คำศัพท์ที่สำคัญ

- Sterilization, Disinfection, Antisepsis, Sanitation
  - Sterilization = วิธีการที่ฆ่า หรือกำจัดเซลล์ที่มีชีวิตทุกชนิด
  - Disinfection = สภาวะที่มีการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogens) ในสภาพเซลล์ปกติ (vegetative cells) แต่ไม่ทำลายสปอร์
  - Antisepsis = ที่มีการยับยั้งการติดเชื้อบนผิวหนัง หรือเนื้อเยื่อต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต
  - Sanitation = สภาวะที่ลดจำนวนจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค

- Disinfectants and antiseptic
  - Disinfectants
    - ใช้กับสิ่งของที่ไม่มีชีวิต
    - ไม่ปลอดภัยต่อการใช้กับเนื้อเยื่อ
    - ใช้ทำความสะอาดโต๊ะ หรือ พื้นที่ทำงาน
    - Chlorine, hypochlorite
  - Antiseptic
    - ใช้กับผิวหนังมนุษย์ได้
    - ฆ่าและยับยั้งจุลินทรีย์
    - ไม่อันตรายต่อเนื้อเยื่อของมนุษย์
    - alcohols, iodine solution

- Bactericidal, Bacteristatic
  - Bactericidal = สภาพที่มีการฆ่าแบคทีเรีย
  - Bacteristatic = สภาพที่มีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมจุลินทรีย์

- ปริมาณจุลินทรีย์
- ชนิดของจุลินทรีย์
- ความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์
- ระยะเวลาที่เชื้อจุลินทรีย์ สัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์
- อุณหภูมิ
- ความเป็นกรด-ด่าง
- สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในสภาวะนั้น

เป้าหมายของการทำลายเชื้อจุลินทรีย์

- เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)
- เอนไซม์ และ โปรตีน
- DNA และ RNA

วิธีการที่ใช้ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์

- วิธีการทางกายภาพ (Physical)
- วิธีการทางเคมี (Chemical)

วิธีการทางกายภาพ (Physical Methods)

- การใช้ความร้อน
  - การใช้ความร้อนแห้ง (Dry Heat)
  - การใช้ความร้อนชื้น (Moist Heat)
- การใช้ความเย็น (Low Temperatures)
- การใช้การกรอง (Filtration)
- การใช้รังสี (Radiation)

การใช้ความร้อนชื้น (Moist Heat)

- กลไกการฆ่าเป็นการเกิดร่วมกันของการทำให้กรดนิวคลีอิก/โปรตีนเสียสภาพ และการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์
- มีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ความร้อนแห้ง
- วิธีการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อนชื้น
  - การต้มเดือด (boiling)
  - พาสเจอร์ไรเซชั่น (pasteurization)
  - Ultra-high-temperature treatment = UHT
  - Autoclave
  - Tyndallization (fractional sterilization)

Boiling การต้มเดือดที่ 100 °C

- ทำลาย vegetative bacterial cells, fungi และ virus
- ไม่มีผลต่อ endospore และ hepatitis virus (20 นาที)
- ใช้กับอาหารได้

พาสเจอร์ไรเซชั่น (pasteurization)

- ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในน้ำนม และเครื่องดื่มที่ต้องการรักษารสชาติ และคุณภาพของอาหารและเครื่องดื่มนั้นไว้
- ลดการเสื่อมเสีย แต่ไม่ใช่ sterilize
- วิธีการดั้งเดิมใช้ 63-67 °C นาน 30 นาที
- Flash pasteurization (high-temperature short term pasteurization) : 72 °C นาน 15 วินาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว

Ultra-high-temperature treatment = UHT

- Sterilization น้ำนม โดยใช้ temp. 141 $^{\circ}$C นาน 2 -3 วินาที
- เหมาะสำหรับสิ่งของที่โดนความร้อนนานไม่ได้ เพราะอาจทำให้เสียคุณค่า
- ใช้กับ อาหาร ผลิตภัณฑ์นม
- ไม่ต้องเก็บในตู้เย็น

Autoclaving

- ใช้อุณหภูมิสูงกว่า 100 °C โดยความดันไอน้ำ
- autoclaves, pressure cookers, retorts
- ใช้อุณหูมิ 121 °C ความดันประมาณ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 15-30 นาที
- นิยมใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ สิ่งที่ปนเปื้อนเชื้อ เครื่องมือผ่าตัดที่ทนความร้อน และความชื้น ทดสอบว่าสามารถทำลาย *Clostridium* หรือ *Bacillus stearothermophilus*

Tyndallization (fractional sterilization)

- ทำลายจุลินทรีย์ในของเหลว หรือ semisolid

Temp. ~ 80-100 °C นาน 30 นาที

วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน

ทำแบบนี้ 3 ครั้ง

Dry Heating

- ต้องใช้อุณหภูมิสูง และเวลานานกว่าการใช้ความร้อนชื้น
- ทำลายโปรตีน และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ cytoplasm แห้ง
- ใช้ในการ sterilization เครื่องแก้ว และวัสดุอื่นๆ เช่น น้ำมัน เจล แป้ง ซึ่งเป็นวัสดุที่สัมผัสความชื้นไม่ได้
- วิธีการที่นิยมใช้มากที่สุดคือ hot-air oven และ incineration.

www.themegallery.com

- การเผา (incineration or burning)
  - Burner flames : pincets, inoculating loops, the mouth of culture tubes
  - Electric loop incinerators
  - furnaces used to destroy disposable items, soiled dressings, tissue specimens etc. at 800°C to 6500°C

- **การอบด้วยตู้ลมร้อน : Oven sterilization (hot-air oven)**
  - ใช้กับการฆ่าเชื้ออุปกรณ์เครื่องแก้ว หรือโลหะที่ทนร้อน
  - โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ 160°C นาน 2 ชม. ในการทำลายสปอร์ ไม่รวมเวลาในการใช้ทำให้อุณหภูมิขึ้นมา

การใช้ความเย็น (Low temperature)

- การแช่ตู้เย็น (fridge)
  - Temp. ~ 4°C
  - ยับยั้งการเจริญของ mesophiles หรือ thermophiles
  - แต่ psychrophiles เจริญได้
- การแช่แข็ง (freezer)
  - Temp. ~ -10 ถึง -20 °C หรืออาจถึง -80 °C
  - มักใช้เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อแบ่งตัวเพิ่ม
  - ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เซลล์เกิดการฉีกขาด

การใช้การกรอง (Filtration)

- ใช้สำหรับวัสดุที่ไม่ทนร้อน เช่น vaccines, antibiotics solution และ serum
- การกรองของเหลว
  - ใช้ membrane filters ที่เป็น plastic polymer หรือ cellulose esters
  - pore sizes (0.2-0.45 μm)
- การกรองอากาศ
  - ใช้ high efficiency particulate air (HEPA) filters
  - สามารถกำจัดจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 0.3 μm
  - ใช้กับ laboratory hoods

A
C
B
D

การใช้รังสี (Radiation)

- **Ultraviolet Radiation**
  - DNA ดูดกลืนรังสี ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 260 nm
  - ไม่สามารถผ่านแก้ว มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำ
  - มีผลต่อ DNA ทำลาย DNA เกิด thymine dimers
  - ใช้ลดจำนวนเชื้อในห้องผ่าตัด ห้องปฏิบัติการ และห้องผู้ป่วย

- **Ionizing radiation**
  - Gamma rays แหล่งกำเนิดที่สำคัญ คือ Co -60
  - ทำให้โมเลกุลของน้ำแตกตัว เกิด free radical (OH-)
  - มีฤทธิ์ทำลาย DNA
  - ใช้กับพลาสติกที่ไม่ทนร้อน ในงานทางด้านเภสัชกรรม และการแพทย์
  - สามารถใช้ในการ sterilization อาหาร

วิธีการทางเคมี (Chemical)

- Phenol
- Halogens
- Alcohol
- Heavy metal
- Surface active agents
- Gaseous sterilants
- Oxidizing agent
- Antibiotic

Phenol and Phenolics

- Phenol, orthocresol, orthophenylphenol, hexachlorophene
- ผลในการทำลาย
  - ทำให้โปรตีนเสียสภาพ
  - ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์
- ไม่ทำลายสปอร์
- Phenols มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส

Halogens

- oxidize โปรตีน และโครงสร้างเซลล์อื่นๆ
- สารประกอบ chlorine
  - sodium hypochlorite, calcium hypochlorite, chlorine gas ใช้ในการทำน้ำประปา
  - Sodium Hypochlorite 10 - 20% ใช้เป็น disinfectant
  - Halazone tablets (parasulfone dichloroamidobenzoic acid) ใช้ในการฆ่าเชื้อในน้ำสำหรับดื่ม

- **สารประกอบไอโอดีน**
  - Tincture of iodine (2.5% iodine solution in 70% alcohol)
  - Betadyne
  - **ใช้ในการทำความสะอาดผิวหนังและแผล**

Alcohols

- ทำลาย vegetative cells ของ bacteria & fungi แต่ไม่ทำลาย spores
- หลักการ :
  - ทำให้โปรตีนเสียสภาพ
  - ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์
- ไม่มีพิษ
- Ethyl, isopropyl 70%-90%

www.themegallery.com

Heavy metal

- อิออนของ ปรอท (Mercury), เงิน (silver), สังกะสี (zinc), สารหนู (arsenic), ทองแดง (copper)
- ทำลายโปรตีน โดยทำให้โปรตีนตกตะกอน
- ในปัจจุบันไม่นิยมใช้เนื่องจากมีความเป็นพิษอยู่ด้วย
- Hg
  - Mercuric chlorides : ใช้แช่ปรอทวัดไข้
  - Mercurochrome = ยาแดง
- Ag
  - 1% silver nitrate : หยอดตาป้องกันการติดเชื้อหนองใน
- Zn
  - Zinc oxide : รักษาโรคผิวหนัง
- copper sulfate
  - ใช้กำจัดสาหร่ายในสระว่ายน้ำ

สารลดแรงตึงผิว (Surface-Active Agents)

- ลดแรงตึงผิว
- ได้แก่ สบู่ และสารซักล้าง
- สบู่มีข้อจำกัดในการฆ่าเชื้อแต่สามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์หลุดออกไปด้วยการขัด

Surfactive active agents

- Anionic surface active agents
  - มีประจุลบ
  - เป็น bactericidal
  - ตัวอย่าง : สบู่
- Cationic surface active agent
  - ประจุบวก
  - Quaternary ammonium

- **Quaternary Ammonium Compounds (QUATS)**
  - จะจับกับ NH_4^+
  - ทำลาย plasma membranes
  - มีประสิทธิดีที่สุดกับ gram-positive bacteria
  - ใช้ในน้ำยาบ้วนปาก

Gaseous sterilants

- ทำลายเซลล์ปกติ และสปอร์ของแบคทีเรีย
- Formaldehyde : ใช้อบห้อง และอบเครื่องใช้ที่เป็นพลาสติก
- Ethylene oxide : เป็นก๊าซที่ติดไฟง่าย ใช้ร่วมกับ CO_2 ในอัตราส่วน 10 % : 90%

Oxidizing agent

- Hydrogen peroxide และ oxidizing agents อื่นๆ สามารถทำลาย bacteria, bacterial spores, viruses และ fungi แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นต่ำ
- Hydrogen peroxide (H_2O_2) : 3% = antiseptic
- Potassium permanganate ($KMnO_4$) : ทำความสะอาดแผล

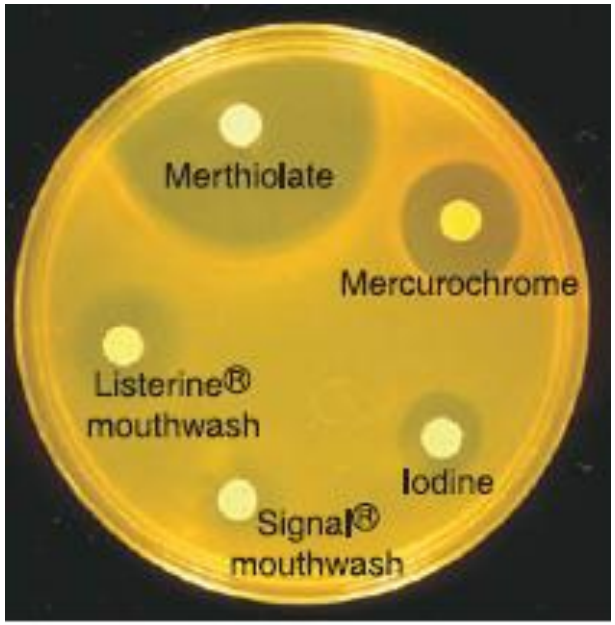
ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics)

