บทที่ 2
สาระสำคัญจากเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2.1 *Salmonella* Species

ประวัติการค้นพบ (Chris B., Alec K. 2002)

เชื้อแบคทีเรีย Genus *Salmonella* ได้ถูกนำเสนอให้เป็นที่รู้จักครั้งแรกในปี 1900 โดย Lignieres ซึ่งการนำเสนอในครั้งนั้น สืบเนื่องมาจากการค้นพบของ นักแบคทีเรียวิทยา ชาว อเมริกัน คือ B.E Salmon และ T.Smith ในปี 1886 โดยทั้งสอง ได้ทำการศึกษาเชื้อ Hog Cholera Bacillus ที่ทำให้เกิด "Swine Plague" เรียกชื่อในขณะนั้นว่า *Bacterium Suipestifer* และ แบคทีเรียชนิดนี้ต่อมาได้ถูกจัดให้เป็น Species หนึ่ง ของ Genus *Salmonella* มีชื่อคือ *S.* Choleraesuis

ในปี 1929 Topley และ Wilson ได้ทำการให้ความหมายของ Genus *Salmonella* ให้เป็นที่เข้าใจตรงกัน โดยให้ความหมาย ของ แบคทีเรียใน Genus นี้ว่า เป็น " แบคทีเรียรูปร่างแท่ง ที่ไม่ทำปฏิกิริยาในการหมัก Lactose แต่ จะสร้างกรดและแก๊ส ในอาหารที่มี Dextrose และ น้ำตาลชนิดอื่น ๆ สามารถหมัก Xylose และ ให้ผล Alkaline reaction ใน litmus milk " และยังให้คำจำกัดความของ Food Poisoning ว่าเป็น " โรคที่มีอาการ Acute Gastroenteritis " ที่เกิดขึ้นแบบเฉียบพลัน หรืออาจเกิดขึ้นได้ในช่วงเวลาของการเกิดโรคซึ่งกล่าวได้ว่าบ่อยครั้งของการเกิดอาการนี้สืบเนื่องมาจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อน เชื้อ *Salmonella* spp. เช่น *Bacterium Enteritidis* และ *Bacterium Aertrycke*".

ในปี 1888 Gaertner สามารถแยกเชื้อ *Bacterium Enteritidis* (ภายหลังได้ตั้งชื่อใหม่ว่า *S. enteritidis*) ได้จากเนื้อวัวที่ชำแหละสดจากโรงชำแหละ และ ได้จากอวัยวะของผู้ป่วยที่เกิดอาการอาหารเป็นพิษ จากการที่รับประทานเนื้อวัวนี้ประมาณ 1.5 lb และเสียชีวิตลงหลังจากเกิดอาการ 36 ชั่วโมง พบมีรายงานจำนวนผู้ป่วยที่เกิดอาการอาหารเป็นพิษครั้งนี้เป็นจำนวน ถึง 58 คน ถือได้ว่าเป็นครั้งแรกในการยืนยันทางห้องปฏิบัติการ เกี่ยวกับการระบาดของ โรค Salmonellosis

ในปี 1900s. ได้มีการระบุคุณลักษณะของเชื้อใน Genus *Salmonella* นี้ อีกหลาย Species เช่น typhosum (ภายหลังชื่อว่า typhi) , paratyphosum A และ B (ภายหลังชื่อว่า paratyphi A และ B) , gallinarum และ typhimurium ซึ่งทำให้มีความเข้าใจกันอย่างแพร่หลายมากขึ้นเกี่ยวกับเชื้อในกลุ่มนี้ซึ่งเป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค ในคนและสัตว์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจุบันนี้ *Salmonella* spp. รู้จักกันดีในด้านที่เป็นเชื้อก่อโรคในอาหารและน้ำที่สำคัญ ซึ่งก่อให้เกิดกลุ่มอาการของโรค เช่น Food Poisoning (Gastroenteritidis), typhoid (enteric fever), paratyphoid, bacteraemia, septicemia และ อาการข้างเคียงที่อาจเกิดตามมา

ในปัจจุบันนี้ ได้มีการจำแนก Serotype ของ *Salmonella* ได้มากกว่า 2400 Serotype และถูกจัดเป็นกลุ่มของเชื้อ ที่จะต้องตระหนักและระมัดระวัง ในอุตสาหกรรมอาหารทั่วไป

Taxonomy (Doyler. *et al*. 2001)

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคเตอริซีอี (Family Enterobacteriaceae) เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ (Facultative anaerobe) ย้อมติดสีกรัม (Gram's stain) เป็นกรัมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรงสั้น ขนาด 0.7-1.5 x 2.0-5.0 μm ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ Peritrichous Flagella แต่มีบาง serovar ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ คือ *Salmonella enterica* serovar Pullorum และ *Salmonella enterica* serovar Gallinarum

Salmonella spp. เป็น Chemoorganotroph ซึ่งสามารถ metabolize สารอาหารได้ทั้งใน Respiratory Pathway และ Fermentation Pathway สามารถเจริญได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส โดยที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้ในช่วงเพาะเชื้อในขั้น Selective enrichment เพราะที่อุณหภูมินี้ เชื้อจะเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ดีกว่า

สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. สามารถ ใช้น้ำตาล D-glucose และ คาร์โบไฮเดรต ตัวอื่นได้ กรด และ แก๊ส สามารถใช้ Citrate เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมักจะสร้าง Hydrogen sulfide มักเกิดปฏิกิริยา Decarboxylate กับ lysine และ Ornithine แต่ไม่ Hydrolyse Urea

ในการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp. จะสร้าง กรด และ แก๊ส จาก Glucose ใน Triple Sugar Ion agar (TSI) แต่จะไม่ใช้ Lactose และ Sucrose ทั้งใน TSI และในอาหารชนิดอื่น ๆ เช่น Brillient Green , Xylose Lysine deoxycholate และ Hektoen enteric agars

สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp. แสดงดังตารางที่ 2.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp.

Test	ผลทางชีวเคมี
TSI acid from glucose	+
TSI gas from glucose *	+
TSI acid from lactose	-
TSI acid from sucrose	-
TSI Hydrogen sulfide produce	+
Catalase	+
Oxidase	-
Urea hydrolysis	-
Lysine decarboxylation	+
Ornithine decarboxylase	+
Production of indole	-
Citrate utilized as sole carbon source *	+
MR	+
VP	-
Motility	+
G+C (mole%of DNA)	50-53

* ยกเว้นใน *S.* Typhi ที่จะให้ผลเป็นลบ

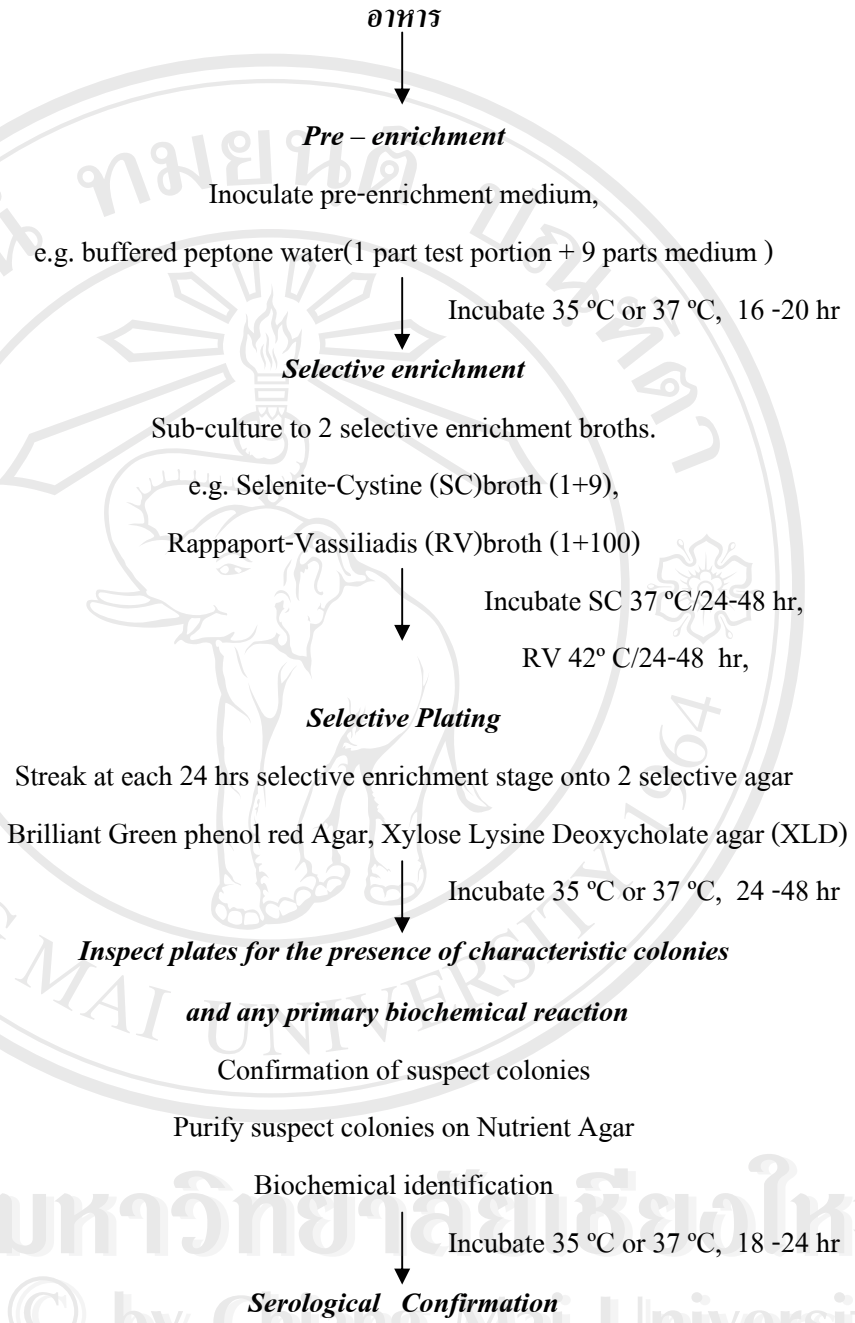
ที่มา: สุมณฑา และคณะ, 2546 และ Chris B., Alec K. 2002

การแยกเชื้อ และตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella* spp. ในอาหารทั่วไปประกอบด้วย 2 กระบวนการคือ

1. วิธีการที่ใช้โดยทั่วไป (Conventional method)
2. วิธีการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว (Rapid method)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ใน Conventional method ประกอบด้วยขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella* spp. (ISO 6579,2002(E))ใน

ขั้นตอนการทำ ***Pre –enrichment*** จะเป็นการช่วยให้เชื้อที่อ่อนแอเนื่อง จากกระบวนกาผลิต เช่น ความร้อน ความเย็น หรือจากสภาวะอื่น ๆ สามารถปรับสภาพให้อยู่ในสภาวะที่สมบูรณ์ โดยการนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในขั้นตอนของการเลี้ยงเชื้อใน ***Selective enrichment*** จะสามารถทำให้ เชื้อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นและในขณะเดียวกัน ก็จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรัมบวก และ กรัมลบ ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคไม่ให้สามารถสามารถเจริญขึ้นได้

ในขั้นตอนของ ***Selective Plating*** ซึ่งเป็นขั้นตอนของการคัดเลือกเชื้อที่ต้องการ เชื้ออื่น ๆ ที่ไม่ต้องการคัดเลือกอาจไม่ตาย แต่จะไม่สามารถเจริญได้ในอาหารชนิดนี้ ตามกฎหมายแล้วการเลือกใช้ Enrichment media และ Selective media จะกำหนดให้ใช้อย่างน้อย 2 ชนิด เพราะในการทดสอบ เชื้อ Salmonella ในแต่ละ Species จะมีสภาวะการเจริญที่แตกต่างกัน อาจเจริญได้ดีในอาหารชนิดใดชนิดหนึ่ง การที่กำหนดเช่นนี้ เพื่อป้องกันข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้ในการทดลอง (Chris B, Alec K. 2002)

การเลี้ยงเชื้อ ใน Selective Media 2 ชนิด

- XLD Agar (Xylose Lysine Deoxycholate agar)(Merck. E, 1982)

การย่อยสลาย ไซโลส (Xylose) แลคโทส (Lactose) และ ซูโครส(Sucrose) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรด ซึ่งจะทำให้ phenol red เปลี่ยนสีไปเป็นสีเหลือง การสร้าง Hydrogen Sulfide ของเชื้อจะสามารถตรวจวัดได้ โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Thiosulfate และ Iron(III) Salt ซึ่งจะได้ตะกอนของ Black Iron Sulfide ในโคโลนีของเชื้อ

แบคทีเรียที่สามารถเกิดปฏิกิริยา ในการย่อยสลาย ไลซีน (Lysine) ให้ได้เป็นคาดาเวอรีน (Cadaverine) จะตรวจพบว่าขอบของโคโลนีจะมีสีม่วงล้อมรอบ โดยจะขึ้นอยู่กับการเพิ่มของ pH ในอาหารด้วย

- BPLS Agar (Brilliant-green, Phenol-Red, Lactose ,Sucrose Agar)(เรณู, 2542)

