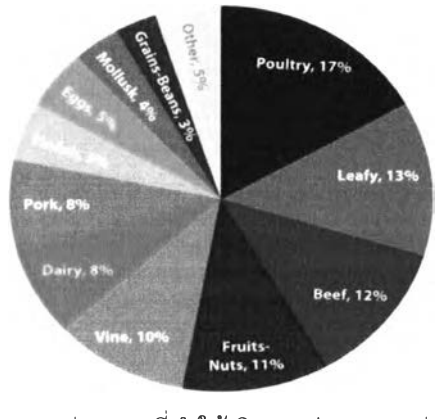
บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

ระบบเศรษฐกิจของประเทศไทยมีรากฐานมาจากภาคเกษตรกรรมมายาวนาน อุตสาหกรรมการเกษตรมีการพัฒนาขึ้นเป็นลำดับนอกจากการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้วยังมีศักยภาพในการผลิตเพื่อส่งออก ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิต และส่งออกสินค้าอาหารที่มีคุณภาพดีและมีชื่อเสียงที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ดังนั้นผู้ผลิตอาหารต้องควบคุมคุณภาพและมาตรฐานด้านสุขอนามัยให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค กระบวนการผลิตอาหารใช้วิธีทางจุลชีววิทยาตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารและสิ่งแวดล้อมในการผลิต โดยมุ่งเน้นไปที่การตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคและจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งบ่งชี้ถึงความสด ความสะอาดและปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ เมื่อมีการพบว่าผลการตรวจจุลินทรีย์สามารถบ่งชี้ว่าเกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตแต่ไม่สามารถบอกสาเหตุของการปนเปื้อนได้ (Giffel, Meeuwisse, & Jong, 2001) ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความเสี่ยงต่อการเสื่อมเสียสูง มีระยะการเก็บน้อย เกิดการผลิตอาหารที่มีลักษณะไม่พึงประสงค์และไม่ปลอดภัยถูกจำหน่ายออกไปจำนวนมาก ทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ จึงมีความพยายามที่จะลดอัตราการแพร่ระบาดของโรคโดยใช้ระบบการจัดการความปลอดภัยในอาหาร ที่เรียกกันว่า HACCP (Hazard analysis critical control point) ร่วมกับการออกกฎหมายในหลายประเทศทั่วโลก (Griffith, Davidson, Peters, & Fielding, 1997) ซึ่งถือว่าเป็นการเน้นย้ำและเพิ่มการตรวจสอบป้องกันและควบคุมปัจจัยในกระบวนการผลิตอาหาร (Kvenberg & Schwalm, 2000)

1312347117

2.1 แบคทีเรียก่อโรค (pathogens)

Painter et al. (2013) พบว่าแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยในสหรัฐอเมริกาจากการสำรวจอาหาร 17 กลุ่ม (รูปที่ 2.1) โดยกลุ่มอาหารประเภทสัตว์ปีกทำให้เกิดการเจ็บป่วยถึง 46% และพบการตายมากกว่าอาหารกลุ่มอื่นๆ จำนวนผู้ป่วย 67,709 จากโรคที่มีอาหารเป็นสื่อจำนวน 3,259 โรคในช่วงระหว่างปี 1998-2008



รูปที่ 2. 1 สัดส่วนการแพร่ระบาดที่ทำให้เกิดการป่วยจากกลุ่มอาหารแต่ละชนิด (Centers for Disease Control and Prevention, 2013c)

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตอาหารเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อาหารเน่าเสียและก่อโรคกับผู้บริโภคได้ จุลินทรีย์ที่ตรวจหาในระบบการผลิตมักขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร เช่น อาหารประเภทไก่แปรรูปและไก่แปรรูปแช่แข็งมักตรวจหา *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (กรมปศุสัตว์, 2550)

2.1.1 เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)

ชื่อดังเดิมว่า Bacterium coli ถูกจำแนกในปี 1885 โดยกุมารแพทย์ชาวเยอรมันชื่อ Theodor von Escherich (1857-1911) แบคทีเรียนี้เรียกสั้นๆว่า อีโคไล (*E. coli*) มีรูปร่างแบบแท่ง (rod-shaped) กว้างประมาณ 1 µm และยาว 2 µm เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10-40°C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอยู่ในช่วง 35-37°C (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2009) บริเวณรอบนอกปกคลุมด้วยขนขนาดเล็ก (pili) ซึ่งใช้ในการเคลื่อนที่ แบคทีเรียชนิดพบได้ทั่วไปในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น อยู่ในวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซี (Enterobacteriaceae) เป็น facultative anaerobe วงศ์นี้มีแบคทีเรียก่อโรครวมอยู่ด้วย เช่น *Salmonella, Shigella* และ *Yersinia* เป็นต้น โดยปกติแล้วอีโคไลส่วนใหญ่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรคแต่สามารถเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ทำให้เกิดการติดเชื้อได้เมื่อภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลงหรือบกพร่อง และก่อโรคในระบบทางเดินอาหารเมื่อรับประทานอาหารและน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไปในร่างกายและมักทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง

T123717

การจำแนกอีโคไลชนิดก่อโรค

จำแนกออกเป็น 6 แบบ (CDC, 2012) ดังนี้

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นกลุ่มแรกทำให้เกิดโรคท้องร่วงในมนุษย์ สร้างสารพิษสองชนิดคือ ชนิดทนความร้อน (Heat-stable toxin, ST) และชนิดไม่ทนความร้อน (Heat-labile toxin, LT) ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในทารกหรือคนที่เดินทางไปต่างถิ่น จะมีอาการท้องร่วงเป็นน้ำชาวข้าวคล้ายอหิวาตกโรค ปวดเกร็งท้อง มีไข้ คลื่นไส้ อาจมีอาเจียน ปวดหัวและไม่อยากอาหาร

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร สร้างสารพิษทำลายเซลล์ลักษณะคล้ายสารพิษที่สร้างจากเชื้อบิดชิเจลลา ทำให้ทารกที่มีอายุต่ำกว่าหนึ่งขวบท้องร่วงอย่างรุนแรง

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ Verocytotoxin producing *E. coli* กลุ่มที่ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร สร้างสารพิษทำลายเซลล์คือสารพิษชิกาและสร้างสารพิษลักษณะคล้ายสารพิษที่สร้างจากเชื้อบิดชิเจลลา ทำให้ลำไส้ใหญ่อักเสบมีเลือดออก (hemorrhagic colitis) หรือ อาการที่เรียกว่า มีเม็ดเลือดแดงแตกและไตวาย Hemolytic Uremic syndrome (HUS) ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงอาจมีเลือดปน

ปวดท้องและอาเจียน ผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษนี้จะหายเองได้ภายใน 10 วัน ในยุโรปปี 2011 ได้มีการระบาดของ *E. coli* O104:H4 เป็นเชื้อที่สร้างสารพิษชิกาได้ซึ่งอยู่ในกลุ่ม EHEC ส่วนในอเมริกาเหนือมักพบ *E. coli* O157:H7 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม STEC

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) กลุ่มที่ทำลายเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร เกิดอาการคล้ายโรคบิดจากชิเจลลา แต่มักไม่เข้าสู่กระแสเลือด

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) กลุ่มที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์บุผนังลำไส้ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเรื้อรังในทารกและอาจตายได้

Diffusely adherent *E.coli* (DAEC) ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อกลุ่มนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด ผู้ป่วยมักมีอาการถ่ายเป็นน้ำ หรือเหลวแบบอาหารไม่ย่อย โดยส่วนใหญ่พบผู้ป่วยจากเชื้อกลุ่มนี้ในเด็กวัยก่อนเรียนมากกว่าในเด็กทารก

จากการสำรวจของ Centers for Disease Control and Prevention (2006a) ของประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงปี 2006-2013 สายพันธุ์อีโคไลที่เป็นปัญหาก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ คือ STEC O157:H7 ในผลิตภัณฑ์ชีส เนื้อสัตว์และผัก, STEC O26 ในผักสดจำพวก sprout STEC O145 ในผักกาดหอม, STEC O121 ในอาหารแช่แข็ง

2.1.2 สแตปไฟโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*)

เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 µm เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่นหรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองหรือสีทองเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 35-40 °C ช่วง pH 7-7.5 บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซินซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดี และเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ สารพิษชนิดนี้ทนความร้อนถึงระดับ 143.3°C เป็นเวลา 9 วินาทีได้ ดังนั้นอุณหภูมิในการหุงต้มธรรมดาหรืออุณหภูมิน้ำเดือดจึงไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้

ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติดเชื้อนั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็วและรุนแรงในหลายๆ กรณี ซึ่งอาการทั่วไปของผู้ได้รับเชื้อที่พบคือ ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลียในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน หลายรายจะมีอาการปวดหัว เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อด้วย (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549)

2.1.3 ซัลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม (*Salmonella* Typhimurium)

ในปี พ.ศ. 2428 สามารถแยกซัลโมเนลลาจากสุกรได้เป็นครั้งแรก โดยชาวอเมริกันมีชื่อว่า Salmon และ Smith เรียกว่า "hog cholera bacillus" ต่อมาจึงเรียกชื่อใหม่เป็น *Salmonella choleraesuis*

ซัลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมเป็นจีนัสหนึ่งในตระกูล Enterobactiriaceae ดำรงชีวิตเป็นแบบ facultative anaerobe ลักษณะเป็นท่อนสั้น แกรมลบขนาดประมาณ 0.6x1-3 µm เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37°C และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 8-45°C ช่วง pH 4-9 ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว ไม่สร้างแคปซูลและสปอร์ อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ โดยทั่วไปซัลโมเนลลาก่อโรคในคนเท่านั้น แต่สัตว์เป็นพาหะที่แพร่เชื้อมาสู่คน ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรีย ภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ความเป็นกรดของกระเพาะอาหาร จุลชีพประจำถิ่นในลำไส้ เป็นต้น

โรคสำคัญที่เกิดจากซัลโมเนลลา เช่น โรคไข้เอนเทอริกหรือไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ (enteric fevers) มีสาเหตุจากเชื้อ *Salmonella* Typhi ส่วนพาราไทฟอยด์มีสาเหตุจาก *S.* Paratyphi A,B และ C นอกจากนั้นยังทำให้มีอาการลำไส้อักเสบซึ่งเกิดจาก *salmonella* หลายซีโรไทป์ด้วยกัน บางชนิดทำให้เกิดโรคในสัตว์เลือดอุ่น รวมทั้งคน เชื้อที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรค คือ *S.* Enteridis และ *S.* Typhimuriam และโรคโลหิตเป็นพิษ (septicemia) การติดเชื้อ *salmonella* ในกระแสเลือด เกิดจาก *S.* Choleraesuis เป็นส่วนใหญ่ แต่ก็อาจเกิดจากแบคทีเรียในซีโรไทป์อื่นได้ เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะไปเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในกระแสเลือด ทำให้มีไข้สูง หนาวสั่น เบื่ออาหาร น้ำหนักตัวลดลง จะตรวจไม่พบแบคทีเรียในอุจจาระแต่สามารถตรวจพบในกระแสเลือดได้ โรคนี้จะเป็นอยู่นานจนเรื้อรัง แบคทีเรียในเลือดจะกระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย ทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปอดอักเสบ ไตอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ไขกระดูกและกระดูกอักเสบ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549)

2.1.4 ลิสทีเรีย โมโนไซโตจีเนส (*Listeria monocytogenes*)

ในปี 1926 E.G.D. Murray เป็นคนแรกที่รายงานการแยกลิสทีเรีย โมโนไซโตจีเนสจากกระต่าย หลังจากนั้นจัดให้เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคขั้นต้นในสัตว์ ทำให้เกิด circling disease ในพวกสัตว์เคี้ยวเอื้อง (วัว, ควาย, แพะและแกะ) หมู แมวและสุนัข สัตว์จะเดินเป็นวงกลมและทำท่าทางไม่สอดคล้องกับการเดิน จนในที่สุดไม่สามารถยืนโดยไม่มีอุปกรณ์ช่วยค้ำได้ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ขนาดยาว 1-2 µm อาจพบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ได้ ปกติมักอยู่เรียงกันเป็นสายโซ่ยาว (Bhunia, 2008) เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลารอบตัว เมื่อเลี้ยงไว้ที่ 25°C แต่ที่ 37°C จะมีแฟลกเจลลาน้อย เจริญเติบโตในที่ที่มีออกซิเจนจนถึงภาวะที่มีออกซิเจนน้อย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ & ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2553) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและอยู่รอดภายใต้สิ่งแวดล้อมที่มีภาวะเกลือสูง (10%) หรือความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง (pH 4.1-9.6) หรือในที่ที่มี

ยาต้านจุลชีพได้ เจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (1-45°C) *L. monocytogenes L. seeligeri* และ *L. ivanovii* ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (hemolytic) (Bhunia, 2008)

เนื่องจาก *L. monocytogenes* สามารถมีชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิต่ำ จึงได้รับความสนใจกันมากเพราะเป็นปัญหากับอุปกรณ์เครื่องมือในการผลิตอาหาร Carpentier and Cerf (2011) พบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการพบ *L. monocytogenes* ในอุตสาหกรรมเกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมที่เอื้อต่อการเจริญเติบโต ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในบริเวณที่การล้างทำความสะอาดเข้าถึงยากของอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ อาจจะมีช่องหรือรอยแตกร่วมอยู่ด้วย ทำให้มีสารอาหารหลงเหลืออยู่ให้ใช้ในการเติบโต

การจำแนก *Listeria* spp.

Listeria spp. แบ่งออกเป็น 6 สายพันธุ์ คือ *L. monocytogenes, L. innocua, L. seeligeri, L. welshimeri, L. ivanovii* และ *L. grayi L. monocytogenes* ก่อให้เกิดโรค listeriosis ในคนและสัตว์ได้ ในขณะที่ *L. ivanovii* ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ และสายพันธุ์อื่นไม่ก่อให้เกิดโรคแต่พบว่า *L. seeligeri* มีกลุ่มของยีนที่บอกถึงความเป็นพิษซึ่งเหมือนกับ *L. monocytogenes* และ *L. ivanovii*

L. monocytogenes มีรูปแบบของ O-antigenic 13 แบบ ซึ่งประกอบด้วยซีโรวาร์ ดังนี้ 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab และ 7 การระบาดส่วนใหญ่ 98% มีสาเหตุมาจากซีโรวาร์ 1/2a, 1/2b และ 4b และซีโรไทป์ 4b อันตรายที่สุด *L. monocytogenes* ถูกจำแนกตาม ribopattern และความสัมพันธ์กับการระบาดออกเป็น 3 เชื้อสาย (lineage) ดังนี้ Lineage I เป็นเชื้อสายที่ก่อให้เกิดโรคสูงที่สุดและซีโรไทป์ที่อยู่ในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการแพร่ระบาดของเชื้อที่ลุกลามอย่างรวดเร็ว Lineage II เป็นเชื้อสายที่ก่อให้เกิดโรคในระดับปานกลางและเกิดการระบาดนานๆครั้ง ส่วน Lineage III เป็นเชื้อสายที่ก่อให้เกิดโรคในระดับต่ำและทำให้เกิดการติดเชื้อในคนน้อยมาก นอกจากนั้น *L. monocytogenes* สามารถจำแนกตามแฟลกเจลลาแอนติเจน (H antigen) ได้เป็น serogroup ดังนี้ A, B, C, D และ E

ช่วงปลาย 1970 รู้จักกันว่า *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียก่อโรคจากอาหารที่เกิดการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วไปยังผู้คนที่อาศัยบริเวณอเมริกาเหนือ รวมทั้งการตายของทารกแรกเกิดและการแท้งที่เรียกว่า listeriosis เมื่อไม่นานมานี้ยังมีรายงานว่าทำให้เกิดกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) อีกด้วย เชื้อนี้ทำให้อาหารเป็นพิษไม่บ่อยเท่ากับเชื้อชนิดอื่นๆ แต่ทำให้เกิดการเสียชีวิตในอัตราที่สูงกว่าเชื้อก่อโรคในอาหารชนิดอื่น โดยปกติอยู่ที่ 20-30% และบางครั้งสูงถึง 50% ในสหรัฐอเมริกาห้ามตรวจพบเชื้อนี้ในอาหารประเภท ready-to-eat ประเทศอื่นๆ เช่น แคนาดา และบางประเทศในยุโรป อนุญาตให้พบได้ 100 CFU/25g การระบาดเกิดขึ้นในหลายรัฐของสหรัฐอเมริกา มักพบในอาหารประเภทเนื้อสัตว์แบบ ready-to-eat เช่น ในปี 1998-1999 ทำให้มีผู้ป่วย 101 ราย เสียชีวิต 15 ราย แท้งบุตร 6 รายจากการบริโภค hotdogs ในปี 2000 อาหารจำพวก deli meat ที่ทำจากไก่งวงทำให้เกิดผู้ป่วย 30 ราย เสียชีวิต 4 รายและแท้งบุตร 3 ราย ในปี

1312347117

2000-2001 ผู้บริโภคอาหารแบบเม็กซิกันที่มีชีสนุ่ม (Queso Fresco) ทำจากนมที่ไม่ผ่านการพาสเจอไรส์ ทำให้มีผู้ป่วย 12 รายที่เป็น listeriosis และแท้งบุตร 5 ราย ที่ North Corolina ในรัฐแม็กซัสปี 2003 เกิดการระบาดของเชื้อในชีสที่ทำจากน้ำนมดิบ และในปี 2005 เกิดการระบาดของเชื้อในอาหารจำพวก deli meat จากไก่งวง โดยพบว่าการระบาดของเชื้อดังกล่าวมาจากซีโรไทป์ 4b การปนเปื้อนของแบคทีเรียอาจไม่ส่งผลทำให้เกิดการระบาดเสมอไป แต่ถ้าผู้ผลิตมีตรวจพบจะทำการเรียกคืนสินค้าซึ่งถือเป็นการปฏิบัติขั้นต้นที่ทำเป็นประจำ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคในอาหาร (Bhunia, 2008) Gómez, Ariño, Carraminana, Rota, and Yangüela (2012) ใช้สวอบ 2 ชนิด คือ ฟองน้ำ และ ลูกกลิ้งขนาดเล็ก (mini roller) สุ่มตรวจ *L. monocytogenes* บนพื้นผิวสัมผัสอาหารจำนวน 69 ครั้งจากโรงงานผลิตเนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์แปรรูปทั้งหมด 26 แห่ง ฟองน้ำตรวจพบลิสทีเรีย โมโนไซโตจีเนส 31.9% จำนวนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.17-2.75 log CFU/cm^2 และลูกกลิ้งขนาดเล็กตรวจพบ 26.1% จำนวนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.28-5.83 log CFU/cm^2

2.1.5 คุณสมบัติของเซลล์แบคทีเรียที่มีผลต่อการเกาะบนพื้นผิว

แบคทีเรียก่อโรคโดยปกติอาศัยอยู่ในวัตถุดิบก่อนนำเข้ากระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งวัตถุดิบมีการสัมผัสกับพื้นผิวในหน่วยต่างๆของระบบ แบคทีเรียจึงสามารถเข้าเกาะกับพื้นผิวได้เช่นกัน ถ้าขั้นตอนการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อไม่เพียงพอที่จะกำจัดได้ แบคทีเรียก่อโรคจะหลงเหลืออยู่บนพื้นผิวและสามารถปนเปื้อนลงในอาหารที่ปรุงสุกแล้วหรือผลิตภัณฑ์ได้ แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการเกาะและการแยกออกจากพื้นผิวซึ่งส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ในสิ่งแวดล้อม อิทธิพลที่มีผลต่อการเกาะ คือ ผิวของแบคทีเรีย การเข้าเกาะบนพื้นผิวและสารอาหารที่อยู่รอบตัว (Frank, 2001)

2.1.5.1 พื้นผิวของแบคทีเรีย

เป็นโครงสร้างชั้นนอกสุดมีอิทธิพลต่อการยึดเกาะบนพื้นผิวมาก พื้นผิวเซลล์จะมีองค์ประกอบหลายอย่างที่เป็นพอลิเมอร์ถูกยึดไว้ภายเซลล์ ในขณะเดียวกันสามารถเชื่อมต่อกับพื้นผิวได้ (Rogers, 1979)

2.1.5.1.1 แคปซูล (capsules)

สารที่มีลักษณะคล้ายเจลหุ้มอยู่รอบผนังเซลล์ แคปซูลประกอบด้วยน้ำและและน้ำตาลที่เป็นโพลิเมอร์ยึดอยู่ในพื้นผิวเซลล์ การเกาะของแคปซูลบนเซลล์แตกต่างกับสารเมือกแบคทีเรียปล่อยออกมานอกเซลล์ซึ่งเป็นแคปซูลโพลิเมอร์ เมื่อปล่อยสารเมือกออกมาแล้วไม่ได้ยึดติดอยู่กับเซลล์ แคปซูลโพลิเมอร์จะแผ่กระจายและอาจจะไปเชื่อมกับอีกเซลล์หนึ่งได้ พวกที่มีสมบัติเป็น acidic อาจจะเชื่อมโดยใช้โลหะที่เป็น divalent ions (Beveridge & Graham, 1991) แคปซูลโพลิเมอร์มัก

ประกอบด้วย acidic residue เช่น uronic, hyaluronic, acetic, pyruvic, glucoronic และ glutamic acids (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1988; Sutherland, 1985) จะทำให้ประจุรวมบนพื้นผิวเป็นค่าลบ แคปซูลจะสร้างพันธะทางเคมีกับอิออนของโลหะและกรดอะมิโนซึ่งจะสามารถดึงสารอาหารเข้ามาใกล้เซลล์ได้ (J. W. Costerton, Marrie, & Cheng, 1985) แคปซูลสามารถยึดเกาะหรือต้านการยึดเกาะได้ แคปซูลที่เป็น hydrophilic สามารถเข้าเกาะกับสารประกอบที่เป็น hydrophobic บนพื้นผิวเซลล์ได้ซึ่งขัดขวางการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิวที่เป็น hydrophobic (Ofek & Doyle, 1994)