- สารที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง แล้วสามารถฆ่าหรือยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้
- อาจเป็นสารธรรมชาติ หรือเป็นสารกึ่งสังเคราะห์ หรือสารสังเคราะห์ก็ได้
- ออกฤทธิ์กับจุลินทรีย์อย่างเฉพาะเจาะจง
- **ขอบเขตการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ (Antibiotic Spectrums)**
  - **Broad-spectrum** : สารปฏิชีวนะนั้นสามารถออกฤทธิ์กับแบคทีเรียหลายชนิด เช่น Tetracycline ออกฤทธิ์ยับยั้ง gram-positive bacteria และ gram-negatives หลายชนิด Chlamydia, Mycoplasmas และ Rickettsiae
  - **Narrow-spectrum** : สารปฏิชีวนะนั้นสามารถออกฤทธิ์กับแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว หรือเพียง 2-3 ชนิด เช่น Vancomycin ซึ่งใช้ยับยั้ง gram-positive cocci (Staphylococci และ Enterococci).

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

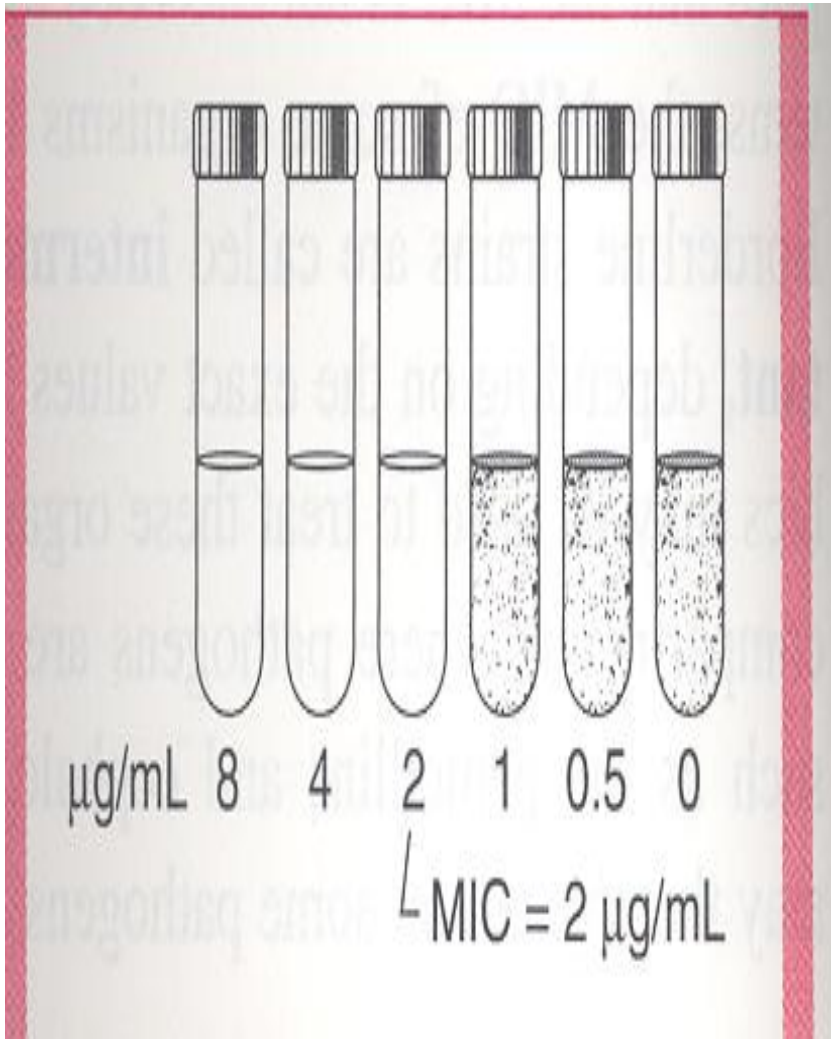
Antimicrobial susceptipility (sensitivity) tests

- เป็นวิธีการที่ทดสอบในหลอดทดลอง เพื่อดูความเป็นไปได้ในการใช้ในสิ่งมีชีวิต
- **Disk diffusion:**
  - มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย
  - สารละลายของยาปฏิชีวนะจะบรรจุไว้ในแผ่นกระดาษ แล้ววางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรีย
  - บ่มที่ 35-37°C นาน 24-48 hrs.
  - สังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

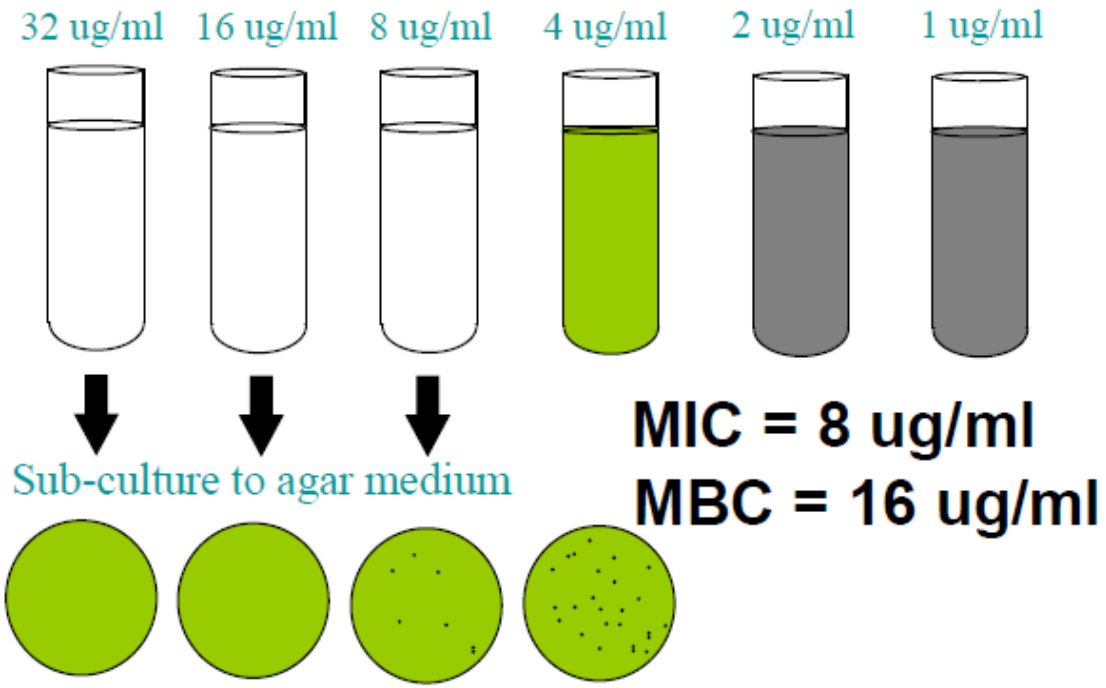


Dilution method

- เจือจางสารละลาย antibiotic ที่ระดับต่างๆ ในอาหารเหลว
- ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงไป จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม
- ถ้าไม่ขุ่นแปลว่าเชื้อไม่เจริญ



- Minimum Inhibition Concentration (MIC): ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์
- Minimum Bactericidal Concentration (MBC): ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์
- หลอดที่ไม่มีการเจริญ นำไปเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นมาแปลว่าเชื้อถูกฆ่า
- MBC มีค่าสูงกว่า MIC



กลไกการออกฤทธิ์ (Mode of action)

1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์

- **ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ โดยยับยั้งเอนไซม์ *transpeptidase*** ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้าง cross-linking ในชั้น peptidoglycan ที่ผนังเซลล์ เช่น Pinicillin, cephalosporins และ vancomycin

2. ทำลาย cell membrane:

- **จับกับ** membrane เป็นผลให้สูญเสียคุณสมบัติ semi-permeable ทำให้สารผ่านออกมาทำให้เซลล์ตาย เช่น polymyxin

3.ยับยั้งการสร้าง protein:

- **มีผลกับกระบวนการ *translation*** ในเซลล์ เช่น aminoglycosides

4. ยับยั้งการสังเคราะห์ nucleic acid:

- เช่น Nalidixic acid ยับยั้ง DNA replication หรือ rifampicin ยับยั้งการเกิด transcription ในเซลล์แบคทีเรีย