บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

ตัวอย่างกุ้งสด

- กุ้งที่จุดแรกรับจากบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์หาดใหญ่ จำกัด (มหาชน) อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา เป็นกุ้งกุลาดำ*(Peneaus monodon*) ซึ่งเป็นกุ้งเลี้ยง จำนวน 8 ตัวอย่าง ขนาดของกุ้ง 45-50 ตัว / กิโลกรัม
- กุ้งจากตลาดสดคลองเรียน อำเภอหาดใหญ่ , ตลาดโก้งโค้ง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เป็นกุ้งขาวแวนนาไม *(Peneaus vannamei)* 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกุ้งเลี้ยงทั้งหมด ขนาดของกุ้ง 45-50 ตัว / กิโลกรัม และตลาดสดบ้านชิงโค อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา เป็นกุ้งกุลาดำ *(Peneaus monodon*) ซึ่งเป็นกุ้งเลี้ยง จำนวน 2 ตัวอย่าง ขนาดของกุ้ง 45-50 ตัว / กิโลกรัม

เชื้อจุลินทรีย์

- *Vibrio parahaemolyticus* PSU 1894
- *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 PSU 2119

(จากงานวิจัย รศ.ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต
Bacto lysine decarboxylase broth	Difco
Bacto peptone	Difco
CHROMagar Vibrio	CHROMagar
Luria Bertani agar (LB)	Difco
Motility test medium	Difco
Nutrient agar	Difco
Triple sugar iron(TSI) agar	Difco
Thiosulfate citrate bile salt (TCBS agar)	Difco

Tryptic soy broth (TSB)	Difco

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol	**Merck**
Acetic acid, conc. (glacial)	**Merck**
Chitosan (85% deacetylation , 161 kDa)	Sigma
Chlorine	วิทยาศรม
Chloroform	Lab-scan
Potassium bi-iodate	Fluka
Potassium iodide	J.T Baker
Sodium chloride	Merck
Sodium thiosulfate	Merck
Sulfuric acid	Merck

สารเคมีเกรดอณูวิทยา	**บริษัทผู้ผลิต**
Agarose	Gibco, USA
10X boffer	Promega
dNTPs	Boeheringer Mannheim
Ethidium bromide	Sigma
Magnesium chloride	Promega
Primers	Invitrogen
Taq DNA polymerase	Promega

อุปกรณ์

- เครื่องแก้วสำหรับใช้วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- หลอด microcentrifuge ขนาด1.5 มิลลิเมตร

- หลอด PCR ขนาด 0.2 และ 0.5 มิลลิเมตร
- Automatic pipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร(Gilson France)
- เครื่องเขย่า (Vortex mixer) รุ่น 232 (Fisher Scientific, USA)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น 200/2.0 (Bio-Rad, USA)
- เครื่องฉายอุลตราไวโอเลต(UV light transilluminator) (San Gabriel, Inc USA)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอนเอ (PCR Machine)PCR systen 2400(Perkin Elmer, USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-1201V (SHIMADZU)
- เครื่องอีเลคโตรโฟลิซิส (Electrophoresis) (Bio-RAD, USA)
- เครื่อง Hotplate & Stirrer (Fisher Scientific, USA)
- เครื่อง pH meter (Metro, Switzerland)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Gallenkamp, U.K.)
- ตู้เย็นแช่แข็ง –20 , –70 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot Air Oven) (Venticell)
- หม้อหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy Japan)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 1235 (Sheldon Manufacturing, Inc USA)
- Microcentrifuge (Eppendorf) รุ่น 5415 C (Brinkman Instrument, Inc USA)
- เครื่องตีป่นอาหาร(Stomacher)
- เครื่องชั่ง (Denver Instrument Company USA)
- ปากคีบ (forceps)
- กระดาษฟอยด์
- ถุงพลาสติกใส

2.2 วิธีดำเนินการ

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

2.2.1.1 ตัวอย่างกุ้งสด

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวชนิดละ 10 ตัวอย่างโดยกุ้งกุลาดำจากจุดแรกรับบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์หาดใหญ่ จำกัด (มหาชน) จำนวน 8 ตัวอย่าง จากตลาดชิงโคจำนวน 2 ตัวอย่าง และกุ้งขาวเก็บตัวอย่างจากตลาดสดคลองเรียนจำนวน 4 ตัวอย่าง ตลาดโก้งโค้งจำนวน 2 ตัวอย่าง และตลาดชิงโคจำนวน 4 ตัวอย่าง

2.2.1.2 การตรวจนับปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN)

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำหรือกุ้งขาว ที่ปอกเปลือกและดึงเส้นหลังทิ้งแล้ว ปริมาณ 25 กรัม เจือจางด้วยสารละลาย alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 1% ตีป่นด้วย stomacher 1 นาทีเจือจางตัวอย่างลง 10 เท่าตามลำดับโดยดึงตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด ที่มี APW หลอดละ 9 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด (แผนภูมิที่ 2.1) นำหลอดอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีการเจริญเติบโตโดย การ streak บนอาหาร CHROMagar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีที่เป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีลักษณะกลม ขอบเรียบ โคโลนีสีม่วงครามตรงกลาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มิลลิเมตร และ *V. cholerae* มีลักษณะกลม ขอบเรียบ โคโลนีมีสีฟ้า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร

2.2.1.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

นำโคโลนีที่บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ดังรายละเอียดในข้อ 2.1.1.2 จำนวน 3 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยถ่ายเชื้อลงในอาหาร lysine decarboxylase broth , indole , motility medium และทำ oxidase test ซึ่งผลการทดสอบเชื้อทั้ง 2 ชนิดจะให้ผลเป็นบวกในทุกการทดสอบ ส่วนการทดสอบในอาหาร triple sugar iron agar เชื้อ *V. parahaemolyticus* จะให้ผลเป็น alkaline/acid (K/A) ไม่สร้าง H_2S และ *V. cholerae* จะให้ผลเป็น acid/acid (A/A) ไม่สร้าง H_2S หลังจากนั้นนำโคโลนีของ เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ที่ให้ผลการทดสอบดังกล่าวยืนยันผลอีกครั้งด้วย PCR

2.2.1.4 การยืนยันผลด้วย PCR

2.2.1.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. cholerae* ใน LB broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 1% เขย่าที่ 150 รอบ/นาที 18-24 ชั่วโมง ที่ 35 องศาเซลเซียส นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2,500xg (Eppendorf รุ่น 5415 C) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เศษเซลล์ตกตะกอน DNAจะอยู่ในส่วน supernatant ดูดสารละลายใสเจือจางอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำกลั่น จะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR

2.2.1.4.2 การทำ PCR

นำ DNA ที่ได้จากข้อ 2.2.1.4.1 มาทำ PCR เพื่อบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* โดยใช้จีน *toxR* gene เป็นจีนเป้าหมาย และ *V. cholerae* ใช้ *ompW* gene เป็นจีนเป้าหมาย (Kim *et al*., 1999 ; Nandi *et al*., 2000)

การตรวจ *toxR* gene มีส่วนผสมของ PCR ดังนี้

น้ำกลั่น	8.2	ไมโครลิตร
10X buffer free Mg^{2+}	2.0	ไมโครลิตร
2.5 mM $MgCl_2$	1.6	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	1.6	ไมโครลิตร
primer(T4&T7)	5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ ตัวอย่าง	1.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมดต่อหลอด	20.0	ไมโครลิตร

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน Hot start	96^0C	5 นาที	จำนวน	1	รอบ
Denature	94^0C	1 นาที	จำนวน	35	รอบ
Annealing	63^0C	1.5 นาที	จำนวน	35	รอบ
Extension	72^0C	1.5 นาที	จำนวน	35	รอบ
Final extension	72^0C	7 นาที	จำนวน	1	รอบ

การตรวจ *ompW* gene มีส่วนผสมของ PCR ดังนี้

น้ำกลั่น	5.5	ไมโครลิตร
10X buffer free Mg^{2+}	2.0	ไมโครลิตร
2.5 mM $MgCl_2$	1.6	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	1.0	ไมโครลิตร
primer	8.3	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ ตัวอย่าง	1.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมดต่อหลอด	20.0	ไมโครลิตร

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน Hot start	96^0C	5 นาที	จำนวน	1	รอบ
Denature	94^0C	1 นาที	จำนวน	30	รอบ

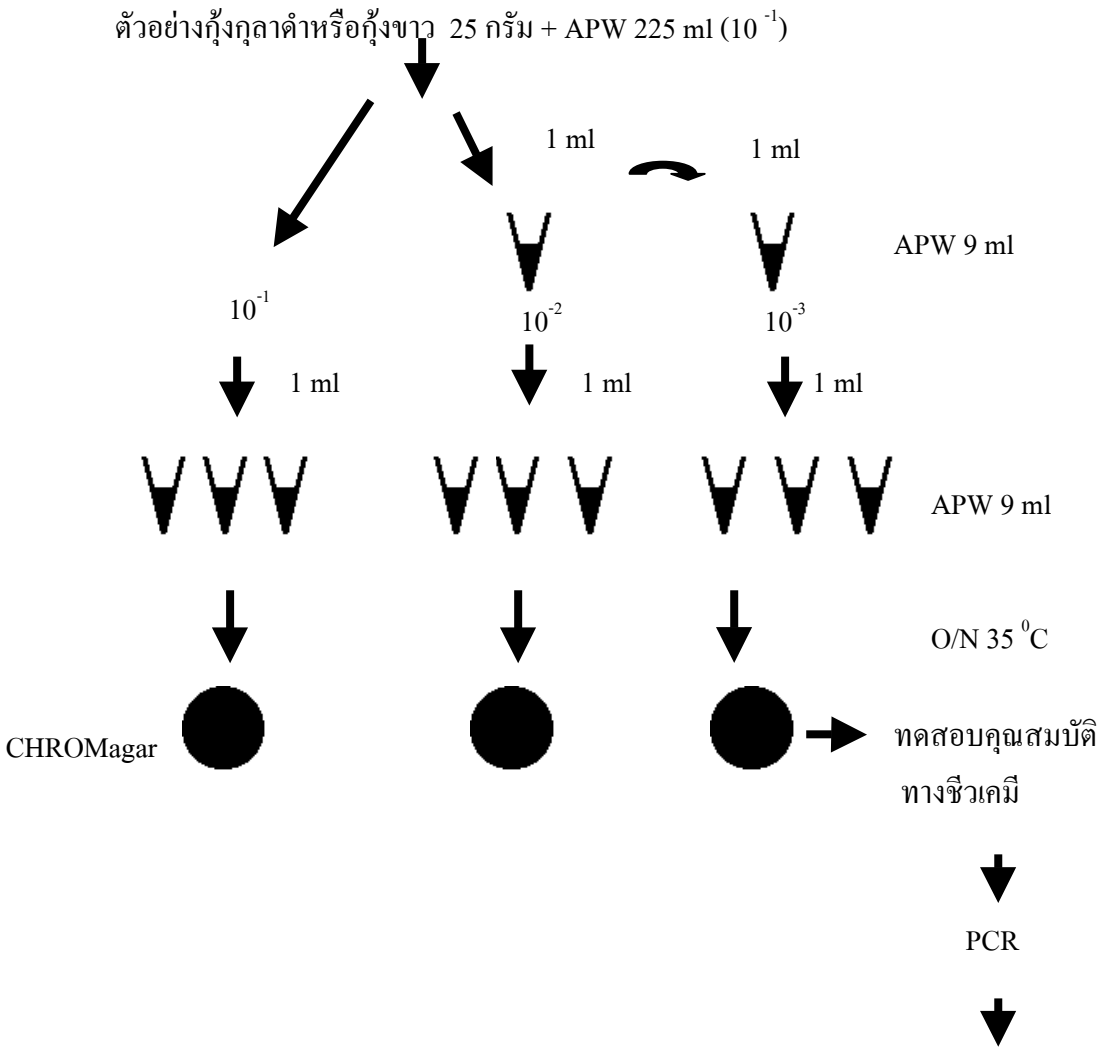
Annealing 63^0C 1 นาที จำนวน 30 รอบ

Extension 72^0C 1 นาที จำนวน 30 รอบ

Final extension72^0C 7 นาทีจำนวน 1 รอบ

2.2.1.4.3 การวิเคราะห์ ผลิตภัณฑ์ PCR โดย agarose gel electrophoresis

นำผลผลิต PCR product ที่ได้ผสมกับ loading dye แล้วดูดส่วนผสมที่ได้ปริมาตร 8.5 ไมโครลิตร ลงในหลุมของแผ่น agarose gel ที่แช่อยู่ใน 1X TBE แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 100 โวลท์ ให้เครื่องทำงานเป็นเวลาประมาณ 30 นาที นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปส่องด้วยเครื่อง UV transilluminator เพื่อวิเคราะห์แถบ DNA ที่ได้ นำผลที่ได้ย้อนกลับไปตรวจนับจำนวนหลอด alkaline peptone water ของตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจางที่ให้ผลบวกจากการยืนยันผลด้วย PCR นำไปเปิดตาราง MPN สำหรับ 3 หลอด รายงานผลจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ต่อกรัม (BAM , 2001)



รูปที่ 2.1 แผนภูมิแสดงการตรวจนับปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN)

2.2.2 ผลของคลอรีนและไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในหลอดทดลอง

2.2.2.1 การเตรียมสารละลายคลอรีน (Sousa *et al*., 2001)

เตรียม stock ของคลอรีน (400 ppm) ซึ่งในการทำการทดลองครั้งนี้ใช้แคลเซียม-ไฮโปคลอไรท์ แล้วนำไปไตเตรตเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ residual chlorine ที่แท้จริง โดยวิธี Iodometric method จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของสารละลายคลอรีนที่จะใช้ในการทดลอง (25-200 ppm) โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ที่ 7 องศาเซลเซียส

2.2.2.2 การเตรียมสารละลายไคโตแซน (สิริรัตน์, 2546)

ไคโตแซนที่ใช้ในการทำวิจัยเตรียมจากเปลือกปูมีค่าการกำจัดหมู่อะซิติล 85% และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 161 kDa เจือจางไคโตแซนให้มีความเข้มข้น 250-2500 ppm โดยละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 1 % และโซเดียมคลอไรด์ 1% ปรับ pH ของสารละลายดังกล่าวให้ได้ 5.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 N นำสารละลายดังกล่าวเข้าเครื่อง shaker ที่ความเร็วรอบ 150 อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง จนไคโตแซนละลายหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เก็บไว้ที่ 7 องศาเซลเซียส

2.2.2.3 การเตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* (No *et al.,* 2002)

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ใน nutrient agar ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 1 % บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อถ่ายลงอาหารเหลว tryptic soy broth(TSB)ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 % เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เวลา 12-14 ชั่วโมง ที่ 35 องศาเซลเซียส นำไป centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 2,500xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บเซลล์ แล้วล้างเซลล์อีก 2 ครั้งด้วย โซเดียมคลอไรด์ 1% เจือจางเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 % ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาณ 1.5 x10^8 cfu/ml (McFarland # 0.5) ตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยวิธี spread plate บนอาหาร NA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 % บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อเริ่มต้น

2.2.2.4 การทดสอบผลของคลอรีนต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

(Sousa *et al.,* 2001)

นำเซลล์ของ *V. cholerae* หรือ *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 x10^8 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในสารละลายคลอรีนที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 25 - 200 ppm ระดับความเข้มข้นละ 100 มิลลิลิตร ให้เซลล์สัมผัสกับสารละลายคลอรีนเป็นระยะเวลา 1 และ 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปริมาณเชื้อที่เหลือรอดโดยดึงตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตรทำการเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้วตรวจสอบเชื้อที่เหลือรอดโดยใช้วิธี spread plate บนอาหาร NA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส

24 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุม (control) จะใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 % ทำการทดลองเช่นนี้ 3 ซ้ำ คำนวณ % การลดจำนวนลงของเชื้อ โดยใช้สูตร

$$\% \text{ การลดจำนวนลงของเชื้อ} = \left[\frac{\text{จำนวนแบคทีเรียกลุ่มควบคุม} - \text{จำนวนแบคทีเรียกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มควบคุม}} \right] \text{x100}$$

2.2.2.5 การทดสอบผลของไคโตแซนต่อเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*

(Sousa *et al.,* 2001)

นำเซลล์ของ *V. cholerae* หรือ *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 1.5 x10^8 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 250 – 2,500 ppm ระดับความเข้มข้นละ 100 มิลลิลิตร ให้เซลล์สัมผัสกับสารละลายไคโตแซนระยะเวลา 10 , 20 และ 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปริมาณเชื้อที่เหลือรอดเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2.4 ส่วนชุดควบคุม (control) จะใช้สารละลายกรดอะซิติก 1 % และโซเดียมคลอไรด์ 1 % ปรับ pH เป็น 5.5 ทำการทดลองเช่นนี้ 3 ซ้ำ คำนวณ % การลดจำนวนลงของเชื้อ โดยใช้สูตรในหัวข้อ 2.2.2.4

2.2.3 ผลของคลอรีนและไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* (Sousa *et al.,* 2001)

2.2.3.1 การเตรียมเชื้อ

เตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.2.2.3 ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร

2.2.3.2 การเตรียมตัวอย่างกุ้งสด และการเติมเชื้อบริสุทธิ์

ปอกเปลือกกุ้ง ดึงเส้นหลังทิ้ง และล้างตัวอย่างกุ้งที่จะใช้ในการทดสอบให้สะอาดและแช่ใน 4% ฟอมัลดีไฮด์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เวลา 3 นาที ล้างฟอมัลดีไฮด์ออกจากกุ้งโดยการใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง และล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1% ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นครั้งสุดท้าย หลังจากนั้นใช้กุ้งที่เตรียมไว้ปริมาณ 1,000 กรัม ใส่ถุงพลาสติก ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. cholerae* บริสุทธิ์ที่เตรียมจาก ข้อ 2.2.3.1 เทลงไปในถุงที่มีกุ้งอยู่ วางทิ้งไว้ 30 นาที เทส่วนของเหลวที่มีเชื้อออกจากถุง ตรวจนับเชื้อเริ่มต้นโดยสุ่มหยิบกุ้ง 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เจือจางด้วย APW ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีป่นด้วย Stomacher 1 นาที เจือจางตัว

อย่างลง 10 เท่าตามลำดับโดยดึงตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มี APW หลอดละ 9 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด นำหลอดอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีการเจริญเติบโตโดยการ streak บนอาหาร CHROMagar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่ให้ผลเป็นบวก เปิดตาราง MPN รายงานผลจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ต่อกรัม (BAM, 2001)

2.2.3.3 การล้างกุ้งสดที่เติมเชื้อบริสุทธิ์ด้วยคลอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ใช้กุ้งสดจากการเตรียมข้อ 2.2.3.2 สุ่มหยิบกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม แต่ละชุดนำมาเติมสารละลายคลอรีนที่ระดับความเข้มข้น 25-200 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีระยะเวลาสัมผัส 30 และ 60 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนชุดควบคุมจะใช้โซเดียมคลอไรด์ 1 % เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด ตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดด้วยวิธีเดียวกับการนับเชื้อเริ่มต้นในข้อ 2.2.3.2 ทำการทดลองเช่นนี้ 3 ครั้ง

2.2.3.4 การล้างกุ้งสดที่เติมเชื้อบริสุทธิ์ด้วยไคโตแซน

ใช้กุ้งสดจากการเตรียมข้อ 2.2.3.2 สุ่มหยิบกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม แต่ละชุดนำมาเติมสารละลายไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้น 1,000 และ 2,500 ppm ความเข้มข้นละ 100 มิลลิลิตร โดยมีระยะเวลาสัมผัส 30 , 60 และ 120 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนชุดควบคุม (control) จะใช้สารละลายกรดอะซิติก 1 % และโซเดียมคลอไรด์ 1 % ปรับ pH เป็น 5.5 เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด ตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดด้วยวิธีเดียวกับการนับเชื้อเริ่มต้น ในข้อ 2.2.3.2 ทำการทดลองเช่นนี้ 3 ครั้ง

2.2.4 ผลของคลอรีนและไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ

2.2.4.1 ตรวจนับเชื้อเริ่มต้นที่พบในกุ้ง

ใช้วิธีเดียวกันกับการทดลองที่ 2.2.3.2 (การทดลองในหัวข้อนี้ทำ 4 ชุดการทดลอง)

2.2.4.2 การล้างกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติด้วยคลอรีน

ปอกเปลือกกุ้ง ดึงเส้นหลังทิ้ง นำกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม เติมคลอรีนที่ความเข้มข้น 50 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ระยะเวลาสัมผัส 30 นาที บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ชุดควบคุม (control)จะใช้โซเดียมคลอไรด์ 1 % เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดเทคลอรีนออกจากถุง ตรวจนับเชื้อที่เหลือรอดอยู่ในกุ้งด้วยวิธีเดียวกับการนับเชื้อเริ่มต้นในข้อ 2.2.3.2 (BAM, 2001)

2.2.4.3 การล้างกุ้งสดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติด้วยไคโตแซน

ปอกเปลือกกุ้ง ดึงเส้นหลังทิ้ง นำกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม เติมไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.1 % (1,000 ppm) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ระยะเวลาสัมผัส 120 นาที บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ชุดควบคุม(control) จะใช้สารละลายกรดอะซิติก 1 % และโซเดียมคลอไรด์ 1 % ปรับ pH เป็น 5.5 เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดเทไคโตแซนออกจากถุง ตรวจนับเชื้อที่เหลือรอดอยู่ในกุ้งด้วยวิธีเดียวกับการนับเชื้อเริ่มต้น ในข้อ 2.2.3.2 (BAM, 2001)