Agricultural Sci. J. 37 : 5 (Suppl.) : 333-336 (2006) ว. วิทย. กษ. 37 : 5 (พิเศษ) : 333-336 (2549)

การแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียในปลานิลภายหลังการเก็บเกี่ยวและการเหลือรอดของเชื้อกลุ่ม *Aeromonas hydrophila* ระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น

Bacterial Isolation and Identification of Tilapia (*Tilapia nilotica*) after Cultivation and Survival of *Aeromonas hydrophila* group during Cold-smoking Process

ตรี วาทกิจ[1] บวรศักดิ์ ลีนานนท์[1] และ จันทนี อุริยะพงศ์สรรค์[1]

Tree Vatakit[1], Borwonsak Leenanon[1] and Juntanee Uriyapongson[1]

Abstract

The objective of this research was to isolate and identify bacteria from skin gills and intestine of Tilapia cultured in fish baskets at Nam-phong river area in Khon Kaen. It was found that there were 12 stains of bacteria in total including *Aeromonas sobria*, *Bordetell alcaligenes*, *Edwardsiella tarda*, *Flavimonas oryzihaditans*, *Plesiomonas shigelloids*, *Proteus mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgalis*, *Providencia alcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putrefaciens* and *Weeksella virosa*. Then the survival of *Aeromonas sobria* during cold smoking process was evaluated. The initial numbers of artificially contaminating *A. sobria* were adjusted to 2 4 6 and 8 $\log_{10}$ cfu/ml and found that after passing through the whole smoking process, *A. sobria* had a percentage of survival about 36-47% (2-3 $\log_{10}$ cfu/g) at the contamination level of 6 and 8 $\log_{10}$ cfu/ml and the process could eliminate all bacteria with the initial concentration at 3.71 $\log_{10}$ cfu/g. Also the efficiency for *A. sobria* inactivation depended on the smoking step which resulted from formaldehyde and phenol compounds in smoke to reduce the number of *A. sobria* to 1.2-2.4 $\log_{10}$cfu/g.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อแยกและจำแนกแบคทีเรียจาก ผิวหนัง เหงือก และเครื่องในของปลานิลซึ่งเพาะเลี้ยงในกระชังบริเวณแม่น้ำพอง จังหวัดขอนแก่น พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 12 สายพันธุ์ได้แก่ *Aeromonas sobria*, *Bordetell alcaligenes*, *Edwardsiella tarda*, *Flavimonas oryzihaditans*, *Plesiomonas shigelloids*, *Proteus mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgalis*, *Providencia alcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putrefaciens* และ *Weeksella virosa* จากนั้นศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างการรมควันแบบเย็น โดยปรับจำนวนเชื้อเริ่มต้นของการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ของเชื้อ *A. sobria* เป็น 2 4 6 and 8 $\log_{10}$ cfu/ml พบว่าเมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแล้ว เชื้อ *A. sobria* มีการเหลือรอดอยู่ประมาณร้อยละ 36-47 (2-3 $\log_{10}$ cfu/g) ที่ระดับการปนเปื้อน 6 และ 8 $\log_{10}$ cfu/ml และกระบวนการรมควันแบบเย็นสามารถทำลายเชื้อที่มีจำนวนเริ่มต้น 3.71 $\log_{10}$cfu/g ลงได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. sobria* ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการรมควันซึ่งเป็นผลมาจากสารฟอร์มาดีไฮด์และสารฟีนอลในควันฟที่สามารถลดจำนวนเชื้อ *A. sobria* ลงได้ประมาณ 1.2-2.4 $\log_{10}$ cfu/g

คำนำ

ปลานิล (*Tilapia nilotica*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและเป็นสินค้าส่งออกที่มีศักยภาพสูงเนื่องจากสามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพเจริญเติบโตรวดเร็ว เป็นที่นิยมบริโภคกันแพร่หลาย อาจมีปัญหาและอุปสรรคบ้างในการส่งออกปลานิลสดเนื่องจาก ปัญหาปลานิลราคาต่ำ, ปัญหาน้ำท่วม เป็นต้น ด้วยเหตุนี้การหาแนวทางในการเพิ่มมูลค่าในการส่งออกผลิตภัณฑ์เพื่อการส่งออก จึงเป็นแนวทางที่สำคัญ ซึ่งการแปรรูปด้วยการรมควัน (smoking process) ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาปลานิล นอกจากนี้ยังเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยความร้อนที่เป็นที่นิยมมา

นาน ทั้งในประเทศและต่างประเทศ โดยการแปรรูปด้วยวิธีการรมควันจะใช้อุณหภูมิในการแปรรูปอยู่ในช่วงต่ำกว่า 30^0ซ (cold smoking) และ มากกว่า 60^0ซ (hot smoking) ซึ่งการแปรรูปด้วยวิธีการรมควันเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาโดยอาศัยหลักการลดค่า water activity (a_w) ลงบางส่วน และจากการเติมเกลือ และการทำแห้ง ทำให้เกิดองค์ประกอบทางกายภาพในการทำหน้าที่ป้องกันและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้องค์ประกอบของควันที่ใช้ในการแปรรูป

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[1] Department of Food Technology, Faculty of Technology, Khon Kaen University

ประกอบด้วยสารฟอร์มาลดีไฮด์ และ สารฟีนอล ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามอาจมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังคงเหลือรอดอยู่ในระหว่างกระบวนการรมควันโดยเฉพาะการรมควันแบบเย็น ซึ่งใช้อุณหภูมิต่ำในการแปรรูป ซึ่งมีงานวิจัยหลายเรื่องที่กล่าวถึงเชื้อกลุ่ม *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila, A. sobria, A. caviae*) (Popoff et al., 1981) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบในปลา สัตว์ปีกและเนื้อสัตว์ โดยมักพบในปลาน้ำจืดเป็นส่วนใหญ่และสามารถเจริญเติบโตในที่อุณหภูมิตู้เย็น ได้มีรายงานระบุถึงอันตรายจากสารเอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) ที่สร้างขึ้นซึ่งทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โดยจะเป็นอันตรายแก่เด็กและผู้สูงอายุ (Hristo, 2005) ดังนั้นเมื่อทราบข้อมูลชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในปลารมควัน การควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคจึงสามารถปฏิบัติได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจทำการศึกษาการแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่พบในส่วนต่างๆของปลานิลก่อนนำไปแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็นและศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *Aeromonas sobria* ที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น

อุปกรณ์และวิธีการ

ปลานิลเก็บเกี่ยวจากกระชัง บริเวณตำบลห้วยเสือเต้น อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ต่อมานำปลานิลมาทำการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -35° ซ จนอุณหภูมิบริเวณกึ่งกลางลดต่ำถึง -18°ซ วัดค่าอัตราการแช่เยือกแข็ง (freezing rate) มีค่าเท่ากับ 8.47± 0.47 มม./ชม.จากนั้นทำการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากบริเวณ ผิวหนัง เหงือก และเครื่องใน นอกจากนี้ยังทำการแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ Nutrient Agar (NA) Xylose-Lysine-Deoxycholate (XLD) และ Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose agar (TCBS) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่างๆของปลานิล โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม. และตรวจสอบสายพันธุ์แบคทีเรียด้วย API 20E (bioMeriux, France) และนอกจากนี้ยังทำการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างขั้นตอนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น (35° ซ, 2.5 ชม.) ทำการตรวจสอบจำนวน *Aeromonas sobria* ในส่วนผิวหนัง เหงือกและ เครื่องใน ของปลานิล รวมทั้งตรวจสอบการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น (35° ซ, 2.5 ชม.)

ผลและวิจารณ์

บริเวณผิวหนังของปลานิลเป็นส่วนที่มีจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนมากที่สุดคือ 4.95±0.01 $\log_{10}$cfu/cm^2 ส่วนจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบริเวณเครื่องใน (4.71±0.04 $\log_{10}$cfu/g) มีจำนวนมากกว่าบริเวณเหงือก (3.96±0.03 $\log_{10}$cfu/g) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ahmed and Uddin (2005) โดยตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในบริเวณเครื่องในและเหงือกของปลานิลพบว่ามีจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 7.4- 8.0 $\log_{10}$ cfu/g และ 5.9 - 6.3 $\log_{10}$ cfu/g ในส่วนเครื่องในและเหงือกตามลำดับ และในการแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียในส่วนต่างๆของปลานิล(ผิวหนัง เหงือก และเครื่องใน) โดยใช้ Nutrient Agar (NA) Xylose-Lysine-Deoxycholate (XLD) และ Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose agar (TCBS) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aeromonas sobria, Bordetell alcaligenes, Edwardsiella tarda, Flavimonas oryzihaditans, Plesiomonas shigelloids, Proteus mirabilis, P. penneri, P. vulgalis, Providencia alcaligenes, Pseudomonas aeruginosa, P. putrefaciens* และ *Weeksella virosa* (Table 1) และในการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างขั้นตอนการแปรรูปโดยการรมควัน คือขั้นตอน ปลาแช่เยือกแข็ง การชำแหละและล้างน้ำ การแช่น้ำเกลืออิ่มตัว (NaCl, 360g/L) การรมควัน และ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2°ซ นาน 12 ชม.ด้วย Petrifilm™ aerobic plate count (3M, USA) พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยที่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนการชำแหละและล้างน้ำ (3.73±0.07 $\log_{10}$cfu/g) ซึ่งสาเหตุเนื่องจากการถูกปนเปื้อนกลับ (recontamination) เมื่อผ่านกระบวนการรมควันแบบเย็น และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2°ซ นาน12 ชม. พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจะมีจำนวนคงที่ ระหว่างการเก็บรักษา และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสุดท้ายลดลงเหลือ 2.14±0.03 $\log_{10}$ cfu/g

Table 1 Bacterial isolation and identification from skin gills and intestine of Tilapia

Bacteria name	Skin		Gills		Intestine	
	No.	%	No.	%	No.	%
Aeromonas sobria	2	20.00	3	30.00	1	16.67
Bordetell alcaligenes	1	10.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Edwardsiella tarda	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	16.67
Flavimonas oryzihaditans	N.D.	N.D.	1	10.00	N.D.	N.D.
Plesiomonas shigelloids	1	10.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Proteus mirabilis	2	20.00	2	20.00	N.D.	N.D.
Proteus penneri	1	10.00	1	10.00	N.D.	N.D.
Proteus vulgaris	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	16.67
Providencia alcaligenes	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2	33.33
Pseudomonas aeruginosa	1	10.00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Pseudomonas putrefaciens	N.D.	N.D.	2	20.00	N.D.	N.D.
Weeksella virosa	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

N.D. = Not Detectable

การตรวจสอบจำนวน *A. sobria* ในส่วนผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อของปลานิล ด้วยอาหาร SAA บ่มที่อุณหภูมิ 28^0ซ นาน 24 ชม. โดยใช้วิธี surface plate พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยในส่วนเหงือกมีจำนวนเชื้อ *A. sobria* อยู่มากที่สุดคือ 2.97 ± 0.02 $\log_{10}$cfu/g และผิวหนังมีจำนวนรองลงมาคือ 2.71 ± 0.01 $\log_{10}$cfu/cm^2 ในส่วนเครื่องในมี *A. sobria* จำนวนน้อยที่สุดคือ 1.62 ± 0.02 $\log_{10}$cfu/g จากนั้นศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น และปริมาณการปนเปื้อนแบบสังเคราะห์ (artificial contamination) โดยใช้ปริมาณของเชื้อ *A. sobria* เริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 $\log_{10}$cfu/ml จากการทดลอง พบว่าการแช่ในการละลายเกลือเข้มข้นสามารถลดจำนวน *A. sobria* ให้ลดลงประมาณ 2 $\log_{10}$cfu/g จากนั้นรมควันแบบเย็นที่อุณหภูมิ 35 $^\circ$ ซ นาน 2.5 ชม. ความเร็วลม 2 เมตร/วินาที (Cardinal et al., 2001) โดยใช้ชานอ้อยอบแห้ง (อุณหภูมิ 75^0ซ, 24 ชม.) เป็นวัสดุให้ควันพบว่ามีจำนวน *A. sobria* เหลือรอด 2.15 ± 0.21 และ 3.38 ± 0.03 $\log_{10}$cfu/g ที่ระดับความเข้มข้นของจำนวนเชื้อเริ่มต้น 6 และ8 $\log_{10}$cfu/ml ตามลำดับ เนื่องจากอิทธิพลของสารประกอบในควันไฟ (wood smoke) เช่น สารประกอบพวกฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด (Coultate, 1996) และอิทธิพลจากการลดลงของค่า water activity (a_W) เนื่องจากการแช่สารละลายเกลืออิ่มตัว (NaCl, 360g/L) และผลของความร้อนในระหว่างการรมควัน

การเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็นพบว่า ที่ระดับการปนเปื้อน 2 และ 4 $\log_{10}$cfu/ml โดยที่ *A. sobria* มีแนวโน้มลดลงในขั้นตอน การแช่สารละลายเกลืออิ่มตัว (NaCl, 360g/L) และพบว่าไม่มีการเหลือรอดของ *A. sobria* ในขั้นตอนการรมควันแบบเย็น อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะผ่านทุกขั้นตอน ในกระบวนการรมควันจำนวนของ *A. sobria* ที่ระดับการปนเปื้อน 6 และ 8 $\log_{10}$cfu/ml ยังคงมีการเหลือรอดอยู่ในช่วง 2-3 $\log_{10}$cfu/g (Figure 1)

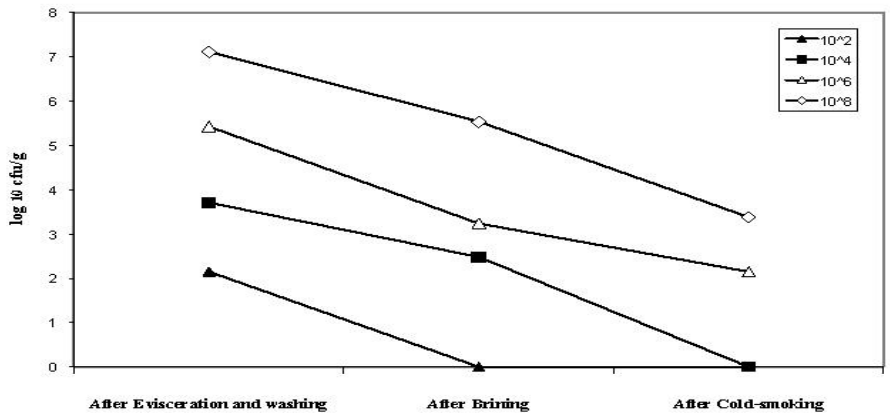

Figure 1 Survival of *Aeromonas sobria* during cold smoking process

Table 2 Log reduction (log_{10}cfu/g ± S.D.) of *A. sobria* during cold smoking steps

Level of contamination (log_{10}cfu/ml)	After Evisceration& washing (log_{10}cfu/g) ± S.D.	After Brining (log_{10}cfu/g) ± S.D.	After Cold-smoking (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^{e} ±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

N.D. = Not Detectable

จาก Table 2 แสดงค่าล็อคผลต่างของเชื้อ *A. sobria* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.2- 2.1 log_{10}cfu/g ซึ่งน้อยกว่าเมื่อผ่านในขั้นตอนการรมควันแบบเย็น ที่มีค่าในช่วง 1.2-2.4 log_{10}cfu/g อย่างไรก็ตาม เมื่อผ่านขั้นตอนการแช่เกลือ และกระบวนการรมควันแบบเย็นแล้ว พบว่าค่าล็อคผลต่างจำนวน *A. sobria* มีค่ามากกว่าซึ่งสามารถลดจำนวน *A. sobria* ลงได้ประมาณ 3.25 log_{10}cfu/g เฉพาะที่ระดับการปนเปื้อนที่ 6 และ 8 log_{10}cfu/ml จากค่าล็อคผลต่างของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างกระบวนการแปรรูป โดยการรมควันแบบเย็น และสามารถสรุปได้ว่า ในกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็นสามารถทำลายเซลล์ของ *A. sobria* ที่มีจำนวนเริ่มต้นสูงสุดไม่เกิน 3.73 log_{10}cfu/g ลงได้ทั้งหมดซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *A. sobria* อยู่ในช่วงขั้นตอนการรมควัน โดยเกิดจากสารประกอบฟอร์มาลดีไฮด์และสารฟีนอลในควันไฟ ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (antimicrobial compound) แต่อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการแช่น้ำเกลืออิ่มตัว ก็มีความสำคัญเช่นกันเนื่องจากการแช่เกลือเป็นการลดค่า a_w และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

สรุป

จากการทดลองพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียจากส่วนต่างๆของปลานิลปลานิลได้ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ และพบว่ากระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็นสามารถทำลายจำนวนของเชื้อ *A. sobria* ได้ไม่เกิน 3.73 log_{10}cfu/g ลงได้ทั้งหมด

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ที่ให้ทุนสนับสนุนในงานวิจัยและสถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวที่สนับสนุนการนำเสนอผลงานในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Ahmed AH, Uddin, N. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. Aquaculture. 250:566-572.

Cardinal M, Cornet J, Serot T, Baron R. 2006. Effects of the smoking process on odour characteristics of smoked herring (*Clupea harengus*) and relationships with phenolic compound content. Food Chemistry. 96: 137-146.

Coultate TP. 1996. Food The Chemistry of Its Components. 3rd ed. London: Athenaeum Press Ltd, Tyne & Wear.

Hristo Daskalov. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. Food Control 2005; 17: 474-483.

Popoff M, Cognault C, Kinedjian M, Lemelin M. 1981. Polynucleotide sequence relatedness among motile A*eromonas* species. Current Microbiology. 159:1629-1631.