P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj
ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 (มกราคม-กุมภาพันธ์ 2565) หน้า [174-185]

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดบนพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Comparison of the Efficacy of Cleaning Agents for the Surface of Laboratory Benches in Microbiology Laboratory at Faculty of Medicine, Thammasat University

สุนทรี สวนทับทิม*
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120
Suntaree Suantubtim*
Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120

Received 16 March 2021; Received in revised 26 July 2021; Accepted 11 August 2021

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีเป้าหมายในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการ ภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โดยทดสอบสารทำความสะอาดที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เป็นสารซักล้างได้แก่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผงซักฟอกกับกลุ่มที่เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อ ได้แก่ 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป โดยมีน้ำประปาเป็นตัวควบคุม ทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการ ด้วยวิธีการ Swab test พื้นที่ 25.81 cm^2 (4 in^2) จำนวน 4 พื้นที่ต่อสารทำความสะอาด 1 ชนิด ก่อนและหลังทำความสะอาดในวันที่มีเรียนปฏิบัติการจุลชีววิทยา ทำการทดสอบทั้งหมด 7 ครั้ง ทดสอบทั้งหมด 10 โต๊ะปฏิบัติการ จำนวน 20 ตัวอย่าง นำข้อมูลการเจริญขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบมาหาค่าทางสถิติความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พบว่า ในช่วงก่อนทำความสะอาดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบไม่แตกต่างกัน แต่ภายหลังจากการทำความสะอาด จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ก่อนทำความสะอาดอยู่ในช่วง 9.39 – 18.18 CFU/cm^2 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์หลังทำความสะอาดอยู่ในช่วง 0.39 – 2.14 CFU/cm^2 เมื่อนำมาทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ด้วยวิธีของ Scheffe ผลการวิเคราะห์ก่อนและหลังทำความสะอาด พบว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผงซักฟอก 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ไม่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** noon12161@gmail.comn **doi:** 10.14456/tstj.2022.15

พบ *Staphylococcus* sp. และ *Bacillus* sp. เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบก่อนและหลังทำความสะอาด พบว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป ทำลายเชื้อ *Staphylococcus* sp. ได้ดีที่สุด และ 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ทำลายเชื้อ *Bacillus* sp. ได้ดีที่สุด

คำสำคัญ: จุลินทรีย์; สารทำความสะอาด; ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

Abstract

This research aimed to compare the efficacy of cleaning agents for the surface of laboratory benches in Microbiology Laboratory at the Faculty of Medicine, Thammasat University. The experiment was set up to investigate the efficacy of cleaning agents, including the detergent group (i.e., 0.5% washing powder) and antiseptic group. For antiseptic group it could be divided into 2 sub-groups, which were disinfection solution (i.e., 70% alcohol and 0.5% sodium hypochlorite) and ready-to-use disinfectant (i.e., 0.5&% commercially available solution). Tap water was used as a control. Samples were collected from the surface of the laboratory table by a swab test method which was performed on an area of 25.81 square centimeters (4 square inches), a total of 4 areas per cleaning agent. The tests were conducted before and after the cleaning with tested agents on the days that had the microbiology laboratory lessons. The experiments were performed on 7 occasions with 10 tested tables and 20 samples per occasion. The different efficiencies among cleaning products in different periods were investigated using the colony count method, and one-way ANOVA was used to evaluate statistically different. The results before cleaning the number of microorganisms found were no different disinfectant. After cleaning, the number of microorganisms found was significantly different ($p<0.05$). Data on the growth of microorganisms when using different cleaning agents before and after cleaning were recorded. It was found that the mean microbial count before cleaning was in the range of 9.39 - 18.18 CFU / cm^2 while the mean microbial count after cleaning was 0.39 – 2.14 CFU / cm^2. The results before and after the cleaning usage with Scheffe method, there was no different disinfectant property between before and after cleaning laboratory benches when using 0.5% washing powder, 70% alcohol, 0.5% sodium hypochlorite, and 0.5% ready-to-use disinfectant. Further bacterial identification of all isolates showed *Staphylococcus* sp. and *Bacillus* sp. both before and after cleaning. When analyzing the average number of microorganisms, it was found that 0.5% ready-to-use disinfectant and 70% alcohol were the best destruction of *Staphylococcus* sp. and *Bacillus* sp., respectively.

Keywords: Microorganisms; Cleaning agent; Microbiology laboratory

1. บทนำ

ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ของสถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก เป็นหน่วยงานที่ให้บริการทางด้านการจัดการเรียนการสอนโดยแยกเป็นสาขารายวิชาดังนี้ ห้องปฏิบัติการกายวิภาคศาสตร์ ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยา ห้องปฏิบัติการชีวเคมี และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โดยทั่วไปแต่ละห้องปฏิบัติการจะประกอบด้วยเครื่องมือ อุปกรณ์ วัสดุ สารเคมี แต่ในส่วนของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาจะมีส่วนประกอบของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการเรียนการสอน หลังจากการเรียนการสอนปฏิบัติการอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบนโต๊ะปฏิบัติการที่นักศึกษาได้ทำการทดลองนั้น หากมีการจัดการที่ไม่เหมาะสมหรือไม่ได้ประสิทธิภาพผู้ที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาจเกิดความเสี่ยงในการได้รับเชื้อเหล่านั้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพของผู้ที่ปฏิบัติงานได้ โดยทั่วไปสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวมีหลายชนิด ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มตามสิ่งมีชีวิตที่สารเหล่านี้ออกฤทธิ์ เช่น pesticide, herbicide, insecticide, algicide, molluscicide, rodenticide หรือ miticide เป็นต้น ส่วนสารที่ออกฤทธิ์กำจัดหรือต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะเรียกรวมๆ ว่า “antimicrobial agent” คือ สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ สามารถฆ่า (microbicide) หรือหยุดยั้งการเจริญเติบโต (microbiostasis) ของเชื้อได้ โดยเมื่อจำแนกสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ตามวัตถุประสงค์การใช้ สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลัก ได้แก่ 1) disinfectant สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายและไม่จำเพาะเจาะจง ใช้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวสิ่งของต่างๆ ที่ไม่มีชีวิตเพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ 2) antiseptic ใช้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เช่น ใช้ฆ่าเชื้อในระหว่างการผ่าตัด ดังนั้น disinfectant บางชนิดที่ไม่มีพิษต่อคนก็สามารถใช้เป็น antiseptic ได้ด้วย และ 3) antibiotic ใช้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ภายในร่างกาย มีความเฉพาะเจาะจง เดิมจะหมายถึงแต่การกำจัดหรือควบคุมเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น แต่ปัจจุบันจะหมายถึงการกำจัดหรือควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ใดๆ การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวจึงใช้สาร disinfectant ซึ่งสารแต่ละชนิดออกฤทธิ์ด้วยกลไกการทำงานที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้าง แรงระหว่างโมเลกุล และ functional group ของสารประกอบนั้นๆ โดยมีผลกระทบต่อเซลล์ในด้านต่างๆ ได้แก่ การรับเข้าสู่เซลล์ การแตกหรือรั่วออกของเซลล์ การรบกวนสมดุลภายในเซลล์ การรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การยับยั้งกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน การยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation การเกิดปฏิกิริยากับ macromolecule ต่างๆ ในปัจจุบันนิยมใช้ Ethanol เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในการฆ่าเชื้อแต่มีข้อจำกัดบางประการคือ Ethanol มีคุณสมบัติในการระเหยง่าย [1] นันทวรรณ จินากุล และคณะ [2] ได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดบนพื้นห้องเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของสารทำความสะอาดต่างชนิดกัน ในช่วงก่อนและหลังการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยสารทำความสะอาดที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ผงซักฟอกสูตรธรรมดา ผงซักฟอกสูตรเข้มข้น ผงซักฟอกผสมนาโนซิลเวอร์ ผงซักฟอกสูตรยับยั้งแบคทีเรีย 1% Chloroxylenol 0.1% Chlorhexidine 0.2% Chlorhexidine 0.5% Umonium[38] และน้ำประปา พบว่าเมื่อใช้สารทำความสะอาดต่างชนิดกันในช่วงก่อน และหลังการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) วิชชุดา ธงกิ่ง และคณะ [3] ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมบนแป้นพิมพ์คอมพิวเตอร์โดยวิธีการทำความสะอาดที่ต่างกัน พบว่าการทำความสะอาดแป้นพิมพ์คอมพิวเตอร์โดยวิธีใช้ไม้ปัดขนไก่ มีค่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมบนแป้นพิมพ์คอมพิวเตอร์เฉลี่ยสูงถึง 14.75 CFU/50 cm^2 ซึ่งมากกว่าการทำความสะอาดแป้นพิมพ์คอมพิวเตอร์โดยวิธีเช็ด

แอลกอฮอล์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเพียง 1.21 CFU/50 cm^2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) นอกจากนั้นปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมเฉลี่ยภายหลังจากการทำความสะอาดโดยวิธีเช็ดแอลกอฮอล์ลดลงถึงร้อยละ 93.74 ศิริวรรณ วิชัย และคณะ [4] ทำการศึกษาการกำจัดจุลินทรีย์บนหนังสือวารสาร และสื่อสารสนเทศด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10% สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผลการทดลองพบว่าสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ลงได้และทำให้ปราศจากเชื้อในที่สุด วิธีดังกล่าวได้รับการพิสูจน์ความถูกต้องเปรียบเทียบกับ Control พบว่าจำนวนจุลินทรีย์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พลวัฒน์ จันทร์ผิว [5] ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารผสมระหว่าง Ethanol และ Clorox® เป็นการศึกษาสารเคมี 5 สูตร คือ 2% Clorox® 4% Clorox® 2% Clorox® ผสมกับ 70% Ethanol 4% Clorox® ผสมกับ 70% Ethanol และ 70% Ethanol โดยใช้วิธี disc diffusion method โดยสูตรฆ่าเชื้อที่ดีที่สุด 2 สูตร คือ 2% Clorox® ผสมกับ 70% Ethanol และ 4% Clorox® ผสมกับ 70% Ethanol ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p\geq0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม ควรแช่วัสดุอุปกรณ์ก่อนทำความสะอาด 10 นาที เพื่อให้สารเคมีฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

0.5% ผงซักฟอก ส่วนประกอบหลัก คือ Anionic Surfactant, Sodium Carbonate, Zeolite, Sodium Carboxymethylcellulose, Optical Brightener เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดสังเคราะห์และ/หรือชนิดธรรมชาติสารลดความกระด้างของน้ำ สารรักษาระดับความเป็นด่าง สารกันคราบคืน สารเพิ่มความสดใส ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการชำระล้างสิ่งสกปรกได้เป็นอย่างดี

70% แอลกอฮอล์ ความสามารถในการทำลายเชื้อได้ดีคือ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งแต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อได้ ความสามารถในการทำลายเชื้อได้ปานกลาง คือ วัณโรค, เชื้อรา, ไวรัส

0.5% sodium hypochlorite ความสามารถในการทำลายเชื้อได้ดีคือ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง, เชื้อรา, ไวรัส

0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป มีส่วนประกอบของ N-benzyl-N-dodecyl-N, N-dimethyl-ammonium chloride/N-benzyl-N, N-dimethyl-N-tetradecyl-ammonium chloride โดยทั่วไปใช้ 2 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นที่ 0.5% ใช้สำหรับทำความสะอาดพื้นผิวทั่วไป และความเข้มข้นที่ 2.5% ใช้สำหรับฆ่าเชื้อในกลุ่มแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อราและสปอร์ได้

ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดแต่ละชนิด เพื่อลดปัจจัยเสี่ยงจากการสัมผัสเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการ ที่อาจส่งผลต่อสุขภาพของบุคคลที่ได้สัมผัสและเพื่อเป็นแนวทางในการบริหารจัดการให้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ที่ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามากยิ่งขึ้น

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ของสารทำความสะอาดที่แตกต่างกัน
2. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณจุลินทรีย์บนโต๊ะปฏิบัติการก่อนและหลังทำการฆ่าเชื้อ

3. อุปกรณ์และวิธีการ

สถานที่สำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการ ได้แก่ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาสถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

3.1 วิธีการเก็บตัวอย่าง

โดยการเก็บตัวอย่างจากพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการด้วยวิธีการ Swab test เป็นวิธีที่ใช้กับพื้นผิวสัมผัสโดยใช้ก้านไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อเช็ดถูบริเวณที่จะทดสอบแล้วนำไปป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการ Swab test บนพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการและหาระดับความเข้มข้นในการเจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยทำการ Swab test ก่อนและหลังทำความสะอาดในวันที่มีเรียนปฏิบัติการจุลชีววิทยา ทั้งหมด 7 ครั้ง โดยจะทำการสุ่มเลือกพื้นที่ที่นักศึกษาทำปฏิบัติการบริเวณที่มีการวางเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธีการ Swab พื้นที่ 25.81 cm^2 (4 in^2) จำนวน 4 พื้นที่ต่อสารทำความสะอาด 1 ชนิด ด้วยสารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ 0.5% ผงซักฟอก 70% แอลกอฮอล์ 0.5% sodium hypochlorite และ 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป โดยมีน้ำประปาเป็นตัวควบคุม ทดสอบทั้งหมด 10 โต๊ะปฏิบัติการ จำนวน 20 ตัวอย่าง

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นชนิดแข็ง (Solid media) ซึ่งระบุวันที่ผลิต วันหมดอายุ และผ่านการตรวจคุณภาพด้านความปลอดเชื้อ (sterility test) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นชนิด low selective ที่สามารถให้จุลินทรีย์ทั้งชนิดที่ต้องการออกซิเจน, ไม่ต้องการออกซิเจน, เชื้อรา และยีสต์ สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยในการวิจัยครั้งนี้ใช้ Nutrient agar เพื่อศึกษารูปร่างและคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อจุลินทรีย์

3.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีนับจำนวนโคโลนี (colony) จากจานเพาะเชื้อ เป็นการตรวจวิเคราะห์หาค่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง โดยสมมุติฐานว่าโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (agar) ซึ่งมีสารอาหารสำหรับให้แบคทีเรียเจริญเติบโตในระหว่างการเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ในเวลา 48±3 ชั่วโมง หนึ่งโคโลนีเจริญมาจากเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตหนึ่งเซลล์ จำนวนโคโลนีที่นับได้บนจานเพาะเชื้อ คูณกับส่วนกลับของอัตราเจือจางที่ใช้จะเท่ากับจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร ซึ่งรายงานผลเป็น colony forming units (CFU/mL) และเมื่อคูณกับจำนวนปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างก็จะเท่ากับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อพื้นที่ทั้งหมด ในที่นี้คือ 25.81 cm^2 (4 in^2) โดยจากการทดสอบระดับการเจือจางของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้ คือ ไม่มีการเจือจาง

นำข้อมูลที่ได้ทั้งก่อนและหลังทำความสะอาดมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย (One-Way ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ก่อนและหลังทำความสะอาดว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

3.4 การวิเคราะห์และจำแนกชนิดของเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย การวิเคราะห์และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) สำหรับการเก็บตัวอย่างบนโต๊ะปฏิบัติการตามจุดที่กำหนด จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด คำนวณจำนวนโคโลนีโดยมีหน่วยเป็น Colony forming unit (CFU/cm^2) และสุ่มเลือกโคโลนีแบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง แล้วตรวจจำแนกหาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย โดยการศึกษารูปร่างลักษณะและคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ทราบชนิดของเชื้อแบคทีเรีย (Bacteria identification)

3.4.1 การศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อม Gram's stain ของเซลล์แบคทีเรีย

1. ทำการ smear เชื้อ โดยการหยดน้ำเกลือหรือน้ำประปา 1 หยดลงบนสไลด์ แล้วใช้ sterile loop เขี่ยเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อป้ายลงบนหยดน้ำแล้วเสมียร์เชื้อให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์ม

2. การ fix ด้วยความร้อน โดยการนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง โดยให้ด้านที่มีเชื้ออยู่ด้านบนเพื่อให้เชื้อไม่หลุดจากสไลด์ระหว่างการย้อม

3. การย้อม Gram's stain วิธีนี้จะทำให้แยกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม แบคทีเรียที่มีโครงสร้างผนังเซลล์แตกต่างกันจะติดสีต่างกัน สีแรกที่ใช้ย้อมคือ crystal violet ในขั้นตอนนี้แบคทีเรียทุกตัวจะติดสีม่วง เมื่อหยด Gram's iodine สาร iodine จะทำหน้าที่เป็นตัว mordant ทำให้แบคทีเรียติดสี crystal violet ได้ดียิ่งขึ้น หลังจากนั้นล้างออกด้วย 95% alcohol ในขั้นตอนนี้แบคทีเรียที่ผนังเซลล์มีชั้นของ peptidoglycan หนาและมีไขมันเป็นส่วนประกอบอยู่น้อย จะสามารถรักษา complex ของสีเอาไว้ภายในเซลล์ได้ทำให้เซลล์ยังคงติดสีม่วงของ crystal violet เรียกแบคทีเรียนี้ว่าแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียแกรมลบผนังเซลล์มีชั้น peptidoglycan บางและมีไขมันเป็นส่วนประกอบอยู่มาก เมื่อถูกล้างด้วย 95% alcohol สีของ crystal violet จะหลุดออกมากับไขมันซึ่งละลายได้ดีใน alcohol เมื่อย้อมทับด้วย safranin จึงติดสีแดงของ safranin ซึ่งเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า แบคทีเรียแกรมลบ การดูผลการย้อมแกรมนอกจากการดูการติดสีแล้วยังต้องดูลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชื้อด้วย เช่น ถ้าพบแบคทีเรียลักษณะกลมติดสีม่วงเรียงตัวเป็นคู่ๆ จะรายงานว่าเป็น Gram positive diplococcic หรือถ้าพบแบคทีเรียลักษณะกลมติดสีม่วง เรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มหรือเป็นสายจะรายงานผลเป็น Gram positive cocci in chains

เชื้อรา การวิเคราะห์และจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) สุ่มเลือกโคโลนีเชื้อรามาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งแล้วตรวจจำแนกหาชนิดของเชื้อรา โดยการศึกษารูปร่างลักษณะและคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อราเพื่อให้ทราบถึงชนิดของเชื้อรา (Fungi identification)

4. ผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในช่วงก่อนทำความสะอาด พบว่า จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบไม่แตกต่างกัน ภายหลังจากการทำความสะอาด พบว่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 1

Table 1 One Way ANOVA results of microorganisms before and after cleaned laboratory benches

	Source of variance	SS	df	MS	F	Sig.
Before	Between groups	1418.39	4.00	354.60	0.49	0.74
	Within groups	97179.75	135.00	719.85		
	Total	98598.14	139.00			
After	Between groups	93.47	4.00	23.37	2.59	0.04*
	Within groups	1215.93	135.00	9.01		
	Total	1309.40	139.00			

*statistical significance at level 0.05

เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบเมื่อใช้สารทำความสะอาดแต่ละชนิด พบว่า 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูปสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด เนื่องจากพบค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด และจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังทำความสะอาดเมื่อใช้สารทำความสะอาดแต่ละชนิดบนพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการจะมีค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าก่อนทำความสะอาด ดังแสดงผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 2

Table 2 The average of microorganisms before and after cleaned laboratory benches by difference cleaning agents

cleaning agents	0.5% washing powder	70% Alcohol	0.5% sodium hypochlorite	0.5% Ready-to-use disinfectant	Tap water
Before	9.57	11.86	18.18	9.39	12.11
After	1.93	2.14	1.25	0.39	2.79

จากผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในช่วงก่อนทำความสะอาด โดยทดสอบเป็นรายคู่ด้วยวิธีของ Scheffe พบว่า 0.5% ผงซักฟอก 70% แอลกอฮอล์ 0.5% sodium hypochlorite และ 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 3

Table 3 Mean difference analysis of before cleaned microorganism by pairs testing in Scheffe's methode

Mean difference analysis of microorganism					
Before	0.5% washing powder	70% Alcohol	0.5% sodium hypochlorite	0.5% Ready-to-use disinfectant	Tap water
0.5% washing powder	-	2.29	8.61	0.18	2.54
70% Alcohol	-2.29	-	6.32	2.46	0.25
0.5% sodium hypochlorite	-8.61	-6.32	-	8.79	6.07
0.5% Ready-to-use disinfectant	-0.18	-2.46	-8.79	-	2.71
Tap water	-2.54	-0.25	-6.07	-2.71	-

จากผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในช่วงหลังทำความสะอาดเมื่อใช้ทำความสะอาดต่างชนิดกัน โดยทดสอบเป็นรายคู่ด้วยวิธีของ Scheffe พบว่า 0.5% ผงซักฟอก 70% แอลกอฮอล์ 0.5% sodium hypochlorite และ 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 4

Table 4 Mean diffence analysis of after cleaned microorganism by pairs testing in Scheffe's methode

Mean difference analysis of microorganism					
After	0.5% washing powder	70% Alcohol	0.5% sodium hypochlorite	0.5% Ready-to-use disinfectant	Tap water
0.5% washing powder	-	0.21	0.68	1.54	0.86
70% Alcohol	-0.21	-	0.89	1.75	1.29
0.5% sodium hypochlorite	-0.68	-0.89	-	0.86	1.54
0.5% Ready-to-use disinfectant	-1.54	-1.75	-0.86	-	2.39
Tap water	-0.86	-1.29	-1.54	-2.39	-

การวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์บนโต๊ะปฏิบัติการ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา พบ *Staphylococcus* sp. และ *Bacillus* sp. เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบก่อนและหลังทำความสะอาด พบว่า 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูปทำลายเชื้อ *Staphylococcus* sp. ได้ดีที่สุด และ 70% แอลกอฮอล์ ทำลายเชื้อ *Bacillus* sp. ได้ดีที่สุด ดังแสดงผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 5

Table 5 The average of staphylococcus and *bacillus* sp. by using diffence cleaning agents

	microorganism	0.5% washing powder	70% Alcohol	0.5% sodium hypochlorite	0.5% Ready-to-use disinfectant	Tap water
Before	*staphylococcus* sp.	9.39	11.75	17.89	9.04	11.89
	bacillus sp.	0.18	0.11	0.29	0.36	0.21
After	*staphylococcus* sp.	1.86	2.11	1.11	0.25	2.68
	bacillus sp.	0.07	0.04	0.14	0.14	0.11

5. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดบนพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ โดยทดสอบวันที่มีเรียนปฏิบัติการทั้งหมด 7 ครั้ง งานวิจัยนี้ได้ทำในสถานที่และสภาพการใช้งานจริง จึงได้ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ก่อนทำความสะอาดอยู่ในช่วง 9.39 – 18.18 CFU/cm^2 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์หลังทำความสะอาดอยู่ในช่วง 0.39 – 2.14 CFU/cm^2 เห็นได้ว่าหลังทำความสะอาดมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลดลง โดยพบว่า 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของนันทวรรณ จินากุล และคณะ ที่พบว่า สารฆ่าชื้อสำเร็จรูป 0.5% Ummonium[38] เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด [2] ซึ่งส่วนประกอบของสารฆ่าเชื้อสำเร็จรูป 0.5% Ummonium[38] มีส่วนประกอบเดียวกันกับ 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิด ก่อนและหลังทำความสะอาด พบว่าสารทำความสะอาดต่างชนิดกัน สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ไม่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์พบว่า 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป ทำลายเชื้อ *Staphylococcus* sp. ได้ดีที่สุด และ 70% แอลกอฮอล์ทำลายเชื้อ *Bacillus* sp. ได้ดีที่สุด

0.5% ผงซักฟอก มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้สามารถใช้ทดแทนกันได้เมื่ออยู่ในพื้นที่ที่สะอาด ซึ่งมีจำนวนโคโลนีอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตารางฟุต แต่ทั้งนี้ความเข้มข้นของผงซักฟอกแต่ละยี่ห้อจะมีส่วนผสมที่แตกต่างกันไป ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพได้ หากมีการเปลี่ยนความเข้มข้นหรือยี่ห้อควรนำมาทดสอบประสิทธิภาพก่อน การใช้งาน [7, 8]

70% แอลกอฮอล์ มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการได้ เนื่องจาก 70% แอลกอฮอล์ สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ความสามารถในการทำลายเชื้อได้ปานกลาง คือ วัณโรค, เชื้อรา, ไวรัส [9]

0.5% sodium hypochlorite มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้ สามารถใช้ทดแทนกันได้เมื่อใช้ในพื้นผิวที่ไม่มีการปนเปื้อนของจำนวนจุลินทรีย์มาก เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการลดลง [10, 11]

0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ปราศจากส่วนประกอบของอัลดีไฮด์ ประกอบด้วย

แอลกอฮอล์ 2 ชนิดและควอเทอนารีแอมโมเนีย จึงมีความปลอดภัย มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อที่กว้าง นอกจากนี้ในส่วนประกอบของน้ำยาฆ่าเชื้อยังมีฤทธิ์ในการทำความสะอาดผิวหน้าของวัสดุ เครื่องมือ โดยไม่ทำลายส่วนประกอบที่เป็นยาง พลาสติก หรือซิลิโคน และยังสามารถป้องกันการเกิดไบโอฟิล์ม (Biofilm) [12] โดยทั่วไปใช้ 2 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นที่ 0.5% ใช้สำหรับทำความสะอาดพื้นผิวทั่วไป และความเข้มข้นที่ 2.5% ใช้สำหรับฆ่าเชื้อในกลุ่มแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อราและสปอร์ได้ โดยทั้งความเข้มข้น 0.5% และ 2.5% สามารถทำลายเชื้อได้อย่างกว้างขวางสำหรับอุปกรณ์สำคัญทางการแพทย์ [13, 14]

ผู้วิจัยให้ความเห็นว่าจากผลการวิจัยข้างต้นพบว่า 0.5% น้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้ดีที่สุด แต่ถ้าไม่มีน้ำยาฆ่าเชื้อสำเร็จรูป ก็สามารถใช้ 70% แอลกอฮอล์ทดแทนได้ เนื่องจาก 0.5% สารฆ่าเชื้อสำเร็จรูป มีราคาที่ค่อนข้างสูง เนื่องจากการเรียนปฏิบัติการแต่ละครั้งต้องใช้สารทำความสะอาดจำนวนมาก 70% แอลกอฮอล์ เป็นสารที่หาซื้อได้ง่าย สามารถเตรียมขึ้นเองได้เพื่อลดค่าใช้จ่ายของห้องปฏิบัติการ

6. กิตติกรรมประกาศ

ทั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยพร้อมทั้งสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิกทุกท่านที่ช่วยเหลือและให้ข้อมูลในการศึกษาวิจัยเป็นอย่างดี

7. References

[1] Chedsada Noppawinyoowong, Chayanid Sornchaithawatwong, Janya Srisangchun, Sarin Tadtong and Amornrat Viriyaroj, Chemical Stability of 70% Alcohol after Opened, SMJ Res. J. 2557; 29:282- 6 p. (in Thai)

[2] Nanthawan Jinakul, Duangjai Chanton and Kanpitcha Namchan, The comparison of disinfectant efficiency among cleansing agents for Cell Culture Laboratory, BJM Res. J. Vol.4 No.2 July-December 2017. (in Thai)

[3] Witchuda thongking, Pornsawan Sukprasert, Orasa Seesamer, Inthuorn Rinlue, Supanida Kampume and Yuparat Limmongkon, Commparison of Total Bacteria Concentration on Computer Keyboards with Different Clean Methods, KKU Res. J. Vol.11 No.2 April – June 2018. (in Thai)

[4] Siriwan Wichai, Nusara yinyom, Khwan Aumdee, Suchao Timkreajeen, Pheera samphao-ngeen, Chanunchida Muangthong and Suwanna Numphitsanu, Decontamination of Microorganisms on Books, Journals and the Media by 10% Hydrogen Peroxide Disinfectant, PULINET Journal Vol.6, No.3, September–December 2019 : pp.68-76. (in Thai)

[5] Phonlawat Janpiw, Comparison of Bactericidal Efficacy between Ethanol- and Clorox®-containing Disinfectants in Laboratories, SMJ Res. J. 2561; 33(5): 444-450. (in Thai)

[6] Pennapa Sriring, Kanchana Sanukul, Awirut Singhakui and Chutima Wichitranuwat, Production of sterile drug and sterile drug, 1st ed. Praboromarajchanok Institute; 2011. (in Thai)

[7] Thai industrial standard TIS. 78-2006, Laundry detergent powder, Thai industrial standards institute (TIST): Ministry of Industry; 2007. (in Thai)

[8] Arumrat Ratchadaruk. Standard of laundry detergent power and development of laundry detergent power, TIST Magazine 2005; 31: 6-7. (in Thai)

[9] Morton HE. Alcohols. In: Block SS, editor. Disinfection sterilization and Preservation. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983: 225-39.

[10] Wannaporn Srisukontharat, Household or Public Health antimicrobial agents. Food and drug Administration, Ministry of Public Health; 2015. (in Thai)

[11] M.H Wilcox, W.N Fawley, N. Wigglesworth, P. Parnell, P. Verity, J. Freeman. Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of *Clostridium difficile* infection. Journal of Hospital Infection. 2004 Jul; 57(3): 267.

[12] Laboratorie Huckert's International. Innovation in Cold Disinfection. [Internet]. [accessed October 04, 2017]. Available from:http://huckerts.net/en/umonium38/.

[13] Paolo Raffo, A.C. Salliez, Christian Collignon and Massimo Clementi. Antimicrobial activity of a formulation for the low temperature disinfection of critical and semi-critical medical equipment and surfaces. New Microbiology. 2007; 30: 463-69.

[14] M. Exner, V. Vacata, B. Hornei, E. Dietlein, J. Gebel. Household cleaning and surface disinfection: new insights and strategies. Journal of Hospital Infection. April 2004, pp. 70-75.