ภาคผนวก ก

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird-Parker' Medium (BP)

Tryptone	10	กรัม
Meat extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Lithium chloride	5	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น คนให้เข้ากันต้มจนละลาย ปรับให้มีพีเอช 6.8 แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 90 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ลดอุณหภูมิอาหารเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลายต่อไปนี้ ซึ่งสารเหล่านี้ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านเครื่องกรองแบคทีเรีย ซึ่งเมื่อผสมแล้วต้องใช้ทันที

Glycine 20 เปอร์เซ็นต์	63	มิลลิลิตร
Potassium tellurite 1 เปอร์เซ็นต์	1	มิลลิลิตร
Sodium pyruvate 20 เปอร์เซ็นต์	5	มิลลิลิตร
Egg yolk emulsion	5	มิลลิลิตร

การเตรียม Egg yolk emulsion

ล้างไข่ให้สะอาด แช่ใน Mercuric chloride 0.1 เปอร์เซ็นต์ นานประมาณ 10-15 นาที เจาะไข่ด้านป้านเพื่อเอาไข่ขาวออกให้หมด เทไข่แดงใส่ลงในกระบอกตวงที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้เท่ากับปริมาตรของไข่แดง ใช้ปิเปตคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2. Glucose-Salt-Teepol Broth (GSTB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	10	กรัม

Sodium chloride	30	กรัม
Glucose	5	กรัม
Methyl violet	0.002	กรัม
Teepol	4	มิลลิลิตร

Double strength medium

Beef extract	6	กรัม
Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	60	กรัม
Glucose	10	กรัม
Methyl violet	0.004	กรัม
Teepol	8	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 9.4±0.2 ถ่ายลงหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient Agar (NA) ประกอบด้วย

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น (ยกเว้น agar) ปรับให้มีพีเอช 7.0 จึงใส่วุ้นลงไปหลอมละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5	กรัม
Yaest extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.1±0.1 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Sulfite Indole Motility Medium (SIM)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	30	กรัม
Peptonized iron	0.2	กรัม
Sodium thiosulfate	0.025	กรัม
Agar	3	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.3 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) Agar

Yeast extract	5	กรัม
Polypeptone หรือ Proteose peptone No. 3	10	กรัม
Sodium thiosulfate ($5H_2O$)	10	กรัม
Sodium cholate	3	กรัม
Oxgall	5	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม

Ferric citrate	1	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นจนเดือด ปรับให้มีพีเอช 8.6±0.2 อาหารนี้เตรียมเสร็จควรใช้ทันที

7. Trypticase Soy Broth (TSB) ประกอบด้วย

Tryptone	5	กรัม
Soytone	5	กรัม
Sodium chlorine	5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.3 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Triple Sugar Iron (TSI) Agar

Beef extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	15	กรัม
Proteose peptone	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Saccharose	10	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Ferrous sulfate	0.2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม

Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ต้มให้เดือดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับให้มีพีเอช 7.4 ถ่ายลงหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางกายภาพและเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

1. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยพีเอชมิเตอร์

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำทั้งตัวจำนวน 2-3 ตัว มาปอกเปลือกออกแล้วบดสับด้วยเครื่องบดประมาณ 2 นาที จนเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งตัวอย่างกุ้งที่บดสับแล้ว 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยพีเอชมิเตอร์

2. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1999)

วัสดุอุปกรณ์

1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)
3. โถดูดความชื้น (desicator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีการหาความชื้น

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบไฟฟ้า ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว

4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 4-5 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบไฟฟ้า ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก

5. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

6. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{100 \times \text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. **การหาค่าปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB)** โดยวิธี Conway (Hasegawa, 1987)

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำทั้งตัวจำนวน 2-3 ตัว มาปอกเปลือกออกแล้วบดสับด้วยเครื่องบดประมาณ 2 นาที จนเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งตัวอย่างกุ้งน้ำหนักแน่นอน 2 กรัม เติม 4 เปอร์เซ็นต์กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid : TCA) เย็น 8 มิลลิลิตร ลงไปบดด้วยโกร่งบดยา (ที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง) ถ่ายสารละลายตัวอย่างลงในหลอดหมุนเหวี่ยง ปิดฝาหลอดด้วยแผ่นพาราฟิน นำเข้าเครื่องแยกเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์ TVB

1. ทา grease ที่ขอบฝาจาน conway ดูดบอร์ริกอินดิเคเตอร์ 1 มิลลิลตร ใส่ในวงกลมชั้นในของ จาน conway ดูดสารละลายโปแตสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัวใส่ชั้นนอกชิดรอยแบ่งของจาน ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ชั้นนอกของจาน conway แต่อยู่คนละด้านกับสารละลายโปแตสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัว ปิดฝา จาน conway ให้สนิท เอียง จาน conway เบาๆ ให้สารละลายโปแตสเซียมคาร์บอเนตอิ่มตัวผสมกับสารละลายตัวอย่าง ระวังอย่าให้เกิดการผสมกับอินดิเคเตอร์ที่วงกลมชั้นในเป็นอันขาด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 45-60 นาที จากนั้นเปิดฝาจาน conway แล้วไตเตรตบอร์ริกอินดิเคเตอร์ในวงกลมชั้นในด้วยกรดเกลือ 0.02 N จนกระทั่งสีเขียวจางหายไป จดปริมาตร การใช้กรดเกลือทำ blank โดยใช้ 4 เปอร์เซ็นต์ TCA จำนวน 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

การคำนวณ

TVB (มิลลิกรัมไนโตรเจน/100 กรัมตัวอย่าง)

$$= \frac{(N)\,(14)\,(A-B)\,(V)\,(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

เมื่อ N = นอร์มัลลิตี้ของกรดเกลือที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง

A = มิลลิลิตรของกรดเกลือที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของกรดเกลือที่ใช้ไตเตรต blank

V = ปริมาตรรวมของตัวอย่างและ TCA ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย 4 เปอร์เซ็นต์กรดไตรคลอโรอะซิติก

   ละลาย 40 กรัมไตรคลอโรอะซิติกในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร

2. สารละลายอิ่มตัวโปแตสเซียมคาร์บอเนต

   ละลาย 60 กรัมโปแตสเซียมคาร์บอเนตในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ต้ม 10 นาที ทำให้เย็น แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง

3. บอร์ริกอินดิเคเตอร์ (Inner ringer solution)

   ละลาย 10 กรัมของกรดบอร์ริกใน 200 มิลลิลิตรเอธานอล แล้วเติม 10 มิลลิลิตรของ mixed indicator ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

4. mixed indicator

   ละลาย 0.01 กรัมของ bromocresol green และ 0.02 กรัมของ methyl red ด้วยเอธานอล แล้วปรับด้วยเอธานอลจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์

1. การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (TVC)

เป็นการหาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดตามวิธีของ Speck (1976) โดยสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำทั้งตัวจำนวน 5-7 ตัว มาตัดเป็นชิ้นแล้วสุ่มชั่งให้ได้น้ำหนัก 50 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากันดีกับน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 450 มิลลิลิตร โดยใช้ stomacher นาน 1 นาที แล้วใช้ปิเปตที่นึ่งฆ่าเชื้อดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปทำให้ได้ความเจือจางเป็น 1 : 100, 1 : 1,000 และ 1 : 10,000 ในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันทุกครั้งก่อนที่จะปิเปต โดยปิเปตตัวอย่างความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ เททับด้วยอาหารวุ้น plate count agar (PCA, Difco) ปริมาตรประมาณ 10-15 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารวุ้นและตัวอย่างเข้ากันได้ดี ทำตัวอย่างละ 2 ความเจือจาง ๆ ละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน นับจำนวนแบคทีเรียเฉพาะจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อกุ้ง 1 กรัม

2. การวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus*

เป็นการปริมาณ *Staphylococcus aureus* ตามวิธีการของ Hasegawa (1987) ซึ่งใช้ตัวอย่างจากการหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในการวิเคราะห์ ทำ dilution 10^1 และ 10^2 ดูดตัวอย่างของแต่ละ dilution ปริมาณ 1 streak ลงบน Baird-Parker Medium with egg yolk ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจานอาหาร โดยแต่ละความเจือจางให้ทำ 2 ซ้ำ กลับจานอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีสีดำแวววาว ขนาดเล็กประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร และรอบโคโลนีมีบริเวณใส (clear zone) ถ่ายโคโลนีที่คิดว่าเป็น *S. aureus* ลงใน Brain Heart Infusion Broth (BHI) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ดูดตัวอย่างมาจากหลอด BHI จำนวน 0.1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่ฆ่าเชื้อแล้ว และเติม rabbit plasma จำนวน 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วตรวจผลการแข็งตัวของพลาสมาหลังจาก 6 ชั่วโมง ถ้าพลาสมายังไม่แข็งตัวให้เก็บหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วตรวจผลอีกครั้ง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง

3. การวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

เป็นการหาปริมาณแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งตามวิธีการของ Hasegawa (1987) ซึ่ง โดยสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่เหลือจากการหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมาตัวอย่างละ 20 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากันดีกับน้ำเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 180 มิลลิลิตร โดยใช้ stomacher นาน 1 นาที แล้วใช้ปิเปตที่นึ่งฆ่าเชื้อดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากความเข้มข้นสูงสุด (10^{-1}) จำนวน 10 มิลลิลิตรใส่ลงใน 9 มิลลิลิตร double strength glucose salt teepol broth (GSTB) จำนวน 3 หลอด แต่สำหรับความเข้มข้นรองลงมา (1 : 100 และ 1 : 1,000) ให้ดูดมาจำนวน 1 มิลลิลิตรลงใน single strength glucose salt teepol broth อย่างละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ให้ผลเป็นบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น ทำการขีดเชื้อที่เลี้ยงใน enrichment broth ทั้งหมดลงบน Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โคโลนีของ *V. parahaemolyticus* มีลักษณะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน สีเขียวเข้มตรงกลาง และค่อนข้างเหนียว เลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus* ไปทดสอบทางชีวเคมีโดยการขีดและแทงลูปลงในหลอดอาหารที่มีอาหาร TSI ลงใน peptone water (1%, 3%, 7%, 9% และ 10% NaCl) และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พร้อมกันนั้นก็ทดสอบการสร้างอินโดล การเคลื่อนที่ในอาหาร SIM และการใช้ L-Lysine HCL โดยเชื้อจะมีการเจริญได้ในสารละลาย peptone water ที่มีเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ 7 เปอร์เซ็นต์ และ 9 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างอินโดลและเคลื่อนที่ได้ ในอาหาร SIM และสามารถใช้ L-Lysine HCL ได้