

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของเครื่องผลิตโอโซน Examination of Antibacterial Efficiency of Ozone Generator

นฤมล คณะวงศ์¹ ณัฐมัย ศุภวรรณวิวัฒน์¹ ยุพารัตน์ เครือวงษา¹ จริญญาภรณ์ อุ๋นวงศ์²
ผดุง กิจแสงวง³ ปฐวี ทองโปรด² จำลอง กิตติวรเวช⁴ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ¹ และ ปาริชาติ พุ่มขจร^{1*}

Naruemon Kanawong¹ Nattamai Supawannawit¹ Yuparat Kruawongsa¹ Jariyaporn Onwong²
Padung Kitsawang³ Patawee Thongprod² Chamlong Kittiworavej⁴ Pongsak Rattanachaikunsopon¹ and
Parichat Phumkhachorn^{1*}

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

²ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

³ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

⁴หน่วยศัลยกรรมประสาท แผนกศัลยกรรม โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี

¹Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

²Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University

³Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University

⁴Neurosurgical Unit, Surgery Department, Sappasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani

*E-mail: scpariph@gmail.com

Received: 10 Oct 20

Revised: 11 Nov 20

Accepted: 26 Nov 20

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนที่พัฒนาขึ้นโดยคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*) และ Extended Spectrum Beta Lactamase *Escherichia coli* (ESBL *E. coli*) ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และแบคทีเรียดื้อยา ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียทดสอบเท่ากับ 0.5 McFarland ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แล้วนำไปอบด้วยโอโซนเป็นเวลา 60 นาที แบคทีเรียทดสอบทุกชนิดถูกยับยั้งได้ นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการอบโอโซน 60 นาที ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1, 2 และ 3 McFarland ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อดำเนินการทดลองเช่นเดิม โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียทดสอบเท่ากับ 0.5 McFarland แต่ลดเวลาในการอบโอโซนลงเป็น 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที พบว่า การอบโอโซนเป็นเวลา 10 และ 20 นาที ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดได้ แต่การอบโอโซนเป็นเวลา 30, 40 และ 50 นาที สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *B. cereus* และ ESBL *E. coli* จากการศึกษาทำให้สามารถสรุปได้ว่าหากต้องนำเครื่องผลิตโอโซนนี้ไปใช้งานจริงและต้องการให้ยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกประเภทควรใช้เวลาในการอบโอโซนเป็นเวลอย่างน้อย 60 นาที

คำสำคัญ: โอโซน แบคทีเรีย ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย

Abstract

This study aimed to examine the ability of an ozone generator developed by the Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University to inhibit several bacteria. The bacteria used in this study included *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*) and Extended Spectrum Beta Lactamase *Escherichia coli* (ESBL *E. coli*) that represented gram negative bacteria, gram positive bacteria, spore producing bacteria and drug resistant bacteria, respectively. When the tested bacteria with the initial concentration of 0.5 McFarland were streaked on BHI agar and exposed to ozone for 60 min, all tested bacteria were inhibited. Moreover, the 60 min exposure time to ozone could also inhibit all tested bacteria with initial concentrations of 1, 2 and 3 McFarland. The experiments were also performed using 0.5 McFarland as the initial concentration of all tested bacteria with different exposure times to ozone, 10, 20, 30, 40 and 50 min. It was found that exposure to ozone for 10 and 20 min could not inhibit all of the tested bacteria. However, exposure to ozone for 30, 40 and 50 min could inhibit *E. coli* and *S. aureus*, but not *B. cereus* and ESBL *E. coli*. From this study, it is suggested the most effective exposure time for the application of the ozone generator to inhibit all types of bacteria would be at least 60 min.

Keywords: Ozone; Bacteria; Antibacterial efficiency

1. บทนำ

โอโซนเป็นสารอยู่ในสถานะก๊าซไม่มีสี แต่มีกลิ่นคาวประกอบด้วยออกซิเจน (oxygen) 3 อะตอม โอโซนที่พบในธรรมชาติแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ stratospheric ozone และ tropospheric ozone [1] stratospheric ozone เป็น โอโซน ที่ พบ ใน ชั้น stratosphere ซึ่งอยู่สูงจากพื้นโลกประมาณ 10-50 กิโลเมตร โอโซนชนิดนี้เกิดจากการแผ่รังสีของพลังงานความร้อนจากดวงอาทิตย์ โดยเฉพาะรังสี ultraviolet เมื่อตกกระทบบรรยากาศชั้น stratosphere จะทำให้ก๊าซออกซิเจน (O_2) แตกตัวกลายเป็นอะตอมของออกซิเจน (O) ซึ่งเมื่อไปรวมตัวกับก๊าซออกซิเจน (O_2) จะได้เป็นโอโซน (O_3) stratospheric ozone เป็น โอโซนที่มีประโยชน์ เนื่องจากทำหน้าที่กรองรังสี ultraviolet ไม่ให้ผ่านมายังโลกมนุษย์มากเกินไป ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตบนโลก [2] tropospheric ozone (หรือ atmospheric ozone หรือ surface-level ozone) เป็นโอโซนที่พบที่ผิวโลกสูงจากพื้นโลกไม่เกิน 10 กิโลเมตร โอโซนชนิดนี้เกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างแสงแดดกับก๊าซที่ปล่อยออกมาจากรถยนต์ และโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ไนโตรเจนออกไซด์ (NO) โอระเหยจากสารจำพวกไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbons) เช่น มีเทน (methane) tropospheric ozone เป็น โอโซนที่มีโทษ และจัดเป็นสารมลพิษทางอากาศ (air pollutant) ชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถทำให้เกิดการระคาย

เคืองตามเยื่อปอดต่าง ๆ จนกระทั่งถึงขั้นเสียชีวิตได้ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโอโซน [3]

ก๊าซออกซิเจนเป็นสารที่มีความเสถียรสูง เนื่องจากพันธะที่ยึดระหว่างอะตอมของออกซิเจนทั้งสอง อะตอมมีความแข็งแรง ในขณะที่โอโซนมีความเสถียรต่ำ เนื่องจากอะตอมของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นมาอีก 1 อะตอม จับกับโมเลกุลของก๊าซออกซิเจนด้วยพันธะที่ไม่แข็งแรง ด้วยเหตุนี้โอโซนจึงมักทำให้เกิดการออกซิเดชัน (oxidation) ได้ง่าย โดยการให้อะตอมของออกซิเจน 1 อะตอมกับโมเลกุลอื่น เพื่อให้ตัวเองกลับไปเป็นก๊าซออกซิเจน ซึ่งมีความเสถียรสูง [4] ในกรณีที่ออกซิเดชันเกิดขึ้นกับส่วนประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน DNA และ RNA มักนำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ ขึ้นกับมนุษย์ ตัวอย่างของโรคที่มีรายงานว่าเกิดจากสาเหตุดังกล่าว เช่น มะเร็ง (cancer) [5], [6] เบาหวาน (diabetes) [7] หอบหืด (asthma) [8] โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) [8] และโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) [9] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าออกซิเดชันที่เกิดจากโอโซนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส แบคทีเรีย ยีสต์ และราได้ [10] ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงมีการสร้างเครื่องผลิตโอโซนเพื่อใช้ฆ่าจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์ โดยวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตโอโซน คือ การใช้แสง ultraviolet ทำให้ก๊าซออกซิเจน แตกตัวเป็นอะตอมของออกซิเจน ซึ่งเมื่อไปจับกับก๊าซออกซิเจนก็จะทำให้ได้โอโซน เครื่องผลิตโอโซนประเภท

นี้สะดวก ปลอดภัย และใช้งานง่าย [11] แต่ราคาแพง ดังนั้นในบางครั้งจึงมีการสร้างเครื่องผลิตโอโซนที่มีต้นทุนต่ำขึ้นใช้เอง ซึ่งเครื่องประเภทนี้นิยมใช้วิธี corona discharge ในการผลิตโอโซน [12] โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในการทำให้ออกซิเจนแตกตัวเป็นอะตอมของออกซิเจน แทนการใช้แสง ultraviolet เหมือนในกรณีของเครื่องผลิตโอโซนเชิงพาณิชย์ นอกเหนือจากการนำโอโซนไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แล้ว ในปัจจุบันยังมีการนำโอโซนไปประยุกต์ใช้ในงานด้านอื่น ๆ อีก เช่น ใช้บำบัดน้ำเสีย ใช้ลดกลิ่นอับในห้อง และใช้กำจัดคราบตะกอนที่เกิดขึ้นกับเครื่องมือที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น [11]

ในสถานการณ์ที่มีการระบาดของโรค เช่น การระบาดของโรค COVID-19 ความต้องการวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกัน หรือฆ่าเชื้อเพิ่มสูงขึ้นเกินกว่ากำลังการผลิตหลายเท่า ซึ่งส่งผลให้เกิดการขาดแคลน หรือการเพิ่มสูงขึ้นของราคาของวัสดุอุปกรณ์ดังกล่าว ด้วยเหตุนี้ทางคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีจึงมีแนวคิดที่จะสร้างเครื่องผลิตโอโซนเพื่อใช้ฆ่าเชื้อ ภายใต้โครงการนวัตกรรมสนับสนุนทางการแพทย์รองรับการระบาดจากเชื้อไวรัส COVID-19 โดยเครื่องดังกล่าวเป็นเครื่องผลิตโอโซนที่ใช้วิธีการผลิตโอโซนแบบ corona discharge และมีกำลังการผลิตโอโซน 36 กรัมต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำเครื่องผลิตโอโซนดังกล่าวไปใช้จริงจำเป็นต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียประเภทต่าง ๆ ซึ่งได้แก่แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และแบคทีเรียดื้อยา

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 ตู้อบโอโซน

ตู้อบโอโซน (ozone chamber) ที่ใช้ประกอบด้วยตู้สี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ผนังทำจากพลาสติก (plaswood) และประตูใส่ทำจากอะคริลิก (acrylic) มีขนาด กว้าง 1 เมตร ยาว 1 เมตร และ สูง 1 เมตร ด้านหน้ามีบานประตูเปิดปิดได้ ส่วนด้านหลังตู้มีช่องเพื่อให้สายไฟผ่านออกจากตู้ได้ ภายในตู้มีเครื่องผลิตโอโซน (ozone generator) ขนาด กว้าง 24 ซม. ยาว 39

ซม. สูง 25 ซม. มีกำลังการผลิตโอโซน 36 กรัมต่อชั่วโมง ด้านหน้าเครื่องมีปุ่มปรับเวลาได้ 6 ระดับ คือ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ระหว่างการทดลองเครื่องดังกล่าวจะวางไว้ใกล้ผนังด้านหลังของตู้ โดยห่างจากผนังด้านหลังประมาณ 6 นิ้ว (Figure 1)

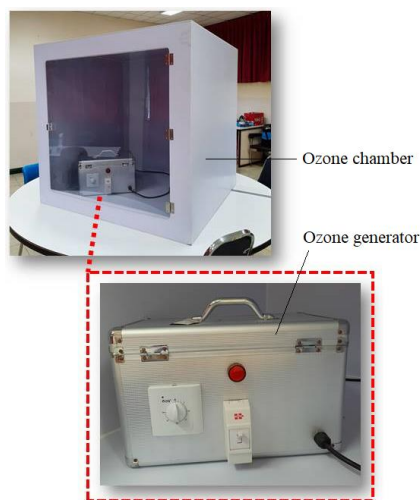


Figure 1 Ozone chamber and ozone generator

2.2 การทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

การทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยใช้แบคทีเรียต่อไปนี้ เป็นแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ ESBL *E. coli* ซึ่งใช้เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และแบคทีเรียดื้อยาตามลำดับ

การทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทำโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ใหม่ โดยใช้ inoculum size เท่ากับ 2% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จน bacterial culture อยู่ในระยะ exponential phase ปรับความเข้มข้นของ bacterial culture ให้เท่ากับ 0.5 McFarland (1.5×10^8 cfu/ml) แล้วนำมาป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ด้วยไม้พินสำลีที่ปลอดเชื้อ (sterile swab) จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มในตู้อบ

โอโซน เป็นเวลา 60 นาที ในลักษณะที่เปิดฝาด้านบนของจานอาหารเลี้ยงเชื้อออก การวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้อบโอโซนให้วางให้จานอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ชิดมาทางด้านประตุนั้น เพื่อให้ห่างจากเครื่องผลิตโอโซนมากที่สุด เมื่อครบกำหนดเวลาให้ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสังเกตการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองนี้มีชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุด positive control ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่มีการป้ายเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แต่ไม่ต้องนำไปบ่มในตู้อบโอโซน และชุด negative control ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ไม่มีการป้ายเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แต่นำไปบ่มในตู้อบโอโซน การทดลองนี้ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยโอโซน

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นของแบคทีเรียประเภทต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยโอโซน โดยใช้แบคทีเรียต่อไปนี้ เป็นแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *ESBL E. coli* ซึ่งใช้เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และแบคทีเรียดื้อยาตามลำดับ

การทดลองนี้ทำเช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ได้กล่าวมาแล้ว เพียงแต่ในการทดลองนี้มีการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแบคทีเรียตั้งต้น โดยให้ความเข้มข้น เท่ากับ 1, 2 และ 3 McFarland ($3, 6$ และ 9×10^8 cfu/ml) การทดลองนี้ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้นของแบคทีเรียตั้งต้น

2.4 การศึกษาผลของเวลาในการอบโอโซนต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

การทดลองนี้เป็นการหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ประเภทต่าง ๆ โดยใช้แบคทีเรียต่อไปนี้ เป็นแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *ESBL E. coli* ซึ่งใช้เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบ

แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และแบคทีเรียดื้อยาตามลำดับ

การทดลองนี้ทำเช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ได้กล่าวมาแล้ว เพียงแต่ในการทดลองนี้มีการปรับเปลี่ยนเวลาในการอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ทั้งที่มีการป้ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบ และไม่มีการป้ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (negative control) เป็น 30, 40 และ 50 นาที การทดลองนี้ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละเวลาของการอบโอโซน

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1 การทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* และ *ESBL E. coli* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland มาป้ายลงบนอาหาร BHI agar แล้วนำไปอบด้วยโอโซนเป็นเวลา 60 นาที พบว่าแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดถูกยับยั้งได้ โดยสังเกตจากการที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบโอโซน ในขณะที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการอบโอโซน ซึ่งใช้เป็น positive control แบคทีเรียทดสอบทุกชนิดสามารถเจริญได้ (Figure 2) การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าตู้อบโอโซนที่ใช้ในการทดลองมีความสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และแบคทีเรียดื้อยา

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าโอโซนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ [13] แบคทีเรียแกรมบวก [13] แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ [14] และแบคทีเรียดื้อยา [15] ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโอโซนสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น เชื้อรา และไวรัสได้ด้วย [16]

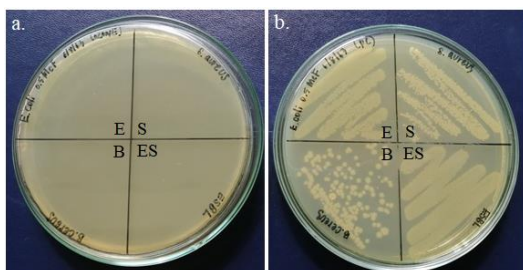


Figure 2 Inhibition of bacteria (0.5 McFarland) after ozone exposure for 60 min
a. treatment group exposed to ozone;
b. control group not exposed to ozone
(E = *E. coli*; S = *S. aureus*; B = *B. cereus*;
ES = ESBL *E. coli*)

3.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยโอโซน

เมื่อนำแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* และ ESBL *E. coli* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2 และ 3 McFarland มาป้ายลงบนอาหาร BHI agar แล้วนำไปอบด้วยโอโซนเป็นเวลา 60 นาทีพบว่าแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดถูกยับยั้งได้ โดยสังเกตจากการที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบโอโซน ในขณะที่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการอบโอโซนซึ่งใช้เป็น positive control แบคทีเรียทดสอบทุกชนิดสามารถเจริญได้ (Figure 3, Table 1) การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของแบคทีเรียไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยโอโซน

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Feng และคณะ [17] ที่ทดลองฆ่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยโอโซนที่ละลายในน้ำ โดยมีความเข้มข้นของโอโซนเท่ากับ 1.2 ppm เป็นเวลาประมาณ 165 วินาที พบว่า สามารถฆ่าแบคทีเรียทดสอบได้ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งได้แก่ 10^4 และ 10^8 cfu/ml

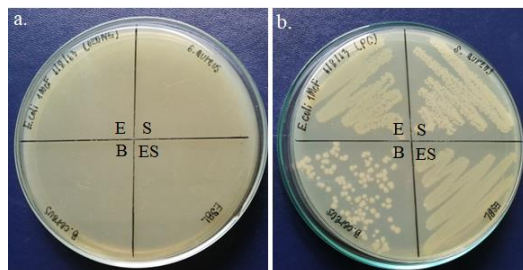


Figure 3 Inhibition of bacteria (1 McFarland) after ozone exposure for 60 min
a. treatment group exposed to ozone;
b. control group not exposed to ozone

Table 1 Inhibition of bacteria with different concentrations after ozone exposure for 60 min

Bacteria	Inhibition of bacteria with different concentrations (McFarland)		
	1	2	3
<i>E. coli</i>	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>B. cereus</i>	+	+	+
ESBL <i>E. coli</i>	+	+	+

+ = bacteria can be inhibited by ozone

3.3 การศึกษาผลของเวลาในการอบโอโซนต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* และ ESBL *E. coli* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland มาป้ายลงบนอาหาร BHI agar แล้วนำไปอบด้วยโอโซนเป็นเวลา 10 และ 20 นาทีพบว่าแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดไม่สามารถถูกยับยั้งได้ โดยสังเกตจากการที่ยังพบการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบโอโซน (Figure 4, Table 2) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดลองเช่นเดิม แต่เพิ่มเวลาการอบโอโซนเป็น 30 นาที พบว่า โอโซนสามารถยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *B. cereus* และ ESBL *E. coli* (Figure 5, Table 2) ผลการทดลองเช่นเดียวกันนี้ก็ถูกพบเมื่อใช้เวลาในการอบโอโซน 40 และ 50 นาที เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากว่า *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ จึงมีความทนทานที่สูง กว่าแบคทีเรียทั่วไปที่ไม่สร้างสปอร์

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gounnaki และคณะ [18] ซึ่งทำการทดลองใช้โอโซนลดจำนวนแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำ ผลปรากฏว่าในการลดจำนวน *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ปนเปื้อนในน้ำอย่างสมบูรณ์จากจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^9 cfu/ml ใช้เวลา 15 นาที ในขณะที่การลดการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในลักษณะเดียวกันต้องใช้เวลา 30 นาที ส่วนในกรณีที่มี ESBL *E. coli* ซึ่งเป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่ดื้อยาไม่สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยการอบโอโซนเป็นเวลา 30 นาที อาจเนื่องมาจากว่าแบคทีเรียที่ดื้อยามีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าแบคทีเรียทั่วไป [19] ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Song และคณะ [20] ซึ่งใช้น้ำมันที่มีการเติมโอโซน (ozonated oil) ยับยั้ง *S. aureus* และ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) ผลปรากฏว่าน้ำมันดังกล่าวสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ภายในเวลา 5 นาที ในขณะที่ต้องใช้เวลาราว 15 นาทีในการยับยั้ง MRSA ส่วนน้ำมันที่ไม่มีการเติมโอโซน ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมไม่สามารถยับยั้งทั้ง *S. aureus* และ MRSA อย่างไรก็ตามสาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้แบคทีเรียดื้อยามีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่ดื้อยาก็ยังต้องมีการศึกษาต่อไป

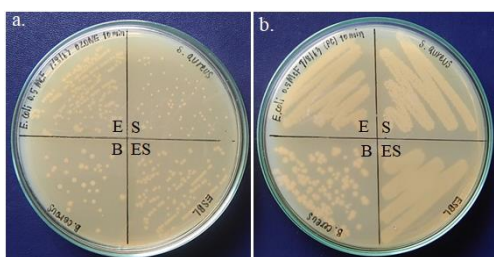


Figure 4 Inhibition of bacteria (0.5 McFarland) after ozone exposure for 10 min
a. treatment group exposed to ozone;
b. control group not exposed to ozone

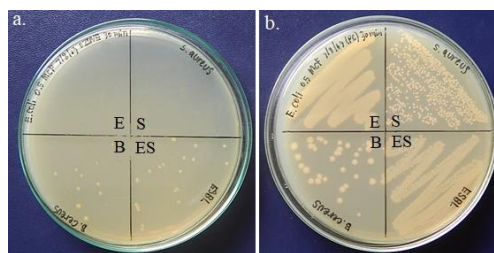


Figure 5 Inhibition of bacteria (0.5 McFarland) after ozone exposure for 30 min
a. treatment group exposed to ozone;
b. control group not exposed to ozone

Table 2 Inhibition of bacteria with the concentration of 0.5 McFarland by using different exposure times to ozone

Bacteria	Inhibition of bacteria with different exposure times to ozone (min)				
	10	20	30	40	50
<i>E. coli</i>	-	-	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	+	+	+
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-
ESBL <i>E. coli</i>	-	-	-	-	-

+ = bacteria can be inhibited by ozone

- = bacteria cannot be inhibited by ozone

4. บทสรุป

การศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องผลิตโอโซนที่พัฒนาขึ้นโดยคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และแบคทีเรียดื้อยา ผลจากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าหากต้องนำเครื่องผลิตโอโซนนี้ไปใช้งานจริง ซึ่งมีแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ปะปนกันอยู่ ควรใช้เวลาในการอบโอโซนอย่างน้อย 60 นาที เนื่องจากเวลาดังกล่าวสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่อนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องผลิตโอโซน และตู้อบโอโซน และโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ที่อนุเคราะห์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

6. References

- [1] Langematz, U. 2019. Stratospheric ozone: down and up through the anthropocene. **ChemTexts**. 5: 8.
- [2] Chipperfield, M.P., Hossaini, R., Montzka, S.A. and et al. 2020. Renewed and emerging concerns over the production and emission of ozone-depleting substances. **Nature Reviews Earth & Environment**. 1: 251-263.
- [3] Lu, X., Zhang, L. and Shen, L. 2019. Meteorology and climate influences on tropospheric ozone: a review of natural sources, chemistry, and transport patterns. **Current Pollution Reports**. 5: 238-260.
- [4] Guzzon, R., Nardin, T., Micheletti, O. and et al. 2013. Antimicrobial activity of ozone. Effectiveness against the main wine spoilage microorganisms and evaluation of impact on simple phenols in wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. 19: 180-188.
- [5] Clavo, B., Santana-Rodríguez, N., Llontop, P. and et al. 2018. Ozone therapy as adjuvant for cancer treatment: Is further research warranted? **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2018: 7931849.
- [6] Luongo, M., Brigida, A.L., Mascolo, L. and et al. 2017. Possible therapeutic effects of ozone mixture on hypoxia in tumor development. **Anticancer Research**. 37: 425-435.
- [7] Hernandez, F., Menendez, S. and Wong, R. 1995. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. **Free Radical Biology & Medicine**. 19: 115-119.
- [8] Lippmann, M. 1989. Health effects of ozone: a critical review. **Journal of the Air & Waste Management Association**. 39: 672-659.
- [9] Croze, M.L. and Zimme, L. 2018. Ozone atmospheric pollution and Alzheimer's disease: from epidemiological facts to molecular mechanisms. **Journal of Alzheimer's disease**. 62(2):503-522.
- [10] Ximenes, M., Cardoso, M., Astorga, F. and et al. 2017. Antimicrobial activity of ozone and NaF-chlorhexidine on early childhood caries. **Brazilian Oral Research**. 31: e2.
- [11] Summerfelt, S. 2003. Ozonation and UV irradiation - an introduction and examples of current applications. **Aquacultural Engineering**. 28: 21-36.
- [12] Dobrynin, D., Friedman, G., Fridman, A. and et al. 2011. Inactivation of bacteria using DC corona discharge: role of ions and humidity. **New Journal of Physics**. 13: 103033.
- [13] Moore, G., Griffith, C. and Peters, A. 2000. Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. **Journal of Food Protection**. 63(8): 1100-1106.
- [14] Aydogan, A. and Gurol, M.D. 2006. Application of gaseous ozone for inactivation of *Bacillus subtilis* spores. **Journal of the Air & Waste Management Association**. 56(2): 179-185.

- [15] Hembach, N., Alexander, J., Hiller, C. and et al. 2019. Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant. **Scientific Reports**. 9: 12843.
- [16] Elvis, A.M. and Ekta, J.S. 2011. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of natural science, biology, and medicine**. 2(1): 66-70.
- [17] Feng, L., Zhang K., Gao, M. and et al. 2018. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by aqueous ozone. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 28(8): 1233–1246.
- [18] Gounaki, I., Lironi, M.A. and Venieri D. 2019. Bacterial inactivation & study of damages in subcellular level during disinfection of aqueous samples. In: **Proceedings of the 16th International Conference on Environmental Science and Technology**, 4-7 September 2019. Rhodes Island, Greece.
- [19] Pudpai, N., Phumkhachorn, P. and Rattanachaikunsopon P. 2017. Isolation and characterization of lytic phages against antibiotic-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 19(Special issue 1): 62-71. (in Thai)
- [20] Song, M., Zeng, Q., Xiang, Y. and et al. 2018. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. **Molecular Medicine Reports**. 17(2): 2449-2455.