วิธีการทดลอง

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

1.1 ตัวอย่างกุ้งสด

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวชนิดละ 10 ตัวอย่าง

1.2 การตรวจนับปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ด้วยวิธี MPN

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำหรือกุ้งขาว ปริมาณ 25 กรัม เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วย stomacher 1 นาทีแล้วเจือจางตัวอย่างลง 10 เท่าตามลำดับ นำตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ในหลอด alkaline peptone water หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด นำหลอดอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่มีการเติบโตลงบนอาหาร Chrome agar บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีที่เป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีลักษณะกลม ขอบเรียบ โคโลนีสีม่วงแดง/ม่วงคราม ตรงกลางโคโลนีมีสีม่วงแดง/ม่วงครามเป็นสีเข้ม ขอบโคโลนีใส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-5 มิลลิเมตร และ *V. cholerae* มีลักษณะกลม ขอบเรียบ โคโลนีมีสีฟ้า ตรงกลางโคโลนีสีฟ้าเข้ม ขอบใส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มม.

1.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

นำโคโลนีที่บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ดังรายละเอียดในข้อ 1.2 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยถ่ายเชื้อลงในอาหาร Lysine decarboxylase broth Indole motility medium และทำ Oxidase test ซึ่งผลการทดสอบเชื้อทั้ง 2 ชนิดจะให้ผลเป็นบวกในทุกการทดสอบ ส่วนการทดสอบในอาหาร TSI เชื้อ *V. parahaemolyticus* จะให้ผลเป็น K/A ไม่เกิด H_2S และ *V. cholerae* จะให้ผลเป็น A/A ไม่เกิด H_2S หลังจากนั้นนำโคโลนีของ เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ที่ให้ผลการทดสอบดังกล่าวยืนยันผลอีกครั้งด้วย PCR

1.4 การยืนยันผลด้วย PCR

1.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. cholerae* ใน LB broth + 1% NaCl 1 ml เขย่าที่ 150 รอบ/นาที 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เศษเซลล์ตกตะกอน DNA จะอยู่ในส่วน supernatant

1.4.2 การทำ PCR

นำ DNA ที่ได้จากข้อ 1.3.1 มาทำ PCR โดยการบ่งชี้ *V. parahaemolyticus* ใช้จีน *toxR* gene เป็นจีนเป้าหมาย และ *V. cholerae* ใช้ *ompW* gene เป็นจีนเป้าหมาย (Nandi *et al.*, 2000)

1.5 การวิเคราะห์ PCR product โดยใช้ agarose gel electrophoresis

นำ PCR product ที่ได้ run gel นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อวิเคราะห์แถบ DNA ที่ได้ นำผลที่ได้ย้อนกลับไปตรวจนับจำนวนหลอด alkaline peptone water ของตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจางที่ให้ผล possitive จากการยืนยันผลด้วย PCR นำไปเปิดตาราง MPN สำหรับ 3 หลอด รายงานผลจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ต่อกรัม (BAM , 2003)

2. ผลของไคโตแซนและคลอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในหลอดทดลอง

2.1 การเตรียมสารละลายไคโตแซน

ละลายไคโตแซนในกรดอะซิติกเข้มข้น 1 % ให้ได้ความเข้มข้น 0.25 % , 0.1%,0.05% 0.025% , 0% และในทุกระดับความเข้มข้นจะเติมโซเดียมคลอไรด์ 1% จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวเข้าเครื่อง shaker ที่ความเร็วรอบ 150 ณ. อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง จนไคโตแซนละลายหมด ปรับ pH ของสารละลายดังกล่าวให้ได้ 5.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3N จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เก็บไว้ที่ 7 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมสารละลายคลอรีน

คำนวณหาจำนวนผงคลอรีนที่จะใช้จริงเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของคลอรีนเบื้องต้นประมาณ 400 ppm แล้วนำไปไตเตรตเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ residual chlorine ที่แท้จริง โดยวิธี Iodometric method หลังจากนั้นการเตรียมความเข้มข้นของสารละลายคลอรีนที่จะใช้ในการทดลอง (200 ppm, 150 ppm, 100 ppm, 50 ppm , 25 ppm , 0 ppm)จะใช้วิธีเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1% เก็บไว้ที่ 7 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ที่เก็บ stock ไว้ streak ลงบน Nutrient Agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่บ่มถ่ายลงอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วปรับความเข้มข้นเป็น 0.5 McFarland (จำนวนเชื้อ ประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml) และเจือจางลงให้มีจำนวนเชื้อ 10^5 cfu/ml ทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยวิธี spread plate

ด้วยอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อเริ่มต้น

2.4 การทดสอบผลของคลอรีนต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

นำเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมไว้ระดับความเข้มข้นของเชื้อระดับละ 1 มิลลิลิตรใส่ลงไปในสารละลายคลอรีนที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm และ 200 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยอุณหภูมิของสารละลายประมาณ 7 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากันหลังจากให้เซลล์สัมผัสกับสารละลายคลอรีน 1 นาที ตรวจสอบปริมาณเชื้อโดยดึงตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตรทำ serial dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ใช้วิธี spread plate ทำ dilution ละ 3 plate ด้วยอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และตรวจสอบเชื้อที่เหลือรอดทุก ๆ 1 นาทีจนครบ 5 นาที ส่วนชุดควบคุม (control) จะใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองเช่นนี้ 3 ครั้ง

2.5 การทดสอบผลของไคโตแซนต่อเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* (Sousa *et al.*, 2001)

นำเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมไว้ระดับความเข้มข้นของเชื้อระดับละ 1 มิลลิลิตรใส่ลงไปสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 0.025%, 0.05%, 0.1% และ 0.25 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยอุณหภูมิของสารละลายประมาณ 7 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน หลังจากให้เซลล์สัมผัสกับสารละลายไคโตแซน 10 นาที ตรวจสอบปริมาณเชื้อโดยดึงตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตรทำ serial dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ใช้วิธี spread plate ทำ dilution ละ 3 plate ด้วยอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และตรวจสอบเชื้อที่เหลือรอดทุก ๆ 10 นาทีจนครบ 30 นาที ส่วนชุดควบคุม (control) จะใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 1% ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% ปรับ pH เป็น 5.5 ทำการทดลองเช่นนี้ 3 ครั้ง

3. ผลของคลอรีนและไคโตแซนในการล้างกุ้งสดที่มีการเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

3.1 การเตรียมเชื้อ

เตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ให้ได้ปริมาณเชื้อมีความเข้มข้นประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียมตัวอย่างกุ้งสด และการเติมเชื้อบริสุทธิ์

ปอกเปลือกกุ้ง ดึงเส้นหลัง และล้างตัวอย่างกุ้งที่จะใช้ในการทดสอบให้สะอาดและแช่ใน 4% ฟอมัลดีไฮด์ เวลา 3 นาที ล้างฟอมัลดีไฮด์ออกจากกุ้งโดยการใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1% ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นครั้งสุดท้าย หลังจากนั้น

ใช้กุ้งที่เตรียมไว้ปริมาณ 1,000 กรัม ใส่ถุงพลาสติก ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. cholerae* บริสุทธิ์ที่เตรียมจาก ข้อ 3.1 เทลงไปในถุงที่มีกุ้งอยู่ วางทิ้งไว้ 30 นาที เทส่วนของเหลวที่มีเชื้อออกจากถุง ตรวจนับเชื้อเริ่มต้นโดยสุ่มหยิบกุ้ง 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เจือจางด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีป่นด้วย Stomacher 1 นาที แล้วเจือจางตัวอย่างลง 10 เท่าตามลำดับ นำตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ในหลอด alkaline peptone water หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด นำหลอดอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนหลอด alkaline peptone water ของตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจางที่มีการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. cholerae* ยืนยันผลอีกครั้งด้วยการ streak บน Chrom agar นำไปเปิดตาราง MPN สำหรับ 3 หลอด รายงานผลจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ต่อกรัม

3.3 การล้างกุ้งสดที่เติมเชื้อบริสุทธิ์ด้วยคลอรีน ที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm (เป็นระดับที่สามารถกำจัดเชื้อได้หมดในการทดสอบในหลอดทดลอง)

ใช้กุ้งสดจากการเตรียมข้อ 3.2 สุ่มหยิบกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม จำนวนถุงขึ้นอยู่กับการวางแผนการทดสอบ แต่ละชุดแช่ด้วยสารละลายคลอรีนโดยใช้ระดับความเข้มข้น 0 ppm และ 25 ppm ความเข้มข้นละ 100 มิลลิลิตร โดยชุดที่ 1 ใช้ระยะเวลา 1 นาที ชุดที่ 2 ใช้ระยะเวลา 5 นาที ชุดที่ 3 ใช้ระยะเวลา 10 นาที ชุดที่ 4 ใช้ระยะเวลา 30 นาที และชุดที่ 5 ใช้ระยะเวลา 60 นาที ทุกชุดการทดสอบวางไว้ที่ 7 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด หยิบกุ้งใส่อีกถุง เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3% และตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดด้วยวิธีเดียวกับการนับเชื้อเริ่มต้น ในข้อ 3.2

3.4 การล้างกุ้งสดที่เติมเชื้อบริสุทธิ์ด้วยคลอรีน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ใช้กุ้งสดจากการเตรียมข้อ 3.2 สุ่มหยิบกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม จำนวนถุงขึ้นอยู่กับการวางแผนการทดสอบ แต่ละชุดแช่ด้วยสารละลายคลอรีนโดยใช้ระดับความเข้มข้น 0 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm และ 200 ppm ความเข้มข้นละ 100 มิลลิลิตร โดยชุดที่ 1 ใช้ระยะเวลา 30 นาที และชุดที่ 2 ใช้ระยะเวลา 60 นาที ทุกชุดการทดสอบวางไว้ที่ 7 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด หยิบกุ้งใส่อีกถุง เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3% และตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดด้วยวิธีเดียวกับการนับเชื้อเริ่มต้น ในข้อ 3.2 ทำการทดลองเช่นนี้ 3 ครั้ง

3.5 การล้างกุ้งสดที่เติมเชื้อบริสุทธิ์ด้วยไคโตแซน

ใช้กุ้งสดจากการเตรียมข้อ 3.2 สุ่มหยิบกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม จำนวนถุงขึ้นอยู่กับการวางแผนการทดสอบ แต่ละชุดแช่ด้วยสารละลายคลอรีนโดยใช้ระดับความเข้มข้น 0%, 0.025%, 0.05% , 0.1% และ 0.25% ความเข้มข้นละ 100 มิลลิลิตร โดยชุดที่ 1 ใช้ระยะเวลา 30 นาที ชุดที่ 2 ใช้ระยะเวลา 60 นาที ชุดที่ 3 ใช้ระยะเวลา 120 นาที ทุกชุดการทดสอบวางไว้ที่ 7 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด หยิบกุ้งใส่อีกถุง เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3% และ

ตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดด้วยวิธีเดียวกับการนับเชื้อเริ่มต้น ในข้อ 3.2 ทำการทดลองเช่นนี้ 3 ครั้ง

4. ผลของคลอรีนและไคโตแซนในการล้างกุ้งสดจากธรรมชาติที่มีเชื้อจุลิทรีย์

4.1 การตรวจนับเชื้อเริ่มต้นที่พบในกุ้ง

ปอกเปลือกกุ้ง ดึงเส้นหลัง และล้างตัวอย่างกุ้งที่จะใช้ในการทดสอบให้สะอาดโดยใช้น้ำผสมน้ำแข็ง หยิบกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม ตรวจนับเชื้อที่เริ่มต้นที่มีในกุ้งโดยเจือจางด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีป่นด้วย Stomacher 1 นาที แล้วเจือจางตัวอย่างลง 10 เท่าตามลำดับ นำตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ในหลอด alkaline peptone water หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด นำหลอดอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนหลอด alkaline peptone water ของตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจางที่มีการเจริญของเชื้อ ยืนยันผลอีกครั้งด้วยการ streak บน Chrom agar นำไปเปิดตาราง MPN สำหรับ 3 หลอด รายงานผลจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ต่อกรัม ส่วนชุดควบคุม ใช้ระยะเวลา และเก็บที่สภาวะเดียวกัน โดยใช้ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (BAM, 2003) ทดสอบทั้งหมด 4 ตัวอย่าง

4.2 การล้างกุ้งสดจากธรรมชาติด้วยคลอรีน

ปอกเปลือกกุ้ง ดึงเส้นหลัง และล้างตัวอย่างกุ้งที่จะใช้ในการทดสอบให้สะอาดโดยใช้น้ำผสมน้ำแข็ง หยิบกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม ล้างด้วยคลอรีนที่ความเข้มข้น 50 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตรระยะเวลา 30 นาที โดยเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดเทส่วนของคลอรีนออกจากถุง ตรวจนับเชื้อที่เหลือรอดอยู่ในกุ้งโดยเจือจางด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีป่นด้วย Stomacher 1 นาที แล้วเจือจางตัวอย่างลง 10 เท่าตามลำดับ นำตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ในหลอด alkaline peptone water หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด นำหลอดอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนหลอด alkaline peptone water ของตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจางที่มีการเจริญของเชื้อ ยืนยันผลอีกครั้งด้วยการ streak บน Chrom agar นำไปเปิดตาราง MPN สำหรับ 3 หลอด รายงานผลจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ต่อกรัม ส่วนชุดควบคุม ใช้ระยะเวลา และเก็บที่สภาวะเดียวกัน โดยใช้ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (BAM, 2003)

4.3 การล้างกุ้งสดจากธรรมชาติด้วยไคโตแซน

ปอกเปลือกกุ้ง ดึงเส้นหลัง และล้างตัวอย่างกุ้งที่จะใช้ในการทดสอบให้สะอาดโดยใช้น้ำผสมน้ำแข็ง หยิบกุ้งใส่ถุง ๆ ละ 25 กรัม ล้างด้วยไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตรระยะเวลา 120 นาที โดยเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดเทส่วนของไคโตแซนออกจากถุง ตรวจนับเชื้อที่เหลือรอดอยู่ในกุ้งโดยเจือจางด้วย

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีป่นด้วย Stomacher 1 นาที แล้วเจือจางตัวอย่างลง 10 เท่าตามลำดับ นำตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ในหลอด alkaline peptone water หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด นำหลอดอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนหลอด alkaline peptone water ของตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจางที่มีการเจริญของเชื้อ ยืนยันผลอีกครั้งด้วยการ streak บน Chrom agar นำไปเปิดตาราง MPN สำหรับ 3 หลอด รายงานผลจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ต่อกรัม ส่วนชุดควบคุม ใช้ระยะเวลา และเก็บที่สภาวะเดียวกัน โดยใช้ สารละลายกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และปรับ pH เป็น 5.5