

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
ตารางวิเคราะห์หน้าหนักและขนาดของปลานิล

ตารางที่ 16 ความยาว ความหนาและน้ำหนัก  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปลานิล

จำนวน	ความยาว (ซม.)	ความหนา (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)
1	23.00	3.40	250.00
2	24.80	3.40	350
3	24.70	3.75	335
4	24.70	3.40	325
5	21.90	3.25	220
6	24.50	3.50	290
7	22.80	3.23	225
8	22.50	3.40	280
9	25.80	3.50	370
10	23.10	3.68	290
11	21.20	3.15	190
12	23.20	3.45	250
13	22.70	4.10	340
14	26.00	3.55	335
15	21.60	2.75	185
เฉลี่ย	$23.50 \pm 1.49$	$3.43 \pm 0.30$	$282.33 \pm 59.97$

ภาคผนวก ข  
ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำแข็งที่ใช้ในการขนส่ง

## การตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำแข็ง

ตารางที่ 17 ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ (cfu/ml) ด้วยวิธี Pour plate

ระดับความเจือจาง	cfu/ml
$10^0$	> 250
$10^0$	>250
$10^{-1}$	>250
$10^{-1}$	>250
$10^{-2}$	>250
$10^{-2}$	>250
$10^{-3}$	213
$10^{-3}$	>250
$10^{-4}$	84
$10^{-4}$	127

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำแข็ง

เท่ากับ  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml

ตารางที่ 18 ตรวจสอบ Coliform bacteria โดยวิธี Most Probable Number (MPN) 9 หลอด บ่มที่ อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  นาน 24 ชม.

10	$10^0$	$10^{-1}$
+++	-++	---

หมายเหตุ

+ คือ เกิดฟองก๊าซ - คือ ไม่เกิดฟองก๊าซ

เปิดตาราง MPN แบบ 3 หลอด

จะได้ ค่า MPN จากตารางเท่ากับ 3-2-0 เท่ากับ 9.5 MPN/ml

แต่เนื่องจาก First dilution ใช้ตัวอย่าง 10 มล.

ดังนั้นถ้าใช้ตัวอย่าง 1 มล. จะมีจำนวน Coliform bacteria

เท่ากับ 0.95 MPN / ml

หรือ 95 MPN /100 ml

ตารางที่ 19 การตรวจหา *E. coli* โดยวิธี MPN 9 หลอดด้วย Brilliant Green Lactose Broth

$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$
+ - -	+ + -	- - -

#### หมายเหตุ

+ คือ เกิดฟองก๊าซ - คือ ไม่เกิดฟองก๊าซ

เปิดตาราง MPN แบบ 3 หลอด

จะได้ ค่า MPN จากตารางเท่ากับ 1-2-0 เท่ากับ 1.1 MPN /ml

แต่เนื่องจาก First dilution ใช้ตัวอย่าง 10 มล.

ดังนั้นถ้าใช้ตัวอย่าง 1 มล. จะมีจำนวน Coliform bacteria เท่ากับ

เท่ากับ 0.11 MPN/ ml

ตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 78 (พ.ศ.2527) เรื่อง น้ำแข็ง กำหนดไว้ดังนี้  
คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์

(ก) ตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม น้อยกว่า 2.2 ต่อน้ำสะอาด 100 มิลลิลิตร โดยวิธีเอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number)

(ข) ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด อี.โคไล (*Escherichia coli*)

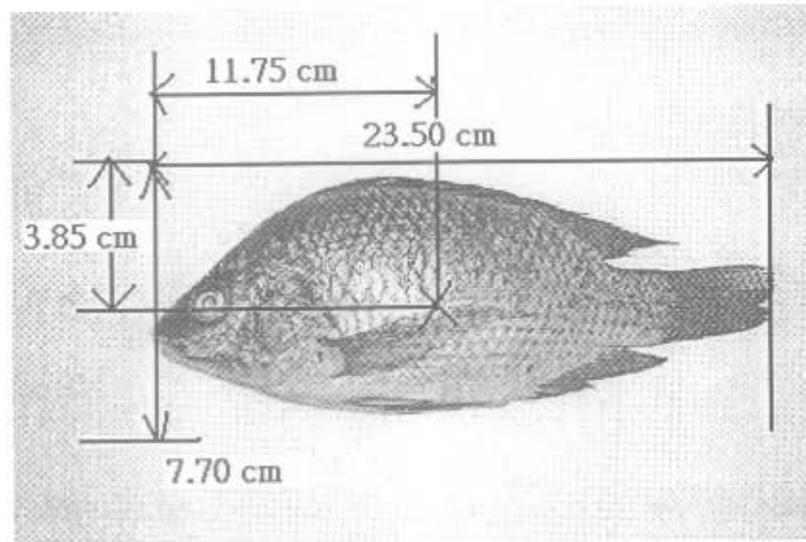
(ค) ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

จากการตรวจสอบจำนวน MPN ของ Coliform bacterial พบว่ามีจำนวนเกินมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข (< 2.2 MPN/100 ml) ซึ่งพบว่ามีจำนวน Coliform ถึง 95 MPN/100 ml นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Escherichia coli* อีกด้วย บ่งชี้ได้ว่าคุณภาพของตัวอย่างน้ำแข็งในการช่วยเก็บรักษาอุณหภูมิของปลาในระหว่างการขนส่ง ไม่ได้มาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข ทำให้มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนเพิ่มมากขึ้นในระหว่างการขนส่ง

ภาคผนวก ก  
ผลการวัดอัตราการแซ่เยือกแข็งปลาชนิด

### การวัดอัตราการแช่เยือกแข็งปลาไนล์

การหาอัตราการแช่เยือกแข็ง (Freezing rate) โดยวัดระยะจากจุดกึ่งกลางของปลาที่ระยะ 3.85 ซม. ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ แสดงในภาพที่ 1 โดยเก็บข้อมูลทุกๆ 1 นาที ด้วยเครื่องบันทึกข้อมูล (Data logger) แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-35^{\circ}\text{C}$  จนกระทั่งอุณหภูมิของปลาไนล์ลดต่ำจนถึง  $-18^{\circ}\text{C}$



ภาพที่ 25 การวัดระยะจุดกึ่งกลางของปลาไนล์

ตารางที่ 20 อัตราการแช่เยือกแข็งปลาไนล์ (มม./ชม.) จนอุณหภูมิบริเวณกึ่งกลางลดลงต่ำถึง  $-18^{\circ}\text{C}$

ปลาไนล์ (ตัว)	ระยะกึ่งกลาง (มม.)	เวลาที่อุณหภูมิที่กึ่งกลางลดต่ำจาก $0^{\circ}\text{C}$ ถึง $-18^{\circ}\text{C}$ (ชม.)	อัตราเร็วในการแช่เยือกแข็ง (มม./ชม.)
1	38.5	1.16	2.16
2	38.4	1.14	5.50
3	38.5	1.42	2.15
4	38.6	1.08	9.52
5	38.5	1.21	3.44
6	38.4	1.20	4.48
ค่าเฉลี่ย	38.49	1.20	8.47
STD	0.08	0.01	0.47

ตารางที่ 21 ระยะเวลาในการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิที่กึ่งกลางมีค่า  $-18^{\circ}\text{ซ}$  และ  $-30^{\circ}\text{ซ}$

ตัวอย่าง	เวลาที่อุณหภูมิที่กึ่งกลางมีค่า $-18^{\circ}\text{ซ}$ $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ชั่วโมง)	เวลาที่อุณหภูมิที่กึ่งกลางมีค่า $-30^{\circ}\text{ซ}$ $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ชั่วโมง)
ปลานิล	$1.58 \pm 0.09$	$2.48 \pm 0.07$

ตารางที่ 22 อัตราเร็วในการแช่เยือกแข็ง (freezing rate) ของปลานิล

ตัวอย่าง	ระยะทาง (มม.)	เวลาที่อุณหภูมิที่กึ่งกลางลดต่ำ จาก $0^{\circ}\text{ซ}$ ถึง $-18^{\circ}\text{ซ}$ (ชั่วโมง)	อัตราเร็วในการแช่เยือก แข็ง (มม./ชม.)
ปลานิล	$38.49 \pm 0.08$	$1.20 \pm 0.01$	$8.47 \pm 0.47$

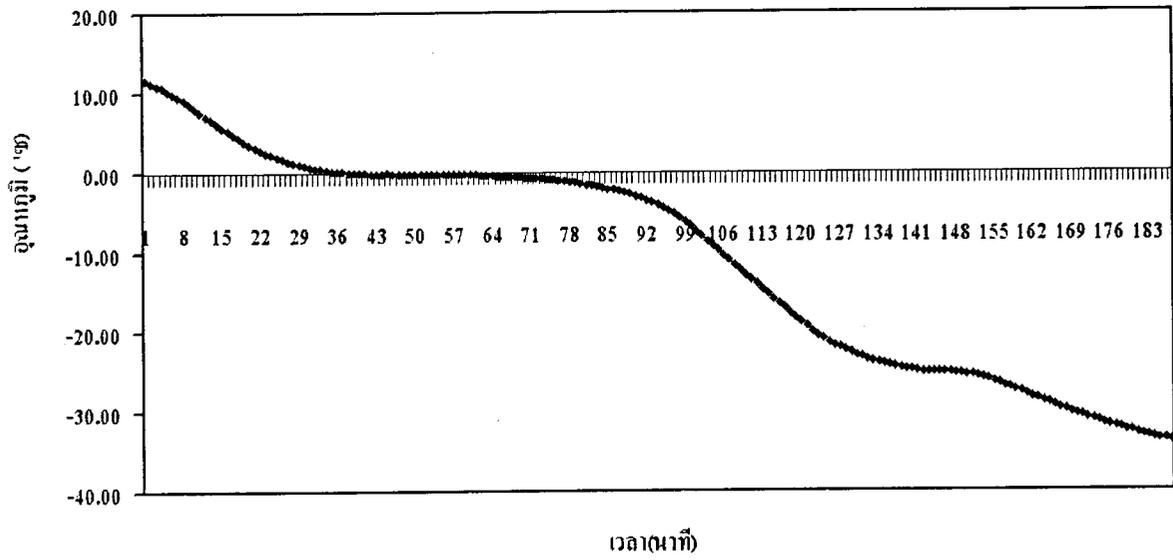
Johnston et al. (1994) ได้กำหนดอัตราเร็วในการแช่เยือกแข็ง อยู่ในช่วงดังนี้

Slow freezing = 2 มม. / ชั่วโมง

Quick freezing = 5 -30 มม. / ชั่วโมง

Rapid freezing = 50 -100 มม. / ชั่วโมง

Ultra-rapid freezing = 100 - 10000 มม. / ชั่วโมง



ภาพที่ 26 กราฟการแซ่เอียงของปลานิล

ภาคผนวก ง

ผลการแยกและจำแนกแบคทีเรียจากส่วนต่างๆของปลานิล

ตารางที่ 23 คุณลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จากเหงือกของปลานิลในอาหาร NA XLD และ TCBS

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคโลนี
Nutrient agar	GN1/1 = สีขาวขุ่นมันวาว ผิวมัน รูปร่างทรงกลม ขอบเรียบสม่ำเสมอ GN2/1= สีขาวขุ่นมันวาว ผิวมัน โคโลนีขนาดเล็ก รูปร่างทรงกลม ขอบเรียบสม่ำเสมอ GN3/1 = สีเหลือง ขุ่น มีผิวหน้าขรุขระ นูน โคโลนีขนาดเล็ก GN4/1 = สีเหลือง ขุ่น มีผิวเรียบ แบน โคโลนีขนาดกลาง วงกลมขอบเรียบ
TCBS	GT1/1= สีเขียว มีขนาดเล็ก นูน ขอบเรียบสม่ำเสมอ GT2/1 = สีเขียว มีขนาดเล็ก นูน ขอบเรียบสม่ำเสมอ GT3/1 = เปลี่ยนสี TCBS เป็นสีเหลือง มีโคโลนีสีเหลือง วงกลมขอบเรียบ นูน ขนาดกลาง
XLD	GX1/1 = โคโลนีสีเหลือง ผิวเรียบ นูน ขนาดกลาง วงกลมขอบเรียบ GX2/1 = เปลี่ยน Phenol red เป็นสีส้ม โคโลนีสีเหลือง นูนวงกลมขอบเรียบ GX3/1= โคโลนีสีขาว มีขนาดกลาง ผิวเรียบวงกลมขอบเรียบ

ตารางที่ 24 คุณลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวหนังของปลานิลในอาหาร NA XLD และTCBS

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคโลนี
Nutrient agar	SN1/1 = สีขาวขุ่น ขนาดใหญ่ มันวาว ผิวแบน รูปร่างทรงกลม ขอบเรียบ สม่ำเสมอ SN2/1= สีขาวขุ่นมันวาว ผิวมันวาว โคโลนีขนาดเล็ก รูปร่างทรงกลม ขอบเรียบ สม่ำเสมอ SN3/1 = สีขาว ขุ่น มีผิวหน้าขรุขระ หนูน โคโลนีขนาดกลาง
TCBS	ST1/1= สีเขียวเข้ม ผิวมันวาว ขอบเรียบสม่ำเสมอ ST2/1 = เปลี่ยนสี TCBS เป็นสีเหลือง โคโลนีสีเหลือง ผิวมันวาว ขอบ เรียบสม่ำเสมอ ST3/1 =โคโลนีสีเขียวเข้ม วงกลม ขนาดกลาง ขอบเรียบ หนูน ขนาดกลาง
XLD	SX1/1 = เปลี่ยนสี Phenol red เป็นสีส้ม โคโลนีสีเหลือง ผิวมันวาว ขนาดกลาง วงกลมขอบเรียบ SX2/1 = สีขาวขุ่นมันวาว ผิวมันวาว โคโลนีขนาดเล็ก รูปร่างทรงกลม ขอบ เรียบสม่ำเสมอ SX3/1 = เปลี่ยน Phenol red เป็นสีส้ม สร้าง H <sub>2</sub> S มีจุดดำตรงกลางโคโลนี รอบๆขอบมีสีแดง ผิวมันวาว ขนาดกลาง วงกลมขอบเรียบ SX3/2 = โคโลนีสีเหลือง ผิวเรียบ หนูน ขนาดใหญ่ วงกลมขอบเรียบ

ตารางที่ 25 คุณลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จากเครื่องในของปลาในอาหาร NA XLD และ TCBS

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคโลนี
Nutrient agar	IN1/1 = สีขาวขุ่น ไม่เป็น โคโลนีเดี่ยว ( Non single colony)
TCBS	IT1/1 = เปลี่ยน สี TCBS เป็นสีเหลือง โคโลนีสีเหลือง สร้าง H <sub>2</sub> S วงกลม นูน ขอบเรียบ IT1/2 = เปลี่ยน TCBS เป็นสีเหลือง โคโลนีสีเหลือง จุดดำตรงกลาง สร้าง H <sub>2</sub> S วงกลม นูน ขอบเรียบ IT1/2/1 = โคโลนีสีเขียว IT2/1 = โคโลนีสีเขียว IT2/1/1 = โคโลนีสีเหลือง
XLD	IX1/1 = โคโลนีสีขาวขุ่น นูน มันวาว วงกลม ขอบเรียบ IX2/1 = เปลี่ยนสี Phenol red เป็นสีส้ม ไม่เป็น โคโลนีเดี่ยว

หมายเหตุ

G = เหงือก (Gills) I = เครื่องใน (Intestines) S = ผิวหนัง (Skin) N = Nutrient agar X = XLD

T = TCBS

โดยการให้สัญลักษณ์คือ

ตัวอักษรแรกคือ “ส่วนที่ใช้ในการแยก เช่น ผิวหนัง เหงือก หรือ เครื่องใน ของปลา”

ตัวอักษรต่อมาคือ “อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น NA XLD หรือ TCBS”

ตัวเลขแรกคือ “จำนวนโคโลนีเดี่ยว (Single colony) ซึ่งแยกได้จากส่วนนั้นๆ ตัวเลขที่ต่างกันแสดงถึงลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน”

ตัวเลขต่อมาคือ “จำนวนของการ Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว”

เช่น IN 1/1 หมายความว่า เป็น โคโลนีเดี่ยว (Single colony) ซึ่งแยกได้จากส่วนเครื่องใน (Intestine: I) โดยใช้อาหาร Nutrient agar (N) ในการเพาะเลี้ยง โดยแยกครั้งที่ 1

หรือ SX 2/2 หมายความว่า เป็น โคโลนีเดี่ยว ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบ ซึ่งแยกได้จากส่วนผิวหนัง (Skin: S) โดยใช้อาหาร XLD ในการเพาะเลี้ยง โดยการแยกครั้งที่ 2

การแยกและจำแนกแบคทีเรียจากส่วนผิวหนัง เหงือกและเครื่องในของปลานิลด้วยอาหาร  
เลี้ยงเชื้อ NA XLD และ TCBS



ภาพที่ 27 *Aeromonas sobria*, GN 1/1



ภาพที่ 28 *Flavimonas orzihaditans*, GN 2/1



ภาพที่ 29 Unidentified, GN 3/1



ภาพที่ 30 *Pseudomonas putrefaciens*, GN 4/1



ภาพที่ 31 *Proteus mirabilis*, GT 1/1



ภาพที่ 32 *Proteus mirabilis*, GT 2/1



ภาพที่ 33 *Proteus mirabilis*, GT3/1



ภาพที่ 34 *Pseudomonas putrefaciens*, GX 3/1



ภาพที่ 35 *Aeromonas sobria*, GX2/1



ภาพที่ 36 *Aeromonas sobria*, GX1/1



ภาพที่ 37 *Bordetella alcaligenes*, SN 3/1



ภาพที่ 38 *Proteus mirabilis*, ST1/1



ภาพที่ 39 *Proteus penneri*, ST 2/1



ภาพที่ 40 *Proteus mirabilis*, ST3/1



ภาพที่ 41 *Aeromonas sobria*, SX1/1



ภาพที่ 42 *Pseudomonas aeruginosa*, SX2/1



ภาพที่ 43 Unidentified, SX3/2



ภาพที่ 44 *Pleiomonas shigelloids*, SX3/1



ภาพที่ 45 *Proteus vulgaris*, IT1/1



ภาพที่ 46 *Providencia alcaligenes*, IT2/1



ภาพที่ 47 *Edwardsiella tarda*, IX1/1



ภาพที่ 48 *Aeromonas sobria*, IX 2/1



ภาพที่ 49 *Aeromonas sobria*, SN 1/1



ภาพที่ 50 *Weeksella virosa*, SN 2/1



ภาพที่ 51 Unidentified, IN 1/1

หมายเหตุ

G = เหงือก (Gills)

I = เครื่องใน (Intestines)

S = ผิวหนัง (Skin)

N = Nutrient agar

X = XLD

T = TCBS

การจำแนกแบคทีเรียด้วย ชุดตรวจสอบ API 20E



ภาพที่ 52 *Aeromonas sobria* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 53 *Proteus mirabilis* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 54

*Flavimonas oryzihaditans* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 55 *Pseudomonas putrefaciens* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 56 *Weeksella virosa* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 57 *Providencia alcalifaciens* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 58 *Proteus vulgaris* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 59 *Pseudomonas aeruginosa* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 60 *Plesiomonas shigelloids* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 61 *Bordetella alcaligenes* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 62 *Proteus penneri* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 63 *Edwardsiella tarda* ตรวจสอบด้วย API20E



ภาพที่ 64 การ Swab ผิวหนังปลานิล



ภาพที่ 65 การผสมด้วย Vortex mixture



ภาพที่ 66 ทุกขั้นตอนปฏิบัติด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ



ภาพที่ 67 การแยกเหงือกปลานิล



ภาพที่ 68 เหงือกปลานิลที่แยกแล้ว



ภาพที่ 69 เครื่องในปลานิลที่แยกแล้ว

ภาคผนวก จ

ผลการตรวจสอบการข้อมแกรม การทดสอบการเคลื่อนที่ และการทดสอบ  
ปฏิกิริยาออกซิเดสและคะตะเลส

### การย้อมสีแกรม (Gram Stain) (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2545)

ในการย้อมสีแกรมเป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกประเภทของจุลินทรีย์ และช่วยให้เห็นเซลล์ของจุลินทรีย์ในกล้องจุลทรรศน์ได้อย่างชัดเจน เทคนิคนี้มีขั้นตอนดังนี้

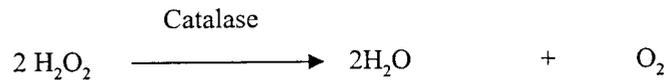
1. นำสไลด์มาวางยั้งที่ย้อม หยคน้ำยา Crystal violet (ประกอบด้วย Crystal violet; gentian violet 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ปล่อยให้แห้งไว้นาน 30-60 วินาที
2. เทสีออก ล้างด้วยน้ำยาไอโอดีน และใส่น้ำยาไอโอดีนไว้นาน 1-2 นาที เพื่อช่วยให้สีติดดีขึ้น (Mordant)
3. ล้างด้วยน้ำก๊อกที่ไหลอ่อนๆ สลัดน้ำออกจากสไลด์ทั้งหมด
4. ใช้น้ำยาล้างสี (Decolorizer; ประกอบด้วยเอทานอลร้อยละ 95 จำนวน 250 มิลลิลิตร และ Acetone 250 มิลลิลิตร) หยดให้ไหลผ่านสไลด์จนน้ำที่หยดผ่านไม่มีสีติดออกมาด้วย ขั้นนี้ใช้เวลา 20 วินาทีถึง 1 นาที ขึ้นอยู่กับความหนาบางของเชื้อที่ทาบบนสไลด์ ระวังอย่าล้างสีออกมากเกินไป เพราะจะทำให้ผลที่ได้ผิดพลาด
5. ล้างด้วยน้ำอย่างรวดเร็ว สลัดน้ำออกจากสไลด์ทั้งหมด
6. ย้อมควบด้วยสีย้อมควบคู่ (Counterstain) คือ Safranin (ที่ประกอบด้วย Safranin 2.5 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร เมื่อต้องการนำมาใช้ให้เจือจางลงอีก 5-10 เท่าโดยใช้น้ำกลั่น) นาน 30-60 วินาที
7. ล้างออกด้วยน้ำ
8. ซับน้ำออกและปล่อยให้สไลด์แห้ง แล้วดูด้วยหัวน้ำมันของกล้องแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกจะติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินของ Crystal violet ส่วนพวกที่เป็นแกรมลบจะติดสีแดงหรือสีชมพูของ Safranin

### การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)

1. หยคน้ำกลั่นจำนวน 1 ลูบ (0.01 มล.) ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด
2. ใช้ลูบเขี่ยโคโลนีเดี่ยว (Single colony) และเขี่ยลงสู่แผ่นสไลด์ที่หยคน้ำกลั่นแล้ว จากนั้นใช้ลูบเขี่ยเชื้อให้กระจายบนแผ่นสไลด์ให้ทั่ว
3. ปิดด้วย Cover slip และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า รวมกับการใช้หัวน้ำมัน (Oil immersion objective)
4. สังเกตการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### การทดสอบปฏิกิริยาอะตะเลสและออกซิเดส (บุญทา วรินทร์รักษ์, 2533)

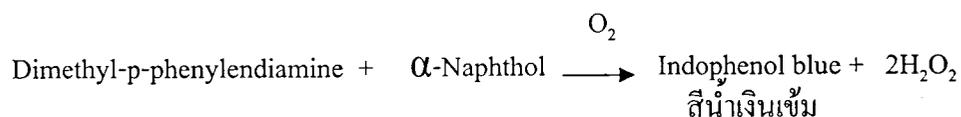
เอนไซม์อะตะเลสมีอยู่ในแบคทีเรียที่มีระบบไซโตโครม (Cytochrome system) ได้แก่ แบคทีเรียพวกที่ใช้อากาศในการเจริญ (Aerobic) และพวกที่ทั้งใช้อากาศและไม่ใช้อากาศในการเจริญ (Facultative anaerobic) กล่าวคือเอนไซม์อะตะเลส จะแยกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้เป็นน้ำกับออกซิเจน



#### ขั้นตอนการทดสอบปฏิกิริยาอะตะเลส

1. หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 35% ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด
2. เชื้อโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ลงบนแผ่นสไลด์ที่ผ่านการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
3. สังเกตการณ์เกิดฟองก๊าซ

แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในระบบการขนส่งอิเล็กตรอน (Electron transport system) ซึ่งจะทำหน้าที่เร่งในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) โดยออกซิเจน



#### ขั้นตอนการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส

1. เชื้อเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้ พาสเจอร์ปีเปต (Pasture pipet) ที่ผ่านการหลอมด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์
2. เตรียมชุดทดสอบ Bactident® เพื่อทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส
3. เชื้อเชื้อถ่ายลงบนแผ่นทดสอบ Bactident®
4. สังเกตการณ์เกิดเปลี่ยนแปลงสีน้ำเงินเข้ม

ตารางที่ 26 การย้อมแกรม (Gram stain) และการทดสอบการเคลื่อนที่ (Mobility test) ของแบคทีเรีย  
ซึ่งแยกได้จากส่วนต่างๆของปลานิล

รหัส	แกรม / รูปร่าง	การทดสอบการเคลื่อนที่
GN2/1	ลบ / กลม	+
IN1/1	ลบ / กลม	-
GN3/1	ลบ / กลม	+
GN4/1	ลบ / กลม	+
SN2/1	บวกลม	+
SN3/1	ลบ / กลม	+
GN1/1	ลบ / กลม	+
SN1/1	ลบ / กลม	+
SX2/1	ลบ/ แท่ง	+
SX3/2	ลบ/ แท่ง	+
ST3/1	ลบ / กลม	+
SX3/1	บวกลม/แท่ง	+
IX2/1	ลบ/ แท่ง	+
IX1/1	ลบ/ แท่ง	+
GX3/1	ลบ/ แท่ง	+
GX1/1	บวกลม/แท่ง	-
ST2/1	ลบ/ แท่ง	+
SX1/1	ลบ/ แท่ง	+
IT2/1	ลบ/กลม	+
GT2/1	ลบ/ แท่ง	+
GT1/1	ลบ/ แท่ง	+
GT3/1	บวกลม/แท่ง	+
GX2/1	ลบ/ แท่ง	+
ST1/1	ลบ/ แท่ง	+
IT1/1	ลบ/ แท่ง	+

หมายเหตุ + คือ มีการเคลื่อนที่ (Positive) - คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ (Negative)

ตารางที่ 27 การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดสและคะตะเลส (Oxidase - Catalase) ของแบคทีเรียที่แยก  
ได้จากส่วนต่างๆของปลานิล

รหัส	ปฏิกิริยาออกซิเดส	ปฏิกิริยาคะตะเลส
GN2/1	-	++
IN1/1	+++	-
GN3/1	+++	+
GN4/1	+++	-
SN2/1	+	+
SN3/1	+	+
GN1/1	++	-
SN1/1	+++	-
SX2/1	++	+++
SX3/2	++	++
ST3/1	+	-
SX3/1	++	+++
IX2/1	+++	-
IX1/1	+	+
GX3/1	+++	-
GX1/1	+++	+
ST2/1	-	+++
SX1/1	+++	+
IT2/1	-	+++
GT2/1	-	+++
GT1/1	-	+++
GT3/1	-	+++
GX2/1	+++	++
ST1/1	-	+++
IT1/1	-	++

หมายเหตุ + คือ เกิดปฏิกิริยา (Positive) - คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา (Negative)



ภาคผนวก ฉ  
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count) ในส่วน (Parts) ผิวหนัง เหงือกและเครื่องในของปลานิล

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.070	2	0.535	517.855	0.000*
Within Groups	0.003	3	0.01		
Total	1.073	5			

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 29 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count) ภายหลังจากผ่านขั้นตอน ปลานิลแช่แข็ง ซ้ำทะเลและล้างน้ำ แช่น้ำเกลือ รอควันแบบเย็นและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2<sup>o</sup>ซ นาน 12 ชม.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.531	4	0.883	1496.042	0.000*
Within Groups	0.003	5	0.001		
Total	3.534	9			

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 30 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเชื้อ *A. sobria* ในส่วน(Parts) ผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อ ของปลานิล

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.933	3	3.644	15344.333	0.000*
Within Groups	0.001	4	0.000		
Total	10.934	7			

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 31 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ที่ระดับการปนเปื้อน  $10^2$   $10^4$   $10^6$  และ  $10^8$  cfu/ml ภายหลังจากผ่านขั้นตอน การฆ่าแผลและล้างน้ำ การแช่น้ำเกลือ และการรมควันแบบเย็น

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PROCESS	21.903	2	10.951	533.08	0.000*
INOCULUM	124.951	4	31.238	2	0.000*
PROCESS*INOCULUM	9.655	8	1.207	1520.5	0.000*
Error	0.308	15	0.21	77	
Total	380.240	30		58.748	

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 32 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการเหลือรอด (ร้อยละ) ของเชื้อ *A. sobria* ที่ระดับการปนเปื้อน  $10^2$   $10^4$   $10^6$  และ  $10^8$  cfu/ml ภายหลังจากผ่านขั้นตอน การแช่น้ำเกลือ การรมควันแบบเย็น และการแช่น้ำเกลือรวมกับการรมควันแบบเย็น

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PROCESS	2834.508	2	1417.254	85.841	0.000*
INOCULUM	21114.589	4	5278.647	319.721	0.000*
PROCESS*INOCULUM	4867.197	8	608.400	36.850	0.000*
Error	247.653	15	16.510		
Total	52547.48	30			

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 33 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าลือกผลต่างของ เชื้อ *A. sobria* ที่ระดับการปนเปื้อน  $10^2$   $10^4$   $10^6$  และ  $10^8$  cfu/ml ภายหลังจากผ่านขั้นตอน การแช่น้ำเกลือ การรมควันแบบเย็น และการแช่น้ำเกลือ การรมควันแบบเย็น

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PROCESS	7.369	2	3.685	193.727	0.008*
INOCULUM	17.432	4	4.358	6.689	0.001*
PROCESS*INOCULUM	19.131	8	2.391	7.912	0.007*
Error	8.262	15	0.551	4.341	
Total	158.905	30			

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ภาคผนวก ข  
ข้อมูลทางด้านเทคนิคของผู้รวมวัน

## ตู้อรมควัน (Smoke House) (ปัญญา แสนชัย, 2545)

ข้อมูลจำเพาะ

ขนาด 119 x 223 x 213 ซม.

Blower = 50 CFM. ใช้มอเตอร์ 1 แรงม้า 1,350 รอบ/นาที

ฮีตเตอร์ 1,800 x 3 วัตต์ และ 700 x 2 วัตต์ (Strib heater)

อุณหภูมิ 0-120<sup>0</sup>ซ

ใช้ไฟฟ้า 220-380 โวลต์

สามารถใช้ได้ 2 แบบ คือ แบบอบแห้ง และแบบรมควัน

### ขั้นตอนในการใช้ตู้อรมควัน

แบบอบแห้ง

1. นำผลิตภัณฑ์เข้าแขวนในตู้หรือใส่ถาดตะแกรงตามความเหมาะสม
2. เสียบปลั๊กเข้ากับปลั๊กไฟที่ใช้เฉพาะเครื่อง Smoke house
3. เปิด Main switch ไฟสีเขียวแสดง (ภาพที่ 72)
4. เปิด Voltmeter switch ไปที่ R-N blower จะทำงาน
5. เปิดสวิตซ์ Heater-1 หลอดไฟสีเหลืองติดเมื่อต้องการอุณหภูมิ 60<sup>0</sup>ซ ถ้าต้องการอุณหภูมิสูง

กว่านี้

6. ให้เปิด Heater-2 เครื่องจะทำอุณหภูมิได้ถึง 90<sup>0</sup>ซ และเปิด Heater-3 ถ้าต้องการอุณหภูมิถึง 120<sup>0</sup>ซ

แบบรมควัน

1. นำผลิตภัณฑ์เข้าแขวนในตู้หรือถาดใส่ตะแกรงตามความเหมาะสม
2. ใส่เชื้อไฟโดยการนำเข้าไปวางในช่องเผาเชื้อไฟ ต้องวางให้เชื้อไฟสัมผัสกับ Heater ถ้าเป็นกาบมะพร้าวใส่คราวละประมาณ 3-5 ชั้น ไม่ควรเกินนี้เพราะจะทำให้เกิดความร้อนมากเกินไป อาจทำให้เกิดความเสียหายได้

3. เปิด Main switch สัญญาณไฟสีเขียวจะแสดง

4. หมุน Voltmeter switch ไปที่ R-N Blower จะทำงาน

5. หมุน Voltmeter switch ไปที่ S-N Blower สัญญาณไฟสีขาวแสดง Heater เผาเชื้อทำงานระหว่างนี้ Heater เผาเชื้อจะร้อนขึ้นเรื่อยๆ และจะติดเชื้อไฟทำให้เกิดควันและห้ามเปิดฝาดูเผาเชื้อไฟทิ้งไว้เพราะจะทำให้เชื้อที่ติดไฟแล้วลุกเป็นเปลว ไม่เกิดควันและอาจทำให้เครื่องมือเสียหายได้

6. เปิดช่องระบายตามความต้องการ

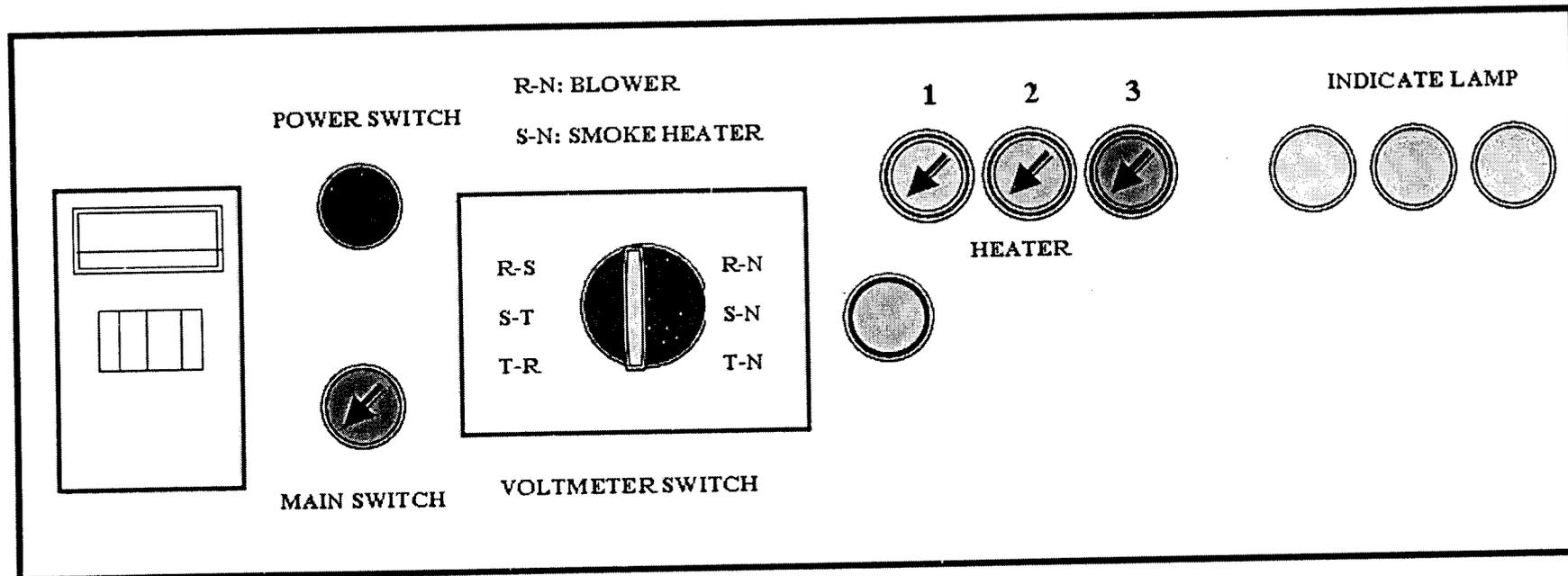
ในกรณีที่ต้องการเพิ่มอุณหภูมิก็ให้เปิด Heater switch ช่วย และควบคุมที่ Temperature control panel อุณหภูมิอาจเกินอยู่บ้างเนื่องจากควันที่ได้จากการเผาเชื้อเพลิงควบคุมอุณหภูมิไม่ได้ อาจควบคุมโดยการลดเชื้อเพลิง หรือใส่ที่ละน้อยขึ้น และควรตรวจเชื้อเพลิงทุกๆ 15 นาที เพื่อป้องกัน การมอดดับเมื่อเสร็จขั้นตอนการรมควันครบกระบวนการทุกอย่างแล้ว ให้ปิดสวิตช์ทุกอย่างไปที่ OFF ให้หมดและปิดฝาช่องเผาเชื้อเพลิง และตุ้มรมควันให้สนิท เพื่อให้ไฟที่อยู่ช่องเผาเชื้อเพลิงดับสนิท

#### ข้อควรระวัง

1. ไม่ควรใส่เชื้อเพลิงมากเกินไปกำหนดเพราะอาจเกิดความร้อนมากและทำให้เครื่องเสียหายได้
2. ไม่ควรเปิดฝาทุ้มรมควันบ่อยๆในขณะที่ใช้งาน
3. ควรใส่ถุงมือกันความร้อนในการยกถาดตะแกรงทุกครั้ง

#### การบำรุงรักษา

1. ก่อนทำการรมควัน ควรตรวจดูว่าในช่องเผาเชื้อเพลิงมีขี้เถ้าเหลืออยู่หรือไม่ ถ้ามีให้ทำการเทขี้เถ้าก่อนใช้ตุ้มรมควัน
2. ควรทำความสะอาดถาดรองน้ำหรือน้ำมันที่หยดลงถาดรองทุกครั้งหลังเสร็จงาน
3. ทำความสะอาดถาดตะแกรงทุกครั้งหลังเสร็จงาน



ภาพที่ 72 แผงควบคุมตู้รมควัน

ภาคผนวก ข  
การเตรียมงานอ้อยอบแห้ง

### ขั้นตอนการเตรียมชานอ้อยอบแห้ง

1. นำชานอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากการผลิตน้ำอ้อยสด เพื่อทำการอบด้วยตู้แห้งแบบชั้น (Carbinet dryer) ที่อุณหภูมิ  $75^{\circ}\text{C}$  นาน 24 ชั่วโมง
2. ชั่งน้ำหนักชานอ้อยที่ผ่านการอบแห้ง พร้อมทั้งตรวจสอบความชื้นและค่าวอเตอร์แอกทีวิตี ( $a_w$ )
3. เก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติกป้องกันอากาศและควบคุมความชื้นด้วยซิลิกาเจล ภายในถุง



ภาพที่ 73 ชานอ้อยก่อนการอบแห้ง



ภาพที่ 74 ชานอ้อยที่ผ่านการอบแห้งที่  
อุณหภูมิ  $75^{\circ}\text{C}$  นาน 24 ชม.

### ข้อมูลจำเพาะของชานอ้อยหลังการอบแห้ง

น้ำหนักชานอ้อยหลังอบแห้ง = 1.7 กิโลกรัม

ความชื้น = ร้อยละ 29.4

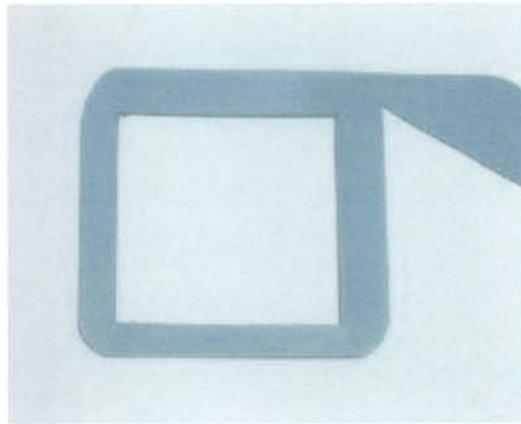
$a_w = 0.3$

วันที่เก็บรักษา 22 กันยายน 2548 ถึง 23 พฤศจิกายน 2548 ( 2 เดือน)

ภาคผนวก ฅ  
การตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียบนผิวหนังปลาชนิด

**การตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียบนผิวหนังปลาชนิด (Roberts and Greenwood, 2003)**

1. เตรียมกรอบ (Frame) ขนาด 5 x 5 ซม. แสดงในภาพที่ 1
2. เตรียมสารทำเจือจางคือ 0.85 % NaCl ปริมาตร 10 มล. และ ไม้ปั่นล้างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
3. นำไม้ปั่นล้างที่จุ่ม 0.85 % NaCl พอชุ่ม จากนั้นทำการ Swab ไม้บนผิวหนังปลาชนิด ให้ทั่ว โดยใช้พื้นที่ภายในกรอบ ซึ่งมีพื้นที่ 25 ซม.<sup>2</sup>.
4. นำลำสีที่ใช้งานแล้วจุ่มลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 10 มล.



ภาพที่ 75 กรอบ (Frame) ที่ใช้ในการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรีย  
บริเวณผิวหนังปลาชนิด

**การคำนวณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบริเวณผิวหนังปลาชนิด**

พื้นที่ Swab เท่ากับ  $5 \times 5 = 25 \text{ ซม.}^2$

นำไม้ Swab ที่ใช้งานแล้วจุ่มลงในสารทำเจือจาง 10 มล. (ความเข้มข้นเท่ากับ 1:1)

ปิเปตจาก 1:1 มา 1 มล. ถ่ายลง 9 มล. ดังนั้นความเจือจาง เท่ากับ 1 : 10

ปิเปตจาก 1:1 มา 1 มล. ถ่ายลง 9 มล. ดังนั้นความเจือจาง เท่ากับ 1 : 100

**ตัวอย่าง**

นับจำนวนโคโลนีได้ที่ ระดับความเจือจาง  $10^{-4}$  มีจำนวนโคโลนี เท่ากับ 75 โคโลนี

ดังนั้นจำนวนโคโลนี เท่ากับ  $75 \times 10^4 \text{ cfu/ml}$

เนื่องจาก 1 มล. มีจำนวนโคโลนี  $75 \times 10^4 \text{ cfu}$

ถ้า 10 มล. เท่ากับ  $75 \times 10^5 \text{ cfu}$

เนื่องจาก Swab จากพื้นที่ 25 ซม.<sup>2</sup> ดังนั้น

พื้นที่ 1 ซม.<sup>2</sup> จะมีจำนวนโคโลนี เท่ากับ  $3 \times 10^5 \text{ cfu/cm}^2$