Reduction of *Listeria* sp. on pork skin after spray washing with ozone for 10, 30, 60 and 120 sec followed by sample holding for 5, 10 and 15 min at various distances: 10cm (A), 20cm (B) and 30cm (C).

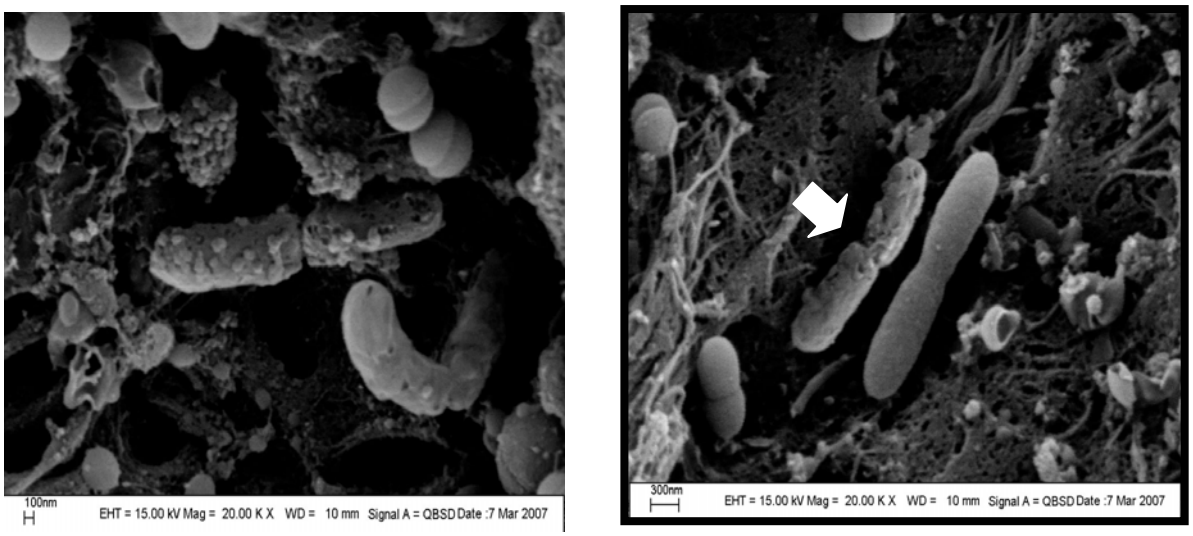

Figure 3 Scanning electron micrograph of *Salmonella* sp. at 15kV, 20,000X. Arrows indicate the affected cells.

วิจารณ์ผล

จากการทดลองพบว่าสารละลายโอโซนมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ดี เนื่องจากโอโซนเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารประกอบเชิงซ้อนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่วน poly-unsaturated fatty acids, lipoproteins และ phospholipids (Scott and Lesher, 1963) โอโซนจึงทำให้เซลล์สูญเสียคุณสมบัติการเลือกผ่านสารเข้าออก (permeability) นอกจากนี้โอโซนมีผลต่อเอนไซม์ภายในเซลล์หลายชนิด เช่น cytoplasmic β-galactosidase และ periplasmic alkaline phosphatase ของเชื้อ *E. coli* ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (Takamoto *et al.*, 1992) โดยสันนิฐานว่าโอโซนสามารถเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนที่ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย เช่น ซีสเทอีน (cysteine) มีหมู่

ซัลไฮดริล (-SH) เมื่อถูกออกซิไดซ์แล้วจะกลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถผันกลับได้ ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกลูโคส ทำให้เซลล์ไม่สามารถนำกลูโคสเข้าไปใช้ ทำให้ขาดอาหารและตายในที่สุด (EPRI, 1997) กลไกอีกลักษณะหนึ่งคือ โอโซนจะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์พิวรีน (purines) และอนุพันธ์ไพริมิดีน (pyrimidines) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย (Kim *et al*., 1999)

เมื่อเพิ่มเวลาการฉีดพ่น (120 วินาที) และเวลาสัมผัสน้ำโอโซนนานขึ้น (15 นาที) จะมีประสิทธิภาพในการลดเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. สูงสุด โดยที่สภาวะเดียวกันโอโซนมีประสิทธิภาพในการลดเชื้อ *Salmonella* sp สูงกว่า *Listeria* sp. ($p<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบบริเวณผนังเซลล์ กล่าวคือแบคทีเรียแกรมลบบริเวณผนังเซลล์ประกอบด้วย polyunsaturated lipid และ protein เป็นส่วนใหญ่ ทำให้ไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโอโซน (Scott and Lesher,1963) มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งผนังเซลล์ส่วนใหญ่ประกอบด้วย peptidoglycan ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล N-acetyl glucosamine (NAG) การทำปฏิกิริยาระหว่างโอโซนกับ polysaccharide เกิดค่อนข้างช้า ทำให้แบคทีเรียแกรมบวกต้านทานต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของโอโซนมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

สรุป

การฉีดพ่นสารละลายโอโซนด้วยระบบการฉีดผ่านท่อ ventury ที่ความเร็ว 0.8 L/min ความดัน 0.5 bar เป็นเวลา 120 วินาที ทุกระยะห่าง มีประสิทธิภาพในการลดเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. สูงที่สุด รองลงมาคือที่เวลา 60, 30 และ 10 วินาที ตามลำดับ โดยที่เวลาสัมผัส 15 นาทีมีประสิทธิภาพสูงกว่า 10 และ 5 นาที อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และที่สภาวะเดียวกันโอโซนมีประสิทธิภาพลดเชื้อ *Salmonella* spp. สูงกว่า *Listeria* sp. โดยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าโอโซนที่ใช้ในการทดลองนี้ทำลายเมมเบรนของแบคทีเรียได้

เอกสารอ้างอิง

EPRI. 1997. Expert Panel Report : Evaluation of History and Safety of Ozone in Processing Food for Human Consumption: Vol. 1-3. EPRI. CA.

Graham, D. M. 1997.Use of ozone for food processing. J. Technology. 51:672-75.

Kim, J. G., Yousef, A.E. and Dave, S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of food: A review". J. Food Protection. 62:1071-1087.

Rdfai, M. K.1979. Manuals of Food Quality Control. Food and Agriculture Organization (FAO), Microbiology Analysis. pp. 2.A-7. C-1.C-8.

Scott, D. B. M. and Lesher, E. C. 1963. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. J. Bacteriology. 85:567-576.