2.1.5.1.2 ฟิมบรี (fimbriae) หรือ พิไล (pili)

ลักษณะคล้ายเส้นด้ายที่ถูกยึดอยู่ภายในเซลล์จนถึงเยื่อหุ้มชั้นนอกของเซลล์ ลักษณะหนา (เส้นผ่าศูนย์กลาง 7-11 nm) หรือบาง (1-4 nm) แข็งหรือยืดหยุ่น ยาวประมาณ 0.5-10 μm (Ofek & Doyle, 1994) ประกอบด้วยหน่วยโปรตีนที่ซ้ำกัน กรดอะมิโนของโปรตีนฟิมบรีบางตัวมี nonpolar side chains ซึ่งมีผลต่อ hydrophobicity (Corpe, 1980)

2.1.5.1.3 Outer membrane polymers

องค์ประกอบบนพื้นผิว เช่น lipopolysaccharides lipoproteins lipoteichoic acid และ lipomannan โมเลกุลขององค์ประกอบสารเหล่านี้มีผลต่อค่า hydrophobicity บนผิวเซลล์ (Neu, 1996) แบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ (wild type) มีส่วนโครงสร้าง polysaccharide ยาวและมี lipopolysaccharide ยื่นออกมาจากเซลล์ (Ofek & Doyle, 1994) มีผลทำให้พื้นผิวมีลักษณะเป็น hydrophilic ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เช่น streptococci กลุ่ม A มีส่วนที่เป็นไขมันของ lipoteichoic acid ยื่นยาวออกจากเซลล์ ทำให้พื้นผิวเป็น hydrophobic (Neu, 1996; Wicken, 1980) โปรตีนที่ฝังอยู่บนพื้นผิวเซลล์มีส่วนในการยึดเกาะของเซลล์กับพื้นผิวอื่น รวมถึงคาร์โบไฮเดรตที่อยู่เชื่อมกับโปรตีนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของ enteric lactobacilli ในลำไส้ (Adlerberth et al., 1996; Henriksson, Szewzyk, & Conway, 1991)

2.1.5.1.4 S layers

S layers เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง หรือ glycoproteins ที่จัดเรียงกันเป็นระเบียบและก่อตัวเป็นตาข่ายปกคลุมบนผิวชั้นนอกของแบคทีเรียบางชนิด รวมถึง *Pseudomonas Aeromonas Bacillus* และ *Clostridium* (Austin, Stewart, & Muray, 1990; Beveridge & Graham, 1991) S layers มีประจุบนพื้นผิวเป็นกลาง และเกาะกับพื้นผิวเซลล์ด้วย electrostatic และ hydrophobic interactions (Beveridge & Graham, 1991)

2.1.5.2 สารที่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์แบคทีเรีย

แบคทีเรียจะปล่อยสารบางอย่างออกจากตัวเซลล์ซึ่งจะปกคลุมอยู่บนพื้นผิวเซลล์ เพื่อใช้ในการเกาะและรวมเป็นกลุ่ม หรือช่วยในการดึงเซลล์ออกจากพื้นผิว (Neu, 1996) สารที่ถูกปล่อยออกมานั้นส่วนใหญ่คือ polysaccharide slimes สารเมือกเหนียวมีความสำคัญต่อการเกาะของเซลล์ที่มักเรียกกันว่า slimectins (Ofek & Doyle, 1994) แบคทีเรียบางชนิดผลิตเมือกเหนียวหลังจากเกาะกับพื้นผิว กลายเป็นองค์ประกอบหนึ่งของ glycocalyx ในไบโอฟิล์ม *Serratia marcescens* หลั่งสารประเภท lipopeptide ออกมานอกเซลล์ทำให้ผิวเซลล์เปลี่ยนจาก hydrophilic เป็น hydrophobic (Matsuyama et al., 1992) ทำให้เซลล์ที่เป็น hydrophobic สามารถเข้าเกาะบนพื้นผิวได้

2.1.5.3 การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายนอก

ผิวของแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงให้เข้ากับสภาวะสิ่งแวดล้อม และเมื่อสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะเดิมแบคทีเรียจึงต้องปรับตัวเพื่อความอยู่รอดด้วย Brown and Williams (1985) ได้รวบรวมข้อมูลความสามารถในการปรับตัวของแบคทีเรียมีผลต่อความสามารถที่ทำให้เกิดโรคของแบคทีเรีย และสรุปว่าเซลล์ที่ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วด้วยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเซลล์ นอกจากจะทำให้เซลล์มีชีวิตรอดแล้วยังเปลี่ยนคุณสมบัติในการยึดด้วยเหมือนแบคทีเรียก่อโรคที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ จนสูญเสียความเป็นพิษด้วย

2.1.5.3.1 ผลจากสิ่งแวดล้อมในการเจริญเติบโต

พื้นผิวของ *Staphylococcus aureus* สามารถเป็น hydrophobic หรือ hydrophilic ได้ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเลี้ยงบนอาหาร blood agar พื้นผิวเซลล์จะเป็น hydrophilic ใน coagulase-negative staphylococci ไม่ว่าจะมีแคปซูลหรือไม่ก็ตาม (Malmo, Rozgonyi, Brown, Hjerten, & Wadstrom, 1987) McEldowney and Fletcher (1986) พบว่าการเปลี่ยนแปลงสารอาหารที่อยู่รอบๆมีผลต่อคุณสมบัติของผิวเซลล์และความสามารถในการเกาะบนพื้นผิวของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ต่างกัน ผลการศึกษานี้ใช้หลักการของ Singh and Vincent (1987) ศึกษา *Pseudomonas fluorescens Enterobacter cloacae* และ *Flexibacter* sp. ที่เป็นสายพันธุ์ในน้ำจืด นำมาเลี้ยงในสารอาหารเจือจางเพื่อส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะได้ดีขึ้น พบว่าค่า hydrophobicity หรือการสร้างแคปซูลเพิ่มขึ้น Kim and Frank (1994) พบว่าการเกาะของ *L. monocytogenes* บนสเตนเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว tryptic soy broth ซึ่งไม่สอดคล้องกับเซลล์ที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สังเคราะห์ขึ้น ความสามารถในการเกาะที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดขึ้นเพราะมี peptone ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.5.3.2 ระยะ stationary phase (การปรับตัวสู่ภาวะการอดอาหาร)

แบคทีเรียในอาหารและสิ่งแวดล้อมกระบวนการผลิตอาหารมักเติบโตอยู่ในระยะ stationary phase เนื่องจากขาดสารอาหารหรือสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต ผู้วิจัยที่ศึกษาการเกาะของแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในช่วง stationary phase จะวางแผนการทดลองให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะการอดอาหาร แบคทีเรียในแหล่งน้ำมักตอบสนองภาวะอดอาหารด้วยการเพิ่ม hydrophobicity ทำให้ความสามารถในการเกาะเพิ่มขึ้นและช่วยเซลล์ในการค้นหาสารอาหารที่หลงเหลืออยู่บนพื้นผิว (Dawson, Humphrey, & Marshall, 1981; S. Kjelleberg & Hermansson, 1984; S. Kjelleberg, Humphrey, & Marshall, 1983) อย่างไรก็ตาม Fletcher (1977) พบว่าเซลล์ระยะ log phase ของ pseudomonad ที่อาศัยในทะเลสามารถเกาะบนพื้นผิวพอลิสไตรีน (polystyrene) ได้ดีกว่าเซลล์ในระยะ stationary phase แสดงว่าเกิดการลดลงของค่า hydrophobicity บนพื้นผิว นอกจากนั้นความเครียดที่ *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes* และ *Escherichia coli* อยู่ในสภาวะอดอาหารจะทำให้การเกาะของเซลล์บนเนื้อเยื่อสัตว์ลดลง (Dickson & Frank, 1993)

1312347117

2.2 ไบโอฟิล์ม (Biofilm)

หลักสำคัญในการผลิตอาหารให้ผู้บริโภคมักจะคำนึงถึงคุณค่าสารอาหาร ความพึงพอใจและการขนส่งที่ปลอดภัยจนถึงมือผู้บริโภค ซึ่งการที่จะได้ลักษณะดังกล่าวนี้การควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารจึงเป็นสิ่งสำคัญ แต่ในบางครั้งการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อไม่สามารถกำจัดแบคทีเรียก่อโรคได้หมด ทำให้มันอยู่รอดและเกิดการเกาะติดบนพื้นผิว เช่น ท่อ สายพาน อุปกรณ์และเครื่องมือต่างได้ เมื่อจุลินทรีย์เกาะกับพื้นผิวแล้วจะใช้สารอาหาร อิออนและสารอินทรีย์รอบๆบริเวณที่อาศัยอยู่เพื่อดำรงชีวิตและและเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์จนกลายเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่พอที่จะจับเศษซากสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ ธาตุอาหารและจุลินทรีย์ชนิดอื่น พร้อมๆกับสร้างสารกลุ่มพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว (Extracellular polymeric substances หรือ EPS) และหลั่งออกมานอกเซลล์เพื่อปกคลุมกลุ่มจุลินทรีย์อีกด้วย เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ไบโอฟิล์ม (Biofilm) ซึ่งยากต่อการกำจัดออกและมักเป็นปัญหาที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมอาหาร (J.W. Costerton et al., 1987)

2.2.1 การเกิดไบโอฟิล์ม

2.2.1.1 การเกาะของแบคทีเรีย กลไกการเกาะของแบคทีเรียที่เป็นที่ยอมรับทั่วไปมี 2 แบบ ดังนี้

แบบ 2 ระยะ (Marshall, Stout, & Mitchell, 1971)

ระยะแรกแบคทีเรียจะเคลื่อนที่เข้าใกล้กับพื้นผิวพอที่จะสามารถเข้าเกาะกับพื้นผิวได้ เรียกว่าระยะผันกลับได้ ซึ่งการล้างเพียงอย่างเดียวก็สามารถกำจัดแบคทีเรียออกได้ เมื่อแบคทีเรียเข้าเกาะกับพื้นผิวแล้วจะเข้าสู่ระยะที่สองซึ่งขึ้นอยู่กับระยะเวลาและเกี่ยวข้องกับการผลิตสารที่เป็นเมือก

เหนียว (extracellular material) ที่ช่วยยึดแบคทีเรียไว้กับพื้นผิว และการล้างอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการกำจัดเซลล์ออกจากพื้นผิว ต้องใช้การขัดถูร่วมด้วย

แบบ 3 ระยะ (Busscher & Weerkamp, 1987)

แบ่งขั้นตอนต่างๆตามระยะห่างระหว่างแบคทีเรียกับพื้นผิว ที่ระยะมากกว่า 50 นาโนเมตร มี long-range force และการยึดเกาะเป็นแบบผันกลับได้ จนระยะห่างประมาณ 20 นาโนเมตร จะเกิด long-range force และ electrostatic interaction ในระยะนี้อาจเป็นการยึดเกาะแบบผันกลับได้ แต่เมื่อเวลาผ่านไปจะกลายเป็นการยึดเกาะแบบผันกลับไม่ได้ และในระยะสุดท้าย เมื่อแบคทีเรียมีระยะห่างน้อยกว่า 15 นาโนเมตร จะมีแรงอื่นๆเพิ่มเข้ามาช่วยทำให้แบคทีเรียเกาะกับพื้นผิวแบบไม่ผันกลับ เช่น แรงจากการผลิตพอลิเมอร์ที่ช่วยในการยึดเกาะ

ในระยะสุดท้ายของกลไกทั้งสองแบบขึ้นอยู่กับความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตสารพอลิเมอร์ที่ใช้ช่วยในการยึดเกาะ ส่วนในระยะแรกจะเกิดแรงดึงดูดระหว่างจุลินทรีย์และพื้นผิว ซึ่งแรงนี้ต้องมีมากกว่าแรงผลักที่เกิดขึ้น และส่งผลต่อการยึดเกาะของแบคทีเรีย แรงต่างๆที่เกิดขึ้น อาทิ Long-range forces เช่น electrostatic และ van der Waals forces ส่วน short-range forces เช่น พันธะทางเคมี และ hydrophobic interactions

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์บนพื้นผิว

Hydrophobic interactions

มีรายงานต่างๆที่สนับสนุนว่า Hydrophobic interactions ผลต่อการยึดเกาะที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์ Rosenberg and Kjelleberg (1987) ได้รวบรวมวิธีการหาค่า hydrophobicity บนพื้นผิวเซลล์ มีทั้งหมด 7 วิธี ดังนี้ Hydrophobic interactive chromatography (HIC), Bacteria adhesion to hydrocarbons (BATH), Salting-out aggregation test 3 วิธีที่กล่าวมานี้เป็นวิธีที่นิยมใช้มากกว่าวิธีอื่นๆ ดังนี้ Adhesion to polystyrene, The use of molecular probe specific for hydrophobic surface components, Determination of contact angles และ two-phase partitioning Gilbert, Evans, Evans, Duguid, and Brown (1991) พยายามเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของ hydrophobicity ของ *E. coli* และ *S. epidermidis* กับพื้นผิวของแก้ว พบว่ามีความสัมพันธ์เกิดขึ้นกับ *S. epidermidis* แต่ไม่พบใน *E. coli* Mafu, Roy, Goulet, and Savole (1991) สำรวจ hydrophobicity ของ *L. monocytogenes* จำนวน 22 strains พบว่าเป็น hydrophilic และไม่พบความสัมพันธ์ของการยึดเกาะกับค่าพลังงานอิสระ (free energy) ของพื้นผิวของ พอลิโพรพิลีน ยาง แก้ว และสเตนเลส รายงานที่อ้างปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อค่า hydrophobicity คือ โครงสร้างโปรตีนบนพื้นผิวเซลล์แบคทีเรีย Paul and Jeffrey (1985) พบว่า proteolytic enzymes ช่วยลดค่า hydrophobicity ของ *Vibrio proteolytica* จากงานวิจัยที่กล่าวนั้นยังเป็นหลักฐานที่ไม่แน่ชัดว่าค่า hydrophobicity เป็นปัจจัยหลักที่สามารถใช้อธิบายการยึดเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิวของแข็งได้เพราะวิธีการทดลองที่ใช้ยังมีจุดบกพร่องอยู่และบางการทดลองยังไม่

สามารถหาเหตุผลมาอธิบายผลการทดลองที่เกิดขึ้นได้แต่อย่างไรก็ตามค่า hydrophobicity น่าจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการยึดเกาะเช่นกัน

Conditioning film

ในกระบวนการผลิตอาหาร แบคทีเรียมักจะมาพร้อมกับสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เช่น โปรตีนจากเนื้อสัตว์ โดยสารเหล่านี้และแบคทีเรียจะถูกส่งไปสัมผัสพื้นผิวโดยการแทรกซึมหรือการไหลของของเหลว จนเกิดการสะสมขึ้นระหว่างผิวของของแข็ง-ของเหลว ทำให้พื้นผิวบริเวณนั้นมีสารอาหารมากกว่าของเหลวที่ไหลหรือซึมผ่านด้านนอก ปริมาณสารอาหารที่เพิ่มขึ้นนี้เรียกกันว่า conditioning film ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพของพื้นผิว เช่น ค่าพลังงานอิสระ, hydrophobicity และประจุของพื้นผิว (Garrett, Bhakoo, & Zhang, 2008)

ลักษณะของพื้นผิว

ค่าพลังงานอิสระ hydrophobicity ความขรุขระ และประจุบนพื้นผิว Chmielewski and Frank (2003) พบว่าการเกาะติดของจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ง่ายบนพื้นผิวที่เป็น hydrophilic (สเตนเลสและแก้ว) หรือมีค่าพลังงานอิสระสูง ส่วนพื้นผิวที่เป็น hydrophobic (ยาง, ไนลอนและเทฟลอน) สามารถเกิดไบโอฟิล์มได้เช่นกันแต่เกิดได้น้อยกว่า

2.2.1.2 การเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์

เมื่อแบคทีเรียเกาะติดแบบไม่ผันกลับกับพื้นผิวแล้ว เซลล์จะใช้สารอาหารที่อยู่รอบๆ ในการเจริญเติบโต แบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (microcolony) จนกระทั่งขยายใหญ่เกาะรวมกันเป็นชั้นของเซลล์ปกคลุมพื้นผิว (Poulsen, 1999)

2.2.1.3 การพัฒนาเป็นไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์

โครงสร้างของไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่อาจเป็นชั้นของเซลล์เพียงชั้นเดียวภายใต้ EPS ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน หรืออาจเป็นชั้นของเซลล์หลายชั้นซ้อนกัน ภายในมีช่องลำเลียงน้ำกระจายอยู่ทั่วไป แบคทีเรียสามารถนำสารอาหารที่ผ่านมายังท่อนี้ไปใช้ในการเจริญเติบโตได้

2.2.2 การยึดเกาะและไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรค

งานวิจัยที่ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวต่างๆ (Chaturongkasumrit, Takahashi, Keeratipibul, Kuda, & Kimura, 2011) ศึกษาความขรุขระของสายพานพอลิเอสเทอร์ยูรีเทนที่มีผลกระทบต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *Listeria monocytogenes* พบว่าความขรุขระของ

พื้นผิวมีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มที่ 15°C และพบว่าระดับการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวสเตนเลสมีมากกว่าพื้นผิวพอลิเอสเทอร์ยูรีเทน Stepanovic´, C´ irkovic´, Ranin, and Vlahovic´ (2004) ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของ *Salmonella* spp. และ *L. monocytogenes* บนพื้นผิวพลาสติกพอลิสไตรีน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ พบว่าสารอาหารมีผลต่อคุณภาพการผลิตไบโอฟิล์ม *Salmonella* spp. ผลิตไบโอฟิล์มได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อย (tryptic soy broth เจือจาง) ในขณะที่ *L. monocytogenes* ผลิตไบโอฟิล์มได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมาก (brain heart infusion broth)

Hyde, Alberg, and Smith (1997) ศึกษาการยึดเกาะของแบคทีเรีย การเกิดไบโอฟิล์มและการกำจัดไบโอฟิล์มออกจากพื้นผิวโพลิเมอร์ฟลูออริเนตเปรียบเทียบสเตนเลส เกรด 316 แก้วและโพลิโพรพิลีน (ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นวัสดุที่ใช้กันอยู่ในโรงงานอุตสาหกรรม) โดยการประเมินค่าจำนวนแบคทีเรีย (*Klebsiella pneumonia, Salmonella choleraisuis* และ *Escherichia coli*) ที่คลุมอยู่บนพื้นผิวก่อนและหลังการใช้สารเคมีแบบอ่อนๆกำจัดแบคทีเรียออกจากพื้นผิว พบว่าความสามารถของแบคทีเรียในการยึดเกาะกับพื้นผิวจากมากไปน้อย ดังนี้ สเตนเลส โพลิโพรพิลีน แก้วและโพลิเมอร์ฟลูออริเนตตามลำดับ ศึกษาค่า contact angle โดยใช้ของเหลว 3 แบบ คือ น้ำปราศจากไอออน (18MΩ) อาหารเลี้ยงเชื้อ peptone water 0.1% และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ของแบคทีเรียที่ตายแล้วที่ระดับ 10^6 cell/ml นำค่า contact angle ไปเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง hydrophobicity ของพื้นผิวและค่า contact angle จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียลอยตัวอยู่ พบว่า พื้นผิวสเตนเลส โพลิโพรพิลีน โพลิเมอร์ฟลูออริเนตและแก้วมีค่า contact angle ต่างๆ ดังนี้ ค่า contact angle จากน้ำอยู่ที่ 41.5, 101.3, 98.5-101.8 และ 38.5 องศา ตามลำดับ ค่า contact angle จากอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ 32.5, 85.5, 87.8-96.5 และ 29.5 องศา ตามลำดับ และค่า contact angle จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียอยู่ที่ 36.3, 87.3, 85.3-93.8 และ 26.8 องศาตามลำดับ จากผลพื้นผิวสเตนเลสและแก้วมีค่า contact angle น้อยแสดงว่าพื้นผิวเปียกได้ง่ายกว่าวัสดุที่เป็นโพลิเมอร์ที่เป็น hydrophobic และการที่ของเหลวมีองค์ประกอบของโปรตีนและจุลินทรีย์ทำให้พื้นผิวเปียกได้ง่ายขึ้นโดยเปลี่ยนแปลงค่า contact angle ของพื้นผิวพอลิเมอร์อยู่ระหว่าง 15-20 องศา ส่วนสเตนเลสและแก้วมีการเปลี่ยนแปลงค่า contact angle น้อยกว่าพื้นผิวพอลิเมอร์โดยที่โพลิเมอร์ฟลูออริเนตมีการเปลี่ยนแปลงค่าน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโพลิโพรพิลีน ศึกษาลักษณะพื้นผิวโดยใช้ atomic force microscopy และ scanning electron microscopy ที่กำลังขยาย 200x ให้ผลเหมือนกันคือพื้นผิวโพลิเมอร์ฟลูออริเนตมีค่าความขรุขระมากที่สุดซึ่งเกิดจากขั้นตอนกระบวนการผลิต รองลงมาคือพื้นผิวสเตนเลส พอลีโพรพิลีนและแก้วมีค่าความขรุขระน้อยที่สุด พื้นผิวแก้วค่อนข้างเรียบ การยึดเกาะทางเคมี ระหว่างแบคทีเรียและพื้นผิวในระหว่างการใช้สารเคมีเป็นแบบผันกลับได้เหมือนกับพื้นผิวสเตนเลสแต่พื้นผิวสเตนเลสมีความขรุขระมากกว่าทำให้แบคทีเรียเข้ายึดเกาะในรูหรือรอยแยกบนพื้นผิวด้วยแรงทางเคมี พื้นผิวโพลิเมอร์ฟลูออริเนตมีความขรุขระมากซึ่งเพิ่มโอกาสให้แบคทีเรียเข้ายึดเกาะแต่พื้นผิวที่มีพันธะระหว่าง C-F มากทำให้แบคทีเรียเข้ายึดเกาะด้วยแรงทางเคมีน้อยทำให้กำจัดไบโอฟิล์มได้ง่าย ส่วนพื้นผิวโพลีโพรพิลีนมีพื้นผิวเรียบ แบคทีเรียยึดเกาะด้วยพันธะทางเคมีเมื่อใส่ลงในน้ำจะเกิดการออกซิเดชั่นทำให้องค์ประกอบที่เป็นหมู่ carbonyl และ hydroxyl เกิดพันธะทางเคมี (ionic bonding หรืออาจ

1312347117

เกิด van der Waals) กับผิวของแบคทีเรีย จากการศึกษาค่าต่างๆที่กล่าวมาพบว่าพื้นผิวทั้งหมดสามารถเกิดไบโอฟิล์มได้ การยึดเกาะของไบโอฟิล์มและการกำจัดออกขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ซึ่งงานนี้ได้เสนอแนะว่าควรพิจารณาถึงจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการผลิต โอกาสที่จะเกิดพันธะทางเคมีระหว่างองค์ประกอบทางชีววิทยา เช่น โปรตีนต่างๆ กับพื้นผิวที่ใช้ และความสามารถทางเคมีและกายภาพของวัสดุที่ใช้ในระบบกระบวนการผลิตนั้นๆ

2.3 พื้นผิวสัมผัสอาหาร (food contact surfaces)

ในอุตสาหกรรมอาหาร พื้นผิวสัมผัสอาหารแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ แบบเปิด (open) และแบบปิด (closed) พื้นผิวแบบปิด เช่น ท่อ (primary pipework) ลำเลียงวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวผ่านภายในท่อ พื้นผิวแบบเปิด เช่น สายพานลำเลียง (conveyors) ขนส่งอาหารแห้งหรืออาหารที่มีความชื้น ดังนั้นของเหลวจึงไม่ได้ ห่อหุ้มอาหารหรือเคลือบบนพื้นผิวสายพาน

ระบบปิดจะพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่รอยต่อระหว่างของแข็ง-ของเหลว (solid-liquid interface) ซึ่งจุลินทรีย์จะเข้าเกาะ (attachment) และรวมตัวเป็นกลุ่มขนาดเล็ก (colonization) การเข้าไปล้างทำความสะอาดพื้นผิวเหล่านี้ค่อนข้างยาก ดังนั้นจึงมีโอกาสพบไบโอฟิล์มอยู่ภายใน ในขณะที่ระบบเปิดจะพบจุลินทรีย์บริเวณรอยต่อระหว่างของแข็ง-อากาศ (solid-air) และระหว่างของแข็ง-ของเหลว-อากาศ (solid-liquid-air) จุลินทรีย์จะเข้าเกาะและเกิดการแข่งขันกับสิ่งแวดล้อมที่มีอาหารและแร่ธาตุน้อยเพื่อการอยู่รอด เจริญเติบโตและเกาะกลุ่มกันไว้เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ (dehydration) จากความแห้ง ขาดความชื้นและเสี่ยงต่อการถูกกำจัดด้วยขั้นตอนการล้างทำความสะอาด ดังนั้นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการมีอยู่และการอยู่รอดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวก่อนและหลังจากล้างทำความสะอาด คือประเภทพื้นผิว (เช่น ลักษณะพื้นผิว องค์ประกอบทางเคมี การออกแบบและการใช้งานที่เหมาะสม) สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่อยู่บนพื้นผิว (จากอาหารและการทำความสะอาด) (Verran, Airey, Packer, & Whitehead, 2008) สายพาน อุปกรณ์และเครื่องมือที่มีการสัมผัสกับอาหารส่วนใหญ่ทำมาจากสเตนเลสและพลาสติก เช่น พอลิเอสเทอร์ยูรีเทนที่ใช้ทำสายพาน

2.3.1 สเตนเลส (stainless steel)

ชื่ออย่างเป็นทางการ คือ “เหล็กกล้าไร้สนิม” ใช้เรียกเหล็กใน กลุ่มที่มีความต้านทานการกัดกร่อนสูง สเตนเลสเป็นโลหะผสมระหว่างเหล็กและคาร์บอน ซึ่งส่วนประกอบจะมีปริมาณคาร์บอนต่ำ มีโครเมียมเป็นส่วนผสมหลักอย่างต่ำประมาณ 10.5% ทำให้เกิดการสร้างฟิล์มโครเมียมออกไซด์ (chromium oxide film : CrO_2 หรือเรียกว่า passive film) ที่มองไม่เห็นเกาะติด แน่นอยู่ที่ผิวหน้า ทำให้เหล็กกล้า มีความต้านทานการกัดกร่อน ถ้าฟิล์มที่ผิวหน้านี้ถูกทำลายจากแรงกลหรือสารเคมี ออกซิเจนที่มีอยู่ในบรรยากาศ จะเข้าทำปฏิกิริยากับโครเมียม สร้างฟิล์มโครเมียมออกไซด์ทดแทนขึ้นใหม่ด้วยตัวมันเอง

สเตนเลสนิยมนำมาทำเป็นวัสดุในการทำเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะทนทานและคงตัวเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ทนทานต่อการกัดกร่อนสูงและมีความเป็นกลาง สามารถปรับปรุงคุณสมบัติในการต้านทานการกัดกร่อนและสมบัติอื่นๆที่ต้องการของสเตนเลสให้สูงขึ้นได้โดยเพิ่มส่วนผสมของโครเมียมและธาตุอื่นๆ เช่น โมลิบดิบนัม นิกเกิลและไนโตรเจนเข้าไป ทำให้สเตนเลสมีหลากหลายมากกว่า 60 ชนิด (Thai Stainless Steel Development Association)

ประเภทของสเตนเลส

สเตนเลสแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ตามโครงสร้างดังนี้

ตระกูลออสเทนนิติค (Austenitic) หรือเรียกกันว่า ซีรี่ส 300 การผลิตสเตนเลสในโลกนี้ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นสเตนเลสตระกูลนี้ ประกอบด้วยคาร์บอนอย่างน้อย 0.15 เปอร์เซ็นต์ มีส่วนผสมของโครเมียมอย่างน้อย 16 เปอร์เซ็นต์ และนิกเกิล ซึ่งเพิ่มความทนทานต่อการกัดกร่อนและช่วยปรับปรุงคุณสมบัติในการขึ้นรูป ใช้งานกันอย่างกว้างขวาง เช่น นำไปทำอุปกรณ์เครื่องครัว เครื่องใช้บนโต๊ะอาหาร เครื่องใช้ไฟฟ้า อุปกรณ์ในการผลิตเบียร์ หรือการผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มและอาหารที่มีสมบัติต้านทานที่เกี่ยวข้องกับความสะอาดและสุขศาสตร์อนามัย

ตระกูลเฟอร์ริติค (Ferritic) มีสมบัติดูดแม่เหล็ก มีโครเมียมเป็นธาตุผสมหลักระหว่าง 10.5-27 เปอร์เซ็นต์ บางเกรดผสมนิกเกิ้ลลงไปเล็กน้อย บางเกรดผสมโมลิบดินัม อลูมิเนียมหรือไททาเนียม นิยมใช้ในงานอุปกรณ์ตกแต่งในอาคาร เครื่องใช้บนโต๊ะอาหาร ช้อนส้อม มีด และเครื่องใช้ในครัว อ่างล้าง อุปกรณ์เครื่องใช้ภายในบ้าน งานสถาปัตยกรรม เครื่องถ่ายความร้อนในกระบวนการผลิต และอุปกรณ์เครื่องใช้ในการผลิตอาหารนม แกนและถังปั่นในเครื่องซักผ้าและเครื่องล้างจาน นอกจากนี้สามารถนำไปใช้ในงานเรือเดินสมุทร ทำแผ่นดาดฟ้าเรือ ฝายน้ำล้น โซ่ในงานขนถ่ายสินค้าอุปกรณ์ ดูดฝุ่นและควัน เป็นต้น

ตระกูลมาร์เทนซิติค (Martensitic) เป็นตระกูลที่มีความต้านทานการกัดกร่อนน้อยกว่าออสเทนนิติค และเฟอร์ริติค แต่มีความทนทานและแข็งแรงมากกว่า มีคุณสมบัติดูดแม่เหล็ก โดยทั่วไปจะมีส่วนผสมของโครเมียม 12 -14 เปอร์เซ็นต์ โมลิบดินัม 0.2-1 เปอร์เซ็นต์ นิกเกิ้ล 0-2 เปอร์เซ็นต์และมีคาร์บอนผสมประมาณ 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ นิยมนำไปใช้ในงานที่ต้องการความทนทานและมีความแข็ง เช่น ทำใบมีด เครื่องมือผ่าตัด ตัวยึด กระสวยหรือแกนเพลา หัวฉีด เพลา และสปริง โดยทั่วไปผลิตออกมาในรูปเป็นท่อนแบน แผ่น และงานหล่อ

ตระกูลดูเพล็กซ์ (Duplex) เนื่องจากมีโครงสร้างผสมระหว่าง โครงสร้างเฟอร์ไรต์และออสตไนต์ จึงทำให้มีความแข็งแรงมากกว่าออสเทนนิติคและมีความทนทานต่อการกัดกร่อน มีโครเมียมเป็นธาตุผสมอยู่ระหว่าง 19 ถึง 28 เปอร์เซ็นต์ โมลิบดินัมสูงกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และมีนิกเกิลน้อยกว่าตระกูลออสเทนนิติคใช้งานมากในสภาพแวดล้อมที่มีคลอไรด์สูง นิยมนำ ไปใช้ในการทำแผงและท่ออุปกรณ์แลกเปลี่ยนความร้อน อุปกรณ์ขนถ่ายวัสดุ ถังเก็บ และถัง ความดันใน

1312347117

บรรยากาศแวดล้อมของคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้นสูง เช่น อุปกรณ์ หล่อเย็นด้วยน้ำทะเล การกลั่นน้ำทะเลให้บริโภคได้ อุตสาหกรรม หมักดอง เหมืองฉีดน้ำ อุตสาหกรรมน้ำมันและแก๊ส

ตระกูลเพิ่มความแข็งโดยการตกผลึก มีความต้านทานกการกัดกร่อนเทียบเคียงกับตระกูลออสเทนนิติค มีความแข็งแรงมากกว่าตระกูลมาร์เทนซิติค ที่รู้จักกันทั่วไปคือเกรด 17-4 มีโครเมียมผสมอยู่ 17 เปอร์เซ็นต์และนิกเกิล 4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังมีทองแดงและไนโอเบียมผสมอยู่ด้วย เหมาะสำหรับทำแกน ปั๊มหัววาล์ว และส่วนประกอบของอากาศยาน

2.3.2 พอลิเอสเทอร์ยูรีเทน (polyesterurethane)

เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์พอลีเอสเทอร์ยูรีเทน (polyesterurethane) หรือ พอลีเอสเทอร์พอลียูรีเทน (polyester polyurethane) เกิดจากการผสมกันของพอลีเอสเทอร์และยูรีเทนแบบโซ่ตรงหรือโซ่กิ่ง ทำให้มีความเหนียวมากขึ้น สามารถด้านการเกิดรอยถลอกหรือรอยขีดข่วน ทนต่อการยืดหรือฉีกได้ และทนทานต่อสารเคมีอีกด้วย (Chaturongkasumrit et al., 2011) มักนำมาใช้เป็นวัสดุในการผลิตสายพานที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

1312347117

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้เก็บจุลินทรีย์จากพื้นผิวสัมผัสอาหาร

โดยปกติการล้างทำความสะอาดถูกออกแบบเพื่อกำจัดซากอาหารและจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับต่ำ (Holah, 1992) แต่อย่างไรก็ตามบนพื้นผิวที่ดูสะอาดสามารถซ่อนจุลินทรีย์จำนวนมาก สามารถปนเปื้อนข้ามไปยังผลิตภัณฑ์ (cross-contamination) เกิดการแพร่ระบาดของโรคอาหารเป็นพิษได้ (Bhunia, 2008) การตรวจสอบด้วยสายตาไม่สามารถบอกได้ว่าพื้นผิวนั้นปราศจากจุลินทรีย์หรือไม่ ถึงแม้ว่าในกระบวนการผลิตจะมีการใช้ระบบ HACCP จึงได้มีการใช้วิธีการทางจุลชีววิทยา วิธีทั่วไปคือเทคนิคสวอบโดยใช้อุปกรณ์รูปแบบต่างๆช่วยเก็บจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่บนพื้นสัมผัสอาหาร (Legnani, Leoni, Berveglieri, Mirolo, & Alvaro, 2004)

อุปกรณ์ที่ใช้เก็บจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่บนพื้นผิวมีหลายชนิด เช่น สวอบอนามัย (hygiene swabs) ฟองน้ำเซลลูโลส (sponges) ผ้าก๊อซ (gauze) และสวอบโฟมพอลิยูรีเทน (polyurethane foam) ปัจจุบันสวอบถูกออกแบบให้มีรูปทรงและขนาดที่หลากหลายเพื่อให้ผู้บริโภคได้เลือกใช้ตามความต้องการและเหมาะสมกับพื้นผิว

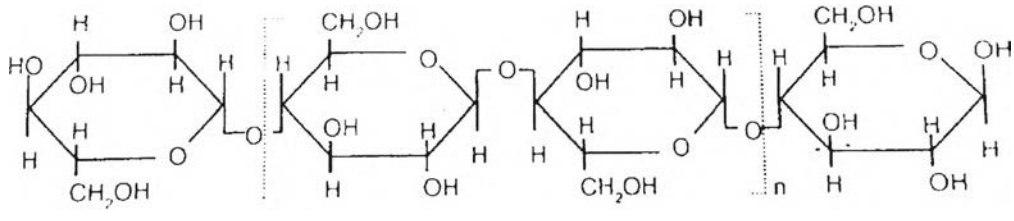
2.4.1 สวอบอนามัย (hygiene swabs)

เป็นอุปกรณ์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมด้านอาหารและด้านสุขภาพ เพื่อกำหนดและประเมินประสิทธิภาพขั้นตอนในการทำความสะอาด (cleaning) และการฆ่าเชื้อโรค (disinfection) ภายในโรงงานและพื้นผิวสัมผัสอาหาร สวอบอนามัยเป็นอุปกรณ์ดั้งเดิมที่ใช้กันมานาน ลักษณะเป็นด้ามไม้หรือพลาสติกที่ปลายพันด้วยเส้นใย เช่น สำลี (cotton) เรยอน (rayon)

พอลิเอสเทอร์ (polyester) สำลี-อัลจิเนต (coton-alginate) หรือดาครอน (Dacron) ใช้ร่วมกับสารละลายเจือจาง (diluent) ที่ช่วยฟื้นฟูเซลล์แบคทีเรียที่บาดเจ็บ หรือ/และเป็นกลางทำให้สารฆ่าเชื้ออยู่ในสารละลายได้ ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างด้วยการสวอบโดยทั่วไปจะใช้สวอบที่จุ่มสารละลายเจือจางขัดถูบนพื้นผิวและนำสวอบใส่กลับในหลอดที่มีสารละลายเจือจาง สวอบแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate swab) เมื่อใช้เก็บเชื้อจากพื้นผิวแล้วใส่สวอบลงในสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟส (sodium hexametaphosphate) อัลจิเนตจะสลายตัวในสารละลายและปล่อยแบคทีเรียออกจากสวอบ สวอบอนามัยมีค่าใช้จ่ายน้อยและใช้งานง่ายในการตรวจการปนเปื้อนบนพื้นผิวในบริเวณซอกมุมที่เข้าถึงได้ยาก (Clemons, 2010)

สวอบอนามัยทำจากเส้นใย (fiber) 2 ประเภท คือ เส้นใยธรรมชาติและเส้นใยประดิษฐ์ เส้นใยธรรมชาติ ได้แก่ เส้นใยที่มีอยู่ในธรรมชาติจากพืช สัตว์และแร่ สวอบสำลี (รูปที่ 2.2) ทำมาจากเส้นใยฝ้าย (cotton) เป็นเส้นใยจากพืชมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (คาร์บอน 44.4% ไฮโดรเจน 6.2% และออกซิเจน 49.4%) หน่วยโครงสร้างพื้นฐานคือ anhydro-d-glucose ($C_6H_{10}O_5$) ต่อกันเป็นลูกโซ่โมเลกุลยาวตามรูป 2.1 แต่ละหน่วยของกลูโคสมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ โครงสร้างคล้ายน้ำตาลแต่เนื่องจากโมเลกุลต่อกันยาวเป็นลูกโซ่จึงไม่ละลายน้ำ หมู่ไฮดรอกซิลจะเป็นตัวดูดน้ำทำให้เส้นใยดูดซึมความชื้นได้ดี (วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา, 2543)

เส้นใยประดิษฐ์ที่นำมาทำสวอบ เช่น เรยอน (rayon) พอลิเอสเทอร์ (polyester) ไนลอน (nylon) และอะซิเทต (acetate) เส้นใยประดิษฐ์ แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือเส้นใยประดิษฐ์จากธรรมชาติ เส้นใยสังเคราะห์ และเส้นใยจากแร่และเหล็ก (ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2004) พัฒนาคุณสมบัติบางประการแตกต่างจากเส้นใยจากธรรมชาติ แสดงตามตารางที่ 2.1 ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายมากขึ้น



รูปที่ 2. 2 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเซลลูโลส (วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา, 2543)

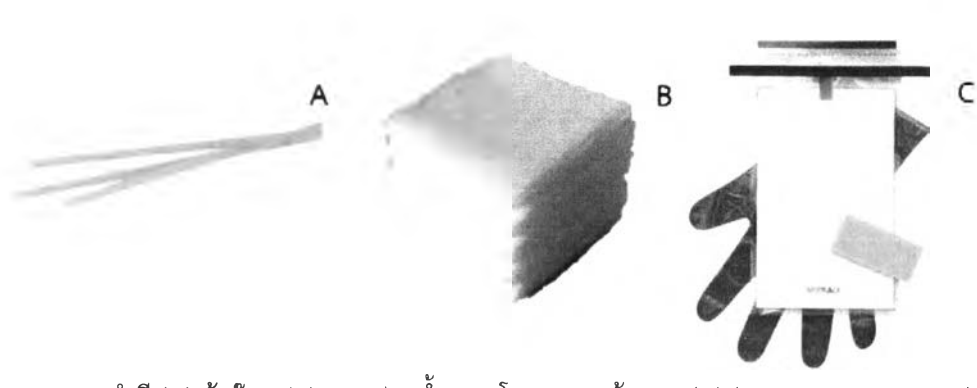
2.4.2 ฟองน้ำเซลลูโลส (cellulose sponge)

ฟองน้ำมีหลักการเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิวเหมือนกับสวอบอนามัย มักใช้กับพื้นผิวที่มีพื้นที่ขนาดใหญ่ เพิ่มโอกาสในตรวจพบแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่บนพื้นผิวในระดับต่ำ เช่น *L. monocytogenes* และ *E. coli* O157:H7 (Lindblad, 2007) ฟองน้ำเซลลูโลสทำจากเซลลูโลส

ธรรมชาติชนิด Biocide-free สะดวกในการใช้งาน และสามารถกักเก็บและปลดปล่อยเชื้อได้ดี (3M Thailand, 2557) (รูปที่ 2.2)

2.4.3 ผ้าก๊อซ (gauze)

อุปกรณ์ที่ใช้เก็บจุลินทรีย์เพื่อนำไปตรวจสอบทางการแพทย์ ในการทดลองนี้ได้นำมาทดสอบประสิทธิภาพการเก็บจุลินทรีย์จากพื้นผิวสัมผัสอาหาร ผ้าก๊อซทำจากเส้นใยฝ้ายเหมือนสวอบสำลีแต่มีลักษณะการใช้งานและขนาดใกล้เคียงกับฟองน้ำเซลลูโลส (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2. 3 สวอบสำลี (A) ผ้าก๊อซ (B) และฟองน้ำเซลลูโลสแบบแห้ง 3M (C) (3M Thailand, 2557)

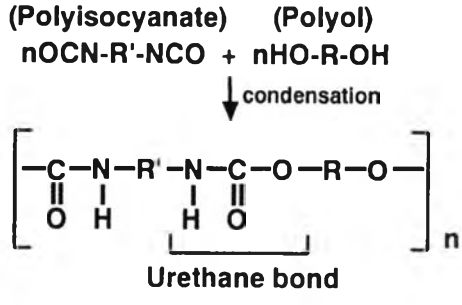
ตารางที่ 2. 1 เปรียบเทียบระหว่างเส้นใยธรรมชาติและเส้นใยประดิษฐ์ (วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา, 2543)

เส้นใยธรรมชาติ	เส้นใยสังเคราะห์
การผลิตขึ้นอยู่กับฤดูกาล และต้องเก็บรักษาเพื่อรอการใช้งาน	การผลิตทำได้ต่อเนื่องตลอดปี
คุณภาพไม่สม่ำเสมอ ขึ้นกับภูมิอากาศ น้ำ อาหาร แมลงและโรคต่างๆ	คุณภาพสม่ำเสมอ
สมบัติทางกายภาพขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโต	สมบัติทางกายภาพขึ้นกับการควบคุมการผลิต
ส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางโมเลกุลขึ้นกับการเจริญเติบโตทางธรรมชาติ	ส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางโมเลกุลขึ้นกับสารตั้งต้นที่ใช้สังเคราะห์
เส้นใยสั้นยกเว้นไหม	ความยาวของเส้นใยไม่จำกัด
ดูดซึมความชื้นได้ดี	ส่วนใหญ่ดูดซึมความชื้นได้ไม่ดี ยกเว้น เรยอน

1312347117

2.4.4 สวอบโฟมพอลิยูรีเทน (polyurethane foam)

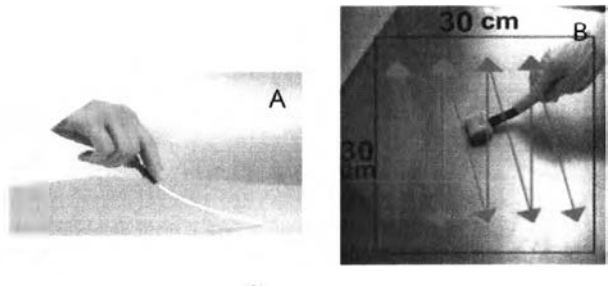
พอลิยูรีเทน (polyurethane, PUR) เป็นพลาสติกอยู่ในกลุ่มเทอร์โมเซต (thermoset) เมื่อผ่านการขึ้นรูปแล้วจะแข็งตัวอย่างถาวร เมื่อได้รับความร้อนจะไม่สามารถหลอมได้อีก และถ้าได้รับความร้อนมากจะเกิดการเสื่อมสภาพของตัวพลาสติก พอลิยูรีเทน (polyurethane, PUR) สังเคราะห์ขึ้นจากการควบแน่นระหว่างพอลิออล (polyol) และพอลิไอโซไซยาเนต (polyisocyanate) ได้เป็นสายพอลิเมอร์คาร์บอนที่เชื่อมต่อด้วยยูรีเทน ตามรูปที่ 2.4 พอลิยูรีเทนแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามพอลิออลที่ใช้ ในการสังเคราะห์พอลิยูรีเทนโดยใช้พอลิเอสเทอร์ (polyester) แทนพอลิออล เรียกว่า พอลิเอสเทอร์ พอลิยูรีเทน (polyester polyurethane) แต่ถ้าใช้พอลิอีเทอร์ (polyether) จะได้พอลิอีเทอร์ พอลิยูรีเทน (polyether polyurethane) (Akutsu et al., 1998) พอลิยูรีเทนเป็นวัสดุที่ยืดหยุ่น อ่อนนุ่ม เมื่อนำมาขึ้นรูปเป็นโฟมโดยใช้สารที่ทำให้เกิดฟอง (foaming agent) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สวอบที่มีรูพรุน น้ำหนักเบาและแข็งแรง (อโนดาษ์ รัชเวทย์, 2552)



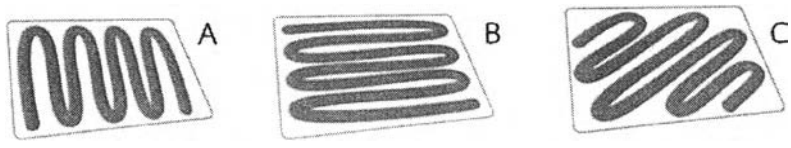
รูปที่ 2. 4 โครงสร้างของพอลิยูรีเทน (PUR) (Akutsu, Kambe, Nomura, & Nakahara, 1998)

2.4.5 การสวอบ

U.S. Food and Drug Administration กำหนดขนาดพื้นที่ในการใช้สวอบเก็บแบคทีเรียดังนี้ สวอบสำลีและโฟมใช้เก็บแบคทีเรียในพื้นที่อย่างน้อย 10 cm x 10 cm ฟองน้ำใช้เก็บแบคทีเรียในพื้นที่อย่างน้อย 30 cm x 30 cm และแนะนำขั้นตอนการใช้อุปกรณ์สวอบเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิวโดยให้สวอบบนพื้นผิวในแนวตั้ง แนวนอนและแนวทแยง อย่างละ 10 ครั้ง ส่วนฟองน้ำ ตามรูปที่ 2.5 และ 2.6



รูปที่ 2. 5 ตัวอย่างการสวอบบนพื้นผิวสเตนเลสด้วยสวอบสำลี (A) และฟองน้ำ (B) (3M Thailand, 2557)



รูปที่ 2. 6 ทิศทางการสวอบ แนวตั้ง (A) แนวนอน (B) และแนวทแยง (C) (3M Thailand, 2557)

2.4.6 การใช้อุปกรณ์สวอบเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิว

Rose et al. (2004) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุสวอบที่แตกต่างกัน 4 ชนิด (แบบจุ่มบัฟเฟอร์และแบบไม่จุ่มบัฟเฟอร์) ในการเก็บสปอร์ของ *Bacillus anthracis* จากพื้นผิวสเตนเลส โดยใช้วัสดุสวอบ 4 ชนิด ดังนี้ สำลี (cotton) พอลิเอสเทอร์ (polyester) เรยอน (rayon) และโฟม (macrofoam) เปรียบเทียบความสามารถในการกักเก็บสปอร์ไว้ในสวอบโดยใส่สารละลายที่มีสปอร์ของ *Bacillus anthracis* ที่ระดับ log 5 CFU/ml ปริมาตร 100 µl ลงบนสวอบโดยตรงแล้วนำสวอบไปจุ่มลงในหลอดที่มีสารละลาย phosphate-buffered saline ที่มี tween 80 อยู่ 0.4% (PBST) 5 ml นำไป vortex พบว่าสวอบสำลี โฟมและเรยอนมีค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยอยู่ที่ 93.9, 93.4 และ 91.7 ตามลำดับ แตกต่างจาก ($p<0.05$) สวอบพอลิเอสเทอร์ มีค่าที่ 83.8% การเปรียบเทียบการใช้สวอบทั้ง 4 ชนิดเก็บสปอร์จากพื้นผิวสเตนเลส เกรด 304 ขนาด 2 นิ้ว x 2 นิ้ว โดยใส่สารละลายสปอร์ที่ระดับ 5 log CFU/ml ปริมาตร 500 µl พบว่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการใช้สวอบแบบจุ่มบัฟเฟอร์เก็บสปอร์ (14.3%) สูงกว่าการใช้สวอบแบบไม่จุ่มบัฟเฟอร์ (4.4%) การดึงสปอร์ออกจากสวอบด้วยการ vortex ให้ผลดีกว่า sonication หรือการเขย่าเพียงเล็กน้อย (minimal agitation) และจำนวนสปอร์เฉลี่ยที่เก็บได้จากพื้นผิวโดยใช้การ vortex พบว่าโฟมและสำลีดีกว่าพอลิเอสเทอร์และเรยอน มีค่าอยู่ที่ 43.6%, 41.7%, 9.9% และ 11.5%ตามลำดับ ประสิทธิภาพการเก็บสปอร์ของ *Bacillus anthracis* จากพื้นผิวสเตนเลสได้ดีที่สุดโดยใช้วัสดุสวอบที่ทำจากโฟมที่จุ่มบัฟเฟอร์และดึงสปอร์ออกจากสวอบด้วยการ vortex มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 43.6%

Pearce and Bolton (2005) เปรียบเทียบการตรวจ *Enterobacteriaceae* จากซากเนื้อวัว หมูและแกะด้วยวิธี excision และวิธีสวอบด้วยฟองน้ำ (polyurethane (PU) sponge และ cellulose acetate sponge) โดยการสุ่มตัวอย่าง 2 แบบ แบบแรกคือการสุ่มตัวอย่าง 4 จุดจากซากสัตว์ตัวเดียวกัน และแบบที่ 2 คือการสุ่มตัวอย่าง 4 จุดจากกลุ่มซากสัตว์ การตรวจแบคทีเรียแบบ excision แบบที่ 1 โดยการตัดชิ้นเนื้อจากจุดต่างๆขนาด 5 cm^2 (หนา 5 mm) ใส่ถุงปลอดเชื้อ (stomacher bag) แต่ละถุง ส่วนการสุ่มตัวอย่างแบบที่ 2 นำชิ้นเนื้อที่ตัดได้จากทั้งสี่จุดใส่ลงในถุงเดียวกัน การตรวจแบคทีเรียด้วยวิธีสวอบ การสุ่มตัวอย่างแบบที่ 1 ใช้ฟองน้ำในถุงปลอดเชื้อที่มีสารละลายเจือจาง (maximum recovery diluent, MRD) ปริมาตร 10 ml นำสวอบออกจากถุง สวอบบนพื้นที่ 100 cm^2 โดยถูในแนวตั้งและแนวนอนอย่างละ 10 ครั้ง ฟองน้ำ 1 อันต่อการสวอบในแต่ละจุด และการสุ่มตัวอย่างแบบที่ 2 ใช้ฟองน้ำอันเดียวกันสวอบบนซากสัตว์ตามจุดต่างๆ วิธีสวอบเหมือนวิธีที่ 1 สวอบแต่ละด้านใช้สวอบบนซากสัตว์ด้านละ 2 จุด นำฟองน้ำที่สุ่มตัวอย่างแล้วใส่กลับในถุง ใส่

1312347117

สารละลายเจือจาง MRD 100 ml ลงในถุงสวอบแต่ละถุง นำเข้าเครื่อง stomacher นำสารละลายที่ได้ไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้ pour plates technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (violet red bile glucose agar, VRBGA) ผลจากการสุ่มตัวอย่างแบบแรก พบว่าการเก็บเชื้อจากซากสัตว์โดยการใช้ PU sponge และ excision มีค่าไม่แตกต่างกันและมากกว่า cellulose acetate sponge การสุ่มแบบที่ 2 พบว่าวิธี excision มีประสิทธิภาพในการตรวจแบคทีเรียจากซากสัตว์ดีกว่าวิธีสวอบ จากผลการทดลองสาเหตุที่ประสิทธิภาพของ sponge ทั้งสองชนิดแตกต่างกันยังไม่แน่ชัด แต่คาดว่ามีความเกี่ยวพันกับขนาดพื้นผิวและการขัดถูบนพื้นผิวของ สวอบที่แตกต่างกัน นอกจากนั้น พบว่าการสวอบด้วยฟองน้ำเก็บเชื้อ *Enterobacteriaceae* ได้ดีกว่าวิธี excision เนื่องจากขนาดพื้นที่ในการเก็บเชื้อต่างกัน ฟองน้ำใช้สวอบในพื้นที่ขนาด 100 cm^2 ส่วน excision ใช้พื้นที่ขนาด 5 cm^2 ซึ่ง Gill and Jones (2000) พบว่าแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อย ถ้าเพิ่มพื้นที่ในการเก็บเชื้อให้มากขึ้นจะเพิ่มโอกาสในการตรวจพบมากขึ้น

Moore and Griffith (2007) ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อวิธีการสวอบ ขั้นแรกศึกษาสารละลายที่ใช้คู่กับอุปกรณ์สวอบ (wetting solution) โดยการใส่สารละลายแบคทีเรีย (*S. aureus* หรือ *E. coli*) 100 µl (ประมาณ 1000 CFU) ลงในหลอดที่มีสารละลาย wetting solution แต่ละชนิด (ทั้งหมด 11 ชนิด) นำหลอดไป vortex นาน 20 วินาที และนับจำนวนแบคทีเรียด้วย pour plates technique นำไปบ่มที่ 30°C นาน 48 ชั่วโมง เก็บหลอดสารละลายในการทดสอบที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 4°C และนับจำนวนแบคทีเรียในหลอดต่างๆทุก 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่า letheen broth และสารละลายที่ประกอบด้วย buffered peptone water สามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียแตกต่างจากการใช้สารละลายอื่นๆ ($p<0.05$) มีจำนวนประมาณ 1.5 log จนถึง 6.5 log หลังจากวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 และ 24 ชั่วโมง จำนวน *E. coli* และ *S. aureus* ที่ได้จากการวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากเดิม 1.67 log และ 0.99 log ตามลำดับ จำนวน *E. coli* และ *S. aureus* ที่ได้จากการวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากเดิม 6.17 log และ 4.02 log ตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิ 4°C แบคทีเรียทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตน้อยมากหลังจากวางทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาผลกระทบจากวัสดุสวอบต่อการกักเก็บและปล่อยแบคทีเรียออกจากสวอบทั้ง 5 ชนิด (cyto-brush-textured spatula และ cyto-brush-textured swab ทำจากไนลอน rayon-tipped swab Dacron-tipped swab และ cotton-tipped swab) ศึกษาการกักเก็บแบคทีเรียของสวอบโดยจุ่มสวอบลงในหลอดที่มีสารละลายแบคทีเรีย 5 มิลลิลิตรที่มีแบคทีเรียประมาณ 2×10^4 CFU/ml ผสมกับสารละลายเจือจางปริมาตร 5 ml นาน 5 วินาที นำสวอบแต่ละอันใส่ลงในสารละลายเจือจาง 10 มิลลิลิตร นำไป vortex 20 วินาที นำไปนับจำนวนด้วยวิธี pour plates technique และชั่งน้ำหนักของสารละลายแบคทีเรียก่อนและหลังจากใช้สวอบจุ่มลงในสารละลาย ศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่ถูกปล่อยออกจากสวอบ โดยปิเปตสารละลายแบคทีเรีย 20 µl (5×10^3 CFU) ใส่บนสวอบที่เปียกจาก wetting solution นำสวอบแต่ละอันใส่ในหลอดที่มีสารละลายเจือจาง 10 ml vortex 20 วินาทีและนับจำนวนแบคทีเรีย ผลพบว่า cotton swab (2.03 g) และ cyto-brush-textured spatula (2.07 g) ดูดซับสารละลายได้ดีกว่า สวอบชนิดอื่น ดังนั้นจากคุณสมบัติการดูดซับของเหลวดีควรกักเก็บแบคทีเรียไว้ในสวอบได้มาก และจำนวนแบคทีเรียที่ได้น่าจะมีปริมาณมาก แต่พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่เก็บได้จาก cotton swab

131234717

และ rayon swab มีปริมาณน้อยกว่าสวอบชนิดอื่น จำนวน *E. coli* และ *S. aureus* ที่ได้จากสวอบสำลีมีค่าอยู่ในช่วง 1.18 – 1.59 log CFU/ml และ 2.03 - 2.27 log CFU/ml ตามลำดับ จำนวนแบคทีเรียที่ได้จาก brush-textured swab/spatula มีค่ามากที่สุดแสดงว่าวัสดุไนลอนของอุปกรณ์ดังกล่าวมีความสามารถในการปล่อยแบคทีเรียได้ดีเมื่อเทียบกับวัสดุสวอบชนิดอื่น และพบว่ามีแบคทีเรียติดอยู่ในเส้นใยสำลีของ cotton swab ศึกษาการใช้สวอบแต่ละชนิดเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิวสเตนเลส นำแผ่นสเตนเลสขนาด 5 cm x 5 cm ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ และใส่สารละลายแบคทีเรียปริมาตร 12.5 µl (ของหลอดที่เจือจางที่ระดับ 10^{-5} $10^{-4.5}$ และ 10^{-3}) ลงบนพื้นผิวแล้วเกลี่ยสารละลายให้ทั่ว ใช้สวอบที่จุ่มด้วยสารละลาย wetting solution สวอบแบบซิกแซก (zig-zag pattern) ประมาณ 20 ครั้งบนพื้นผิวในขณะที่พื้นผิวยังคงเปียกหรือ สวอบหลังจากปล่อยพื้นผิวให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง นำสวอบใส่กลับลงในหลอดที่มีสารละลายเจือจาง 10 ml นำไป vortex 20 วินาทีและตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ได้จากสวอบ พบว่า ประสิทธิภาพของสวอบในการเก็บ *E. coli* จากพื้นผิวสเตนเลสขณะเปียก มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 55 – 77% เรียงจากมากไปน้อยดังนี้ cotton swab (74.56%) cyto-brush-textured spatula (64.69%) rayon swab (60.63%) Dacron swab (54.99%) และ cyto-brush-textured swab (54.77%) และขณะแห้งมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 31 - 84% เรียงจากมากไปน้อยดังนี้ cotton swab (64.54%) cyto-brush-textured spatula (28.42%) rayon swab (27.27%) cyto-brush-textured swab (10.63%) และ Dacron swab (9.93%) ประสิทธิภาพของสวอบในการเก็บ *S.aureus* จากพื้นผิวสเตนเลสขณะเปียก เรียงจากมากไปน้อยดังนี้ cotton swab (74.56%) cyto-brush-textured spatula (64.69%) rayon swab (60.63%) Dacron swab (54.99%) และ cyto-brush-textured swab (54.77%) และขณะแห้ง เรียงจากมากไปน้อยดังนี้ cotton swab (74.97%) rayon swab (58.94%) cyto-brush-textured swab (56.79%) cyto-brush-textured spatula (52.09%) และ Dacron swab (40.06%) เปอร์เซ็นต์จำนวนแบคทีเรียที่ถูกปล่อยออกจากสวอบหลังจากใส่เชื้อลงบนสวอบโดยตรงสูงกว่าจำนวนแบคทีเรียที่ใช้สวอบเก็บได้จากพื้นผิว การเพิ่มแรงกลในระหว่างสวอบเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิวขณะเปียกสามารถดึงแบคทีเรียออกจากพื้นผิวได้มากขึ้น และสันนิษฐานว่าการสวอบขณะพื้นผิวแห้งอาจสร้างความเสียหายให้เซลล์แบคทีเรียทำให้จำนวนแบคทีเรียที่ได้ลดลง การเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพในการดึงแบคทีเรียออกจากพื้นผิวอาจจะไม่มีผลสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียที่ได้จากสวอบ เนื่องจากมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อจำนวนแบคทีเรียที่ได้ คือ ประสิทธิภาพของอุปกรณ์สวอบในการปล่อยแบคทีเรียในสารละลาย อุปกรณ์สวอบและ wetting solution มีอิทธิพลต่อจำนวนแบคทีเรียที่ได้ โดยที่ระบบการเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิวเปียกที่ดีที่สุดควรใช้ cyto-brush-textured swab ร่วมกับสารละลายเจือจางที่ไม่ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโต

Van Horn et al. (2008) ศึกษาประสิทธิภาพระบบสวอบ 3 ชนิดคือ ESwab (ไนลอน, Copan Diagnostics, Murrieta, CA) MaxV (เรยอน, Becton Dickinson, Sparks, MD) และ BactiSwab (เรยอน, Remel, Lenexa, KS) ด้วยการใส่สารละลายแบคทีเรีย (aerobe และ anaerobe) ที่ระดับต่างๆ (3 - 6 log CFU/ml) ปริมาตร 100 µl ลงบนสวอบ วางไว้ 15 วินาทีจากนั้นนำสวอบใส่กลับลงในหลอดที่มีสารละลายเจือจาง วางทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที สำหรับ MaxV และ BactiSwab ใช้ roll-plate method โดยดึงสวอบออกจากหลอดนำมากลิ้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หมุนอาหารเลี้ยงเชื้อ

60 องศาแล้วนำสวอบที่ใส่เชื้อที่ระดับถัดไปมาหมุนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ทำจนครบทุกระดับเชื้อ) สำหรับ ESwab ใส่ลงในหลอดสารละลายเจือจาง Amies transport (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) นำไป vortex 5 วินาที จากนั้นใช้ spread plates technique ตรวจจำนวนแบคทีเรียที่ได้จากสวอบพบว่า ประสิทธิภาพการเก็บแบคทีเรียชนิด aerobe และ anaerobe ของ ESwab มีค่ามากที่สุดอยู่ในช่วง 60.5-85.5% และ 45.9-87.0% ตามลำดับ ในขณะที่ MaxV และ BactiSwab มีค่าประสิทธิภาพการเก็บแบคทีเรียชนิด aerobe อยู่ในช่วง 4.2-7.5 เปอร์เซ็นต์ และ 5.6-14.6 เปอร์เซ็นต์ และค่าประสิทธิภาพการเก็บแบคทีเรียชนิด anaerobe อยู่ในช่วง 4.2-9.8% และ 7.0-13.3% ตามลำดับ การใช้ ESwab ที่ทำจากวัสดุไนลอนและใช้วิธี vortex ดึงแบคทีเรียออกจากสวอบให้ประสิทธิภาพดีกว่า MaxV และ BactiSwab ที่ทำจากวัสดุเรยอนและใช้ roll-plate technique

Clemons (2010) ศึกษาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ 4 ประเภทในการตรวจแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Listeria monocytogenes* และ *Brochothrix thermophacta* อุปกรณ์ 4 ประเภท ได้แก่ Microbial-Vac system (MV) , cellulose sponge (SP), polyester swab (SW) และ composite tissue (CT) พื้นผิว 5 ชนิด ได้แก่ แผ่นสเตนเลส พอลิเอทิลีน สายพานพอลิยูรีเทน open hinge flat top belt conveyor และ mesh conveyor belt ตรวจ *L. monocytogenes* โดยใส่สารละลายแบคทีเรีย 2 ระดับ คือ ระดับต่ำ (10 CFU/900 cm^2) และระดับสูง (100 CFU/900 cm^2) วางทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที นำเข้าตู้เย็นที่ 4°C ใช้อุปกรณ์แต่ละชนิดเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิวและวิเคราะห์ทางด้านคุณภาพ พบว่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการใช้อุปกรณ์ MV SP และ CT ในการตรวจ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวสเตนเลสและพอลิเอทิลีนในระดับสูงมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการใช้อุปกรณ์ MV และ CT ตรวจ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวสเตนเลสในระดับต่ำแตกต่างกัน ($p<0.05$) มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 62.97% และ 17.34% ($p=0.0086$) ตามลำดับ MV มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยสูงที่สุดในการตรวจ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวสเตนเลสทั้งสองระดับ รองลงมาคือ CT และ SP SW มีค่าน้อยที่สุด การใช้ MV ตรวจ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนบน open hinge flat top belt conveyor ในระดับต่ำและสูงดีกว่าการใช้ SP และ SW ($p=0.0004$) ตรวจ *B. thermophacta* โดยใส่สารละลายแบคทีเรียที่ระดับ 10,000 CFU/surface ลงบนพื้นผิวต่างๆขนาด 25 cm^2 วางทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที นำเข้าตู้เย็นที่ 4°C ใช้อุปกรณ์แต่ละชนิดเก็บแบคทีเรียจากพื้นผิวและวิเคราะห์ทางด้านคุณภาพ พบว่า การใช้อุปกรณ์แต่ละชนิดในการตรวจ *B. thermophacta* บนพื้นผิวสเตนเลสและสายพานพอลิยูรีเทนมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่พบว่า ประสิทธิภาพการใช้ MV ตรวจ *B. thermophacta* บนพื้นผิวพอลิเอทิลีนมีค่าเฉลี่ย 4.29 log CFU/25cm^2 ดีกว่าการใช้ SP และ CT มีค่าเฉลี่ย 4.12 และ 3.25 log CFU/25cm^2 ตามลำดับ

1312347117