อาหารเลี้ยงเชื้อ BPLS Agar ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. การเติม Brilliant green เข้มข้นสูง จะช่วยชะงักการเจริญของเชื้ออื่น ๆ *Salmonella* spp. ไม่สามารถหมักแลคโตสและซูโครสได้ ดังนั้นการมีน้ำตาลซูโครสอยู่ในอาหารจะช่วยวินิจฉัยเชื้อที่หมักซูโครสได้ รวมทั้งพวกที่ใช้น้ำตาลแลคโตสได้อย่างช้า ๆ หรือพวกที่หมักแลคโตสไม่ได้เลย แต่เป็นพวกที่ใช้น้ำตาลซูโครสได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบทางชีวเคมี (Biochem test)

เมื่อผ่านขั้นตอนของการเลี้ยงเชื้อ ใน Selective media แล้ว จึงทำการเลือกโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะของ *Salmonella* spp. มาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยการทดสอบ ที่ประกอบด้วย

- TSI (Triple Sugar Iron)(เรณู, 2543)

ในอาหารชนิดนี้มีส่วนประกอบสำหรับจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ในแฟมิลี เอ็นเตอโรแบคทีเรียเซียอี (Family Enterobacteriaceae) เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้ (Ferment) น้ำตาลแลคโตส (Lactose) ซูโครส (Sucrose) และ เด็กโตรส (Dextrose) นอกจากนี้ยังสร้าง ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ได้ด้วย

อาหารนี้ทำหน้าที่ทุกอย่างได้เช่นเดียวกับอาหารกลิคเกลอไอรอนเอการ์ (Kligler iron agar) แต่เนื่องจากใน TSI agar มีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนประกอบด้วย ส่วนอาหาร Kligler iron agar จะไม่มีน้ำตาลนี้ ดังนั้นปฏิกิริยาของแบคทีเรียพวกโปรทีอัส และ พาราโคโลแบคตรัม (Paracolobactrum) บางชนิด ในอาหาร TSI agar จึงแตกต่างไปจาก *Salmonella* เพราะแบคทีเรียพวก โปรทีอัส และ พาราโคโลแบคตรัม สามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นกรดได้อย่างรวดเร็ว ส่วน *Salmonella* ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ ส่วนน้ำตาลแลคโตสนั้น แบคทีเรียพวก โปรทีอัส และ พาราโคโลแบคตรัม ใช้ได้อย่างช้ามากหรือบางชนิดก็ไม่สามารถใช้แลคโตสได้เลยซึ่งจะเหมือน *Salmonella* และ *Shigella* ควรทดสอบปฏิกิริยาของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร TSI agar ควบคู่ไปกับอาหารยูเรียบรอท (Urea broth หรือ Urea agar) เพราะแบคทีเรียพวก โปรทีอัสสามารถใช้ยูเรียได้ ส่วนพวก *Salmonella* ไม่สามารถใช้ยูเรียได้ เหตุนี้จึงสามารถจำแนกจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการใช้ซูโครส ของแบคทีเรียพวก โปรทีอัส และซิโตรแบคเตอร์(Citrobacter)จะกลบหรือปิดบังปฏิกิริยา ซึ่งเกิดจากการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ของแบคทีเรียที่สามารถใช้ซูโครสได้ ในกรณีนี้อาหาร TSI agar จึงไม่เหมาะที่จะใช้กับแบคทีเรียเหล่านี้ จะใช้อาหาร Kligler iron agar ในการทดสอบแทน

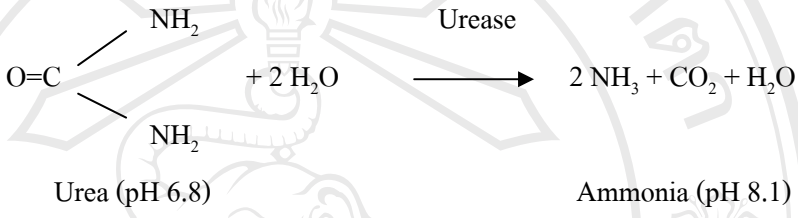
อาหาร TSI agar เป็นอาหารที่ใช้สำหรับวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียพวก *Salmonella* และ *Shigella* ในขั้นคาดคะเน (Presumtive identification) โดยถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* หรือ *Shigella* จากจานอาหารคัดเลือก (Selective plating media) เช่น Salmonella Shigella Agar , Bitmuth Sulphite Agar, Brilliant green Agar , MacConkey Agar หรือ Deoxycholate Citrate Agar ผลจากปฏิกิริยาของ TSI agar นี้เป็นการวินิจฉัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แบคทีเรีย *Salmonella* และ *Shigella* แบบคาดคะเนเท่านั้น ควรจะทดสอบขั้นแน่นอนต่อไปด้วยวิธี Serology

- Urea Agar (ดวงพร, 2537)

เป็นการทดสอบการสร้าง Enzyme Urease โดยอาศัยปฏิกริยาไฮโดรไลส์ ดังสมการ



แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ ยูเรียเอส (Urease)ได้ จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนีย (Ammonia) ซึ่งจะมีผลให้ pH ของอาหารเป็นด่าง ทำให้ ดัชนีชี้วัด (Indicator) ที่นิยมใช้คือ Phenol red เปลี่ยนสีจากเหลือง เป็นสีบานเย็น

ในกรณีของ *Salmonella* spp. จะไม่สามารถสร้าง Enzyme Urease จึงทำให้สีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลงซึ่งยังคงเป็นสีเหลืองดังเดิม

- MIL (Indole Motile Lysine)(เรณู, 2543)

อาหารทดสอบชนิดนี้ใช้ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อได้ 3 ประการ คือ

1. ทดสอบความสามารถในการสร้าง Indole

การทดสอบนี้ จะทดสอบการเกิด indole จากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ Tryptophanase การทดสอบการเกิด indole ทำได้โดยการหยด Kovac's reagent ลงในอาหาร หากพบว่ามีชั้นสีชมพู อยู่ด้านบนอาหาร แสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่หากอาหารไม่เปลี่ยนสีจะให้ผลเป็น ลบ *Salmonella* spp. จะให้ผลการทดสอบ indole เป็นลบ

2. การทดสอบ การเคลื่อนที่ของเชื้อ (Motile)

Salmonella spp. สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ Petrichous flagella จึงทำให้ผลการทดสอบการเคลื่อนที่เป็น บวก จะพบแนวการเคลื่อนที่ ของเชื้อกระจายนอกแนวรอยแทงของเชื้อเป็นรอยขุ่น และเกิด Cloudy ทั่วหลอด แต่หากกรณีที่เชื้อเกิดแนวขุ่นเฉพาะบริเวณรอยแทง แต่ไม่เกิด Cloudy จะอ่านผลเป็น ลบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบการเกิด Decarboxylase ของ Lysine

แบคทีเรียจะทำให้เกิด Decarboxylation ของกรดอะมิโน โดย Enzyme Decarboxylase จะย่อยสลายกรดอะมิโน ได้ เอมีน และ CO_2 ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วยวิธีการดูการเปลี่ยนแปลง pH โดยมี Indicator เช่น Bromthymol blue หรือ Cresol red เป็นตัวชี้วัด

Salmonella spp.ให้ผล Lysine เป็น บวก แสดงว่าเชื้อสามารถสร้าง enzyme lysine decarboxylase เกิดการย่อย lysine ได้เป็น cadaverine และ CO_2 อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง pH เป็นด่าง Indicator เปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็น สีม่วง (ดวงพร, 2537)

- MR-VP (Methyl Red-Voges Proskaer) (เรณู, 2543)

1. การทดสอบ MR

เป็นการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดปริมาณมาก ๆ จากน้ำตาลกลูโคส ให้ผลผลิตเป็น กรด โดยมี Methyl Red เป็น ตัวชี้วัด โดยจะให้สีเหลืองเมื่ออาหารมี pH 6.0 และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อ pH ลดลงเท่ากับ 4.4

วิธีการทดสอบนี้ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้หลายชนิด (กรดแลคติก อะซิติก ฟอร์มิค และ ซัคซินิค เช่น *Escherichia coli*) และกลุ่มที่สองคือผลิตกรดได้บ้าง แต่ผลิตผลหลักคือ 2,3 butanediol เช่น *Klebsiella spp*. และ *Enterobacter spp*.

โดยจะอ่านผลการทดสอบได้ดังนี้คือ ผลเป็นบวกเมื่ออาหารเปลี่ยนสีเป็นแดง และผลเป็นลบ เมื่ออาหารเป็นสีเหลือง

2. การทดสอบ VP

เป็นการทดสอบการมีสารอะเซโตอิน หรือ acetylmethyl carbinol ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิต butylenes glycol การทดสอบคือใส่ รีเอเจนท์ 2 ชนิดคือ α-naphthol และ KOH ถ้ามีอะซีโตนอิน อะซีโตนอินจะถูกออกซิไดส์ในสภาพที่มีออกซิเจน และ KOH ได้ผลผลิตออกมาเป็น diacetyl และ diacetyl นี้ จะทำปฏิกิริยากับกลุ่ม guanidine ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเปบโตนในสภาพด่างโดยมี α-naphthol เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และให้ผลเป็นสารประกอบสีแดง โดยจะอ่านผลการทดสอบได้ดังนี้คือ ผลเป็นบวกเมื่ออาหารเปลี่ยนสีเป็นแดง และผลเป็นลบ เมื่ออาหารเป็นสีเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนใน Rapid method เป็นวิธีการทดสอบที่สามารถให้ผลได้อย่างรวดเร็ว ใช้เวลาและขั้นตอนในการทดสอบ น้อย กว่า Conventional method ประกอบด้วยชุดการทดสอบสำเร็จรูปหลาย ๆ แบบ ยกตัวอย่างเช่น

- Biochemical identification kit
- Enzyme – linked immuno-sorbent assay (ELISA)
- Polymerase Chain Reaction (PCR)
- Finger print method

Rapid method ให้ประโยชน์ต่อการทดลองโดยมีข้อดีคือ ง่าย และ ประหยัดเวลา แต่ก่อนที่จะเลือกใช้วิธีการทดสอบเหล่านี้ ผู้ทำการทดสอบต้องมีความเข้าใจในวิธีการและวิธีการแปลผลอย่างถูกต้อง เพื่อให้การทดสอบได้ผลที่ถูกต้องมากที่สุด (Baylis.C.L., MacPhee.S., Betts. R.P, 2000)

การจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. โดยอาศัยอาศัยเทคนิคทางซีโรวิทยา (สุมณฑาและคณะ, 2546)

นอกจากสมบัติทางชีวเคมีแล้ว ในการจำแนก Species ของ *Salmonella* spp. ยังอาศัยลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่ปรากฏบนผิวเซลล์ และ แซ่ (Flagella) ที่แบคทีเรียใช้เคลื่อนที่ตามแบบแผนที่เรียกว่า Kauffmann-White Scheme ทำให้การจำแนก Species ของเชื้อมีความแม่นยำมากขึ้น ทั้งนี้ลักษณะบนผิวเซลล์ (O-antigen) ได้ถูกจำแนกออกเป็น 64 groups โดยอาศัย Somatic antibodies ที่เตรียมขึ้นมา สำหรับลักษณะทางพันธุกรรมบน Flagella ใช้ H-antibodies จำแนกออกเป็น 2 Phase คือ Phase-1 (หรือ phase ที่จำเพาะ) ประกอบด้วยเชื้อ *Salmonella* spp. เพียงไม่กี่ species และ phase-2 (หรือ group phase) ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นส่วนใหญ่ เชื้อ *Salmonella* spp. อาจมี H-antigen ที่ทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับ Antibodies ของPhase-1 หรือ Phase-2 หรือทั้งสอง Phase ก็ได้ สำหรับ H-antigen Phase-1 ใช้ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กเป็นสัญลักษณ์ ส่วน H-antigen Phase-2 ใช้ตัวเลขอะราบิคเป็นสัญลักษณ์ ตัวอย่างเช่น *S.* Choleraesuis (6,7:c:1,5) หมายความว่าเชื้อนี้มี O-antigen group 6 และ 7 มี H-antigen Phase-1 คือ c และ H-antigen Phase-2 คือ 1 และ 5 เป็นต้น

วิวัฒนาการทางการศึกษาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุลได้เปลี่ยนรูปโฉมการจัดจำแนก Species ของเชื้อ *Salmonella* spp. (Salmonellae's Taxonomy Scheme) ที่อาศัยเทคนิคทาง ซีโรวิทยามาเป็นเทคนิคทาง การใช้ Gene เป็นตัวทดสอบที่เรียกว่า DNA-DNA hybridization และ Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) typing ทำให้เชื้อ *Salmonella* spp.ทั้งหมดถูกนำมาจัดใหม่เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2 Species คือ *Salmonella enterica* และ *Salmonella bongori* โดยใน *Salmonella enterica* ยังถูกจำแนกออกเป็นอีกหลาย Species ย่อย (Subspecies) และเชื้อ *Salmonella* spp. กว่า 2000 Serovars ถูกนำมาจัดอยู่ใน Species *Salmonella enterica* ซึ่งจำแนกย่อยออกเป็น 5 กลุ่มหรือ Subspecies ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การจำแนก Species ใน Genus *Salmonella*

