

พารามิเตอร์ที่เหมาะสมของการสร้างน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยเทคนิคการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน Appropriate Parameters of Plasma Activated Water for Growth Inhibition of *E. coli* by Box-Behnken design

เสถียรฐิติ จันทร์นิมา¹ ชนม์เจริญ แสงรัตน์^{1,*} ชีรวรรณ บุญญวรรณ²

สายสมร ถ้ายอง³ จตุรงค์ คำหล้า³ และ นครินทร์ สุวรรณราช³

Settawut Janthima¹, Choncharoen Sawangrat^{1,*}, Dheerawan Boonyawan²,
Saisamorn Lumyong³, Jatorong Kumla³ and Nakarin Suwannarach³

¹ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาฟิสิกส์และวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

239 ถ.ห้วยแก้ว ต.สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

¹Department of Industrial Engineering, Chiang Mai University

²Department of Physics and Materials, Faculty of Science, Chiang Mai University

³Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

239 Huay Kaew Road, Muang District, Chiang Mai, Thailand, 50200

E-mail: Settawut.J@hotmail.com and Choncharoen@step.cmu.ac.th*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมต่อปริมาณอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH[•]) และการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา (Plasma Activated Water) แบบ Pinhole plasma jet โดยประยุกต์ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface) ด้วยการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design) เพื่อกำหนดเงื่อนไขของการทดลอง โดยมีตัวแปรต้นที่ศึกษา คือ ระยะเวลาลิสซาร์จ อัตราการจ่ายก๊าซอาร์กอน และอัตราผสมก๊าซออกซิเจน และมีตัวแปรตาม คือ ปริมาณอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล และปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ ผลการทดลองพบว่า พารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุด คือ การใช้ระยะเวลาลิสซาร์จ 20 นาที อัตราการจ่ายก๊าซอาร์กอน 5 ลิตร/นาที และอัตราผสมก๊าซออกซิเจน 2% ของก๊าซอาร์กอน ซึ่งสามารถทำให้เกิดปริมาณอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ 10-30 ppm และสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ 0.62-0.98 Log CFU/ml หรือประมาณ 70-80% นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาการใช้น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาล้างผลพริกขี้หนู ซึ่งเป็นพืชตัวอย่างในศึกษา ผลการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลาการแช่ 5, 10 และ 15 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกขี้หนูได้ 0.69, 0.72 และ 0.82 Log CFU/g หรือประมาณ 70-80%

Received 15 August 2018
Revised 10 September 2018
Accepted 8 October 2018

ABSTRACT

The objective of this study were to find appropriate parameters of Plasma Activated Water (PAW) for hydroxyl radical (OH[•]) and growth inhibition of microorganisms. Box-Behnken design (BBD) was applied to determine parameter of factors in experiment. The independent variables were expose time, argon gas and oxygen mixture while hydroxyl radical and *E. coli* reduction were dependent variables. As a result, the optimal parameter were expose time 20 minute, argon gas flow rate 5 L/min and oxygen mixture 2% of Ar gas. The optimal parameters leads to approximately 10-30 ppm of hydroxyl radical and 0.62-0.98 (70-80%) Log CFU/ml of *E. coli* reduction. In addition, the optimal parameters was used to treat with chili and can reduce approximately 0.69, 0.72 and 0.82 (70-80%) Log CFU/g of microorganisms with treatment time 5, 10 and 15 minute, respectively.

1. บทนำ

ความสะอาดและปลอดภัยของอาหารเป็นสิ่งสำคัญสำหรับอาหารทุกชนิด สินค้าเกษตรถือเป็นสินค้าที่สำคัญของไทย โดยเฉพาะพืชผักและผลไม้ การจัดจำหน่ายและส่งออกไปยังต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศสมาชิกสหภาพยุโรป (EU) ซึ่งในปี 2560 พบว่า ปัญหาปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *E. coli* และ *Salmonella* ในสินค้าเกษตรเป็นอย่างมาก จากการสุ่มตรวจการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในเขตกรุงเทพมหานครและนนทบุรี พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เกินมาตรฐานประมาณ 45% จากตัวอย่างผักทั้งหมด [1] ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ ซึ่งวิธีการโดยทั่วไปจะเติมสารฆ่าเชื้อ เช่น คลอรีน (Chlorine) ในน้ำสำหรับล้างผัก ซึ่งอาจทำให้เกิดการตกค้างหากใช้ปริมาณมาก หรือวิธีการฉายรังสีและการใช้ความร้อน ซึ่งก็ส่งผลกระทบต่อคุณภาพต่อพืชผักและผลไม้ได้ [2]

ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีพลาสมา (Plasma Technology) ซึ่งถือได้ว่าเป็นเทคโนโลยีทางเลือกใหม่ สามารถประยุกต์ใช้งานได้หลากหลายด้าน และก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในด้านการทำให้อาหารปลอดภัย จุดเด่นของเทคโนโลยีพลาสมา คือ เป็นเทคโนโลยีสะอาด (Clean Technology) สามารถช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย อีกทั้งยังไม่ทำให้คุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรเสียหาย [3]

ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมของน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแบบพินโฮลพลาสมาเจ็ท (Pinhole plasma jet) ในการหาปริมาณอนุมูลอิสระ

ของไฮดรอกซิล และปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ โดยประยุกต์ใช้หลักการของการออกแบบการทดลอง (Design of experiments) ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

2. ทบทวนวรรณกรรม

2.1 พลาสมากับการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

พลาสมาถือได้ว่าเป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยทั่วไปองค์ประกอบที่สำคัญของพลาสมาจะประกอบด้วยอิเล็กตรอน (Electrons), ไอออน (Ions), โมเลกุล (Molecules), อะตอม (Atoms), โฟตอน (Photons) และอนุมูลอิสระ (Free radicals) ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบที่มีความไวต่อการออกซิเดชัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH[•]) สำหรับพลาสมาในเฟสของเหลว นั้น อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจะอยู่ในรูปของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ [4] โดยกลไกการยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์จากพลาสมาที่สำคัญ ได้แก่ การเกิดปฏิสัมพันธ์ทางเคมีระหว่างผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์กับพลาสมา และการเกิดความเสียหายต่อสารพันธุกรรม (DNA) และโปรตีน [5]

เทคนิคน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา (Plasma activated water) เป็นพลาสมาอุณหภูมิต่ำ (Non-thermal plasma) ประเภทหนึ่ง ที่เกิดจากการดิสชาร์จของไฟฟ้า ทำให้ก๊าซเกิดการแตกตัวกลายเป็นพลาสมา ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลผลิตผลิต

ทางการเกษตรได้ เช่น สตรอว์เบอร์รี เห็ด ผักกาดหอม แครอท และมะเขือเทศ [3, 6, 7]

2.2 การออกแบบการทดลอง

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวดอปสนองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน เป็นวิธีการออกแบบการทดลองเกิดจากการรวมกันของการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2^k และการออกแบบบล็อกไม่สมบูรณ์ ส่งผลในด้านประสิทธิภาพของจำนวนในการทดลองที่ไม่มาก อีกทั้งมีคุณสมบัติด้านการหมุน ทำให้ไม่มีเงื่อนไขการทดลองของจุดที่ไม่สามารถทำการทดลองได้ และสามารถหลีกเลี่ยงความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นจากการทดลองได้ เพราะค่าระดับปัจจัยจะอยู่ในขอบเขตของการออกแบบการทดลองที่สามารถควบคุมและทำการทดลองได้ ซึ่งสามารถทำการทดลองได้สะดวกและประสิทธิภาพ [8]

3. วิธีดำเนินการ อุปกรณ์และวิธีการ

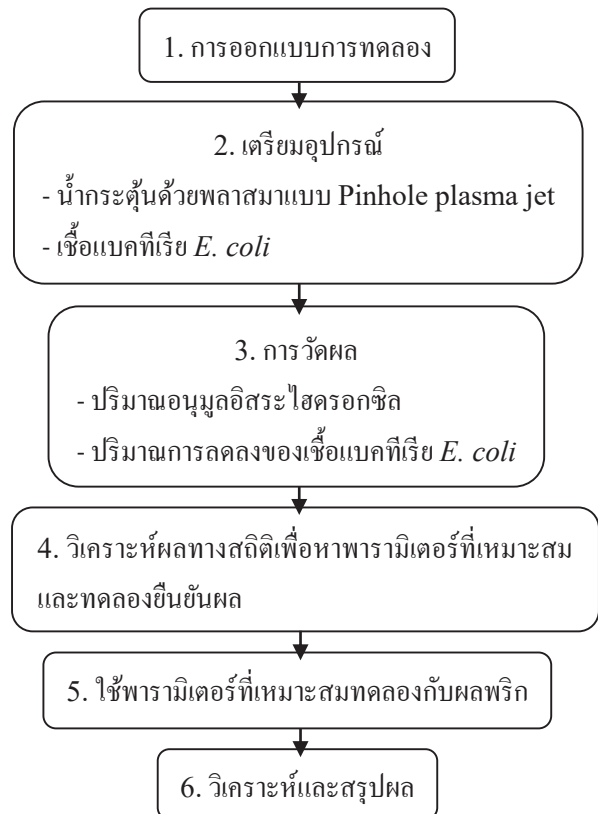
3.1 วิธีดำเนินการ

ขั้นตอนการดำเนินการในงานวิจัยนี้ สามารถแสดงดังรูปที่ 1

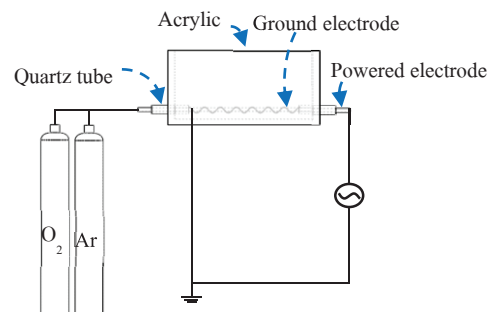
3.2 อุปกรณ์และวิธีการ

3.2.1 เครื่องกำเนิดน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

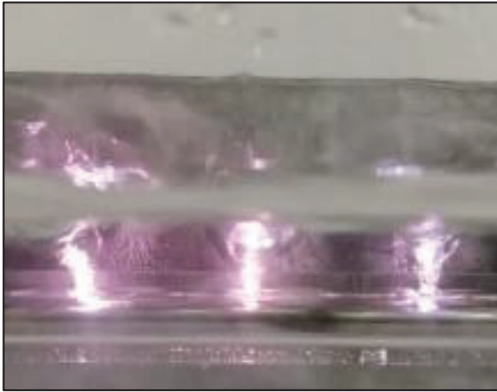
เครื่องกำเนิดน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแบบ Pinhole plasma jet แสดงดังรูปที่ 2 โดยการใช้แหล่งจ่ายไฟฟ้า (Power supply) แรงสูง 15 kV จากไฟฟ้ากระแสสลับของหม้อแปลงนิออน (Neon transformer) แบบขดลวดความถี่ต่ำ 50 Hz เมื่อจ่ายไฟฟ้าแรงดันสูงเข้าไปในหลอดควอตซ์ที่อยู่ในท่อควอตซ์ (Quartz tube) จะทำให้เกิดการปล่อยประจุพลาสมาผ่านรูท่อควอตซ์ไปสัมผัสกับน้ำ สามารถทำให้เกิดการกระจายพลาสมาได้น้ำได้อย่างทั่วถึง [9] แสดงดังรูปที่ 3 ซึ่งการสร้างพลาสมาในน้ำจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าในอากาศ เนื่องจากการสร้างพลาสมาได้น้ำทำให้เกิดองค์ประกอบในการออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการสร้างพลาสมาเหนือผิวน้ำ [10]



รูปที่ 1 ขั้นตอนการดำเนินการ



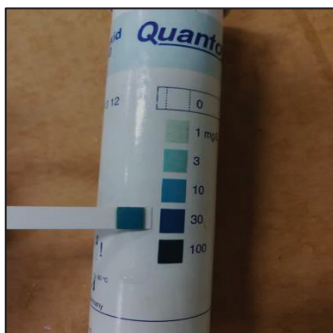
รูปที่ 2 ส่วนประกอบของเครื่องกำเนิดน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแบบ Pinhole Plasma jet



รูปที่ 3 ลักษณะของการปล่อยประจุพลาสมาผ่านรูท่อควอตซ์ไปสัมผัสกับน้ำ

3.2.2 การวัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล

อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล เป็นสารที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก แต่มีครึ่งชีวิตที่สั้น โดยปกติอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในน้ำจะอยู่ในรูปของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการที่ (1) ดังนั้นในการวัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจะวัดผ่านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยกระดาษทดสอบเปอร์ออกไซด์ (Peroxide Test Strip) โดยจุ่มลงไปยังน้ำพลาสมาแล้วทำการวัดผล [9] แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยกระดาษทดสอบเปอร์ออกไซด์

นอกจากนี้จะตรวจสอบความเข้มของแสง Optical Emission Spectrometer (OES) เพื่อศึกษาสมบัติการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ซึ่งจะมีความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่น 306-309 นาโนเมตร [6]

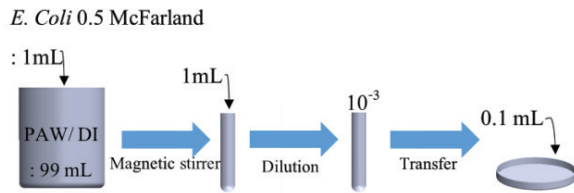
3.2.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การศึกษาเชื้อแบคทีเรียอีโคไล (*Escherichia coli* ; *E. coli*) โดยการเตรียมเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้จากการการนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิด Nutrient Broth (NB) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาทำการปรับความเข้มข้นที่ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีจำนวนโคโลนี (Colony) ของแบคทีเรีย 1.5×10^8 cfu/mL จากนั้นจึงทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ลงในอาหารชนิด Nutrient agar (NA) ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อแล้วทำการกระจายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยใช้เทคนิค Spread Plate เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกัน แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในห้องอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เจริญ หลังจากนั้นนำไปบ่มจะได้เชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์

3.2.4 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

การยับยั้งปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะนำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ระดับเข้มข้น 0.5 McFarland ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงน้ำ DI เพื่อเป็นชุดควบคุม และน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแต่ละเงื่อนไข ปริมาตรอย่างละ 99 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer) จากนั้นนำออกมา 1 มิลลิลิตร ไปทำเจือจางที่ระดับ 10^{-3} เนื่องจากโดยปกติการนับเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการ Spread Plate จะนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย 30-300 โคโลนี (Colony) ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} จะสามารถนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ จากนั้นนำเชื้อปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} ใส่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วทำการกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในห้องอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญ และคำนวณปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย จาก $\text{Log Reduction} = \text{CFU}_{\text{control}} / \text{CFU}_{\text{PAW}}$

[11] โดยขั้นตอนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสติก แสดงดังรูปที่ 5

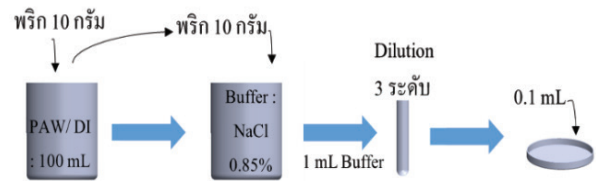


รูปที่ 5 ขั้นตอนการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสติก

สำหรับการยับยั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกชี้หนูด้วยเทคนิคน้ำกระตุ้นด้วยพลาสติก จะนำตัวอย่างพริก 10 กรัม มาทำการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริก แล้วทำการแช่ผลพริกด้วยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสติก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที โดยใช้เครื่องเขย่า (Orbital Shaker) แสดงดังรูปที่ 6 แล้วตัวอย่างพริก 10 กรัม ที่ล้างไปใส่ละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเจือจางอย่างน้อย 3 ระดับ ความเข้มข้น และดูตัวอย่างพริกแต่ละความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วทำการกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในห้องอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนับจำนวนโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญ [2] และคำนวณปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริก โดยขั้นตอนการยับยั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกชี้หนูด้วยเทคนิคน้ำกระตุ้นด้วยพลาสติก แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 6 การแช่พริกชี้หนูในน้ำพลาสติกโดยใช้เครื่องเขย่า



รูปที่ 7 ขั้นตอนการยับยั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกชี้หนูด้วยเทคนิคน้ำกระตุ้นด้วยพลาสติก

3.2.5 การออกแบบการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้หลักการการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน สามารถแสดงพารามิเตอร์ที่ใช้ในการออกแบบการทดลองทั้งหมด 3 ปัจจัย ดังตารางที่ 1 ซึ่งทั้ง 3 ปัจจัยนี้ได้มาจากการทบทวนวรรณกรรม และการทดลองเบื้องต้น โดยตัวแปรตามในการทดลอง คือ ปริมาณอนุโมลอิสระไฮดรอกซิล และปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ และมีลำดับการทดลองเป็นแบบสุ่ม ซึ่งจะทำได้เงื่อนไขการทดลองทั้งหมด 45 การทดลอง

ตารางที่ 1 การออกแบบการทดลองแบบ BBD

ปัจจัย	ระดับ			หน่วย
	ต่ำ (-)	กลาง (0)	สูง (+)	
Exposure Time (A)	15	17.5	20	นาที
Ar gas (B)	5	6.5	8	ลิตร/ นาที
O ₂ mixture (C)	0	1	2	% ก๊าซอาร์กอน

4. ผลการทดลอง

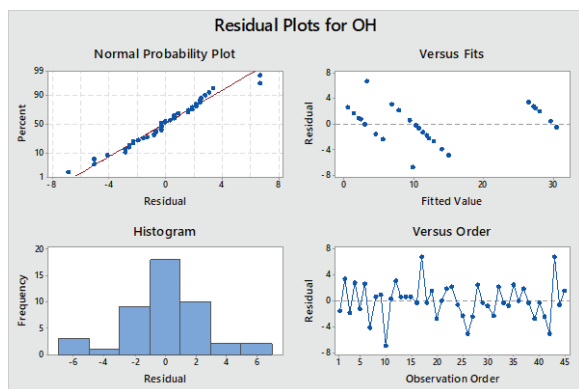
4.1 ผลการประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

ผลการทดลองของปริมาณอนุโมลอิสระไฮดรอกซิล และปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* จะนำมา

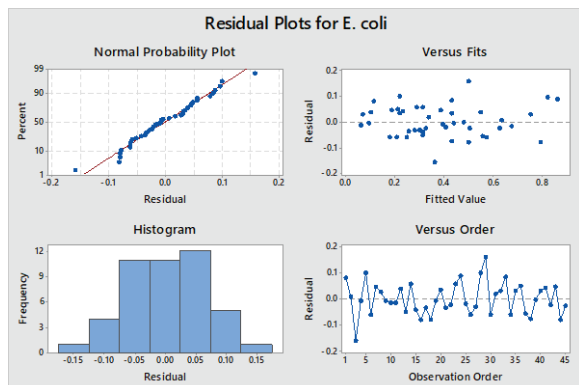
ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab 17 โดยผลการวิเคราะห์ มีดังนี้

4.1.1 การตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง (Model Adequacy Checking)

การตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง เป็นการตรวจสอบรูปแบบของค่าส่วนตกค้าง (Residuals) ซึ่งสามารถบ่งบอกความถูกต้องและน่าเชื่อถือของผลการทดลองได้ สามารถแสดงดังรูปที่ 8 และรูปที่ 9



รูปที่ 8 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองของปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล



รูปที่ 9 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองของปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ E. coli

จากรูปที่ 8 เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองของปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล ได้แก่ 1) การตรวจสอบการกระจายตัวแบบปกติ จากแผนภูมิการกระจายตัวของข้อมูล (Normal probability plot) พบว่า ข้อมูลมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง สามารถประมาณได้ว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ 2) การ

ตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน (Variance Stability) จากแผนภูมิการกระจายของค่าความคลาดเคลื่อนของค่าส่วนตกค้าง (Versus Fits) พบว่า ข้อมูลมีการกระจายแบบสุ่มทั้งทางด้านบวกและด้านลบ สม่่าเสมอ แต่มีลักษณะเป็นแนวโน้ม ซึ่งอาจเกิดจากค่าที่ได้จากเครื่องมือวัดที่ไม่ละเอียดเพียงพอ 3) การตรวจสอบการกระจายตัวแบบปกติ จากแผนภูมิฮิสโตแกรม (Histogram) พบว่า มีลักษณะเป็นทรงระฆังคว่ำ แสดงว่า ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ และ 4) การตรวจสอบความเป็นอิสระ (Independent) จากแผนภูมิการกระจาย (Versus Order) พบว่า ข้อมูลมีความเป็นอิสระต่อกันและไม่มีรูปแบบที่แน่นอน แสดงว่าข้อมูลส่วนตกค้างไม่ขึ้นกับลำดับการทดลอง

จากรูปที่ 9 เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองของปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ได้แก่ 1) การตรวจสอบการกระจายตัวแบบปกติ จากแผนภูมิการกระจายตัวของข้อมูล พบว่า ข้อมูลมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง สามารถประมาณได้ว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ 2) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน จากแผนภูมิการกระจายของค่าความคลาดเคลื่อนของค่าส่วนตกค้าง พบว่า ข้อมูลมีการกระจายแบบสุ่มทั้งทางด้านบวกและด้านลบ สม่่าเสมอและไม่มีแนวโน้ม แสดงว่าข้อมูลมีความแปรปรวนคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามระดับของปัจจัย 3) การตรวจสอบการกระจายตัวแบบปกติ จากแผนภูมิฮิสโตแกรม พบว่า มีลักษณะเป็นทรงระฆังคว่ำ แสดงว่าข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ และ 4) การตรวจสอบความเป็นอิสระ (Independent) จากแผนภูมิการกระจาย (Versus Order) พบว่า ข้อมูลมีความเป็นอิสระต่อกันและไม่มีรูปแบบที่แน่นอน แสดงว่าข้อมูลส่วนตกค้างไม่ขึ้นกับลำดับการทดลอง

4.1.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการวิเคราะห์ที่ความผันแปรหรือปัจจัยที่มีผลกระทบต่อทดลอง โดยจะกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($\alpha = 0.05$)

ซึ่งการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล แสดงดังตารางที่ 2 และการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แสดงดังตารางที่ 3

จากตารางที่ 2 พบว่า ปัจจัยหลัก (Main Effect) ที่มีอิทธิพลหรือผลกระทบต่อปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล ได้แก่ A, B และ C ส่วนปัจจัยร่วม (Interaction Effect) ได้แก่ A*A, C*C และ A*C

จากตารางที่ 3 พบว่า ปัจจัยหลักที่มีผลกระทบต่อปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้แก่ A, B และ C ส่วนปัจจัยร่วม ได้แก่ A*A, A*C

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Const	10.00	1.05	9.55	0.000
A	3.96	0.64	6.17	0.000
B	1.46	0.64	2.27	0.030
C	9.83	0.64	15.33	0.000
A*A	-3.38	0.94	-3.58	0.001
B*B	1.63	0.94	1.72	0.095
C*C	6.04	0.94	6.40	0.000
A*B	-1.75	0.91	-1.93	0.062
A*C	3.83	0.91	4.23	0.000
B*C	-1.17	0.91	-1.29	0.207

S = 3.14, R-sq = 91.66%
R-sq(adj) = 88.87%, R-sq(pred) = 83.26%

จากตารางที่ 2 และ 3 พบว่า การตรวจสอบสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณอนุภาคอิสระของไฮดรอกซิลและปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีค่า R-Square เท่ากับ 91.66% และ 91.67% ตามลำดับ แสดงว่าแบบจำลองที่ใช้ในการทดลองนี้เพียงพอต่อการตีข้อมูลและมีความเหมาะสม สามารถนำไปสร้างสมการทำนายผลได้

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Const	0.4161	0.0238	17.51	0.000
A	0.07	0.02	4.63	0.000
B	-0.06	0.02	-4.28	0.000
C	0.23	0.02	15.47	0.000
A*A	-0.05	0.02	-2.27	0.030
B*B	-0.04	0.02	-1.96	0.059
C*C	0.04	0.02	1.92	0.063
A*B	-0.01	0.02	-0.47	0.645
A*C	0.08	0.02	3.82	0.001
B*C	-0.04	0.02	-1.77	0.086

S = 0.07, R-sq = 91.67%
R-sq(adj) = 88.89%, R-sq(pred) = 85.08%

4.1.3 การสร้างสมการทำนาย

การสร้างสมการทำนาย สามารถสร้างได้โดยการนำค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อตัวแปรตามไปสร้างแบบจำลองสมการถดถอย โดยความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล แสดงดังสมการที่ (2) และความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แสดงดังสมการที่ (3) ซึ่งจะแสดงผลเป็น Uncoded Units

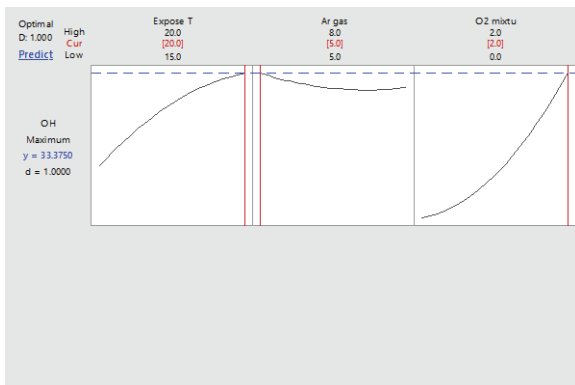
$$\text{OH}^* (\text{ppm}) = -194.00 + 21.98A + 0.53B - 24.03C - 0.540A^2 + 0.72B^2 + 6.04C^2 - 0.47AB + 1.53AC - 0.78BC \quad (2)$$

$$\begin{aligned} E. coli \text{ reduction (Log CFU/ml)} = \\ -3.04 - 0.28A + 0.27B - 0.25C - 0.01A^2 - \\ 0.02B^2 + 0.04C^2 - 0.00AB + 0.03AC - 0.02BC \end{aligned} \quad (3)$$

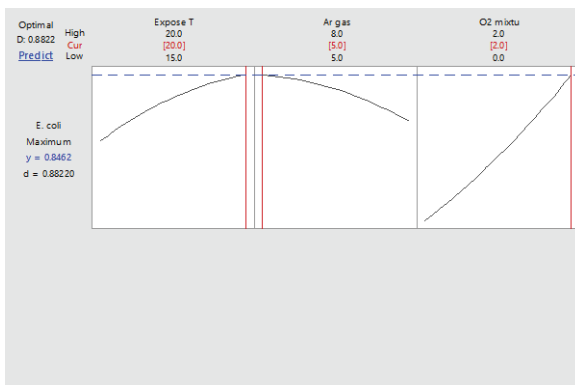
4.2 การหาค่าที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิลและปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยจะกำหนดค่าเป้าหมาย (Goal) เป็นค่าที่สูงที่สุด (Maximum) จากผลการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน ซึ่งจะ

สามารถพยากรณ์เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิลได้ 33.38 ppm และปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ 0.85 Log CFU/ml ดังรูปที่ 10 และ 11



รูปที่ 10 ค่าที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล



รูปที่ 11 ค่าที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

จากการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิลและปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จะเห็นได้ว่าค่าปริมาณที่เหมาะสมที่สุดของตัวแปรตาม มีค่าเท่ากับ ระยะเวลาคิซซาร์จ 20 นาที อัตราการจ่ายก๊าซอาร์กอน 5 ลิตร/นาที และอัตราผสมก๊าซออกซิเจน 2% ของก๊าซอาร์กอน แสดงให้เห็นว่าปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิลจะแปรผันกับปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

4.3 การทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลอง

ในการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลองจะทำซ้ำทั้งหมด 5 ซ้ำ โดยผลการทดลองเพื่อยืนยันผลของปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล และปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แสดงดังตารางที่ 4 จากนั้นจะนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ One-Sample T-test เพื่อทำเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจากการทดลองยืนยันผลกับค่าที่คำนวณได้จากสมการทำนายผล ซึ่งผลการวิเคราะห์ แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการทดลองยืนยันผลของปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิลปริมาณและการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

ลำดับการทดลอง	ผลการทดลอง	
	ปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล (ppm)	ปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> (Log CFU/ml)
1	30 ± 0	0.62 ± 0.14
2	30 ± 0	0.70 ± 0.13
3	30 ± 0	0.81 ± 0.05
4	30 ± 0	0.98 ± 0.15
5	30 ± 0	0.78 ± 0.19

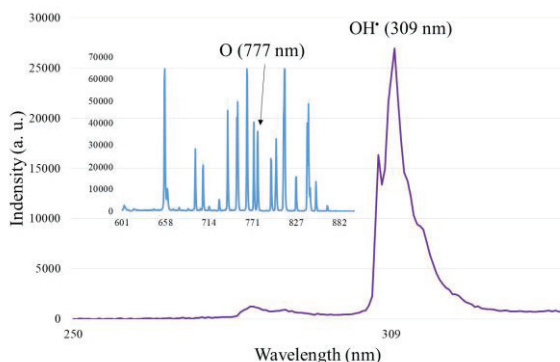
ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจากการทดลองยืนยันผลกับค่าที่คำนวณได้จากสมการทำนายผล

One-Sample T:						
Test of $\mu = 33.42$ vs $\neq 33.42$, Test of $\mu = 0.93$ vs $\neq 0.93$						
Variable	Mean	StD	SE Mean	95% CI	T	P
OH*	30	0.00	0.00	(30.00, 30.00)	*	*
<i>E. coli</i> reduction	0.78	0.14	0.06	(0.61, 0.95)	-1.19	0.299

จากตารางที่ 5 พบว่าที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ ค่า P-value ของปริมาณอนุภาคอิสระไฮดรอกซิล มีค่าเป็น * เนื่องจากค่าที่ได้จากการทดลองเพื่อยืนยันผลไม่มีความแตกต่างกัน จึงทำให้ไม่สามารถประมาณค่า P-value ใดๆก็ตามค่าที่ได้จากการทดลองยืนยันผลมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนายผล จึงสรุปได้ว่า ค่าเฉลี่ยของ

ปริมาณอนุโมลอิสระไฮดรอกซิลจากการทดลองขึ้นขึ้นผลกับค่าที่ได้จากการทำนายผลไม่มีความแตกต่างกัน และค่า P-value ของปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เท่ากับ 0.299 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากการทดลองขึ้นขึ้นผลกับค่าที่ได้จากการทำนายผลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้การศึกษาสมบัติอนุโมลอิสระของไฮดรอกซิลจากเงื่อนไขที่เหมาะสมที่สุด พบว่า ที่ความยาวคลื่นในช่วง 309 นาโนเมตร [6] สามารถตรวจพบความเข้มแสงปริมาณอนุโมลอิสระไฮดรอกซิลเท่ากับ 26,933 Arbitrary unit และที่ความยาวคลื่น 777 นาโนเมตร นอกจากนี้สามารถตรวจพบความเข้มแสงของ atomic oxygen เท่ากับ 36,299 Arbitrary unit แสดงดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 ผลการวัดความเข้มแสงของปริมาณอนุโมลอิสระไฮดรอกซิล

4.4 การทดลองเพื่อยับยั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกชี้หนูด้วยเทคนิคน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

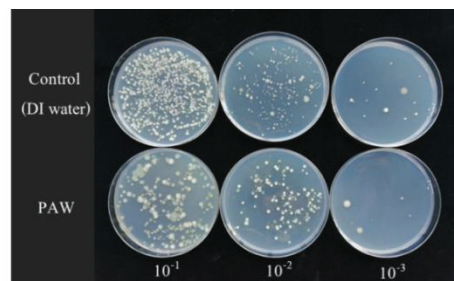
ขั้นตอนนี้จะทำการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนบนผิวของผลพริกชี้หนู โดยจะทำการศึกษาระยะเวลาการแช่ผลพริกจากน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ ในการทดลองจะเลือกค่าจากพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุด คือ ระยะเวลาดิสชาร์จ 20 นาที อัตราการจ่ายก๊าซอาร์กอน 5 ลิตร/นาที และอัตราผสมก๊าซออกซิเจน 2% ของก๊าซอาร์กอน โดยผลการ

ยับยั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกชี้หนู แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการยับยั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกชี้หนู

ระยะเวลา	ปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริก (Log CFU/g)
5	0.69 ± 0.18 (78.23%)
10	0.72 ± 0.08 (80.74%)
15	0.82 ± 0.09 (84.53%)

จากตารางที่ 6 พบว่า ปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริก โดยการเปรียบเทียบจากผลพริกที่แช่ด้วยน้ำพลาสมากับผลพริกที่แช่ด้วยน้ำ DI และคำนวณปริมาณการลดลงจากสมการ Log Reduction = $CFU_{control} / CFU_{PAW}$ โดยปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริก จะมีการลดลงมากขึ้นตามระยะเวลา โดยลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของผลพริก แสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกจากการกระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. สรุปผล

การหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแบบ Pinhole plasma jet โดยประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน พบว่า พารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดต่อตัวแปรตาม คือ การใช้ระยะเวลาดิสชาร์จ 20 นาที อัตราการจ่ายก๊าซอาร์กอน 5 ลิตร/นาที และอัตรา

ผสมก๊าซออกซิเจน 2% ของก๊าซอาร์กอน ซึ่งสามารถทำให้เกิดปริมาณอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ 10-30 ppm และสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ 0.62-0.98 Log CFU/ml หรือประมาณ 70-80%

นอกจากนี้การใช้พารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดของน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาล้างผลพริกชี้หนู ซึ่งเป็นพืชตัวอย่างในการศึกษา ผลการทดลองพบว่า สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดบนผิวของผลพริกชี้หนูได้ 0.69, 0.72 และ 0.82 Log CFU/g ที่ระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ หรือน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกชี้หนูได้ประมาณ 70-80%

6. อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่า พารามิเตอร์ที่เหมาะสมของน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแบบ Pinhole plasma jet นี้ สามารถทำให้เกิดองค์ประกอบของพลาสมา ที่อยู่ในกลุ่มของ reactive oxygen species (ROS) โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่พบว่า อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรง รวมถึงองค์ประกอบอื่น ๆ ที่เกิดจากพลาสมา สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อจุลินทรีย์ [3, 6, 9, 10, 11] มีผลทำให้ผนังเซลล์หรือองค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น DNA ของเชื้อจุลินทรีย์ได้รับความเสียหาย [5] ซึ่งเป็นสาเหตุที่

ทำให้น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

ในงานวิจัยนี้สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเป็นตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาได้ 70-80% และลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลพริกชี้หนูได้ประมาณ 70-80% โดยปัญหาที่พบ น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแบบ Pinhole plasma jet คือ ฟองก๊าซที่เกิดจากพลาสมาที่ไหลไปสัมผัสกับน้ำยังมีขนาดใหญ่ เนื่องจากขนาดของรูท่อควอตซ์มีขนาดใหญ่ และพลาสมาเกิดไม่ต่อเนื่อง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ส่งผลต่อปริมาณความเข้มข้นของอนุมูลอิสระได้

ในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาแหล่งจ่ายไฟอื่น ๆ ที่สามารถปรับค่ากำลังไฟฟ้าได้ หรือประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอื่น ๆ เช่น Micro bubble เข้ามาใช้ทำปฏิกิริยาร่วมกับพลาสมา ซึ่งอาจจะสามารถทำให้เกิดองค์ประกอบต่าง ๆ ของพลาสมาที่ดีขึ้น และสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพได้มากยิ่งขึ้น

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารอ้างอิง

- [1] ปรีชา จึงสมานกุล นวรัตน์ รัตนดิถก ณ ภูเก็ต และ กมลวรรณ กันต์แต่ง. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด. *วารสารสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*, 2553; 52: 30-39.
- [2] เพ็ญแข จิรฉัตร ประเวทย์ ดุ้ยเต็มวงศ์ ชมฉวี ดุ้ยเต็มวงศ์ วรพจน์ สุนทรสุข และ กัญจิรา เกตุแก้ว. การลดเชื้อปนเปื้อนในพริกชี้หนูสดด้วยโอโซนและคลอรีน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45, 30 ม.ค.-2 ก.พ., กรุงเทพมหานคร, 2550; 165-172.
- [3] Xu, Y., Tian, Y., Ma, R., Liu, Q. and Zhang, J. Effect of Plasma Activated Water on the Postharvest Quality of Button Mushrooms, *Agaricus bisporus*. *Food Chemistry*, 2016; 197, 436-444.
- [4] Jiang, B., Zheng, J., Qiu, S., Wu, M., Zhang, Q., Yan, Z. and Xue, Q. Review on Electrical Discharge Plasma Technology for Wastewater Remediation. *Chemical Engineering*, 2014; 236: 348-368.

- [5] Han, L., Patil, S., Boehm, D., Milosavljevic', V., Cullen, P.J. and Bourkea, P. Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Applied and environmental microbiology*, 2016; 82: 450-458.
- [6] Ma, R., Wang, G., Tian, Y., Wang, K., Zhang, J. and Fang, J. Non-Thermal Plasma-Activated Water Inactivation of Food-Borne pathogen on Fresh Produce. *Hazardous Materials*, 2015; 300: 643-651.
- [7] Bermúdez-Aguirre, D., Wemlinger, E., Pedrow, P., Barbosa-Cánovas G., and Garcia-Perez, M. Effect of Atmospheric Pressure Cold Plasma (APCP) on the Inactivation of Escherichia coli in Fresh Produce. *Food Control*, 2013; 34: 149-157.
- [8] สมเกียรติ ตั้งจิตตติเจริญ และ ภูมินทร์ แจ่มเชื้อ (2554). การลดฟองอากาศในกระบวนการผลิตบรรจุภัณฑ์พลาสติก โดยการประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน. *การประชุมวิชาการช่างงานวิศวกรรมอุตสาหกรรม*, หน้า 171-175.
- [9] Muhammad, S.I.K., Lee, E.J. and Kim, Y.J. Roles of Individual Radicals Generated by a Submerged Dielectric Barrier Discharge Plasma Reactor during Escherichia coli O157:H7 Inactivation. *AIP ADVANCES*, 2015; 5: 107111-1 - 107111-9.
- [10] Tian, Y., Ma, R., Zhang, Q., Feng, H., Liang, Y., Zhang, J. and Fang, J. Assessment of The Physicochemical Properties and Biological Effects of Water Activated by Non-Thermal Plasma Above and Beneath the Water Surface. *Plasma Processes and Polymers*. 2015; 12: 439-449.
- [11] Kim, H. S., Lee, D. H., Fridman A. and Cho, Y. I. Residual Effects and Energy Cost of Gliding Arc Discharge Treatment on the Inactivation of Escherichia coli in Water. *Heat and Mass Transfer*. 2014; 77: 1075-1083.