

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

- ศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากบริเวณ ผิวหนัง เหงือก และ เครื่องใน ของปลานิล
จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบริเวณต่างๆของปลานิลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count, \log_{10} cfu/g \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

จากส่วน ผิวหนัง เหงือกและเครื่องใน ของปลานิล บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 24 ชม.

ส่วน (Parts)	จำนวนเชื้อ (\log_{10} cfu/g \pm S.D.)
ผิวหนัง (Skin)*	4.95 ^c \pm 0.01
เหงือก (Gills)	3.96 ^a \pm 0.03
เครื่องใน (Intestine)	4.71 ^b \pm 0.04

a,b.. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

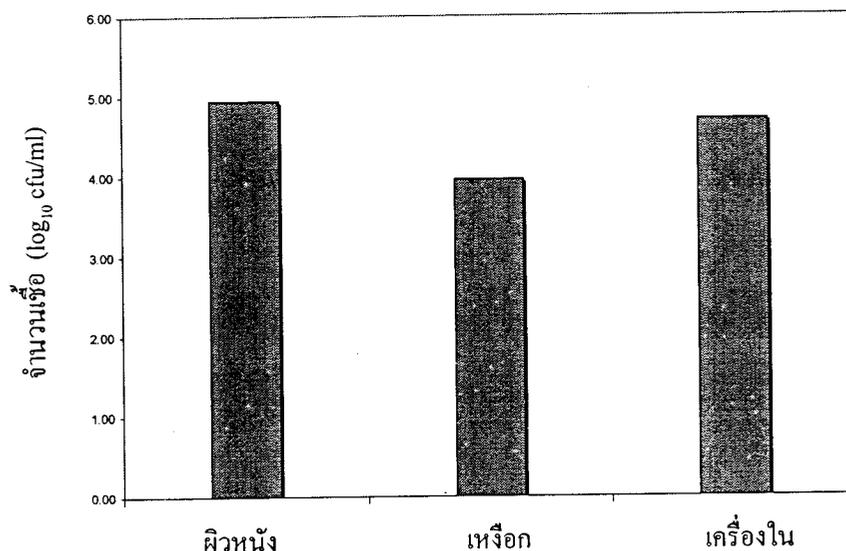
หมายเหตุ * = \log_{10} cfu/cm²

ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable count) จากบริเวณ ผิวหนัง เหงือก และ เครื่องในของปลานิล โดยวิธี Total plate count ด้วย Petrifilm (3M) บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 24 ชม. แสดงในตารางที่ 1 พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

โดยที่ส่วนผิวหนัง (Skin) ของปลานิลเป็นส่วนที่มีจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนมากที่สุดคือ $4.95 \pm 0.01 \log_{10}$ cfu/cm² เนื่องจากเป็นส่วนที่สัมผัสโดยตรงกับสิ่งแวดล้อม และมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระหว่างการจับปลาและการขนส่ง ซึ่งจากการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำแข็งที่ใช้ในการแช่เย็นปลานิลในระหว่างการขนส่ง พบว่ามีจำนวนเท่ากับ $6 \log_{10}$ cfu/ml (ภาคผนวก ข)

จำนวนแบคทีเรียบริเวณเครื่องใน ($4.71 \pm 0.04 \log_{10}$ cfu/g) มีจำนวนมากกว่าบริเวณเหงือก ($3.96 \pm 0.03 \log_{10}$ cfu/g) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ahmed et al. (2005) โดยตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในบริเวณเครื่องในและเหงือกของปลานิลพบว่ามีจำนวนเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วง

7.4-8.0 \log_{10} cfu/g และ 5.9 – 6.3 \log_{10} cfu/g ในบริเวณเครื่องในและเหงือกตามลำดับแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count) จากส่วน ผิวหนัง เหงือก และเครื่องในของปลาชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 24 ชม.

อย่างไรก็ตามในระหว่างการแปรรูปอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนข้าม (Cross-contaminated) ในขั้นตอนการตัดแต่งจากส่วนของเครื่องใน เหงือกและผิวหนังของปลาชนิด ดังนั้นการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาล (Sanitary) และรักษาความสะอาดในระหว่างการแปรรูป จำเป็นต้องลดโอกาสการปนเปื้อนข้ามในขั้นตอนการตัดแต่งและล้างให้มากที่สุดเพื่อเป็นการลดปริมาณแบคทีเรีย (Bacterial load) ให้น้อยที่สุดเท่าที่สามารถทำได้ เช่น การนำหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิต (Good manufacturing practice; GMP) และระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Hazard analysis and critical control Point; HACCP) มาใช้ในการแปรรูปปลาชนิดรมควันแบบเย็น ซึ่งเป็นแนวทางสำคัญในการช่วยลดความเสี่ยงและเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภคให้มากขึ้น

Kolodziejaska et al. (2001) ได้ศึกษาคุณภาพด้านจุลินทรีย์ในทุกขั้นตอนการผลิตปลาแมคเคอเรล (Mackerel) รมควันแบบร้อน (Hot smoking) (อุณหภูมิภายใน $57-58^{\circ}$ ซ นาน 85 นาที) และระยะเวลาการเก็บรักษา โดยใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพสูงนำมาแปรรูปด้วยการรมควันและเก็บที่อุณหภูมิต่ำ (Mild conditions) คือที่อุณหภูมิ $2 \pm 1^{\circ}$ ซ และ $8 \pm 1^{\circ}$ ซ โดยมีการควบคุมสุขอนามัยและความสะอาดในโรงงานให้เป็นไปตามมาตรฐานในทุกขั้นตอนการแปรรูปด้วยรมควัน พร้อมทั้งตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ทุกขั้นตอนในการแปรรูปด้วยวิธี Total plate count (TPC) Coliforms

และ Enterococci ในส่วนบริเวณเนื้อ (Anterior-dorsal) และผิวหนัง (Skin) ของปลาแมคเคอเรลพบว่า จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวหนังและบริเวณเนื้อมีจำนวนลดลงอย่างมากเมื่อภายหลังผ่านขั้นตอนการแช่เกลือและล้างด้วยน้ำสะอาด และพบว่ามีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุดเมื่อผ่านกระบวนการรมควัน

และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการเหลือรอดของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) ที่ส่วนเนื้อ (Meat) ในระหว่างขั้นตอนการแปรรูปโดยการรมควันแบบร้อนมีแนวโน้มลดลงเป็นเส้นตรง โดยเริ่มจากขั้นตอนปลาแช่แข็ง (Frozen fish) ซึ่งมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง $2.0 - 4.7 \log_{10} \text{cfu/g}$ และลดเหลือ $1.9 - 3.3 \log_{10} \text{cfu/g}$ ในขั้นตอนการควักไส้และล้างด้วยน้ำสะอาด และมีแนวโน้มลดลงอย่างมากเมื่อผ่านขั้นตอนการแช่เกลือและรมควันซึ่งมีจำนวนเหลือรอดจุลินทรีย์ทั้งหมดคือ $1.0 - 2.2 \log_{10} \text{cfu/g}$

2. ศึกษาการแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาชนิด

การศึกษาการแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากปลาชนิดในส่วนต่างๆคือ ผิวหนัง (Skin) เหงือก (Gills) และเครื่องใน (Intestine) โดยใช้ Nutrient agar (NA) Xylose-lysine-deoxycholate (XLD) และ Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่างๆของปลาชนิด โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. แยกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA XLD และ TCBS ตามลำดับโดยวิธี Streak plate

จากตารางที่ 10 พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ด้วยชุดตรวจสอบ API 20 E (bioMerieux, France) แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ *Aeromonas sobria*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Providencia alcaligenes*, *Pseudomonas putrefaciens* ซึ่งส่วนมากเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (ร้อยละ 88) รูปร่างท่อน (Rod) และสามารถเคลื่อนที่ได้ (Motility) และพบว่าแบคทีเรียส่วนผิวหนัง และส่วนเหงือกมีความหลากหลายของสายพันธุ์มากกว่าแบคทีเรียในเครื่องใน

ตารางที่ 10 เชื้อแบคทีเรียที่แยกและจำแนกได้จากบริเวณ ผิวหนัง เหมือง และเครื่องใน

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ผิวหนัง		เหมือง		เครื่องใน	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
<i>Aeromonas sobria</i>	2	20.00	3	30.00	1	16.67
<i>Bordetella alcaligenes</i>	1	10.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Edwardsiella tarda</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	16.67
<i>Flavimonas oryzihaditans</i>	N.D.	N.D.	1	10.00	N.D.	N.D.
<i>Plesiomonas shigelloids</i>	1	10.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Proteus mirabilis</i>	2	20.00	2	20.00	N.D.	N.D.
<i>Proteus penneri</i>	1	10.00	1	10.00	N.D.	N.D.
<i>Proteus vulgaris</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	16.67
<i>Providencia alcaligenes</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2	33.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	10.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	N.D.	N.D.	2	20.00	N.D.	N.D.
<i>Weeksella virosa</i>	1	10.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Unidentified	1	10.00	1	10.00	1	16.67
Total	10	100.00	10	100.00	6	100.00

หมายเหตุ N.D. = Not Detectable (ตรวจไม่พบ)

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *A. hydrophila* เป็นพวกที่สามารถเคลื่อนที่ได้สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic motile aeromonads) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *A. caviae* นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในคน (Food Disease Handbook vol.1, 1994) Ahmed et al. (2005) กล่าวถึงการตรวจพบ *A. hydrophila* ในบริเวณเหงือกของปลานิล (ร้อยละ 3.06) และพบว่าแบคทีเรียในบริเวณเหงือกมีความหลากหลายของสายพันธุ์มากกว่าบริเวณเครื่องใน เนื่องจากบริเวณเหงือกเป็นบริเวณที่สัมผัสกับน้ำเพื่อใช้ในการหายใจ ซึ่งทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียสูงกว่าในบริเวณเครื่องใน นอกจากนี้ Sugita et al. (1996) สามารถจำแนกเชื้อ *A. caviae*, *A. hydrophila* จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ในบริเวณส่วนเครื่องในของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ภาพที่ 16 แสดงการจำแนกเชื้อ *A. sobria* ซึ่งตรวจสอบโดยชุดทดสอบ API 20E บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม.



ภาพที่ 16 API 20 E ของเชื้อ *Aeromonas sobria* ซึ่งแยกได้จากปลานิล

ความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลอาจมีจำนวนมากกว่า 12 สายพันธุ์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น แหล่งน้ำ ภูมิประเทศ การให้อาหาร อุณหภูมิ การเลี้ยงดู และ สายพันธุ์ของปลานิล จากงานวิจัยของ Ahmed et al. (2004) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลต่อความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียบริเวณเครื่องใน (Intestine) ของปลานิลลูกผสม (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) จากบ่อเพาะเลี้ยงในประเทศซาอุดีอาระเบีย โดยตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count) และจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วย API 20E API 20 STREP และ API 50CH (bioMerieux, France) ในฤดูกาลต่างๆคือ ดันฤดูร้อน (22-35°C) ฤดูร้อน (23-39°C) ฤดูใบไม้ร่วง (12-31°C) และฤดูหนาว (7-20°C) พบว่า ฤดูใบไม้ร่วง (12-31°C) มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมากที่สุดคือ $3.1 \pm 1.4 \times 10^8$ - $1.3 \pm 2.2 \times 10^9$ cfu/g และฤดูหนาวมีจำนวนน้อยที่สุดคือ $8.9 \pm 1.8 \times 10^5$ - $1.3 \pm 0.9 \times 10^7$ cfu/g นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (ร้อยละ 77) และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 17 สายพันธุ์ ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบได้แก่

Aeromonas hydrophila, *Shewanella putrefaciens*, *Corynebacterium urealyticum*, *Escherichia coli* และ *Vibrio cholerae* ซึ่งในฤดูหนาวจะพบเฉพาะ *Pseudomonas* เท่านั้น ส่วน *Photobacterium damsela*, *Pasteurella* spp., *Cellulomonas* sp. และ *Bacillus* sp. จะพบในบางฤดูกาล

เชื้อกลุ่ม *A. hydrophila* ที่เลือกใช้ในการศึกษาคือ *A. sobria* เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนใหญ่ และสามารถแยกได้จากปลาชนิด ทั้งยังเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในปลาน้ำจืด รวมทั้งทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารในคน (Goodwin et al., 1983) นอกจากนี้ *A. sobria* ยังสามารถสร้างสารพิษคือ ไซโตท็อกซิน (Cytotoxin) และฮีโมไลซิน (Haemolysin) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (Pathogenicity) ดังนั้นจึงเลือก *A. sobria* เพื่อนำมาใช้ในการศึกษากราฟการเจริญเติบโต

3. ศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าขั้นตอนกระบวนการแปรรูปปลารมควันแบบเย็นมีอิทธิพลต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count, \log_{10} cfu/g \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชม.

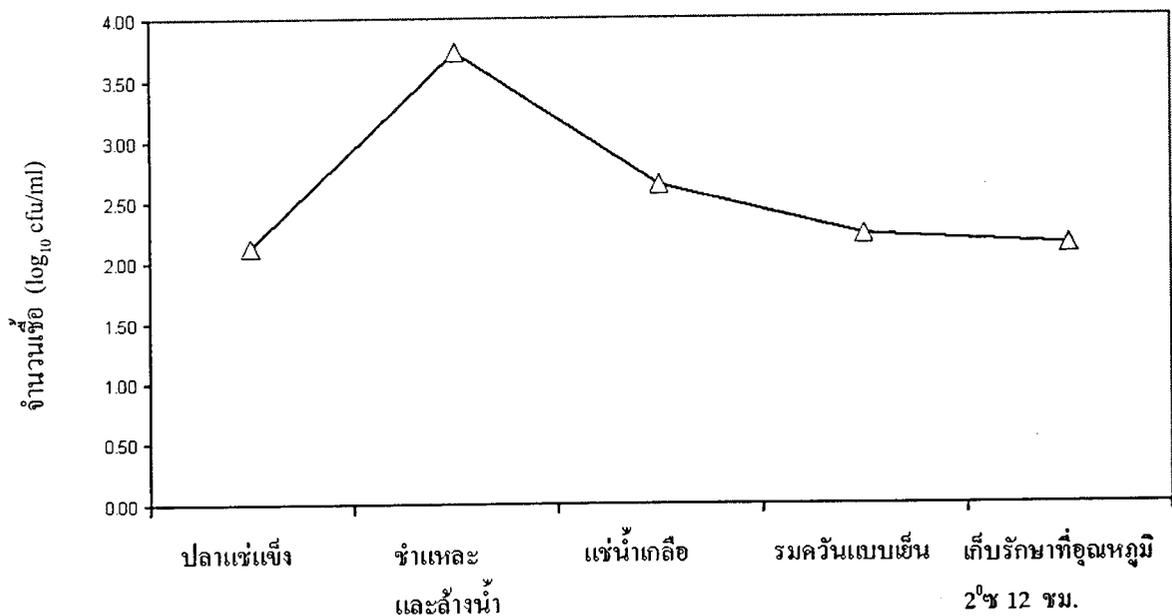
ขั้นตอน	จำนวนเชื้อ (\log_{10} cfu/g \pm S.D.)
ปลาแช่แข็ง (Frozen fish)	2.13 ^a \pm 0.02
ชำแหละและล้างน้ำ (Evisceration and washing)	3.73 ^c \pm 0.07
แช่น้ำเกลือ (Brining)	2.64 ^b \pm 0.02
รมควันแบบเย็น (Cold smoking)	2.23 ^a \pm 0.03
เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2°ซ 12 ชม. (Storage)	2.14 ^a \pm 0.03

a,b.. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 11 ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count) ในระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น โดยวิธี Total plate count ด้วย Petrifilm (3M) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชม. พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยที่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนการชำแหละและล้างน้ำอยู่ในช่วง $3.73 \pm 0.07 \log_{10}$ cfu/g ซึ่งสาเหตุ

เนื่องจากการถูกปนเปื้อนกลับ (Recontamination) ถึงแม้ว่ามีการใช้แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 (v/v) ในการเช็ดทำความสะอาดอุปกรณ์ในระหว่างการชำแหละ แต่ไม่สามารถควบคุมจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดให้ลดจากจำนวนเริ่มต้นในชั้นตอนปลาแช่แข็ง (Frozen fish) ลงได้ เมื่อผ่านกระบวนการรมควันแบบเย็นและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2°C นาน 12 ชม. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจะมีจำนวนคงที่

จากภาพที่ 17 แสดงแนวโน้มของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดซึ่งเพิ่มขึ้นในขั้นตอนการชำแหละและมีแนวโน้มที่ลดลงในขั้นตอนการแช่น้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว (NaCl 360g/L) เนื่องจากผลของเกลือในการลดค่ากิจกรรมของน้ำ ซึ่งขั้นตอนการแช่เกลือเป็นการลดค่า a_w สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ค่า a_w ต้องต่ำกว่า 0.95 เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งความเข้มข้นของน้ำเกลือที่ใช้ต้องสูงกว่าร้อยละ 5 (Hall, 1997) จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนลดลงจากขั้นตอนการชำแหละประมาณ $1.0 \log_{10}$ cfu/g และเมื่อผ่านกระบวนการรมควันแบบเย็นจะสามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลงไปได้ $1.5 \log_{10}$ cfu/g ในระหว่างการเก็บรักษาปลานิรมควันที่อุณหภูมิ 2°C นาน 12 ชม.พบว่า จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสุดท้ายลดลงเหลือ $2.14 \pm 0.03 \log_{10}$ cfu/g



ภาพที่ 17 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count) ในระหว่างขั้นตอนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น

4. ศึกษาจำนวนเชื้อ *A. sobria* ในส่วนผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อ ของปลานิล

จากภาพที่ 18 แสดงการตรวจสอบลักษณะของโคโลนีของเชื้อ *A. sobria* บนอาหาร Starch-ampicillin agar (SAA) พบว่าโคโลนีของ *A. sobria* มีลักษณะกลมมนสีเหลือง-น้ำผึ้ง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. บ่มที่อุณหภูมิ 28^oซ นาน 24 ชม.



ภาพที่ 18 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. sobria* บนอาหาร Starch-ampicillin agar (SAA); 10 mg/L ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 28^oซ นาน 24 ชม.

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า อิทธิพลของบริเวณ ผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และ เนื้อ ของปลานิลมีผลต่อจำนวนของเชื้อ *A. sobria* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นในตารางที่ 2 จึงแสดงอิทธิพลของบริเวณ ผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อ ที่มีผลต่อจำนวนของเชื้อ *A. sobria*

จากตารางที่ 12 แสดงการตรวจสอบจำนวน *A. sobria* ในส่วนผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อของปลานิล ด้วยอาหาร SAA บ่มที่อุณหภูมิ 28^oซ นาน 24 ชม. โดยวิธี Surface plate พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในส่วนเหงือกมีจำนวนเชื้อ *A. sobria* อยู่มากที่สุด คือ $2.97 \pm 0.02 \log_{10}\text{cfu/g}$ และผิวหนังมีจำนวนรองลงมา $2.71 \pm 0.01 \log_{10}\text{cfu/cm}^2$ ในส่วนเครื่องในมี *A. sobria* จำนวนน้อยที่สุด $1.62 \pm 0.02 \log_{10}\text{cfu/g}$ แต่ไม่พบ *A. sobria* ในส่วนเนื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ 1 นั่นคือเชื้อ *A. sobria* เป็นแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่บริเวณ เหงือกและผิวหนัง เนื่องจากบริเวณเหงือกและผิวหนังเป็นบริเวณที่สัมผัสกับน้ำเป็นส่วนใหญ่ซึ่งทำให้มีโอกาสในการปนเปื้อนของเชื้อ *A. sobria* มากกว่าส่วนอื่น (Ahmed et al., 2005) ภาพที่ 19 แสดงกราฟแท่งเปรียบเทียบจำนวน *A. sobria* ในส่วนผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อของปลานิลตามลำดับ

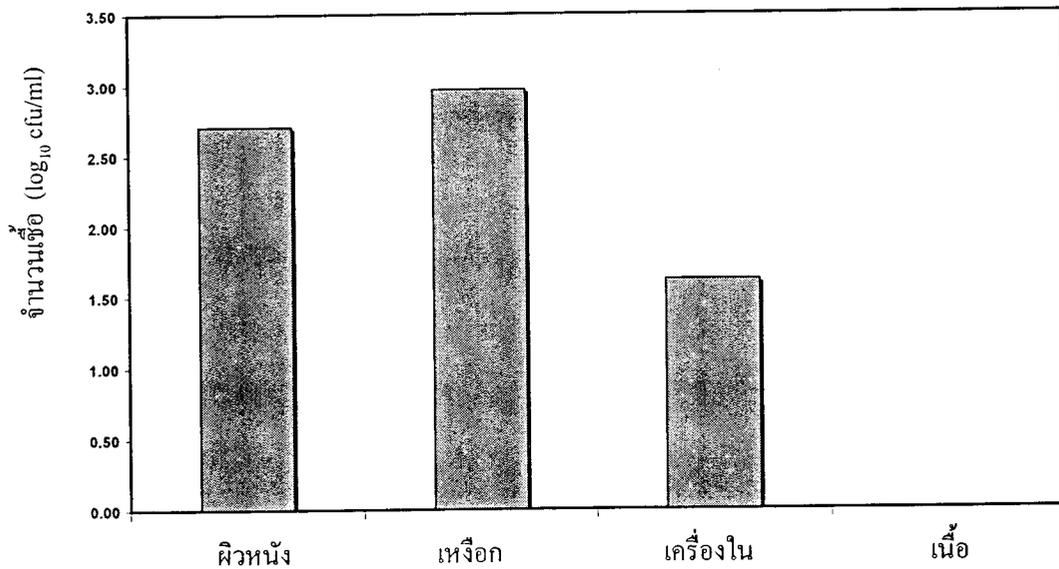
ตารางที่ 12 จำนวน *A. sobria* จากส่วน ผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อ ของปลานิลบนอาหาร SAA บ่มที่อุณหภูมิ 28^o ซ นาน 24 ชม.ตรวจสอบโดยวิธี Surface plate

ส่วน (Parts)	จำนวน <i>A. sobria</i> ($\log_{10}\text{cfu/g} \pm \text{S.D.}$)
ผิวหนัง (Skin)*	$2.71^b \pm 0.01$
เหงือก (Gills)	$2.97^c \pm 0.02$
เครื่องใน (Intestine)	$1.62^a \pm 0.02$
เนื้อ (Meat)	N.D.

a,b.. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

หมายเหตุ * Skin = $\log_{10}\text{cfu/cm}^2$

N.D. = Not Detectable (ตรวจไม่พบ)



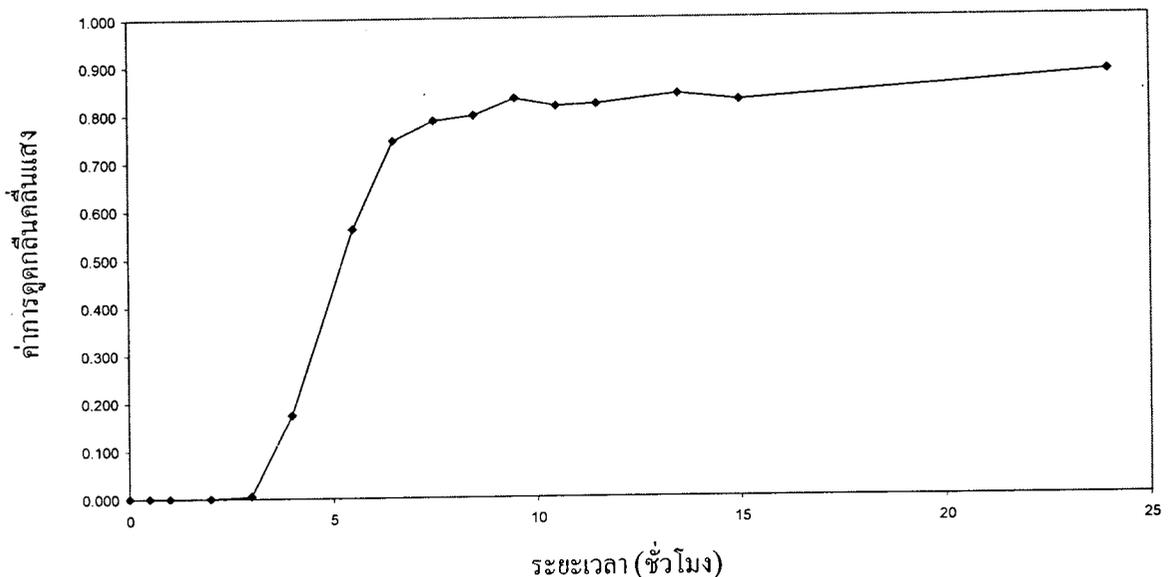
ภาพที่ 19 จำนวน *A. sobria* ในส่วนผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อ ของปลานิลในอาหาร SAA บ่มที่อุณหภูมิ 28^oซ นาน 24 ชม. โดยวิธี Surface plate

5. ศึกษากราฟการเจริญของเชื้อ *Aeromonas sobria* ที่แยกได้จากปลานิล

การศึกษารูปการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. sobria* ในอาหารเลี้ยงเชื้อTSB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37^o ซ โดยสุ่มตัวอย่างที่ช่วงเวลาต่างๆ เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงและตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีการ Pour plate ทำการทดลอง 2 ซ้ำ แสดงในกราฟดังภาพที่ 20

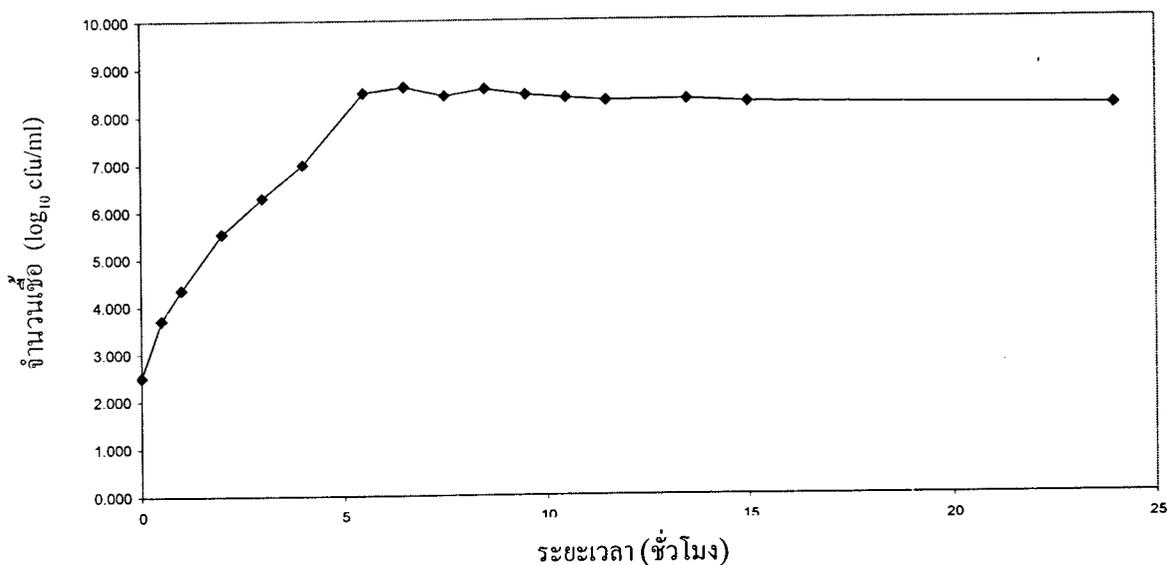
จากภาพที่ 20 แสดงการศึกษากราฟการเจริญของเชื้อ *A. sobria* บนอาหาร TSB ซึ่งบ่มที่ อุณหภูมิ 37⁰ซ นาน 24 ชม โดยตรวจสอบค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance) ของอาหารเลี้ยง เชื้อ TSB ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นค่าการดูดกลืน คลื่นแสงมีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการเพิ่มขึ้นจำนวนเซลล์ของ *A. sobria* ส่งผลทำให้อาหาร เลี้ยงเชื้อ TSB เกิดความขุ่นเพิ่มมากขึ้น

การวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer เป็นวิธีที่ง่ายในการติดตามการเจริญเติบโต ของเชื้อจุลินทรีย์ แต่เป็นการวัดเซลล์ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตรวมกัน (ดวงพร คันธโชติ, 2545) ดังนั้นเพื่อให้ทราบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจึงตรวจสอบโดยวิธี Pour plate โดยใช้ TSA เป็นอาหาร เลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 20 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD₆₀₀) ของเชื้อ *Aeromonas sobria* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่ม ที่ อุณหภูมิ 37⁰ซ นาน 24 ชม.

ในการตรวจสอบจำนวนเชื้อโดยวิธี Pour plate จากภาพที่ 21 พบว่าช่วงแรกในการสุมตัวอย่างมาศึกษากราฟการเจริญ เชื้อ *A. sobria* มีช่วง Lag phase ที่สั้นมาก คือช่วง 0 – 30 นาที โดยมีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ $2 \log_{10}$ cfu/ml และเข้าสู่ช่วง Log phase ในชั่วโมงที่ 1 ซึ่งจำนวนของเชื้อ *A. sobria* จะค่อยๆเพิ่มจำนวนเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ $8 \log_{10}$ cfu/ml และเริ่มเข้าสู่ระยะตาย (Death phase) ภายหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมงหรือมากกว่า ในระยะ Lag phase ซึ่งเมื่อปลูกถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในระยะเริ่มต้นจะยังไม่มีการเพิ่มจำนวนทันทีทันใด แต่จะมีการสังเคราะห์สารต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ทำเซลล์แต่ละเซลล์มีขนาดเพิ่มขึ้น และแบคทีเรียจะมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ระยะ log phase หรือ Exponential phase เซลล์จะมีการแบ่งตัวอย่างสม่ำเสมอด้วยอัตราคงที่เมื่อสร้างกราฟค่า \log_{10} จำนวนเซลล์กับเวลาจะได้เป็นกราฟเส้นตรง (ดวงพร คันธโชติ, 2545)



ภาพที่ 21 กราฟการเจริญเติบโต (Growth curve) ของเชื้อ *Aeromonas sobria* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TS บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม.

เมื่อเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนเซลล์และมีความทนทานต่อความเครียด (Stress) สูงสุด จำนวนประชากรแบคทีเรียอาจสูงถึง $9 \log_{10}$ cfu/ml และเป็นช่วงที่มีจำนวนเซลล์คงที่ ซึ่งเกิดเนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น ปริมาณของสารอาหารหมดลงหรือเกิดจากค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเองเช่น กรดแลคติก (Lactic acid) นอกจากนี้อาจเกิดจากสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ได้จากเมแทบอลิซึม

ลิซิม เช่น เอทานอล (Ethanol) และจากการที่มีปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน ต่อมาในระยะตาย (Death phase) แบคทีเรียจะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งสาเหตุมาจากการสารอาหารที่จำเป็นหมดลง การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดค่าและ การสะสมของสารพิษ ในช่วงนี้เซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell) จะลดลงแบบ Exponential โดยเซลล์จะเกิดย่อยสลาย (Cell lysis) เป็นผลให้เซลล์ถูกทำลาย (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

ดังนั้นในระยะคงที่ (Stationary phase) ที่นำมาใช้คือชั่วโมงที่ 6-15 ซึ่งนำมาใช้ในการศึกษาการเหี่ยวรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างการแปรรูปโดยการหมักวันแบบเย็นต่อไปในการทดลองที่ 6 ซึ่งช่วงเวลาที่นำมาศึกษาคือชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นช่วงที่พบว่ามีความเข้มข้นของเชื้อสูงถึง $8 \log_{10} \text{cfu/ml}$

6. ศึกษาการเหี่ยวรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างการแปรรูปโดยการหมักวันแบบเย็น

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าอิทธิพลของขั้นตอนในการแปรรูป และอิทธิพลของระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria* มีผลต่อจำนวนเหี่ยวรอดของเชื้อ *A. sobria* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 และอิทธิพลร่วมระหว่างขั้นตอนในการแปรรูปและระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria* มีผลต่อการเหี่ยวรอดของเชื้อ *A. sobria* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ดังนั้นในตารางที่ 13 จึงแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างขั้นตอนในการแปรรูป และระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria*

ตารางที่ 13 เชื้อ *A. sobria* (\log_{10} cfu/g±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) โดยพิจารณาเฉพาะอิทธิพลร่วมระหว่างขั้นตอนในการแปรรูปและระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria*

ระดับการปนเปื้อน (\log_{10} cfu/ml)	ภายหลังฆ่าแหละและล้างน้ำ (\log_{10} cfu/g) ± S.D.	ภายหลังแช่น้ำเกลือ (\log_{10} cfu/g) ± S.D.	ภายหลังรมควันแบบเย็น (\log_{10} cfu/g) ± S.D.
Control	N.D.	N.D.	N.D.
2	2.15 ^a ± 0.21	N.D.	N.D.
4	3.71 ^d ± 0.04	2.48 ^b ± 0.01	N.D.
6	5.43 ^c ± 0.01	3.24 ^c ± 0.34	2.15 ^a ± 0.21
8	7.12 ^f ± 0.01	5.54 ^e ± 0.18	3.38 ^c ± 0.03

a,b.. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
หมายเหตุ N.D. = Not Detectable (ตรวจไม่พบ)

การศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็นและปริมาณการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ (Artificial contamination) โดยใช้ปริมาณของเชื้อ *A. sobria* เริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml ตามลำดับ โดยใช้ร้อยละ 0.85 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็น สารเจือจางในการเจือจางความเข้มข้นของเชื้อ *A. sobria* ตามระดับที่ต้องการต่อการเจริญเหลือรอดของ *A. sobria* พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภายหลังจากนำชิ้นปลานิลที่ผ่านการตัดแต่งแล้วมาแช่ในสารละลายของเชื้อ *A. sobria* ที่ระดับความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml ตามลำดับ นาน 2 นาที / ด้าน จากนั้นตรวจสอบจำนวน *A. sobria* ที่หลงเหลือในตัวอย่างเนื้อปลา (\log_{10} cfu/g) โดยใช้อาหาร Starch-ampicillin agar (SAA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (Selective media) ในการศึกษาบ่มที่อุณหภูมิ 28^o ซ นาน 24 ชม. โดยวิธี Surface plate (Palumbo, 1985)

จากตารางที่ 13 พบว่าจำนวน *A. sobria* ที่หลงเหลือในเนื้อปลานิลในขั้นตอนการฆ่าแหละ ซึ่งมีการถ่ายเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml ตามลำดับ พบว่า จำนวนเชื้อ *A. sobria* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยที่จำนวนของ *A. sobria* ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆเช่น ความสามารถในการเกาะติดของเชื้อ *A. sobria* และระยะเวลาในการแช่สารละลายของเชื้อ *A. sobria*

A. sobria เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (Facultative anaerobe) และส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ (Motile aeromonads) สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลา 1 เส้น (Single polar flagellum) (Austin et al., 1996) แม้ว่าจะไม่สามารถยึดเกาะพื้นผิวของตัวอย่างอาหารได้ทั้งหมด แต่ยังสามารถเคลื่อนที่ไปได้ทำให้เกิดความสม่ำเสมอของปริมาณเชื้อ *A. sobria* รอบๆพื้นผิวดัวของตัวอย่างอาหาร จากการทดลองพบว่า *A. sobria* มีจำนวนเชื้อหลงเหลือประมาณร้อยละ 90-95 จากจำนวนเชื้อเริ่มต้น ซึ่งมีจำนวนเชื้อหลงเหลืออยู่ที่ 2.15 ± 0.21 3.71 ± 0.04 5.43 ± 0.01 และ 7.12 ± 0.01 \log_{10} cfu/g ที่ระดับความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml ตามลำดับ

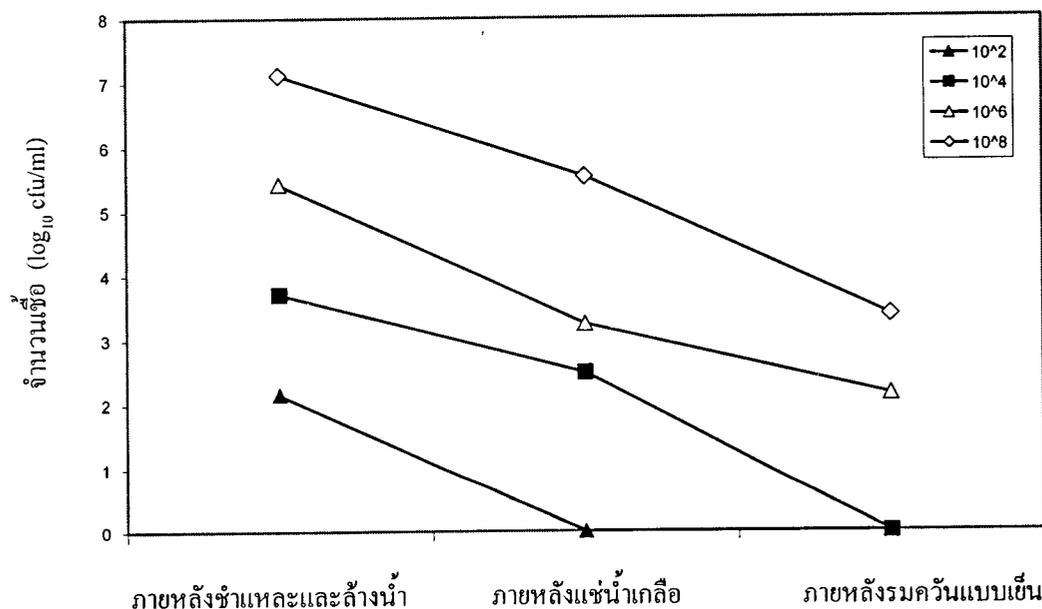
ภายหลังจากนำชิ้นปลาชนิดที่ผ่านการถ่ายเชื้อที่ระดับ 2 4 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml ตามลำดับ จากนั้นนำมาแช่สารละลายน้ำเกลืออิ่มตัว (360g/L) ในอัตราส่วน 1:1 (w/v) อุณหภูมิ 2^o ซ เป็นเวลา 6 ชม. นำมาล้าง (Rinse) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2^o ซ นาน 12 ชม. (Cardinal, M. et al., 2001) จากนั้นตรวจสอบจำนวน *A. sobria* ด้วยอาหาร SAA บ่มที่อุณหภูมิ 28^o ซ นาน 24 ชม. ตรวจสอบจำนวนโดยวิธี Surface plate

พบว่าจำนวน *A. sobria* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีจำนวนลดลง เนื่องจากผลของเกลือในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการลดปริมาณวอเตอร์แอกติวิตี (a_w) ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของความดันระหว่างของเหลวภายในเซลล์ (Intracellular) และภายนอก (Surrounding medium) เกิดเป็นแรงดันภายในเซลล์ (Turgor pressure) เป็นสาเหตุในการเกิดพลาสโมไลซิส (Plasmolysis) ทำให้เซลล์ถูกทำลาย (Csonka, 1989) จากการทดลองพบว่า การแช่ในการละลายเกลือเข้มข้นสามารถลดจำนวน *A. sobria* ให้ลดลงประมาณ 2 \log_{10} cfu/g

การตรวจสอบจำนวน *A. sobria* ภายหลังจากผ่านกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น (Cold smoking) โดยใช้ตูรมควัน (Smokehouse, ขนาด 119x223x213 ซม.) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบบิจิตอล (0-120^oซ) และทำการอบแห้งเบื้องต้น (Pre drying) ที่อุณหภูมิ 30^oซ นาน 30 นาที จากนั้นรมควันแบบเย็นที่อุณหภูมิ 35^oซ นาน 2.5 ชม. ความเร็วลม 2 เมตร/วินาที (Cardinal et al., 2001) โดยใช้ชานอ้อยอบแห้ง (อุณหภูมิ 75^oซ, 24 ชม.) เป็นวัสดุให้ควันพบว่าจำนวน *A. sobria* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีจำนวนเหลือรอด 2.15 ± 0.21 และ 3.38 ± 0.03 \log_{10} cfu/g ที่ระดับความเข้มข้นของจำนวนเชื้อเริ่มต้น 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml ตามลำดับ การลดจำนวนของ *A. sobria* เกิดเนื่องมาจากอิทธิพลของสารประกอบในควันไฟ (Wood smoke) ซึ่งสารประกอบพวกฟอร์มาดีไฮด์ เป็นสารที่ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด (Coultate, 1995) และอิทธิพลจากการลดค่าวอเตอร์แอกติวิตี (a_w) เนื่องจากการแช่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว (NaCl 360g/L) และความร้อนในระหว่างการรมควัน

จากภาพที่ 22 แสดงการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ระหว่างกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็นพบว่า ที่ระดับการปนเปื้อน 2 และ 4 \log_{10} cfu/ml มีแนวโน้มลดลงในขั้นตอนการแช่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว (NaCl 360g/L) และพบว่าไม่มีการเหลือรอดของ *A. sobria* ในขั้นตอนการรมควันแบบเย็น อย่างไรก็ตามที่ แม้ว่าผ่านทุกขั้นตอนในกระบวนการรมควันแล้วก็ตาม จำนวนของ *A. sobria* ที่ระดับการปนเปื้อน 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml ยังคงมีการเหลือรอดอยู่ในช่วง 2-3 \log_{10} cfu/g

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า อิทธิพลของขั้นตอนในการแปรรูป และระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria* มีผลต่อจำนวนร้อยละการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 และอิทธิพลร่วมระหว่างขั้นตอนในการแปรรูปและระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95



ภาพที่ 22 การเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ระหว่างกระบวนการแปรรูปโดย การรมควันแบบเย็น

ดังนั้นในตารางที่ 14 จึงแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างขั้นตอนในการแปรรูปและระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria* ต่อจำนวนร้อยละการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria*

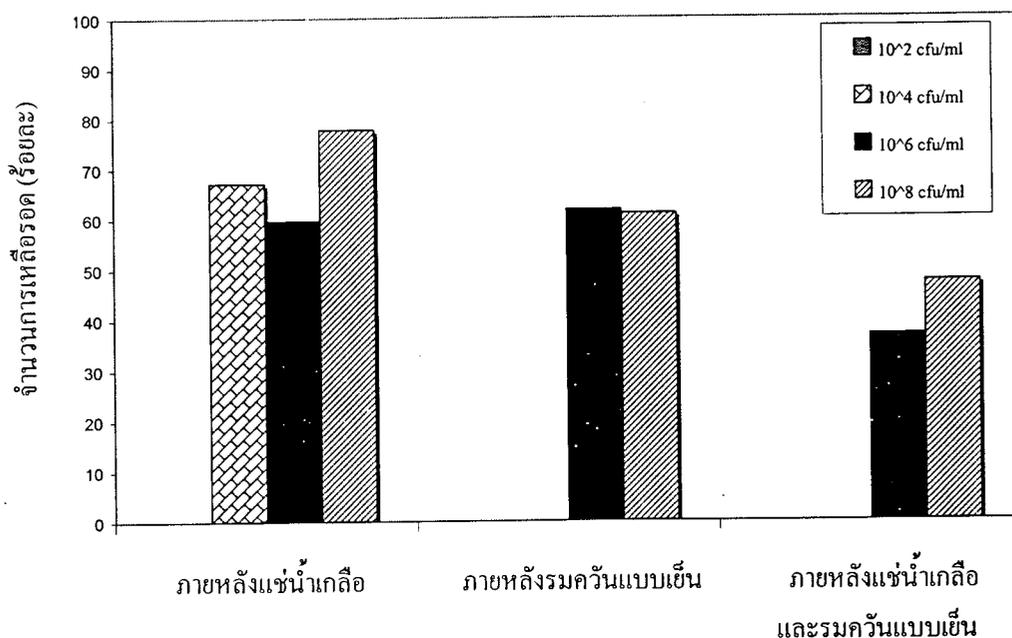
จากตารางที่ 14 แสดงจำนวนร้อยละการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างขั้นตอนการแปรรูปโดยการรมควัน และระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria* พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ภายหลังจากผ่านขั้นตอนการแช่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว (NaCl 360g/L) เชื้อ *A. sobria* เหลือรอดอยู่ประมาณร้อยละ 68 ที่ระดับการปนเปื้อน 4 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml ตามลำดับ และเมื่อผ่านขั้นตอนการรมควันแบบเย็นพบว่า เชื้อ *A. sobria* เหลือรอดอยู่ประมาณร้อยละ 61 เฉพาะที่ระดับการปนเปื้อนที่ 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml เท่านั้น เมื่อผ่านขั้นตอนทั้งหมดในกระบวนการรมควันซึ่งรวมทั้งการแช่น้ำเกลือและการรมควันแบบเย็นแล้ว พบว่าเชื้อ *A. sobria* สามารถเหลือรอดได้ประมาณร้อยละ 36-47 เฉพาะที่ระดับการปนเปื้อนที่ 6 และ 8 \log_{10} cfu/ml แสดงในภาพที่ 23

ตารางที่ 14 จำนวนร้อยละการเหลือรอด \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเชื้อ *A. sobria* โดยพิจารณาเฉพาะ อิทธิพลร่วมระหว่างขั้นตอนในการแปรรูปและระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria*

ระดับการปนเปื้อน (\log_{10} cfu/ml)	ภายหลังแช่น้ำเกลือ [1] % \pm S. D.	ภายหลังรมควันแบบเย็น [2] % \pm S. D.	[1] และ [2] % \pm S. D.
Control	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.	N.D.
4	67.91 ^c \pm 0.42	N.D.	N.D.
6	59.67 ^c \pm 6.28	67.11 ^c \pm 13.56	39.62 ^a \pm 3.88
8	77.82 ^d \pm 2.56	61.04 ^c \pm 1.47	47.49 ^b \pm 0.42

a,b.. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

หมายเหตุ N.D. = Not Detectable (ตรวจไม่พบ)



ภาพที่ 23 จำนวนการเหลือรอด (ร้อยละ) ของเชื้อ *A. sobria* ระหว่างกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น

จากตารางที่ 15 แสดงค่าล็อกผลต่าง ($\log_{10} \text{cfu/g}$) ของจำนวนเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันและระดับของการปนเปื้อนแบบตั้งคราะห์ของเชื้อ *A. sobria* พบว่า แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านขั้นตอนการแช่น้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ($\text{NaCl } 360\text{g/L}$) จำนวนผลต่างของเชื้อ *A. sobria* มีค่าอยู่ในช่วง 1.2- 2.1 $\log_{10} \text{cfu/g}$ ซึ่งน้อยกว่าเมื่อผ่านในขั้นตอนการรมควันแบบเย็นที่มีค่าในช่วง 1.2-2.4 $\log_{10} \text{cfu/g}$ อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านขั้นตอนการแช่เกลือและกระบวนการรมควันแบบเย็นแล้ว พบว่าค่าล็อกผลต่างของจำนวน *A. sobria* มีค่ามากกว่าซึ่งสามารถลดจำนวน *A. sobria* ลงได้ประมาณ 3.25 $\log_{10} \text{cfu/g}$

ตารางที่ 15 ค่าลี้กผลต่างเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเชื้อ *A. sobria* โดยพิจารณาเฉพาะอิทธิพลร่วม ระหว่างขั้นตอนในการแปรรูปและระดับของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria*

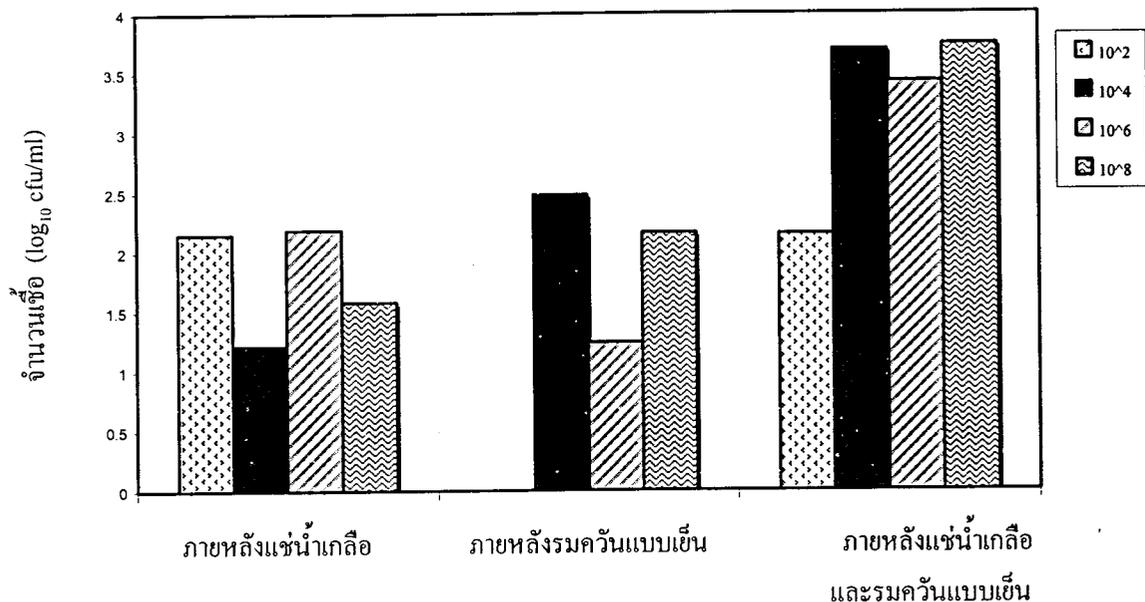
ระดับการปนเปื้อน (log ₁₀ cfu/ml)	ภายหลังแช่น้ำเกลือ [1] (log ₁₀ cfu/g) \pm S.D.	ภายหลังรมควันแบบเย็น[2] (log ₁₀ cfu/g) \pm S.D.	[1] และ [2] (log ₁₀ cfu/g) \pm S.D.
Control	N.D.	N.D.	N.D.
2	2.15 ^{bc} \pm 0.21	N.D.	2.15 ^{bc} \pm 0.21
4	1.23 ^a \pm 0.03	2.48 ^c \pm 0.01	3.71 ^e \pm 0.04
6	2.19 ^{bc} \pm 0.34	1.09 ^a \pm 0.55	3.27 ^{de} \pm 0.21
8	1.58 ^{ab} \pm 0.18	2.81 ^{cd} \pm 0.78	3.73 ^e \pm 0.03

a,b.. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
หมายเหตุ N.D. = Not Detectable (ตรวจไม่พบ)

Antonios, Michael (2005) ได้ศึกษาอิทธิพลของการหมักเกลือและวิธีการรมควันแบบร้อนต่อการรักษาคุณภาพของปลา Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) ในด้านชีวเคมี และคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส พบว่าการหมักเกลือเพียงอย่างเดียวมีอิทธิพลต่อการถนอมอาหารน้อยกว่าอิทธิพลร่วมระหว่างการหมักเกลือและการรมควัน โดยที่ค่าดัชนีที่ศึกษาได้แก่ กรด 2-ไทโอบาบิพูติก ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด และค่าไตรเมทิลเอมีน ในโตรเจน ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหมักเกลืออย่างเดียว ในระยะเวลา 30 วัน ส่วนค่าคะแนนทางด้านประสาทสัมผัสของปลารมควันพบว่า ปลาที่ผ่านการหมักเกลือและรมควันแล้ว มีค่าคะแนนความชอบมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 24 แสดงค่าผลต่างของเชื้อ *A. sobria* ระหว่างกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็นซึ่งสามารถสรุปได้ว่าในกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็นสามารถทำลายเซลล์ของ *A. sobria* ที่มีจำนวนเริ่มต้นสูงสุดไม่เกิน 3.73 log₁₀cfu/g ลงได้ทั้งหมดซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *A. sobria* อยู่ในช่วงขั้นตอนการรมควัน โดยเกิดจากสารประกอบฟอร์มาดีไฮด์ (Formaldehyde) และฟีนอล (Phenol) ในควันไฟซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Antimicrobial compound) แต่อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการแช่น้ำเกลืออิมดัวก็มี

ความสำคัญเช่นกัน เนื่องจากการแช่เกลือ เป็นการลดค่าออกเตอร์แอกทิวิตีและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Hall, 1997)



ภาพที่ 24 ค่าผลต่างของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น

Sunen et al. (2003) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของควันไฟเหลว (Wood smoke condensates) ต่อการยับยั้ง *A. hydrophila* ในปลาเรนโบว์เทราต์ (Rainbow trout) รมควันแบบเย็นซึ่งบรรจุลงภายใต้สภาพสุญญากาศ โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 0 1 7 14 และ 21 วัน ในการทดลองมีการเติม *A. hydrophila* ลงไปจำนวน 5×10^2 cfu/g จากนั้นนำปลา Rainbow trout มาผ่านการหยดควันเหลว นาน 1 นาที ตรวจสอบจำนวน *A. hydrophila* ที่เหลือรอดพบว่า *A. hydrophila* มีจำนวนเหลือรอดอยู่น้อยมาก (น้อยกว่า 2×10^2 cfu/g) ในช่วง 0-1 วันและไม่สามารถตรวจสอบได้ ในช่วง 7 14 และ 21 วัน เนื่องจากผลของสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบในควันเหลวส่วนใหญ่เป็นสารอนุพันธ์ของฟีนอล (Phenol) และ คาร์บอนิล (Carbonyl) ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ยรวม 9,400 mg/kg และ 13,000 mg/kg ตามลำดับ และนอกจากนี้ยังมีผลของการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4.5 รวมลงไปด้วยซึ่งเป็นวิธีฮาร์ดเดิล (Hurdle) ชนิดหนึ่งในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *A. hydrophila* ในปลารมควันแบบเย็น

นอกจากนี้ขั้นตอนการอบแห้งก่อนการรมควัน (Pre drying) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงขึ้น เนื่องจากโดยเมื่อโปรตีนที่สามารถละลายได้ในน้ำเกลือจะละลาย

ออกมา ทำให้สารละลายมีความหนืดขึ้น ในระหว่างช่วงการทำแห้ง น้ำจะระเหยและหยดไปบางส่วน โปรตีนส่วนหนึ่งจะเคลือบอยู่ที่ผิวของชิ้นปลาทำให้ผิวของปลามีลักษณะเป็นมัน ทำให้คว้นสามารถเคลือบบริเวณผิวหนังของชิ้นปลาได้ง่ายขึ้น เกิดสีค่อนข้างเหลือง แต่ถ้าบริเวณผิวหนังชิ้นปลาเปียกเกินไปเมื่อนำไปรมควันจะทำให้เกิดสีดำและกลิ่นไม่ดี ส่วนถ้าผิวหนังแห้งเกินไปจะทำให้คว้นไม่ค่อยจับทำให้ไม่เกิดสีและกลิ่นไม่ดี (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาทิก, 2529)