Salmonella species and subspecies	No.of serovars
S.*enterica* subsp.*enterica* (I)	1454
S.*enterica* subsp.*salamae* (II)	489
S.*enterica* subsp.*arizonae* (IIIa)	94
S.*enterica* subsp.*diarizonae* (IIIb)	324
S.*enterica* subsp.*houtenae* (IV)	70
S.*enterica* subsp.*indica* (VI)	12
S.*bongori*(V)	20
Total	2463

ที่มา: (Doyler., *et al*. 2001)

แบคทีเรียกลุ่ม V เดิม ถูกยกฐานะขึ้นเป็น Species คือ *Salmonella bongori* การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนำไปสู่พัฒนาการของวิธีการเขียนชื่อแบคทีเรียใหม่ กล่าวคือ เดิมเคยเขียนว่า *Salmonella typhimurium* ต่อไปนี้จะต้องเขียนว่า *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (หรือเขียนย่อว่า *Salmonella* Typhimurium) โดยชื่อ Genus ใช้ตัวเอน ส่วนชื่อ Species ย่อยให้ใช้ตัวธรรมดา และตัวอักษรแรกให้เป็นตัวพิมพ์ใหญ่ หรือเขียนย่อว่า *S.* Typhimurium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การจำแนกเชื้อในทางระบาดวิทยา ได้มีการจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (สุมณฑาและคณะ , 2546)

1. เชื้อที่อาศัยคนเป็นโฮสต์เพียงอย่างเดียว

ประกอบด้วย *S.* Typhi, *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi C, เป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ และไข้รากสาดน้อย จัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงมากที่สุด และมีอัตราการตายสูงสุดในบรรดาเชื้อ *Salmonella* spp.ทั้งหมด เชื้อไข้ไทฟอยด์ใช้ระยะเวลาฟักตัวนานที่สุด ผู้ป่วยมักมีไข้ขึ้นสูงมาก อาจแยก *S.* Typhi ได้จากเลือด อุจจาระ และ/หรือปัสสาวะของผู้ป่วยได้ก่อนและหลังอาการไข้ขึ้นสูง ส่วนไข้รากสาดน้อยมีอาการรุนแรงน้อยกว่าไข้ไทฟอยด์

2. เชื้อที่ปรับตัวตามโฮสต์: (สามารถทำให้เกิดโรคกับคนโดยผ่านทางอาหาร)

ประกอบด้วย *S.* Enteritidis สายพันธ์ PT4, *S.* Pullorum และ *S.* Gallinarum อาศัยเป็ด และไก่ เป็นโฮสต์ประจำ, *S.* Dublin อาศัยวัวเป็นโอสต์ประจำ *S.* Abortus-equi อาศัยม้าเป็นโฮสต์ประจำ *S.* Abortus-ovis อาศัยแกะเป็นโฮสต์ประจำ และ *S.* choleraesuis อาศัยห่านเป็นโฮสต์ประจำ

3. เชื้อที่ไม่จำกัดโฮสต์

ได้แก่ เชื้อ *Salmonella* spp. นอกเหนือจาก 2 กลุ่มที่กล่าวมาแล้ว สามารถแพร่จาก คน สัตว์เป็นโรค รวมทั้งอาหาร น้ำ ดินและ สิ่งแวดล้อม และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Salmonellosis) นับเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญ และจะต้องควบคุมผ่านกิจกรรมการจัดการสุขาภิบาลอาหารที่ดี เพื่อตัดวงจรการแพร่กระจายของโรค

การเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. (สุมณฑาและคณะ, 2546)

1. อุณหภูมิ

เชื้อ *Salmonella* spp. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง แม้ว่าจะมีรายงานว่า เชื้อนี้ในบางกรณีสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส (D'Aoust, 1991)ก็ตาม สำหรับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนี้เจริญได้คือ 49.5 องศาเซลเซียส (ICMSF, 1996) ด้วยเหตุนี้ การปฏิบัติอย่างถูกต้องเพื่อเก็บรักษาอาหารร้อนหรืออุ่นอาหารเพื่อให้ปลอดภัยจากเชื้อตามที่ USDA/FSIS แนะนำจึงใช้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเกณฑ์ (แม้ว่าในทฤษฎีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะสามารถทำลายเชื้อได้แล้วก็ตาม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. pH

ค่า pH ต่ำที่สุดที่เชื้อ *Salmonella* spp. ชนิดที่ทนกรดมากที่สุดจะเจริญได้อยู่ที่ pH 3.8 และสูงสุดอยู่ที่ 9.5 ช่วง pH ที่เชื้อส่วนมากเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 7-7.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เชื้อเจริญเติบโตและชนิดของเชื้อแต่ละ Species ด้วย จากการทดลอง ของ Chung and Goepfert ในปี 1970 พบว่ากรดที่ใช้ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมีผลต่อการปรับตัวของเชื้อ กล่าวคือ ในกรณีที่ใช้กรดเกลือและกรดซิตริกปรับ pH เชื้อ *Salmonella* spp ปรับตัวกับการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าการใช้กรดน้ำส้ม หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าเชื้อ *Salmonella* spp. จะไวต่อกรดน้ำส้มมากกว่ากรดเกลือและกรดซิตริก

3. ค่า Water Activity (a_w)

Water Activity หรือกิจกรรมของน้ำอิสระ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. กล่าวคือเชื้อ *Salmonella* spp. จะเจริญได้ดีในช่วงที่มี Water Activity แคบมาก คือต่ำสุดที่ 0.94 ส่วนสูงสุดอยู่ที่ 0.99-1.00

ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น มีอาหารเหมาะสมมี Water Activity เหมาะสม มีอุณหภูมิเหมาะสม เชื้อ *Salmonella* spp.สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าปกติ ฉะนั้น ปัจจัยร่วม (Combined effect) จึงมีความสำคัญในด้านของการประยุกต์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อ *Salmonella* spp. มากกว่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงปัจจัยเดียว

ตารางที่ 2.3 ปัจจัยด้านอุณหภูมิ pH และ a_w ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp.

สภาวะ	ค่าต่ำสุด	ค่าเหมาะสม	ค่าสูงสุด
อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	5.2 *	35-43	49.5
pH	3.8**	7-7.5	9.5
a_w	0.94	0.99	>0.99

* เชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนมากไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส

** เชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนมากไม่เจริญที่ที่ pH ต่ำกว่า 4.5

ที่มา : สุมณฑาและคณะ, 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. แพร่กระจายในอาหารหลายชนิด โดยอาหารที่มักพบการปนเปื้อนของเชื้อซึ่งก่อให้เกิดโรค Salmonellosis ในคนคือ ไข่ สัตว์ปีก นม และ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อ โดยทั่วไปการเกิดโรคนี้ จะเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อในจำนวนที่มากพอสมควร ซึ่งปริมาณที่ทำให้เกิดโรค อยู่ในช่วง $10^7 - 10^8$ cell/g แต่จากรายงานการพบการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร พบว่า *S.* Typhimurium ที่ปนเปื้อนใน Cheddar cheese และ Chocolate เพียง 1 -100 เซลล์ สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ (Jean *et al.,* 2001) โดยอาการอาหารเป็นพิษจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนแล้วประมาณ 6-48 ชั่วโมง และจะมีอาการอยู่ระหว่าง1-5 วัน

สำหรับอาการของโรค Salmonellosis ที่พบได้ทั่วไปคือ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน ปวดศรีษะ ปวดท้อง มีไข้ หนาวสั่น และอ่อนเพลีย ความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นนั้น จะแตกต่างไปตามปริมาณเชื้อที่บริโภค ชนิดของเชื้อที่บริโภค และความต้านทานของผู้บริโภค ถ้าหากเป็นผู้สูงอายุ หรือเด็กทารก จะพบว่าอาการจะหนักกว่าคนในวัยอื่นที่บริโภคเชื้อชนิดเดียวกันเข้าไปในปริมาณที่เท่ากัน และยังพบอีกว่าผู้ป่วยโรคภูมิต้านทานบกพร่อง (AIDS) มีโอกาสเกิดโรคแทรกซ้อนจากเชื้อ *Salmonella* spp. ได้มากกว่าคนธรรมดาถึง 20 เท่า (USFDA, 1992)

เมื่อร่างกายเราได้รับเชื้อ *Salmonella* spp. เข้าสู่ร่างกายแล้วเชื้อโรคจะมุ่งเข้าสู่เซลล์น้ำเหลืองของลำไส้เล็กและจะเจริญแบ่งตัวที่นั่น ในระยะนี้จะยังไม่มีอาการอะไร เป็นระยะฟักตัว ต่อมาเชื้อจะแพร่เข้าสู่กระแสเลือดและกระจายสู่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกายผู้ป่วยจะเริ่มแสดงอาการต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ในรายที่ไม่มีโรคอื่นแทรกซ้อนจะมีชีพจรเต้นช้ากว่าปกติ ผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้มักจะเสียชีวิตเนื่องจากเลือดออกในลำไส้เล็ก และลำไส้ทะลุ ซึ่งอันตรายที่มักเกิดกับผู้ป่วยที่รู้เท่าไม่ถึงการณ์ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีอาการท้องผูกคือ ผู้ป่วยจะซื้อยาถ่ายอย่างแรงมารับประทาน โดยหวังจะถ่ายท้องให้สบาย แต่ยาถ่ายกลับจะเร่งให้เลือดออก และลำไส้ทะลุเร็วขึ้น ส่วนในรายที่ไม่มีโรคแทรกซ้อน ไข้จะค่อย ๆ ลดลงจนหายเป็นปกติได้ ผู้ป่วยที่หายเองร่างกายจะผอม และทรุดโทรมมากต้องใช้เวลานานในการรักษา ซึ่งอันตรายที่สำคัญที่สุดสำหรับผู้ป่วยที่หายเอง หรือผู้ป่วยที่รักษาไม่ถูกต้อง คือผู้ป่วยนั้นอาจกลายเป็นคนนำเชื้อ และจะเป็นพาหะในการแพร่เชื้อต่อไป (Division of Bacteria and Mycotic diseases.2004)

มีรายงานการเกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก *Salmonella* spp. ที่แสดงให้เห็นความรุนแรงของเชื้ออยู่หลายรายงาน ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ามีความรุนแรงของโรคมากกว่าการเกิดอาหารเป็นพิษจากเชื้อปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ ยกตัวอย่าง เช่น เหตุการณ์รุนแรงที่เกิดในปี 1976 มีการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ ด้วย *Salmonella* spp. ใน ประเทศสเปน พบว่าเกิดจากการปนเปื้อนในสลัดไข่ ทำให้มีผู้ป่วยถึง 702 ราย และเสียชีวิต จำนวน 7 ราย (Jean *et al.,* 2001)

ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบมีการระบาดของเชื้อครั้งใหญ่เกิดขึ้น 2 ครั้ง ในปี 1985 มีผู้ป่วย 200,000 ราย จากการบริโภคนมที่มีไขมัน 2 % ซึ่งผลิตจากโรงงานแห่งเดียวกัน ในมลรัฐอิลลินอยด์ที่ตรวจพบการปนเปื้อน *S.* Typhimurium และอีกครั้งจาก *S.* Enteritidis เป็นผลให้มีผู้ป่วยถึง 224,000 ราย เนื่องมาจากการรับประทานไอศกรีมที่ผลิตจากนม ซึ่งได้รับการขนส่งมาในถังบรรทุกที่ใช้ขนส่งไข่เหลวมาก่อน

ในปี 1975-1987 มีการเกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในสถานพักฟื้น 26 มลรัฐ ของสหรัฐ ฯ มีผู้ป่วยจำนวน 4,944 ราย เสียชีวิต 51 ราย (Tauxe, 1991)

นอกจากเหตุการณ์การระบาดของโรคที่รุนแรงดังยกตัวอย่างเหล่านี้แล้ว ยังคงพบว่ามีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในอาหาร และก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษอยู่เป็นประจำในหลายประเทศทั่วโลก และพบว่ามีการตรวจพบการปนเปื้อนในอาหารหลากหลายชนิดมากขึ้น เช่น ในปี 2000 ในสหรัฐอเมริกา พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารกลุ่มอื่นที่ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ โดยพบว่ามีการปนเปื้อนในอาหารจำพวก น้ำส้ม, แคนตาลูป และถั่วงอก (Jean *et al.,* 2001)

สถานการณ์การแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* spp. ในประเทศไทย

พบการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *Salmonella* spp. อยู่เป็นประจำ จากรายงานของกองระบาดวิทยาในช่วงปี 2542-2544 กล่าวว่า *Salmonella* spp. เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษที่มีสถิติสูงเป็นอันดับสองรองจาก *Vibrio parahaemolyticus*

