ประสิทธิภาพโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการล้างปลาหมึกกระดอง

EFFICIENCY OF SODIUM HYPOCHLORITE TO REDUCE BACTERIA ASSOCIATED IN CUTTLEFISH DURING WASHING STEP.

เพ็ญนิภา แก้วอุไร
PENNIPA KAEWURAI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาคุหกิบาลอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ประสิทธิภาพโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการล้างปลาหมึกกระดอง

EFFICIENCY OF SODIUM HYPOCHLORITE TO REDUCE BACTERIA ASSOCIATED IN CUTTLEFISH DURING WASHING STEP.

เพ็ญนิภา แก้วอุไร

PENNIPA KAEWURAI

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....74537
วัน,เดือน,ปี.....3 ต.ค. 2550

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาสุขาภิบาลอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

EFFICIENCY OF SODIUM HYPOCHLORITE TO REDUCE BACTERIA ASSOCIATED IN CUTTLEFISH DURING WASHING STEP.

PENNIPA KAEWURAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2007

หน้านี้ไม่มีในต้นฉบับ

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการล้างปลาหมึกกระดอง
นักศึกษา	นางสาวเพ็ญนิภา แก้วอุไร
รหัสประจำตัว	45063009
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2550
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

ข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อ *Escherichia coli* และ เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าโรงงานในปี 2548 พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบ คือ 2.9 $\log_{10}$ CFU/g ถึง 5.4 $\log_{10}$CFU/g ซึ่งลักษณะที่พบมากที่สุดเป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน แกรมลบ ขณะที่ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ตรวจพบตั้งแต่ < 3 ถึง 93 MPN /g และเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตรวจพบตั้งแต่ < 3 ถึง 23 MPN /g

เมื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อ *E. coli* และเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหลอดทดลอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาณจุลินทรีย์แต่ละชนิด คือ ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เท่ากับ 50 ppm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 วินาที โดยประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อ *E. coli* และเชื้อ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 26.4 % 25.4 % และ 28.3 % ตามลำดับ ทั้งนี้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสให้ผลต่อการลดปริมาณของเชื้อไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

เมื่อศึกษาการล้างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด, เชื้อ *E. coli* และเชื้อ *V. parahaemolyitcus* เท่ากับ 5 ± 0.55 $\log_{10}$CFU/g, 4 ± 0.10 $\log_{10}$CFU/g และ 4 ± 0.09 $\log_{10}$CFU/g ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่า ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เหมาะสมในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อ *E. coli* และเชื้อ *V. parahaemolyitcus* คือ ที่ความเข้มข้นของสารละลาย เท่ากับ 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อ *E. coli* และเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cutได้สูงเท่ากับ 30.4% 31.7% และ 27.0 % ตามลำดับ สำหรับปลาหมึกชนิดCuttlefish fillet slit ได้เท่ากับ

31.0% 37.2% และ 45.4 % ตามลำดับ ส่วนปลาหมึกชนิด Cuttlefish fillet ได้เท่ากับ 36.8% 60.7% และ 58.8% ตามลำดับ โดยสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวไม่มีผลกระทบกับคุณภาพของสินค้าทั้งในเรื่องของกลิ่น และการตกค้างของคลอรีนในเนื้อปลาหมึก

Thesis Title	Efficiency of Sodium Hypochorite to Reduce Bacteria Associated in Cuttlefish during Washing Step.
Student	Miss Pennipa Kaewurai
Student ID	45063009
Degree	Master of Science
Program	Food Sanitation
Year	2550
Thesis Advisor	Asso. Prof. Dr. Warawut Krusong

ABSTRACT

Analysis data of total bacteria, *Escherichia coli* and *Vibrio parahaemolyticus* contaminated in cuttlefish which received at manufacturing during the year 2005. The 2.9 $\log_{10}$CFU/g to 5.4 $\log_{10}$CFU/g of total bacteria were detected. The rod shape gram negative bacteria were dominant. Simultaneously, the <3 MPN/g to 93 MPN /g of *E. coli* and < 3 MPN/g to 23 MPN/g of *V. parahaemolyticus* were detected.

The efficiency of sodium hypochlorite solution for reducing total bacteria, *E. coli* and *V. parahaemolyticus* in test tube were studied. The suitable condition for sodium hypochlorite solution was 50 ppm at 25°C for 60 sec. of contact time. The efficiency for reduction of total bacteria, *E. coli* and *V. parahaemolyticus* were 26.4%, 25.4% and 28.3%, respectively. Moreover, the efficiency of sodium hypochlorite solution at 25°C had not significantly different from that at 10°C.

The application of sodium hypochlorite solution for reducing the associated bacteria during washing step of cuttlefish dice cut, cuttlefish fillet slit and cuttlefish fillet were inoculated with 5 ± 0.55 $\log_{10}$CFU/g of total bacteria, 4 ± 0.10 $\log_{10}$CFU/g of *E. coli* and 4 ± 0.09 $\log_{10}$CFU/g of *V. parahaemolyticus*, respectively. At solution temperature of 10°C, the suitable conditions for significant reduction efficiency ($P < 0.05$) were 50 ppm of sodium hypochlorite solution and 60 sec. of contact time. The reduction of total bacteria, *E. coli* and *V. parahaemolyticus* in cuttlefish dice cut were 30.4%, 31.7% and 27.0%, respectively. While in cuttlefish fillet slit were 31.0%, 37.2% and 45.4 %, respectively. The 36.8%, 60.7% and 58.8 %, respectively, were determined in cuttlefish fillet. By using this appropriate conditions for washing step, the natural odour of cuttlefish and no hypochlorite residual were observed.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาจาก รศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ. เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ ผศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ ผศ. ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ที่กรุณาให้ความรู้และให้การแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนสำเร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ คุณกำชัย รังสิยานันต์ ประธานกรรมการ บริษัทแม่กลองฟู้ดส์ จำกัด ที่เป็นผู้เปิดโอกาสให้เข้าศึกษาในช่วงของการทำงาน รวมถึงสนับสนุนทรัพยากรต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์นี้ และขอขอบพระคุณ คุณวรพงษ์ จงอ่อน รองประธานกรรมการ และคุณไชยา ประสมศรี ผจก.โรงงาน ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องเวลา และสถานที่ ตลอดจนทรัพยากรที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณดนัย หล้าแหล่ง หัวหน้าฝ่ายผลิต และคุณรจนา ทองมา หัวหน้าแผนกห้องปฏิบัติการ และเพื่อนๆ บริษัทแม่กลองฟู้ดส์ จำกัด ที่เสียสละเวลาช่วยทำการทดลอง และตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ และเพื่อน น้อง ๆ นักศึกษาสาขาสุขาภิบาลอาหาร ที่คอยให้การช่วยเหลือแนะนำในด้านต่าง ๆ และอำนวยความสะดวก ในระหว่างทำการทดลอง

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ พ่อพล และคุณแม่นิตย์ บุญแท้ ที่เป็นแรงใจ และเป็นกำลังใจที่สำคัญให้เพียรพยายามในการศึกษาครั้งนี้ รวมถึง ญาติ พี่ น้อง ที่คอยห่วงใย และเป็นกำลังใจด้วยดีเสมอมา

คุณค่า และประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

เพ็ญนิภา แก้วอุไร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง..... VII

สารบัญภาพ.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มา.....1

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย.....3

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ปลาหมึก.....4

2.2 คลอรีน และสารประกอบคลอรีน.....6

2.3 อันตรายจากคลอรีน.....8

2.4 ประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียของโซเดียมไฮโปคลอไรท์.....10

2.5 กลไกการทำลายจุลินทรีย์ของคลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน.....13

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายจุลินทรีย์ของคลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน.....15

2.7 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพและมาตรฐานทางผลิตภัณฑ์ประมง.....19

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....21

3.1 วัตถุดิบ.....21

3.2 เครื่องมือ สารเคมี และวิธีการวิเคราะห์.....21

3.3 สถานที่ทำการทดลอง.....22

3.4 วิธีการทดลอง.....22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล.....29

4.1 ผลการสำรวจกลุ่มของแบคทีเรียที่มีอยู่ในวัตถุดิบปลาหมึกกระดอง.....29

4.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและ คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา ของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในปลาหมึกกระดองที่รับเข้าในโรงงาน.....31

4.3 ประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณ เชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง.....32

4.4 ผลการเตรียมตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ใช้ในการทดลอง.....41

4.5 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อ แบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึก.....42

4.6 ศึกษาการตกค้างของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในเนื้อปลาหมึกกระดอง หลังจากขั้นตอนการล้าง.....50

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....55

เอกสารอ้างอิง.....57

ภาคผนวก.....64

ก. การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์.....64

ข. วิธีวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์.....69

ค. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์..... 72

ง. เกณฑ์คุณภาพของวัตถุดิบปลาหมึกทางด้านจุลชีววิทยา (ฉบับร่าง).....74

จ. การย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining).....76

ฉ. ขั้นตอนการล้างปลาหมึกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์.....78

ช. ข้อมูลผลการทดลอง.....80

ประวัติผู้เขียน.....93

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลาหมึกแช่แข็ง....6

2.2 ค่าคงที่ของกรดไฮโปคลอรัสที่อุณหภูมิต่าง ๆ....7

2.3 ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อเปอร์เซนต์การแตกตัวของกรดไฮโปคลอรัส....8

2.4 ปริมาณก๊าซคลอรีนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ....10

2.5 ประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการยับยั้งเชื้อชนิดต่าง ๆ....11

2.6 ระดับความไวของจุลินทรีย์ต่อการทำลายของคลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน....18

4.1 จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองที่รับเข้าโรงงาน
ตั้งแต่เดือน มกราคม – ธันวาคม 2548....30

4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่พบในวัตถุดิบปลาหมึกกระดอง....31

4.3 ค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
หลังการเตรียมสารละลาย 32

4.4 เปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยสารละลายโซเดียม
ไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25 องศาเซลเซียส....39

4.5 สภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดในหลอดทดลอง
ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์....40

4.6 ปริมาณการตกค้างของสารไปคลอไรท์ในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสด
หลังผ่านขั้นตอนการล้าง 42

4.7 ค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ วัดค่าได้
หลังการเตรียมสารละลาย และหลังจากล้างตัวอย่างปลาหมึก....48

4.8 สภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดในเนื้อปลาหมึก
กระดองสดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส....49

4.9 ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยการดมกลิ่นปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลาย
โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 75 และ100 52

4.10 ผลการวัดไฮโปคลอไรท์ตกค้างในเนื้อปลาหมึก.... 53

ผนวกที่ 1 ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เติมลงในน้ำประปา
ปริมาตร 50 ลิตร....73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ผนวกที่ 2 ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/ml) ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25 ^{o}C.....81

ผนวกที่ 3 ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/ml) ของเชื้อ *E. coli* ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25 ^{o}C.....82

ผนวกที่ 4 ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/ml) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25 ^{o}C.....83

ผนวกที่ 5 ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/g) ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับ ความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm อุณหภูมิ 10^{o}C.....84

ผนวกที่ 6 ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/g) ของเชื้อ *E. coli* ในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ100 ppm อุณหภูมิ 10^{o}C.....85

ผนวกที่ 7 ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/g) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึกชนิดต่างๆภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ100 ppm อุณหภูมิ 10^{o}C.....86

ผนวกที่ 8 เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25^{o}C ในหลอดทดลองที่ระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ 87

ผนวกที่ 9 เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *E .coli* ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25^{o}C ในหลอดทดลองที่ระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ.....88

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ผนวกที่ 10 เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25°C ในหลอดทดลองที่ระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ.....89

ผนวกที่ 11 เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm ณ อุณหภูมิ 10°C ในระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ.....90

ผนวกที่ 12 เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* ในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm ณ อุณหภูมิ 10°C ในระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ.....91

ผนวกที่ 13 เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm ณ อุณหภูมิ 10°C ในระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ.....92

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ปฏิกิริยาการแตกตัวของ NaOCl..... 7

3.1 การเตรียมน้ำผสมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์..... 24

(ก) เตรียมน้ำใส่ภาชนะ 24

(ข) เติมไฮโปคลอไรท์ลงในถังน้ำที่เตรียมไว้.....24

(ค) ตรวจสอบปริมาณไฮโปคลอไรท์ โดยใช้เครื่องวัด Lovibond 24

(ง) ตรวจสอบปริมาณไฮโปคลอไรท์
โดยใช้กระดาษวัดไฮคลอไรท์.....24

(จ) ตรวจวัดอุณหภูมิของน้ำ 24

3.2 ตัวอย่างลักษณะปลาหมึกกระดอง.....25

(ก) ตัวอย่างปลาหมึกกระดองแล่หั่นเต๋า (Cuttlefish dice cut).....25

(ข) ตัวอย่างปลาหมึกกระดองแล่กรีด (Cuttlefish fillet slit) 25

(ค) ตัวอย่างปลาหมึกกระดองแล่ (Cuttlefish fillet).....25

3.3 การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างปลาหมึก.....26

(ก) ตัวอย่างปลาหมึกหลังล้าง.....26

(ข) เติมเชื้อจุลินทรีย์ 26

(ค) คลุกเคล้าให้เชื้อจุลินทรีย์สัมผัสกับเนื้อปลาหมึก..... 26

(ง) ตัวอย่างปลาหมึกปนเปื้อนด้วยเชื้อ.....26

3.4 การล้างตัวอย่างปลาหมึกที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์.....27

(ก) ตัวอย่างปลาหมึกปนเปื้อเชื้อจุลินทรีย์.....27

(ข) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างปลาหมึกก่อนล้างด้วยน้ำสารละลาย
โซเดียมไฮโปคลอไรท์..... 27

(ค) ล้างปลาหมึกที่ชั่งเตรียมไว้จนครบตามเวลาที่กำหนด..... ...27

(ง) ตัวอย่างปลาหมึกหลังล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์.....27

(จ) เก็บตัวอย่างปลาหมึกเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต.....27

4.1 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส
ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่อุณหภูมิของสารละลาย
โซเดียมไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 0 องศาเซลเซียส.....34

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่อุณหภูมิของ สารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 10 องศาเซลเซียส....34

4.3 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่อุณหภูมิของ สารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส....34

4.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิของ สารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 0 องศาเซลเซียส....35

4.5 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิของ สารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 10 องศาเซลเซียส....35

4.6 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิของ สารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส....35

4.7 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิของ สารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 0 องศาเซลเซียส....36

4.8 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิของ สารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 10 องศาเซลเซียส....36

4.9 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิของ สารละลายโซเดียม ไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส....36

4.10 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เหลือรอดหลังผ่านขั้นตอนการล้าง (Log_{10}CFU/g)....41

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.11 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส.....43

4.12 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet slit อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส.....44

4.13 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส.....44

4.14 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส.....44

4.15 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet slit อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส.....45

4.16 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส.....45

4.17 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส.....45

4.18 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet slit อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส.....46

4.19 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส.....46

ผนวกที่ 1 ลักษณะของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา.....65

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ปลาหมึกเป็นสินค้าส่งออกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และทำรายได้ให้กับประเทศหลายล้านบาท ปลาหมึกที่ส่งออกไปขายต่างประเทศแบ่งเป็นFresh , Frozen cuttlefish และ Prepared or Preserved cuttlefish อาจจำแนกได้เป็นผลิตภัณฑ์ดิบ (Raw product) ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านความร้อน (Cooked product)และ ผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค (Ready to eat product) รายงานการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลาหมึกแช่แข็ง ระหว่างปี 2544 –2545 โดยปี 2544 ส่งออกเป็นจำนวน 91,064.00 ตัน มูลค่า 13,836.45 ล้านบาท และปี 2545 ส่งออกเป็นจำนวน 103,309.00 ตัน มูลค่า 14,661.83 ล้านบาท (สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2545) การส่งออกสินค้าได้ต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เป็นสำคัญ

นงลักษณ์และปรีชา (2541) ได้กล่าวถึงคุณภาพและการตรวจสอบคุณภาพของสัตว์น้ำไว้ดังนี้ คุณภาพของสัตว์น้ำหรือผลิตภัณฑ์ประมง เป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่งโดยเฉพาะความสด (Freshness) เนื่องจากสัตว์น้ำเป็นวัตถุดิบที่เสื่อมคุณภาพง่าย (Perishable product) บางครั้งการบริโภคสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคในด้านอันตรายทางชีวภาพ เป็นอันตรายที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะกลุ่มของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา รวมถึงพยาธิชนิดต่าง ๆ โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มักเกี่ยวข้องกับมนุษย์ วัตถุดิบ และพบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป อัจฉรา (2537) ได้กล่าวถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง ได้แก่ ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารขึ้นอยู่กับปัจจัยดังนี้

1. จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบ
2. สุขลักษณะของสถานที่ผลิต
3. สุขลักษณะที่เกี่ยวกับอุปกรณ์และภาชนะบรรจุอาหาร ตลอดจนน้ำใช้ น้ำแข็ง
4. การกำจัดและป้องกันสัตว์นำโรคในบริเวณผลิต
5. สุขอนามัยส่วนบุคคลและพฤติกรรมในการปฏิบัติงานของผู้สัมผัสอาหาร
6. การป้องกันการปนเปื้อนข้าม (Cross contamination) ระหว่างสิ่งแวดล้อมไปยังอาหารในทุกขั้นตอนการผลิต
7. ความถูกต้องของกรรมวิธีการผลิตที่ใช้และการควบคุมคุณภาพการผลิต
8. การบรรจุผลิตภัณฑ์
9. การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

10. ระบบการควบคุมคุณภาพ

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพและมาตรฐานทางผลิตภัณฑ์ประมง รัตนา (2535) ได้รวบรวมไว้ดังนี้ แบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นดัชนีในเรื่องความสะอาด ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มซึ่งเป็นดัชนีเพื่อบ่งบอกถึงความสะอาดของวัตถุดิบ อุปกรณ์ที่ใช้ การผลิตที่ถูกสุขลักษณะและการเก็บรักษาที่ถูกต้อง แบคทีเรียจำพวกโคลิฟอร์มมี 4 สกุล คือ *Escherichia, Klebsiella, Citrobacter* และ *Enterobacter* และแบคทีเรียที่เป็นโทษในผลิตภัณฑ์ประมง ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, Salmonella, *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

อาหารทะเลเยือกแข็งเมื่อตรวจวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยา จะพบแบคทีเรียในปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่อาจตรวจพบมี 4 ประเภท

1. Psychophillic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำได้แก่ *Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium*

2. Mesophillic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง มักปนมากับวัตถุดิบ ภาชนะบรรจุ และขณะทำการผลิต ได้แก่ *Bacillus, Clostridium*

3. Sanitary index แบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้เป็นดัชนีของการผลิตอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เกิดการปนเปื้อนระหว่างกรรมวิธีการผลิต ได้แก่ Faecal coliform, *E. coli* และ *Staph. aureus*

4. Pathogenic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ Salmonella, *V. cholerae, V. parahaemolyticus, Staph. aureus* และ *Clostridium botolinum* type E

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นจะต้องมีการควบคุมคุณภาพของสินค้าให้เป็นไปตามความต้องการของผู้ซื้อและเป็นไปตามมาตรฐานอาหารสากล การลดปริมาณจุลินทรีย์ในโรงงานผลิตอาหารทะเลแช่แข็งมีการนำคลอรีนมาใช้ในการลดหรือทำลายจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิต ได้แก่ ในน้ำ น้ำบริโภค น้ำล้างวัตถุดิบ อุปกรณ์ เครื่องมือ น้ำลำเลียง น้ำหล่อเย็น และน้ำที่เป็นส่วนประกอบในอาหาร สารประกอบคลอรีนที่ใช้ในปัจจุบัน คือ ก๊าซคลอรีน (Cl_2) แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) โดยคลอรีนแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการลดหรือทำลายจุลินทรีย์แตกต่างกันไป และเกี่ยวเนื่องกับเรื่องของค่าใช้จ่าย ซึ่งเกี่ยวข้องกับเรื่องต้นทุนการผลิต จึงต้องมีการพิจารณาและตัดสินใจที่จะใช้ ทั้งนี้ทั้งนั้นต้องอยู่ภายใต้หลักเกณฑ์ของ Codex Committee on Fish and Fishery Product (2000)

การศึกษาวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงการลดปริมาณจุลินทรีย์บนพื้นที่ผิวสัมผัสของวัตถุดิบ และศึกษาปริมาณของสารเคมีที่นำมาใช้ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิตปลาหมึกแช่เยือกแข็ง เพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีเกินปริมาณที่กำหนด เสียค่าใช้จ่ายโดยไม่จำเป็น และคำนึงถึงอันตรายหรือผลกระทบที่จะเกิดกับผู้บริโภค ผลการศึกษาจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตอาหารทะเลแช่เยือกแข็งต่อไป

1.2 ขอบข่ายของงานวิจัย

มุ่งเน้นศึกษาถึงการลดปริมาณจุลินทรีย์บนพื้นที่ผิวสัมผัสของปลาหมึกกระดอง และศึกษาปริมาณของสารเคมีที่นำมาใช้ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการล้างปลาหมึกกระดองแช่เย็น เพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีเกินปริมาณที่กำหนด เสียค่าใช้จ่ายโดยไม่จำเป็น และคำนึงถึงอันตรายหรือผลกระทบที่จะเกิดกับผู้บริโภค

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. สำรวจข้อมูลกลุ่มของแบคทีเรียที่มีอยู่ในวัตถุดิบปลาหมึกกระดอง
2. ผลของปริมาณโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการลดแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria), *Escherichia coli* และ *Vibrio parahaemolyticus* ในหลอดทดลอง
3. ผลของปริมาณโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อการลด Total bacteria, *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึกกระดอง
4. การตกค้างของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในเนื้อหมึกกระดองหลังจากขั้นตอนการล้าง

บทที่ 2
ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลาหมึก

ปลาหมึก เป็นทรัพยากรสัตว์ทะเลที่นับวันจะทวีความสำคัญมากขึ้นทั้งในแง่การบริโภคและเป็นสินค้าส่งออก ปลาหมึกเป็นสัตว์อยู่ในจำพวกหอยจัดอยู่ใน Class Cephalopod, Phylum Mollusca (อนุวัฒน์, 2536; จารุวัฒน์,2538) หมายถึงสัตว์ที่มีส่วนหัว(Cephalo) และ เท้า (Poda)อยู่ติดกัน ส่วนหัวยื่นออกเป็นวงกลมที่แยกออกเป็นหนวดแต่ละเส้น หนวดเชื่อมต่อกันโดยเยื่อ (Web) ลำตัวมีลักษณะคล้ายถุง ห่อหุ้มเหงือกและอวัยวะภายในไว้ รูปร่างและลำตัวแตกต่างกันตามชนิด ชนิดของปลาหมึกประกอบด้วยปลาหมึกกลางน้ำ (เช่น ปลาหมึกกล้วย ปลาหมึกหอม จะมีรูปร่างเพรียวไม่ต้านน้ำ) ปลาหมึกหน้าดิน มีรูปร่างอ้วนสั้นกว่า สามารถว่ายน้ำได้อย่างรวดเร็วโดยการพ่นน้ำจากช่องภายในลำตัวผ่านท่อที่อยู่ด้านใต้ของหัว แรงของน้ำที่พ่นออกมาจากตัวปลาหมึกให้พุ่งไปคล้ายการเคลื่อนที่ของจรวด การบังคับทิศทางกระทำโดยการหันปลายท่อไปในทิศทางตรงกันข้ามกับทิศที่ต้องการ โดยอาศัยครีบช่วยในการทรงตัว ปลาหมึกกลางน้ำจะอยู่รวมกันเป็นฝูง ส่วนปลาหมึกกระดองมักแยกกันอยู่และจะอยู่เป็นฝูงในระหว่างการล่าเหยื่อและหนีศัตรู และมีพฤติกรรมฝังตัวลงในหน้าดิน ปลาหมึกสายมักอยู่กับหน้าดินตลอดเวลา อาศัยตามแนวหิน หรือโพรงหินปลาหมึกทุกชนิดเป็นสัตว์กินเนื้อ ชนิดของอาหารขึ้นอยู่กับที่อยู่อาศัย ซึ่งได้แก่ ปลา กุ้ง ปู เคย ปลาหมึกจะจับเหยื่อโดยการกางหนวดออกทำให้มีลักษณะคล้ายร่มแล้วครอบลงไปที่เหยื่อ เยื่อระหว่างหนวดแต่ละเส้นจะคลุมตัวเหยื่อไว้ และกัดบริเวณต้นคอ หรือรอยต่อระหว่างส่วนหัวและลำตัว หลังจากนั้นใช้ปาก และเขี้ยวขูดกินเฉพาะเนื้อของเหยื่อ

ชนิดของปลาหมึกในอ่าวไทย แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ (มาลา, 2536)

2.1.1 ปลาหมึกกล้วย Order Teuthoidea

รูปร่างยาว คล้ายตอร์ปิโด มีครีบด้านข้างค่อนไปทางท้ายลำตัว (Postero laceral fin) ระยางค์รอบปากมีระยางค์สั้นหรือแขน (Arm) 4 คู่ มีปุ่มดูดบนแขน 2 แถวหรืออาจเป็น 4 ซึ่งประกอบด้วย Chitinous ring บางชนิด และ/หรือ มีตะขอ (Hook) ด้วย ส่วนระยางค์ยาว หรือ หนวด (Tentacle) 1 คู่ มีปุ่มดูด 2 แถว หรือ มากกว่า และ/หรือ มี Hook ด้วย (เจิดจินดา, 2536) ลักษณะสำคัญคือ มีกระดองใสที่เรียกว่า Siliceous shell ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมี 4 ชนิด ประกอบด้วย

- ปลาหมึกศอก (Mitre squid) - *Loligo chinenis*
- ปลาหมึกจิกโก๋ (Indian squid) – *L. duvauceli*

- ปลาหมึกกระตอย (Sumatrensis) - Loligolus (Niponololigo)
- ปลาหมึกตะเภา ปลาหมึกหอม (Bigfin reef squid) - *Sepioteuthis lessoniana*

2.1.2 ปลาหมึกกระดอง Oder Sepioidea

รูปร่างแบนกว้าง หรือ คล้ายถุง มีครีบด้านข้าง ซึ่งถ้ามีตลอดความยาวของลำตัวเป็นพวก Sepiidea ถ้าครีบสั้นกลม (Flap link) เป็นพวก Sepiolidea ระยางค์เหมือนในพวกปลาหมึกกล้วย มีแขน 4 คู่ หนวด1 คู่ ไม่มี Hook (เจิดจินดา, 2536) ลักษณะที่สำคัญคือ มีกระดองแข็ง สีขาวขุ่นเป็นแบบ Calcareous shell ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมี 6 ชนิด ประกอบด้วย

- ปลาหมึกกระดองลายเสือ (Pharaoh cuttlefish) – *Sepia pharaonis*
- ปลาหมึกกระดอง (Needle cuttlefish) – *Sepia aculeate*
- ปลาหมึกกระดอง (Kisslip cuttlefish) – *Sepia lycidas*
- ปลาหมึกกระดอง (Curvespine cuttlefish) – *Sepia recurvirostra*
- ปลาหมึกกระดอง (Shortclub cuttlefish) – *Sepia brevimana*
- ปลาหมึกกระดองก้นไหม้ (Spineless cuttlefish) – *Sepiella inermis*

2.1.3 ปลาหมึกสาย หรือปลาหมึกสายยักษ์ Order Octopoda

ลำตัวกลม คล้ายถุง ไม่มีครีบข้าง ๆ แต่ในพวกน้ำลึกบางชนิด Paddle link fin ระยางค์รอบปากมี 8 อัน ปุ่มดูดไม่มี Chitinous ring ลักษณะที่สำคัญ คือ ไม่มีกระดองหรือพัฒนาไปจนเหลือเล็กน้อย มีแขนเพียง 4 คู่รอบปาก (เจิดจินดา, 2536) ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมี 5 ชนิด เป็นปลาหมึกสายขาว และปลาหมึกสายดำ ประกอบด้วย

- *Octopus membranaceus*
- *Oc. aegina*
- *Oc. Dellfusi*
- *Cistiopus indicus*
- *Hapalochlaena maculosa*

ประเทศไทยส่งผลิตภัณฑ์ปลาหมึกไปจำหน่ายยังประเทศต่าง ๆ ในลักษณะของปลาหมึกแช่แข็ง ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลาหมึกแช่แข็ง

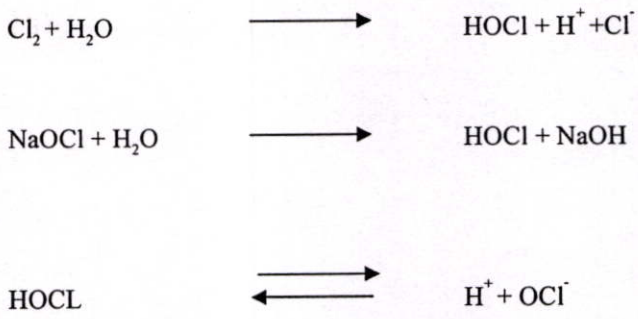
ปี พ.ศ.	ปริมาณ (ก.ก.)	มูลค่า (บาท)
2542	40,233,706	3,941,870,983
2543	39,084,461	7,958,304,190
2544	37,180,620	8,084,938,142
2545	39,261,803	7,885,364,569

ที่มา : กรมศุลกากร (2547)

2.2 คลอรีน และสารประกอบคลอรีน

คลอรีนเป็นสารเคมีฆ่าเชื้อที่มีการใช้อย่างกว้างขวางและใช้มากที่สุด คลอรีนยังเป็นสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เติมลงในน้ำที่ใช้ลำเลียงวัตถุดิบอาหาร เติมในน้ำที่ใช้หล่อเย็นอาหารกระป๋องที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้สำหรับฆ่าเชื้อพื้นที่ผิวสัมผัสอาหาร ใช้ล้างวัตถุดิบเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ในอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บของอาหารบางชนิด เช่น เนื้อ สัตว์ปีกและปลา (Cords และ Dychdala, 1993) นอกจากนี้ยังเป็นสารเคมีที่ได้รับการยอมรับจากหน่วยงานป้องกันสิ่งแวดล้อม (Environmental Protection Agency) และ องค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration)

สารประกอบคลอรีนอยู่ได้ทั้งในรูปแก๊ส ของเหลว และของแข็ง ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้คลอรีนในรูปไฮโปคลอไรท์ (Hypochlorite) ซึ่งเป็นเกลือของกรดไฮโปรคลอรัส เนื่องจากเป็นสารฆ่าเชื้อที่ออกฤทธิ์ได้ดี ช่วยกำจัดกลิ่น ไม่เป็นพิษ และไม่มีสารตกค้างเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่กำหนด ไฮโปรคลอรัสเป็นสารไม่มีสี ราคาไม่แพง (Dychdala, 1968) เกลือของไฮโปคลอไรท์ที่นิยมใช้ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ นิยมใช้ในรูปของสารละลาย (Boyette และคณะ, 1993) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ สูตรทางเคมี NaOCl (Trueman, 1971) ความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ของสารประกอบคลอรีนเกิดขึ้นเมื่อละลายน้ำ เมื่อคลอรีนหรือไฮโปคลอไรท์ละลายน้ำ จะเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ปฏิกิริยาการแตกตัวของ NaOCl
ที่มา : Trueman (1971)

ปฏิกริยาการแตกตัว (Hydrolysis) ของคลอรีนจะเกิดกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) และ คลอไรท์อิออน (OCl^-) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นนี้ค่อนข้างสมบูรณ์และเกิดขึ้นเร็วมาก กรดไฮโปคลอรัสนี้เป็นสารฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ มีสมบัติเป็นกรดอ่อน และมีค่าคงที่การแตกตัวที่ 0–25 ^{o}C เป็น 1.6-3.2 x 10^{-8} และมีค่า pKa 7.8 –7.5 (Morris, 1966) ค่าการแตกตัวที่อุณหภูมิต่ำ จะให้ค่าคงที่ของการแตกตัวต่ำกว่าที่อุณหภูมิสูง หรือที่อุณหภูมิห้อง 30^{o}C แสดงในตารางที่ 2.2 (White, 1992)

ตารางที่ 2.2 ค่าคงที่ของกรดไฮโปคลอรัสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (^{o}C)	0	5	10	15	20	25	30
Ki x 10^{-8} (moles/liter)	1.488	1.753	2.032	2.320	2.621	2.898	3.175

ที่มา: ดัดแปลงจาก White (1992)

การแตกตัวของกรดไฮโปคลอรัส ขึ้นกับ pH ของสารละลาย และสมดุลระหว่างไฮโปคลอไรท์อิออน (OCl^-) โดยทั่วไปเมื่อกล่าวถึงคลอรีนอิสระ (Free available chlorine) หมายถึงคลอรีนที่อยู่ในรูปแก๊สคลอรีน(Cl_2) กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) และไฮโปคลอไรท์อิออน(OCl^-) เมื่อ pH ของสารละลายน้อยกว่า 4 คลอรีนอิสระจะอยู่ในรูปกรดไฮโปคลอรัส และเมื่อ pH สารละลายอยู่ในช่วง 4-5 คลอรีนอิสระที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจะอยู่ในรูปกรดไฮโปคลอรัส และเมื่อ pH ของสารละลายมากกว่า 5 คลอรีนอิสระจะอยู่ในรูปไฮโปคลอไรท์อิออน

กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของคลอรีน (Microbial inhibition activity) ขึ้นกับปริมาณคลอรีนอิสระในรูปของกรดไฮโปคลอรัสในน้ำที่จะสัมผัสกับเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งกรดไฮโปคลอรัสจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากที่สุดเมื่อ pH ของสารละลายอยู่ที่ 4 – 5 แต่โดยทั่วไปในโรงงานอุตสาหกรรมจะนิยมปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.5 –7.5 (Rushing, 1986) เนื่องจากหากใช้สารละลายที่มีสภาพเป็นกรดมากจะทำให้พื้นที่ผิวของกระบวนการผลิตเกิดการกัดกร่อน โดยเฉพาะอุปกรณ์ที่ทำจากสแตนเลส สำหรับผลของ pH และอุณหภูมิต่อเปอร์เซนต์การแตกตัวของกรดไฮโปคลอรัส แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อเปอร์เซนต์การแตกตัวของกรดไฮโปคลอรัส

pH	HOCl (%)	
	0 ^{o}C (32 ^{o}F)	20^{o}C (68 ^{o}F)
4.0	100	100
5.0	100	99.7
6.0	98.2	96.8
7.0	83.2	75.2
8.0	32.2	23.2
8.5	13.7	8.8
9.0	4.5	2.9
10.0	0.5	0.3

ที่มา : ดัดแปลงจาก Beuchat (2000)

2.3 อันตรายจากคลอรีน

ปัญหานี้มีผู้สนใจและทำการวิจัยออกมาหลายทาง คือ เมื่อปีค.ศ.1974 ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้พบว่าผลของการใช้คลอรีนในน้ำดื่มทำให้เกิดสารที่เรียกว่าTrihalomethane (THM)มากขึ้น (Condie, 1986) ซึ่งเกิดจากคลอรีนทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ (Humic acid) ที่มีในน้ำ ต่อมาองค์การอาหารและยาได้ทำการตรวจสอบ และพบว่าการสร้างสาร THM ทำให้เกิดมะเร็งในหนูตะเภา (Cords และ Dychdala, 1993) Ames (1979) ได้ทำการทดลอง Ames Salmonella/microsome test โดยทดสอบผลของคลอรีนต่อศักยภาพการเกิดมะเร็ง และการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่า โซเดียมไฮโปคลอไรท์ทำให้ *S.* Typhimurium เกิดการกลายพันธุ์ได้ และในปีค.ศ.1976 The National Cancer Institute ได้รายงานว่า คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ซึ่งเป็นผลิตผล

จากการใช้คลอรีนในน้ำเป็นสารที่ชักนำให้เกิดมะเร็งเพิ่มขึ้นในสัตว์ทดลอง 2 ชนิด Kirk และ Mitchell (1980) ได้สรุปว่าสารทั้ง 2 ชนิดสามารถสะสมในร่างกาย ทำให้ลดการเจริญเติบโตและเพิ่มขนาดและน้ำหนักของตับ และสามารถสะสมไปยังลูกอ่อนในสัตว์ทดลองได้ นอกจากนี้การบริโภคสารไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 2,000 ppm เป็นสาเหตุให้น้ำหนักของไตเพิ่มขึ้น (Wei และคณะ,1985) Lykins และ Griese (1986) ได้เสนอว่าสารอินทรีย์ที่ไปรวมตัวกับคลอรีนคือ กรดฮิวมิค (Humic acid) และกรดฟูลวิค (Fulvic acid) ซึ่งทำให้เกิดพวก Chlorinated organic compounds ซึ่งจะเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogens) โดยกระตุ้นการเกิดเซลล์มะเร็ง

Noack และ Doerr (1978), Cunningham (1980) และ Abdel-Rahman (1985) ได้สรุปว่า Humic, Fuvic, Hydroxybenzoic, Citric, p-ketoglutaric, Fumaric , Malic, Pyruvic acids และสารพวก Ketones, Aldehydes เช่น Acetone, Acelacetone, Acetaldehydes, Alcohols ซึ่งใน 2 ชนิดแรกจะมีบทบาทมากที่สุดและทำให้เกิดสารพิษหลายชนิด เช่น THM, Chloroform, Dichloromethane, Bis(2-chlorothyl) ether, Trichloethylene, Tetrachloethylene และอื่นๆ อีกหลายชนิด (Wei และคณะ, 1985) ซึ่งจากการที่คลอรีนสามารถสร้างสารที่มีความเป็นพิษได้ และปัญหาอีกหลายประการ เช่น รวมตัวกับ ฟีนอล (Phenol)ให้สารพวก Chlorophenol ซึ่งทำให้เกิดกลิ่น รส ผิดปกติ และการที่ต้องใช้คลอรีนในปริมาณมาก เพื่อไปทำปฏิกริยากับสารอินทรีย์และแอมโมเนีย เมื่อใช้ในปริมาณมากความเป็นพิษก็จะมีสูงมากขึ้นด้วย

คลอรีนเป็นสารเคมีที่นำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางที่พบกันมากได้แก่ การใช้ฆ่าเชื้อในน้ำประปา น้ำประปาที่ใส่คลอรีนมากเกินไปเมื่อเปิดก๊อกน้ำจะได้กลิ่นฉุนของคลอรีนออกมาพร้อมกับน้ำประปาด้วย

เรื่องของคลอรีนได้ปรากฏเป็นข่าวใหญ่ที่มีผลเป็นอันตรายต่อสุขภาพมาแล้วมากมาย โดยเฉพาะเหตุการณ์ที่เกิดในประเทศสหรัฐอเมริกาในเดือนเมษายน พ.ศ. 2539 เมื่อรถไฟที่บรรทุกคลอรีนเหลวได้เกิดอุบัติเหตุทำให้มีการรั่วของคลอรีนเหลวออกมา และคลอรีนเหลวจะเปลี่ยนสถานะเป็นก๊าซคลอรีน (คลอรีนเหลว1 ลิตร จะเปลี่ยนเป็นก๊าซคลอรีนได้ประมาณ 434 ลิตร) จึงแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวางและรวดเร็ว ทำให้ประชาชนได้รับก๊าซคลอรีนจนมีอาการเจ็บป่วยเป็นจำนวนมากซึ่งก๊าซคลอรีนจะมีอันตรายแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณที่ได้รับดังนี้ (บัญญัติ, 2543) ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ปริมาณก๊าซคลอรีนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ความเข้มข้นของก๊าซคลอรีน (ppm)	อาการที่เป็นอันตราย
0.002	ได้กลิ่นฉุน แต่ยังไม่เป็นอันตราย
1-3	เกิดการระคายเคืองของเยื่อบุต่าง ๆ โดยเฉพาะเยื่อบุจมูกและนัยน์ตา
5-15	น้ำมูก และน้ำตาไหลมาก
30	แน่นหน้าอก ไอ หายใจไม่สะดวก กล่องเสียงบวมทำให้เสียงแหบ
40-60	มีอาการน้ำท่วมปอด ระคายเคืองที่ผิวหนังลักษณะปวดแสบปวดร้อน
400	ทำให้เสียชีวิตภายใน 30 นาที
1,000	เสียชีวิตภายในเวลาไม่กี่นาที

ที่มา : บัญญัติ (2543)

2.4 ประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียของโซเดียมไฮโปคลอไรท์

โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เป็นสารฆ่าเชื้อที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งในกระบวนการผลิตอาหาร และการจัดเตรียมวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาได้รวดเร็วแตกตัวอย่างสมบูรณ์ในน้ำและไม่เกิดสารพิษตกค้างบนผิวที่สัมผัสกับอาหาร จึงช่วยควบคุมโรค pasteurellosis ในวัว และไก่ ลดจำนวนแบคทีเรียบนไข่และเนื้อไก่ การฉีดพ่นสารละลายไฮโปคลอไรท์ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร ลดจำนวนแบคทีเรียบนเนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อกุ้งที่ผ่านการแปรรูป และในผลิตภัณฑ์ประมง (Park และคณะ, 1991)

Odlaug (1981) ได้ทำการรวบรวมประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อชนิดต่าง ๆ ให้ลดลงได้ 90 % ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการยับยั้งเชื้อชนิดต่าง ๆ

ชนิดของเชื้อ	pH	Free available chlorine (ppm)	เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณเชื้อลง 90 % (วินาที)
S. Derby	7.2	12.5	1.5
E. coli	8.5	3	2.7
	7.1	1	30
	7.5	0.6	<6
	7.9	12.5	3.5
Streptococus faecalis	7.5	0.6	11.9
Strep. lactis	8.4	6	3.5
Lactobacillus pantarum	5.0	6	3.4
Pediococcus cerevisiae	8.5	6	7.1
V. parahaemolyticus	7.0	13	15
Pseudomonas aeruginosa	8.0	2	7.5
B. cereus	7.0	5	100

ที่มา : Odlaug (1981)

Cutter และ Siragusa (1995) ได้ศึกษาการลดการปนเปื้อนของ *E. coli* และ *E. coli* O157 : H7 บนผิวเนื้อวัว โดยการพ่นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นคลอรีน 50 100 250 500 และ 800 ppm เก็บรักษาเนื้อวัวที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การฉีดพ่นด้วยน้ำช่วยลดจำนวนแบคทีเรียลงต่ำกว่า 0.60 $\log_{10}$ CFU/cm^2 แต่การฉีดพ่นด้วยสารละลาย ไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นคลอรีน 500 และ 800 สามารถลดปริมาณ *E. coli* ลงถึง 1.22 และ 1.28 $\log_{10}$ CFU/cm^2 ตามลำดับ การใช้คลอรีนที่ความเข้มข้น 800 ppm ลดปริมาณ *E. coli* O157 : H7 ลงได้ 1.04 $\log_{10}$ CFU/cm^2 สรุปได้ว่าการฉีดพ่นด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แม้ช่วยในการลดจำนวนของ *E. coli* ลง แต่ไม่เพียงพอที่จะลดการเกาะติดที่พื้นที่ผิวได้อย่างสมบูรณ์

Tamblyn และ Conner (1997) ทดสอบผลของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 20 400 และ 800 ppm ต่อการทำลาย Salmonellae ที่ผิวไก่โดยทำการแช่เย็นเนื้อไก่ที่ 0°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาลวกที่ 50°C เป็นเวลา 2 นาที และจุ่มในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 23°Cเป็น

เวลา 15 วินาที พบว่า จำนวนของ *S.* Typhimurium ลดลง โดยเมื่อใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆในปริมาณ 20 ppm สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้น้อย แต่ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ สูงขึ้น ประสิทธิภาพในการลดจำนวนแบคทีเรียก็เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ร่วมกับกระบวนการแช่เย็น

นอกจากนี้มีการนำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์มาใช้ในการล้างและลดการปนเปื้อนในผักสด และผลไม้ ในประเทศญี่ปุ่นนิยมใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อรา (Park และคณะ, 1991) ต่อมา Suzuki และคณะ (1996) ได้ทดลองเปรียบเทียบการใช้ Acidified sodium hypochorite solution กับ Electrically acidified water เพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *B. subtilis* พบว่าสารละลายทั้งสองให้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน

Piemas และ Guiraud (1997) ทดลองใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1,000 ppm เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ในขณะที่เมล็ดข้าวกำลังงอก ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ลงได้ 2-3 $\log_{10}$ CFU/g และถ้าต้องการให้ปริมาณแบคทีเรียลดลงมากขึ้น (>5 $\log_{10}$ CFU/g) ควรจุ่มเมล็ดข้าวลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C

Beuchat (1997) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 2,000 ng/ml ต่อการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) และ Salmonellae จำนวน 5 สายพันธุ์ บนเมล็ด Alfalfa sprout พบว่า เมื่อนำเมล็ดจุ่มสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีคลอรีนอิสระ 2,000 ng/ml เป็นเวลา 10 นาที สามารถลด Salmonella ลงมากกว่า 1,000 เท่า

Ubldi-Erioa และ Porto (1995) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีนกับใบผักกาดหอม แต่ทดสอบกับแบคทีเรียชนิด *V. cholerae* (10^6 CFU/ml) โดยนำผักกาดหอมที่ปนเปื้อน ทิ้งข้ามคืนในตู้เย็นและเก็บตัวอย่าง 25 กรัม จุ่มลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์นาน 15 นาที ตัวอย่างที่จุ่มลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีคลอรีนอิสระ 200 ppm นาน 15 และ 30 นาที พบว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *V. cholerae* ได้ดี

Adams และคณะ (1989) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของขั้นตอนการล้างในกระบวนการเตรียมผักสลัด พบว่าการเติมคลอรีนที่มีปริมาณคลอรีนอิสระ 100 ppm ที่ pH 9 สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ได้ 98 % เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำประปาจะสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ได้ 93%

Zhang และ Farber (1996) ได้ศึกษาการลดจำนวน *Listeria monocytogenes* ในผักกาดหอมและกะหล่ำปลีหั่นฝอย โดยล้างด้วยสารละลายคลอรีน 200 ppm เป็นเวลา 10 นาที ทำให้สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ในผักกาดหอมได้มากที่สุดถึง 1.3 –1.7 $\log_{10}$ CFU/g และในกะหล่ำปลีหั่นฝอยได้ 0.9 -1.2 $\log_{10}$ CFU/g

Escudero และคณะ (1999) ได้ทดลองล้างผักกาดหอมโดยเติมคลอรีนในน้ำที่ใช้ล้างพบว่า คลอรีน 100 ppm สามารถลดจำนวน *Yersinia enterocolitica* สายพันธุ์ A ได้ 2.7 $\log_{10}$ CFU/g และสายพันธุ์ B ได้ 2.4 $\log_{10}$ CFU/g หลังจากล้างเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 22°C ขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของคลอรีนเป็น 300 ppm ล้างผักที่อุณหภูมิ 4°C สามารถลดสายพันธุ์ A ได้ 3.2 $\log_{10}$ CFU/g และสายพันธุ์ B ได้ 2.6 $\log_{10}$ CFU/g

Torriani และ Massa (1994) พบว่าการล้างแครอทด้วยน้ำที่เติมคลอรีนที่ปริมาณคลอรีนอิสระ 20 ppm เป็นเวลา 20 นาที ช่วยลดจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรียได้ แต่ไม่มีผลต่อการลดจำนวน Total bacteria

Albrecht และคณะ (1995) ได้สำรวจและตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ในผักชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ผักกาดหอม มะเขือเทศ บรอคเคอรี และกะหล่ำดอก ที่จำหน่ายในสลัดบาร์ จากการเปรียบเทียบการล้างบรอคเคอรีที่ปนเปื้อน *E. coli* ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อกับสารละลายคลอรีนที่ความเข้มข้น 50 ppm เป็นเวลา 2 นาที พบว่า สามารถลดจำนวนโคลิฟอร์มได้ 10 เท่า ของน้ำกลั่น แต่จำนวน Total bacteria ลดลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ Garg และคณะ (1990) ได้ทดลองล้างผักกาดหอมชนิดหั่นฝอยและใบในน้ำคลอรีนความเข้มข้น 200-250 ppm พบว่าสามารถลด Total bacteria ได้ประมาณ 1-2 $\log_{10}$ CFU/g

2.5 กลไกการทำลายจุลินทรีย์ของคลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน

ทฤษฎีที่อธิบายกลไกของคลอรีนในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์มีหลายทฤษฎี แต่ยังไม่มีทฤษฎีใดสามารถอธิบายได้อย่างสมบูรณ์ กลไกการทำลายจุลินทรีย์โดยคลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีนนี้อาจยังไม่เป็นที่แน่ชัด จากทฤษฎีต่างๆ ระบุว่ากรดไฮโปคลอรัสเข้าไปมีผลกระทบต่อเซลล์ใน 3 ตำแหน่ง (บุษกร, 2536 ; Wei และคณะ, 1985) ประกอบด้วย

2.5.1 ส่วนห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์

ส่วนห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ ได้แก่ ผนังเซลล์ (Cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) และเยื่อหุ้มสปอร์ (Spore coat)

Bryan และคณะ (1979) เสนอว่า คลอรีนจะมีผลต่อการทำลายผนังเซลล์ หรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แบ่งตัวผิดปรกติ ในขณะที่ Baker (1926) ได้สรุปว่าคลอรีนสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่อยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ สร้างสารประกอบไนโตรคลอโร (N-chloro compounds) ซึ่งรบกวนเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้สมบัติการควบคุมการผ่านเข้าออกของเซลล์สูญเสียไปไม่สามารถรับสารอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน หรือสารอาหารที่จำเป็นในการ

ดำรงชีวิตเข้าสู่เซลล์ได้ ทำให้เซลล์ขาดสารอาหารการเจริญของจุลินทรีย์หยุดชะงักและตายในที่สุด ส่วน Rudolph และ Leavine (1941) กล่าวว่าคลอรีนมีความสามารถซึมเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อสร้างสารพิษในโปรโตพลาสม ได้แก่ สารประกอบไนโตรคอลโร (N-chloro compounds) Kirk และ Michell (1980) เสนอว่า คลอรีนทำให้คุณสมบัติการควบคุมการผ่านเข้าออก (Permeability) ของเซลล์สูญเสียไป เช่นเดียวกับ Cheremisinoff และคณะ (1981) เสนอว่าจะทำให้ผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ ไม่สามารถป้องกันการผ่านเข้าออกของสารได้ ทำให้กรดไฮโปคลอรัสซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ และทำปฏิกิริยากับส่วนอื่น ๆของเซลล์ได้ Cords และ Dychdala (1993) กล่าวว่า คลอรีนมีผลต่อสปอร์ โดยคลอรีนจะทำลายเยื่อหุ้มสปอร์ (Spore coat) ทำให้สปอร์ถูกทำลายได้ง่ายขึ้น คลอรีนยังรบกวนคุณสมบัติการผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มสปอร์ เกิดการสูญเสียของแคลเซียมอิออน กรดดิพิโคโลนิก (Dipicolonic acid) และสารพันธุกรรม ได้แก่ RNAและ DNA ส่วน Wyatt และ Waites (1975) รายงานว่าคลอรีนมีผลต่อกลไกการงอกของสปอร์ทำให้อัตราการงอกของสปอร์ลดลง คลอรีนอาจมีผลต่อรูปร่างลักษณะ (Morphological) ของจุลินทรีย์ เนื่องจากคลอรีนเกิดปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิค (Campers และ McFeters, 1979) และสารพิวรีน ไพริมิดีน เกิดการขัดขวางการใช้ออกซิเจน ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีน และทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของโปรตีน

2.5.2 ส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ หรือโปรโตพลาสม(protoplasm) และเอนไซม์

คลอรีนจะไปทำปฏิกริยาออกซิเดชั่น (Oxidation) กับโปรโตพลาสมของเซลล์ เป็นเหตุให้โปรตีนของเซลล์ตกตะกอน และทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นซัลไฮดริล (Sulfhydryl radical) ของโปรตีน เกิดผลิตภัณฑ์แบบที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (Irreversible product) จึงรบกวนการทำงานของเซลล์ (Bryan และคณะ, 1979) ในส่วนที่เป็นเอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ Bryan และคณะ (1979) ยังรายงานว่า ระบบการทำงานของเอนไซม์ชนิดที่จำเป็นต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ถูกรบกวนทำให้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ และคลอรีนยังสามารถทำลายเอนไซม์ได้โดยตรง คลอรีนจะไปทำลายทั้งเอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน จึงถูกคลอรีนเข้าไปเปลี่ยนโครงสร้าง อาจทำให้การรวมตัว (Coagulate) ของโปรตีนทำให้ระบบการทำงานเสียไป มีเอนไซม์หลายชนิดที่ถูกทำลายด้วยคลอรีน ได้แก่ Triosephosphate dehydrogenases, Glucose oxidase, d-amino acid oxidase transaminase, Succinic oxidase เป็นต้น (The American Water Works Association Inc., 1971; Cheremisinoff และคณะ, 1981) เอนไซม์ที่ไวต่อการทำลายของคลอรีนส่วนมากเป็นเอนไซม์ในกลุ่มซัลไฮดริล ส่วนเอนไซม์ที่ไม่ใช่กลุ่มนี้ เช่น คะตะเลส (Catalase) คลอรีนจะยับยั้งเอนไซม์โดยจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ซัลไฮดริล (Sulhydryl group) ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับ ป้องกันการเกิดใหม่ของเอนไซม์ และยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการเผาผลาญกลูโคสของเซลล์ ทำให้เซลล์ขาด

พลังงานที่จะนำไปใช้ในการดำรงชีวิต Green และ Stumof (1946) อ้างว่า แม้ว่าปริมาณคลอรีนต่ำมากก็มีผลในการฆ่าจุลินทรีย์ จึงให้สมมุติฐานว่า คลอรีนเป็นตัวยับยั้งระบบการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ และพบว่าอัตราการยับยั้งปฏิกิริยากลูโคสออกซิเดชันในเซลล์มีผลเกี่ยวข้องกับอัตราการถูกทำลายของเซลล์แบคทีเรียด้วย

2.5.3 ส่วนของสารพันธุกรรมของเซลล์

ส่วนของสารพันธุกรรมของเซลล์ สามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ DNA ในส่วนเบสพิวรีน และไพริมิดีน ทำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) (Cords และ Dychdala, 1993) นอกจากนี้คลอรีนทำให้ DNA เกิดบาดแผล (Lesions) สูญเสียความสามารถในการ transforming ของ DNA ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งนอกจากนี้คลอรีนยังทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม (Chromosomal aberrations) (Marriott, 1999)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายจุลินทรีย์ของคลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน

2.6.1 ความเข้มข้น (Concentration)

เมื่อความเข้มข้นของคลอรีนอิสระเพิ่มขึ้นจะมีผลให้ประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย แต่หากปริมาณสารประกอบไฮโปคลอไรท์มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะมีผลทำให้ pH ของน้ำสูงตามและทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลง เช่น สารประกอบไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 1000 ppm ทำให้ pH ของน้ำสูงขึ้นเป็น 11-12 ต้องใช้เวลาฆ่าเชื้อนานถึง 3 เท่าของความเข้มข้น 25 ppm ที่ให้ pH เพียง 8-9 เท่านั้น (กรมประมง, 2547) Caldwell (1990) สรุปว่าการใช้คลอรีนที่ความเข้มข้นระดับต่ำ 0.5-5 ppm มีผลยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์ม (Biofilm) และการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นอยู่ที่ 50 ppm หรือสูงกว่า จะลดการเกิดไบโอฟิล์ม เนื่องจากกระบวนการที่เรียกว่า “ Biocidal action” Lopes (1986) พบว่า การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มี Available chlorine 100 ppm มีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *L. monocytogenes* และ *S.* Typhimurium ได้ถึง 99.99 % ภายในเวลา 30 วินาที ส่วน Gardner และ Peel (1991) ค้านว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมาถึงระดับหนึ่ง พบว่าประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้สารละลายคลอรีน 1,000 ppm (pH 9.0) ทั้งนี้เนื่องจากมีปัจจัยอื่นเกี่ยวข้อง ได้แก่ pH ของสารละลาย เป็นต้น

2.6.2 พีเอช (pH)

โซเดียมไฮโปคลอไรท์มักถูกนำมาใช้ในช่วง pH 7-9 สาเหตุเนื่องจากช่วง pH 4-5 มีความคงตัวน้อย (Macreae และคณะ, 1993) คลอรีน และสารประกอบคลอรีนจะมีประสิทธิภาพลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อ pH สูงกว่า 10 (กรมประมง, 2547) ทั้งนี้ Cords และ Dychdala (1993) พบว่าที่ pH 5.2 และ 8.5 มีผลอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพของสารไฮโปคลอไรท์ในการยับยั้ง *Strep. lactis, P. cerevisiae* และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่ง Roudolph และ Leavine (1941) รายงานก่อนว่าในสภาพด่างที่ pH 10 ต้องใช้เวลาถึง 121 นาที จึงจะมีประสิทธิภาพในการทำลาย *B. metiens* เท่ากับปริมาณคลอรีนที่ใช้ในระดับ pH 6 ซึ่งใช้เวลาเพียง 2.5 นาทีนั้น นอกจากนี้ยังพบว่าสารไฮโปคลอไรท์ที่ผลิตในการค้าโดยทั่วไป เมื่อเตรียมอยู่ในรูปสารละลายจะให้ pH ที่ค่อนไปทางด่าง ประสิทธิภาพการเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial) ของคลอรีนจะไม่ดีภายใต้สภาวะด่าง แต่ความคงตัวของสารละลายจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ต่อมา Benarde และคณะ (1965) พบว่ากรดไฮโปคลอรัสและคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 0.75 ppm pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพในการทำลาย Faecal *E. coli* เท่ากันกับที่ไม่มีสารอินทรีย์ แต่เมื่อเพิ่ม pH เป็น 8.5 จะเป็นตัวกำหนดการเกิดไอออนไนเซชั่น (Ionization) ของกรดไฮโปคลอรัสเปลี่ยนไปเป็นไฮโปคลอไรท์อิออนซึ่งมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียน้อยกว่า ดังนั้นที่ pH 6.5 คลอรีนจะอยู่ในรูปกรดไฮโปคลอรัสซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเปลี่ยน pH เป็น 8.5 คลอรีนจะอยู่ในรูปไฮโปคลอไรท์ไอออนที่ความเข้มข้นเท่ากัน แต่ต้องใช้เวลาในการสัมผัสนานกว่าถึงมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เท่ากัน ส่วนคลอรีนไดออกไซด์จะไม่ถูกไอออนไนซ์ทำให้มีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียคงที่ในช่วง pHที่กว้างกว่า สุมณฑา (2545) กล่าวว่าช่วง pH ระหว่าง 4-5 เป็นช่วงที่สารประกอบคลอรีนออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อสูงที่สุด เพราะคลอรีนอิสระอยู่ในรูปของกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ที่ไม่แตกตัว และพบว่าการใช้คลอรีนในช่วง pH ดังกล่าวจะก่อให้เกิดการกัดกร่อนโลหะสูง และก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังของผู้ใช้

2.6.3 อุณหภูมิ (Temperature)

คลอรีนและสารประกอบคลอรีนจะให้ประสิทธิภาพในการทำลายและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิเหมาะสม คือ ในช่วง 21-38 องศาเซลเซียส (กรมประมง, 2547) อุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพของสารประกอบคลอรีนในการทำลายจุลินทรีย์ กล่าวคือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการแพร่ (Diffusion) ของสารฆ่าเชื้อแพร่ไปยังเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มขึ้น (Anonymous, 1987) Ito และ Seeger (1980) กล่าวว่า ประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียของคลอรีน และสารประกอบคลอรีนจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น Trueman (1971) ได้ทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพในการเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ของคลอรีน พบว่า ที่ความเข้มข้นของคลอรีนสูง ๆ

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อุณหภูมิไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของคลอรีนชัดเจนนัก แต่อุณหภูมิมีผลอย่างยิ่งเมื่อความเข้มข้นของคลอรีนต่ำๆ โดยเฉพาะประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ Johns (1954) พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารไฮโปคลอไรท์ 10 ppm ที่อุณหภูมิ 5 20 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่พบความแตกต่างของอัตราการทำลาย *Micrococcus pyogenes var.aureus, E. coli* และ *Ps. aeruginosa*

2.6.4 ปริมาณสารอินทรีย์

สารอินทรีย์โดยเฉพาะโปรตีนทำให้คลอรีนสูญเสียไปอย่างรวดเร็ว (Kotula และคณะ 1997) เนื่องจากปฏิกิริยาคลอรีนเนชั่นและออกซิเดชันระหว่างหมู่อะมิโนกับคลอรีนที่เกิดขึ้น (Butterfield และคณะ, 1943) ทำให้ปริมาณคลอรีนอิสระที่มีผลในการทำลายจุลินทรีย์ลดลงด้วย (Borick, 1968) Ito และ Seeger (1980) กล่าวว่าอาหารที่มีสารอินทรีย์เจือปนอยู่สูงจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อสูงขึ้นด้วยเพื่อเป็นการชดเชยส่วนที่ต้องทำปฏิกริยากับสารอินทรีย์ Hekmati และ Bradley (1979) รายงานว่า เมื่อทำการเติม Skim milk 0.1-1.0 % ลงไปผสมกับสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์มีผลลดประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรีย *Staph. aureus* และ *E. coli*

2.6.5 ชนิดของจุลินทรีย์ และจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีสมบัติการต้านทานต่อการทำลายของสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางกายภาพแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น *Staph. aureus* มีความต้านทานสูงกว่าเมื่อเทียบกับ Pseudomonas และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ หรือยีสต์ ในขณะที่แบคทีเรียชนิดแอซิดฟาสท์ (Acid fast) ทนต่อคลอรีนได้ดีกว่ายีสต์ และยังพบว่า *E. coli* และ *Strep. lactis* ทนต่อการทำลายโดยสารฆ่าเชื้อน้อยกว่า *P. cerevisiae* และ *Sac. cerevisiae* เมื่อทดสอบในสารละลายไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 6 ppm ที่เวลา 15 วินาที (Cords และ Dychchasa, 1993) Hays และคณะ (1967) และ Ito และ Seeger (1980) พบว่า สปอร์ของเชื้อรา มีความต้านทานต่อคลอรีนสูงกว่าเซลล์ของแบคทีเรียเล็กน้อยเป็นเพราะผนังที่หุ้มสปอร์ของเชื้อราแทรกซึมได้ยากกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรีย Ito และ Seeger (1980) และ Odlaug (1981) ศึกษาความต้านทานคลอรีนระหว่างแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้กับไม่สร้างสปอร์ สรุปได้ว่าสปอร์ของแบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานคลอรีนได้มากกว่าเซลล์ของแบคทีเรีย (Vegetative cell) Bolton และคณะ (1988) พบว่า *Staph. aureus* สายพันธ์ที่แยกได้จาก Biofilm และจากตัวอย่างที่เก็บได้จากเครื่องมือที่ใช้แปรรูป มีความต้านทานคลอรีนได้สูงกว่าสายพันธ์ที่เก็บได้จากผิวหนังของสัตว์ปีกเกือบ 8 เท่า อาจเป็นผลมาจากความสามารถในการสร้าง Macroclump จาก Extracellular slime ระดับความไวของจุลินทรีย์ต่อการทำลายของคลอรีน และสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน สรุปได้ดังตารางที่ 2.6 (Gardner และ Peel, 1991) กัลยาณี (2540) สรุปว่าอัตราการทำลาย

74537

โดยคลอรีนมีค่าต่ำเมื่อมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหารปริมาณสูง หากจุลินทรีย์เริ่มต้นในอาหารมีปริมาณต่ำอัตราการทำลายเซลล์โดยสารฆ่าเชื้อจะเร็วขึ้น

ตารางที่ 2.6 ระดับความไวของจุลินทรีย์ต่อการทำลายของคลอรีนและสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน

ชนิดของจุลินทรีย์	ความไวต่อสารคลอรีน
แบคทีเรียแกรมบวก	มาก
แบคทีเรียแกรมลบ	มาก
แอซิด-ฟาสต์แบคทีเรีย	ปานกลาง
สปอร์แบคทีเรีย	พอใช้
ไวรัส	พอใช้ (ที่ความเข้มข้นสูง)
อะมีบา	พอใช้
เชื้อรา	ปานกลาง
ไฟรอน	ปานกลาง (ที่ความเข้มข้นสูง)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Gardner และ Peel (1991)

2.6.6 ระยะเวลาที่สัมผัส (Exposure time)

เมื่อคลอรีนสัมผัสกับเซลล์จุลินทรีย์ เซลล์จะถูกทำลายมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคลอรีน และระยะเวลาที่ให้คลอรีนสัมผัสเซลล์ บุษกร (2536) ได้ทดลองใช้สารละลาย ClO_2 ที่ความเข้มข้น 10 ppm ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 5 10 15 และ 30 นาที ในการล้างกุ้งที่ปนเปื้อนด้วย *S.* Typhimurium พบเปอร์เซนต์ของการอยู่รอดของเชื้อ *S.* Typhimurium เท่ากับ 82.6 77.2 66.3 42.4 และ 34.8 ตามลำดับ ซึ่งสรุปได้ว่าเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นจุลินทรีย์จะถูกทำลายได้มากขึ้นด้วย

2.6.7 ชนิดของสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีน

สารประกอบคลอรีนที่ใช้ในปัจจุบัน คือ ก๊าซคลอรีน(Cl_2) แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) โดยคลอรีนแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการลดหรือทำลายจุลินทรีย์แตกต่างกัน ข้อมูลเกี่ยวกับสารประกอบคลอรีน

ประเภทสารอินทรีย์ที่แตกตัวให้คลอรีนอิสระ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไฮโปคลอไรท์ที่ทำลาย *S.* Typhi สรุปได้ว่าชนิดของตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์เป็นตัวจำกัดในการเป็นสารฆ่าเชื้อของคลอรีน (Cords และ Dychdala, 1993) คลอรีนที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร จะอยู่ในรูปของคลอรีนอิสระ (Free available chlorine) มักใช้กับคลอรีนที่ละลายในน้ำ ซึ่งอยู่ในรูปต่อไปนี้ ธาตุคลอรีน (Cl_2) กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) และไฮโปคลอไรท์อิออน (OCl^-) เมื่อเปรียบเทียบสมบัติในการฆ่าเชื้อระหว่างคลอรีนทั้ง 3 รูป ปรากฏว่า HOCl มีสมบัติในการฆ่าเชื้อ (Bactericidal) ดีที่สุด ส่วนคลอรีนอีก 2 รูป มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากกว่าที่จะฆ่าจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) (สุมณฑา, 2545)

2.6.8 ความกระด้างของน้ำ

ความกระด้างของน้ำมีผลทำให้ pH ของสารละลายเปลี่ยนแปลง กล่าวคือทำให้ pH ของน้ำเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงเป็นผลทางอ้อมโดยไปลดประสิทธิภาพของคลอรีนลง ซึ่งความกระด้างของน้ำไม่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของคลอรีนโดยตรง (Hays และคณะ, 1967; Mosley และคณะ, 1976)

2.7 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพและมาตรฐานทางผลิตภัณฑ์ประมง

รัตนา (2535) ได้รวบรวมไว้ดังนี้ แบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นดัชนีในเรื่องความสะอาด ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มซึ่งเป็นดัชนีเพื่อบ่งบอกถึงความสะอาดของวัตถุดิบ อุปกรณ์ที่ใช้ การผลิตที่ถูกสุขลักษณะ และการเก็บรักษาที่ถูกต้อง แบคทีเรียจำพวกโคลิฟอร์มมี 4 สกุล คือ *Escherichia , Klebsiella, Citrobacter* และ *Enterobacter* และแบคทีเรียที่เป็นโทษในผลิตภัณฑ์ประมง ได้แก่ *Staph. aureus* , Salmonella, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

อาหารทะเลเยือกแข็งเมื่อตรวจวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยา จะพบแบคทีเรียในปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่อาจตรวจพบมี 4 ประเภท

1.Psychophillic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำได้แก่ *Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium*

2. Mesophillic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง มักปนมากับวัตถุดิบ ภาชนะบรรจุ และขณะทำการผลิต ได้แก่ *Bacillus, Clostridium*

3. Sanitary index แบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้เป็นดัชนีของการผลิตอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เกิดการปนเปื้อนระหว่างกรรมวิธีการผลิต ได้แก่ *Fecal coliform, E. coli* และ *Staph. Aure*

4. Pathogenic Bacteria เป็นแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Salmonella* , *V. cholerae, V. parahaemolyticus, Staph. aureus* และ *C. botulinum* type E

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ปลาหมึกกระดองสด สายพันธุ์ *Sepia pharaonis* โดยเตรียมเป็น 3 ลักษณะ

1. ปลาหมึกกระดองแล่หั่นเต๋า (Cuttlefish dice cut)
2. ปลาหมึกกระดองแล่กรีด (Cuttlefish fillet slit)
3. ปลาหมึกกระดองแล่ (Cuttlefish fillet)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

1. เชื้อแบคทีเรียรวม (Total bacteria) จากวัตถุดิบปลาหมึก
2. เชื้อ *Escherichia coli* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
3. เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.2 เครื่องมือ สารเคมี และวิธีการวิเคราะห์

3.2.1 เครื่องมือ

- เครื่องตีป่นตัวอย่าง (Stomacher) (Seward 3715, England)
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) (Binder 02-38813, Germany)
-หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Rexell 98207, Taiwan)
- Vortex Genie 2 (1SCI G560E, China)
- เครื่องอบลมร้อน (Hot Air Oven) (Heraeus kelvitron, Germany)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก (Balance) (Sartorius BP 3105)
- เครื่องนับโคโลนี (Colony counter) (Funke Gerber, Germany)
- pH meter (Inolab pH level 1, Germany)
- Thermometer (Testo)
-อุปกรณ์ตรวจวัดคลอรีน ชนิดเทียบสี ได้แก่ เครื่องวัด Lovibond และ กระดาษวัดคลอรีน 10-50 ppm, 25-200 ppm (ADVANTEC Toyo Roshi Kaisha,Ltd. Japan)
-ชุดทดสอบไฮโปคลอไรท์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
- เครื่องแก้ว

3.2.2 สารเคมี

-Buffer peptone water (Merck)

-Plate count agar (PCA) (Merck)

-Trypicase Soy Agar (TSA) (Merck)

-Lauryl sulfate tryptose broth (LST) (Oxoid)

-Trypicase Soy Broth (TSB) (Merck)

-Eosin methylene blue agar (EMB) (Merck)

-Alkaline peptone water (Oxoid)

-Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS) (Merck)

- Sodium chloride (Merck)

-สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ห้างหุ้นส่วนจำกัด พรภพ เคมีภัณฑ์แอนด์ซัพพลาย ประเทศไทย)

3.3 สถานที่ทำการทดลอง

3.3.1 บริษัทแม่กลองฟู้ดส์ จำกัด จ. สมุทรสงคราม

3.3.2 โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 สำรวจข้อมูลกลุ่มของแบคทีเรียที่มีอยู่ในวัตถุดิบปลาหมึกกระดอง

3.4.1.1 สุ่มตัวอย่างวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าโรงงาน ควบคุมอุณหภูมิในการรับไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส มาทำการตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) โดยวิธี Pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ตรวจหา *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี MPN เก็บตัวอย่างเดือนละ 2 ครั้ง เป็นระยะเวลา 12 เดือน เพื่อประเมินความเสี่ยงของวัตถุดิบ

3.4.1.2 นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าโรงงานมาทำการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA agar ทำการศึกษาคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) โดยดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ และการย้อมติดสี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.2 การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์

ทำการเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) ที่แยกจากปลาหมึกกระดอง เชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *V. parahaemolyticus* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยทำการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) ที่ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml สารละลายเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml และ สารละลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml ดังแสดงในภาคผนวก ก เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.3 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณแบคทีเรียในหลอดทดลอง

ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD โดยศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และศึกษาผลของระยะเวลาการสัมผัสของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ดำเนินการทดลองดังนี้

3.4.3.1 ผลของอุณหภูมิ และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 2 10 50 100 และ 200 ppm แล้วทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ โดยที่ระดับความเข้มข้น 2 ppm ใช้อุปกรณ์ Lovibond ในการวัดปริมาณไฮโปคลอไรท์ และที่ระดับความเข้มข้น10 50 100 และ 200 ppm ใช้กระดาษวัดปริมาณไฮโปคลอไรท์ ดังแสดงในภาคผนวก ค จากนั้นทำการวัดค่า pH ของสารละลายในแต่ละความเข้มข้น และทำการปรับอุณหภูมิของสารละลายแต่ละความเข้มข้นให้ได้ 0 10 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งนี้ขั้นตอนการปฏิบัติแสดงใน ภาพที่ 3.1 ก ข ค ง จ

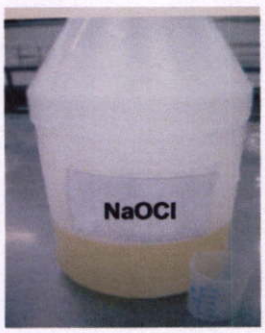
3.4.3.1.1 นำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.2 ใส่ Flask ปริมาตร 90 ml

3.4.3.1.2 ปิเปตสารละลายเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.2 โดยปิเปตสารละลายเชื้อแต่ละชนิดปริมาตรเท่ากับ 10 ml ใส่ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.3.1.1 และทำการควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 0 10 และ 25 องศาเซลเซียส

3.4.3.2 ผลของระยะเวลาการสัมผัสของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย

ทำการปีเปตสารละลายเชื้อ ใส่ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ดังวิธีการในข้อ 3.4.3.1.2 เขย่าให้เชื้อสัมผัสกับสารละลาย เป็นระยะเวลา 5 10 15 20 30 45 และ 60 วินาที จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่าง ตามระยะเวลา 5 10 15 20 30 45 และ 60 วินาที ไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต ดังวิธีการที่แสดงในภาคผนวก ข.

(ก)



(ข)

(ค)

(ง)

(จ)

ภาพที่ 3.1 : การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

(ก) เตรียมน้ำใส่ภาชนะ

(ข) เติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ลงในถังน้ำที่เตรียมไว้

(ค) ตรวจสอบปริมาณไฮโปคลอไรท์ โดยใช้เครื่องวัด Lovibond

(ง) ตรวจสอบปริมาณไฮโปคลอไรท์ โดยใช้กระดาษวัดไฮโปคลอไรท์

(จ) ตรวจวัดอุณหภูมิของน้ำ

3.4.4 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึก

ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเนื้อปลาหมึก โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิของสารละลาย 10 องศาเซลเซียส ผลของระยะเวลาในการล้างปลาหมึกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ทำการวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และผลตกค้างของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในเนื้อปลาหมึกหลังทำการล้าง ดำเนินการทดลองดังนี้

3.4.4.1 เตรียมตัวอย่างปลาหมึกกระดอง โดยปลาหมึกที่ใช้ในการทดลองมี 3 ลักษณะ ดังนี้

- เนื้อปลาหมึกกระดองแล่หั่นเต๋า (Cuttlefish fillet dice cut) คือ นำปลาหมึกกระดองแล่มาตัดด้วยเครื่องตัด ให้มีขนาดของชิ้น 1- 1.5 เซนติเมตร
- เนื้อปลาหมึกกระดองแล่กรีด (Cuttlefish fillet slit) คือ นำปลาหมึกกระดองแล่มาผ่านเครื่องกรีด ให้มีขนาดของรอยกรีด 0.3 - 0.5 เซนติเมตร
- เนื้อปลาหมึกกระดองแล่ (Cuttlefish fillet) คือ การนำปลาหมึกกระดองตัวดำมาทำการกรีดบริเวณกระดอง แล้วทำการลอกหนัง ล้างทำความสะอาด ตัดแต่งส่วนที่ไม่สะอาดออก ลักษณะของปลาหมึกแต่ละลักษณะ ดังแสดงในภาพที่ 3.2

(ก) (ข) (ค)

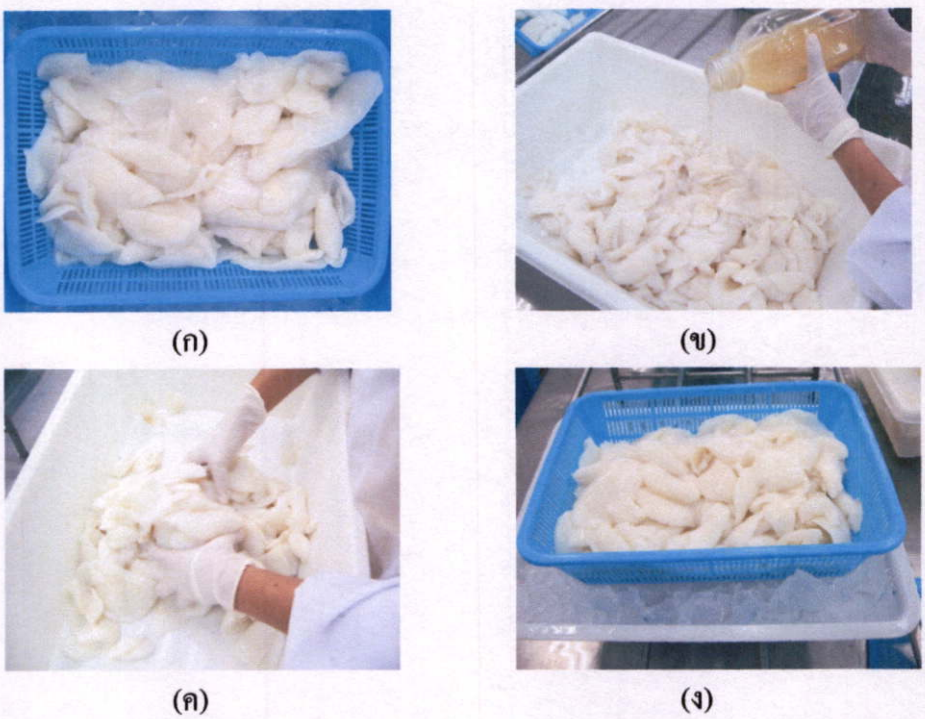
ภาพที่ 3.2 : ลักษณะปลาหมึกกระดอง: (ก) ปลาหมึกกระดองแล่หั่นเต๋า (Cuttlefish dice cut); (ข) ปลาหมึกกระดองแล่กรีด (Cuttlefish fillet slit); (ค) ปลาหมึกกระดองแล่ (Cuttlefish fillet)

ปลาหมึกกระดองที่ใช้ในการทดลองเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายซึ่งผ่านการลดปริมาณจุลินทรีย์มาแล้วระดับหนึ่ง จากนั้นนำมาละลาย และทำการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 50 ppm 2 ครั้ง แล้วล้างตามด้วยน้ำสะอาด อีก 3 ครั้งเพื่อลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตออกอีกครั้ง ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต และตรวจหาการตกค้างของไฮโปคลอไรท์ก่อนทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างปลาหมึก

3.4.4.2 ทำการเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วยเชื้อ

แบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) ที่แยกจากปลาหมึกกระดอง เชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *V. parahaemolyticus* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยทำการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) ที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml สารละลายเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 10^4 CFU/ml และ สารละลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้น 10^4 CFU/ml ดังแสดงในภาคผนวก ก เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.4.3 ทำการถ่ายสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.2 ลงในตัวอย่างปลาหมึกแต่ละลักษณะที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.1 จำนวนครั้งละ 5 กิโลกรัม ใส่ภาชนะที่สะอาด จากนั้นทำการคลุกเคล้าตัวอย่างปลาหมึกกับเชื้อจุลินทรีย์ให้ทั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที สะเด็ดน้ำ และควบคุมอุณหภูมิตัวอย่างที่ถ่ายเชื้อแล้วไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอนการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างปลาหมึกดังแสดงในภาพที่ 3.3 ก ถึง ง



(ก) (ข)

(ค) (ง)

ภาพที่ 3.3 : การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างปลาหมึก

(ก) ตัวอย่างปลาหมึกหลังล้างในข้อ 3.4.4.1

(ข) เติมเชื้อจุลินทรีย์

(ค) คลุกเคล้าให้เชื้อจุลินทรีย์สัมผัสกับเนื้อปลาหมึก

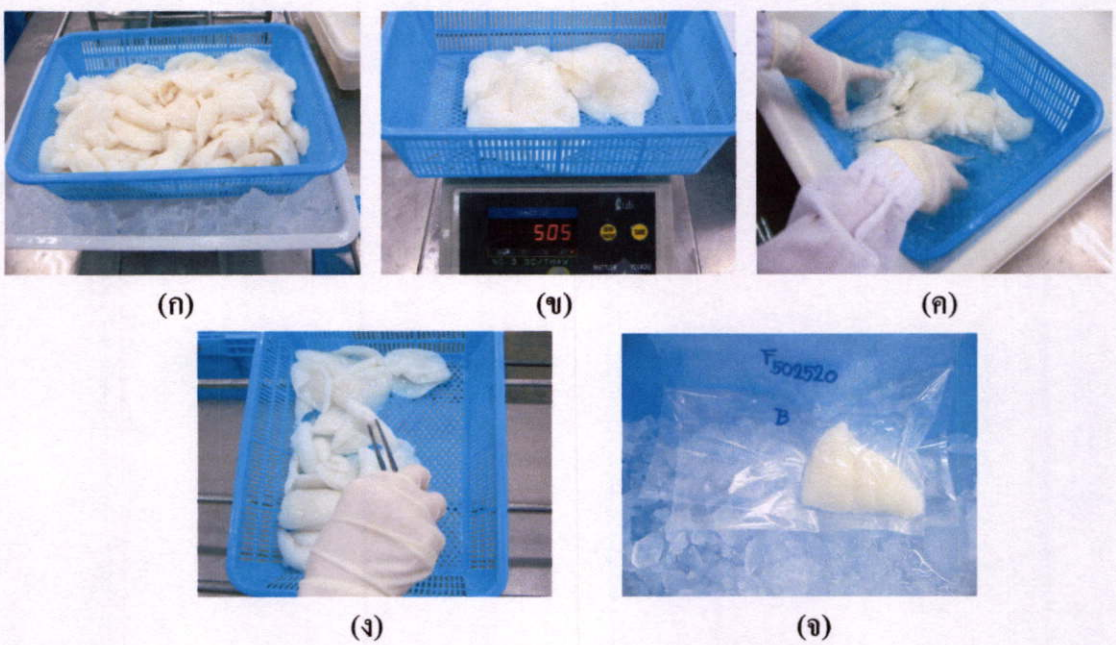
(ง) ตัวอย่างปลาหมึกปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

3.4.4.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการล้างปลาหมึก 3 ลักษณะ เพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด

ทำการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 10 25 50 75 และ 100 ppm ดังแสดงในภาคผนวก ค ที่อุณหภูมิของสารละลาย 10 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ โดยที่ระดับความเข้มข้น 2 ppm ใช้อุปกรณ์ Lovibond ในการวัดปริมาณไฮโปคลอไรท์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น10 50 100 และ 200 ppm ใช้กระดาษวัดปริมาณไฮโปคลอไรท์ ดังแสดงในภาพที่ 3.1 ก ถึง จ จากนั้นทำการวัดค่า pH ของสารละลายในแต่ละความเข้มข้น

3.4.4.1 นำตัวอย่างปลาหมึกในแต่ละลักษณะที่ผ่านการถ่ายเชื้อ Total bacteria เท่ากับ 10^5 CFU/g, *E. coli* เท่ากับ 10^4 CFU/g และ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 10^4 CFU/g ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.2 มาล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.4 โดยใช้มือคนกวน ภายใต้สภาวะวัตถุดิบ 1 kg ต่อน้ำ 4 ลิตร ดังแสดงในภาพที่ 3.4 ก ข และ ค จากนั้นทำการวัดค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์หลังล้างปลาหมึก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.4.4.2 ทำการสุ่มตัวอย่างปลาหมึกไปตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่รอดชีวิต ตามระยะเวลา 5 10 15 20 30 45 และ 60 วินาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3.4 ง และ จ



(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ)

ภาพที่ 3.4 : การล้างตัวอย่างปลาหมึกที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

(ก) ตัวอย่างปลาหมึกปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

(ข) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างปลาหมึกก่อนล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

(ค) ล้างปลาหมึกที่ชั่งเตรียมไว้จนครบตามเวลาที่กำหนด

(ง) ตัวอย่างปลาหมึกหลังล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

(จ) เก็บตัวอย่างปลาหมึกเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต

3.4.4.4.3 นำตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่ผ่านขั้นตอนการล้าง มาทำการทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยการดมกลิ่น และตรวจหาโปคลอไรท์ตกค้าง โดยจะกล่าวต่อไปในข้อ 3.4.5

3.4.5 ผลการตกค้างของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในเนื้อปลาหมึกกระดองหลังทำการล้าง

3.4.5.1 นำตัวอย่างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ระดับความเข้มข้น 50 75 และ 100 ppm ที่ระยะเวลาในการล้าง 5 10 15 20 30 45 และ 60 วินาที ตามลำดับ ทำการทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยการดมกลิ่น โดยให้ผู้ทดสอบดมกลิ่นปลาหมึกที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ โดยเปรียบเทียบกลิ่นกับตัวอย่างควบคุม (การเตรียมตัวอย่างควบคุม นำตัวอย่างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet มาล้างด้วยสะอาด แล้วนำไปใช้ในการทดลอง) กลุ่มคนที่ใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัส เป็นผู้ที่ได้รับการฝึกฝน และมีความชำนาญในการทดสอบ ซึ่งใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คน ใช้การวิเคราะห์เชิงพรรณนา (ด้านกลิ่น) และหากพบว่าตัวอย่างใดมีผู้ทดสอบได้กลิ่น นำตัวอย่างนั้นๆ มาทำการล้างด้วยน้ำสะอาด 1 ครั้ง และให้ผู้ทดสอบ ดมกลิ่นปลาหมึกหลังล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง

3.4.5.2 นำตัวอย่างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 50 75 และ 100 ppm ระยะเวลาในการล้าง 5 10 15 20 30 45 และ 60 วินาที ตามลำดับ มาทำการตรวจหาการตกค้างของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์โดยชุดทดสอบไฮโปคลอไรท์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หากพบว่าตัวอย่างใด ตรวจพบไฮโปคลอไรท์ตกค้าง นำตัวอย่างนั้นๆ มาทำการล้างด้วยน้ำสะอาด 1 ครั้ง และทำการตรวจหาไฮโปคลอไรท์ตกค้างในปลาหมึกหลังล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง

บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

4.1 ผลการสำรวจกลุ่มของแบคทีเรียที่มีอยู่ในวัตถุดิบปลาหมึกกระดอง

จากการสุ่มตัวอย่างวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าโรงงานมาทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลชีววิทยา ทำการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) และทำการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* เพื่อเป็นข้อมูลการตรวจติดตามคุณภาพของวัตถุดิบ และประเมินคุณภาพวัตถุดิบในการพิจารณาจัดซื้อวัตถุดิบเบื้องต้นกับคู่ค้า (Supplier) รวมถึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสืบย้อนกลับกรณีพบปัญหาที่ผลิตภัณฑ์สุดท้าย ทำการเก็บตัวอย่างเดือนละ 2 ครั้ง เป็นระยะเวลา 12 เดือน และนำผลการตรวจวิเคราะห์มาพิจารณากำหนดปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการทดลอง ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ที่ตรวจพบในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองที่รับเข้าโรงงานระดับต่ำสุดที่ตรวจพบ คือ 2.9 $\log_{10}$ CFU/g ระดับสูงสุดที่ตรวจพบ คือ 5.4 $\log_{10}$ CFU/g โดยพบว่าช่วงที่มีปริมาณเชื้อค่อนข้างสูง คือช่วงเดือนมีนาคม – กรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงหน้าร้อน ปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 4 - 5 $\log_{10}$ CFU/g เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจัดเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นดัชนี (Indicator organism) บ่งชี้ถึงความสด ความสะอาด สุขลักษณะของโรงงาน รวมถึงผลิตภัณฑ์ และคนงาน แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นพวกต้องการอากาศ และเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (Mesophillic aerobic bacteria) (มัทนา, 2545) จุลินทรีย์กลุ่ม Mesophillic มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 35 - 37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างระหว่าง 20 - 50 องศาเซลเซียส (วราวุฒิ, 2538) ดังนั้นหน้าร้อนซึ่งอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 - 35 องศาเซลเซียส จึงเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้พบปริมาณเชื้อสูงมากกว่าช่วงเดือนอื่น ๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้เมื่อมีปริมาณสูงจะส่งมีผลต่ออายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์(อัจฉรา, 2537) และจากผลการวิเคราะห์คุณภาพของวัตถุดิบปลาหมึกสดที่รับเข้าโรงงาน ยังตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ตั้งแต่ < 3 ถึง สูงสุด 93 MPN /g และ *V. parahaemolyticus* ตั้งแต่ < 3 ถึง สูงสุด 23 MPN /g ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้มีผลในด้านคุณภาพของสินค้า ซึ่ง *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวกำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร โดย *E. coli* อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นดัชนีทางสุขาภิบาลอาหาร ใช้เป็นดัชนีแสดงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ และในอาหาร การตรวจพบเชื้อนี้ในอาหาร แสดงว่ามีการปนเปื้อนในระหว่างการผลิตจากผู้สัมผัสอาหาร หรือมีการปนเปื้อนในช่วงการเก็บรักษา ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารนั้นมีโอกาสที่จะมีเชื้อโรคทางเดินอาหารปนเปื้อนอยู่ด้วย ส่วนเชื้อ *V. parahaemolyticus* โอกาสที่จะ

พบมีมาก เนื่องจากเชื้อนี้มีอยู่ทั่วไปในทะเลและเพิ่มจำนวนมากขึ้นในฤดูร้อน (อัจฉรา, 2537) การเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้พิจารณาจากโอกาสของการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าโรงงาน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่เลือกนำมาใช้ในการทดลอง คือ เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ เชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ถ่ายลงในเนื้อปลาหมึกเท่ากับ 5 $\log_{10}$ CFU/g หรือ 10^5 CFU/g ส่วนเชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *V. parahaemolyticus* ถ่ายลงในเนื้อปลาหมึกเท่ากับ 4 $\log_{10}$ CFU/g หรือ 10^4 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับที่ตรวจพบจริงและเป็นระดับที่เกิดความอันตรายสูงสุด เมื่อทำการเปรียบเทียบกับร่างมาตรฐานสินค้าเกษตร และอาหารแห่งชาติ ว่าด้วยเรื่องปลาหมึก (2547) พบว่าไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งเกณฑ์กำหนดแสดงในภาคผนวก ง.

ตารางที่ 4.1 : จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองที่รับเข้าโรงงาน ตั้งแต่เดือน มกราคม - ธันวาคม 2548

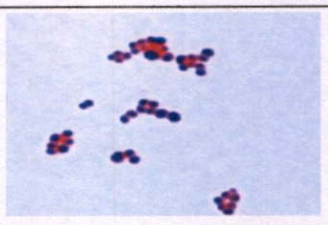
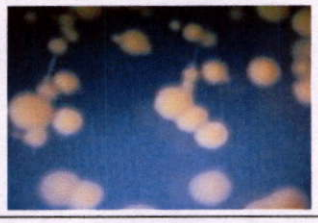
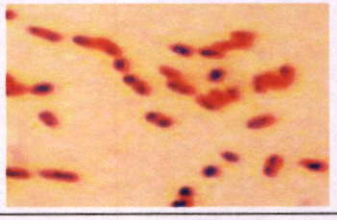
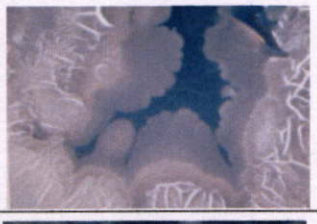
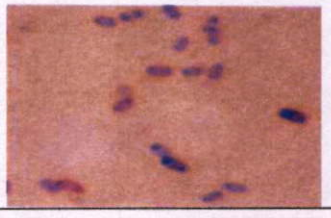
เดือน	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ($\log_{10}$ CFU/g)	*E. coli* (MPN/g)	*V. parahaemolyticus* (MPN/g)
มกราคม	3.7 - 3.6	< 3	< 3
กุมภาพันธ์	3.5 - 4.8	< 3	< 3
มีนาคม	4.6 - 4.9	21	3.6
เมษายน	4.5 - 5.4	9.1	< 3
พฤษภาคม	4.7 - 4.9	<3	< 3
มิถุนายน	4.8 - 5.1	<3	23
กรกฎาคม	4.7 - 5.1	93	< 3
สิงหาคม	2.9 - 4.0	<3	< 3
กันยายน	3.8 – 4.0	<3	< 3
ตุลาคม	3.7 - 3.9	3.6	15
พฤศจิกายน	3.5 - 3.7	< 3	< 3
ธันวาคม	3.5 - 3.6	< 3	< 3

หมายเหตุ : <3 หมายถึง ตรวจไม่พบเชื้อโดยวิธี MPN

4.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในปลาหมึกกระดองที่รับเข้าในโรงงาน

หลังจากตรวจวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองที่รับเข้าโรงงานแล้วนำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบมาทำการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (Culture characteristic) และคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) โดยการดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ และการย้อมติดสี แสดงผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2: ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่พบในวัตถุดิบปลาหมึกกระดอง

ลำดับที่	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะหลังย้อมแกรม	รูปร่าง	แกรม
1.			เซลล์รูปท่อนสั้น	แกรมลบ
2.			เซลล์รูปกลมจับกันเป็นกลุ่ม	แกรมบวก
3			เซลล์รูปท่อนสั้น	แกรมลบ
4.			เซลล์รูปท่อนสั้น และมีสปอร์	แกรมบวก
5.			เซลล์รูปท่อนต่อกัน	แกรมลบ

จากการตรวจติดตามปริมาณเชื้อในปลาหมึกกระดองดังกล่าวพบว่า ลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จากวัตถุดิบปลาหมึกกระดองที่พบมากที่สุด คือ แบคทีเรียในลำดับที่ 1 โดยลักษณะของโคโลนีที่พบมีลักษณะกลม สีขาว เซลล์มีรูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ จึงเลือกลักษณะของแบคทีเรียดังกล่าวเป็นตัวแทนของแบคทีเรียทั้งหมดเพื่อใช้ในการทดลองครั้งนี้

4.3 ประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง

สารละลายเชื้อที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) ที่แยกจากปลาหมึกกระดอง เชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *V. parahaemolyticus* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) ได้ที่ความเข้มข้น 2.73×10^6 CFU/ml ($6.44 \log_{10}$ CFU/ml) สารละลายเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 2.38×10^5 CFU/ml ($5.38 \log_{10}$ CFU/ml) สารละลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้น 3.45×10^5CFU/ml ($5.54 \log_{10}$ CFU/ml)

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 2 10 50 100 และ 200 ppm วัดค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์หลังการเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3: ค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังการเตรียมสารละลาย

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ppm)	pH
2	7.8
10	8.2
50	8.4
100	9.0
200	9.8

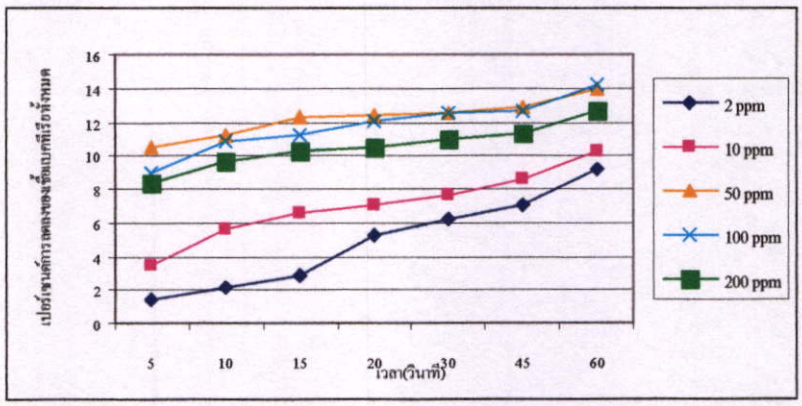
จากตารางที่ 4.3 ค่า pH ที่วัดได้หลังจากการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า pH อยู่ในช่วง 7.8 – 9.8 จากผลของ pH ที่วัดได้ pH มีค่า > 5 ดังนั้นแสดงว่าการแตกตัวจะอยู่ในรูป

ของไฮโปคลอไรท์อิออน (OCl^-) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากกว่าที่จะฆ่าจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) (สุมณฑา, 2547) และค่า pH > 5 จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อน้อยกว่าคลอรีนที่มีค่า pH ช่วง 4-5 ยิ่งค่า pH เป็นด่างมากขึ้นประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อก็จะน้อยลง

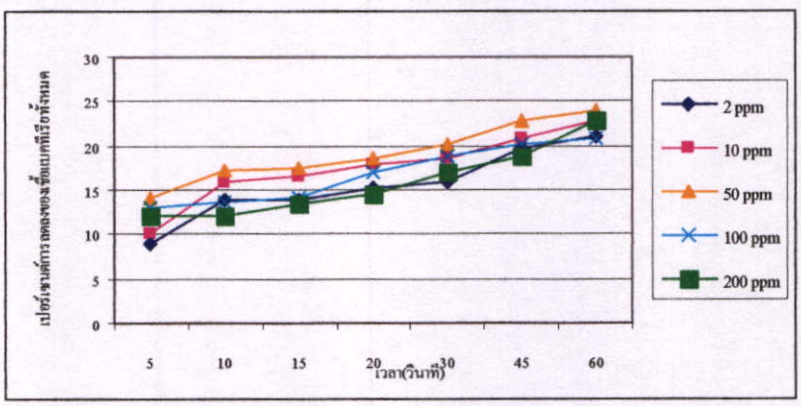
นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการลดปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้เนื่องจากมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ค่า pH ของสารละลาย ซึ่ง ค่า pH ของสารละลายจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ค่า pH ที่ให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีที่สุดจะอยู่ในช่วงที่มีค่าความเป็นกรด pH 4-5 และเมื่อ pH > 5 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจะลดลงทั้งนี้เนื่องจากคลอรีนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างซึ่งโครงสร้างของคลอรีนมีผลต่อประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ ทั้งนี้ Benarde และคณะ (1965) ได้รายงานว่าที่ pH 6.5 คลอรีนจะอยู่ในรูปกรดไฮโปคลอรัสซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเปลี่ยน pH เป็น 8.5 คลอรีนจะอยู่ในรูปไฮโปคลอไรท์ไอออนที่ความเข้มข้นเท่ากัน แต่ต้องใช้เวลาในการสัมผัสนานกว่าถึงจะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์เท่ากัน ในส่วนของ Gardner และ Peel (1991) ได้กล่าวว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึงระดับหนึ่งกลับพบว่าประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์คงที่ เช่น การใช้สารละลายคลอรีน 100 ppm (pH 7.6) ให้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้สารละลายคลอรีน 1,000 ppm (pH 9.0) นอกจากนี้ยังพบว่า การที่คลอรีนหรือสารประกอบคลอรีนมีค่า pH เพิ่มขึ้น จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนลดลง กล่าวคือ เมื่อทำการทดลองโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับ pH 9.0 จะมีผลทำให้เชื้อ *B. subtilis* NCDO 1919 ลดลง 90 % โดยใช้เวลา 24-41 นาที ในขณะที่ระดับ pH 11.8 จะทำให้เชื้อลดลงไป 90 % ต้องใช้เวลามากกว่าถึง 480 นาที (Foegesing,1983)

4.3.1 ผลของระยะเวลาสัมผัส (Contact time) ความเข้มข้น และอุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ต่อการลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง

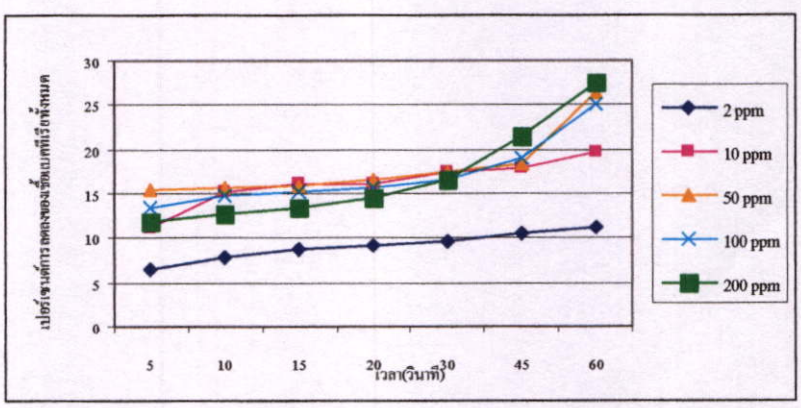
จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 2 10 50 100 และ 200 ppm วัดค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และปรับอุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ 0 10 และ 25 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการลดปริมาณเชื้อในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ในหลอดทดลองเป็นเวลาต่างกันในช่วง 5 – 60 วินาที และทำการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ที่เหลือรอด ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1 ถึง 4.9 เมื่อระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์นานขึ้น เป็นผลให้ปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (ภาพที่ 4.1- 4.3) ปริมาณการลดลงของเชื้อ *E. coli* (ภาพที่ 4.4-4.6) และปริมาณการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ภาพที่ 4.7-4.9) เพิ่มขึ้นในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์



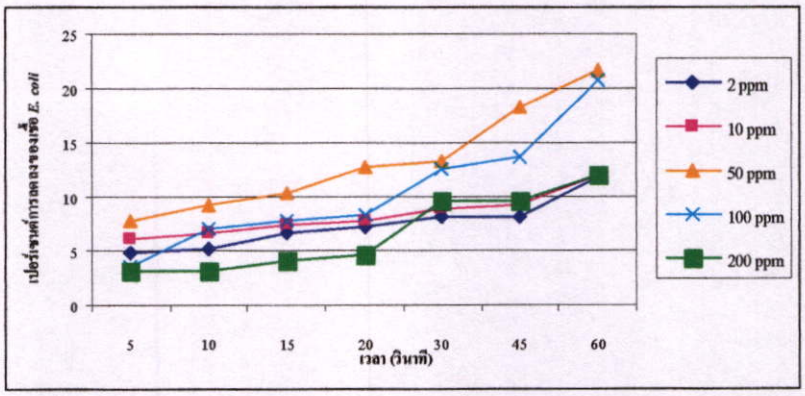
ภาพที่ 4.1: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 0 องศาเซลเซียส



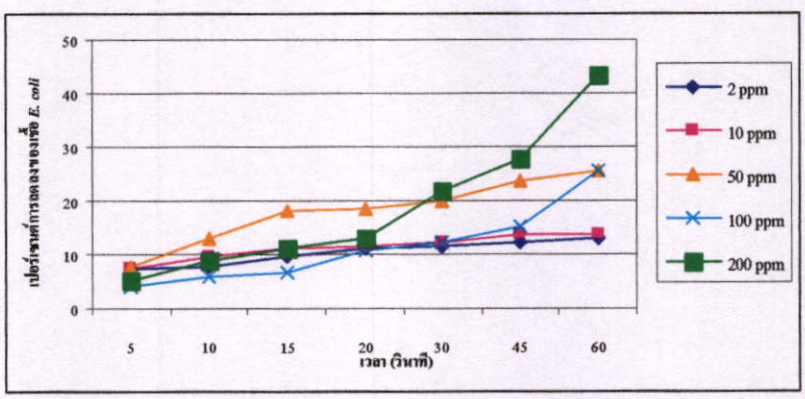
ภาพที่ 4.2: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่อุณหภูมิของ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 10 องศาเซลเซียส



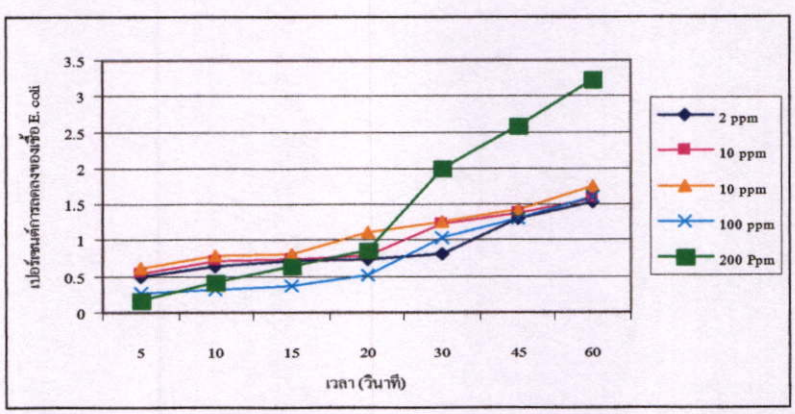
ภาพที่ 4.3: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส



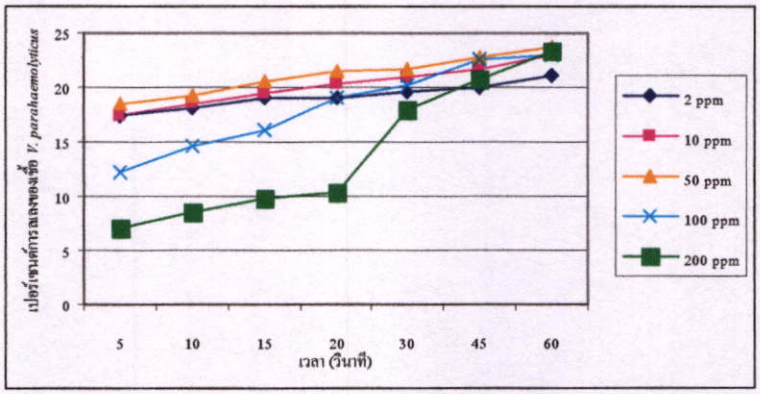
ภาพที่ 4.4: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 0 องศาเซลเซียส



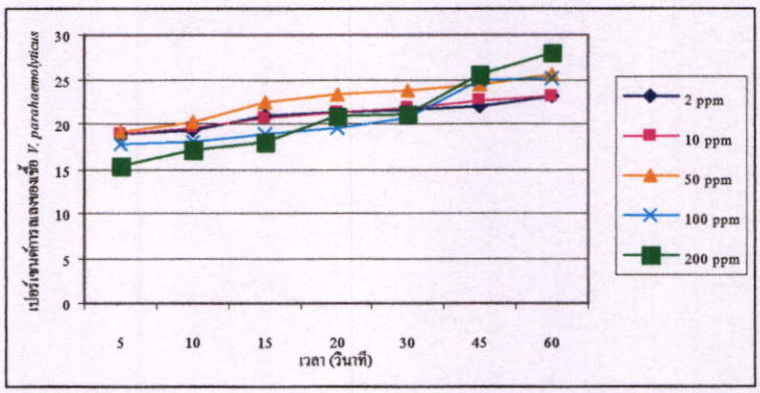
ภาพที่ 4.5: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 10 องศาเซลเซียส



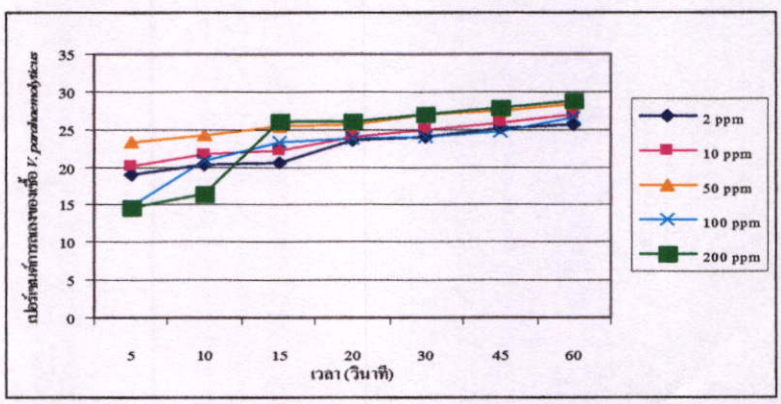
ภาพที่ 4.6: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.7: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เท่ากับ 0 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.8: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เท่ากับ 10 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.9: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส

จึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25 องศาเซลเซียสนั้น ระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์นาน 60 วินาที มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแบคทีเรียได้สูงที่สุด

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4.1 ถึง 4.9) พบว่า เมื่อระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับสารละลายนานขึ้นเป็นผลให้ปริมาณการลดลงของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญสอดคล้องกับ รุ่งทิวา (2541) ซึ่งได้ทำการทดลองประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium ที่ความเข้มข้น 30 ppm ระยะเวลา 10 20 30 40 และ 60 นาที พบว่า มีปริมาณ *S.* Typhimurium ลดลง คิดเป็น 87.0 89.3 90.7 92.0 93.9 และ 97.8 % ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงผลของอุณหภูมิ 0 10 และ 25 °C และระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ 2 10 50 100 และ 200 ppm ต่อการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ในหลอดทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1 ถึง 4.9 พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงสุด ณ อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0 °C พบว่า ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ซึ่งให้ผลเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงที่สุด เท่ากับ 14.0% ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับระดับความเข้มข้นของสารละลาย 100 และ 200 ppm ที่ระยะเวลาเดียวกัน

ส่วนอุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10°C พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงสุด คือ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 10 ppm ที่ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลเปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงที่สุด เท่ากับ 22.9% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 50 ppm ณ เวลาเดียวกัน

และที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 25°C พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงสุด คือ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 50 ppm ที่ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลเปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงที่สุด เท่ากับ 26.4% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 100 และ 200 ppm ตามลำดับ ณ ระยะเวลาเดียวกัน

จากการพิจารณาปริมาณการลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้สูงที่สุด ณ อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0°C คือ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที โดยพบว่าเชื้อ *E. coli* มีปริมาณการลดลงสูงสุดคิดเป็น 21.6 % และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 100 และ 200 ppm ณ เวลาเดียวกัน

ณ ที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10°C พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงสุด คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลาย

200 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้สูงที่สุด (43.4 %) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายอื่น ๆ

ส่วนที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 25°C พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงสุด คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 200 ppm ระยะเวลา 60 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* ได้สูงที่สุด(59.8 %)โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายอื่น ๆ

เมื่อพิจารณา ณ ที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0°C พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงสุด คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 10 ppm ระยะเวลา 60 วินาที มีปริมาณการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 22.9 % แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายทั้ง 50 100 และ 200 ppm

ส่วนที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10°C พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงสุด คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 200 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้สูงที่สุด(28.0 %) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายอื่น ๆ

และที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 25°C พบว่า ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงสุด คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้สูงที่สุด เท่ากับ 28.3 % ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 200 ppm ณ ระยะเวลาเดียวกัน

ผลของอุณหภูมิต่อการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* โดยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25 °C ในการ ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลอง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า เมื่ออุณหภูมิของสารละลายเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ 0°C สามารถลดปริมาณของเชื้อลงได้น้อยที่สุด รองลงมา คือ ที่ 10 และที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 25°C สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้สูงที่สุด เป็นไปตามที่ Gelinas และ คณะ (1984) รายงานว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการฆ่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิของสารละลายเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.4 : เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25°C

อุณหภูมิ (°C)	เปอร์เซนต์การลดลง(%) ของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ *		
	เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด	*E. coli*	*V. parahaemolyticus*
0	14.0[b]	21.6[b]	23.7[c]
10	24.0[a]	25.4[ab]	25.5[b]
25	26.4[a]	32.5[a]	28.3[a]

*ตัวอักษร a, b และ c ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

และจากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm อุณหภูมิ 0 10 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีเปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อสูงที่สุด ที่อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0 และ 10 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ *E. coli* และ Total bacteria ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้สูงที่สุด รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* และ Total bacteria จากผลการทดลอง อุณหภูมิน่าจะมีผลต่อการลดปริมาณเชื้อแต่ละชนิดโดยเชื้อแต่ละชนิดมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญแตกต่างกัน โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะที่สุด สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* คือ 35-37 องศาเซลเซียส (Nickelson และ Vanderzant, 1971) ส่วนอุณหภูมิที่เชื้อยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้ คือ 42-44 องศาเซลเซียส (Linton และคณะ, 1971) และอุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้ คือ 8 องศาเซลเซียส นอกจากนี้มีรายงานว่า ในน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส มักจะไม่พบเชื้อ *V.parahaemolyticus* (Baross และ Liston, 1970) จึงเป็นเหตุผลให้ *V. parahaemolyticus* มีเปอร์เซนต์ การลดลงของเชื้อสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 0 และ 10 องศาเซลเซียส ส่วน *E. coli* มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะที่สุด คือ 30-45 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิที่เชื้อยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้ คือ 45-55 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้ คือ 5-15 องศาเซลเซียส (สุวิมล, 2546)

นอกจากนี้องค์ประกอบทางของผนังเซลล์อาจมีผลต่อการถูกทำลายของเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิด กล่าวคือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจะมีผนังเซลล์ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก คือ เพปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) มีความหนาประมาณ 15-60 นาโนเมตร ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ จะมีผนังเซลล์ 2 ชั้น

ชั้นในมีองค์ประกอบเป็น Peptidoglycan เหมือนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีความหนาประมาณ 2-3 นาโนเมตร เมมเบรนชั้นนอก (Outer membrane) มีองค์ประกอบเป็น ไลโปพอลิแซคคาไรท์ (Lipopolysaccharide) และ ไลโปโปรตีน (Lipoprotein) มีความหนาประมาณ 8-10 นาโนเมตร ล้อมรอบ Peptidoglycanไว้ ดังนั้นแบคทีเรียแกรมลบ อาจมีความคงทนต่อการถูกทำลายได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (สุวิมล, 2546) หรืออาจเป็นผลจากช่วงของการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียอาจถูกทำลายได้ง่ายเมื่ออยู่ในช่วงการปรับตัว (Lag phase) อย่างไรก็ตามผลการทดลองใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นสูง 50 100 และ 200 ppm ระยะเวลานานที่สุด 60 วินาทีนั้นไม่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 2.73 x 10^6 CFU/ml, *E. coli* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 2.38 x 10^5CFU/ml และ *V. parahaemolyticus* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 3.45 x 10^5CFU/ml ได้หมด เนื่องมาจากเมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นจะต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมี และเวลาในการทำลายเชื้อมากขึ้น (Park และคณะ, 1991; Wei และคณะ, 1985) ตามลำดับ

จากการทดลองใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดในหลอดทดลอง สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมได้ ดังตารางที่ 4.5

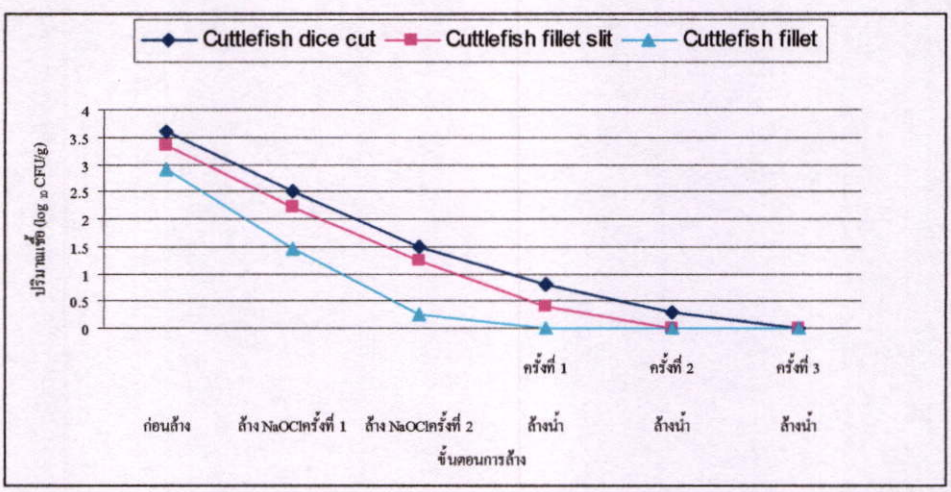
ตารางที่ 4.5 : สภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดในหลอดทดลองด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

ชนิดจุลินทรีย์	ระดับความเข้มข้น (ppm)	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา (วินาที)
แบคทีเรียทั้งหมด	50	25	60
E. coli	200	25	60
V. parahaemolyticus	50	25	60

จากการตารางที่ 4.5 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด คือ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาณเชื้อ *E. coli* คือ ที่ระดับความเข้มข้น 200 ppm ระยะเวลา 60 วินาที และ สภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* คือ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ณ ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 ^{o} C อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่ 25 ^{o} C มีผลให้จุลินทรีย์ที่รอดชีวิต และเชื้อที่อาจปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตมีโอกาสเจริญเติบโต ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ 10 ^{o}C ไปทำการทดลองต่อไป

4.4 ผลการเตรียมตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ใช้ในการทดลอง

ในการเตรียมตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย สารที่นิยมใช้มากที่สุดในโรงงานผลิตอาหาร คือ สารประกอบไฮโปคลอไรท์ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ไฮโปคลอไรท์เหลว) ลักษณะที่นำมาใช้ส่วนมากใช้ในรูปของสารละลายเจือจางที่เหมาะสม จะไม่ทำให้เกิดพิษ ไม่มีสี และสามารถกำจัดแบคทีเรียได้ทุกชนิด โดยสารนี้จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลาย เนื่องจากไฮโปคลอไรท์จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ หรือส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์ ทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติ หรืออาจเกิดปฏิกิริยารบกวนการทำงานของเอนไซม์ทำให้โปรตีนตกตะกอน เป็นต้น (กรมประมง, 2547) จากการนำตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดมาทำให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งปลาหมึกระดองที่ใช้ในการทดลองเป็นตัวอย่างของผลิตภัณฑ์สุดท้าย ที่ผ่านการลดปริมาณจุลินทรีย์มาแล้วระดับหนึ่ง ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างปลาหมึกแต่ละชนิดเพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น และทำการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 50 ppm 2 ครั้ง แล้วล้างตามด้วยน้ำสะอาด อีก 3 ครั้ง เก็บตัวอย่างหลังจากการล้างไปตรวจยืนยันว่าปราศจากแบคทีเรียหรือมีปริมาณน้อยที่สุด และทำการตรวจสอบไฮโปคลอไรท์ในตัวอย่างเพื่อให้มั่นใจว่าตัวอย่างไม่มีไฮโปคลอไรท์ตกค้างเมื่อใช้ในการทดลองประสิทธิภาพของกระบวนการล้างดังกล่าวทำให้ปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดปราศจากเชื้อ และไม่พบการตกค้างของไฮโปคลอไรท์ ก่อนทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดในแต่ละระดับความเข้มข้นที่ต้องการลงในตัวอย่างปลาหมึก ผลแสดงดังภาพที่ 4.10 และตารางที่ 4.6



ภาพที่ 4.10 : ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เหลือรอดหลังผ่านขั้นตอนการล้าง ($Log_{10}CFU/g$)

ตารางที่ 4.6 : ปริมาณการตกค้างของสารไฮโปคลอไรท์ในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดหลังผ่านขั้นตอนการล้าง

ขั้นตอนการล้างตัวอย่างปลาหมึกกระดอง	ผลการตรวจสอบการตกค้างของสารไฮโปคลอไรท์*
หลังล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ครั้งที่ 1	พบ
หลังล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ครั้งที่ 2	พบ
ปลาหมึกกระดองหลังน้ำสะอาด ครั้งที่ 1 2 3	ไม่พบ

*วิธีการทดสอบด้วยชุดทดสอบไฮโปคลอไรท์ ของกรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข

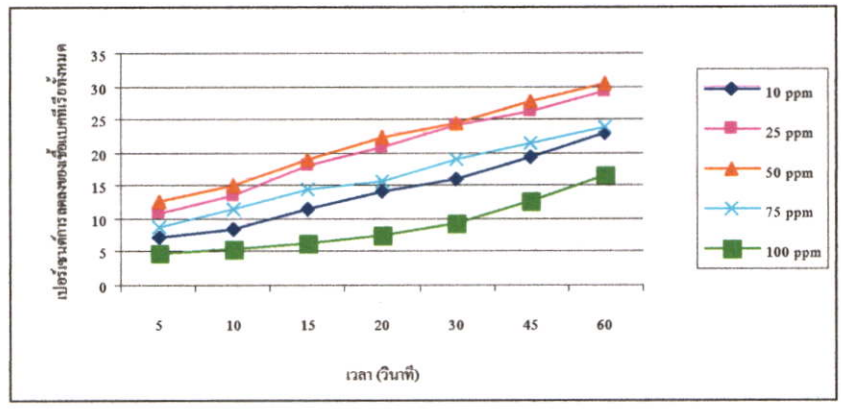
4.5 ประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึก

หลังจากเตรียมตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดให้ปราศจากเชื้อเรียบร้อย แล้วทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดในแต่ละระดับความเข้มข้นที่ต้องการลงในตัวอย่างปลาหมึก ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่ถ่ายลงไปในตัวอย่างปลาหมึกทั้ง 3 ลักษณะ เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Pour plate ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในตัวอย่างปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet เท่ากับ 1.33×10^5 CFU/g (หรือ5.12 $\log_{10}$CFU/g) 2.45×10^5 CFU/g (หรือ5.39 $\log_{10}$CFU/g) และ 1.75×10^5 CFU/g (หรือ5.24 $\log_{10}$CFU/g)ตามลำดับ

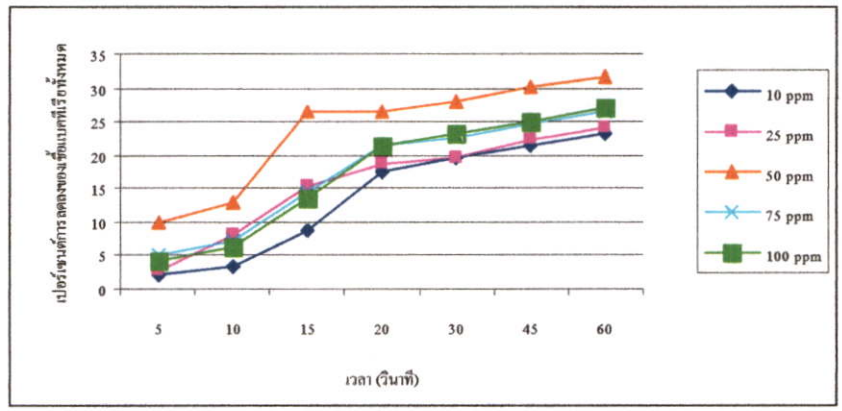
ส่วน *E. coli* ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Spread plate ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในตัวอย่างปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet เท่ากับ 6.25×10^4 CFU/g (หรือ 4.79 $\log_{10}$CFU/g) 6.90×10^4 CFU/g (หรือ 4.84 $\log_{10}$CFU/g) และ 6.07×10^4 CFU/g (หรือ 4.78 $\log_{10}$CFU/g) ตามลำดับ และ *V. parahaemolyticus* ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Spread plate ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในตัวอย่างปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet เท่ากับ 3.63×10^4 CFU/g (หรือ 4.56 $\log_{10}$CFU/g) 2.28×10^4 CFU/g (หรือ 4.44 $\log_{10}$CFU/g) และ 2.76×10^4 CFU/g (หรือ 4.36 $\log_{10}$CFU/g) ตามลำดับ แล้วทำการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 10 25 50 75 และ 100 ppm โดยควบคุมอุณหภูมิในการล้างให้เป็น 10°C ที่ระยะเวลา 5 10 15 20 30 45 และ 60 วินาที สืบเนื่องจากการทดลองในข้อ 4.3 เป็นเหตุผลหนึ่งในการพิจารณาเลือกระดับความเข้มข้นที่แคบลงและ อยู่ในช่วงที่น่าจะมีความ

เป็นไปได้ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ ส่วนการพิจารณาเลือกควบคุมอุณหภูมิในการล้างที่ 10 °C สอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.1 แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ ที่ 0 °C สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้น้อยที่สุด ส่วนที่ 10 และ 25 °C มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณจุลินทรีย์ได้มากขึ้นตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลทางสถิติ พบว่าที่ 10 °C มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่อุณหภูมิ 25 °C และในการควบคุมกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ประมงว่าด้วยการผลิตทั่วไป ต้องควบคุมอุณหภูมิทุกขั้นตอนการผลิตให้ใกล้เคียง 0 °C เสมอหรือไม่ควรสูงกว่า 10 °C ซึ่งจะมีผลในการช่วยป้องกันการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ (กรมประมง, 2547) ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ 10 °C ในการทดลอง

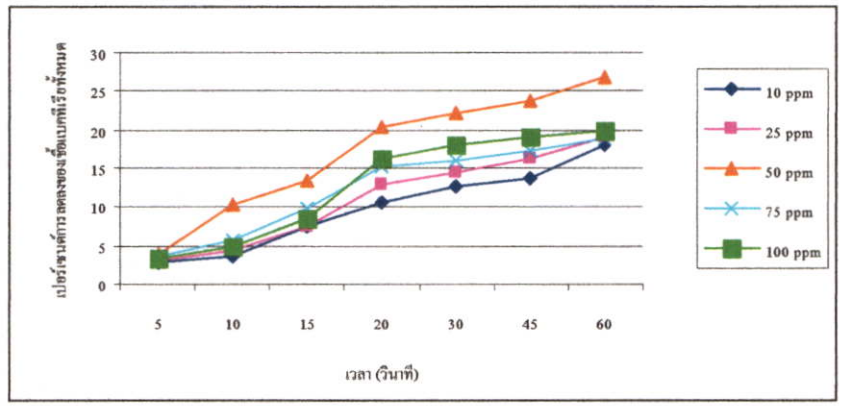
จากการตรวจนับปริมาณการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดภายหลังการล้างปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet ที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เท่ากับ 5.12 $\log_{10}$CFU/g, 5.39 $\log_{10}$CFU/g และ 5.24 $\log_{10}$CFU/g5.24 $\log_{10}$CFU/g ตามลำดับ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในเนื้อปลาหมึกทุกลักษณะมีปริมาณการลดลงของเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการฆ่าเชื้อนานขึ้นในทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งระยะเวลาในการล้างปลาหมึกที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ดีที่สุด คือ ระยะเวลา 60 วินาที ดังแสดงผลในภาพที่ 4.11- 4.13



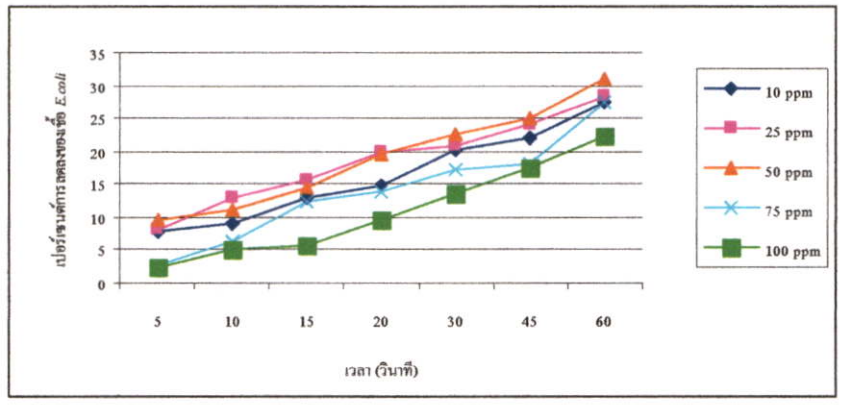
ภาพที่4.11: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส



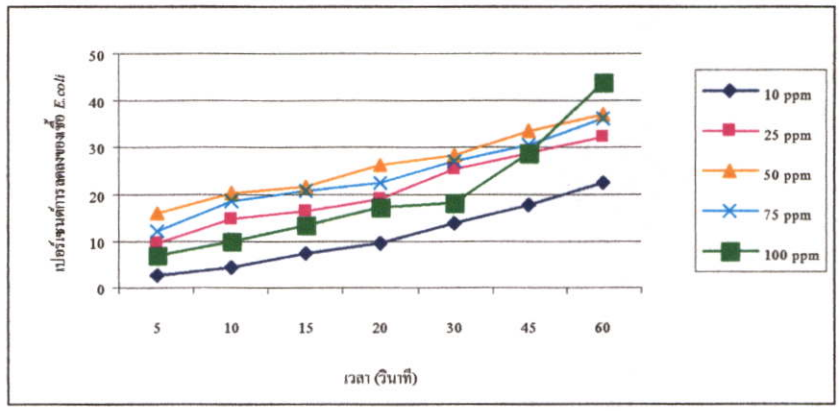
ภาพที่4.12: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet slit อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส



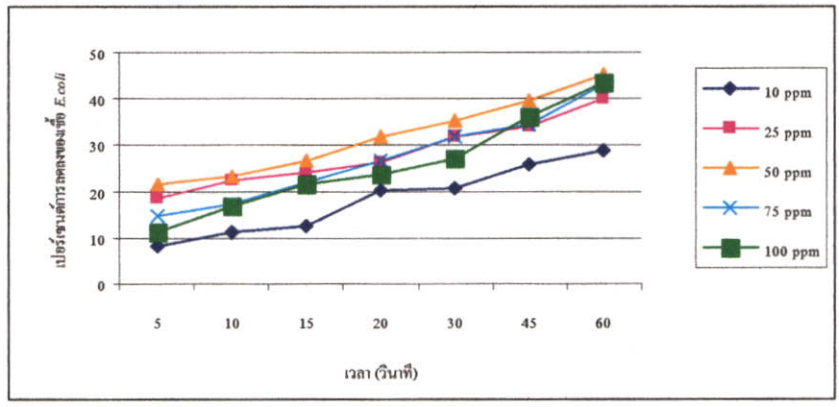
ภาพที่4.13: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส



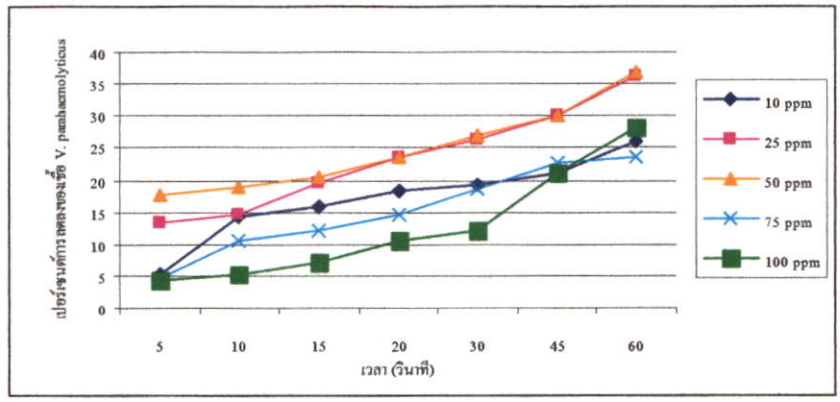
ภาพที่4.14: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส



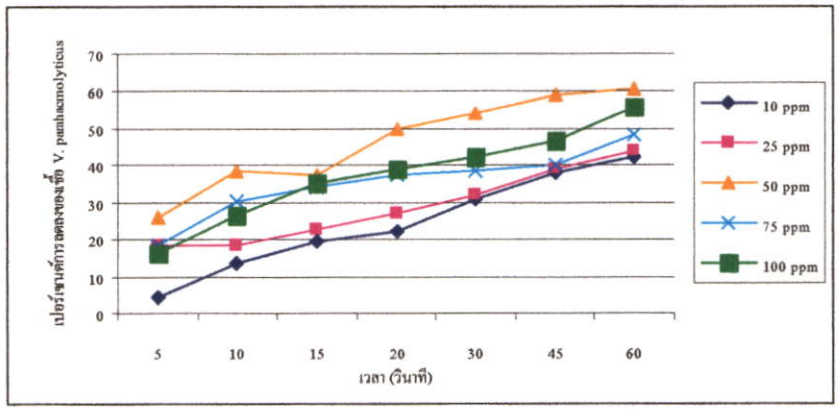
ภาพที่4.15: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet slit อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส



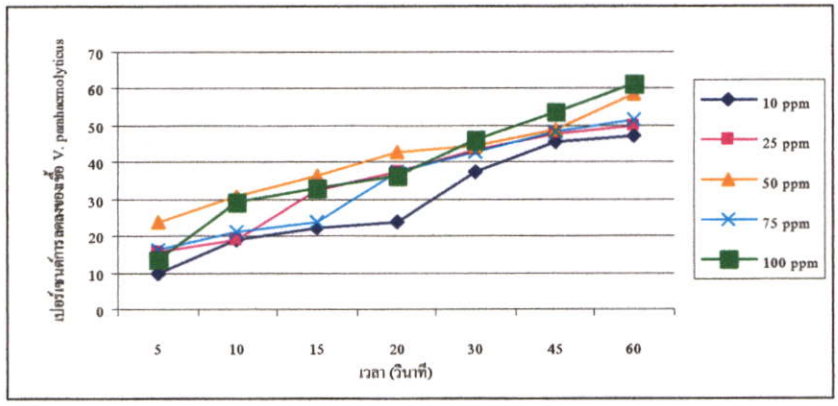
ภาพที่4.16: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส



ภาพที่4.17: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส



ภาพที่4.18: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet slit อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส



ภาพที่4.19: ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และระยะเวลาสัมผัส ต่อการลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet อุณหภูมิของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาถึงระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้างปลาหมึกแต่ละชนิด พบว่าการล้างปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm เป็นระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที

ในขณะที่การล้างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet slit ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 31.7 % ซึ่งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ

ส่วนการล้างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 27.0 % ซึ่งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ

ผลของปริมาณการลดลงของเชื้อ *E. coli* ภายหลังการล้างปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet ที่ถ่ายเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 4.79 $\log_{10}$CFU/g, 4.84 $\log_{10}$CFU/g และ 4.78 $\log_{10}$CFU/g ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14 ถึง 4.16) ภายหลังการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น เวลา และอุณหภูมิที่กำหนด พบว่า ในการฆ่าเชื้อของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในปลาหมึก พบการลดลงของเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อนานขึ้นในทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งระยะเวลาในการล้างปลาหมึกที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด คือ ระยะเวลา 60 วินาที เช่นกัน

เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ล้างปลาหมึกแต่ละชนิด พบว่าในการล้างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณ *E. coli* ได้สูงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ 25 50 และ 75 ppm ณ เวลาเดียวกัน

ในขณะที่การล้างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet slit ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณ *E. coli* ได้สูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ 50 และ 75 ppm ณ เวลาเดียวกัน

ส่วนการล้างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณ *E. coli* ได้สูงโดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ 50 และ 75 ppm ณ เวลาเดียวกัน

จากการทดลองล้างปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet ที่ถ่ายเชื้อ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 4.56 $\log_{10}$CFU/g, 4.36 $\log_{10}$CFU/g และ 4.44 $\log_{10}$CFU/g ตามลำดับ ภายหลังการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น เวลา และอุณหภูมิที่กำหนด ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.17 ถึง 4.19 พบว่า ในการฆ่าเชื้อของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในปลาหมึกจะมีปริมาณการลดลงของเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการฆ่าเชื้อนานขึ้นในทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งระยะเวลาในการล้างปลาหมึกที่สามารถลดปริมาณ *V. parahaemolyticus* ได้สูงที่สุด คือ ระยะเวลา 60 วินาที เช่นกัน

เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ล้างปลาหมึกแต่ละชนิด พบว่าในการล้างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish dice cut ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณ *V. parahaemolyticus* ได้สูงโดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ 50 ppm ณ เวลาเดียวกัน

ขณะที่การล้างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet slit ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลา 30 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณ *V. parahaemolyticus* ได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (เท่ากับ 54.0 %)

ส่วนการล้างปลาหมึกกระดองชนิด Cuttlefish fillet ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ให้ผลในการลดปริมาณ *V. parahaemolyticus* ได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 58.8 %

จากผลการทดลองเมื่อทำการพิจารณาระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ในการล้างปลาหมึกโดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลายให้สูงขึ้น พบว่า ไม่มีผลต่อการลดลงของของปริมาณจุลินทรีย์ ทั้งนี้อาจมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือค่า pH จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์หลังการเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้น 50 75 และ 100 ppm และทำการวัด pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์หลังล้างปลาหมึกได้ผลดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 : ค่า pH ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ วัดค่าได้หลังการเตรียมสารละลาย และหลังจากล้างตัวอย่างปลาหมึก

ชนิดปลาหมึก	ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ppm)	ค่า pH							
		หลังเตรียมสารละลาย	หลังล้างปลาหมึกที่ระยะเวลาต่าง ๆ (วินาที)						
			5	10	15	20	30	45	60
Cuttlefish dice cut	50	8.4	8.0	8.0	7.9	7.9	7.9	7.8	7.7
	75	8.6	8.5	8.5	8.4	8.4	8.3	8.1	8.0
	100	8.9	8.8	8.8	8.7	8.6	8.5	8.3	8.1
Cuttlefish fillet slit	50	8.3	8.2	8.2	7.9	7.9	7.8	7.7	7.7
	75	8.5	8.4	8.3	8.2	8.2	8.1	8.0	8.0
	100	8.8	8.8	8.8	8.7	8.7	8.6	8.5	8.2
Cuttlefish fillet	50	8.3	8.1	8.0	7.9	7.8	7.8	7.7	7.7
	75	8.5	8.4	8.4	8.3	8.2	8.1	8.0	8.0
	100	8.7	8.7	8.5	8.5	8.5	8.4	8.3	8.2

จากตารางที่ 4.7 ค่า pH ที่วัดได้หลังจากการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 50 75 และ 100 ppm พบว่า pH อยู่ในช่วง 8.3-8.4, 8.5-8.6 และ 8.7-8.9 ตามลำดับ ค่า pH มีผลต่อประสิทธิภาพของสารประกอบคลอรีน พบว่าเมื่อ pH เพิ่ม ปริมาณกรดไฮโปคลอรัสที่

สามารถฆ่าเชื้อลดลง ดังนั้นเมื่อเตรียมสารละลายคลอรีนในสภาวะด่าง ประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ของคลอรีนจะลดลง แต่ความคงตัวของสารละลายจะเพิ่มขึ้น (Rudolph และ Leaven, 1941; Baker, 1959) Benarde และคณะ (1965) พบว่าที่ pH 6.5 คลอรีนจะอยู่ในรูปกรดไฮโปคลอรัส ซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อ pH เปลี่ยนเป็น 8.5 คลอรีนจะอยู่ในรูปไฮโปคลอไรท์ไอออน ที่ความเข้มข้นเท่ากัน แต่ต้องใช้เวลาในการสัมผัสนานกว่าถึงมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้เท่ากัน

จากการทดลองสามารถสรุปผลการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการล้างปลาหมึกกระดองสด เพื่อลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมได้ ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 : สภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดในเนื้อปลาหมึกกระดองสดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

ชนิดจุลินทรีย์	ชนิดปลาหมึก								
	Cuttlefish dice cut			Cuttlefish fillet slit			Cuttlefish fillet		
	ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (วินาที)	การลดลงของเชื้อ (%)	ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (วินาที)	การลดลงของเชื้อ (%)	ความเข้มข้น (ppm)	เวลา (วินาที)	การลดลงของเชื้อ (%)
แบคทีเรียทั้งหมด	50	60	30.4 ^{ab}	50	60	31.7^{a}	50	60	27.0^{b}
E. coli	50	60	31.0^{b}	50	60	37.2^{ab}	50	60	45.4^{a}
V. paraheamolyticus	50	60	36.8^{b}	50	60	60.7^{a}	50	60	58.8^{a}

*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

จากตารางที่ 4.8 การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดในเนื้อปลาหมึกกระดองสด พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในเนื้อปลาหมึก คือ ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ระยะเวลา 60 วินาที ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ 50 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีในระดับหนึ่ง และไม่มีผลกระทบกับคุณภาพของวัตถุดิบในเรื่องของกลิ่นไฮโปคลอไรท์ และการตกค้างของสารไฮโปคลอไรท์ในเนื้อปลาหมึก ส่วนที่ไม่พิจารณาที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เนื่องจากตรวจพบการตกค้างของสารไฮโปคลอไรท์ และกลิ่นไฮโปคลอไรท์ตกค้างในเนื้อปลาหมึกหลังจากล้างด้วยน้ำสะอาด ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และ 4.10 เมื่อ

ทำการพิจารณาผลของพื้นที่ผิวสัมผัสปลาหมึกแต่ละลักษณะหลังจากล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า ปลาหมึกกระดองลักษณะ Cuttlefish dice cut มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดได้น้อยที่สุด ส่วน ปลาหมึกกระดองลักษณะ Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet ปริมาณการลดลงของเชื้อได้ค่อนข้างสูง และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการตัดชิ้นปลาหมึกกระดองให้มีลักษณะเป็นชิ้นลูกเต๋า (Cuttlefish dice cut)ทำให้เชื้อที่ทำการปนเปื้อนเข้าสัมผัสกับเนื้อเยื่อภายในของปลาหมึก ส่วนการนำชิ้นปลาหมึกกระดองแล่มากรีดให้เป็นรอย (Cuttlefish fillet slit) และชิ้นปลาหมึกกระดองแล่ (Cuttlefish fillet)มาทำการปนเปื้อนเชื้อ เชื้อที่ปนเปื้อนจะถูกเคลือบไว้เฉพาะที่ผิวภายนอกของชิ้นปลาหมึก เมื่อทำการล้างปลาหมึกแต่ละชนิด Cuttlefish fillet slit และชิ้นปลาหมึกกระดองแล่ Cuttlefish fillet ทำให้เกิดการชะล้างออกได้ง่ายกว่า ปลาหมึกกระดองลักษณะ Cuttlefish dice cut ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแต่ละชนิด ในปลาหมึกกระดอง Cuttlefish fillet slit และCuttlefish fillet ดีกว่า ปลาหมึกกระดอง Cuttlefish dice cut

ในการลดขนาดของวัตถุดิบให้เล็กลงโดยการหั่น หรือการตัด จะมีผลทำให้ลักษณะของเนื้อสัมผัสเปลี่ยนไป และเพิ่มพื้นที่ผิวด้านนอก (นิธิยา, 2544) การที่เซลล์แตก และมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน และกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ หรือเอนไซม์บางชนิดที่ถูกปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่อที่ฉีกขาด เพิ่มขึ้น (วิไล, 2543)

4.6 ศึกษาการตกค้างของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในเนื้อหมึกกระดองหลังจากขั้นตอนการล้าง

การศึกษาการตกค้างของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในเนื้อปลาหมึก หลังจากการนำปลาหมึกล้างในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 50 75 และ 100 ppm ที่ระยะเวลา 5 10 15 20 30 45 และ 60 วินาที แล้วทำการทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยการดมกลิ่น ใช้จำนวนผู้ทดสอบ 20 คน ได้ผลการทดสอบ ดังตารางที่ 4.9 เมื่อพิจารณาผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยการดมกลิ่นปลาหมึกที่นำมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 75 และ 100 ppm ที่ระยะเวลา 5 – 60 วินาที พบว่า ระยะเวลาในการล้างปลาหมึกทั้ง 3 ลักษณะด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์นานขึ้น และระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เป็นผลให้จำนวนผู้ทดสอบที่ได้กลิ่นของไฮโปคลอไรท์มีจำนวนมากขึ้นตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าที่ 50 ppm ระยะเวลา 5 วินาที มีจำนวนผู้ทดสอบที่ได้กลิ่นไฮโปคลอไรท์น้อยที่สุดอยู่ในช่วง 2-5 คน คิดเป็น 10 -25 % (Cuttlefish dice cut = 10%, Cuttlefish fillet slit= 25% และ Cuttlefish fillet =10%) และเมื่อล้างเป็นระยะเวลานานขึ้นจำนวนผู้ได้กลิ่นก็เพิ่มมากขึ้น จนถึงที่ระยะเวลานานที่สุด 60 วินาที มี

จำนวนผู้ทดสอบได้กลิ่นไฮโปคลอไรท์มากที่สุด คิดเป็น 100 % ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm มีจำนวนผู้ทดสอบได้กลิ่นไฮโปคลอไรท์คิดเป็น 100 % ตั้งแต่ 5 วินาทีแรก

หลังจากผู้ทดสอบดมกลิ่นปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์แล้ว พบว่ามีกลิ่นก็จะนำปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นนั้นๆ ไปล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง ผลปรากฏว่า ปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 50 และ 75 ppm เมื่อนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด สามารถล้างกลิ่นที่ติดอยู่ที่เนื้อปลาหมึกออกได้หมดซึ่งจำนวนผู้ทดสอบที่ได้กลิ่นไฮโปคลอไรท์ คิดเป็น 0 % และพบว่า ปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น ที่ 100 ppm เมื่อนำมาล้างด้วยน้ำสะอาดสามารถล้างกลิ่นที่ติดอยู่ที่เนื้อปลาหมึกออกได้ ส่วนที่ปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นที่ 100 ppm เป็นระยะเวลา 45-60 วินาที การล้างด้วยน้ำสะอาดเพียง 1 ครั้งไม่สามารถล้างกลิ่นที่ติดอยู่ที่เนื้อปลาหมึกออกได้ จากผลการทดลองมีจำนวนผู้ทดสอบที่ได้กลิ่นไฮโปคลอไรท์ 20-100 % (ที่ 60 วินาที Cuttlefish dice cut = 50 %, Cuttlefish fillet slit = 100 % และ Cuttlefish fillet = 35 %) (ที่ 45 วินาที Cuttlefish dice cut = 30 %, Cuttlefish fillet slit = 60 % และ Cuttlefish fillet = 20 %)

จากนั้นได้ทำการทดสอบหาการตกค้างของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในเนื้อปลาหมึก โดยชุดทดสอบไฮโปคลอไรท์ ของกรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ผลดังตารางที่ 4.10 แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกันกับการผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยการดมกลิ่นว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เพิ่มขึ้น ระยะเวลาในการล้างปลาหมึกนานขึ้น มีโอกาสที่จะตรวจพบการตกค้างของไฮโปคลอไรท์ในเนื้อปลาหมึกได้สูงขึ้นเช่นกัน จากผลการทดลองพบว่า ปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ระดับความเข้มข้น 50 -100 ppm ระยะเวลา 5 วินาที สามารถตรวจพบการตกค้างของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆโอกาสตรวจพบการตกค้างของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการล้าง จากผลการทดลอง พบว่า การล้างปลาหมึกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm ที่ระยะเวลา 5-60 วินาที ตรวจไม่พบการตกค้างของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนการล้างปลาหมึกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm ที่ระยะเวลา 60 วินาที มีโอกาสตรวจพบการตกค้างของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และหลังจากตรวจสอบปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์แล้วตรวจพบการตกค้าง จะนำปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นนั้น ๆ ไปล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง ผลปรากฏว่า ปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 75 ppm หลังจากล้างด้วยน้ำสะอาดแล้ว ตรวจไม่พบการตกค้างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 100 ppm เมื่อนำมาล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วยังตรวจพบการตกค้างสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระยะเวลาในการล้าง 45-60 วินาที

เมื่อพิจารณาถึงผลของลักษณะของปลาหมึกในการตกค้างของกลิ่น พบว่า Cuttlefish fillet slit มีจำนวนผู้ทดสอบ พบกลิ่นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ตกค้างมีเปอร์เซ็นต์สูงที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากลักษณะของปลาหมึกกระดอง Cuttlefish fillet slit มีรอยกรีด อาจทำให้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แทรกเข้าไปในรอยกรีดนั้น อาจส่งผลให้เกิดกลิ่นตกค้างได้

ตารางที่ 4.9 : ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยการดมกลิ่นปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 75 และ100 ppm

ชนิดปลาหมึก	เวลา (วินาที)	จำนวนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส (ดมกลิ่น) ปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ppm)						จำนวนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส (ดมกลิ่น) ปลาหมึกที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ppm) แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด					
		50		75		100		50		75		100	
		มีกลิ่น	% ได้กลิ่น	มีกลิ่น	% ได้กลิ่น	% ได้กลิ่น	มีกลิ่น	มีกลิ่น	% ได้กลิ่น	มีกลิ่น	% ได้กลิ่น	มีกลิ่น	% ได้กลิ่น
Cuttlefish dice cut	5	2	10	8	40	20	100	0	0	0	0	0	0
	10	10	50	16	80	20	100	0	0	0	0	0	0
	15	16	80	16	80	20	100	0	0	0	0	0	0
	20	16	80	17	85	20	100	0	0	0	0	0	0
	30	17	85	19	95	20	100	0	0	0	0	0	0
	45	18	90	20	100	20	100	0	0	0	0	6	30
	60	20	100	20	100	20	100	0	0	0	0	10	50
Cuttlefish fillet slit	5	5	25	14	70	20	100	0	0	0	0	0	0
	10	12	60	16	80	20	100	0	0	0	0	0	0
	15	16	80	16	80	20	100	0	0	0	0	0	0
	20	16	80	17	85	20	100	0	0	0	0	0	0
	30	17	85	18	90	20	100	0	0	0	0	0	0
	45	19	95	20	100	20	100	0	0	0	0	12	60
	60	20	100	20	100	20	100	0	0	0	0	20	100
Cuttlefish fillet	5	2	10	12	60	20	100	0	0	0	0	0	0
	10	11	55	16	80	20	100	0	0	0	0	0	0
	15	16	80	17	85	20	100	0	0	0	0	0	0
	20	17	85	18	90	20	100	0	0	0	0	0	0
	30	18	90	19	95	20	100	0	0	0	0	0	0
	45	19	95	20	100	20	100	0	0	0	0	4	20
	60	20	100	20	100	20	100	0	0	0	0	7	35

ตารางที่ 4.10 : ผลการวัดไฮโปคลอไรท์ตกค้างในเนื้อปลาหมึก

ชนิดปลาหมึก	เวลา (วินาที)	ผลการตรวจไฮโปคลอไรท์ตกค้างในเนื้อหมึกหลังล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ *					ผลการตรวจไฮโปคลอไรท์ตกค้างในเนื้อหมึกหลังล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แล้วล้างด้วย น้ำสะอาด*				
		10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm
Cuttlefish dice cut	5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	10	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	15	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	20	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	45	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	60	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Cuttlefish fillet slit	5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	10	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	15	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	20	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	45	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	60	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Cuttlefish fillet	5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	10	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	15	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	20	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	45	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	60	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+

หมายเหตุ : เครื่องหมายลบ (-) = ไม่พบไฮโปคลอไรท์ตกค้าง

เครื่องหมายบวก (+) = พบไฮโปคลอไรท์ตกค้าง

*วัดการตกค้างด้วยชุดทดสอบไฮโปคลอไรท์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

จากการทดลองสอดคล้องกับ Watson และ Prout (1996) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านประสาทสัมผัสของกุ้งต้มที่ผ่านการจุ่มแช่น้ำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับ 500 100 50 และ 20 ppm เป็นระยะเวลา 5 นาที พบว่า กุ้งต้มที่จุ่มแช่น้ำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับ 500 ppm มีกลิ่นและรสชาติเปลี่ยนไปโดยมีกลิ่นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แรง ในขณะที่การจุ่มแช่น้ำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับ 100 ppm พบว่ามีกลิ่นเล็กน้อย และที่การจุ่มแช่น้ำสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับ 50 ppm และ 20 ppm ไม่มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงในเรื่องของกลิ่นและรสชาติของกุ้งต้ม

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษากลุ่มแบคทีเรียที่ตรวจพบในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองที่รับเข้าโรงงาน และจากปัญหาของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เยือกแข็ง อันได้แก่ แบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) *Escherichia coli* และ *Vibrio parahaemolyticus* ประสิทธิภาพโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลอง และประสิทธิภาพโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการล้างปลาหมึกกระดอง เพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มากับวัตถุดิบ และเพื่อให้เกิดความมั่นใจในความปลอดภัยของอาหาร รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานทางการค้า สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสด ที่รับเข้าโรงงานในปี 2548 ตรวจพบเท่ากับ 2.9 $\log_{10}$ CFU/g ถึง 5.4 $\log_{10}$ CFU/g ช่วงที่มีปริมาณเชื้อค่อนข้างสูง คือช่วงเดือนมีนาคม – กรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงหน้าร้อน ปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 4 - 5 $\log_{10}$ CFU/g นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อ *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ด้วย โดยปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ตรวจพบตั้งแต่ < 3 ถึง 93 MPN /g และ *V. parahaemolyticus* ตั้งแต่ < 3 ถึง 23 MPN /g

2. ลักษณะของกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจวิเคราะห์วัตถุดิบปลาหมึกในห้องปฏิบัติการภายในโรงงาน พบว่า แบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างกลม (Cocci shape) แกรมบวก รูปร่างท่อน (Rod shape) มีทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ส่วนกลุ่มที่พบมากที่สุด และใช้เป็นตัวแทนในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ แบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างท่อนสั้น (rod shape) ย้อมติดสีแกรมลบ

3. การศึกษาประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria), *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 2.73 x 10^6 CFU/ml (หรือ6.44 $\log_{10}$ CFU/ml), 2.38 x 10^5 CFU/ml (หรือ5.38 $\log_{10}$ CFU/ml) และ 3.45 x 10^5CFU/ml (หรือ5.54 $\log_{10}$CFU/ml) ตามลำดับในหลอดทดลอง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาณจุลินทรีย์แต่ละชนิดในหลอดทดลอง คือ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm อุณหภูมิของสารละลาย 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 วินาที โดยมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด *E. coli* และ *V. parahaemolyticus*ได้สูง เท่ากับ 26.4 %, 25.4 % และ 28.3 % ตามลำดับ

4. ผลของเปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) เชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish filletโดยเนื้อปลาหมึกกระดองแต่ละชนิดจะถ่ายเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปริมาณ เท่ากับ 1.33 x 10^5 CFU/g (หรือ5.12 $\log_{10}$CFU/g), 2.45 x 10^5 CFU/g (หรือ5.39 $\log_{10}$CFU/g) และ 1.75 x 10^5 CFU/g (หรือ5.24 $\log_{10}$CFU/g) ตามลำดับ ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เท่ากับ 50 ppm ระยะเวลาสัมผัสนานเท่ากับ 60 วินาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อ *E. coli* และ เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cutได้สูงเท่ากับ 30.4 %, 31.7% และ 27.0 % ตามลำดับ, Cuttlefish fillet slit เท่ากับ 31.0%, 37.2% และ 45.4 % ตามลำดับ และใน Cuttlefish fillet เท่ากับ 36.8 %, 60.7% และ 58.8 % ตามลำดับ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวไม่มีผลกระทบกับคุณภาพของสินค้าทั้งในเรื่องของกลิ่น และการตกค้างของคลอรีนในเนื้อปลาหมึก

ในการพิจารณาประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ว่าเพียงพอที่จะลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อปลาหมึกให้อยู่ในระดับที่กฎหมายกำหนดหรือลูกค้ายอมรับนั้นต้องพิจารณาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วย หากปริมาณเชื้อเริ่มต้นในวัตถุดิบมีปริมาณมาก อาจต้องเพิ่มระยะเวลาในการล้าง หรือเพิ่มขั้นตอนการล้างมากกว่า 1 ครั้ง ซึ่งการเพิ่มเวลาในการล้าง หรือเพิ่มขั้นตอนการล้างจะก่อให้เกิดผลเสีย ในเรื่องของค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น กระบวนการผลิตล่าช้า(Delay) โอกาสของการปนเปื้อนเพิ่มขึ้น ของเสียมากขึ้น และ คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ด้อยลง ดังนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาแนวทางในการควบคุม หรือลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นในวัตถุดิบ การป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และการป้องกันการปนเปื้อนข้ามในระหว่างกระบวนการผลิต โดยอาศัยระบบการประกันคุณภาพการผลิต เริ่มตั้งแต่การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบ ทราบแหล่งที่มาของวัตถุดิบ ตรวจวัดอุณหภูมิวัตถุดิบเมื่อมาถึงโรงงาน ความสะอาดของภาชนะที่ใส่ ความเหมาะสมของการขนส่งเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เมื่อรับวัตถุดิบเข้าสู่โรงงานควรมีมาตรการในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในเบื้องต้น โดยการล้างทำความสะอาด และมีการป้องกันการปนเปื้อน รวมถึงป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยปฏิบัติตามหลักสุขลักษณะที่ดีในการผลิต (Good Manufacturing Practice; GMP) และมีการสุ่มตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่สะอาด นำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพได้มาตรฐานของสินค้า และความพึงพอใจของลูกค้า

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2547. คู่มือสุขลักษณะในการผลิตผลิตภัณฑ์ประมง.กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ.ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 71 หน้า.

กัลยาณี ดีประเสริฐวงศ์. 2540. ผลของแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ต่อการลดปริมาณ *Staphylococcus aureus* ในจุดควบคุมวิกฤติของกระบวนการผลิตลูกชิ้นปลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

กรมศุลกากร. (2547). กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง . 25 หน้า.

จารุวัฒน์ นภีตะภัฏ. 2538. ชีววิทยาและการเพาะเลี้ยงปลาหมึก.สถานีเพาะเลี้ยงชายฝั่งจังหวัดระยอง กรมประมง. 15 หน้า.

เจิดจินดา โชติยะปุตตะ. 2536. เอกสารการประกอบคำบรรยายในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการชีววิทยาและการเพาะเลี้ยงปลาหมึก. ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยตอนบน กองประมงทะเล,ระยอง. 8 หน้า.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541.จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ ฯ. 735 หน้า.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2544. หลักการแปรรูปอาหารเบื้องต้น.โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 160 หน้า.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2543. คลอรีนอิสระที่มีอยู่ FAC (Free Available Chlorine). ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 4 หน้า.

บุษกร ปาละกูล. 2536. ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการลดปริมาณ *Salmonella* Typhimuriumในกุ้งก่อนกระบวนการแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ.

มาลา สุพงษ์พันธ์. 2536. ทรัพยากรปลาหมึกในอ่าวไทย. เอกสารประกอบการสัมนา ฟื้นฟูทะเลไทย ณ ศูนย์การพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยตอนบน,ระยอง. 12 หน้า.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2545. ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ. 316 หน้า.

รุ่งทิวา อิศรางพร. 2541 . การเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimurium. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ.

รัตนา สุขสรรค์. 2535. เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ. 17 หน้า

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร.โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 209 หน้า.

วิไล รังสาดทอง. 2543. เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร. ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. กรุงเทพ ฯ. 401 หน้า.

สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย. 2545. รายงานการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป. กรุงเทพ ฯ. 170 หน้า.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. การสุขาภิบาลอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพ ฯ.

สุวิมล กีรติพิบูล. 2546. จุลินทรีย์กับการควบคุมสุขลักษณะการผลิตอาหารในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. สำนักพิมพ์ ส.ส.ท. กรุงเทพ ฯ. 160 น.

สุวิมล กีรติพิบูล และ บัณฑิต ประดิษฐานุวงษ์. 2545. การควบคุมจุลินทรีย์ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ ส.ส.ท. กรุงเทพ ฯ. 136 น.

อัจฉรา พุ่มฉัตร. 2537. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง. เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาประมง . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ. 26 หน้า.

อนุวัฒน์ นทีวัฒนา. 2536. เอกสารการประกอบคำบรรยายในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการชีววิทยาและการเพาะเลี้ยงปลาหมึก. ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยตอนบน กองประมงทะเล,ระยอง. 6 หน้า.

Abdel-Rahman, M.S.1985. Pharmacokinetics of Chlorine Obtained from Chlorine Dioxide, Chlorine, Chloramine and Chloride, pp.281-293. *In* R.L.Jolley, R.J. Bull, W.P Davis, S. katz, M.H. Roberts,Jr. and V.A.Jacobs (eds). Water Chlorination Environmental Impact and Health Effects. Vol.5. Ann Arbor Science Publishers, Inc., Michigan.

Adams, M.R., A.D. Hartley and L.J. Cox. 1989. Factors Affecting the Efficacy of Washing Procedures Used in the Production of Prepared Salads. Food Microbiol. 6: 69-77.

Albrecht, J. A., F.L. Hamouz and S.S. Sumner. 1995. Microbial Evaluation of Vegetable Ingredients in Salad bars. J. Food Prot. 58: 683 – 685.

Ames, B.N. 1979. Identifying Environment Chemicals Causing Mutations and Cancer. Science 204: 587-593.

Anonymous. 1987. FDA Continues to Find *Listeria* during Dairy Plant Inspections, p. 622. *Cited by* S.E. EI-Kest and E.H. Marth. Temperature, pH and Strain of Pathogen as Factors Affecting Inactivation of *Listeria monocytogenes* by Chlorine. J. Food Prot. 51: 622-625.

Baker, J.C. 1926. Chlorine in Sewage and Waste Disposal, p.107. Cited by C.I. Wei, D.L. Cook and J.R. Kirk. Use of Chlorine Compounds in the Food Industry. Food Technol. 39: 107-115.

Bacteriological Analytical Manual Online January, 2001. http://www.cfsan.fda.gov/~ ebam/bam-toc.html

Baross, J. and J. Liston. 1970. Occurrence of *V. parahaemolyticus* and Relate Hemolyticus Vibrio in Marine Environments of Washington State. Appl. Microbiol. 20: 179-186.

Benarde, M.A., B.M. Israel and V.P. Olivieri. 1965. Efficiency of Chlorine Dioxide as a Bactericide. Appl. Microbiol. 13: 776-781.

Beuchat. L. R. 1997. Comparison of Chemical Treatments to Kill Salmonella on Alfalfa Seeds Destined for Sprout Production. Int. J. Food Microbiol. 34:329 – 333.

Beuchat. 2000. Use of Sanitizers in Raw Fruit and Vegetable Processing ,pp. 64 – 67 In S.M. Alzamora, M. S. Tapia and A. Lo'pez-Malo(eds.). Minimally Processed Fruits and Vegetables. Aspen Publishers, Inc., Maryland.

Borick, P.M. 1968. Chemical Sterilizers, p. 524. *Cited by* S.E. EI-Kest and E.H. Marth. Inactivation of *Listeria mocytogenes* by Chlorine. J.Food Prot. 33: 520-524, 530.

Bolton, K.J., C.E.R. Doss, G.C. Mead and W.M.Waites. 1988. Chlorine Resistance of Strain of *Staphylococcus aureus* Isolated from Poultry Processing Plants. Appl. Microbiol. 6: 31-34.

Boyette. M. D., D. F. Ritchie, S. J. Carballo, S. M. Blankenship and D.C. Sanders.1993. Chlorination and Posharvest Disease Control. Hort. Technol. 3: 395 – 400.

Bryan, F.L., M.J. Fanelli and H. Riemann.1979. *Salmonella* Infection, pp. 74-130. *In* H. Riemann and F.L. Bryan (eds.). Food-borne Infections and Intoxications.Academic Press, Inc., London.

Butterfied, C.T., E. Wattie, S. megregian and C.W. Chambers. 1943. Influence of pH and Temperature on the Survival of *Coliforms* and Enteria Pathogens When Exposed to Free Chlorine, p. 524. *Cited by* S.E. EI-Kest and E.H. Marth. Inactivation of *Listeria mocytogenes* by Chlorine. J. Food Prot. 8: 430-434, 440.

Caldwell, D.R. 1990. Analysis of Biofilm Formation : Confocal Laser Microscopy and Computer Image Analysis. *In* Sanitizer : Halogens, Surface-Active Agents and Peroxides. *Cited by* P.M. Davidson and A.L. Branen. Antimicrobials in Foods. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Campers, A.K. and G.A. McFeters.1979. Cholrine Injury and the Enumeration of Waterborne Coliform Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 37: 633-641.

Cheremisinoff, N.P., P.N. Cheremisnoff and R.B.Trattner. 1981. Chemical and Non-chemical Disinfection. Ann Arbor Science Publishers,Inc., Michigan.172 pp.

Codex Committee on Fish and Fishery Products. 2000. The Use of Chlorine in Fish Processing. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Discussion Paper on The Use of Chlorinated Water.Agenda Item 13.CX/FFP 00/13 World Health Organization, Geneva.

Condie, L.W. 1986. Toxicological Problems Associated with Chlorine Dioxide. J. Amer. Water Works. Assoc. 78: 73–78.

Cords, B.R. and G.R. Dychdala. 1993. Sanitizers : Halogens, Surface-Active Agents, and Peroxides, pp.469 – 537. *In.* P. M. Davidson and A. L. Branen (eds.). Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker, Inc., New York.

Cunningham, H.M. 1980. Toxicology of Compounds Resulting from the Use of Chlorine in Food Processing, pp. 995 –1005. *In.* R.L. Jolley ,W.A. Brungs, R.B. Cumming and V.A. Jacobs(eds). Water Chlorination Environmental Impact and Health Effects. Vol.3. Ann Arbor Science Publishers,Inc.,Michigan.

Cutter, C.N. and G.R. Siragusa. 1995. Application of Chlorine to Reduce Populations of *Escherichia coli* on Beef. J.Food Safety. 15: 67-67 (Abstr.).

Dychdala, G. R. 1968. Chlorine and Chlorine Compounds, pp 278 – 304. *In.* C.A. Lawrence and S.S. Block (eds.). Disinfection, Sterilization and Preservation. Lea & Febiger. Philadelphia.

Escudero, M. E., L. Velazquez, M.S. di Genaro and A.M.S. de Guzman.1999. Effectiveness of Various Disinfectants in the Elimination of *Yersinia enterocolitica* on Fresh Lettuce. J. Food Prot. 62: 665 – 669.

Foegesing, P.M. 1983. Bacterial Spore Resistance to Chlorine Compounds. Food Technol. 18: 100-103, 110.

Fujio, I.1984. Shin Shokuhin koujyo no Eisei Nyuumon Kouza Series No.2 Shokuhin Koujyo no Biseibutsu Seigyo,Vol.1 , No. 1 , 87 p.

Gardner, J.F. and M.M. Peel. 1991. Introduction to Sterilization, Disinfection and Infection Control. 2nd ed., Churchill Livingstone, New York. 264 p.

Garg, N., J.J. Churey and D.F. Splittstoesser. 1990. Effect of Processing Conditions on the Microflora of Fresh-cut Vegetables. J. Food Prot. 53: 701 – 703.

Gelinas, P., J. Goulet, G.M. Tastayre and G.A. Picard. 1984. Effect of Temperature and Contact Time on the Activity of Eight Disinfectants-a Classification. J. Food Prot. 47: 841-847.

Green, D. E. and P.K. Stumof. 1946. The Mode of Action of Chlorine, p. 107. Cited by C.I. Wei, D.L. Cook and J. R. Kirk. Use of Chlorine Compounds in the Food Industry. Food Technol. 39: 107-115.

Hays, H.A., P.R. Elliker and W.E. Sandine. 1967. Microbial Destruction by Low Concentrations of Hypochlorite and Iodophor Germicides in Alkaline and Acidified Water. Appl. Microbiol. 55: 575- 577.

Hekmati, M. and R.L. Bradley. 1979. Effect of Milk Constituents on the Persistence of Sodium Hypochlorite Sanitizer. J. Dairy Sci. 62: 47-52.

Ito, K.A. and M.L. Seeger. 1980. Effects of Germicides on Microorganisms in Can Cooling Water. J. Food Prot. 43: 484-487.

Johns, C.K. 1954. Iodophors as Sanitizing Agents. Can. J. Technol. 32: 71-72.

Kirk, J.R. and S.K. Michell.1980. Risks and Benefits Associated with Chlorine in the Food Industry, pp 284 – 304. *In.* R.L. Jolley , W. D. Burngs, R. B. Cumming and V.A. Jacobs(eds.). Water Chlorination Environmental Impact and Health Effect. Vol. 3. Ann Arbor Science Publishers,Inc., Michigan.

Kotula, K.L., A.W. Kotula, B.E. Rose, C.J. Pierson and M. Camp. 1997. Reduction of Aqueous Chlorine by Organic Material. J. Food Prot. 604: 276 -282.

Lopes, J.A. 1986. Evaluation of Dairy and Food Plant Sanitizers Against *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. J. Dairy Sci. 69: 2791-2796.

Linton, J., J.R. Mathches and J. Baross. 1971.Survival and Growth of Pathogenic Bacteria in Seafoods, pp. 246-249. In R. Kreuzer (ed). Fish Inspection and Quality Control. Fishing News Ltd., London.

Lykins, W.B., Jr. and M.H. Griese. 1986. Using Chlorine Dioxide for Trihalomethane Control. J. Amer. Water Works Assoc. 78: 88-93.

Macreae, R., R.K. Robinson and M.J. Sadler. 1993. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press Ltd., New York. 424 pp.

Marriot, N.G.1999. Principles of Food Sanitation. 4 th ed. Aspen Publishers, Inc., Maryland. 364 pp.

Mosley, E.B., P.R. Elliker and H. Hay. 1976. Destruction of Food Spoilage Indicator and Pathogenic Organisms by Various Germicides in Solution and on a Stainless Steel Surface. J. Food Prot. 40: 830-835.

Morris, J.C. 1966. The Acid Ionization Constant of HOCl from 5 ^{o}C to 35 ^{o}C.108 p. Cited by C.I. Wei, D.L. Cook and J.R. Kirk. Use of Chlorine Compounds in the Food Industry. Food Technol. 1: 107-115.

Noack , M.G. and R.L. Doerr. 1978. Reaction of Chlorine, Chlorine Dioxide and Mixtures Thereof with Humic acid : an Interim Report, pp. 49-58. *In.* R.L. Jolley, H. Gerchev and D.H. Hamilton ,Jr.(eds.) Water Chlorination Environtmental Impact and Health Effects. Vol.2. Ann Arbor Science Publishers, Inc., Michigan.

Odlaug, T.E. 1981. Antimicrobial Activity of Halogens. Food Prot. 45: 608-615.

Park, D.L., S.M. Rua and R.F. Acker.1991. Direct Application of a New Hypochlorite Sanitizer for Reducing Bacterial Contamination on Food. J. Food Prot. 53: 960 – 965.

Piemas, V. and J.P. Guiraud.1997. Disinfection of Rice Seeds Priot to Sprouting. J. Food Sci. 62: 611 – 615.(Abstr.).

Rudolph, D.S. and M. Levine.1941. Factors Affecting the Germicidal Efficiency of Hypochlorite Sulutions, p.107. Cited by C.I. Wei, D.L. cook and J.R. Kirk. Use of Chlorine Compounds in the Food Industry. Food Technol. 20: 107-115.

Rushing , J. 1986. Harvesting and Handling South Carolina Vegetable: Water Chlorination, pp. 398. Cited by M.D. Boyette, D.F. Ritchie, S.J.carballo, S.M. Blankenship and D.C. Sanders. Chlorination and Posthavest Disease Control. Hort. Technol. 3: 395-400.

Suzuki, K., T. Mizoto, M. Makino and M. Tomito. 1996. Comparison of Germicidal Activity between Electrically Acidified Water and Acidified Sodium Hypochlorite Solution – Jap. J. Food Microbiol. 13: 127–131. (Abstr.).

Tamblyn. K.C. and D.E. Conner. 1997. Bacteria Activity of Organic acid Against *Salmonella* typhimurium Attached to Broiler Chicken Skin. J. Food Prot. 60: 629-633.

The American Water Works Association, Inc. 1971. Water Quality and Treatment. McGrew – Hill Book Company, New York. 654 pp.

Torriani, S. and S. Massa . 1994. Bacteriological Survey on Ready-to-use Sliced Corrots. Lebensmittel Wissenschaft und Technologic. 27: 487 – 490. (Abstr.).

Trueman, J.R. 1971. The Halogens, pp. 137 –183. *In.* W.B. Hugo(ed.).Inhibition and Destruction of the Microbial Cell. Academic Prees, London.

Ubldi-Eiroa,M.N. and E. Porto. 1995. Evaluation of Different Chlorine Based Dissinfectants and Vinegar Against *Vibrio cholerae* Present in Lettuce. Coletanea do Instituto de Technologia de Alimentos. 25: 169 – 172. (Abstr.).

Watson, P. and P. Prout. 1996. Technical Development to Improve Hygine in the Inshore Shrimp Industry. Seafish Report Number SR 466, The Sea Fish Industry Authority, UK.

Wei, C.I., D.L. Cook and J.R. Kirk. 1985. Use of Chlorine Compounds in the Food Industry. Food Technol. 20: 107–115.

White,G.C. 1992 . The Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants. Van Nostrand Reinhold,New York . 888 pp.

Wyatt , L.R. and W.M. Waites. 1975 . The Effect of Chlorine on Spores of *Chlostridium bifermentans, Bacilus subtilis* and *Bacillus cereus* . J. Gen. Micribiol. 89: 337–340.

Zhang , S. and J.M. Farber. 1996. The Effects of Various Disinfectants Against *Listeria monocytogenes* on Fresh – cut Vegetables. Food Microbiol. 13: 311-321.

ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์

การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ (Stock culture solution)

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด; BAM (2001)

1.1 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria)

สุ่มตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าโรงงาน

↓

ชั่งตัวอย่างปลาหมึก จำนวน 50 กรัม

↓

เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 450 มิลลิลิตร

↓

ใส่ในเครื่องตีป่นตัวอย่าง (Stomacher) นาน 1 นาที

↓

ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1: 10 เท่า ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

↓

ใส่ในขวดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

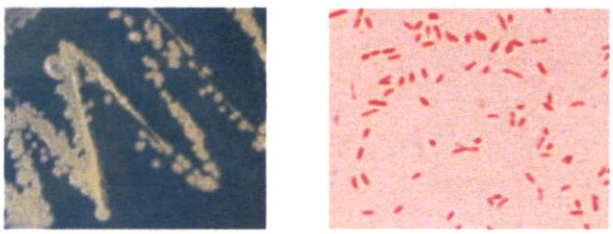
↓

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

คัดเลือกลักษณะโคโลนีเพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา

1.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเพื่อใช้ในการทดลองคือ เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว เซลล์รูปร่างเป็นท่อนสั้น ย้อมติดสีแกรมลบ ดังภาพผนวกที่ 1



ภาพผนวกที่ 1 : ลักษณะของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

จากนั้นนำเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าว เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บ Stock ที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อเดือนละครั้ง

1.3 การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์

ถ่ายเชื้อจาก Nutrient agar (NA) ในข้อ 1.1.2 ปริมาณ 1 ลูป

↓

ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) slant

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ถ่ายเชื้อจาก TSA slant ปริมาณ 1 ลูป

↓

ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ปิเปตสารละลายที่มีเชื้อเจริญอยู่ 10 มิลลิลิตร

↓

ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBปริมาณ 90 มิลลิลิตร

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml

↓

นำไปเจือจางในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml และ 10^5 CFU/ml เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การเตรียมสารละลายเชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์; BAM (2001)

การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ เชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการทดลองได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร NA slant จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ปริมาณ 1 ลูป

↓

ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA slant

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ถ่ายเชื้อจาก TSA slant ปริมาณ 1 ลูป

↓

ใส่ลงในลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulfate tryptose broth (LST) ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ปิเปตสารละลายที่มีเชื้อเจริญอยู่ 10 มิลลิลิตร

↓

ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LSBปริมาณ 90 มิลลิลิตร

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml

↓

นำไปเจือจางในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์
ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/ml และ 10^4 CFU/ml เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การเตรียมสารละลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* บริสุทธิ์; BAM (2001)

การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ เชื้อ *V. pahaemolyticus* ที่ใช้ในการทดลองได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารNutrient agar (NA) + 3 % Salt จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปริมาณ 1 ลูป

↓

ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + 3 % NaCl slant

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ถ่ายเชื้อจาก TSA + 3 % NaCl slant ปริมาณ 1 ลูป

↓

ใส่ลงในลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB+ 3 % NaCl ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ปิเปตสารละลายที่มีเชื้อเจริญอยู่ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

↓

ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 3 % NaCl ปริมาณ 90 มิลลิลิตร

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml

↓

นำไปเจือจางในสารละลาย Alkaline peptone water ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^5 และ 10^4 CFU/ml เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ภาคผนวก ข.

วิธีวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

วิธีวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ; BAM (2001)

1.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัม เติม Peptone dilution 0.1 % จำนวน 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Stomacher

1.2 เจือจางตัวอย่างอาหาร 1: 10 ด้วย Peptone dilution 0.1 % จนได้ความเจือจางที่ต้องการ

1.3 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจางต่าง ๆ กันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ โดยทำความเจือจางละ 2 จาน

1.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อ จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันตั้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

1.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.6 การอ่านผล คัดเลือกจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25 -250 โคโลนี

1.7 หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ แล้วคูณด้วยค่า dilution factor ของความเจือจางที่นับได้ คำนวณเป็นจำนวนโคโลนีที่พบในตัวอย่าง 1 กรัม

2. การตรวจวิเคราะห์ *E. coli* โดยวิธี MPN ; BAM (2001)

2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัม เติม Peptone dilution 0.1 % จำนวน 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Stomacher

2.2 เจือจางตัวอย่างอาหารด้วย Peptone dilution 0.1 % 1: 10 0 และ 1: 1000 ตามลำดับ

2.3 ปิเปตสารละลายตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulfate tryptose broth (LST) ที่มีหลอดดักก๊าซ (durham's tube) ความเจือจางละ 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

2.4 สังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซในแต่ละหลอด ถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซ 1 ลูป ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ ถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซ 1 ลูป ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth (EC)หลอดต่อหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.5 ใช้ loop ถ่ายเชื้อจากหลอด EC broth ที่เกิดก๊าซทุกหลอด streak ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Levine's eosin-methylene blue (L-EMB) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6 อ่านผล สังเกตลักษณะโคโลนีของ *E .coli* บน L-EMB agar ซึ่งจะมีโคโลนีที่มีสีเข้มตรงกลาง และมีสีวาวโลหะ (Metallic sheen)

2.7 นำโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าว ไปทดสอบ IMViC

2.8 บันทึกผลการทดสอบ IMViC เป็น ++-- หรือ -+--

2.9 คำนวณหาค่า MPN จากตาราง รายงานผลเป็น MPN *E. coli* ต่อกรัมของตัวอย่าง

3. การตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus* ; BAM (2001)

3.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัม เติม Peptone water + 3% salt จำนวน 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Stomacher

3.2 เจือจางตัวอย่างอาหาร 1: 10 0 และ 1: 1000 ตามลำดับ ด้วย Peptone water + 3% salt

3.3 ปิเปตสารละลายตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline peptone water (APW) ความเจือจางละ 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18ชั่วโมง

3.4 ใช้ loop ถ่ายเชื้อจากแต่ละหลอดในบริเวณที่ต่ำกว่าผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองประมาณ 1 เซนติเมตร streak ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5 อ่านผลโดยสังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar มีลักษณะกลม มีสีเขียว หรือน้ำเงินอมเขียว และมีลักษณะหนืดเหนียว

ภาคผนวก ค.

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

ปิเปตสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มี Active chlorine 10 % ในระดับความเข้มข้นที่ต้องการลงในน้ำประปา คนกวนให้เข้ากัน ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เติมลงในน้ำประปา แสดงดังตารางผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ 1: ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เติมลงในน้ำประปาปริมาตร 50 ลิตร

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ต้องการ (ppm)	ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ml)
2	1
10	5
25	12.5
50	25
75	37.5
100	50
200	100

หมายเหตุ : ปริมาตรน้ำประปาที่ใช้ในแต่ละความเข้มข้นให้ลบจำนวนปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เติม เช่น เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 50 ppm ต้องปิเปตสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 25 ml เติมลงในน้ำประปา 49.975 ลิตร หรือ 49975 ml

2. การคำนวณหาปริมาตรการเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

คำนวณหาปริมาณคลอรีนที่ใช้ผสมในน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ คำนวณได้ดังนี้

ถ้าต้องการเตรียมน้ำที่มีคลอรีนเข้มข้น 50 ppm 500 ลิตร โดยใช้ โซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 10 % จะต้องใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์เท่าไร เปลี่ยนความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 % ให้เป็น ppm

$$10\ \% = \frac{10 \times 1{,}000{,}000}{100} = 100{,}000\ \text{ppm}$$

คำนวณปริมาณโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ โดยใช้สูตร

$$50\ \text{ppm} \times 500\ \text{ลิตร} = 100{,}000\ \text{ppm} \times V$$

$$V = \frac{50 \times 500}{100{,}000} = 0.25\ \text{ลิตร}$$

ดังนั้น ต้องเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0.25 ลิตร หรือ 250 มิลลิลิตร ลงในน้ำ 499.75 ลิตร เพื่อให้ได้น้ำใช้ที่มีความเข้มข้นคลอรีน 50 ppm

ภาคผนวก ง.

เกณฑ์คุณภาพของวัตถุดิบปลาหมึกทางด้านจุลชีววิทยา (ร่าง)

เกณฑ์คุณภาพของวัตถุดิบปลาหมึกทางด้านจุลชีววิทยา (ร่าง)

จุลินทรีย์ต้องไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดต่อไปนี้

1. จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดต้องไม่เกิน 10^7 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมของหมึก แต่จะมีจำนวนจุลินทรีย์เกิน 10^6 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมของหมึกได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง
2. เอสเคอริเชียโคไล (*Escherichia coli*) กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ต้องไม่เกิน 500 ต่อตัวอย่าง 1 กรัมของหมึก แต่ขะมีค่า MPN เกิน 11 ต่อตัวอย่าง 1 กรัมของหมึกได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง
3. จำนวนวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส (*Vibrio parahaemolyticus*) ต้องไม่เกิน 103 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมของหมึก แต่จะมีจำนวน วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส เกิน 102 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมของหมึกได้ไม่เกิน 1 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง
4. จำนวนสตาฟีโลคอกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) ต้องไม่เกิน 104 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมของหมึก แต่จะมีจำนวน สตาฟีโลคอกคัส ออเรียส เกิน 103 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัมของหมึกได้ไม่เกิน 2 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง
5. ต้องไม่พบ ซาลโมเนลลา (Salmonella spp.) ในตัวอย่าง 25 กรัม

ภาคผนวก จ.

การย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining)

การย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining)

วัสดุและอุปกรณ์

1. สไลด์ ลวดเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์
2. สีที่ใช้ย้อม Crystal violet, Sarfanin O
3. สารละลายไอโอดีน, สารละลายแอลกอฮอล์ 95 %

วิธีปฏิบัติ

1. ทำความสะอาดสไลด์ และเช็ดให้แห้ง
2. เตรียมรอยเสมียร์ และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน
3. หยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอยเสมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
4. เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยเสมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที
5. เทสารละลายไอโอดีนทิ้งแล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95 % จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้นานเกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบา ๆ
6. ซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี Sarfanin O ให้ท่วมรอยเสมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
7. เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้ง
8. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ฉ.

ขั้นตอนการล้างปลาหมึกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

ขั้นตอนการล้างปลาหมึกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

1. ขั้นตอนการล้างปลาหมึก (เตรียมตัวอย่าง)

ปลาหมึกกระดองสด

↓

ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 50 ppm ครั้งที่ 1

↓

ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 50 ppm ครั้งที่ 2

↓

ล้างน้ำสะอาด ครั้งที่ 1

↓

ล้างน้ำสะอาด ครั้งที่ 2

↓

ล้างน้ำสะอาดครั้งที่ 3

↓

สะเด็ดน้ำ แล้วเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ

2. ขั้นตอนการล้างปลาหมึกเพื่อลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

ปลาหมึกกระดองสดที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

↓

ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm
โดยใช้มือคนกวนให้ทั่วถึง

↓

เก็บตัวอย่างตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต/ การตกค้างของไฮโปคลอไรท์

ภาคผนวก ช.

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ 2: ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/ml) ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25 ^{o}C

เวลา (วินาที) *	ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/ml) ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด **														
	0°C					10°C					25°C				
	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 Ppm
5	0.08^{e}_{z}	0.22^{d}_{y}	0.68^{c}_{w}	0.68^{c}_{w}	0.54^{d}_{x}	0.57^{b}_{y}	0.65^{b}_{xy}	0.92^{d}_{w}	0.83^{c}_{wx}	0.77^{c}_{wxy}	0.42^{c}_{x}	0.73^{c}_{w}	0.99^{b}_{w}	0.87^{c}_{w}	0.77^{c}_{w}
10	0.14^{e}_{y}	0.36^{c}_{x}	0.72^{bc}_{w}	0.70^{bc}_{w}	0.62^{c}_{w}	0.89^{ab}_{xy}	1.02^{ab}_{wx}	1.11^{c}_{w}	0.88^{c}_{xy}	0.79^{c}_{y}	0.50^{bc}_{y}	0.98^{b}_{wx}	1.01^{b}_{w}	0.95^{c}_{wx}	0.81^{c}_{x}
15	0.19^{de}_{z}	0.43^{bc}_{y}	0.79^{bc}_{w}	0.72^{bc}_{wx}	0.66^{bc}_{x}	0.90^{ab}_{y}	1.07^{ab}_{wx}	1.13^{bc}_{w}	0.92^{c}_{xy}	0.89^{bc}_{y}	0.56^{bc}_{x}	1.04^{ab}_{w}	1.03^{b}_{w}	0.98^{bc}_{w}	0.87^{c}_{w}
20	0.31^{cd}_{x}	0.45^{bc}_{x}	0.80^{abc}_{w}	0.78^{bc}_{w}	0.68^{bc}_{w}	0.98^{ab}_{xy}	1.15^{ab}_{wx}	1.19^{bc}_{w}	1.10^{b}_{wxy}	0.94^{bc}_{y}	0.59^{bc}_{x}	1.04^{ac}_{w}	1.07^{ab}_{w}	1.00^{bc}_{w}	0.94^{c}_{w}
30	0.40^{bc}_{x}	0.49^{bc}_{x}	0.81^{abc}_{w}	0.80^{abc}_{w}	0.71^{b}_{w}	1.00^{ab}_{x}	1.21^{a}_{wx}	1.30^{b}_{w}	1.19^{ab}_{wx}	1.10^{bc}_{wx}	0.62^{bc}_{x}	1.12^{ab}_{w}	1.12^{ab}_{w}	1.07^{bc}_{w}	1.06^{c}_{w}
45	0.52^{ab}_{x}	0.55^{ab}_{x}	0.83^{ab}_{w}	0.82^{ab}_{w}	0.73^{b}_{w}	1.27^{a}_{x}	1.34^{a}_{wx}	1.47^{a}_{w}	1.30^{a}_{wx}	1.21^{ab}_{x}	0.68^{bc}_{x}	1.15^{ab}_{w}	1.19^{ab}_{w}	1.23^{b}_{w}	1.38^{b}_{w}
60	0.59^{a}_{x}	0.66^{a}_{x}	0.90^{a}_{w}	0.91^{a}_{w}	0.81^{a}_{w}	1.35^{a}_{x}	1.48^{a}_{wx}	1.55^{a}_{w}	1.34^{a}_{x}	1.48^{a}_{wx}	0.71^{a}_{y}	1.27^{a}_{x}	1.70^{a}_{w}	1.61^{a}_{wx}	1.77^{a}_{w}

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ:เปรียบเทียบเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่แต่ละอุณหภูมิ

ตารางผนวกที่ 3: ปริมาณการลดลง (log_{10} CFU/g) ของเชื้อ *E. coli* ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25 °C

เวลา (วินาที) *	ปริมาณการลดลง (log_{10} CFU/ml) ของเชื้อ *E. coli* **														
	0°C					10°C					25°C				
	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 Ppm
5	0.26^{c}_{wx}	0.32^{e}_{wx}	0.42^{e}_{w}	0.19^{d}_{x}	0.17^{b}_{x}	0.40^{d}_{wx}	0.40^{d}_{wx}	0.43^{e}_{w}	0.22^{d}_{x}	0.28^{e}_{x}	0.50^{c}_{wx}	0.54^{a}_{xw}	0.61^{d}_{w}	0.27^{c}_{wx}	0.18^{c}_{x}
10	0.28^{c}_{y}	0.36^{de}_{x}	0.50^{de}_{w}	0.38^{d}_{x}	0.17^{b}_{z}	0.42^{cd}_{x}	0.52^{c}_{wx}	0.70^{d}_{w}	0.33^{cd}_{x}	0.47^{de}_{x}	0.65^{bc}_{wx}	0.71^{bc}_{wx}	0.79^{cd}_{w}	0.31^{c}_{x}	0.43^{c}_{wx}
15	0.36^{b}_{y}	0.40^{cde}_{x}	0.56^{d}_{w}	0.42^{cd}_{x}	0.22^{b}_{y}	0.53^{bc}_{x}	0.59^{bc}_{x}	0.97^{c}_{w}	0.37^{cd}_{x}	0.60^{d}_{x}	0.72^{bc}_{wx}	0.75^{bc}_{wx}	0.81^{cd}_{w}	0.37^{c}_{x}	0.63^{c}_{wx}
20	0.39^{b}_{y}	0.41^{cd}_{x}	0.69^{c}_{w}	0.45^{cd}_{x}	0.25^{b}_{y}	0.59^{ab}_{x}	0.62^{b}_{x}	1.00^{c}_{w}	0.58^{bc}_{x}	0.69^{d}_{x}	0.74^{bc}_{xy}	0.79^{bc}_{xy}	1.10^{bcd}_{w}	0.51^{bc}_{y}	0.86^{bc}_{wx}
30	0.44^{b}_{x}	0.48^{bc}_{xy}	0.72^{c}_{w}	0.68^{bcd}_{w}	0.52^{a}_{x}	0.61^{ab}_{x}	0.67^{ab}_{x}	1.07^{bc}_{w}	0.66^{bc}_{x}	1.18^{c}_{w}	0.81^{b}_{x}	1.23^{b}_{wx}	1.26^{abc}_{wx}	1.04^{abc}_{wx}	1.99^{ab}_{w}
45	0.44^{b}_{x}	0.50^{b}_{x}	0.99^{b}_{w}	0.72^{b}_{wx}	0.52^{a}_{x}	0.65^{a}_{x}	0.74^{a}_{x}	1.27^{ab}_{w}	0.81^{b}_{x}	1.50^{b}_{w}	1.30^{a}_{x}	1.37^{ab}_{x}	1.42^{ab}_{x}	1.31^{ab}_{x}	2.58^{a}_{w}
60	0.64^{a}_{x}	0.65^{a}_{x}	1.16^{a}_{w}	1.11^{a}_{w}	0.65^{a}_{x}	0.70^{a}_{y}	0.74^{a}_{y}	1.37^{a}_{x}	1.37^{a}_{x}	2.34^{a}_{w}	1.52^{a}_{x}	1.57^{a}_{x}	1.75^{a}_{x}	1.60^{a}_{x}	3.22^{a}_{w}

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ:เปรียบเทียบเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่แต่ละอุณหภูมิ

ตารางผนวกที่ 4: ปริมาณการลดลง (log_{10} CFU/g) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความ เข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25 ^{o}C

เวลา (วินาที) *	ปริมาณการลดลง (log_{10} CFU/ml) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* **														
	0°C					10°C					25°C				
	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 Ppm
5	0.97^{e}_{x}	0.97^{e}_{x}	1.03^{f}_{w}	0.69^{e}_{y}	0.39^{f}_{z}	1.05^{c}_{w}	1.05^{d}_{w}	1.06^{d}_{w}	0.98^{e}_{x}	0.85^{e}_{y}	1.06^{d}_{y}	1.12^{f}_{x}	1.29^{e}_{w}	0.82^{e}_{z}	0.81^{e}_{z}
10	1.01^{d}_{w}	1.03^{d}_{w}	1.07^{e}_{w}	0.81^{de}_{x}	0.47^{e}_{y}	1.07^{c}_{w}	1.08^{d}_{w}	1.12^{d}_{w}	0.99^{e}_{x}	0.95^{d}_{x}	1.13^{c}_{y}	1.20^{e}_{x}	1.34^{d}_{w}	1.15^{d}_{y}	0.91^{d}_{z}
15	1.05^{cd}_{wx}	1.08^{d}_{wx}	1.14^{d}_{w}	0.89^{d}_{x}	0.55^{d}_{y}	1.16^{b}_{xy}	1.14^{c}_{xy}	1.24^{c}_{w}	1.05^{d}_{y}	1.00^{de}_{y}	1.14^{c}_{z}	1.23^{e}_{y}	1.41^{c}_{w}	1.29^{c}_{x}	1.44^{c}_{w}
20	1.06^{c}_{y}	1.13^{c}_{x}	1.19^{c}_{w}	1.06^{c}_{y}	0.57^{d}_{z}	1.18^{b}_{x}	1.18^{bc}_{x}	1.29^{bc}_{w}	1.08^{c}_{y}	1.16^{c}_{x}	1.30^{b}_{y}	1.33^{d}_{x}	1.42^{c}_{w}	1.31^{bc}_{xy}	1.44^{c}_{w}
30	1.09^{bc}_{y}	1.16^{bc}_{wx}	1.20^{c}_{w}	1.12^{bc}_{xy}	0.99^{c}_{z}	1.19^{b}_{x}	1.20^{b}_{x}	1.32^{b}_{w}	1.14^{b}_{y}	1.17^{c}_{xy}	1.33^{b}_{y}	1.38^{c}_{x}	1.50^{b}_{w}	1.33^{bc}_{y}	1.50^{b}_{w}
45	1.11^{b}_{y}	1.20^{b}_{wx}	1.26^{b}_{w}	1.25^{b}_{w}	1.15^{b}_{xy}	1.22^{b}_{w}	1.26^{a}_{y}	1.35^{ab}_{x}	1.38^{a}_{wx}	1.41^{b}_{w}	1.39^{a}_{x}	1.43^{b}_{x}	1.52^{b}_{w}	1.36^{b}_{x}	1.55^{ab}_{w}
60	1.17^{a}_{x}	1.27^{a}_{w}	1.31^{a}_{w}	1.27^{a}_{w}	1.29^{a}_{w}	1.28^{a}_{y}	1.28^{a}_{y}	1.41^{a}_{x}	1.39^{a}_{x}	1.55^{a}_{w}	1.42^{a}_{y}	1.49^{a}_{xy}	1.57^{a}_{wx}	1.47^{a}_{y}	1.60^{a}_{w}

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ:เปรียบเทียบเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่แต่ละอุณหภูมิ

ตารางผนวกที่ 5: ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/g) ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับ ความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm อุณหภูมิ 10°C

เวลา (วินาที) *	ปริมาณการลดลง ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (log_{10}CFU/g) **														
	Cuttlefish dice cut					Cuttlefish fillet slit					Cuttlefish fillet				
	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm
5	0.15^{d}_{x}	0.17^{c}_{wx}	0.21^{d}_{w}	0.19^{c}_{wx}	0.18^{d}_{wx}	0.37^{d}_{xy}	0.57^{e}_{wx}	0.65^{d}_{w}	0.45^{b}_{wxy}	0.25^{d}_{y}	0.12^{b}_{x}	0.14^{f}_{x}	0.54^{c}_{w}	0.27^{d}_{x}	0.23^{c}_{x}
10	0.19^{cd}_{x}	0.23^{bc}_{wx}	0.55^{cd}_{w}	0.29^{c}_{wx}	0.26^{d}_{wx}	0.43^{cd}_{xy}	0.70^{de}_{wx}	0.77^{cd}_{w}	0.59^{ab}_{wxy}	0.28^{c}_{y}	0.17^{b}_{y}	0.44^{e}_{x}	0.70^{bc}_{w}	0.39^{cd}_{x}	0.34^{c}_{xy}
15	0.39^{cd}_{x}	0.40^{bc}_{x}	0.71^{c}_{w}	0.51^{bc}_{wx}	0.45^{cd}_{wx}	0.59^{bc}_{x}	0.92^{cde}_{w}	0.97^{bcd}_{w}	0.74^{ab}_{w}	0.32^{bc}_{x}	0.48^{b}_{y}	0.83^{d}_{xy}	1.37^{bc}_{w}	0.78^{cd}_{y}	0.73^{c}_{y}
20	0.56^{bcd}_{x}	0.68^{b}_{x}	1.08^{c}_{w}	0.80^{bc}_{wx}	0.85^{c}_{wx}	0.73^{bc}_{wx}	1.06^{cd}_{w}	1.14^{abcd}_{w}	0.80^{ab}_{wx}	0.39^{ab}_{x}	0.94^{b}_{x}	1.00^{d}_{x}	1.46^{bc}_{w}	1.16^{c}_{x}	1.15^{c}_{x}
30	0.67^{abc}_{x}	0.77^{a}_{x}	1.17^{b}_{w}	0.84^{ab}_{wx}	0.94^{b}_{wx}	0.82^{ab}_{wx}	1.23^{bc}_{w}	1.25^{abc}_{w}	0.98^{ab}_{wx}	0.48^{ab}_{x}	1.06^{a}_{x}	1.05^{c}_{x}	1.51^{b}_{w}	1.22^{b}_{wx}	1.25^{b}_{wx}
45	0.72^{ab}_{x}	0.85^{a}_{x}	1.25^{b}_{w}	0.91^{a}_{wx}	1.00^{a}_{wx}	0.99^{a}_{wx}	1.35^{ab}_{w}	1.42^{ab}_{w}	1.09^{ab}_{wx}	0.65^{ab}_{x}	1.16^{a}_{x}	1.21^{b}_{x}	1.62^{a}_{w}	1.35^{a}_{wx}	1.33^{a}_{wx}
60	0.95^{a}_{x}	1.00^{a}_{x}	1.42^{a}_{w}	0.99^{a}_{x}	1.05^{a}_{x}	1.18^{a}_{wx}	1.50^{a}_{w}	1.56^{a}_{w}	1.22^{a}_{wx}	0.85^{a}_{x}	1.25^{a}_{x}	1.30^{a}_{x}	1.71^{a}_{w}	1.43^{a}_{x}	1.47^{a}_{wx}

หมายเหตุ : ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut เท่ากับ 5.12 log_{10} CFU/g

ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish fillet slit เท่ากับ 5.39 log_{10} CFU/g

ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish fillet เท่ากับ 5.24 log_{10} CFU/g

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x และ y ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ : เป็นการเปรียบเทียบตามระดับความเข้มข้นเฉพาะชนิดของเนื้อปลาหมึก

ตารางผนวกที่ 6: ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/g) ของเชื้อ *E. coli* ในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm อุณหภูมิ 10°C

เวลา (วินาที) *	ปริมาณการลดลง ของเชื้อ *E. coli* (log_{10}CFU/g) **														
	Cuttlefish dice cut					Cuttlefish fillet slit					Cuttlefish fillet				
	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm
5	0.15^{d}_{x}	0.17^{c}_{wx}	0.21^{d}_{w}	0.19^{c}_{wx}	0.18^{d}_{wx}	0.37^{d}_{xy}	0.57^{e}_{wx}	0.65^{d}_{w}	0.45^{b}_{wxy}	0.25^{d}_{y}	0.12^{b}_{x}	0.14^{f}_{x}	0.54^{c}_{w}	0.27^{d}_{x}	0.23^{c}_{x}
10	0.19^{cd}_{x}	0.23^{bc}_{wx}	0.55^{cd}_{w}	0.29^{c}_{wx}	0.26^{d}_{wx}	0.43^{cd}_{xy}	0.70^{de}_{wx}	0.77^{cd}_{w}	0.59^{ab}_{wxy}	0.28^{c}_{y}	0.17^{b}_{y}	0.44^{e}_{x}	0.70^{bc}_{w}	0.39^{cd}_{x}	0.34^{c}_{xy}
15	0.39^{cd}_{x}	0.40^{bc}_{x}	0.71^{c}_{w}	0.51^{bc}_{wx}	0.45^{cd}_{wx}	0.59^{bc}_{x}	0.92^{cde}_{w}	0.97^{bcd}_{w}	0.74^{ab}_{w}	0.32^{bc}_{x}	0.48^{b}_{y}	0.83^{d}_{xy}	1.37^{bc}_{w}	0.78^{cd}_{y}	0.73^{c}_{y}
20	0.56^{bcd}_{x}	0.68^{b}_{x}	1.08^{c}_{w}	0.80^{bc}_{wx}	0.85^{c}_{wx}	0.73^{bc}_{wx}	1.06^{cd}_{w}	1.14^{abcd}_{w}	0.80^{ab}_{wx}	0.39^{ab}_{x}	0.94^{b}_{x}	1.00^{d}_{x}	1.46^{bc}_{w}	1.16^{c}_{x}	1.15^{c}_{x}
30	0.67^{abc}_{x}	0.77^{a}_{x}	1.17^{b}_{w}	0.84^{ab}_{wx}	0.94^{b}_{wx}	0.82^{ab}_{wx}	1.23^{bc}_{w}	1.25^{abc}_{w}	0.98^{ab}_{wx}	0.48^{ab}_{x}	1.06^{a}_{x}	1.05^{c}_{x}	1.51^{b}_{w}	1.22^{b}_{wx}	1.25^{b}_{wx}
45	0.72^{ab}_{x}	0.85^{a}_{x}	1.25^{b}_{w}	0.91^{a}_{wx}	1.00^{a}_{wx}	0.99^{a}_{wx}	1.35^{ab}_{w}	1.42^{ab}_{w}	1.09^{ab}_{wx}	0.65^{ab}_{x}	1.16^{a}_{x}	1.21^{b}_{x}	1.62^{a}_{w}	1.35^{a}_{wx}	1.33^{a}_{wx}
60	0.95^{a}_{x}	1.00^{a}_{x}	1.42^{a}_{w}	0.99^{a}_{x}	1.05^{a}_{x}	1.18^{a}_{wx}	1.50^{a}_{w}	1.56^{a}_{w}	1.22^{a}_{wx}	0.85^{a}_{x}	1.25^{a}_{x}	1.30^{a}_{x}	1.71^{a}_{w}	1.43^{a}_{x}	1.47^{a}_{wx}

หมายเหตุ : ปริมาณเชื้อ *E. coli* เริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut ท่ากับ 4.79 log_{10}CFU/g

ปริมาณเชื้อ *E. coli* เริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish fillet slit เท่ากับ 4.84 log_{10}CFU/g

ปริมาณเชื้อ *E. coli* เริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish fillet เท่ากับ 4.78 log_{10}CFU/g

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ : เป็นการเปรียบเทียบตามระดับความเข้มข้นเฉพาะชนิดของเนื้อปลาหมึก

ตารางผนวกที่ 7: ปริมาณการลดลง (log_{10}CFU/g) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm อุณหภูมิ 10°C

เวลา (วินาที) *	ปริมาณการลดลง ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* (log_{10}CFU/g) **														
	Cuttlefish dice cut					Cuttlefish fillet slit					Cuttlefish fillet				
	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm
5	0.24^{f}_{x}	0.60^{d}_{w}	0.80^{c}_{w}	0.22^{d}_{x}	0.19^{b}_{x}	0.19^{e}_{y}	0.59^{f}_{xy}	1.13^{c}_{w}	0.81^{b}_{wx}	0.71^{e}_{wx}	0.44^{d}_{y}	0.71^{e}_{x}	1.05^{e}_{w}	0.73^{e}_{x}	0.59^{d}_{xy}
10	0.65^{e}_{wx}	0.67^{c}_{wx}	0.86^{bc}_{w}	0.48^{d}_{xy}	0.24^{b}_{y}	0.60^{de}_{x}	0.81^{ef}_{wx}	1.64^{c}_{w}	1.32^{b}_{wx}	1.15^{d}_{wx}	0.84^{cd}_{x}	0.84^{de}_{x}	0.37^{d}_{w}	0.93^{de}_{wx}	1.29^{cd}_{wx}
15	0.75^{de}_{wx}	0.89^{c}_{w}	0.93^{ab}_{w}	0.55^{cd}_{xy}	0.32^{a}_{y}	0.86^{d}_{x}	1.00^{de}_{x}	1.69^{c}_{w}	1.50^{ab}_{w}	1.53^{cd}_{w}	0.99^{c}_{x}	1.44^{d}_{w}	1.61^{d}_{w}	1.55^{cd}_{w}	1.47^{c}_{w}
20	0.83^{cd}_{wx}	1.07^{bc}_{w}	1.08^{ab}_{w}	0.67^{bc}_{x}	0.48^{a}_{x}	0.97^{c}_{y}	1.18^{cd}_{y}	2.17^{bc}_{w}	1.64^{ab}_{x}	1.71^{cd}_{x}	1.06^{b}_{x}	1.66^{c}_{w}	1.71^{c}_{w}	1.67^{bc}_{w}	1.62^{b}_{w}
30	0.88^{bc}_{xy}	1.21^{ab}_{wx}	1.24^{ab}_{w}	0.85^{abc}_{y}	0.55^{a}_{y}	1.35^{bc}_{x}	1.40^{bc}_{x}	2.36^{ab}_{w}	1.67^{ab}_{x}	1.84^{c}_{wx}	1.65^{b}_{x}	1.94^{b}_{wx}	1.98^{bc}_{wx}	1.92^{b}_{wx}	2.06^{b}_{w}
45	0.96^{b}_{x}	1.37^{a}_{w}	1.37^{a}_{w}	1.03^{ab}_{x}	0.96^{a}_{x}	1.67^{b}_{x}	1.71^{ab}_{x}	2.58^{ab}_{w}	1.75^{ab}_{x}	2.05^{b}_{wx}	1.84^{b}_{y}	2.12^{a}_{x}	2.17^{b}_{x}	2.15^{a}_{x}	2.38^{a}_{w}
60	1.19^{a}_{y}	1.66^{a}_{wx}	1.68^{a}_{w}	1.08^{a}_{y}	1.28^{a}_{wxy}	1.85^{a}_{y}	1.91^{a}_{xy}	2.65^{a}_{w}	2.12^{b}_{x}	2.45^{a}_{y}	2.10^{a}_{x}	2.22^{a}_{x}	2.61^{a}_{x}	2.29^{a}_{x}	2.72^{a}_{w}

หมายเหตุ : ปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* เริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut เท่ากับ 4.56 log_{10} CFU/g

ปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* เริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish fillet slit เท่ากับ 4.36 log_{10} CFU/g

ปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* เริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish fillet เท่ากับ 4.44 log_{10} CFU/g

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x และ y ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ : เป็นการเปรียบเทียบตามระดับความเข้มข้นเฉพาะชนิดของเนื้อปลาหมึก

ตารางผนวกที่ 8: เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25°C ในหลอดทดลองที่ระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ

ระยะเวลาสัมผัส (วินาที) **	เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ณ อุณหภูมิ *														
	0°C					10°C					25°C				
	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 Ppm
5	1.4^{d}_{x}	3.5^{d}_{x}	10.5^{c}_{w}	9.0^{b}_{w}	8.3^{d}_{w}	8.9^{e}_{y}	10.1^{f}_{xy}	14.2^{f}_{w}	13.0^{c}_{wx}	12.0^{e}_{wxy}	6.5^{c}_{x}	11.3^{c}_{w}	15.4^{b}_{w}	13.5^{c}_{w}	11.9^{c}_{w}
10	2.2^{d}_{y}	5.6^{c}_{x}	11.2^{bc}_{w}	10.9^{ab}_{w}	9.7^{c}_{w}	13.9^{d}_{xy}	15.8^{e}_{wx}	17.2^{e}_{w}	13.6^{c}_{xy}	12.2^{c}_{y}	7.8^{bc}_{y}	15.2^{b}_{wx}	15.6^{b}_{w}	14.8^{c}_{wx}	12.7^{c}_{x}
15	2.9^{d}_{z}	6.6^{bc}_{z}	12.3^{abc}_{w}	11.2^{ab}_{wx}	10.3^{bc}_{y}	13.9^{d}_{y}	16.6^{de}_{wx}	17.5^{de}_{w}	14.2^{c}_{xy}	13.5^{bc}_{y}	8.7^{abc}_{x}	16.1^{ab}_{w}	16.0^{b}_{w}	15.3^{bc}_{w}	13.5^{c}_{w}
20	5.2^{c}_{x}	7.0^{bc}_{x}	12.4^{abc}_{w}	12.1^{ab}_{w}	10.5^{bc}_{w}	15.2^{c}_{xy}	17.8^{cd}_{wx}	18.5^{d}_{w}	17.0^{b}_{wxy}	14.5^{bc}_{y}	9.2^{abc}_{x}	16.2^{ab}_{w}	16.6^{b}_{w}	15.6^{bc}_{w}	14.6^{c}_{w}
30	6.2^{bc}_{x}	7.6^{bc}_{x}	12.5^{abc}_{w}	12.5^{a}_{w}	11.0^{b}_{w}	16.0^{c}_{x}	18.6^{c}_{wx}	20.1^{c}_{w}	18.7^{ab}_{wx}	17.1^{bc}_{wx}	9.6^{abc}_{x}	17.4^{ab}_{w}	17.4^{b}_{w}	16.6^{bc}_{w}	16.5^{c}_{w}
45	7.1^{ab}_{x}	8.6^{ab}_{x}	12.9^{ab}_{w}	12.7^{a}_{w}	11.3^{b}_{w}	19.7^{b}_{x}	20.9^{b}_{wx}	22.9^{b}_{w}	20.2^{a}_{wx}	18.8^{ab}_{x}	10.6^{ab}_{x}	17.9^{ab}_{w}	18.4^{b}_{w}	19.1^{b}_{w}	21.5^{b}_{w}
60	9.2^{a}_{x}	10.3^{a}_{x}	**14.0^{a}_{w}**	14.2^{a}_{w}	12.6^{b}_{w}	21.0^{a}_{x}	**22.9^{a}_{wx}**	24.0^{a}_{w}	20.8^{a}_{x}	22.9^{a}_{wx}	11.1^{a}_{y}	19.8^{a}_{x}	**26.4^{a}_{w}**	25.0^{a}_{wx}	27.5^{a}_{w}

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ :(1) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เริ่มต้น เท่ากับ 6.44 $\log_{10}$ CFU/ml

(2) เปรียบเทียบเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่แต่ละอุณหภูมิ

(3) ค่า SD (Standard deviation): 0°C ± 1.8 CFU/g, 10°C ± 0.9 CFU/g และ 25°C ±1.5 CFU/g

ตารางผนวกที่ 9: เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *E .coli* ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25°C ในหลอดทดลองที่ระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ

ระยะเวลาสัมผัส (วินาที) **	เปอร์เซนต์การลดลง ของเชื้อ *E. coli* ณ อุณหภูมิ *														
	0°C					10°C					25°C				
	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
5	4.9^{d}_{wx}	6.1^{e}_{wx}	7.8^{e}_{w}	3.6^{d}_{x}	3.1^{b}_{x}	7.4^{c}_{wx}	7.5^{d}_{wx}	7.9^{e}_{w}	4.1^{d}_{x}	5.2^{e}_{wx}	9.3^{c}_{wx}	10.0^{c}_{wx}	11.3^{d}_{w}	5.1^{b}_{wx}	3.4^{c}_{x}
10	5.2^{d}_{y}	6.6^{de}_{x}	9.2^{de}_{w}	7.0^{d}_{x}	3.2^{b}_{z}	7.8^{c}_{x}	9.6^{c}_{wx}	12.9^{d}_{w}	6.1^{cd}_{x}	8.8^{de}_{x}	12.1^{bc}_{wx}	13.1^{c}_{wx}	14.7^{cd}_{w}	5.8^{b}_{x}	7.9^{c}_{wx}
15	6.7^{c}_{x}	7.4^{cde}_{x}	10.3^{d}_{w}	7.8^{cd}_{x}	4.1^{b}_{y}	9.8^{b}_{x}	11.0^{bc}_{x}	18.0^{c}_{w}	6.8^{cd}_{x}	11.2^{d}_{x}	13.4^{bc}_{wx}	14.0^{c}_{wx}	15.1^{cd}_{w}	7.0^{b}_{x}	11.6^{c}_{wx}
20	7.2^{bc}_{x}	7.7^{cd}_{x}	12.8^{c}_{w}	8.3^{cd}_{x}	4.7^{b}_{y}	11.0^{ab}_{x}	11.5^{b}_{x}	18.6^{cd}_{w}	10.8^{bc}_{x}	12.9^{d}_{x}	13.8^{bc}_{xy}	14.6^{c}_{xy}	20.5^{cd}_{w}	9.4^{b}_{y}	16.0^{bc}_{wx}
30	8.1^{b}_{y}	8.9^{bc}_{xy}	13.4^{c}_{w}	12.6^{bc}_{w}	9.7^{a}_{x}	11.3^{ab}_{x}	12.4^{ab}_{x}	19.9^{bc}_{w}	12.2^{bc}_{x}	21.9^{c}_{w}	15.1^{b}_{x}	22.8^{b}_{wx}	23.4^{abc}_{wx}	19.4^{ab}_{wx}	37.0^{ab}_{w}
45	8.1^{b}_{x}	9.3^{b}_{x}	18.3^{b}_{w}	13.7^{b}_{wx}	9.6^{a}_{x}	12.1^{a}_{x}	13.7^{a}_{x}	23.6^{ab}_{w}	15.1^{b}_{x}	27.9^{b}_{w}	24.1^{a}_{x}	25.5^{ab}_{x}	26.4^{ab}_{x}	24.4^{a}_{x}	48.0^{a}_{w}
60	11.9^{a}_{x}	12.0^{a}_{x}	$\mathbf{21.6}^{a}_{w}$	20.7^{a}_{w}	12.1^{a}_{x}	12.9^{a}_{y}	13.7^{a}_{y}	25.4^{a}_{x}	25.5^{a}_{x}	$\mathbf{43.4}^{a}_{w}$	28.2^{a}_{x}	29.1^{a}_{x}	32.5^{a}_{x}	29.7^{a}_{x}	$\mathbf{59.8}^{a}_{w}$

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ :(1) ปริมาณเชื้อ *E. coli* เริ่มต้น เท่ากับ 5.38 $\log_{10}$ CFU/ml

(2) เปรียบเทียบเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่แต่ละอุณหภูมิ

(3) ค่า SD (Standard deviation): 0°C ± 0.8 CFU/g, 10°C ± 2.1 CFU/g และ 25°C ±2.2 CFU/g

ตารางผนวกที่ 10: เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 2 10 50 100 และ 200 ppm ที่อุณหภูมิ 0 10 และ 25°C ในหลอดทดลองที่ระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ

ระยะเวลาสัมผัส (วินาที) **	เปอร์เซนต์การลดลง ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ณ อุณหภูมิ*														
	0°C					10°C					25°C				
	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	2 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
5	17.5^{e}_{x}	17.5^{e}_{x}	18.6^{f}_{w}	12.2^{d}_{y}	7.0^{f}_{z}	19.0^{c}_{w}	19.0^{d}_{w}	19.1^{d}_{w}	17.7^{d}_{x}	15.3^{e}_{y}	19.1^{d}_{y}	20.2^{f}_{x}	23.3^{e}_{w}	14.8^{d}_{z}	14.6^{e}_{z}
10	18.2^{d}_{w}	18.6^{d}_{w}	19.3^{e}_{w}	14.6^{cd}_{x}	8.5^{e}_{y}	19.3^{c}_{w}	19.5^{d}_{w}	20.2^{d}_{w}	17.9^{d}_{x}	17.2^{e}_{x}	20.4^{c}_{y}	21.7^{e}_{x}	24.2^{d}_{w}	20.8^{c}_{y}	16.4^{d}_{z}
15	19.0^{cd}_{wx}	19.5^{d}_{wx}	20.6^{d}_{w}	16.1^{c}_{x}	9.9^{d}_{y}	20.9^{b}_{wx}	20.6^{c}_{wx}	22.4^{c}_{w}	19.0^{c}_{x}	18.1^{de}_{x}	20.6^{c}_{z}	22.2^{e}_{y}	25.5^{c}_{w}	23.3^{bc}_{x}	26.0^{c}_{w}
20	19.1^{c}_{y}	20.4^{c}_{x}	21.5^{c}_{w}	19.1^{b}_{y}	10.3^{d}_{z}	21.3^{b}_{x}	21.3^{bc}_{x}	23.3^{bc}_{w}	19.5^{c}_{y}	20.9^{cd}_{x}	23.5^{b}_{x}	24.0^{d}_{x}	25.6^{c}_{w}	23.7^{bc}_{x}	26.0^{c}_{w}
30	19.7^{bc}_{y}	20.9^{bc}_{wx}	21.7^{c}_{w}	20.2^{ab}_{xy}	17.9^{c}_{z}	21.5^{b}_{wx}	21.7^{bc}_{wx}	23.8^{b}_{w}	20.6^{b}_{x}	21.1^{bc}_{wx}	24.0^{b}_{wx}	24.9^{c}_{wx}	27.1^{b}_{w}	24.0^{abc}_{x}	27.1^{b}_{w}
45	20.0^{b}_{z}	21.7^{b}_{xy}	22.7^{b}_{w}	22.6^{a}_{wx}	20.8^{b}_{yz}	22.0^{ab}_{y}	22.7^{a}_{y}	24.4^{ab}_{x}	24.9^{a}_{wx}	25.5^{ab}_{w}	25.1^{a}_{x}	25.8^{b}_{x}	27.4^{b}_{w}	24.6^{ab}_{x}	28.0^{ab}_{w}
60	21.1^{a}_{x}	**22.9^{a}_{w}**	23.7^{a}_{w}	22.9^{a}_{w}	23.3^{a}_{w}	23.1^{a}_{y}	23.1^{a}_{y}	25.5^{a}_{x}	25.1^{a}_{x}	**28.0^{a}_{w}**	25.6^{a}_{y}	26.9^{ax}_{y}	**28.3^{a}_{wx}**	26.6^{a}_{y}	28.9^{a}_{w}

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย

หมายเหตุ :(1) ปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* เริ่มต้น เท่ากับ 5.54 $\log_{10}$ CFU/ml

(2) เปรียบเทียบเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่แต่ละอุณหภูมิ

(3) ค่า SD (Standard deviation): 0°C ± 0.4 CFU/g, 10°C ± 0.4 CFU/g และ 25°C ±0.4 CFU/g

ตารางผนวกที่ 11: เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm ณ อุณหภูมิ 10°C ในระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ

ระยะเวลาสัมผัส (วินาที) **	เปอร์เซนต์การลดลง ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อปลาหมึก *														
	Cuttlefish dice cut					Cuttlefish fillet slit					Cuttlefish fillet				
	10 ppm	**25 ppm**	**50 ppm**	**75 ppm**	**100 ppm**	**10 ppm**	**25 ppm**	**50 ppm**	**75 ppm**	**100 ppm**	**10 ppm**	**25 ppm**	**50 ppm**	**75 ppm**	**100 ppm**
5	7.2^{d}_{xy}	11.0^{e}_{xy}	12.6^{d}_{w}	8.8^{b}_{wxy}	4.9^{d}_{y}	2.1^{b}_{x}	2.6^{f}_{x}	10.1^{c}_{w}	5.0^{d}_{x}	4.3^{c}_{x}	2.9^{d}_{x}	3.2^{c}_{wx}	3.9^{d}_{w}	3.6^{c}_{wx}	3.4^{d}_{wx}
10	8.4^{d}_{xy}	13.7^{de}_{wx}	15.0^{cd}_{w}	11.4^{ab}_{wxy}	5.4^{cd}_{y}	3.2^{b}_{y}	8.2^{e}_{x}	12.9^{c}_{w}	7.3^{d}_{x}	6.4^{c}_{xy}	3.5^{cd}_{x}	4.4^{c}_{wx}	10.4^{c}_{w}	5.6^{c}_{wx}	4.9^{d}_{wx}
15	11.5^{cd}_{wx}	18.0^{cd}_{w}	19.0^{bcd}_{w}	14.5^{ab}_{w}	6.2^{cd}_{x}	8.9^{b}_{x}	15.4^{d}_{x}	26.5^{b}_{w}	14.5^{c}_{x}	13.5^{b}_{x}	7.4^{bcd}_{x}	7.5^{c}_{x}	13.5^{c}_{w}	9.8^{bc}_{wx}	8.6^{c}_{wx}
20	14.2^{bc}_{wx}	20.8^{bc}_{w}	22.3^{abcd}_{w}	15.7^{ab}_{wx}	7.6^{cd}_{x}	17.5^{a}_{x}	18.6^{c}_{x}	26.6^{b}_{w}	21.3^{b}_{x}	21.4^{a}_{x}	10.7^{abc}_{x}	12.9^{b}_{x}	20.5^{b}_{w}	15.2^{ab}_{wx}	16.2^{b}_{wx}
30	16.0^{bc}_{wx}	24.1^{abc}_{w}	24.4^{abc}_{w}	19.0^{ab}_{wx}	9.4^{bc}_{x}	19.7^{a}_{x}	19.5^{c}_{x}	28.0^{ab}_{w}	22.7^{ab}_{wx}	23.1^{a}_{wx}	12.8^{ab}_{x}	14.6^{ab}_{x}	22.2^{b}_{w}	16.0^{ab}_{wx}	18.0^{ab}_{wx}
45	19.4^{ab}_{wx}	26.4^{ab}_{w}	27.7^{ab}_{w}	21.3^{ab}_{wx}	12.6^{b}_{x}	21.5^{a}_{x}	22.4^{b}_{x}	30.1^{ab}_{w}	24.7^{ab}_{wx}	25.0^{a}_{wx}	13.8^{ab}_{x}	16.2^{ab}_{x}	23.8^{ab}_{w}	17.3^{a}_{wx}	19.2^{a}_{wx}
60	23.0^{a}_{x}	29.3^{a}_{w}	**30.4^{a}_{w}**	23.8^{a}_{xy}	16.6^{a}_{x}	23.2^{a}_{x}	24.1^{a}_{x}	**31.7^{a}_{w}**	26.6^{a}_{x}	27.3^{a}_{wx}	18.1^{a}_{x}	19.1^{a}_{x}	**27.0^{a}_{w}**	18.9^{a}_{x}	20.0^{a}_{x}

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ : (1) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และ Cuttlefish fillet เท่ากับ 5.12 $\log_{10}$ CFU/g, 5.39 $\log_{10}$ CFU/g และ 5.24 $\log_{10}$ CFU/g ตามลำดับ

(2) เปรียบเทียบเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่ล้างตัวอย่างปลาหมึกแต่ละลักษณะ

(3) ค่า SD (Standard deviation): Cuttlefish dice cut ± 2.8 CFU/g, Cuttlefish fillet slit ± 1.7 CFU/g และ Cuttlefish fillet ±1.7 CFU/g

ตารางผนวกที่ 12: เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* ในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm ณ อุณหภูมิ 10°C ในระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ

ระยะเวลาสัมผัส (วินาที) **	เปอร์เซนต์การลดลง ของเชื้อ *E. coli* ในเนื้อปลาหมึก *														
	Cuttlefish dice cut					Cuttlefish fillet slit					Cuttlefish fillet				
	10 ppm	**25 ppm**	**50 ppm**	**75 ppm**	**100 ppm**	**10 ppm**	**25 ppm**	**50 ppm**	**75 ppm**	**100 ppm**	**10 ppm**	**25 ppm**	**50 ppm**	**75 ppm**	**100 ppm**
5	7.7^{d}_{x}	8.0^{e}_{x}	9.7^{e}_{w}	2.6^{c}_{y}	2.3^{e}_{y}	2.7^{d}_{y}	9.5^{d}_{wxy}	16.1^{d}_{w}	12.1^{d}_{wx}	7.0^{d}_{xy}	8.3^{e}_{x}	18.4^{b}_{wx}	21.5^{e}_{w}	14.8^{d}_{wx}	11.3^{e}_{wx}
10	9.1^{d}_{wx}	13.0^{de}_{w}	11.1^{de}_{wx}	6.4^{c}_{wx}	5.0^{e}_{x}	4.3^{d}_{y}	14.7^{cd}_{wx}	20.3^{cd}_{w}	18.6^{cd}_{w}	10.1^{cd}_{xy}	11.4^{d}_{x}	22.6^{b}_{w}	23.1^{e}_{w}	17.1^{d}_{wx}	16.9^{de}_{wx}
15	12.9^{c}_{w}	15.7^{cd}_{w}	14.6^{d}_{w}	12.4^{b}_{w}	$5.7d^{e}_{x}$	7.4^{cd}_{y}	16.2^{cd}_{wx}	21.6^{c}_{w}	20.8^{bcd}_{w}	13.5^{cd}_{x}	12.7^{d}_{x}	24.3^{ab}_{w}	26.6^{de}_{w}	22.1^{cd}_{w}	21.7^{cd}_{w}
20	14.9^{c}_{w}	20.0^{bc}_{w}	19.6^{c}_{wx}	13.9^{b}_{yz}	9.7^{cd}_{z}	$9.5b^{cd}_{y}$	18.8^{bc}_{x}	26.2^{b}_{w}	22.2^{bcd}_{wx}	17.1^{c}_{x}	20.4^{c}_{x}	26.4^{ab}_{wx}	31.8^{cd}_{w}	26.7^{bc}_{wx}	23.9^{cd}_{wx}
30	20.1^{b}_{xy}	20.9^{bc}_{w}	22.5^{bc}_{w}	17.2^{b}_{x}	13.6^{bc}_{y}	14.0^{bc}_{y}	25.5^{ab}_{wx}	28.3^{b}_{w}	27.3^{abc}_{wx}	18.0^{c}_{xy}	20.7^{c}_{x}	32.0^{ab}_{wx}	35.5^{bc}_{w}	31.9^{b}_{wx}	27.1^{c}_{x}
45	22.1^{b}_{x}	24.2^{ab}_{wx}	25.0^{b}_{w}	18.1^{b}_{y}	17.5^{b}_{y}	17.5^{ab}_{x}	29.0^{a}_{w}	33.7^{a}_{w}	30.6^{ba}_{w}	28.8^{b}_{w}	25.7^{b}_{x}	34.2^{ab}_{w}	39.7^{ab}_{w}	34.3^{b}_{w}	36.1^{b}_{w}
60	$\mathbf{27.6}^{a}_{wx}$	28.5^{a}_{wx}	31.0^{a}_{w}	27.4^{a}_{wx}	22.2^{a}_{x}	22.4^{a}_{x}	$\mathbf{32.4}^{a}_{wx}$	37.2^{a}_{w}	36.0^{a}_{wx}	44.0^{a}_{w}	28.8^{a}_{x}	$\mathbf{40.1}^{a}_{w}$	45.4^{a}_{w}	43.1^{a}_{w}	43.6^{a}_{w}

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ : (1) ปริมาณเชื้อ *E. coli* เริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และCuttlefish fillet เท่ากับ 4.79 $\log_{10}$ CFU/g, 4.84 $\log_{10}$ CFU/g และ 4.78 $\log_{10}$ CFU/g ตามลำดับ

(2) เปรียบเทียบเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่ล้างตัวอย่างปลาหมึกแต่ละลักษณะ

(3) ค่า SD (Standard deviation): Cuttlefish dice cut ± 1.4 CFU/g, Cuttlefish fillet slit ± 2.9 CFU/g และ Cuttlefish fillet ±2.9 CFU/g

ตารางผนวกที่ 13: เปอร์เซนต์การลดลงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึกชนิดต่าง ๆ ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 ppm ณ อุณหภูมิ 10°C ในระยะเวลาสัมผัสต่าง ๆ

ระยะเวลาสัมผัส (วินาที) **	เปอร์เซนต์การลดลง ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อปลาหมึก *														
	Cuttlefish dice cut					Cuttlefish fillet slit					Cuttlefish fillet				
	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	75 ppm	100 ppm
5	5.2^{f}_{x}	13.2^{e}_{w}	17.6^{c}_{w}	4.8^{d}_{x}	4.2^{b}_{x}	4.3^{e}_{x}	18.2^{d}_{wx}	25.8^{c}_{w}	18.6^{b}_{wx}	16.2^{c}_{wx}	9.9^{d}_{y}	15.9^{e}_{x}	23.7^{d}_{w}	16.4^{c}_{x}	13.3^{d}_{xy}
10	14.3^{e}_{wx}	14.7^{e}_{wx}	18.9^{c}_{w}	10.6^{cd}_{xy}	5.3^{b}_{y}	13.7^{d}_{x}	18.6^{d}_{wx}	38.7^{bc}_{w}	30.2^{ab}_{wx}	26.4^{d}_{wx}	18.8^{cd}_{x}	18.9^{e}_{x}	30.9^{c}_{w}	21.0^{c}_{wx}	29.1^{c}_{wx}
15	15.8^{de}_{wx}	19.5^{de}_{w}	20.4^{bc}_{w}	12.0^{bcd}_{xy}	7.0^{b}_{y}	19.6^{cd}_{x}	22.8^{cd}_{x}	37.5^{bc}_{w}	34.4^{ab}_{w}	35.1^{c}_{w}	22.3^{c}_{y}	32.4^{d}_{wx}	36.3^{c}_{w}	23.7^{b}_{cxy}	33.0^{c}_{wx}
20	18.2^{cd}_{wx}	23.5^{cd}_{w}	23.7^{bc}_{w}	14.6^{bc}_{xy}	10.6^{b}_{x}	22.2^{c}_{y}	27.1^{bcd}_{y}	49.7^{ab}_{w}	37.5^{a}_{x}	39.2^{bc}_{x}	23.9^{c}_{x}	37.3^{c}_{w}	42.9^{b}_{w}	37.7^{ab}_{w}	36.4^{c}_{w}
30	19.3^{cd}_{xy}	26.4^{bc}_{wx}	27.1^{bc}_{w}	18.5^{ab}_{y}	12.1^{b}_{y}	31.0^{b}_{x}	32^{abc}_{x}	$\mathbf{54.0}^{a}_{w}$	38.3^{a}_{w}	42.2^{bc}_{wx}	37.2^{b}_{x}	43.6^{b}_{wx}	44.5^{b}_{wx}	43.1^{a}_{wx}	46.3^{b}_{w}
45	21.1^{b}_{x}	30.0^{b}_{w}	30.1^{ab}_{w}	22.5^{a}_{x}	21.0^{a}_{x}	38.2^{ab}_{x}	39.2^{ab}_{x}	59.1^{a}_{w}	40.2^{a}_{x}	46.9^{b}_{wx}	45.4^{ba}_{x}	47.8^{ab}_{wx}	48.8^{b}_{wx}	48.4^{a}_{wx}	53.7^{ab}_{w}
60	26.1^{a}_{xy}	$\mathbf{36.3}^{a}_{wx}$	36.8^{a}_{w}	23.7^{a}_{y}	28.1^{a}_{wxy}	42.5^{a}_{y}	43.8^{a}_{xy}	60.7^{a}_{w}	48.5^{a}_{x}	56.1^{a}_{w}	47.2^{a}_{x}	49.9^{a}_{x}	$\mathbf{58.8}^{a}_{w}$	51.5^{a}_{x}	61.2^{a}_{w}

*ตัวอักษร a, b, c และ d ที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

**ตัวอักษร w, x, y และ z ที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

หมายเหตุ : (1) ปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* เริ่มต้นในเนื้อปลาหมึกชนิด Cuttlefish dice cut, Cuttlefish fillet slit และCuttlefish fillet เท่ากับ 4.56 $\log_{10}$CFU/g, 4.36 $\log_{10}$CFU/g และ 4.44 $\log_{10}$CFU/g ตามลำดับ

(2) เปรียบเทียบเฉพาะในระดับความเข้มข้นที่ล้างตัวอย่างปลาหมึกแต่ละลักษณะ

(3) ค่า SD (Standard deviation): Cuttlefish dice cut ± 2.3 CFU/g, Cuttlefish fillet slit ± 3.8 CFU/g และ Cuttlefish fillet ±2.6CFU/g

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเพ็ญนิภา แก้วอุไร เกิดเมื่อวันที่ 30 เมษายน 2520 ที่จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาชีววิทยาประยุกต์) จากสถาบันราชภัฏเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีการศึกษา 2542 ศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาสุขาภิบาลอาหาร ปี พ.ศ. 2545 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2550