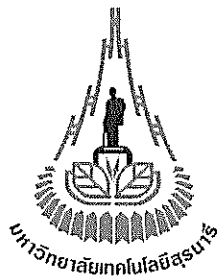

เอกสารประกอบการสอน

เรื่อง

การควบคุมจุลินทรีย์

อาจารย์ ดร.นวรัตน์ นันทพงษ์

สาขาวิชาปรีคลินิก สานักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การควบคุมจุลินทรีย์

(Control of Microbes)

หัวข้อที่ควรรู้

1. หลักโดยทั่วไป
2. หลักวิธีที่ใช้สำหรับควบคุมจุลินทรีย์ (คำจำกัดความ)
3. ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมจุลินทรีย์
4. กลไกการออกฤทธิ์
5. การควบคุมจุลินทรีย์โดยวิธีทางกายภาพ
6. การควบคุมจุลินทรีย์โดยวิธีทางเคมี

หลักโดยทั่วไป

ในทางจุลชีววิทยา ความหมายของคำว่า**ตาย** คือ การที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้อีก แม้ว่าจะนำไปเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม แต่ความหมายของการควบคุมจุลินทรีย์นั้นหมายถึงการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ โดยที่เซลล์อาจจะไม่ตายก็ได้ ดังนั้นหลักในการควบคุมจุลินทรีย์จึงแบ่งออกได้ 2 ทาง คือ

1. เพื่อทำลายจุลินทรีย์ (ทำให้ตาย)
2. เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

โดยวิธีการที่ใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีหลักๆ ดังนี้

1. โดยวิธีทางกายภาพ
2. โดยวิธีทางเคมี

หลักวิธีที่ใช้สำหรับควบคุมจุลินทรีย์ (คำจำกัดความ)

Sterilization เป็นวิธีที่ใช้เพื่อทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ออกจากวัตถุสิ่งของ หรือสารตัวอย่าง เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งวิธีนี้สามารถทำลายเซลล์ได้ทุกชนิด ซึ่งรวมไปถึงสปอร์และไวรัส

Disinfection เป็นวิธีที่ใช้สำหรับลดจำนวนเชื้อที่ปนเปื้อนมากับวัตถุสิ่งของและตามบริเวณผิวหน้าของวัสดุต่างๆ วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องทำลายเชื้อออกไปทั้งหมด อาจมีเชื้อบางอย่างหลงเหลืออยู่ โดยสารที่ใช้จะเรียกว่า disinfectant

Sanitation เป็นการลดปริมาณของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนออกไป ให้ปริมาณของเชื้ออยู่ในระดับที่ปลอดภัย ตามมาตรฐานทางสาธารณสุข

Antiseptic เป็นสารที่ทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งมักเป็น disinfectant ที่มีฤทธิ์อ่อนๆ จึงสามารถนำมาใช้กับร่างกายคนและสัตว์ได้

-cidal เป็นส่วนขยายที่ใช้เติมตรงส่วนท้ายของคำศัพท์ (suffix) เพื่อให้มีความหมายว่า “สารที่มีฤทธิ์ในการ ฆ่า ทำลาย” เช่น Bacteriocidal คือ สารที่มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรีย

-static เป็นส่วนขยายที่ใช้เติมตรงส่วนท้ายของคำศัพท์ (suffix) เพื่อให้มีความหมายว่า “สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต” เช่น Fungistatic คือ สารที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แต่เชื้อจะไม่ตาย

ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมจุลินทรีย์

1. ปริมาณของเชื้อ โดยจุลินทรีย์ที่มีปริมาณมากจะกำจัดได้ยากกว่า เช่น เวลาที่ใช้ในการทำลายจะเพิ่มขึ้น ปริมาณของสารที่ใช้ก็จะมากขึ้น
2. ชนิดของเชื้อ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความทนทานต่างกัน เช่น สปอร์ของเชื้อจะมีความทนทานกว่าเซลล์ในระยะปกติ (vegetative cell)
3. ปัจจัยจากสภาพแวดล้อม โดยอินทรีย์สาร เช่น เลือด อุจจาระ น้ำลาย สามารถไปเคลือบผิวเซลล์ของ จุลินทรีย์ และจะไปลดประสิทธิภาพการทำงานของสารต้านจุลชีพ เป็นต้น
4. เวลาที่ใช้ในการบ่ม โดยสารเคมีและรังสีจะออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นถ้าเวลาที่ใช้ในการบ่มนานขึ้น ส่วนการใช้อุณหภูมิต่ำจะมีผลดีขึ้นหากเพิ่มเวลา

กลไกการออกฤทธิ์

การที่จุลินทรีย์จะถูกยับยั้งหรือทำลายนั้นมีสาเหตุมาจากการที่เซลล์ถูกทำลายในส่วนต่างๆ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนหลักๆ ดังนี้

1. ออกฤทธิ์โดยไปเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์
    a. ไปมีผลต่อองค์ประกอบที่เป็นไขมันและโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่มีผลทำให้สมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป
    b. ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์รั่วออกมาภายนอก เป็นผลให้เซลล์หยุดการเจริญและตายได้
2. ทำลายโปรตีนและกรดนิวคลิอิกของจุลินทรีย์ เนื่องจากเซลล์มีโครงสร้างสำคัญส่วนใหญ่ที่เป็นโปรตีน และกรดนิวคลิอิกก็เป็นส่วนประกอบหลักของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ ดังนั้นการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงสภาพขององค์ประกอบเหล่านี้จึงเป็นเหตุสำคัญในการที่เซลล์จะถูกยับยั้งหรือทำลาย
    a. สารควบคุมอาจออกฤทธิ์ในการทำลายพันธะเคมีภายในโมเลกุลโปรตีน
    b. ไปยับยั้งหรือขัดขวางการสังเคราะห์ DNA RNA หรือ โปรตีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การควบคุมจุลินทรีย์โดยวิธีทางกายภาพ (Physical controls)

ปัจจัยทางกายภาพที่ใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์อาจแบ่งออกได้หลายข้อ ดังนี้

1. ***ความร้อน***

โดยความร้อนจะไปมีผลทำให้เอนไซม์และโปรตีนภายในเซลล์เสียสภาพ ซึ่งความสามารถในการทนอุณหภูมิจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ โดยในสภาวะแวดล้อมหนึ่งๆ จะมีชนิดของเชื้อแตกต่างกันไป ทำให้การใช้ความร้อนในการควบคุมจุลินทรีย์จะต้องคำนึงถึง

a. Thermal Death Point (TDH) คือ อุณหภูมิที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดในสารละลายได้ภายในเวลา 10 นาที
b. Thermal Death Time (TDT) คือ เวลาที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรีย ณ อุณหภูมิหนึ่งๆ
c. Decimal Reduction Time (DRT) คือ เวลาเป็นนาทีที่จะทำลายแบคทีเรียได้ 90% ณ อุณหภูมิหนึ่งๆ

ซึ่งการควบคุมด้วยความร้อนจะแบ่งได้เป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือ การใช้ความร้อนชื้น และ การใช้ความร้อนแห้ง

1.1 <u>การใช้ความร้อนชื้น</u>

เป็นการทำลายจุลินทรีย์โดยการทำให้โปรตีนเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน ซึ่งวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ความร้อนแห้ง โดยอาจแบ่งออกได้หลายวิธี ดังนี้

การต้ม โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C มีผลในการทำลายเฉพาะ vegetative cell แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ได้ และวิธีนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้กับสารบางชนิด หรืออาหารบางประเภท ที่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน

การใช้ไอน้ำภายใต้ความดัน เป็นการทำลายจุลินทรีย์โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 15 ถึง 30 นาที ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้สำหรับทำ Sterilization

Pasteurization เป็นวิธีที่ Louis Pasteur พัฒนาขึ้น มักใช้เพื่อลดปริมาณของเชื้อในน้ำนมและเครื่องดื่มเพื่อที่จะรักษารสชาติและคุณภาพของอาหารเอาไว้ ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นแค่การชะลอการเน่าเสียของอาหารเท่านั้น จุลินทรีย์จึงไม่ได้ถูกกำจัดออกไปหมด ซึ่งวิธีนี้แบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ

A. วิธีการดั้งเดิม (Classic method) โดยใช้อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที
B. เวลาสั้นอุณหภูมิสูง (High Temperature Short Time, HTST) โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72°C นาน 15 วินาที

C. ใช้อุณหภูมิที่สูงมาก (Ultra High Temperature, UHT) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140°C นาน 3 วินาที แล้วนำมาทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว ลักษณะนี้เป็นการทำแบบกึ่ง sterile (partial sterilization)

1.2 การใช้ความร้อนแห้ง มักใช้กับวัสดุอุปกรณ์ เครื่องแก้ว ต่างๆ โดยต้องใช้ทั้งอุณหภูมิและเวลาที่มากกว่าการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้น ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี ดังนี้

การใช้ความร้อนโดยตรงจากเปลวไฟ มักใช้ในการฆ่าเชื้อกับอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เข็มเขี่ยเชื้อ ทำได้โดยการนำไปจ่อกับเปลวไฟจนลวดร้อนแดง

การใช้เตาเผา เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และมักใช้กับอุปกรณ์ที่ใช้แล้วทิ้ง หรือใช้เพื่อทำลายของเสียทางชีวภาพ

การอบด้วยไอร้อน ทำโดยนำเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ต้องการฆ่าเชื้อไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 170°C นาน 2 ชั่วโมง

2. ***การใช้ความเย็น*** แบ่งออกได้เป็น

อุณหภูมิระดับตู้แช่เย็น โดยอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ในช่วง 0 ถึง 7°C ซึ่งความเย็นระดับนี้จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic) ทำให้เจริญได้ช้าลง เนื่องจากอัตราการเกิดเมทาบอลิซึมของเซลล์ลดลง

การแช่แข็ง โดยปกติจะใช้อุณหภูมิประมาณ -10 ถึง -20°C แต่ถ้าเป็นระดับที่เย็นจัดจะลดอุณหภูมิลงถึง -80°C โดยการแช่แข็งอาจแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

การทำให้แข็งอย่างรวดเร็ว (flash freezing) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ทำให้เซลล์ตาย และมักใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ของเชื้อเอาไว้ใช้ในอนาคต

การทำให้แข็งอย่างช้าๆ (slow freezing) วิธีนี้เป็นอันตรายต่อเซลล์ อาจทำให้เซลล์บางส่วนถูกทำลาย เนื่องจากเกร็ดน้ำแข็งที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะไปทำลายโครงสร้างต่างๆ ของเซลล์ได้

3. ***การกรอง***

เป็นการแยกจุลินทรีย์ออกจากสารละลายเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ โดยนำไปกรองผ่านเยื่อกรองที่มีรูเล็กๆ ซึ่งขนาดของรูและวัสดุที่ใช้ทำเยื่อกรองจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการใช้งาน โดยมากมักใช้กับของเหลวที่โดนความร้อนไม่ได้หรือเสื่อมสภาพด้วยความร้อน

4. ***ความแห้ง***

ทำให้กระบวนการเมทาบอลิซึมหยุดชะงัก จุลินทรีย์จึงไม่สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ สุดท้ายก็จะตายไป แต่เชื้อบางชนิดสามารถที่จะมีชีวิตรอดได้นานเป็นปีๆ เช่น ไวรัส และ สปอร์ จะทนทานต่อความแห้งได้ดีกว่า vegetative cell ของแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. ***แรงดันออสโมติก***

เป็นการควบคุมจุลินทรีย์โดยนำจุลินทรีย์มาไว้ในภาวะที่เซลล์อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์มากๆ (hypertonic solution) เช่น สารละลายที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลหรือเกลือสูงๆ สภาวะเช่นนี้จะทำให้เซลล์เหี่ยวเนื่องจากการสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์ (plasmolysis) วิธีนี้ไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ เป็นเพียงการยับยั้งการเจริญเท่านั้น

6. ***รังสี***

รังสีที่อยู่ในช่วงคลื่นที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้แบ่งออกเป็น 3 ชนิดหลักๆ คือ

รังสีที่มีการแตกตัวให้ไอออน ได้แก่ รังสีที่มีการปลดปล่อยพลังงานออกมาสูง เช่น รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ โดยรังสีเหล่านี้จะมีความยาวคลื่นสั้นกว่า 1 nm มีอำนาจทะลุทะลวงสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์ รวมทั้งมนุษย์และสัตว์ มักใช้สำหรับฆ่าเชื้อทางการแพทย์

รังสีที่ไม่แตกตัวให้ไอออน (Ultraviolet) มีความยาวคลื่นมากกว่า 1 nm สามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นเดียวกัน ใช้ฆ่าเชื้อตามโรงพยาบาล สถานดูแลเด็กอ่อน หรือตามโรงอาหาร รังสี UV มีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำ แต่ก็สามารถทำลายเยื่อบุดวงตาและผิวหนังของมนุษย์ได้

คลื่นไมโครเวฟ มีผลต่อส่วนที่เป็นของเหลวของเซลล์ โดยของเหลวจะดูดซับความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟเอาไว้ โดยอาจนำไปใช้เพื่อทำลาย vegetative cell ในอาหารที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ สำหรับสปอร์ของแบคทีเรียที่ไม่มีส่วนที่เป็นน้ำ จะไม่ถูกทำลายด้วยไมโครเวฟ

การควบคุมจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางเคมี (Chemical controls)

สารเคมีที่ใช้สำหรับควบคุมจุลินทรีย์มีอยู่หลายกลุ่ม ดังนี้

1. *Phenols และ Phenolics*

Phenol หรือ Carbolic acid นำมาใช้ครั้งแรกโดย Joseph Lister มีฤทธิ์ในการทำให้โปรตีนเสียสภาพ และมีความสามารถในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ปัจจุบันไม่ค่อยนำมาใช้ เนื่องจากมีกลิ่นแรง ทำให้ผิวหนังเกิดการระคายเคือง และทำลายเซลล์สมอง สำหรับ Phenolics นั้นเป็นอนุพันธ์ของ Phenol จึงมีฤทธิ์คล้ายๆกัน ข้อดีของสารทั้งคู่นี้คือ มีเสถียรภาพสูง และยังทำงานได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่มีสารอินทรีย์

2. *Alcohols*

เช่น Ethanol & Isopropanol มักใช้ที่ความเข้มข้นระหว่าง 70-95% สามารถทำลายโปรตีนและเยื่อหุ้มเซลล์ ใช้ในการกำจัด vegetative cell ของแบคทีเรียและเชื้อรา แต่ไม่มีความสามารถในการทำลายสปอร์ นำมาใช้ฆ่าเชื้อบริเวณผิวหนังของมนุษย์และสัตว์ได้

3. *Halogens*

มีความสามารถในการทำให้โปรตีนเสียสภาพ สารเคมีที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่

สารประกอบไอโอดีน เช่น ทิงเจอร์ไอโอดีน ซึ่งเป็นสารละลายของไอโอดีนในแอลกอฮอร์ ทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยเข้าไปรวมตัวกับกรดอะมิโน Tyrosine มักใช้เพื่อทำความสะอาดบาดแผล ส่วน Betadine ก็เป็นอีกตัวอย่างหนึ่ง

สารประกอบคลอไรด์ เช่น Sodium Hypochlorite มักใช้เป็น disinfectant สำหรับทำความสะอาดพื้นผิววัสดุ

4. *Chlorhexidine*

มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ตกตะกอน ไม่มีความสามารถในการทำลายสปอร์ของแบคทีเรีย และ เชื้อวัณโรค มักใช้ทำความสะอาดผิวหนัง เครื่องมือทางการแพทย์ ฆ่าเชื้อบนพื้นผิวอุปกรณ์ แต่มีขีดจำกัดในการใช้ เพราะฤทธิ์การทำลายเชื้อต่ำ ส่วนใหญ่ใช้เป็นส่วนผสมในสบู่ น้ำยาบ้วนปาก หรือใช้ผสมกับ alcohol สำหรับทำความสะอาดผิวหนังก่อนผ่าตัด

5. *Oxidizing Agents*

มีความสามารถในการทำลายโปรตีน และ เยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะไป oxidize องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่

Hydrogen peroxide ใช้เป็น Antiseptic ไม่เหมาะในการฆ่าเชื้อบาดแผลที่ปากแผลเปิด เนื่องจาก hydrogen peroxide ถูกทำลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ catalase จากเซลล์ผิวหนัง มีฤทธิ์ทำลาย endopore ที่อุณหภูมิสูง มักใช้ฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ตามวัตถุ สิ่งของ เครื่องใช้

Peracetic Acid เป็นหนึ่งในสารที่มีประสิทธิภาพในการทำลาย endospore ใช้เป็น disinfectiant กับอุปกรณ์ที่ใช้กับอาหารและยาเพราะไม่ทำให้เกิดสารตกค้างที่เป็นพิษ

6. *Heavy Metals*

มีคุณสมบัติเป็น oligodynamic action คือ สารที่ใช้ในปริมาณน้อยแต่มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์สูง เมื่อรวมตัวกับโปรตีนของเซลล์จะทำให้โปรตีนเสียสภาพ ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่

Copper: copper sulfate มักใช้ทำลายสาหร่ายในสระน้ำ ตู้ปลา

Selenium: ทำลาย fungi และ spore ของเชื้อรา ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อรา เป็นส่วนผสมในแชมพูขจัดรังแค

Zinc: zinc chloride ใช้ในน้ำยาป้วนปาก zinc oxide ใช้เป็นสารกำจัดเชื้อราในพืช

7. *Quaternary Ammonium Compounds* มีความสามารถในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ใช้เป็น disinfectants และ skin antiseptics ทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้มีประสิทธิภาพกว่าแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการทำลาย fungi amoebas และ viruses

8. *Aldehydes*

ทำลายเซลล์จุลินทรีย์โดยทำให้โปรตีนภายในเซลล์เสียสภาพ ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่

Formaldehyde: เป็น disinfectant ที่มีประสิทธิภาพสูง มักใช้ในรูปของ formalin (ใช้เก็บรักษาตัวอย่างทางชีวภาพ) ผลเสียต่อผู้ใช้ คือ มีกลิ่นฉุน และ ทำให้เยื่อบุผิวเกิดการระคายเคือง

Glutaraldehyde: มีประสิทธิภาพดีกว่า formaldehyde รวมทั้งยังก่อให้เกิดการระคายเคืองน้อยกว่า formaldehyde

2% glutaraldehyde (Cidex): ใช้เป็น bactericidal tuberculocidal viricidal และ sporicidal มักใช้ในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ เครื่องใช้ ตามโรงพยาบาล

9. *Sterilizing Gases*

มีความสามารถในการทำให้โปรตีนเสียสภาพ ตัวอย่างของแก๊สที่มักนำมาใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ ได้แก่

Ethylene Oxide: มีอำนาจทะลุทะลวงสูง สามารถทำลายจุลินทรีย์ และ endospores ได้ภายในเวลา 4 - 18 ชั่วโมง แต่มีข้อเสียคือ มีความเป็นพิษสูง และเป็นแก๊สที่มีความไว ทำให้เกิดการระเบิดได้จึงมักนำมาผสมกับแก๊สเฉื่อยเพื่อใช้สำหรับฆ่าเชื้อกับอุปกรณ์ขนาดใหญ่ตามโรงพยาบาล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี