

การปรับปรุงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกิ้งกูดดำ *Penaeus monodon*
ที่ตลาดกลางกุ้งจังหวัดสมุทรสาครโดยไอโซน



นางสาวจิราภา เสถจินตนิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6283-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMPROVEMENT OF MICROBIAL QUALITY OF BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon*
AT SAMUT SAKHON PROVINCE SHRIMP MARKET BY OZONE



MISS JIRAPA SETJINTANIN

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2004

ISBN 974-17-6283-6

จิราภา เสฐจินตนิน : การปรับปรุงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ตลาดกลางกุ้งจังหวัดสมุทรสาครโดยโอโซน. (IMPROVEMENT OF MICROBIAL QUALITY OF BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon* AT SAMUT SAKHON PROVINCE SHRIMP MARKET BY OZONE) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.รมณี สงวนดีกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.สุเมธ ตันตระเจียร 78 หน้า. ISBN 974-17-6283-6

กุ้งกุลาดำสดที่ขาย ณ ตลาดกลางกุ้งจังหวัดสมุทรสาคร ในช่วงเดือนมีนาคม 2546 ถึงกุมภาพันธ์ 2547 มีปริมาณแบคทีเรียรวม $1.9 \times 10^5 - 4.1 \times 10^5$ โคโลนีต่อกรัม ในแต่ละเดือนของฤดูร้อน ฝน และหนาว ปริมาณแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงมกราคม (ฤดูหนาว) พบแบคทีเรียกลุ่ม ทนความเย็นมีแนวโน้มสูงกว่าช่วงอื่น และจากการตรวจพบแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม และ *E. coli* พบว่ามี เพียงร้อยละ 45.0 และ 6.7 ที่มีปริมาณไม่เกิน 10 MPN/g และน้อยกว่า 3 MPN/g ตามลำดับ แต่ไม่พบ การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ คือ *Salmonella spp.*, *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างที่สุ่มมา ในการลดปริมาณแบคทีเรียจึงได้ทดลองใช้น้ำโอโซนเข้มข้น 548.53 mg/l TOC (0.13 mg/l ROC) ลดจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นของแบคทีเรียรวม แบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น โคลิฟอร์ม *E. coli*, *S. anatum* และ *V. parahaemolyticus* ในระดับ 5, 6 และ 9 log พบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียจนเหลือ ประมาณ 2, 4 และ 7 log ตามลำดับ หลังจากใช้เวลาสัมผัสนาน 1 นาที และอัตราส่วนของจำนวนแบคทีเรีย ที่ตายต่อจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นแต่ละชนิดสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นโอโซนมากขึ้นเมื่อทำการทดลองในช่วง 217.60 – 1132.27 mg/l TOC (น้อยกว่า 0.1 – 0.32 mg/l ROC) และเมื่อศึกษาผลการใช้น้ำโอโซนในการ ทำลายแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ พบว่าน้ำโอโซนสามารถลดจำนวนแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำได้ ส่วนการศึกษา ระยะเวลาการเก็บ ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังผ่านการล้างด้วยน้ำโอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 mg/l TOC นาน 1 นาทีพบว่ามีการเก็บ 6 และ 8 วันตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่มี อายุการเก็บ 4 วันโดยใช้ค่า TVB เท่ากับ 30 mg N/100 g เป็นเกณฑ์การยอมรับ และมีการเปลี่ยนแปลง ของกลิ่นช้ากว่าโดยไม่มีความแตกต่างทางด้านประสาทสัมผัสของเนื้อสัมผัสและสีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อนิสิต
 สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา 2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372237723 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : BLACK TIGER PRAWN / OZONATED WATER

MISS JIRAPA SETJINTANIN : IMPROVEMENT OF MICROBIAL QUALITY OF BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon* AT SAMUT SAKHON PROVINCE SHRIMP MARKET BY OZONE THESIS ADVISOR : ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D., 78 pp. ISBN 974-17-6283-6.

Black tiger prawn obtained from Samut Sakhon province shrimp market during March 2003 to February 2004 was assessed for the amount of total bacteria, psychrotrophs, coliform and *Escherichia coli*. It was found that the amount of total bacteria were $1.9 \times 10^5 - 4.1 \times 10^5$ CFU/g. The total bacteria detected from each season was not significantly different ($P > 0.05$). During October to January, it was found that the amount of psychrotrophs was higher than the other. The coliform and *E. coli* detected during this period was 45.0 and 6.7% which less than 10 and less than 3 MPN/g, respectively. No *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus* was detected in all samples. Ozonated water of 548.53 mg/l TOC (0.13 mg/l ROC) could effectively reduce 5, 6 and 9 log of initial bacteria suspension to 2, 4 and 7 log respectively of total bacteria, psychrotrophs, coliform, *E. coli*, *S. anatum* and *V. parahaemolyticus* after contacting for 1 minute. The ratio between the amount of death bacteria and initial bacteria was increased when the concentration of ozone was in the range of 217.60 – 1132.27 mg/l TOC (less than 0.1 – 0.32 mg/l ROC). In addition, ozonated water could reduced all tested bacteria on black tiger prawn. The black tiger prawn that treated with ozonated water at the concentration of 217.60 – 1132.27 mg/l TOC for 1 minute could prolong the shelf-life to 6 and 8 days respectively, while the prawn that was not treated with ozonated could be kept for 4 days at 4 °C before the TVB number of the prawn went over 30 mgN/100g. The ozonated water treated prawn had a better odor score than the untreated ones, but the texture and color score showed no significantly difference ($P > 0.05$).

Department Food technology...	Student's signature.....
Field of study Food technology...	Advisor's signature
Academic year 2004...	Co- Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ ผศ.ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือสนับสนุนให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มงานจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ผศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.สุทัศนศักดิ์ สุขในศิลป์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิตวิรกุล และ อาจารย์ ดร.ปรีเปรม พัฒนมหกุล ที่ได้กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และได้เสนอแนวทางแก้ไขและปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่มอบทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณเอกวัฒน์ อุณหเลขกะ ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่าง ณ จังหวัดสมุทรสาคร และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และบุคคลในครอบครัวที่ส่งเสริม ให้โอกาสที่ดี ตลอดจนให้กำลังใจ และความช่วยเหลือในทุกๆด้านด้วยดีเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ซ
คำย่อ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	3
3. วัตถุประสงค์และการดำเนินการทดลอง.....	24
4. ผลการทดลอง.....	30
5. วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	48
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	56
รายการอ้างอิง.....	58
ภาคผนวก.....	66
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกของกุ้งกุลาดำในปี 2543 – 2546.....	4
2.2 ความสามารถในการละลายของก๊าซไอโซนที่อุณหภูมิต่างๆ.....	10
2.3 การยี้ดเกาะของ <i>E. coli</i> บนผิวแอปเปิ้ล.....	19
2.4 ค่ามาตรฐานความเข้มข้นโดยปริมาตรของก๊าซไอโซนในอากาศ.....	23
4.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำสดและการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ TPC และ PPC ในช่วง มี.ค. 2546 ถึง ก.พ. 2547.....	30
4.2 ความถี่ของการตรวจพบ <i>E. coli</i> และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในกุ้งกุลาดำสด จำแนกตามฤดูกาล (4 เดือน) ในช่วง มี.ค. 2546 ถึง ก.พ. 2547.....	32
4.3 ความเข้มข้นของก๊าซไอโซนทั้งหมด และความเข้มข้นของก๊าซไอโซนตกค้าง ณ เวลาต่างๆที่ให้ก๊าซไอโซน.....	34
4.4 จำนวนแบคทีเรียที่เหลือหลังจากผสมกับน้ำไอโซนที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที.....	36
4.5 ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรีย หลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้น 548.53 มิลลิกรัม ต่อลิตร TOC ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที.....	36
4.6 จำนวนแบคทีเรียที่เหลือหลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที.....	37
4.7 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียหลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้นระดับ ต่างๆที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที.....	38
4.8 จำนวนแบคทีเรียที่เหลือหลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 3 นาน 1 นาที.....	39
4.9 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำสดหลังจากผสมกับน้ำไอโซน เข้มข้นระดับต่างๆที่อัตราส่วน 1 ต่อ 3 นาน 1 นาที.....	40
4.10 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่า TVB, pH, ปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย กลุ่มทนความเย็นของกุ้งกุลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่ระยะเวลาการเก็บ 8 วัน ณ อุณหภูมิ 4 °C	42
4.11 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยคะแนนทางประสาทสัมผัส ด้านเนื้อสัมผัส กลิ่น และสี ของกุ้งกุลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่ระยะเวลา การเก็บ 8 วัน ณ อุณหภูมิ 4 °C.....	45

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1	ปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ของไอซอน.....7
2.2	ปฏิกิริยาการเกิดก๊าซไอซอน.....8
2.3	การผลิตไอซอนแบบ Corona discharge(Dielectric barrier discharge หรือ Silent electrical discharge) A) แบบพื้นฐาน B) แบบท่อ (Tube-type generator unit).....9
2.4	สูตรโครงสร้างของ Molozone, Zwitter ion และ Ozonide.....13
2.5	รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงการแตกของเซลล์เมมเบรนของ <i>Salmonella enteritidis</i> (A และ B) และเปลือกหุ้มสปอร์ของ <i>Bacillus subtilis</i> (C และ D) เมื่อก่อนและหลังได้รับไอซอนตามลำดับ.....14
2.6	อัตราส่วนของจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต 4 ชนิดได้แก่ (a) <i>P. fluorescens</i> , (b) <i>E. coli</i> O157:H7, (c) <i>Leu. Mesenteroids</i> , (d) <i>L. monocytogenes</i> (ปริมาณเริ่มต้น $1.3 \times 10^8 - 2.5 \times 10^8$ CFU/ml) เมื่อผ่านไอซอนที่ความเข้มข้นต่างๆที่ pH 5.9 อุณหภูมิ 25 °C (N ₀ : จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น, N: จำนวนจุลินทรีย์หลังผ่านไอซอน.....18
2.7	ภาพ Photomicrograph ของ <i>E. coli</i> (ATCC 25922) ใน Biofilm.....19
2.8	ระดับความเข้มข้นต่างๆของก๊าซไอซอนที่ทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย.....21
4.1	ค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียรวม (TPC) ในช่วง มี.ค. 2546 ถึง ก.พ. 2547.....31
4.2	ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น (PPC) ในช่วง มี.ค. 2546 ถึง ก.พ.2547.....31
4.3	ความถี่ของการตรวจพบปริมาณ <i>E. coli</i> ในกึ่งกลาดำสดที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานในช่วง มี.ค. 2546 ถึง ก.พ. 2547.....33
4.4	ความถี่ของการตรวจพบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในกึ่งกลาดำสดที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานในช่วง มี.ค. 2546 ถึง ก.พ. 2547.....33
4.5	ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของก๊าซไอซอนทั้งหมด (TOC) กับเวลาที่ใช้ก๊าซไอซอน.....35
4.6	ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของก๊าซไอซอนตกค้างในน้ำ (ROC) กับเวลาที่ใช้ก๊าซไอซอน.....35

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
4.7	ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรีย หลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที.....38
4.8	ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรีย ในกึ่งกลาดำสดหลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆที่อัตราส่วน 1 ต่อ 3 นาน 1 นาที.....40
4.9	ความสัมพันธ์ของค่า TVB ในกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บที่ 4 °C.....43
4.10	ความสัมพันธ์ของค่า pH ในกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ 4 °C43
4.11	ความสัมพันธ์ของค่าแบคทีเรียรวมในกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ 4 °C44
4.12	ความสัมพันธ์ของค่าแบคทีเรียกลุ่มทนความเป็นในกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ 4 °C44
4.13	ค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัสของกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ 4 °C46
4.14	ค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ 4 °C46
4.15	ค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านสีของกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ 4 °C47

คำย่อ

DF = Death fraction

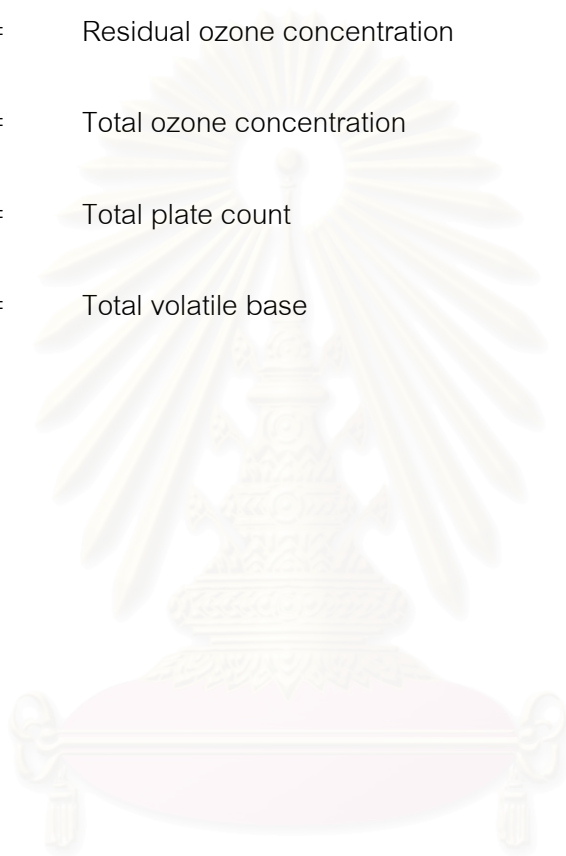
PPC = Psychrotrophic plate count

ROC = Residual ozone concentration

TOC = Total ozone concentration

TPC = Total plate count

TVB = Total volatile base



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

กุ้งเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยปีละหลายหมื่นล้านบาท โดยในช่วง 9 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2546 การส่งออก กุ้งแช่เย็น แช่แข็ง และกระป๋อง มีจำนวน 167,350 ตัน มูลค่า 52,741 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าขยายตัวเพิ่มขึ้นจากระยะเดียวกันของปีก่อนร้อยละ 12.5 และ 3.5 ตามลำดับ เนื่องจากปริมาณผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงภายในประเทศมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 300,000 ตัน จาก 270,000 ตันของปี พ.ศ. 2545 โดยส่งออกกุ้งในรูปแช่แข็งมากที่สุดคือร้อยละ 65 – 70 ของกุ้งทั้งหมด และส่วนใหญ่เป็นกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นกุ้งที่มีรสชาติดีและสีสวย ผู้นำเข้าที่สำคัญได้แก่สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และสหภาพยุโรป โดยมูลค่าส่งออกไปยังสหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่นมีแนวโน้มขยายตัวขึ้น ขณะที่การส่งออกไปสหภาพยุโรปยังคงลดลงอย่างต่อเนื่อง (ชัยวัฒน์ ประสมสุข, 2546) แต่ในขณะเดียวกันไทยก็ประสบปัญหาในการส่งออกหลายประการ ศิริลักษณ์ สุวรรณรังษี (2542) รายงานการกักกันหรือไม่ยอมรับผลผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งไทยเนื่องจากปัญหาสารปฏิชีวนะตกค้าง เช่น ออกซี-เตตราไซคลิน คลอแรมเฟนิคอล และไนโตรฟูแรน ปัญหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น สหรัฐกักกันสินค้าสำหรับตรวจสอบเฉพาะบางรุ่นจำนวน 10 รุ่น และกักกันอัตโนมัติ 76 รุ่น เนื่องจากปัญหาซาล-โมเนลลา (สุวิมล กิรติวิริยาภรณ์ และ ศันสนีย์ ศรีจันทร์งาม, 2543) และปัญหาเชื้อจุลินทรีย์เกินมาตรฐาน ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ภาวะสุขภาพการผลิตและการเก็บรักษา

จากปัญหาดังกล่าวแสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนตั้งแต่การเพาะเลี้ยง การจับกุ้ง การขนส่งจากแหล่งเลี้ยงหรือแหล่งจับไปยังโรงงานผลิต และกระบวนการผลิตในโรงงาน (Ward et al., 1997) โดยการปนเปื้อนดังกล่าวไม่สามารถกำจัดให้หมดไปได้ในกระบวนการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านความร้อน เช่น ผลิตภัณฑ์แช่แข็ง เนื่องจากการแช่แข็งเป็นการยับยั้งเมตาบอลิซึมของ จุลินทรีย์เท่านั้น ดังนั้นการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบจึงมีผลต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์เป็นอย่างมาก จากงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบข้อมูลจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นตอน (พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์ และคณะ, 2529; ลีลา เรื่องแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และกุลวรา แสงรุ่งเรือง, 2540; Bhaskar et al., 1995; Chen, Moody and Jiang, 1990; Cobb III et al., 1976; Zuberi, Qadri and Siddiqui, 1983) แต่ยังไม่มีการศึกษาคุณภาพกุ้งกุลาดำสดในช่วงการขายที่ตลาดกลาง ซึ่งนับว่าเป็นขั้นตอนสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อย่างมาก เพราะใช้เวลารอประมูลขายประมาณ 6-8 ชั่วโมง ในสภาวะที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากลักษณะสุขภาพที่ไม่ดีพอ ผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยนี้จะทำให้ได้ข้อมูลตลอดทุกขั้นตอนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น เพื่อใช้ในการ

เสนอแนวทางหรือป้องกันแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ต่อไป ในการวิจัยนี้มีการประยุกต์ใช้ไอโซนเพื่อลดหรือกำจัดจุลินทรีย์ ไอโซนเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรง สามารถทำลายจุลินทรีย์ต่างๆได้หลายชนิด โดยทำลายการทำงานของระบบเอนไซม์และเซลล์เมมเบรน จึงจัดเป็นสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่ความเข้มข้นต่ำ เวลาสัมผัสน้อย และจัดเป็นสารที่ปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เมื่อเทียบกับสารคลอรีนที่นิยมใช้ในโรงงานในปัจจุบัน (Kim, Yousef and Dave, 1999) ดังนั้นผลที่ได้จะมีประโยชน์อย่างมากในการลดการใช้สารเคมีและสามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ การประกันคุณภาพ การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารจากประเทศไทย นอกจากนี้ยังลดการสูญเสียค่าใช้จ่ายที่ไม่อาจประมาณได้ของมูลค่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่ยอมรับหรือถูกทำลาย เนื่องจากประเทศผู้นำเข้าไม่มีสถิติแจ้งปริมาณมูลค่าการกักกันและการไม่ยอมรับสินค้า จากสาเหตุสำคัญต่างๆดังกล่าวข้างต้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ 2 ประการ คือ ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกึ่งอุตสาหกรรมที่ตลาดกลางค้ากุ้งในแต่ละเดือน และศึกษาการใช้ไอโซนในการพัฒนาคุณภาพกึ่งอุตสาหกรรมเพื่อให้ได้วัตถุดิบกึ่งอุตสาหกรรมที่มีคุณภาพได้มาตรฐานสำหรับการแปรรูปต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ประเทศไทยส่งออกกุ้งไปจำหน่ายยังต่างประเทศเป็นจำนวนมาก และนำเงินตราเข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท โดยมีตลาดส่งออกที่สำคัญคือญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา และตลาดอื่นๆ ได้แก่ ออสเตรเลีย ตลาดเอเชียยกเว้นญี่ปุ่น เช่น สิงคโปร์ ไต้หวัน เกาหลีใต้ รวมถึงประเทศกลุ่มตลาดร่วมยุโรป ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (Thai Frozen Foods Association [TFFA], 2004) แต่ประเทศไทยต้องเผชิญกับปัญหาการส่งออกนอมนับประการ ไม่ว่าจะเป็นปัญหาการกีดกันทางการค้าที่นอกเหนือจากเรื่องภาษี (non-tariff barrier) เช่น มาตรการทางสุขอนามัย ได้แก่ Food sanitation law ของญี่ปุ่น Consumer seafood safety act หรือกฎระเบียบการนำเข้าและการขนถ่ายสินค้าที่เพิ่มขึ้น ตลอดจนมาตรการป้องกันในโรงงานแปรรูปตามกฎหมายต่อต้านการก่อการร้าย ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นต่อนการทำงานนอกเหนือจากระบบ HACCP ของสหรัฐอเมริกา และมาตรการทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ISO 14000 ขององค์การการค้าโลก (WTO) เป็นต้น ปัจจุบันประเทศต่างๆ เริ่มนำมาตราการเหล่านี้มาใช้ เพื่อเป็นการปกป้องผู้บริโภคและผู้ผลิตในประเทศของตนเอง (นุชจรินทร์ เกตุนิล, 2544) นอกจากนั้นปัญหาด้านต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้นเนื่องจากพ่อแม่พันธุ์กุ้งหายาก ราคาแพง แต่ให้ลูกที่ไม่แข็งแรงจึงจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยง ทำให้เกิดปัญหาคุณภาพทางเคมีตามมา ปัญหาภาวะการแข่งขันที่รุนแรงขึ้นในตลาดโลกเนื่องจากมีผู้ผลิตกุ้งเพิ่มขึ้น เช่น เอกวาดอร์ อินโดนีเซีย และเวียดนาม โดยในปี พ.ศ. 2544 ที่ไทยมีปัญหาเรื่องแหล่งน้ำเสียและโรคระบาด ทำให้ไทยเสียส่วนแบ่งการตลาดการนำเข้ากุ้งของประเทศต่างๆ ลดลง โดยเฉพาะของญี่ปุ่น ซึ่งการนำเข้ากุ้งของไทยมาอยู่ในอันดับที่ 4 รองจาก อินโดนีเซีย อินเดีย และเวียดนาม (TFFA, 2004) และปัญหาทางภาษี เช่น การตัดสิทธิพิเศษทางการค้า (GSP) ของสหภาพยุโรป ทำให้การส่งออกกุ้งของไทยลดลง จากอุปสรรคข้างต้นแสดงว่าตลาดนำเข้ากุ้งรายใหญ่ของโลกไม่ว่าจะเป็นสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และสหภาพยุโรปที่มีปริมาณความต้องการกุ้งรวมกันประมาณร้อยละ 87 ของตลาดโลก (สถาบันอาหาร, 2543) ซึ่งเป็นตลาดที่มีเงื่อนไขด้านคุณภาพและมาตรฐานสุขอนามัย และสิ่งแวดล้อมสูงมาก การเลี้ยงกุ้งให้มีคุณภาพตามที่ตลาดเหล่านี้ต้องการ มีข้อจำกัดในการผลิต ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ดังนั้นแม้ว่าไทยจะมีศักยภาพในการแปรรูปสูงเพียงใด แต่ถ้าวัตถุดิบและกระบวนการผลิตไม่ได้มาตรฐานตามความต้องการของประเทศผู้ซื้อดังกล่าวแล้ว ไทยก็ต้องประสบปัญหาด้านวัตถุดิบที่นำมาแปรรูปอยู่ดี ทำให้การปรับปรุงคุณภาพของ วัตถุดิบกุ้ง กลายเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในที่สุด

ตารางที่ 2.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกของกุ้งกุลาดำในปี 2543 – 2546

ลำดับที่	ประเทศ	ปี 2543		ปี 2544		ปี 2545		ปี 2546	
		ปริมาณ(ตัน)	มูลค่า(ล้านบาท)	ปริมาณ(ตัน)	มูลค่า(ล้านบาท)	ปริมาณ(ตัน)	มูลค่า(ล้านบาท)	ปริมาณ(ตัน)	มูลค่า(ล้านบาท)
1	เอเชีย(รวมญี่ปุ่น)	60,037	23,969.17	57,366	20,314.58	47,672	14,712.92	41,459	13,066.30
		ญี่ปุ่น	23,053	13,101.09	24,878	11,671.07	26,445	9,619.55	22,380
2	สหรัฐอเมริกา	65,261	29,098.37	67,167	27,245.43	42,296	15,547.13	62,920	18,705.80
3	แคนาดา	4,498	1,999.39	5,802	2,265.20	4,901	1,819.27	6,696	2,071.10
4	สหภาพยุโรป	6,612	2,354.85	7,059	2,422.45	1,814	536.12	692	235.50
5	ออสเตรเลีย	3,927	1,701.42	3,643	1,407.73	3,209	1,016.84	4,033	1,067.50
6	นิวซีแลนด์	-	-	337	115.25	454	145.42	-	-
7	สวิสเซอร์แลนด์	3,605	1,004.66	235	110.02	77	28.43	158	56.40
8	อื่นๆ	3,605	1,004.66	2,997	867.37	3,330	618.40	3,478	748.50
รวม		144,338	60,270.28	144,606	54,748.03	102,753	34,424.53	119,436	35,951.10

ที่มา : TFFA (2004)

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

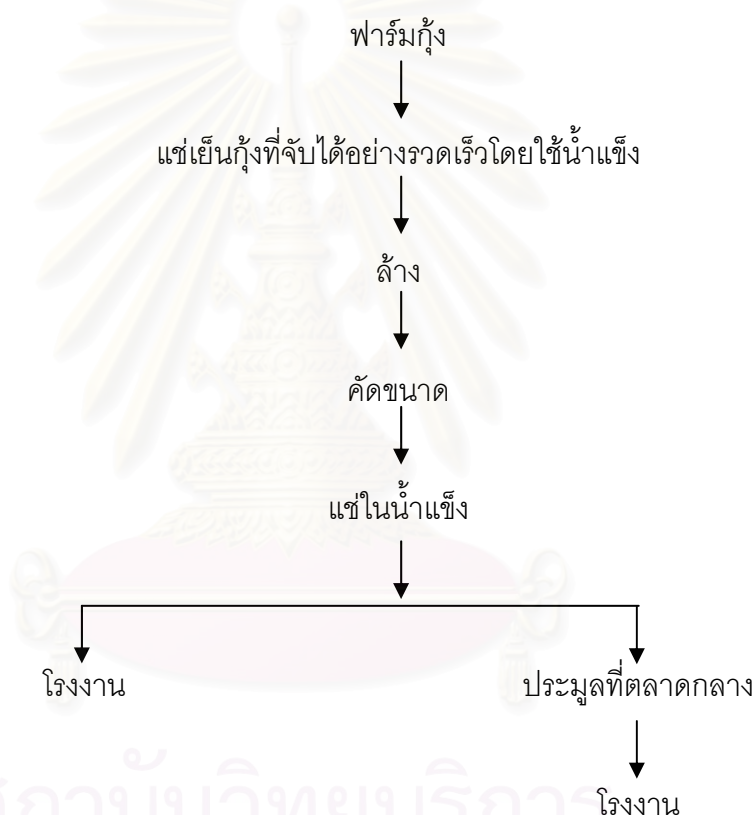
กุ้งกุลาดำจัดอยู่ใน Class Crustacea Phylum Arthropoda เป็นสัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลัง ที่เปลือกมีแถบคาดสีดำ มีการลอกคราบเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ เพื่อสร้างเปลือกใหม่ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำเริ่มจากการผสมของไข่และน้ำเชื้อภายนอก แล้วฟักเป็นตัวอ่อนตามระยะต่างๆ คือ นอเพลียด ซูเอีย ไมซีต ระยะโพสลาวา ระยะวัยรุ่น และระยะโตเต็มวัย มีขนาด 180-250 มิลลิเมตร (Putchakarn, 1991) กุ้งกุลาดำชอบอาศัยบนพื้นดินทราย ในน้ำที่ความเข้มข้นเกลือค่อนข้างต่ำ กินสาหร่าย สัตว์เล็กๆ หรืออาหารสำเร็จที่ทำจากเนื้อปลา หอย หมึก ถั่วเหลือง กุ้งส่วนใหญ่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบอินเทนซีฟ คือใช้เทคนิคในการเลี้ยงสูง พื้นที่น้อย ความหนาแน่นของกุ้งสูง มีการให้อาหารและอากาศอย่างมาก ทำให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์ง่าย และต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการดูแลรักษากุ้ง (Rosenberry, 2001) กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่นิยมผลิตมากที่สุด เพราะเมื่อนำมาปรุงอาหารจะได้กุ้งเนื้อแน่น รสชาติหวานอ่อนๆ และใช้เวลาในการปรุงน้อย

ในช่วงที่ผ่านมาประเทศไทยนิยมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นกุ้งที่มีรสชาติดีและสีสวย แต่โตช้าและมีความต้านทานโรคต่ำ ขณะที่ประเทศต่างๆ ส่วนใหญ่เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเติบโตเร็วและมีความต้านทานโรคสูง เมื่อรัฐบาลไทยผ่อนผันให้มีการนำพ่อแม่พันธุ์เข้ามาเลี้ยง เกษตรกรส่วนใหญ่จึงหันไปเลี้ยงกุ้งขาวแทนเนื่องจากให้ผลผลิตมากกว่า เพราะมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 80 แต่ข้อเสียของกุ้งขาวคือกุ้งมีขนาดเล็ก และมีคู่แข่งจากหลายประเทศที่มีต้นทุนต่ำกว่าประเทศไทย เช่น ประเทศแถบอเมริกากลาง/ใต้ และจีน ดังนั้นแนวทางที่เหมาะสมคือการเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้ได้ขนาด 40-60 ตัวต่อกิโลกรัม เพื่อส่งออกในรูปกุ้งแช่เย็นแช่แข็ง ส่วนกุ้งขาวให้ผลิตเฉพาะขนาด

เล็ก คือ ขนาดมากกว่า 60 ตัวต่อกิโลกรัม เพื่อใช้บริโภคในประเทศและแปรรูปเพิ่มมูลค่าต่อไป (ชัยวัฒน์ ประสมสุข, 2546)

กระบวนการขนส่งกุ้งกุลาดำจากแหล่งเลี้ยงไปยังโรงงานผลิต

ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในหลายจังหวัดได้แก่ จันทบุรี ระยอง ตราด สงขลา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง ฉะเชิงเทรา พังงา สตูล ชุมพร กระบี่ ภูเก็ต ระนอง เพชรบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร ประจวบคีรีขันธ์ พัทลุง ชลบุรี สุพรรณบุรี กรุงเทพฯ และสมุทรสงคราม ซึ่งกุ้งที่ผลิตได้จะเข้าสู่กระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมตามขั้นตอน ดังนี้



กุ้งที่จับขึ้นจากบ่อจะมาแช่น้ำแข็งหรือดองแห้ง ใช้เวลาประมาณ 4-6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาส่งที่โรงงานโดยตรงหรือที่ตลาดกลางกุ้ง ตามปกติระยะเวลาการขนส่งจะแปรผันตามระยะทางแต่ระยะเวลามาตรฐานที่โรงงานยอมรับได้สำหรับกุ้งสดตั้งแต่จับกุ้งจนส่งเข้าโรงงานคือ 1 วัน และอุณหภูมิต้องไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส (ประทีป สมยาประเสริฐ, 2545) โดยมีตลาดกลางกุ้งเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญ เพราะเป็นตลาดศูนย์กลางในการซื้อขายที่ผู้เลี้ยงหรือผู้รวบรวมกุ้งจากแหล่งต่างๆ ทั้งทางภาคใต้และตะวันออกเฉียงนำมาส่งแพกุ้งเพื่อเป็นตัวแทนในการซื้อขายกุ้งให้กับผู้ประกอบการห้องเย็นและโรงงานต่อไป (สำนักงานพาณิชย์จังหวัดสมุทรสาคร, 2545)

คุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำ

แบคทีเรียทั้งหมดในกุ้งแช่แข็งขึ้นกับแบคทีเรียเริ่มต้นในกุ้งเป็นส่วนใหญ่ โดยแบคทีเรียที่พบมากในกุ้งสดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ พันธุ์ของกุ้ง ฤดูกาล สิ่งแวดล้อมในการเลี้ยง การขนส่ง การเก็บรักษา เวลาและอุณหภูมิ ในระหว่างการเก็บในน้ำแข็ง (Cobb III และคณะ, 1976) เพ็ญศรี รอดมา, อุรารัตน์ วุฒิกมลรัตน์ และอชฌมา ฐานานุวัฒน์ (2534) ศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของผลิตภัณฑ์กุ้งเพาะเลี้ยงและกุ้งทะเลแช่เยือกแข็งในช่วง 1 ปี เพื่อประเมินเปรียบเทียบคุณภาพ และความสัมพันธ์ระหว่างฤดูกาลกับจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบ ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณแบคทีเรียในกุ้งทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า อิทธิพลของฤดูกาลมีผลต่อคุณภาพกุ้งทั้งสองชนิด โดยฤดูร้อนปริมาณแบคทีเรียจะสูงขึ้น

ในอาหารทะเลที่จับใหม่ๆ แบคทีเรียที่พบมากในเขตร้อน ได้แก่ *Micrococcus* 49%, *Pseudomonas* 18%, *Coryneforms* 12% และ *Acinetobacter* 9% (นภา โล่ห์ทอง, 2535) ดังนั้น การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบจึงเป็นขั้นตอนสำคัญ เนื่องจากการจับ การขนส่งจากแหล่งเพาะเลี้ยงมาตลาดกลาง และระหว่างการขายที่ตลาดกลาง มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตลอดเวลา นอกจากนี้อาจมีการปนเปื้อนจากสุขลักษณะที่ไม่ได้มาตรฐาน โดยแบคทีเรียที่สำคัญและนิยมใช้กำหนดคุณภาพคือ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โคลิฟอร์ม และต้องตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรค เช่น ซาลโมเนลลาและวิบริโอ (สุวิมล กิรติวิริยาภรณ์ และ ศันสนีย์ ศรีจันทร์งาม, 2543) ประเทศคู่ค้ารายใหญ่ เช่น สหรัฐอเมริกาค่อนข้างเข้มงวดต่อเชื้อซาลโมเนลลามาก ซึ่งเป็นผลมาจากการเจ็บป่วยของประชากรในประเทศ โดย Wallace และคณะ (2000) รายงานการตรวจพบโรค Salmonellosis 2,205 ราย และการติดเชื้อจากวิบริโอ 51 ราย จากทั้งหมด 8,576 ราย ส่วนในญี่ปุ่นเน้นเชื้อวิบริโอ เพราะเป็นสาเหตุ 1 ใน 4 ของโรคอาหารเป็นพิษ และในปี ค.ศ. 1998-1999 กลุ่มประเทศยุโรปไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำของไทย เนื่องจากพบเชื้อซาลโมเนลลาและวิบริโอ (Feldhusen, 2000) ในไทย ศิริลักษณ์ สุวรรณรังษี (2541) รายงานการพบเชื้อซาลโมเนลลา 0.5-1% ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่แข็งช่วงปี พ.ศ.2538-2540

ในการเพาะเลี้ยง พิมพันธุ์ เลียงพิบูลย์ และคณะ (2529) สํารวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากนากุ้งในเขตจังหวัดสมุทรปราการ พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกุ้งเรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* non O1 และ *V. fluvialis* และมีแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง $1.0-2.3 \times 10^5$ โคโลนีต่อกรัม สุณิสา ศรีพงษ์พันธุ์กุล (2538) รายงานการตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดในกุ้งจากบ่อเลี้ยงเท่ากับ $1.40-9.10 \times 10^4$ โคโลนีต่อกรัมและไม่พบแบคทีเรียกลุ่ม Coliform, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *V. parahaemolyticus* และ *Salmonella spp.* Reilly และ Twiddy (1992) รายงานการพบ *Salmonella spp.* 16% และ *V. cholerae* 1.5% ในบ่อเลี้ยงกุ้งน้ำกร่อยของประเทศแถบ

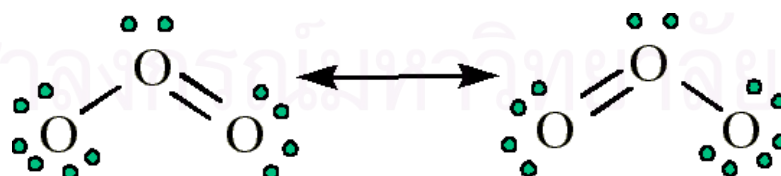
ตะวันออกเฉียงใต้ที่เป็นผู้ส่งออกกุ้งรายใหญ่ของโลกจำนวน 131 บ่อ เป็นเวลา 2 ปี นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียก่อโรคนี้อีกขึ้นในช่วงฤดูฝนและในบ่อเลี้ยงที่อยู่ใกล้แหล่งชุมชน สายพันธุ์ของซาลโมเนลลา ที่พบเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ *S. weltevreden*, *S. anatum*, *S. wandswoth*, *S. pothdam* ส่วน *V. cholerae* ที่พบเป็น non O1 และ Dalsgaard และคณะ (1995) ตรวจไม่พบซาลโมเนลลา จาก 158 ตัวอย่างแต่พบ *V. cholerae* O1 2%, *V. cholerae* non O1 33% จาก 107 ตัวอย่างของน้ำ ตะกอน กุ้ง อาหารเม็ด และปุ๋ยไก่ จากฟาร์ม 16 แห่งของไทย

ส่วนในขั้นต้นก่อนเข้าโรงงานตรวจไม่พบ แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม *Salmonella* spp. และ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งดิบ (Hanpongkittikun, Siripongvutikorn และ Cohen, 1995) แต่สุวิมล กীরติวิริยาภรณ์ และคันสนีย์ ศรีจันทรงาม (2543) ตรวจพบ *Salmonella* 11.5% ในกุ้งดิบจากโรงงานในจังหวัดสมุทรสาคร

โอโซน

โอโซนเป็นสารฆ่าเชื้อที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยา มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ ไวรัส และโปรโตซัว นอกจากนี้โอโซนยังสลายตัวอย่างรวดเร็วและได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาในปี 1997 ให้ใช้กับอาหารได้ (Kim และคณะ, 1999)

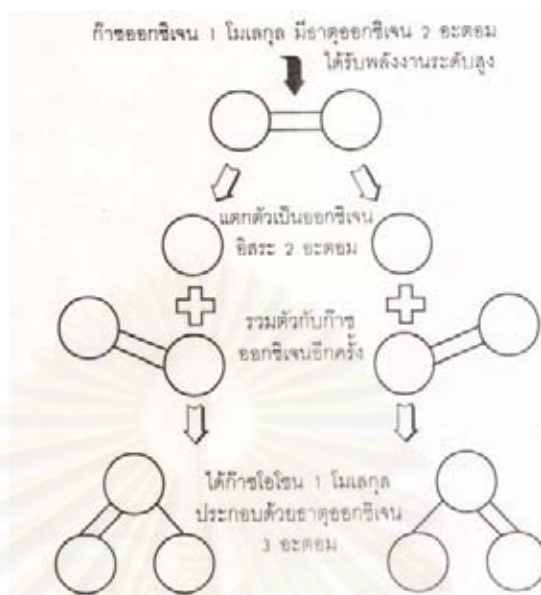
คุณสมบัติของโอโซน เป็นก๊าซสีฟ้าเมื่อละลายน้ำเป็นสีฟ้าถึงสีน้ำเงินเข้ม สูตรเคมีคือ O_3 โครงสร้างโมเลกุลเป็นรูปสามเหลี่ยมมีปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ แสดงดังรูปที่ 2.1 ก๊าซโอโซนมีกลิ่นเฉพาะตัวค่อนข้างฉุนคล้ายคลาวปลา มีน้ำหนักประมาณ 0.135 ปอนด์/ตารางฟุต มีค่าออกซิเดชันโพเทนเชียลสูง(-2.07V) เมื่อเทียบกับกรดไฮโปคลอรัส(-1.49V) หรือคลอรีน(-1.36V) จึงเป็นตัวออกซิแดนท์ที่แรง มีความเสถียรต่ำ สลายตัวง่ายคือมีครึ่งชีวิตประมาณ 36 นาทีถึง 2 ชั่วโมงในภาวะก๊าซ ส่วนในน้ำที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาทีและเมื่อสลายตัวจะกลายเป็นออกซิเจน (Budavari, 1996; Xu, 1999)



รูปที่ 2.1 ปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ของโอโซน (สุรพล รักปทุม, 2543)

ก๊าซโอโซนสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติ และมนุษย์สามารถสร้างขึ้นได้โดยการให้พลังงานสูงแก่โมเลกุลออกซิเจน ทำให้โมเลกุลออกซิเจนแตกตัวเป็นอะตอมออกซิเจนอิสระซึ่ง

ต่อมาจะรวมตัวกับโมเลกุลออกซิเจนอื่นเกิดเป็นก๊าซโอโซน (สุเมธ ขวเดช, 2541) การเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการเกิดก๊าซโอโซน (สุรพล รักปทุม, 2543)

การผลิตโอโซน

ในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตโอโซนทำในระบบปิด มีการสร้างและปล่อยโอโซนในจุดที่ต้องการใช้งาน โดยมีส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน (กัญญาจิต โสภิญโญสิริ, 2543; สิริพร สธนเสาวภาคย์, 2543; สุรพล รักปทุม, 2543) คือ

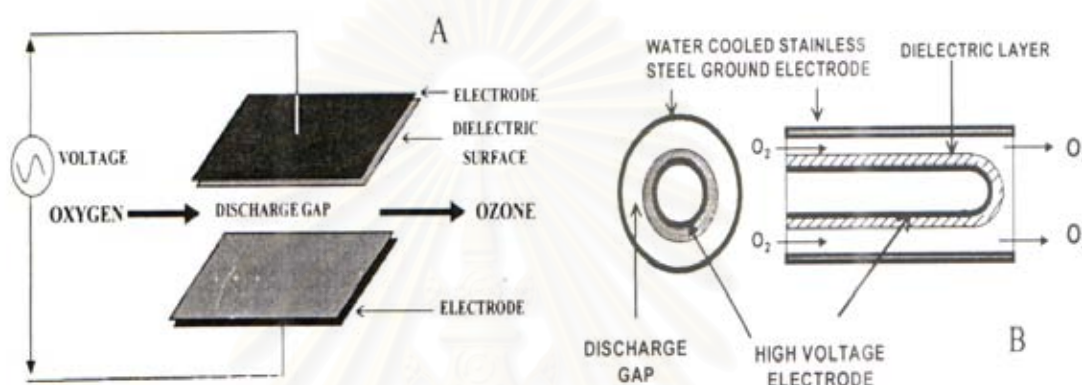
1. ก๊าซที่ใช้ผลิตเป็นอากาศปกติ หรือถ้าต้องการโอโซนความเข้มข้นสูงควรใช้ก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ สิ่งสำคัญคือควรใช้ก๊าซแห้งเพราะอากาศชื้นนำไปสู่การสร้างกรดในตริกซึ่งมีฤทธิ์ในการกัดกร่อนอุปกรณ์

2. เครื่องให้กำเนิดโอโซน มีการผลิตได้หลายวิธี ได้แก่

2.1 วิธี Photochemical โดยการปล่อยรังสีเหนือม่วงที่มีความยาวคลื่น 185 นาโนเมตรเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนทำให้เกิดการรวมตัวกันใหม่ในรูปของก๊าซโอโซนหรือ Activated oxygen วิธีนี้ให้ความแรงของการออกซิไดซ์สูงและใช้พลังงานในการผลิตน้อย แต่นิยมใช้กับการผลิตขนาดเล็กเนื่องจากปัญหาการขุ่นมัวของหลอดยูวีทำให้ปริมาณก๊าซที่ได้น้อยลงและไม่คงที่

2.2 วิธี Corona discharge เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการผลิตก๊าซโอโซนที่มีความเข้มข้นสูงกว่าวิธีแรกร้อยละ 0.5-2.0 และเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำจาก 0.35 mg/l เป็น 5.29 mg/l โดยใช้ไฟฟ้ากระแสสลับที่มีแรงเคลื่อนไฟฟ้าสูง (4,000-15,000 V) ผ่านเข้าไปใน Discharge gap ที่มีออกซิเจนอยู่ด้วย ซึ่งการเร่งอิเล็กตรอนให้วิ่งผ่าน Discharge

gap นี้ จะให้พลังงานในการแยกพันธะออกซิเจนของโมเลกุลออกซิเจนออกเป็นอะตอมออกซิเจน จากนั้นอะตอมออกซิเจนจะรวมตัวกับโมเลกุลออกซิเจนอื่น ทำให้เกิดโอโซนขึ้น โดยอิเล็กตรอนที่วิ่งผ่านขั้วไฟฟ้าทั้งสองที่มี Dielectric material ซึ่งทำจากแก้วหรือเซรามิกแทรกอยู่ ช่วยทำให้เกิดสนามไฟฟ้าที่สม่ำเสมอ แสดงดังรูปที่ 2.3 ปริมาณและคุณภาพของโอโซนที่ผลิตขึ้นอยู่กับแรงเคลื่อนไฟฟ้า ความถี่กระแสไฟฟ้า คุณสมบัติและความหนาของ Dielectric material และแรงดันใน Discharge gap



รูปที่ 2.3 การผลิตโอโซนแบบ Corona discharge (Dielectric barrier discharges หรือ Silent electrical discharge) A)แบบพื้นฐาน B) แบบท่อ (Tube-type generator unit)
(สิริพร สธนเสาวภาคย์, 2543)

2.3 วิธี Electrochemical เป็นวิธีที่ใช้หลักการ Electrolysis แยกน้ำออกเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอม แล้วแยกโมเลกุลไฮโดรเจนออกไป ส่วนอะตอมออกซิเจนจะรวมกันเป็นก๊าซโอโซน (O_3) และ Diatomic oxygen (O_2)

ถ้าต้องการผลิตเป็นน้ำโอโซนต้องเพิ่มถังผสม โดยต่อท่อจากเครื่องให้กำเนิดก๊าซโอโซนผ่านเข้าไปผสมกับน้ำ การผสมกันในถังอาจใช้วิธีการพ่นน้ำเป็นละออง ใช้ใบพัด หัวฉีด หัวผสม หรือการพ่นให้มีการไหลเวียนก็ได้

3. กระแสไฟฟ้าที่ใช้กับเครื่องผลิตก๊าซโอโซน ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงจะทำให้ผลิตก๊าซโอโซนได้มากขึ้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการละลายของก๊าซโอโซนในน้ำ

เมื่อใช้ก๊าซโอโซนในรูปของเหลว ความสามารถในการละลายของก๊าซโอโซนในของเหลว จะมีผลต่อประสิทธิภาพของน้ำโอโซนด้วย โดยมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง (Khadre, Yousef และ Kim, 2001) ได้แก่

1. ความดันและอุณหภูมิ การละลายของก๊าซในน้ำเป็นไปตามกฎของ Henry ที่กล่าวว่า “ปริมาณก๊าซในสารละลาย ณ อุณหภูมิที่กำหนดเป็นอัตราส่วนโดยตรงกับความดันของก๊าซ” และความสามารถในการละลายของก๊าซโอโซนในน้ำแสดงได้ในรูป Solubility ratio (S_r)

$$S_r = \frac{\text{mg/L โอโซนในน้ำ}}{\text{mg/L โอโซนในภาวะก๊าซ}}$$

ค่า Solubility ratio ของโอโซนเพิ่มขึ้นถ้าอุณหภูมิของน้ำลดลง แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ความสามารถในการละลายของก๊าซโอโซนที่อุณหภูมิต่างๆ

Ozone conc. (% w/w)	Method	Ozone Solubility in mg/l					
		5 °C	10°C	15°C	20°C	25°C	30 °C
0.001	UV	0.007	0.007	0.006	0.005	0.004	0.003
0.1	UV	0.74	0.65	0.55	0.42	0.35	0.27
1	CD	7.34	6.50	5.60	4.29	3.53	2.70
1.5	CD	11.09	9.75	8.40	6.43	5.29	4.04
2	CD	14.79	13.00	11.19	8.57	7.25	5.39
3	CD	22.18	19.50	16.79	12.86	10.58	8.09

ที่มา : Coastnet (2003)

งานวิจัยของ Chen และคณะ (1992) และ Yang และ Chen (1979) รายงานว่า ความสามารถในการละลายและความคงตัวของก๊าซโอโซนในสารละลายสกัดจากกุ่มและน้ำกลั่นที่อุณหภูมิต่ำดีกว่าที่อุณหภูมิสูง

2. ขนาดของฟองอากาศ เช่น เมื่อใช้ Bubbling O₃ ฟองอากาศจะมีขนาดเล็กลง มีพื้นที่ผิวมากขึ้น สามารถละลายในน้ำได้มากขึ้นขนาดฟองอากาศที่เหมาะสมควรมีขนาด 1-3 มม.

3. อัตราการไหลและเวลาสัมผัสของก๊าซโอโซนในสถานะก๊าซไปสู่สถานะของเหลว

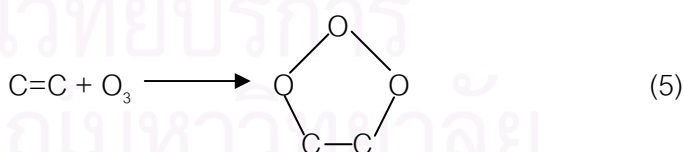
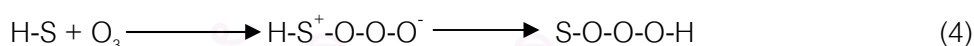
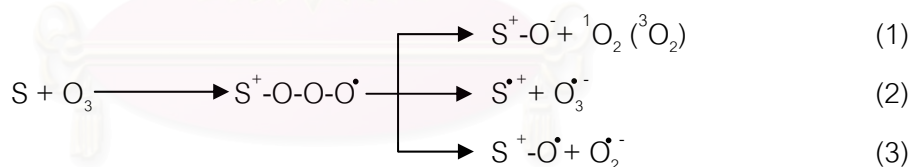
4. การผสมที่เหมาะสมจะเพิ่มการสัมผัสระหว่างฟองอากาศกับน้ำ ทำให้ความสามารถในการละลายดีขึ้น ดังนั้นการออกแบบถังผสมจึงมีผลอย่างมากต่อการละลาย (Schultz และ Bellamy, 2000)

5. ความบริสุทธิ์ของน้ำ เช่น Bubbled gaseous O_3 (1mM) ละลายในน้ำกลั่นและน้ำที่กำจัดแร่ธาตุออก ได้เร็วกว่าน้ำประปา และมีความเข้มข้นของก๊าซโอโซนสูงกว่าด้วย เนื่องจากสารอินทรีย์ในน้ำทำปฏิกิริยากับก๊าซโอโซน ส่วนเกลือแร่ในน้ำเร่งการสลายตัวของก๊าซโอโซน ทำให้มีก๊าซโอโซนเหลือค้างในน้ำน้อยลง

6. pH ของน้ำ ที่ pH สูงก๊าซโอโซนไม่เสถียรทำให้อัตราการละลายลดลง ความคงตัวของก๊าซโอโซนขึ้นกับ pH เป็นอย่างมาก การทดลองเติมก๊าซโอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M ที่ pH 5-9 นาน 15 วินาที แล้ววัดความเข้มข้นของก๊าซโอโซนโดยใช้วิธี Indigo พบว่าก๊าซโอโซนเสถียรมากที่สุดในสารละลายที่ pH 5 ความเสถียรของก๊าซโอโซนจะลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น และตรวจไม่พบก๊าซโอโซนในบัฟเฟอร์ที่ pH 9

ปฏิกิริยา Oxidation ของก๊าซโอโซนกับสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (Gunten, 2003)

การ Oxidation ของสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ด้วยก๊าซโอโซนเกิดขึ้นได้โดยผ่านปฏิกิริยาขั้นต้นหลายปฏิกิริยา โดยที่ปฏิกิริยา Electrophilic addition นั้น จะนำไปสู่การสร้างสารตัวกลาง ($S-O_3$) ซึ่งสลายตัวให้ผลิตภัณฑ์ขั้นต้นดังปฏิกิริยาที่ 1-5



โดยที่ สมการที่ 1 คือปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายออกซิเจนอะตอม กลายเป็น Anionic,

Uncharged และ Cationic species

สมการที่ 2 คือปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน

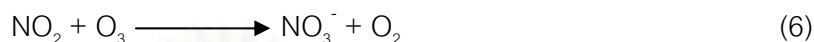
สมการที่ 3 คือปฏิกิริยาการสร้าง Oxyl radical

สมการที่ 4 คือปฏิกิริยาการแทรกก๊าซโอโซน

สมการที่ 5 คือปฏิกิริยาการสร้างวงแหวน

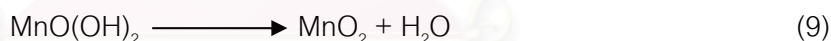
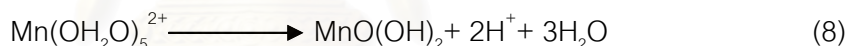
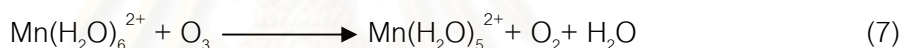
1. สารอนินทรีย์

สารอนินทรีย์ประจุลบส่วนใหญ่ เช่น Br^- , I^- , NO_2^- ทำปฏิกิริยา Oxidation กับก๊าซโอโซนโดยผ่านปฏิกิริยาในสมการที่ 1 โดยใช้ Singlet oxygen ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นตัวชี้วัดในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาสำหรับการ Oxidation ของ Nitrite โดยก๊าซโอโซน พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น Singlet oxygen ถึง 100% ดังสมการที่ 6



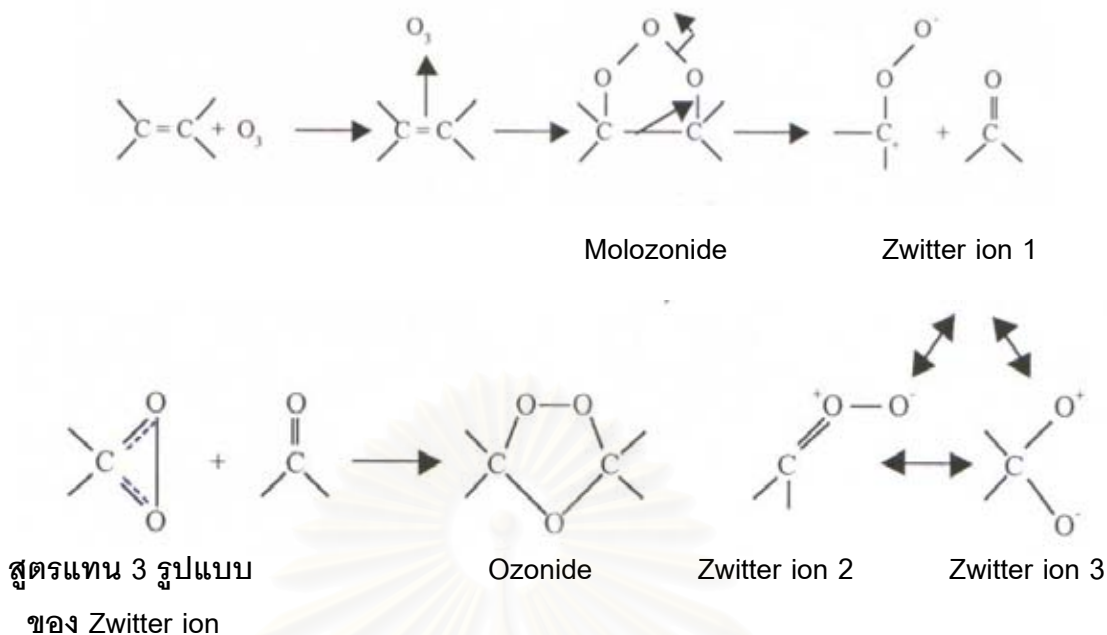
สาร Heavy anions เช่น Br^- , I^- เกิด Singlet oxygen น้อยกว่า 100% ซึ่งสามารถอธิบายตามสมมติฐานที่ว่า สาร S-O_3 ที่เป็นสารตัวกลางมีชีวิตนานพอที่จะลดการสร้าง Singlet oxygen เนื่องจากผลของ Heavy atom และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ Bromate และ Iodate

ส่วนโลหะ เช่น Fe(II) และ Mn(II) เกิดปฏิกิริยา Oxidation กับก๊าซโอโซนโดยผ่านปฏิกิริยาในสมการที่ 1 ได้ ดังสมการ 7-9



2. สารอินทรีย์

ปฏิกิริยา Oxidation ของสารอินทรีย์กับก๊าซโอโซน ขึ้นกับชนิดสารอินทรีย์เป็นสิ่งสำคัญ เช่น สารประกอบ Aliphatic จะเกิดปฏิกิริยา Electrophillic substitution reaction ที่บริเวณพันธะคู่ ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{C-O-R}$, $\text{C}=\text{C-X}$) หรืออะตอมที่มีประจุลบ (N, P, O, S และ Nucleophillic C ทำให้เกิดสาร Intermediate ที่ไม่คงตัวกลายเป็น Molozonides จากนั้น Zwitter ion ที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับ Aldehyde อย่างรวดเร็ว เกิดเป็น Ozonides ที่มีความเป็นพิษ ดังรูปที่ 2.4 ซึ่งสามารถเข้าไป Oxidize สารชีวเคมีต่างๆ ทำให้เซลล์แตกและเสียหายไปในที่สุด ปฏิกิริยานี้ต่างกับการเกิด Oxidation ธรรมดาเพราะก๊าซโอโซนจะไม่แตกตัวออกเป็นอะตอมเดี่ยวหรือโมเลกุลของออกซิเจนก่อน เนื่องจากก๊าซโอโซนทำปฏิกิริยากับสารประกอบเร็วกว่าการแตกตัวของก๊าซโอโซน (สุรพล รักปทุม, 2543)



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ Molozonide, Zwitter ion และ Ozonide (สุรพล รักปทุม, 2543)

สารประกอบ Formate เกิด Oxidation ผ่านปฏิกิริยาในสมการที่ 4 และสาร Amine ผ่านปฏิกิริยาในสมการ 1 – 3 แต่สาร Aromatic ผ่านปฏิกิริยาที่แตกต่างจากปฏิกิริยาทั้ง 4 ดังกล่าวข้างต้น โดยก๊าซโอโซนจะ Oxidize สารเหล่านี้ผ่าน Cycle addition (ปฏิกิริยา Dipolar cyclo-addition) ได้สารประกอบที่รวมกันเป็นรูวงแหวน สาร Aromatic ที่มีหมู่ OH, CH หรือ OCH₃ อยู่ตรงบริเวณ Ortho จะทำปฏิกิริยากับก๊าซโอโซนได้ดี แต่ถ้ามีหมู่ NO₂, CO₂H หรือ CHO ปฏิกิริยาจะเกิดช้า

