

## บทที่ 2

### เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ความสำคัญ และความเป็นมาของ *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*) เป็นที่รู้จักว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์มากกว่า 70 ปี (Murray et al.,1996) แต่ยังไม่ได้รับความสำคัญมากนักในด้านของทางอุตสาหกรรมอาหาร จนเมื่อระยะ 20-30 ปีที่ผ่านมา ที่พบว่ามีการถ่ายทอดผ่านทางอาหาร และทำให้เกิดโรคในมนุษย์ โดยเป็นสาเหตุของโรค Febrile gastroenteritis

*L.monocytogenes* จัดอยู่สกุล *Listeria* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น ขนาดประมาณ 0.45-0.5 x 0.5-2.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส โดยใช้แฟลกเจลลา ชนิด peritrichous เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญเพิ่มจำนวนทั้งในสภาวะที่ใช้อากาศ และใช้อากาศเพียงเล็กน้อย (facultatively anaerobic) ประกอบด้วย 13 ซีโรไทป์ คือ 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c 4d, 4e และ 7 โดยบ่งชี้ความแตกต่างจากชนิดของ O factor และ H factor (Seeliger and Hohes,1979) โดยทุกซีโรไทป์มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค Listeriosis แต่ซีโรไทป์ที่พบบ่อย คือ 1/2a, 1/2b หรือ 4b

ตารางที่ 1: คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *L.monocytogenes* และ *Listeria spp.* (ICMSF,1996)

species	$\beta$ -haemolysis	การสร้างกรดจากน้ำตาล		
		L-Rhamnose	D-Xylose	D-Mannitol
<i>L.monocytogenes</i>	+	+	-	-
<i>L.innocua</i>	-	+/-	-	-
<i>L.ivanovii</i>	++	-	+	-
<i>L.welshimeri</i>	-	+/-	+	-
<i>L.seeligeri</i>	+ <sub>weak</sub>	-	+	-
<i>L.grayi</i>	-	-	-	+

จากที่ *L.monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม (ubiquitous bacterium) เช่น สิ่งปฏิกูล ดิน ซากพืชที่เน่าเปื่อย มูลสัตว์ทั้งสัตว์ป่า และสัตว์เลี้ยง หรือแม้กระทั่งในมูลสัตว์ของนก หรือสัตว์ปีก ดังนั้นจึงทำให้สามารถพบได้ในอาหารดิบ (raw food) หลายชนิด *L.monocytogenes* สามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้ 3 ทาง คือ สัมผัสกับสัตว์โดยตรง รับเชื้อข้ามจากทารกแรกเกิดในโรงพยาบาล และผ่านทางอาหาร โดย *L.monocytogenes* อาจพบในลำไส้ของคน สุขภาพปกติได้แบบชั่วคราว โดยจากการศึกษาของ Muller (1990) พบว่าสามารถแยกพบ *L.monocytogenes* จากอุจจาระของคนงานสุขภาพปกติในไลน์ผลิตอาหารจำนวน 2,000 คน ที่อัตราร้อยละ 0.8 แม้จะสามารถรับจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้หลายทาง แต่ที่สัมพันธ์กับการทำให้เกิดโรค listeriosis ในมนุษย์เป็นส่วนใหญ่ ก็คือการรับ *L.monocytogenes* จากการปนเปื้อนมากับอาหารที่บริโภคประจำวัน

*L.monocytogenes* จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม psychrotropic ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส แต่จะสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาอาหาร ทั่วไปจะอยู่ในช่วง 0-8 องศาเซลเซียส แม้จะมีการเจริญได้ในอัตราที่ต่ำในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว แต่ในอาหารที่ไม่มีคุณลักษณะที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L.monocytogenes* เช่น ค่าพีเอช จะทำให้อายุการเก็บอาหาร (shelf life) สั้นลง หรือบางครั้งอายุของอาหารอาจมากพอที่จะทำให้ *L.monocytogenes* เพิ่มจำนวนจนกระทั่งอยู่ในระดับที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้

ตารางที่ 2: แสดงอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีปัจจัยกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Mossel et al.,1995)

Lag time (ระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้ปรับสภาพเซลล์ในสิ่งแวดล้อมที่อาศัยก่อนการแบ่งเซลล์)					
อุณหภูมิ (°C)	0-1	2-3	5-6	7-8	9-10
เวลา (วัน)	3-33	2-8	1-3	2	<1.5
Generation time (เวลาที่จุลินทรีย์ใช้สำหรับแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า)					
อุณหภูมิ (°C)	0-1	4-5	10-13		
เวลา (ชั่วโมง)	62-131	13-25	5-9		

โดยปกติ *L.monocytogenes* จะมีความสามารถเจริญได้ในอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในของอาหาร เช่น ค่าพีเอช ปริมาณน้ำใช้ได้ หรือสารประกอบของอาหาร และสภาวะที่อาหารชนิดนั้นๆถูกเก็บรักษา อย่างไรก็ตามถึงแม้ *L.monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในอาหารที่เก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิต่ำกว่าสภาวะที่สามารถเจริญเพิ่มจำนวน แต่ยังคงพบว่าจุลินทรีย์ก่อโรคดังกล่าวสามารถอยู่รอดได้ (survive) ในอาหารเป็นเวลานาน โดย International Commission on Microbiological Specifications for Food รายงานในปี 1996 ว่า *L.monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในเนื้อหมูด ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส สามารถอยู่รอดได้มากกว่า 6 เดือน หรือในเนื้อดิบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถอยู่รอดได้มากกว่า 14 วัน ขณะที่ Lund (2000) รายงานว่า *L.monocytogenes* อยู่รอดได้ใน ice cream และ Ewes' milk ที่ -18 องศาเซลเซียส มากกว่า 5 เดือน และ 7 เดือน ตามลำดับ

ตารางที่ 3 : สภาวะที่ *L.monocytogenes* สามารถเจริญ และอยู่รอดได้ (ICMSF,1996)

ปัจจัย	ช่วงต่ำสุด	ช่วงที่เหมาะสม	ช่วงสูงสุด
อุณหภูมิ (°C)	-0.4	37	45
ความเป็นกรดต่าง	4.4	7.0	9.4
ความทนเกลือ (%)	N/A*	10	25% ที่ 4 °C
ออกซิเจน (%)	N/A	5	N/A
ปริมาณน้ำใช้ได้	0.90	0.92	0.97

\* N/A : Not applicable

## 2.2 โรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis)

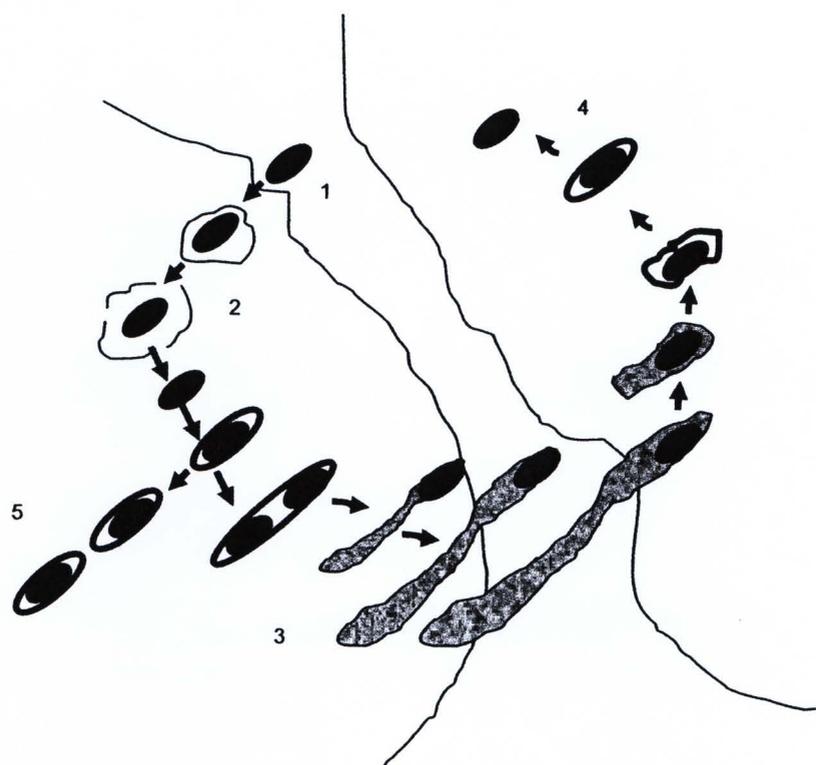
โรค Listeriosis มีรายงานครั้งแรกในปี 1953 หลังจากเกิดกรณีทารกคลอดก่อนกำหนด ที่สัมพันธ์กับมารดาที่บริโภคน้ำนมดิบจากวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (mastitis) และเป็นที่ยอมรับมากขึ้นเมื่อเกิดระบาดครั้งรุนแรง ในช่วงทศวรรษที่ 1980 ในอเมริกาเหนือ และยุโรป ซึ่งมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อน *L.monocytogenes* ในอาหาร โรค Listeriosis แบ่งตามลักษณะทางคลินิกได้เป็น 2 ประเภท คือ invasive listeriosis และ non-invasive listeriosis โดย invasive listeriosis จะเกิดการติดเชื้อที่เนื้อเยื่อลำไส้ แล้วสามารถรุกรานไปยังส่วนอื่นๆ ซึ่งผู้ป่วยจะมีโอกาสเสียชีวิตสูง ส่วนประเภท non-invasive listeriosis ผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการท้องร่วง มีไข้ ปวดศีรษะ และปวดกล้ามเนื้อ (Aureli et al.,2000)

ผู้ป่วยจะได้รับ *L.monocytogenes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สาเหตุของโรค จากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน *L.monocytogenes* เป็นทางหลัก โดยอุบัติการณ์การเกิดโรค Listeriosis ในกลุ่มประชากรอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น อาทิ โรคซัลโมเนลโลซิส (salmonellosis) หรือ แคมไพโลแบคเทอริโอซิส (campylobacteriosis) แต่อย่างไรก็ตามโรสดังกล่าวจะมีอัตราการตายของผู้ป่วยสูง โดยเฉพาะหากเกิดกับกลุ่มประชากรจำเพาะ คือ หญิงมีครรภ์ ทารกแรกเกิด ผู้สูงอายุ หรือผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือไม่สมบูรณ์ ลักษณะกลุ่มอาการของโรค Listeriosis คือ การติดเชื้อในกระแสเลือด การเกิดเยื่อสมองอักเสบ หรือ เยื่อสมองร่วมกับไขสันหลังอักเสบ (meningoencephalitis) (McLauchlin,1993) ในผู้หญิงตั้งครรภ์หากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จะทำให้เกิดภาวะแท้ง หรือคลอดก่อนกำหนด หรือทารกมีความผิดปกติ เนื่องจากติดเชื้อที่ตัวอ่อน ทารกแรกเกิดที่ติดเชื้อ *L.monocytogenes* จะมีอัตราการเสียชีวิตสูงประมาณร้อยละ 35 ส่วนโรค Listeriosis แบบ milder form จะทำให้เกิดอักเสบของลำไส้ และกระเพาะอาหาร (Salamina et al.,1996)

กลไกการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจาก *L.monocytogenes* มีความซับซ้อนขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระดับภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน จำนวนของเซลล์ที่รับเข้าสู่ร่างกาย และความรุนแรงของสายพันธุ์ของ *L.monocytogenes* แต่เชื่อว่า Listeriolysin O คือปัจจัยหลักที่บ่งชี้ความรุนแรงของ *L.monocytogenes* (Kathariou, 2002)

กระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ และการแพร่กระจายขึ้นอยู่กับระดับภูมิคุ้มกันของผู้รับเชื้อ (T cell mediated immunity) หลังจากการรับ *L.monocytogenes* เข้าสู่ร่างกายโดยปนเปื้อนมากับอาหารที่บริโภค แล้วไปก่อตัวอยู่ที่เยื่อผนังลำไส้ ซึ่งแต่ละขั้นตอนในกระบวนการจะต้องอาศัย virulence factor ที่จำเพาะ (Domann et al., 1992; Marquis et al., 1995; Gaillot et al., 2000; Dramsi et al., 1997, 2004) ดังนี้

- 1) internalin ควบคุมด้วยยีน *inl* ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการรุกราน (invasion) epithelial cells ของ *L.monocytogenes* โดยโปรตีน internalin จะมีความจำเพาะกับ receptor บนผิวเซลล์ของ macrophages จะเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกิน (phagocytosis) ของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell)
- 2) listeriolysin O ควบคุมด้วยยีน *hlyA* และ phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) ควบคุมด้วยยีน *plcA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการทำให้เกิดการแตก (lysis) ของ phagosome ก่อนเกิด phagolysosome fusion เพื่อให้ *L.monocytogenes* รอดจากการถูกทำลาย และออกมาเพิ่มจำนวนใน cytoplasm
- 3) act A-protein ควบคุมด้วยยีน *actA* เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเคลื่อนที่ไปยังเซลล์อื่น (direct cell-to-cell) โดยส่งเสริมการสร้าง actin ซึ่งทำให้ *L.monocytogenes* สามารถรุกรานไปยังเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ (intracellular) อื่นๆ ได้
- 4) เอนไซม์ต่างๆ เช่น lecithinase, zinc metal protease และ serine protease
- 5) Fibronectin-binding protein (FbpA) จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อตัว (colonization) ที่ลำไส้ และตับ ซึ่งตับจะเป็นอวัยวะเป้าหมายหลักในการรุกราน ขณะที่ *L.monocytogenes* มีการแบ่งตัวที่ตับ หรือม้าม มีอาการหนาวสั่น และมีไข้



รูปที่ 1 : กระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของ *L. monocytogenes*.. : (1) *L. monocytogenes* บุกรุกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (2) ออกจาก phagosome โดยการทำงานของ listeriolysin O และ phospholipase C แล้วเพิ่มจำนวนภายใน cytoplasm (3) แพร่กระจายไปยังเซลล์อื่นๆ โดยใช้ actin filaments.

จากเหตุผลที่ว่า การแพร่กระจายของ *L. monocytogenes* ในร่างกายจะขึ้นอยู่กับระบบภูมิคุ้มกันของผู้ที่ได้รับ *L. monocytogenes* เป็นสำคัญ ดังนั้นโรคนี้จึงส่งผลกระทบต่อประชากรบางกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อโรคมากกว่าประชากรทั่วไป เช่น เด็กทารก คนสูงอายุ และหญิงมีครรภ์ โดย Armstrong (1995) รายงานว่า จากเอกสารทางการแพทย์มีผู้ป่วยด้วยโรค Listeriosis เป็นหญิงตั้งครรภ์ ประมาณร้อยละ 33 รวมถึงผู้ป่วยหรือผู้ที่มีความบกพร่องทางระบบภูมิคุ้มกัน ก็มีความเสี่ยงต่อโรค Listeriosis สูงเช่นกัน Farber และ Peterkin (2000) พบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรค listeriosis จำนวน 200 คน เป็นผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะเป็นโรคมะเร็งร้อยละ 61 ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะร้อยละ 15 ผู้ป่วยโรคเบาหวานร้อยละ 24 ผู้ป่วยตับอักเสบ และผู้ป่วยโรค AIDS ร้อยละ 5 เป็นต้น จะเห็นว่าทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่มีภาวะของระบบภูมิคุ้มกันไม่สมบูรณ์ทั้งสิ้น



ตารางที่ 4: ตัวอย่างการระบาดของโรค Listeriosis ในผู้บริโภคร (McLauchlin et al.,2004)

ประเทศ	ปี	อาหาร	จำนวนผู้ป่วย	จำนวนคนตาย	ซีโรไทป์
USA	1976	Raw salad	20	5	4b
New Zealand	1980	Fish	22	7	1/2a
Canada	1981	Coleslaw	41	18	4b
USA	1983	Milk	49	14	4b
USA	1985	Soft cheese	142	30	4b
Switzerland	1983-1987	Soft cheese	122	34	4b
UK	1987-1989	Pate	355	94	4b
France	1993	Pork tongue in aspic	279	-	4b
France	1993	Pork rillettes	38	10	4b
USA	1994	Milk	45	0	1/2b
Sweden	1994-1995	Fish	9	2	4b
France	1995	Soft cheese	17	4	4b
Canada	1996	Crab meat	2	0	1/2a
Italy	1997	Salad	1566	0	4b
USA	1998-1999	Hot dog	50	>8	4b
Finland	1998-1999	Butter	25	6	3a
Finland	1999	Fish	5	-	1/2a
France	1999-2000	Pork rillettes	10	2	4b
France	1999-2000	Pork tongue in jelly	32	10	4b
USA	2000	Turkey meat	29	7	-
Switzerland	2005	Soft cheese	3	1	-

จากข้อมูลตัวอย่างการระบาดในช่วงปี 1976 ถึง 2005 จะเห็นได้ว่า *L.monocytogenes* ที่พบจะเป็นซีโรไทป์ 4b เป็นส่วนใหญ่ โดยมีอัตราการเจ็บป่วย และอัตราการเสียชีวิตค่อนข้างสูง (McLauchlin et al.,2004) อีกทั้งขนาดการก่อให้เกิดการเจ็บป่วย (infectious dose) ของ *L.monocytogenes* จะอยู่ในระดับต่ำ ในผู้ป่วยบางรายมีรายงานว่าได้รับ *L.monocytogenes* เพียงแค่ 100 เซลล์เท่านั้น



### 2.3 การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

จากที่ *L.monocytogenes* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม จึงมักพบการปนเปื้อนในผัก นมพาสเจอร์ไรส์ และ soft cheese รวมถึงพบมีการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ดิบทั้งประเภทเนื้อไก่ และเนื้อวัว เนื่องจากธรรมชาติของเนื้อสัตว์ดิบจะมีระดับปริมาณน้ำใช้ได้สูง (มากกว่า 0.98) มีค่าพีเอชอยู่ในระดับกลาง (5.5-6.5) และเป็นแหล่งพลังงาน คาร์บอน และสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Varnam and Sutherland,1985) ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารจากเนื้อสัตว์ถือว่า *L.monocytogenes* เป็นปัญหาหลักของกระบวนการผลิต โดยจะเห็นว่ามีความเสี่ยงที่จะเกิดการปนเปื้อนในอาหารได้ในทุกขั้นตอนของการผลิต เนื่องจาก *L.monocytogenes* สามารถก่อตัว และอยู่รอดได้บนพื้นผิวของอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ หรือบริเวณผนังเป็นระยะเวลาอันยาวนาน สามารถทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อต่างๆ อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ชนิดนี้คุณสมบัติที่สามารถสร้าง biofilm ได้ (Chasseingnaux et al.,2002, Giovannacci et al.,2000, Herald and Zottola,1998) นอกจากนี้ *L.monocytogenes* เป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานการปนเปื้อนในอาหารประเภทพร้อมบริโภค (ready-to-eat ; RTE) ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเพื่อขยายอายุการเก็บของอาหาร ซึ่งเป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในกระบวนการผลิต (Roberts et al.,1996 และ Bell and Kyriakides,2002) โดยเชื่อว่าเป็นการปนเปื้อนภายหลังกระบวนการผลิต (post contamination) การที่ *L.monocytogenes* มีคุณสมบัติสามารถดำรงชีวิต และเจริญได้ที่อุณหภูมิในตู้เย็น ช่วงอุณหภูมิ 0-8 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่อสารนอมอาหารต่างๆได้เป็นอย่างดี (อ้างถึงโดย Gandhi and Chikindas, 2007) นอกจากนี้จะเป็นปัจจัยหลักที่ต้องมีการควบคุมแล้ว มีอีกหนึ่งปัจจัยที่ต้องให้ความสนใจคือ ผู้บริโภคบางรายจะมีพฤติกรรมกรบริโภคอาหารประเภท RTE โดยไม่ผ่านความร้อนซ้ำ (reheat) โดยเฉพาะอาหารกลุ่มไส้กรอก และผลิตภัณฑ์ปรุงสุกจากเนื้อสัตว์ (deli meat) ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารในกลุ่มนี้ จะมีความเสี่ยงเพิ่มมากขึ้นถ้ามีการปนเปื้อนจาก *L.monocytogenes* ที่จำนวนเริ่มต้นในระดับที่ต่ำมากๆ ซึ่งอาจทำให้ตรวจไม่พบทันทีหลังผ่านกระบวนการผลิตจากโรงงาน จะเห็นได้จากรายงานการตรวจพบ *L.monocytogenes* ร้อยละ 0.89 ถึง 3.5 ในอาหารผลิตภัณฑ์ปรุงสุกจากเนื้อสัตว์ (Gombas et al.,2003)

Busani และคณะ (2005) ได้สำรวจอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* เกินมาตรฐานอาหารในอาหารที่ผลิตมาจากสัตว์ โดยประเทศอิตาลีกำหนดมาตรฐานอาหารไว้คือ ห้ามพบ *L.monocytogenes* ในอาหาร 25 กรัม สำหรับอาหารประเภท RTE ส่วนในอาหารที่ต้องปรุงสุกก่อนบริโภค ให้พบ *L.monocytogenes* ได้ไม่เกิน 110 โคโลนีต่อกรัม ระหว่างปี 2001-2002 พบว่าจากจำนวนตัวอย่างอาหาร 42,300 ตัวอย่าง ตรวจพบ *L.monocytogenes* คิดเป็นร้อยละ 2.4 โดยเป็นอาหารที่ผลิตมาจากเนื้อหมู ร้อยละ 10.3 เนื้อวัว ร้อยละ 64 เนื้อไก่ ร้อยละ 1.9 และจากปลาร้อยละ 6.5 นอกจากนี้ยังมีรายงานอุบัติการณ์ในอาหารจากแหล่งอื่นๆ ตามรายละเอียดในตารางที่ 5 (Bell and Kyriakides, 2005)

ตารางที่ 5: รายงานอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในอาหาร

แหล่งของตัวอย่าง	อุบัติการณ์(%)	อ้างอิง
USA		
Raw cows' milk from farm bulk tanks	12/292 (4.1)	Rohrbach et al. (1992)
UK		
Raw cows' milk from farm bulk tanks	102/2009 (5.1)	O'Donnell (1995)
UK		
Raw cows' drinking milk	32/1591 (2)	Anon. (1998a)
Spain		
Raw caprine milk	37/1445 (2.56)	Gaya et al. (1996)
Sweden		
Soft and semi soft cheeses	20/333 (6)	Loncarevic et al. (1995)
UK		
Ready to eat foods:		
Raw salad vegetable ,pre-packed	77/2123 (3.6)	Little et al. (1997a)
Crudités, pre-packed	2/242 (0.8)	
Spain		
Ready to use mixed vegetable salads	21/70 (30)	Garcia-Gimeno et al (1996)
USA		
Vegetable salads	1/63 (1.6)	Lin et al. (1996)

ตารางที่ 5: รายงานอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในอาหาร (ต่อ)

แหล่งของตัวอย่าง	อุบัติการณ์(%)	อ้างอิง
Malaysia		
Raw chicken portions	19/32 (59)	Arumugaswamy et al (1994)
Raw beef	6/12 (50)	
Fresh prawns-raw	7/16 (44)	
Leafy vegetable	5/22 (23)	
Ready to eat squid, prawns, chicken and clams	6/27 (22)	
Italy		
Fresh ground beef, fresh pork and sausages	65/490 (13.3)	Comi et al (1992)
Denmark		
Raw fish	33/232 (14.2)	Norrung et al. (1999)
Raw meat	106/343 (30.9)	
Brazil		
Dressed lamb carcasses	3/69 (4.3)	Antoniollo et al. (2003)
USA		
Raw meats:		Amoril and bhunia (1999)
Ground beef and steak	6/20 (30)	
Poultry-regular-cut chicken and skinless-boneless chicken	7/20 (35)	
Ground pork	171/340 (50.2)	
Northern Ireland		
Raw chicken (retail)	14/80 (17.5)	Kanuganti et al. (2002)
France		
Breton live shellfish	11/120 (9.2)	Monfort et al. (1998)
UK		
Cooked, ready to eat, out of shell molluscs	221/2425 (9.1)	Little et al. (1997b)

ตารางที่ 5: รายงานอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในอาหาร (ต่อ)

แหล่งของตัวอย่าง	อุบัติการณ์(%)	อ้างอิง
USA		
Ready to eat meat and poultry products (USDA-FSIS testing program 1999)		Anon. (2000a)
Large sausage	(0.4)	
Small sausage	(1.8)	
Cooked poultry	(1.4)	
Salads/spreads	(1.1)	
Sliced ham/pork	(4.6)	
Fermented sausage	(2.1)	
Argentina		
Seafood (hake, mackerel, squid, mussel)	3/100 (3)	Laciar and de Centorbi (2002)
USA		
Crawfish (raw, whole)	3/78 (3.8)	Thimothe et al. (2002)
UK		
Ready to eat meat:		Elson et al. (2004)
Sliced meats	61/2894 (2.1)	
Pate	22/1184 (1.86)	
USA		
Ready to eat foods:		Gombas et al. (2003)
Bagged salads	22/2966 (0.74)	
Smoked seafood and seafood salads	229/5090 (4.5)	
Deli salads	202/8549 (2.36)	
Cheeses	42/5901 (0.71)	
Luncheon meat	82/9199 (0.89)	
Denmark		
Samples examined at the end of commercial shelf life:		Jorgensen and Huss (1998)

ตารางที่ 5: รายงานอุบัติการณ์การปนเปื้อนของ *L.monocytogenes* ในอาหาร (ต่อ)

แหล่งของตัวอย่าง	อุบัติการณ์(%)	อ้างอิง
Cold smoked salmon	(40)	Jorgensen and Huss (1998)
Cold smoked halibut	(60)	
Gravad salmon and halibut	(25)	
Heat-treated seafood	(12)	
Spain		
Prepared salads	15/146 (10.3)	De Simon and Ferrer (1998)
Prepared meals:		
Vegetables	8/217 (3.7)	
Meat, Poultry	16/324 (4.9)	
Seafoods	2/137 (1.4)	
Denmark		
Preserved fish products not heat-treated	35/335 (10.4)	Norrung et al. (1999)
Preserved meat product not heat-treated	77/328 (23.5)	
	45/772 (5.8)	
Heat-treated meat product	670/7703 (8.7)	
Prepared retail foods including meat, fish, vegetable and cheese product (LM>10/g.)		
Korea		
Frozen, smoked mussels –imported	3/68 (4.4)	Baek et al. (2000)
Ice cream-imported	8/132 (6.1)	
Domestic foods	111/1337 (8.3)	
Finland		
Fish roe (rainbow trout, white fish, vendace, burbot), fresh, frozen or frozen-thawed	7/147 (4.8)	Miettinen et al. (2003)

จากข้อมูลการสำรวจอุบัติการณ์ของ *L.monocytogenes* ในอาหารจากตารางที่ 5 จะเห็นว่าสามารถตรวจพบ *L.monocytogenes* ได้ในอาหารหลากหลายชนิด และส่วนใหญ่จะเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่มีต้นกำเนิดมาจากสัตว์ ซึ่งเนื้อสัตว์เป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโอกาสเน่าเสียง่าย ยกเว้นมีการจัดการที่ถูกต้องสำหรับการเก็บรักษา การผลิต การบรรจุ และการขนส่ง ซึ่งการเน่าเสียจะมีสาเหตุมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ และนำมาถึงอันตรายที่อาจเกิดกับผู้บริโภค โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารโดยไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติกับสภาพอาหารปกติ หรือจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษได้ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์มีผลเกิดจากสภาพของสัตว์ก่อนถูกฆ่า วิธีการฆ่า และการจัดการภายในโรงฆ่าเกี่ยวกับการรักษาซาก (Jackson et al.,1997) ขณะที่การเกิดการปนเปื้อน *L.monocytogenes* ภายหลังกระบวนการทำสุกแล้ว ความเสี่ยงนี้จะลดลงถ้ามีกระบวนการล้างและฆ่าเชื้อที่บริเวณ food contact surface อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งการควบคุมให้มีกระบวนการผลิตอาหารอย่างถูกสุขลักษณะ ตามหลัก good sanitary practices

แม้ว่า *L.monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ -0.4 จนถึง 45 องศาเซลเซียส แต่ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเจริญ โดย ICMSF (1996) รายงานถึงขอบเขตการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่มีปัจจัยกระทบเป็นอุณหภูมิ ค่าพีเอช และปริมาณน้ำใช้ได้ ดังนี้

ตารางที่ 6 : สภาวะจำกัดการเจริญของ *L.monocytogenes* (ICMFS, 1996)

	ต่ำสุด	เหมาะสม	สูงสุด
อุณหภูมิ (°C)	-0.4	37	45
pH	4.39	7.0	9.4
NaCl	-	-	10%
ปริมาณน้ำใช้ได้	0.90 (glycerol,30°C)	-	-
ปริมาณน้ำใช้ได้	0.92 (NaCl)	-	-
ปริมาณน้ำใช้ได้	0.93 (sucrose)	-	-

แต่การเจริญของ *L.monocytogenes* ในอาหารจริงๆ จะมีความจำเพาะมากกว่าข้อมูลในตารางที่ 6 เนื่องจากในอาหารจะมี interactions ของปัจจัยเหล่านี้ Farber และ Hartwig (1996) สรุปว่า สภาวะที่ *L.monocytogenes* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร ready to eat (RTE) มี 3 สภาวะ คือ อาหารมีสภาวะ ของค่าพีเอช อยู่ในช่วง 5.9-5.5 และปริมาณน้ำใช้ได้ น้อยกว่า 0.95 หรือ พีเอช น้อยกว่า 5.0 โดยไม่ต้องคำนึงถึงค่าปริมาณน้ำใช้ได้ของอาหาร หรือ ค่าปริมาณน้ำใช้ได้ในอาหาร น้อยกว่า 0.92 โดยไม่ต้องคำนึงถึงค่าพีเอช นอกจากนี้ลักษณะตามธรรมชาติของอาหารชนิดนั้นๆ ก็มีผลต่อการเจริญของ *L.monocytogenes* ต่างกัน โดยพบว่าเนื้อไก่จะมีคุณสมบัติส่งเสริมให้ *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ดีกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่น (Glass and Doyle, 1989) รวมถึง พื้นฐานด้านจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) (Farber and Peterkin, 1991)

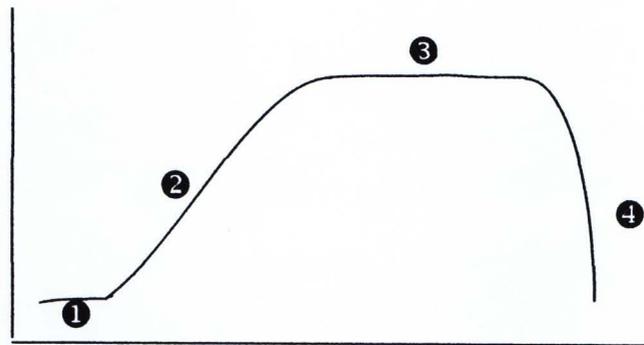
## 2.4 วิธีสำหรับการวัดการเจริญของจุลินทรีย์

การเจริญ (growth) ในทางจุลชีววิทยา หมายถึง การทวีจำนวนของจุลินทรีย์ ซึ่งถือว่าเป็น การเปลี่ยนแปลงในด้านปริมาณ มากกว่าการเพิ่มขนาดของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็นผลมา จากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และฟิสิกส์ภายในเซลล์ การเจริญเติบโตของประชากรนั้นสามารถที่ จะตรวจสอบได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ หรือมวลชีวภาพ (biomass) ของ ประชากรต่อหนึ่งหน่วยเวลา ซึ่งเรียกว่า "อัตราการเจริญ" (growth rate) เวลาที่ใช้ในการเพิ่ม จำนวนประชากรจากเดิมเป็น 2 เท่า เรียกว่า generation time หรือ doubling time โดยขึ้นอยู่กับ ชนิดของจุลินทรีย์ และนสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่

การเจริญของจุลินทรีย์สามารถศึกษาได้จากเส้นโค้งการเจริญ (growth curve) โดยที่ typical growth curve แบ่งออกเป็น 4 ระยะ (ตามรูปที่ 2) คือ

1. lag phase เซลล์จะอยู่ในช่วงการปรับตัวก่อนแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน
2. log phase เซลล์มีการเจริญอย่างเต็มที่ จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ (exponential)
3. stationary phase อัตราการเพิ่มมวลชีวภาพเป็น 0 หรืออัตราการเพิ่มเท่ากับอัตราการตาย
4. decline หรือ death phase อัตราการเพิ่มจำนวนน้อยกว่าอัตราการตาย

จำนวนจุลินทรีย์ (logCFU)



เวลา

รูปที่ 2: typical growth curve ของจุลินทรีย์ เปรียบเทียบระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ กับเวลา

การทวีจำนวนโดยวิธี binary fission ของแบคทีเรียจะทำให้จำนวนของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นแบบอนุกรมเรขาคณิต วิธีการวัดการเจริญของแบคทีเรียมีหลายวิธีด้วยกัน คือ

1. Counting chamber method เป็นการนับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งใช้สไลด์ที่เรียกว่า Petroff Hausser ที่ทำเป็นร่อง ซึ่งทราบขนาดของความกว้างและความลึก เมื่อหยด suspension ของแบคทีเรียแล้วปิดด้วย cover slide นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope หรือแบบ phase microscope นับจำนวนแบคทีเรียที่พบแล้วคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรใน suspension ได้ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทราบจำนวนแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว และสามารถสังเกตลักษณะของแบคทีเรียที่นับได้ด้วย ข้อเสียคือ เป็นการนับเซลล์แบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งไม่สามารถแยกได้ว่าแบคทีเรีนั้นมีชีวิตหรือไม่ และไม่เหมาะที่จะนับจำนวนแบคทีเรียใน suspension ที่มีปริมาณมากหรือน้อยเกินไป
2. plate count technique เป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ มี 2 วิธี คือ วิธีแรกเรียก pour plate โดยการนำ suspension ของแบคทีเรียจำนวนหนึ่งใส่จากเพาะเชื้อแล้วใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวลงไป เขย่าให้เชื้อแพร่กระจาย ทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่มเชื้อ ส่วนวิธีที่สองเรียกว่า spread plate โดยนำจานเพาะเชื้อที่เทอาหารทิ้งไว้จนแข็ง หยด suspension ของแบคทีเรียลงไป แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัว L เกลี่ยให้เชื้อแพร่กระจาย นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิเหมาะสม ประมาณ 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ได้

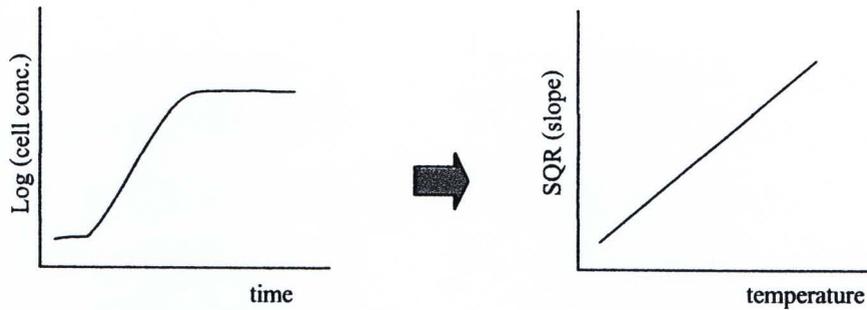
โดยถือว่าแบคทีเรียแต่ละกลุ่มเซลล์ได้มาจากการประมาณ 30-300 โคโลนี เท่านั้น ถ้ามีมากกว่านี้ต้องนำ suspension มาทำให้เจือจางเสียก่อน ข้อดีของวิธีนี้เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียที่ถูกต้อง เพราะนับเฉพาะแบคทีเรียที่มีชีวิตเท่านั้น นอกจากนี้ยังทำได้ง่าย รวดเร็ว ส่วนข้อเสียคือ แต่ละกลุ่มเซลล์ของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น บางครั้งอาจไม่ได้เกิดจากเซลล์เดียว แต่เกิดจากหลายๆเซลล์ที่อยู่ใกล้กัน มีการเจริญและทวีจำนวนจนเกิดเป็นกลุ่มเซลล์เดียวกันได้ ดังนั้นจำนวนแบคทีเรียที่ได้จึงน้อยกว่าจำนวนที่เป็นจริง

3. การวัดความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียใน suspension โดยใช้เครื่องวัดที่เรียกว่า spectrophotometer ซึ่งใช้หลักการฉายแสงผ่าน suspension ของแบคทีเรีย แสงส่วนหนึ่งจะถูกเซลล์แบคทีเรียดูดซับไว้ ซึ่งปริมาณแสงที่ถูกดูดซับจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับขนาดของเซลล์หรือจำนวนแบคทีเรีย กล่าวคือ เซลล์แบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่จะดูดซับแสงไว้ได้มากกว่าเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า หรือ suspension ที่มีแบคทีเรียจำนวนมากจะดูดซับแสงไว้ได้มากกว่า suspension ที่มีจำนวนเซลล์น้อยกว่า การวัดปริมาณการเจริญของแบคทีเรียวิธีนี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นการดูความขุ่นของ suspension นั้นเอง ข้อดีของวิธีนี้คือทำได้สะดวก รวดเร็ว ส่วนข้อเสียคือเป็นการนับเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดซึ่งไม่สามารถแยกได้ว่าแบคทีเรียนั้นมีชีวิตหรือไม่
4. วัดหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ วิธีนี้เป็นการวัดการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำหนักของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นโดยนำ suspension ของแบคทีเรียไปทำให้แห้งและต้องไม่ให้มีสารอื่นๆเจือปนมาด้วย suspension ที่จะนำมาหาน้ำหนักของเซลล์นั้นจะต้องมีเซลล์แบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมาก วิธีนี้นิยมใช้มากในงานวิจัยทางจุลชีววิทยา
5. วัดปริมาณสารที่แบคทีเรียผลิตออกมา เช่น นำแบคทีเรียบางชนิดไปเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตส จะ ferment น้ำตาลให้ผลิตผลออกมาเป็นกรดหรือบางชนิด ferment น้ำตาลแล้วให้ก๊าซซึ่งก๊าซหรือกรดที่ได้นี้จะ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแบคทีเรีย กล่าวคือถ้ามีปริมาณก๊าซหรือกรดมากจะมีแบคทีเรียจำนวนมากด้วย

## 2.5 การสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับทำนายการเจริญของจุลินทรีย์

จุลชีววิทยาพยากรณ์ทางอาหาร (Predictive food microbiological) เป็นทางเลือกหนึ่ง ที่คาดว่าจะมีประโยชน์เป็นอย่างมากในงานทางด้านจุลชีววิทยาอาหาร ซึ่งจะใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ (mathematical model) มาอธิบายพฤติกรรมของการเจริญ หรือการตายของจุลินทรีย์ ภายใต้เงื่อนไขการอาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีปัจจัยจำเพาะที่แตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช และปริมาณน้ำใช้ได้ เป็นต้น จุลชีววิทยาพยากรณ์ เริ่มใช้ครั้งแรก โดย Esty และ Meyer (1922) ซึ่งเป็นผู้ใช้แบบจำลอง log linear มาอธิบายถึงอัตราการตายของ *Clostridium botulinum* type A โดยใช้ความร้อนทำลายสปอร์ และใช้ประเมินระดับความร้อนที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตอาหารประเภท low-acid canned ซึ่งแบบจำลองดังกล่าวจะอธิบายอุณหภูมิที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของแบคทีเรีย ณ ช่วงเวลาหนึ่ง ต่อมา Scott (1936) ได้ดำเนินการสืบสวนหาอัตราการตายจำเพาะที่สัมพันธ์กับปริมาณน้ำใช้ได้ และภายหลังได้ทำการศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่ออัตราการตายของจุลินทรีย์เพิ่มเติม ซึ่งก็คือทฤษฎีของ thermal inactivation ในปัจจุบัน และเชื่อว่าอัตราการตายจำเพาะในรูปเลขยกกำลัง จะลดลงเป็นเส้นตรงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

การพัฒนาแบบจำลองคณิตศาสตร์เพื่อทำนายอัตราการเจริญของแบคทีเรีย (Growth rate) ในอาหาร โดยทั่วไปจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ เริ่มจากการสร้างแบบจำลองการเจริญ (Growth curve) ของแบคทีเรีย ต่อสภาวะแวดล้อมที่สนใจศึกษา จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลองระดับปฐมภูมิ ในที่นี้ก็คือ อัตราการเจริญ lag time หรือ doubling time ว่ามีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะอย่างไร เมื่อมีปัจจัยกระทบในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน แล้วสร้างแบบจำลองมาอธิบาย (Mckellar and Lu, 2003)



รูปที่ 3: การพัฒนาแบบจำลองคณิตศาสตร์การทำนายการเจริญของจุลินทรีย์

แบบจำลองคณิตศาสตร์ของงานจุลชีววิทยาพยากรณ์ อ้างอิงตาม Buchanan และ Whiting (1993) ประกอบด้วย 3 ระดับ คือ

1. แบบจำลองระดับปฐมภูมิ (Primary model) เป็นแบบจำลองที่อธิบายการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ ที่สัมพันธ์กับเวลา ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่จำเพาะ พารามิเตอร์ คือ อัตราการเจริญ อัตราการตาย อัตราการอยู่รอด หรือระยะเวลาของ lag phase เป็นต้น ตัวอย่างแบบจำลองระดับนี้ เช่น Gompertz functions (Gibson et al., 1987) ลักษณะแบบจำลองเป็น sigmoidal function คล้ายเส้นโค้งการเจริญของจุลินทรีย์;

$$\log x(t) = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\}$$

โดย	$x(t)$	คือ	จำนวนของเซลล์ที่เวลา $t$
	$A$	คือ	จำนวนเซลล์ ณ จุดที่เมื่อ $t$ ลดลงเป็น 0
	$C$	คือ	ความต่างของจำนวนเซลล์ระหว่างจุดต่ำสุดกับสูงสุด
	$B$	คือ	อัตราการเจริญที่สัมพันธ์กับ $M$
	$M$	คือ	เวลาที่มีอัตราการเจริญสูงสุด

สมการของ Gompertz สามารถใช้วิเคราะห์ความเหมาะสมของเส้นโค้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลากหลาย เช่น *Yersinia enterocolitica* , *Staphylococcus aureus* , *L. monocytogenes* , *Vibrio parahaemolyticus* และ *Bacillus cereus* และสามารถปรับใช้กับเส้นโค้งการเจริญที่ได้จากข้อมูลความชุกของเซลล์ การเกิดการเน่าเสียในผัก หรือ

เนื้อสัตว์ รวมทั้งการงอกของสปอร์ และการเจริญของ *Clostridium botulinum* แต่สมการของ Gompertz มีข้อจำกัด คือ อัตราการเจริญที่ได้จากสมการจะเป็นอัตราการเจริญสูงสุดเสมอ ค่า generation time จะมีค่าต่ำกว่าปกติ และค่า lag time ในข้อมูลบางชุดจะได้ค่าติดลบ เนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์ ที่  $t = 0$  มีค่าต่ำกว่าระดับของจุลินทรีย์ตั้งต้น (inoculum level) อย่างไรก็ตามสมการของ Gompertz ถือเป็นสมการที่ผู้วิจัยนิยมสำหรับใช้วิเคราะห์ความเหมาะสมข้อมูลการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากไม่ซับซ้อน และมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้อธิบายข้อมูลการเจริญของจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกับแบบจำลองชนิดอื่น อาทิ logistic, Richard, Schunutr and Stannard (Zwietering et al.,1990)

นอกจากนี้ยังมีแบบจำลองระดับปฐมภูมิ อีกหลายชนิดที่ผู้วิจัยนำมาใช้สำหรับการศึกษาอัตราการเจริญ อัตราการตาย หรืออัตราการอยู่รอด ของจุลินทรีย์ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ หรือศึกษาการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน โดยสามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสม หรือข้อจำกัดของแต่ละชนิด เช่น แบบจำลองของ Baranyi model (Baranyi and Roberts,1994) แบบจำลองของ McKellar (McKellar et al.,1997) และ Buchanan (Buchanan et al.,1997) เป็นต้น

2. แบบจำลองระดับทุติยภูมิ (Secondary model) เป็นแบบจำลองที่ได้มาจากแบบจำลองระดับปฐมภูมิ ซึ่งใช้อธิบายพารามิเตอร์การเจริญ ที่สัมพันธ์กับสภาวะแวดล้อมจำเพาะ ตัวอย่างเช่น Belegr'adek, classical Arrhenius equation หรือ square root type เป็นต้น แบบจำลอง Square root type หรือ Ratkowsky type เป็นแบบจำลองที่พัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาที่ classical Arrhenius equation ไม่สามารถใช้อธิบายผลกระทบที่เกิดจากอุณหภูมิในช่วง suboptimal ต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Ratkowsky et al,1982) เริ่มแรกแบบจำลองชนิดนี้ใช้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของจุลินทรีย์เพียงปัจจัยเดียว จากนั้น McMeekin และคณะ (1987) นำแบบจำลองดังกล่าวมาพัฒนาใช้กับปัจจัยกระทบชนิดอื่นร่วมด้วยเพื่ออธิบายการเจริญของจุลินทรีย์ และแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองนี้สามารถใช้ทำนายการเจริญของ *Staphylococcus xylosus* CM21/3 ใน

สภาวะแวดล้อมที่มีปัจจัยกระทบคือ อุณหภูมิ ร่วมกับปริมาณน้ำใช้ได้อย่างเหมาะสม ได้เป็นแบบจำลอง คือ

$$\sqrt{r} = b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \sqrt{a_w - a_{w\min}}$$

โดย;  $b$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์จำเพาะของแบบจำลอง

$T$  คือ อุณหภูมิที่สนใจทำนาย  $T_{\min}$  คือ อุณหภูมิต่ำสุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้

$a_w$  คือ ปริมาณน้ำใช้ได้ที่สนใจ  $a_{w\min}$  คือ ปริมาณน้ำใช้ต่ำสุดที่จุลินทรีย์เจริญได้

นอกจากนี้ Adams และคณะ (1991) ได้ใช้แบบจำลอง square root type สำหรับการทำนายการเจริญของ *Yersinia enterocolitica* โดยมีปัจจัยกระทบจากอุณหภูมิ และค่าพีเอช และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ เช่น ปริมาณก๊าซบอนไดออกไซด์ กรดแลคติก เป็นต้น

3. แบบจำลองระดับตติยภูมิ (Tertiary model) เป็นแบบจำลองที่รวมข้อมูลของแบบจำลองระดับปฐมภูมิ และทุติยภูมิที่มากกว่า 1 แบบจำลองเข้าด้วยกัน โดยพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของโปรแกรมสำเร็จรูป (software) เพื่อความสะดวกในการใช้งาน เช่น USDA พัฒนาโปรแกรม Pathogen Modeling Program (PMP) สำหรับทำนายการเจริญโดยรวมรวมข้อมูลการเจริญจากการใช้สมการ Gompertz หรือในปี 1992 MAFF ได้พัฒนาโปรแกรมชื่อ Food MicroModel สำหรับใช้ในการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน

ความก้าวหน้าของงานด้านจุลชีววิทยาพยากรณ์ โดยมีงานวิจัยหลายฉบับที่มีการพัฒนาและทวนสอบแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายการเจริญ โดยศึกษาจากปัจจัยกระทบต่างๆกัน ซึ่งอุณหภูมิ ถือเป็นปัจจัยกระทบที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร ลำดับต่อมาจะเป็นค่าพีเอช และปริมาณน้ำใช้ได้ จากนั้นจะเป็นสารอนมอาหารต่างๆ รวมถึงสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และอัตราส่วนของ atmosphere ปกติอุณหภูมิมักจะถูกควบคุมอย่างเข้มงวดให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมระหว่างขั้นตอนการเก็บรักษาอาหาร แต่ไม่ได้ครอบคลุมถึง

ปัจจัยกระทบอื่นๆ ยิ่งไปกว่านั้นปัจจัยกระทบต่างๆ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงอันมีผลมาจากการเจริญของแบคทีเรียเอง หรืออาจเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วม (interaction) ระหว่างปัจจัยกระทบ หรือระหว่างอาหารกับจุลินทรีย์ ด้วยเหตุนี้การพัฒนาแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายควรรณการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์แบบ dynamic เพราะสภาวะของอาหารสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่

Walker และคณะ (1990) ได้ศึกษาการเจริญของ *L.monocytogenes* (ซีโรไทป์ 4b) ที่อุณหภูมิตู้เย็น (-0.5 ถึง 9.3 องศาเซลเซียส) ในอาหาร chicken broth (พีเอช 6.4) และ นม UHT (พีเอช 6.6) พบว่าอุณหภูมิต่ำสุดที่ *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ อยู่ในช่วง -0.1 ถึง -0.4 องศาเซลเซียส ที่ 5 องศาเซลเซียส Lag time เท่ากับ 1-3 วัน และ generation time เท่ากับ 13-14 ชั่วโมง ขณะที่ 0 องศาเซลเซียส Lag time จะอยู่ระหว่าง 3 วัน จนถึง มากกว่า 34 วัน และ generation time เท่ากับ 62-131 ชั่วโมง โดยชนิดของอาหารจะมีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* รวมทั้งถ้า *L.monocytogenes* มีการผ่านการบ่ม preincubation ที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ศึกษาระยะ Lag time จะลดลง

Fernandez และคณะ (1997) ได้ศึกษาอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* (ซีโรไทป์ 4b) ที่มีปัจจัยกระทบจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (0-100% v/v) ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0.5-8.0% w/v) พีเอช (4.5-7.0) และอุณหภูมิ (4-20 องศาเซลเซียส) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth สร้างเส้นโค้งการเจริญ และการหาอัตราการเจริญจำเพาะตามแบบจำลองของ Baranyi และ Roberts (1994) พบว่า ปัจจัยที่ดำเนินการศึกษามีผลทำให้อัตราการเจริญระยะเวลาที่จำนวนเซลล์เพิ่มเป็น 1,000 เท่า และ doubling time จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบความใช้ได้ของสมการที่ได้จากการศึกษา กับสมการอื่นที่มีการตีพิมพ์ในวารสารเผยแพร่ พบว่าสมการการทำนายดังกล่าวมีความเหมาะสมสามารถใช้ทำนายค่าการเจริญของ *L.monocytogenes* ในอาหารที่บรรจุภายใต้สภาวะ modified atmosphere ได้อย่างถูกต้อง ผลการวิจัยบ่งชี้ว่า เมื่ออุณหภูมิ พีเอช และปริมาณน้ำใช้ได้ ในอาหาร อยู่ในช่วงเหมาะสมต่อการเจริญ (optimal condition) จะสังเกตพบผลกระทบต่อการเจริญของ *L.monocytogenes* (inhibitory effect) เมื่อร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ร้อยละความเข้มข้น 80 ขึ้นไป แต่ถ้าปัจจัยดังกล่าวอยู่ในช่วงไม่เหมาะสม (suboptimal) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ร้อยละความเข้มข้น

เท่ากับ 25 ก็จะมีผลกระทบต่อการเจริญของ *L.monocytogenes* นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ผลกระทบต่อการเจริญของ *L.monocytogenes* มากกว่าความเข้มข้นของ กลีโคไซด์เคมคลอไรด์ โดยจะเห็นว่าในสภาวะที่ความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เดียวกัน และ พีเอชใกล้เคียงกัน เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนจาก 12 องศาเซลเซียส เป็น 4 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ ระยะเวลาที่จำนวนเซลล์จะเพิ่มเป็น 1,000 เท่าจากจำนวนตั้งต้นเปลี่ยนจาก น้อยกว่า 4 วัน เป็น 22 วัน ตามลำดับ แม้ว่าจะมีความเข้มข้นกลีโคไซด์เคมคลอไรด์ที่เป็นปัจจัยร่วมในกรณีแรก สูงถึง ร้อยละ 8 ขณะที่ในกรณีที่สองมีเพียงร้อยละ 0.5

Miles และคณะ (1997) ได้ทำการพัฒนา และประเมินผลแบบจำลองการทำนายสำหรับ อัตราการเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* 4 สายพันธุ์ โดยมีปัจจัยกระทบเป็นอุณหภูมิ และ ปริมาณน้ำใช้ได้ ซึ่งใช้ square root model สรุปว่าแบบจำลองดังกล่าวสามารถใช้ทำนาย generation time ของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เจริญอยู่ในสภาวะอุณหภูมิ ช่วงระหว่าง 8 ถึง 45 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำใช้ได้ ในช่วง 0.936 ถึง 0.995 ได้ ซึ่งมีค่า bias factor เท่ากับ 1.01 และ accuracy factor เท่ากับ 1.38 วิเคราะห์ความเหมาะสมของอัตราการเจริญจำเพาะ ของ *Vibrio parahaemolyticus* ตามสมการของ Gompertz และหาค่า  $T_{min}$  ได้เท่ากับ 278.5, 279.9, 280.7 และ 278.1 ค่า  $a_{wmin}$  เท่ากับ 0.921, 0.926 และ 0.937 ของ *Vibrio parahaemolyticus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ตามลำดับ

Nyati (2000) ศึกษาการรอดชีวิต (survival) และการทำนายอัตราการเจริญ ของ *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรด์ โดยเทคโนโลยี sous vide และในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptose phosphate broth พบว่า *L.monocytogenes* ใน tryptose phosphate broth ตัวอย่างเนื้อไก่ และเนื้อวัว ที่เก็บแบบสภาวะไม่มีอากาศ สามารถเจริญได้ 2 log ในเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส และ 4-5 log ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส และได้ศึกษาการประยุกต์ใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ เพื่อทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* ตามแบบจำลองของ Ratkowsky และคณะ (1982) ซึ่งพบว่า square root model สามารถทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่ 0-25 องศาเซลเซียส ใน tryptose phosphate broth ตัวอย่างเนื้อไก่ และเนื้อวัวได้ โดยมีค่า coefficient of determination ( $R^2$ ) เท่ากับ 98.36-99.63 เปอร์เซนต์ และค่า bias factor เท่ากับ 1.08 ถึง 1.21



Wei และ Fang (2001) ทำการทวนสอบแบบจำลองการเจริญของ *L.monocytogenes* และ *Yersinia enterocolitica* ในเนื้อไก่สุก ที่อุณหภูมิ 4-34 องศาเซลเซียส ตามแบบจำลองของ Zwietering (1990) โดยวิเคราะห์ความเหมาะสมของแบบจำลองสำหรับใช้ทำนายอัตราการเจริญ จากค่า mean square error , regression coefficient , bias factor และ accuracy factor พบว่า โมเดลที่ได้มีความเหมาะสมในการใช้ทำนายอัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* และ *Yersinia enterocolitica* ในเนื้อไก่สุก และไม่พบการเจริญของ *L.monocytogenes* ในเนื้อไก่สุกที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ *Yersinia enterocolitica* เป็นจุลินทรีย์แข่งขันมีผลไปยังการ เจริญของ *L.monocytogenes* ในช่วงอุณหภูมิ 10-34 องศาเซลเซียส

Carrasco และคณะ (2006) ดำเนินการพัฒนาแบบจำลองสำหรับการทำนายอัตราการ เจริญของ *L.monocytogenes* สายพันธุ์ NCTC 11944 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ และชนิดกรดที่ แตกต่างกัน โดยศึกษาอุณหภูมิ ที่ 10, 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับ กรดซิติริก ความเข้มข้น (0-0.4% w/v) และกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth ซึ่งกรดทั้งสองชนิดมักจะใช้เป็นสารถนอมอาหารในอุตสาหกรรมอาหาร แล้ววิเคราะห์ความเหมาะสมของเส้นโค้งการเจริญ และหาค่าอัตราการเจริญตามสมการของ Baranyi และ Roberts (1994) แบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้ ประเมินค่าทางสถิติ โดยค่า RMSE เท่ากับ 0.04 ค่า Bias factor เท่ากับ 1.05 ค่า Accuracy factor เท่ากับ 1.16 และมีค่า standard error ของการทำนาย เท่ากับ 18.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในช่วงการยอมรับสามารถใช้ทำนายอัตราการ เจริญของ *L.monocytogenes* ในสภาวะที่ศึกษาได้

McClure และคณะ (1997) ศึกษาผลกระทบของ NaCl (5.0-115.0 g/l) ค่าพีเอช (4.0- 7.2) อุณหภูมิ (1-35 องศาเซลเซียส) และ  $\text{NaNO}_2$  (0-200 mg/l) ต่ออัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์ความเหมาะสมของเส้นโค้งการเจริญตามสมการ ของ Baranyi และ Roberts (1994) และสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนาย ตาม แบบ quadratic polynomial โดยทวนสอบความใช้ได้ของแบบจำลองจากข้อมูลอัตราการเจริญ, lag time, doubling time และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มเป็น 1,000 เท่า ในผลิตภัณฑ์อาหาร เนื้อสัตว์ นม และผัก จากเอกสารตีพิมพ์ต่างๆ ซึ่งจะเปรียบเทียบกับแบบจำลองของ Buchanan และ Phillips (1990) Murphy และคณะ (1996) และโปรแกรม Food MicroModel พบว่า สมการ

Gompertz และ Baranyi ทำนาย doubling time ได้ต่ำกว่าค่าที่ได้จากการทดลองในอาหาร (อัตราการเจริญจะเร็วกว่า) ขณะที่แบบจำลองการทำนายที่ได้จากการศึกษาจะให้ค่าการทำนายใกล้เคียงกับค่าจากการทดลองเป็นอย่างมาก เท่ากับ 4.49 เมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลองของ Buchanan และ Phillips (1990) เท่ากับ 23.22 Murphy และคณะ (1996) เท่ากับ 7.73 และโปรแกรม Food MicroModel เท่ากับ 28.23 ซึ่งทั้งหมดจะให้ค่าการทำนายสูงกว่าค่าจากการทดลอง แต่ยังคงอยู่ในขอบเขตการยอมรับ

## 2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับทำนายการเจริญ

1. Lag phase duration : ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายการเจริญของ *L.monocytogenes* จะศึกษาจากเซลล์ตั้งต้น (prior state) ที่เจริญอยู่ในระยะ stationary phase ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Buchanan and Klawitter, 1991; Whiting and Bagi, 2000) แต่มีข้อมูลบ่งชี้ว่าช่วงเวลาของ Lag phase ของการเจริญมีความสำคัญสำหรับการทำนายการเจริญของแบคทีเรีย การออกแบบแบบจำลอง และการประเมินความเสี่ยง โดย Whiting และ Bagi (2002) ได้ศึกษาช่วงเวลาของ Lag phase ของ *L.monocytogenes* โดยใช้เซลล์ตั้งต้นที่มาจากสภาวะต่างๆ พบว่า ถ้าจะศึกษาการเจริญของ *L.monocytogenes* ที่ช่วงอุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) แต่ใช้เซลล์ตั้งต้นที่บ่มผ่านอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมาก่อน ( $T_{prior}$ ) จะมี Lag phase ที่นานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มผ่านอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปเซลล์ตั้งต้นที่เจริญอยู่ในระยะ exponential จะมีระยะเวลาของ Lag phase สั้นกว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ stationary และเซลล์ที่เจริญอยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร (starved cell) ส่วนเซลล์ตั้งต้นที่ผ่านการแช่แข็งจะมีระยะเวลาของ Lag phase เพิ่มขึ้น ขณะที่เซลล์ที่ผ่านการทำแห้ง (desiccated cell) จะมีช่วงเวลาของ Lag phase นานที่สุด
2. จำนวนเซลล์ตั้งต้น (Initial inoculum level) : ก่อนหน้านี้งานด้านจุลชีววิทยาพยากรณ์ไม่ได้คำนึงถึงความสำคัญของจำนวนเซลล์ตั้งต้น เนื่องจากเชื่อว่าจะไม่มีผลกระทบต่อเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่ง Duffy และคณะ (1994) ได้ยืนยันสมมุติฐานดังกล่าวว่าจำนวน *L.monocytogenes* ตั้งต้นไม่มีผลต่อการเจริญ แต่ Gay และคณะ (1996) สังเกตพบว่า

จำนวนเซลล์ตั้งต้น มีผลต่อระยะ Lag phase ของ *L.monocytogenes* ภายใต้สภาวะการเจริญใน soft cheese จากข้อสังเกตนี้ทำให้เกิดข้อขัดแย้งต่อ ความถูกต้องของแบบจำลองการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ ที่สร้างมาจากข้อมูลการเจริญที่ใช้จำนวนเซลล์ตั้งต้นสูงกว่า  $10^3$  cfu/ml และในความเป็นจริงจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารปกติคาดว่าจะอยู่ในระดับที่ต่ำมาก ซึ่งมีงานวิจัยอื่นที่สนับสนุนข้อสังเกตนี้ โดยพบว่า จำนวนเซลล์ตั้งต้นของ *Bacillus* หรือ *Salmonella* มีผลต่อระยะ Lag phase แต่จะสังเกตพบกรณีการศึกษาในสภาวะที่เป็น suboptimal เท่านั้น เช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่สมบูรณ์ (poor medium) หรือเป็น heat-injured cell เป็นต้น (Lankford et al.,1966; Stephens et al.,1997) ต่อมา Augustin และคณะ (2000) ได้ศึกษาความสำคัญของจำนวนเซลล์ตั้งต้นของ *L.monocytogenes* ว่ามีผลกระทบต่อ Lag phase อย่างไร โดยศึกษาการเจริญของ *L.monocytogenes* ใน poor medium pH 6 ภายใต้สภาวะ suboptimal ที่อุณหภูมิ 6.5 องศาเซลเซียส และใช้เซลล์ที่กระตุ้นให้อยู่ในภาวะขาดแคลนอาหาร (starvation) พบว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้นจะมีผลกระทบต่อ Lag phase โดยทำให้ lag phase เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉพาะที่เซลล์ *L.monocytogenes* ถูกกระตุ้นให้อยู่ภาวะเครียดเท่านั้น (ขาดแคลนอาหารมากกว่า 160 ชั่วโมง) ด้วยเหตุนี้การพัฒนาแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนต่ำควรจะสัมพันธ์กับ stochastic model โดยเฉพาะถ้าเซลล์ของจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะเป็น injured cell

3. Preincubation effect: มีงานวิจัยหลายฉบับที่กล่าวถึงผลของ preincubation ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ถ้าสิ่งแวดล้อมเดิมที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ก่อนเปลี่ยนสิ่งแวดล้อมใหม่มีอุณหภูมิใกล้เคียงกันจุลินทรีย์จะใช้เวลาในการปรับสภาพก่อนเจริญเพิ่มจำนวนน้อยลง กล่าวคือ *L.monocytogenes* จะมีระยะ Lag phase ของการเจริญในอุณหภูมิที่เย็นลดลง ถ้าผ่านการ preincubation ที่อุณหภูมิต่ำมาก่อน เมื่อเทียบกับอุณหภูมิสูง (Buchanan and Klawitter,1991; Gay et al.,1996; Membre et al,1999; Augustin et al.,2000a; Dyhes,2003; Mellefont and Ross,2003) นอกจากนี้ Francois และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ และค่าพีเอช ที่ใช้ preincubation ต่อระยะ Lag

phase ของ *L.monocytogenes* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส พบว่า Lag phase การเจริญที่ 7 องศาเซลเซียส ของ *L.monocytogenes* จะเพิ่มมากขึ้น ถ้าอุณหภูมิสำหรับ preincubation เท่ากับ 37, 15 หรือ 10 องศาเซลเซียส แต่จะไม่มีระยะ Lag phase ถ้าอุณหภูมิสำหรับ preincubation เท่ากับ 7, 4 หรือ 2 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับผลกระทบจากค่าพีเอช ถ้าเปลี่ยนจากค่าพีเอชสูงไปต่ำก็จะมี lag phase เพิ่มขึ้น

4. Change Temperature ( $T_c$ ) : จากที่ Bajard และคณะ (1996) ได้ศึกษาพฤติกรรมเฉพาะของ *L.monocytogenes* ที่เจริญภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (sub-optimal temperature) โดยหาอัตราการเจริญ ( $\mu_{max}$ ) ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ -2 ถึง 42 องศาเซลเซียส ในอาหาร Mueller Hinton broth โดยใช้สมการ linear regression จากการสร้างเส้นโค้งความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า  $\mu_{max}$  กับอุณหภูมิ จะได้ค่าอุณหภูมิต่ำสุด อุณหภูมิสูงสุด และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ -3, 43 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Rosso et al,1993) แต่พบว่า  $\sqrt{\mu_{max}}$  ของ *L.monocytogenes* อาจไม่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงทั้งหมดของช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ (-2 ถึง 42 องศาเซลเซียส) เนื่องจากเมื่อสร้างเส้นโค้งความสัมพันธ์ระหว่าง  $\sqrt{\mu_{max}}$  และอุณหภูมิ แล้ว fit ด้วย linear model ปรากฏว่ามีบางค่าที่อยู่ในช่วง 95% confidence interval ของ  $\sqrt{\mu_{max}}$  ไม่อยู่บนเส้น regression line  $\sqrt{\mu_{max}}$  ของ *L.monocytogenes* ที่สภาวะ suboptimal temperature มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับอุณหภูมิประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส ถ้าต่ำกว่านี้ slope ของสมการจะเปลี่ยนไป จึงบ่งชี้ว่าช่วงระหว่างอุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส เป็นจุดที่เรียกว่า "change temperature" ซึ่งพฤติกรรมการเจริญของ *L.monocytogenes* ลักษณะนี้เป็นสิ่งที่ผู้วิจัยต้องให้ความสำคัญเมื่อมีการศึกษาการเจริญของ *L.monocytogenes* ในสภาวะที่เป็น suboptimal เนื่องจากจะมีผลต่อการประมาณหาค่า  $T_{min}$  ของชุดข้อมูล และที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า  $T_c$  อัตราการเจริญของ *L.monocytogenes* จะเร็วกว่าที่ประเมินไว้
5. Food structure : จากการศึกษาอิทธิพลของ food structure และ cell immobilize ต่อพฤติกรรมการเจริญของจุลินทรีย์ แสดงให้เห็นว่าการเจริญของแบคทีเรียในลักษณะการ

สร้างโคโลนี (surface growth) จะถูกจำกัด และเจริญได้ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญในลักษณะเป็น planktonic growth (Brocklehurst et al.,1997; Stechini et al.,1998; Skandamis et al.,2000; Wilson et al.,2002; Meldrum et al.,2003) ซึ่งคาดว่า อาจจะมีสาเหตุจาก คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์ ความสามารถในการดูดซึมอาหาร ความสามารถในการใช้อากาศ หรือการติดต่อระหว่างเซลล์กับเซลล์ (cell to cell communication) (Fuqua et al.,1994; Walker et al.,1997; Yoon et al.,2003) จึงคาดว่า structure ของอาหารมีผลต่อการสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ แม้ว่า te Giffel และ Zwietering (1999) จะบ่งชี้ว่าแบบจำลองที่ศึกษา ข้อมูลการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อของห้องปฏิบัติการ (broth) สามารถใช้ทำนายการเจริญได้อย่างถูกต้องในอาหารบางชนิด นอกจากนี้ Koutsoumanis และคณะ (2004) ได้ศึกษา เปรียบเทียบสภาวะจำกัดการเจริญ (growth limit) ของ *L.monocytogenes* จากอุณหภูมิ ช่วง 4-30 องศาเซลเซียส พีเอช ช่วง 4.24-6.58 และปริมาณน้ำใช้ได้ ช่วง 0.900-0.993 เมื่ออยู่ในของเหลว (suspension) และบน solid surface พบว่า *L.monocytogenes* มี อัตราการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งใน suspension และ solid surface แต่การเจริญบน solid surface จะมีขอบเขตการจำกัดการเจริญมากกว่า (limites of growth) จะเห็นได้จากที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส *L.monocytogenes* สามารถเจริญได้ใน suspension ที่ pH ต่ำสุดเท่ากับ 4.45 และปริมาณน้ำใช้ได้ต่ำสุด เท่ากับ 0.900 ขณะที่ใน solid surface จะเจริญได้ที่ pH ต่ำสุด เท่ากับ 5.10 และ ปริมาณ น้ำใช้ได้ต่ำสุด เท่ากับ 0.945

## 2.7 การประยุกต์ใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์ในอุตสาหกรรมผลิตอาหาร

Ross และ McMeekin (1994) นำเสนอว่าแบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายที่พัฒนาขึ้นอย่างเป็นระบบ สามารถจะนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านความปลอดภัยอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ใช้แบบจำลองคณิตศาสตร์เพื่อทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแล้วแต่สามารถเป็นเครื่องมือหนึ่งที่ใช้ศึกษาปัจจัยกระทบต่างๆ เช่น ปริมาณน้ำใช้ได้ ค่าพีเอช สารถนอมอาหาร ปริมาณอากาศ แม้กระทั่งลักษณะการบรรจุอาหาร ที่จะมีผลต่อ thermal inactivation kinetic ของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารอีกด้วย (Horner et al.,1975; McMahan et al.,1999; Chhabra et al.,1999, 2002; Linton et al.,1995, 1996; Augustin et al.,1998; Gaillard et al.,1998; Murphy et al.,2004; Membre et al.,2006; Valdramidis et al.,2006; Fernandez et al.,2007; Shabala et al.,2008) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ มีความสำคัญสำหรับการเลือกวิธีการให้ความร้อนกับอาหารที่เหมาะสมที่สุดเพื่อกำจัดโอกาสการพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารหลังผ่านกระบวนการปรุงสุก

แบบจำลองคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายจำนวนจุลินทรีย์ล่องหน้า สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ระยะความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรค และอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร แต่ค่อนข้างซับซ้อน เนื่องจากความหลากหลายของส่วนประกอบของอาหารที่เป็นปัจจัยกระทบต่อการเจริญ และความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่มีโอกาสปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร (Banks, 1994; Vankerschaver et al.,1996; Kant-Muermans et al., 1997; Neumeyer et al.,1997a,b; Devlieghere et al.,1999) หรือนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาจุดวิกฤต (critical control point) การทวนสอบ และการปรับปรุงโปรแกรม HACCP ของกระบวนการผลิตอาหาร (Broughall and Brown,1984; Roberts,1989; McMeekin et al.,1992; Bachanan and Whiting,1996; Elliott,1996) รวมถึงนำไปใช้ในกระบวนการประเมินความเสี่ยงด้านจุลินทรีย์ในอาหาร เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดการเจ็บป่วยอันเกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคในห่วงโซ่การผลิต (Walls and Scott,1997a, 1997b) หรือการออกแบบการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ระดับห้องปฏิบัติการ เป็นต้น