และจากรายงานการวิจัยของ Aroon และคณะในปี 2004 กล่าวว่าในประเทศไทยมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella enterica* Weltevreden ซึ่งก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษเป็นอันดับหนึ่งสามารถแยกเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจที่มาจากผู้ป่วย ได้มากถึง 5,491 ตัวอย่าง รองลงไปคือ *Salmonella enterica* Enteritidis ที่สามารถแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยได้ 5,010 ตัวอย่าง และยังพบการปนเปื้อนของเชื้อเหล่านี้ได้มากใน อาหารจำพวก อาหารทะเล น้ำ และ เนื้อเป็ด ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า แหล่งน้ำ เป็นแหล่งสำคัญในการก่อให้เกิดการ ปนเปื้อนในอาหารเหล่านี้ (ดังแสดงในตารางที่ 2.4)

นอกจากนี้ยังพบมีรายงานสถานการณ์การเกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Salmonella* spp. จากจังหวัดต่าง ๆ ทั่วประเทศ โดยมีการเฝ้าระวังจากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค และมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

รายงานการเกิดอาการอาหารเป็นพิษจาก *Salmonella* spp. อยู่เป็นระยะ เช่น จากรายงานในจังหวัดน่าน เมื่อวันที่ 27 มีนาคม 2547 พบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษจำนวน 14 รายที่เกิดเนื่องมาจากการรับประทานลาบหมูป่าดิบ และแกงหมูป่า ที่ชาวบ้านล่าได้จากป่า และมีการจัดแบ่งกันรับประทาน ใน 3 หมู่บ้าน (สุทธนันท์ สุทธชนะ และ นัฐพล แย้มพิกุลสกุล, 2547)

รายงานจากสำนักระบาดวิทยา ในปี 2548 พบว่า ในระหว่าง วันที่ 14-17 มกราคม 2548 ที่จังหวัดเลย พบมีผู้ป่วยด้วยอาการอุจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ และแน่นหน้าอก บางรายมีอาการหนาวสั่น อ่อนเพลีย วิงเวียนศรีษะ และช๊อคร่วมด้วย รวมทั้งสิ้น 128 ราย โดยมีอาการหลังรับประทานอาหารที่ปรุงจากเนื้อวัว ซึ่งเป็นวัวที่มีอาการป่วย และถูกชำแหละ ก่อนนำเร่ขายตามหมู่บ้าน ซึ่งชาวบ้านต่างซื้อมาปรุงอาหาร ทั้งแบบสุก ๆ ดิบ ๆ และ แบบดิบ จากการส่งตัวอย่างตรวจทางห้องปฏิบัติการพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ใน Rectal Swab และ พบ *Salmonella* group C และ *Clostridium perfringen* จากซากวัว (สุชาดา จันทสิริยากร และ คำนวณ อึ้งชูศักดิ์ , 2548)

ในวันที่ 26 มีนาคม 2548 พบผู้ป่วยจำนวน 32 ราย เข้ารับการรักษาที่ โรงพยาบาล สองแคว จังหวัดน่าน ด้วยอาการอาหารเป็นพิษ พบว่าเกิดจากการรับประทาน ลาบกวางดิบ และการนำเลือดกวางไปผสมกับน้ำพริก ผลจากการส่งตัวอย่างตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* group C ทั้งจาก เนื้อกวาง และ จากอุจจาระของผู้ป่วย (สุทธนันท์ สุทธชนะ และ นัฐพล แย้มพิกุลสกุล, 2547)

วันที่ 5 เมษายน 2548 พบว่ามี ภิกษุ และสามเณร จากวัดแห่งหนึ่งในเขตสาธร กรุงเทพมหานคร ซึ่งอยู่ในช่วงการจัดกิจกรรมบรรพชาสามเณรภาคฤดูร้อน จำนวน 106 ราย ป่วยด้วยอาการอาหารเป็นพิษ หลังจากที่ ฉันก๋วยจั๊บเป็นอาหารเช้า ประมาณ 4-13 ชั่วโมง ตรวจพบ *Salmonella* group C จากอุจจาระของผู้ป่วย คาดว่าน่าจะมาจาก การที่โรงครัวไม่ถูกสุขลักษณะ โดยมีสภาพเป็นโรงครัวชั่วคราว ประกอบกับผู้ประกอบอาหาร ไม่มีความรู้ความเข้าใจในเรื่องของการสุขาภิบาลดีพอ (สุชาดา จันทสิริยากร และ นัฐพล แย้มพิกุลสกุล, 2548)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.4 การกระจายของเชื้อที่พบได้บ่อย 10 ซีโรวาร์ จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย

Serovar	Reservoir and No. of isolation (%) *					
	Humans	Frozen chicken	Frozen seafood	Frozen duck	Other food products	Water
Weltevreden	5,491 (12.5)	-	265(26.3)	320(12.0)	457(6.6)	143(14.5)
Enteritidis	5,010(11.4)	2,901(19.9)	14(1.4)	-	309(4.5)	22(2.2)
Anatum	3,263(7.4)	423(2.9)	20(2.0)	-	1,177(17.0)	113(11.5)
Derby	2,889(6.6)	-	20(2.0)	-	370(5.3)	71(7.2)
1.4.5,12:i:-ssp,1	2,804(6.4)	-	-	-	-	-
Typhimurium	2,322(5.3)	-	12(1.2)	-	198(2.9)	-
Rissen	2,319(5.3)	-	21(2.1)	-	712(10.3)	93(9.5)
Stanley	1,688(3.8)	-	20(2.0)	279(10.4)	-	-
Panama	1,474(3.3)	-	-	41(1.5)	254(3.7)	47(4.8)
Agona	1,096(2.7)	452(3.1)	-	80(3.0)	273(3.9)	39(4.0)
Paratyphi B var Java	-	1,037(7.1)	-	-	-	-
Hadar	-	1,357(9.3)	21(2.1)	263(9.9)	439(6.3)	-
Virchow	-	863(5.9)	-	-	249(3.6)	27(2.7)
Schwarzengrund	-	565(3.9)	-	-	-	-
Emek	-	359(2.5)	-	-	-	-
Blockley	-	676(4.6)	-	-	-	-
Amsterdam	-	368(2.5)	-	103(3.9)	-	-
Seftenberg	-	-	49(4.9)	86(3.2)	-	-
Lexington	-	-	47(4.7)	-	-	35(3.6)
Newport	-	-	-	100(3.7)	-	-
Tennessee	-	-	-	77(2.9)	-	-
Chester	-	-	-	171(6.4)	-	-
London	-	-	-	-	-	22(2.2)
Other	15,824(35.9)	5,558(38.2)	518(51.4)	1,150(4.1)	2,490(35.9)	372(37.8)
Total	44,087	14,559	1,007	2,670	6,928	984

* ตารางนี้แสดงการกระจายของเชื้อมากกว่า 10 ซีโรวาร์ของเชื้อที่พบบ่อย

ที่มา: (Aroon *et al,*. (2004))

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อาการของผู้ป่วยและความเป็นพิษของเชื้อ *Salmonella* spp.

อาการของผู้ป่วย (สุมณฑาและคณะ, 2546)

ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อจะมีอาการจำแนกออกได้เป็น 3 แบบ

1. อาการของระบบทางเดินอาหาร (Gastroenteritis)

โดยทั่วไปเกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ไม่เลือกโฮสท์ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ช่วงระยะเวลาฟักตัวของเชื้ออยู่ระหว่าง 5 ชั่วโมง ถึง 5 วัน แต่ปกติสัญญาณบอกอาการของโรคมักเริ่มขึ้นประมาณ 12-36 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ ในกรณีที่ได้รับเชื้อเป็นจำนวนมาก อาการจะปรากฏขึ้นเร็วกว่าปกติหรือถ้าบุคคลไวต่อเชื้อมากเป็นพิเศษ อาการก็จะปรากฏขึ้นเร็วกว่าปกติด้วย อาการของผู้ป่วยประกอบด้วย ท้องเดิน คลื่นไส้ ปวดท้อง ไข้สูงปานกลาง หนาวสั่น อาการท้องร่วงจะรุนแรงต่างกันตามลักษณะการถ่ายอุจจาระ เช่น อุจจาระอาจมีลักษณะเหลวคล้ายน้ำซุปผัก จนถึงการถ่ายเป็นน้ำและเกิดอาการขาดน้ำ (dehydration) ในบางครั้งผู้ป่วยอาจอาเจียน อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ปวดศรีษะ กระสับกระส่าย โดยทั่วไปอาการดังกล่าวจะปรากฏอยู่นาน 2-5 วัน ถ้านำสิ่งขับถ่ายของผู้ป่วยไปตรวจวิเคราะห์ ในช่วงนี้จะพบเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นจำนวนมาก เมื่อเวลาผ่านไปจำนวนของเชื้อ *Salmonella* spp. จะลดลง แต่ผู้ป่วยบางรายอาจขับถ่ายเชื้อที่มิใช่ไทฟอยด์หลังจากนี้ไปแล้วอีก 3 เดือนก็เป็นได้

2. อาการไข้ไทฟอยด์ (Enteric Fever)

เกิดจาก *S.* Typhi , *S.* Paratyphi, *S.* Paratyphi B (*S.* Schottmuellleri) ส่วน *S.* Typhimurium มีรายงานว่าเป็นเชื้อไข้ไทฟอยด์ของหนู ระยะเวลาฟักตัวของเชื้อไข้ไทฟอยด์อยู่ระหว่าง 7-28 วัน (ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ได้รับ) เฉลี่ยประมาณ 14 วัน ผู้ป่วยมีอาการไม่สบาย ปวดศรีษะ ไข้ขึ้นสูงมากและทรงอยู่หลายวัน ปวดท้องและปวดเมื่อยตามร่างกาย อ่อนเพลีย ถ่ายอุจจาระมีลักษณะเหลวคล้ายน้ำถั่ว (Pea-like) หรือเหลวเป็นน้ำ นอกจากนี้ยังมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ไอ มีเหงื่อออกตามตัว หนาวสั่น และเบื่ออาหาร มีจุดแดงตามลำตัว แผ่นหลังและหน้าอก หัวใจเต้นช้าและอ่อน ท้องบวมน้ำ ม้ามโต บางครั้งมีเลือดออกจากช่องท้องหรือจมูกด้วย ผู้ป่วยอาจหมดความรู้สึกอาการทุเลาช้า (ประมาณ 1-8 สัปดาห์) และบางครั้งผู้ป่วยอาจเป็นพาหะของโรคไปอีกหลายเดือน หรือเป็นปีก็ได้ ในกรณีนี้มักพบเชื้อในถุงน้ำดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. อาการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Bacteraemia/Septiceamia)

เกิดจากเชื้อเข้าไปในกระแสโลหิต สืบเนื่องจากเชื้อฟักตัวในลำไส้เล็ก แล้วเข้าสู่กระแสโลหิต ผู้ป่วยจะมีไข้สูง ปวดหลัง ปวดท้อง และเจ็บหน้าอก หนาวสั่น เหงื่อออกตามลำตัว ไม่สบาย เบื่ออาหาร น้ำหนักลด อาการที่เกิดขึ้นอาจเป็นแบบสั้น ๆ หรือเป็นเรื้อรังก็ได้ เชื้อที่เป็นสาเหตุได้แก่ *S.* Typhi *S.* Cholerae-suis และ *S.* Dublin เชื้อจากกระแสโลหิตอาจเข้าไปอยู่ตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายได้

ความเป็นพิษ

เชื้ออาจเข้าไปอยู่ในช่องว่าง (lumen) ของลำไส้เล็กส่วนปลาย และเพิ่มจำนวนขึ้น หลังจากนั้นจะไชผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่ระบบท่อน้ำเหลือง และจะทำลายเม็ดเลือดขาว จากนั้นจะเข้าไปในกระแสโลหิต ทำให้เลือดเป็นพิษ (Septiceamia)

เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่า อาการเป็นพิษของเชื้อเกี่ยวข้องกับสารพิษ 2 ชนิดคือ Enterotoxin และ Cytotoxin จากรายงานการวิจัยของ Koupal and Deibel ในปี 1975 ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษของ enterotoxin ลักษณะความเป็นพิษคล้ายกับพิษของ *E.coli* โดยมีการเพิ่มของ cAMP (cyclic adenosine monophosphate) ในลำไส้ และชักนำให้ของเหลวในร่างกายสัตว์ทดลองตกตะกอน แต่แตกต่างจาก *E.coli* ตรงที่ Enterotoxin ที่เชื้อ *Salmonella* spp. ผลิตได้มีปริมาณน้อยกว่า และยากมากกว่าในการจำแนกสารพิษออกจากเซลล์ ของแบคทีเรียยิ่งกว่านั้น Enterotoxin ของเชื้อยังคล้ายสารพิษของเชื้ออหิวาต์ (Cholera toxin-CT) ในด้านลักษณะทางชีวภาพและทางพันธุกรรม กระนั้นก็ตามเชื้อ Salmonella ก่อให้เกิดอาการคล้ายบิดด้วย คือมีการทำลายเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นอาการที่รุนแรงมากกว่าที่จะเกิดจาก Enterotoxin แต่เพียงอย่างเดียว ด้วยเหตุนี้ Koo และคณะ ในปี 1984 จึงทำการตรวจหา Cytotoxin จากสารสกัดของเชื้อ ตามที่มีนักวิจัยชาวยุโรปเคยศึกษาในเรื่องนี้ไว้ เมื่อเติมสารสกัดของเชื้อลงในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กของกระต่าย ปรากฏว่าเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนขึ้น ดังนั้นนักวิจัยจึงสรุปว่าการทำลายเซลล์ของเชื้อที่เกิดขึ้นที่เยื่อบุลำไส้เล็กหรือเซลล์เวอโรนั้นเป็นผลมาจาก Cytotoxin นั่นคือ อาการเป็นพิษของเชื้อ *Salmonella* spp. เกิดจากสารพิษประเภท Enterotoxin และ Cytotoxin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อกำหนดในกฎหมายอาหารเกี่ยวกับ *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม Severe Hazard ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้ออันตรายที่ก่อให้เกิดอัตราการเสียชีวิตสูงสุด ตามกฎหมายอาหารกำหนดไม่ให้พบเชื้อนี้ปนเปื้อนในอาหารทุกชนิด (Zero Tolerance) ทั้งในอาหารที่ปรุงแล้ว (Precooked) และ อาหารพร้อมบริโภค (Ready to eat)

