บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง เป็นอุปกรณ์จากห้องปฏิบัติการหน่วยวิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อาหาร (Media) อาหารทุกชนิดจะต้องผ่านการสเตอริไลซ์ด้วยตู้อบความดันไอน้ำและวิธีการเตรียมอาหารได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

2.1 อาหารเพาะแยกเชื้อ ได้กำหนดชื่อย่อของอาหารไว้ในวงเล็บดังรายชื่อต่อไปนี้

Alkaline Peptone Water (APW)

Baird-Parker Agar (Baird-Parker, 1962) (BP)

Blood Agar (BA)

Brilliant Green Agar (BGA)

Brilliant Green Lactose Bile Broth 2% (BGLB)

Differential Reinforced Clostridial Medium (DRCM)

(Harrigan et al., 1976)

Eosin Methylene Bule Agar (EMB)

Glucose Azide Broth (GZ) (Harrigan et al., 1976)

Lactose Broth (LB)

Litmus milk

Tetrathionate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)

MacConkey Broth (Mac)

Maltose Azide Broth (MZ) (Harrigan et al., 1976)

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Agar 3% NaCl (NA 3% NaCl)

Peptone Salt Dilution Fluid (PSD)

Plate Count Agar (PCA)

Tetrathionate Brilliant Green Broth (TTBB)

2.2 อาหารทดสอบเชื้อ เตรียมตามสูตรที่ปรากฏในภาคผนวก ก สำหรับอาหารทดสอบที่ใช้กับ Vibro parahaemolyticus จะต้องเติมเกลือแกง (NaCl) ให้เป็น 3 % มีดังนี้

Broth Sugar (BS) ทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต 6 ชนิดคือ arabinose, mal tose, mannitol, sucrose, lactose & starch

Decarboxylase Test Media (Falkon's) เติมด้วยกรดอะมิโน (amino acid) 3 ชนิดคือ arginine, lysine & ornithine

Hugh-Leifson Medium (H-L Medium) (Hugh and Leifson's)

MR-VP Broth (MR-VP)

Nitrate Broth

Simmon Citrate Agar (Simmon's)

Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Tryptone Broth ที่มีปริมาณเกลือแกง 0%, 8, และ 10%

Indole Test Media

Urea Medium

3. สารเคมีที่ใช้ทดสอบเชื้อ เตรียมตามสูตรที่ปรากฏในภาคผนวก ก.

3.1 สารเคมีใช้ในการวิเคราะห์ชื้อ ได้แก่

Cytochrome Oxidase Reagent

Hydrogen peroxide solution 3%

Indole Reagent (Kovac's Reagent)

Methyl Red Solution

Solution A (0.8% Sulphanilic acid in 5N acetic acid)

Solution B (0.5% Alpha-naphthylamine in 5N acetic acid)

Voges-Proskauer Test Reagent

3.2 น้ำยาที่ใช้ในการย้อมสีแกรม (Gram's Staining) ได้แก่

Crystal Violet solution

Iodine Solution

Safranin O Solution

Alcohol 95%

วิธีการ

1. สถานที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่โรงงานผลิตสัตว์น้ำแช่แข็ง 2 แห่ง ดังนี้

1.1 โรงงานที่ 1 เป็นโรงงานขนาดใหญ่ อยู่ในจังหวัดธนบุรี ประกอบด้วยคนงานจำนวนมาก แต่งกายในชุดของโรงงานกำหนด ซึ่งประกอบด้วยผ้าคลุมผม ผ้าปิดปาก ถุงมือยาง ผ้ากันเปื้อนยาง และสวมรองเท้ายางที่คลุมถึงน่อง (Boots) ในด้านอุปกรณ์ในโรงงานนั้นมีจำนวนมากประกอบด้วยตะกร้าที่เป็นพลาสติกทั้งหมด โต๊ะที่วางสินค้าสัตว์น้ำเป็นรางสูงจากพื้นประมาณ 1 เมตร หุ้มด้วยอลูมิเนียม ถังสำหรับการล้าง เป็นถังสี่เหลี่ยมที่ทำด้วยอลูมิเนียม พื้นปูด้วยปูนซีเมนต์ ล้างตลอดเวลาด้วยน้ำจากแม่น้ำเพื่อระเบียงของสัตว์น้ำที่ไม่ต้องการลงในรางน้ำที่มีการถ่ายเทดี ไม่มีการขังของน้ำภายในโรงงานได้รับแสงสว่างจากหลังคาที่เป็นกระเบื้องใส อากาศในโรงงานค่อนข้างเย็นในด้านระบบการแช่แข็งของโรงงาน ใช้แอมโมเนียเหลวเป็นตัวทำให้เกิดความเย็น โดยไหลไปตามท่อที่ขดไปมาทั่วห้องทำความเย็น กระจายความเย็นด้วยพัดลมให้ได้ความเย็น – 40° ซ ในห้องแช่แข็ง และอุณหภูมิ – 18° ซ ในห้องเก็บ หลังจากการ

ผลิตโดยผ่านขบวนการต่าง ๆ ของโรงงานแล้วถูกนำเข้าแช่แข็งในห้องแช่เย็นทันทีจนกว่าจะแข็งตามลักษณะของสัตว์น้ำแต่ละชนิด สินค้าสัตว์น้ำที่นำมาผลิตนั้นจะได้จากหลายแห่ง เช่น สะพานปลากรุงเทพมหานคร จังหวัดแถบชายฝั่งทะเลเช่น สมุทรสาคร และจังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย เป็นต้น เป็นต้น ส่วนระบบน้ำที่ใช้ในโรงงาน ใช้น้ำ 2 ประเภทคือ น้ำประปาที่ผ่านการทำความเย็นและเติมคลอรีนโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 60 % จากท่อประปาเป็นน้ำที่ใช้ล้างสินค้าสัตว์น้ำ นอกจากนี้จะเป็นน้ำจากแม่น้ำที่ใช้เป็นน้ำล้างพื้น ส่วนน้ำแข็งนั้นโรงงานทำการผลิตเอง จากน้ำประปาที่เติมคลอรีนแล้ว

1.2 โรงงานที่ 2 เป็นโรงงานขนาดเล็ก ตั้งอยู่ในเขตสะพานปลากรุงเทพมหานคร ประกอบด้วยคนงานประมาณ 156 คน ภาชนะที่บรรจุสินค้าสัตว์น้ำนั้นเป็นตะกร้าพลาสติกโต๊ะที่วางเป็นโต๊ะพื้นราบหุ้มด้วยอลูมิเนียม สูงจากพื้นประมาณ 1 เมตร คนงานแต่งกายในชุดเครื่องแบบของโรงงานที่มีผ้าคลุมผม ผ้าปิดปาก สวมถุงมือยาง ผ้ากันเปื้อนยาง และสวมรองเท้ายางยาวถึงน่อง (Boots) แต่ไม่ค่อยเคร่งครัดนัก พื้นเป็นปูนซีเมนต์ ไม่มีการสะสมเศษของสัตว์น้ำ เนื่องจากจะล้างด้วยน้ำตลอดเวลา ภายในโรงงานได้รับแสงสว่างจากหลังคาที่ใส อากาศค่อนข้างเย็น บริเวณรอบนอกของหลังคา มีการปล่อยน้ำผ่านหลังคาโรงงานตลอดเวลาเพื่อควบคุมอุณหภูมิ ระบบการทำความเย็นเช่นเดียวกับระบบของโรงงานที่ 1 แต่สินค้าที่นำเข้าแช่แข็งนั้น นาน, ประมาณ 12 ชั่วโมง นับแต่เริ่มเข้าสู่ห้องทำความเย็น สินค้าสัตว์น้ำได้จากสะพานปลากรุงเทพมหานครและจากจังหวัดสมุทรสาครด้วย ระบบน้ำของโรงงาน เป็นน้ำประปาทั้งหมดที่ไหลโดยตรงจากท่อประปา และทำน้ำแข็งเองโดยการใช้น้ำประปา

2. ประเภทของตัวอย่าง จากโรงงานทั้ง 2 แห่งจะทำการเก็บตัวอย่าง 4 ประเภทคือ

2.1 กุ้งตะกาด (Metapenaeus monoceros Fabricius)

2.2 ปลาหมึกกล้วย (Loligo spp.)

2.3 น้ำที่ใช้ในโรงงาน

2.4 น้ำแข็ง

กระบวนการผลิตสัตว์น้ำแช่แข็ง

การผลิตสัตว์น้ำแช่แข็งในโรงงานห้องเย็น ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

สัตว์น้ำเข้าสู่โรงงาน (ระยะที่ 1 นำเข้าสู่โรงงาน)

↓

การเด็ดหัวกุ้ง, การล้างน้ำ, การคัดขนาด (ระยะที่ 2 ระหว่างการคกแต่ง)

↓

ล้างน้ำ

↓

เรียงใส่กล่องบรรจุ (ระยะที่ 3 ก่อนการแช่แข็ง)

↓

เติมน้ำ

↓

แช่แข็งที่อุณหภูมิ – 40 °ซ

↓

เก็บที่ห้องเก็บ – 18 °ซ (ระยะที่ 4 หลังการแช่แข็ง)

3. วิธีการเก็บตัวอย่าง

3.1 ตัวอย่างกุ้งตะกาด

3.1.1 การเก็บตัวอย่างกุ้งตะกาดตามกระบวนการผลิตของโรงงาน 2 แห่ง ปฏิบัติดังต่อไปนี้

ตัวอย่างที่ 1 เป็นการเก็บตัวอย่างระยะนำเข้าสู่โรงงาน

เริ่มตั้งแต่การนำกุ้งตะกาดลงจากรถบรรทุก แล้วใส่ในตะกร้าพลาสติกเพื่อนำไปชั่งน้ำหนัก หลังจากการชั่งน้ำหนักแล้ว จึงทำการเก็บตัวอย่างจากตะกร้าลงในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้แน่น เก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่ จำนวน 2 ตัวอย่าง ๆ ละ 200 กรัม

ตัวอย่างที่ 2 เป็นการเก็บตัวอย่างระยะระหว่างการตกแต่ง

กุ้งตะกาดถูกถ่ายจากตะกร้าลงบนโต๊ะสแตนเลสใส่น้ำแข็งปนลงบนกองกุ้งทำการเด็ดหัวทิ้ง นำไปล้างด้วยน้ำผสมคลอรีนและใส่น้ำแข็ง โดยความเข้มข้นของคลอรีนไม่แน่นอน เมื่อล้างเสร็จแล้วจึงทำการเก็บตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง น้ำหนัก 200 กรัม ลงในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้แน่น เก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งหลังจากกุ้งตะกาดผ่านการล้างน้ำจะถูกลำเลียงไปยังโต๊ะเพื่อทำการคัดขนาด จึงทำการสุ่มตัวอย่างอีก 1 ตัวอย่าง น้ำหนัก 200 กรัม ลงในถุงพลาสติก ฉะนั้นตัวอย่างจากมีจำนวน 2 ตัวอย่าง ๆ ละ 200 กรัม

ตัวอย่างที่ 3 เป็นการเก็บตัวอย่างระยะก่อนการแช่แข็ง

โรงงานที่ 1 กุ้งตะกาดที่ถูกคัดขนาดแล้วนำมาล้างด้วยน้ำผสมคลอรีนเย็นในความเข้มข้นไม่แน่นอน 3 ครั้ง จึงนำกุ้งไปชั่งน้ำหนัก เรียงใส่กล่องโลหะตามจำนวนน้ำหนักที่ต้องการ จึงสุ่มเก็บตัวอย่างจากกล่องบรรจุ 2 กล่อง ๆ ละ 1 ตัวอย่าง ๆ ละ 200 กรัม ลงในถุงพลาสติก

ปิดปากถุงให้แน่น เก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่ ส่วนโรงงานที่ 2 หลังจากคัดขนาดแล้ว ผ่านการล้างด้วยน้ำคลอรีนที่เย็น 1 ครั้ง จึงทำการชั่งน้ำหนักเรียงลงในกล่องโลหะเรียบร้อยแล้ว ทำการเก็บตัวอย่างจากกล่องโลหะ 2 กล่อง ๆ ละ 1 ตัวอย่าง หนักตัวอย่างละ 200 กรัม ลงในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้แน่น เก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็ง

ตัวอย่างที่ 4 เป็นการเก็บตัวอย่างระยะหลังการแช่แข็ง

โรงงานที่ 1 กล่องที่บรรจุกุ้งตะกาด นำมาเติมน้ำลงในกล่อง นำไปแช่แข็งในห้องทำความเย็นที่อุณหภูมิ -40°ซ เมื่อแข็งแล้วจึงแกะออกจากกล่อง เก็บในห้องเก็บที่มีอุณหภูมิ -18°ซ นาน 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง ๆ ละ 1 กล่องหนึ่ง หนัก 500 กรัม ส่วนโรงงานที่ 2 กล่องที่บรรจุกุ้งตะกาดจะนำไปแช่ลงในน้ำจึงนำเข้าสู่ห้องทำความเย็น เพื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40°ซ และเก็บในห้องเก็บนาน 48 ชั่วโมง

3.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่างกุ้งตะกาดจากเรือประมงในทะเล

กุ้งตะกาดถูกจับจากทะเลด้วยอวนลาก เมื่อแยกได้กุ้งตะกาดแล้ว ใส่ถุงทันที ตัวอย่างกุ้งตะกาดจากเรือประมงในทะเลจำนวน 2 ตัวอย่าง ๆ ละ 500 กรัม ถูกนำมายังห้องปฏิบัติการประมาณ 13.00 น. ทำการวิเคราะห์ทันที

3.2 ตัวอย่างปลาหมึกกล้วย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างปลาหมึกกล้วยตามกระบวนการผลิตของโรงงาน 2 แห่ง ปฏิบัติดังต่อไปนี้

ตัวอย่างที่ 1 เป็นการเก็บตัวอย่างระยะนำเข้าสู่โรงงาน

ปลาหมึกกล้วยถูกถ่ายจากรถบรรทุกลงในตะกร้าพลาสติกของโรงงาน นำเข้าชั่ง

น้ำหนัก เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก จำนวน 2 ตัวอย่าง ๆ ละ 500 กรัม โดยลักษณะของปลาหมึกกล้วยที่เข้าสู่โรงงานนั้นไม่มีเยื่อสีน้ำตาลหุ้มลำตัว อวัยวะภายในบางส่วนถูกล้างออก ตัวอย่างที่ถูกเก็บแล้ว นำไปใส่ในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่

ตัวอย่างที่ 2 การเก็บตัวอย่างระยะระหว่างการตกแต่ง

โรงงานที่ 1 ปลาหมึกกล้วย ถูกนำมาแช่น้ำผสมคลอรีนที่มีความเข้มข้นไม่แน่นอนเพื่อรอการคัดขนาด ขณะที่แช่อยู่ในน้ำผสมคลอรีนที่มีน้ำแข็งปนอยู่ด้วยนั้น จึงทำการเก็บตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง หนัก 500 กรัม ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้แน่นหลังจากนั้น นำขึ้นมาคัดขนาด ขณะทำการคัดขนาด เก็บตัวอย่างอีก 1 ตัวอย่าง หนัก 500 กรัม ทั้ง 2 ตัวอย่าง เก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่

โรงงานที่ 2 ปลาหมึกกล้วย นำมาแช่น้ำผสมคลอรีนที่ไม่ทราบความเข้มข้น โดยใส่น้ำแข็งลงไปด้วย ขณะแช่สุ่มเก็บตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง หนัก 500 กรัม หลังจากแช่ปลาหมึกกล้วยแล้ว ล้างด้วยน้ำคลอรีนที่เย็น 2 ครั้ง นำขึ้นคัดขนาด ทำการเก็บตัวอย่างอีก 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างปลาหมึกกล้วยทั้ง 2 ตัวอย่าง ถูกใส่ลงในถุงพลาสติกปิดปากถุงให้แน่นเก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่

ตัวอย่างที่ 3 เป็นการเก็บตัวอย่างก่อนการแช่แข็ง

โรงงานที่ 1 นำปลาหมึกกล้วยที่คัดขนาดแล้วล้างด้วยน้ำผสมคลอรีนที่มีความเข้มข้นไม่แน่นอนปนด้วยน้ำแข็ง 3 ครั้ง ชั่งน้ำหนักเรียงลงในกล่องโลหะจนครบ ทำการเก็บตัวอย่างจากกล่องบรรจุ 2 กล่อง ๆ ละ 1 ตัวอย่าง หนักตัวอย่างละ 500 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้แน่นเก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็ง

โรงงานที่ 2 หลังจากการคัดขนาดแล้ว นำมาเรียงใส่กล่องบรรจุโดยชั่งน้ำหนักก่อนจากกล่องบรรจุ 2 กล่อง เก็บตัวอย่างกล่องละ 500 กรัม 2 ตัวอย่าง ใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้แน่น เก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็ง

ตัวอย่างที่ 4 เป็นการเก็บตัวอย่างระยะหลังการแช่แข็ง

ปลาหมึกกล้วยถูกเติมน้ำลงในกล่องบรรจุ นำเข้าสู่ห้องเย็นเพื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 40 °ซ และถูกเก็บในห้องเก็บนาน 48 ชั่วโมง จึงเก็บตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง ๆ ละ 1 กล่อง ชั่งหนัก 1,000 กรัม

3.2.2 วิธีการเก็บตัวอย่างปลาหมึกกล้วยจากเรือประมงในทะเล

ปลาหมึกกล้วยถูกจับจากทะเล ซึ่งเรือประมงออกจากฝั่งในเวลากลางคืนและกลับเข้าสู่ท่าเรืออ่างศิลาในตอนเช้า ปลาหมึกกล้วยเมื่อถูกจับขึ้นสู่เรือแล้ว เก็บใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งไว้ หลังจากนั้นตัวอย่างปลาหมึกกล้วย 2 ตัวอย่าง ๆ ละ 500 กรัม ถูกนำเข้าสู่ห้องปฏิบัติการประมาณเวลา 13.00 น. เพื่อทำการวิเคราะห์ทันที

3.3 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำที่ใช้ในโรงงาน มีวิธีการเก็บตามชนิดของน้ำดังต่อไปนี้

3.3.1 น้ำใช้ ได้แก่น้ำประปา สำหรับโรงงานที่ 1 น้ำใช้จะเป็นน้ำประปาที่ทำให้เย็น และเติมด้วยคลอรีนอีกเล็กน้อย ในรูปแคลเซี่ยมไฮโปคลอไรต์ 60 % ไหลหมุนเวียนไปตามท่อต่าง ๆ ทั้งโรงงาน น้ำใช้นี้จะถูกนำใส่ขวดจากท่อประปา จนเต็ม จึงปิดฝาเก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่ ส่วนโรงงานที่ 2 นั้น น้ำใช้เตรียมเป็นน้ำประปาจากท่อประปาโดยตรง ไม่มีการเติมคลอรีนหรือทำให้เย็น เก็บน้ำจากท่อประปาจนเต็มขวด ปิดฝาเก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่

3.3.2 น้ำก่อนล้าง เป็นน้ำจากหัวข้อ 3.3.1 ผสมด้วยแคลเซี่ยมไฮโปคลอไรต์ 60 % และทำให้เย็นด้วยการใส่น้ำแข็งลงไป ใช้เป็นตัวระล้าง เก็บใส่ขวดปากแคบจนเต็ม ปิดฝาให้แน่น เก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่

3.3.3 น้ำล้างระหว่างการตกแต่ง คือน้ำในหัวข้อ 3.3.2 ที่ใช้ล้างสัตว์น้ำสำหรับกุ้งตะกาด เป็นน้ำที่ใช้ล้างกุ้งที่เด็ดหัวแล้ว ล้างนาน 30 นาที ทำการเก็บใส่ขวด

ปากแคบจนเต็มปิดฝาให้แน่น สำหรับปลาหมึกกล้วยเป็นน้ำที่ใช้แช่ปลาหมึกกล้วยก่อนการคัดขนาด แช่นาน 30 นาที ทำการเก็บใส่ขวดปากแคบ ปิดสนิท เก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่

3.3.4 น้ำล้างก่อนการแช่แข็ง สำหรับโรงงานที่ 1 ทั้งกุ้งตะกาดและปลาหมึกกล้วยใช้น้ำล้างอีกครั้งในระยะที่ 3 ของกระบวนการแช่แข็ง เป็นน้ำล้างก่อนเรียงลงในกล่องบรรจุ ล้างนาน 15 นาที เก็บใส่ขวดปากแคบ ปิดฝาขวด ส่วนโรงงานที่ 2 นั้น ตัวอย่างน้ำใช้ก่อนการแช่แข็ง คือน้ำที่ใช้แช่กล่องบรรจุกุ้งตะกาดและปลาหมึกกล้วยเพื่อเป็นการเติมน้ำก่อนเข้าสู่ห้องทำความเย็น โดยแช่นาน 15 นาที เก็บใส่ขวดปากแคบปิดฝาทันที

3.4 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำแข็ง โรงงานที่ 1 จะทำน้ำแข็งได้เอง โดยนำน้ำจากหัวข้อ 3.3.1 มาผ่านความเย็นจนเป็นน้ำแข็ง เก็บตัวอย่างจากห้องเก็บน้ำแข็งในขวดปากกว้าง เก็บในตู้เก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่ ส่วนโรงงานที่ 2 นั้นทำน้ำแข็งได้เองเช่นกัน โดยนำน้ำประปาจากท่อประปาโดยตรงมาผ่านความเย็น ไม่ได้เติมแคลเซี่ยมไฮโปคลอไรต์ 60 % ก่อนแต่อย่างใด ทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับโรงงานที่ 1

4. ระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง

4.1 กุ้งตะกาด

ตัวอย่างกุ้งตะกาดจากโรงงาน ได้ทำการเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 12 ครั้ง เป็นเวลา 6 เดือน โดยเก็บจากโรงงานที่ 1 6 ครั้ง และโรงงานที่ 2 อีก 6 ครั้ง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคม โดยโรงงานที่ 1 ทำการเก็บตัวอย่างในสัปดาห์แรกของเดือน และโรงงานที่2 ในสัปดาห์ที่ 3 ของเดือน ตัวอย่างกุ้งตะกาดจากโรงงานที่นำมาวิเคราะห์แต่ละครั้งมีจำนวน 8 ตัวอย่าง

ตัวอย่างกุ้งตะกาดจากเรือประมงในทะเล ได้เก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 4 ครั้ง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึงตุลาคม แต่ละครั้งมี 2 ตัวอย่าง

4.2 ปลาหมึกกล้วย

ตัวอย่างปลาหมึกกล้วยจากโรงงาน สำหรับโรงงานที่ 1 เก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 5 ครั้ง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม ยกเว้นเดือนสิงหาคม ไม่มีปลาหมึกกล้วยเข้าสู่โรงงาน เก็บพร้อมกับการเก็บตัวอย่างกุ้งตะกาดจากโรงงานคือ สัปดาห์แรกของเดือน ส่วนโรงงานที่ 2 เก็บตัวอย่างได้ 3 ครั้งเท่านั้น ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม หลังจากนั้นโรงงานได้หยุดการผลิตเนื่องจากสินค้าปลาหมึกกล้วยแช่แข็งของโรงงานมีจำนวนมากแล้ว โดยเก็บตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 3 ของเดือนเช่นเดียวกับกุ้งตะกาด เก็บตัวอย่างครั้งละ 8 ตัวอย่าง

ตัวอย่างปลาหมึกกล้วยจากเรือประมงในทะเล เก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึงเดือนตุลาคม เก็บตัวอย่างครั้งละ 2 ตัวอย่าง

4.3 ตัวอย่างน้ำและน้ำแข็ง เก็บตัวอย่างพร้อมกับการเก็บตัวอย่างกุ้งตะกาดและปลาหมึกกล้วยจากโรงงาน โดยแต่ละครั้งของการเก็บจะได้ตัวอย่างน้ำ 6 ตัวอย่าง และน้ำแข็งอีก 1 ตัวอย่าง

5. วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย

5.1 กุ้งตะกาด

5.1.1 การเตรียมตัวอย่างกุ้งตะกาด

กุ้งตะกาดที่ได้จากธรรมชาติและโรงงานตามกระบวนการแช่แข็ง 3 ระยะแรกนั้น อยู่ในสภาพสด จึงนำไปวิเคราะห์ได้ทันที ส่วนตัวอย่างกุ้งตะกาดจากระยะที่ 4 ของการผลิตสัตว์น้ำแช่แข็งนั้นอยู่ในสภาพเป็นน้ำแข็ง ก่อนการวิเคราะห์นับจำนวนเชื้อ ต้อง

ทำให้ละลายโดยใส่ในถุงพลาสติก 2 ชั้น ปิดปากถุงให้แน่น แช่ในน้ำประปาจนกระทั่งน้ำแข็งละลายจึงทำการวิเคราะห์

5.1.2 การเตรียมส่วนผสมเนื้อเดียวกัน (Homogeneous)

นำเอาตัวอย่างกุ้งตะกาดมาคัดออกเป็นชิ้น ๆ ด้วยกรรไกรและปากคีบที่ลนไฟแล้วใส่ลงในขวด Voltex Beaker ให้ได้ 10 กรัม แล้วเติม PSD ประมาณ 40 มล. ลงไปทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียด (MSE Homogenizer) จากความเร็วต่ำแล้วค่อย ๆ เพิ่มความเร็วขึ้น นาน 3 นาที จึงเติม PSD อีก 50 มล. ที่เหลือในขวดลงไป ทำให้ได้ส่วนผสมเนื้อเดียวกันที่มีความเข้มข้น 10^{-1}

5.1.3 การเตรียมความเจือจางของส่วนผสมเนื้อเดียวกัน

จากส่วนผสมเนื้อเดียวกันของกุ้งตะกาดในขวด Voltex Beaker ที่มีความเจือจาง 10^{-1} ใช้ปิเปตขนาด 1 มล. ดูดมา 1 มล. ลงใน PSD 9 มล. ในหลอดทดลอง ได้ความเจือจาง 10^{-2} จากหลอดที่มีความเจือจาง 10^{-2} ใช้ปิเปตดูดมา 1 มล. ลงใน PSD 9 มล. ได้ส่วนผสมเนื้อเดียวกันของกุ้งตะกาดที่มีความเจือจาง 10^{-3} ทำเช่นนี้ไปตามลำดับ จนกว่าได้ส่วนผสมเนื้อเดียวกันที่มีความเจือจาง 10^{-6}

5.2 ปลาหมึกกล้วย

5.2.1 การเตรียมตัวอย่างปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติเช่นเดียวกับหัวข้อ 5.1.1

5.2.2 การเตรียมส่วนผสมเนื้อเดียวกัน ปฏิบัติเช่นเดียวกับหัวข้อ 5.1.2

5.2.3 การเตรียมความเจือจางของส่วนผสมเนื้อเดียวกัน ปฏิบัติเช่นเดียวกับหัวข้อ 5.1.3

5.3 ตัวอย่างน้ำใช้ในโรงงาน

5.3.1 การเตรียมความเจือจาง โดยความเข้มข้นในขวดเก็บน้ำนั้น ถือเป็น stock sample ใช้ปิเปตขนาด 1 มล. ดูดมา 1 มล. ลงใน PSD 9 มล.

ทำให้ได้ส่วนผสมเนื้อเดียวกันที่มีความเจือจาง 10^{-1} ทำเช่นนี้ต่อไปตามลำดับจนได้ความเจือจางของสารผสมเนื้อเดียวกันเป็น 10^{-4}

5.4 ตัวอย่างน้ำแข็ง

5.4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำแข็ง โดยการปล่อยให้ ละลายภายในขวดเก็บน้ำที่อุณหภูมิห้อง

5.4.2 การเตรียมความเจือจาง ปฏิบัติเช่นเดียวกับหัวข้อ 5.3.1

6. วิธีการเพาะเชื้อและนับจำนวน

6.1 total plate count เป็นวิธีการนับจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดที่เกิดภายในจานอาหารที่เพาะเชื้อทำการศึกษาพบอาหารเพาะเชื้อหลายชนิดดังนี้

6.1.1 การเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนบน PCA ตามวิธีของ Elliott et al. (1978) โดยทำ 2 วิธีคือ

6.1.1.1 pour plate method

6.1.1.1.1 กุ้งตะกาด

นำส่วนผสมเนื้อเดียวกันของกุ้งตะกาดที่มีความเจือจางตั้งแต่ $10^{-3} - 10^{-6}$ ใช้ปิเปตดูดส่วนผสมดังกล่าวจากความเจือจางมากไปหาความเจือจางน้อย จำนวนความเจือจางละ 1 มล. ลงในจานเพาะเชื้อ (petri dish) หลังจากนั้นเท PCA ที่มีอุณหภูมิ 50°ซ ลงในจานเพาะเชื้อเหล่านั้นหมุนจานกลับไปมาหลายครั้ง จนส่วนผสมกระจายไปทั่วจานอย่างสม่ำเสมอ ปล่อยไว้จน PCA แข็ง นำเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ 4 จาน

และที่อุณหภูมิ 37 °ซ จำนวน 4 จาน นาน 48 ชั่วโมง เลือกจาน ที่ได้ปริมาณเชื้อตามลำดับกับความเจือจางของสารผสมเนื้อเดียวกัน ระหว่าง 30–300 โคโลนี ถ้ามากกว่า 300 โคโลนี ให้นับจำนวน โคโลนีโดยการแบ่งเนื้อที่จานเพาะเชื้อเป็นส่วน ๆ เท่ากันแล้วจึงนับ จำนวนเชื้อแต่ละส่วนคูณด้วยจำนวนส่วนที่แบ่ง หลังจากนั้นคำนวณ จำนวนเชื้อให้เป็นจำนวนเชื้อ/กรัม โดยนำจำนวนโคโลนีที่นับได้ ทั้งหมดในจานคูณด้วยความเจือจางของตัวอย่างแล้ว คำนวณค่าเฉลี่ย จากตัวอย่างทั้ง 2

6.1.1.1.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติการเช่น เดียวกับกุ้งตะกาดในหัวข้อ 6.1.1.1.1

6.1.1.1.3 น้ำที่ใช้ในโรงงาน ปฏิบัติการเช่น เดียวกับกุ้งตะกาดในหัวข้อ 6.1.1.1.1 โดยตรวจนับจำนวนเชื้อ ที่ระดับความเจือจางดังนี้

น้ำใช้ มีความเจือจาง stock sample , 10^{-1},10^{-2}
น้ำก่อนล้าง มีความเจือจาง stock sample
10^{-1}, 10^{-2}
น้ำล้างระหว่างการตกแต่งมีความเจือจาง
10^{-3}, 10^{-4},10^{-5}
น้ำล้างก่อนการแช่แข็ง มีความเจือจาง
10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}

เมื่อบ่มเพาะเชื้อแล้วเลือกจานที่มีจำนวนโคโลนีที่เหมาะสม อยู่ระหว่าง 30–300 โคโลนี นำมาคำนวณหาจำนวนเชื้อ/มล. โดย จำนวนโคโลนีที่นับได้คูณด้วยความเจือจางของตัวอย่าง บันทึกผล

6.1.1.1.4 น้ำแข็ง ปฏิบัติการเช่นเดียวกับ 6.1.1.1.1 โดยตรวจจำนวนเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} แล้วคำนวณหาจำนวนเชื้อ/มล เช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.1.1.3

6.1.1.2 spreading method

6.1.1.2.1 กุ้งตะกาด

นำส่วนผสมเนื้อเดียวกันของกุ้งตะกาดที่มีความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} ใช้ปิเปตขนาด 1 มล. ดูดส่วนผสมเนื้อเดียวกันจากความเจือจางมากไปหาความเจือจางน้อย จำนวน 0.1 มล. แต่ละความเจือจางลงบนจานเพาะเชื้อที่มี PCA ที่ผิวหน้าแห้งแล้ว 2 จานต่อหนึ่งความเจือจาง ใช้ Pasteur pipette ลนไฟงอเป็นรูปสามเหลี่ยมเกลี่ยลงบน PCA เพื่อช่วยการกระจายส่วนผสมเนื้อเดียวกันไปทั่วจานเพาะเชื้อ จากจานที่มีความเจือจางมากไปหาความเจือจางน้อย เพาะเชื้อในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ จำนวน 3 จาน และที่อุณหภูมิ 37°ซ จำนวน 3 จาน นาน 48 ชั่วโมง เลือกจานที่ได้ปริมาณเชื้อตามลำดับกับความเจือจางของสารผสมเนื้อเดียวกัน โดยมีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30–300 โคโลนี ถ้ามากกว่า 300 โคโลนี ให้แบ่งเนื้อที่ของจานเพาะเชื้อเป็นส่วน ๆ เท่ากัน นับจำนวนใน 1 ส่วนด้วยเครื่องนับจำนวนโคโลนี คูณด้วยส่วนที่แบ่งต่อมา คำนวณจำนวนเชื้อ/กรัม ทำดังนี้คือจำนวนโคโลนีที่นับได้คูณด้วยความเจือจางของจานเพาะเชื้อที่นับแล้วคูณด้วย 10 บันทึกผล คำนวณหาค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างทั้ง 2

6.1.1.2.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติการเช่นเดียวกับกุ้งตะกาดในหัวข้อ 6.1.1.2.1

6.1.1.2.3 น้ำที่ใช้ในโรงงาน ปฏิบัติการเช่นเดียวกับกุ้งตะกาดในหัวข้อ 6.1.1.2.1 โดยตรวจหาเชื้อที่ระดับความเจือจางตัวอย่างน้ำใช้ในโรงงานคือ

น้ำใช้ มีความเจือจาง stock sample 10^{-1}, 10^{-2}
น้ำก่อนล้าง มีความเจือจาง stock sample 10^{-1}, 10^{-2}
น้ำล้างระหว่างการตกแต่ง 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}
น้ำล้างก่อนการแช่แข็ง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}

หลังจากอบเพาะเชื้อแล้วเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนเชื้อ 30–300 โคโลนี นับด้วยเครื่องนับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณจำนวนเชื้อ/มล. ดังนี้คือ จำนวนเชื้อที่นับได้คูณด้วย 10 บันทึกผล

6.1.1.2.4 น้ำแข็ง ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.1.2.3 ทุกประการ โดยตรวจหาเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-2} และ 10^{-4}

6.1.2 การเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนบน BA

BA เป็นอาหารเพาะเชื้อ ก่อนนำมาใช้อยู่ในจานเพาะเชื้อซึ่งผิวหน้าของ BA ต้องแห้ง ทำการเพาะเชื้อโดยวิธี spreading method

6.1.2.1 กุ้งตะกาด

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับ spreading method บน PCA เท่ากับที่อาหารเพาะเชื้อเป็น BA นำไปเพาะเชื้อในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Haemolytic bacteria) ซึ่งมีลักษณะรอบ ๆ โคโลนี ใสบน BA ที่มีสีแดงทำการคำนวณจำนวนเชื้อเช่นเดียวกับ 6.1.1.2.1 และนับจำนวนแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดให้ด้วย (Non-haemolytic bacteria)

6.1.2.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติการเช่นเดียวกับ 6.1.2.1

6.1.2.3 น้ำใช้ในโรงงาน ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.2.1 โดยตรวจนับเชื้อที่ระดับความเจือจาง ดังนี้

น้ำใช้ มีความเจือจาง stock sample ..
10^{-1}, 10^{-2}
น้ำก่อนล้าง มีความเจือจาง stock sample .,
10^{-1}, 10^{-2}
น้ำล้างระหว่างตกแต่ง มีความเจือจาง
10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}
ชะล้างก่อนการแช่แข็ง มีความเจือจาง
10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}

6.1.2.4 น้ำแข็ง ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.2.1 โดยตรวจนับเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}; 10^{-3}, 10^{-4}

6.1.3 การเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวน Vibrios บน TCBS

6.1.3.1 การตรวจนับเชื้อ Vibrio parahaemolyticus

6.1.3.1.1 กุ้งตะกาด

ใช้วิธีการ spreading method บน TCBS ซึ่งเป็นอาหารเพาะเชื้อในจานเพาะเชื้อที่มีผิวหน้าแห้งแล้ว โดยนำเอาส่วนผสมเนื้อเดียวกันที่มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} ใช้ปิเปตดูดมา 0.1 มล. ในแต่ละความเจือจางลงบน TCBS แล้วใช้ pasteur pipette ลนไฟจนงอเป็นสามเหลี่ยนเกลี่ยส่วนผสมเนื้อเดียวกันให้ทั่วจานเพาะเชื้อนำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวน Vibrio parahaemolyticus . มีลักษณะสีเขียวเข้ม ขึ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2–3 มม. คำนวณหาเชื้อเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.1.2.1 หลังจากนั้นเขี่ยลักษณะโคโลนีดังกล่าวลงบน NA 3 % NaCl ด้วยเข็มเกลี่ยเชื้อให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชม. เพื่อทำการพิสูจน์เชื้อต่อไป

6.1.3.2 การตรวจนับเชื้อ Marine Vibrios อื่น ๆ

6.1.3.2.1 กุ้งตะกาด

จากจานเพาะเชื้อในหัวข้อ 6.1.3.1.1 นับลักษณะโคโลนีที่เป็น Marine Vibrios คือโคโลนีสีเหลือง เส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1 มม. ขึ้นไป (เกรียงศักดิ์ สายชนู และคณะ, 2524) คำนวณหาเชื้อเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.1.2.1

6.1.3.2.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติเช่นเดียวกับกุ้งตะกาดในหัวข้อ 6.1.3.2.1

6.1.3.3 การพิสูจน์เชื้อ Vibrio parahaemolyticus ทางชีวเคมี

นำเชื้อบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA 3% NaCl มาทำการทดสอบทางชีวเคมีดังนี้

6.1.3.3.1 การย้อมสีแกรม (Gram's staining method) (Hucker's Modification) Elliott et al. (1978) ปฏิบัติดังต่อไปนี้

ก. ป้ายเชื้อเล็กน้อยบนสไลด์ หยดด้วยน้ำกลั่น เกลี่ยให้ทั่วสไลด์ปล่อยให้แห้งและลนไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อติดกับสไลด์

ข. หยด crystal violet ลงบนสไลด์นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

ค. หยดสารละลายไอโอดีนลงไป ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

ง. หยด แอลกอฮอล์ 95 % นาน 30 วินาที ถึง 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

จ. ย้อมด้วย Safranin O Solution นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำซับให้แห้ง

ฉ. ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดูการติดสีและรูปร่างของเซล โดย Vibrio parahaemolyticus จะติดสีแดง มีรูปร่างเป็นแท่ง

17036598

6.1.3.3.2 การทดสอบคะตะเลส (Catalase Test)

โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl ลงบนสไลด์ แล้วหยดด้วย Hydrogen peroxide (H_2O_2) 3% ลงบนเชื้อ สังเกตการฟองอากาศ Vibrio parahaemolyticus จะให้ผลบวก

6.1.3.3.3 การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test)

ใช้กระดาษกรองหยดด้วยสารละลาย Cytochrome oxidase แล้ว ป้ายเชื้อจาก NA 3% NaCl ลงบนกระดาษกรองนั้น ถ้าเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงเข้มจะให้ผลบวก Vibrio parahaemolyticus จะให้ผลบวก

6.1.3.3.4 การทดสอบออกซิเดทีพ-เฟอร์เมนเตทีฟ (Oxidative-Fermentative Test) และการทดสอบการเคลื่อนที่ (motility) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแทงลงใน H-L Medium 2 หลอดต่อ 1 เชื้อ โดยหลอดหนึ่งปิดด้วย soft paraffin อีกหลอดหนึ่งไม่ต้องปิด เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง สังเกตผล Vibrio parahaemolyticus จะทำให้ H-L Medium 3% NaCl เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ทั้ง 2 หลอด อ่านผลเป็น F และสามารถเคลื่อนที่ได้โดยลักษณะเชื้อ แผ่ออกตามขวางจากรอยเข็มที่แทง

6.1.3.3.5 การทดสอบความทนเกลือ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl ลงใน Tryptone Broth

3 หลอดที่มี NaCl จำนวน 0 %, 8 % และ 10 %
เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง สังเกตผลถ้าเกิด
ความขุ่นขึ้นแสดงว่าเชื้อนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ Vibrio
parahaemolyticus ส่วนมาก เจริญได้ไม่เกิน 8 %
NaCl ส่วน 0 % และ 10 % ส่วนมากไม่เจริญเติบโต

6.1.3.3.6 การทดสอบดีคาร์บอกซิเลส
(Decarboxylase Test) เขี่ยเชื้อลงใน Decarboxylase
Test Medium (Falkon's) 4 หลอด หลอดที่หนึ่ง
จะเป็นหลอดควบคุม (Control) ส่วนอีก 3 หลอด
จะมีกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ arginine, lysine
และ ornithine หลังจากเขี่ยเชื้อลงไปแล้ว ปิดด้วย
พาราฟินเหลว (Liguid paraffin) เพาะเชื้อที่
อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยหลอดควบคุม
ต้องเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง Vibrio parahaemolyticus
จะให้ผล arginine -, Lysine +, ornithine +

6.1.3.3.7 การทดสอบคาร์โบไฮเดรต
เฟอร์เมนเตชั่น (Carbohydrate Fermentation)
เขี่ยเชื้อลงใน BS ที่มีคาร์โบไฮเดรต 6 ชนิดคือ arabinose,
lactose, sucrose, mannitol, maltose
และ starch เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง

6.1.3.3.8 การทดสอบการเกิด H_2S
เขี่ยเชื้อจาก NA 3% NaCl ลงบน TSI โดยป้ายเชื้อบนผิวหน้า
(slant) และแทงลงในเนื้อของ TSI (butt)

เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง Vibrio parahaemolyticus ให้ผลคือ ไม่เกิดสีดำของ H_2S ผิวหน้าของ TSI (slant) เปลี่ยนเป็นสีแดง ส่วนเนื้อของ TSI (butt) เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

6.1.3.3.9 การทดสอบอินดอล (Indole Test)

เขี่ยเชื้อลงใน Tryptone Water เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการเติมสาร Kovac's Reagent ลงไปแล้วเขย่าสำหรับ Vibrio parahaemolyticus ให้ผลการทดสอบเป็นบวก เกิดวงแหวนสีแดงที่ผิวหน้าของอาหารที่ใช้ทดสอบ

6.1.3.3.10 การทดสอบ Nitrate Reduction

เขี่ยเชื้อลงใน Nitrate Broth เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการเติมด้วย Solution A และ Solution B สำหรับ Vibrio parahaemolyticus ให้ผลบวกต่อการทดสอบโดยหลังจากเติมด้วยสารละลาย A และ B ทำให้อาหารทดสอบเปลี่ยนเป็นสีแดง

6.1.3.3.11 การทดสอบการใช้ Citrate

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อป้ายเชื้อบนผิวหน้าของ Simmon's Citrate Medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง Vibrio parahaemolyticus ให้ผลการทดสอบเป็นบวก โดยทำให้อาหารทดสอบเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

6.2 การตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียที่เป็นอินดิเคเตอร์ (Indicator) โดยวิธี MPN (Most Probable Number)

6.2.1 แบคทีเรีย Coliforms ตรวจหาตามวิธีของ Elliott et al. (1978) และ W.H.O. (1971)

6.2.1.1 กุ้งตะกาด

ปฏิบัติการขั้นต้น (presumptive test)
ใช้ปิเปตขนาด 5 มล. ดูดส่วนผสมเนื้อเดียวกันที่มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} จำนวนความเจือจางละ 3 มล. ลงใน MacConkey Broth 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. จนครบทุกความเจือจาง เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูลักษณะการเกิดแก๊สในหลอด durham fermentation tube และอาหารเพาะเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง บันทึกผลจำนวนหลอด

ปฏิบัติการขั้นยืนยัน (confirmed test)
ใช้ลวดเขี่ยเชื้อจากหลอด MacConkey Broth ที่ให้ผลบวก แล้วเกลี่ย (Streak) บนผิวหน้าของอาหารเพาะเชื้อ EMB ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ โดยเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง ลักษณะของโคโลนีที่เป็น Coliforms มี 3 ลักษณะคือ โคโลนีสีชมพูขึ้น โคโลนีสีชมพูตรงกลางมีสีดำ และโคโลนีสีเหลือบปีกแมลงทับ (metallic sheen) หมวนกับ จำนวนหลอดที่ได้ผลบวกจาก MacConkey Broth หาจำนวนเชื้อจากตาราง MPN ต่อกรัม จากตารางในภาคผนวก ข.

6.2.1.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับกุ้งตะกาด ในหัวข้อ 6.2.1.1

6.2.1.3 น้ำที่ใช้ในโรงงาน

ปฏิบัติการขั้นต้น (Presumptive test)

โดยใช้ MacConkey Broth ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า และ 2 เท่า ความเจือจางของน้ำใช้ตั้งแต่ stock sample, 10^{-1} และ 10^{-2} ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดตัวอย่างน้ำที่เป็น stock sample ลงใน MacConkey Broth ความเข้มข้น 2 เท่า จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 10 มล. ต่อไปใช้ปิเปตดูดส่วนผสมเนื้อเดียวกันของตัวอย่างน้ำใช้จากโรงงานที่เป็น stock sample ลงใน MacConkey Broth ความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. สำหรับส่วนผสมของตัวอย่างน้ำที่มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} ปฏิบัติการเช่นเดียวกัน คือ ใส่ลงใน MacConkey Broth ความเข้มข้น 1 เท่า 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลบวกบันทึกผล

ปฏิบัติการขั้นยืนยัน (confirmed test)

ปฏิบัติเช่นเดียวกับกุ้งตะกาดทุกประการในหัวข้อ 6.2.1.1 นำผลบวกไปหาจำนวน Coliforms จากตาราง MPN ในภาคผนวก ข. มีหน่วยเป็น . /100 มล.

6.2.1.4 น้ำแข็ง ปฏิบัติการเช่นเดียวกับน้ำใช้ในโรงงาน หัวข้อที่ 6.2.1.3

6.2.2 Escherichia coli ทำตามวิธีการของ Elliott et al. (1978)

6.2.2.1 กุ้งตะกาด

ดำเนินการทดลองต่อจากหัวข้อ 6.2.1.1 คือใช้ลวดถ่ายเชื้อจาก MacConkey Broth ที่ให้ผลบวกลงในอาหารเพาะเชื้อ BGLB และ Peptone Water นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผล Escherichia coli จะทำให้เกิดแก๊สใน durham tube ที่ใส่อยู่ใน BGLB และผลบวกในการทดสอบอินดอลของ Peptone Water บันทึกผลหาจำนวนจากตาราง MPN ในภาคผนวก ข.

6.2.2.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.2.2.1

6.2.2.3 น้ำใช้ในโรงงาน ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.2.2.1

6.2.2.4 น้ำแข็ง ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.2.2.1

6.2.3 Fecal Streptococci ดำเนินการตามวิธีของ Harrigan et al. (1976)

6.2.3.1 กุ้งตะกาด

ปฏิบัติการขั้นต้น (Presumptive test)

ใช้ปิเปตดูดส่วนผสมเนื้อเดียวกันที่มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ความเจือจาง ละ 5 มล. ลงใน MZ 5 หลอด ๆ ละ 1 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง บันทึกผลจำนวนหลอดของ MZ ที่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ปฏิบัติการขั้นยืนยัน (confirmed test)

ใช้ลวดถ่ายเชื้อจาก MZ ที่ให้ผลบวกลงใน GZ หลอดต่อหลอดจนครบแล้วทำการเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5°ซ นาน 48 ชั่วโมง บันทึกผลจำนวนหลอดที่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง นำไปหาจำนวน Fecal Streptococci จากตาราง MPN ในภาคผนวก ข. มีหน่วยเป็น /กรัม

6.2.3.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.2.3.1

6.2.3.3 น้ำที่ใช้ในโรงงาน

ปฏิบัติการขั้นต้น (presumptive test)

ใช้ปิเปตดูดส่วนผสมของน้ำที่เป็น stock solution ลงใน GZ ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า จำนวน 5 หลอด ๆ ละ 10 มล. จากตัวอย่างน้ำที่เป็น stock sample ใช้ปิเปตดูดใส่ลงใน GZ ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า 5 หลอด ๆ ละ 1 มล. จากส่วนผสมที่มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} ใช้ปิเปตดูดใส่ลงใน GZ ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 5 หลอด ๆ ละ 1 มล. เพาะเชื้อ

ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง บันทึกผลหลอด GZ ที่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ปฏิบัติการขั้นยืนยัน (confirmed test) จากหลอดที่ให้ผลบวกถ่ายเชื้อด้วยลวดถ่ายเชื้อลงใน GZ ใหม่ หลอดต่อหลอด เพาะเชื้อในอุณหภูมิ 44.5 °ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลหลอดที่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง บันทึกผลหาจำนวนแบคทีเรียจากตาราง MPN ในภาคผนวก ข. มีหน่วยเป็น /100 มล.

6.2.3.4 น้ำแข็ง ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.2.3.3 ทุกประการ

6.2.4 Clostridium perfringens ตรวจหาเชื้อตามวิธีการของ Harrigan et al. (1976) และ Collin et al. (1976)

6.2.4.1 กุ้งทะเล

ปฏิบัติการขั้นต้น (Presumptive test) ใช้ปิเปตดูดส่วนผสมเนื้อเดียวกันที่มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} แต่ละความเจือจางลงในอาหาร DRCM 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลในหลอด DRCM เปลี่ยนเป็นสีดำ บันทึกผลจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก

ปฏิบัติการขั้นยืนยัน (confirmed test) ใช้ลวดถ่ายเชื้อจาก DRCM ที่ให้ผลบวกลงใน Litmus milk ที่ไล่อากาศด้วยความร้อนแล้ว หลอดต่อหลอด เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลบวกโดย Litmus milk จะให้ลักษณะ stormy reaction (acid, coagution, gas, peptonize) (Poonsuk, 1978) บันทึกผล และหาจำนวนแบคทีเรียจากตาราง MPN ในภาคผนวก ข. มีหน่วยเป็น /กรัม

6.2.4.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.2.4.1 ทุกประการ

6.2.4.2 น้ำที่ใช้ในโรงงาน

ปฏิบัติการขั้นต้น (Presumptive test)

ใช้ปิเปตดูดส่วนผสมของน้ำที่เป็น stock sample ลงใน DRCM ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 10 มล. ต่อมาใช้ปิเปตดูดส่วนผสมของน้ำที่เป็น stock sample ลงใน DRCM ที่มีความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. ทำต่อไปอีก 2 ความเข้มข้นของส่วนผสมของน้ำที่ใช้ในโรงงาน ลงใน DRCM ความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 1 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลบวกเช่นเดียวกันหัวข้อ 6.2.4.1 บันทึกผล

ปฏิบัติการขั้นยืนยัน (confirmed test)

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับการยืนยันในหัวข้อ 6.2.4.1 อ่านผลแล้วบันทึกผลเทียบหาจำนวน Clostridium perfringens จากตาราง MPN ในภาคผนวก ข. มีหน่วยเป็น /100 มล.

6.3 การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ดังนี้

6.3.1 Staphylococcus aureus โดยการใช้อาหาร BP ตามวิธีของ Elliott et al. (1978)

6.3.1.1 กุ้งตะกาด

ปฏิบัติการขั้นต้น (Presumptive test)

ใช้ปิเปตขนาด 1 มล. ดูดส่วนผสมเนื้อเดียวกันความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} ความเจือจางละ 0.1 มล. ลงบน BP ที่ผิวหน้าแห้งแล้ว ใช้วิธีการ spreading method เกลี่ยให้ส่วนผสมเนื้อเดียวกันกระจายทั่วผิวหน้า BP เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ได้ลักษณะโคโลนีสีดำ แวว มีขอบขาว เห็นรอยใสล้อมรอบโคโลนี ขอบของโคโลนีเกลมเรียบไม่ขรุขระ

ปฏิบัติการขั้นยืนยัน (confirmed test)

เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะจากการปฏิบัติการขั้นต้น เกลี่ย (streak) บนผิวหน้าของ BA ที่แห้งแล้ว เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ให้โคโลนีลักษณะสีขาวขุ่น เกิดรอยใส รอบโคโลนี

coagulase test เป็นการทดสอบขั้นสมบูรณ์ เขี่ยเชื้อจาก BA ลงใน Rabbit Plasma 0.3 % ปริมาณหลอดละ 0.5 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ถ้าเป็น Staphylococcus aureus แล้ว จะทำให้เกิดการจับเป็นก้อน (clot) ของ Rabbit Plasma (Elliott et al., 1978)

6.3.1.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติการทดสอบเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.3.1.1 ทุกประการ

6.3.1.3 น้ำที่ใช้ในโรงงาน ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.3.1.1 ทุกประการ

6.3.1.4 น้ำแข็ง ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.3.1.1 ทุกประการ

6.3.2 Vibrio cholerae ทำการเพาะเชื้อตามวิธีการของ Elliott et al., (1978)

6.3.2.1 กุ้งตะกาด

นำตัวอย่างที่เป็นกุ้งตะกาด มาตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรและปากคีบที่ลนไฟให้ได้ 25 กรัม ใส่ลงในขวดที่มีอาหารเพาะเชื้อ APW ปริมาณ 225 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นานไม่เกิน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก APW ด้วยลวดถ่ายเชื้อ นำมาเกลี่ย (streak) บนผิวหน้าของ TCBS ที่แห้งแล้ว ให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีที่สงสัย เป็น

Vibrio cholerae คือ โคโลนีสีเหลืองนวล ขนาดเล็ก กลม หลังจากนั้นเขี่ยลักษณะโคโลนีเหล่านี้ลงบน TSI เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ทั้งส่วนบนผิวหน้า (slant) และเนื้อใน TSI (butt)

การทดสอบทางชีวเคมี โดยเขี่ยเชื้อจาก TSI ลงบน NA เกลี่ย (streak) ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ทดสอบดังต่อไปนี้

ก. การทดสอบดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase Test) ปฏิบัติเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.6 บน Decarboxylase Test Medium ซึ่ง Vibrio cholerae ให้ผลการทดสอบคือ Lysine เป็นบวก ornithine เป็นบวก และ arginine เป็นลบ

ข. การทดสอบคาร์โบไฮเดรทเฟอร์เมนเตชั่น (Carbohydrate Fermentation) ปฏิบัติเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.7 โดยใช้ BS Vibrio cholerae ให้ผลการทดสอบคือ mannitol บวก sucrose บวก และ arabinose ลบ

ค. การทดสอบอินดอล (Indole Test) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.9 ใส่อาหาร peptone water Vibrio cholerae ให้ผลบวก

ง. การทดสอบ Citrate (Citrate Test) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.11 โดยใช้ Simmon's Citrate Medium Vibrio cholerae ให้ผลบวก หรือลบอย่างใดอย่างหนึ่ง

จ. การทดสอบ MR-VP (MR-VP Test) โดยเขี่ยเชื้อลงใน MR-VP Medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน

24 ชั่วโมง แล้วแบ่ง MR - VP Medium ออกเป็น 2 ส่วน ๆ หนึ่งทดสอบ MR โดยเติมด้วยสารละลาย Methyl Red เขย่าออก Vibrio cholerae ให้ผลบวก และอีกส่วนหนึ่งนั้นทดสอบ VP โดยเติมสารละลาย Voges-Proskauer Test Reagent ลงไปเขย่าหลอด ซึ่ง Vibrio cholerae ให้ผลบวกหรือลบอย่างใดอย่างหนึ่ง

6.3.2.2. ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.3.2.1 ทุกประการ

6.3.3. Salmonella spp. ทำการเพาะแยกเชื้อตามวิธีของ Elliott et al. (1978)

6.3.3.1 กุ้งตะกาด

นำตัวอย่างกุ้งตะกาดแต่ละตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรและปากคีบที่ลนไฟแล้วให้ได้น้ำหนัก 25 กรัม ใส่ลงใน LB ปริมาณ 225 มล. เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อด้วยปิเปตขนาด 1 มล. ลงใน TTBB ทำการเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 43°ซ นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้ออีกครั้งหนึ่งด้วยลวดเขี่ยเชื้อลงบนผิวหน้าของ BGA ที่แห้งแล้ว เกลี่ย (streak) ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เมื่อเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น Salmonella spp. มีลักษณะโคโลนีสีชมพู ใส หรือขุ่น เขี่ยโคโลนีเหล่านี้ลงบน TSI ทำการเพาะเชื้อที่อุณหภูมิที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เชื้อที่สงสัยจะต้องทำให้ slant ของ TSI เปลี่ยนเป็นสีแดง และ butt เปลี่ยนเป็นสีเหลือง นอกจากนี้บริเวณ butt อาจ มีสีดำ

ของ H_2S ได้หลังจากนั้นจึงนำเอาเชื้อที่ให้ลักษณะดังกล่าวซึ่งสงสัย เป็น Salmonella spp. มาทดสอบเชื้อทางชีวเคมีต่อไป

การทดสอบเชื้อทางชีวเคมี

ก. การทดสอบดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase Test) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.6 โดยใช้ Decarboxylase Test Medium ซึ่ง Salmonella spp. ให้ผลการทดสอบ lysine เป็นบวก, ornithine เป็นบวก, และ arginine เป็นบวกหรือลบอย่างใดอย่างหนึ่ง

ข. การทดสอบคาร์โบไฮเดรตเฟอร์เมนเตชั่น (Carbohydrate Fermentation) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.7 โดยใช้ BS Salmonella spp. ทำให้ sucrose เป็นลบ, mannitol เป็นบวก และ lactose เป็นลบ

ค. การทดสอบอินดอล (Indole Test) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.9 โดยใช้ Peptone Water Salmonella spp. ให้ผลเป็นบวก

ง. การทดสอบ Citrate (Citrate Test) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.11 โดยใช้ Simmon's Citrate Medium Salmonella spp. ให้ผลบวก

จ. การทดสอบ MR - VP (Mr - VPtest) ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.3.2.1 จ. Salmonella spp. ให้ VP เป็นลบ และ MR เป็นบวก

ฉ. การทดสอบการใช้ยูเรีย (Urea Test) เขี่ยเชื้อลงบนผิวหน้า (slant) ของ Urea Medium เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง โดย Salmonella spp. ต้องให้ผลลบคือ ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของ Urea Medium

6.3.3.2 ปลาหมึกกล้วย ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.3.3.1

6.3.4 Pseudomonas spp.

เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จาก BA โดยวิธี spreading method จากหัวข้อ 6.1.2 โดยเลือกโคโลนีที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ นำมาทดสอบคุณสมบัติดังนี้

ก. การย้อมแกรม (gram's staining) ปฏิบัติตามหัวข้อ 6.1.3.3.1 Pseudomonas spp. ให้ gram + มีรูปร่างเป็นแท่ง

ข. Oxidase Test ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.3 Pseudomonas spp. ให้ผลบวก

ค. Catalase Test ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.2 Pseudomonas spp. ให้ผลบวก

ง. Oxidative-Fermentation Test ปฏิบัติการเช่นเดียวกับหัวข้อ 6.1.3.3.4 Pseudomonas spp. ทำให้เกิด Oxidation (O) อ่านผลเป็น O

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองได้นำมาใช้วิเคราะห์ทางสถิติตามหลักของ Sokal and Rohf (1973) ดังนี้

ตัวกลางเลขคณิต ($\bar{X}$)

$$\bar{X} = \frac{x_1+x_2+x_3+\ldots\ldots X_n}{N} = \frac{\Sigma x}{N}$$

Σx = ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด

N = จำนวนข้อมูล

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance)

ใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา

1. ความแตกต่างของปริมาณเฉลี่ยแบคทีเรียของกุ้งตะกาดและปลาหมึกกล้วยจากเรือประมงในทะเล ระหว่างเดือนเมษายนถึงตุลาคม 2525

2. ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียต่าง ๆ โดยเฉลี่ยในระยะทั้ง 4 ของการผลิตกุ้งตะกาดแช่แข็งของโรงงานที่ 1 และที่ 2

3. ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียต่าง ๆ โดยเฉลี่ยในระยะทั้ง 4 ของการผลิตปลาหมึกกล้วยแช่แข็งของโรงงานที่ 1 และที่ 2

4. ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียเฉลี่ยระหว่างเดือนในการผลิตกุ้งตะกาดแช่แข็งของโรงงานที่ 1 และที่ 2

5. ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียระหว่างเดือนในการผลิตปลาหมึกกล้วยแช่แข็งของโรงงานที่ 1 และที่ 2

6. ความแตกต่างของปริมาณเฉลี่ยของแบคทีเรียต่าง ๆ ในปลาหมึกกล้วยระยะทั้ง 4 ของการผลิตระหว่างโรงงานที่ 1 และที่ 2

7. ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียต่าง ๆ ในกุ้งทะกาดระยะทั้ง 4 ของการผลิตระหว่างโรงงานที่ 1 และที่ 2

โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมี 1 ตัวประกอบ (One-Way Analysis of Variance) ดังนี้

Source of Variance	df	Sum of Square (SS)	Mean Square (MS)	F	F_{table}
Between	K-1	$SS_B = \sum_{j=1}^{k} \left(\frac{T_j^2}{n_j} \right) - \frac{T^2}{N}$	$MS_B = \frac{SS_B}{k-1}$	$\frac{MS_B}{MS_W}$	$F, df_1 = k-1$ $df_2 = N-k$ $\alpha = 0.05$
Within	N-K	$SS_W = SS_T - SS_B$	$MS_W = \frac{SS_W}{N-k}$		
Total	N-1	$SS_T = \sum_{j=1}^{k} \sum_{i=1}^{nj} x_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$			

เมื่อ i = หมายเลขที่ของข้อมูลในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

j = หมายเลขที่ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

nj = จำนวนข้อมูลในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

Tj = ผลรวมของคะแนน n ค่าในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

$\sum_{j=1}^{k} \sum_{i=1}^{nj} x_{ij}^2$ = ผลรวมของข้อมูลแต่ละตัวยกกำลังสองทุก ๆ ค่า ในทุกกลุ่มตัวอย่าง

k = จำนวนกลุ่มตัวอย่าง

N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

T = ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด

T_2 = ผลรวมของข้อมูลทั้งหมดยกกำลังสอง

การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณเฉลี่ยเป็นคู่ โดยใช้ LSD (Least significant difference) ดังนี้

$$LSD = t_{\alpha/2} \cdot S\sqrt{\frac{2}{f}}$$

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล 2 ชุด โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient-R)

ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ดังนี้

1. หาความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในระยะทั้ง 4 ของการผลิตปลาหมึกกล้วยและกุ้งตะกาดแช่แข็ง

2. หาความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรีย Fecal Streptococci, Coliforms และ Clostridium perfringens ในปลาหมึกกล้วยและกุ้งตะกาดระยะหลังการแช่แข็ง

3. หาความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรีย Fecal Streptococci, Coliforms Escherichia coli, Clostridium perfringens, Vibrio parahaemolyticus และ Marine Vibios ในปลาหมึกกล้วยและกุ้งทะเลในธรรมชาติจากเรือประมง

วิธีการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ดังกล่าว โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient - R) ดังสูตร

$$R = \frac{N\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{\sqrt{\left[N\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2\right]\left[N\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2\right]}}$$

เมื่อ Σx = ผลรวมของข้อมูลชุด x

Σy = ผลรวมของข้อมูลชุด y

Σx^2 = ผลรวมของข้อมูลชุด x แต่ละตัวยกกำลังสอง

Σy^2 = ผลรวมของข้อมูลชุด y แต่ละตัวยกกำลังสอง

Σxy = ผลรวมของผลคูณระหว่าง x กับ y

N = จำนวนข้อมูล

แล้วทดสอบนัยสำคัญของค่า R โดยใช้สูตร t ดังนี้

$$t = \frac{R\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-R^2}}$$

$$df = n-2$$

เมื่อ n = จำนวนข้อมูลในแต่ละชุด x และ y