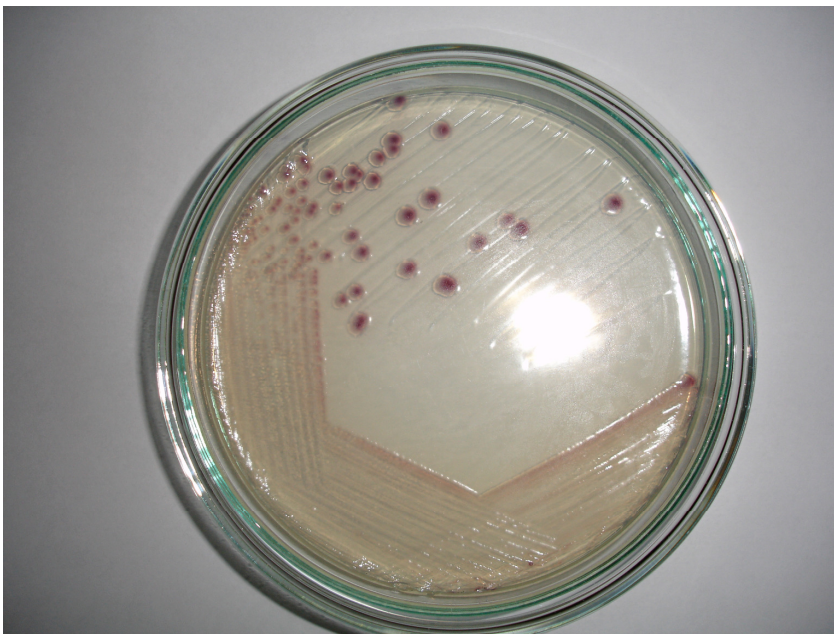


บทที่ 3

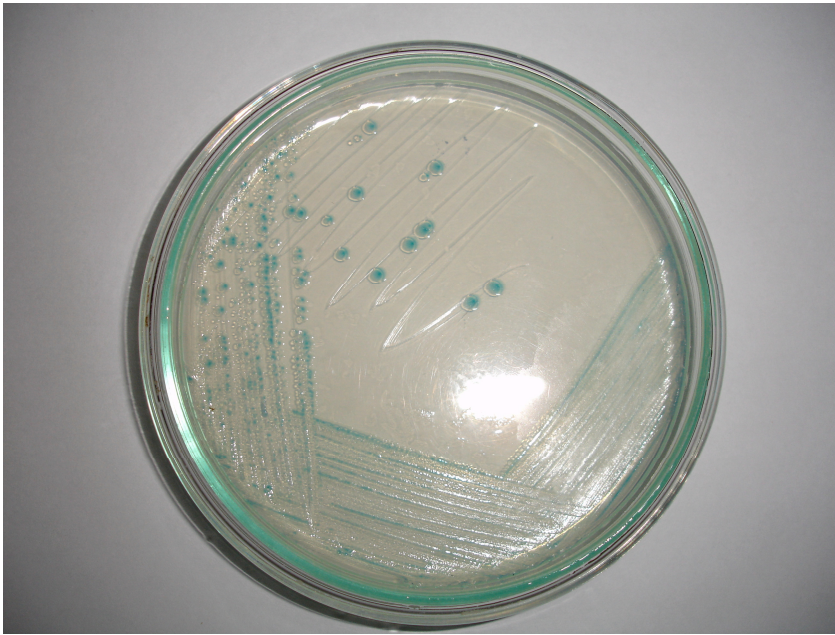
ผล

3.1 การตรวจนับปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวก่อนเข้ากระบวนการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็ง

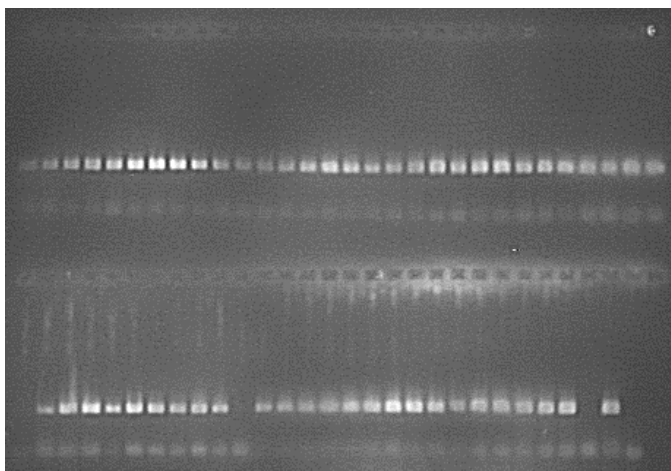
จากการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวอย่างละ 10 ตัวอย่าง นำตัวอย่างกุ้ง มาตรวจหาปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* โดยวิธี MPN ทำการแยกโคโลนีที่คาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ด้วยการ streak บน CHROMagar สังเกตลักษณะโคโลนีที่บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีลักษณะกลม ขอบเรียบ โคโลนีสีม่วงคราม (รูปที่ 3.1) และโคโลนีที่บ่งชี้ว่าเป็น *V. cholerae* ซึ่งมีลักษณะกลม ขอบเรียบ โคโลนีมีสีฟ้า (รูปที่ 3.2) นำโคโลนีดังกล่าวไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และยืนยันผลบวกอีกครั้งด้วย PCR (รูปที่ 3.3 และรูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.1 ลักษณะของโคโลนี *V. parahaemolyticus* บน CHROMagar



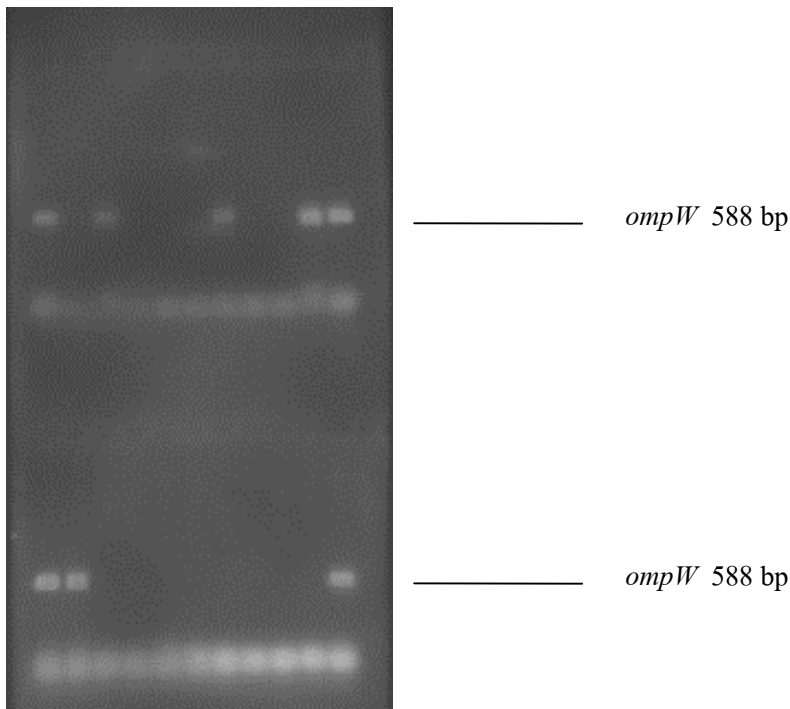
รูปที่ 3.2 ลักษณะของโคโลนี *V. cholerae* บน CHROMagar



————— *toxR* 367 bp

————— *toxR* 367 bp

รูปที่ 3.3 ผลการทำ PCR ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยใช้จีน *tox R* เป็นจีนเป้าหมาย



รูปที่ 3.4 ผลการทำ PCR ของเชื้อ *V. cholerae* โดยใช้จีน *ompW* เป็นจีนเป้าหมาย

จากการศึกษากุ้งกุลาดำจำนวน 10 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีค่าอยู่ระหว่าง < 3 - 3,600 MPN/กรัม *V. cholerae* มีค่าอยู่ระหว่าง < 3 - 3 MPN/กรัม ส่วนการศึกษาในกุ้งขาวจำนวน 10 ตัวอย่างตรวจพบ *V. parahaemolyticus* มีค่าอยู่ระหว่าง 11 - 11,000 MPN/กรัม และ *V. cholerae* มีค่าอยู่ระหว่าง < 3-11 MPN/กรัม (ตาราง 3.1)

ตารางที่ 3.1 จำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวก่อนเข้ากระบวนการผลิตกุ้งแช่แข็ง

แหล่งที่มาของกุ้ง	กุ้งกุลาดำ จำนวนเชื้อ MPN/กรัม		แหล่งที่มาของกุ้ง	กุ้งขาว จำนวนเชื้อ MPN/กรัม	
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>
บริษัทห้องเย็นโซคิวัฒน์ หาดใหญ่ จำกัด (มหาชน)	21	<3	ตลาดสดคลองเรียน	11	3
”	16	<3	”	350	<3
”	<3	<3	”	160	3
”	<3	<3	”	2,100	<3
”	360	<3	ตลาดกิ่งไผ่	2,800	3
”	280	<3	”	11,000	11
”	21	<3	ตลาดชิงโค จ.สงขลา	2,100	3
”	280	3	”	1,100	<3
ตลาดชิงโค จ.สงขลา	3,600	3	”	460	<3
”	1,600	3	”	350	<3

3.2 ผลของคลอรีนและไอโอดีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ

V. parahaemolyticus และ *V. cholerae* ในหลอดทดลอง

3.2.1 ผลของคลอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ

V. parahaemolyticus และ *V. cholerae* ในหลอดทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของคลอรีน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในหลอดทดลองโดยให้เชื้อบริสุทธิ์สัมผัสกับคลอรีนที่ระดับความเข้มข้นที่ 25-200 ppm ระยะเวลาสัมผัส 1 และ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังทำการตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดพบว่าคลอรีนที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 25 ppm ระยะเวลาสัมผัส 1 นาที สามารถทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ผลของคลอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโต

ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในหลอดทดลอง

ระยะเวลาสัมผัส (นาที)	ความเข้มข้นของคลอรีน (ppm)	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. cholerae</i>	
		จำนวนเซลล์ที่เหลือรอด (cfu/ml)	% การลดจำนวนลงของเชื้อ	จำนวนเซลล์ที่เหลือรอด (cfu/ml)	% การลดจำนวนลงของเชื้อ
1	0	$1.89 \pm 5.6 \times 10^6$	0	$1.37 \pm 6.2 \times 10^6$	0
	25	0	100	0	100
	50	0	100	0	100
	100	0	100	0	100
	150	0	100	0	100
	200	0	100	0	100
5	0	$1.77 \pm 8.2 \times 10^6$	0	$1.40 \pm 8.5 \times 10^6$	0
	25	0	100	0	100
	50	0	100	0	100
	100	0	100	0	100
	150	0	100	0	100
	200	0	100	0	100

* หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย \pm SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีการใช้โซเดียมคลอไรด์ 1% พบว่าจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดไม่แตกต่างจากเซลล์เริ่มต้น

3.2.2 ผลของไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ

V. parahaemolyticus และ *V. cholerae* ในหลอดทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของไคโตแซนในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในหลอดทดลอง โดยการให้เชื้อบริสุทธิ์สัมผัสกับสารละลายไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นที่ 250 – 2,500 ppm ระยะเวลาสัมผัส 10 , 20 และ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังทำการตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอด (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 ผลของไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโต

ของ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในหลอดทดลอง

ระยะเวลาสัมผัส (นาที)	ความเข้มข้นของไคโตแซน (ppm)	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. cholerae</i>	
		จำนวนเซลล์ที่เหลือรอด (cfu/ml)	% การลดจำนวนลงของเชื้อ	จำนวนเซลล์ที่เหลือรอด (cfu/ml)	% การลดจำนวนลงของเชื้อ
10	0	$1.7 \pm 0 \times 10^6$	0	$1.7 \pm 0.1 \times 10^6$	0
	250	$6.3 \pm 0.4 \times 10^5$	63.0 \pm 3.2	$2.2 \pm 0.1 \times 10^5$	87.5 \pm 0.8
	500	$5.9 \pm 0.8 \times 10^5$	65.3 \pm 4.9	$2.3 \pm 0.1 \times 10^5$	86.9 \pm 0.5
	1,000	$3.8 \pm 0.6 \times 10^5$	77.7 \pm 3.8	$2.1 \pm 0 \times 10^5$	87.5 \pm 0.6
	2,500	$3.2 \pm 0.3 \times 10^5$	81.2 \pm 1.8	$1.8 \pm 0 \times 10^5$	89.8 \pm 0.1
20	0	$1.6 \pm 0 \times 10^6$	0	$1.8 \pm 0.2 \times 10^6$	0
	250	$5.0 \pm 1.0 \times 10^5$	69.1 \pm 1.3	$2.3 \pm 0.1 \times 10^5$	86.9 \pm 1.1
	500	$3.5 \pm 0.4 \times 10^5$	78.4 \pm 2.3	$1.8 \pm 0.2 \times 10^5$	89.7 \pm 1.0
	1,000	$7.2 \pm 0.5 \times 10^4$	95.6 \pm 0.4	$1.4 \pm 0 \times 10^5$	91.8 \pm 0.9
	2,500	$5.5 \pm 0.6 \times 10^4$	96.6 \pm 0.3	$1.1 \pm 0.1 \times 10^5$	94.0 \pm 0.2
30	0	$1.8 \pm 0 \times 10^6$	0	$1.9 \pm 0.1 \times 10^6$	0
	250	$4.8 \pm 0.4 \times 10^5$	72.6 \pm 2.0	$2.4 \pm 0 \times 10^5$	87.0 \pm 0.3
	500	$3.8 \pm 0.2 \times 10^5$	78.3 \pm 1.6	$1.9 \pm 0.2 \times 10^5$	89.6 \pm 0.6
	1,000	$6.3 \pm 0.3 \times 10^4$	96.4 \pm 0.1	$1.9 \pm 0.1 \times 10^5$	90.0 \pm 1.0
	2,500	$5.8 \pm 0.8 \times 10^4$	96.7 \pm 0.5	$9.6 \pm 1.6 \times 10^4$	94.8 \pm 0.7

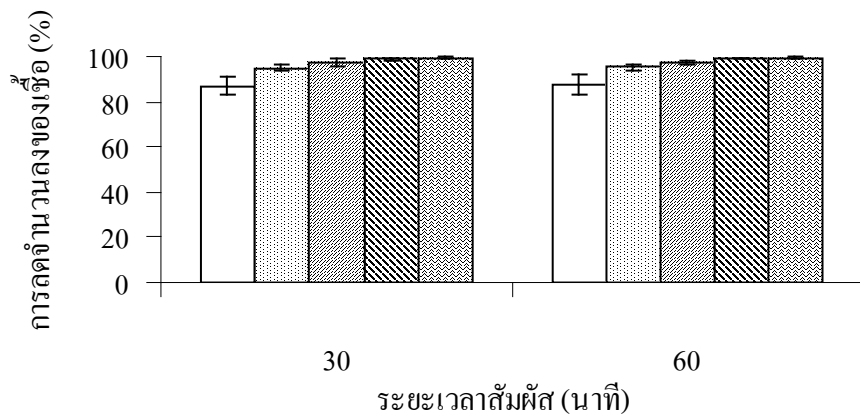
* หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย \pm SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

พบว่าไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 250 – 2,500 ppm ในระยะเวลาสัมผัส 10 นาที ไม่มีความเข้มข้นใดที่สามารถลดจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ลงได้มากกว่า 90 % แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาสัมผัสเป็น 20 นาทีพบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 ppm ขึ้นไป สามารถลดเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้มากกว่า 90 % โดยที่ 1,000 ppm ระยะเวลาสัมผัส 20 นาที สามารถลดได้ $95.6\pm 0.4\%$ และ $91.8\pm 0.9\%$ ตามลำดับ และพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาสัมผัสเป็น 30 นาทีที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ไคโตแซนไม่ได้ทำให้การลดลงของเชื้อทั้ง 2 แยกต่างไป

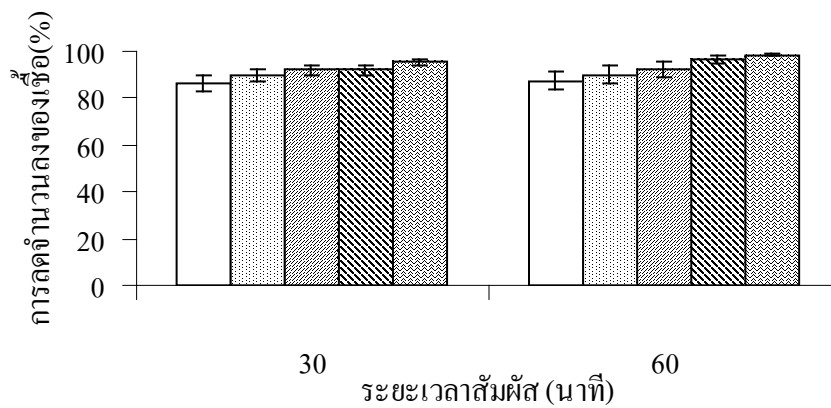
3.3 ผลของคลอรีนและไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

3.3.1 ผลของคลอรีนในการล้างกุ้งสดที่มีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

จากการทดสอบ ผลของคลอรีนในการล้างกุ้งสด ที่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* โดยใช้คลอรีนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสที่ได้จากการทดลองในหลอดทดลอง พบว่าไม่สามารถลดจำนวนเชื้อทั้ง 2 ชนิดลงได้ จึงได้ทดสอบโดยใช้คลอรีนที่ระดับความเข้มข้น 25-200 ppm ที่ระยะเวลาสัมผัสเพิ่มขึ้นคือ 30 และ 60 นาที ที่อุณหภูมิของสารละลาย 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการลดจำนวนของเชื้อโดยวิธี MPN และยืนยันผลอีกครั้งด้วย PCR พบว่าในการลดจำนวนเชื้อในกุ้งให้ได้มากกว่า 90% ต้องเพิ่มความเข้มข้นของคลอรีนและระยะเวลาสัมผัสมากกว่าในการกำจัดเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลอง คือ ในขณะที่ในหลอดทดลองที่คลอรีนระดับความเข้มข้น 25 ppm สามารถทำลายเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาสัมผัสเพียง 1 นาที ในขณะที่ในกุ้งเติมเชื้อ ระดับความเข้มข้นเดียวกันและระยะเวลาสัมผัส 30 นาที สามารถลดเชื้อทั้ง 2 ชนิดลงได้ $86.9\pm 3.9\%$ และ $86.1\pm 3.3\%$ ตามลำดับเท่านั้น หากต้องการจะลดเชื้อทั้ง 2 ชนิดให้ได้มากกว่า 90 % ต้องใช้คลอรีนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ppm และระยะเวลาสัมผัส 30 นาทีขึ้นไป โดยที่ความเข้มข้นของคลอรีน 50 ppm ระยะเวลาสัมผัส 30 นาที สามารถลดจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ได้ $95.0\pm 1.0\%$ และ $95.0\pm 2.5\%$ ตามลำดับ และพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาสัมผัสนานขึ้นเป็น 60 นาที ระดับการลดลงของเชื้อทั้ง 2 ไม่แตกต่างกับที่ระยะเวลาสัมผัส 30 นาที ที่ทุกระดับความเข้มข้นของคลอรีน (รูปที่ 3.5)



(A)



(B)

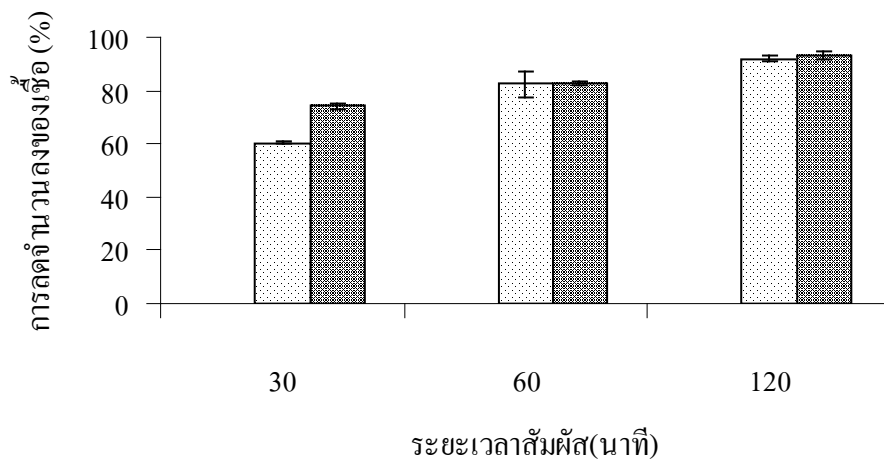
รูปที่ 3.5 ผลของคลอรีนในการล้างกุ้งสดที่มีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* (A)

และ *V. cholerae* (B)

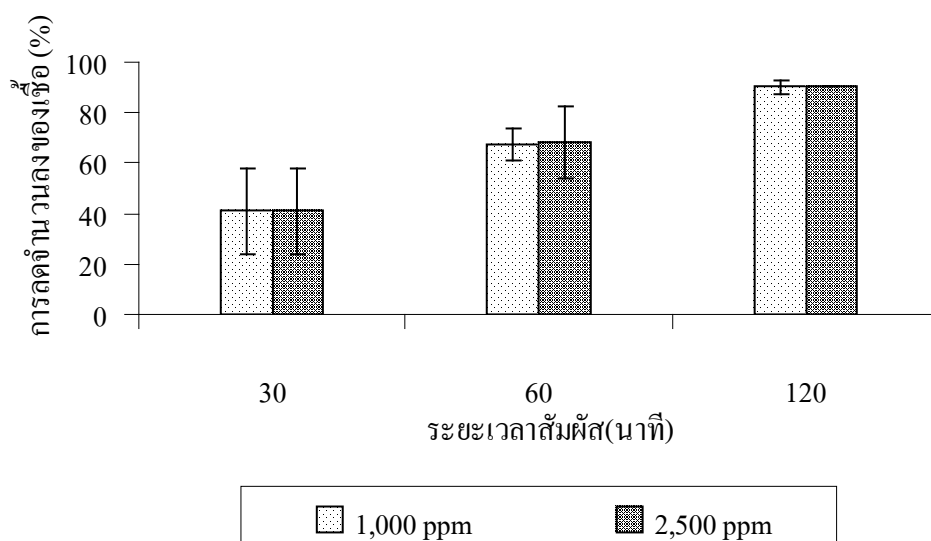
3.3.2 ผลของไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

จากการทดสอบผลของไคโตแซน ในการล้างกุ้งสดที่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* เมื่อใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสที่ได้จากการทดลองในหลอดทดลองพบว่า ไม่สามารถลดจำนวนเชื้อทั้ง 2 ชนิดลงได้เช่นเดียวกับผลของคลอรีน จึงทำการทดสอบผลของไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* โดยใช้ไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นคือ 0.1%(1,000 ppm) และ 0.25% (2,500 ppm) ที่ระยะเวลาสัมผัส 30 , 60 และ 120 นาที ที่อุณหภูมิของสารละลาย 4 องศาเซลเซียส และค่า pH 5.5 ตรวจสอบผลการลดจำนวนของเชื้อโดยวิธี MPN และยืนยันผลอีกครั้งด้วย PCR

พบว่าในการลดจำนวนเชื้อในกุ้งต้องเพิ่มความเข้มข้นของไคโตแซนและระยะเวลาสัมผัสมากกว่าในการกำจัดเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งจากการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของไคโตแซนที่ 0.1% (1,000 ppm) ในระดับหลอดทดลองใช้ระยะเวลาสัมผัสเพียง 20 นาที สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่า 90% ในขณะที่การทดสอบในกุ้งเดิมเชื้อ ต้องเพิ่มระยะเวลาสัมผัสเป็น 120 นาทีจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ลดลงได้ $92.0 \pm 1.2 \%$ และ $90.2 \pm 2.8 \%$ ตามลำดับ แต่ที่ระยะเวลาสัมผัสเดียวกันนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.25% (2,500 ppm) จะให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน ($93.2 \pm 1.2 \%$ และ $90.6 \pm 0 \%$) ความเข้มข้นของไคโตแซนทั้ง 2 ระดับนี้ ที่ระยะเวลาสัมผัสที่สั้นกว่า (30 และ 60 นาที) จำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ลดลงไม่ถึง 90% (รูปที่ 3.6)



(A)



(B)

รูปที่ 3.6 ผลของไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีการเดิมเชื้อ *V. parahaemolyticus* (A) และ *V. cholerae* (B)

3.4 ผลของคลอรีนและไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ

3.4.1 ผลของคลอรีนในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ

ในการศึกษาผลของคลอรีนในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ได้ใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่า 90% จากชุดการทดสอบในกุ้งเดิมเชื้อ มาทดสอบคือ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm ระยะเวลาสัมผัส 30 นาที และทำการตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดเช่นเดียวกับในกุ้งเดิมเชื้อ ทำการทดสอบทั้งหมด 4 ชุดซึ่งทั้ง 4 ชุดไม่พบว่าการปนเปื้อนของ *V. cholerae* ในตัวอย่างกุ้ง ดังนั้นจึงไม่ปรากฏผลการทดสอบของคลอรีนต่อเชื้อ *V. cholerae* ในกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ส่วนผลของคลอรีนในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยธรรมชาติพบว่าคลอรีนจะสามารถลดจำนวน *V. parahaemolyticus* ได้ 85.3 – 97.4% (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ผลของคลอรีนในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ *V. parahaemolyticus* ตามธรรมชาติ

ชุดการทดสอบ	จำนวนเซลล์ ในชุดควบคุม (cfu/ml)	จำนวนเซลล์ ในชุดทดลอง (cfu/ml)	% การลดจำนวนลง ของเชื้อ
1	2.9×10^4	7.5×10^2	97.4
2	7.5×10^4	1.1×10^4	85.3
3	4.6×10^4	2.4×10^3	94.8
4	6.4×10^4	3.8×10^3	94.1

3.4.2 ผลของไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ

ในการศึกษาผลของไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ได้ใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่า 90% จากชุดการทดสอบในกุ้งเดิมเชื้อ มาทดสอบคือ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1%(1,000 ppm) ระยะเวลาสัมผัส 120 นาที และทำการตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดเช่นเดียวกับในกุ้งเดิมเชื้อ ทำการทดสอบทั้งหมด 4 ชุด ซึ่งทั้ง 4 ชุดไม่พบว่าการปนเปื้อนของ *V. cholerae* ในตัวอย่างกุ้ง ดังนั้นจึงไม่ปรากฏผลการทดสอบของไคโตแซนต่อเชื้อ *V. cholerae* ในกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ส่วนผลของไคโตแซน ในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตามธรรมชาติพบว่า ไคโตแซนจะสามารถลดจำนวน *V. parahaemolyticus* ได้ 67.4 – 68.7 % (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 ผลของไคโตเซนในการล้างล้างสัดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ *V. parahaemolyticus* ตามธรรมชาติ

ชุดการทดสอบ	จำนวนเซลล์ ในชุดควบคุม (cfu/ml)	จำนวนเซลล์ ในชุดทดลอง (cfu/ml)	% การลดจำนวนลง ของเชื้อ
1	4.6×10^4	1.5×10^4	67.4
2	2.4×10^4	7.5×10^3	68.7
3	4.3×10^4	1.4×10^4	67.4
4	4.6×10^4	1.5×10^4	67.4