นอกจากเชื้อ *Salmonella* spp. จะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคแล้ว ยังพบว่าเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตและจัดจำหน่ายสินค้า เพราะตามกฎหมายที่กำหนดไม่ให้พบในอาหารได้เลย จึงทำให้มีความเข้มงวดในการรับสินค้าเข้าประเทศในหลายประเทศ ยกตัวอย่างเช่น สหรัฐอเมริกา ซึ่งมีผลทำให้สินค้าบางประเภทของไทย เช่น กุ้งแช่แข็ง ปลาแช่แข็ง ถูก FDA ของสหรัฐอเมริกา ปฏิเสธที่จะรับสินค้าอาหารนั้นเข้าประเทศ เหตุเพราะพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ (USFDA, 2004) และสอดคล้องกับรายงาน ของ อรุณและคณะ (2004) ที่กล่าวว่า เชื้อ *Salmonella enterica* Weltevreden นี้เอง ที่เป็นปัญหาสำคัญที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็ง ซึ่งเป็นเหตุให้อาหารที่ส่งออกของไทยถูกส่งคืน

การป้องกันและการควบคุม

ทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยปฐมภูมิของ *Salmonella* spp จึงคาดเดาได้ว่าอุจจาระของมนุษย์และสัตว์อาจมีเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วย แต่ในอุจจาระของสัตว์มีโอกาสพบเชื้อได้มากกว่าในอุจจาระของมนุษย์ เพราะสัตว์กินอาหารไม่เลือกอีกทั้งอาหารสัตว์ก็มีโอกาสปนเปื้อนได้มากกว่าอาหารของมนุษย์ ตามร่างกายและสิ่งปกปิดใต้ขน ข้อพับของสัตว์อาจมีเชื้อด้วย แหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่เชื้อไปยังเนื้อสัตว์ชำแหละ คือ สัตว์ที่เป็นพาหะ และอาหารสัตว์

การปนเปื้อนในลำดับต่อมาคือ ผู้ปฏิบัติงานที่สัมผัสกับอาหาร ยิ่งถ้าผู้ทำหน้าที่ที่ต้องสัมผัสกับอาหารเป็นพาหะของเชื้อแล้ว ความเสี่ยงของผู้บริโภค ก็จะยิ่งสูงขึ้น

การเตรียมและการเคลื่อนย้ายอาหารจำเป็นต้องกระทำอย่างถูกต้องทั้งในระดับครัวเรือนและในสถาบันจัดบริการอาหาร โดยต้องมั่นใจว่าวิธีการจัดเตรียมและการบริการอาหารได้ทำลายเชื้อจนมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคแล้ว หากไม่แล้วจะเป็นการส่งมอบอันตรายให้กับผู้บริโภคโดยมิได้ตั้งใจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การควบคุมเชื้อจำเป็นต้องทำตลอดห่วงโซ่อาหาร นับตั้งแต่ระดับฟาร์มหรือเกษตรกร โดยต้องมีความรู้และความเข้าใจในการป้องกันและควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ มีการป้องกันการปนเปื้อนข้าม (Cross Contamination) และการผลิตต้องเป็นไปตามระบบมาตรฐานที่มีคุณภาพ เช่น GMP หรือ HACCP มีระบบการฆ่าเชื้อที่ได้มาตรฐาน ไม่ว่าจะด้วยวิธีการ ใช้ความร้อน การฉายรังสี หรือการใช้ Preservative เข้าร่วมกับการผลิต ในด้านการจัดจำหน่าย ต้องมีการควบคุมสุขลักษณะของบริเวณที่จัดจำหน่ายสินค้า ตลอดจนต้องได้รับการสนับสนุนจากทางรัฐบาลในด้านการสนับสนุนการดำเนินการตามนโยบายแผนงานด้านความปลอดภัยของอาหารของชาติ ในทุกระดับและมีการปฏิบัติอย่างต่อเนื่อง

ปัญหาการปนเปื้อน *Salmonella* spp. จึงเป็นปัญหาใหญ่ ที่ผู้ผลิตอาหารควรตระหนักเสมอ การควบคุมคุณภาพในระหว่างการผลิตถือเป็นสิ่งที่ต้องยึดถือปฏิบัติให้ถูกต้อง ตามสุขลักษณะที่ดีประกอบกับการใช้เทคนิคในการควบคุมการเจริญของเชื้อ ที่อาจมีผลต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของอาหาร รวมทั้งลดอัตราการเกิดโรคในผู้บริโภค ปัจจัยที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคในอาหาร ประกอบด้วย 2 ปัจจัยสำคัญคือ ปัจจัยภายใน และปัจจัยภายนอก ซึ่งมีความสัมพันธ์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยตรง โดยปัจจัยภายใน ได้แก่ สารอาหาร ความชื้น ความเป็นกรด-เบส ของอาหาร ซึ่งมีผลร่วมกันในการควบคุมการเจริญของเชื้อ การถนอมอาหารถือเป็นอีกวิธีหนึ่ง ที่นอกจากจะมีวัตถุประสงค์ในการถนอมอาหารให้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานมากขึ้นแล้ว ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อได้ การเลือกชนิดของสารถนอมอาหาร หรือวัตถุกันเสียที่จะใช้ในอาหารแต่ละประเภทจึงมีความสำคัญ มีวัตถุกันเสียหลายชนิดที่อนุญาตให้สามารถใช้ได้ในอาหารตามปริมาณที่กำหนด แต่พบว่าวัตถุกันเสียบางชนิด อาจก่ออันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้หากใช้ในปริมาณมากกว่าที่กำหนด เช่น การใช้ไนไตรท์ และ ไนเตรท ในอาหาร พบว่าหากใช้ในปริมาณเกินกว่าที่กำหนดแล้ว จะเกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ เพราะสารประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้จะรวมตัวกับสารประกอบ เอมีน (Amine) ในอาหาร เกิดเป็นสารประกอบไนโตรซามีน (Nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Swan,1975;NAS/NRC,1981) ซึ่งปัจจุบันได้มีความพยายามในการศึกษาเพื่อหาวัตถุกันเสียที่ปลอดภัยนำมาใช้ทดแทน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 โซเดียมแลกเทต (Sodium Lactate)

คุณสมบัติของโซเดียมแลกเทต (FDA, 2003)

โซเดียมแลกเทตมีสูตรโมเลกุล คือ $C_3H_5NaO_3$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 112.06 ลักษณะเป็นของเหลวใส ข้น มีกลิ่นกรด มีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ง่าย ข้อมูลจาก Code of Federal Regulation sec 184.1768 (FDA, 2003) ได้ให้ความหมายของ โซเดียมแลกเทต ว่าเป็นเกลือของกรดแลคติค ที่เตรียมเพื่อใช้ในทางการค้า โดยการทำให้เป็นกลางด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ นิยมผลิตในรูป Solid powder หรือ Liquid Solution ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 % โดยน้ำหนักหรือ 60 % โดยน้ำหนัก

โดยเกลือของกรดแลคติค ที่มีการผลิตขึ้นมีจำนวนหลายชนิด แต่ ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวางมี อยู่ 2 ชนิด คือ โซเดียมแลตเตท และ โพแทสเซียมแลกเทต ซึ่ง โซเดียมแลกเทต นี้ถูกจัดให้มีคุณสมบัติ เป็นวัตถุกันเสียที่มีการประกาศอนุญาตให้ใช้ได้กับอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ และ สัตว์ปีก ยกเว้นใน ผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับทารก โดย Food Safety and Inspection Service (FSIS, 2000) เมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2543 โดยได้จัดกลุ่มให้เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial agent) และกำหนดให้สามารถใช้โซเดียมแลกเทตในอาหารได้ในปริมาณไม่เกิน 4.8 % ของน้ำหนักรวมของอาหาร (FSIS, 2000) และ FDA กำหนดให้ จัดอยู่ในกลุ่มของสารที่อนุญาตให้ใช้ในระดับ GRAS (General Recognized As Safe) (FDA, 2003)

Antimicrobial Activity (Bogaert J.C., Naidu A.S. 2000)

จุดประสงค์ของการนำ Antimicrobial Agent มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร คือการใช้เพื่อลด หรือ ทำลายกิจกรรม ของจุลินทรีย์โดยกระบวนการ ที่เรียกว่า Stasis หรือ Cidal mechanism

ในอุตสาหกรรมอาหาร มีจุดมุ่งหมายในการนำเอา Lactic acid และ Lactate มาใช้ 2 ประการคือ

1. เพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนในอาหาร เช่น ไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในซากวัว ที่ชำแหละจากโรงฆ่าสัตว์

2. เพื่อเพิ่ม Shelf-life ให้แก่ อาหารสด หรือ Semi-process food

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Inhibition Mechanism ของ Lactic acid และ Lactate ประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ

1. ความเป็น Permeabilizer ของ Lactic acid (Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M. *et al.* 2000) ที่สามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียมีผลทำให้ pH ภายในเซลล์ ลดลงต่ำกว่า pH ภายนอกเซลล์ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์ของแบคทีเรีย (Bogaert J.C., Naidu A.S. 2000)

Alakomi และ คณะ ได้ทำการศึกษาถึงผลของ Lactic acid ที่มีต่อ Cell membrane ของแบคทีเรียกรัมลบ พบว่า Lactic acid มีคุณสมบัติในการเป็น Permeabilizer ที่ดี กล่าวคือ นอกจากการศึกษาที่พบว่า Lactic acid สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียโดยผ่านทาง Water-filled porin protein ที่ Outer membrane แล้วเข้าไปมีผลต่อ pH ภายในเซลล์ของแบคทีเรียแล้ว จากการศึกษาพบว่า Outer membrane นั้น มีคุณสมบัติที่ค่อนข้างเด่นชัดในการควบคุมการส่งผ่านสารเข้าและออกเซลล์ เพราะว่าบน Outer membrane มี Lipopolysaccharide (LPS)อยู่ การที่ Lactic acid จะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้นั้น จึงต้องผ่าน LPS นี้ก่อนแล้วจึงจะผ่านเข้าทาง Water-filled porin protein ได้ซึ่งจากการศึกษาต่อมาพบว่า Lactic acid ส่งผลอย่างไรต่อ LPS นี้ โดย Alakomi และคณะ ได้ทำการ ศึกษาถึงความสามารถของ Lactic acid , HCl และ KCN ที่มีต่อ LPS บน Outer membrane ของ แบคทีเรียกรัมลบ 3 ชนิดคือ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *Salmonella* serovar Typhimurium ด้วยวิธี Electrophoresis โดย SDS – PAGE และ การวิเคราะห์ Fatty acid ด้วย Gas chromatography ผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการสกัดสารจาก เซลล์ของแบคทีเรีย 3 ชนิดที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่มี Lactic acid , HCl และ KCN มาทำการวิเคราะห์ด้วย Gel Electrophoresis พบว่าปริมาณของแบคทีเรียที่เลี้ยงในสภาวะที่มี Lactic acid ถูกสกัดออกมาและแยกได้บน Gel มากที่สุดเป็นแถบชัดที่สุด มากกว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงใน สภาวะที่มี HCl และ KCN ซึ่งแสดงให้เห็นคุณสมบัติในการที่จะมีผลทำให้ LPS หลุดออกจาก Outer membrane ของแบคทีเรีย ทำให้คุณสมบัติการควบคุมการส่งผ่านสารของ Outer membraneของแบคทีเรียลดลง และส่งผลให้ตัวมันสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ดีขึ้น จึงเรียกได้ว่ามันเป็น Permeabilizer ที่ดีด้วย

เมื่อ Lactic acid สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแล้ว จะมีผลทำให้ pH ภายในเซลล์ลดลงต่ำกว่า pH ภายนอกเซลล์ (Bogaert J.C., Naidu A.S. 2000)ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว pH ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จะมีค่าสูงกว่า ภายนอก แต่เมื่อ Organic acid เช่น Lactic Acid ซึมผ่านเข้าสู่เซลล์แล้วเกิดการแตกตัวจาก Protonized Form [HA] ได้ $[A^-]+ [H^+]$ ซึ่งเมื่อมีความเข้มข้นของ H^+ ภายในเซลล์มากจะมีผลให้ pH ในเซลล์ลดลง โดยเซลล์จะพยายามส่งโปรตอนออกนอกเซลล์ เพื่อเหตุผลให้เกิดความสมดุลทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ผ่านทาง electron transport chain และการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่งผ่านนี้ทำให้เกิด Electro-chemical potential เรียกว่า Proton motive force เมื่อระบบนี้เกิดขึ้นต่อเนื่อง จะสันนิษฐานได้ว่า มีผลกระทบต่อ ระบบการสร้าง ATP (ATP generation system) และระบบการส่งผ่านสารอาหารสู่เซลล์ จะไม่สามารถดำเนินไปอย่างสมบูรณ์ อีกทั้ง กระบวนการสร้างพลังงาน (energy metabolism) ก็เป็นไปอย่างผิดปกติ นอกจากนี้ยังมีผลต่อโครงสร้างโปรตีนในเซลล์ และ ระบบเอนไซม์ (Enzymatic system) ด้วย และเมื่อ pH ภายในเซลล์ลดลงจนถึงจุดหนึ่ง การเจริญเติบโตของเซลล์จะหยุดชะงักและถ้าเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมสภาวะของเซลล์ให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ เซลล์จะตาย

สำหรับ เกลือของกรดแลคติค อย่างเช่น โซเดียมแลกเทต ที่มีค่า pH ค่อนข้างเป็นกลาง จึงไม่ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของ pH ภายในและนอกเซลล์ของแบคทีเรียมากนัก แต่ Inhibition mechanism ของมันก็จะเป็นไปตามทฤษฎี ดัง ที่เกิดขึ้นอย่างเช่นใน Lactic acid แต่จะเกิดขึ้นต่อเมื่อตัวมันเกิดการแตกตัว ใน aqueous phase ทั้งหมดแล้วก่อนเท่านั้น

2. การศึกษาถึงผลของโซเดียมแลกเทตที่มีต่อค่า a_w ในอาหาร (Bogaert J.C., Naidu A.S. 2000)

จากรายงานการทดลองหลาย ๆ การทดลองกล่าวเปรียบเทียบคุณสมบัติของ โซเดียมแลกเทต และ โซเดียมคลอไรด์ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย บางการทดลองกล่าวว่า โซเดียมแลกเทต ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีกว่า โซเดียมคลอไรด์ แต่ในบางการทดลองกล่าวว่า ให้ผลการทดลองที่ตรงกันข้ามหรือในบางการทดลองกล่าวว่า สารทั้งสองตัวให้ผลที่เท่าเทียมกัน

จากคุณสมบัติของโซเดียมแลกเทต ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเช่นเดียวกับโซเดียมคลอไรด์ จึงอาจคาดการณ์ว่า กลไกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ของโซเดียมแลกเทต น่าจะมีความเกี่ยวข้องใกล้เคียงกับ คุณสมบัติของโซเดียมคลอไรด์ ที่เมื่อเติมลงในอาหารแล้วมีผลในการลด ค่า a_w ของอาหาร ซึ่งมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

จากการทดลองของ Sheref ในปี 1994 กล่าวว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของโซเดียมแลกเทตที่ใช้ยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารที่ผ่านการปรุงสุกแล้ว พบว่าจะใช้ในปริมาณที่น้อยกว่า เมื่อทดลองใน Culture media แต่หากเมื่อทำการศึกษาถึงค่าของ a_w ในอาหาร โดยค่า a_w ที่น้อยที่สุดที่ยอมให้ *Listeria monocytogenes* เจริญได้นั้น จะมีค่าอยู่ในช่วง 0.90-0.94 โดยใน culture media ทั่วไป จะมีค่า a_w เฉลี่ยแล้วประมาณ 0.92 ซึ่งค่านี้ เป็นค่าที่น้อยกว่าอย่างมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ ผลิตภัณฑ์เนื้อ ที่ผ่านการเติม โซเดียมแลกเทตลงไป และผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะมีค่า a_w เฉลี่ยแล้วประมาณ 0.95

จากข้อมูลนี้ทำให้ อธิบายได้ว่า ถึงแม้ในผลิตภัณฑ์เนื้อที่มี ค่า a_w มากกว่าใน culture media ซึ่งน่าจะส่งผลให้ *Listeria monocytogenes* เจริญได้ดีกว่าและคงต้องใช้ โซเดียมแลกเทตในปริมาณมากขึ้นเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของมัน แต่กลับพบว่า ปริมาณของโซเดียมแลกเทตที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อกลับใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าใน culture media

จากการศึกษาดังกล่าวนี้ ทำให้สามารถอธิบายได้ถึงคุณสมบัติจำเพาะของโซเดียมแลกเทตได้ว่า กลไกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของโซเดียมแลกเทต นั้นเป็นกลไกที่เกิดขึ้นโดยมีผลเกี่ยวข้องกับค่าของ a_w ในอาหาร แต่ โซเดียมแลกเทต และ a_w มีผลผกผันกัน ในด้านของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยพบว่าโซเดียมแลกเทตจะคงอยู่ในส่วนที่เป็น ส่วนของน้ำในอาหาร เป็นส่วนใหญ่ ทำให้คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ในอาหารที่มี a_w มากกว่า ให้ผลการทดลองที่ดีกว่า

ผลของโซเดียมแลกเทต ที่มีต่อคุณสมบัติของอาหาร

การใช้ Antimicrobial agent เช่น โซเดียมแลกเทตในอาหาร จำเป็นต้องคำนึงถึงผลที่จะเกิดขึ้นกับคุณสมบัติของอาหาร หลังการใช้ Antimicrobial agent ร่วมกระบวนการผลิต โดยทั่วไปแล้วผู้บริโภคจะยอมรับอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิต มากน้อยเพียงใดขึ้นกับ คุณภาพของอาหาร ในด้านต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น

- คุณสมบัติที่มองเห็นได้ด้วยตา (Visual) เช่น ลักษณะปรากฏ (apparance) หรือ สี(color)
- คุณสมบัติด้าน Organoleptic เช่น กลิ่น (Odor) และ กลิ่นรส (Flavor)

พบรายงานที่กล่าวถึงคุณสมบัติในการช่วยพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เช่นในรายงานของ Soon Hee และ Koo Bok (2003) กล่าวว่า ในไส้กรอกที่เติม โซเดียมแลกเทต 3.3 % จะมีค่าสีที่ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา อีกทั้งพบปริมาณของ Thiobarbituric acid reactant substrate (TBARS) ที่เป็นสารที่บอกถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน น้อยกว่าที่พบในตัวอย่างควบคุม สอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Nnanna I.A., Ukuku D.O., Mcvann K.B., Shelef L.A. (1994) ที่กล่าวว่า โซเดียมแลกเทต มีผลขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

และส่งผลต่อการจัดรูปแบบโครงสร้างของ TBARS จึงพบว่ามีปริมาณของ TBARS น้อยในอาหารที่เติมโซเดียมแลกเทต

ในการทดลองถึงผลของโซเดียมแลกเทต และ Starter culture ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *Salmonella* spp. ใน Chicken dry ferment sausage พบว่า โซเดียมแลกเทตสามารถทำงานร่วมกับ Starter culture บางตัวได้ดี โดยช่วยในการควบคุม Acidification ของไส้กรอก คือช่วยควบคุมการเจริญของ แลคติคแอซิด แบคทีเรีย ไม่ให้เจริญสร้างกรดแลคติค ซึ่งจะมีผลทำให้ไส้กรอกมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น และมีรสชาติเปรี้ยวเกินไป (Francois and Antoine, 2003)

2.3 โซเดียมคลอไรด์ (Ravishanker S., Juneja V.K, 2000)

Sodium Chloride (NaCl) โดยทั่วไปแล้วเรียกว่า เกลือ(Salt) ในภาษาทางวิทยาศาสตร์การอาหารนั้น หมายถึงเกลือที่ใช้ในการปรุงอาหาร (Cooking Salt หรือ Table Salt) ถ้าเรียกตามแหล่งที่มาจะเรียกได้ 2 แบบ คือ

เกลือสมุทร (Solar Salt) ซึ่งได้จากการทำนาเกลือ โดยการตกผลึกของเกลือจากน้ำทะเล หรืออีกแบบคือ เกลือสินเธาว์ (Rock Salt) ได้จากการทำเหมืองเกลือจากผลึกเกลือที่จับตัวกันเป็นก้อนเกลือขนาดใหญ่ (กล้าณรงค์, 2521)

เกลือช่วยเพิ่มรสชาติ ให้แก่อาหาร และมีบทบาทใน กระบวนการผลิตอาหาร ยกตัวอย่าง เช่น ควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ ,ช่วยเพิ่มคุณลักษณะที่ดีแก่อาหารหมักดอง, ควบคุมกิจกรรมของยีสต์ ช่วยเพิ่มความคงตัวให้แก่ กลูเตน และช่วยเพิ่มสีในส่วน ผิว(crust) ของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ นอกจากนี้ เกลือยังช่วยควบคุมอัตราการหมักที่เกิดขึ้นโดย Lactic acid แบคทีเรีย แล้วยังช่วยเพิ่มคุณสมบัติในด้าน รสชาติ เนื้อสัมผัส แก่ผลิตภัณฑ์ และยังมีส่วนช่วยให้ค่า a_w ลดลง (Ravishanker S., Juneja V.K, 2000)

Antimicrobial Activity (Ravishanker S., Juneja V.K, 2000)

Antimicrobial Activity ของ NaCl สามารถเรียกได้ว่ามีทั้งการนำมาใช้แบบโดยตรงและโดยอ้อม เช่นในกรณีของ เนื้อตากแห้ง หรือเนื้อรมควัน จะมีการเติมเกลือลงไปในปริมาณมาก เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ มีความคงตัวดีขึ้น การใช้งานลักษณะนี้เป็นแบบการใช้โดยตรง

ในช่วงระยะไม่กี่ปีมานี้ เกลือถูกนำมาใช้ร่วมกับ Preservative ตัวอื่น ๆ หรือร่วมกันกับ Hurdle effect ตัวอื่น ๆ เพื่อวัตถุประสงค์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยปริมาณของเกลือที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้องเติมลงในอาหาร เพื่อเหตุผลนี้จะต้องใช้ในปริมาณมาก (สารละลายเกลือความเข้มข้น 16.54 % ให้ค่า a_w เท่ากับ 0.90) ซึ่งจะมีผลต่อรสชาติของอาหาร จึงนิยมใช้ร่วมกับ Preservative ตัวอื่น ๆ มากกว่าอย่างไรก็ตาม เกลือยังคงมีบทบาทสำคัญในการเติมลงในอาหาร เพื่อช่วยในด้านของรสชาติ โดยมีบทบาทเป็นส่วนประกอบหนึ่งของสูตรอาหาร คุณลักษณะนี้เป็นแบบโดยอ้อม

บทบาทของเกลือที่มีผลต่อของจุลินทรีย์

1. เกลือเป็นตัวลดความชื้น หรือลด a_w ของอาหารลงทั้งนี้เนื่องจากเกลือละลายน้ำ สารละลายที่เกิดขึ้นมานั้น น้ำจะถูกแรงดึงตัวเกาะกันกับเกลือเกิดเป็น ion hydration คุณสมบัติหรือความเป็นอิสระของน้ำจึงเปลี่ยนไปค่า a_w ในอาหารนี้มีผลต่อการเจริญของ จุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า a_w แตกต่างกันไป การลดปริมาณน้ำในอาหารให้น้อยกว่าค่าที่ จุลินทรีย์จะเจริญได้ จึงเป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร (นิธิยา, 2545)

2. สารละลายเกลือจะมีผลทำให้เกิด การสูญเสียน้ำ (Dehydration) ของเซลล์แบคทีเรีย อันเนื่องมาจากแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) และเป็นเหตุให้เกิดการเสียน้ำอย่างรุนแรง (Plasmolysis) และหยุดการเจริญ

3. เกลือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์โดยตรงเมื่อมีมากเกินความต้องการและอนุมูล ของ Chloride (Cl) ก็มีความเป็นพิษในตัวเอง

4. น้ำเกลือช่วยลดการแพร่หรือแทรกซึมของออกซิเจน ดังนั้น ปริมาณของออกซิเจน จึงซึมลงไปในสารละลายได้น้อยลง จุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ ออกซิเจนจะเจริญเติบโตได้ยาก

5. เกลือเป็นตัวทำลายเอนไซม์บางชนิด เนื่องจากเกลือมีความเข้มข้นมากจนถึงระดับหนึ่งจะมีผลทำให้โปรตีนบางตัวเกิดการเสียสภาพ (Denature) และเสียคุณสมบัติ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงหยุดการเจริญ(กล้าณรงค์, 2521)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 Predictive Microbiology

ประวัติความเป็นมา

แบบจำลองการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร เริ่มมีการพัฒนาขึ้นในช่วงปี 1920 โดยเป็นแบบจำลองที่พัฒนาขึ้นเพื่อประเมินค่า Thermal dearth time สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง จนถึงช่วงปี ค.ศ 1980 ได้มีการพัฒนาเพื่อฟื้นฟู แบบจำลองนี้อีกครั้ง ด้วยเหตุผลของการขยายตัวของอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อให้สามารถใช้ในงานได้หลากหลายมากขึ้น เช่นใช้ในงานประเมินคุณภาพในการเก็บรักษาอาหาร เนื่องจากปัญหาของการที่อาหารมักจะมีช่วงเวลาการเก็บรักษาที่จำกัด ประกอบกับการที่ได้มีการริเริ่มพัฒนาขบวนการผลิต ระบบ Multiple-hurdle preservation เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอีกทั้งในช่วงนั้น ยังเป็นช่วงที่มีการพัฒนาระบบคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคลให้มีขอบเขตและมีประสิทธิภาพ ในการใช้งานกว้างขวางมากขึ้น

มีการนำเอาความรู้ ทางด้านจุลชีววิทยา คณิตศาสตร์ และ สถิติ มาใช้ประกอบกันเพื่อพัฒนาแบบจำลองการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร แต่กลับพบว่า แบบจำลองนี้ไม่ได้รับความนิยมใช้อย่างแพร่หลายนัก เป็นเพราะเหตุผลที่ว่า สมการที่เกี่ยวข้องในแบบจำลองประกอบด้วยสมการที่ซับซ้อนหลายสมการ และยังไม่สามารถหาวิธีการแก้สมการเหล่านั้นให้สำเร็จได้ด้วยวิธีที่ง่าย และรวดเร็วได้

จนกระทั่งช่วงปี ค.ศ 1997 จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการจัดทำแบบจำลองการเจริญจนมีมาตรฐาน เหมาะสมกับการใช้ให้เป็นประโยชน์ในการทดลอง และง่ายต่อการอธิบายผลการทดลอง

ในปัจจุบันจะพบว่า แบบจำลองการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร มักพบว่าเป็นส่วนหนึ่งในงานวิจัยอยู่เสมอ ในงานวิจัยที่แสดงข้อมูลการเจริญของจุลินทรีย์ในรูปกราฟ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านั้นถูกศึกษาร่วมกับ การใช้ปัจจัยหนึ่งปัจจัย ในหลายระดับ หรือ มีปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง 2 ปัจจัย ผู้อ่านจะสามารถแปลผลการทดลองได้ไม่ยากนัก แต่หากการทดลองประกอบด้วยปัจจัยมากกว่า 2 ปัจจัยขึ้นไป จะทำให้เกิดความยุ่งยากในการแปลผลการทดลอง มากขึ้น

แบบจำลองของจุลินทรีย์ในอาหารนี้คาดหวังว่าจะสามารถใช้ทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ หรือ ทำนายการถูกยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ด้วยการใช้สมการทางคณิตศาสตร์ ซึ่งสามารถทำการศึกษาได้ทั้งใน Broth culture หรือในสภาวะอื่น ๆ ที่สอดคล้องกับสภาวะทางธรรมชาติของจุลินทรีย์ เช่นในสภาวะที่มี อุณหภูมิ หรือความเป็นกรด-ด่างรวมอยู่

ในสภาวะที่อาหารและ เชื้อก่อโรค เกิดปฏิกิริยาร่วมกัน จำเป็นที่ว่าจะต้องมีแบบจำลองที่เหมาะสมกับสภาวะนี้ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ระบบชีวเคมีของจุลินทรีย์ เป็นระบบที่มีความสลับซับซ้อน ประกอบกับความรู้ในด้านที่เกี่ยวกับ ข้อจำกัดของการใช้ปัจจัยต่าง ๆ ในอาหารยังมีอยู่น้อย ดังนั้น แบบจำลองการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารจึงเป็นแบบจำลองที่ได้มาด้วยวิธีการพยายามทดลองแบบท้าทาย เพื่อให้ได้ข้อมูล ซึ่งแตกต่างจากแบบจำลองของกระบวนการหมัก หรือกระบวนการทางชีวเคมี อื่น ๆ

การแปลผลการทดลองจากแบบจำลอง จะได้ค่าการแปลผลข้อมูล ที่มีความน่าเชื่อถือ ด้วยวิธีการทางสถิติ และแบบจำลองทั้งหมดทั้งที่เป็นแบบ Individual step หรือ Multiple process สามารถอธิบายความซับซ้อนของ กระบวนการทางชีวเคมี ที่ควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้อย่างง่าย และสามารถอธิบาย ถึงเหตุผลในการกรอกข้อมูลและขั้นตอนต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน ค่าของตัวแปรจะต้องง่ายต่อการวัด เช่น อุณหภูมิ และ ความเป็นกรด-ด่าง หรือต้องเป็นค่าที่ได้จากปัจจัยที่มักเติมในอาหารอยู่แล้ว เช่น ปริมาณของเกลือ

แบบจำลองสำหรับการทดลองที่มีขั้นตอนเฉพาะ หรือ แบบจำลองที่ใช้ใน กระบวนการผลิต ซึ่งจะต้องนำมาศึกษาพร้อมกัน จะต้องมีข้อมูลที่มากพอที่จะใช้สำหรับการทำนาย แต่จะต้องเป็นข้อมูลง่าย ๆ เพื่อใช้ประโยชน์ได้

เมื่อคำนึงถึงความสมดุลระหว่าง ความเข้าใจได้ง่าย (Simplicity) และ ความสลับซับซ้อน (Complexity) ของแต่ละแบบจำลอง ทำให้ความหมายของแบบจำลอง เป็นไปในแบบที่ว่าแต่ละแบบจำลองจะไม่ใช่แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทุกสภาวะ เพราะมีความสลับซับซ้อนต่างกันไป

เมื่อแบบจำลองของกระบวนการถูกสร้างขึ้นโอกาสที่จะใส่รายละเอียดมีได้หลายทางโดยผู้สร้างแบบจำลองสามารถพิจารณาตัดสินได้ว่า ข้อมูลไหนที่มีค่าเพียงพอที่จะนำไปใช้กับแบบจำลอง เพื่อให้การคำนวณ เกิดความถูกต้องมากที่สุด

ระดับของแบบจำลอง (Level of Model)

แบบจำลองแบ่งออกได้เป็น 3 ระดับ (Richard C.W., Robert L.B. 2001)

ระดับปฐมภูมิ (Primary Level) แบ่งออกได้ 3 ประเภท

1. สมการทางคณิตศาสตร์ ที่ใช้อธิบายความเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ ไปตามเวลาที่เปลี่ยนยกตัวอย่างเช่นแบบจำลองการเจริญที่สามารถประเมินความเปลี่ยนแปลงเป็นค่า log cfu/ml กับเวลา

2. สมการที่ใช้ในการอธิบายการลดลงของจำนวนจุลินทรีย์ ไปตามเวลาที่เปลี่ยน ใน Thermal process เช่น ค่าที่นิยมใช้ คือ D-value

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. สมการอธิบายการสร้าง สารพิษของจุลินทรีย์ หรือ Metabolic product อื่น ๆ ไปตามเวลาที่เปลี่ยน

ระดับทุติยภูมิ (Secondary Level)

เป็นสมการที่ใช้อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงของค่าพารามิเตอร์ ใน Primary Level Model ว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร เมื่อสภาวะแวดล้อมหรือสภาวะของอาหาร เปลี่ยนแปลงไป สมการนี้จะมีพื้นฐานเป็นสมการ Arrhenius หรือ Square root relation ซึ่งในแบบจำลอง Level นี้ จะใช้ได้ดีในกรณีของอาหารที่มีความจำเพาะเจาะจง

ในกรณีที่การทดลองมีการใช้ปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือระดับต่าง ๆ สมการของแบบจำลองจะเป็น Polynomial equation

สมการใน Level นี้มีความยืดหยุ่น ในการวิเคราะห์ในทุกมุม และทุกมิติ รวมถึงวิเคราะห์แบบ cross-product term แต่มีกลไกน้อยในการแปลผล ยกตัวอย่าง Second level model เช่น ค่าของ Z-value ที่ใช้ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงค่า D-value เมื่อ อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไป

ระดับตติยภูมิ (Tertiary Level)

ในขั้นนี้ จะเป็นขั้นตอนของการทำนายค่า และการประเมินค่า โดยการวิเคราะห์จะใช้ ทั้ง Primary level model และ Second Level Model ร่วมกัน โดยค่าที่เกี่ยวข้องที่สนใจจะถูกนำใส่เข้าไปใน Second Level Model เพื่อหาค่าของ พารามิเตอร์ที่จำเพาะเจาะจงใน Primary level model เพื่อให้สามารถแก้ปัญหาของการเพิ่มขึ้นของเวลา และเพื่อให้ได้ค่าของ เส้นโค้งของการเจริญ หรือค่าของการ Inactivate ที่ได้มาจากการคาดการณ์จากการรวมกันของค่าที่เกี่ยวข้องทั้งหมด

สมการนี้มีความซับซ้อนและข้อมูลค่อนข้างมาก ทำให้มีความเทอะทะ จึงได้มีการนำเอา Model ใน Primary level model และ Second level Model มาเชื่อมกันใน Spread sheet หรือใน Soft ware program และจะถูกเขียนขึ้นได้เป็น Tertiary Level Model โดยค่าจาก Model นี้จะแปรผันไปตาม ความซับซ้อนของ สมการบน Spread sheet เพื่อให้ได้ ระบบที่มีประสิทธิภาพในการแปลผล และ เป็นระบบที่มีความเสี่ยงต่อการผิดพลาดน้อยที่สุด Tertiary Level model มี 2 ระบบที่ได้รับความนิยมในการใช้ ประกอบด้วย Food Micro model และ Pathogen Modeling Program

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Growth Model

แบบจำลองการเจริญนี้ ประกอบด้วยสมการที่ใช้ประเมินการเพิ่มขึ้น ของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ ไปตามเวลาที่เปลี่ยนแปลง โดยแบบจำลองที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในการใช้ประเมินค่า Exponential growth rate คือ Gompertz equation และ Baranyi Model ซึ่งเป็นแบบจำลองที่จัดว่าอยู่ในประเภท Primary Level Model (Richard C.W., Robert L.B. 2001)

ก่อนที่จะมีการจัดทำแบบจำลองทั้งสองนี้ขึ้น ค่าของ Exponential growth rate จะหาได้จากการกำหนดจุดสร้างกราฟ ซึ่งจะใช้ Curve-fitting software เข้าช่วยในการ วิเคราะห์ จนกระทั่ง Buchanan และ คณะ ในปี 1992 ได้พยายามสร้างแบบจำลองนี้ขึ้น โดยได้สมการที่เกี่ยวข้องเป็น Three-phase linear models คือ

Lag phase	$N_t = N_0$	เมื่อ $t \leq t_{lag}$
Exponential – growth phase	$N_t = N_0 + \mu(t - t_{lag})$	เมื่อ $t_{lag} < t < t_{max}$
Stationary phase	$N_t = N_{max}$	เมื่อ $t \geq t_{max}$

เมื่อ N_t = Log number/ml ของเซลล์ ที่เวลา t

N_0 = Log initial number ของเซลล์

N_{max} = Log stationary phase number

μ = Maximum growth rate

t_{lag} = Lag-phase duration

t_{max} = time when N_{max} reach

เส้นโค้งในกราฟ ที่เกิดขึ้นในช่วงระหว่าง Lag phase และ Exponential – growth phase ใช้อธิบายการเจริญของเชื้อ ณ ช่วงเวลาที่เป็นจุดสิ้นสุดของ Lag-phase และเซลล์เริ่มมีการแบ่งตัว โดยสันนิษฐานได้ว่าเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีความเปลี่ยนแปลงในช่วง t_{lag} และ μ โดยลักษณะของเส้นโค้งในกราฟ จะเกิดการเปลี่ยนแปลง

Roberts และคณะ ในปี 1992 ได้เริ่มใช้ Gompertz equation ในงานด้านจุลชีวอาหาร พบว่า Gompertz equation ให้เส้นโค้งในกราฟที่เป็นแบบ Sigmoid shape และ มีเส้นโค้งในช่วงระหว่าง Lag phase และ Exponential growth phase ที่มีความคมชัดเจนมากกว่า กราฟที่ได้จากสมการอื่น ๆ อีกทั้งมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์กราฟการเจริญในช่วง Stationary phase ได้ดีทำให้ Gompertz equation ได้รับความนิยมในการใช้งานมากกว่าสมการอื่น ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยสมการของ Gompertz คือ

$$N(t) = A + C \cdot e^{-e^{-B \cdot (t-M)}}$$

เมื่อ $N(t)$ = log cell population (log cfu/ml)

A = log initial cell population (log cfu/ml)

C = log maximum cell population – log initial cell population (log cfu/ml)

B = Relative Maximum Growth rate at M

M = time, when growth rate reach maximum (h)

โดยสามารถนำค่าของ A, B, C และ M มาทำการวิเคราะห์ต่อจะได้ค่าของพารามิเตอร์ที่เกี่ยวเนื่องกัน ดังนี้

Maximum Growth Rate (K) $= \frac{B*C}{e}$

Maximum Cell Population (D) $= A + C$

Lag-Phase Duration (L) $= M - \frac{1}{B}$

GT (Generation Time) $GT = \frac{[\log_{10}(2)]\, e}{B*C}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ ประสิทธิภาพของโซเดียมแลกเทต ในการเพิ่มอายุการเก็บรักษาอาหาร และผลที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์

มีรายงานการทดลองใช้ โซเดียมแลกเทต ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มที่ผลิตจากเนื้อสัตว์ และ สัตว์ปีก ซึ่งให้ผลในการควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้เป็นอย่างดี

จากการทดลองของ Kou-Wei และ Shu – Ni (2002) พบว่า การใช้โซเดียมแลกเทต ในกุนเชียงไขมันต่ำ จะให้ผลดีที่สุดในการควบคุมการเจริญของเชื้อปนเปื้อน เมื่อเทียบกับ 0.2 % ไตรโซเดียมฟอสเฟส และ 0.2 % โพแทสเซียมซอร์เบท อีกทั้งพบว่ามีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานมากกว่า

ส่วนในการทดสอบใช้ 3 % โซเดียมแลกเทต ในกุนเชียงที่บรรจุในภาวะ Vacuum package และเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานถึง 25 วัน ซึ่งพบว่าให้ผลดีกว่าการใช้ ไนซิน ในปริมาณ 100 mg/kg ที่พบว่าเกิดกลิ่นเหม็นเปรี้ยวจากจุลินทรีย์ เมื่อเก็บในเวลา เพียง 10 วัน (Feng-Sheng, 2000)

ในการทดลองในไส้กรอกไก่ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิตู้เย็น เมื่อใช้โซเดียมแลกเทตในปริมาณ 1-2 % พบว่าจะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนานขึ้น ถึง 3-4 เท่า เมื่อเทียบกับการผลิตด้วยวิธีทั่วไป และพบว่าเมื่อบรรจุในภาวะที่เป็น Vacuum nitrogen จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ถึง 35 วัน (Cegeilska and Pikul , 2004)

ในการทดลองของ Mbandi และ Shelef (2001) ได้ทำการศึกษาถึงผลร่วมกันของ โซเดียมแลกเทต และ โซเดียมไดอะซีเตท ต่อการเจริญของ *Salmonella* Enteritidis และ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อพร้อมรับประทาน พบว่า การใช้ โซเดียมแลกเทต 2.5 % ร่วมกับ โซเดียมไดอะซีเตท 0.2 % สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อทั้ง สอง ได้ดีที่สุด ทั้งในสภาวะการเก็บในตู้เย็น และ สภาวะอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ในการศึกษาต่อมาของผู้วิจัยกลุ่มนี้ ในปี 2002 ได้ทำการ ศึกษาถึงผลร่วมกันของ โซเดียมแลกเทต และ โซเดียมไดอะซีเตท ต่อการเจริญของเชื้อ กลุ่มเดิม ใน beef bologna พบว่าจากปริมาณเชื้อ เริ่มต้น 10^3 log cfu/ml ทำการเก็บรักษา beef bologna เป็นเวลา 60 วัน ผลการทดลองพบว่า ในการตรวจนับการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. หลังการเก็บผลิตภัณฑ์ 20 -30 วัน พบว่ามีปริมาณของเชื้อลดลงจนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจนับได้ ไม่ว่าจะเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ 5 หรือ 10 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อทำการทดลอง โดยใช้ Origano ซึ่งเป็นเครื่องเทศที่มีรายงานว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ร่วมกับสารกันเสีย เช่น โซเดียมแลกเทต และ โซเดียมอะซีเตท ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *E.coli* 0157:H7 และ *Salmonella* typhimurium โดยเมื่อใช้ โซเดียมแลกเทต และ โซเดียมอะซีเตท ที่ความเข้มข้น 1 % ร่วมกับ Origanox 0.075 % พบว่าให้ผลในการลดการเจริญของเชื้อทั้งสอง อย่างมีนัยสำคัญ (Ibrahim S.A., Dharmavaram S.R.K., Seo C.W. 2005)

การทดลองของ Marie J.L., Julie C., Pascal J.D และคณะ (2002) ที่ได้ทำการศึกษาถึงผลสารกันเสียจากธรรมชาติ ได้แก่ โซเดียมแลกเทต ไนซิน และน้ำมันจากมัสตาร์ด ที่ทำการเติมลงในไส้กรอกไก่ที่ปรับให้มีความเป็นกรด และเติม เชื้อ *E.coli* , *Brochothrix thermosph*acta และ *Lactobacillus allimentarius.* ลงไป เมื่อเก็บไส้กรอก เป็นเวลา 14 วัน พบว่า โซเดียมแลกเทตให้ผลในการต้านการเจริญของเชื้อกลุ่มนี้ได้ดีที่สุด ในขณะที่ สารกันเสียตัวอื่น ๆ ให้ผลแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ

มีรายงานที่กล่าวถึงคุณสมบัติของ โซเดียมแลกเทต ต่อกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ พบว่าโซเดียมแลกเทต สามารถชะลอการสร้างสารพิษ ของ *Clostridium botulinum* ในผลิตภัณฑ์ไก่งวงได้ ซึ่งสารพิษนี้สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค หากขบวนการในการผลิตโดยเฉพาะในขั้นตอนการฆ่าเชื้อไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ โอกาสในการหลงเหลือของเชื้อและสปอร์ของเชื้อจะมีสูง และเป็นปัญหาสำคัญในกระบวนการผลิตอาหาร โดยเฉพาะในอาหารกระป๋อง (Maas *et al*., 1989)

ในกรณีของ ยีสต์ พบว่า สามารถทนทานต่อโซเดียมแลกเทตได้ดี โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทตสูงมากกว่า 10 % W/V (Houtsma P.C., Wit J.C., Rombouts. 1993)

2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ ประสิทธิภาพของโซเดียมคลอไรด์ ที่มีผลต่อคุณภาพของอาหารและผลที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์

Lee S.K., Mei L.,Decker E.A (1997) กล่าวถึงการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านการเกิด ออกซิเดชั่น โดยทำการทดลองใน เนื้อหมูบด ที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-2 % เก็บรักษาที่ -15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า Thiobarbiturate acid reactant substrate (TBARS) และ Lipid Peroxidase เพิ่มขึ้นเมื่อ โซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น และกล่าวได้ว่า ความสามารถของโซเดียมคลอไรด์ ในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะขึ้นกับความคงตัวของปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของเกลือในกล้ามเนื้อของเนื้อหมู

ในการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของการเกิดออกซิเดชั่นของ ไขมัน และค่าสีใน เนื้อหมูสดที่บดแล้ว โดยการใช้ โซเดียมคลอไรด์ 1 และ 2 % ,โซเดียมแลกเทต 2 % และ และผลร่วมกันของโซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมแลกเทต พบว่าผลร่วมกันของ โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมแลกเทต จะมีผลต่อการชะลอการเกิดการเน่าเสียของอาหารมากกว่า ผลของปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงตัวเดียว ผลร่วมกันของ โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมแลกเทต จะช่วยเพิ่มความคงตัวของไขมัน ในอาหารที่เก็บใน -20 องศาเซลเซียส โดยโซเดียมคลอไรด์จะมีผลในการลด Prooxidant activity.

เกลือ มีผลต่อ Cheese โดยมีบทบาทในการ เพิ่มคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส และ อีกทั้งยังมีบทบาทเป็นสารกันเสีย เมื่อทำการใช้ร่วมกับสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ตัวอื่น เช่น ซอร์เบท โดยเกลือจะถูกเติมลงใน เคิร์ดของเนยแข็งในรูปเกลือแห้ง หรือในรูปของสารละลาย โดยขึ้นกับชนิดของเนยแข็ง พบว่าการใช้เกลือมากถึง 5 % จะมีผลทำให้มี ปริมาณความชื้น (Water content) ที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเนยแข็ง (Leuck, 1980)

ในกรณีของผลิตภัณฑ์จำพวกเนื้อ เกลือยังคงนิยมใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญ ในกระบวนการ หมักไส้กรอก เพื่อเหตุผลในการเป็นสารกันเสีย และช่วยเพิ่มรสชาติและเนื้อสัมผัส พบว่าในกรณีของเนื้อบด จะมีการเติมเกลือ 2-4 % เบคอนใช้เกลือประมาณ 2.25 % แฮม ใช้ระหว่าง 3-6 % และ ในข้าวโพดอ่อนใช้ประมาณ 6.25 % เพื่อให้รสชาติและเนื้อสัมผัสดีที่สุด (Kaufmann, 1960)

จากงานวิจัยของ Hinton A.J (1999) พบว่า ความสามารถในการต้านการเจริญของ โซเดียมคลอไรด์ และ โพรพิโอนิค แอซิด ที่มีต่อ *Salmonella* typhimurium ST-10 ที่เลี้ยงใน Brain Heart Infusion จะมีผลเพิ่มขึ้นเมื่อ ใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันในระดับสูง โดยผลร่วมกันนี้มีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อมากกว่าผลของสารตัวใดตัวหนึ่ง เพียงตัวเดียว

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ การประยุกต์ใช้ Gompertz equation ในการทำนายการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

งานวิจัยของ Thomas P.O (1999) ที่ได้พยายามสร้าง Response surface model จากการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ใน เนื้อออกไก่บดที่ผ่านการปรุงสุกแล้วโดยศึกษาผลร่วมกันของอุณหภูมิในการทดลอง และอุณหภูมิก่อนการทดลอง ที่มีต่อค่า Lag time(λ) และ Specific Growth rate (μ) ผลการทดลองสามารถสร้างแบบจำลองทั้งสองได้และ แสดงได้ว่าแบบจำลองสามารถ

ทำนายค่าทั้งสอง ในเชื้อทดสอบได้ และยังพบอีกว่าอุณหภูมิก่อนการทำการทดลอง ไม่ใช่ ปัจจัยหลักที่มีต่อการเจริญของเชื้อ

งานวิจัยของ Afshin A.B และ Vadood R. (2004) ในการสร้างแบบจำลอง เพื่อทำนาย Growth Kinetics parameter ของ *Salmonella* Typhimurium ได้ทำการศึกษาค่าของ Time to detect (TTD)หรือเวลาที่สามารถตรวจพบเชื้อ และค่า log P % หรือเปอร์เซ็นต์ที่เชื้อสามารถเจริญเพิ่มขึ้นได้ ในสภาวะที่ได้รับอิทธิพลจาก 4 ปัจจัย คือ pH , โซเดียมคลอไรด์ โพแทสเซียมซอร์เบท และอุณหภูมิ พบว่า ค่า TTD ได้รับอิทธิพลของ pH โพแทสเซียมซอร์เบท และ อุณหภูมิ อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่ได้รับอิทธิพลจาก โซเดียมคลอไรด์ ส่วนค่าของ เปอร์เซ็นต์ที่เชื้อสามารถเจริญเพิ่มขึ้นได้ (log P %)ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทุกตัว และพบว่า การทำนายใน TTD model มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.91 จะแสดงผลการทำนายได้ดีกว่า log P % (R^2 = 0.73)

งานวิจัยของ Dickson J.S., Siragusa G.R. และ Wray J.E (1992) ได้สร้างแบบจำลองทำนายการเจริญของ *Salmonella* Typhimurium ที่ได้รับอิทธิพลจากช่วงเวลาในการทำให้เย็น (Cooling time) ภายใต้สภาวะการแช่แข็งซากสัตว์ โดยศึกษาจาก Growth Kinetics parameter 2 ค่า คือค่าของ Lag time และ Generation Time พบว่า สามารถทำนายการเจริญของเชื้อในสภาวะที่อุณหภูมิลดลงได้เป็นอย่างดี และสามารถเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนาย และค่าที่ได้จากการสังเกตในการทดลอง พบว่าค่าทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

งานวิจัยของ Zhao.L., Montville T.J และ Schaffner. D.W. (2001) ได้ศึกษาถึงผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น pH และ โซเดียมคลอไรด์ ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Clostridium botulinum* 56 A และสร้างแบบจำลองการเจริญเพื่อศึกษา เวลาในการตรวจพบเชื้อ (Time to detect) และเปอร์เซ็นต์ในการพบว่าเชื้อเริ่มเจริญขึ้น (% Growth positive) พบว่า เมื่อ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเพิ่มขึ้น % Growth positive จะลดลง ในขณะที่ Time to detect จะเพิ่มขึ้น และกล่าวได้ว่า Maximum growth rate ของ เชื้อจะไม่ขึ้นกับค่าของ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น คือเป็นอิสระต่อกันนั่นเอง

งานวิจัยของ Koutsoumanis.K., Lambropoulou. K., และ Nychas G-J. E. (1998)ได้ทำการศึกษาถึงผลร่วมกันของ อุณหภูมิในการเก็บรักษา pH และ สารต้านการเจริญของเชื้อจากธรรมชาติ คือ Oregano oil ในผลิตภัณฑ์ Taramasalad ซึ่งเป็นอาหารของชนชาติกรีก และทำการศึกษากับ *Salmonella* Enteritidis ข้อมูลจากการทดลองถูกนำมาศึกษา ถึง Growth kinetic parameter คือ Death rate และ Death response พบว่า Death rate และ Death response ต่างได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทั้ง 3 ค่าอย่างมีนัยสำคัญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved