

ความสามารถในการยับยั้งไวรัสของเครื่องผลิตโอโซนที่พัฒนาโดยคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Antiviral Ability of Ozone Generator Developed by Faculty of Engineering Ubon Ratchathani University

ปาริชาติ พุ่มขจร^{1*} อารยา ปุ้ยไชยสร¹ จริยาภรณ์ อุ่นวงศ์² ณัฐมัย ศุภวรรณวิวัฒน์¹

ยุภารัตน์ เครือวงษา¹ ศศิธร หล่อเรืองศิลป์¹ ผดุง กิจแสวง³ ปฐวิ ทองโปรด²

จำลอง กิตติวรเวช⁴ และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ¹

Parichat Phumkhachorn^{1*} Araya Puichaisorn¹ Jariyaporn Onwong² Nattamai Supawannawit¹

Yuparat Kruawongsa¹ Sasithorn Lorroengsil¹ Padung Kitsawang³ Patawee Thongprod²

Chamlong Kittiworavej⁴ and Pongsak Rattanachaisophon¹

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, Sunpasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani

*E-mail: scpariph@gmail.com

Received: Aug 05, 2021

Revised: Aug 19, 2021

Accepted: Oct 22, 2021

บทคัดย่อ

โอโซนเป็นก๊าซที่ประกอบด้วยออกซิเจนจำนวน 3 อะตอม มีความเสถียรต่ำ เนื่องจากอะตอมของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นมาอีก 1 อะตอมจับกับโมเลกุลของก๊าซออกซิเจนด้วยพันธะที่ไม่แข็งแรง ด้วยเหตุนี้โอโซนจึงมักทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชัน ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ในปัจจุบันมีการสร้างเครื่องผลิตโอโซนเพื่อใช้ฆ่าจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์ ซึ่งทางคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีได้สร้างเครื่องผลิตโอโซนขึ้นมา ภายใต้โครงการนวัตกรรมสนับสนุนทางการแพทย์รองรับการระบาดจากเชื้อไวรัส COVID-19 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนที่พัฒนาขึ้นโดยคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในการยับยั้งเชื้อไวรัส โดยการศึกษาที่ใช้ coliphage ซึ่งเป็นไวรัสที่สามารถบุกรุก *Escherichia coli* ได้เป็นตัวแทนของไวรัส การศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการอบโอโซนต่อความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้ง coliphage ทำโดยนำ coliphage ที่มีความเข้มข้น 10^7 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แล้วนำไปบ่มในตู้อบโอโซน เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที จากนั้นเททับ BHI agar ที่มีหยดของ coliphage อยู่ ด้วย soft BHI agar ที่มี *E. coli* ผสมอยู่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการอบโอโซนเป็นเวลาตั้งแต่ 60 นาทีสามารถยับยั้ง coliphage ได้อย่างสมบูรณ์ การศึกษาผลของปริมาณไวรัสต่อความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้ง coliphage ทำโดยนำ coliphage ที่มีความเข้มข้น 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แล้วนำไปบ่มในตู้อบโอโซน เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเททับ BHI agar ที่มีหยดของ coliphage อยู่ ด้วย soft BHI agar ที่มี *E. coli* ผสมอยู่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการอบโอโซนเป็นเวลา 30 นาทีสามารถยับยั้ง coliphage ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10^5 pfu/ml ได้อย่างสมบูรณ์ จากการศึกษาทำให้สามารถสรุปได้ว่าหากต้องนำเครื่องผลิตโอโซนนี้ไปใช้งานจริงและต้องการให้ยับยั้งไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ควรใช้เวลาในการอบโอโซนเป็นเวลาอย่างน้อย 60 นาที

คำสำคัญ: โอโซน ไวรัส ความสามารถในการยับยั้งไวรัส

Abstract

Ozone consisted of 3 atoms of oxygen. It is a relatively unstable gas because of a weak bond joining an extra oxygen atom to oxygen gas. Consequently, it usually causes oxidation leading to growth inhibition of microorganisms. Currently, ozone generators for sterilization have been developed commercially. The faculty of

Engineering, Ubon Ratchathani University has developed an ozone generator under the project “Innovations for medical supports during COVID-19 pandemic”. This study aims to examine the ability of the ozone generator developed by the Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University to inhibit viruses. In this study, coliphage, a virus infecting *Escherichia coli*, was used as a representative of viruses. To examine the effect of exposure time to ozone on inhibitory ability of the ozone generator against coliphage, ten microliter of coliphage with the concentration of 10^7 pfu/ml was spotted onto BHI agar and then subjected to ozonation for 30, 60, 90 and 120 min. After ozonation, BHI agar having ozonated coliphage was overlaid with soft BHI agar containing *E. coli* and then incubated at 37°C for 24 h. It was found that ozone treatment for 60 min or more could completely inhibit coliphage. To examine the effect of viral load on inhibitory ability of the ozone generator against coliphage, ten microliter of coliphage with the concentrations of 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 and 10 pfu/ml was spotted onto BHI agar and then subjected to ozonation for 30 min. After ozonation, BHI agar having ozonated coliphage was overlaid with soft BHI agar containing *E. coli* and then incubated at 37°C for 24 h. It was found that ozone treatment for 30 min could completely inhibit coliphage with the concentrations of 10^5 pfu/ml or less. From this study, it was suggested that the most effective exposure time for the application of the ozone generator to completely inhibit viruses would be at least 60 min.

Keywords: Ozone, Virus, Antiviral ability

1. บทนำ

ไวรัส (virus) เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่จัดเป็นเซลล์ เนื่องจากไม่มีโครงสร้างที่เซลล์ทั่วไปต้องมี เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ ไรโบโซม (ribosome) และไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ไวรัสนี้มีโครงสร้างที่ง่ายประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 2 ชนิด คือ สารพันธุกรรมและโปรตีนห่อหุ้ม (capsid) ซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม ไวรัสแต่ละชนิดที่มีรูปร่างที่แตกต่างกันเป็นเพราะมีโปรตีนห่อหุ้มที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ไวรัสบางชนิดอาจมีชั้นไขมันที่เรียกว่า envelope ห่อหุ้มอยู่ชั้นนอกสุด สารพันธุกรรมที่พบในไวรัสอาจเป็น DNA หรือ RNA ก็ได้ [1] โดยไวรัสที่ใช้ DNA เป็นสารพันธุกรรมจะเรียกว่า DNA virus ส่วนไวรัสที่ใช้ RNA เป็นสารพันธุกรรมจะเรียกว่า RNA virus ไวรัสหลายชนิดมีความสำคัญทางการแพทย์เนื่องจากสามารถก่อโรคได้ DNA virus ที่ก่อโรค เช่น Herpes Simplex virus ซึ่งทำให้เกิดโรคเริม (Herpes) และ Varicella Zoster virus ซึ่งทำให้เกิดโรคงูสวัด (Herpes Zoster) [2] ส่วน RNA virus ที่ก่อโรค เช่น Ebola virus ซึ่งทำให้เกิดโรค Ebola, Influenza virus ซึ่งทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ และ Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) ซึ่งทำให้เกิดโรค COVID-19 ซึ่งเป็นโรคระบาดที่สำคัญในปัจจุบันที่คร่าชีวิตผู้คนนับล้านชีวิต [3]

โอโซน (ozone, O_3) เป็นก๊าซที่ประกอบด้วยออกซิเจน (oxygen) 3 อะตอม ไม่มีสี แต่มีกลิ่นคาว [4] โอโซนสามารถเกิดได้เองในธรรมชาติ โดยเกิดจากการที่พลังงาน ซึ่งอาจมาจากรังสี ultraviolet หรือกระแสไฟฟ้าแรงสูงจากฟ้าแลบหรือฟ้าผ่า [5] ไปทำให้ก๊าซออกซิเจน (O_2) แตกตัวกลายเป็นอะตอมของออกซิเจน (O) ซึ่งเมื่อไปรวมตัวกับก๊าซออกซิเจนก็จะทำให้เกิดโอโซน แต่เนื่องจากพันธะที่ใช้จับระหว่างอะตอมของออกซิเจนกับก๊าซออกซิเจนภายในโมเลกุลของโอโซนเป็นพันธะที่อ่อน จึงทำให้โอโซนมีความเสถียรต่ำ และมีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) โดยการให้อะตอมของ

ออกซิเจน 1 อะตอมกับสารอื่น ส่วนโอโซนก็จะกลายเป็นก๊าซออกซิเจนที่มีความเสถียรสูง ปฏิกิริยาออกซิเดชันดังกล่าวทำให้โอโซนสามารถฆ่าจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ [6], [7] จากการศึกษาพบว่าโอโซนมีความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือที่เรียกว่ามีค่าความต่างศักย์ออกซิเดชัน (Oxidation potential) สูงถึง 2.07 Electron Volt (eV) ซึ่งสูงกว่าสารเคมีต่าง ๆ ที่นิยมใช้ฆ่าเชื้อโรค เช่น hydrogen peroxide และ sodium hypochlorite ซึ่งมีค่าความต่างศักย์ออกซิเดชันเท่ากับ 1.78 eV และ 1.36 eV ตามลำดับ [8] ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเครื่องผลิตโอโซนขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์เพื่อกำจัดเชื้อโรคต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ รา และไวรัส

ในสถานการณ์ที่มีการระบาดของโรค เช่น การระบาดของโรค COVID-19 ในปัจจุบัน ทำให้ความต้องการวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกัน หรือฆ่าเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ด้วยเหตุนี้ทางคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีจึงมีแนวคิดที่จะสร้างเครื่องผลิตโอโซนเพื่อใช้ฆ่าเชื้อ ภายใต้โครงการนวัตกรรมสนับสนุนทางการแพทย์รองรับการระบาดจากเชื้อไวรัส COVID-19 โดยเครื่องดังกล่าวเป็นเครื่องผลิตโอโซนที่ใช้วิธีการผลิตโอโซนแบบ corona discharge ซึ่งใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในการทำให้ก๊าซออกซิเจนแตกตัวเป็นอะตอมของออกซิเจน ซึ่งเมื่อไปจับกับก๊าซออกซิเจนก็จะทำให้เกิดโอโซน [9] เครื่องดังกล่าวมีกำลังการผลิตโอโซน 36 กรัมต่อชั่วโมง ถึงแม้ว่าที่ผ่านมาจะมีรายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าโอโซนมีความสามารถในการฆ่าไวรัสได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรียโอฟาง [10] Influenza virus [11] Human immunodeficiency virus (HIV) [12] Poliovirus [13] Ebola [14] และ SARS-CoV-2 [15] อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำเครื่องผลิตโอโซนดังกล่าวไปใช้ในจริงจำเป็นต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของไวรัสก่อน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งไวรัส รวมทั้งผลของเวลาในการอบโอโซน และปริมาณเชื้อไวรัส ต่อประสิทธิภาพของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งไวรัส ในการทดลองนี้ใช้ coliphage ซึ่งเป็นแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) ที่สามารถบุกรุกและทำลาย *Escherichia coli* เป็นตัวแทนของไวรัส โดยคำนึงถึงความปลอดภัยทางชีวภาพ เนื่องจากทั้ง coliphage และ *E. coli* ที่ใช้เป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย และไม่ก่อโรคในมนุษย์

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. ตู้อบโอโซน

ตู้อบโอโซน (ozone chamber) ที่ใช้ประกอบด้วยตู้สี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ผนังตู้ทำจากพลาสติก (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 โดยห่างจากผนังด้านหลัง 6 นิ้ว (Figure 1)

2.2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้

แบคทีริโอเฟจที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ coliphage ซึ่งเป็นแบคทีริโอเฟจที่ผู้เขียนแยกได้เองโดยแยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากกบป่าบึงน้ำทิ้ง จากการตรวจสอบพบว่าอยู่ใน family *Siphoviridae* ส่วนแบคทีเรียที่ใช้เป็น host ของ coliphage คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน biosafety level 1

2.3. การทดสอบความสามารถของ coliphage ในการยับยั้ง *Escherichia coli*

การทดสอบความสามารถของ coliphage ในการยับยั้ง *E. coli* ทำโดยนำ coliphage ที่มีความเข้มข้น 10^7 pfu (plaque forming unit)/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar นำ soft BHI agar (0.4% agar) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรที่มีการเติมเชื้อ *E. coli* ปริมาตร 100 ไมโครลิตรโดยให้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) 10^6 cfu (colony forming unit)/ml มาเททับลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการหยด coliphage ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นเพื่อวิเคราะห์ความสามารถของ coliphage ในการยับยั้ง *E. coli* ในชุดควบคุม (control) ใช้ BHI broth แทน coliphage การทดลองนี้ทำซ้ำ 3 ครั้ง

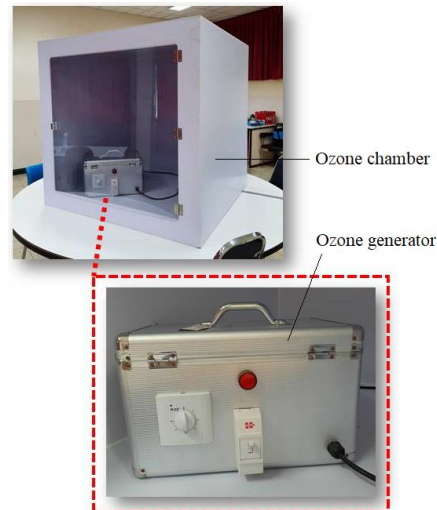


Figure 1 Ozone chamber and ozone generator

2.4. การศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการอบโอโซนต่อความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งไวรัส

การทดลองนี้ใช้แบคทีริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Escherichia coli* หรือ coliphage เป็นตัวแทนของไวรัส ในการศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการอบโอโซนต่อความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งไวรัส ซึ่งทำโดยนำ coliphage ที่มีความเข้มข้น 10^7 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี coliphage อยู่ไปบ่มในตู้อบโอโซน ที่เวลาต่าง ๆ ได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 นาที ในลักษณะที่เปิดฝาด้านบนของจานอาหารเลี้ยงเชื้อออก การวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้อบโอโซนให้วางให้จานอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ชิดมาทางด้านประตูหน้า เพื่อให้ห่างจากเครื่องผลิตโอโซนมากที่สุด เมื่อครบกำหนดเวลาให้นำ soft BHI agar (0.4% agar) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรที่มีการเติมเชื้อ *E. coli* ปริมาตร 100 ไมโครลิตรโดยให้ความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 cfu/ml มาเททับลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบโอโซนแล้ว หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น เพื่อตรวจสอบความสามารถของ coliphage ในการยับยั้ง *E. coli* ในการทดลองนี้ ทุกเวลาของการอบโอโซนมีชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุด positive control ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่มีการหยด coliphage ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แต่ไม่ต้องนำไปบ่มในตู้อบโอโซน และชุด negative control ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ไม่มีการหยด coliphage ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แต่นำไปบ่มในตู้อบโอโซน การทดลองนี้ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละเวลาของการอบโอโซน

2.5. การศึกษาผลของปริมาณไวรัสต่อความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งไวรัส

ในการศึกษาผลของปริมาณไวรัสต่อความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งไวรัส ทำโดยนำ coliphage ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปหยดลงบนจานอาหาร

เลี้ยงเชื้อ BHI agar นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี coliphage อยู่ไปบ่มในตู้บ่มโอโซนเป็นเวลา 30 นาที ในลักษณะที่เปิดฝาด้านบนของจานอาหารเลี้ยงเชื้อออก การวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มโอโซนให้วางให้จานอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ชิดมาทางด้านประตูด้านหน้าเพื่อให้ห่างจากเครื่องผลิตโอโซนมากที่สุด เมื่อครบกำหนดเวลาให้นำ soft BHI agar (0.4% agar) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรที่มีการเติมเชื้อ *E. coli* ปริมาตร 100 ไมโครลิตรโดยให้ความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 cfu/ml มาเทปที่ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบโอโซนแล้ว หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นเพื่อตรวจสอบความสามารถของ coliphage ในการยับยั้ง *E. coli* ในการทดลองนี้ ทุกความเข้มข้นของไวรัสมีชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุด positive control ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่มีการหยด coliphage ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แต่ไม่ต้องนำไปบ่มในตู้บ่มโอโซน และชุด negative control ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ไม่มีการหยด coliphage ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แต่นำไปบ่มในตู้บ่มโอโซน การทดลองนี้ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละปริมาณของ coliphage ที่ใช้

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. การทดสอบความสามารถของ coliphage ในการยับยั้ง *Escherichia coli*

เมื่อนำ coliphage ปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แล้วเททับด้วย soft BHI agar ที่มี *E. coli* ผสมอยู่ พบว่าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบโซนใสเกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด coliphage (Figure 2a) ในขณะที่ในชุดควบคุม ซึ่งใช้ BHI broth แทน coliphage ไม่ปรากฏโซนใสเกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด BHI broth (Figure 2b) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า coliphage มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli*

โดยปกติแล้วไวรัสทั่วไปไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ด้วยตัวเอง การเพิ่มจำนวนของไวรัสจะเกิดขึ้นได้ภายในเซลล์อื่นเท่านั้น โดยเรียกเซลล์ที่ไวรัสจำเป็นต้องไปอาศัยอยู่เพื่อเพิ่มจำนวนว่าเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) [16], [17] กลไกที่ไวรัสแต่ละชนิดใช้ในการเพิ่มจำนวนจะคล้ายกัน เพียงแต่มียาละเอียดบางประการที่แตกต่างกัน ในกรณีของ coliphage ไวรัสต้องไปจับกับ receptor ที่จำเพาะที่อยู่บนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งในกรณีนี้คือ *E. coli* หลังจากนั้น coliphage จะปล่อยสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งจะถูกใช้ในการเพิ่มจำนวน coliphage ภายในเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อภายในเซลล์เจ้าบ้านมี coliphage จำนวนมาก เซลล์เจ้าบ้านจะแตก และปลดปล่อย coliphage ออกมาเพื่อไปบุกรุกและทำลายเซลล์เจ้าบ้านเซลล์อื่น ๆ ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงต่อไป [16] ด้วยกลไกการบุกรุกเซลล์เจ้าบ้านของ coliphage ในลักษณะนี้ ทำให้บริเวณที่ยึด coliphage ลงไปจึงไม่มี *E. coli* เหลืออยู่จึงปรากฏเป็นโซนใส

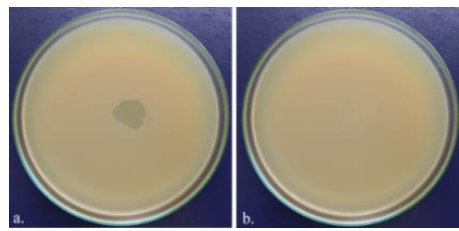


Figure 2 Inhibition of *E. coli* by coliphage

- a. presence of a clear zone;
- b. absence of a clear zone

3.2. การศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการอบโอโซนต่อความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งไวรัส

เมื่อนำ coliphage ที่มีความเข้มข้น 10^7 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มโอโซน เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที จากนั้นเททับ BHI agar ที่มีหยดของ coliphage อยู่ ด้วย soft BHI agar ที่มี *E. coli* ผสมอยู่ พบว่าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง coliphage ที่ผ่านการอบโอโซนเป็นเวลา 30 นาทียังคงมีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ได้ โดยสังเกตได้จากการมีโซนใสเกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด coliphage ลงบน BHI agar โดยโซนใสดังกล่าวมีขนาดที่เล็กกว่าโซนใสที่พบใน positive control (ชุดควบคุมที่ coliphage ไม่ผ่านการอบด้วยโอโซน) แสดงว่าการอบโอโซนเป็นเวลา 30 นาทีสามารถทำลาย coliphage ได้เพียงแค่ว่าบางส่วนเท่านั้น (Figure 3) อย่างไรก็ตามเมื่อนำ coliphage ไปอบโอโซนเป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที พบว่าไม่มีโซนใสเกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด coliphage ลงบน BHI agar ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการอบโอโซนเป็นเวลาตั้งแต่ 60 นาทีขึ้นไปสามารถทำลาย coliphage ได้อย่างสมบูรณ์ (Figure 3, Table 1)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโอโซนที่ผลิตจากเครื่องผลิตโอโซนของคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีมีความสามารถในการฆ่าไวรัสได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าโอโซนมีความสามารถในการฆ่าไวรัสได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรียอีโอฟาจ [10] Influenza virus [11] Human immunodeficiency virus (HIV) [12] Poliovirus [13] Ebola [14] หรือแม้แต่ SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค COVID-19 ที่กำลังระบาดทั่วโลกในปัจจุบัน [15]

กลไกการกำจัดจุลินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งไวรัสโดยโอโซนอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยโอโซนจะแตกตัวเป็นก๊าซออกซิเจน (O_2) และออกซิเจนอะตอมเดี่ยว (single oxygen atom) [18] ซึ่งสามารถไปทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะสารที่มีพันธะคู่ (double bond) เช่น ไขมัน และสารที่มีวงแหวนฟีนอล (phenolic ring) เช่น โปรตีน DNA และ RNA ทำให้สารเหล่านั้นมีโครงสร้างและหน้าที่เสียไปซึ่งนำไปสู่การตายของจุลินทรีย์ [19]

เวลาในการอบโอโซนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ต้องคำนึงถึงเมื่อต้องการใช้โอโซนในการฆ่าไวรัส เนื่องจากไวรัสแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนต่อโอโซนได้แตกต่างกัน Dubuis และคณะ [10] ได้ทดลองฆ่าเชื้อไวรัสหลาย ๆ ชนิดด้วยโอโซน ซึ่งผลที่ได้พบว่าการฆ่าแบคทีเรียโอเฟจ PR772 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli* สายพันธุ์ HER1221 ต้องใช้เวลา 10 นาที ในขณะที่การฆ่าแบคทีเรียโอเฟจ MS2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *E. coli* สายพันธุ์ HER1462 และการฆ่า murine norovirus MNV-1 ซึ่งเป็นไวรัสที่จำเพาะต่อเซลล์หนู (mouse) ต้องใช้เวลาถึง 40 นาที นอกจากนี้ Dubuis และคณะ [10] ยังสรุปว่าชนิดของสารพันธุกรรม รูปร่างและโครงสร้างของไวรัสไม่สามารถใช้ในการคาดคะเนความสามารถในการทนต่อโอโซนของไวรัสได้ ดังนั้นหากต้องการทราบแน่ชัดว่าไวรัสที่สนใจทนต่อโอโซนได้มากน้อยเพียงใดจึงต้องทำการทดสอบกับไวรัสที่สนใจเท่านั้น

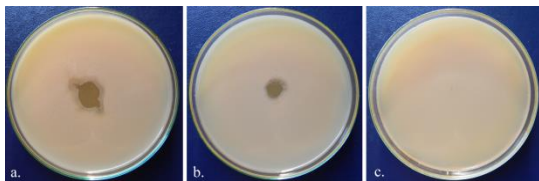


Figure 3 Inhibition of coliphage (10^7 pfu/ml) by using different exposure times to ozone

- a. control group not exposed to ozone;
- b. exposed to ozone for 30 min;
- c. exposed to ozone for 60 min

Table 1 Inhibition of coliphage by using different exposure times to ozone

Exposure time (min)	Inhibition of coliphage
0 (control)	×
30	×
60	✓
90	✓
120	✓

✓ = coliphage can be inhibited by ozone

× = coliphage cannot be inhibited by ozone

3.3. การศึกษาผลของปริมาณไวรัสต่อความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนในการยับยั้งไวรัส

เมื่อนำ coliphage ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แล้วนำไปบ่มในตู้อบโอโซน เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเททับ BHI agar ที่มีหยดของ coliphage อยู่ ด้วย soft BHI agar ที่มี *E. coli* ผสมอยู่ พบว่าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง coliphage ที่มีความเข้มข้น 10^7 และ 10^6 pfu/ml ที่ผ่านการอบโอโซนเป็นเวลา 30 นาที ยังคงมีความสามารถในการ

ยับยั้ง *E. coli* ได้ โดยสังเกตได้จากการมีโซนใสเกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด coliphage ลงบน BHI agar (Figure 4) โดยโซนใสที่พบมีขนาดเล็กลงตามความเข้มข้นของ coliphage ที่ใช้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำ coliphage ที่มีความเข้มข้น 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 pfu/ml ไปอบโอโซนเป็นเวลา 30 นาที พบว่าไม่มีโซนใสเกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยด coliphage ลงบน BHI agar (Figure 4) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการอบโอโซนเป็นเวลา 30 นาที สามารถทำลาย coliphage ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10^5 pfu/ml ได้อย่างสมบูรณ์ (Figure 4, Table 2)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของไวรัสเริ่มต้นมีผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าไวรัสด้วยโอโซน หากความเข้มข้นของไวรัสเริ่มต้นมาก เวลาที่ใช้ในการอบเพื่อฆ่าไวรัสก็ต้องมากตามไปด้วย ในการนำโอโซนไปงานจริงในการฆ่าไวรัสเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดต้องคำนึงถึงปัจจัยต่อไปนี้ ความเข้มข้นของไวรัสเริ่มต้น เวลาที่ใช้ในการอบโอโซน และความเข้มข้นของโอโซน [10] แต่ในกรณีของเครื่องอบโอโซนที่พัฒนาโดยคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เป็นเครื่องที่ไม่สามารถปรับค่าความเข้มข้นของโอโซนที่ผลิตออกมาได้ ดังนั้นการนำเครื่องดังกล่าวไปใช้งานจริงจึงต้องคำนึงถึง 2 ปัจจัยหลักเป็นสำคัญคือ ความเข้มข้นของไวรัสเริ่มต้น และเวลาที่ใช้ในการอบโอโซน

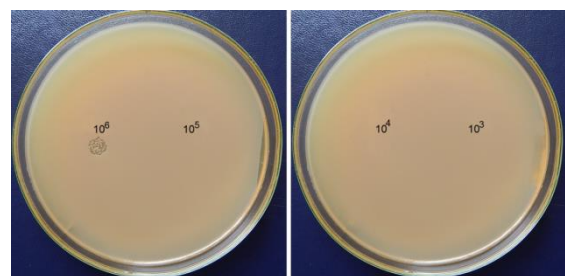


Figure 4 Inhibition of coliphage with different concentrations (10^6 , 10^5 , 10^4 and 10^3 pfu/ml) by ozone exposure for 30 min

4. บทสรุป

เครื่องผลิตโอโซนที่พัฒนาขึ้นโดยคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีมีความสามารถยับยั้ง coliphage ได้ หากต้องนำเครื่องผลิตโอโซนนี้ไปใช้งานจริงและต้องการให้ยับยั้งไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ควรใช้เวลาในการอบโอโซนเป็นเวลาอย่างน้อย 60 นาที

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่อนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องผลิตโอโซนและตู้อบโอโซน และโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ที่อนุเคราะห์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

Table 2 Inhibition of coliphage with different concentrations by ozone exposure for 30 min

Coliphage concentrations (pfu/ml)	Inhibition of coliphage
10 ⁷	✗
10 ⁶	✗
10 ⁵	✓
10 ⁴	✓
10 ³	✓
10 ²	✓
10	✓

✓ = coliphage can be inhibited by ozone

✗ = coliphage cannot be inhibited by ozone

6. References

- [1] Rossmann, M.G. 2013. Structure of viruses: A short history. **Quarterly Reviews of Biophysics**. 46(2): 133-180.
- [2] Kinchington, P.R. and et al. 2012. Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave. **Herpesviridae**. 3: 5.
- [3] Atkinson, B. and Petersen, E. 2020. SARS-CoV-2 shedding and infectivity. **The Lancet**. 395(10233): 1339-1340.
- [4] Elvis, A.M. and Ekta, J.S. 2011. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine**. 2(1): 66-70.
- [5] Barnes, P.W. and et al. 2019. Ozone depletion, ultraviolet radiation, climate change and prospects for a sustainable future. **Nature Sustainability**. 2: 569-579.
- [6] Ximenes, M. and et al. 2017. Antimicrobial activity of ozone and NaF-chlorhexidine on early childhood caries. **Brazilian Oral Research**. 31: e2.
- [7] Kanawong, N. and et al. 2020. Examination of antibacterial efficiency of ozone generator. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 22(3): 45-52. (in Thai)
- [8] Ilyas, M., Masih, I. and van der Hoek, J.P. 2018. Disinfection methods for swimming pool water: Byproduct formation and control. **Water**. 10: 797.
- [9] Dobrynin, D. and et al. 2011. Inactivation of bacteria using DC corona discharge: Role of ions and humidity. **New Journal of Physics**. 13: 103033.
- [10] Dubuis, M.E. and et al. 2020. Ozone efficacy for the control of airborne viruses: Bacteriophage and norovirus models. **PLoS One**. 15(4): e0231164.
- [11] Jakab, G.J. and Hmielecki, R.R. 1988. Reduction of influenza virus pathogenesis by exposure to 0.5 ppm ozone. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. 23(4): 455-472.
- [12] Wells, K.H. and et al. 1991. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by ozone *in vitro*. **Blood**. 78: 1882-1890.
- [13] Hudson, J.B., Sharma, M. and Vimalanathan, S. 2009. Development of a practical method for using ozone gas as a virus decontaminating agent. **Ozone: Science & Engineering**. 31(3): 216-223.
- [14] Rowen, R.J. 2019. Ozone and oxidation therapies as a solution to the emerging crisis in infectious disease management: a review of current knowledge and experience. **Medical Gas Research**. 9: 232-237.
- [15] Cattell, F. and et al. 2021. Ozone therapy in COVID-19: A narrative review. **Virus Research**. 291: 198207.
- [16] Salmond, G. and Fineran, P. 2015. A century of the phage: Past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**. 13: 777-786.
- [17] Phumkhachorn, P. and Rattanachaiyunsopon, P. 2019. Bacteriophages: Biology and applications. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 21(3): 1-13. (in Thai)
- [18] Gomez-Ramos, M.D.M. and et al. 2011. Chemical and toxicological evolution of the antibiotic sulfamethoxazole under ozone treatment in water solution. **Journal of Hazardous Materials**. 192(1): 18-25.
- [19] Khadre, M.A., Yousef, A.E. and Kim, J.G. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. **Journal of Food Science**. 66(9): 1242-1252.