Perez และคณะ (1995) พบว่า N-acetyl glucosamine (สารประกอบอยู่ใน Peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรียและ Viral capsids) จะทนทานต่อก๊าซโอโซนในของเหลวที่ pH 3-7 ก๊าซโอโซนทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับ Glucosamine เมื่อเทียบกับ Glucose ซึ่งทนทานต่อการย่อยสลาย จากการค้นพบนี้สามารถใช้อธิบายเหตุผลของการที่แบคทีเรียแกรมบวกสามารถทนต่อก๊าซโอโซนได้ดีกว่าแกรมลบเนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีปริมาณ Peptidoglycan ในผนังเซลล์มากกว่าแกรมลบ ก๊าซโอโซนสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีเป็นพิเศษกับ Amino acids และ Peptides ที่ pH เป็นกลางจนถึงด่าง โดยทำปฏิกิริยาบริเวณอะตอมไนโตรเจน หรือ R-group หรือทั้งสอง

Ishisaki และคณะ (1981) พบว่า ก๊าซโอโซนทำปฏิกิริยาอย่างช้าๆกับกรดไขมันอิ่มตัว ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะถูก Oxidize ด้วยก๊าซโอโซนและ Cycle-addition products ก๊าซโอโซนทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับ Nucleo bases โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กับ Thymine, Guanine และ

Uracil และจากปฏิกิริยาของก๊าซไอโซนกับ Nucleotides เหล่านี้จะได้คาร์โบไฮเดรตและ Phosphate ions

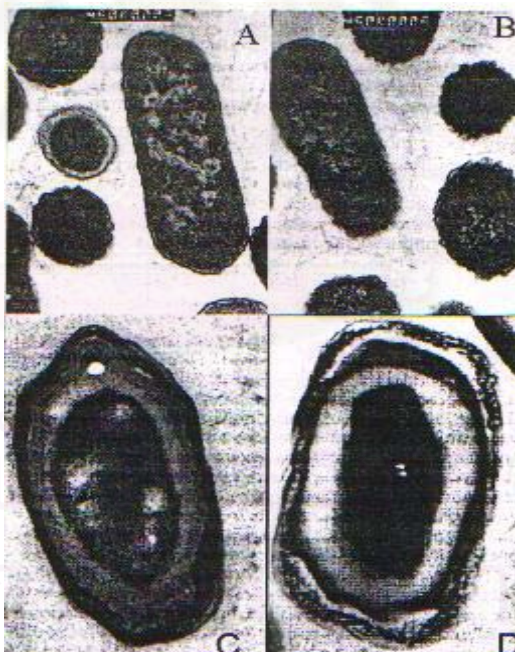
การทำลายจุลินทรีย์ของก๊าซไอโซน

การทำลายจุลินทรีย์ของก๊าซไอโซนเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ก๊าซไอโซนและ Reactive-by products เช่น $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2$ - และ HO_2 เป็นสารสำคัญในการทำลาย Cell envelope, Enzymes และ Nucleic acid ของจุลินทรีย์ (Chen และคณะ, 1992)

1. Cell envelopes และ Bacterial spore coats

ไอโซนอาจจะ Oxidize สารต่างๆ ของ Cell envelopes เช่น พันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว, SH gr. ของ Membrane-bound enzymes, Glycoproteins และ Glycolipids ทำให้เกิดการรั่วของเซลล์ สูญเสียการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ และเป็นสาเหตุการแตกของเซลล์ ทำให้เซลล์ตายอย่างรวดเร็ว

Dave (1999, อ้างถึงใน Khadre และคณะ 2001) ทดลองใช้ก๊าซไอโซนในภาวะของเหลวกับ *Salmonella enteritidis* พบว่ามีการแตกของเซลล์เมมเบรน ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงการแตกของเซลล์เมมเบรนของ *Salmonella enteritidis* (A และ B) และเปลือกหุ้มสปอร์ของ *Bacillus subtilis* (C และ D) เมื่อก่อนและหลังได้รับไอโซน ตามลำดับ

Foegeding (1985) พบว่าสปอร์ของ *Bacillus cereus* ที่ปราศจากโปรตีนเคลือบ จะถูกทำลายโดยก๊าซไฮโดรเจนอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์ปกติ และบางงานวิจัยพบว่า สปอร์ของ *Bacillus subtilis* เกิดการแตกของ Outer spore coat อย่างชัดเจนเมื่อผ่านสารละลาย ก๊าซไฮโดรเจน (Khadre และ Yousef, 2001)

2. Enzymes

กลไกสำคัญของก๊าซไฮโดรเจนในการทำลายเซลล์คือการทำลายเอนไซม์ เนื่องจาก ก๊าซไฮโดรเจนทำให้โปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเอนไซม์หลายชนิดที่มีบทบาทในการทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญต่างๆ ตกตะกอนออกมา ทำให้โปรตีนนั้นเสียสภาพ ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เช่น การให้ก๊าซไฮโดรเจนแก่ *E. coli* เป็นการทำลายระบบเอนไซม์ Dehydrogenase ของเซลล์ ทำให้ระบบการหายใจของเซลล์ถูกรบกวน *E. coli* จึงตายในที่สุด (ศิริรักษ์ เนตรรัตน์, 2539)

Takamoto, Maeba และ Kamimura (1992) รายงานว่าก๊าซไฮโดรเจนสามารถลด Activity ของเอนไซม์ใน *E. coli* ในภาวะที่มี Cytoplasmic acid galactosidase มากกว่าในภาวะที่มี Periplasmic alkaline phosphatase

3. Nucleic material

ก๊าซไฮโดรเจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA และ RNA หรือเกิดพันธะกับ RNA ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ DNA และ RNA เกิดขึ้นได้อย่างไม่สมบูรณ์ (กัญญาจิต ใส่ภิญโญศิริ, 2543)

จากการทดลองใช้สารละลายก๊าซไฮโดรเจนทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิกในหลอดทดลอง พบว่า Thymine มีความไวต่อก๊าซไฮโดรเจนมากกว่า Cytosine และ Uracil (Ishisaki และคณะ, 1981) จึงสันนิษฐานว่าก๊าซไฮโดรเจนอาจทำลายกรดนิวคลีอิกในเซลล์ได้

ก๊าซไฮโดรเจนสามารถเปิดวงของ Plasmid DNA ของ *E. coli* HB101, ลดความสามารถในการ Transformed, ทำให้เกิด Single&Double strand ที่ไม่สมบูรณ์ใน Plasmid DNA และลด Transcription activity ด้วย แต่การทดลองใช้ก๊าซไฮโดรเจนกับ *Salmonella* spp. และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าไม่มีผลต่อการเกิดการกลายพันธุ์ (Khadre และคณะ, 2001)

Chen และคณะ (1992) รายงานว่าก๊าซไฮโดรเจนสามารถย่อยสาย M13 RF DNA ใน *E. coli* และ Single strand DNA ใน Phage M13 ภายนอกเซลล์แบคทีเรีย ภายในเวลา 30 นาที แต่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ในเนื้อกึ่งที่สัมผัสกับน้ำไฮโดรเจน

ปัจจัยที่มีผลต่อ Reactivity ของโอโซน

1. อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นตัวกำหนดอัตราของปฏิกิริยาของสารฆ่าเชื้อที่ซึมผ่านเซลล์จุลินทรีย์ และอัตราเร็วของปฏิกิริยากับสารตั้งต้น เมื่อความเข้มข้นของรีเอเจนต์คงที่ การเพิ่มอุณหภูมิ 10 °C จะเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยา 2-3 เท่า แต่ก๊าซโอโซนเป็นสารที่ละลายน้ำและคงตัวน้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แม้ว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาของก๊าซโอโซนกับสารตั้งต้นจะสูงขึ้นก็ตาม

Yang และ Chen (1979) พบว่าที่อุณหภูมิ 2 °C ก๊าซโอโซนทำลายจุลินทรีย์ในเนื้อไก่ที่มีความเข้มข้น 3.63 log/ml ได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 10 นาที เมื่อใช้ก๊าซโอโซนเข้มข้น 37.7 mg/l ที่มีอัตราการไหล 650 ml/min ซึ่งเร็วกว่าที่ 25 °C อย่างชัดเจน

2. ค่า pH

ก๊าซโอโซนมีความเสถียรที่ pH ต่ำ มากกว่าที่ pH สูง การทำลายจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ จะผ่านปฏิกิริยาโดยตรงของก๊าซโอโซนที่ pH ต่ำ ส่วนที่ pH สูงประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อเกิดจากปฏิกิริยาการสลายตัวของก๊าซโอโซนเป็นอนุมูลต่างๆ เช่น Hydroxyl ion ความสัมพันธ์ของ 2 ปฏิกิริยานี้อาจจะแปรผันตามชนิดของจุลินทรีย์และภาวะการทดลอง เช่น ปริมาณ Ozone-demanding contaminants

Foegeding (1985) ศึกษาการใช้ก๊าซโอโซนเพื่อยับยั้งสปอร์ของ Bacillus และ Clostridium ที่ pH ต่างๆ พบว่าภาวะกรดเร่งอัตราการตายของสปอร์จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด

Yang และ Chen (1979) ศึกษาผลของ pH ต่อการลดจำนวนแบคทีเรีย โดยใช้ก๊าซโอโซนความเข้มข้น 2.48 mg/l นาน 5 นาทีที่อัตราการไหล 3175 ml/min พบว่าที่อุณหภูมิ 2 °C การใช้ pH 5, 7 และ 9 ไม่มีความแตกต่างกันในการลดจำนวนแบคทีเรีย แต่ที่ pH 3 แบคทีเรียลดจำนวนลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ pH 11 แบคทีเรียลดจำนวนลงเพียงเล็กน้อย ส่วนที่อุณหภูมิ 25 °C ค่า pH ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการลดจำนวนแบคทีเรีย จึงสรุปได้ว่าการใช้ก๊าซโอโซนทำลายจุลินทรีย์ในเนื้อไก่ที่ pH ต่างๆจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของก๊าซโอโซนในน้ำ

3. ความต้องการก๊าซโอโซนของตัวกลาง

ในภาวะที่มีสารอินทรีย์สูง ต้องใช้ก๊าซโอโซนที่มีความเข้มข้นมากขึ้นและเวลาสัมผัสนานขึ้นในการลดจำนวนจุลินทรีย์ลง เนื่องจากสารอินทรีย์จะแข่งขันกับจุลินทรีย์เพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับก๊าซโอโซน ดังนั้นไวรัสหรือแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับเศษซากเซลล์หรือสิ่งปฏิภูลจึงทนต่อก๊าซโอโซน ในขณะที่ไวรัสหรือแบคทีเรียบริสุทธิ์ถูกยับยั้งอย่างชัดเจน (Emerson, Sproul และ Buck, 1982) ดังนั้นน้ำโอโซนที่ใช้ในกระบวนการผลิตจึงไม่ควรมีสารอินทรีย์ปนอยู่ นอกจากนี้ผล

พลอยได้จากปฏิกิริยาของก๊าซไอโซนกับสารอินทรีย์ทำให้อายุการเก็บลดลง คุณภาพทางประสาทสัมผัสเปลี่ยนแปลง และผลิตภัณฑ์ไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค

Yang และ Chen (1979) พบว่าก๊าซไอโซนมีผลต่อแบคทีเรียลดลงในสารละลาย Ringer และ albumin จากไข่ เมื่อเทียบกับน้ำกลั่น

Restaino และคณะ (1995) พบว่า ในภาวะที่มีสารอินทรีย์ อัตราการตายของแบคทีเรียแกรมบวก (*Stap. aureus*, *L. monocytogenes*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*S. typhimurium*, *E. coli*) ในน้ำไอโซนที่มีแอมโมเนียละลายอยู่ 20 ppm ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเติม Bovine serum albumin 20 ppm พบว่าอัตราการตายลดลง เพราะก๊าซไอโซนตกค้างในสารละลาย Bovine serum albumin มีค่าน้อยกว่าในน้ำกลั่นและน้ำแอมโมเนีย

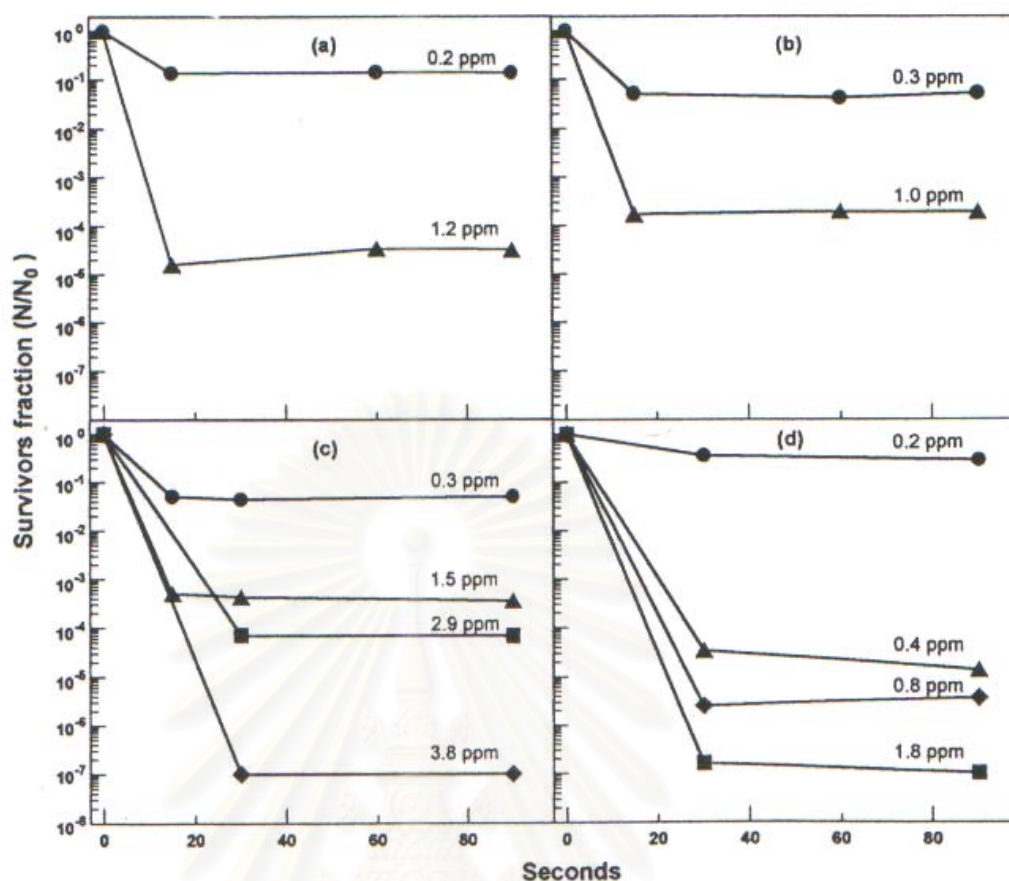
4. ชนิดของจุลินทรีย์

โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมบวกทนต่อก๊าซไอโซนมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เพราะแบคทีเรียแกรมบวกมี Peptidoglycan ในผนังเซลล์มากกว่า และมีลักษณะเป็น Multilayer ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบเป็น Single layer และแบคทีเรียแกรมลบมี Lipid และ Lipoprotein มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้ก๊าซไอโซนเข้าโจมตีบริเวณพันธะคู่ของไขมันอิมิตัวก่อน นอกจากนี้ Physiological state เช่น Lag phase, Exponential phase หรือ Stationary phase รวมทั้งรูปแบบเซลล์ที่เป็น Vegetative cell หรือ Spore ก็มีผลทำให้จุลินทรีย์มีความทนทานต่อก๊าซไอโซนแตกต่างกันด้วย

Restaino และคณะ (1995) รายงานว่าน้ำไอโซนมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*Stap. aureus*, *Enterococcus faecalis*) และแกรมลบ (*S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*) แต่แบคทีเรียแกรมบวกทนน้ำไอโซนมากกว่าแกรมลบ ยกเว้นแต่ *L. monocytogenes* ทั้งในภาวะที่มีสารอินทรีย์หรือไม่ก็ตาม สำหรับยีสต์มีความไวต่อไอโซน และสปอร์ราทนน้ำไอโซนมากที่สุด

Chen และคณะ (1992) ศึกษาผลการยับยั้งจุลินทรีย์จำนวน 9 ชนิดในสารละลายเกลือ 0.8% ที่ 25 °C โดยใช้ก๊าซไอโซนที่อัตราการไหล 100 ml/min พบว่าก๊าซไอโซนมีผลต่อจุลินทรีย์เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ *Stap. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholera*, *S. typhimurium*, *Flavobacterium aquatile*

Kim และ Yousef (2000) รายงานว่าจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีความทนทานต่อไอโซนแตกต่างกันโดยเรียงตามลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ *E. coli* O157:H7, *P. fluorescens*, *Leuconostoc mesenteroides* และ *L. monocytogenes* แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 อัตราส่วนของจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต 4 ชนิดได้แก่ (a) *P. fluorescens*, (b) *E. coli* O157:H7, (c) *Leu. mesenteroids* (d) *L. monocytogenes* (ปริมาณเริ่มต้น 1.3×10^8 - 2.5×10^8 CFU/ml) เมื่อผ่านโอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 5.9 อุณหภูมิ 25 °C

5. ความชื้นสัมพัทธ์

ก๊าซโอโซนสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ในภาวะที่บรรยากาศมีความชื้นสูง ในภาวะที่ %Relative humidity (RH) ในอากาศมีค่าน้อยกว่า 45 ก๊าซโอโซนจะไม่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ Ishisaki, Shinriki และ Matsuyama (1986) พบว่าก๊าซโอโซนเข้มข้น 0.5-3 mg/l สามารถยับยั้ง *Bacillus spore* ได้ดียิ่งขึ้น ที่ %RH สูงขึ้น และที่ %RH ≤ 50 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

6. ความสามารถของก๊าซโอโซนในการเข้าถึงเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ลอยอยู่ทั่วไปในอากาศจะถูกก๊าซโอโซนทำลายได้มากกว่าจุลินทรีย์ที่อยู่บนพื้นผิวใดๆ เนื่องจากมีตำแหน่งที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับก๊าซโอโซนได้มากกว่า และถ้าอยู่บนพื้นผิวเรียบ เช่น ผิวแก้ว ก็จะถูกกำจัดได้ง่ายกว่าบนพื้นผิวขรุขระ แต่จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่ได้แยกอยู่เป็นอนุภาคเดี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหาร ทำให้ก๊าซโอโซนเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ได้ยากขึ้น นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการ Inoculate ก็มีผลต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ต่างกันด้วย แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การยึดเกาะของ *E. coli* บนผิวแอปเปิ้ล

Time After Inoculation (hr)	Log ₁₀ CFU/g ³			
	4 °C		20 °C	
	Inoculated Control	After Water Wash	Inoculated Control	After Water Wash
0.5	4.4 ± 0.1	3.5 ± 0.0	4.4 ± 0.0	3.4 ± 0.0
24	3.9 ± 0.1	3.2 ± 0.1	4.8 ± 0.0	4.3 ± 0.2
48	3.9 ± 0.2	4.0 ± 0.8	4.1 ± 0.2	4.6 ± 0.1
72	3.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2	4.2 ± 0.3	3.9 ± 0.0

Mean of duplicate trials ± standard deviation

ที่มา : Cherry (1999)

เนื่องจากจุลินทรีย์จะสร้าง Biofilm เพื่อยึดติดกับผิวผลไม้ ดังรูปที่ 2.7 จึงทนทานต่อการล้างด้วยเทคนิคและสารฆ่าเชื้อต่างๆ ยิ่งไปกว่านั้นในผลไม้ที่ผิวไม่เรียบ เช่น แคนตาลูป และเมลอน ซึ่งเป็นที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโตและสร้าง Biofilm เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาวิธีและสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพใหม่ๆ อยู่ตลอดเวลา โดยทั่วไปก๊าซไอโซนที่ใช้ในการล้างผักและผลไม้จะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1–4 ppm และสามารถลด จุลินทรีย์ได้ 1–3 log (Cherry, 1999)



รูปที่ 2.7 ภาพ Photomicrograph ของ *E. coli* (ATCC 25922) ใน Biofilm

การวัดปริมาณก๊าซไอโซน (Khadre และคณะ, 2001)

การวัดปริมาณก๊าซไอโซนสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. วิธีทางกายภาพ โดยวัดการดูดกลืนแสงในช่วง UV, Visible และ Infrared
2. วิธีทางเคมีกายภาพ โดยวัดผลทางกายภาพจากปฏิกิริยาของก๊าซไอโซนกับสารเคมีชนิดต่างๆ ที่แสดงออกในรูปของความร้อน หรือ Chemiluminescence
3. วิธีทางเคมี โดยวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อก๊าซไอโซนทำปฏิกิริยากับสารเคมี เช่น Potassium iodide วิธี Iodometric นี้ ก๊าซไอโซนจะออกซิไดส์ Iodide ion แล้วปล่อย Iodine มาทำปฏิกิริยากับ Sodium thiosulfate จนถึงจุดยุติ วิธีนี้ใช้วัดได้ไม่เฉพาะแต่ก๊าซไอโซน แต่ตรวจวัด O_3 ; $HO_2 \cdot$ และ $O_2 \cdot$ ด้วย ดังนั้นการวัดก๊าซไอโซนตกค้างด้วยวิธีนี้จึงไม่ถูกต้อง วิธีทางเคมีที่ได้รับการยอมรับคือ Indigo method โดยก๊าซไอโซนจะจับกับพันธะคู่ของ C ของ Sulfonated indigo dye แล้วทำให้สีจางลง จากนั้นตรวจวัดด้วย Spectrophotometer วิธีนี้มีสารรบกวนน้อยกว่าวิธี Colorimetric อื่นๆ และวิธี Iodometric ด้วย

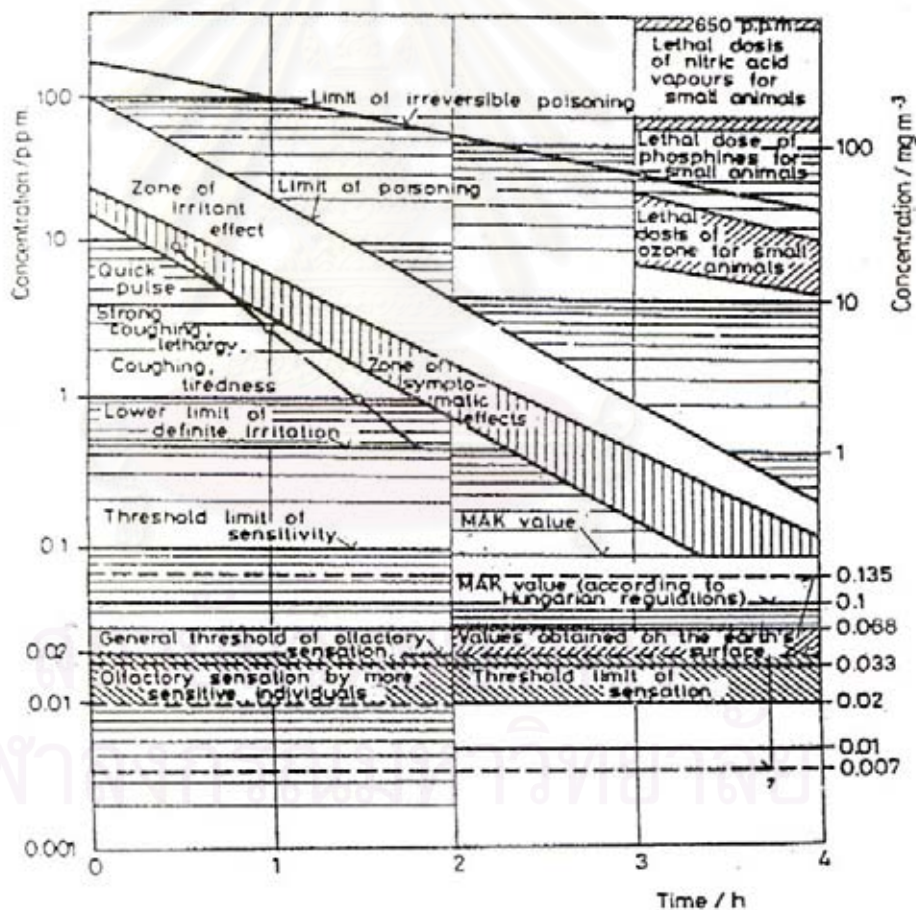
การประยุกต์ใช้ก๊าซไอโซนในอาหารทะเล

การทำลายจุลินทรีย์ของก๊าซไอโซนบนพื้นผิวอาหารมีประสิทธิภาพน้อยกว่าบนตัวกลางที่ต้องการไอโซนต่ำ ดังนั้นการลดจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารจึงขึ้นกับธรรมชาติและองค์ประกอบของพื้นผิวอาหาร ชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน และระยะเวลาที่จุลินทรีย์สัมผัสกับอาหาร โดยในอุตสาหกรรมประมงได้มีการทดสอบการใช้ก๊าซไอโซนเป็นสารฆ่าเชื้อแล้ว พบว่าก๊าซไอโซนมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนจุลินทรีย์ สามารถเพิ่มคุณภาพทางประสาทสัมผัส และเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ เช่น Haraguchi, Simidu และ Aiso (1969) รายงานว่าการใช้น้ำเกลือ 3 % ที่มีก๊าซไอโซนเข้มข้น 0.6 ppm นาน 30-60 นาทีในการล้างปลา Jack mackerel สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ 2-3 log และยืดอายุการเก็บได้ 20-60 % เมื่อใช้น้ำไอโซนล้างทุก 2 วัน Kim และคณะ (2000) พบว่าน้ำไอโซนเข้มข้น 10 ppm สามารถลด total Coliform และ Psychrotrophs ใน Channel catfish fillets ได้ 0.7 และ 0.52 log ตามลำดับ และลดจำนวนแบคทีเรียแกรมลบ เช่น Acinetobacter, Pseudomonas และ Aeromonas ได้ แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกแต่อย่างใด นอกจากนี้ยังยืดอายุการเก็บได้มากกว่า 25 % Chen และคณะ (1992) ศึกษาจุลินทรีย์ 9 ชนิดที่เติบโตในกุ้งกุลาดำที่สัมผัสน้ำไอโซนเข้มข้น 2.9-4.8 mg/l เป็นเวลา 15 และ 60 นาที พบว่าน้ำไอโซนทำลายแบคทีเรียได้ โดยมีความทนทานต่อไอโซนเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. putida*, *V. cholera*, *Stap. aureus*, *P. aeruginosa*, *V. parahaemolyticus*, *P. fluorescens*, *Flavobacterium aquatile* และ Dewitt และคณะ (1984)

พบว่าจำนวนแบคทีเรียในกึ่งที่เก็บในน้ำแข็งไอโซนมีค่าน้อยกว่าตัวควบคุมและยืดอายุการเก็บได้ 1-2 วัน

ความเป็นพิษของก๊าซไอโซน

ก๊าซไอโซนเป็นก๊าซที่มีค่า Threshold Limit Value Long Term Exposure Limit : TLV-LTEL ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับก๊าซชนิดอื่น เช่น CO_2 , N_2 , O_2 ไอโซนจึงเป็นก๊าซที่ปลอดภัยกว่าก๊าซชนิดอื่น (Xu, 1999) แต่ก๊าซไอโซนสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษที่ความเข้มข้นสูงและเวลาสัมผัสระยะหนึ่ง ซึ่ง Committee of the American Conference of Government Industrial Hygienist, Federal Ministry of Labour of the Federal Republic of Germany, Hungarian Regulation และ The Mauna Loa U.S. Weather Bureau ได้กำหนดขอบเขตการตอบสนองของมนุษย์ต่อภาวะการสัมผัสไอโซนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 ระดับความเข้มข้นต่างๆของก๊าซไอโซน ที่ทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย

(ศิริรักษ์ เนตรรัตน์, 2539)

จากรูปที่ 2.8 ผลกระทบของก๊าซไอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่

1. ความเข้มข้น 0.01 ppm เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของผู้ที่มีประสาทสัมผัสไวจะรู้สึกได้กลิ่น
2. ความเข้มข้น 0.02-0.04 ppm เป็นความเข้มข้นที่คนทั่วไปรู้สึกได้ โดยให้กลิ่นที่สดชื่น สร้างความพึงพอใจ
3. ความเข้มข้น 0.1 ppm เป็นความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายในภาวะทำงาน 8 ชั่วโมง/วัน
4. ความเข้มข้น 0.2-0.9 ppm เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อจมูกและคอ ทำให้จาม มีน้ำมูกไหล เจ็บคอ คลื่นไส้ ปวดศีรษะ และถ้าได้รับเป็นเวลานานอาจเป็นสาเหตุของอาการน้ำคั่งในปอด และติดเชื้อได้ง่าย
5. ความเข้มข้น 1-2 ppm เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดอาการ อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ เจ็บหน้าอก ไอและทางเดินหายใจแห้ง
6. ความเข้มข้น 2-10 ppm เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการไออย่างแรง เพลีย มีการอักเสบของทางเดินหายใจ ปอดบวม ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ซีพจรเต้นเร็ว
7. ความเข้มข้น 10 ppm ขึ้นไป เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดอาการอย่างรวดเร็ว ที่ความเข้มข้น 15 ppm นาน 1 ชั่วโมง เกิดความเป็นพิษ และพบว่าสัตว์ทดลองตายเมื่อมีความเข้มข้นของก๊าซไอโซน เท่ากับ 50 ppm เป็นเวลานานติดต่อกัน 1 ชั่วโมง ส่วนในคนที่ความเข้มข้น 95 ppm นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เกิด Irreversible lethal effects

โดยทั่วไปอาการที่เกิดจากการสัมผัสกับก๊าซไอโซนจะบรรเทาลงอย่างรวดเร็วเมื่อผู้ป่วยไม่ได้สัมผัสกับก๊าซไอโซน และจะหายขาดภายในเวลาเป็นชั่วโมงหรือวัน พิษของการสูดก๊าซไอโซนจะเห็นได้อย่างชัดเจนที่ปอด เช่น ปอดบวม น้ำ เลือดไหลไม่หยุด เกิดการอักเสบของทางเดินหายใจ นอกจากนี้ไอโซนยังทำลายเซลล์เม็ดเลือด และ Serum protein ส่วนการสันนิษฐานว่าก๊าซไอโซนเป็นสารก่อกลายพันธุ์หรือก่อมะเร็งในมนุษย์ยังไม่ชัดเจนเมื่อเทียบกับข้อมูลกลไกทางชีวเคมีของความเป็นพิษของก๊าซไอโซนในสัตว์และหลอดทดลอง และจากการที่ก๊าซไอโซนไม่สะสมในเนื้อเยื่อไขมันหรือเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรัง (Xu, 1999) ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันอันตรายที่เกิดจากความเป็นพิษของก๊าซไอโซน จึงมีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานการทำงานกับก๊าซไอโซนดังตารางที่ 2.4

การประยุกต์ใช้ก๊าซไอโซนในอุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีการพัฒนาการใช้ก๊าซไอโซนอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ที่มากเกินไป และต้องมีมาตรการความปลอดภัย เช่น

- 1) มีการตรวจวัดปริมาณก๊าซไอโซนซึ่งครอบคลุมท่อส่งก๊าซ ถึงผสม เครื่องทำลายก๊าซไอโซน และท่อเดินอากาศหลังจากผ่านเครื่องทำลายก๊าซไอโซนแล้ว

- 2) มีเครื่องทำลายก๊าซโอโซนแบบความร้อนหรือแบบ Catalytic
- 3) มีสัญญาณเตือนภัยทั้งในระบบภาพและเสียง
- 4) มีเครื่องช่วยหายใจแบบมีที่ใส่สารกรองก๊าซพิษในที่หยิบใช้ได้สะดวก
- 5) มีการฝึกอบรมให้ความรู้ ความเข้าใจในการใช้ก๊าซโอโซน และการปฐมพยาบาลเมื่อมีผู้ป่วยจากการสัมผัสกับก๊าซโอโซน

ตารางที่ 2.4 ค่ามาตรฐานความเข้มข้นโดยปริมาตรของก๊าซโอโซนในอากาศ (สุรพล รักปทุม, 2543; Xu,1999)

ผู้กำหนด	ความเข้มข้นโอโซน (ppm)	
	8 ชั่วโมง	1 ชั่วโมง
องค์การอนามัยโลก	0.10 – 0.12	0.15 – 0.20
สหรัฐอเมริกา (ACGIH)	TLV-LTEL = 0.1	TLV-STEL = 0.3 (15 นาที)
สหภาพยุโรป	0.11	0.18
ไทย	0.10 – 0.12	0.15 – 0.20

หมายเหตุ ACGIH = The American Conference of Governmental Industrial Hygienists

TLV-LTEL = Threshold Limit Value Long Term Exposure Limit

TLV-STEL = Threshold Limit Value Short Term Exposure Limit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินการทดลอง

สารเคมี

- การวิเคราะห์ความเข้มข้นของก๊าซโอโซนทั้งหมด (Total ozone concentration: TOC)
 - Potassium iodide (A.R.; Merck)
 - Sulfuric acid (A.R.; Merck)
 - Sodium thiosulfate (A.R.; Merck)
 - Sodium tetraborate (A.R.; Merck)
 - Mercuric iodide (A.R.; Merck)
 - Potassium dichromate (A.R.; Merck)
 - Modified starch (A.R.; Merck)
- การวิเคราะห์ความเข้มข้นของก๊าซโอโซนตกค้าง (Residual ozone concentration: ROC)
- ชุดทดสอบสำหรับวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซโอโซนตกค้าง (Spectroquant[®]; Merck)
- การวิเคราะห์ Total volatile base (TVB)
 - Potassium ferrocyanide (A.R.; Merck)
 - Zinc acetate (A.R.; Merck)
 - Lithium carbonate (A.R.; Merck)
 - Alizarin red (A.R.; Merck)
 - Sulfuric acid (A.R.; Merck)
 - Silicone antifoam (Merck)
- การวัด pH
 - สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.01 (Orion)
 - สารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.00 (Orion)
 - สารละลายบัฟเฟอร์ pH 10.01 (Orion)
- การตรวจทางจุลชีววิทยา
 - Potassium dihydrogen phosphate (A.R.; Merck)

แบคทีเรีย

- แบคทีเรียจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้แก่
 - *Escherichia coli* ATCC 25922 (DMS T 4212)
 - *Vibrio parahaemolyticus* (DMS T 5665)
 - *Salmonella anatum* (DMS T 4667)
- แบคทีเรียที่ได้จากกึ่งอุตสาหกรรม
 - แบคทีเรียรวม (Total plate count, TPC) (ภาคผนวก ข ข้อ 1.1)
 - แบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น (Psychrotrophic plate count, PPC) (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2)
 - แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (Total coliform count, TCC) (ภาคผนวก ข ข้อ 1.3)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียรวม (TPC) และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น (PPC)
 - Standard plate count agar (Oxoid)
- การตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (TCC) และ *E. coli*
 - Lauryl tryptose broth (Difco)
 - EC broth (Merck)
 - Brilliant green bile lactose broth (Merck)
 - Levine's eosin-methylene blue agar (Merck)
 - Violet red bile lactose agar (Oxoid)
- การตรวจหา *Salmonella spp.*
 - Lactose broth (Merck)
 - Salmonella enrichment broth acc. to RAPPAPORT and Vassiliadis (Merck)
 - Tetrathionate broth (Oxoid)
 - Bismuth sulfite agar (Difco)
 - Xylose lysine desoxycholate agar (Difco)
 - Hektoen enteric agar (Oxoid)
- การตรวจหา *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*
 - Alkaline peptone water (Oxoid)
 - Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (Eiken)

- การเตรียมแบคทีเรีย
 - Nutrient broth (Oxoid)

อุปกรณ์

- การผลิตและวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซไอโซน
 - เครื่องผลิตก๊าซไอโซน รุ่น OZ 3050 บริษัท EBASE Corp. Ltd. กำลังการผลิต 2000 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง อัตราการไหลของก๊าซที่ 27 องศาเซลเซียส 1 บรรยากาศ คือ 5 – 10 ลิตรต่ออนาที
 - Spectrophotometer SHIMADZU รุ่น UV-160A
 - ถังก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ 99.7%
- การตรวจวัดทางฟิสิกส์
 - pH meter ORION รุ่น 940
- การวิเคราะห์ทางเคมี
 - ชุดกลั่น TVB ประกอบด้วย Clamp, Stand, Heating mantle, Condenser, Three way adapter bent, Kjeldahl flask และ Pear shape flask
- การตรวจทางจุลชีววิทยา
 - Autoclave HIRAYAMA รุ่น HICLAVE HV-85
 - Hot air oven MEMMERT รุ่น D06064
 - Water bath MEMMERT รุ่น WB 22
 - Colony counter STUART SCIENTIFIC รุ่น SC 5
 - Refrigerated centrifuge JOUAN รุ่น MR 23i
 - Incubator INCUCCELL รุ่น MMM Medcenter
 - Biosafety carbinet class II HOLTEN รุ่น S-2010
 - Spectrophotometer SHIMADZU รุ่น UV-160A
 - Stomacher SEWARD รุ่น STOMACHER 400
 - Vortex mixer SCIENTIFIC INDUSTRIES รุ่น G-560E
 - Analytical balance SARTORIUS รุ่น BP 3100 S
 - เตาไมโครเวฟ TURBORA รุ่น TRX-4314
 - ตะเกียงแก๊สอัตโนมัติ INTEGRA BIOSCIENCE รุ่น Fireboy plus
 - ตู้เย็น WHIRLPOOL รุ่น WRN-614

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกึ่งกลาดำสดในแต่ละเดือน

สุ่มตัวอย่างกึ่งกลาดำสดจากตลาดกลางกึ่งจังหวัดสมุทรสาคร และตลาดทะเลไทย ในช่วงเวลา 01.00 – 03.00 น. ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2546 ถึง กุมภาพันธ์ 2547 เดือนละ 1 ครั้ง โดยสุ่มกึ่งทั้งตัวมีเปลือกขนาด 50 ตัวต่อกิโลกรัม ที่ไม่ผ่านการล้างจากถังใส่กึ่งหลายๆถังของร้านค้าจำนวน 5 ร้าน(5 ตัวอย่าง) ตัวอย่างละอย่างน้อย 1 กิโลกรัม รวมทั้งหมด 60 ตัวอย่าง แล้วเก็บรักษาในน้ำแข็งควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลาตั้งแต่เก็บตัวอย่างจนถึงการตรวจไม่เกิน 3 ชั่วโมง แล้วเตรียมตัวอย่างกึ่งกลาดำสดเพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียโดยนำมาตรวจหาแบคทีเรียรวม (ภาคผนวก ก ข้อ 1), แบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น (ภาคผนวก ก ข้อ 2), แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* (ภาคผนวก ก ข้อ 3), *Salmonella sp.* (ภาคผนวก ก ข้อ 4) และ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* (ภาคผนวก ก ข้อ 5) วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนแบคทีเรียในแต่ละเดือนโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ร่วมกับสถิติทดสอบ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

เพื่อศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกึ่งกลาดำ ณ ตลาดกลางในแต่ละเดือน และใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของชนิดและปริมาณแบคทีเรียในกึ่งกลาดำสดสำหรับใช้ในการเตรียมจำนวนเริ่มต้นของแบคทีเรียในการทดลองขั้นต่อไป

3.2 ศึกษาการเตรียมก๊าซไอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.2.1 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของก๊าซไอโซนทั้งหมด (Total ozone concentration: TOC) ที่เวลาต่างๆ

นำก๊าซไอโซนที่ผลิตได้จากเครื่องผลิตก๊าซไอโซนเป่าพ่นลงในสารละลาย KI แล้ววิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซไอโซนทั้งหมดด้วยวิธี Iodometric method (APHA, 1995) (ภาคผนวก จ ข้อ 1) ณ เวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 และ 60 นาที เมื่อใช้สารละลาย KI เริ่มต้น 200 และ 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และแหล่งกำเนิดก๊าซคือก๊าซออกซิเจน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าเฉลี่ยมาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของก๊าซไอโซนทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร กับเวลา

3.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของก๊าซโอโซนตกค้าง (Residual ozone concentration: ROC) ที่เวลาต่างๆ

นำก๊าซโอโซนที่ผลิตได้จากเครื่องผลิตก๊าซโอโซนเป่าพ่นลงในน้ำกลั่นแล้ววิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซโอโซนตกค้างด้วยชุดทดสอบ Spectroquant® (ภาคผนวก จ ข้อ 2) ณ เวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 และ 60 นาที เมื่อใช้น้ำกลั่นเริ่มต้น 200 และ 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และแหล่งกำเนิดก๊าซคือก๊าซออกซิเจน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่ามาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของก๊าซโอโซนตกค้างในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร ต่อเวลา

จากการศึกษาข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 ใช้เป็นข้อมูลในการเตรียมน้ำโอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 ศึกษาการทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆของน้ำโอโซน

3.3.1 ศึกษาการทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นต่างๆของน้ำโอโซน

เตรียมเชื้อ TPC, PPC, TCC, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, และ *S. anatum* โดยวัดความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่า Optical Density (OD) เท่ากับ 0.25, 0.125 และ 0.025 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข ข้อ 1 และ 2) เพื่อใช้เป็นจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในระดับที่ 1 2 และ 3 แล้วนำไปผสมกับน้ำโอโซนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 548.53 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC (จากข้อ 3.2.1) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิด (ภาคผนวก ค) นำจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจวัดได้มาคำนวณในรูปแบบ Death fraction (DF) เท่ากับ $(N_0 - N)/N_0$ เมื่อ N_0 คือจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในหน่วย log และ N คือจำนวนแบคทีเรียที่เหลือหลังจากสัมผัสโอโซนในหน่วย log

3.3.2 ศึกษาการทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆของน้ำโอโซนที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

เตรียมเชื้อ TPC, PPC, TCC, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, และ *S. anatum* โดยวัดความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่า OD เท่ากับ 0.25 (ภาคผนวก ข ข้อ 1 และ 2) เพื่อเป็นเชื้อตั้งต้น แล้วนำไปผสมกับน้ำโอโซนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 0, 217.60, 447.28, 548.53, 930.84, 1019.86 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิด (ภาคผนวก ค) นำจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจวัดได้มาคำนวณในรูปแบบ DF โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ร่วมกับสถิติทดสอบ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.3.3 ศึกษาผลของน้ำไอโซนในการทำลายแบคทีเรียในกึ่งกลาดำสด

เตรียมเชื้อ *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, และ *S. anatum* โดยวัดความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่า OD เท่ากับ 0.1 แล้วนำมาเจือจางใน PBS ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 เพื่อเป็นเชื้อตั้งต้น นำไปเติมลงในกึ่ง (ภาคผนวก ง) แล้วนำกึ่งไปล้างน้ำไอโซนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 0, 217.60, 447.28, 548.53, 930.84, 1019.86 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิด แต่การตรวจวัด TPC, PPC และ TCC ไม่ต้องเติมเชื้อตั้งต้นลงในกึ่ง นำจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจวัดได้มาคำนวณในรูปแบบ DF โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน ด้วยวิธี ANOVA ร่วมกับสถิติทดสอบ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.4 ศึกษาคุณภาพระหว่างการเก็บของกึ่งที่ผ่านการล้างด้วยน้ำไอโซน

นำกึ่งกลาดำสดมาแบ่งออกเป็น 3 ชุดคือชุดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น, น้ำไอโซนความเข้มข้นต่ำ (217 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC) และน้ำไอโซนความเข้มข้นสูง (1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวัดในวันที่ 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 โดยนำทั้ง 3 ชุดมาวิเคราะห์ค่า TVB ตามวิธีใน Medical Science, 1999 , pH และปริมาณแบคทีเรีย วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของคุณภาพกึ่งจากค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ตามรายการข้างต้น โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ร่วมกับสถิติทดสอบ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ภาคผนวก ข) โดยใช้ Semi-trained panelist 12 คน ให้คะแนนคุณสมบัติต่างๆได้แก่ ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น และสี โดยใช้การทดสอบในเชิงพรรณนาแบบให้คะแนนต่ำสุดถึงสูงสุดอยู่ในช่วง 1 ถึง 5 คะแนน ตามแบบทดสอบในภาคผนวก จ โดยวางแผนการทดลองแบบ RBD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ร่วมกับสถิติทดสอบ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

บทที่ 4

ผลการทดลอง

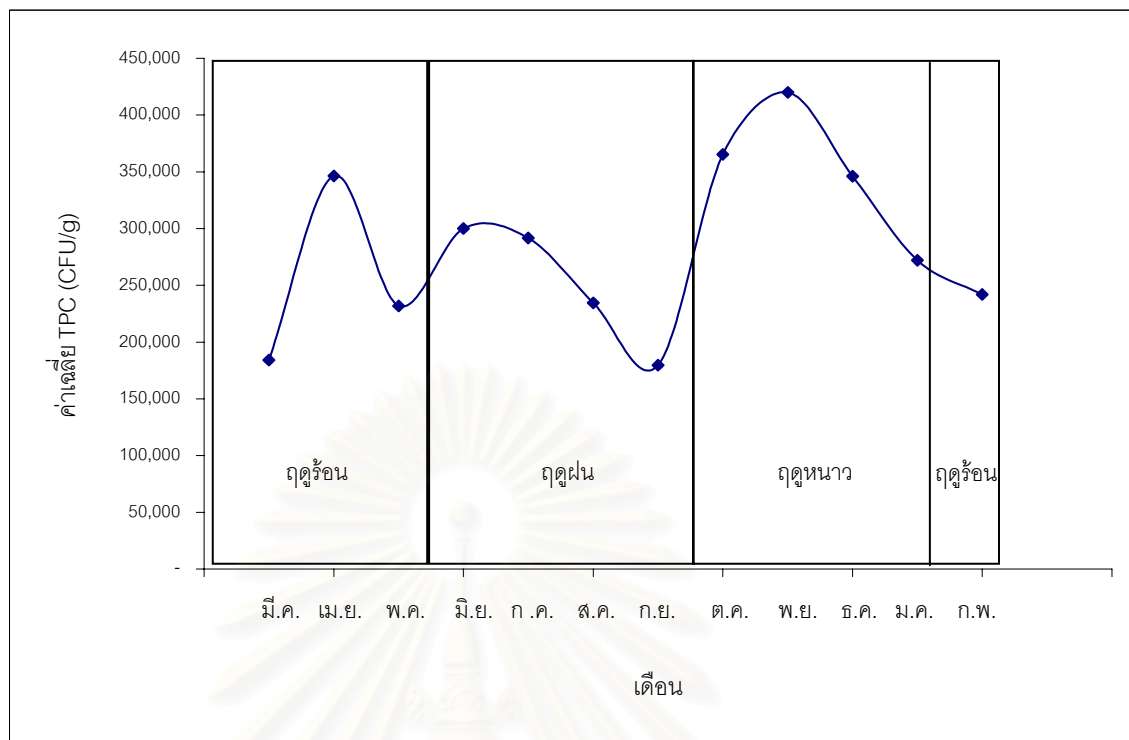
4.1 ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำสดในแต่ละเดือน

ผลการศึกษานิตและปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำสดจากตลาดกลางกุ้งและตลาดทะเลไทย จังหวัดสมุทรสาคร พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียรวม (TPC) และแบคทีเรียกลุ่มทนความร้อน (PPC) ในแต่ละเดือน แสดงดังตารางที่ 4.1 เมื่อนำค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียกลุ่มทนความร้อนมาหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรีย (CFU/g) กับเดือนแสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ โดยมีรูปแบบของการแกว่งตัวขึ้นลงของจำนวนแบคทีเรียเหมือนกัน และปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าอยู่ในช่วง $1.90 \times 10^5 - 4.12 \times 10^5$ CFU/g และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนความร้อนมีค่าอยู่ในช่วง $2.83 \times 10^3 - 1.43 \times 10^4$ CFU/g ในแต่ละเดือนค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียกลุ่มทนความร้อนในหน่วย log มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพียงบางเดือน แสดงดังตารางที่ 4.1 โดยในช่วงเดือนตุลาคม - มกราคม (ฤดูหนาว) มีแนวโน้มการตรวจพบจำนวนจุลินทรีย์กลุ่มทนความร้อนสูงกว่าช่วงอื่น

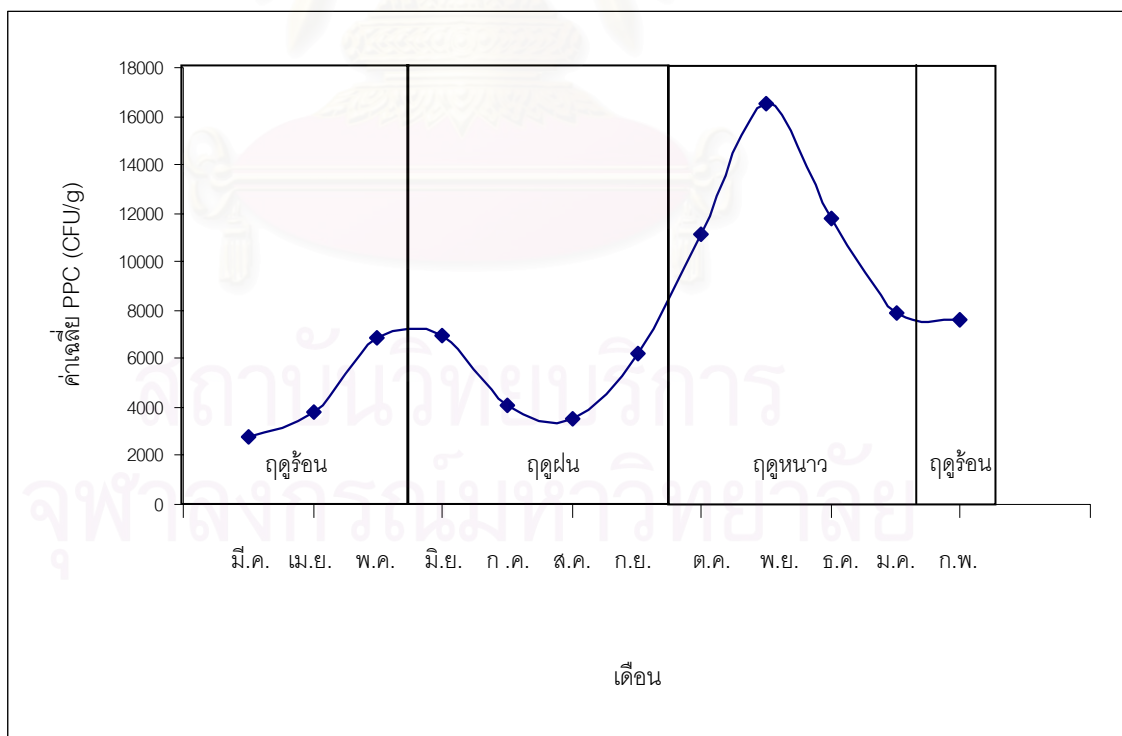
ตารางที่ 4.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำสดและการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ TPC และ PPC ในช่วง มี.ค.2546 ถึง ก.พ.2547

เดือน	TPC (โคโลนี/กรัม)	ค่าเฉลี่ยของ TPC (log)	PPC (โคโลนี/กรัม)	ค่าเฉลี่ยของ PPC (log)
มีนาคม	1.98×10^5	5.29 ^{ab}	2.83×10^3	3.43 ^e
เมษายน	3.93×10^5	5.36 ^{ab}	4.08×10^3	3.48 ^{de}
พฤษภาคม	2.37×10^5	5.31 ^{ab}	6.62×10^3	3.77 ^{abc}
มิถุนายน	3.02×10^5	5.40 ^{ab}	6.65×10^3	3.72 ^{bcd}
กรกฎาคม	2.90×10^5	5.37 ^{ab}	4.62×10^3	3.50 ^{cde}
สิงหาคม	2.35×10^5	5.25 ^b	3.60×10^3	3.47 ^{de}
กันยายน	1.90×10^5	5.21 ^b	6.47×10^3	3.75 ^{bcd}
ตุลาคม	3.68×10^5	5.39 ^{ab}	1.15×10^4	4.05 ^a
พฤศจิกายน	4.12×10^5	5.57 ^a	1.43×10^4	4.01 ^{ab}
ธันวาคม	3.33×10^5	5.49 ^{ab}	1.23×10^4	3.96 ^{ab}
มกราคม	2.77×10^5	5.42 ^{ab}	8.7×10^3	3.87 ^{ab}
กุมภาพันธ์	2.45×10^5	5.38 ^{ab}	8.15×10^3	3.88 ^{ab}

a,b,c... หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)



รูปที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียรวม (TPC) ในช่วง มี.ค.2546 ถึง ก.พ.2547



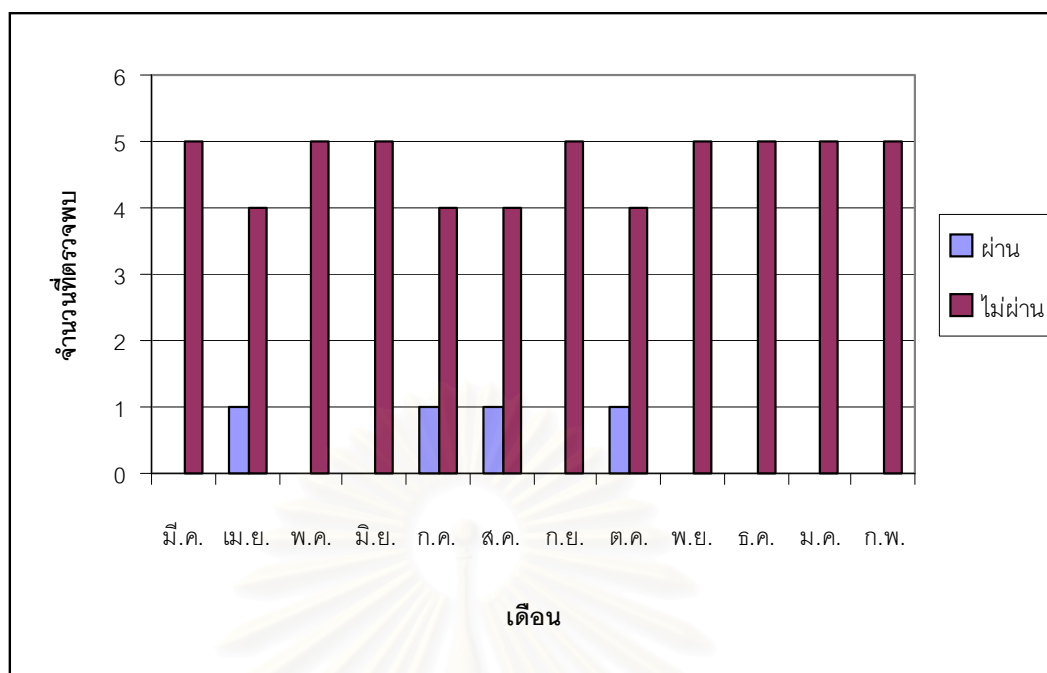
รูปที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนความร้อน (PPC) ในช่วง มี.ค.2546 ถึง ก.พ.2547

ผลการวิเคราะห์ค่า Most Probable Number (MPN) ของเชื้อ *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม แสดงในรูปความถี่ที่ตรวจพบดังตารางที่ 4.2 โดยพบว่ามี *E. coli* อยู่ในช่วงน้อยกว่า 3 – 240 MPN/g และโคลิฟอร์มอยู่ในช่วงน้อยกว่า 3 – 460 MPN/g และเมื่อใช้เกณฑ์ปริมาณ MPN ของผลิตภัณฑ์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ยอมรับได้สำหรับการส่งออกคือน้อยกว่า 3 MPN/g สำหรับ *E. coli* และไม่เกิน 10 MPN/g สำหรับแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (International trade center, Unctad/Gatt, 1983; Anonymous, 1987 อ้างถึงใน เพ็ญศรี รอดมา, อรุณีรัตน์ วุฒิกมลรัตน์ และอชฌมา สุวานานุวัฒน์, 2534) พบว่าค่าตัวอย่างกึ่งที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานการส่งออกสำหรับ *E. coli* ร้อยละ 6.67 และสำหรับโคลิฟอร์ม 45 ตามลำดับ และมีจำนวนที่ตรวจพบผ่านเกณฑ์ดังรูปที่ 4.3 และ 4.4

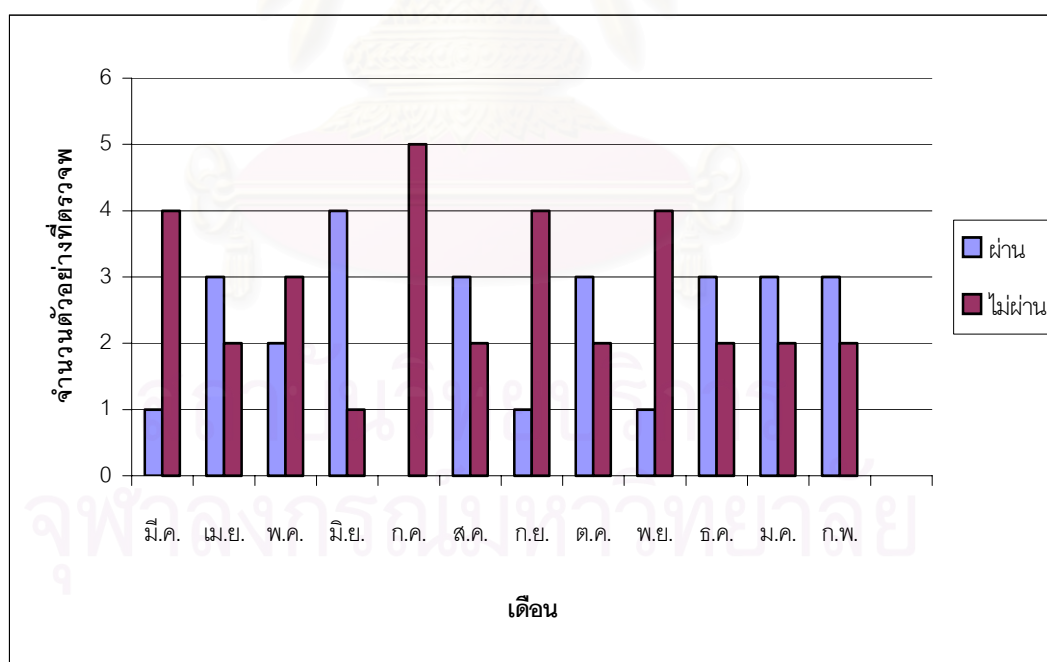
ส่วนแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* และ *Salmonella* spp. ตรวจไม่พบทั้ง 60 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4.2 ความถี่ของการตรวจพบ *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในกุ้งกุลาดำสด จำแนกตามฤดูกาล (4 เดือน) ในช่วง มี.ค.2546 ถึง ก.พ.2547

MPN/g	<i>E. coli</i>			Coliforms		
	ก.พ. – พ.ค.	มิ.ย. – ก.ย.	ต.ค. – ม.ค.	ก.พ. – พ.ค.	มิ.ย. – ก.ย.	ต.ค. – ม.ค.
	(ฤดูร้อน)	(ฤดูฝน)	(ฤดูหนาว)	(ฤดูร้อน)	(ฤดูฝน)	(ฤดูหนาว)
< 3	1	2	1	2	3	0
3 – 9.4	5	7	9	7	5	10
11 – 20	5	3	7	3	4	7
21 – 36	3	6	1	4	3	2
42 – 93	5	1	2	3	5	0
120 – 160	0	1	0	0	0	0
210 – 290	1	0	0	1	0	0
460 – 1100	0	0	0	0	0	1



รูปที่ 4.3 ความถี่ของการตรวจพบปริมาณ *E. coli* ในกึ่งกลางด่ำสดที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานในช่วง มี.ค.2546 ถึง ก.พ.2547



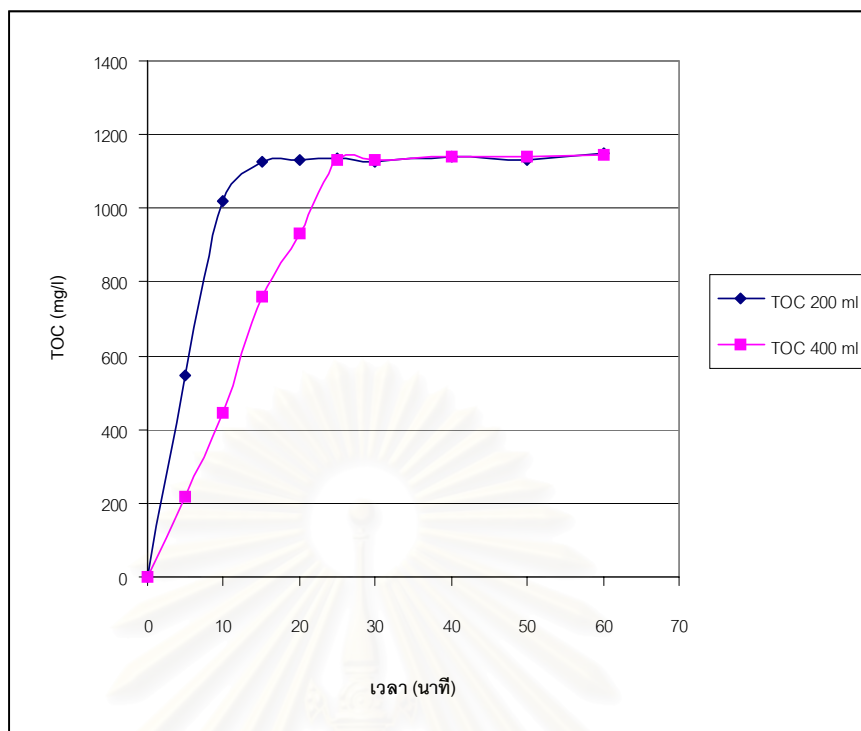
รูปที่ 4.4 ความถี่ของการตรวจพบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในกึ่งกลางด่ำสดที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานในช่วง มี.ค.2546 ถึง ก.พ.2547

4.2 ศึกษาการเตรียมก๊าซโอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ

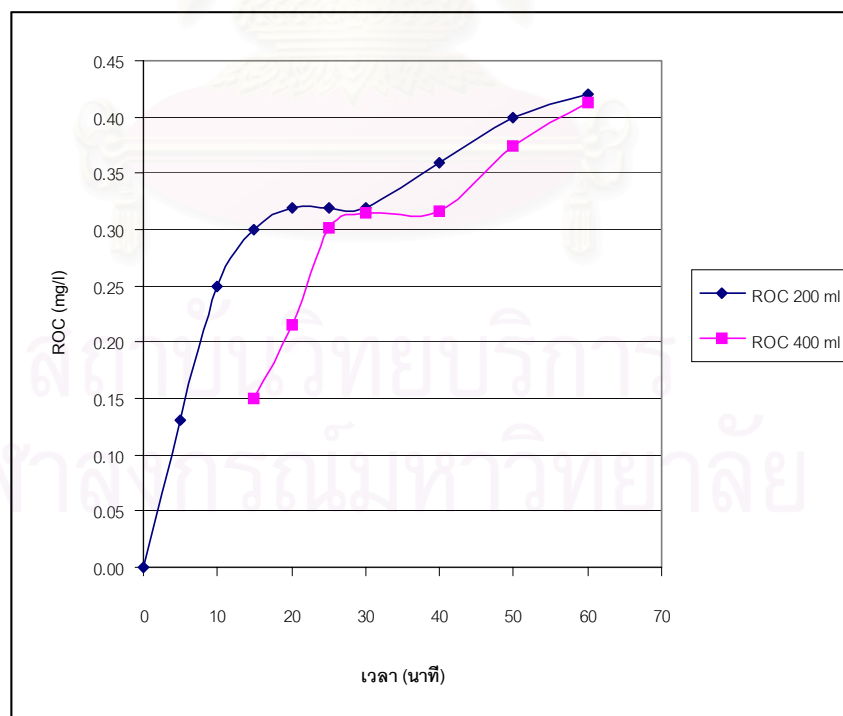
ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของก๊าซโอโซนทั้งหมด (TOC) และความเข้มข้นของก๊าซโอโซนตกค้าง (ROC) กับเวลาที่ให้ก๊าซโอโซน แสดงดังตารางที่ 4.3 และเมื่อนำค่าความเข้มข้นของก๊าซโอโซนทั้งหมด และความเข้มข้นของโอโซนตกค้างมาหาความสัมพันธ์กับเวลา แสดงดังรูปที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการผ่านก๊าซโอโซนลงในสารละลายมากขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของก๊าซโอโซนทั้งหมด และความเข้มข้นของโอโซนตกค้างมีค่ามากขึ้น ส่วนการเพิ่มปริมาตรของสารละลายมากขึ้น ต้องใช้เวลานานขึ้นเพื่อให้สารละลายมีความเข้มข้นของก๊าซโอโซนทั้งหมด และความเข้มข้นของโอโซนตกค้างมีค่าสูงสุดของความสามารถของเครื่องผลิตโอโซน

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของก๊าซโอโซนทั้งหมด และความเข้มข้นของก๊าซโอโซนตกค้าง ณ เวลาต่างๆที่ให้ก๊าซโอโซน

เวลาที่ให้ก๊าซ (นาที)	ปริมาตร 200 ml.		ปริมาตร 400 ml.	
	TOC (mg/l)	ROC (mg/l)	TOC (mg/l)	ROC (mg/l)
5	548.53 ±6.09	0.13 ±0.01	217.60 ±6.04	น้อยกว่า 0.1
10	1019.86 ±3.52	0.25 ±0.01	447.28 ±3.02	น้อยกว่า 0.1
15	1127.54 ±6.09	0.30 ±0.02	760.82 ±4.62	0.15 ±0.03
20	1132.27 ±1.76	0.32 ±0.01	930.84 ±6.04	0.21 ±0.01
25	1137.70 ±9.31	0.32 ±0.01	1129.30 ±4.62	0.30 ±0.03
30	1126.87 ±4.65	0.32 ±0.01	1133.42 ±3.02	0.31 ±0.02
40	1140.40 ±4.65	0.36 ±0.01	1138.69 ±3.49	0.32 ±0.03
50	1131.60 ±3.52	0.40 ± 0.02	1140.75 ±3.49	0.37 ±0.02
60	1149.89 ±3.52	0.42 ± 0.01	1143.27 ±4.62	0.41 ±0.01



รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของก๊าซไอโซนทั้งหมด(TOC) กับเวลาที่ให้ก๊าซไอโซน



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของไอโซนตกค้างในน้ำ(ROC) กับเวลาที่ให้ก๊าซไอโซน

4.3 ศึกษาการทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆของน้ำไอโซน

4.3.1 ศึกษาการทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นต่างๆของน้ำไอโซน

จากผลการทดลองพบว่าน้ำไอโซนมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรีย ได้แก่ แบคทีเรียรวม แบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น กลุ่มโคลิฟอร์ม *E. coli*, *V. parahaemolyticus* และ *S. anatum* โดยเมื่อใช้เวลาสัมผัสนาน 1 นาที ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำไอโซนในการทำลายแบคทีเรียข้างต้น ที่มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 5 log มีค่าเท่ากับ 548.53 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC (0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร ROC) แสดงดังตารางที่ 4.4 และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ย Death fraction (DF) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด เมื่อมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่าเมื่อจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นมีค่าน้อยลง ค่า DF จะมีค่ามากขึ้น แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 จำนวนแบคทีเรียที่เหลือหลังจากผสมกับน้ำไอโซนที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที

จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น (log)	ความเข้มข้นไอโซน(mg/l)		จำนวนแบคทีเรียที่เหลือ (log)					
	TOC	ROC	TPC	PPC	TCC	<i>E. coli</i>	<i>S. anatum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
8.71 - 8.97	0	0	8.97	8.90	8.94	8.97	8.87	8.71
	548.53	0.13	6.70	6.67	6.69	6.75	6.38	6.11
5.58 - 5.79	0	0	5.71	5.58	5.79	5.79	5.68	5.5
	548.53	0.13	4.05	3.83	4.03	4.01	3.89	3.71
4.67 - 4.90	0	0	4.90	4.88	4.85	4.78	4.67	4.63
	548.53	0.13	2.27	2.16	2.09	2.25	1.85	1.46

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียหลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้น 548.53 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที

จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น (log)	DF					
	TPC	PPC	TCC	<i>E. coli</i>	<i>S. anatum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
8.71 - 8.97	0.25	0.25	0.25	0.25	0.28	0.30
5.58 - 5.79	0.29	0.31	0.30	0.31	0.32	0.32
4.67 - 4.90	0.54	0.56	0.57	0.53	0.60	0.68

4.3.2 ศึกษาการทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆของน้ำไอโซนที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

จากผลการทดลองข้อ 4.3.1 พบว่าความเข้มข้นของไอโซนในระดับ 548.53 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC (0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร ROC) มีแนวโน้มที่จะทำให้ลายแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 5 log ได้หมด ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนนี้จึงเลือกใช้จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 9 log เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียแต่ละชนิดกับความเข้มข้นของไอโซนในระดับต่างๆ

จำนวนแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นไอโซนต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.6 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียแต่ละชนิดกับความเข้มข้นของไอโซนในระดับต่างๆด้วยวิธีทางสถิติ พบว่าระดับความเข้มข้นของไอโซนแต่ละค่า ทำให้ค่า DF ของแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.7 และความสัมพันธ์ระหว่างค่า DF ของแบคทีเรียแต่ละชนิดกับความเข้มข้นของไอโซนที่ระดับต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.7

จากรูปที่ 4.7 พบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดมีจำนวนลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของไอโซน และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไอโซนที่ระดับ 548.53 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC ขึ้นไปพบว่า *S. anatum* และ *V. parahaemolyticus* มีแนวโน้มการถูกทำลายสูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

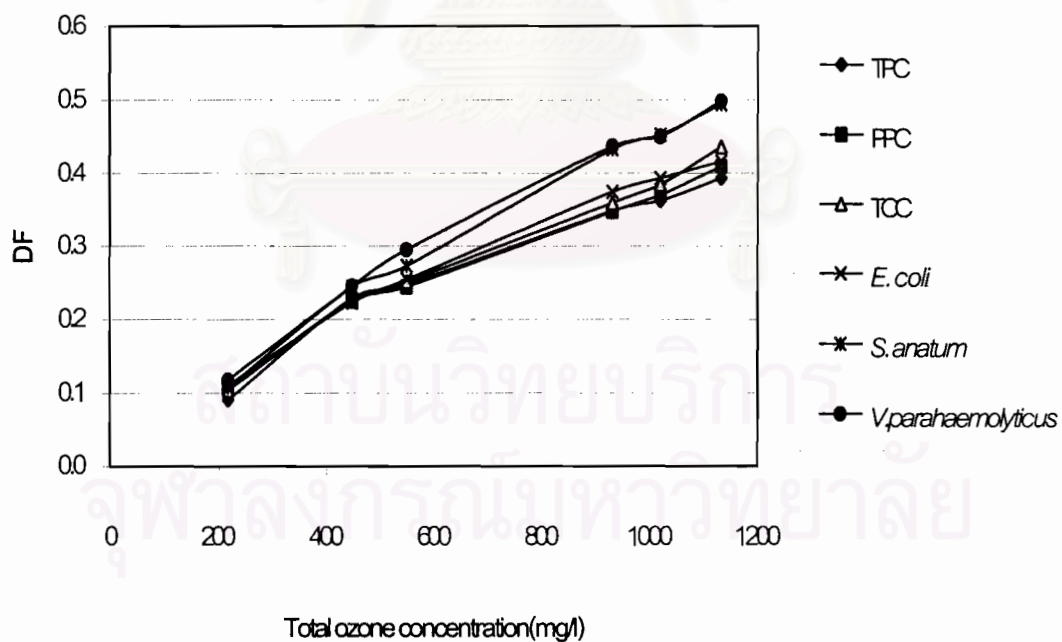
ตารางที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียที่เหลือหลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที

ความเข้มข้นไอโซน(mg/l)		จำนวนแบคทีเรียที่เหลือ (log)					
TOC	ROC	TPC	PPC	TCC	<i>E. coli</i>	<i>S. anatum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
0	0	9.00	8.90	8.93	9.00	8.89	8.72
217.60	< 0.1	8.18	7.96	8.00	8.00	7.93	7.69
447.29	< 0.1	6.94	6.89	6.92	6.99	6.72	6.58
548.53	0.13	6.78	6.73	6.69	6.71	6.46	6.15
930.84	0.21	5.87	5.81	5.72	5.63	5.04	4.91
1019.86	0.25	5.74	5.61	5.50	5.46	4.87	4.80
1132.27	0.32	5.46	5.26	5.04	5.26	4.50	4.38

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียหลังจากผสมกับน้ำโอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที

ความเข้มข้นของโอโซน (มิลลิกรัม/ลิตร TOC)	DF					
	TPC	PPC	TCC	<i>E. coli</i>	<i>S. anatum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
217.60	0.091 ^f	0.106 ^f	0.104 ^f	0.106 ^f	0.108 ^f	0.119 ^f
447.29	0.229 ^e	0.226 ^e	0.225 ^e	0.226 ^e	0.244 ^e	0.245 ^e
548.53	0.246 ^d	0.244 ^d	0.251 ^d	0.244 ^d	0.273 ^d	0.295 ^d
930.84	0.348 ^c	0.348 ^c	0.360 ^c	0.348 ^c	0.434 ^c	0.437 ^c
1019.86	0.363 ^b	0.370 ^b	0.384 ^b	0.370 ^b	0.452 ^b	0.450 ^b
1132.27	0.393 ^a	0.409 ^a	0.437 ^a	0.409 ^a	0.493 ^a	0.498 ^a

a,b,c... หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)



รูปที่ 4.7 ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียหลังจากผสมกับน้ำโอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 9 นาน 1 นาที

4.3.3 ศึกษาผลของน้ำไอโซนในการทำลายแบคทีเรียในกึ่งกลาดำสด

เมื่อเปลี่ยนตัวกลางจากน้ำกลั่นมาเป็นกึ่ง พบว่าน้ำไอโซนยังคงสามารถลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาทดสอบได้ แสดงดังตารางที่ 4.8 และค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียในกึ่งกลาดำสด (แบคทีเรียรวม แบคทีเรียกลุ่มทนความเย็นและกลุ่มโคลิฟอร์ม) และแบคทีเรียที่เติมลงในกึ่งกลาดำสด (*E. coli*, *S. anatum* และ *V. parahaemolyticus*) กับความเข้มข้นของไอโซนระดับต่างๆด้วยวิธีทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.9 คือระดับความเข้มข้นของไอโซนมีผลต่อความแตกต่างของค่า DF อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และความสัมพันธ์ระหว่างค่า DF ของแบคทีเรียแต่ละชนิดกับความเข้มข้นของไอโซนที่ระดับต่างๆแสดงดังรูปที่ 4.8

จากผลการทดลอง พบว่าไอโซนจะทำลายแบคทีเรียแต่ละชนิดในกึ่งกลาดำสดแปรผันตามความเข้มข้น และมีแนวโน้มในการทำลาย *V. parahaemolyticus* ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น เช่นเดียวกับผลการทดลองข้อ 3.2 แต่มีแนวโน้มในการทำลาย *E. coli* ได้มากกว่า *S. anatum* แสดงว่าประสิทธิภาพการทำลายแบคทีเรียของไอโซนในตัวกลางที่ไม่เหมือนกันจะแตกต่างกัน

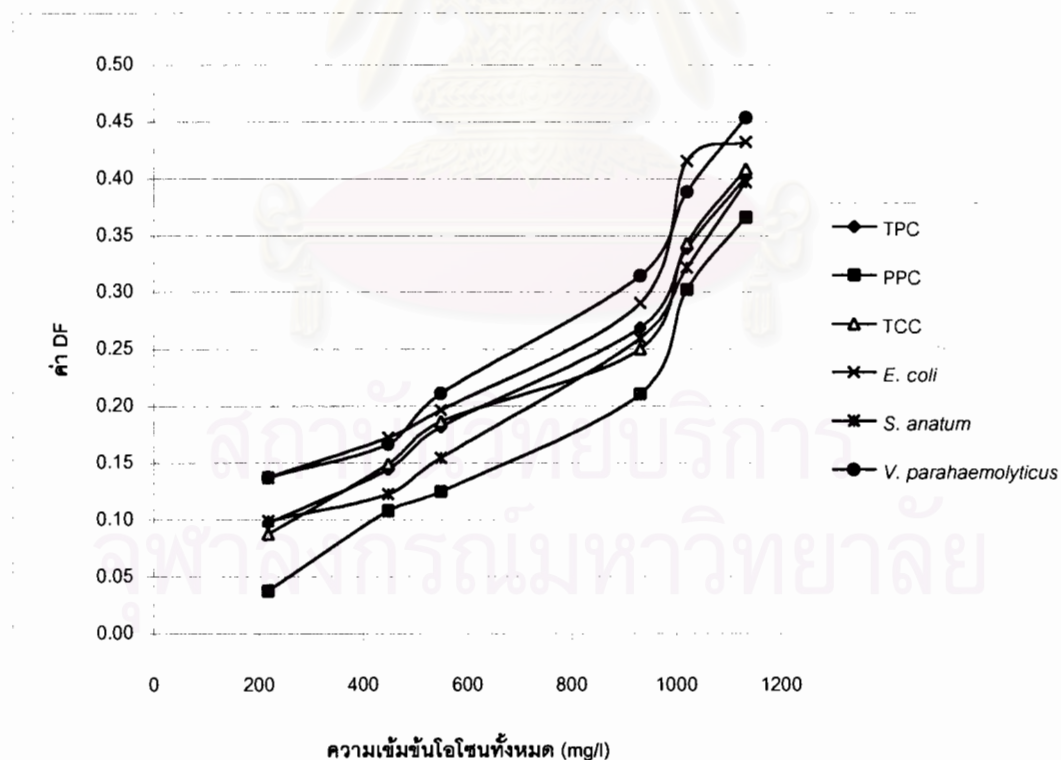
ตารางที่ 4.8 จำนวนแบคทีเรียที่เหลือหลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 3 นาน 1 นาที

ความเข้มข้นไอโซน(mg/l)		จำนวนแบคทีเรียที่เหลือ (log)					
TOC	ROC	TPC	PPC	TCC	<i>E. coli</i>	<i>S. anatum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
0	0	5.52	4.15	4.20	4.38	4.26	4.15
217.60	< 0.1	4.98	3.99	3.83	3.78	3.83	3.58
447.29	< 0.1	4.72	3.70	3.58	3.62	3.73	3.46
548.53	0.13	4.52	3.63	3.42	3.52	3.60	3.28
930.84	0.21	4.04	3.27	3.15	3.11	3.15	2.84
1019.86	0.25	3.65	2.89	2.76	2.56	2.89	2.54
1132.27	0.32	3.30	2.63	2.49	2.49	2.57	2.27

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำสดหลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 3 นาน 1 นาที

ความเข้มข้นไอโซน (มิลลิกรัม/ลิตร TOC)	DF					
	TPC	PPC	TCC	<i>E. coli</i>	<i>S. anatum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
217.60	0.097 ^f	0.038 ^e	0.088 ^f	0.137 ^f	0.099 ^f	0.137 ^f
447.29	0.145 ^e	0.108 ^d	0.149 ^e	0.172 ^e	0.122 ^e	0.167 ^e
548.53	0.182 ^d	0.125 ^d	0.186 ^d	0.197 ^d	0.154 ^d	0.211 ^d
930.84	0.269 ^c	0.211 ^c	0.250 ^c	0.291 ^c	0.260 ^c	0.315 ^c
1019.86	0.338 ^b	0.302 ^b	0.343 ^b	0.415 ^b	0.322 ^b	0.388 ^b
1132.27	0.402 ^a	0.366 ^a	0.408 ^a	0.432 ^a	0.397 ^a	0.453 ^a

a,b,c... หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)



รูปที่ 4.8 ค่าเฉลี่ย DF ของแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำสดหลังจากผสมกับน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 3 นาน 1 นาที

4.4 ศึกษาคุณภาพระหว่างการเก็บของกึ่งที่ผ่านการล้างด้วยน้ำไอโซน

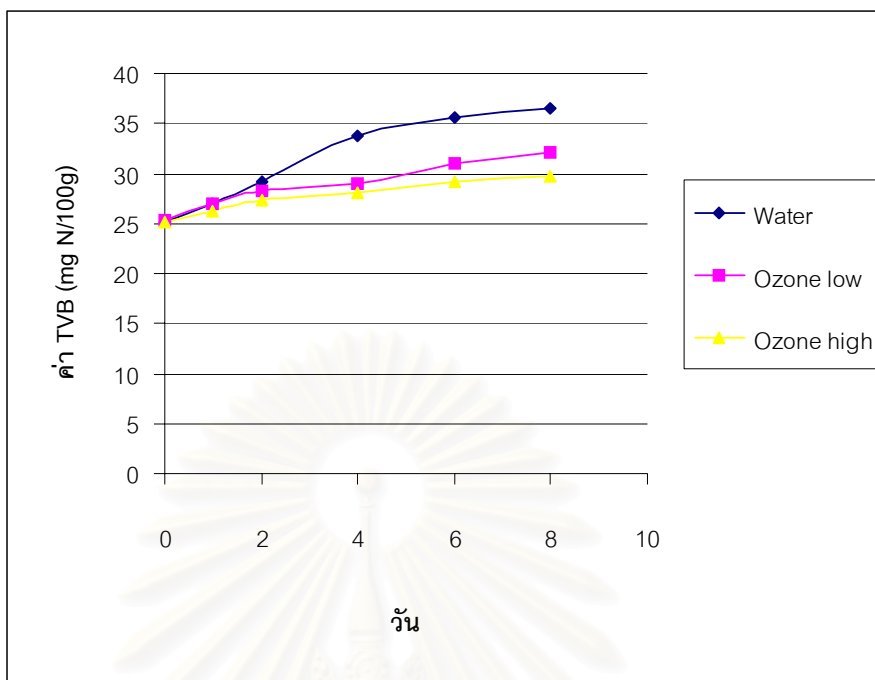
จากผลการทดลองในข้อ 3 แสดงว่าน้ำไอโซนสามารถทำลายแบคทีเรียในกึ่งได้ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงทำการศึกษาเพื่อทดสอบคุณภาพทางฟิสิกส์ เคมี จุลชีววิทยา และประสาทสัมผัส ของกึ่งที่ผ่านการล้างด้วยน้ำไอโซนที่ความเข้มข้น 0, 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC และเก็บที่ระยะเวลาต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ TVB, pH ปริมาณแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนความร้อนของกึ่งกุลาดำสดทั้ง 3 ชุด ในวันที่ 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 พบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากการล้างกึ่งด้วยน้ำไอโซนระดับต่างๆในแต่ละวันของการเก็บรักษา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยแสดงค่าการเปรียบเทียบทางสถิติดังตารางที่ 4.10 ความสัมพันธ์ของ TVB, pH ปริมาณแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนความร้อนของกึ่งกุลาดำสดทั้ง 3 ชุด กับระยะเวลาการเก็บต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.9 – 4.12 โดยไอโซนที่ความเข้มข้น 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC จะทำลายแบคทีเรียกลุ่มทนความร้อนได้หมดในวันที่ 0 และ 1

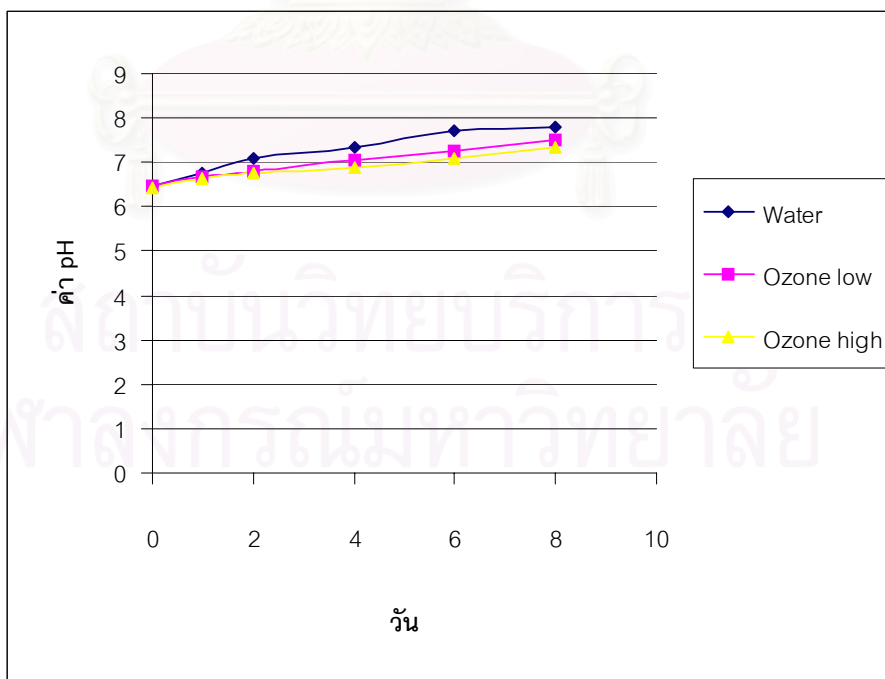
ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่า TVB, pH, ปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียกลุ่ม
ทนความเย็นของกุ้งกุลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่ระยะเวลา
การเก็บ 8 วัน ณ อุณหภูมิ 4 °C

ชนิดของน้ำ ที่ใช้ล้างกุ้ง	ระยะเวลา การเก็บ(วัน)	TVB	pH	TPC (log)	PPC (log)
น้ำกลั่น	0	25.11 ^a	6.49 ^a	5.53 ^{hi}	3.94 ^{ef}
	1	27.00 ^{bc}	6.75 ^{bc}	5.64 ⁱ	4.13 ^{fg}
	2	29.10 ^{de}	7.09 ^e	5.83 ^j	4.35 ^h
	4	33.67 ^h	7.34 ^f	6.06 ^k	4.54 ⁱ
	6	35.60 ^l	7.71 ^h	6.16 ^k	4.72 ^{ij}
	8	36.49 ⁱ	7.80 ^h	6.34 ^l	4.84 ^j
น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 mg./l TOC	0	25.27 ^a	6.46 ^a	4.95 ^e	3.43 ^c
	1	26.93 ^{bc}	6.69 ^b	5.19 ^f	3.64 ^d
	2	28.25 ^{cde}	6.81 ^{cd}	5.31 ^g	3.82 ^{de}
	4	29.00 ^{de}	7.07 ^e	5.42 ^{gh}	3.94 ^{ef}
	6	30.99 ^{fg}	7.27 ^f	5.65 ⁱ	4.02 ^{fg}
	8	32.05 ^g	7.51 ^g	5.88 ^j	4.15 ^g
น้ำไอโซนเข้มข้น 1132.27 mg./l TOC	0	25.05 ^a	6.44 ^a	4.19 ^a	not detected ^a
	1	26.23 ^{ab}	6.65 ^b	4.37 ^b	not detected ^a
	2	27.40 ^{bc}	6.75 ^{bc}	4.59 ^c	1.45 ^b
	4	28.09 ^{cd}	6.88 ^d	4.75 ^d	1.39 ^b
	6	29.11 ^{de}	7.08 ^e	5.16 ^f	1.48 ^b
	8	29.74 ^{ef}	7.36 ^f	5.32 ^g	1.45 ^b

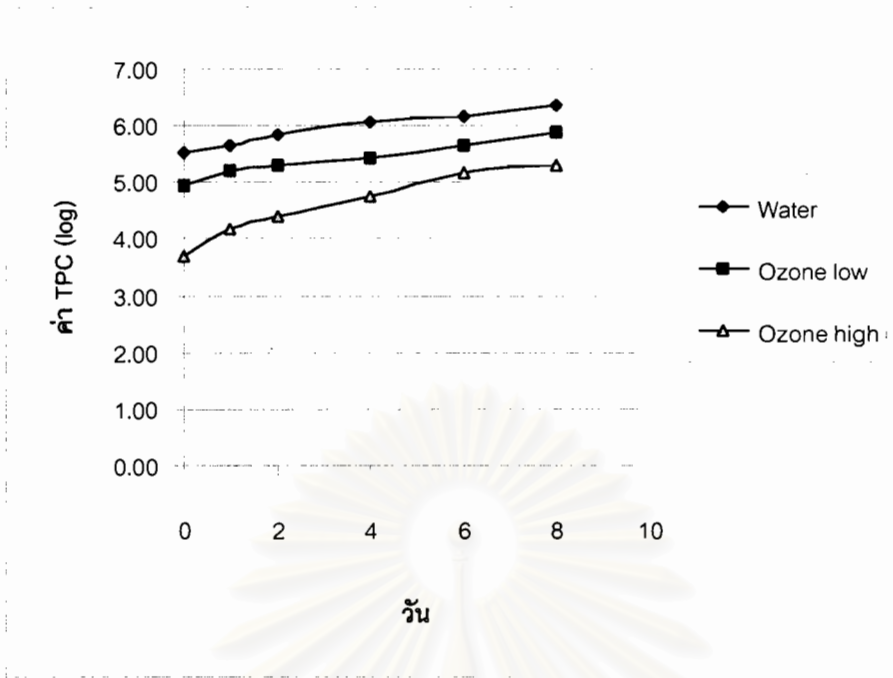
a,b,c... หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)



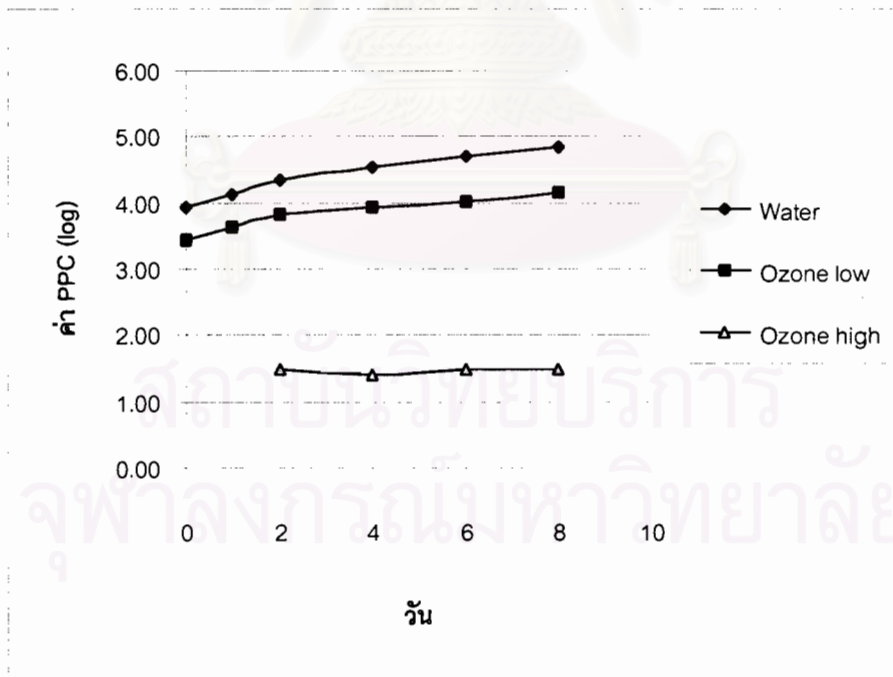
รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ของค่า TVB ในกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำโอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ ณ อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ของค่า pH ในกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำโอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ ณ อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ของค่าแบคทีเรียรวมในกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำโอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ ณ อุณหภูมิ 4 °C



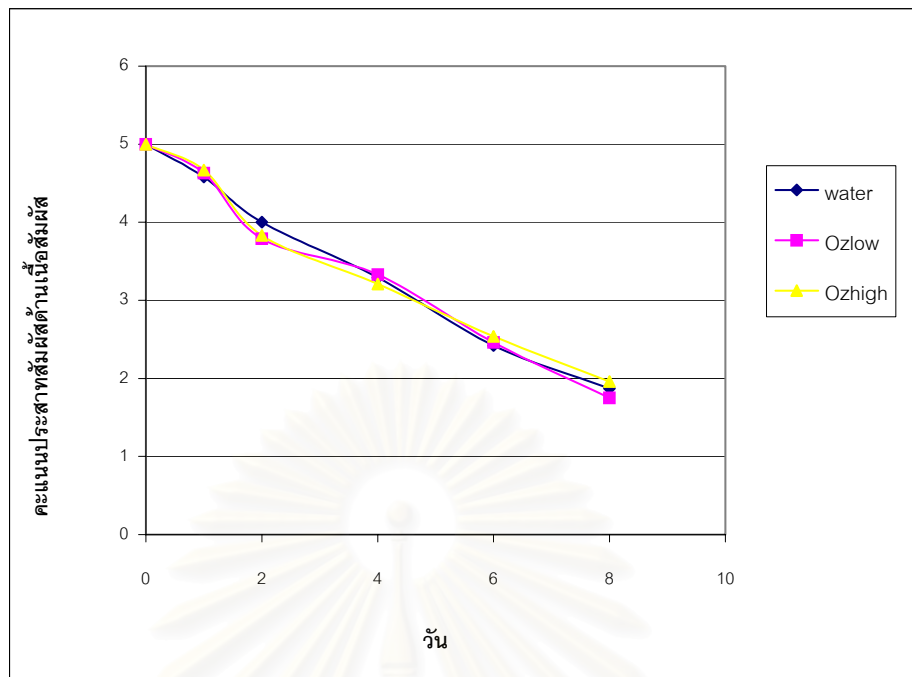
รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ของค่าแบคทีเรียกลุ่มทนความเย็นในกึ่งกลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำโอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บ ณ อุณหภูมิ 4 °C

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคะแนนทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น และสี ของกุ้งกุลาดำสดทั้ง 3 ชุด ที่ระยะเวลาการเก็บ 8 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการล้างกุ้งด้วยน้ำ ไอโซนระดับต่างๆ ในแต่ละวันของเก็บรักษา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยแสดงค่าการเปรียบเทียบทางสถิติดังตารางที่ 4.11 ส่วนความสัมพันธ์ของคะแนนการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ในด้านลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น และสี กับระยะเวลาการเก็บแสดงดังรูปที่ 4.13 - 4.15

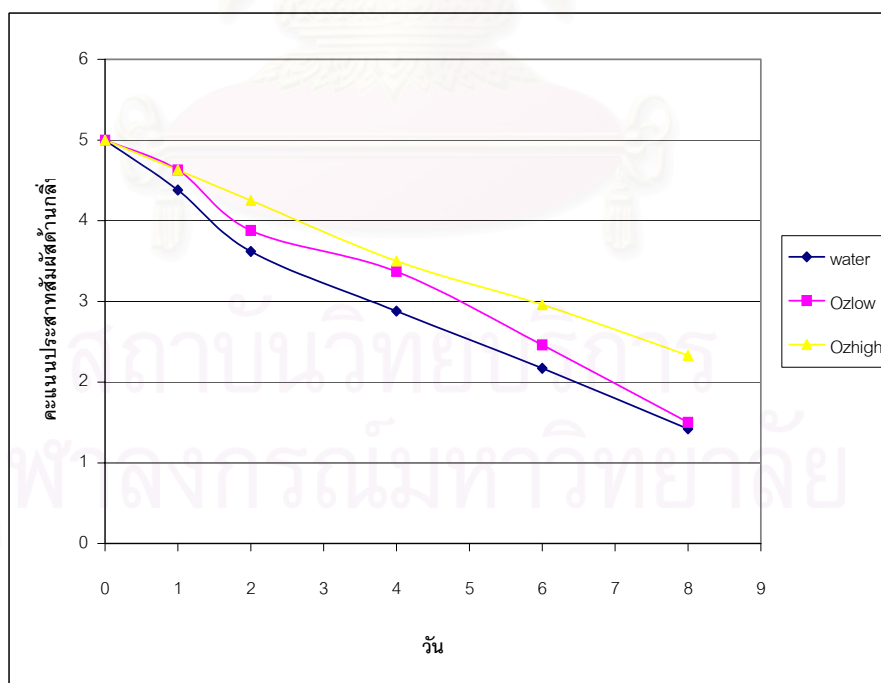
ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยคะแนนทางประสาทสัมผัสด้าน เนื้อสัมผัส กลิ่น และสี ของกุ้งกุลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำไอโซนเข้มข้นระดับต่างๆ ที่ระยะเวลาการเก็บ 8 วัน ณ อุณหภูมิ 4°C

ชนิดของน้ำที่ใช้ล้างกุ้ง	ระยะเวลาการเก็บ(วัน)	เนื้อสัมผัส	กลิ่น	สี
น้ำกลั่น	0	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a
	1	4.58 ^b	4.38 ^{bc}	4.33 ^b
	2	4.00 ^c	3.62 ^e	3.46 ^c
	4	3.29 ^d	2.88 ^f	2.58 ^d
	6	2.42 ^e	2.17 ^h	2.04 ^e
	8	1.87 ^f	1.42 ⁱ	1.25 ^f
น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 mg./l TOC	0	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a
	1	4.63 ^b	4.63 ^b	4.42 ^b
	2	3.79 ^c	3.88 ^d	3.25 ^c
	4	3.33 ^d	3.37 ^e	2.42 ^d
	6	2.46 ^e	2.46 ^g	1.88 ^e
	8	1.75 ^f	1.50 ⁱ	1.39 ^f
น้ำไอโซนเข้มข้น 1132.27 mg./l TOC	0	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a
	1	4.67 ^b	4.63 ^b	4.46 ^b
	2	3.83 ^c	4.25 ^c	3.38 ^c
	4	3.21 ^d	3.50 ^e	2.67 ^d
	6	2.54 ^e	2.96 ^f	1.96 ^e
	8	1.96 ^f	2.33 ^{gh}	1.17 ^f

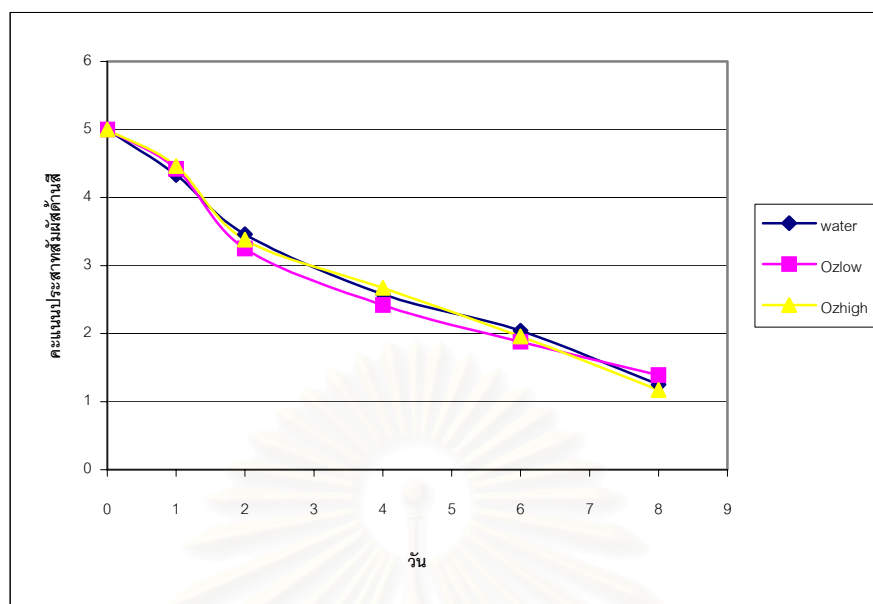
a,b,c... หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)



รูปที่ 4.13 ค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพทางประสาธสัผัสด้านเนื้อสัมผัสของกึ่งกูลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บที่ 4 °C



รูปที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพทางประสาธสัผัสด้านกลิ่นของกึ่งกูลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บที่ 4 °C



รูปที่ 4.15 ค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพทางประสาตสัมผัสด้านสีของกึ่งกูลาดำสดที่ล้างด้วยน้ำกลั่น น้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัมต่อลิตร TOC กับระยะเวลาการเก็บที่ 4 °C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำสดในแต่ละเดือน

ในการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำสดจากตลาดกลางกุ้งนั้น พบว่าค่าจำนวนแบคทีเรียรวมเฉลี่ยตลอดทั้งปีอยู่ในช่วง $1.90 \times 10^5 - 4.12 \times 10^5$ โคโลนีต่อกรัม (ตารางที่ 4.1) ซึ่งเป็นปริมาณที่ยอมรับได้สำหรับการส่งออกของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งที่กำหนดให้มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ไม่เกิน 10^6 โคโลนีต่อกรัม (International trade center, Unctad/Gatt, 1983; Anonymous, 1987, อ้างถึงใน เพ็ญศรี รอดมา และคณะ, 2534) โดยในแต่ละเดือนมีค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียรวมแกว่งตัวขึ้นลงตลอด เมื่อพิจารณาในแต่ละเดือนของฤดูร้อน (กุมภาพันธ์ – พฤษภาคม) ฤดูฝน (เดือนมิถุนายน – กันยายน) และฤดูหนาว (เดือนตุลาคม – มกราคม) พบว่าจำนวนแบคทีเรียรวมมีค่าไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ต่างกับการศึกษาของ เพ็ญศรี รอดมา และคณะ (2534) ที่รายงานว่าคุณภาพของฤดูกาลมีผลต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์กุ้งเพาะเลี้ยงและกุ้งทะเลแช่เยือกแข็ง โดยในฤดูร้อนปริมาณแบคทีเรียจะสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของตัวอย่างที่เป็นกุ้งกุลาดำสดกับผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งซึ่งผ่านกระบวนการแปรรูปเบื้องต้นแล้ว ทำให้กระบวนการผลิตในแต่ละขั้นตอนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียรวม (Zuberi Qadri และ Siddiqui, 1983)

เมื่อเก็บกุ้งไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าแบคทีเรียจะมี Activity ช้าลง แต่แบคทีเรียกลุ่มทนความเย็นยังสามารถเจริญและทำให้เกิดการเน่าเสียในกุ้งได้ ดังนั้นจึงตรวจหาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มนี้โดยพบว่าจำนวนแบคทีเรียกลุ่มทนความเย็นมีการแกว่งตัวขึ้นเช่นเดียวกับจำนวนแบคทีเรียรวม ในช่วงเดือนตุลาคม – มกราคม (ฤดูหนาว) มีแนวโน้มสูงกว่าช่วงเดือนอื่นเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากในช่วงฤดูหนาวมีอุณหภูมิต่ำกว่าฤดูอื่นจึงมีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้มากขึ้น โดยแบคทีเรียกลุ่มทนความเย็นนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ที่ 0 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส (Berry และ Foegeding, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahaman และคณะ (2001) และ Rattagool และคณะ (1986) ที่สรุปว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีมากในกุ้ง ได้แก่ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มนี้

เมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละของการตรวจพบ MPN *E. coli* และโคลิฟอร์ม โดยใช้เกณฑ์ปริมาณที่ยอมรับได้สำหรับการส่งออกของผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งคือ ต่ำกว่า 3 และไม่เกิน 10 MPN/g. ตามลำดับ (International trade center, Unctad/Gatt, 1983; Anonymous, 1987, อ้างถึงใน เพ็ญศรี รอดมา และคณะ, 2534) พบว่าทั้ง *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม ผ่านเกณฑ์

เพียงร้อยละ 6.67 และ 45.00 ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุงคุณภาพคุณภาพกึ่ง
 กูลาดำสดให้มีปริมาณ *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มให้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และจาก
 ผลการศึกษาในแต่ละเดือนตลอดปี พบว่ามีแนวโน้มการตรวจพบใกล้เคียงกัน การตรวจพบ *E. coli*
 และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มนั้นน่าจะมีความสัมพันธ์กับสภาพการเพาะเลี้ยง ดังงานวิจัยของ
 Bhaskar และคณะ (1995) ซึ่งรายงานว่แหล่งสำคัญที่ตรวจพบ *E. coli* คือตะกอนดินในบ่อที่เกิด
 จากการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ และการให้อาหาร Dalsgaard และคณะ (1995) พบว่าเมื่อปริมาณ
 Coliforms ในตะกอนมีค่าสูงขึ้นทำให้ปริมาณ Coliforms ที่ตรวจพบในกึ่งสูงขึ้นตามไปด้วย อันเป็น
 ผลมาจากธรรมชาติของกึ่งที่ฝังตัวในตะกอนดินก้นบ่อ บริเวณเหนืออกและหัวจึงมีการปนเปื้อนสูง
 ดังนั้นการจัดการฟาร์มที่ดี ทำการเพาะเลี้ยงอย่างถูกสุขลักษณะ อาจช่วยลดปัญหาจากแบคทีเรีย
 กลุ่มนี้ได้ และน้ำแข็งที่ใช้ในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อรักษาคุณภาพกึ่งนั้น ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง
 ที่นำมาพิจารณา เพราะน้ำแข็งอาจไม่สะอาดพอและมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ ดัง
 ผลการสำรวจของ ศิรินทิพย์ อินทร์ชัย, สมชาย สิทธิโสภากุล และกรรณา ศิริสมิทธิ์ (2543) ที่พบว่า
 ตัวอย่างน้ำแข็งไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน จากปัญหา *E. coli* และ Total Coliforms ที่กำหนดให้
 ต้องไม่พบ และน้อยกว่า 2.2 MPN/100 มิลลิลิตร (สาธารณสุข, 2522) คิดเป็น 14.1 และ 49.5 %
 ตามลำดับ อันทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามจากน้ำแข็งสู่กึ่งได้

ส่วนแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ เช่น *Salmonella* และ *Vibrio* นั้นตรวจไม่พบในทุกตัวอย่าง
 ซึ่งสอดคล้องกับ พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์ และคณะ (2529) ที่ตรวจพบ *Salmonella* จากน้ำกึ่งเขต
 จังหวัดสมุทรปราการเพียง 0.5 % จากตัวอย่าง น้ำและตะกอนดิน จำนวน 283 ตัวอย่าง และ
 Dalsgaard และคณะ (1995) ที่ไม่พบ *Salmonella* จากตัวอย่างน้ำ ตะกอน ดิน กึ่ง อาหารเม็ด
 และปุ๋ยมูลไก่ ในบ่อเลี้ยงกึ่งภาคใต้ของไทย ทั้งที่มีปริมาณ Total และ Fecal Coliforms สูง โดย
 แตกต่างจาก Kaper และคณะ (1977) ที่รายงานการตรวจพบ *Salmonella* ในปริมาณที่สัมพันธ์
 กับปริมาณ Total และ Fecal Coliforms Reilly และ Twiddy (1992) ตรวจพบ *Salmonella*
 16.0 และ 22.1 % ในตัวอย่างกึ่ง และดินตะกอน ตามลำดับในประเทศแถบตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่ง
 สันนิษฐานว่าการตรวจพบ *Salmonella* มีความเกี่ยวข้องกับการใช้ปุ๋ยมูลไก่สด อาหารเสริมจาก
 ปลาเล็กปลาน้อยและเปลือกหอยสด ซึ่งแตกต่างจากไทยที่นิยมใช้ปุ๋ยมูลไก่แห้งอัดเม็ดซึ่งมี
 ความชื้นต่ำกว่าและผ่านกระบวนการผลิตที่ใช้ UV และความร้อนสูง จึงสามารถลดจำนวน
 แบคทีเรียลงได้ ยิ่งไปกว่านั้นผู้เลี้ยงกึ่งของไทยยังนิยมใช้ปุ๋ยมูลไก่ในช่วง 4-5 สัปดาห์แรกของการ
 เลี้ยง 1 รอบ (4-5 เดือน) เท่านั้น จึงเป็นการลดปัญหา *Salmonella* ได้ Bhaskar และคณะ (1995)
 ตรวจพบ *Salmonella* ในกึ่ง ตะกอนดิน น้ำ เนื้อหอยลายและอาหารเม็ด ในช่วง 12.5-54.5%
 ระหว่างการเลี้ยงและการเก็บเกี่ยว แม้ว่าอัตราการตรวจพบ Fecal Coliforms และ *E. coli* ต่ำก็
 ตาม โดย *Salmonella* ที่ปนเปื้อนเนื้อหอยลายเกิดจากลักษณะการกินอาหารของหอย ในขณะที่

การปนเปื้อนจากอาหารเม็ดเกิดจากวิธีปฏิบัติของคนที่ไม่ถูกต้อง ในแต่ละขั้นตอนการผลิตก็มีผลต่อการตรวจพบ Salmonella ด้วย ดังผลงานวิจัยของ Iyer และ Varma (1990) รายงานว่าแหล่งสำคัญที่ตรวจพบ Salmonella ในกุ้งเลี้ยง คือตะกอนดิน น้ำ และอาหารที่ใช้ ส่วนในโรงงานผลิตพบในน้ำใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ และมูลสัตว์ที่พบในโรงงานและ สุกิมล กীরติวิริยาภรณ์ และ ศันสนีย์ ศรีจันทร์งาม (2543) สำนักรวจการปนเปื้อน Salmonella ในกุ้งเลี้ยงจากโรงงานผลิตจำนวน 97 ตัวอย่าง พบว่าสายพันธุ์หลักที่ตรวจพบ คือ *S. anatum* ซึ่งพบได้ในคน จึงเป็นไปได้ที่การปนเปื้อนมาจากการสัมผัสวัตถุที่ปลูกซึ่งไม่ถูกสุขลักษณะ ดังนั้น Salmonella จึงไม่ใช่เชื้อธรรมชาติในกุ้ง (Llobrerra, Bulalacao และ Tan, 1987) แต่เป็นเชื้อปนเปื้อนจากมูลสัตว์ แหล่งที่อยู่อาศัยของคน และสุขลักษณะที่ไม่ได้มาตรฐานในแต่ละขั้นตอนการผลิตมากกว่า

แบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญอีกสายพันธุ์หนึ่งคือ Vibrio โดยชนิดที่ก่อให้เกิดโรคจากการบริโภคอาหารทะเล ได้แก่ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* โดย *V. cholerae* เป็นสาเหตุสำคัญของอาการท้องร่วงรุนแรงจนทำให้เสียชีวิตได้ถ้าบริโภคอาหารทะเลที่ไม่สุกซึ่งมีเชื้อ *V. cholerae* O1 และ O139 จำนวน $10^3 - 10^9$ โคโลนีต่อกรัม หรือเกิดโรคทางเดินอาหารถ้ามีเชื้อ *V. cholerae* non-O1 ในจำนวนเดียวกัน ส่วน *V. parahaemolyticus* เป็น Vibrio กลุ่ม non cholerae ที่ตรวจพบมากที่สุดและพบบ่อยแถบชายฝั่งในเขตร้อนและอบอุ่น ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากอาหารทะเลเมื่อมีจำนวนเชื้อ $10^5 - 10^6$ โคโลนีต่อกรัม แต่การปรับปรุงสุขลักษณะและระบบการประกันคุณภาพของผลิตภัณฑ์สามารถลดจำนวนแบคทีเรียนี้ได้ (Feldhusen, 2000) โดยงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่รายงานของ Rattagool และคณะ (1986) ได้รายงานว่าตรวจไม่พบ Vibrio ทั้งในกุ้งขาว และกุ้งกุลาดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและจับจากทะเล สุนิสา ศรีพงษ์พันธุ์กุล (2538) ตรวจไม่พบ *V. parahaemolyticus* ทั้งในตัวอย่างน้ำและกุ้งจากบ่อเลี้ยง และ Hanpongkittikun และคณะ (1995) ตรวจไม่พบ *V. parahaemolyticus* ทั้งในตัวอย่างกุ้งที่ควบคุมการเก็บเองและที่ซื้อจากตลาดกลาง ตรงกันข้ามกับงานวิจัยของ พิมพันธุ์ เลียงพิบูลย์ และคณะ (2529) ที่พบ Vibrio จากตัวอย่างกุ้งจำนวน 23 ตัวอย่างเรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* non O1 และ *V. fluvialis* โดยพบ 16 ตัวอย่าง (69.6%), 6 ตัวอย่าง (26.1%), 6 ตัวอย่าง (26.1%) และ 3 ตัวอย่าง (13.0%) ตามลำดับ ลีลา เรืองแป้น และคณะ (2540) รายงานว่า Vibrio เป็นกลุ่มที่เด่นที่สุดในที่พบในดับและดับอ่อน และลำไส้ของกุ้ง โดยมีสายพันธุ์ ดังนี้ *V. alginolyticus*, *V. cholerae* non O1, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ซึ่งเป็นผลจากชนิดหรือปริมาณของแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำและอาหารที่ใช้เลี้ยงนั่นเอง Reilly และ Twiddy (1992) พบว่าการตรวจพบ *V. cholerae* ในกุ้งสัมพันธ์กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดอาหารโดยพบว่าบ่อเลี้ยงกุ้งที่ใช้อาหารสำเร็จรูปในการเลี้ยง มีการตรวจพบ *V. cholerae* ในกุ้งและโคลนน้ำ มากกว่าการใช้อาหารชนิด

อื่น ทั้งที่อาหารสำเร็จรูปผ่านกระบวนการผลิตที่มีความร้อนสูงและตรวจไม่พบ *V. cholerae* ในอาหารสำเร็จรูป ดังนั้นสาเหตุแท้จริงเกิดจากการให้อาหารชนิดนี้อย่างไม่เหมาะสมมากกว่า เช่นเดียวกับวิธีการเลี้ยงแบบอินเทนซีฟ ที่ตรวจพบ *V. cholerae* มากกว่าวิธีอื่นเนื่องจากมีสารอินทรีย์ตกค้างมากกว่า ทำให้น้ำเสีย กุ้งเครียด และอ่อนแอติดโรคนง่าย และฤดูกาลกับที่ตั้งบ่อเลี้ยงก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากในฤดูฝนน้ำเสียจากบ้านเรือนไหลลงสู่ชายฝั่งทะเลและก่อให้เกิดการปนเปื้อนในบ่อเลี้ยงมากกว่าฤดูแล้ง นอกจากนี้คนน้ำก็เป็นอีกปัจจัยที่ควรนำมาพิจารณาในการเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายเชื้อ *V. cholerae* และ *Salmonella spp.* จากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง (Fenlon, 1983) และ Dalsgaard และคณะ (1995) สรุปว่า *V. cholerae* non O1 ที่ตรวจพบ 33 % จากตัวอย่างน้ำชายฝั่ง น้ำบ่อเลี้ยง ตะกอนดินและกุ้ง จำนวน 107 ตัวอย่าง ไม่มีความสัมพันธ์กับ ความเค็มของน้ำ อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณ Fecal Coliforms

จากผลการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำสดที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ทราบถึงคุณภาพกุ้งกุลาดำสดในขั้นตอนการซื้อขายที่ตลาดกลางของประเทศไทย เนื่องจากแหล่งเก็บตัวอย่างเป็นตลาดกลางกุ้งที่สำคัญของประเทศ และยังไม่เคยมีการศึกษาคุณภาพกุ้งในขั้นตอนนี้มาก่อน ผลการศึกษาที่ได้จึงช่วยทำให้ข้อมูลในทุกขั้นตอนการผลิตสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และใช้เป็นข้อมูลในการทดลองขั้นต่อไปที่มีเป้าหมายเพื่อปรับปรุงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำสดให้ดียิ่งขึ้นโดยใช้โอโซน

5.2 ศึกษาการเตรียมก๊าซโอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในการนำก๊าซโอโซนมาใช้จำเป็นต้องมีองค์ประกอบที่ถูกต้องมีการวัดความเข้มข้นของก๊าซโอโซนจากเครื่องผลิตโอโซน เนื่องจากความสามารถของเครื่องผลิตโอโซนอาจมีค่าน้อยกว่าค่าที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดและความเข้มข้นของก๊าซโอโซนหลังเป่าพ่นลงน้ำมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การนำโอโซนมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร (กัญญาจิต ไล่ภิญโญศิริ, 2543) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องศึกษาความเข้มข้นของก๊าซโอโซนทั้งหมดและก๊าซโอโซนตกค้าง เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำโอโซนที่ได้จากการเป่าพ่นก๊าซโอโซนลงในน้ำต่อการทำลายแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกุ้งกุลาดำสดในขั้นตอนต่อไป

ความเข้มข้นของก๊าซโอโซนทั้งหมดสามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี Iodometric ที่อาศัยหลักการว่า ก๊าซโอโซนที่ผลิตได้จากเครื่องผลิตจะถูกจับโดยสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ กลายเป็นสารประกอบโพแทสเซียมไอโอเดต แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แท้จริงได้โดยการไทเทรตกับโซเดียมไรโอ-ซัลเฟต การทำการตรวจวัดโอโซนในโพแทสเซียมไอโอเดต แทนที่จะตรวจวัดโอโซน

ในน้ำ เนื่องจากความไม่เสถียรของก๊าซไอโซนทำให้ไม่สามารถตรวจวัดความเข้มข้นที่แน่นอนของไอโซนในน้ำได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเครื่องผลิตไอโซนมีประสิทธิภาพเพียง 55% ของค่าที่บริษัทผู้ผลิตระบุคือ 2000 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง ส่วนค่าความเข้มข้นของไอโซนตกค้างที่เหลืออยู่ในน้ำ สามารถวัดได้ด้วยวิธี N, N-diethyl-1,4 phenylenediammonium (DPD) spectrophotometric โดยใช้การทำปฏิกิริยาระหว่างไอโซนกับสาร DPD ในการฟอร์มตัวเป็นสารสีม่วงแดงในสภาพที่เป็นกรดอ่อน แล้วตรวจวัดความเข้มข้นด้วยการดูดกลืนแสง โดยปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความเข้มข้นของไอโซนในน้ำ ได้แก่ ความสามารถของเครื่องผลิตไอโซน ลักษณะการแพร่ของไอโซนสู่น้ำ อัตราการไหลของก๊าซ และแหล่งก๊าซออกซิเจน (Meunpol, Lopinyosiri และ Menasveta, 2003) นอกจากนี้เมื่อทดลองใช้ปริมาณมากขึ้นพบว่าต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นในการผลิตให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดที่เครื่องผลิตไอโซนสามารถผลิตได้ โดยกราฟที่ได้จากการพลอตค่าความเข้มข้นของไอโซนที่ผลิตได้กับเวลาที่ปริมาตรต่างกัน จะมีลักษณะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และคงที่ เมื่อถึงความเข้มข้นสูงสุดของความสามารถเครื่อง และเป็นไปในรูปแบบเดียวกับค่าความเข้มข้นของไอโซนตกค้าง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Burleson, Murray และ Pollard (1975) ที่ทดลองในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และน้ำทิ้งที่ผ่านขบวนการบำบัดขั้นต้นแล้ว

5.3 ศึกษาการทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆของน้ำไอโซน

5.3.1 ศึกษาการทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆที่จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นต่างๆของน้ำไอโซน

เนื่องจากในภาวะที่มีสารอินทรีย์สูงหรือมีจำนวนแบคทีเรียมาก สารอินทรีย์หรือแบคทีเรียจะกลายเป็นเกราะกำบังให้กับแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ และเป็นคู่แข่งกันในการเข้าทำปฏิกิริยาของไอโซนกับแบคทีเรีย ทำให้มีผลต่อความสามารถของน้ำไอโซนในการเข้าทำลายแบคทีเรีย ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงศึกษาการทำลายแบคทีเรียของน้ำไอโซนเมื่อมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นต่างกัน โดยพบว่าน้ำไอโซนมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย (แบคทีเรียรวมและแบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น) แบคทีเรียที่เป็นตัวชี้วัดสุขภาพ (E. coli และกลุ่มโคลิฟอร์ม) และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร (V. parahaemolyticus และ S. anatum) สอดคล้องกับหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Sheldon, 1986; Kim และคณะ, 2000; Byun, 1998; Restaino และคณะ, 1995) นอกจากนี้ค่า Death fraction ของแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดมีค่ามากขึ้นเมื่อจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim และ Yousef (2000) ที่พบว่าไอโซนเข้มข้น 1.3 ppm ลดจำนวน *Listeria mesenteroides* เริ่มต้นที่ 7.7 log ได้น้อยกว่า 1 log ขณะที่สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้มากกว่า 6 log ถ้าจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นลดลงครึ่งหนึ่ง เนื่องมาจากไอโซนมีกลไกการทำลายแบคทีเรียโดยการทำให้เซลล์แตกจึงเป็นการเพิ่มทั้งชนิดและปริมาณสารอินทรีย์ในตัวกลางมากขึ้น ดังนั้นแบคทีเรียจึงทนทานต่อไอโซนมากขึ้น (Emerson,

Sproul และ Buck, 1982; Hoigne, 1982, Cited in Finch, Smith และ Stiles, 1998) ด้วยเหตุนี้ อัตราส่วนระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับความเข้มข้นของไอโซนที่ใช้จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องนำมาพิจารณาเพื่อให้การใช้น้ำไอโซนมีประสิทธิภาพสูงสุด

5.3.2 ศึกษาการทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆของน้ำไอโซนที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

โดยทั่วไปประสิทธิภาพของไอโซนในการลดจำนวนแบคทีเรียเกิดจากการออกซิไดส์ผนังเซลล์ และออกแกเนลล์ต่างๆของแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (Arturo และ Tapas, 1988) ทำให้การลดลงของจำนวนแบคทีเรียขึ้นกับความเข้มข้นของไอโซน (Hoigne, 1982, อ้างถึงใน Finch, Smith และ Stiles, 1998) ซึ่งตรงกับผลงานวิจัยในครั้งนี้ ที่พบว่าน้ำไอโซนที่ความเข้มข้นระดับต่างๆทำลายแบคทีเรียได้แตกต่างกัน จากงานวิจัยที่ผ่านมาการทดลองหาความสามารถในการทำลายแบคทีเรียของไอโซนมักทำในลักษณะการแปรค่าเวลาสัมผัสระหว่างไอโซนกับแบคทีเรียกับจำนวนแบคทีเรียซึ่งกราฟที่ได้จะมีลักษณะเป็นแบบ Biphasic คือ ในช่วงแรกแบคทีเรียลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ต่อจากนั้นค่อยลดจำนวนลงอย่างช้าๆ (Restaino และคณะ, 1995; Finch และคณะ, 1998; Burleson และคณะ, 1975) ในขณะที่งานวิจัยครั้งนี้เป็นกราฟที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอโซนกับจำนวนแบคทีเรียที่ถูกทำลายในรูปค่า DF ที่เวลาสัมผัสเท่ากัน ดังนั้นกราฟที่ได้จึงไม่เป็นแบบ Biphasic แต่เป็นกราฟเส้นตรงที่มีรูปแบบเดียวกันสำหรับแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาทดสอบ โดย *S. anatum* และ *V. parahaemolyticus* มีแนวโน้มการถูกทำลายสูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นเนื่องจากการทดลอง

S. anatum และ *V. parahaemolyticus* อยู่ในรูปเชื้อบริสุทธิ์ชนิดเดียว และแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ก็ เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีความไวต่อไอโซนมากกว่าแกรมบวก (Restaino และคณะ, 1995) ในขณะที่ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบเหมือนกัน แต่มีความไวต่อไอโซนน้อยกว่าโดยใกล้เคียงกับแบคทีเรียรวม แบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น และโคลิฟอร์ม อาจเป็นผลเนื่องมาจาก *E. coli* สามารถสร้างแคปซูลได้ (Holt และคณะ, 1994) จึงทนทานต่อไอโซนได้มากกว่า ซึ่งใกล้เคียงกับผล การศึกษาของ Farooq และ Akhlaque (1983) ที่พบว่า *S. typhimurium* มีความไวต่อไอโซนมากกว่า *E. coli* ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่แตกต่างจาก Restaino และคณะ (1995) ที่รายงานว่า *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* และ *Y. enterocolitica* มีความไวต่อไอโซนไม่แตกต่างกันในน้ำกลั่น และ Zhao และ Cranston (1995) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นไอโซนน้อยที่สุดใน การลดจำนวน *E. coli* และ *Salmonella* spp. ประมาณ 5 log คือ 0.4 กรัม/ลิตรเท่ากัน ซึ่งอาจเป็น ผลเนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาทดลองมี Physiological state แตกต่างกัน (Yousef, 2000)

5.3.3 ศึกษาผลของน้ำไอโซนในการทำลายแบคทีเรียในกึ่งอุตสาหกรรม

เนื่องจากสารอินทรีย์มีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพของไอโซน โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดของสารอินทรีย์มีผลต่อประสิทธิภาพของไอโซนมากกว่าปริมาณ ดังผลการศึกษาของ Restaino

และคณะ (1995) ที่รายงานว่าความเข้มข้นของไอโซนในน้ำกลั่น และน้ำกลั่นผสมน้ำแข็ง 20 ppm มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่มีค่าสูงกว่าในน้ำกลั่นผสม Bovine serum albumin 20 ppm และ Sheldon และ Brown (1986) ที่รายงานว่าไอโซนสามารถลดจำนวนแบคทีเรียในน้ำล้างไก่ได้ดี แต่ลดจำนวนแบคทีเรียบนซากไก่ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาผลของน้ำไอโซนในการทำลายแบคทีเรียในกุ้ง ซึ่งพบว่าน้ำไอโซนสามารถทำลายแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาทดสอบในกุ้งได้ โดยเมื่อน้ำไอโซนมีความเข้มข้นสูงขึ้นก็สามารถทำลายแบคทีเรียได้มากขึ้น ส่วน *S. anatum* ถูกทำลายน้อยลงเมื่อเทียบกับตัวกลางน้ำกลั่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียแต่ละชนิดในแต่ละตัวกลางไม่เท่ากัน พื้นผิวของตัวกลางที่มีลักษณะขรุขระ มีการซ้อนทับกันทำให้ไอโซนเข้าไปทำลายได้ยากขึ้น และการแพร่กระจายที่ไม่สม่ำเสมอบนผิวตัวกลาง รวมทั้งปฏิกิริยาของไอโซนต่อสารอินทรีย์ หรือสารปนเปื้อนต่างๆ บนผิวตัวกลาง ซึ่งตรงกับการวิจัยของ Bancroft และคณะ (1984) ที่สรุปว่าจุลินทรีย์มีความไวต่อน้ำไอโซนแตกต่างกันขึ้นกับธรรมชาติของสารอินทรีย์ในตัวกลาง ซึ่งป้องกันจุลิน-ทรีย์ทั้งทางด้านกายภาพ และลดความเข้มข้นของไอโซน

5.4 ศึกษาคุณภาพระหว่างการเก็บของกุ้งที่ผ่านการล้างด้วยน้ำไอโซน

การประเมินคุณภาพและอายุการเก็บของอาหารทะเลที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ การทดสอบทางเคมี ฟิสิกส์ จุลชีววิทยา และประสาทสัมผัส ในงานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้การทดสอบทางเคมีด้วยค่า Total volatile base (TVB) เนื่องจาก Chang และคณะ (1983) และ Shamshad และคณะ (1990) รายงานว่าการเสื่อมเสียและการสร้าง Indole ในกุ้ง ในภาวะการเก็บแช่เย็นมีค่าแปรผันตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น โดยการผลิต indole จะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 12, 20 และ 35 องศาเซลเซียสในปริมาณสูง แต่ไม่มีการผลิตที่ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่ค่า TVB มีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาและอุณหภูมิ แม้ในที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ดังนั้น The National Research Council of USA จึงสรุปว่าแบคทีเรียกลุ่ม Mesophillic เป็นจุลินทรีย์หลักที่สร้าง Indole ทำให้ไม่เหมาะสมที่จะนำค่า Indole มาวัดการเสื่อมเสียของการเก็บรักษากุ้งในภาวะแช่เย็น การที่ค่า TVB มีค่าสูงขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงหลังการตายทำให้มีปริมาณแอมโมเนียที่ถูกปล่อยจากปฏิกิริยา Deamination ของ Adenosine monophosphate (AMP) หรือ Histamine สูงขึ้น (Shakila, Vijayalakshmi และ Jeyasekaran, 2003) เมื่อใช้ค่า TVB เท่ากับ 30 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม มาใช้เป็นเกณฑ์กำหนดค่าการยอมรับความสดของกุ้ง (Montgomery, 1970) ในการวิจัยครั้งนี้พบว่ากุ้งที่ผ่านน้ำไอโซนความเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัม/ลิตร TOC ไม่ผ่านเกณฑ์ประมาณวันที่ 6 และ 8 ตามลำดับ ขณะที่ตัวควบคุมไม่ผ่านเกณฑ์ประมาณวันที่ 4 เมื่อเทียบค่า TVB ที่ไม่ผ่านเกณฑ์กับค่าปริมาณแบคทีเรียรวม พบว่ามีค่า TPC ประมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่

ยอมรับได้สำหรับการส่งออก แสดงว่าค่า TVB, TPC และ PPC มีความสัมพันธ์กับอายุการเก็บของกุ้ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wibowo, Putro และ Suwarno (1989) ที่พบว่ากุ้งกุลาดำที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) เริ่มมีกลิ่นเมื่อมีค่า TPC ประมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัม และ TVB 30.44 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Matches (1982) ซึ่งรายงานว่างุ้งชายฝั่งทะเลแปซิฟิก *Pandalus jordani* มีค่า TPC 1.6×10^6 โคโลนี/กรัม เมื่อ TVB มีค่า 40 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม Chang และคณะ (1983) และ Leitao และ Rios (2000) ในกุ้งขาวและกุ้งน้ำจืด ตามลำดับ ที่รายงานว่างุ้งมีค่า TVB 30 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม เมื่อจุลินทรีย์รวมมีค่าประมาณ 10^7 โคโลนี/กรัม

ส่วนค่า pH ของกุ้งเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บรักษานานขึ้น เริ่มต้นจาก pH 6.44 ถึง 7.80 เนื่องจากเกิดการสร้าง Amine จากปฏิกิริยา Aminoacids decarboxylation (Leitao และ Rios, 2000) โดยพบว่าในวันที่ตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างล้างด้วยน้ำไอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัม/ลิตร TOC ไม่ผ่านเกณฑ์ TVB มีค่า pH เท่ากับ 7.34, 7.27 และ 7.36 ตามลำดับ สอดคล้องกับการรายงานของ Cobb III และคณะ (1976) ซึ่งพบว่าค่า pH ที่ทำให้กุ้งไม่เป็นที่ยอมรับมีค่าอยู่ในช่วง 7.2-7.6 และกุ้งที่เก็บจากตลาดกับกุ้งที่ควบคุมการเก็บ มีค่าเท่ากับ 7.8 และ 7.3 ตามลำดับ ในวันที่กุ้งไม่ผ่านเกณฑ์ TVB (Hanpongkittikun และคณะ, 1995)

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้าน เนื้อสัมผัส และสีของตัวอย่างทั้ง 3 ชุด ในแต่ละวันของการเก็บรักษา พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่พบว่าในวันที่ 4 และ 6 กุ้งที่ผ่านการล้างด้วยน้ำไอโซนมีคะแนนทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นสูงกว่ากุ้งที่ล้างด้วยน้ำกลั่น แสดงว่าไอโซนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นช้าลง ใกล้เคียงกับการทดลองของ Kim และคณะ (2000) ที่รายงานว่าการใช้ไอโซนเข้มข้น 10 ppm สามารถลดจำนวน TPC และ PPC บนชิ้นปลา Channel catfish ได้ โดยการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ สี และกลิ่นของตัวควบคุมและที่ผ่านไอโซนไม่แตกต่างกัน และการศึกษาของ Dewitt และคณะ (1984) ที่แสดงว่าการล้างกุ้งด้วยน้ำไอโซนและเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งไอโซนสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ลงได้ ซึ่งยืดอายุการเก็บได้ 1 – 2 วัน แสดงว่าการใช้ไอโซนสามารถลดการเสื่อมเสียของกุ้งได้เพียงบางส่วนเท่านั้นจากการลดปริมาณจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นลง แต่การเน่าเสียยังคงดำเนินต่อไปเนื่องจากปัจจัยอื่น เช่น การเกิด Autolytic reaction โดย Endogeneous enzyme ซึ่งทำให้เกิด สี กลิ่น รส และรวมทั้งเนื้อสัมผัส ที่เปลี่ยนไปเนื่องจากกล้ามเนื้อของพวก Shellfish มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันน้อย และ Collagenolytic enzyme ช่วยเร่งทำให้เนื้อกุ้งนิ่มในการเก็บรักษาในน้ำแข็ง และการเกิด Oxidative rancidity ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเน่าเสียของอาหารทะเล (Ashie, Smith และ Simpson, 1996)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษากการปรับปรุงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกึ่งกลาดำที่ตลาดกลางกึ่งโดยใช้โอโซน แบ่งขั้นตอนการศึกษาได้ดังนี้ คือ คุณภาพทางจุลินทรีย์ของกึ่งกลาดำสด ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซโอโซนทั้งหมดและโอโซนตกค้าง การทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆ ของน้ำโอโซนที่มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในระดับต่างๆ การทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆของน้ำโอโซนที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ผลของน้ำโอโซนในการทำลายแบคทีเรียในกึ่งกลาดำสด และคุณภาพระหว่างการเก็บของกึ่งที่ผ่านการล้างด้วยน้ำโอโซน ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

1. กึ่งกลาดำสดที่ขาย ณ ตลาดกลางกึ่ง มีคุณภาพของแบคทีเรียรวมอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญ คือ *Salmonella* spp., *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* แต่มีปัญหาด้านคุณภาพในเรื่องปริมาณ *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่ผ่านเกณฑ์เพียงร้อยละ 6.67 และ 45.00 ตามลำดับ โดยในแต่ละฤดูกาลมีแนวโน้มของคุณภาพทางจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นปัจจัยอื่น เช่น การจัดการฟาร์มให้ถูกสุขลักษณะ วิธีการเลี้ยงที่ถูกต้อง การดูแลรักษาหลังการเก็บเกี่ยว น่าจะมีผลต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์มากกว่าฤดูกาล

2. ความเข้มข้นของโอโซนทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและค่อนข้างคงที่เมื่อถึงค่าสูงสุดของความสามารถเครื่องผลิตโอโซนเช่นเดียวกับความเข้มข้นโอโซนตกค้าง แต่เมื่อปริมาตรเพิ่มขึ้นต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นจนกว่าจะถึงค่าสูงสุด นอกจากนี้การใช้โอโซนให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดต้องพิจารณาจากวัตถุประสงค์เป็นสำคัญ เพื่อกำหนดเทคนิคและปริมาณการใช้อย่างถูกต้อง และจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทดลองต้นแบบก่อนทุกครั้งเพื่อให้ทราบค่าแท้จริงของโอโซนทั้งหมดและความเข้มข้นโอโซนตกค้างในตัวกลาง

3. โอโซนเป็นสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นของแบคทีเรียรวม แบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น กลุ่มโคลิฟอร์ม *E. coli*, *S. anatum* และ *V. parahaemolyticus* ในตัวกลางน้ำกลั่น โดยความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำโอโซนในการทำลายแบคทีเรียข้างต้นที่มีจำนวนเริ่มต้นประมาณ 5 log มีค่าเท่ากับ 548.53 mg/l TOC (0.13 mg/l ROC) และเมื่อจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นมีค่าน้อยลง พบว่าน้ำโอโซนสามารถทำลายแบคทีเรียแต่ละชนิดได้มากขึ้น

4. ในภาวะที่มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 9 log พบว่าจำนวนแบคทีเรียแต่ละชนิดลดลงเมื่อความเข้มข้นของโอโซนมากขึ้น ในรูปแบบของสมการเส้นตรงเหมือนกัน นอกจากนี้แบคทีเรียในรูปเชื้อเดี่ยวมีแนวโน้มถูกทำลายได้มากกว่าแบคทีเรียที่เป็นเชื้อผสม

5. โอโซนสามารถทำลายแบคทีเรียรวม แบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น และกลุ่มโคลิฟอร์มที่อยู่ในกุ้ง รวมทั้ง *E. coli*, *S. anatum* และ *V. parahaemolyticus* ที่เติมในกุ้งได้ เช่นเดียวกับการทดลองในตัวกลางน้ำกลั่น นอกจากนี้ชนิดของแบคทีเรียก็มีความไวต่อโอโซนแตกต่างกันในน้ำกลั่น อันเป็นผลเนื่องมาจากความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียแต่ละชนิดในแต่ละบริเวณของพื้นผิวที่แตกต่างกัน

6. การใช้น้ำโอโซนเข้มข้น 217.60 และ 1132.27 มิลลิกรัม/ลิตร TOC สามารถยืดระยะเวลาการเก็บกุ้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 2 และ 4 วัน ตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยใช้ค่า TVB เท่ากับ 30 มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัม เป็นเกณฑ์กำหนด และการเปลี่ยนแปลงกลิ่นเกิดช้าลง โดยไม่มีความแตกต่างทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัสและสีที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลงานวิจัยทั้งหมดแสดงว่า โอโซนมีประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำสด ทำให้มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นลดลง และสามารถยืดอายุการเก็บได้ โดยไม่มีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัส ซึ่งถ้าใช้โอโซนกับกุ้งหักหัวน่าจะทำให้ยืดระยะเวลาการเก็บได้มากขึ้น จึงควรมีการศึกษการใช้โอโซนในผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ รวมถึงรูปแบบการใช้งาน เช่น ในรูปของน้ำแข็งโอโซน เพื่อเพิ่มคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้ดียิ่งขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กัญญาจิต โล่ภิญโญสิริ. 2543. การใช้ไอโซนในการควบคุมคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชัยวัฒน์ ประสมสุข. 2546. ทิศทางอุตสาหกรรมกุ้งไทย. รายงานเศรษฐกิจ บมจ. ธนาคารกรุงไทย 36(12): 62-69.
- นภา โล่ห์ทอง. 2535. จุลชีววิทยาของอาหารทะเลแช่แข็ง เอกสารประกอบคำบรรยายเรื่อง จุลชีววิทยาของอาหารทะเลแช่แข็ง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- นุชจรินทร์ เกตุนิล. 2544. ภาวะการส่งออกอาหารของไทยในช่วง 9 เดือนแรก ปี 2543. วารสารสถาบันอาหาร 3(15): 47-50.
- ประทีป สมยาประเสริฐ. 2545. หัวหน้าฝ่ายควบคุมคุณภาพ บ. ส.ชัยวารีห้องเย็น จก. สัมภาษณ์, 4 กรกฎาคม 2545.
- ประมง, กรม. คู่มือประกอบการประเมินคุณภาพสัตว์น้ำ. (ม.ป.ป.)
- พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์, จุไรรัตน์ นิลกุล, ฉัตรชัย ศรีไชย, ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช และเกศรา เกษมสุขสกุล. 2529. การสำรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดก่อโรคจากนากุ้ง. วารสารเกษตรศาสตร์(วิทย.) 20: 333-337.
- เพ็ญศรี รอดมา, อุรรัตน์ วุฒิกมลวัฒน์ และอัชฌา สุวานานุวัฒน์. 2534. คุณภาพของกุ้งเพาะเลี้ยงและ
กุ้งทะเลแช่แข็ง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 33(4): 183-188.
- ไพโรจน์ วิริยจारी. 2535. การวางแผนและการวิเคราะห์ทางด้านประมงสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 232-253.
- ลิลิตา เรืองแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และกุลธรรมา แสงรุ่งเรือง. 2540. แบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อระบบพัฒนา. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35: 3-10.
- ศิรินทิพย์ อินทร์ชัย, สมชาย สิทธิโสภากุล และ กรรณา ตีรสมิทธิ์. 2543. คุณภาพน้ำแข็งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 42(2): 160-166.
- ศิริรักษ์ เนตรรัตน์. 2539. การวิเคราะห์เงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการใช้กาชไอโซนในการฆ่าเชื้อโรคที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชา

- วิศวกรรมอุตสาหการ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศิริลักษณ์ สุวรรณรังษี. 2542. มาตรฐานการผลิตและระดับคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำส่งออก. วารสารสถาบันอาหาร 3(4): 22-29.
- สถาบันอาหาร. 2543. สมรภูมิกุ้งโลก ไทยโดนรุกตลอดแนว. วารสารสถาบันอาหาร 3(13): 5-19.
- สาธารณสุข, กระทรวง. 2522. พระราชบัญญัติอาหาร. ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 78 (พ.ศ.2527) เรื่องน้ำแข็ง ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 101 ตอนที่ 23 ลงวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2527.
- สิริพร ธรนเสาวภาคย์. 2543. โอโซนกับความปลอดภัยในอาหาร. วารสารอาหาร 30(2): 79-86.
- สุรพล รักปทุม. 2543. โอโซนเพื่อชีวิตและสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. (ม.ป.ท.)
- สุนิสา ศรีพงษ์พันธุ์กุล. 2538. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกุ้งกุลาดำระหว่างการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง. วารสารจาร์พา 2(20): 56-57.
- สุวิมล กীরติวิริยาภรณ์ และคันสนีย์ ศรีจันทร์งาม. 2543. การปนเปื้อนของเชื้อแซลโมเนลล่าในวัตถุดิบกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง 53(5): 455-459.
- สุเมธ ชวเดช. 2541. การพัฒนากระบวนการออกซิเดชันโอโซนสำหรับการบำบัดน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานพาณิชย์จังหวัดสมุทรสาคร. 2545. กุ้งกุลาดำ[Online]. Available from: <http://www.moc.go.th/opscenter/sm/prawn2.html>[2002, March 13]

ภาษาอังกฤษ

- APHA. 1985. Standard method for the examination of water and waste water. 16th ed. Washington DC. : APHA.
- APHA. 1992. Standard method for the examination of water and waste water. 18th ed. Washington DC. : APHA.
- APHA. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association. 4th ed. Washington DC. : APHA.
- Arturo, L. and Topas, Jr. 1988. Ozone as disinfection. Master's Thesis. Department of Engineer, Graduate school, Asian Institute of Technology.
- Ashie, I. N. A., Smith, J. P. and Simpson, B. K. 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 36 (1&2): 87-121.

- Bancroft, K., Chrostowski, P., Wright, R. I. and Suffet, I. H. 1984. Ozonation and oxidation competition values. Water Research 18: 473-478.
- Berry, E. D. and Foegeding, P. M. 1997. Review: Cold temperature and growth of microorganisms. Journal of Food Protection 60(12): 1583-1594.
- Bhaskar, N., et al. 1995. Incidence of Salmonella in cultured shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 138: 257-266.
- Budavari, S., ed. 1996. The Merck index. 12th ed. New Jersey: White house station.
- Burleson, G. R., Murray, T. M., and Pollard, M. 1975. Inactivation of viruses and bacteria by ozone with and without sonication. Applied Microbiology 29:340-344.
- Byun, M., Kwon, O., Yook, H. and Kim, K. 1998. Gamma irradiation and ozone treatment for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in cultured media. Journal of Food Protection 61(6): 728-730.
- Chang, P., Chuck, W. L., Nickerson, R., Martin, R. and Finne, G. 1983. Indole in shrimp: effect of fresh storage temperature, freezing and boiling. Journal of Food Science 48: 813-816.
- Chen, H., Huang, S., Moody, M.W., and Jiang, S. 1992. Bacteriocidal and mutagenetic effects of ozone on shrimp (*Penaeus monodon*) Meat. Journal of Food Science 57(4): 923-927.
- Chen, H., Moody, M. W. and Jiang, S. 1990. Changes in biochemical and bacteriological quality of Grass Prawn during transportation by icing and oxygenating. Journal of Food Science 55: 670-673.
- Cherry, J. P. 1999. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. Food Technology 53(11): 54-57.
- Coastnet. 2003. Ozone [Online]. Available from: <http://www.coastnet.com/~bcga/bcga/zozone1.html> [2003, September 23]
- Cobb III, B. F., Vanderzant, C, Hanna, M. O. and Yeh, C. S. 1976. Effect of ice storage on microbiological and chemical changes in shrimp and melting ice in a model system. Journal of Food Science 41: 29-34.
- Dalsgaard, A., Huss, H. H., H-Kittikun, A. and Larsen, J. L. 1995. Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. International Journal of Food Microbiology 28: 101-113.

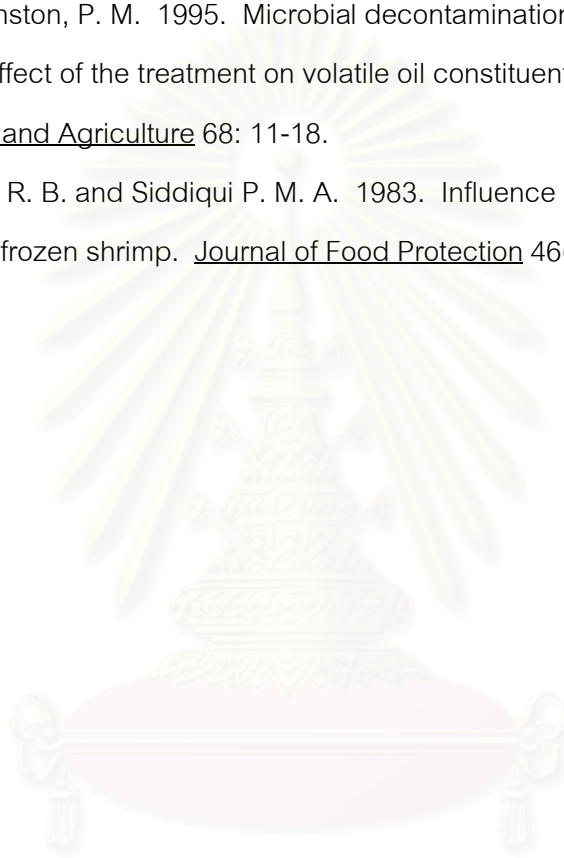
- Dave, S. A. 1999. Efficacy of ozone against *Salmonella enteritidis* in aqueous suspensions and on poultry meat. Master's Thesis, Department of Science, The Ohio State University. Cited in Khadre, M. A., Yousef, A. E., Kim, J. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. Journal of Food Science 66:1242-1252, 9.
- Dewitt, B. J., et al. 1984. The potential use of ozonated ice for on-board storage of gulf of Mexico shrimp. In proceeding ninth annual tropical and subtropical fisheries technological conference of the Americas, pp.269-279. USA.
- Emerson, M. A., Sproul, O. J. and Buck, C. E. 1982. Ozone inactivation of cell-associated viruses. Applied and Environmental Microbiology 43: 603-608.
- Farooq, S. and Akhlaque, S. 1983. Comparative response of mixed cultures of bacteria and viruses to ozonation. Water Research 17: 809-812.
- Feldhusen, F. 2000. Review: The role of seafood in bacterial foodborne diseases. Microbes and Infection 2: 1651-1660.
- Fenlon, D. R. 1983. A comparicon of *Salmonella* serotypes found in the faeces of gulls feeding at sewage works with serotypes in the sewage. Journal of Hygiene 91: 47-52.
- Finch, G. R., Smith, D. W. and Stiles, M. E. 1998. Dose-response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. Water Research 22 (12): 1563-1570.
- Foegeding, P. M. 1985. Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populations and the importance of the spore coat to resistance. Journal of Food Microbiology 2: 123-134.
- Gunten, V. U. 2003. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation: A review. Water Research 37(7): 1443-1467.
- Hanpongkittikun, A., Siripongvutikorn, S., Cohen, L. D. 1995. Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) quality changes during iced storage. ASEAN Food Journal 10(4): 125-130.
- Haraguchi, T., Simidu, U. and Aiso, K. 1969. Effect of ozone on preservation of fresh fish. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 35(9): 915-919.
- Hoigne, J. 1982. Mechanisms, rates and selectiveness of oxidation of organic compounds initiated by ozonation of water. In Handbook of ozone technology and applications, ed. Rice R. G. and Netzer A. (Mich, Ann Arbor Science: Ann Arbor), pp. 341-379. Cited in Finch, G. R., Smith, D. W. and Stiles, M. E. 1998. Dose-response of

- Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. Water Research 22 (12): 1563-1570.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.
- International Trade Centre, Unctad/Gatt. 1983. Shrimp : A survey of the world market. Geneva. P. 273; Anonymous. 1987. Sampling methods and subsequent action for imported food inspection. The Common Wealth of Australia Gazette. pp. 1-23. อ้างถึงใน เพ็ญศรี รอดมา, อุรารัตน์ วุฒิกวรรณ์ และอัชฌา สุวานานูวัฒน์. 2534. คุณภาพของกุ้งเพาะเลี้ยงและกุ้งทะเลแช่แข็ง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 33(4): 183-188.
- Ilyer, P. G. A. and Varma, P. R. G. 1990. Source of contamination with Salmonella during processing of frozen shrimp. Fishery Technology 27: 60-63.
- Ishisaki, K., Shinriki, N. and Matsuyama, H. 1986. Inactivation of Bacillus spores by gaseous ozone. Journal Applied Bacteriology 60(1): 67-72.
- Ishisaki, K., Shinriki, N., Ikehata, A., and Ueda, T. 1981. Degradation of nucleic acids with ozone. I. Degradation of nucleobases, ribonucleosides, and ribonucleoside-5'-monophosphates. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo) 29: 868-872.
- Kaper, J. B., Saylor, G. S., Baldini, M. M. and Colwell, R. R. 1977. Ambient- temperature primary non selective enrichment for isolation of *Salmonella spp.* from an estuarine environment. Applied Environmental Microbiology 33: 829-835.
- Khadre, M. A., Yousef, A. E., Kim, J. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. Journal of Food Science 66:1242-1252, 1259.
- Khadre, M. A., Yousef, A. E. 2001. Sporicidal action of ozone and hydrogenperoxide: a comparative study. International Journal of Food Microbiology 71: 131-138.
- Kim, J., and Yousef, A. E. 2000. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. Journal of Food Science 65(3): 521-528.
- Kim, J., Yousef, A. E., and Dave S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. Journal of Food Protection 62(9):1071-1087.
- Kim, T. J., Silva, J. L., Chamul, R. S., and Chen T. C. 2000. Influence of ozone, hydrogenperoxide, or salt on microbial profile, TBARS and color of channel cat fish fillets. Journal of Food Science 65(7):1210-1213.

- Leitao, M. F. F. and Rios, D. P. A. 2000. Microbiological and chemical changes in fresh water prawn (*Machrobrachium rosenbergii*) stored under refrigeration. Brazilian Journal of Microbiology 31: 178-183.
- Llobrerra, A. T., Bulalacao, M. L. and Tan, A. 1987. Effect of farming phase and in-plant processing on the microbiological quality of prawns (*Penaeus monodon*). Tigbanan: FAO. (Mimeographed)
- Matches, J. R. 1982. Effects of temperature on the decomposition of Pacific coast shrimp (*Pandalus jordanii*). Journal of Food Science 47: 1044-1047,1069.
- Medical Sciences, Department. 1999. SOP for Total Volatile Base Analysis. Bangkok: Department of Medical Sciences. (Mimeographed)
- Meunpol, O., Lopinyosiri, K. and Menasveta, P. 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 220: 437-448.
- Montgomery, W. A., Sidhu, G. S. and Vale, G. L. 1970. The Australian prawn industry.1, Natural resources and quality aspects of whole cooked fresh prawns and frozen meat. CSIRO Food Preservation Quarterly 30: 21-27.
- Perez, R. R., Nunez, S. A., Baluja C., and Otero M. L. 1995. Ozonation kinetics of glucosamine and N-acetyl glucosamine in aqueous medium. Ozone-Science & Engineering 17(4): 463-467.
- Putchakarn, S. 1991. Effect of the crude extracts of molting hormone (Ecdysteroid) from some plants in Thailand on the molt cycle of the Giant Tiger. Master's Thesis, Department of Technology of Environmental Management, Graduate School, Mahidol University.
- Rahaman, M., Yasmin, L., Kamal, Md., Mazid, M. A. and Islam, Md. N. 2001. Effect of delayed icing on the quality changes in brackish water shrimp *Penaeus monodon* during ice storage. Pakistan Journal of Biological Sciences 4(11): 1390-1394.
- Rattagool, P., Wongchinda, N., Methatip, P. and Sanghtong, N. 1986. Hygienic processing of shrimp in Thailand. Bangkok: FAO. (Mimeographed)
- Reilly, P. J. A. and Twiddy, D. R. 1992. Salmonella and *Vibrio cholerae* in brackishwater cultured tropical prawns. International Journal of Food Microbiology 16: 293-301.

- Restaino, L., Frampton, E. W., Hemphill, J. B. and Palnikar, P. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. Applied and Environmental Microbiology 61(9): 3471-3475.
- Rosenberry, B. 2001. About shrimp farming[Online]. Available from: <http://www.shrimpnews.com/About.html>[2001, June 15]
- Schultz, C. R., and Bellamy, W. D. 2000. The role of mixing in ozone dissolution systems. Ozone-Science & Engineering 22: 329-350.
- Shakila, R. J., Vijayalakshmi, K. and Jeyasekaran, G. 2003. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. Food Chemistry 82: 347-352.
- Shamshad, S. I., Kher-un-nisa, Riaz, M., Zuberi, R. and Qadri, R. B. 1990. Shelflife of shrimp (*Penaeus merguensis*) stored at different temperatures. Journal of Food Science 55: 1201-1205,1242.
- Sheldon, B. W., and Brown, A. L. 1986. Efficacy of ozone as a disinfectant for poultry carcasses and chill water. Journal of Food Science 51:305-309.
- Takamoto, Y., Maeba H., and Kamimura, M. 1992. Changes in survival rates of enzymes activities in *Escherichia coli* with ozone. Applied Microbiology and Biotechnology 37: 393-395.
- Thai Frozen Foods Association. 2004. What's happening, Facts and figures[online]. Available from: <http://www.thai-frozen.or.th> [2004, April 7]
- US. FDA. 1998. Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. Gaithersburg: AOAC international.
- Wallace, D. J., et al. 2000. Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. Journal of Food Protection 63(6): 807-809.
- Ward, C., et al. 1997. Hazard analysis and critical control point training curriculum. 2nd ed. Raleigh: North Carolina Sea Grant.
- Wibowo, S., Putro, S. and Suwarno, T. 1989. The pattern of post-mortem biochemical and microbiological changes in farmed tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) at ambient temperature. Jakarta: FAO. (Mimeographed)
- Xu, L. 1999. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. Food Technology 53(10): 58-61,63.

- Yang, P. P. W., and Chen, T. C. 1979. Stability of ozone and its germicidal properties on poultry meat microorganisms in liquid phase. Journal of Food Science 44(2): 501-504.
- Yousef, A. 2000. Microbiological aspects of ozone processing [Online]. Available from: http://www.ift.confex.com/ift/2000/techprogram/paper_1233.html [2003, September 29]
- Zhao, J. and Cranston, P. M. 1995. Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. Journal of Sciences and Agriculture 68: 11-18.
- Zuberi, R., Qadri, R. B. and Siddiqui P. M. A. 1983. Influence of processing on bacteriological quality of frozen shrimp. Journal of Food Protection 46(7): 572-577.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ในกึ่งกลาดำสด

1. การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียรวม (Total Aerobic Plate Count) ในกึ่งกลาดำสดด้วยวิธี Direct plate count (US.FDA, 1998)

ชั่งกึ่งกลาดำสดหนัก 25 กรัม ใส่ลงในถุงปลอดเชื้อสำหรับเครื่อง stomacher เติม phosphate buffer saline (PBS) ปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง stomacher เปิดเครื่องนาน 1 นาที สารละลายที่ได้เป็น dilution ที่เจือจางลง 10 เท่า หรือ 10^{-1} แล้วทำ serial dilution 10^{-2} , 10^{-3} ต่อไป โดยการปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด PBS ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร

จากนั้นปิเปต 1 มิลลิลิตร ของแต่ละ dilution ลงใน petridish ปลอดเชื้อ แล้วเท Standard plate count agar ปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 – 15 มิลลิลิตร ลงบน petridish โดยใช้เทคนิค pour plate โดยทำ 3 ซ้ำและทำการทดลองเดียวกันที่ dilution ถัดไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลื่อนนับจำนวนโคโลนีบน plate ที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี แล้วนำมาคำนวณหาค่าจำนวนจุลินทรีย์จากสูตร

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2) \times d]}$$

N : จำนวนโคโลนี (CFU/มิลลิลิตรหรือกรัมของตัวอย่าง)

$\sum C$: ผลรวมของจำนวนโคโลนีของทุก plate ที่นับได้

n_1 : จำนวน plate ของ dilution แรกที่นับได้

n_2 : จำนวน plate ของ dilution ถัดไป

d : dilution แรกที่เริ่มนับได้

2. การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนความเย็น (Psychrotrophic Plate Count) ในกึ่งกลาดำสดด้วยวิธี Direct plate count (APHA, 2001)

ชั่งกึ่งกลาดำสด 25 กรัม ใส่ลงในถุงปลอดเชื้อสำหรับเครื่อง stomacher เติม phosphate buffer saline (PBS) ปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง stomacher เปิดเครื่องนาน 1 นาที สารละลายที่ได้เป็น dilution ที่เจือจางลง 10 เท่า หรือ 10^{-1} แล้วทำ serial dilution 10^{-2} , 10^{-3} ต่อไป โดยการปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด PBS ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร

จากนั้นปิเปต 1 มิลลิลิตร ของแต่ละ dilution ลงใน petridish ปลอดเชื้อ แล้วเท Standard plate count agar ปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 – 15 มิลลิลิตร ลงบน petridish โดยใช้เทคนิค Pour plate โดยทำ 3 ซ้ำและทำการทดลองเดียวกันที่ dilution ถัดไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 7-9 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เลื่อนนับจำนวน โคโลนีบน plate ที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี แล้วนำมาคำนวณหาค่าจำนวนจุลินทรีย์จากสูตรใน ข้อ 1

3. การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* ในกึ่งกลาดำสดด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) แบบ 3-3-3 (US.FDA, 1998)

ชั่งกึ่งกลาดำสด 25 กรัม ใส่ลงในถุงปลอดเชื้อสำหรับเครื่อง stomacher เติม phosphate buffer saline (PBS) ปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง stomacher เปิดเครื่องนาน 1 นาที สารละลายที่ได้เป็น dilution ที่เจือจางลง 10 เท่า หรือ 10^{-1} แล้วทำ serial dilution 10^{-2} , 10^{-3} ต่อกัน โดยการปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด PBS ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร

จากนั้นปิเปต 1 มิลลิลิตร ของ serial dilution 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ลงใน Lauryl tryptose broth ที่มีหลอดดักก๊าซโดยใช้ dilution ละ 3 หลอด แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายตัวอย่าง 1 loop จาก Lauryl tryptose broth แต่ละ หลอด ใส่ลงใน Brilliant green lactose bile (BGLB) broth แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและถ่ายตัวอย่าง 1 loop จากแต่ละหลอดใส่ลงใน EC broth แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การคำนวณหาปริมาณโคลิฟอร์มทำได้โดยนับจำนวนหลอด BGLB broth ที่หลอดดักก๊าซ มีก๊าซอยู่ภายในอย่างน้อย 1 ใน 10 ของหลอด แล้วเทียบกับตาราง MPN 3 tube series จะได้ ค่าประมาณของปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มต่อตัวอย่างกึ่ง 1 กรัม สำหรับการคำนวณหาปริมาณเชื้อ *E. coli* โดยนับจำนวนของหลอด EC broth ที่หลอดดักก๊าซมีก๊าซอยู่ภายในอย่างน้อย 1 ใน 10 ของหลอด แล้วมาเทียบกับตาราง MPN 3 tube series จะได้ค่าประมาณของปริมาณเชื้อ *E. coli* ต่อตัวอย่างกึ่ง 1 กรัม

4. การตรวจหา *Salmonella* spp. ในกึ่งกลาดำสด (US.FDA, 1998)

ชั่งกึ่งกลาดำสด 25 กรัม ใส่ลงใน Lactose broth 225 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปต 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 10 มิลลิลิตร ของ Rappaport-Vassiliadis medium แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ ปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 10 มิลลิลิตร ของ Tetrathionate broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ

43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น streak ลงบน Bismuth sulfite (BS) agar, Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar และ Hektoen enteric (HE) agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อหาโคโลนีจำเพาะของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยบนอาหารแต่ละชนิด ลักษณะของโคโลนีจำเพาะจะแตกต่างกัน ดังนี้

- BS agar โคโลนีจะมีลักษณะสีน้ำตาล เทา หรือดำ (อาจมี Metallic sheen)
- XLD agar โคโลนีจะมีลักษณะสีชมพู มีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลาง
- HE agar โคโลนีจะมีลักษณะสีฟ้า หรือฟ้าอมเขียว มีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลาง หากพบลักษณะของโคโลนีจำเพาะดังกล่าว จะนำไปตรวจยืนยันต่อไป

5. การตรวจหา *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งกุลาดำสด (US.FDA, 1998)

ชั่งกุ้งกุลาดำสด 25 กรัม ใส่ลงใน Alkaline peptone water 225 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น streak ลงบน Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อหาโคโลนีจำเพาะของเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* โดยลักษณะของโคโลนีจำเพาะจะแตกต่างกัน ดังนี้

- *V. cholerae* โคโลนีจะมีลักษณะแบนเรียบ ขนาดใหญ่ มีสีเหลือง (Sucrose positive)
- *V. parahaemolyticus* โคโลนีจะมีลักษณะนูนขนาดใหญ่ มีสีเขียว (Sucrose negative)

ภาคผนวก ข

การเตรียมแบคทีเรียชนิดต่างๆ

1. การเตรียมแบคทีเรีย TPC, PPC และ TCC

เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากกึ่งกลาดำสดโดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 Total Aerobic Plate Count (TPC)

เตรียมโดยวิธี direct plate count โดยชั่งกึ่งกลาดำสดหนัก 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกสำหรับเครื่อง stomacher ที่ปลอดเชื้อใส่ PBS ปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง stomacher เปิดเครื่องนาน 1 นาที แล้วบีบเปิดตัวอย่างลงใน petridish ปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเท Standard plate count agar ปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 – 15 มิลลิลิตร ลงบน petridish โดยใช้เทคนิค pour plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2 Psychrotrophic Plate Count (PPC)

ทำการเตรียมเหมือนในข้อ 1.1 แต่บ่มที่อุณหภูมิ 7-9 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

1.3 Total Coliform Count (TCC)

ทำการเตรียมเหมือนในข้อ 1.1 แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile lactose (VRB) agar แทน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Bridson, comp., 1995)

เมื่อบ่มเชื้อแบคทีเรียได้ตามที่กำหนดแล้ว ใช้ loop เชี่ยเชื้อจาก agar ใส่ลงใน Nutrient broth (NB) นำไป vortex นาน 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรให้มีค่า OD ตามที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลอง

2. การเตรียมแบคทีเรีย *E. coli*, *S. anatum* และ *V. parahaemolyticus*

เชี่ยเชื้อมาตรฐาน *E. coli*, *S. anatum* ลงใน NB และ *V. parahaemolyticus* เลี้ยงใน NB +3% NaCl นำไป vortex นาน 1 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรให้มีค่า OD ตามที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลอง

ภาคผนวก ค

การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำไอโซน

ปิเปตสารละลายแบคทีเรียที่ได้จากการผสมกับน้ำไอโซนในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (10^{-1}) มา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด PBS ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร เพื่อทำ serial dilution 10^{-2} , 10^{-3} ต่อไป หลังจากนั้นปิเปต 1 มิลลิลิตร ของ serial dilution ลงใน petridish ปลอดเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 – 15 มิลลิลิตร ลงบน petridish แล้วใช้เทคนิค pour plate ทำซ้ำอีกใน dilution ถัดไป โดยการวิเคราะห์จำนวน TPC และ PPC ใช้ Standard plate count agar ป่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 7-9 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ตามลำดับ ส่วน TCC และ *E. coli* ใช้ VRB agar ป่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง *S. anatum* ใช้ XLD agar ป่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ *V. parahaemolyticus* ใช้ TCBS agar ป่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีตามภาคผนวก ก ข้อ 2

ภาคผนวก ง

การเติมแบคทีเรียลงในกึ่ง

เตรียมกึ่งกลูตาดีมาสด โดยนำกึ่งน้ำหนัก 300 กรัม มาแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 900 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำกลั่นออก แล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นใช้ forcep ปลอดเชื้อคีบกึ่งวางผึ่งไว้บน rack ใน biosafety cabinet เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำกึ่งทั้งหมดใส่ลงในสารละลายแบคทีเรียปริมาณ 900 มิลลิลิตร ที่มีค่า OD ตามที่กำหนดไว้ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายแบคทีเรียออก แล้วแบ่งกึ่งลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อถุงละ 2 ตัว (ประมาณ 40 กรัม)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของก๊าซไอโซนทั้งหมดด้วยวิธี Iodometric method (APHA, 1985)

1.1 วิธีเตรียมสารละลาย

1.1.1 20% Potassium iodide (20% KI)

- ชั่ง KI 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.2 2 N Sulfuric acid (2 N H₂SO₄)

- ตวง H₂SO₄ เข้มข้น 56 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.3 1 N Potassium dichromate (1 N K₂Cr₂O₇)

- ชั่ง K₂Cr₂O₇ 4.904 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 6 นาที ก่อนจะไตเตรทด้วย 0.1 N Na₂S₂O₃

1.1.4 0.005 N Sodium thiosulfate (0.005 N Na₂S₂O₃)

- เตรียม 0.1 N Na₂S₂O₃ โดยละลาย Na₂S₂O₃ 12.5 กรัม ลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดและปล่อยให้เย็น เติมน้ำ Sodium tetraborate 2 กรัม และ Mercuric iodide 5 กรัม แล้ว Standardise ด้วย K₂Cr₂O₇ (หลังจากที่เตรียม 0.1 N Na₂S₂O₃ อย่างน้อย 2 อาทิตย์ เพื่อให้ปฏิกิริยา oxidation เกิดอย่างสมบูรณ์) จากนั้นตวง 0.1 N Na₂S₂O₃ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เพื่อให้ได้ 0.005 N Na₂S₂O₃

1.1.5 สารละลาย Starch indicator

- ชั่ง Modified starch 0.2 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้ว 10 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน

1.2 วิธีวิเคราะห์

1.2.1 ตวงสารละลาย 20% Potassium iodide 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ต่อกับท่อจากเครื่องผลิตก๊าซไอโซน

1.2.2 นำสารละลาย KI ที่เป่าพ่นก๊าซไอโซนแล้วมา 40 มิลลิลิตร ทำให้เป็นกรดด้วย 2 N H₂SO₄ 1 มิลลิลิตร

1.2.3 นำสารละลาย KI ที่ได้ไปไตเตรทกับ 0.005 N Sodium thiosulfate จนกระทั่งสีเหลืองเกือบจะหายไป

1.2.4 เติม Starch indicator 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย จากนั้นไตเตรทต่อจนกระทั่ง

ตัวอย่างไม่มีสี

1.2.5 คำนวณความเข้มข้นของก๊าซไอโซนทั้งหมดโดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้นของก๊าซไอโซนทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{ปริมาตร Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times N \cdot \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 24,000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

2. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของก๊าซไอโซนตกค้าง (APHA, 1992)

2.1 ปิเปิดน้ำที่เป่าพ่นก๊าซไอโซนแล้วมา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.2 เติม Reagent R-1 1 ซีออน(ของชุดทดสอบ) เขย่าอย่างแรงจนกระทั่ง Reagent ละลายอย่างสมบูรณ์

2.3 เติม Reagent R-3 2 หยด ผสมให้เข้ากัน

2.4 ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

2.5 คำนวณความเข้มข้นของก๊าซไอโซนตกค้างโดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้นของก๊าซไอโซนตกค้าง (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} \times 2.35$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณ Total Volatile Base (Medical Sciences, 1999)

3.1 วิธีเตรียมสารละลาย

3.1.1 15% WV Potassium ferrocyanide (15% $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$)

- ชั่ง $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 15 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.2 30% WV Zinc acetate (30% $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

- ชั่ง $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.3 สารละลายอิ่มตัว Lithium carbonate (Saturated Li_2CO_3)

- เตรียมสารละลายอิ่มตัว Li_2CO_3 ด้วยน้ำกลั่น

3.1.4 0.5% Alizarin red

- ชั่ง Alizarin red 0.5 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.2 วิธีวิเคราะห์

3.2.1 ชั่งกึ่งที่ปั่นแล้วมา 10 กรัม ใส่ใน homogenized cup แล้วเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร

3.2.2 เติม silicone antifoam 2-3 หยด แล้วนำไป homogenized นาน 5 นาที

3.2.3 เทตัวอย่างที่ได้ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม 15% $K_4Fe(CN)_6$ 1 มิลลิลิตร, 30% $(CH_3COO)_2Zn \cdot 2H_2O$ 1 มิลลิลิตร และ saturated Li_2CO_3 25 มิลลิลิตร

3.2.4 นำ Kjeldahl flask ต่อเข้ากับชุดกลั่น

3.2.5 เติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร ใน pear shape flask (receiving flask) แล้วเติม Alizarin red 2-3 หยด จากนั้นนำไปต่อเข้ากับชุดกลั่น

3.2.6 กลั่นตัวอย่าง โดยเริ่มจับเวลาตั้งแต่ receiving flask เปลี่ยนสีจากเหลืองส้มเป็น สีชมพูเป็นเวลา 15 นาที

3.2.7 นำสารละลายใน receiving flask มาไตเตรทกับ 0.1 N H_2SO_4 จนได้จุดยุติสี

เหลือง

3.2.8 คำนวณค่า TVB โดยใช้สูตร

$$TVB \text{ (มิลลิกรัมไนโตรเจน/ 100 กรัม)} = \frac{1.4 \times \text{ปริมาตร } H_2SO_4 \times N \cdot H_2SO_4 \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง} \times 0.1}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

การวัดทางฟิสิกส์

1. การวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ORION รุ่น 940 (Hanpongkittikun et al., 1995)

ชั่งตัวอย่างกุ้งที่ป่นแล้ว 10 กรัม ใส่ลงใน homogenized cup แล้วเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร นำไป homogenized นาน 1 นาที แล้วนำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ORION รุ่น 940



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช

การวัดคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ไพโรจน์ วิริยจारी, 2535) โดยใช้ผู้ทดสอบแบบ semi-trained โดยฝึกฝนผู้ทดสอบด้วยการกำหนดค่านิยามของลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น และสี ของกึ่งกูลาดำสดที่จะทำการทดสอบ โดยใช้คู่มือประกอบการประเมินคุณภาพสัตว์น้ำ (ประมง, ม.ป.ป.) ร่วมกับการวิจารณ์และปรึกษาหารือ ทำความตกลงในลักษณะต่างๆข้างต้นที่ต้องการทดสอบ และฝึกฝนผู้ทดสอบให้ทราบว่าคุณลักษณะนั้นๆของกึ่งกูลาดำสดเป็นอย่างไร ก่อนที่จะมีการตัดสินใจในการบันทึกการให้คะแนนลงไป และฝึกฝนในลักษณะดังกล่าวจนมีความชำนาญก่อนการทดสอบจริงต่อไป โดยใช้แบบทดสอบดังนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ชื่อผู้ทดสอบ

วัน/เดือน/ปี.....

โปรดประเมินกุ่มกุลาดำที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นและน้ำไอโซน เพื่อทดสอบคุณภาพด้าน กลิ่น สี และลักษณะเนื้อสัมผัส โดยเขียนเครื่องหมายลงในช่องที่แสดงถึงความหมายในการพรรณนา ที่ดีที่สุดของกุ่มกุลาดำที่กำลังทดสอบ และโปรดให้คำเสนอแนะด้วยจักเป็นพระคุณอย่างยิ่ง

	คะแนน	กุ่มกุลาดำ ล้างด้วยน้ำ กลั่น	กุ่มกุลาดำ ล้างด้วยไอโซน 217.60 mg/l TOC	กุ่มกุลาดำ ล้างด้วยไอโซน 1132.27 mg/l TOC
ลักษณะเนื้อสัมผัส				
- เนื้อแน่น เปลือกแข็งมาก	5
- เนื้อแน่น เปลือกแข็ง	4
- เนื้อแน่นเล็กน้อย เปลือกแข็ง	3
- เนื้อนิ่ม เปลือกนิ่มเล็กน้อย	2
- เนื้อและเปลือกนิ่ม	1
กลิ่น				
- ไม่มีกลิ่นหรือกลิ่นสดหรือกลิ่นธรรมชาติ	5
- ไม่มีกลิ่นหรือกลิ่นแรงขึ้น แต่ไม่มีกลิ่นคาวที่น่ารังเกียจ	4
- มีกลิ่นคาวหรือกลิ่นผิดปกติเล็กน้อย	3
- มีกลิ่นคาว เปรี้ยว เน่า	2
- มีกลิ่นเหม็นเน่าชัดเจนไม่เหมาะแก่การบริโภค	1
สี				
- แก้มและลำตัวมีสีเทาอมน้ำเงินถึงซีดจาง	5
- แก้มสีเทาดำและลำตัวมีสีซีดจาง	4
- แก้มสีดำและแนวสันหลังมีสีเหลืองอ่อน	3
- แก้มสีดำมาก หางสีดำเล็กน้อย	2
- สีดำทั้งหัว แนวสันหลังมีสีเหลือง เนื้อชุ่น และหางดำ	1

ข้อเสนอแนะ.....

ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจิราภา เสฐจินตนิน เกิดเมื่อวันที่ 6 ธันวาคม พ.ศ. 2515 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ ในปีการศึกษา 2537 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2543



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย