การตรวจวิเคราะห์จำนวน *Salmonella* spp. ที่บาดเจ็บในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius แช่แข็ง

นางสาวจิราวรรณ ช่วยชู

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0188-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF INJURED *Salmonella* spp. IN FROZEN GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* Fabricius.

Chirawan Chouychoo

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974–17-0188-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจวิเคราะห์จำนวน *Salmonella* spp. ที่บาดเจ็บในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius แช่แข็ง
โดย	นางสาวจิราวรรณ ช่วยชู
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... รองคณบดีฝ่ายบริหาร
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จิราวรรณ ช่วยชู : การตรวจวิเคราะห์จำนวน *Salmonella* spp. ที่บาดเจ็บในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius แช่แข็ง.(DETECTION OF INJURED *Salmonella* spp. IN FROZEN GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* Fabricius). อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์.102 หน้า. ISBN 974-17-0188-8.

ในการศึกษาผลของการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* spp. ในกุ้งสด โดยการแช่แข็งด้วยอัตราเร็ว 0.45, 0.79 , 1.50 และ 45 cm/hr พบว่าการแช่แข็งด้วยอัตราเร็ว 45 cm/hr จะมีผลต่อการรอดตายน้อยและการบาดเจ็บมากกว่าของ *Salmonella* spp. เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งด้วยอัตราเร็วที่ต่ำกว่าคือการรอดตายร้อยละ 0.21ของทั้งหมดซึ่งในจำนวนนี้มีเชื้อที่บาดเจ็บคิดเป็นร้อยละ78.34 ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับ การตรวจนับจำนวน *Salmonella* spp. จากการแช่แข็ง Salmonella suspension ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 60 cm/hr พบว่ามีการรอดตายน้อยและการบาดเจ็บมากกว่าการแช่แข็งด้วยอัตราเร็วที่ต่ำกว่า คือการรอดตายเท่ากับร้อยละ 0.15 ของทั้งหมดซึ่งในจำนวนนี้มีเชื้อที่บาดเจ็บคิดเป็นร้อยละ 81.09 สำหรับผลของการเก็บSalmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่อุณหภูมิ –10 , – 20 และ – 75 ° C เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ พบว่าการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ –10 °C มีผลต่ออัตราการลดลงของจำนวนเชื้อเร็วที่สุด โดยมีเชื้อทั้งหมดลดลงเฉลี่ยทั้งหมด 3.04 สัปดาห์ / log cfu เชื้อที่แข็งแรงลดลงเฉลี่ย 3.10 สัปดาห์ / log cfu และเชื้อที่บาดเจ็บลดลงเฉลี่ย 2.94 สัปดาห์ / log cfu สำหรับผลของการเก็บตัวอย่าง Salmonella suspension แช่แข็ง พบว่าการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ –10 °C มีผลต่ออัตราการลดลงของจำนวนเชื้อเร็วที่สุด โดยมีเชื้อทั้งหมดลดลงเฉลี่ยทั้งหมด 2.51 สัปดาห์ / log cfu เชื้อที่แข็งแรงลดลงเฉลี่ย 2.34 สัปดาห์ / log cfu และเชื้อที่บาดเจ็บลดลงเฉลี่ย 2.56 สัปดาห์ / log cfu สำหรับ pre – enrichment ที่เหมาะสมในการฟื้นตัวของ *S.derby* คือ Tryptic soy broth ที่เติม sodium pyruvate และ yeast extract โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ช่วยเพิ่มจำนวนเชื้อที่แข็งแรงคิดเป็น 88 เปอร์เซ็นต์ จาก 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth ที่ไม่ได้เติม sodium pyruvate และ yeast extract เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ 42 °C โดยใช้เวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง

ภาควิชา……..-…… ลายมือชื่อนิสิต……

สาขาวิชา… เทคโนโลยีทางชีวภาพ…. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา……

ปีการศึกษา……. 2544…… ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม……..

4272237623: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: effect of freezing rate / survival / injury/ frozen shrimp

Chirawan chouychoo : DETECTION OF INJURED *Salmonella* spp. IN FROZEN GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* Fabricius. THESIS ADVISOR: Assist. Prof.Sumate Tontratean, Ph.D. THESIS COADVISOR: Assist.Prof. Sutisuk Suknaisil. 101 pp. ISBN 974-17-0188-8.

The effect of freezing on the survival of *Salmonella* spp. was studied by freezing the sample of giant tiger shrimp added with Salmonella at 0.47, 0.79, 1.5 and 45 cm/hr. It was found that the detectable number of survival cells was lowest (0.21%) but highest in the number of injured cells (78.34%) when the samples were frozen at freezing rate of 45 cm/hr. The same affects show in the freezing of salmonella suspension, the percentage of the survival was 0.15 % and the injured cell was 81.09 % of the survival. The Salmonella suspension was stored at - 10, - 20 and - 75 ^{o} C for 12 week, and found that the storage at -10 ^{o} C caused the decreasing of survival of salmonella, healthy salmonella and injured salmonella faster than storage at the lower temperature. At -10 ^{o} C, the reduction of total salmonella, healthy salmonella and injured salmonella cells were at the rate of 2.51, 2.34 and 2.56 weeks/log cfu, respectively. The Salmonella that added to the shrimp samples when stored with shrimp at - 10, - 20 and - 75 ^{o} C for 12 week was found that at -10 ^{o} C the reduction of total salmonella,healthy salmonella and injured salmonella was fastest , at the rate of 3.04, 3.10 and 2.94 weeks/log cfu, respectively. The suitable pre - enrichment for recovery the injured cell of *S. derby* was Tryptic soy broth supplemented with sodium pyruvate, yeast extract. This medium increased the healthy cells up to 88 % from 40% of Tryptic soy broth without yeast extract and sodium pyruvate, within 3 h at 42 ^{o} C respectively.

Department of…….-…..….. Student ‘ s singnature……..

Field of study…Biotechnology… Advisor ‘ s singnature……

Academic year……..2001…… Co- advisor ‘ s signature……..

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สามารถสำเร็จได้ เนื่องจากความอนุเคราะห์ของหลายๆท่าน ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ ,อ.ดร. รมณี สงวนดีกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ที่ได้สละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณา สุถิมารส ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำการวิจัย

ขอบพระคุณ บริษัทบางกอกอินดัสเทรียลแก๊ส ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และไนโตรเจนเหลวในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท สตรองแพค จำกัด (มหาชน) ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ อ.ดร.ชิดพงศ์ ประดิษฐสุวรรณ สำหรับคำปรึกษาที่ดีและการช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านตลอดเวลาที่ทำวิจัยที่ภาคเทคโนโลยีทางอาหาร

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และ พี่ ๆ น้อง ๆ รวมทั้งเพื่อนๆ ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร สำหรับความอบอุ่นที่มีให้เสมอมาและขอขอบคุณสำหรับทุกความช่วยเหลือตลอดเวลาที่ทำวิจัยที่ภาคเทคโนโลยีทางอาหาร

ขอขอบคุณ คุณอภิศักดิ์ วานิชนาม สำหรับกำลังใจและคำปรึกษา อีกทั้งยังเป็นแรงบันดาลใจในการทำงานวิจัยชิ้นนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณแม่และคุณพ่อ รวมทั้งน้องโม ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา รวมทั้งให้ความสนับสนุนในทุก ๆ ด้านตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญรูป..... ฐ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. วารสารปริทัศน์..... 2
3. วิธีการทดลอง..... 26
4. ผลการทดลองและวิจารณ์..... 39
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 66
รายการอ้างอิง.....67
ภาคผนวก.....71
ภาคผนวก ก.....72
ภาคผนวก ข.....75
ภาคผนวก ค.....77
ภาคผนวก ง.....81
ภาคผนวก จ.....92
ประวัติผู้เขียน.....102

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งกุลาดำ.....	3
2	แสดง %รอดตาย และ %บาดเจ็บของ*S .derby* ของตัวอย่างสารละลาย Salmonella หลังผ่านกระบวนการแช่แข็งด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ.....	40
3	แสดง %รอดตาย และ %บาดเจ็บของ*S. derby* ของตัวอย่างSalmonellaที่ปนกับกุ้งกุลาดำหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ	41
4	แสดงเวลา (สัปดาห์) ที่จำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บลดลง 1 log cfu หลังเก็บที่ – 10,- 20และ – 75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ของตัวอย่างสารละลาย Salmonella แช่แข็ง.....	46
5	แสดงเวลา (สัปดาห์) ที่จำนวนเชื้อทั้งหมด จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บลดลง 1 log cfu หลังเก็บที่ – 10,- 20และ – 75 °Cเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำ.....	47
6	แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและอัตราส่วนของเชื้อที่แข็งแรงและเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 -24ชั่วโมง.....	50
7	แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและอัตราส่วนของเชื้อที่แข็งแรงและเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 - 24 ชั่วโมง.....	51
8	แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและอัตราส่วนของเชื้อที่แข็งแรงและเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 -24 ชั่วโมง.....	58
9	แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและอัตราส่วนของเชื้อที่แข็งแรงและเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา3 - 24 ชั่วโมง.....	59
10	แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและอัตราส่วนของเชื้อที่แข็งแรงและเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 - 24 ชั่วโมง.....	63
11	แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและอัตราส่วนของเชื้อที่แข็งแรงและเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 - 24 ชั่วโมง.....	64
12	แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมด จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บก่อนและหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งตัวอย่าง Salmonella suspension เมื่อแช่แข็งตัวอย่างด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ.....	75

บทที่ หน้า

13 แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมด จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บก่อนและหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำเมื่อแช่แข็งตัวอย่างด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ..... 76

14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ เปอร์เซ็นต์รอดตาย และ เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของ *Salmonella derby* ของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งที่อัตราเร็วต่าง ๆ 92

15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ เปอร์เซ็นต์รอดตายและเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของ *Salmonella derby* ของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งที่อัตราเร็วต่าง ๆ..... 92

16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella, Healthy Salmonella และ Injured Salmonella ของ *Salmonella derby* ของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งที่เก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ..... 92

17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella, Healthy Salmonella และ Injured Salmonella ของ *Salmonella derby* ของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่เก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ..... 93

18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3ชั่วโมง..... 93

19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6ชั่วโมง..... 93

20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง..... 94

21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 94

บทที่ หน้า

22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3ชั่วโมง..... 94

23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6ชั่วโมง..... 95

24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง..... 95

25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 95

26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง..... 96

27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง..... 96

28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง..... 97

29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 97

30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง..... 97

บทที่ หน้า

31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง..... 98

32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonellaของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง..... 98

33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในสารละลายแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 98

34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง..... 99

35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง..... 99

36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง..... 100

37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....100

38 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง..... 100

39 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง..... 101

บทที่ หน้า

40 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง……..101

41 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง…….. 101

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะและส่วนประกอบต่าง ๆ ของกุ้ง……	4
2	วงจรชีวิตของกุ้ง……	4
3	Freezing curve ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ แช่แข็งด้วย Still air อุณหภูมิประมาณ –10 ° C (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น) โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 0.45 cm/hr……	39
4	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –10 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่1)……	44
5	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –20 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่1)……	45
6	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –75 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่1)……	45
7	แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานต่าง ๆ (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่างสารละลายSalmonella แช่แข็ง)……	49
8	แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานต่าง ๆ (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่างSalmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง)……	52
9	แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเติม 1 % ของ Yeast extract และ1 % ของ Sodium pyruvate (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่างสารละลาย Salmonella แช่แข็ง)……	56
10	แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเติม 1 % ของ Yeast extract ,1 % ของ Sodium pyruvate และ 0.0018 % Brilliant green (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่างสารละลาย Salmonella แช่แข็ง)……	57
11	แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเติม 1 % ของ Yeast extract และ1 % ของ Sodium pyruvate (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง)……	61
12	แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเติม 1 % ของ Yeast extract ,1 % ของ Sodium pyruvate และ 0.0018 % Brilliant green (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง)……	62
13	อาหาร TSAYE และลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* spp……	72

รูปที่		หน้า
14	อาหาร TSAYE ที่ผสม Ammonium iron (III) citrate และ Sodium thiosulphate รวมทั้งโคโลนีของ *Salmonella* spp.	72
15	ลักษณะของโคโลนีของ Salmonella spp. ที่เจริญบนอาหาร XLD	72
16	อาหาร SIM medium	73
17	อาหาร TSI	73
18	อาหาร LIA	74
19	Freezing curve ของ Salmonella ในสารละลาย แช่แข็งด้วย Still air อุณหภูมิประมาณ –10 ° C (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น) โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 0.62 cm/hr	77
20	Freezing curve ของ Salmonella ในสารละลาย แช่แข็งด้วย Still air อุณหภูมิประมาณ –20 ° C โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 1.05 cm/hr	77
21	Freezing curve ของ Salmonella ในสารละลาย แช่แข็งด้วย Air blast อุณหภูมิประมาณ –20 ° C โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 2.00 cm/hr	78
22	Freezing curve ของ Salmonella ในสารละลาย แช่แข็งด้วย Cryogenic อุณหภูมิประมาณ – 70 ° C โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 60 cm/hr	78
23	Freezing curve ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ แช่แข็งด้วย Still air อุณหภูมิประมาณ –20 ° C โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 0.79 cm/hr	79
24	Freezing curve ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ แช่แข็งด้วย Air blast อุณหภูมิประมาณ –20 ° C โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 1.50 cm/hr	80
25	Freezing curve ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ แช่แข็งด้วย Cryogenic อุณหภูมิประมาณ – 70 ° C โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 45 cm/hr	80
26	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –10 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่2)	81
27	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –10 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่3)	82
28	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –10 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่4)	82
29	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –20 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่2)	83

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

30 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่3)…….. 83

31 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่4)…….. 84

32 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่2)…….. 84

33 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่3)…….. 85

34 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในสารละลาย หลังเก็บที่ –75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่4)…….. 85

35 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่1)…….. 86

36 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่2)…….. 86

37 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่3)…….. 87

38 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่4)…….. 87

39 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่1)…….. 88

40 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่2)…….. 88

41 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่3)…….. 89

42 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่4)…….. 89

43 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่1)…….. 90

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

44 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่2)..... 90

45 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่3)..... 91

46 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่ –75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่4)..... 91

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การถนอมอาหารโดยการแช่แข็งเป็นที่นิยมมาก เนื่องจากสามารถรักษากลิ่นรส สีและคุณค่าทางอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่การแช่แข็งมีผลกระทบต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารอยู่บ้าง นอกจากนั้นยังทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งปนมากับอาหารที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง เนื่องจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะผลึกขนาดเล็กที่เกิดกระจายทั้งภายในและนอกเซลล์ จะทำให้ pH เปลี่ยนแปลงและโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ นอกจากนั้นภาวะที่ใช้ในการเก็บและอัตราเร็วในการละลายน้ำแข็งจะทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์ด้วย จุลินทรีย์ที่บาดเจ็บเหล่านี้จะมีผลทำให้การตรวจวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์เกิดการผิดพลาด โดยเฉพาะการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella* spp. ซึ่งเชื้อนี้จะต้องไม่มีอยู่ในอาหารชนิดต่าง ๆ ถ้าเกิดความผิดพลาดในการตรวจวิเคราะห์อาจเกิดความเสียหายทั้งทางด้านความปลอดภัยของผู้บริโภคและยังอาจกระทบต่อการส่งออกอาหารไปต่างประเทศ ในปัจจุบันนี้ได้มีการสำรวจพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ในวัตถุดิบกุ้งกุลาดำจากการเพาะเลี้ยงในเขตจังหวัดสมุทรสาคร (สุวิมล กีรติวิริยากรณ์ และ ศันสนีย์ ศรีจันทร์งาม, 2543) ดังนั้นการศึกษาเรื่องผลของกระบวนการแช่แข็งต่อการรอดตายและบาดเจ็บของ *Salmonella* spp.ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงวิธีการตรวจ *Salmonella spp.* ในผลิตภัณฑ์กุ้งกุลาดำแช่แข็ง ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นและการทำให้เซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บฟื้นตัวขึ้นมาในขณะที่ตรวจวิเคราะห์จะช่วยเพิ่มโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อที่บาดเจ็บมากขึ้น ซึ่งทำได้โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะในขั้น Pre – enrichment รวมทั้งการเติมสารที่ช่วยให้เซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บฟื้นตัวขึ้นอย่างรวดเร็วและสารยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นในปริมาณที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการฟื้นตัวของซาลโมเนลล่า จะทำให้สามารถปรับปรุงวิธีการตรวจซาลโมเนลล่าในกุ้งกุลาดำแช่แข็งให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.ศึกษาผลของกระบวนการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *Salmonella* spp. ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

2.ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ *Salmonella* spp. ที่บาดเจ็บหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งกุ้งกุลาดำ

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

1. กุ้งกุลาดำ

1.1 อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Superorder	Eucarida
Order	Decapod
Suborder	Natantia
Family	Penaeidae
Genus	*Penaeus*
	Penaeus monodon Fabricius

1.2 ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ หรือ กุ้งกะลา หรือ กุ้งม้าลาย เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในชั้นครัสเตเชีย (Class Crustacea) เป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Penaeus monodon* Fabricius และมีชื่อภาษาอังกฤษคือ Giant black tiger prawn หรือ Tiger prawn หรือ Jumbo tiger prawn (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

1.3 ลักษณะโดยทั่วไป

ผิวนอกของลำตัวกุ้งปกคลุมด้วย Cuticle ซึ่งประกอบด้วย Chitin ทำให้เปลือกแข็งแรง ยกเว้นบริเวณข้อต่อ เปลือกหุ้มตัวซึ่งเป็นโครงร่างภายนอก เรียกว่า Exoskeleton แบ่งออกเป็น ส่วน ๆ คือ เปลือกหุ้มส่วนหัว – อกทั้งหมด เรียก Carapace เปลือกที่คลุมส่วนท้องแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่คลุมด้านหลัง เรียก Tergum ส่วนที่คลุมส่วนท้อง เรียก Sternum ลำตัวกุ้งแบ่งได้ 2 ส่วน คือ ส่วนหัว – อก (Cephalothorax) มี 13 ปล้อง (ส่วนหัวมี 5 ปล้อง ส่วนอกมี 8 ปล้อง) และส่วนท้อง (Abdome) มี 6 ปล้อง ดังที่แสดงในรูปที่ 1 (Anderson,1993)

กุ้งกุลาดำจะมีลำตัวเป็นสีน้ำเงินเข้มปนสีม่วง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวางลำตัวเป็นปล้องๆ สลับกับแถบสีจาง ดังนั้นจึงเห็นลักษณะสีลำตัวเป็นปล้องตามแถบสี เปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน โคนและปลายกรีเชิดขึ้นเล็กน้อย (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

1.4 วงจรชีวิต

กุ้งกุลาดำมีอายุขัยประมาณ 18 - 24 เดือน เปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยวิธีลอกคราบ (นันทริกา ชันซื่อ, 2540) จากลูกกุ้งวัยอ่อนระยะต่าง ๆ จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย ดังรูปที่ 2 (Motoh, 1985)

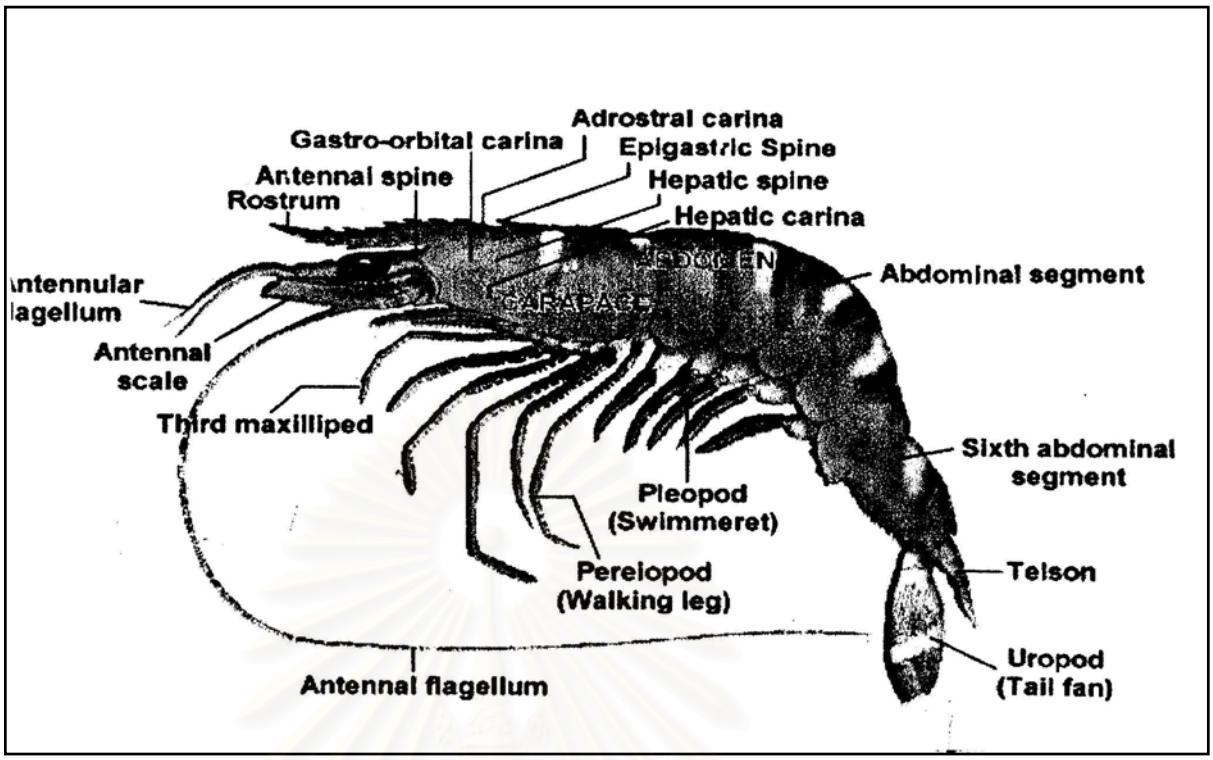
กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญที่สุดประเภทหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากเนื้อมีรสอร่อย เป็นที่นิยมของตลาดต่างประเทศโดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นและอเมริกา เป็นสินค้าเกษตรที่มีมูลค่าส่งออกสูงสุดของประเทศไทย โดยในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคมปี พ.ศ. 2543 มีปริมาณส่งออก 51,617 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่าส่งออกประมาณ 20,267.1 ล้านบาท (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ , 2542)

<u>ตารางที่ 1</u> องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งกุลาดำ (ประจวบ หลำอุบล, 2533)

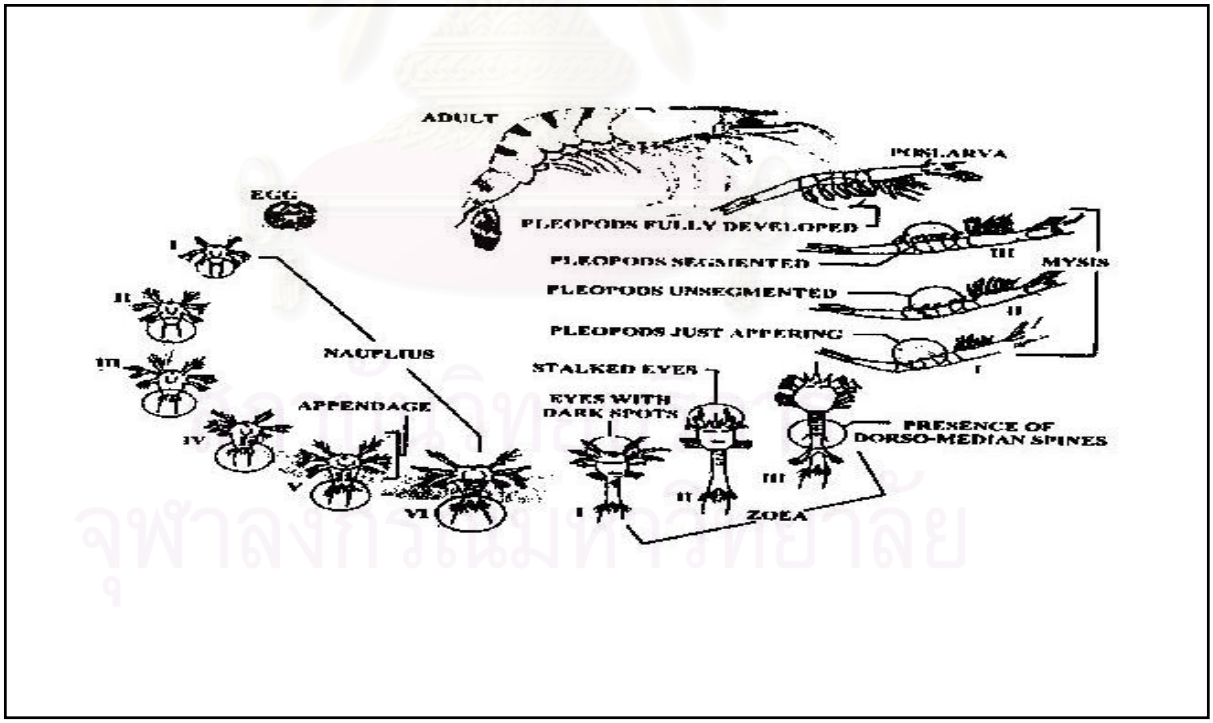
องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (%)
ความชื้น	67.5 – 84.8
โปรตีน	8.9 – 23.2
ไขมัน	0.1 – 3.2
เถ้า	1.3 – 6.8
คาร์โบไฮเดรต	2.2

กุ้งกุลาดำนอกจากจะให้รสชาติที่ดีในการบรโภคแล้วยังให้คุณค่าทางอาหาร โดยเฉพาะโปรตีนสูงด้วย ดังแสดงในตารางที่ 1และนอกจากจะใช้ในการบริโภคโดยตรงแล้วยังใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ลักษณะต่าง ๆ ที่ทำให้สามารถเก็บไว้ได้นานขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 ลักษณะและส่วนประกอบต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ (Anderson,1993)



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ (ดัดแปลงจาก Motoh, 1985)

2. **การแช่เยือกแข็ง** (Freezing)

การแช่แข็งประกอบด้วยการลดอุณหภูมิซึ่งโดยทั่วไปจะลดถึง – 18 °C หรือต่ำกว่า และการตกผลึกของส่วนที่เป็นน้ำกับส่วนที่เป็นตัวถูกละลาย การแช่แข็งเป็นวิธีที่ดีและสามารถปฏิบัติได้วิธีหนึ่งที่มีอยู่ในปัจจุบัน เพื่อใช้ถนอมอาหารระยะยาว เมื่อปฏิบัติอย่างถูกต้อง วิธีนี้จะสามารถรักษากลิ่นรส สี และคุณค่าทางอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่จะสามารถรักษาลักษณะเนื้อสัมผัสไว้ได้ปานกลางเท่านั้น (รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2535)

2.1 **ประเภทของการแช่แข็ง**

Fennema (1975) ได้แบ่งการแช่แข็งอาหารโดยแบ่งตามอัตราเร็วของการแช่แข็งได้เป็นประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้คือ

- **การแช่แข็งแบบช้า** (Slow freezing) หมายถึง การทำให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิประมาณต่ำกว่า 5 °C อย่างช้าๆ โดยใช้เวลาประมาณ 3 – 72 ชั่วโมง เช่นการแช่แข็งอาหารในช่องแช่แข็งของตู้เย็นที่ใช้ตามบ้านซึ่งมักมีอุณหภูมิระหว่าง –1 ถึง - 5 °C

- **การแช่แข็งแบบเร็ว** (Quick freezing) หมายถึง การนำอาหารมาผ่านอุณหภูมิในช่วงที่สามารถทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งได้มากที่สุดโดยใช้เวลาไม่เกิน 30 นาที

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต (2535) ได้เปรียบเทียบข้อดีของการแช่แข็งแบบเร็วไว้ดังนี้คือ

- เซลล์ของอาหารเกิดความเสียหายน้อยกว่า
- อาหารแข็งตัวเร็วกว่า ทำให้ประหยัดเวลา
- ป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่า
- ชะลอการทำงานของเอนไซม์ได้เร็วกว่า

2.2 **การแช่แข็งในอุตสาหกรรม**

Fennema (1973) ได้แบ่งประเภทของการแช่แข็งที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็งดังนี้

2.2.1 Liquid Immersion Freezing หรือ การจุ่มอาหารโดยตรงในน้ำยาหรือสารให้ความเย็น (Refrigerant) เป็นวิธีการแช่แข็งที่มีการใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ เช่น ไก่ และสัตว์ปีกต่างๆ มากกว่าจะใช้กับผลิตภัณฑ์จากประมง เช่น ชิ้นปลาหมึก หรือ ชิ้นปลาชำแหละ การแช่แข็งด้วยวิธีนี้ผิวของผลิตภัณฑ์เกิดเกล็ดน้ำแข็งกระจายตัวได้ดี เนื่องจากเกิดการถ่ายเทความร้อนบริเวณผิวดีมาก และทำให้สีผิวของผลิตภัณฑ์ขาวหม่น นอกจากนั้นยังปรับให้เป็นระบบต่อเนื่องค่อนข้างง่าย

2.2.2 **วิธีการใช้ลมเย็น** (Air Freezing) โดยใช้ลมเย็นที่มีอุณหภูมิในช่วง –18 ถึง – 40 °C แบ่งเป็น

- Still Air Freezing เป็นการแช่แข็งโดยใช้อากาศเย็นหมุนเวียนเหนืออาหารอย่างช้าๆหรือไม่มี ตัวทำความเย็นที่ใช้คือ แอมโมเนีย, Dichlorodifluoromethane หรือน้ำเกลือที่เย็นจัดไหลอยู่ภายในท่อที่ขดเป็นวง และมีขั้นวางทับท่อเย็นนั้น การแช่แข็งทำโดยวางชิ้นอาหารลงบนถาดที่วางอยู่บนชั้น อัตราการถ่ายเทความร้อนระหว่างสารทำความเย็นกับชิ้นอาหารมีค่าต่ำเพราะพื้นที่ผิวของชิ้นอาหารไม่ได้สัมผัสกับท่อเย็นโดยตรง และภายในมีการหมุนเวียนของลมเย็นช้ามาก

- Air Blast Freezing เป็นการแช่แข็งโดยใช้อากาศเย็นหมุนเวียนเหนืออาหารด้วยความเร็วสูง การใช้ลมเย็นเป่าลงบนอาหารที่เข้ามาแบบต่อเนื่องในอัตราเร็วสูง โดยให้อากาศนั้นผ่านขดลวดทำความเย็นซึ่งหล่อไว้ด้วยสารให้ความเย็นโดยมากใช้แอมโมเนีย ส่วนใหญ่นิยมบรรจุอาหารก่อนนำมาแช่แข็ง อุณหภูมิที่เป่าลงบนอาหารจะประมาณ – 34.1 °C หรือต่ำกว่า การแช่แข็งแบบนี้มีผลดีก็คือ เป็นกระบวนการที่ใช้ต้นทุนและ Cost of operation ต่ำ แต่ทั้งนี้หากควบคุมสภาวะการแช่แข็งไม่ดีพอ จะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำมาก โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้บรรจุหีบห่อ อัตราเร็วของการแช่แข็งขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเครื่องและขนาดของอาหาร

- **การใช้แรงลมเป่าให้อาหารลอยตัว** (Fluidized bed freezing) หลักการคล้ายกับ air blast แต่ความเร็วลมจะสูงกว่าเพราะต้องใช้ลมเป่าให้อาหารลอยตัวในขณะที่แช่แข็ง ซึ่งวิธีนี้อาหารจะต้องเป็นของแข็งเท่านั้นและมีขนาดเล็ก

2.2.3 **การใช้แผ่นความเย็น** (Plate freezer) การแช่แข็งแบบนี้จะทำในตู้เก็บที่หุ้มฉนวน อาหารจะถูกนำไปวางบนแผ่นโลหะที่ไม่เป็นสนิมเรียงเป็นชั้นซ้อนกันภายในตู้มีเครื่องทำความเย็นและสามารถส่งสารให้ความเย็นผ่านไปตามท่อระหว่างชั้นของแผ่นโลหะที่วางอาหารไว้ แล้วจึงอัดแผ่นโลหะให้ผิวหน้าแนบสนิทกับชิ้นอาหารโดยอาศัยแรงกด จนอาหารมีอุณหภูมิต่ำลงถึง – 18 °C

2.2.4 Cryogenic Freezing เป็นการแช่แข็งที่มีอัตราเร็วในการแช่แข็งสูง การแช่แข็งแบบนี้ถูกสร้างโดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสถานะของสารให้ความเย็นโดยอาศัยการดูดความร้อนจากอาหารที่จะแช่แข็งและเกิดการเปลี่ยนสถานะของตัวทำความเย็น สารตัวทำความเย็นที่ใช้ต้องเป็นประเภทที่ใช้กับอาหาร (Food grade) สารให้ความเย็นที่นิยมใช้กันทั่วไปได้แก่ Nitrogen, Carbon dioxide แข็งหรือเหลว ข้อดีของการแช่แข็งวิธีนี้คือ การสูญเสียน้ำของผลิตภัณฑ์น้อยมาก ออกซิเจนถูกกำจัดออกระหว่างการแช่เยือกแข็ง ทำลายเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้อย และเนื่องจากอัตราการแช่แข็งเร็วมาก สามารถแช่แข็งผลิตภัณฑ์ ได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น

2.3 การเปลี่ยนแปลงในขณะแช่แข็ง

Fennema (1973) ได้อธิบายเรื่องการเปลี่ยนแปลงของอาหารระหว่างการแช่แข็ง ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นที่สำคัญ 2 ประการ คือ การเกิดผลึก (Ice crystal formation) และการขยายตัวของผลึก (Crystal Growth) ดังนี้คือ

- **การเกิดนิวเคลียสผลึก (Nucleation)** เกิดขึ้นเมื่อสภาวะเอื้ออำนวยให้โมเลกุลมาจับตัวกันเป็นอนุภาคเล็กๆที่มีระเบียบจนมีขนาดโตพอที่สามารถจะอยู่ได้และสามารถเป็นจุดสำหรับการขยายตัวของผลึกต่อไป การเกิด Nucleation มี 2ลักษณะ คือ Homogeneous และ Heterogeneous nucleation

- **การขยายตัวของผลึก** หลังการเกิด Nucleation แล้ว การขยายตัวของผลึกน้ำแข็งจะเกิดในความเร็วที่ควบคุมโดยอัตราเร็วที่โมเลกุลน้ำทำปฏิกิริยากับผิวผลึก อัตราการแพร่ของน้ำไปยังผิวผลึก และอัตราการนำความร้อนออก การเปลี่ยนแปลงของน้ำไปเป็นน้ำแข็งจะทำให้ความเข้มข้นของสารละลายที่ยังไม่ถูกทำให้เปลี่ยนสถานะเพิ่มขึ้น และจุดเยือกแข็งลดลง จนกระทั่งตัวถูกละลายถูกลดอุณหภูมิจนถึงจุดเยือกแข็งที่เรียกว่า Eutectic point ได้หลายจุด ซึ่งจำนวนจุดเหล่านี้บางครั้งอาจไม่เท่ากับจำนวนตัวถูกละลาย และอัตราการขยายตัวของผลึกน้ำแข็งจะเพิ่มขึ้นเมื่อความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างผิวหน้าของผลึกน้ำแข็งกับอุณหภูมิของส่วนที่ยังไม่แข็งตัวมีค่ามากอีกด้วย

2.4 อัตราเร็วในการแช่แข็งและคุณภาพของผลิตภัณฑ์

สิ่งที่น่าสนใจและสำคัญอีกประการของการตกผลึก คือการกระจายของน้ำแข็งในเนื้อเยื่อ และสารแขวนลอย ทั้งนี้ตำแหน่งของผลึกน้ำแข็งในเนื้อเยื่อและสารแขวนลอยของเซลล์นั้นยังมีความสัมพันธ์กับอัตราเร็วในการแช่แข็ง อุณหภูมิของตัวอย่าง และธรรมชาติของเซลล์ การแช่เยือกแข็งแบบช้า (Slow freezing) จะมีผลทำให้ได้ผลึกขนาดใหญ่ ตำแหน่งของน้ำเปลี่ยนแปลงไป เกิดลักษณะปรากฏของความเหี่ยวย่นในอาหารแช่แข็ง และในบางครั้งทำให้มีคุณภาพต่ำกว่าที่ยอมรับได้ (Fennema, 1973) ในขณะที่การแช่แข็งอย่างรวดเร็ว (Quick freezing) เนื้อเยื่อและสารแขวนลอยของเซลล์ทุกชนิดจะให้ผลึกน้ำแข็งกระจายทั้งภายในและภายนอกเซลล์อย่างสม่ำเสมอ การเกิดผลึกอย่างสม่ำเสมอนี้มีผลทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กจำนวนมาก การเคลื่อนย้ายตำแหน่งของน้ำเกิดขึ้นน้อย ลักษณะที่ปรากฏจะเหมือนกับลักษณะที่เป็นของสด อาหารที่ได้มีคุณภาพสูงกว่าอาหารที่ได้จากการแช่แข็งแบบช้า

ผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง (Frozen products) เป็นที่รู้จักกันมานานแล้วตั้งแต่ปี พ.ศ. 2403 โดยประเทศอเมริกาเริ่มพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง ส่วนประเทศไทยเริ่มมีการผลิตผลิตภัณฑ์แช่แข็งตั้งแต่ปีพ.ศ. 2505 (อัจฉรา พุ่มฉัตร, 2537) สถิติการจับสัตว์น้ำของโลกในปีค.ศ. 1980 ได้มีการนำสัตว์น้ำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งร้อยละ 21.7 โดยมีการแปรรูปสัตว์น้ำเป็นผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 20.0 ในปีค.ศ. 1976 ถึงแม้ว่าจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นแต่มั่นคงและเป็นเครื่องชี้ว่าในอนาคตผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งก็ยังคงได้รับความนิยมจากผู้บริโภค เนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีคุณสมบัติที่เป็นข้อได้เปรียบหลายประการ คือ สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน 6 เดือนถึง 1 ปี โดยที่ยังมีคุณภาพที่ดีอยู่ , มีการสูญเสียวิตามินในอาหารน้อยกว่าการแปรรูปด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น การบรรจุกระป๋อง เป็นต้น และง่ายต่อการสะดวกต่อการดูแลรักษาและขนส่ง (Wheaton และ Lawson, 1985)

2.5 กุ้งแช่เยือกแข็ง

มยุรี จัยวัฒน์ (2532) ได้สรุปข้อมูลที่เกี่ยวกับกุ้งแช่แข็งไว้ดังนี้คือกุ้งที่นำมาทำกุ้งเยือกแข็งส่วนใหญ่เป็นกุ้งทะเลที่อยู่ในวงศ์ต่าง ๆ ดังนี้ Paneidae , Pandalidae , Crangonidae และ Palaemonidae ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าดังนี้คือ กุ้งโอคัก (Pink shrimp) , กุ้งแชบ๊วย (White shrimp) , กุ้งกุลาดำ (Tiger prawn) , กุ้งลายแดง (Flower prawn) , กุ้งหิน (King or sakura prawn) และกุ้งทราย (Sand shrimp) ที่เป็นกุ้งเลี้ยงคือ กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย (กุ้งขาวหรือกุ้งวัง) และกุ้งก้ามกราม

รูปแบบที่ใช้ในการส่งออกมี 2 ลักษณะด้วยกันคือ

- Block frozen เป็นการแช่แข็งรวมกันหลายชิ้นในกล่องเดียวกัน
- Individual frozen เป็นการแช่แข็งเป็นตัว ๆ หรือชิ้นเดียว

กุ้งแช่เยือกแข็งแบ่งตามลักษณะการผลิตได้ดังนี้คือ

- Whole shrimp เป็นกุ้งทั้งตัว ทำจากกุ้งที่มีความสดมาก คุณภาพดี ไม่มีจุดสีดำ ที่หัว หรือที่เปลือก
- Headless shrimp เป็นกุ้งหักหัวออกแล้ว
- Peel tail – on (PTO) หรือ cutlet เป็นกุ้งแกะเปลือกแต่ไว้หาง
- PTO – deveined คือกุ้ง PTO ที่มีการผ่าหลังเอาไส้ออก
- Butterfly เป็นกุ้งหักหัว แกะเปลือก และมีการผ่าหลังลึกลงไปจนเกือบถึงด้านท้องจนแผ่กางออกได้ นิยมใช้กุ้งโดคักและกุ้งทราย
- RPUD เป็นกุ้งหักหัว แกะเปลือก ไม่มีหาง

- RPD เหมือนชนิด RPUD แต่ผ่าเอาไส้ออก
- PC เป็นกุ้งหักหัว แกะเปลือก และลวกสุก
- CP หรือ CPC มีการลวกก่อนแกะเปลือกหรือมีการลวกอีกครั้งหลังแกะเปลือก
- กุ้งบั้ง (Kelemate)

2.6 การเตรียมการผลิตกุ้งแช่แข็ง

มยุรี จัยวัฒน์ (2532) ได้อธิบายขั้นตอนการทำการแช่แข็งไว้ดังต่อไปนี้

2.6.1 การรับวัตถุดิบ (Receiving) ผู้ผลิตอาจรับวัตถุดิบจากชาวประมงหรือสะพานปลา นำมาส่งให้กับบริษัทในสภาพกุ้งทั้งตัว (ถ้าสดมาก) หรือเด็ดหัวแล้ว (ในกรณีที่ต้องการป้องกันการเกิดจุดสีดำบนตัวกุ้ง) หลังจากรับวัตถุดิบจะมีการล้างด้วยน้ำที่ผ่านการเติมคลอรีน 3 – 5 ส่วนในล้านส่วน (ppm) และทำให้เย็นลงประมาณ 10 °C

2.6.2 การเตรียมการ (Preparation) มีการคัดเลือกพวกที่เสียทิ้งหรือแยกตามคุณภาพหรือการคัดเกรดในกรณีที่วัตถุดิบไม่มีความสม่ำเสมอกัน นอกจากนั้นมีการคัดตามขนาดต่าง ๆ หลังจากนั้นอาจมีการเด็ดหัว แกะเปลือก ผ่าหลังเอาไส้ออก ทำให้สุกและอื่น ๆ ตามชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ แล้วทำความสะอาดอีกครั้งหนึ่งโดยการล้างด้วยน้ำเย็นที่ผ่านการเติมคลอรีนแล้ว

2.6.3 การบรรจุ (Packing) มีการบรรจุตามน้ำหนักที่ต้องการเช่นขนาด 1 ปอนด์, 1 กิโลกรัม, 1.8 กิโลกรัม, 5 ปอนด์ และ2 กิโลกรัม เป็นต้น การชั่งน้ำหนักเพื่อการบรรจุ นิยมชั่งให้เกินไว้ประมาณร้อยละ 5 –10 ของน้ำหนักเพื่อให้ได้น้ำหนักสุทธิหลังการละลายน้ำแข็งออก (Thawing) ที่ถูกต้อง ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการเก็บในห้องเย็นจะมีการระเหยของน้ำทำให้สูญเสียน้ำหนักส่วนหนึ่งไป ในขั้นตอนนี้อาจมีการใช้วัตถุเจือปนเพื่อวัตถุประสงค์บางอย่างได้ เช่น การเติมเกลือ การเติมหรือแช่ในสารละลายฟอสเฟตเพื่อช่วยรักษาน้ำหนัก (Yield) และคุณภาพของเนื้อสัมผัส (Texture) ในปริมาณที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้กำหนดไว้

2.6.4 การแช่เยือกแข็ง (Freezing) อาจใช้ระบบ Air blast ที่อุณหภูมิ – 40 °C ใช้เวลาประมาณ 6 – 10 ชั่วโมงหรือระบบ Contact freezing โดยใช้เวลาประมาณ 3 – 4 ชั่วโมง หรือระบบ Quick freezing โดยใช้เวลาไม่เกิน 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง

2.6.5 การบรรจุหีบห่อ (Packaging) หลังการแช่แข็งแล้ว มีการบรรจุผลิตภัณฑ์ในถุงพลาสติก กล่องกระดาษ (Inner carton) และกล่องกระดาษแข็งหรือกล่องลูกฟูก (Master carton)

2.6.6 การเก็บในห้องเย็น (Cold storage) ควรเก็บในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า – 20 $^{\circ}$C โดยหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิให้มากที่สุดและหากจะใช้ห้องเย็น ระบบมีพัดลมควรควบคุมให้มีความเร็วของลมต่ำ เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาที่เก็บ ยิ่งระยะเวลาการเก็บนานเท่าใด ก็จะมีการสูญเสียน้ำมากขึ้น

2.7 มาตรฐานสุขลักษณะกุ้งแช่แข็ง

สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม (2529) ได้กำหนดมาตรฐานของกุ้งแช่แข็งไว้ดังนี้

2.7.1ในกรณีที่เป็นกุ้งดิบ

- จุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count) ต้องไม่เกิน 1 x 10^{7} โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และจะมีจุลินทรีย์เกิน 1 x 10^{6} โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง

- เอสเคอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) ค่า MPN ต้องไม่เกิน 4 x 10^{2} ต่อตัวอย่าง 1 กรัมและจะมีค่า MPN เกิน 4 ต่อตัวอย่าง 1 กรัมได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง

- สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ต้องไม่เกิน 5 x 10^{3} โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมและจะมีจำนวนไม่เกิน 1 x 10^{3} โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง

- ซาลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม

2.7.2 ในกรณีที่เป็นกุ้งสุกและกุ้งกึ่งสุก

- จุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count) ต้องไม่เกิน 1 x 10^{6} โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และจะมีจุลินทรีย์เกิน 1 x 10^{5} โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ไม่เกิน 2 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง

- เอสเคอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) ค่า MPN ต้องไม่เกิน 1 x 10^{2} ต่อตัวอย่าง 1 กรัมและจะมีค่า MPN เกิน 4 ต่อตัวอย่าง 1 กรัมได้ไม่เกิน 2 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง

- สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) ต้องไม่เกิน 5 x 10^{3} โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมและจะมีจำนวนไม่เกิน 5 x 10^{2} โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ไม่เกิน 2 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง

- ซาลโมเนลลา (Salmonella) ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม

2.8 การเก็บรักษา

การใช้อุณหภูมิต่ำในการถนอมอาหารเป็นการทำให้ปฏิกิริยาทางเคมีและปฏิกิริยาจากเอนไซม์ของอาหารดำเนินไปอย่างช้า ๆ หรือหยุดการทำงาน พบว่าแบคทีเรีย ยีสต์ และราบางชนิดสามารถเจริญได้อย่างช้าๆที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ดังนั้นที่อุณหภูมิ 0 °C หรือที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 °C จึงไม่สามารถป้องกันการเน่าเสียของอาหารได้ การเก็บรักษาอาหารไว้ที่อุณหภูมิต่ำนั้นทำได้หลายแบบซึ่งแตกต่างกันที่ระดับของอุณหภูมิที่ใช้ ดังนี้

2.8.1 **การเก็บแบบแช่เย็น** หมายถึง การเก็บแบบใช้อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่าจุดเยือกแข็งก็ได้ แต่มักจะหมายถึงการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 °C

2.8.2 **การเก็บแบบแช่แข็ง** หมายถึง การเก็บรักษาอาหารไว้ในสภาพเป็นน้ำแข็ง ซึ่งจะสามารถเก็บอาหารไว้ได้นานเป็นปีในห้องเย็น แต่การที่จะใช้อุณหภูมิเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร การถนอมอาหารในสภาพแช่แข็งได้มีการนำมาใช้เป็นเวลานานแล้ว และได้มีการพัฒนาเครื่องมือในการทำให้เย็นและกระบวนการในการแช่แข็งอย่างเร็ว (Quick freezing process) ทำให้อุตสาหกรรมห้องเย็นเจริญก้าวหน้าไปได้อย่างรวดเร็ว แม้แต่ตามครัวเรือนก็นิยมนำวิธีการแช่แข็งอาหารมาใช้กัน ในสภาพการเก็บแบบแช่แข็งจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้เต็มที่และการทำงานของเอนไซม์ต่างๆก็ถูกรบกวน ถ้าอุณหภูมิในการเก็บยิ่งต่ำ ปฏิกิริยาทางเคมีหรือการทำงานของเอนไซม์ก็ยิ่งช้าลงแต่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บอาหารในปัจจุบันปฏิกิริยาเหล่านี้จะยังดำเนินต่อไปได้อย่างช้าๆ ดังนั้นจึงนิยมลวกอาหารก่อนที่จะนำมาเก็บแบบแช่แข็ง(Fennema, 1975)

2.9 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับอาหารระหว่างการเก็บ (Frozen storage)

อาหารที่ผ่านการแช่แข็ง เมื่อนำมาเก็บในสภาพเยือกแข็ง (Frozen storage) อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้หลายลักษณะดังนี้ (Robinson, 1985)

- การเปลี่ยนแปลงของลักษณะปรากฏ ของอาหารแช่แข็งที่เก็บเป็นเวลานาน
- การเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางอาหาร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณค่าทางอาหารเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Jansen, 1969)
- Oxidation of lipids oxidative deteriorations ของไขมัน
- การเปลี่ยนแปลงอันเกิดจาก Thaw Exudates จากเนื้อเยื่ออาหาร
- ในขณะที่อาหารถูกเก็บไว้ในสภาพแช่แข็ง ปฏิกิริยาทางเคมีและเอนไซม์เกิดขึ้นอย่างช้าๆ

2.10 การปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่แข็ง

Salmonella spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคต่อคนที่บริโภคอาหารที่มีเชื้อนี้เข้าไป จะทำให้เกิดอาการท้องเสีย อุจจาระร่วง เป็นไข้ คลื่นเหียน อาเจียน ทั้งนี้ความรุนแรงของอาการขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ที่รับเข้าไป *Salmonella* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ถูกกำหนดให้ต้องตรวจไม่พบในมาตรฐานคุณภาพของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่แข็งของประเทศผู้นำเข้าต่าง ๆ ซึ่งหากมีการตรวจพบในผลิตภัณฑ์ สินค้าดังกล่าวจะถูกปฏิเสธการนำเข้าจากต่างประเทศทันที สำหรับสำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศผู้นำในการส่งออกสินค้าสัตว์น้ำทะเลไปยังหลาย ๆ ประเทศ มีมูลค่าการส่งออกปีละไม่ต่ำกว่า 130,000 ล้านบาท ปัจจุบันก็ยังคงมีการตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแซลโมแนลล่าในผลิตภัณฑ์เป็นระยะ ๆ (สุวิมล กีรติวิริยาภรณ์ และ ศันสนีย์ ศรีจันทร์งาม, 2543) สำหรับการส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่แข็งในระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2539 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2540 พบว่ามีการปนเปื้อนร้อยละ 1.74 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่สุ่มตรวจ (91ใน 5,219 ตัวอย่าง) (ศิริลักษณ์ สุวรรณรังษี และ กนกพรรณ ศรีมโนภาษ,2541)

3. การเจริญของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ

อาหาร พืชและสัตว์ตามธรรมชาติแทบทุกชนิดจะมีจุลินทรีย์ติดมาด้วยไม่มากก็น้อย ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ซึ่งเพียงแต่สิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเท่านั้นก็จะสามารถทำให้อาหารเสียได้ จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ติดมาในอาหารจะมีอุณหภูมิเหมาะสมในการเจริญและอุณหภูมิขั้นต่ำสำหรับการเจริญต่างกัน ถ้าอุณหภูมิในอาหารต่ำกว่าอุณหภูมิขั้นต่ำที่จะเจริญได้แล้วจุลินทรีย์จะไม่เพิ่มจำนวน หรือถ้าอุณหภูมิในอาหารต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมก็จะทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ช้าลงและจะช้าที่สุด ที่อุณหภูมิขั้นต่ำของการเจริญความเย็นจะช่วยป้องกันการเจริญและชลอกิจกรรมเกี่ยวกับเมตาโบลิซึ่มของจุลินทรีย์ ดังนั้นการทำให้อาหารเย็นกว่าปกติจะมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ติดมากับอาหารต่างๆ กัน ถ้าลดอุณหภูมิในอาหารให้ต่ำถึง 10°C อาจทำให้ จุลินทรีย์บางชนิดไม่เจริญ และบางชนิดเจริญได้ช้าลง ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 10°C จุลินทรีย์ที่เจริญไม่ได้ก็จะมีมากขึ้นและจุลินทรีย์ที่ยังคงเจริญได้แต่ช้าก็จะน้อยลง ดังนั้นในการเก็บอาหารในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันจะเป็นผลต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้อาหารเสีย การเจริญและปฏิกิริยาในเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับเอนไซม์และอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์ก็ขึ้นกับอุณหภูมิ ดังนั้นผลที่เกิดจากการลดอุณหภูมิก็คืออัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะลดลง โดยทั่ว ๆไปการแช่แข็ง (Freezing) จะป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารได้ และการแช่เย็น (Refrigeration) จะทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ต่ำลง การทำให้อาหารมีอุณหภูมิไม่เกิน 5 – 6 องศาเซลเซียส ก็เพียงพอที่จะทำให้การเจริญของ

จุลินทรีย์ต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษซ้าลงได้ ยกเว้น *Clostridium botulinum* type E มีรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิที่ต่ำที่สำคัญได้แก่ รา เช่น Cladosporium กับ Sporotrichum พบว่าเจริญได้ในอาหารที่มีอุณหภูมิ – 6.7 °C และ Penicillium กับ Monilia เจริญที่อุณหภูมิ – 4 °C ยีสต์บางชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิ – 34 °C และบางชนิดเจริญได้ที่ -18 °C สำหรับแบคทีเรียมีรายงานว่าเจริญได้ที่อุณหภูมิ – 5 °C ในเนื้อสด ที่อุณหภูมิ –10 °C ในไอศกรีม ยีสต์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ – 5 °C ในเนื้อสด และที่ – 17.8 °C ในหอยนางรม และราเจริญได้ที่ – 7.8 °C ในเนื้อสดและผักต่างๆ และที่ – 6.7 °C ในเบอร์รี (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538)

4. ผลของการใช้ความเย็นต่อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จากการรวบรวมของ Robinson ในปี ค.ศ. 1985 เขาได้กล่าวถึงผลของการแช่แข็งที่มีผลค่อการตายและบาดเจ็บของจุลินทรีย์ต่างๆดังนี้คือ การทำให้เซลล์เย็นถึง 0 องศาเซลเซียส, การทำให้เย็นจะดำเนินต่อไปจนเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายนอกและภายในเซลล์, ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่อยู่ทั้งภายนอกและภายในเซลล์, การเก็บเซลล์ไว้ในสภาพแช่แข็งและการละลายของจุลินทรีย์และสับสเตรทการแช่แข็งมักจะลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ในอาหารและจากการที่จำนวนของจุลินทรีย์ลดลงนี้อาจเนื่องมาจากผลของลีธาล (Lethal effect) หรือสับลีธาล (Sub lethal effect) ก็ได้

4.1 ผลของลีธาล เซลล์หลายเซลล์อาจถูกฆ่าตายได้โดยการแช่แข็ง แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อในอาหารได้ทั้งหมด การแช่แข็งหรือการเก็บในสภาพแช่แข็งนี้เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ ซึ่งมักจะใช้ไนโตรเจนเหลว ผลของลีธาลนั้นเป็นผลจากการที่โปรตีนหรือเอนไซม์ที่จำเป็นในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ความเข้มข้นของตัวถูกละลายเพิ่มขึ้นจากเดิมก่อนแช่แข็งหรือสภาพทางกายภาพเกิดความเสียหาย เนื่องจากผลึกน้ำแข็ง การให้ความเย็นกับเซลล์อย่างรวดเร็วจากอุณหภูมิที่เหมาะสมจนถึง 0 °C ก็อาจทำให้เซลล์ตายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกเทอร์โมฟายล์และมีโซฟายล์ เรียกว่าการช๊อคด้วยความเย็น(Cold shock) และคงมีความเกี่ยวข้องกับไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการรั่วหรือไปทำให้การปล่อยสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ (Robinson, 1985)

4.2 ผลของสับลีธาล การแสดงจำนวนของจุลินทรีย์ในอาหารแช่แข็งนั้นพบว่าจำนวนของจุลินทรีย์ที่ลดลงนั้นอาจจะไม่ใช่จุลินทรีย์ที่ตายแล้วทั้งหมด แต่จะมีบางเซลล์เกิดความเสียหายบางส่วนจนไม่สามารถที่จะเจริญให้เห็นได้เท่านั้น แต่ถ้าทิ้งระยะเวลาให้

นานพอสมควร ให้มีการซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย หรือมีการเติมสารอาหารบางอย่างให้เซลล์ก็อาจจะเจริญต่อไปได้ (Robinson, 1985)

5. การตอบสนองต่อการแช่แข็งของจุลินทรีย์

ปัจจัยตัวที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นปัจจัยที่เกิดขึ้นในขณะแช่แข็งและบางครั้งจะเป็นตัวกำหนดว่าเหตุใดจุลินทรีย์บางชนิดจึงตาย บางชนิดไม่ตาย และบางชนิดเกิดอาการบาดเจ็บ แต่ไม่ตาย(มาลัย บุญรัตนกรกิจ, 2540)

5.1 ชนิดและระยะการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้านทานต่อการแช่แข็งได้ไม่เท่ากัน ระยะการเจริญต่างกันหรือเซลล์เวทเจทเตตีฟกับสปอร์ก็เช่นเดียวกัน Robinson ในปี ค. ศ.1985 ได้ทดสอบความไวของจุลินทรีย์ต่อการแช่แข็ง ทำให้สามารถแบ่งจุลินทรีย์ออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ

- พวกที่มีความไว ได้แก่ พวกเซลล์เวทเจทเตตีฟของยีสต์และรา รวมทั้งแบคทีเรียแกรมลบ
- พวกที่ทนทานได้ปานกลาง ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบกลุ่มต่างๆ รวมทั้ง staphylococci และ enterococci
- พวกที่ทนทานมาก ได้แก่ แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ เช่น เอนโดสปอร์ทั้งของ bacillus และ clostridium ทนทานต่อการแช่แข็งได้อย่างดี

5.2 ระยะเวลาในการเก็บอาหารแช่แข็ง การทำลายจุลินทรีย์ ในขณะแช่แข็งจะเป็นไปได้เร็วในตอนแรก และจุลินทรีย์จะค่อยๆ ลดจำนวนลงเมื่อเก็บไว้ในสภาพแช่แข็งนานขึ้น

5.3 ชนิดของอาหาร ส่วนประกอบของอาหารจะมีอิทธิพลต่ออัตราการตายของจุลินทรีย์ในขณะแช่แข็งและขณะเก็บ อาหารที่มีน้ำตาล เกลือ โปรตีน คอลลอยด์และไขมันอาจสามารถป้องกันจุลินทรีย์จากการแช่แข็งได้ และตรงกันข้ามถ้าอาหารมีความชื้นสูง และมีค่า pH ต่ำจะช่วยให้การทำลายเป็นไปได้เร็วยิ่งขึ้น

5.4 อิทธิพลของการละลาย จุลินทรีย์จะตอบสนองต่ออัตราเร็วในการละลาย แตกต่างกันไป การทำให้อุ่นอย่างรวดเร็วพบว่าเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียบางชนิด

5.5 การแช่แข็งสลับกับการละลาย การแช่แข็งอาหารสลับกับการละลาย จะช่วยให้การทำลายจุลินทรีย์เป็นไปได้ง่ายขึ้น แต่ไม่นิยมกัน เนื่องจากทำให้คุณภาพของอาหารด้อยลง

5.6 ปัจจัยอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในขณะแช่แข็ง เช่น เมื่ออุณหภูมิยิ่งต่ำลงน้ำก็จะกลายเป็นน้ำแข็งมากขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของตัวถูกละลายต่างๆ ก็จะสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH ในเซลล์ โปรตีนต่างๆ เปลี่ยนแปลงไปความเข้มข้นของอีเลคโทรไลท์ต่างๆ เพิ่มขึ้น และเซลล์มีความหนืดมากขึ้น ผลึกน้ำแข็งจะเกิดขึ้นที่ด้านนอกเซลล์ และดึงน้ำออกจากเซลล์ซึ่งเป็นผลทำให้เซลล์และความเข้มข้นของสารละลายในเซลล์สูงขึ้น ผลึกน้ำแข็งที่เกิดในเซลล์จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์รั่ว

6. ผลของกระบวนการแช่แข็งต่อการตายและบาดเจ็บของจุลินทรีย์

ในปัจจุบันนี้การเก็บรักษาอาหารด้วยการแช่แข็งเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากวิธีนี้สามารถรักษากลิ่น รส สี และคุณค่าทางอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเลือกใช้อัตราการแช่แข็ง สภาวะในการเก็บ และกระบวนการแช่แข็งที่เหมาะสมในแต่ละผลิตภัณฑ์ (รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2535) แต่กระบวนการแช่แข็งสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารได้ นอกจากนั้นยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์ได้รับบาดเจ็บ Lowry and Gill (1984) ได้รวบรวมรายงาน และสรุปว่ามี 5 ปัจจัยที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ขณะแช่แข็ง คือ การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว การเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ ความเข้มข้นของIntracellular solutes การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ และ ความเข้มข้นของ Extracellular solutes ซึ่งสองปัจจัยสุดท้ายเป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์เพราะทั้งสองปัจจัยนี้ทำให้เซลล์จุลินทรีย์มีการสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์ ความเข้มข้นของสารภายในเซลล์จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง pH รวมทั้งทำให้activity และการทำงานของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลทำให้การยอมให้สารผ่านเข้าออกผนังเซลล์จุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงและจุลินทรีย์ไม่สามารถทนต่อสารเคมีใน Selective media นอกจากการแช่แข็งจะมีผลต่อการบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์แล้ว ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาและการละลายน้ำแข็งก็มีผลต่อการบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์เช่นกัน เนื่องจากถ้าเก็บอาหารแช่แข็งเป็นระยะเวลานาน อาจจะมีผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์และการทำละลายน้ำแข็งโดยใช้อัตราเร็วต่ำๆ จะทำให้มีการเกิดผลึกใหม่ (Recrystalization) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์จุลินทรีย์บาดเจ็บ (Fennema, 1973) ในปี 1966 Mazur ได้เปรียบผลของกระบวนการแช่แข็งต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อการแช่แข็งมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และCalcott (1978)ได้ศึกษาพบว่าอัตราเร็วในการแช่แข็งมีผลต่อการตายและการบาดเจ็บของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอัตราเร็วในการแช่แข็งตั้งแต่ 3 $^{\circ}$ C ต่อนาทีขึ้นไป มีผลทำให้เกิด intracellular ice ของเซลล์จุลินทรีย์ได้มาก นอกจากนั้น Ingram และ Mackey (1976)ได้ศึกษาพบว่าแบคทีเรียแกรมลบ

ตัวอย่างเช่น *Escherichia* ,*Salmonella* ,*Serratia* , *Pseudomonas* , *Acinetobactobacter* , *Moraxxella* และ *Vibrio* จะเป็นเชื้อที่มีความไวทั้งต่อการแช่แข็งและการเก็บในสภาวะแช่แข็ง ในปี 1966 Mazur ได้เปรียบผลของกระบวนการแช่แข็งต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อการแช่แข็งมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

การบาดเจ็บของจุลินทรีย์มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารโดยเฉพาะซาลโมเนลล่าที่ไม่ควรมีในผลิตภัณฑ์อาหารทุกชนิด ถ้าเกิดความผิดพลาดในการตรวจวิเคราะห์อาจส่งผลให้เกิดความเสียหายทั้งทางด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและส่งผลกระทบต่อความเสียหายทางเศรษฐกิจในแง่ของการส่งออกอาหารแช่แข็ง โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่เป็นสินค้าที่ทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการศึกษาถึงผลกระทบของกระบวนการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของซาลโมเนลล่าที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งกุ้งกุลาดำ รวมทั้งปรับปรุงวิธีการตรวจวิเคราะห์ซาลโมเนลล่าให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นคือสามารถทำให้ซาลโมเนลล่าที่ได้รับการบาดเจ็บจากกระบวนการแช่แข็งอาหาร สามารถฟื้นตัวขึ้นอย่างรวดเร็วในขณะทำการตรวจเชื้อที่ปนเปื้อนมากับอาหารได้ จะทำให้การตรวจวิเคราะห์ซาลโมเนลล่าในกุ้งกุลาดำแช่แข็งมีความแม่นยำและประสิทธิภาพสูงขึ้น

7. *Salmonella* spp.

7.1สัณฐานวิทยา

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีลักษณะเป็นรูปแท่ง (Rod shape) มีขนาด 0.6 x 1 – 3 ไมโครเมตร แหล่งที่พบเชื้อจะพบได้ตามปกติในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์หลายชนิด สามารถพบได้ตามธรรมชาติทั่วไป ในดิน น้ำ และสิ่งปฏิกูลต่างๆ ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีแคปซูล แต่ทนต่อสภาพแห้งแล้งและเย็นจัด อยู่รอดได้นานในขณะขาดอาหาร พบ *Salmonella* spp. อยู่รอดในดินได้นานถึง 200 วัน ในฝุ่นนาน 10 เดือน อุจจาระของสัตว์ฟันแทะนาน 5 เดือน และในฟองไข่ที่แห้งได้นานกว่า 4 ปี นอกจากนั้นยังสามารถเคลื่อนที่โดยใช้ flagella ที่ยาวซึ่งอยู่รอบเซลล์ (Peritrichous flagella) ยกเว้น *S. pullorum* ,*S. gallinarum* และบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ยกเว้น *S. paratyph*i A , *S. choleraesuis* C และสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้เป็นจำนวนมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI agar เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ในอาหารชนิดนี้จะให้โคโลนีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 – 4 มิลลิเมตรขอบเรียบผิวมัน ไม่มีสี และสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่ว ๆ ไป อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้จะอยู่ในช่วง 7 – 46 °C (อรษา สุตเธียรกุล, 2541) สำหรับอุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ 42 °C เจริญได้ในช่วง pH 4.5 – 9.0 และ aw อยู่ในช่วง

0.93 – 0.99 ไม่ทนต่อความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 1 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 15 – 20 นาที หรือที่อุณหภูมิ 62 °C นาน 4 นาที *S. senftenberg* เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ถึง 10 – 20 เท่าโดยต้องให้ความร้อนถึง 62 °C นาน 1 ชั่วโมง การใช้ความเย็นหรืออุณหภูมิที่ต่ำไม่สามารถทำลาย *Salmonella* spp. แต่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้น *Salmonella* spp. จะหยุดการเจริญเมื่อช่วงความเป็นกรดด่างสูงกว่า 9.0หรือต่ำกว่า 4.0 ส่วนอุณหภูมิต่ำกว่า 5 °C หรือสูงกว่า 44 - 47 °C จะยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. บางชนิดได้ นอกจากนี้ยังสามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ดี เช่น ภาวะอุณหภูมิแช่แข็ง แต่เชื้อไม่สามารถทวีจำนวนได้ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิหรือนำอาหารมาไว้อุณหภูมิห้องหลังจากเก็บในอุณหภูมิต่ำนาน ๆ จะทำให้เชื้อเพิ่มอย่างรวดเร็ว *Salmonella* spp.สามารถทนต่อสารเคมีบางชนิด เช่นบิลเลียนกรีน โซเดียมเตตราไธโอเนต และโซเดียมดีออกซีคลอเรท ซึ่งสารเคมีเหล่านี้ใช้ทำลายโคลิฟอร์มแบคทีเรียและยังถูกทำลายได้ด้วยสารเคมีต่าง ๆเช่น ฟีนอล เมอคิวริคลอไรด์และฟอร์มาลดีไฮด์ ส่วนคลอรีนและโปรแตสเซียมเปอร์มังกาเนตใช้ทำลายเชื้อได้แต่ใช้เวลานาน (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2541)

7.2 **ลักษณะทางชีวเคมี**

Biochemical characteristics (D /d = varies by SPECIES / strain, + = positive, - = negative)

Catalase	+	Dulcitol	D	M.R.	+
Oxidase	-	Inositol	d	V.P.	-
β - Galactosidase	D	Lactose	D	Nitrate reduction	+
Gas from glucose	+	Citrate	+	Arginine	+
KCN (growth on)	D	Maltose	+	Gelatine	D
Mucate (acid)	D	Gluconate	-	H_2S	+
Adonitol	-	Malonate	D	Indole	-
Arabinose	+	d – tartrate	D	Xylose	+
Lysine decarboxylase	+	Ornithin	+	Urea hydrolysis	-
Manitol	+	Salicin	-	Sorbitol	+
Sucrose	-	Arabinose	+	Trehalose	+
d- Tartrate	D	Indole	-	Xylose	+

(Refai, 1980)

7.3 ลักษณะทางเซรุ่มวิทยา (Serology) (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2541)

ลักษณะทางแอนติเจนที่สำคัญของ *Salmonella* ที่ใช้ในการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา มี 3 ชนิดดังนี้

- โอ แอนติเจน หรือโซมาติก แอนติเจน (O or somatic antigen) เป็นแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ประกอบด้วยสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และฟอสโฟไลปิด มีคุณสมบัติคือสามารถทนต่อความร้อนที่ 100 °C ได้นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที ทนต่อเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 % มีความคงทนต่อกรดเจือจาง

- เอช หรือ แฟลกเจลลา แอนติเจน (H or flagella antigen) เป็นส่วนประกอบของสารประเภทโปรตีน มีคุณสมบัติคือถูกทำลายได้ด้วยความร้อนอุณหภูมิ 60 °C และถูกทำลายได้ด้วยกรดและแอลกอฮอล์

- วีไอ แอนติเจน (Vi antigen) เป็นแอนติเจนที่คลุมอยู่รอบนอก โอ แอนติเจน คุณสมบัติของแอนติเจนชนิดนี้คือจะถูกทำลายได้เมื่อได้รับความร้อน กรด หรือ ฟีนอล โดยปกติเชื้อที่มี วีไอ แอนติเจน จะก่อให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรง

7.4 การก่อโรค (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2542)

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียใน Familly Enterobacteriaceaeซึ่งแบคทีเรียในตระกูลนี้เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคกับคนได้บ่อย นักวิชาการได้จัดกลุ่มอยู่ในพวกที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร (Enteropathogen) ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ หนาวสั่น อุจจาระร่วง ในรายที่มีอัตราการเสี่ยงสูง เช่น เด็กเล็ก ผู้สูงอายุ อาจเกิดภาวะแบคทีรีเมียได้ ได้กล่าวถึง ปริมาณเชื้อที่สามารถทำให้คนเกิดโรคได้อยู่ในระหว่าง 3-5 เซลล์ ต่อกรัมของอาหารดังนั้นจะเห็นได้ว่า ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อนี้สูงมาก (Highly Pathogen) เชื้อตัวนี้ในทุกๆสายพันธ์ สามารถทำให้คนและสัตว์เกิดโรคได้ ถึงแม้ว่า โรคติดเชื้อซัลโมเนลลาแต่ละสายพันธ์อาจมีชื่อเรียกเฉพาะ เช่นโรคไทฟอยด์ ในคน มีสาเหตุมาจาก*S. typhi* โรคพาราไทฟอยด์ ในคน มีสาเหตุมาจาก *S. paratyphi*, *S. pullorum* ทำให้เกิดโรค อุจจาระขาว (Pullorum disease หรือ Bacillary disease) ในสัตว์ปีก โรคไทฟอยด์ในไก่ เกิดจากเชื้อ *S. gallinarum* ส่วนโรคติดเชื้อซาลโมเนลลาในสายพันธ์อื่นอาจเรียกกว้างๆว่า โรคติดเชื้อซาลโมเนลลา(Salmonellosis)นอกเหนือไปจากที่มันทำให้เกิดโรคติดเชื้อในคนและสัตว์แล้ว มันยังมีความสำคัญในแง่สุขศาสตร์ จากการที่มันปนเปื้อนมากับน้ำและอาหาร และยังอยู่ในกลุ่มของโรคสัตว์ติดคน (Zoonosis) อาการของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* spp. สามารถจำแนกออกเป็น 3 แบบคือ

- Enteric fever ได้แก่โรคไข้ไทฟอยด์(Typhoid fever)และพาราไทฟอยด์ (Paratyphoid fever) เชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์คือ*S. typh*i ส่วนเชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้พาราไทฟอยด์คือ *S. paratyphi*

- Gastroenteritis เชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนมากจะทำให้เกิดอาการแบบที่ 2 นี้ โดยเชื้อติดเข้าไปกับอาหารประเภท เนื้อสัตว์ ไข่ นม หรือสิ่งอื่น ๆ ผู้ป่วยจะได้รับเชื้อจากอาหารที่รับประทานเข้าไป เชื้อที่ได้รับจะแทรกเข้าไปอยู่ในเยื่อบุลำไส้ใหญ่และลำไส้เล็กส่วนกลาง

- Septicemia เชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตโดยตรงสามารถตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิตโดยไม่มีอาการของโรคอุจจาระร่วง ผู้ป่วยจะมีไข้สูงเป็นระยะ ๆ ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เซื่องซึม เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคคือ *S. choleraesuis*

(นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2542)

7.5 การตรวจหาเชื้อซาลโมเนลล่า (Detection of *Salmonella* spp.) (BAM,1999)

Salmonella spp. ทุกชนิดเป็นอันตรายต่อคน การถ่ายทอดเชื้อสู่คนจะต้องเข้าทางปากเท่านั้น การตรวจหาเชื้อในอาหารจึงมีความสำคัญมาก วิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอนดังนี้

- **การเตรียมตัวอย่างอาหาร (Preparation of sample)** การเลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมเป็นวิธีที่ละเลยไม่ได้เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ไม่ผิดพลาด ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่างจะแตกต่างกันตามชนิดของตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างทุกขั้นตอนต้องปราศจากเชื้อ การวิเคราะห์ส่วนใหญ่จะใช้ตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว 225 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างกระจายไม่จับเป็นก้อน ปิดฝาขวดให้แน่นแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เขย่าและปรับ pH ให้ได้ประมาณ 6.8 $\pm$ 0.2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 $^{\circ}$C นาน 24 $\pm$ 2 ชั่วโมง

- **การส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโดยทั่วไป (Non – selective enrichment หรือ Pre – enrichment)** อาหารที่นำมาตรวจสอบอาจมี *Salmonella* spp. ในปริมาณน้อยมาก และเชื้ออาจจะอยู่ในสภาพที่บาดเจ็บ จากการแปรรูป หรือ การเก็บรักษาอาหาร เช่น การผ่านการให้ความร้อน การทำแห้ง การฉายรังสี การแช่แข็ง การปรับ pH ของอาหารให้เป็นกรด ทำให้*Salmonella* spp. บาดเจ็บได้ จึงจำเป็นที่จะต้องปรับสภาวะให้เชื้ออยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ก่อน อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมี Lactose broth, Buffered peptone water, Nutrient broth, Trypticase soy broth ตัวอย่างอาหารบางชนิดเช่น ยีสต์แห้ง (Dried yeast) ใช้วิธีผสมน้ำกลั่น นมผงพร่องมันเนยใช้วิธีผสมกับน้ำ

กลั่นที่มี Brilliant green dye ลูกกวาดใช้วิธีละลายในน้ำนมพร่องมันเนยที่มี Brilliant green dye กรณีที่ตัวอย่างอาหารไขมันสูงควรเติม Terigol anionic 7เพื่อช่วยให้ไขมันกระจายตัว

- **การส่งเสริมการเจริญเฉพาะ *Salmonella* spp. (Enrichment)** เป็นการปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของ *Salmonella* spp. แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น เช่น Coliform Proteus Pseudomonase ซึ่งอาจจะมีอยู่จำนวนมากในตัวอย่างอาหาร อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Salmonella* spp.ในขั้นตอนนี้คือSelenite cystine broth และTetrathionate brilliant green broth โดยบ่มเชื้อไว้ที่ อุณหภูมิ 43 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ *Salmonella* spp. เจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

- **การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเพื่อแยก *Salmonella* spp. ออกจากแบคทีเรียอื่น** โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella* spp. แล้วออกแบบอาหารเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม อาจจะมีสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นและมีการเติมสีที่เปลี่ยนแปลงตามคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Salmonella* spp. อาหารเพาะเลี้ยงแบบนี้เรียกว่า อาหารเฉพาะ (Differential medium) ควรใช้ Bismuth sulfite agar และ Brilliant green agar ร่วมกับอาหารชนิดอื่น เช่น Brilliant green sulfadiazine agar, Brilliant green Mac conkey agar, Desoxycholate citrate agar หรือ Salmonella –Shigella agar หรืออาหารเฉพาะอื่นๆ

- **การทดสอบทางชีวเคมี** แบคทีเรียหลายชนิด ยังคงเจริญในอาหารเพาะเลี้ยง ในขั้นตอนที่ 4 และแสดงลักษณะเหมือนกับ *Salmonella* spp. การทดสอบเชื้อทางชีวเคมีเพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อที่พบเป็น *Salmonella* spp. จริงหรือไม่ การทดสอบที่ใช้มีการเจริญใน Triple sugar iron agar (TSI) และ Lysine iron agar (LIA) เมื่อ *Salmonella* spp. เจริญบนอาหาร TSI บริเวณผิวเอียงจะสีแดงเนื่องจากเป็นด่าง และบริเวณด้านก้นหลอดมีสีเหลืองเพราะเกิดกรด อาจมีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือไม่มีก็ได้ ถ้าเชื้อสร้างจะเกิดสีดำในอาหาร เมื่อ *Salmonella* spp. เจริญบนอาหาร LIA จะมีสีม่วงทั้งหมด เพราะเกิดสภาวะเป็นด่าง อาจมีหรือไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

- **การทดสอบทางซีโรโลยี และการทดสอบกับฟาจ** เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อที่แยกได้คือ*Salmonella* spp. จริงหรือไม่ และถ้าใช่คือ *Salmonella* spp. ชนิดใดจึงจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบการเป็นแอนติเจนของเซลล์ และแฟลกเจลลา โดยทดสอบกับโพลีวาเลนท์ โอ และโพลีวาเลนท์ เอช แอนตีซีรา สำหรับการทดสอบฟาจ เป็นการจัดจำแนกที่มีความจำเพาะระดับสูงมาก เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อที่ได้คือ *Salmonella* spp. กลุ่มใด ซึ่งมีประโยชน์ต่อการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา เพราะเชื้อที่มีความจำเพาะกับฟาจ

เป็นแบบเดียวกัน มักมีต้นกำเนิดมาจากแหล่งเดียวกัน ขณะที่เชื้อมีแอนติเจนชนิดเดียวกัน แต่มีความจำเพาะกับฟาจเป็นแบบต่างกัน

8. **การหาเปอร์เซ็นต์รอดตายของจุลินทรีย์และทำให้เชื้อฟื้นตัวจากการบาดเจ็บ**

Denilde (1998) ได้หาอัตราการรอดตายของเชื้อ *Vibrio cholerae* 01 หลังจากการที่เชื้อที่ปนเปื้อนบนอาหาร ได้ผ่านกระบวนการแช่แข็งพร้อมอาหารและหาอัตราการรอดตายของเชื้อหลังจากผ่านความร้อนพร้อมอาหาร ในการเตรียมอาหารตัวอย่างของทั้ง 2 กรณี จะต้องนำตัวอย่างมาผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อก่อน สำหรับในการทดลองนี้ได้เลือกการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน เพื่อต้องการจะกำจัด Microflora ที่ติดมากับอาหาร เพราะ Microflora ที่ติดมากับเชื้ออาจทำให้ปริมาณเชื้อที่เราต้องการวัดมีการผิดพลาดเกิดขึ้น ซึ่งอาจจะมีปริมาณมากกว่าปกติหรือมีปริมาณน้อยกว่าปกติ หลังจากนั้นก็จะนำเชื้อถ่ายที่รู้จำนวนแน่นอน ลงในตัวอย่างอาหาร แล้วบ่มในสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำให้เชื้อเจริญเติบโต เชื้อจะเจริญเติบโตอยู่บนผิวของอาหาร โดยขั้นตอนต่อจากนี้จะต้องควบคุมไม่ให้มีการปนเปื้อนของเชื้อเพิ่มไปในตัวอย่าง เพราะอาจจะทำให้ผลการทดลองผิดพลาด ทุกขั้นตอนจะต้องระวังเรื่องความสะอาดของเครื่องมือและความสะอาดของสารที่นำมาใช้ในการทดลอง ซึ่งสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อมาก่อน ขั้นตอนต่อไปคือนำตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างนั้นมาทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อ โดยในการทดลองนี้จะนำตัวอย่างมาทำการบด และ นำไปผสมกับอาหารที่ช่วยให้เชื้อฟื้นตัวและรอดตายกลับมามากที่สุด นั้นก็คืออาหารประเภท Pre- enrichment แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟื้นตัวและรอดตายของเชื้อ ซึ่งในขั้นตอนนี้จะต้องเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการฟื้นตัวและรอดตายของเชื้อ โดยอาหารจะต้องไม่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อในขณะที่ยังไม่ได้ตรวจนับจำนวน และการเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมโดยจะต้องคำนึงถึงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ หลังจากที่ได้ทำให้เชื้อฟื้นตัวและรอดตายกลับมาแล้ว ก็จะทำการทดลองต่อโดยนำไปนับจำนวนเชื้อที่รอดตายโดยการใช้วิธี Pour plate ผู้ทดลองจะข้ามขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อ เมื่อรู้ปริมาณเชื้อที่รอดตายมาแล้ว ก็นำไปคำนวณเพื่อหาอัตราการรอดตาย สำหรับการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลล่าโดยทั่วไปถ้าไม่คำนึงถึงจำนวนของเชื้อที่แน่นอนก็จะใช้วิธีการเหมือนกับที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น แต่สำหรับการทดลองที่ต้องการทราบจำนวนเชื้อที่แน่นอนจะต้องไม่ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อในขณะที่รอการทดสอบ ดังนั้นขั้นตอนใดที่มีผลทำให้เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้น ก็จะเป็นขั้นตอนที่ไม่นำมาใช้ในการทดลองนั้น ในกรณีของตรวจวัดปริมาณ *Salmonella* spp. ถ้าผู้ทำการทดลองต้องการทราบจำนวนเชื้อที่แน่นอน ก็จะทำการถ่ายเชื้อลงอาหารแข็งเพื่อนับจำนวนเชื้อหลังจากการผ่านขั้นตอนการ Pre – enrichment แทน

ที่จะต้องนำไปทำการเพิ่มจำนวนเชื้อโดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารประเภท Enrichment จากการทดลองของ อรุณ บ่างตระกูลนนท์และ นพรัตน์ หมานริม เรื่องการเปรียบเทียบ Pre – enrichment 4 ในการตรวจหาซัลโมเนลลาจากอาหาร โดยวิธี MSRV ปี 2542 พบว่าการใช้อาหาร NB เป็น Pre – enrichment ดีที่สุดเมื่อใช้คู่กับวิธี MSRV เมื่อเปรียบเทียบกับ BPW , LB , TSB แต่ถ้าคำนึงถึงซีโรวาร์ที่ได้นั้น BPW จะให้ซีโรวาร์ของเชื้อซาลโมเนลล่ามากที่สุดในการใช้ร่วมกับวิธี MSRV ดังนั้นในการทดลองที่จะหาปริมาณเชื้อที่แน่นอนในตัวอย่างอาหารจะต้องคำนึงถึงปัจจัยดังต่อไปนี้ เริ่มตั้งแต่ วิธีการกำจัด Microflora , วิธีการถ่ายเชื้อลงในตัวอย่าง , การนับจำนวนเชื้อที่แน่นอนทั้งก่อนที่จะผ่านกระบวนการแช่แข็งและหลังจากการผ่านการแช่แข็งแล้ว , การเลือกใช้อาหารที่ทำให้เชื้อที่บาดเจ็บรอดตายและทำให้เกิดการฟื้นตัวกลับมามากที่สุด , วิธีการนับจำนวนที่มีประสิทธิภาพดีพอ โดยเราจะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการบาดเจ็บของเชื้อว่ามีปัจจัยใด แล้วทำการควบคุมปัจจัยนั้นๆให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการทดลองได้ผลที่น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

9.การพัฒนาวิธีการตรวจ *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารได้ทั้งในคนและสัตว์ต่างๆ U.S. Centers for Disease Control (CDC) ได้รายงาน ว่าเป็นระยะเวลามากกว่า 20 ปีแล้วที่มีการระบาดของโรค Salmonellosisเพิ่มขึ้น ในปี 1983 – 1987 ได้มีรายงานว่า 57 % ของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ คือ ซาลโมเนลล่า นอกจากนั้นได้มีการประมาณความเสียหายที่เกิดจากการระบาดของโรค Salmonellosis ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวน 1,900,000 ราย พบว่าก่อให้เกิดความสูญเสียคิดเป็นมูลค่า 983 พันล้านดอลล่า ถึง 1.4 billion ต่อปี (Ratih , 1992) ในประเทศไทย ซาลโมเนลล่าได้เริ่มเข้ามามีบทบาทในปี ค.ศ. 1990 โดยมีการตรวจพบ *S. enteritidis* จากแหล่งต่างๆ เช่น วัสดุรองพื้นไก่ , เนื้อไก่แช่แข็ง , อาหารสัตว์ ฯลฯ จนกระทั่งปัจจุบันสามารถตรวจพบ *S. enteritidis* ได้จากคน , อาหารพร้อมบริโภค , เนื้อไก่แช่แข็ง , อาหารทะเลส่งออก , อาหารสัตว์ , น้ำ และสิ่งแวดล้อมต่างๆ (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2542) วิธีการตรวจซาลโมเนลล่าในอาหาร โดยทั่วไปจะมี 5 ขั้นตอนดังนี้ คือ ขั้น Pre - enrichment เพื่อให้เชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารในปริมาณที่น้อยหรือเชื้อที่บาดเจ็บได้มีโอกาสปรับตัวให้แข็งแรงและเพิ่มปริมาณมากขึ้น ขั้น Selective enrichment จะเป็นการถ่ายเชื้อที่ได้จากการบ่มในขั้นตอนแรก ลงใน Selective enrichment media เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีการปนเปื้อนมาพร้อมกัน และเพิ่มจำนวนของซาลโมเนลล่าให้มากขึ้น ขั้น Isolation เป็นการศึกษาลักษณะโคโลนี โดยนำเชื้อจากในขั้นตอนที่สอง มาเลี้ยงบน Selective agar หรือ

Differential agar ขั้นBiochemical screening test นำโคโลนีให้ลักษณะของซาลโมเนลล่ามาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ขั้น Confirmation เป็นการทดสอบทางด้านเซรัมวิทยากับแอนติเซรัม เพื่อยืนยันว่าเชื้อชนิดที่ตรวจสอบเป็นซาลโมเนลล่ารวมทั้งเป็นการระบุว่าอยู่ในSerotype หรือ Serovar ใด (Refai, 1980) ถึงแม้ว่าการตรวจวิเคราะห์แบบนี้จะเป็นวิธีที่ดี แต่ก็ยังมีข้อเสียคือใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งในการตรวจวิเคราะห์แต่ละครั้งจะใช้เวลานานประมาณ 5 วัน จึงจะรู้ผลการตรวจวิเคราะห์

นอกจากนั้นประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ซาลโมเนลล่าต่ำ คือ ไม่สามารถตรวจหาที่ปนเปื้อนมาในปริมาณน้อย ๆ ได้ (Association of Official Analytical Chemists, 1995 อ้างอิงโดย Velazquez และคณะในปี ค.ศ. 2000) จึงมีงานวิจัยหลายงานที่พยายามจะปรับปรุงโดยพยายามลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ให้สั้นลงและเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์เชื้อที่ปนเปื้อนมาในปริมาณที่ต่ำๆรวมทั้งวิธีที่สามารถทำให้เซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บฟื้นตัวจากการบาดเจ็บมาได้มากที่สุดในขณะที่ทำการตรวจวิเคราะห์เพื่อเพิ่มโอกาสที่จะตรวจพบซาลโมเนลล่าที่บาดเจ็บในอาหารมากขึ้น ในการปรับปรุงวิธีการตรวจซาลโมเนลล่าได้เน้นการปรับปรุงด้านความเร็วและประสิทธิภาพในการทำเชื้อฟื้นตัวจากการบาดเจ็บและการตรวจเชื้อที่ปนเปื้อนมาในปริมาณน้อยๆ โดยได้มีการปรับปรุงในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนและทำให้เชื้อฟื้นคืนตัว(Pre-enrichment และ Enrichment step) เพื่อให้การตรวจเชื้อนั้นสามารถตรวจพบเชื้อได้ในระยะเวลาที่สั้นโดยทำให้เชื้อที่บาดเจ็บฟื้นคืนตัวรวดเร็วและสามารถตรวจเชื้อที่ปนเปื้อนมาในปริมาณน้อยๆได้ดี จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจ ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวมีดังต่อไปนี้ วิธีการตรวจที่มีความไวในการตรวจสูง ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกในการ identification ซาลโมเนลล่าในอาหาร ส่วนใหญ่มักจะใช้ร่วมกับวิธีการตรวจทางชีวเคมี งานวิจัยเหล่านี้รวบรวมโดย Madeline Velazquezในปี ค.ศ. 2000 เช่น การใช้ DNA and RNA probes , polymerase chain reaction (PCR) (Tietjen and Fung ,1998) , การใช้ antibody assays (Hayashi and Yamazaki ,1998) อย่างไรก็ตาม แต่ละวิธีจะต้องใช้เวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง สำหรับขั้นตอนการ Pre-enrichment และ selective enrichment เพื่อทำให้เชื้อที่ปนเปื้อนมาในปริมาณน้อยๆ ฟื้นตัวอย่างรวดเร็ว แต่การใช้ระยะเวลานานๆจะทำให้ Sensitivity ของวิธีการตรวจลดลงเพราะ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตโดย Microflora ในขั้น Enrichment (Keith, 1997) ในปี 1995 Pignato และ colleaques ได้ทำการทดลองโดยการนำเนื้อที่ถูกทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อ มาตรวจเชื้อโดยใช้วิธีการที่มีการลดเวลาที่ใช้ในการตรวจซึ่งทำได้โดยการรวมขั้นตอน Pre - enrichment และ Selective enrichment มารวมเป็นขั้นตอนเดียว หลังจากนั้นก็ทำการ Selective plating โดยใช้ Salmosyst broth และ Rambach agar ตามลำดับ นอกจากนั้นได้ปรับปรุงวิธีของ AOAC method 994.04 ซึ่งเป็นวิธีที่ได้พัฒนาใช้สำหรับการตรวจ

ซาลโมเนลล่าในตัวอย่างที่เป็นอาหารแห้ง (Whole egg powder, Milk chocolate, Instant skim milk powder และ Feed animals) ทำการตรวจวัดโดยการแช่เย็น (อุณหภูมิประมาณ 2 –10 °C) Pre - enrichment broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิธีนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการตรวจใน Dry food แต่วิธีนี้จะใช้เวลานานและสามารถใช้ได้เฉพาะDry food เท่านั้น (D' Aoust et al., 1995) ในปี ค.ศ. 1993 Hammack และคณะได้ใช้การใช้ Pre - enrichment broth เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ 35 °C ร่วมกับการ Centrifuge เพื่อทำให้ซาลโมเนลล่าที่บาดเจ็บจากกระบวนการ Freeze - dried ฟื้นตัวและใช้เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับขั้นตอนSelective enrichment ในปี ค.ศ. 1992 Bailey และ Cox ได้คิดค้น Universal pre - enrichment (UP) broth ที่ใช้สำหรับ การฟื้นตัวและการเพิ่มจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บจากความร้อน วิธีนี้จะใช้สำหรับ *Salmonella* and *Listeria* ในอาหาร UP broth ที่ผลิตขึ้นมีประสิทธิภาพดีมากจะเห็นได้จากสามารถตรวจเชื้อที่มีอยู่จำนวนน้อยประมาณ 10 cell และบาดเจ็บจากความร้อนในตัวอย่างอาหารที่มี Microflora ที่ปนเปื้อนมาในปริมาณสูงได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้จะต้องใช้เวลา 24 ชั่วโมงสำหรับการบ่มใน Pre - enrichment broth ที่ 35 °C ก่อนจะถ่ายเชื้อลงใน Selective enrichment broth นอกจากนั้น Amaguana และคณะ (อ้างอิงโดย Madeline Velazquez ในปี ค.ศ. 2000) ได้ประเมินประสิทธิภาพของ UP broth ที่ใช้ สำหรับ Recovery ซาลโมเนลล่าจากนมผงที่ไม่มีไขมันชนิดละลายได้ทันทีเทียบกับน้ำกลั่นที่ผสมกับ 1 % Brilliant green (BG) dye จากการทดลองนี้พบว่าการใช้BG pre – enrichment broth ให้ผลการตรวจที่ดีกว่าการใช้UP broth เพราะให้ผลการตรวจที่เป็นพบเชื้อสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ Alcaide et al. 1987, D'Aoust et al. 1992 และ Hammack et al. 1993 (อ้างอิงโดย Madeline Velazquez ในปี ค.ศ.2000) ได้ใช้อุณหภูมิและการเติมสารบางชนิดเพื่อปรับปรุงวิธีการตรวจแบบดั้งเดิมให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น การใช้อุณหภูมิในช่วง 40 – 43 °C จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการฟื้นตัวของซาลโมเนลล่าในขั้นตอนที่ถูกเลี้ยง ในอาหารEnrichment broth (D'Aoust et al. 1992) และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นๆได้ (Alcaide et al. 1987) ในปี 1993 Hammack และคณะได้พบว่าการเติมสารบางชนิดเช่น Pyruvate, Lactate และ Catalase ลงไปในอาหารเลี้ยง เชื้อจะช่วยให้เชื้อฟื้นตัวได้ดีขึ้น ในปี ค.ศ. 1996 Hoffman และคณะ(อ้างอิงโดย Madeline Velazquez ในปี ค.ศ. 2000) ได้เสนอวิธีการที่จะตรวจซาลโมเนลล่าที่บาดเจ็บจากกระบวนการแช่แข็งในขณะที่ทำ Ice – cream โดยวิธีนี้จะใช้เวลาในการตรวจประมาณ 3 – 4 วัน โดยวิธีนี้ได้ดัดแปลงมา จากวิธีของ AOAC ในปี ค.ศ. 1995 ในขั้น Pre-enrichment broth จะเลี้ยงเชื้อใน Lactose broth และบ่มเชื้อ ที่ 41 °C จากนั้นก็นำเชื้อที่บ่มจากขั้นตอนแรกเป็นเวลา 7 ชั่วโมง มาถ่ายลงอาหารแข็ง XLD วิธีนี้สามารถตรวจเชื้อได้ตั้งแต่เชื้อมีจำนวน 2 – 4 เซลล์ในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ซึ่งละลายอยู่ใน Enrichment broth ปริมาตร 225

มิลลิลิตร ต่อมานักวิจัยกลุ่มเดิมได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยเติม 1 % Sodium pyruvate และ 0.1 % Yeast extract ลงไปใน Lactose broth เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการฟื้นตัวของซาลโมเนลล่าที่ได้รับบาดเจ็บจากกระบวนการแช่แข็ง โดยทดลองกับเชื้อ 2 สายพันธุ์ คือ *S. enteritidis* และ *S. newport* พบว่าเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนเป็น 10 เท่า หลังจากการบ่มในอาหาร Lactose broth ที่เติม 1% Sodium pyruvate และ 0.1 % Yeast extract หลังจากนั้นนักวิจัยกลุ่มนี้ได้ทดลองเติม Brilliant green ลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดอื่นที่ไม่ใช่ซาลโมเนลล่า ที่ปนเปื้อนมาใน Ice - cream

สำหรับในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของกระบวนการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของซาลโมเนลล่าในกุ้งแช่แข็งและปรับปรุงวิธีตรวจซาลโมเนลล่าที่บาดเจ็บหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งกุ้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius จากตลาดสามย่าน ขนาด 60 ตัว/กิโลกรัม ที่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเย็นและทำการตัดแต่งกุ้งโดยการเด็ดหัวและปอกเปลือก ล้างด้วยน้ำเย็นวางบนตะแกรงให้สะเด็ดน้ำที่อุณหภูมิ 10 ° C

3.2 สารเคมี , อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารเคมี

Agar powder	Merck
Brilliant green dye	A.R. grade
Ethanol 95 %	A.R. grade
Lactose broth	Merck
Lysine iron agar	Merck
Methanol	A.R. grade
Nutrient broth	Merck
Plate count agar	Merck
Peptone from meat	Merck
SIM medium	Merck
Sodium pyruvate	A.R. grade
Tryptic soy broth	Merck
Yeast extract	Merck
Xylose lysine desoxycholate agar	Merck
Triple sugar iron agar	Merck
Sodium thiosulphate	A.R. grade
Ferric ammonium citrate	A.R. grade

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.2.2.1 อาหารที่ใช้หาปริมาณ *Salmonella* spp. ทั้งหมด

- TSAYE เตรียมได้จาก Tryptic soy broth 3% ผสมด้วย Agar powder 1.5 % และ Yeast extract 0.1 % ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml นำไป Sterilize ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตัวอย่างอาหารและลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* spp. ที่ขึ้นบนอาหารชนิดนี้ แสดงดังภาพที่ 12 ในภาคผนวก ก

- TSAYE modified เตรียมได้จาก Tryptic soy broth 3% ผสมด้วย Agar powder 1.5 % ,Yeast extract 0.1 % , 0.08 % Ammonium iron (III) citrate และ 0.68 % Sodium thiosulphate ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml นำไป Sterilize ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตัวอย่างอาหารและลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* spp. ที่ขึ้นบนอาหรชนิดนี้ แสดงดังภาพที่ 13 ในภาคผนวก ก

3.2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Salmonella derby เก็บเชื้อที่ – 20 °C ในอาหาร Nutrient agar ก่อนนำเชื้อมาทดลองจะนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- ใช้ถุง HDPE (High density polyethylene) ที่ผสมไนลอน ขนาด 6 x 10.5 นิ้ว ความหนา 0.05 มิลลิเมตร
- Air blast freezer อุณหภูมิต่ำสุด – 22 °C ความเร็วลมสูงสุด 8 เมตรต่อวินาที
- Cryo – Test Chamber Nitrogen Freezer Model CT – 1818 –12 F
- ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว Model XL – 55 HP
- เครื่องบันทึกอุณหภูมิและเวลา (Data recorder) Y – okogawa , LR 4210
- ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ – 20 °C
- ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ – 75 °C
- สาย Thermocouple ชนิด Copper – Constan (Type – T) สามารถวัดอุณหภูมิได้ตั้งแต่ – 200 ถึง 400 °C
- เครื่องชั่งน้ำหนักSartorius ทศนิยม 2 ตำแหน่ง, BA 4100 S
- เครื่องชั่งน้ำหนักSartorius ทศนิยม 4 ตำแหน่ง, A 2000 S
- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) Sanyo , MLS 3020
- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) Tomy Autoclave , SS – 320
- เครื่องวัด pH (pH meter) Horiba , F – 21

- ตู้อบลมร้อน (Air oven) Memmert , KL 26
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubarot) Model B80
- เครื่อง Spectronic O Genesis Jasco , V – 530
- ตู้ปลอดเชื้อ ISSCO Laminar flow model BVT - 123
- Water bath ,Heto lab Equipment
- เครื่องตีบดอาหาร (Stochmacher) AES Laboratoire รุ่น mix 1
- เครื่อง centrifuge , Heraeus Christ รุ่น medifuge
- เครื่องเขย่าตัวอย่าง (Votex), super – mixer cat.no.129
- Magnetic sterior , Thermix® Striring Hot Plate Model 210 T
- Magnetic bar
- เครื่องปิดผนึกผลิตภัณฑ์ บริษัท Sea master
- ตู้เย็น , Whirlpool รุ่น WRN – 57HGG3

3.4 วิธีวิเคราะห์

3.4.1วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ

3.4.1.1 หาอัตราเร็วในแช่แข็งกุ้งกุลาดำ

วัดระยะทางจากผิวหน้าของกุ้ง จนถึงจุดกึ่งกลางของกุ้ง หน่วยเป็นเซนติเมตร นำมาหารด้วยระยะเวลาในช่วงการเกิดผลึกน้ำแข็ง(Ice crystal formation) หน่วยเป็นชั่วโมง ดังสมการด้านล่างนี้

$$\text{อัตราเร็ว} = \frac{\text{ระยะทางจากผิวถึงจุดศูนย์กลางของกุ้งกุลาดำ (cm.)}}{\text{ระยะเวลาในช่วง ice crystal formation (hr.)}}$$

3.4.1.2 หาอัตราเร็วในการแช่แข็ง Salmonella suspension

วัดระยะทางจากผิวหน้าของขวดบรรจุตัวอย่าง จนถึงจุดกึ่งกลางของขวดบรรจุตัวอย่าง หน่วยเป็นเซนติเมตร นำมาหารด้วยระยะเวลาในช่วงการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal formation) หน่วยเป็นชั่วโมง ดังสมการด้านล่างนี้

$$\text{อัตราเร็ว} = \frac{\text{ระยะทางจากผิวจนถึงจุดศูนย์กลางของขวดบรรจุตัวอย่าง (cm.)}}{\text{ระยะเวลาในช่วง ice crystal formation (hr.)}}$$

3.4.2 วิธีวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง Salmonella suspension

เพาะเลี้ยง *S. derby* ใน Tryptic soy broth ที่ 42 ° C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำเชื้อมาปั่นเก็บเซลล์ที่ 3,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดมาด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปั่นเก็บเซลล์อีกครั้ง นำเซลล์ที่ได้ มาเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 cell / ml ด้วย Peptone water 0.1 % ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำSalmonella suspensionบรรจุในขวดพลาสติกใสทรงกระบอกที่มีฝาปิด เส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 1 ซม. สูงประมาณ 6ซม. ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยเติมเชื้อ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาหาปริมาณเชื้อตั้งต้น

3.4.2.2 การเตรียมตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำ

เพาะเลี้ยง *S. derby* ใน Tryptic soy broth ที่ 42 ° C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำเชื้อมาปั่นเก็บเซลล์ที่ 3,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดมาด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปั่นเก็บเซลล์อีกครั้ง นำเซลล์ที่ได้ มาเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 cell / ml ด้วย Peptone water 0.1 % ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำกุ้งกุลาดำ ขนาด 60 ตัว / กิโลกรัม มาล้างด้วยน้ำเย็นประมาณ 10 ° C จากนั้นทำการตัดแต่งกุ้งโดยเด็ดหัวและปอกเปลือก ล้างด้วยน้ำเย็น วางพักบนตะแกรงให้สะเด็ดน้ำที่ อุณหภูมิต่ำ หลังจากนั้นนำกุ้งมาเติม *S. derby* ที่เตรียมใน Peptone water 0.1 % ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและทำให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6cell/ ml ในการทดลองจะใช้กุ้งจำนวน 25 กรัม ต่อ *S. derby* เข้มข้น 10^6 cell / ml จำนวน 1 ml จากนั้นนำมาบรรจุแบบสุญญากาศในถุงHDPE ที่ผสมไนลอน จากนั้นนำมาหาปริมาณเชื้อตั้งต้น

3.4.2.3 การหาจำนวน *Salmonella* spp. ทั้งหมด(ดัดแปลงจากวิธีของ Velazquez, 2000)

- กรณีที่เป็นตัวอย่าง Salmonella suspension แช่แข็ง

นำตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งมาละลายน้ำแข็งออก โดยละลายใน water bath อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C หลังจากนั้นทำ dilution ด้วย peptone water แล้วทำ spread plate บนอาหาร Tryptic soy agar ที่ผสม 1 % ของ yeast extract นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ขึ้น ลักษณะของโคโลนีของ *Salmonella* spp. เป็นดังภาพที่ 9 จากนั้นนำโคโลนีไปตรวจยืนยันในอาหาร SIM medium, TSI และ LIA

- กรณีที่เป็นตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

นำตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งมาละลายน้ำแข็งออก โดยละลายใน water bath อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัว

อย่างเท่ากับ 5 °C หลังจากนั้นนำตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำ(25 g) มาเติม peptone water จำนวน 225 ml แล้วนำไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stochmacher จากนั้นดูดตัวอย่างมา 1 ml นำมาทำ dilution ด้วย peptone water แล้ว spread plate บนอาหาร Tryptic soy agar ที่ผสม 1 % yeast extract , 0.08 % Ammonium iron (III) citrate และ 0.68 % Sodium thiosulphate นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ขึ้น ลักษณะของโคโลนีของ *Salmonella* spp. เป็นดังภาพที่ 10 จากนั้นนำโคโลนีไปตรวจยืนยันในอาหาร SIM medium, TSI และ LIA

3.4.2.4 การหาจำนวน *Salmonella* spp. ที่แข็งแรง

(ดัดแปลงจากวิธีของ Madeline Velazquez, 2000)

- ในกรณีที่เป็นตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็ง

นำตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งมาละลายน้ำแข็งออก โดยละลายใน water bath อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C หลังจากนั้นทำ dilution ด้วย peptone water แล้วทำ spread plate บนอาหาร XLD นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ขึ้น ลักษณะของโคโลนีของ *Salmonella* spp. เป็นดังภาพที่ 12 จากนั้นนำโดโลนีไปตรวจยืนยันในอาหาร SIM medium, TSI และ LIA

- ในกรณีที่เป็นตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

นำตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งมาละลายน้ำแข็งออก โดยละลายใน water bath อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C หลังจากนั้นนำตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำ(25 g) มาเติม peptone water จำนวน 225 ml แล้วนำไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stochmacher จากนั้นดูดตัวอย่างมา 1 ml นำมาทำ dilution ด้วย peptone water แล้ว spread plate บนอาหาร XLD นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ขึ้น ลักษณะของโคโลนีของ *Salmonella* spp. เป็นดังภาพที่ 12 จากนั้นนำโดโลนีไปตรวจยืนยันในอาหาร SIM medium, TSI และ LIA

3.4.4.5 การหาจำนวน *Salmonella* spp. ที่บาดเจ็บ(ดัดแปลงวิธีของ Hayashi S. ,1998)

จำนวนเชื้อที่บาดเจ็บสามารถหาได้จากจำนวนเชื้อทั้งหมด ลบด้วยจำนวนเชื้อที่แข็งแรง

3.4.4.6 **การหาเปอร์เซ็นต์รอดตายของ** *Salmonella* spp. **หลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง** (ดัดแปลงวิธีของ Hayashi S. ,1998)

คำนวณเปอร์เซ็นต์รอดตายได้จาก

$$\text{- เปอร์เซ็นต์การรอดตาย} = \frac{\text{จำนวนเชื้อทั้งหมดหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง} \times 100}{\text{จำนวนเชื้อทั้งหมดก่อนผ่านกระบวนการแช่แข็ง}}$$

3.4.4.7 **การหาเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของ** *Salmonella* spp. **หลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง** (ดัดแปลงวิธีของ Hayashi S. ,1998)

คำนวณการบาดเจ็บได้จาก

$$\text{- เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บ} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่บาดเจ็บหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง} \times 100}{\text{จำนวนเชื้อทั้งหมดหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง}}$$

3.5 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 ศึกษาผลของกระบวนการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby*

3.5.1.1 ศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ Salmonella suspension

การเตรียมตัวอย่าง

รายละเอียดแสดงในข้อ 3.4.2.1

การทดลอง

นำSalmonella suspensionมาแช่แข็ง แปรอัตราเร็วในการแช่แข็งเป็น 4 ระดับ ซึ่งทำได้โดยทำการแช่แข็งตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้

- Still air อุณหภูมิ –10 °C (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น)
- Still air อุณหภูมิ – 20 °C
- Air blast อุณหภูมิประมาณ – 20 °C
- Cryogenic อุณหภูมิ – 70 ° C

ติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของตัวอย่าง โดยใช้ Themocouple Type – T เสียบเข้าส่วนที่อยู่ที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่าง บันทึกอุณหภูมิด้วยเครื่องบันทึกอุณหภูมิ โดยบันทึกอุณหภูมิเริ่มต้นของตัวอย่าง จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ - 20 ° C

การตรวจสอบ

- อัตราเร็วของการแช่แข็งตัวอย่าง ของแต่ละอุปกรณ์ที่ใช้ในการแช่แข็ง
- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ทั้งหมดก่อนผ่านกระบวนการแช่แข็ง

- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ทั้งหมดหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง
- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ที่แข็งแรงหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง
- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ที่บาดเจ็บหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง

(ดัดแปลงจากวิธีของ Madeline Velazquez , 2000)

- เปอร์เซ็นต์การรอดตายของ *S. derby* หลังผ่านการแช่แข็ง
- เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของ *S. derby* หลังผ่านการแช่แข็ง

(ดัดแปลงจากวิธีของ Hayashi S. ,1998)

วางแผนการทดลองแบบ CompletelyRandomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ ทดสอบข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan‘ s New Multiple Range Test

3.5.1.2 **ศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ (*Peneaus monodon* Febricius)**

การเตรียมตัวอย่าง

รายละเอียดแสดงในข้อ 3.4.2.2

การทดลอง

นำ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ มาแช่แข็ง แปรอัตราเร็วในการแช่แข็งเป็น 4 ระดับ ซึ่งทำได้โดยทำการแช่แข็งตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้

- Still air อุณหภูมิ –10 °C (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น)
- Still air อุณหภูมิ – 20 °C
- Air blast อุณหภูมิประมาณ – 20 °C
- Cryogenic อุณหภูมิ – 70 ° C

ติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของตัวอย่าง โดยใช้ Themocouple Type – T เสียบเข้าส่วนที่อยู่ที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่าง บันทึกอุณหภูมิด้วยเครื่องบันทึกอุณหภูมิ โดยบันทึกอุณหภูมิเริ่มต้นของตัวอย่าง จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ - 20 ° C

การตรวจสอบ

ทำการตรวจสอบเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.1.1

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ ทดสอบข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan ‘ s New Multiple Range Test

3.5.1.3 **ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ Salmonella suspensionแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby***

การเตรียมตัวอย่าง

รายละเอียดแสดงในข้อ 3.4.2.1

การทดลอง

นำ Salmonella suspensionมาแช่แข็ง ด้วย Air blast อุณหภูมิประมาณ – 20 °C และแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บSalmonella suspensionแช่แข็งเป็น 3 ระดับ ซึ่งทำโดยการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 3 เดือน ที่อุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้

- อุณหภูมิ –10 °C (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น)
- อุณหภูมิ – 20 °C
- อุณหภูมิ – 75 °C

การตรวจสอบ

- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ทั้งหมดหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง ก่อนการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ
- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ทั้งหมดหลังผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทุกสัปดาห์
- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ที่แข็งแรงหลังผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทุกสัปดาห์
- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ที่บาดเจ็บหลังผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทุกสัปดาห์

(ดัดแปลงจากวิธีของ Madeline Velazquez ,2000)

- เปอร์เซ็นต์การรอดตายของ *S. derby* หลังผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทุกสัปดาห์
- เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของ *S. derby* หลังผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทุกสัปดาห์

(ดัดแปลงจากวิธีของ Hayashi S. ,1998)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ ทดสอบข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSSเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan ' s New Multiple Range Test

3.5.1.4 **ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby***

การเตรียมตัวอย่าง

รายละเอียดแสดงในข้อ 3.4.2.2

การทดลอง

นำ Salmonella ในกุ้งกุลาดำมาแช่แข็ง ด้วย Air blast อุณหภูมิประมาณ – 20 °C และแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ Salmonella suspensionแช่แข็งเป็น 3 ระดับ ซึ่งทำโดยการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 3 เดือน ที่อุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้

- อุณหภูมิ –10 °C (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น)
- อุณหภูมิ – 20 °C
- อุณหภูมิ – 75 °C

การตรวจสอบ

ทำการตรวจสอบเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.1.3

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ ทดสอบข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan ' s New Multiple Range Test

3.5.2 ศึกษาปัจจัยที่ *S. derby* ฟื้นตัวจากการบาดเจ็บหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง

3.5.2.1เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ S. *derby* ที่บาดเจ็บหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

3.5.2.1.1เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* ที่บาดเจ็บในตัวอย่างSalmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

การเตรียมตัวอย่าง

รายละเอียดแสดงในข้อ 3.4.2.1

การทดลอง

นำ สารละลายSalmonella ที่ผ่านการแช่แข็ง เก็บที่ Still air อุณหภูมิ – 20 °C เป็นเวลา 3 เดือน มาละลายน้ำแข็ง ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C จากนั้น นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Pre-enrichment media) โดยแปรชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ดังนี้

- Buffered peptone water (BPW)
- Nutrient broth (NB)
- Tryptic soy broth (TSB)
- Lactose broth (LB)

เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 ° C (อุณหภูมิที่ *Salmonella spp.*เจริญได้ดีที่สุด) นับจำนวนเชื้อทั้งหมดหลังการถ่ายเชื้อลงใน Pre– enrichment media เป็นเวลา 0, 3,6,9 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ(ดัดแปลงจากวิธีของ Velazquez, 2000) เปรียบเทียบการฟื้นตัวและรอดตายของ *S. derby* (ดัดแปลงจากวิธีของ Hayashi S., 1998)

การตรวจสอบ

- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ทั้งหมดหลังผ่านการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา0, 3, 6, 9, และ 24 ชั่วโมง
- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ที่แข็งแรงหลังผ่านการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 0,3 , 6, 9, และ 24 ชั่วโมง
- ปริมาณเชื้อ *S. derby* ที่บาดเจ็บหลังผ่านการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 0, 3 , 6, 9, และ 24 ชั่วโมง

(ดัดแปลงจากวิธีของ Velazquez ,2000)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ ทดสอบข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan ' s New Multiple Range Test

3.5.2.1.2 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* ที่บาดเจ็บหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็งพร้อมกุ้งกุลาดำ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

การเตรียมตัวอย่าง

รายละเอียดแสดงในข้อ 3.4.2.2

การทดลอง

นำกุ้งกุลาดำที่เติม Salmonella และผ่านการแช่แข็ง ที่เก็บที่อุณหภูมิ – 20 °C เป็นเวลา 3 เดือน มาละลายน้ำแข็ง ใน water bath ที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C จากนั้นเติม นำตัวอย่างมาเติม Peptone water จำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วนำไปตีป่นด้วยเครื่อง Stomacher แล้วนำตัวอย่างจำนวน1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Pre-enrichment media) โดยแปรชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดดังนี้

- Buffered peptone water (BPW)
- Nutrient broth (NB)
- Tryptic soy broth (TSB)

- Lactose broth (LB)

นับจำนวนเชื้อทั้งหมดหลังการถ่ายเชื้อลงใน Pre– enrichment media เป็นเวลา 0, 1,3,6,9 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ(ดัดแปลงจากวิธีของ Madeline Velazquez, 2000) เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S.derby* (ดัดแปลงจากวิธีของ Hayashi S., 1998)

การตรวจสอบ

ทำการตรวจสอบเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.2.1.1

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ ทดสอบข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมSPSSเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

3.5.2.2 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* ที่บาดเจ็บหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีการเติมสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (repairing agent) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp.

3.5.2.2.1 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* ที่บาดเจ็บในตัวอย่าง Salmonella suspensionหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีการเติมสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (repairing agent) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp.

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.1.1

การทดลอง

นำSalmonella suspensionที่ผ่านการแช่แข็ง ที่เก็บที่อุณหภูมิ – 20 °C เป็นเวลา 3 เดือน มาละลายน้ำแข็ง ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C จากนั้นนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Pre-enrichment media)ทั้ง 4 ชนิด(X)ที่ผสมกับสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (Repairing agent) ดังนี้ 1%ของ Yeast extract (YE), 1% ของ Sodium pyruvate (P) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ Microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ซาลโมเนลล่าคือ 0.0018 % ของ Brilliant green (BG) ซึ่งจะได้สูตรอาหารทั้งหมด 3 สูตรดังนี้คือ X, XPYE และ XPYEBG เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 °C (MadelineVelazquez และคณะ, 2000) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานมีดังนี้ คือ Buffered peptone water (BPW), Nutrient broth (NB), Trypicase soy broth (TSB) และ Lactose broth (LB) นับจำนวนเชื้อทั้งหมดหลังการถ่ายเชื้อลงใน Pre–enrichment media เป็นเวลา 0, 3, 6,9 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ(ดัดแปลงจากวิธีของ

Madeline Velazquez, 2000) เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* (ดัดแปลงจากวิธีของ Hayashi S., 1998)

การตรวจสอบ

ทำการตรวจสอบเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.2.1.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ ทดสอบข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมSPSSเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

3.5.2.2.2 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* ที่บาดเจ็บหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็งพร้อมกุ้งกุลาดำ หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีการเติมสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (repairing agent) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ Microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp.

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.1.2 จากนั้นหาปริมาณเชื้อตั้งต้น

การทดลอง

นำ Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง ที่เก็บที่ Still air อุณหภูมิ – 20 °C เป็นเวลา 3 เดือน มาละลายน้ำแข็ง ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C จากนั้นนำมาเติม Peptone water จำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วนำไปตีป่นด้วย Stomacher จากนั้นนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Pre-enrichment media)ทั้ง 3 ชนิด(X)ที่ผสมกับสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (Repairing agent) ดังนี้ 1%ของ Yeast extract (YE) , 1% ของ Sodium pyruvate (P) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ Microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ซาลโมเนลล่าคือ 0.0018 % ของ Brilliant green (BG) ซึ่งจะได้สูตรอาหารทั้งหมด 3 สูตรดังนี้คือ X , XPYE และ XPYEBG เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 °C (Madeline Velazquez และคณะ, 2000) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานมีดังนี้ คือ Buffered peptone water (BPW), Nutrient broth (NB), Trypicase soy broth (TSB) และ Lactose broth (LB) นับจำนวนเชื้อทั้งหมดหลังการถ่ายเชื้อลงใน Pre–enrichment media เป็นเวลา 0,3,6, 9 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ(ดัดแปลงจากวิธีของ Madeline Velazquez , 2000) เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* (ดัดแปลงจากวิธีของ Hayashi S. ,1998)

การตรวจสอบ

ทำการตรวจสอบเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.2.1.1

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ ทดสอบข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan ‘ s New Multiple Range Test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

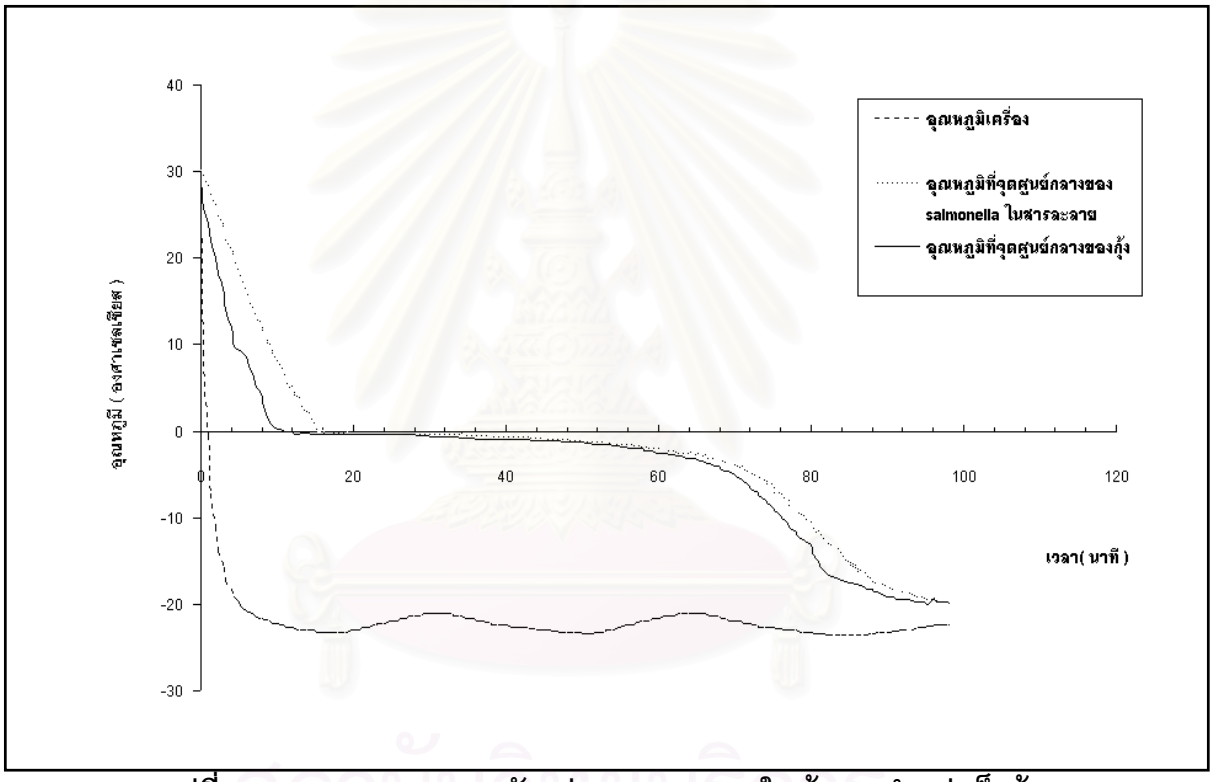
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ศึกษาผลของกระบวนการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby*

4.1.1ศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby*

รูปที่ 3 เป็นรูปที่แสดง Freezing curve ของการแช่แข็งตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำ ด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ กัน ในรูปจะแสดงอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่าง และอุณหภูมิของอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอย่าง ในขณะที่เริ่มแช่แข็งตัวอย่างจนเสร็จสิ้นการแช่แข็ง



รูปที่ 3 Freezing curve **ของตัวอย่าง** Salmonella **ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งด้วย** Still air **(ช่องแช่แข็งของตู้เย็น) อุณหภูมิประมาณ** – 10 ^{o}C **โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ** 0.45 cm/hr

ผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby* ของตัวอย่างSalmonella suspensionที่แช่แข็งด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ กันดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง % รอดตาย และ % บาดเจ็บ ของ *S. derby* ของตัวอย่างSalmonella suspensionหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ

Freezing rate of Salmonella suspension (cm/hr)	% Survival	% Injury of survival
0.62	$4.01^{a} \pm (9.57 \times 10^{-3})$	$25.30^{d} \pm 0.27$
1.05	$3.05^{b} \pm (0.53 \times 10^{-3})$	$30.47^{c} \pm 0.37$
2.00	$1.03^{c} \pm (9.57 \times 10^{-3})$	$50.77^{b} \pm 0.77$
60	$0.15^{d} \pm (9.57 \times 10^{-3})$	$81.09^{a} \pm 0.06$

a,b,… ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

จากการแช่แข็งตัวอย่างSalmonella suspensionโดยแปรอัตราเร็วในการแช่แข็งซึ่งทำได้โดยแช่แข็งตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้คือ Still air อุณหภูมิ -10° C (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น), Still air อุณหภูมิ -20° C, Air blast อุณหภูมิ ประมาณ -20° C และ Cryogenic อุณหภูมิ -70° C พบว่ามีอัตราเร็วของการแช่แข็งตัวอย่างดังนี้คือ 0.62, 1.05, 2.00 และ 60.00 cm/hr ตามลำดับ Freezing curve ของการแช่แข็งตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 19 - 22 ในภาคผนวก ค.1 จากการแช่แข็งตัวอย่างด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ พบว่าอัตราเร็วต่าง ๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งมีผลต่อเปอร์เซ็นต์รอดตายและเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของ *S. derby* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเมื่ออัตราเร็วในการแช่แข็งสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์รอดตายของ *S. derby* ลดลง แต่เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของ*S. derby* ที่รอดตายมีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby* ของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำที่แช่แข็งด้วยอัตราเร็วที่ต่าง ๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดง % รอดตาย และ % บาดเจ็บ ของ *S. derby* ของตัวอย่าง Salmonella ที่ปนกับกุ้งกุลาดำหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ

Freezing rate of Shrimp with Salmonella solution(cm/hr)	% Survival	% Injury
0.45	$4.49^{a} \pm (5.91 \times 10^{-2})$	$30.43^{d} \pm 0.31$
0.79	$3.44^{b} \pm (2.38 \times 10^{-2})$	$33.52^{c} \pm 0.16$
1.50	$1.46^{c} \pm (5.23 \times 10^{-2})$	$55.37^{b} \pm 0.29$
45	$0.21^{d} \pm (1.83 \times 10^{-2})$	$78.34^{a} \pm 0.24$

a,b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

จากการแช่แข็ง Salmonella ในกุ้งกุลาดำโดยแปรอัตราเร็วในการแช่แข็งซึ่งทำได้โดยแช่แข็งตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้คือ Still air อุณหภูมิ –10 $^{\circ}$ C (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น), Still air อุณหภูมิ – 20 $^{\circ}$ C, Air blast อุณหภูมิ ประมาณ – 20 $^{\circ}$ C และ Cryogenic อุณหภูมิ – 70 $^{\circ}$ C พบว่ามีอัตราเร็วของการแช่แข็งตัวอย่างดังนี้คือ 0.45, 0.79, 1.50 และ 45.00 cm/hr ตามลำดับ Freezing curve ของการแช่แข็งตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 23 – 25 ในภาคผนวก ค.2

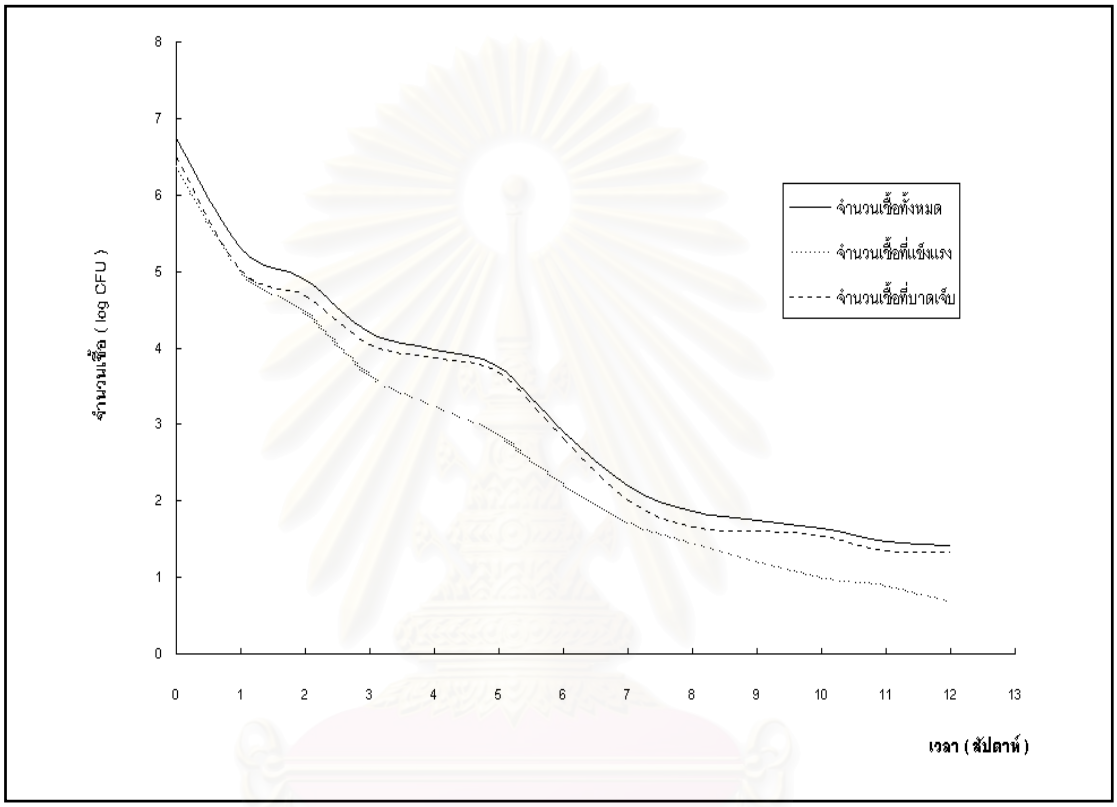
จากการแช่แข็งตัวอย่างด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ พบว่าอัตราเร็วต่าง ๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งมีผลต่อเปอร์เซ็นต์รอดตายและเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของ *S. derby* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเมื่ออัตราเร็วในการแช่แข็งสูงขึ้นพบว่าเปอร์เซ็นต์รอดตายของ *S. derby* ลดลงแต่เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของ *S. derby* ที่รอดตายมีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการแช่แข็งSalmonella suspension และให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของนอก จากนั้น Calcott (1978) ได้อธิบายถึงการแช่แข็งสารละลายของเซลล์จุลินทรีย์ ไว้ว่าในขณะที่แช่แข็ง เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์จะมีลักษณะเหมือนตัวถูกละลายและถูกทำให้กลายเป็นองค์ประกอบและถูกทำให้เข้มข้นในส่วนที่ไม่แข็งตัว(unfrozen portion)ของสารละลายซึ่งคล้ายกับเป็นผลึกน้ำแข็ง ดังนั้นเซลล์ของจุลินทรีย์จึงเปรียบเสมือนถูกห้อมล้อมด้วย super cooling solution ซึ่งพร้อมจะกลายเป็นผลึกน้ำแข็งได้ตลอดเวลา ถ้ามีการคายพลังงานออกsuper cooling solution

ที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์จะกลายเป็นผลึกน้ำแข็งที่อยู่รอบ ๆ เซลล์จุลินทรีย์ จึงมีผลทำให้จุลินทรีย์ได้รับผลกระทบของตัวถูกละลายที่เข้มข้นซึ่งก็คือผลึกน้ำแข็งที่อยู่รอบๆเซลล์ของจุลินทรีย์นั่นเอง เมื่อมีผลึกน้ำแข็งอยู่รอบ ๆ จะทำให้น้ำที่อยู่ในเซลล์ถูกดึงออกจากเซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์จุลินทรีย์มีการเสียน้ำเพิ่มขึ้นอีก นอกจากการเสียน้ำเนื่องจากการเกิด Intracellular ice formation ดังนั้นเมื่อแช่แข็งด้วยอัตราเร็วที่สูง ดังที่Fenama (1973) ได้อธิบายไว้ว่า การแช่แข็งแบบเร็วจะทำให้เกิดผลึกที่มีขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป การแช่แข็งแบบเร็วจึงมีผลทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ของจุลินทรีย์ได้มากกว่าการแช่แข็งแบบช้า ดังนั้นเมื่ออัตราเร็วในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์รอดตายของจุลินทรีย์ที่ถูกแช่แข็งจึงลดลงและในขณะเดียวกันจะทำให้เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของจุลินทรีย์ที่รอดตายมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราเร็วในการแช่เพิ่มขึ้น ซึ่ง Mazur (1973) ได้อธิบายเกี่ยวกับผลของการแช่แข็งที่มีต่อเซลล์จุลินทรีย์ไว้ดังนี้คือมี 5 ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการตายและการบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิที่ต่ำ , การเกิด extracellular ice formation , การเกิด intracellular ice formation , ความเข้มข้นของ extracellular solutes และความเข้มข้นของ intracellular solutesซึ่งจากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่ต่ำและ การเกิด extracellular ice formation ไม่ได้เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เซลล์บาดเจ็บ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ยังมีชีวิตอยู่หลังเกิดการสูญเสียน้ำ นอกจากนั้นความเข้มข้นของ intracellular solutes ก็ไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ทำให้เซลล์จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บ ส่วนการเกิด intracellular ice formation จะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บเนื่องจากความแตกต่างของ osmotic pressure ระหว่าง super cool cytoplasm และ freezing external medium ซึ่งทำให้เซลล์จุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์ให้แก่สิ่งแวดล้อม อัตราการสูญเสียน้ำจะขึ้นกับความแตกต่างระหว่างความดันไอของ cytoplasm และ medium นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับขนาดของเซลล์จุลินทรีย์ ยิ่งเซลล์มีขนาดเล็กจะเกิดการสูญเสียน้ำได้เร็วกว่าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ เมื่อเกิดการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ จะทำให้ความเข้มข้นของสารภายในเซลล์จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง pH รวมทั้งทำให้ activityและการทำงานของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนั้นทำให้ไม่สามารถทนต่อSelective media ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่บาดเจ็บ การเกิด intracellular ice formation จะขึ้นอยู่กับอัตราเร็วที่ใช้ในการแช่แข็งดังที่ Fennema (1973) ได้อธิบายถึงความสัมพันธ์ของอัตราเร็วในการแช่แข็งกับตำแหน่งที่เกิดผลึกและขนาดของผลึกว่าการแช่แข็งแบบช้า ทำให้เกิดการเยือกแข็งภายนอกเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้ได้ผลึกขนาดใหญ่ ตำแหน่งของน้ำเปลี่ยนไปสูงสุด ส่วนการแช่แข็งแบบเร็วทำให้เกิดผลึกอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดผลึกขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งก็คือมีการเกิด intracellular ice formation มาก เนื่องมาจากมีการเคลื่อนย้ายของน้ำน้อย Robinson(1985) ได้อธิบายถึงการเกิดผลึกน้ำแข็งและการบาดเจ็บของเซลล์

จุลินทรีย์ไว้ดังนี้ว่า เมื่อมีการเกิดผลึกจากการกระบวนการแช่แข็ง ผลึกจะมีการดึงน้ำเข้าสู่ตัวผลึก จึงเป็นการแยกน้ำออกจากสารอื่นที่มันรวมตัวกันอยู่ ผลึกน้ำแข็งสามารถที่จะทำลายโครงสร้างเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ฉีกขาดและดึงน้ำผ่านผนังเซลล์ออกมา สำหรับผลของการแช่แข็งของเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ Calcott (1978) ได้ศึกษาพบว่าอัตราเร็วในการแช่แข็งมีผลต่อการตายและการบาดเจ็บของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอัตราเร็วในการแช่แข็งตั้งแต่ 3 $^{\circ}$ C ต่อนาทีขึ้นไป มีผลทำให้เกิด intracellular ice ของเซลล์จุลินทรีย์ได้มาก นอกจากนั้น Ingram และ Mackey (1976) ได้ศึกษาพบว่า แบคทีเรียแกรมลบตัวอย่างเช่น *Escherichia* ,*Salmonella* ,*Serratia* , *Pseudomonas* , *Acinetobactobacter* , *Moraxxella* และ *Vibrio* จะเป็นเชื้อที่มีความไวทั้งต่อการแช่แข็งและการเก็บในสภาวะแช่แข็ง ในปี 1966 Mazur ได้เปรียบผลของกระบวนการแช่แข็งต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบพบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อการแช่แข็งมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก Jame และ Bailey (1982) ได้ศึกษาพบว่าการตายและการบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหารมีความสัมพันธ์กับอัตราเร็วที่ใช้ในการแช่แข็งอาหารโดยพบว่าถ้าการแช่แข็งอาหารมีอัตราเร็วน้อยกว่า 1 $^{\circ}$ C ต่อนาที ภายในเซลล์จุลินทรีย์จะไม่เกิด Intracellular freezing ขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายและการบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากคุณสมบัติการเป็นฉนวนของความเย็นของอาหารทำให้อัตราเร็วที่ผิวของจุลินทรีย์มีค่าน้อยกว่าอัตราเร็วที่ผิวของอาหาร ทำให้ต้องใช้อัตราเร็วที่สูงกว่าจึงจะทำให้เซลล์จุลินทรีย์บาดเจ็บได้เท่ากับการแช่แข็งสารละลายของจุลินทรีย์ ดังนั้นเมื่อแช่แข็งด้วยอัตราเร็วที่สูง จึงมี เปอร์เซ็นต์รอดตายที่ลดลงมากว่า และในขณะเดียวกันจะทำให้เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อเทียบการแช่แข็งด้วยอัตราเร็วที่ต่ำกว่า Lowry และ Gill (1984) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตายและบาดเจ็บหลังผ่านการแช่แข็งของเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ปนมากับเนื้อพบว่า นอกจากอัตราเร็วที่ใช้ในการแช่แข็งเนื้อแล้ว องค์ประกอบของเนื้อและบริเวณที่จุลินทรีย์มีการปนเปื้อนในเนื้อขณะที่ทำการแช่แข็งก็มีผลต่อการตายและการบาดเจ็บ ตัวอย่างเช่นเนื้อที่มีองค์ประกอบของไขมันสูงจะเป็นฉนวนที่ปกป้องผลของการแช่แข็งต่อการตายและบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์ได้ดีกว่าเนื้อที่มีองค์ประกอบของไขมันต่ำกว่า และต่ำแหน่งที่มีการปนเปื้อนของเชื้อก็มีผลต่อการตายและบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์ด้วย นอกจากนั้นยังได้อธิบายถึงการแช่แข็งแบบเร็วของการปนเปื้อนเชื้อที่ผิวของเนื้อพบว่าเซลล์ของจุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะถูกรวมเข้าไปอยู่กับ Frozen solution มากกว่าที่จะถูกรวมเข้ากับ pure ice ซึ่งการแช่แข็งด้วยอัตราเร็วที่สูง ๆ จะทำให้เซลล์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารมีแนวโน้มที่จะเกิด intracellular freezing ได้มากกว่าการแช่แข็งแบบช้า ถ้าต่ำแหน่งที่จุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ในอาหารอยู่ภายในเซลล์ของอาหาร ในขณะที่มีการแช่แข็ง เซลล์จุลินทรีย์ก็จะเปรียบเสมือนมีเกราะป้องกันผลจากการแช่แข็งต่อการรอดตายและบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์ ดังนั้นในบางครั้งจึงมีจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตจากการแช่แข็งอาหารที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อน

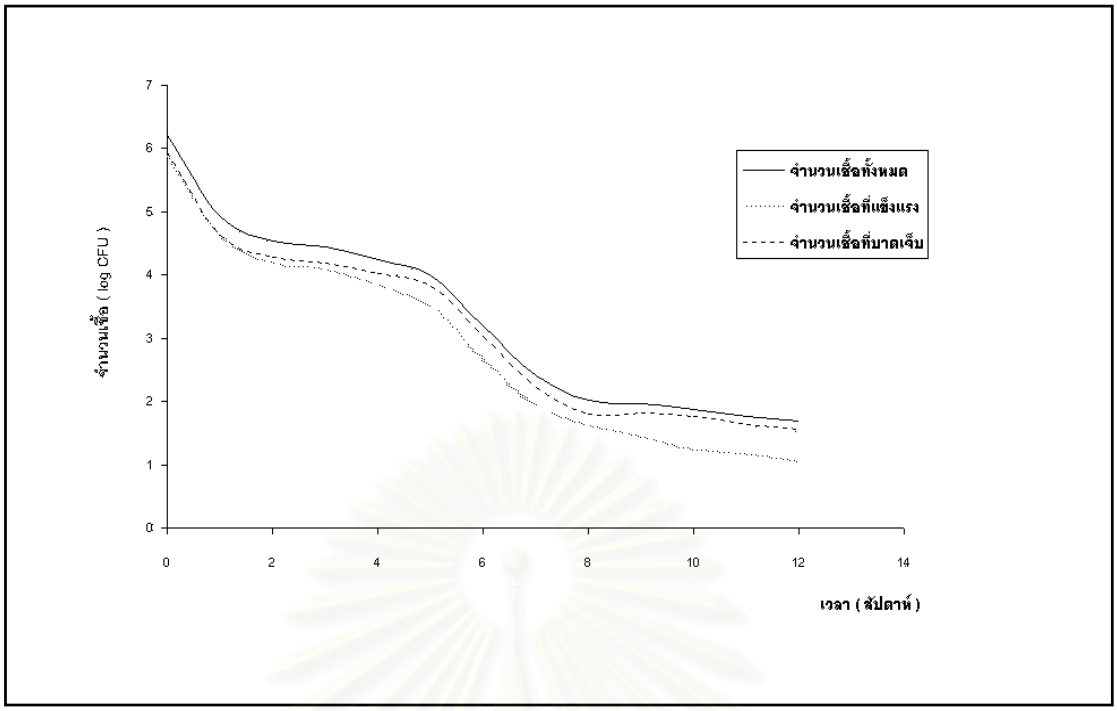
4.1.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ *S. derby* แช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby*

รูปที่ 4 - 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็ง หลังเก็บที่ – 10, - 20 และ - 75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ตามลำดับ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ

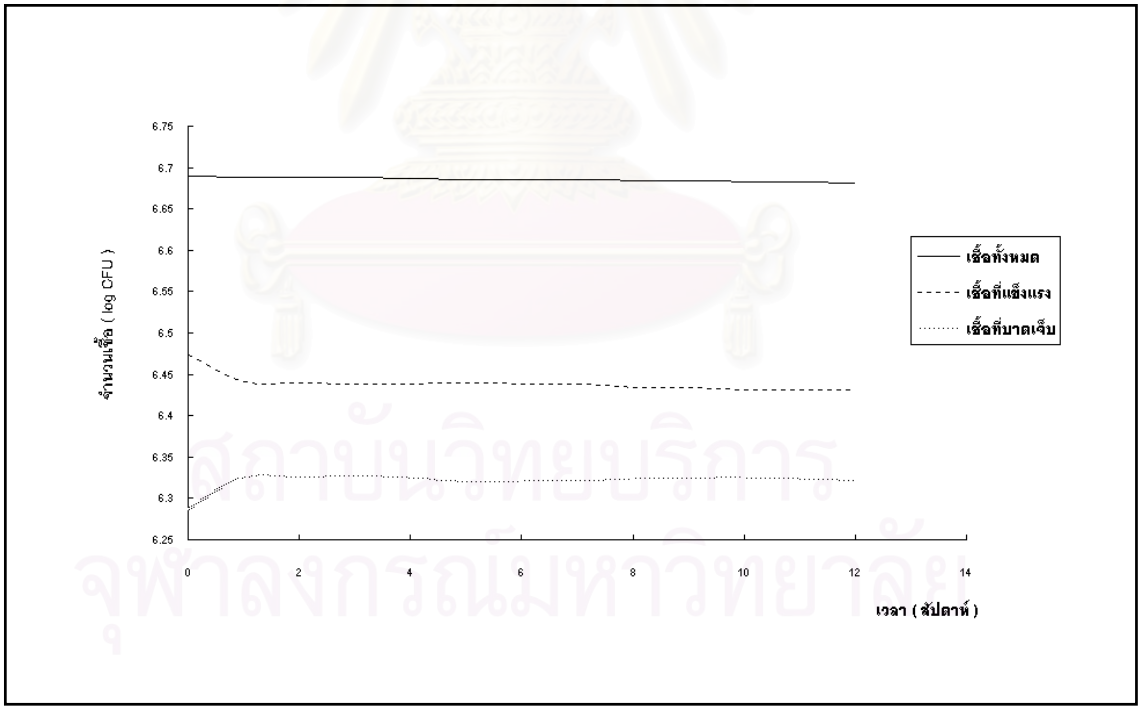


รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเก็บที่ – 10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อทีบาดเจ็บของสารละลายSalmonella แช่แข็งหลังเก็บที่ – 20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 1)



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อทีบาดเจ็บของสารละลายSalmonella แช่แข็งหลังเก็บที่ – 75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 1)

ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บสารละลาย Salmonellaแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby* หลังจากผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงเวลา (สัปดาห์) ที่จำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ลดลง 1 log cfu หลังเก็บที่ – 10 , - 20 และ – 75 $^{\circ}$C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็ง

Storage temperature ($^{\circ}$c)	Average time in weeks used for decreasing Salmonella in 1 log cfu		
	Total Salmonella	Healthy Salmonella	Injured Salmonella
- 10	$2.51^{b} \pm 0.18$	$2.34^{b} \pm 0.26$	$2.56^{b} \pm 0.21$
- 20	$2.92^{b} \pm 0.51$	$2.60^{b} \pm 0.23$	$3.04^{b} \pm 0.59$
- 75	$944.50^{a} \pm 365.82$	$337.50^{a} \pm 136.19$	$1025.75^{a} \pm 190.03$

a,b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ

จากการทดลองนำสารละลาย Salmonellaที่ผ่านการแช่แข็งด้วย Air blast ที่อุณหภูมิประมาณ – 20 $^{\circ}$C แล้วนำมาเก็บที่ Still air โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บออกเป็น 3 ระดับคือ –10, - 20 และ – 75 $^{\circ}$C ทำการเก็บตัวอย่างมานับจำนวน *S. derby* ทั้งหมดและแข็งแรงทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยการเก็บตัวอย่างแต่ละอุณหภูมิจะทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ รูปแสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บหลังเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของตัวอย่างSalmonella suspensionแช่แข็ง แสดงในรูปที่ 24 - 35 จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างมีผลต่อการลดของจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ หลังเก็บที่ – 10, - 20 และ – 75 $^{\circ}$C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยมีอัตราการลดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4พบว่าเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บต่ำลง ระยะเวลา (สัปดาห์) ที่จำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ลดลงเป็นจำนวน 1 log cfu มีระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งหมายความว่าเมื่อเก็บเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ ๆ จะมีผลทำให้เชื้อตายและบาดเจ็บน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิสูงกว่า

ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby*ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังจากผ่านการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงเวลา (สัปดาห์) ที่จำนวนเชื้อทั้งหมด จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บ ลดลง 1 log cfu หลังเก็บที่ – 10 , - 20 และ – 75 $^{\circ}$C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

Storage temperature ($^{\circ}$c)	Average time in weeks used for decreasing Salmonella in 1 log cfu		
	Total Salmonella	Healthy Salmonella	Injured Salmonella
- 10	3.04 ^{b} ± 0.14	3.10 ^{b} ± 0.12	2.94 ^{b} ± 0.16
- 20	3.30 ^{b} ± 0.18	3.35 ^{b} ± 0.24	3.25 ^{b} ± 0.24
- 75	1064.00 ^{a} ± 487.66	575.75 ^{a} ± 303.16	1139.00 ^{a} ± 396.66

a,b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ

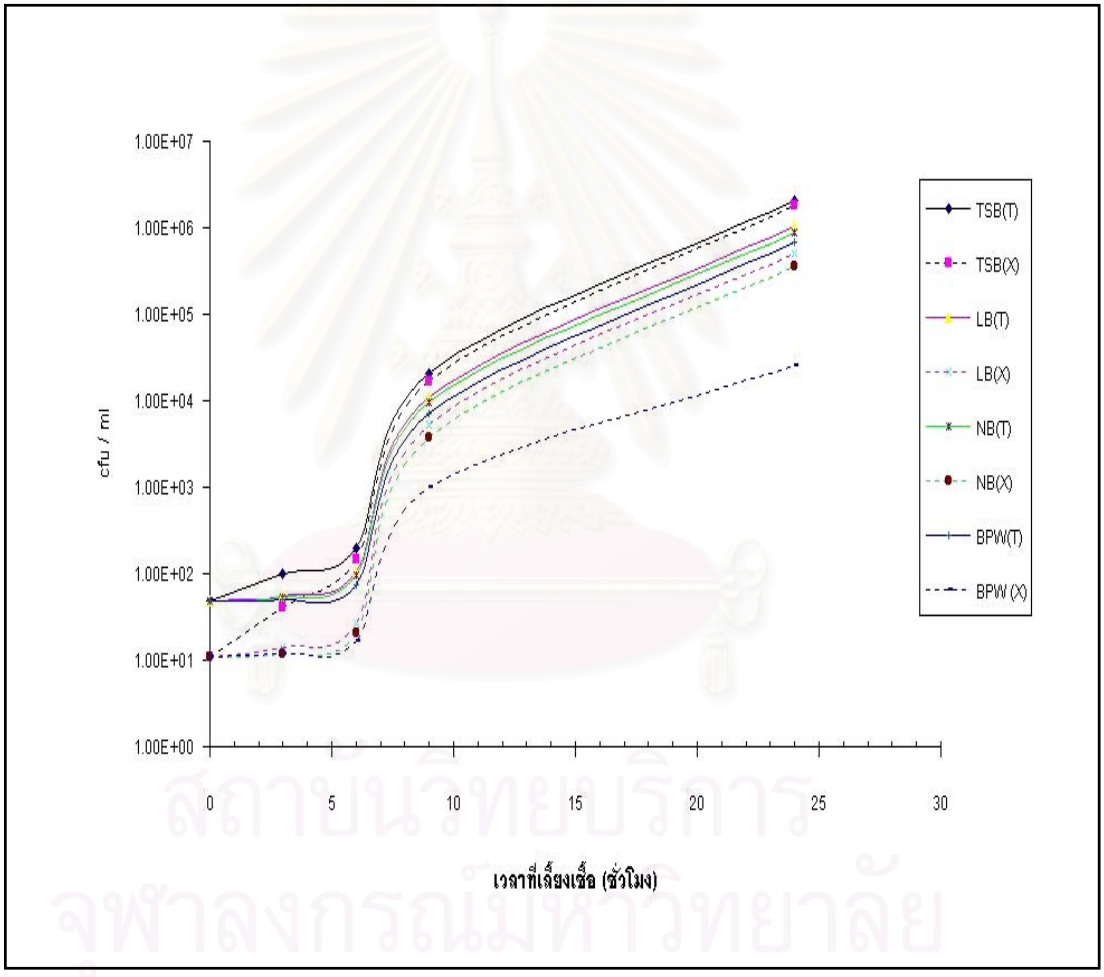
จากการทดลองนำ Salmonellaในกุ้งกุลาดำที่ผ่านการแช่แข็งด้วย Air blast ที่อุณหภูมิประมาณ – 20 $^{\circ}$C แล้วนำมาเก็บที่ Still air โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บออกเป็น 3 ระดับคือ –10, - 20 และ – 75 $^{\circ}$C ทำการนับจำนวน *S. derby* ทั้งหมดและแข็งแรงทุก ๆ สัปดาห์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ รูปที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บแสดงผลในรูปที่ 36 - 47 จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างมีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ หลังเก็บที่ – 10, - 20 และ – 75 $^{\circ}$C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยมีอัตราการลดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 5 พบว่าเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บต่ำลง ระยะเวลา (สัปดาห์) ที่จำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บ ลดลงเป็นจำนวน 1 Log cfu มีระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งหมายความว่าเมื่อเก็บเชื้อที่อุณหภูมิต่ำกว่าศูนย์มาก ๆจะมีผลทำให้เชื้อตายและบาดเจ็บน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิสูงกว่าและให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันกับการทดลองเก็บ Salmonella suspensionแช่แข็งที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการทดลองเก็บSalmonella suspensionแช่แข็งการแช่แข็งที่ air blast อุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าศูนย์มาก ๆ การตายและบาดเจ็บของเซลล์ซาลโมเนลล่าจะเกิดน้อยลงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่าซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองเก็บ Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าศูนย์มาก ๆ การตายและบาดเจ็บของเซลล์ซาลโมเนลล่าจะเกิดน้อยลงเมื่อเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่า นอกจากนั้นยังให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองของMacleodและ Calcott (1976) ซึ่งทดลองเก็บเซลล์จุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำกว่า – 60 ° C พบว่ามีการลดลงของอัตราการตายของเซลล์จุลินทรีย์และอัตราการตายของเซลล์จุลินทรีย์เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า – 60 ° C มีอัตราน้อยมาก นอกจากนี้ยังมีรายงานที่เกี่ยวสาเหตุที่จุลินทรีย์ตายในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆจะมีผลมาจาก การตกตะกอนของ Solute ต่าง ๆในระหว่างการเก็บ (van derBerg, 1968) การลดลงของ pH (Mazur, 1966) และการเติบโตของผลึกน้ำแข็งซึ่งเกิดจากการตกตะกอนใหม่ของผลึกน้ำแข็ง (Davies, 1970) นอกจากนั้นอาจมีผลมาจากการเกิดผลึกใหม่(Recystalization) ในระหว่างการเก็บ Fennema, 1973 ได้อธิบายเกี่ยวกับการเกิดผลึกใหม่ว่าถ้าผลึกที่เกิดขึ้นแล้วมีความคงตัว การควบคุมขนาดและรูปร่างผลึกก็สามารถกระทำได้ง่าย แต่ในความเป็นจริงแล้ว ผลึกจะอยู่ในสภาพที่ไม่คงที่ในระหว่างการเก็บเยือกแข็ง ผลึกเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปของผลึก ซึ่งหมายถึงการเกิดผลึกใหม่นั่นเอง โดยมีการเปลี่ยนแปลงของจำนวน ขนาดรูปร่าง การจัดเรียงตัวหรือความสมบูรณ์ของผลึก หลังจากที่เปลี่ยนสภาพเป็นของแข็งอย่างสมบูรณ์แล้วในครั้งแรก การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลต่อจุลินทรีย์ ซึ่งเกิดจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นระหว่าง การแช่แข็งที่ไม่คงตัวดังกล่าวมาแล้ว และเนื่องจากอุณหภูมิมีการขึ้น ๆ ลง ๆ (Fluctuation) ระหว่างการเก็บในสภาพเยือกแข็ง โดยทั่วไปแล้ว อัตราการเกิดผลึกใหม่นี้จะขึ้นกับอุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิใกล้จุดเยือกแข็งเริ่มต้น อัตราการเกิดขึ้นจะสูง และถ้าอุณหภูมิต่ำมาก อัตราการเกิดจะต่ำ ดังนั้นการควบคุมการตกผลึกใหม่ สามารถกระทำได้โดยควบคุมอุณหภูมิที่เก็บให้ต่ำและคงที่ Calcott (1978) ได้อธิบายว่าการเกิดผลึกน้ำแข็งใหม่มักจะเกิดในขณะที่เก็บ การเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของขนาดและรูปร่างของผลึก โดยการเกิดเหตุการณ์จะขณะที่อุณหภูมิของการเก็บสูงกว่าอุณหภูมิ – 18 ° C ซึ่งมักจะเกิดจากการอุณหภูมิในการเก็บมีการเปลี่ยนแปลงขึ้น ๆ ลง ๆ (Temperature fluctulations) เมื่อผลึกมีการขนาดที่ใหญ่ขึ้นทำให้อัตราการสูญเสียน้ำเกิดมากขึ้น จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายและการบาดเจ็บเพิ่มขึ้นในขณะที่เก็บเชื้อจุลินทรีย์

4.2 ศึกษาปัจจัยที่ *S. derby* ฟื้นตัวจากการบาดเจ็บหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง

4.2.1 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* ที่บาดเจ็บหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

ผลการเปรียบเทียบจำนวนของ *S. derby* ทั้งหมดและ *S. derby* ที่แข็งแรงหลังจากนำ *S. derby* ที่บาดเจ็บในตัวอย่าง สารละลายSalmonella แช่แข็ง มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ กัน โดยนับจำนวนเชื้อในชั่วโมงที่ 3 6 9 และ 24 หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว แสดงผลในรูปที่ 7 โดยแต่ละการทดลองมีจำนวนเชื้อทั้งหมดเฉลี่ย เท่ากับ48 CFU/ ml (นับจำนวนเชื้อบนอาหาร TSAYE)จำนวนเชื้อที่แข็งแรงเฉลี่ยเท่ากับ 11 CFU / ml (นับจำนวนเชื้อบนอาหาร XLD) โดยเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บได้เท่ากับ 77.08%



รูปที่ 7 จำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานต่าง ๆ (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่าง สารละลายSalmonella แช่แข็ง)

ตารางที่ 6 แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรง และอัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 - 24 ชั่วโมง

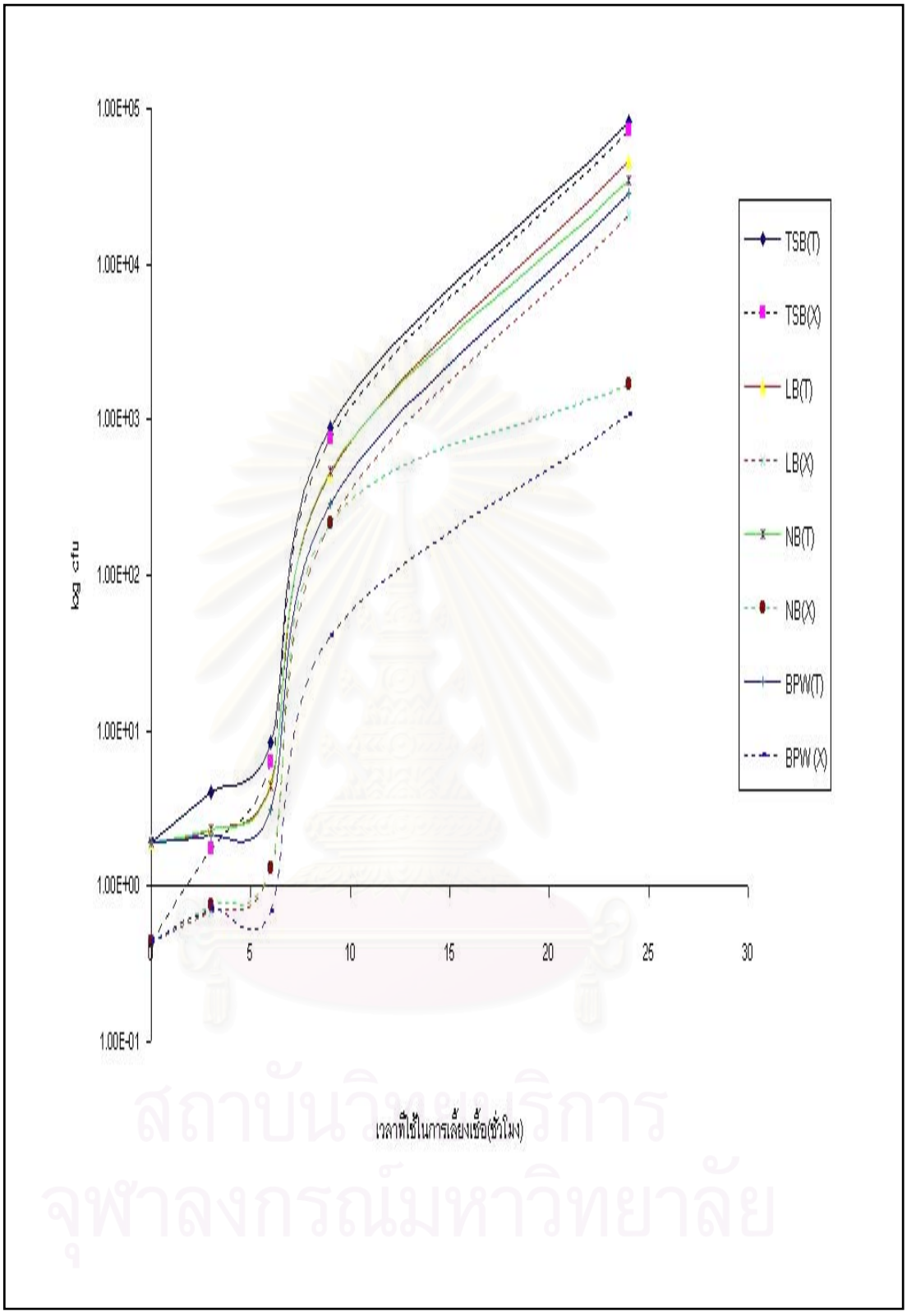
ชนิดอาหาร : ชั่วโมง	จำนวนเชื้อทั้งหมด/จำนวนเชื้อตั้งต้น	จำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อที่แข็งแรง	อัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด
TSB:3	2.01	3.59	0.41
LB:3	1.11	1.27	0.26
NB:3	1.08	1.09	0.23
BPW:3	1.04	1.09	0.24
TSB:6	4.17	13.36	0.73
LB:6	2.17	2.45	0.26
NB:6	2.00	1.91	0.22
BPW:6	1.54	1.54	0.23
TSB:9	420.83	1511.36	0.82
LB:9	219.27	459.09	0.48
NB:9	189.58	331.82	0.40
BPW:9	144.79	87.73	0.14
TSB:24	42031.25	152500.00	0.83
LB:24	21510.42	42954.55	0.46
NB:24	17552.08	31818.18	0.42
BPW:24	13541.67	2145.46	0.04

จากการทดลองนำ Salmonella suspensionแช่แข็ง ที่เก็บที่ Still air อุณหภูมิ – 20 °C เป็นเวลา 3 เดือน มาละลายน้ำแข็ง ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์ของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C จากนั้น นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Pre-enrichment media) โดยแปรชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 4 ชนิด ดังนี้ Buffered peptone water (BPW), Nutrient broth (NB), Tryptic soy broth (TSB) และ Lactose broth (LB) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 ° C (อุณหภูมิที่ *Salmonella spp.*เจริญได้ดีที่สุด) นับจำนวนเชื้อทั้งหมดหลังการถ่ายเชื้อลงใน Pre– enrichment media เป็นเวลา 0, 3,6,9 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เปรียบ

เทียบการฟื้นตัว ของ *S. derby* พบว่าที่ชั่วโมงที่ 3 หลังการเลี้ยง จำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงมีจำนวนเพิ่มขึ้นและมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดโดยอาหารที่ส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อทั้งหมดสามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้คือ TSB, LB, NB และ BPW ส่วนจำนวนเชื้อที่แข็งแรงพบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจนคือกลุ่มแรกคือ TSB และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย LB, NB และ BPW โดยTSBจะเป็นอาหารที่ส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนเชื้อที่แข็งแรงได้ดีกว่าอาหารในกลุ่มหลัง จากผลการทดลองหลังเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 6 9 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าอาหาร TSB เป็นอาหารที่ส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงมากที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลองเพราะสามารถทำให้เชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงเพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็ว หลังจากเลี้ยงเชื้อในเวลาเท่ากัน สามารถเรียงลำดับอาหารที่ส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงจากมากไปน้อยดังนี้คือTSB , LB ,NB และ BPW ตามลำดับ จากการทดลองนี้ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการทดลองของ อดิสร เสวตวิวัฒน์ และ นภา โล่ห์ทอง (2534) ซึ่งทำการทดลองเรื่องอาหารเพาะเชื้อสำหรับพรีเอนริชซานโมเนลลาในแหนมและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อ จากการทดลองพบว่า เมื่อเทียบระหว่าง pre – enrichment 2 ชนิดคือ TSB และ LB พบว่า TSB สามารถทำให้ซานโมเนลลาฟื้นตัวจากการบาดเจ็บได้ดีกว่า LB เนื่องจากระหว่างการบ่มในอาหาร LB ค่า pH จะมีการลดลงอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ TSB เป็นอาหารที่ทำให้จุลินทรีย์มีการฟื้นตัวที่ดีกว่า LB

ส่วนผลการเปรียบเทียบจำนวนของ *S. derby* ทั้งหมดและ *S. derby* ที่แข็งแรงหลังจากนำ *S. derby* ที่บาดเจ็บในตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ กัน โดยนับจำนวนเชื้อในชั่วโมงที่ 3 6 9 และ 24 หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว แสดงผลในรูปที่ 8 ในแต่ละการทดลองมีจำนวนเชื้อทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ1.8 CFU/ g (นับจำนวนเชื้อบนอาหาร TSAYEที่ผสม Ammonium iron (III) citrate และSodium thiosulphate) จำนวนเชื้อที่แข็งแรงเฉลี่ยเท่ากับ 0.36 CFU/ g (นับจำนวนเชื้อบนอาหาร XLD)โดยมีเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บเท่ากับ 77.50 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 จำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานต่าง ๆ (เชื้อเริ่มต้นจาก ตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรง และอัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 - 24 ชั่วโมง

ชนิดอาหาร : ชั่วโมง	จำนวนเชื้อทั้งหมด/ จำนวนเชื้อเริ่มต้น	จำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อที่แข็งแรง	อัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด
TSB:3	2.31	4.56	0.40
LB:3	1.29	1.86	0.29
NB:3	1.30	2.08	0.32
BPW:3	1.14	1.97	0.34
TSB:6	4.73	17.33	0.73
LB:6	2.55	3.61	0.28
NB:6	2.50	3.67	0.29
BPW:6	1.74	1.75	0.20
TSB:9	492.22	2127.78	0.86
LB:9	249.44	605.56	0.49
NB:9	252.78	591.67	0.47
BPW:9	156.67	115.28	0.15
TSB:24	45888.89	201111.10	0.88
LB:24	25444.44	57166.67	0.45
NB:24	16611.11	46388.89	0.56
BPW:24	15555.56	3027.78	0.04

จากการทดลองนำ Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง ที่เก็บที่ still air อุณหภูมิ – 20 °C เป็นเวลา 3 เดือน มาละลายน้ำแข็ง ใน water bath ที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C จากนั้นเติม นำตัวอย่างมาเติม Peptone water จำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วนำไปตีป่นด้วยเครื่อง Stomacher แล้วนำตัวอย่างจำนวน1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Pre-enrichment media) โดยแปรชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 4 ชนิดดังนี้ Buffered peptone water (BPW), Nutrient broth (NB), Tryptic soy broth (TSB) และ Lactose broth (LB) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 ° C (อุณหภูมิที่ *Salmonella spp.*เจริญได้ดีที่สุด) นับจำนวน

เชื้อทั้งหมดหลังการถ่ายเชื้อลงใน Pre– enrichment media เป็นเวลา 0, 3,6,9 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* พบว่า หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังเลี้ยงในอาหารแต่ละชนิดมีความแตกต่างทางถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยอาหารที่ส่งเสริมการเจริญให้เชื้อทั้งหมดมีจำนวนเพิ่มมากที่สุด สามารถเรียงลำดับได้ดังนี้คือ TSB , NB ,LB และ BPW ส่วนอาหารที่ส่งเสริมให้เชื้อที่แข็งแรงเพิ่มจำนวนขึ้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้ กลุ่มแรกคือ TSB ส่วนกลุ่มที่สองคือ LB, NB และ BPW ส่วนผลการทดลองหลังการเลี้ยงในชั่วโมงที่ 6 9 และ 24 พบว่า อาหารที่ส่งเสริมให้มีการเจริญของจำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงสามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้คือ TSB , LB , NB และ BPW เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองการฟื้นตัวของ *S.derby* ที่บาดเจ็บในตัวอย่างสารละลายSalmonella แช่แข็ง พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกันคือ อาหารที่ส่งเสริมให้มีการเจริญของจำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงสามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้คือ TSB , LB , NB และ BPW จากการทดลองนี้ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการทดลองของ อดิสร เสวตวิวัฒน์ และ นภา โล่ห์ทอง (2534)

จากผลการทดลองของทั้งสองการทดลอง ถ้าพิจารณาในแง่ของ pre – enrichment ที่ดีคือจะต้องเป็นอาหารที่ทำให้เชื้อที่บาดเจ็บฟื้นตัวจากการบาดเจ็บได้ดีและทำให้จำนวนเชื้อทั้งหมดไม่เพิ่มจำนวนมาก จากผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ 77.50% , 77.08% ในอาหาร TSB เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาชั่วโมงที่ 6 สามารถทำให้เชื้อที่แข็งแรงเพิ่มขึ้น17.33 เท่าของจำนวนเชื้อตั้งต้น , 13.36 เท่าของจำนวนเชื้อตั้งต้น ตามลำดับ นอกจากนั้นที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังการเลี้ยง จำนวนเท่าของการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อทั้งหมดมีจำนวนไม่มากกว่าจำนวนเท่าของการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อที่แข็งแรง และอัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด มีค่าใกล้เคียงกับการเลี้ยงที่เวลานานกว่า คือมีค่าเท่ากับ 0.73 ดังนั้นอาหาร TSB จึงน่าจะเป็น pre – enrichment ที่ดีเมื่อเทียบกับอาหารพื้นฐานชนิดอื่น ๆ

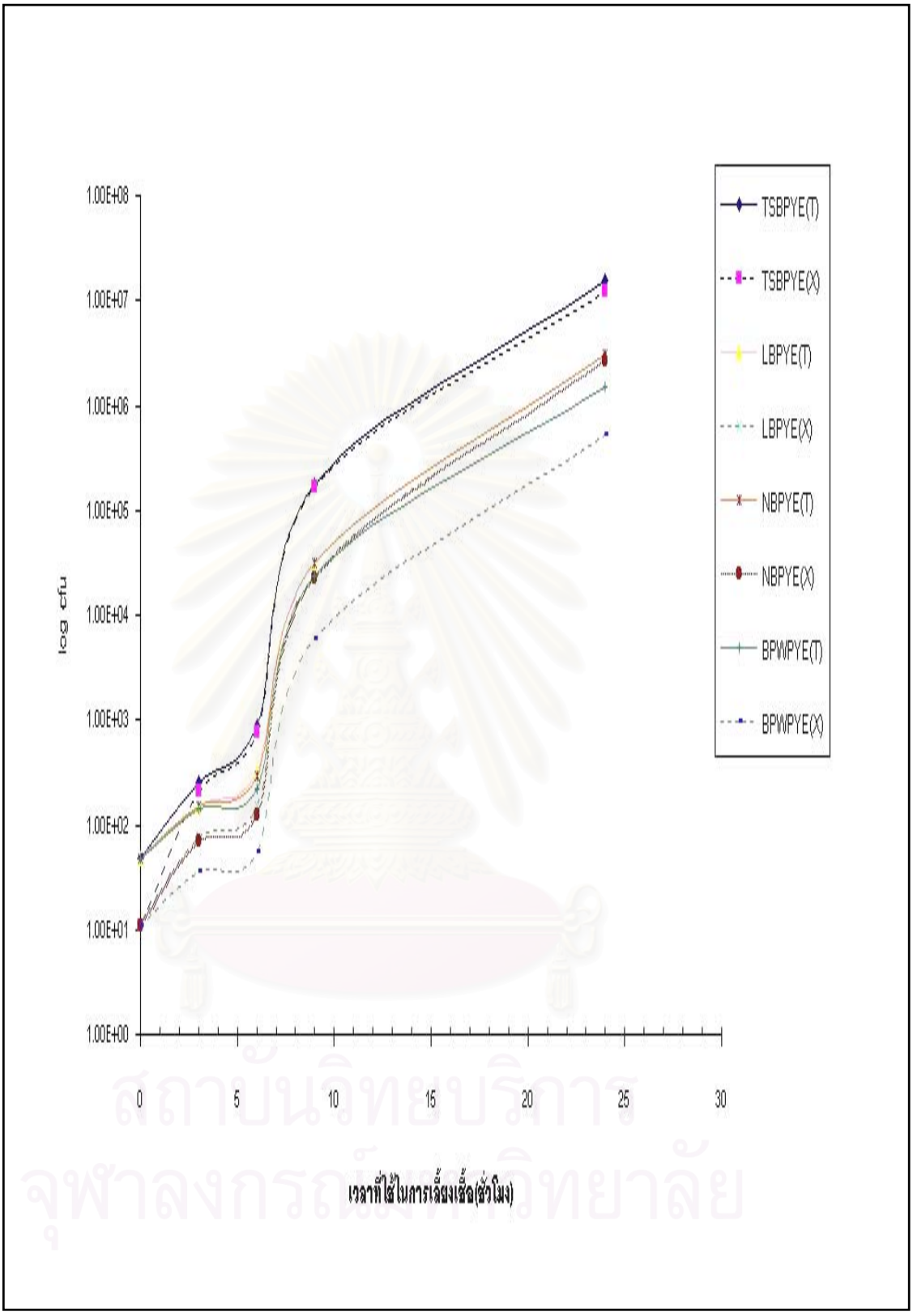
4.2.2 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S. derby* ที่บาดเจ็บหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีการเติมสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (Yeast extract และ Sodium pyruvate) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp.(Brilliant green)

ผลการเปรียบเทียบจำนวนของ *S. derby* ทั้งหมดและ *S. derby* ที่แข็งแรงหลังจากนำ *S. derby*ที่บาดเจ็บในตัวอย่าง สารละลายSalmonellaแช่แข็งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด

ต่าง ๆ ที่มีการเติม1%ของ Yeast extract (YE), 1% ของ Sodium pyruvate (P) และ 0.0018% ของ Brilliant green (BG) โดยนับจำนวนเชื้อในชั่วโมงที่ 3 6 9 และ 24 หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว แสดงผลในรูปที่ 8 และ 9 โดยแต่ละการทดลองมีจำนวนเชื้อเท่ากับการทดลองที่ 3.5.2.1.1

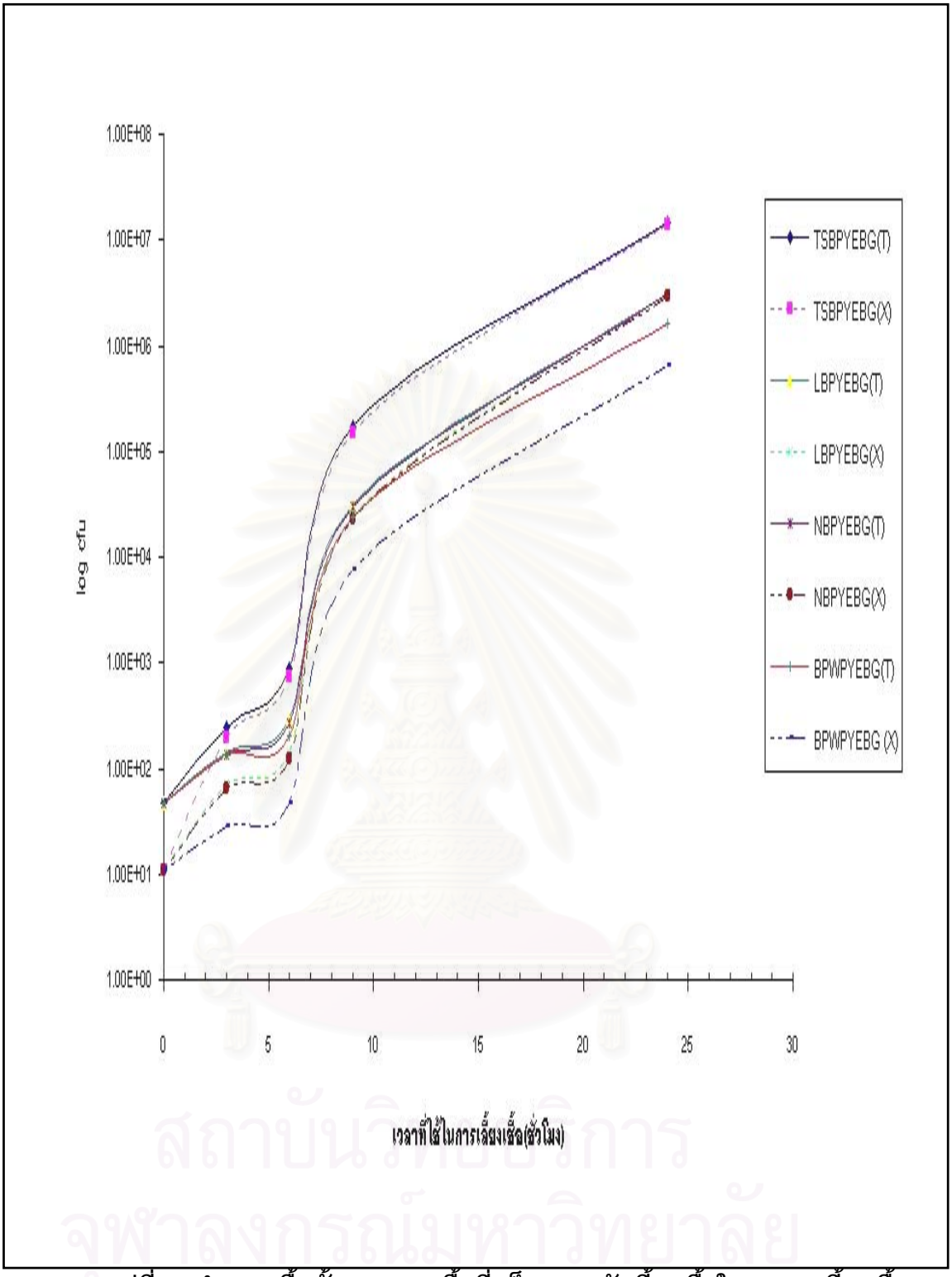
จากการทดลองนำ สารละลายSalmonella ที่ผ่านแช่แข็ง ด้วย Air blast อุณหภูมิประมาณ – 20 °C และเก็บที่ Still air อุณหภูมิ – 20 °C เป็นเวลา 3 เดือน มาละลายน้ำแข็ง ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์ของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C จากนั้นนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Pre-enrichment media)ทั้ง 4 ชนิด(X) ที่ผสมกับสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (Repairing agent) ดังนี้ 1%ของ Yeast extract (YE), 1% ของ Sodium pyruvate (P) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ Microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ซาลโมเนลล่าคือ 0.0018% ของ Brilliant green (BG) ซึ่งจะได้สูตรอาหารทั้งหมด 3 สูตรดังนี้คือ X , XPYE และ XPYBG เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 °C โดยอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานมีดังนี้ คือ Buffered peptone water (BPW) ,Nutrient broth (NB), Tryptic soy broth (TSB) และ Lactose broth (LB)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 จำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรง หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่มีการเติม 1%ของ Yeast extract และ1% ของ Sodium pyruvate (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่าง สารละลายSalmonella แช่แข็ง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 **จำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรง หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่มีการเติม** 1%**ของ** Yeast extract, 1% **ของ** Sodium pyruvate **และ**0.0018% **ของ** Brilliant green (**เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่าง สารละลาย**Salmonella **แช่แข็ง**)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นับจำนวนเชื้อทั้งหมดหลังการถ่ายเชื้อลงใน Pre– enrichment media เป็นเวลา 0, 3,6,9 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เปรียบเทียบการฟื้นตัวและรอดตายของ *S. derby* รูปที่ 8 เป็นผลการทดลองที่แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งหลังเลี้ยงในอาหารที่มีการเพิ่ม Sodium pyruvate และ Yeast extract เพิ่มลงในอาหารสูตรพื้นฐาน พบว่าอาหารชนิดนี้เป็นอาหารที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ คือจะทำให้เชื้อทั้งหมดสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วมากกว่าเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน นอกจากนั้นยังทำให้จำนวนเชื้อที่แข็งแรงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว นั่นหมายความว่าเชื้อที่บาดเจ็บอาจมีการฟื้นตัวจนสามารถเจริญบนอาหารที่ใช้ตรวจนับได้แล้ว เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดมาทดสอบทางสถิติ พบว่าหลังการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 – 24 มีความแตกต่างทางสถิติของจำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) รูปที่ 8 เป็นผลการทดลองที่แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงหลังเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม Sodium pyruvate ,Yeast extract และ Brilliant green dye พบว่าให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกันกับการเติม Sodium pyruvate และ Yeast extractซึ่งแสดงผลในรูปที่ 9 คือ มีการเพิ่มจำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงได้เร็วกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

ตารางที่ 8 แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรง และอัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 - 24 ชั่วโมง

ชนิดอาหาร : ชั่วโมง	จำนวนเชื้อทั้งหมด/ จำนวนเชื้อตั้งต้น	จำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อที่แข็งแรง	อัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด
TSBPYE:3	5.33	18.61	0.80
LBPYE:3	3.20	6.89	0.49
NBPYE:3	3.07	6.14	0.46
BPWPYE:3	2.99	2.95	0.23
TSBPYE:6	17.5	66.82	0.875
LBPYE:6	6.41	13.77	0.49
NBPYE:6	5.92	11.43	0.44
BPWPYE:6	4.58	4.84	0.24
TSBPYE:9	3588.54	14954.55	0.96
LBPYE:9	650.52	2193.19	0.77

NBPYE:9	635.94	2029.55	0.73
BPWPYE:9	477.60	502.27	0.24
TSBPYE:24	318750.00	1165909.00	0.84
LBPYE:24	63802.08	254681.82	0.88
NBPYE:24	63906.25	203636.36	0.73
BPWPYE:24	31875	47500	0.34

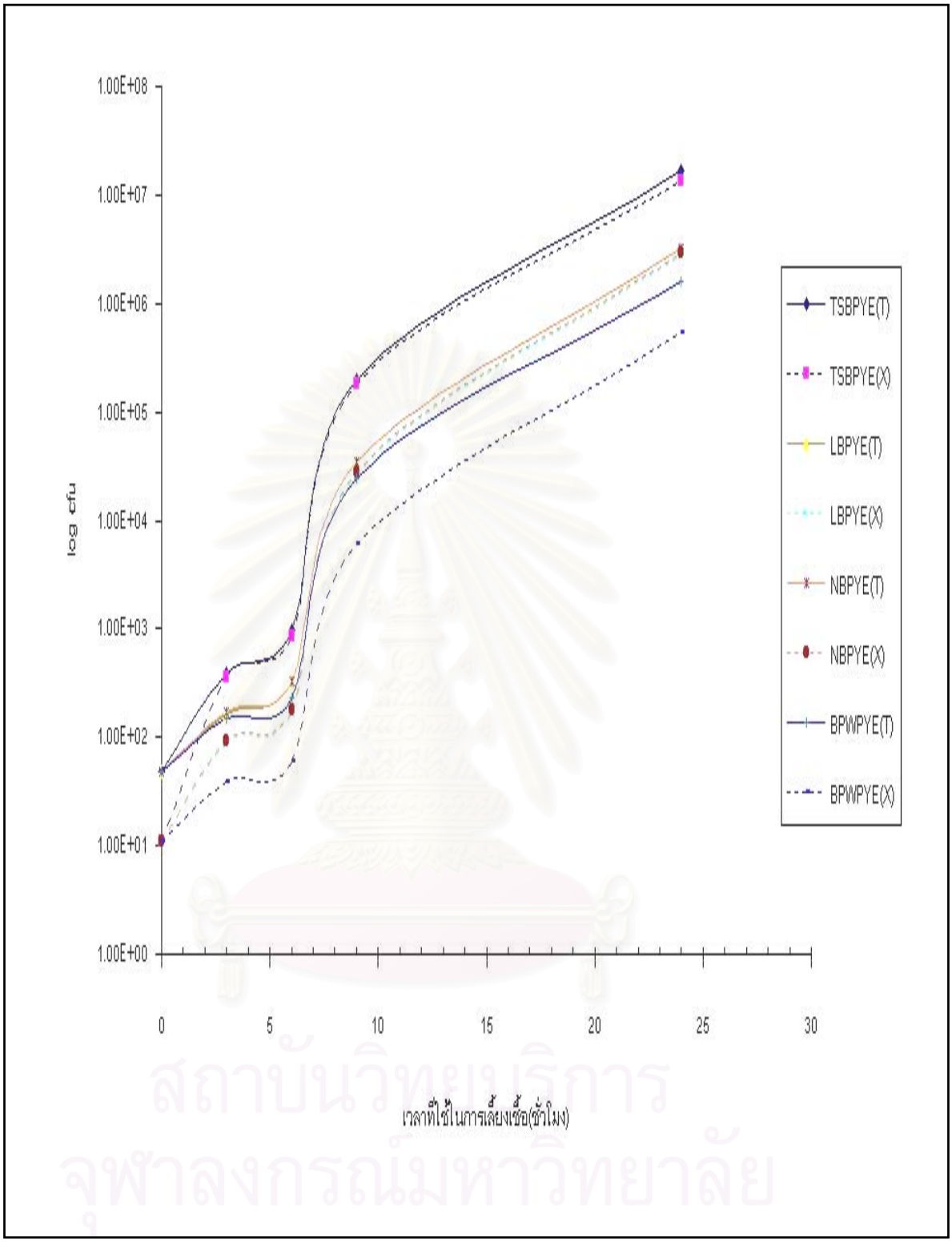
ตารางที่ 9 แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรง และอัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 - 24 ชั่วโมง

ชนิดอาหาร : ชั่วโมง	จำนวนเชื้อทั้งหมด/จำนวนเชื้อตั้งต้น	จำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อที่แข็งแรง	อัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด
TSBPYEBG:3	4.88	17.70	0.83
LBPYEBG:3	2.92	6.27	0.49
NBPYEBG:3	2.77	5.95	0.49
BPWPYEBG:3	2.76	2.41	0.20
TSBPYEBG:6	18.02	67.39	0.86
LBPYEBG:6	6.09	12.57	0.47
NBPYEBG:6	5.45	10.84	0.46
BPWPYEBG:6	4.11	4.27	0.24
TSBPYEBG:9	3562.50	13636.36	0.88
LBPYEBG:9	655.73	2113.64	0.74
NBPYEBG:9	634.90	2031.82	0.73
BPWPYEBG:9	502.08	704.54	0.32
TSBPYEBG:24	303125.00	1275000.00	0.96
LBPYEBG:24	62708.33	263409.09	0.96
NBPYEBG:24	63593.75	27818.18	0.98
BPWPYEBG:24	33854.17	58863.64	0.40

ผลการเปรียบเทียบจำนวนของ *S. derby* ทั้งหมดและ *S. derby* ที่แข็งแรงหลังจากนำ *S. derby*ที่บาดเจ็บในตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีการเติมสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (1%ของ Yeast extract และ1% ของ Sodium pyruvate) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่*Salmonella* spp.(0.0018% ของ Brilliant green)โดยนับจำนวนเชื้อในชั่วโมงที่ 3 6 9 และ 24 หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว แสดงผลในรูปที่ 9 และ 10 โดยแต่ละการทดลองมีจำนวนเชื้อเท่ากับการทดลองที่ 3.5.2.1.2

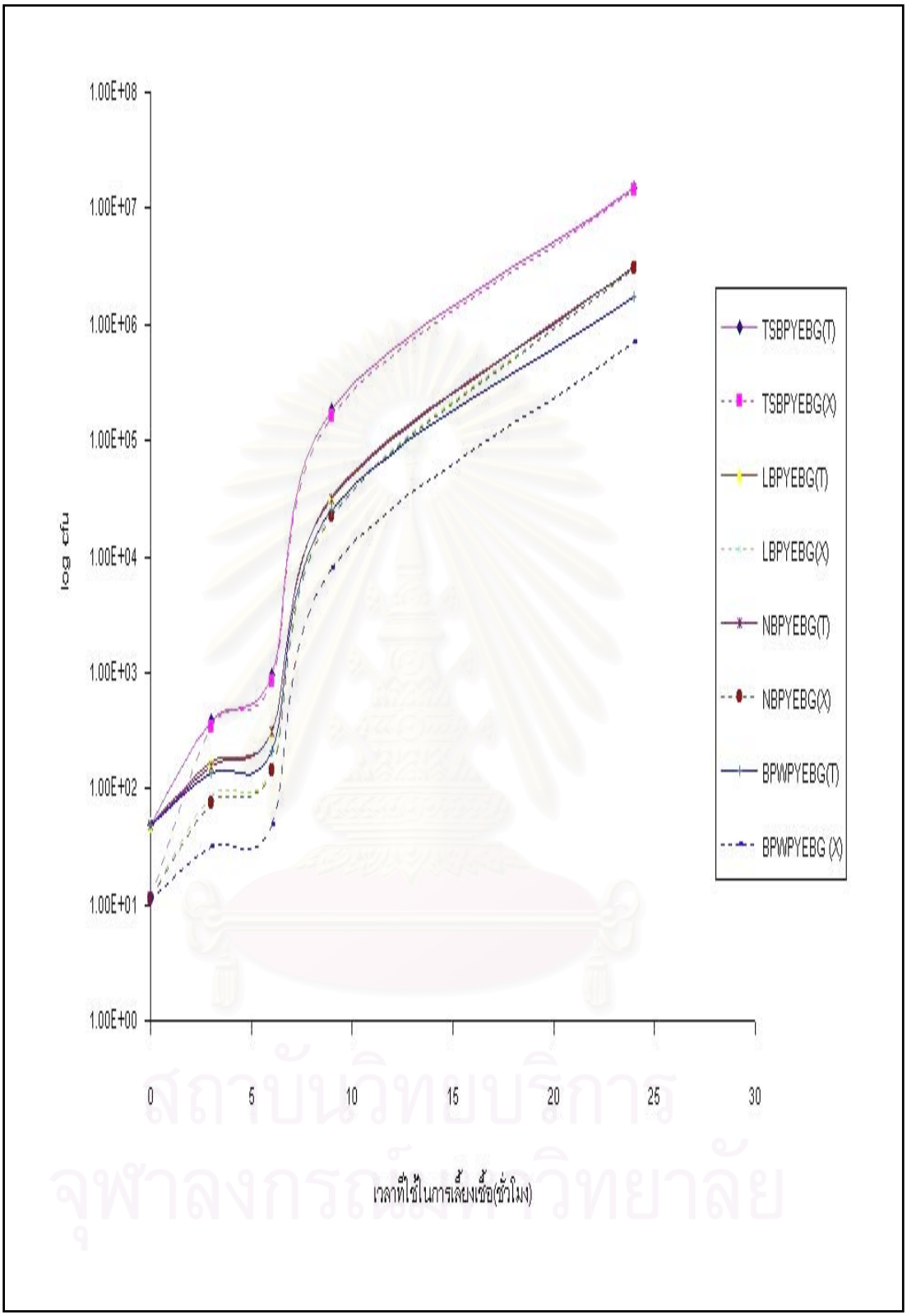
จากการทดลองนำ Salmonella ในกุ้งกุลาดำ ที่ผ่านแช่แข็ง ด้วย Air blast อุณหภูมิประมาณ – 20 °C และเก็บที่ Still air อุณหภูมิ – 20 °C เป็นเวลา 3 เดือน มาละลายน้ำแข็ง ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดศูนย์ของตัวอย่างเท่ากับ 5 °C จากนั้น นำมาเติม Peptone water จำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วนำไปตีป่นด้วย Stomacher จากนั้นนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Pre-enrichment media)ทั้ง 4 ชนิด(X)ที่ผสมกับสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (Repairing agent) ดังนี้ 1%ของ Yeast extract (Y) , 1% ของ Sodium pyruvate (P) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ Microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ซาลโมเนลล่าคือ 0.0018 % ของ Brilliant green (BG) ซึ่งจะได้สูตรอาหารทั้งหมด 3 สูตรดังนี้คือ X , XPY และ XPYBG เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 °C (MadelineVelazquez และคณะ,2000) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานมีดังนี้ คือ Buffered peptone water(BPW) ,Nutrient broth (NB), Tryptic soy broth (TSB) และ Lactose broth (LB)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 จำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรง หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่มีการเติม 1%ของ Yeast extract และ1% ของ Sodium pyruvate (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 จำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรง หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่มีการเติม 1%ของ Yeast extract ,1% ของ Sodium pyruvate และ 0.0018% ของ Brilliant green (เชื้อเริ่มต้นจากตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง)

นับจำนวนเชื้อทั้งหมดหลังการถ่ายเชื้อลงใน Pre– enrichment media เป็นเวลา 0, 3, 6,9 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S.derby* จากรูปที่ 10 เป็นผลการทดลองที่แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งหลังเลี้ยงในอาหารที่มีการเพิ่ม Sodium pyruvate และ Yeast extract ลงในอาหารสูตรพื้นฐานแต่ละชนิด พบว่าอาหารชนิดนี้เป็นอาหารที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วมากกว่าเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดมาทดสอบทางสถิติ พบว่าหลังการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 – 24 มีความแตกต่างทางสถิติของจำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากรูปที่ 11 เป็นผลการทดลองที่แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมดและเชื้อที่แข็งแรงหลังเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม Sodium pyruvate, Yeast extract และ Brilliant green dye พบว่าให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกันกับการเติม Sodium pyruvate และYeast extract คือ มีการเพิ่มจำนวนเชื้อทั้งหมดและจำนวนเชื้อที่แข็งแรงได้เร็วกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

ตารางที่ 10 แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรง และอัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 - 24 ชั่วโมง

ชนิดอาหาร : ชั่วโมง	จำนวนเชื้อทั้งหมด/ จำนวนเชื้อตั้งต้น	จำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อที่แข็งแรง	อัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด
TSBPYE:3	7.92	30.45	0.88
LBPYE:3	3.40	8.07	0.54
NBPYE:3	3.41	8.20	0.55
BPWPYE:3	3.15	3.27	0.27
TSBPYE:6	20.38	78.05	0.88
LBPYE:6	6.64	15.66	0.54
NBPYE:6	6.57	15.45	0.54
BPWPYE:6	4.90	5.82	0.27
TSBPYE:9	4062.50	15863.64	0.89
LBPYE:9	681.25	2393.18	0.81
NBPYE:9	688.54	2379.55	0.79
BPWPYE:9	515.63	590.91	0.26

TSBPYE:24	333333.33	1181818.2	0.81
LBPYE:24	63697.92	254090.91	0.91
NBPYE:24	63489.58	250000.00	0.90
BPWPYE:24	31510.42	47727.27	0.35

ตารางที่ 11 แสดงการเพิ่มของจำนวนเชื้อทั้งหมด , จำนวนเชื้อที่แข็งแรง และอัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อทั้งหมด หลังเลี้ยงเชื้อในอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 3 - 12 ชั่วโมง

ชนิดอาหาร : ชั่วโมง	จำนวนเชื้อทั้งหมด/ จำนวนเชื้อตั้งต้น	จำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อที่แข็งแรง	อัตราส่วนของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด
TSBPYEBG:3	7.79	29.70	0.87
LBPYEBG:3	3.45	7.57	0.50
NBPYEBG:3	3.21	6.69	0.47
BPWPYEBG:3	2.90	3.22	0.25
TSBPYEBG:6	19.71	76.00	0.88
LBPYEBG:6	6.31	13.20	0.48
NBPYEBG:6	6.40	13.14	0.47
BPWPYEBG:6	4.40	4.64	0.24
TSBPYEBG:9	3859.38	14522.73	0.86
LBPYEBG:9	670.83	2177.27	0.74
NBPYEBG:9	651.04	2029.55	0.71
BPWPYEBG:9	530.21	725.00	0.31
TSBPYEBG:24	312500.00	1272727.30	0.93
LBPYEBG:24	63906.25	274318.18	0.98
NBPYEBG:24	64479.17	274772.73	0.98
BPWPYEBG:24	35729.17	62727.27	0.40

จากตารางที่ 10 จะพบว่า หลังเลี้ยงเชื้อที่ได้จากตัวอย่างSalmonella suspensionแช่แข็งในชั่วโมงที่ 3 หลังการเลี้ยงในอาหาร TSBPYE จะเป็นอาหารที่เหมาะสำหรับการ pre – enrich

เมื่อเทียบกับอาหารที่เติมสารชนิดเดียวกันเพราะ มีค่าจำนวนเท่าของการเพิ่มของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงสูงคือเท่ากับ 18.61 นอกจากนั้นยังมีค่าอัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมดในสัดส่วนที่สูงคือมีค่าเท่ากับ 0.80 แต่ถ้านำมาเปรียบเทียบกับอาหาร TSBPYEBG แล้วพบว่า อาหาร TSBPYEBG น่าจะเป็น pre – enrichment ที่ดีกว่าเพราะให้ค่าอัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมดในสัดส่วนที่สูงกว่า คือมีค่าเท่ากับ 0.83 ถึงแม้ว่าค่าจำนวนเท่าของการเพิ่มของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อทั้งหมด จะน้อยกว่า

จากตารางที่ 11 จะพบว่า หลังเลี้ยงเชื้อที่ได้จากตัวอย่างSalmonella suspensionแช่แข็ง ในชั่วโมงที่ 3 หลังการเลี้ยงในอาหาร TSBPYE จะเป็นอาหารที่เหมาะสำหรับการ pre – enrich เมื่อเทียบกับอาหารที่เติมสารชนิดเดียวกันเพราะ มีค่าจำนวนเท่าของการเพิ่มของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงสูงคือเท่ากับ 30.45 นอกจากนั้นยังมีค่าอัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมดในสัดส่วนที่สูงคือมีค่าเท่ากับ 0.88 แต่ถ้านำมาเปรียบเทียบกับอาหาร TSBPYEBG แล้วพบว่า อาหาร TSBPYEBG น่าจะเป็น pre – enrichment ที่ดีกว่าเพราะถึงแม้ว่าค่าอัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อที่แข็งแรงต่อจำนวนเชื้อทั้งหมดในสัดส่วนที่น้อยกว่า คือมีค่าเท่ากับ 0.87 และยังมีค่าจำนวนเท่าของการเพิ่มของจำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อทั้งหมดน้อยกว่า แต่ก็มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากนั้น pre – enrichment ที่ดีจะต้องไม่เพิ่มจำนวนเชื้อทั้งหมดมากเกินไป และจากคุณสมบัติที่ดีของอาหาร TSBPYEBG คือเป็นอาหารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดอื่นได้ อาหารชนิดนี้จึงน่าจะเหมาะที่จะใช้เป็น pre – enrichmentที่ดี

จากผลการทดลองทั้งสองพบว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Hammack และคณะ ในปี 1993 (อ้างอิงโดย Madeline Velazquez ในปี ค.ศ.2000) ได้ใช้อุณหภูมิและการเติมสารบางชนิดเพื่อปรับปรุงวิธีการตรวจแบบดั้งเดิมให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นและการใช้อุณหภูมิในช่วง 40 – 43 $^{\circ}$C จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการฟื้นตัวของซาลโมเนลล่าในขั้นตอนที่ถูกเลี้ยง ในอาหาร Enrichment broth (D’Aoust et al. 1992) และการใช้สารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นๆได้ (Alcaide et al. 1987) ในปี 1993 Hammack et al. ได้พบว่าการเติมสารบางชนิดเช่น Pyruvate, Lactate และ Catalase ลงไปในอาหารเลี้ยง เชื้อจะช่วยให้เชื้อฟื้นตัวได้ดีขึ้น เหตุผลต่าง ๆ เหล่านี้จะเป็นการปรับปรุงคุณภาพของอาหารที่ใช้ตรวจหาเชื้อที่บาดเจ็บให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการแช่แข็ง Salmonella suspensionด้วยอัตราเร็ว 4 ระดับคือ 0.62, 1.05 , 2.00 และ 60.00 cm/hr พบว่าเมื่ออัตราเร็วในการแช่แข็งสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บเพิ่มขึ้นแต่เปอร์เซ็นต์รอดตายลดลง จากการแช่แข็ง Salmonella ในกุ้งกุลาดำ ด้วยอัตราเร็ว 4 ระดับคือ 0.45, 0.79 , 1.50และ 45.00 cm/hr พบว่าให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกันคือเมื่ออัตราเร็วในการแช่แข็งสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บเพิ่มขึ้นแต่เปอร์เซ็นต์รอดตายลดลง คือเมื่ออัตราเร็วในการแช่แข็งสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์รอดตาย ลดลง และ เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ เพิ่มขึ้น

นอกจากการแช่แข็งจะมีผลต่อการบาดเจ็บของจุลินทรีย์แล้ว ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บก็มีผลต่อการบาดเจ็บและรอดตายของจุลินทรีย์เช่นกัน จากการทดลองเก็บSalmonella suspensionที่แช่แข็งด้วยอัตราเร็วเท่ากับ1.5 cm/hrโดยการแช่แข็งที่ air blastอุณหภูมิประมาณ – 20°C ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าศูนย์มาก ๆ การตายและบาดเจ็บของเซลล์ซาลโมเนลล่าจะเกิดน้อยลง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการเก็บ Salmonella ในกุ้งแช่แข็ง

สำหรับการทดลองเรื่องการฟื้นตัวของเชื้อที่บาดเจ็บหลังจากผ่านการเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานชนิดต่าง ๆ พบว่า อาหาร TSB เป็นอาหารเหมาะที่จะเป็น pre – enrichment ที่ดี แต่ถ้าเปรียบเทียบกับอาหารที่มีการเติมสารต่าง ๆ ลงไป พบว่า TSBPYE และTSBPYEBGเป็น pre – enrichment ที่ดีกว่า โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เป็นอย่างน้อย

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองเรื่องผลของการเก็บตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็ง และSalmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง ต่อการรอดตายและการบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์ น่าจะมีการศึกษาเรื่องผลึกของน้ำแข็งควบคู่ไปด้วย เมื่อเก็บตัวอย่างมานับจำนวนเชื้อก็น่าจะมีการดูการเปลี่ยนแปลงของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นด้วย
2. การศึกษาเรื่องผลของกระบวนการแช่แข็งต่อการรอดตายและบาดเจ็บของ *Salmonella* spp. ควรจะมีการศึกษาในสายพันธุ์อื่นๆ ด้วยนอกจาก *S. derby*
3. การศึกษาเรื่องการฟื้นตัวของ *Salmonella* spp. ควรจะมีการศึกษาในสายพันธุ์อื่นๆ ด้วยนอกจาก *S. derby*

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์.2542.ยอดส่งออกกุ้งแช่แข็งไทย ปี 2541. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ข่าวกุ้ง 128: 4.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ.2535. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.กรุงเทพมหานคร : ฐานเศรษฐกิจ.

นันทริกา ชันชื่อ . 2540. ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ . ในศุภชัย นิลวานิช (ผู้รวบรวม) , กุ้งกุลาดำทางเลือก – ทางรอด, หน้า 15 - 24. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มติชน.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ.2542. เอนเทอโรแบคทีริเอซี.แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค.ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2537. สาระน่ารู้เกี่ยวกับอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ (การตรวจหาแบคทีเรียซาลโมเนลลาในอาหาร), อาหาร, 24: 282 – 290.

ประจวบ หลำอุบล . 2533.กุ้ง . กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มัทนา แสงจินดาวงษ์ . 2538. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง . จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมงประเภทแช่เยือกแข็ง.หน้า 33-48 . ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .

มาลัย บุญรัตนกรกิจ . 2540 . จุลินทรีย์ในอาหารแช่แย็นและอาหารแช่เยือกแข็ง.จุลินทรีย์ในอาหารแช่แย็นและอาหารแช่เยือกแข็ง.หน้า 1 – 26. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณา ชูฤทธิ์ และคณะ 2533, การตรวจจุลินทรีย์ในอาหารทะเลแช่เยือกแข็ง, ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วัลลภ คงเพิ่มพูน.2534 . กุ้งกุลาดำ.กรุงเทพมหานคร. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริลักษณ์ สุวรรณรังษี และ กนกพรรณ ศรีมโนภาษ . 2541 . การปนเปื้อนและชนิดของเชื้อซาลโมแนลล่าในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำส่งออก. เอกสารวิชาการกรมประมง ฉบับที่ 4/2541

สุมาลี เหลืองสกุล. 2527. จุลชีววิทยาทางอาหาร, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

สุวิมล กีรติวิริยากรณ์ และ ศันสนีย์ ศรีจันทร์งาม. 2543.การปนเปื้อนของเชื้อแซลโมเนลล่าในวัตถุดิบกุ้งกุลาดำ.วารสารการประมง .ฉบับที่ 5. ปีที่ 53 . หน้า 455 – 459.

อดิสร เสวตวัฒน์ และนภา โล่ห์ทอง. 2534.อาหารเพาะเชื้อสำหรับพรีเอนริชซานโมเนลลาในแหนมและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเชื้อ.อาหาร.ฉบับที่6.ปีที่53.หน้าที่ 45 – 53 .

อรุณ บ่างตระกูลนนท์และ นพรัตน์ หมานริม. 2542. การเปรียบเทียบ Pre – enrichment 4 ในการตรวจหาซัลโมเนลลาจากอาหาร โดยวิธี MSRV. หน้า 61 – 95.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2541.คู่มือประกอบการวินิจฉัยแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ การตรวจยืนยันแบคทีเรียก่อโรคลำไส้.สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 29 : 193 – 201.

อัจฉรา พุ่มฉัตร.2532. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง.เอกสารประกอบการสอนวิชา จุลชีววิทยาประมง 25 หน้า

อรสา สุตเธียรกุล.2541.โรคติดเชื้อที่เกิดจากอาหารและน้ำ.เอกสารประกอบการสอบวิชา Advance Food Microbiology 50 หน้า

ภาษาอังกฤษ

Alcaide,E.,Aznar,R.,Puijalte,M.J. and Garay,E.,1987. Enumeration of salmonellas by most probable numble method from sewage polluted natural waters, comparing the use of preenrichment versus direct enrichment in NR 10 at different temperatures.Zentrablatt Fur Bakteriologie.184,34 – 41.

Anderson, I.1993. The Veterinary approach to Marine PRAWNS.In Brawn (ed.) Aquaculture for Veterinarians:Fish husbandruy and maducine,pp.271 – 290.Oxfoid:Pergamon Press.

Bailey,J.S. and Cox, N.A.,1992. Universal pre- enrichment broth for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria* in foods. J.Food Prot.55, 256 – 259.

Calcott,P.H. ,1978. In : Freezing and Thawing Microbes, Patterns of Progress, Meadowfield Press Ltd,Shildon,Co.Durham.

Center for Disease Control and Prevention .1996. Outbreaks of *Salmnella* serotype Enteritidis infection associated with consumption of raw shell eggs – United States,1994 – 1995 . Morbid. Mortal.Weekly Rep.45, 737- 742.

D' Aoust,J.Y.,Seweel,A.M. and McDonald,C.,1995. Recovery of *Salmonella* spp. from refrigerated pre – enrichment cultures of dry food composites.J.AOAC Int.78, 1322 – 1327.

Davies,J.E.,1970. In: The Frozen cell (Eds G.E.W.Wolstenholme and M.O' Conner) ,Churchill,London.

Denilde R. Nascumento , Regine H. S. F. Vieira , Hauston B. Almeida , Thakor R. Patel, and Sebatiao T. Iaria . 1998. Survival of *Vibrio cholerae* 01 Strain in Shrimp Subjected to Freezing and Boiling. J. food protection . 61 :1317 – 1320.

Fennema O. R., William D. P., and Elmer H. M. 1973 . Low-Temperature preservation of foods and living matter. Marcel Dekker, New York.

Hammack,T.S.,Satchell,F.B.,Andrews,W.H.,Amaguana,R.M.,June,G.A.,Sherrod,P.S.and Koopman,L.,1993. Abbreviated pre-enrichment period for recovery of *Salmonella* spp. from selected low- moisture dairy foods. J.Food .Prot.56,201-204.

Hayashi , S. and Yamazaki , H. 1998 . Enrichment of injured Salmonella in poultry profucts for detection by polymyxin – cloth enzyme immunoassay. Food Microbiol. 15 , 471 – 478.

Ingram,M.and Mackey,B.M.1976.In : Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes,(Eds F.A. Skinner and W.B. Hugo) ,Academic Press, London.

James,S.J. and Bailey,C.1982. Cooling rate in commercial process. Institute of Rerfrigeration Proceedings,78,33-41.

Keith,M.1997,Evaluation of an automated enzyme – linked fluorescent immunoassay system for the detection of Salmonellae in foods.J.Food.Prot.60,682-685.

Lowry, P.D. and Gill C.O. 1984.Effect of freezing on the microbial environment. J. Food. Prot.47, 309 – 311.

Macleod,R.A.and Calcott,P.H.,1976. In: Survival of Vegetative Bacteria (Eds T.R.G. Gray and J.R. Postgate),Cambridge University Press, Cambridge.

Madeline Valazquez et al. 2000. Evaluation of a two – step protocol for rapid detection of *Salmonella* in ice cream and cheddar cheese,J.Food Prot. 60, 682 – 685.

Mazur,P.1966, In : Cryobiology (ED.H.T.Meryman) ,Academic Press,Nen York.

Motoh,H.1985.Biology and Ecology of *Penaeus monodon* .In Itaki,Y., Primavera , J.H. ,AND Llobrera , J.A. (eds.), Pric. 1st Int. Cof.on Curture of Penaeid Prawns/Shrimps. Lloilo City , Philippines,SEAFDEC Aquaculture Department , pp. 27 – 36 .

Pignato,S.,Marino,A.M.,Emanuele,M.C.,Iannotta,V.,Caracappa,S.and Giammanco,G.,1995. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of salmonellae in foods.Appl.Environ.Microbiol.61,1966-1999.

Raith Dewanti and Micheal P. Doyle.1992.Ifluence of Cultural Conditions on Cytotoxin Production by Salmonella enteritidis,J.Food Prot. 55,28 – 33.

Refai M.K. 1980. Manuals of food quality control. Food and nutrition paper,14, 1 – 5 .

Robinson R.K. 1985. Microbiology of frozen foods . Elsevier Applied Science Publishers

Wheaton, F.A. and Thomas B. Lawson. 1985. Processing Aquatic Food Products. John Wiely & Sons, New York.518 pp.

Tietjen,M.and Fung,D.Y.1998.Salmonellae and food safety.Crit.Rev.Microbiol.21 ,53 – 83.

Van den Berg,L.,1968. In: Low Temperature Biology of Foodstuffs(Eds J.Hawthorn and E. J. Rolfe), Pergammon Press,London.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

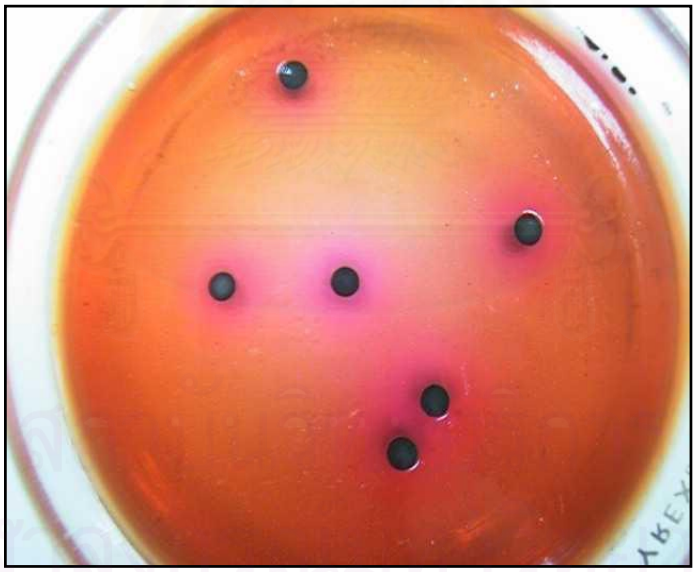
ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

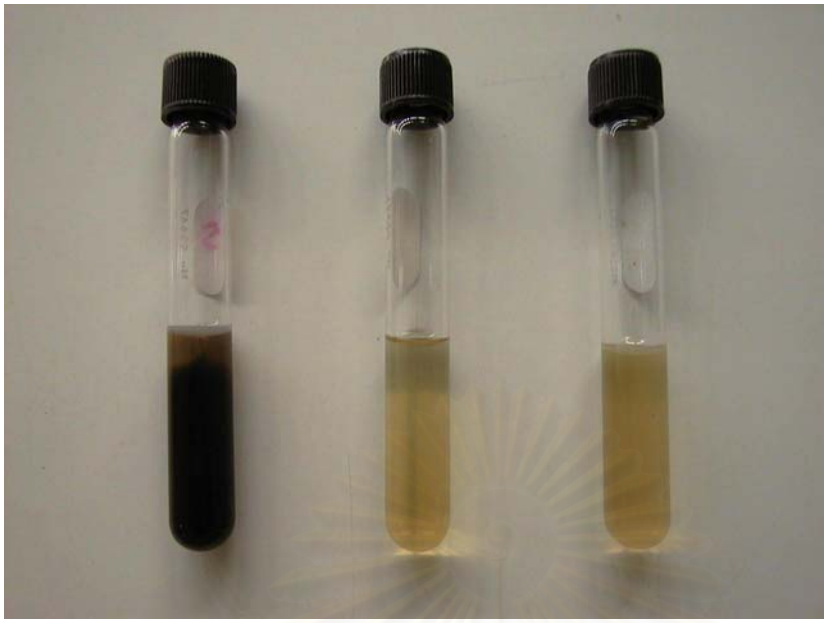
ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ภาพที่ 13 โคโลนีของ *Salmonella* spp. ที่ขึ้นบนอาหาร TSAYE

ภาพที่ 14 โคโลนีของ *Salmonella* spp. ที่ขึ้นบนอาหารTSAYE modified



ภาพที่ 15 ลักษณะของโคโลนีของ *Salmonella* spp. ที่เจริญบนอาหาร XLD



+ ve - ve control

ภาพที่ 16 **อาหาร** SIM medium

+ ve - ve

ภาพที่ 17 **อาหาร** Triple sugar iron agar (TSI)

+ ve

control

ภาพที่ 18 **อาหาร** Lysine iron agar (LIA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ข.1 ศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ Salmonella suspension

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมด จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บก่อนและหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งตัวออย่าง Salmonella suspensionเมื่อแช่แข็งตัวอย่างด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ

Freezing rate of Salmonella in solution (cm/hr):ซ้ำที่	จำนวนเชื้อทั้งหมดก่อนผ่านกระบวนการแช่แข็ง(CFU/ml)	จำนวนเชื้อทั้งหมดหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง(CFU/ml)	จำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง(CFU/ml)	จำนวนเชื้อที่บาดเจ็บหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง(CFU/ml)
0.62:1	3.9×10^{7}	1.6×10^{6}	1.2×10^{6}	4.0×10^{5}
0.62:2	6.7×10^{7}	2.7×10^{6}	2.0×10^{6}	6.8×10^{5}
0.62:3	2.8×10^{8}	1.1×10^{7}	8.5×10^{5}	2.8×10^{5}
0.62:4	1.6×10^{8}	6.3×10^{6}	4.7×10^{6}	1.6×10^{5}
1.05:1	5.9×10^{6}	1.8×10^{5}	1.3×10^{5}	5.6×10^{4}
1.05:2	1.6×10^{8}	4.7×10^{5}	3.2×10^{5}	1.5×10^{5}
1.05:3	2.6×10^{7}	7.9×10^{5}	5.6×10^{5}	2.4×10^{5}
1.05:4	5.2×10^{8}	1.6×10^{6}	1.1×10^{6}	4.8×10^{6}
2.00:1	4.9×10^{8}	5.1×10^{6}	2.5×10^{5}	2.6×10^{5}
2.00:2	6.6×10^{8}	6.7×10^{6}	3.2×10^{5}	3.4×10^{5}
2.00:3	1.6×10^{8}	2.0×10^{6}	1.0×10^{6}	1.0×10^{6}
2.00:4	1.6×10^{8}	1.6×10^{6}	8.0×10^{5}	8.0×10^{5}
60.00:1	5.2×10^{8}	8.1×10^{5}	1.5×10^{5}	6.6×10^{5}
60.00:2	4.1×10^{8}	6.1×10^{5}	1.2×10^{5}	5.0×10^{4}
60.00:3	1.9×10^{8}	3.0×10^{5}	5.7×10^{4}	2.4×10^{5}
60.00:4	1.1×10^{7}	1.5×10^{4}	2.9×10^{3}	1.2×10^{4}

ข.2 ศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

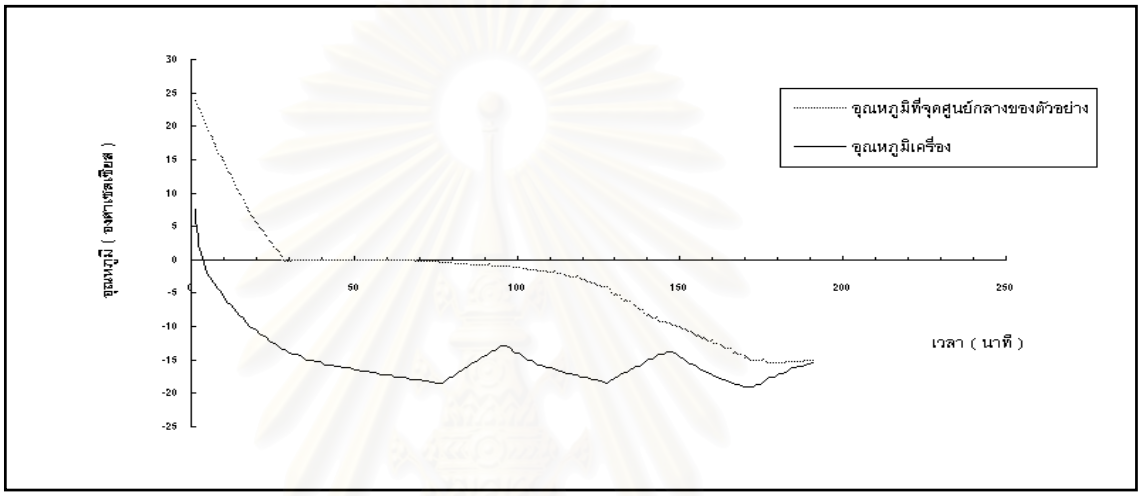
ตารางที่ 13 แสดงจำนวนเชื้อทั้งหมด จำนวนเชื้อที่แข็งแรงและจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บก่อนและหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งตัวออย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำเมื่อแช่แข็งตัวอย่างด้วยอัตราเร็วต่างๆ

Freezing rate of Salmonella added shrimp sample (cm/hr):ซ้ำที่	จำนวนเชื้อทั้งหมดก่อนผ่านกระบวนการแช่แข็ง(CFU/g)	จำนวนเชื้อทั้งหมดหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง(CFU/g)	จำนวนเชื้อที่แข็งแรงหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง(CFU/g)	จำนวนเชื้อที่บาดเจ็บหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง(CFU/g)
0.45:1	1.6×10^{6}	7.0×10^{4}	4.8×10^{4}	2.2×10^{4}
0.45:2	2.7×10^{6}	1.2×10^{5}	8.3×10^{4}	3.6×10^{4}
0.45:3	1.1×10^{7}	5.2×10^{5}	3.6×10^{5}	1.6×10^{5}
0.45:4	6.2×10^{6}	2.8×10^{5}	1.9×10^{5}	8.4×10^{4}
0.79:1	2.4×10^{5}	8.2×10^{3}	5.4×10^{3}	2.7×10^{3}
0.79:2	6.2×10^{6}	2.2×10^{5}	1.4×10^{5}	7.2×10^{4}
0.79:3	1.1×10^{7}	3.6×10^{5}	2.4×10^{5}	1.2×10^{5}
0.79:4	2.1×10^{7}	7.1×10^{5}	4.7×10^{5}	2.4×10^{5}
1.50:1	2.0×10^{7}	2.8×10^{5}	1.2×10^{5}	1.5×10^{5}
1.50:2	2.6×10^{7}	3.7×10^{5}	1.7×10^{5}	2.1×10^{5}
1.50:3	7.8×10^{6}	1.2×10^{5}	5.2×10^{4}	6.5×10^{4}
1.50:4	6.2×10^{6}	9.4×10^{4}	4.2×10^{4}	5.2×10^{4}
45.00:1	2.1×10^{7}	4.2×10^{4}	9.2×10^{3}	3.3×10^{4}
45.00:2	1.6×10^{5}	3.1×10^{4}	6.7×10^{3}	2.5×10^{4}
45.00:3	7.4×10^{6}	1.7×10^{4}	3.7×10^{3}	1.4×10^{4}
45.00:4	4.4×10^{5}	9.6×10^{2}	2.1×10^{2}	7.5×10^{2}

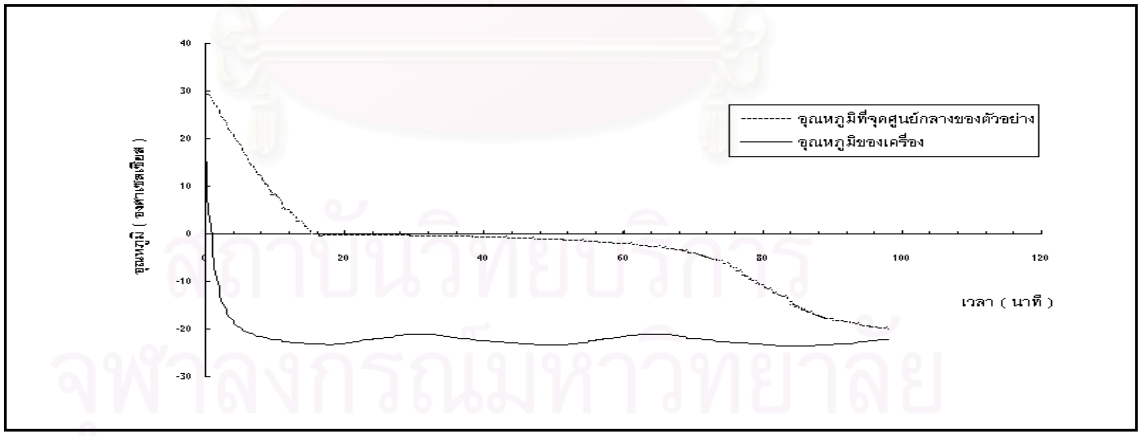
ภาคผนวก ค.

ค.1 ศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ Salmonella suspension

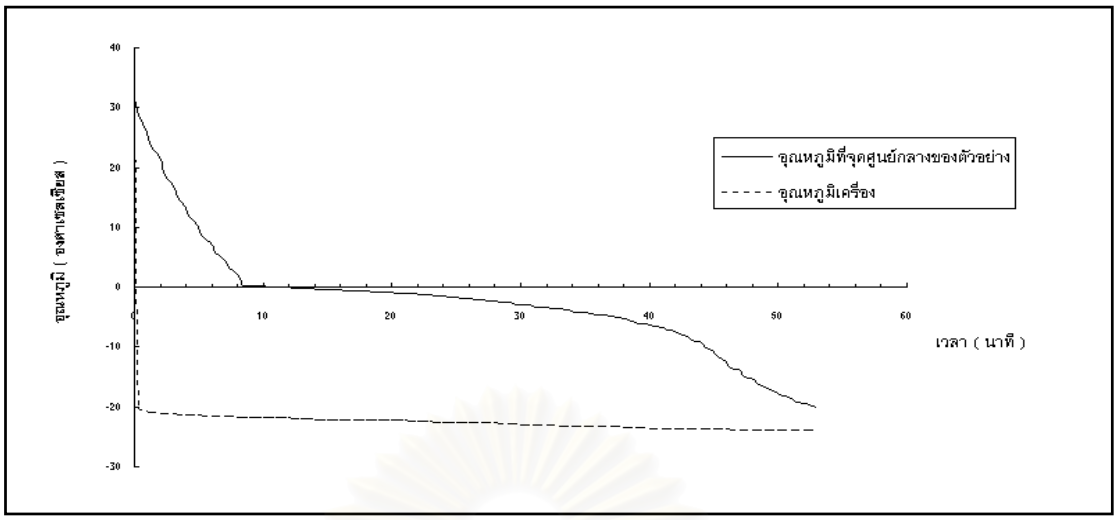
รูปที่ 19 – 22 เป็นรูปที่แสดง Freezing curve ของการแช่แข็งตัวอย่าง Salmonella suspensionด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ กัน ในรูปจะแสดงอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่าง และอุณหภูมิของอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอย่าง ในขณะที่เริ่มแช่แข็งตัวอย่างจนเสร็จสิ้นการแช่แข็ง



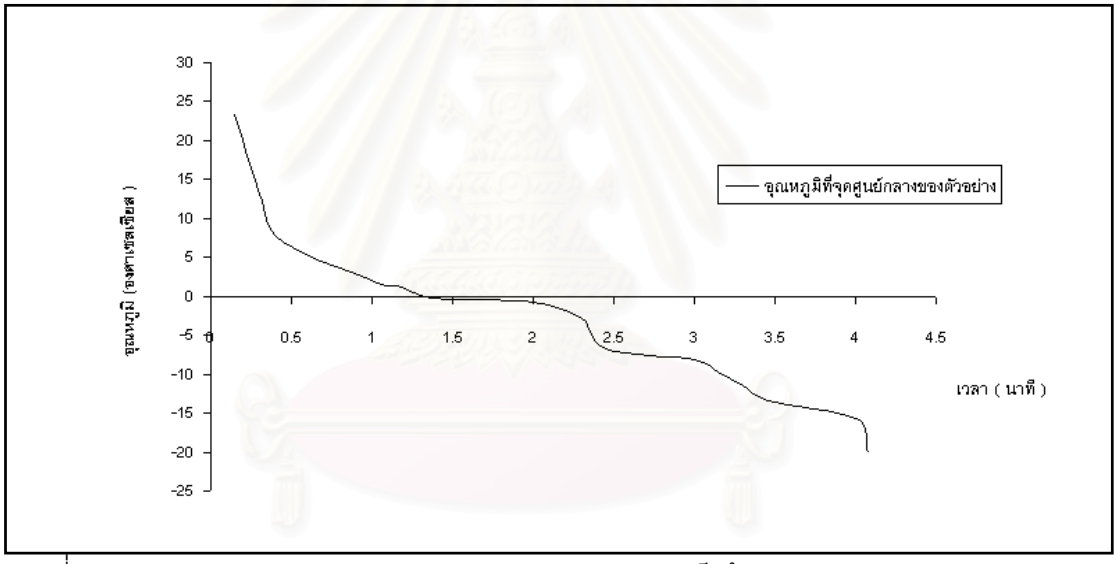
รูปที่ 19 Freezing curve **ของ**Salmonella suspension**แช่แข็งด้วย** Still air**อุณหภูมิประมาณ** – 10 ^{0}C **(ช่องแช่แข็งของตู้เย็น) โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็ง เท่ากับ** 0.62 cm/hr



รูปที่ 20 Freezing curve **ของ**Salmonella suspension**แช่แข็งด้วย** Still air**อุณหภูมิประมาณ** – 20 ^{0} C **โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ** 1.05 cm/hr



รูปที่ 21 Freezing curve ของสารละลายSalmonella แช่แข็งด้วย Air blast อุณหภูมิ ประมาณ – 20 ^{0} C โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 2.00 cm/hr

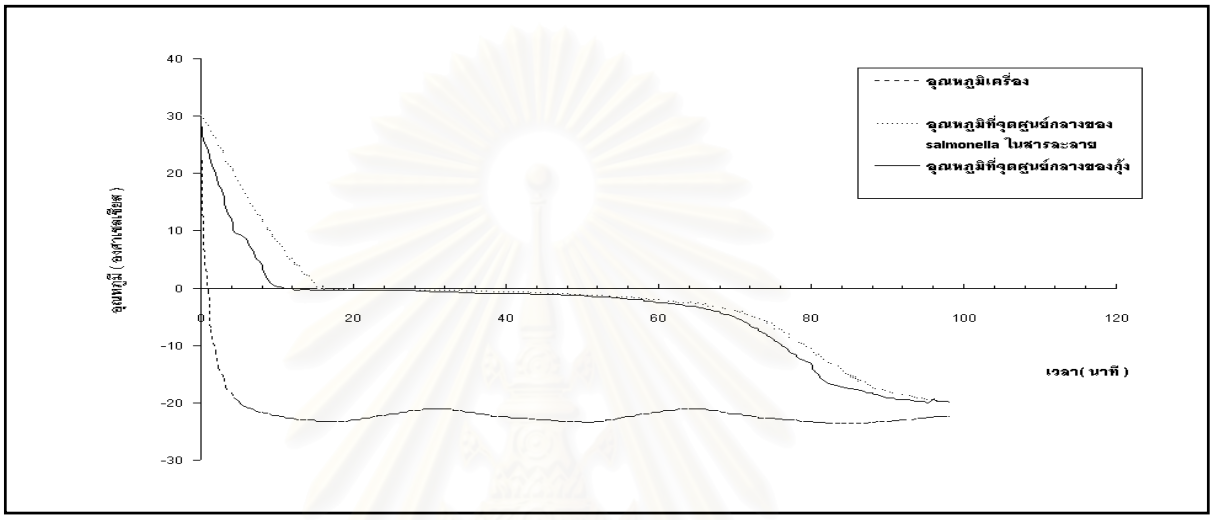


รูปที่ 22 Freezing curve ของSalmonella suspensionแช่แข็งด้วย Cryogenic อุณหภูมิ ประมาณ – 70 ^{0} C โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ 60.00 cm/hr

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

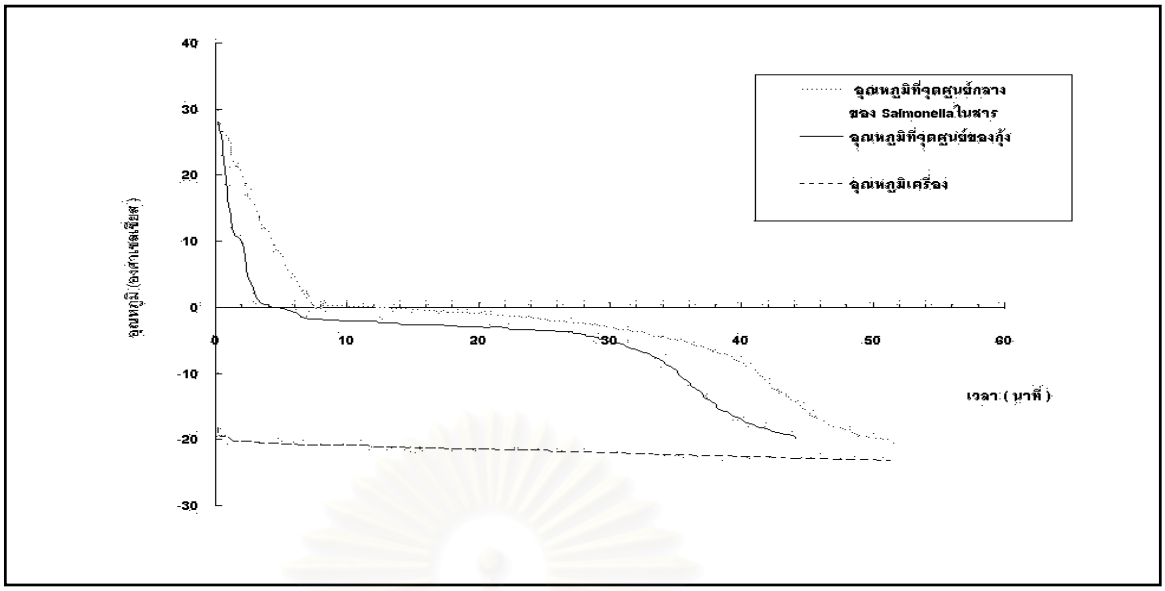
ค.2 ศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการรอดตายและบาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

รูปที่ 23 – 25 เป็นรูปที่แสดง Freezing curve ของการแช่แข็งตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ กัน ในรูปจะแสดงอุณหภูมิที่จุดศูนย์กลางของตัวอย่าง และอุณหภูมิของอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอย่าง ในขณะที่เริ่มแช่แข็งตัวอย่างจนเสร็จสิ้นการแช่แข็ง

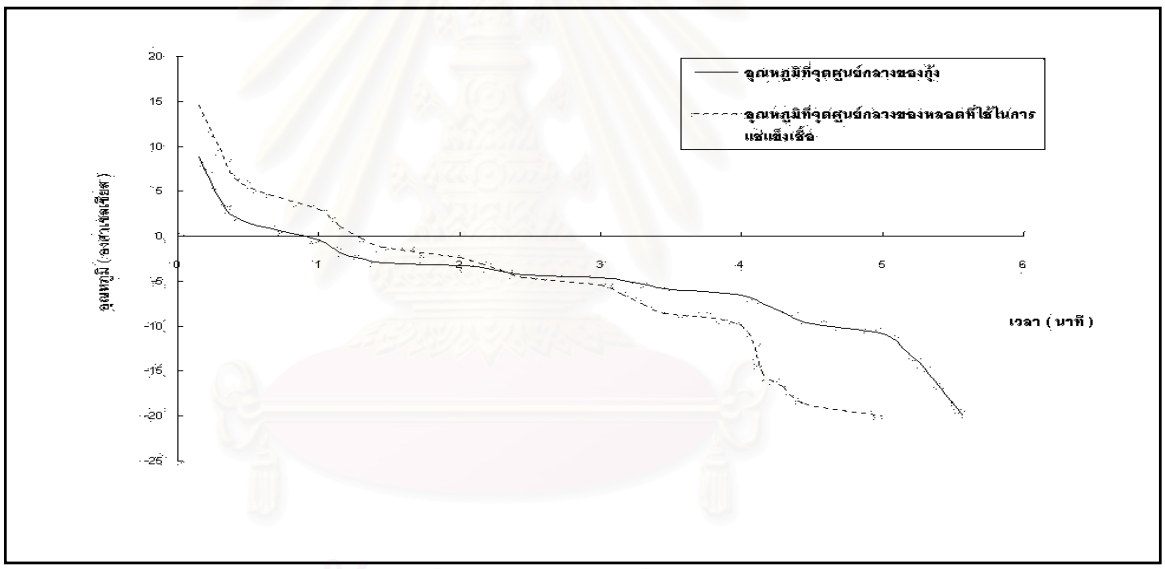


รูปที่ 23 Freezing curve **ของ** Salmonella **ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งด้วย** Still air **อุณหภูมิประมาณ** – 20 ° C **โดยมีอัตราเร็วในการแช่แข็งเท่ากับ** 0.79 cm/hr

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 Freezing curve **ของ** Salmonella **ในกุ้งแช่แข็งด้วย** Air blast **อุณหภูมิประมาณ** – 20 °C **โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ** 1.50 cm/hr



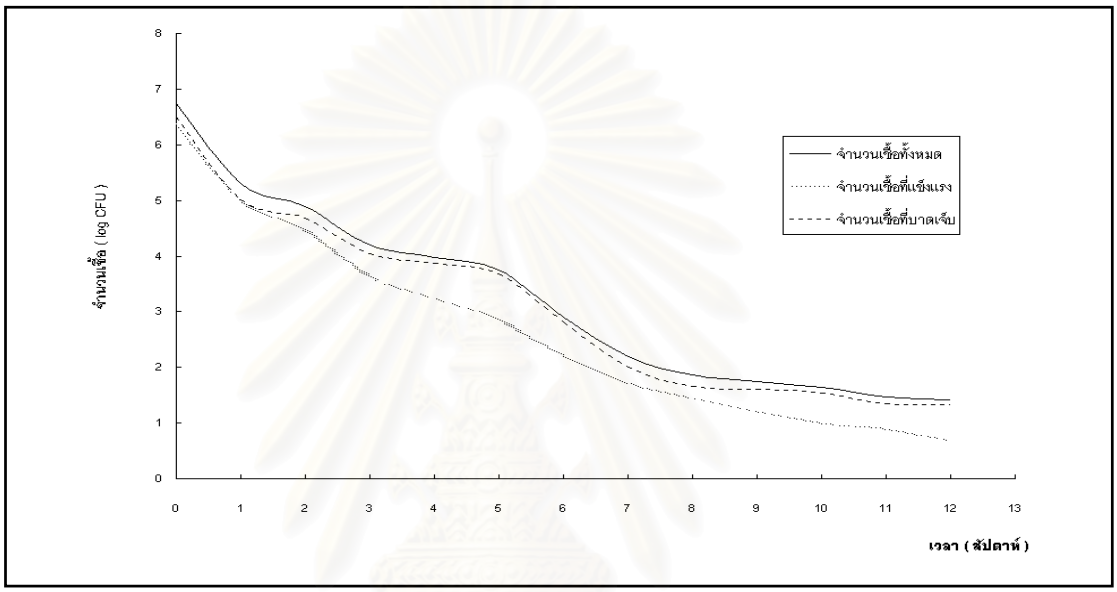
รูปที่ 25 Freezing curve **ของ** Salmonella **ในกุ้งแช่แข็งด้วย** Cryogenic **อุณหภูมิประมาณ** – 70 °C **โดยมีอัตราเร็วของการแช่แข็งเท่ากับ** 45 cm/hr

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.

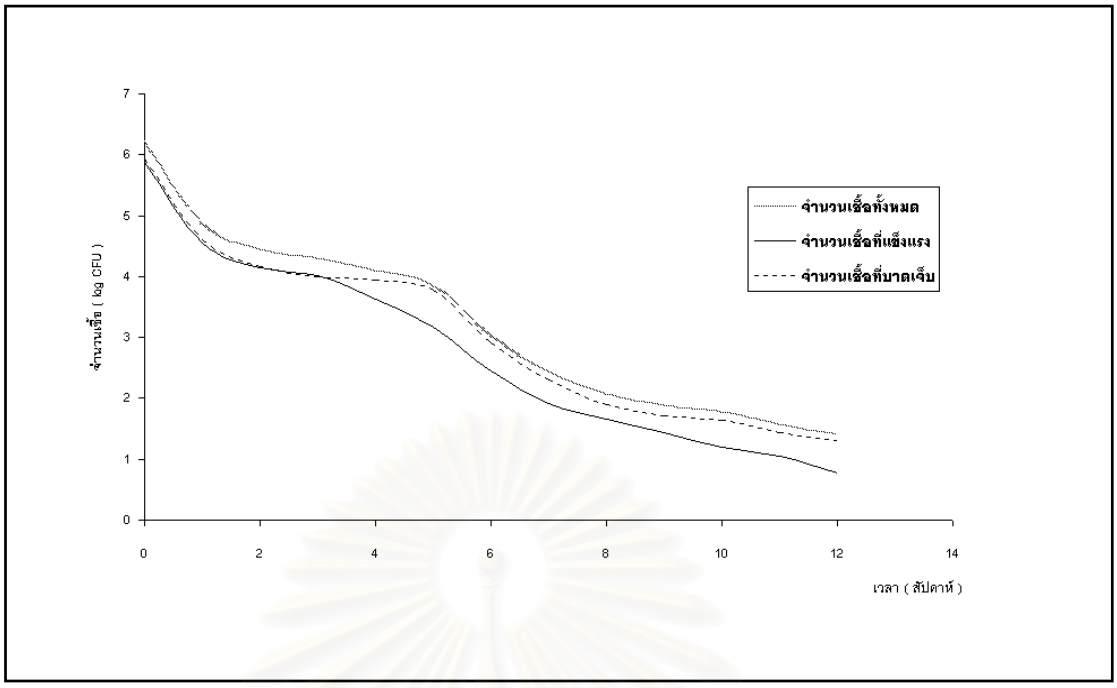
ง.1ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ Salmonella suspension ต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby*

รูปที่ 26 – 28 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็ง หลังเก็บที่ – 10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ

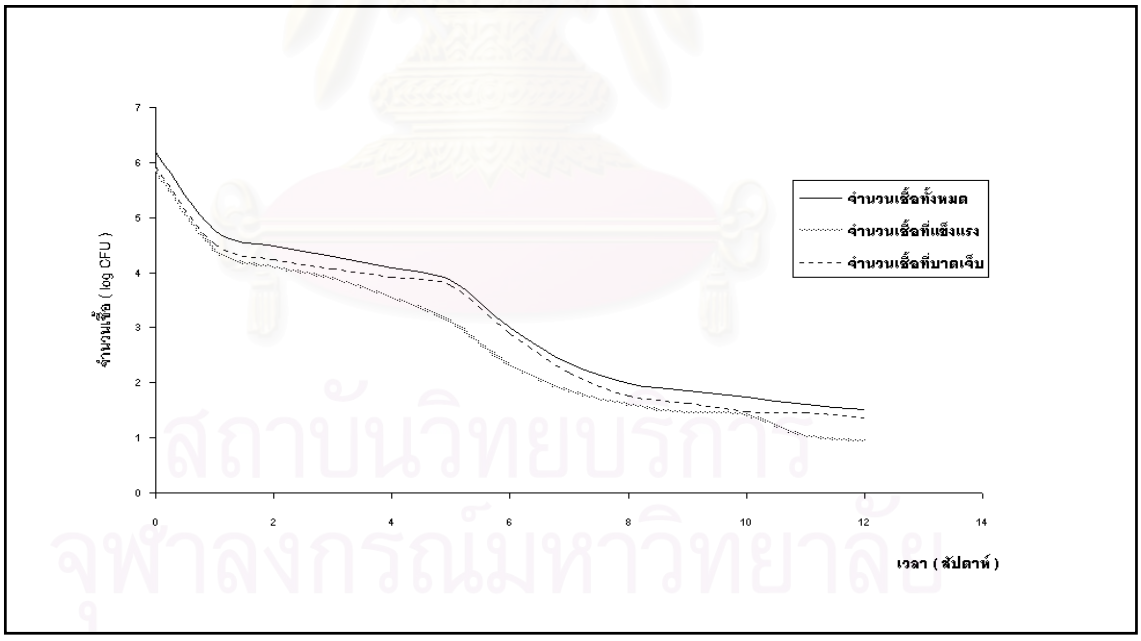


รูปที่ 26 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็ง หลังเก็บที่ – 10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

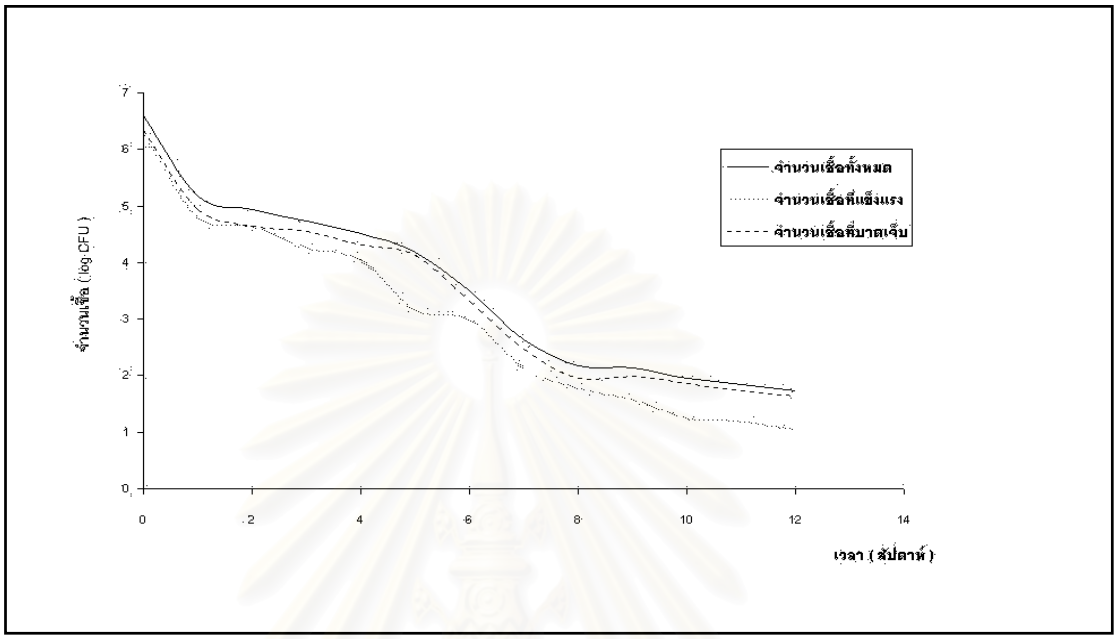


รูปที่ 27 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของสารละลาย Salmonellaแช่แข็งหลังเก็บที่ – 10 °Cเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 3)

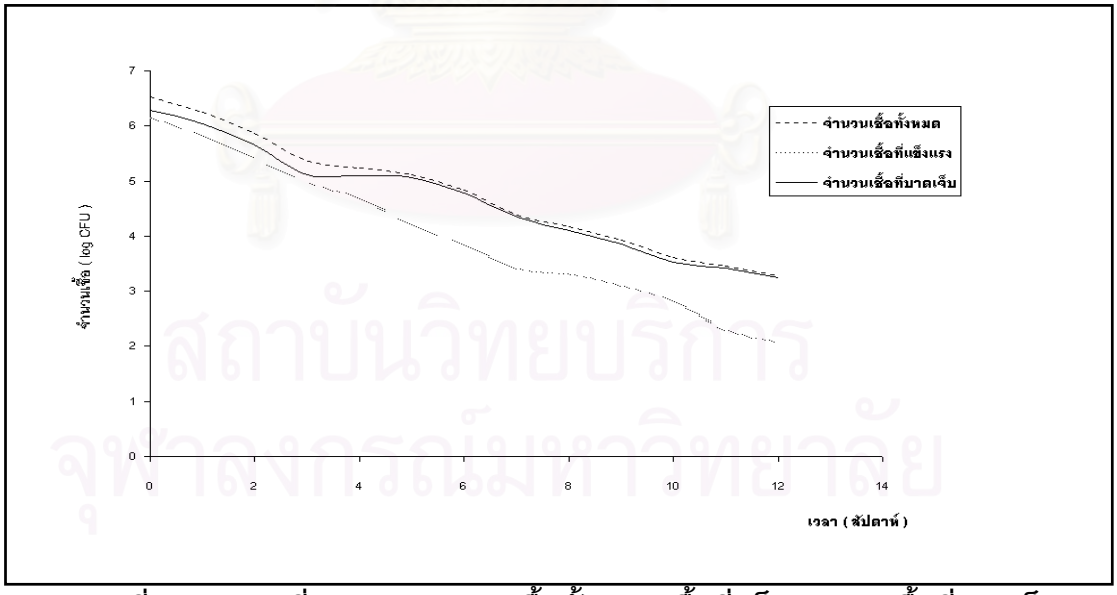


รูปที่ 28การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็ง หลังเก็บที่ – 10 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 4)

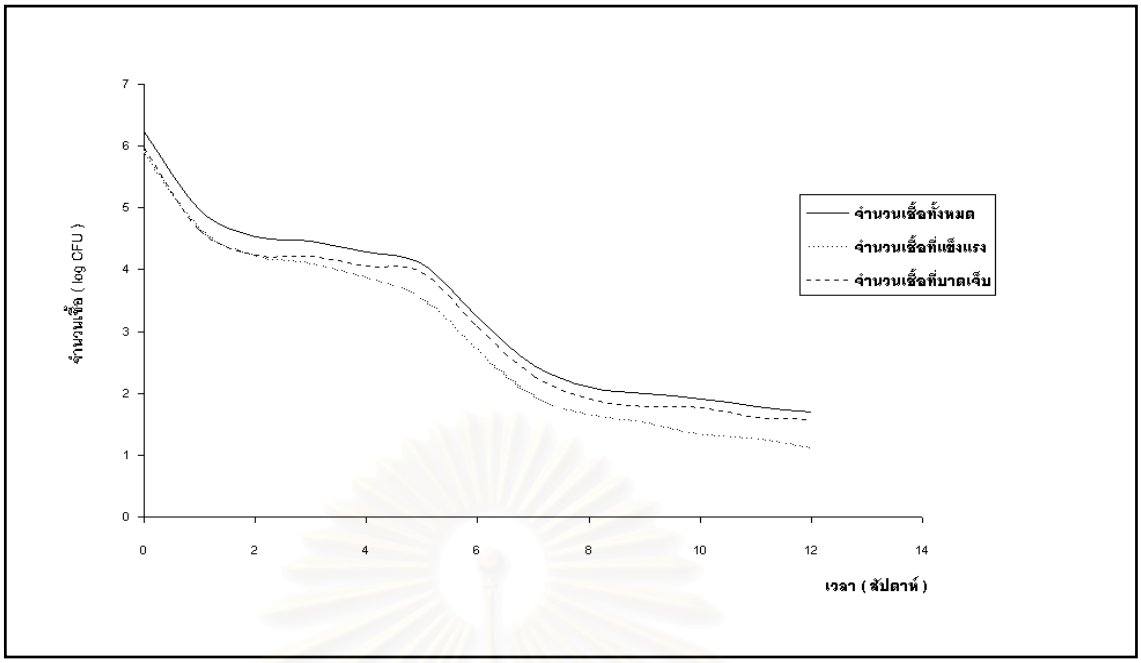
รูปที่ 29 – 37 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็ง หลังเก็บที่ – 20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ



รูปที่ 29 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของสารละลายSalmonellaแช่แข็งหลังเก็บที่ – 20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 1)

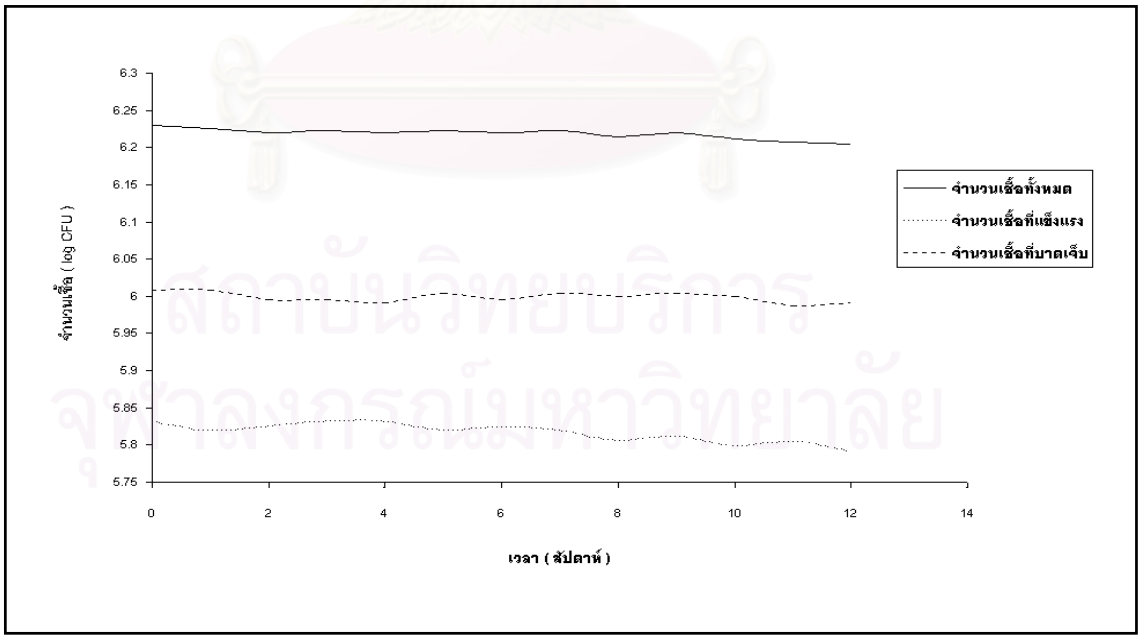


รูปที่ 30 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของSalmonella suspensionแช่แข็งหลังเก็บที่ – 20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 2)

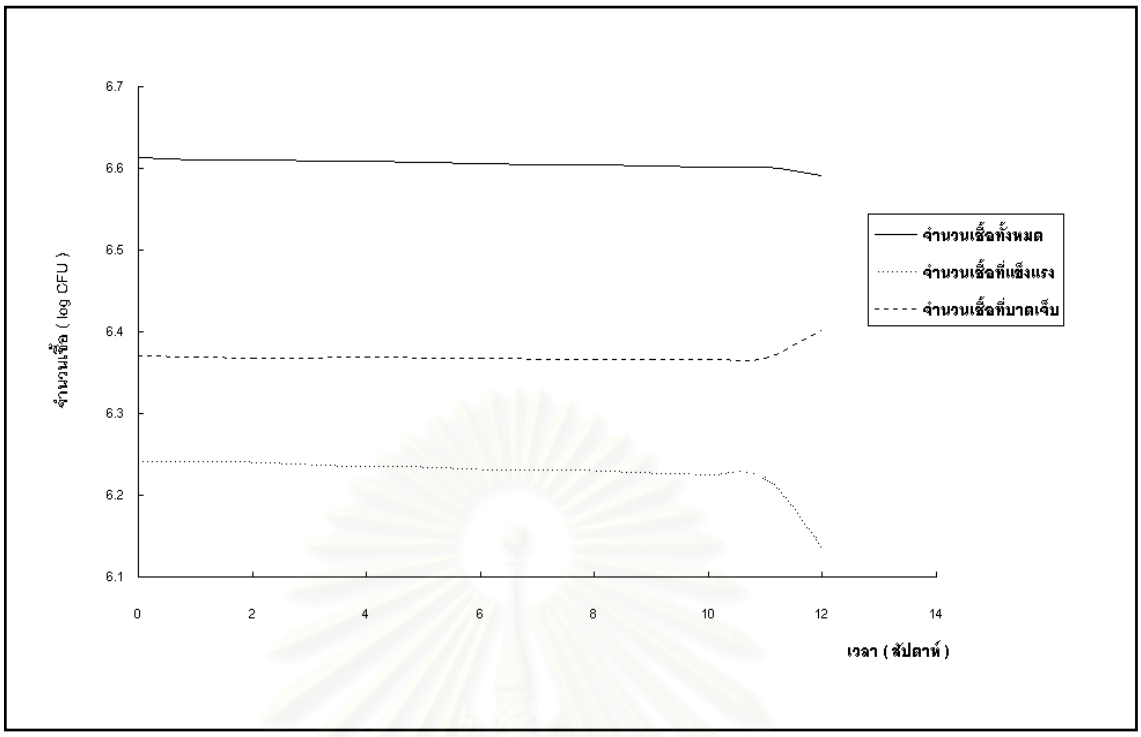


รูปที่ 31 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspension แช่แข็งหลังเก็บที่ – 20 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 3)

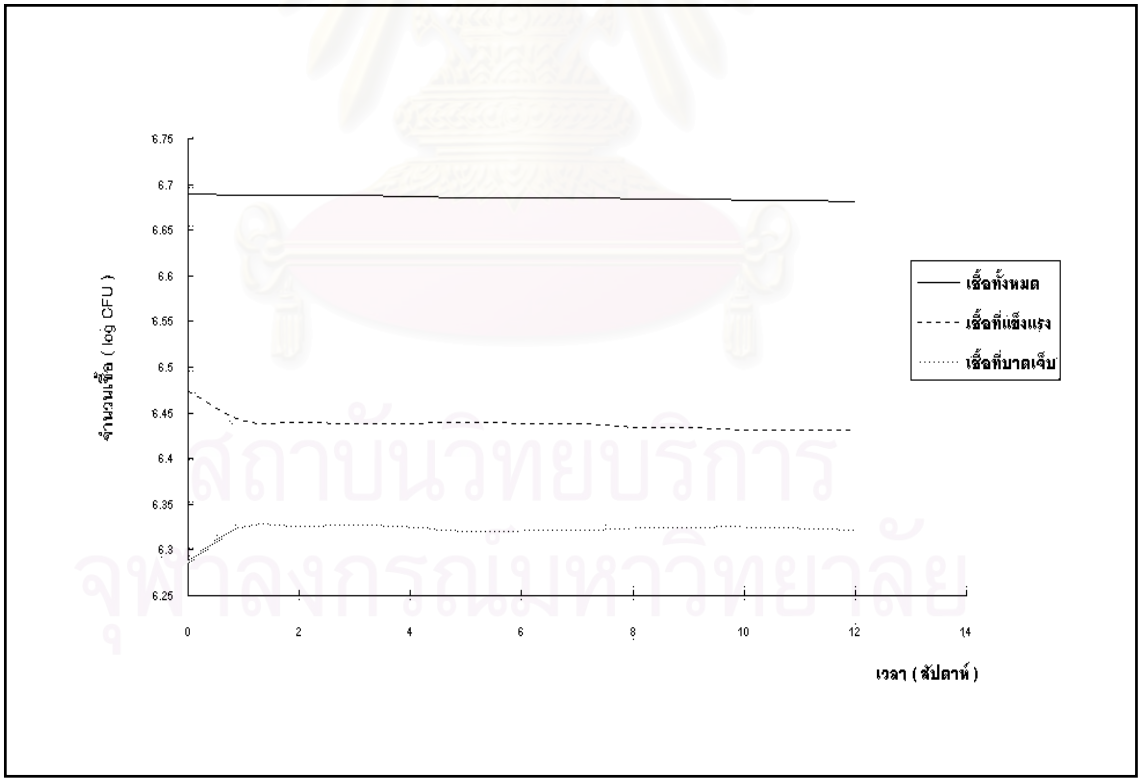
รูปที่ 32 – 30 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็ง หลังเก็บที่ – 75 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ



รูปที่ 32 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อทีบาดเจ็บของ สารละลายSalmonella แช่แข็งหลังเก็บที่ – 75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่2)



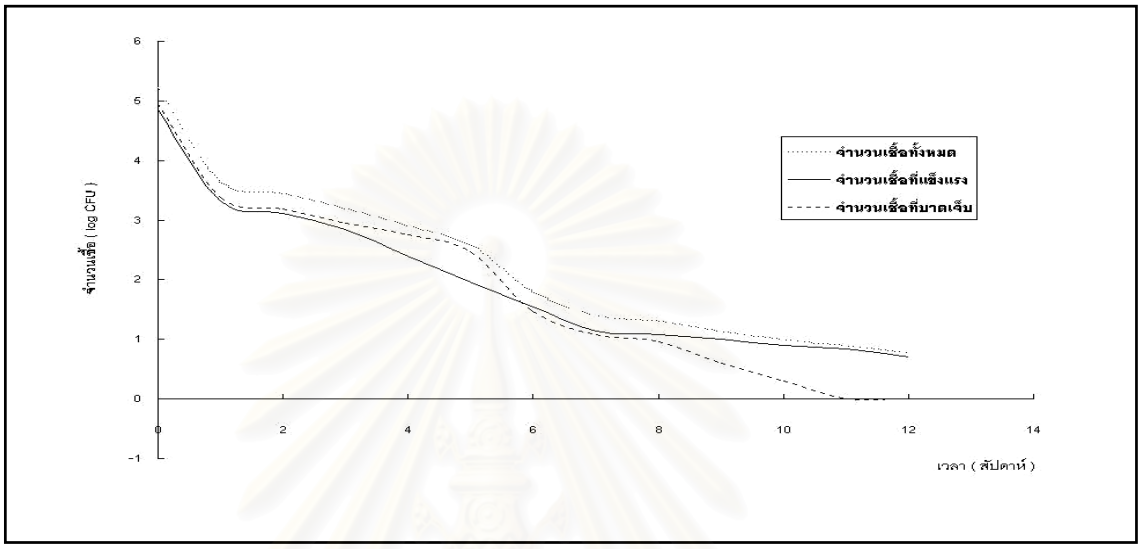
รูปที่ 33 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ สารละลายSalmonella แช่แข็งหลังเก็บที่ – 75 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 3)



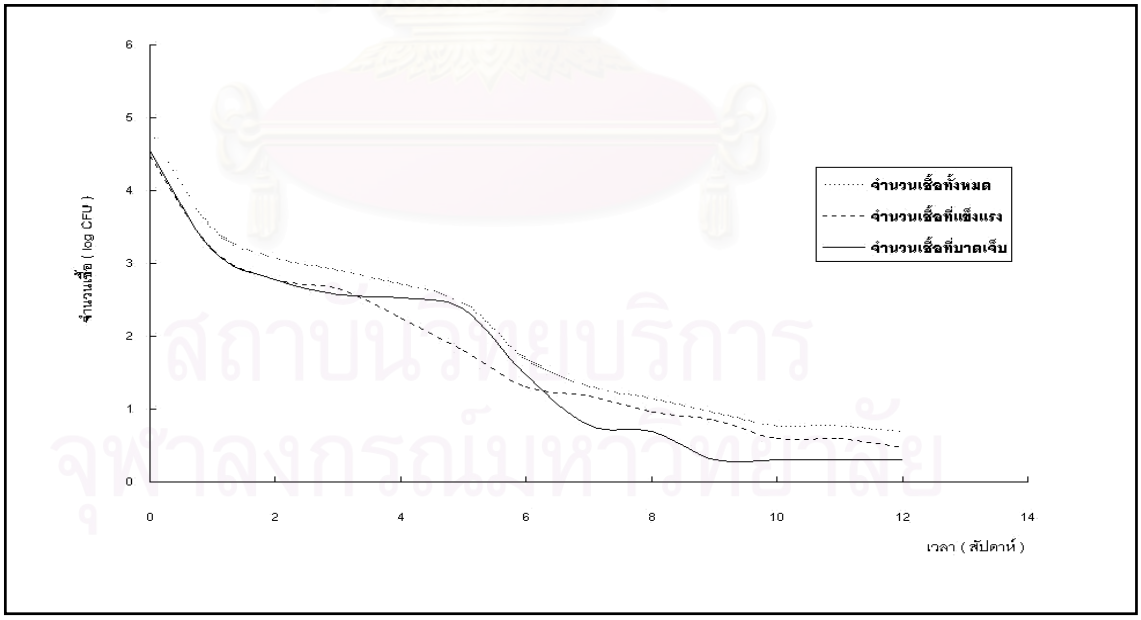
รูปที่ 34 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเก็บที่ – 75 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์(การทดลองซ้ำที่4)

ง.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ Salmonella ในกุ้งกุลาดำต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S. derby*

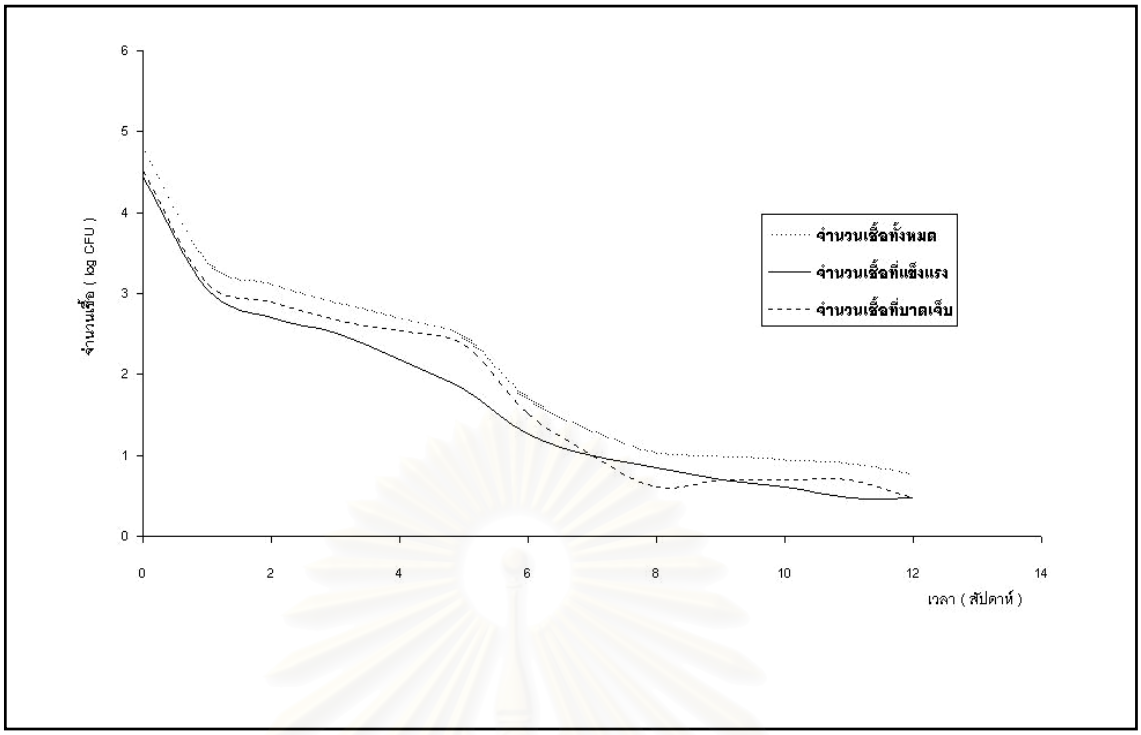
รูปที่ 35 – 38 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง หลังเก็บที่ – 10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ



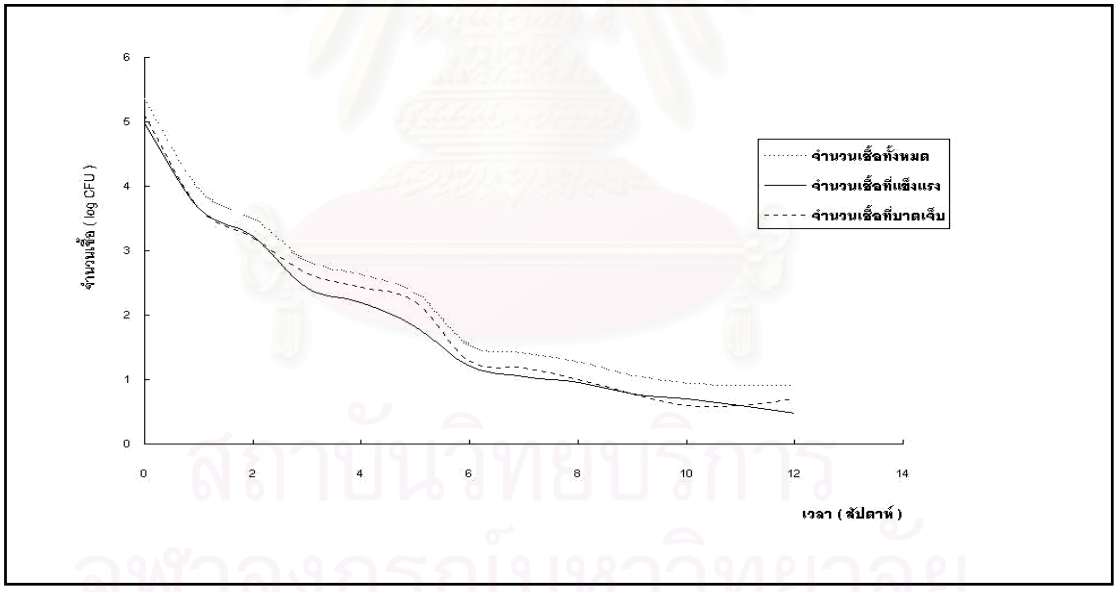
รูปที่ 35 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่1)



รูปที่ 36 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 10 °Cเป็นเวลา 12 สัปดาห์(การทดลองซ้ำที่2)

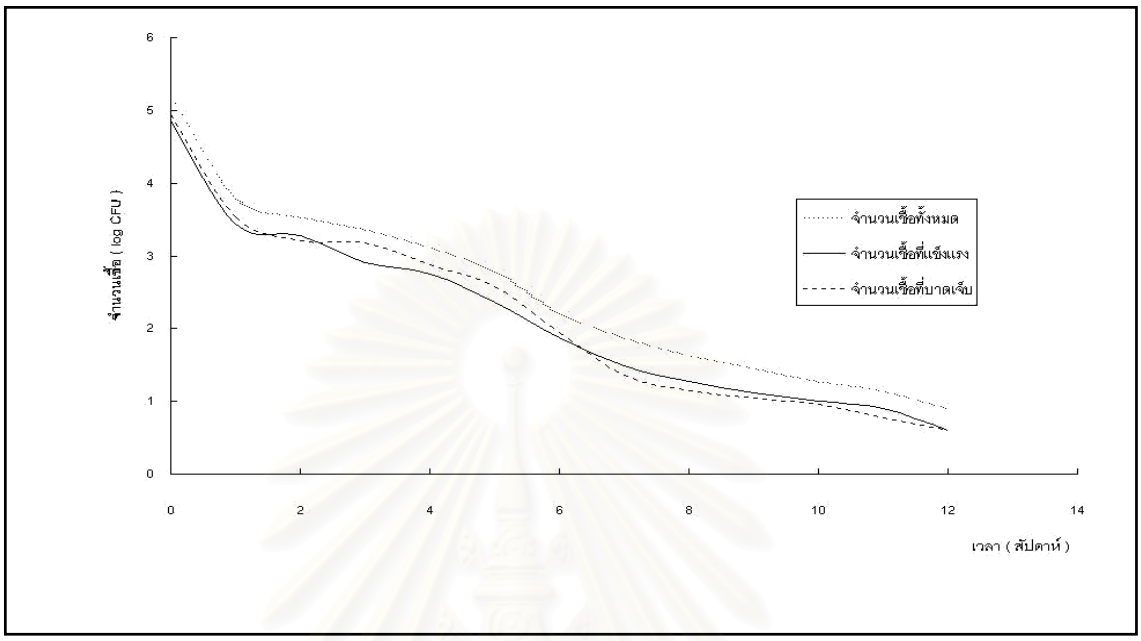


รูปที่ 37 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 10 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 3)

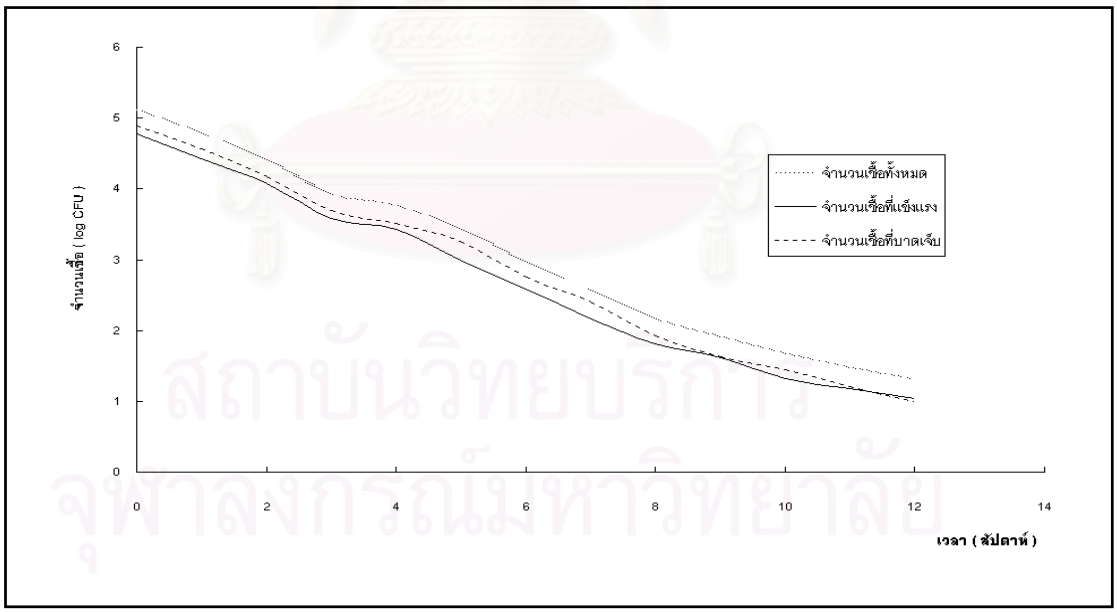


รูปที่ 38 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 10 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่4)

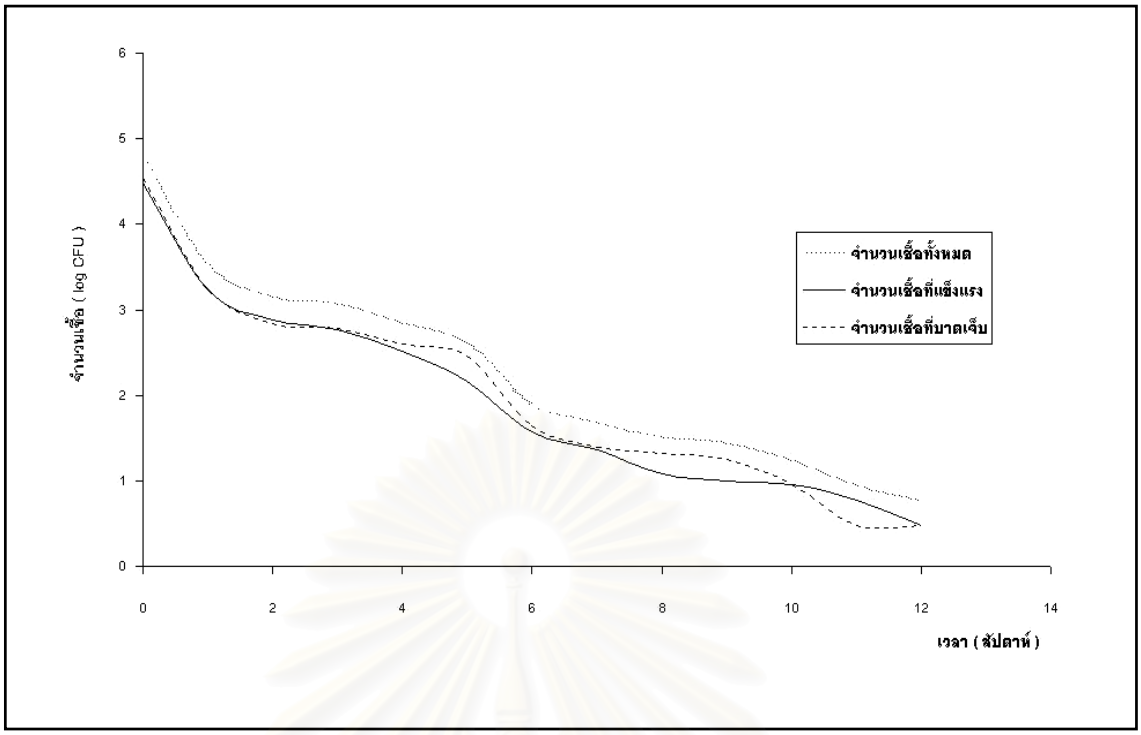
รูปที่ 39 – 42 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็ง หลังเก็บที่ – 75 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ



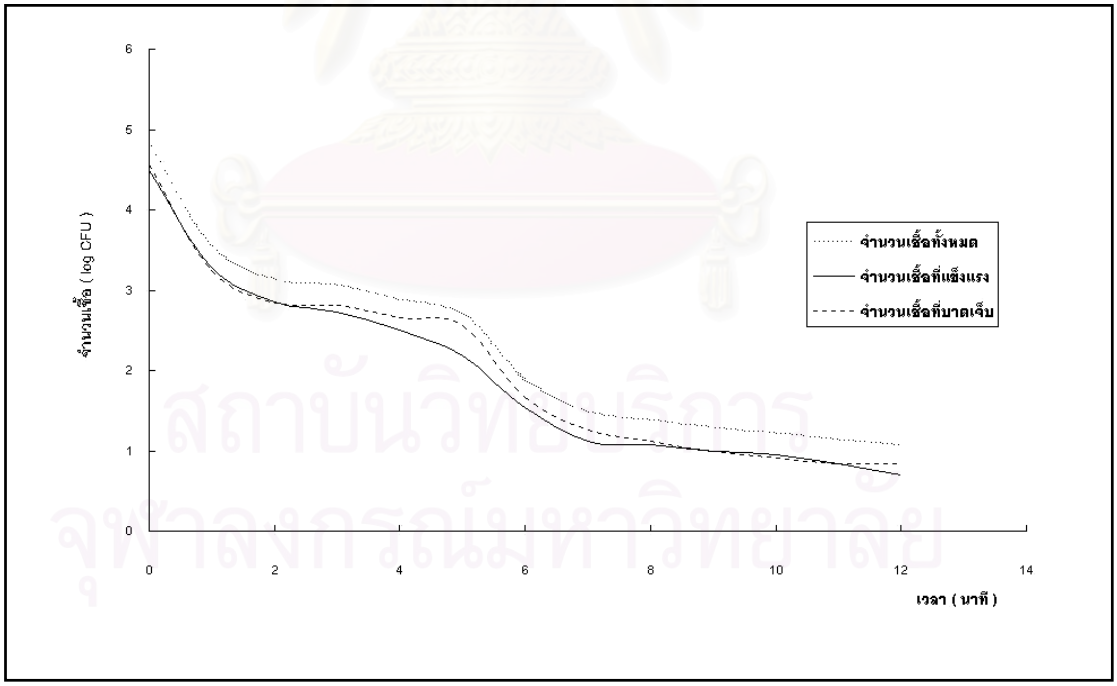
รูปที่ 39 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่ 1)



รูปที่ 40 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 20 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่2)

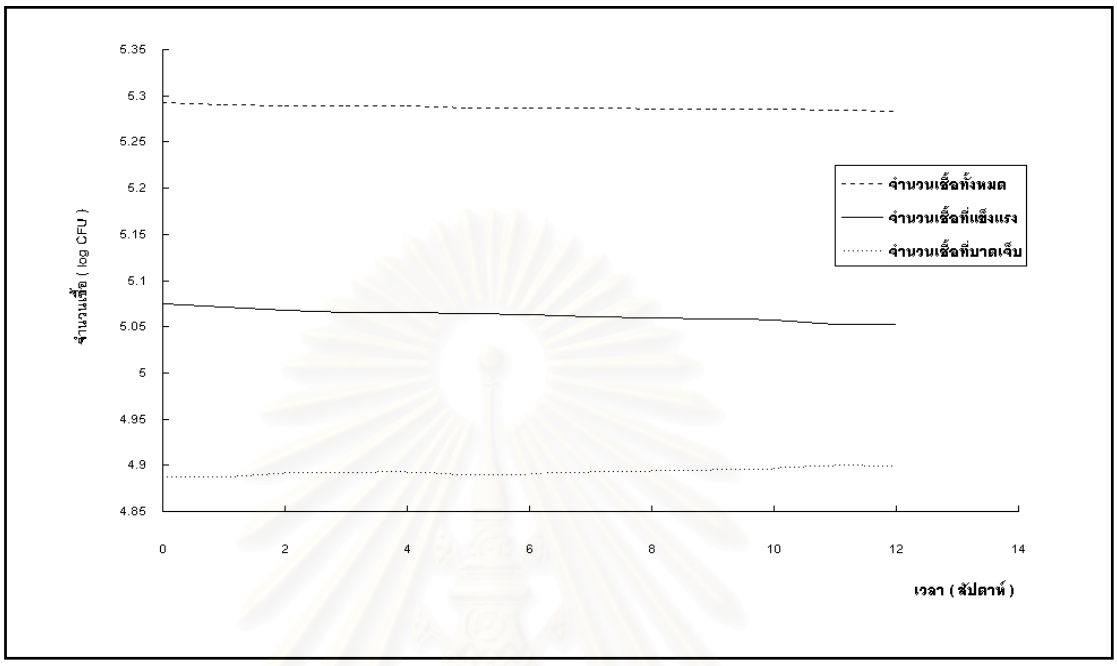


รูปที่ 41 **การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ** Salmonella **ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่** – 20 ° C **เป็นเวลา** 12 **สัปดาห์(การทดลองซ้ำที่**3)

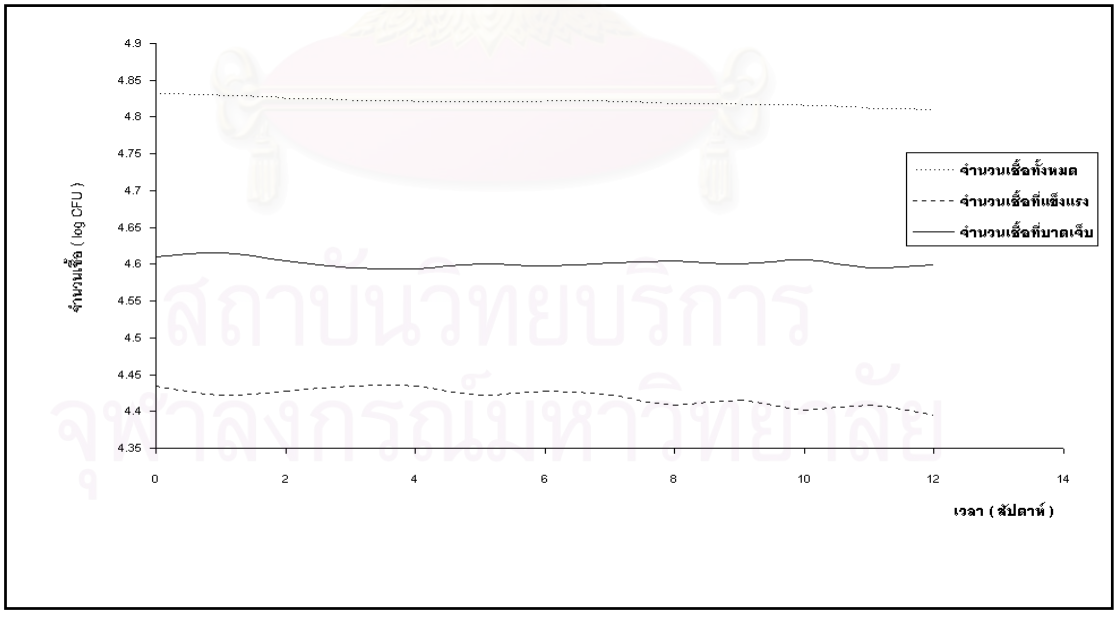


รูปที่ 42 **การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ** Salmonella **ในกุ้งกุลาดำ หลังเก็บที่** – 20 °C **เป็นเวลา** 12 **สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่**4)

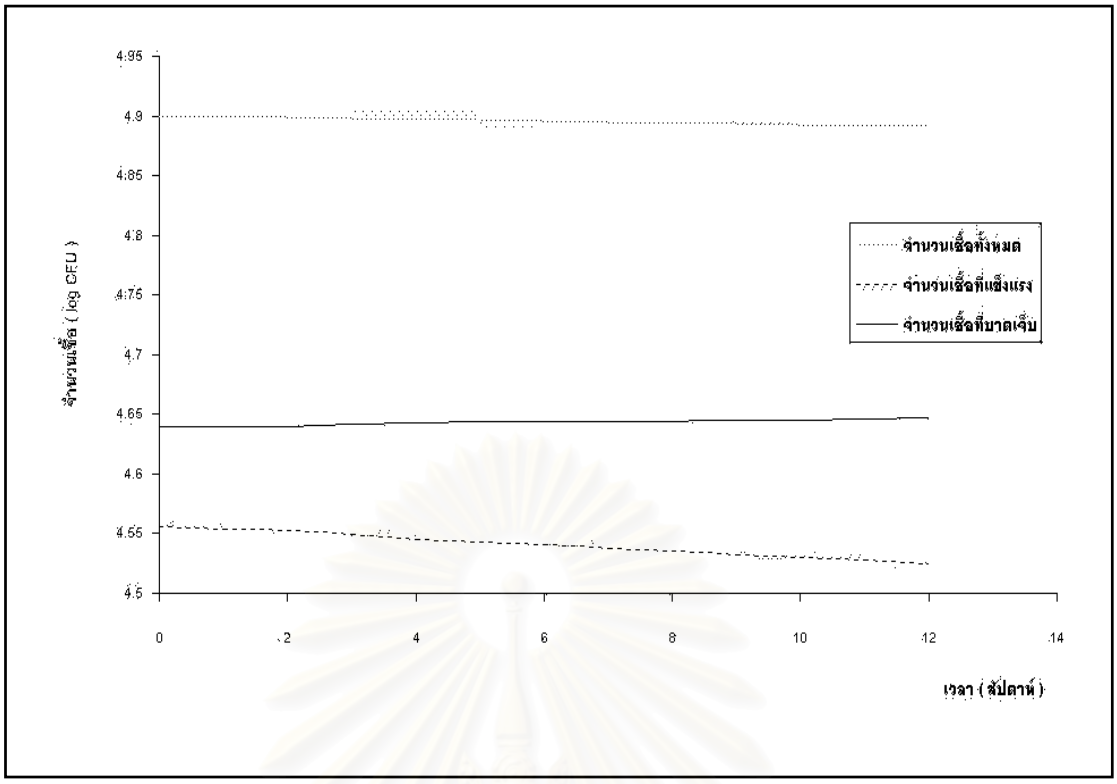
รูปที่ 43 – 46 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella suspensionแช่แข็ง หลังเก็บที่ – 75 $^{\circ}$C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ



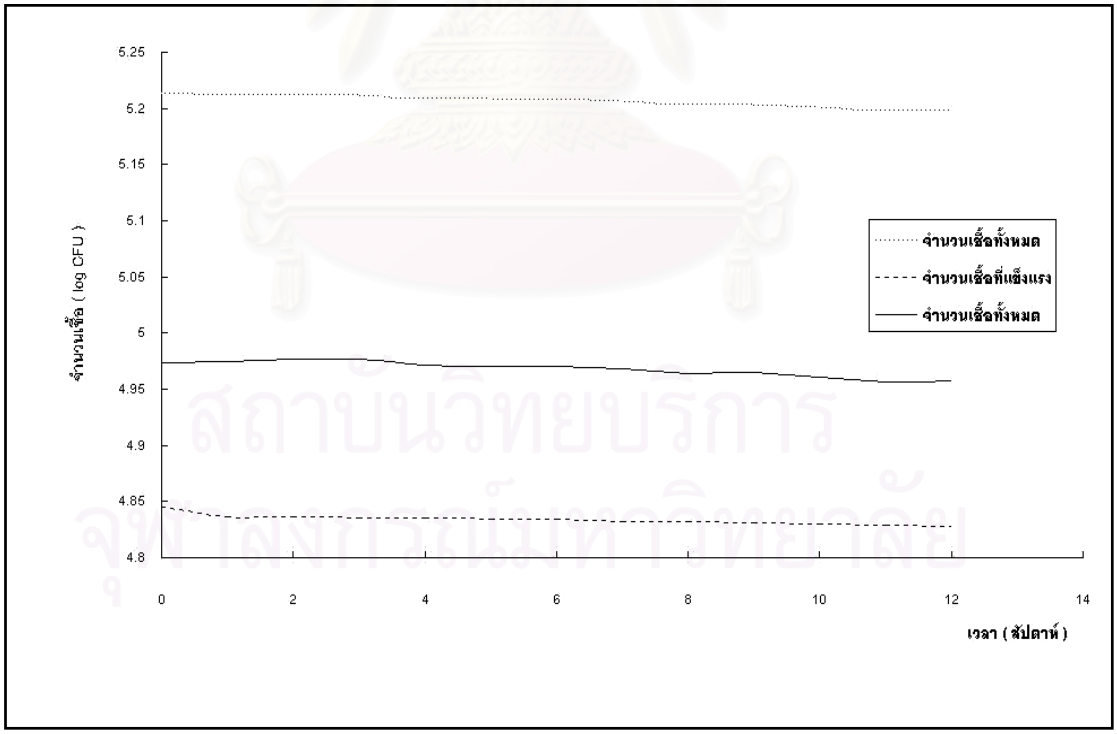
รูปที่ 43 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 75 $^{\circ}$C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่1)



รูปที่ 44 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 75 $^{\circ}$C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่2)



'รูปที่ 45 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 75 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์(การทดลองซ้ำที่3)



รูปที่ 46 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อทั้งหมด เชื้อที่แข็งแรงและเชื้อที่บาดเจ็บของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังเก็บที่ – 75 ° C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (การทดลองซ้ำที่4)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

จ.1 ศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ Salmonella suspension

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ เปอร์เซ็นต์รอดตาย และ เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของ *S.derby* ของตัวอย่าง Salmonella suspensionหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งที่อัตราเร็วต่าง ๆ

Sov	df	MS	
		% รอดตาย	% บาดเจ็บ
อัตราเร็วของการแช่แข็ง	3	12.61*	2560.74*
error	12	7.60×10^{-4}	0.20

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จ.2 ศึกษาผลของอัตราเร็วในการแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ เปอร์เซ็นต์รอดตายและเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของ *S.derby* ของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งที่อัตราเร็วต่าง ๆ

Sov	df	MS	
		% รอดตาย	% บาดเจ็บ
อัตราเร็วของการแช่แข็ง	3	14.81*	1980.15*
error	12	1.78×10^{-3}	6.57×10^{-2}

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จ.3 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ Salmonella suspensionต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S.derby*

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella, Healthy Salmonella และ Injured Salmonella ของ *S.derby* ของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งที่เก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Sov	df	MS		
		Total Salmonella	Healthy Salmonella	Injured Salmonella
อุณหภูมิที่ใช้เก็บ	2	1182618.40*	149661.32*	1395239.30*
error	9	44609.10	6182.82	12037.77

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จ.4 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งต่อการบาดเจ็บและรอดตายของ *S.derby*

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella, Healthy Salmonella และ Injured Salmonella ของ *S.derby* ของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่เก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Sov	df	MS		
		Total Salmonella	Healthy Salmonella	Injured Salmonella
อุณหภูมิที่ใช้เก็บ	2	1500484.00*	437046.56*	1720377.40*
error	9	79269.57	30635.22	52445.14

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จ.5 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บในตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	3	1988.42*	723.58*
error	12	2.71	1.58

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6ชั่วโมง

.Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	3	12506.40*	15776.00*
error	12	6.23	2.50

*** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)**

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	3	1.30×10^{8} *	1.91×10^{8} *
error	12	28125.00	20666.67

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	3	2.09×10^{12} *	1.48×10^{12} *
error	12	8.52×10^{8}	1.73×10^{9}

*** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ** ($p \leq 0.05$)

จ.6 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S.derby* ที่บาดเจ็บในตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	3	2320.73*	543.23*
error	12	2.73	2.69

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	3	13439.56*	16876.56*
error	12	4.06	2.98

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	3	1.70×10^{8} *	2.50×10^{8} *
error	12	47916.67	10647.92

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	3	1.60×10^{12} *	2.40×10^{12} *
error	12	3.20×10^{8}	1.20×10^{8}

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จ.7 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *S.derby* ที่บาดเจ็บในตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีการเติมสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (repairing agent) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp.

ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYE)	3	11641.73*	22770.75*
error	12	8.313	6.13

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYE)	3	329713.06*	397337.75*
error	12	113.31	45.71

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYE)	3	2.08×10^{10} *	2.19×10^{10} *
error	12	1052708.30	1148541.70

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYE)	3	1.65×10^{14} *	1.25×10^{14} *
error	12	4.02×10^{10}	1.97×10^{10}

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYEBG)	3	9869.23 *	21388.73 *
error	12	9.60	10.90

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYEBG)	3	384006.73 *	415461.23 *
error	12	18.40	3.85

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYEBG)	3	2.03×10^{10} *	1.77×10^{10} *
error	12	2206250.00	879166.67

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella suspensionแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYEBG)	3	1.45×10^{14} *	1.45×10^{14} *
error	12	1.15×10^{10}	7.57×10^{9}

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จ.8 เปรียบเทียบการฟื้นตัวของ *Salmonella derby* ที่บาดเจ็บในตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีการเติมสารที่ช่วยให้เซลล์ฟื้นตัว (repairing agent) และสารที่ยับยั้งการเจริญของ microflora ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp.

ตารางที่ 34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYE)	3	48790.56 *	70561.83 *
error	12	27.19	47.79

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYE)	3	479634.60 *	533053.60 *
error	12	52.73	35.98

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYE)	3	2.70×10^{10} *	2.40×10^{10} *
error	12	2296667.00	11855.79

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYE)	3	1.90×10^{14} *	1.20×10^{14} *
error	12	3.70×10^{10}	3.90×10^{10}

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 38 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYEBG)	3	49311.17 *	70691.17 *
error	12	16.13	40.63

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 39 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYEBG)	3	460236.10 *	529719.60 *
error	12	67.69	58.31

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 40 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYEBG)	3	2.40×10^{10} *	2.00×10^{10} *
error	12	832500.00	409583.30

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 41 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Total Salmonella และ Healthy Salmonella ของ *S.derby* ที่บาดเจ็บของตัวอย่าง Salmonella ในกุ้งกุลาดำแช่แข็งหลังเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Sov	df	MS	
		Total Salmonella	Healthy Salmonella
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (XPYEBG)	3	1.50×10^{14} *	1.40×10^{14} *
error	12	2.30×10^{10}	2.20×10^{10}

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจิราวรรณ ช่วยชู เกิดเมื่อวันที่ 5 กรกฎาคม พ.ศ. 2520 ที่อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ในปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย