โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในหอยกันในพื้นที่อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา โดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

ชื่อนิสิต บุรัสกร พิมแพง **เลขประจำตัว** 5832122323

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในหอยกันในพื้นที่อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา โดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

นางสาวบุรัสกร พิมแพง

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

Detection of pathogenic bacterial contamination in *Polymesoda bengalensis* in Thepha district, Songkhla province using molecular genetic technique

Burassakorn Pimpang

A Senior Project Submitted in partial Fulfillment of Requirement
For the Degree of Bachelor of Science in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2018

ชื่อเรื่อง	การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในหอยกันในพื้นที่อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา โดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ Detection of pathogenic bacterial contamination in *Polymesoda bengalensis* in Thepha district, Songkhla province using molecular genetic technique
ชื่อนิสิต	นางสาวบุรัสกร พิมแพง
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในหอยกันในพื้นที่อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา โดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์
ชื่อนิสิต นางสาวบุรัสกร พิมแพง
ภาควิชา พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคเป็นข้อกำหนดตามมาตรฐานอาหารสากลซึ่งมีจำนวนกลุ่มของแบคทีเรียจำกัด และอีกทั้งยังไม่มีการศึกษาในสัตว์น้ำที่พบเฉพาะถิ่น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค 5 กลุ่ม ได้แก่ *Escherichia coli/*coliform, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium* spp. และ *Bacillus* spp. ซึ่งการตรวจแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp. และ *Bacillus* spp. เป็นการตรวจเพิ่มขึ้นจากเกณฑ์มาตรฐาน โดยตรวจสอบในหอยกัน (*Polymesoda bengalensis*) จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่เก็บจากคลองควาย อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ในฤดูร้อนและฤดูฝน พ.ศ. 2561 ด้วยวิธีคัดแยกเชื้อและระบุชนิดโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ร่วมกับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ผลการศึกษาพบการปนเปื้อนของ coliform ในตัวอย่างหอยกันจากฤดูร้อนมากกว่าฤดูฝน โดยพบจำนวนเฉลี่ย $6.7x10^4$ และ $4.1x10^4$ CFU/ml ตามลำดับ อีกทั้งพบการปนเปื้อนของ *Bacillus cereus* ในตัวอย่างหอยกันจากฤดูร้อนมากกว่าฤดูฝน โดยพบจำนวนเฉลี่ย $6.7x10^3$ และ 40 CFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Clostridium* sp. ในตัวอย่างหอยกันจากฤดูฝนจำนวนเฉลี่ยมากกว่า $1.6x10^3$ MPN/ml จากการตรวจสอบพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Shewanella algae, Clostridium* sp., *B. cereus, Aeromonas allosaccharophila, Enterococcus* sp. และ *Rahnella aquatilis* ซึ่งตรวจเพิ่มเติมจากข้อระบุในเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารทะเลที่บริโภคดิบ โดยสรุป การตรวจสอบแบคทีเรียตามเกณฑ์มาตรฐานปัจจุบันไม่ครอบคลุมถึงแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และจากการพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดในหอยกัน ผู้บริโภคจึงควรหลีกเลี่ยงการบริโภคหอยกันที่ยังไม่ผ่านการปรุงสุก

คำสำคัญ: หอยกัน, แบคทีเรียก่อโรค, เทคนิคอณูพันธุศาสตร์

Title	Detection of pathogenic bacterial contamination in *Polymesoda bengalensis* in Thepha district, Songkhla province using molecular genetic technique
Student name	Burassakorn Pimpang
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assist. Prof. Dr. Chompunuch Glinwong
Co-Advisor	Assoc. Prof. Dr. Warawut Chulalaksananukul
Academic year	2018

Abstract

Detection of pathogenic bacterial contamination is a requirement of international food standards which have a limited number of bacterial groups. Pathogenic bacterial contamination in local endemic aquatic has never been studies. This research aimed to examine 5 groups of pathogenic bacterial: *Escherichia coli/* coliform, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium* spp. and *Bacillus* spp. In addition, examination of *Clostridium* spp. and *Bacillus* spp. was an optional test to check for quality control. Six samples of *Polymesoda bengalensis* were collected from Khwai Canal, Thepha District, Songkhla Province during summer and rainy season in 2018. Bacterial isolates were identified using combinatorial analysis of rDNA nucleotide sequence and biochemical tests. The results showed that samples from summer having higher coliform contamination than that in rainy season, with an average amount of $6.7x10^4$ and $4.1x10^4$ CFU/ml respectively and also presence of *Bacillus cereus* contamination was much higher than that in rainy season, with an average amount of $6.7x10^3$ and 40 CFU/ml respectively. Besides, *Clostridium* sp. contamination in sample from the rainy season had an average amount of more than $1.6x10^3$ MPN/ml. After inspection, the contamination included pathogenic groups of *Clostridium* sp., *B. cereus, Aeromonas allosaccharophila, Shewanella algae, Enterococcus* sp. and *Rahnella aquatilis* which were additionally examined from the criteria in the microbiological quality of raw seafood. In summary, the current standard bacteriological examination does not cover other bacterial groups that affect consumer's health. Also, due to the contamination of several pathogenic bacterial found in *Polymesoda bengalensis*, the consumers should avoid consuming uncooked *Polymesoda bengalensis.*

Keywords: *Polymesoda bengalensis*, pathogenic bacterial, molecular genetic technique

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬ้าลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณพี่มนัสชยา เนื่องจุ้ย พี่อ้อม พี่กระต่าย พี่มิ้ง พี่ฝ้าย พี่เก่ง และพี่ๆ หน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ ที่คอยให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจ และช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ทั้ง พลอย เบส เนิร์ส น้ำ มุก และเพื่อนทุกคนที่คอยให้กำลังใจ รับฟัง และให้คำปรึกษามาโดยตลอด

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่เข้าใจ และให้ความช่วยในทุก ๆ ด้านอย่างเต็มที่

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง	22
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล	35
เอกสารอ้างอิง	39

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะของหอยกัน	3
2	แผ่นอาหารสำเร็จรูป 3M Petrifilm™	5
3	ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* spp. บนอาหาร SS agar	7
4	ลักษณะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* บนอาหาร TCBS agar	8
5	ลักษณะโคโลนีของ *Clostridium* spp. บนอาหาร TSC agar	10
6	ลักษณะโคโลนี *B. cereus* บนอาหาร MYP agar	11
7	ป่าชายเลนบริเวณคลองควาย	16
8	แผ่น 3M petrifilm ที่มี coliform และ แผ่น 3M petrifilm ที่ไม่พบการเจริญ	22
9	ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อกลุ่ม *Vibrio* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อน	24
10	ลักษณะโคโลนีของ *S. algae* และ *A. allosaccharophila* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS	26
11	ลักษณะโคโลนีของ *Enterococcus* sp. และ *A. allosaccharophila* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS	28
12	อาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar ของตัวอย่าง SM1 และ ตัวอย่าง RN1 ซึ่งไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย	28
13	ลักษณะโคโลนีของ *B. cereus* *E. faecalis* และ *R. aquatilis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP	30
14	ลักษณะโคโลนีของ *B. cereus* และ *E. faecalis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP	31
15	ชุดทดสอบ API 50 CHB ที่ผ่านการเพาะเชื้อ *B. cereus*	32
16	ลักษณะโคโลนีของ *Clostridium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC	34
17	ชุดทดสอบ API 20 A ที่ผ่านการเพาะเชื้อ *Clostridium* sp.	34

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารทะเลที่บริโภคดิบ	13
2	จำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Total coliform และ *Escherichia coli* ที่พบในตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนและฤดูฝน	23
3	ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนด้วยชุดทดสอบ API 20 E และยีน 16S rDNA	25
4	ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝนด้วยชุดทดสอบ API 20 E และยีน 16S rDNA	27
5	ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB และยีน 16S rDNA	29
6	ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝนด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB และยีน 16S rDNA	31
7	ผลการทดสอบเชื้อ *B. cereus* ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB	32
8	ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝนด้วยชุดทดสอบ API 20 A และยีน 16S rDNA	33
9	ผลการทดสอบเชื้อ *Clostridium* sp. ด้วยชุดทดสอบ API 20 A	34

บทที่ 1
บทนำ

อาหารทะเลเป็นอาหารที่นิยมบริโภคกันมากเพราะมีสารอาหารที่ดีอย่างเช่น โปรตีน รวมทั้งแร่ธาตุที่สำคัญอย่าง ไอโอดีน แคลเซียม เหล็ก วิตามินบี ซึ่งหอยเป็นหนึ่งในวัตถุดิบหลักของอาหารทะเล หอยในทะเลไทยเกือบทุกชนิดใช้เป็นอาหารได้ มีคุณค่าทางอาหารไม่น้อยกว่าสัตว์น้ำจำพวกปลา ปูและกุ้ง ลักษณะเด่นของหอย ได้แก่ มีเนื้อนุ่ม และมีเปลือกห่อหุ้ม หอยพบได้ทั้งในทะเล และในน้ำจืด โดยหอยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก เป็นหอยที่มีความสำคัญเชิงพาณิชย์ซึ่งได้จากการทำฟาร์มเพาะเลี้ยง และจากการทำประมงขนาดกลางและขนาดใหญ่ เช่น หอยนางรม หอยแมลงภู่ และหอยแครง เป็นต้น อีกกลุ่มเป็นหอยในท้องถิ่นที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น หอยตาวัว หอยเสียบ เป็นต้น ซึ่งมีปริมาณไม่มากและมีการบริโภคกันในท้องถิ่น (วันทนา อยู่สุข และ ธีระพงศ์ ด้วงดี, 2536)

หอยกัน *(Polymesoda bengalensis)* หรือที่มีชื่อเรียกในท้องถิ่นว่า หอยตาควาย เป็นอาหารท้องถิ่นในจังหวัดสงขลาและบางพื้นที่ในภาคตะวันออก หอยกันเป็นหอยสองฝาหรือหอยกาบคู่ มีลักษณะลำตัวแบน มีสองฝาประกบเข้าหากัน ซึ่งมีพฤติกรรมการกินอาหารแบบกรองกิน (filter feeding) เริ่มด้วยหอยจะดูดน้ำและอาหารเข้าสู่ร่างกาย ทางท่อน้ำเข้า (incurrent siphon) อาหารจะผ่านการกรองที่เหงือก (external gill) และจะถูกลำเลียงไปที่ร่องอาหาร (ventral food groove) ในบริเวณนี้จะมี การผลิตเมือกทำให้อนุภาคของอาหารเป็นเส้นสาย และลาเบียลพัล (labial pale) ทำหน้าที่โบกพัดอาหารเข้าปาก (Navarro and Thompson, 1997) โดยพฤติกรรมแบบกรองกินจะทำให้สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ล่องลอยอยู่ในกระแสน้ำไม่ว่าจะเป็น แพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ แบคทีเรีย ไดอะตอม หรือแม้แต่เศษดินเศษทรายที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ มีโอกาสที่จะเข้าไปสะสมภายในตัวหอยได้ง่าย อีกทั้งแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยกันส่วนใหญ่จะเป็นบริเวณทะเลที่มีชายฝั่งเป็นโคลนและบริเวณปากแม่น้ำ (จุฑามาศ จิวาลักษณ์, พิชิต พรหมประศรี และอรภา นาคจินดา, 2550) ซึ่งเป็นบริเวณรองรับของเสียจากแม่น้ำ ชุมชน เกษตรกรรม และโรงงานอุตสาหกรรม ทำให้มีโอกาสพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่างๆ ได้ เช่น *Salmonella* spp., *Bacillus* spp. และ *Vibrio* spp. เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรคไข้ไทฟอยด์ โรคอาหารเป็นพิษ และอหิวาตกโรค ตามลำดับที่กล่าวมา (ภาวิน ผดุงทศ, 2547) ส่วนใหญ่การบริโภคหอยหรืออาหารทะเลนั้นจะนิยมบริโภคโดยไม่ปรุงสุก บริโภคดิบๆ หรือกึ่งสุกกึ่งดิบ ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย

ก่อโรค ย่อมส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและอาจทำให้ถึงขั้นเสียชีวิตได้ อีกทั้งปัจจุบันการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในสิ่งมีชีวิตประเภทหอยสองฝา มักทำในหอยนางรม หอยแครง หอยเป๋าฮื้อ หอยแมลงภู่ หอยเซลล์ ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ มีการส่งออก ในส่วนการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคของหอยที่เป็นอาหารท้องถิ่นนั้น แทบจะไม่มีข้อมูลดังกล่าว โดยเฉพาะข้อมูลจุลินทรีย์ก่อโรคตามฤดูกาล (สุขุม เร้าใจ, กาญจนา พัฒธนานุรักษ์ และ อิสริยา วุฒิสินธุ์, 2550)

ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค 5 กลุ่ม ได้แก่ *Escherichia coli* และ Total coliform, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium* spp. และ *Bacillus* spp. ในหอยกันในพื้นที่ อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ด้วยวิธีคัดแยกเชื้อและบ่งชี้ชนิดด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน 16S rDNA ซึ่งถือเป็นยีนที่สำคัญที่จะมี โพรแคริโอติกเซลล์ทุกชนิดโดยเฉพาะในแบคทีเรีย สามารถนำมาใช้จัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธานโมเลกุลได้ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์มีความอนุรักษ์สูง และเป็นระบบที่เป็นข้อมูลยอมรับเป็นสากลในการนำมาใช้ชี้เฉพาะชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว (Woo et al., 2008) ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการบ่งชี้คุณภาพอาหารทะเล แนวทางการป้องกัน แก้ไข และประยุกต์ใช้ในการควบคุมปัญหาสิ่งแวดล้อมต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในหอยกันในพื้นที่อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา โดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

บทที่ 2
การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หอยกัน (*Polymesoda bengalensis*)

หอยกัน เป็นหอยกาบหรือหอยสองฝาอยู่ในชั้นไบวาลเวีย (class bivalvia) ของสัตว์ในกลุ่มหอย (phylum Mollusca) ดังรูปที่ 1 จะเห็นว่าเปลือกหอยทั้งสองฝามีรูปร่างเหมือนกัน ขนาดใกล้เคียงกัน ยึดติดกันด้วยกล้ามเนื้อยึดฝา (adductor muscle) และเอ็นยึดฝา (hinge ligament) บริเวณใต้เอ็นยึดฝา ประกอบด้วย ฟันคาร์ดินัล 3 ซี่ ในแต่ละฝา ฟันแลเทอรัลเรียบ มี 1 ซี่ ในฝาซ้าย และ 2 ซี่ ในฝาขวา มีขนาดความยาว 5.5 - 6.2 เซนติเมตร ความสูง 5.4 – 6.0 เซนติเมตร และความหนา 2.8 – 3.5 เซนติเมตร (จุฑามาศ จิวาลักษณ์, พิชิต พรหมประศรี และ อรภา นาคจินดา, 2550)

พฤติกรรมการกินอาหาร หอยกันมีพฤติกรรมการกินอาหารเป็นแบบกรองกิน (filter feeding) เริ่มด้วยการดูดน้ำและอาหารเข้าสู่ร่างกาย ทางท่อน้ำเข้า (incurrent siphon) อาหารจะผ่านการกรองที่เหงือก (external gill) และจะถูกลำเลียงไป ที่ร่องอาหาร (ventral food groove) ในบริเวณนี้จะมีการผลิตเมือกทำให้อนุภาคของอาหารเป็นเส้นสาย และ ลาเบียลพัล (labial pale) ทำหน้าที่โบกพัดอาหารเข้าปาก (Navarro and Thompson, 1997)

การกระจายตัว หอยกันมีการกระจายตัวอยู่บริเวณลุ่มแม่น้ำภาคใต้และลุ่มแม่น้ำภาคตะวันออก พบมากในบริเวณทะเลที่มีชายฝั่งเป็นโคลนและบริเวณปากแม่น้ำ จึงมีการนำมาประกอบอาหารและบริโภคกันในระดับท้องถิ่น (ราชบัณฑิตยสถาน, 2540)

รูปที่ 1 ลักษณะของหอยกัน มาตราส่วนเท่ากับ 1 เซนติเมตร (จุฑามาศ จิวาลักษณ์, พิชิต พรหมประศรี และอรภา นาคจินดา, 2550)

แบคทีเรียก่อโรค (Pathogenic bacterial)

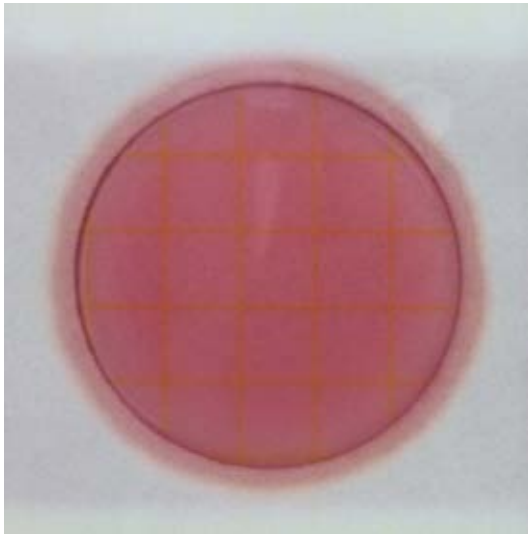
แบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacterial) หมายถึงแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในคนและสัตว์ โรคที่เกิดจากแบคทีเรียมีด้วยกันหลายโรคเช่น วัณโรค ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* โรคอาหารเป็นพิษซึ่งเกิดได้จากแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของสารพิษที่เชื้อขับออกมาและปริมาณเชื้อซึ่งต้องมีปริมาณสูงถึงระดับหนึ่งที่จะทำให้เกิดการเจ็บป่วยขึ้นได้ (ภาวิน ผดุงทศ, 2547) ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่

1. Coliform เป็นกลุ่มของแบคทีเรียในสกุล Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming) เจริญได้ทั้งมีอากาศและไม่มีอากาศ ย้อมติดสีแกรมลบ สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทส (lactose) ทำให้เกิดกรดและแก๊สได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส โคลิฟอร์มสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ตามแหล่งที่มาคือ ฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliform) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้คน และสัตว์เลือดอุ่น ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*) อีกประเภทคือ นันฟีคัลโคลิฟอร์ม (non-fecal coliform) เช่น *Enterobacter aerogenes* เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในดิน ในพืช บางชนิดพบในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น เช่น สุกร โค กระบือ เป็นต้น ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้จะพบมากในสภาพแวดล้อมที่มีสภาวะสุขาภิบาลไม่ดีที่อาจมีการปนเปื้อนของอุจจาระของคนหรือสัตว์เลือดอุ่น (สมคิด รื่นภาควุฒิ, 2548)

การก่อโรค แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มส่วนใหญ่ไม่ใช่เชื้อก่อโรค มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ ซึ่งได้แก่ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงในทารก สร้างสารพิษที่ทำลายเซลล์คล้ายสารพิษชิกาจากเชื้อบิดชิเจลลา Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดอาการคล้ายบิดจากเชื้อชิเจลลา แต่มักไม่เข้าสู่กระแสเลือด Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในทารก สร้างสารพิษเอนเทอโรท็อกซินที่ทำให้มีอาการท้องร่วงคล้ายอหิวาตกโรคและ Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ *E. coli* 0157:H7 สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงอาจมีเลือดปน อาจมีไข้หรือไม่มีไข้ได้ อาเจียน สร้างสารพิษที่ทำลายเซลล์ ที่เรียกว่าสารพิษชิกา (Shiga toxin) และสารพิษคล้ายชิกา (Shiga-like toxin) ซึ่งเป็นสารพิษจากเชื้อบิดชิเจลลา (Gerardi and Zimmerman, 2005: ภาวิน ผดุงทศ, 2547) โดยความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์อยู่ที่ชนิดของสารพิษที่สร้างขึ้น กลไกที่ทำให้เกิดโรคและอาการของโรคที่แสดงออกมา นอกจากนี้ปริมาณของโคลิฟอร์มแบคทีเรียยังสามารถ

ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ สุขาภิบาลอาหารและน้ำได้ โดยการพบโคลิฟอร์มแบคทีเรียในอาหารและน้ำปริมาณมาก บ่งชี้ถึงความไม่สะอาด ไม่ถูกสุขลักษณะ อาจมีการปนเปื้อนของอุจจาระของคนหรือ สัตว์เลือดอุ่น และมีโอกาสที่จะมีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคชนิดอื่นปนเปื้อนอยู่ด้วย (ธีรพง กงบังเกิด, 2546)

การคัดแยกเชื้อ การคัดแยกเชื้อกลุ่ม Coliform สามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่นิยมมี 2 วิธี คือ MPN method (most probable number) และ 3M Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plate ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับโดย FDA, ISO, AOAC โดยแผ่น 3M Petrifilm™ ดังแสดงในรูปที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป ที่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อไวโอเล็ตเรดไบล์ (VRB), เจลที่ละลายได้ด้วยน้ำเย็น, สีย้อมเพื่อบ่งชี้ปฏิกิริยาจากเอ็นไซม์กลูคิวโรนิเดส (glucuronidase) และ สีย้อมเพื่อช่วยในการนับโคโลนี หากมีเชื้อกลุ่ม Coliform จะมีโคโลนีสีชมพูหรือแดง ส่วนเชื้อ *E. coli* จะมีโคโลนีสีน้ำเงินและมีฟองก๊าซ (Matner et al., 1990)



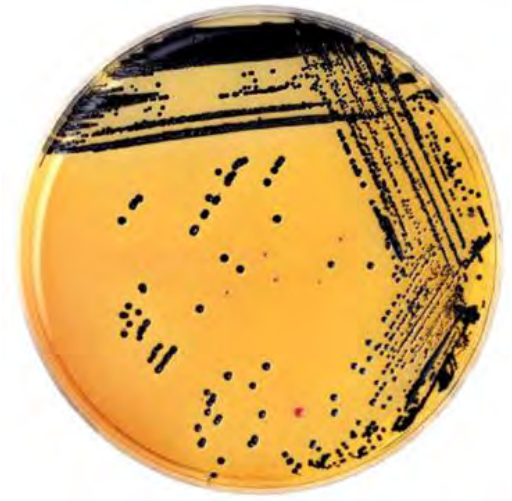
รูปที่ 2 แผ่นอาหารสำเร็จรูป 3M Petrifilm™

2. ***Salmonella* spp.** เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง มีขนาด 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมลบ สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา (flagella) ที่อยู่รอบเซลล์ยกเว้นบางสายพันธุ์ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน และส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 5 - 47 องศาเซลเซียส เชื้อ *salmonella*

สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติรวมถึงในทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์เลื้อยคลานและแมลง เช่น คน โค สุนัข ม้า สุกร และแมว เป็นต้น สำหรับการติดเชื้อในคนส่วนใหญ่มาจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อซึ่งออกมากับอุจจาระหรือปัสสาวะของผู้ที่ป่วยหรือผู้ที่เป็นพาหะ บางส่วนติดเชื้อจากสัตว์เลี้ยงที่อาศัยตามบ้านเรือน โดยอาหารที่มักพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ได้แก่ เนื้อสัตว์ ไข่ นม ปลาและอาหารทะเล เป็นต้น (ทนิฐ หงส์ดุสิต, 2551; ภาวิน ผดุงทศ, 2547)

การก่อโรค เชื้อ *Salmonella* สามารถทำให้เกิดโรคได้ 2 แบบคือ 1. ไข้เอนเทอริก (enteric fever) ได้แก่ ไข้ไทฟอยด์และไข้พาราไทฟอยด์ สาเหตุเกิดได้จากเชื้อ *S. typhi, S. paratyphi* A*, S. paratyphi* B และ *S. paratyphi* C โดยมีอาการที่พบได้ทั่วไป เช่น ปวดหลัง มีไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดท้อง และท้องเสีย เป็นต้น 2. ซาลโมเนลโลซิส (salmonellosis) เกิดจากเชื้อ *salmonella* สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจาก *S. typhi, S. paratyphi* A*, S. paratyphi* B และ *S. paratyphi* C โดยก่อให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินอาหาร หรือ โรคอุจจาระร่วง ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดในกลุ่มเด็กอายุ 0-15 ปี สำหรับอาการที่พบได้ทั่วไป คือ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย มีไข้ หนาวสั่นและอ่อนเพลีย โดยความรุนแรงของอาการจะแตกต่างกันไปตามปริมาณของเชื้อที่บริโภค ชนิดของเชื้อที่บริโภค และความต้านทานของผู้บริโภค (Eng et al., 2015)

การคัดแยกเชื้อ สามารถทำได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญของแบคทีเรียเฉพาะชนิด ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้มีหลายแบบ เช่น MacConkey agar , Eosin methylene blue (EMB) agar และ Salmonella-Shigella (SS) agar เป็นต้น ซึ่ง SS agar มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางกลุ่มได้สูง โดยมีส่วนประกอบคือ peptone, lactose, ferric citrate และ sodium citrate อีกทั้งยังมี brilliant green และ bile salt ที่เป็นสารยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม Coliform และมี neural red เป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) โดยลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* spp. จะสีขาว ขอบเรียบ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำเนื่องจากเชื้อผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Ruiz et al., 1996) ดังแสดงในรูปที่ 3



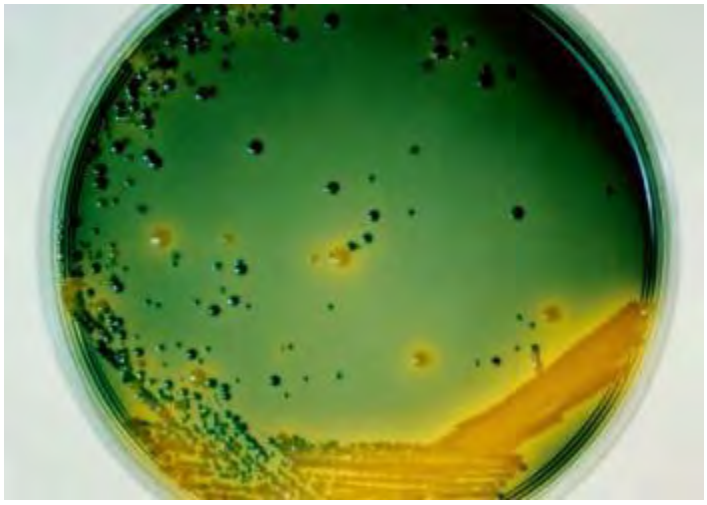
รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* spp. บนอาหาร SS agar
(ที่มา : https://hyserve .com/ product.php?lang=pt&gr=33&pr=295)

3. ***Vibrio* spp.** เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล Vibrionaceae มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น โค้งงอเล็กน้อย (curved rod) ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีแคปซูล มีขนาดยาวประมาณ 1.3 – 3 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่ปลายเซลล์ ย้อมติดสีแกรมลบ เจริญได้ทั้งมีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ดีในอุณหภูมิประมาณ 35-37 องศาเซลเซียส ช่วง pH ในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 6-9 เชื้อ *Vibrio* สามารถพบได้ตามธรรมชาติ โดยเชื้อจะอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ตามชายฝั่งทะเล ในน้ำทะเล แหล่งน้ำจืด บริเวณปากแม่น้ำ สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น ลำไส้ของแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ สาหร่าย และสัตว์ทะเลจำพวก ปลา กุ้ง ปู และหอย เป็นต้น (Beyhan and Yildiz, 2007)

การก่อโรค เชื้อ *Vibrio* มีสมาชิกมากกว่า 30 สายพันธุ์ ซึ่งมีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค เชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *V. parahaemolyticus, V. cholera* และ *V. vulnificus* เป็นต้น (Pruzzo et al., 2005) โดยเชื้อ *V. cholerae* เป็นสาเหตุสำคัญของอหิวาตกโรคหรือโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงในประเทศต่าง ๆ รวมถึงประเทศไทย อาการที่พบทั่วไป ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดเกร็งช่องท้อง และท้องเสีย เป็นต้น ส่วนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยจะมีอาการปวดท้องอย่างรุนแรง อุจจาระเหลว มีไข้ บางคนอาจมีอาการหายใจลำบาก หนาวสั่น ชีพจรลดต่ำอย่างรวดเร็ว อาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ และเชื้อ *V. vulnificus* เป็นเชื้อที่ก่อโรคในคนได้ 3 ลักษณะคือ 1. ติดเชื้อที่บาดแผล จนทำ

ให้เกิดเนื้อเยื่ออักเสบ ผิวหนังจะมีอาการบวม ร้อนแดง และเจ็บปวด 2. เกิดอาการโลหิตเป็นพิษ โดยจะมีอาการ หนาวสั่น ความดันต่ำ อาเจียน อาจมีอาการท้องเสียร่วมด้วย 3. กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ทำให้มีอาการท้องเสีย และอาเจียน ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่ของการเกิดโรคมาจากการรับประทานอาหารทะเลแบบดิบ ๆ หรือปรุงสุก ๆ ดิบๆ (Daniels and Shafaie, 2000)

การคัดแยกเชื้อ สามารถทำได้ด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญของแบคทีเรียเฉพาะชนิด ซึ่งการคัดแยกเชื้อ *Vibrio* spp. นิยมใช้ Thiosulphate citrate bile-salt sucrose (TCBS) agar เนื่องจากสามารถคัดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus , V. cholerae* และ สายพันธุ์อื่น ๆ ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคใน *Vibrio* spp. ได้ ซึ่ง TCBS agar ประกอบด้วย yeast extract, peptone, sodium thiosulfate, sodium citrate, ox bile, sucrose, sodium chloride, iron (III) citrate, bromothymol blue, thymol blue, agar, และน้ำ-กลั่น โดยโคโลนีของ *Vibrio* spp. จะมีสีเขียวหรือสีเหลืองและมีขนาดที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Percival and Williams, 2014) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ลักษณะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* (สีเขียว) และ *V. cholerae* (สีเหลือง) บนอาหาร TCBS agar (ที่มา : http://fsl.nmsu.edu/laboratory-safety.html)

4. ***Clostridium*** **spp.** เป็นแบคทีเรียในสกุล Clostridiaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง สร้างสปอร์ ย้อมติดสี แกรมบวก เจริญได้ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 5 - 8.5 เชื้อ *Clostridium* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ ผัก เนื้อสัตว์ นม สัตว์ทะเล เป็นต้น

และยังพบได้ในอาหารที่อยู่ในสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งผ่านความร้อนไม่เพียงพอ เช่น อาหารกระป๋องไส้กรอก เป็นต้น โดยหากอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต กล่าวคือ บรรยากาศที่มีออกซิเจน จะอยู่ในรูปสปอร์ซึ่งทนต่อความร้อนได้ดี การทำลายเชื้อในรูปสปอร์ต้องใช้อุณหภูมิมากกว่า 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 30 นาที แต่เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะเจริญเติบโตและสร้างสารพิษขึ้นมา (Public Health England, 2015)

การก่อโรค เชื้อ *Clostridium* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญซึ่งสายพันธุ์หลักๆที่ก่อให้เกิดโรคในคนได้แก่ *C. botulinum* ก่อให้เกิดโรคโบทูลิซึมซึ่งแบ่งเป็น 3 ชนิดหลัก ๆ คือ โรคโบทูลิซึมอาหารเป็นพิษ (foodborne botulism) โรคโบทูลิซึมบาดแผล (wound botulism) และโรคโบทูลิซึมลำไส้ (intestinal botulism) อาการทั่วไปของโรคโบทูลิซึมคือ มองเห็นภาพซ้อน เปลือกตาตก พูดไม่ชัด เป็นต้น *C. perfringens* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ อาการทั่วไปคือ ปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย อาเจียน เป็นต้น และ *C. difficile* ซึ่งก่อให้เกิดอาการท้องเสียและลำไส้ใหญ่อักเสบ อาการทั่วไปคือ มีไข้สูง ปวดท้อง และท้องเสีย เป็นต้นซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคมาจากการบริโภคอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ โดยมักเป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการถนอมอาหารและการบรรจุที่ไม่ได้มาตรฐาน (วินัย วนานุกูล, 2551; Anany et al., 2015)

การคัดแยกเชื้อ สามารถทำได้ด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญของแบคทีเรียเฉพาะชนิด ซึ่งการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. สายพันธุ์ที่ก่อโรค เช่น *C. perfringens* APHA แนะนำให้ใช้อาหาร Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar ที่ประกอบด้วย tryptose, soytone, yeast extract, sodium metabisulfite, iron (III) ammonium citrate, D-Cycloserine, agar และน้ำกลั่น โดย *Clostridium* spp. ที่สามารถรีดิวซ์ sulfite จะมีโคโลนีสีดำจากการสร้าง ferrous sulfide (Downes and Ito., 2001) ดังแสดงในรูป ที่ 5

รูปที่ 5 ลักษณะโคโลนีของ *Clostridium* spp. บนอาหาร TSC agar
(ที่มา:http://www.dongnamlab.com/ clostridium-difficile-325/bk031ha-tsc-agar-915)

5. ***Bacillus* spp.** เป็นแบคทีเรียในสกุล Bacillaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลล่า เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ บางสายพันธุ์จะมีหรือไม่มีอากาศก็สามารถเจริญได้ สร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน แบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอุณหภูมิระหว่าง 30 – 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์เจริญเติบโตได้ดีในที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารกระป๋อง อีกทั้งยังเจริญได้ในค่า pH ช่วงกว้าง กล่าวคือ ตั้งแต่ 2 – 11 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เชื้อ *Bacillus* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ส่วนสปอร์ของเชื้อนี้พบได้ในฝุ่น ควัน และปนเปื้อนมากับอาหารแห้ง เช่น เครื่องเทศ เส้นก๋วยเตี๋ยว อาหารกึ่ง-สำเร็จรูป เป็นต้น (กระทรวงสาธารณสุข, 2557 : ออนไลน์)

การก่อโรค แบคทีเรียกลุ่มนี้มีหลายสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและในสัตว์ ตัวอย่าง สายพันธุ์ที่สำคัญที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *B. cereus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ มี 2 ลักษณะอาการคือ ทำให้อาเจียนและทำให้ท้องเสีย ซึ่งเกิดจากสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น เรียกว่า เอนเทอโรท๊อกซิน (enterotoxin) โดยมักพบการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในอาหารที่มีโปรตีนสูงจำพวกเนื้อสัตว์ นม ไข่ เป็นต้น *B. anthracis* ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกซ์ (anthrax) ซึ่งสัตว์ที่เป็นโรค แอนแทรกซ์มักตายในทันที โรคนี้สามารถติดต่อมาสู่คนได้ จากการสัมผัสทางผิวหนัง การหายใจ และการกิน อาการที่พบในคนคือ มีไข้สูง ไอ เจ็บหน้าอกรุนแรง หายใจลำบาก (กฤติยา วนิชจิวพันธ์, 2545) อีกเชื้อที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ

เชื้อ *Bacillus* ที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคในคน คือ *S. aureus* ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและบาดแผล รวมไปถึงโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน และอาหารที่พบบ่อยว่าเป็นสาเหตุของโรคคือ อาหารสดที่ไม่ผ่านความร้อน อาหารที่มีการหยิบจับสัมผัสด้วยมือ (นฤมล ธนานันต์ และ ธีระชัย ธนานันต์, 2555)

การคัดแยกเชื้อ สามารถทำได้ด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญของแบคทีเรียเฉพาะชนิด ซึ่งการคัดแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างที่เป็นอาหาร นิยมใช้อาหาร Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar เนื่องจากสามารถคัดแยก *B. cereus* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการก่อให้เกิดโรคในคน โดย MYP agar ประกอบด้วย peptone, meat extract, sodium chloride, mannitol, phenol red, polymyxin B, egg yolk emulsion, agar และน้ำกลั่น โดย *S. aureus* และ *Bacillus* spp. บางสายพันธุ์จะมีโคโลนีสีเหลือง ส่วน *B. cereus* จะมีโคโลนีโคโลนีเป็นสีขาว มีโซนขุ่นรอบโคโลนี และอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีชมพู (Tallent et al., 2012) ดังแสดงในรูปที่ 6

รูปที่ 6 ลักษณะโคโลนี *B. cereus* บนอาหาร MYP agar
(ที่มา: https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xbc/xbc04)

การระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน 16S rDNA (16S rDNA identification)

ไรโบโซมของโพรคาริโอตมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยขนาดใหญ่ 50S (large subunit) และหน่วยขนาดเล็ก 30S (small subunit) โดยหน่วยใหญ่ประกอบด้วย 23S rRNA ขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ 5S rRNA ขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ และโปรตีน 34 ชนิด ส่วนหน่วยเล็กประกอบด้วย 16S rRNA ขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์และโปรตีน 21 ชนิด เนื่องจากไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิดมีหน้าที่ที่แน่นอนและมีความสำคัญต่อเซลล์ โดยมีการสังเคราะห์โปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ และพบว่า rRNA มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ กล่าวคือ มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง ซึ่งในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะจึงสามารถนำมาใช้สำหรับจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้ การบ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมนิยมเลือก ยีน 16S rDNA มาใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากความเหมาะสมของยีน 16S rDNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,500 นิวคลีโอไทด์ ส่วน 23 rRNA มี 2,900 นิวคลีโอไทด์ ถึงจะมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มากแต่ในทางปฏิบัติและการวิเคราะห์นั้นทำได้ยากกว่า รวมทั้งยีน 16S rDNA มีส่วนของบริเวณอนุรักษ์และความแปรผันที่เพียงพอสำหรับจัดกลุ่ม หรือบอกความสัมพันธ์ได้ (Janda and Abbott, 2007)

ชุดทดสอบ Analytical profile index (API identification)

Analytical profile index หรือ API คือการจำแนกแบคทีเรียโดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่ง API ได้รับการพัฒนาเพื่อให้สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว โดยชุดทดสอบ API เป็นแถบพลาสติกประกอบด้วยหลุม หรือช่อง (microtubes) ที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) ใช้สำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเติมสารแขวนลอยของเชื้อลงไปในช่องที่บรรจุสารเคมีเชื้อจะสามารถเจริญและใช้สารเหล่านี้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น เช่น การเปลี่ยนแปลงสีและความขุ่น หลังจากบ่มเชื้อและเติม reagent บางชนิดลงไป เมื่อแปรผลที่บันทึกได้จากการทดสอบจะทำให้ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียได้ ยกตัวอย่างเช่น ชุดทดสอบ API 20 E ซึ่งใช้ในการทดสอบแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriacae และแบคทีเรียที่ย้อมติดสี แกรมลบอื่น ๆ ชุดทดสอบ API 50 CHB ใช้ในการทดสอบแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. และชุดทดสอบ API 20 A ใช้ในการทดสอบแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp. (Biomerieux, 2017 : online)

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร

จากประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารทะเลที่บริโภคดิบ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารทะเลที่บริโภคดิบ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560)

อาหารทะเลที่บริโภคดิบ เช่น กุ้ง ปลา ปลาหมึก หอย และซาชิมิ เป็นต้น	
จำนวนจุลินทรีย์ CFU/กรัม	น้อยกว่า 1×10^5
Escherichia coli MPN/กรัม	น้อยกว่า 3
Staphylococcus aureus CFU/กรัม	น้อยกว่า 100
Salmonella spp. /25 กรัม	ไม่พบ
Vibrio cholera /25 กรัม	ไม่พบ
Vibrio parahaemolyticus /25 กรัม	ไม่พบ
Listeria monocytogenes /25 กรัม	ไม่พบ

ดังนั้นการตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารนั้นจึงมีความจำเป็น เพื่อบ่งชี้คุณภาพของอาหารและให้ข้อมูล เพื่อลดความเสี่ยงการเกิดโรคที่อาจเกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรค (กระทรวงสาธารณสุข, 2559 : ออนไลน์)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน

วัสดุและอุปกรณ์

จานเลี้ยงเชื้อ

หลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร

Screw cap tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร (Axygen, USA)

ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow (Esco, Gibthai)

ตู้บ่มเชื้อ (Memmert)

ตู้แช่แข็ง (Mirage)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส (Bio-Active, Thailand)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich, Germany)

เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง

เครื่องผสมสารละลาย (vortex) (KMC-1300V, Better syncate)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (WNB 7, Memmert)

ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร และ 5 มิลลิลิตร (Oxygen)

ทิป ขนาด 2, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร และ 5 มิลลิลิตร (Oxygen)

เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

เครื่องถ่ายเจล

3M Petrifilm™ (3M, USA)

Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar (Himedia, India)

Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar (Scharlau, Spain)

Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar (Scharlau, Spain)

Rappapaort-Vassiliadis (RV) broth (Himedia, India)

Salmonella Shigella (SS) agar (Himedia, India)

Differential reinforced clostridia medium (DRCM) (Himedia, India)

API 20 E kit (Biomerieux, USA)

API 50 CHB kit (Biomerieux, USA)

API 20 A kit (Biomerieux, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีในขั้นเตรียมอาหาร

Peptone

Sodium chloride

Disodium hydrogen phosphate

Potassium dihydrogen phosphate

สารเคมีในขั้นสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็น และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

10X บัฟเฟอร์ PCR (Biolabs, USA)

Phusion DNA polymerase (Biolabs, USA)

dNTP

DNA ladder marker 1 kb (Vivantis, Malaysia)

ไพรเมอร์ 27F

ไพรเมอร์ 1492R

สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) (Maestrogen, Taiwan)

เจลอะกาโรส (Agarose gel)

พื้นที่ศึกษา

ศึกษาหอยกันในพื้นที่ป่าชายเลนบริเวณคลองควาย อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ซึ่งเป็นป่าชายเลนที่อยู่ใกล้กับชุมชน พื้นที่ป่าบางส่วนถูกใช้เป็นพื้นที่ทางการเกษตร ดินมีลักษณะเป็นดินโคลน ดังแสดงในรูปที่ 7

รูปที่ 7 ป่าชายเลนบริเวณคลองควาย

วิธีการดำเนินงาน

1. **ศึกษารวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง**

2. **เก็บตัวอย่างหอยกัน**

เก็บตัวอย่างหอยกันจากพื้นที่บริเวณคลองควาย 3 จุด จุดละ 30 ตัว ล้างทำความสะอาดเปลือกของหอยกันและแกะเนื้อหอยกันด้วยวิธีการปลอดเชื้อ โดยทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในการแกะเนื้อหอยด้วยแอลกอฮอล์ จากนั้นบรรจุหอยกันลงในขวดเก็บตัวอย่าง แยกตามจุดเก็บตัวอย่าง แล้วใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในขวดเก็บตัวอย่าง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ โดยเก็บตัวอย่างหอยกันในช่วงฤดูร้อน (เดือนเมษายน 2561) และ ช่วงฤดูฝน (เดือนสิงหาคม 2561)

3. **คัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากตัวอย่างหอยกัน**

3.1 แบคทีเรียกลุ่ม *Escherichia coli* และ total coliform

วิเคราะห์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 3M Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plate นำสารแขวนลอยจากขวดเก็บตัวอย่าง มาเจือจางให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} เขย่าจนสารแขวนลอยตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน เปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนขึ้น จากนั้นดูดสารแขวนลอยตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วถ่ายสารแขวนลอยตัวอย่างลงบนแผ่น 3M Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plate วางตัวกด (spreader) ใช้นิ้วกดจนสารแขวนลอยตัวอย่างกระจายเต็มวงกลม วางแผ่นทิ้งไว้ 1 นาทีก่อนเคลื่อนย้าย แล้วนำไปบ่ม โดยสำหรับ Coliform บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

และสำหรับ *E. coli* บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และรายงานผลเป็น CFU/ml อ้างอิงตามวิธี AOAC Official Method 991.14

3.2 แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp.

วิเคราะห์โดยอ้างอิงวิธีจาก Most probable number (MPN) method APHA 2001 และ BAM/FDA 2004 (Silva et al., 2013)

เริ่มจากการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ ทำโดยปิเปตต์สารแขวนลอยจากขวดตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Phosphate Buffered Saline (PBS) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางสารแขวนลอยให้ได้ 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} เขย่าจนสารแขวนลอยเป็นเนื้อเดียวกันกับอาหารเหลว ปิเปตต์สารแขวนลอยที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Alkaline Peptone water (APW) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด โดยทำขั้นตอนดังกล่าวเหมือนกันในสารแขวนลอยที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดแยกจุลินทรีย์ด้วยนำอาหารเหลวที่ผ่านการเพาะเชื้อมาสตรีค (Streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar รวมทั้งหมดเป็นจำนวน 12 เพลต แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากครบระยะเวลาที่กำหนดแล้วมีเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีคล้าย *Vibrio* spp. จะทำการคัดเลือก 5 โคโลนี เพื่อนำไปทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีทำโดยนำโคโลนีที่คัดเลือกมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 E kit identification ด้วยการเขี่ยโคโลนีที่คัดเลือกลงในหลอดที่มีน้ำเกลือปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารแขวนลอยลงในแถบทดสอบ โดยสำหรับการทดสอบ Citrate utilization : CIT, Voges Proskauer : VP และ Gelatin : GEL เติมสารแขวนลอยทั้งส่วนที่เป็นหลอดและส่วนที่เป็นรูปถ้วย ส่วนการทดสอบ Arginine Dihydrolase : ADH, Lysine Decarboxylase : LDC, Ornithine Decarboxylase : ODC, Urease (URE) และ H_2O production : H_2S เติมสารลายส่วนที่เป็นหลอดและเติมน้ำมันแร่ (mineral oil) ในส่วนที่เป็นรูปถ้วย และการทดสอบอื่น ๆ นั้นให้เติมสารแขวนลอยเฉพาะส่วนที่เป็นหลอด แล้วใส่ในกล่องบ่มเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง บันทึกผลและแปรผลด้วยซอฟแวร์สำหรับการจำแนกชนิด apiweb™

3.3 แบคทีเรียกลุ่ม *Salmonella* spp.

วิธีวิเคราะห์ประยุกต์จาก Bacteriological Analytical Manual, chapter 5, *Salmonella* (Silva et al., 2013)

เริ่มจากการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ โดยปิเปตต์สารแขวนลอยจากขวดเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวแลคโตส (lactose broth) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่า pH ของสารแขวนลอยให้ได้ 6.8 ± 2 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดแยกจุลินทรีย์ด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappapaort-Vassiliadis (RV) broth โดยปิเปตต์อาหารเหลวที่ผ่านการเพาะเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อ RV ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด แล้วบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่มครบตามเวลามาสตรีค ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella Shigella (SS) agar จำนวน 3 เพลต แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง หลังจากครบระยะเวลาที่กำหนดแล้วมีเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีคล้าย *Salmonella* spp. จะทำการคัดเลือก 5 โคโลนี เพื่อนำไปทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ทำโดยนำโคโลนีที่คัดเลือกมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 E kit identification ด้วยการเขี่ยโคโลนีที่คัดเลือกลงในหลอดที่มีน้ำเกลือปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารแขวนลอยลงในแถบทดสอบ โดยสำหรับการทดสอบ Citrate utilization : CIT , Voges Proskauer : VP และ Gelatin : GEL เติมสารแขวนลอยทั้งส่วนที่เป็นหลอดและส่วนที่เป็นรูปถ้วย ส่วนการทดสอบ Arginine Dihydrolase : ADH, Lysine Decarboxylase : LDC, Ornithine Decarboxylase : ODC, Urease (URE) และ H_2O production : H_2S เติมสารลายส่วนที่เป็นหลอดและเติมน้ำมันแร่ (mineral oil) ในส่วนที่เป็นรูปถ้วย และการทดสอบอื่น ๆ นั้นให้เติมสารแขวนลอยเฉพาะส่วนที่เป็นหลอด แล้วใส่ในกล่องบ่มเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง บันทึกผลและแปรผลด้วยซอฟแวร์สำหรับการจำแนกชนิด apiweb™

3.4 แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

วิธีวิเคราะห์ประยุกต์จากวิธีวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Plate Count Method APHA 2001 (Silva et al., 2013)

เริ่มจากการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ โดยปิเปตต์สารแขวนลอยจากขวดเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตน (peptone water) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารแขวนลอยตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} จากนั้นคัดแยกจุลินทรีย์ด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar โดยปิเปตต์สารแขวนลอยตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 เพลต ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 1 เพลต และปิเปตต์สารแขวนลอยตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างละ 1 เพลต รวมทั้งหมดเป็นจำนวน 6 เพลต จากนั้นทำการสเปรด (spread) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง หลังจากครบระยะเวลาที่กำหนดแล้ว มีเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีคล้าย *Bacillus* spp. จะทำการคัดเลือก 5 โคโลนี เพื่อนำไปทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ทำโดยนำโคโลนีที่คัดเลือกมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB kit identification โดยเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHB/E ให้มีความขุ่นเท่ากับ 2.0 แม็คฟาร์แลนด์ (McFarland) จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเพาะเชื้อในหลอด เติมลงในแถบทดสอบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง บันทึกผลและแปรผลด้วยซอฟแวร์สำหรับการจำแนกชนิด apiweb™

3.5 แบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp.

วิธีวิเคราะห์ประยุกต์จากวิธีวิเคราะห์เชื้อ *C. perfringens* ด้วยวิธี Most probable number (MPN) method (Corry, Curtis and Baird, 1995)

เริ่มจากปิเปตต์สารแขวนลอยจากขวดเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (0.1% peptone water) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารแขวนลอยตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} จากนั้นปิเปตต์สารแขวนลอยที่มีระดับความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลอดทดลองที่มี differential reinforced clostridia medium (DRCM) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด และทำขั้นตอนดังกล่าวเหมือนกันในสารแขวนลอยที่

มีระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} รวมเป็นจำนวน 20 หลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีอากาศ หลังจากบ่มจนครบระยะเวลาที่กำหนดแล้ว นำหลอดทดลองมาบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปิเปตต์สารแขวนลอยที่ผ่านการบ่ม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร DRCM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีอากาศ เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดแล้ว เจือจางสารแขวนลอยที่มีระดับความเข้มข้น 10^{-1} ให้มีความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} จากความเข้มข้นเดิม แล้ว spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar และทำขั้นตอนดังกล่าวเหมือนกันในสารแขวนลอยที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} รวมทั้งหมดเป็นจำนวน 20 เพลต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีอากาศ เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง หลังจากครบระยะเวลาที่กำหนดแล้วมีเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีคล้าย *Clostridium* spp. จะทำการคัดเลือก 5 โคโลนี เพื่อนำไปทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ทำโดยนำโคโลนีที่คัดเลือกมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 A kit identification โดยเขี่ยโคโลนีที่คัดเลือก ใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ API 20 A จากนั้นปิเปตต์สารแขวนลอยเติมลงในแถบทดสอบ โดยสำหรับการทดสอบ Gelatin : GEL เติมสารแขวนลอยทั้งส่วนที่เป็นหลอดและส่วนที่เป็นรูปถ้วย ส่วนการทดสอบ Indole : IND เติมสารแขวนลอยเฉพาะส่วนที่เป็นหลอดและเติมน้ำมันแร่ (mineral oil) ในส่วนที่เป็นรูปถ้วยขนาดเล็ก แล้วใส่ในกล่องบ่มเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีอากาศ บันทึกผลและแปรผลด้วยซอฟแวร์สำหรับการจำแนกชนิด apiweb™

4. ระบุชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส (polymerase chain reaction : PCR) ซึ่งการเตรียมสารแขวนลอยจากเชื้อ ทำได้โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวที่คัดเลือกใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำหลอดไปต้มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีสารละลาย Master Mix ปริมาตร 43 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลาย Master Mix ใน 1 ปฏิกิริยา ประกอบด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 27.5 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร, dNTPs ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ 27F ปริมาตร

1.56 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ 1492R ปริมาตร 1.56 ไมโครลิตร และ Phusion DNA polymerase ปริมาตร 0.625 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดตัวอย่างเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส โดยทำปฏิกิริยา 25 รอบ ซึ่งใช้อุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ในระยะเริ่มต้นของขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ (initial denaturation) ใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ (denaturation) ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) และใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เป็นอุณหภูมิสุดท้าย (final hold)

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จาก PCR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (gel electrophoresis) ซึ่งใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ตรวจดูแถบแบนที่ขึ้นเปรียบเทียบกับ DNA ladder 1 kb จากนั้นส่งตัวอย่างเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) กับบริษัท แปซิฟิค ไซแอนซ์ จำกัด เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA แล้ว ใช้โปรแกรม BlastN เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

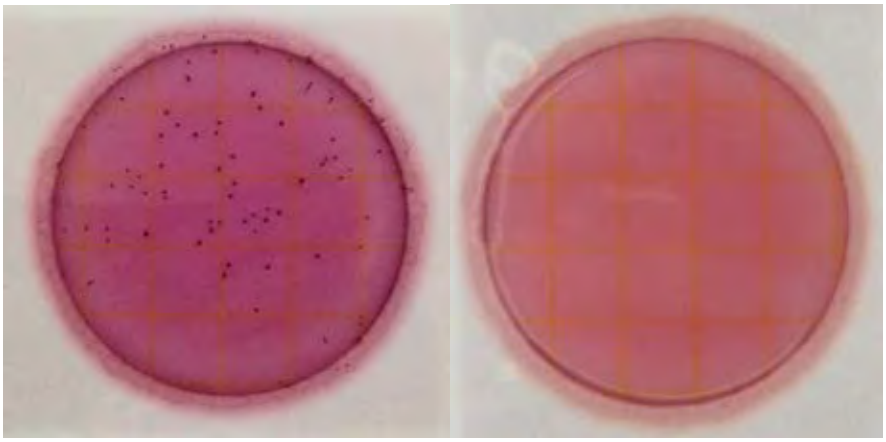
5. **สรุปผลและเขียนรายงาน**

วิเคราะห์การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค 5 กลุ่ม ในฤดูร้อนและฤดูฝน

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ผลการคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Total coliform **และ** *Escherichia coli*

ผลบวกของเชื้อ Coliform คือ มีโคโลนีสีแดง ดังแสดงในรูปที่ 8 ส่วนผลบวกของเชื้อ *E. coli* คือ มีโคโลนีสีน้ำเงิน มีฟองก๊าซ



รูปที่ 8 แผ่น 3M petrifilm ที่มี total coliform (ซ้าย) และ แผ่น 3M petrifilm ที่ไม่พบการเจริญ (ขวา)

จากตารางที่ 2 ตัวอย่าง SM1, RN2 และ RN3 พบเชื้อกลุ่ม Coliform จำนวน $6.7x10^4$, $7.6x10^4$ และ $6x10^3$ CFU/ml ตามลำดับ โดยค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อที่พบในตัวอย่างหอยกันจากฤดูฝนคือ $4.1x10^4$ CFU/ml แสดงให้เห็นว่า การปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม Coliform ในหอยกันมีความแตกต่างตามฤดูกาล พบการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่มนี้ในฤดูร้อนมีมากกว่าฤดูฝน

ตารางที่ 2 จำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Total coliform **และ** *Escherichia coli* **ที่พบในตัวอย่างหอยกันจากทั้งฤดูร้อนและฤดูฝน**

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Total coliform และ *Escherichia coli* (CFU/ml)	
	Total coliform	*Escherichia coli*
SM1	$6.7x10^4$	ไม่พบ
SM2	ไม่พบ	ไม่พบ
SM3	ไม่พบ	ไม่พบ
RN1	ไม่พบ	ไม่พบ
RN2	$7.6x10^4$	ไม่พบ
RN3	$6x10^3$	ไม่พบ

หมายเหตุ

กำหนดให้ SM1 คือตัวอย่างหอยกันจากจุดที่ 1 ในฤดูร้อน (เดือนเมษายน)

กำหนดให้ SM2 คือตัวอย่างหอยกันจากจุดที่ 2 ในฤดูร้อน (เดือนเมษายน)

กำหนดให้ SM3 คือตัวอย่างหอยกันจากจุดที่ 3 ในฤดูร้อน (เดือนเมษายน)

กำหนดให้ RN1 คือตัวอย่างหอยกันจากจุดที่ 1 ในฤดูฝน (เดือนสิงหาคม)

กำหนดให้ RN2 คือตัวอย่างหอยกันจากจุดที่ 2 ในฤดูฝน (เดือนสิงหาคม)

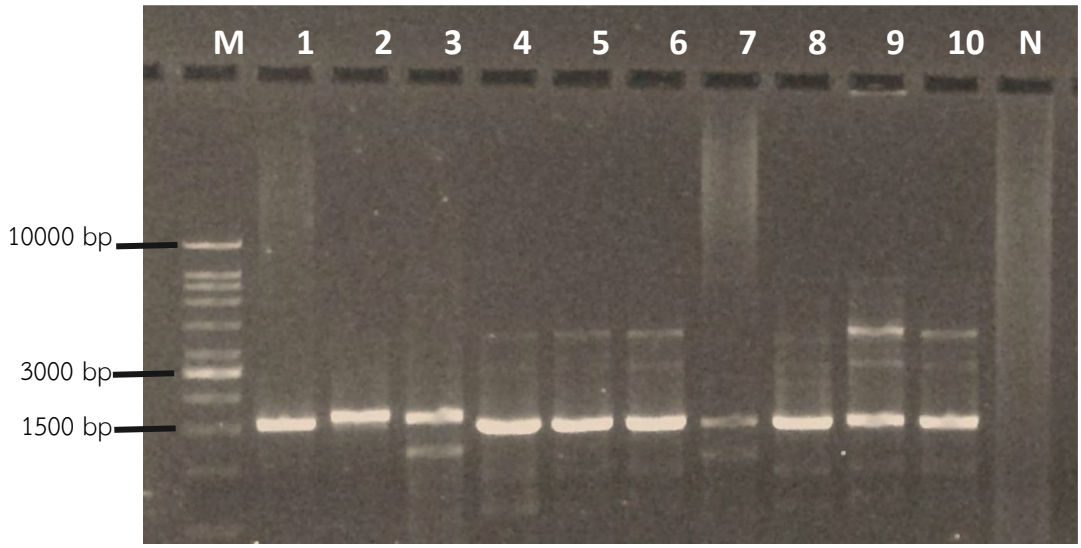
กำหนดให้ RN3 คือตัวอย่างหอยกันจากจุดที่ 3 ในฤดูฝน (เดือนสิงหาคม)

ผลการคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio spp.*

จากการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อน พบว่าตัวอย่าง SM1 พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน มากกว่า1,100 MPN/ml โดยมีลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียว และสีเหลือง เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนตัวอย่าง SM2 และ SM3 ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการตรวจสอบการเพิ่มประมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนจากตัวอย่าง SM1 จำนวน 10 โคโลนี ได้แก่ VSM1, VSM2, VSM3 ,VSM4, VSM6, VSM8, VSM9, VSM11, VSM12 และ VSM13 พบว่าทุกตัวอย่างมีแถบของดีเอ็นเอ

ชัดเจนและตรงกับขนาดที่ต้องการ (ประมาณ 1500 คู่เบส) ส่วน Negative control (N) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 9



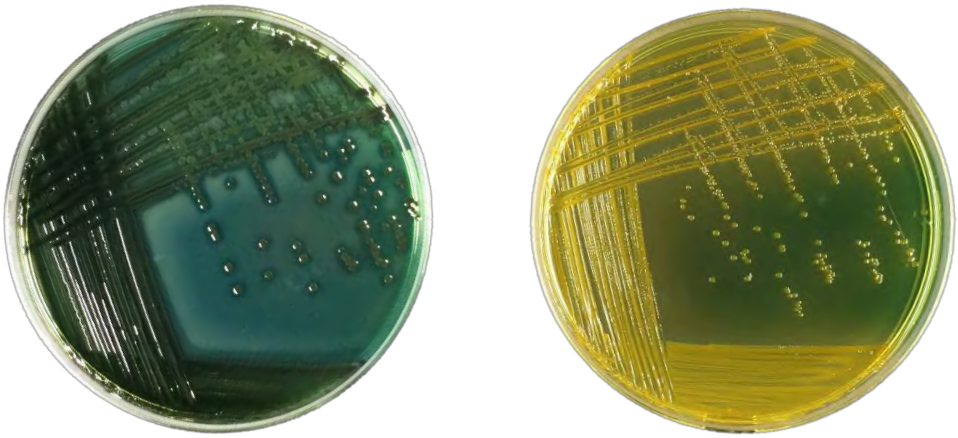
รูปที่ 9 ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อกลุ่ม *Vibrio* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อน

โดยแถบดีเอ็นเอ M คือ DNA marker 1 kb และแถบดีเอ็นเอ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 คือ โคโลนี VSM1, VSM2, VSM3, VSM4, VSM6, VSM8 ,VSM9, VSM11, VSM12 และ VSM13 ตามลำดับ

จากตารางที่ 3 ผลจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และใช้โปรแกรม BlastN เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI และผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 E พบว่าโคโลนีที่มีลักษณะสีเขียว คือ *Shewanella algae* และโคโลนีที่มีลักษณะสีเหลือง คือ *Aeromonas allosaccharophila* ซึ่งลักษณะโคโลนีเป็นดังแสดงในรูปที่ 10

ตารางที่ 3 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนด้วยชุดทดสอบ API 20 E และยีน 16S rDNA

ตัวอย่างโคโลนี	API 20 E		ยีน 16S rDNA		
	ชนิดของแบคทีเรีย	% Identity	ชนิดของแบคทีเรีย	Accession number	% Identity
VSM1	*Aeromonas hydrophila/caviae/sobria*	97.00	*Aeromonas allosaccharophila*	KC202260.1	97.14
VSM2	*Shewanella putrefaciens* group	99.30	*Shewanella algae*	MH361603.1	96.34
VSM3	*Aeromonas hydrophila/caviae/sobria*	97.00	*Aeromonas allosaccharophila*	KC202276.1	96.78
VSM4	*Shewanella putrefaciens* group	99.90	*Shewanella algae*	CP018456.1	96.35
VSM6	*Shewanella putrefaciens* group	99.30	*Shewanella algae*	CP018456.1	97.96
VSM8	*Shewanella putrefaciens* group	99.90	*Shewanella algae*	CP018456.1	97.70
VSM9	Doubtful profile		*Aeromonas allosaccharophila*	KC202260.1	97.66
VSM11	*Shewanella putrefaciens* group	99.90	*Shewanella algae*	CP018456.1	97.88
VSM12	*Shewanella putrefaciens* group	99.90	*Shewanella algae*	MH361595.1	97.25
VSM13	*Shewanella putrefaciens* group	99.90	*Shewanella algae*	MF171030.1	98.04



รูปที่ 10 ลักษณะโคโลนีของ *S. algae* (ซ้าย) และ *A. allosaccharophila* (ขวา) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

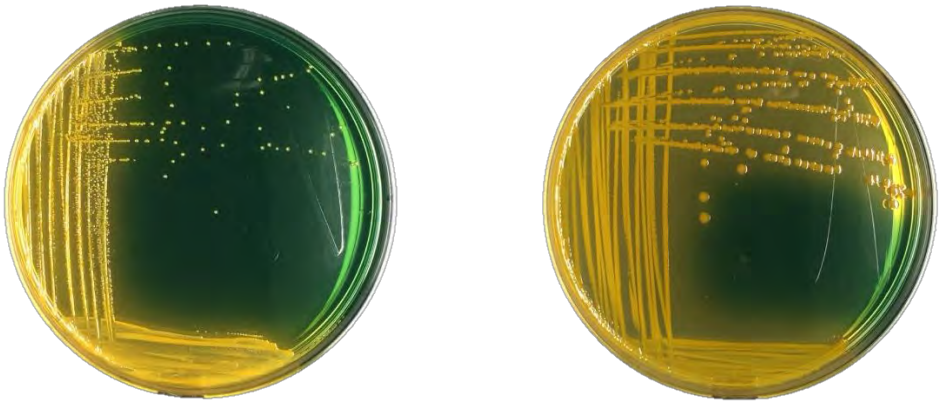
จากการคัดแยกเชื้อตัวอย่างหอยกันในฤดูฝน พบว่าตัวอย่าง RN1 มีเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากกว่า 1,100 MPN/ml โดยมีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลือง กลม ขนาดเล็ก และ RN3 มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน มากกว่า 1,100 MPN/ml โดยมีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลือง แบน ขนาดใหญ่ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ส่วนตัวอย่าง RN2 ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากการเพิ่มประมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝนจากตัวอย่าง RN1 จำนวน 5 โคโลนี ได้แก่ VRN1-1, VRN1-2, VRN1-3, VRN1-4 และ VRN1-5 และเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝนจากตัวอย่าง RN3 จำนวน 5 โคโลนี ได้แก่ VRN3-6, VRN3-7, VRN3-8, VRN3-9 และ VRN3-10 แล้วส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR กับฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN และผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 E เป็นดังแสดงในตารางที่ 4

จากตารางที่ 4 พบว่าโคโลนีสีเหลือง กลม ขนาดเล็ก ที่คัดแยกจากตัวอย่าง RN1 คือ *Enterococcus* sp. และโคโลนีสีเหลือง แบน ขนาดใหญ่ ที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง RN3 คือ *Aeromonas allosaccharophila* ซึ่งลักษณะโคโลนีเป็นดังแสดงในรูปที่ 11

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝนด้วยชุดทดสอบ API 20 E และยีน 16S rDNA

ตัวอย่างโคโลนี	API 20 E		ยีน 16S rDNA		
	ชนิดของแบคทีเรีย	% Identity	ชนิดของแบคทีเรีย	Accession number	% Identity
VRN1-1	Low discrimination		*Enterococcus casseliflavus*	KJ803876.1	97.98
VRN1-2	*Enterobacter cloacae*	86.10	*Enterococcus* sp.	AB675128.1	97.90
VRN1-3	*Enterobacter cloacae*	86.10	*Enterococcus* sp.	AB675128.1	97.48
VRN1-4	*Enterobacter cloacae*	86.10	*Enterococcus* sp.	FJ965843.1	98.33
VRN1-5	*Enterobacter cloacae*	86.10	*Enterococcus* sp.	AB675128.1	98.10
VRN3-6	*Aeromonas hydrophila/caviae/sobria*	97.00	*Aeromonas allosaccharophila*	KC202275.1	99.93
VRN3-7	*Aeromonas hydrophila/caviae/sobria*	97.00	*Aeromonas allosaccharophila*	JF920535.1	99.86
VRN3-8	*Aeromonas hydrophila/caviae/sobria*	97.00	*Aeromonas allosaccharophila*	KC202275.1	99.79
VRN3-9	*Aeromonas hydrophila/caviae/sobria*	97.00	*Aeromonas allosaccharophila*	KC202275.1	96.42
VRN3-10	*Aeromonas hydrophila/caviae/sobria*	97.00	*Aeromonas allosaccharophila*	KC884670.1	99.49



รูปที่ 11 ลักษณะโคโลนีของ *Enterococcus* sp. (ซ้าย) และ *A.allosaccharophila* (ขวา) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

ผลการคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Salmonella* spp.

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนได้แก่ SM1, SM2 และ SM3 และตัวอย่างหอยกันในฤดูฝน ได้แก่ RN1, RN2 และ RN3 พบว่า ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Salmonella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยตัวอย่างเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เป็นดังแสดงในรูปที่ 12

รูปที่ 12 อาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar ของตัวอย่าง SM1 (ซ้าย) และ ตัวอย่าง RN1 (ขวา) ซึ่งไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

จากการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อน พบว่าตัวอย่าง SM1 และ SM2 พบเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่าง SM1 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว มีโซนขุ่นรอบโคโลนี และอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีชมพู และเชื้อที่มีโคโลนีสีเหลือง กลม ขนาดเล็ก ส่วนตัวอย่าง SM2 พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น กลม และตัวอย่าง SM3 ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากการเพิ่มประมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนจากตัวอย่าง SM1 ได้แก่ BSM1-1, BSM1-2, BSM1-3, BSM1-4 และ BSM1-5 และเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง SM2 ได้แก่ BSM2-6, BSM2-7, BSM2-8, BSM2-9 และ BSM2-10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR กับฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN และผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB เป็นดังแสดงในตารางที่ 5

จากตารางที่ 5 พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่าง SM1 คือ *B. cereus* และ *Enterococcus faecalis* โดยพบเชื้อ *B. cereus* จำนวนเฉลี่ย $6.7x10^3$ CFU/ml ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่าง SM2 คือ *Rahnella aquatilis* ซึ่งลักษณะโคโลนีเป็นดังแสดงในรูปที่ 13

ตารางที่ 5 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB และยีน 16S rDNA

ตัวอย่างโคโลนี	API 50 CHB		ยีน 16S rDNA		
	ชนิดของแบคทีเรีย	% Identity	ชนิดของแบคทีเรีย	Accession number	% Identity
BSM1-1	*Bacillus cereus*	99.30	*Bacillus cereus*	DQ923480.1	93.69
BSM1-2	*Bacillus cereus*	99.30	*Bacillus cereus*	MH988719.1	97.36
BSM1-3	*Bacillus cereus*	99.30	*Bacillus cereus*	MH569380.1	97.47
BSM1-4	Unacceptable profile		*Enterococcus faecalis*	KU311637.1	96.91
BSM1-5	Unacceptable profile		*Enterococcus faecalis*	KX527572.1	98.33
BSM2-6	Unacceptable profile		*Rahnella aquatilis*	GU204974.1	99.65

ตัวอย่างโคโลนี	API 50 CHB		ยีน 16S rDNA		
	ชนิดของแบคทีเรีย	% Identity	ชนิดของแบคทีเรีย	Accession number	% Identity
BSM2-7	*Rahnella aquatilis*	98.80	*Rahnella aquatilis*	GU204974.1	99.51
BSM2-8	*Rahnella aquatilis*	98.80	*Rahnella aquatilis*	KC840866.1	99.71
BSM2-9	*Rahnella aquatilis*	98.80	*Rahnella aquatilis*	KJ877661.1	99.65
BSM2-10	*Rahnella aquatilis*	98.80	*Rahnella aquatilis*	KJ877661.1	99.44

รูปที่ 13 ลักษณะโคโลนีของ *B. cereus* (ซ้าย) *E. faecalis* (กลาง) และ *R. aquatilis* (ขวา) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP

จากการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝน พบว่าตัวอย่าง RN1 และ RN3 พบเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่าง RN1 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว มีโซนขุ่นรอบโคโลนี อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีชมพู และโคโลนีสีขาว อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลือง ส่วนตัวอย่าง RN3 พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลือง และตัวอย่าง RN2 ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP

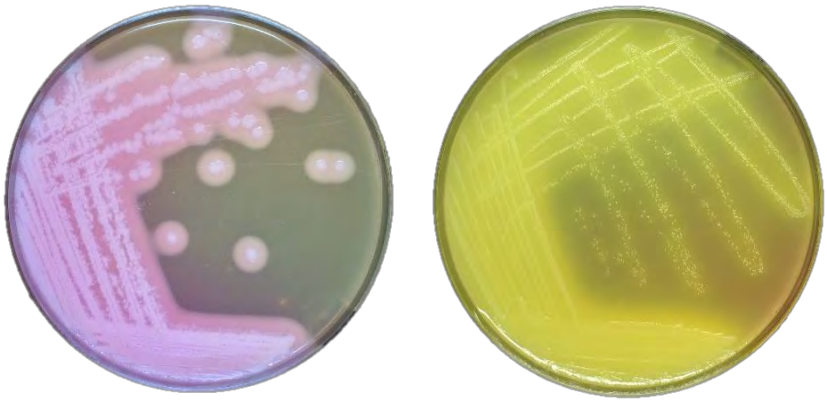
จากการเพิ่มประมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนจากตัวอย่าง RN1 จำนวน 5 โคโลนี ได้แก่ BRN1-1, BRN1-2, BRN1-3, BRN1-4 และ BRN1-5 และเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง RN3 จำนวน 5 โคโลนี ได้แก่ BRN3-6, BRN3-7, BRN3-8, BRN-9 และ BRN3-10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

ผลิตภัณฑ์ PCR กับฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN และผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB เป็นดังแสดงในตารางที่ 6

จากตารางที่ 6 พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่าง RN1 คือ *B. cereus* และ *E. faecalis* โดยพบเชื้อ *B. cereus* จำนวนเฉลี่ย 40 CFU/g ซึ่งลักษณะโคโลนีเป็นดังแสดงในรูปที่ 14

ตารางที่ 6 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝนด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB และยีน 16S rDNA

ตัวอย่างโคโลนี	API 50 CHB		ยีน 16S rDNA		
	ชนิดของแบคทีเรีย	% Identity	ชนิดของแบคทีเรีย	Accession number	% Identity
BRN1-1	Unacceptable profile		*Enterococcus faecalis*	MK045767.1	99.33
BRN1-2	Unacceptable profile		*Enterococcus faecalis*	MH210885.1	92.60
BRN1-3	*Bacillus cereus*	99.30	*Bacillus cereus*	KY312802.1	97.38
BRN1-4	*Bacillus cereus*	99.30	*Bacillus cereus*	MH988719.1	99.72
BRN1-5	*Bacillus cereus*	99.30	*Bacillus cereus*	MH988719.1	99.66



รูปที่ 14 ลักษณะโคโลนีของ *B. cereus* (ซ้าย) และ *E. faecalis* (ขวา) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP

จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโคโลนีที่ให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB โดยเชื้อที่จำแนกได้เป็น *B. cereus* ให้ผลบวกในการทดสอบ Glycerol (1), D-ribose (5), D-galactose (10), D-glucose (11), D-fructose (12), N-acetylglucosamine (22), Arbutin (24), Esculin ferric citrate (25), Salicin (26), D-cellobiose (27), D-maltose (28), D-saccharose (31), D-trehalose (32), Amidon (36) และ Glycogen (37) ดังในตารางที่ 7 และชุดทดสอบ API 50 CHB ที่ผ่านการเพาะเชื้อ *B. cereus* เป็นดังแสดงในรูปที่ 15

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบเชื้อ *B. cereus* ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
B. cereus	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
B. cereus	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
B. cereus	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

รูปที่ 15 ชุดทดสอบ API 50 CHB ที่ผ่านการเพาะเชื้อ *B. cereus*

ผลการคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp.

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนได้แก่ SM1, SM2 และ SM3 พบว่า ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝน พบว่าตัวอย่าง RN1 พบเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อที่พบมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวมีจุดสีดำตรงกลาง ส่วนตัวอย่าง RN2 และ RN3 ไม่พบการเจริญชองเชื้อแบคทีเรีย

จากการเพิ่มประมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝนจากตัวอย่าง RN1 จำนวน 5 โคโลนี ได้แก่ CRN1-1, CRN1-2, CRN1-3, CRN1-4 และ CRN1-5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR กับฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastN และผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 A เป็นดังแสดงในตารางที่ 8

จากตารางที่ 7 พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่าง RN1 คือ *Clostridium* sp. โดยพบเชื้อ *Clostridium* sp. จำนวนเฉลี่ย มากกว่า 1600 MPN/ml ซึ่งลักษณะโคโลนีเป็นดังแสดงในรูปที่ 16

ตารางที่ 8 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp. จากตัวอย่างหอยกันในฤดูฝนด้วยชุดทดสอบ API 20 A และยีน 16S rDNA

ตัวอย่างโคโลนี	API 20 A		ยีน 16S rDNA		
	ชนิดของแบคทีเรีย	% Identity	ชนิดของแบคทีเรีย	Accession number	% Identity
CRN1-1	*Clostridium* sp.	43.90	*Clostridium bifermentans*	LN998086.1	99.86
CRN1-2	*Clostridium* sp.	75.10	*Clostridium* sp.	LC194786.1	99.93
CRN1-3	*Clostridium* sp.	43.90	*Clostridium* sp.	HM104461.1	99.64
CRN1-4	*Clostridium* sp.	43.90	*Clostridium bifermentans*	KP944167.1	99.78
CRN1-5	*Clostridium* sp.	43.90	*Clostridium* sp.	HM104461.1	99.90

รูปที่ 16 ลักษณะโคโลนีของ *Clostridium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC

จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโคโลนีที่ให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC ด้วยชุดทดสอบ API 20 A โดยเชื้อที่จำแนกได้เป็น *Clostridium* sp. ให้ผลกบวกในการทดสอบ Gelatin (11), Esculin ferric citrate (12) และ Glycerol (13) ดังแสดงในตารางที่ 9 ชุดทดสอบ API 20 A ที่ผ่านการเพาะเชื้อ *Clostridium* sp. ดังแสดงในรูปที่ 17

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบเชื้อ *Clostridium* sp. ด้วยชุดทดสอบ API 20 A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Clostridium sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

รูปที่ 17 ชุดทดสอบ API 20 A ที่ผ่านการเพาะเชื้อ *Clostridium* sp.

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

จากการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม Total coliform และ *E.coli* พบว่าการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม Coliform ในหอยกันมีความแตกต่างกันตามฤดูกาล โดยพบการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่มนี้ในฤดูร้อนมากกว่าฤดูฝน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในฤดูร้อน มีสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อกลุ่มนี้ อีกทั้งน้ำที่ไหลผ่านบริเวณคลองควายมีปริมาณน้อย เชื้อจึงสะสมอยู่ในดินมาก ทำให้โอกาสที่เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้จะปนเปื้อนในหอยกันที่อาศัยอยู่ในบริเวณผิวดินมีมากตามไปด้วย จึงพบปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม Coliform ในหอยกันในฤดูร้อนมากกว่าฤดูฝน สอดคล้องกับการศึกษาของ มณีย์ กรรณรงค์, อนุวัฒน์ รัตนโชติ และ สุพาภร ทศพร้อม (2551) ซึ่งศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในหอยสองฝา บริเวณอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 12 เดือน ในปีพ.ศ. 2550 พบเชื้อกลุ่ม Coliform และ fecal coliform ในหอยสองฝาสูงมากในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน

การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนและฤดูฝนมีเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียวและสีเหลือง โดยผลจากระบุชนิดด้วยยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเขียวที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง SM1 คือ *S. algae* แต่ผลจากการระบุชนิดด้วยชุดทดสอบ API 20 E ให้ผลที่แตกต่างไป โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีโคโลนีเป็นสีเขียวคือ *S. putrefaciens* group เนื่องจาก *S. algae* และ *S. putrefaciens* group ให้ผลทดสอบทางเคมีเหมือนกันในหลายปฏิกิริยา (Khashe and Janda, 1998) และชุดทดสอบ API 20 E ไม่ครอบคลุมถึงการระบุชนิดของ *S. algae* จึงสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียโคโลนีสีเขียวที่พบคือ *S. algae* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่พบได้ในแหล่งน้ำทั่วไป ทำให้มีโอกาสที่จะพบสาหร่ายชนิดนี้ได้ในหอยกัน โดยสาหร่ายชนิดนี้ยังไม่มีการพบว่าก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร แต่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในหูและเนื้อเยื่ออ่อนได้ (Holt, Garhrn-Hensen and Bruun, 2005) ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง แบน ขนาดใหญ่ที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง SM1 และ RN3 ผลจากการระบุชนิดด้วยยีน 16S rDNA พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *A. allosaccharophila* แต่ผลจากการระบุชนิดด้วยชุดทดสอบ API 20 E ให้ผลที่แตกต่างไป โดยจากการวิเคราะห์ผลระบุว่าสามารถเป็นเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 3 ชนิด

คือ *A. hydrophila* หรือ *A. caviae* หรือ *A. sobria* เนื่องจากผลทดสอบทางเคมีของเชื้อแบคทีเรียสกุล Aeromonas เหมือนกันในหลายปฏิกิริยา และชุดทดสอบ API 20 E ไม่ครอบคลุมถึงการระบุชนิดของ *A. allosaccharophila* จึงสรุปได้ว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง SM1 และ RN3 คือ *A. allosaccharophila* ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้มักพบในแหล่งน้ำและในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะหอยสองฝาและปลา (Miñana-Galbis et al., 2002) โดยเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคในปลา และก่อให้เกิดอาการท้องเสียและอาหารเป็นพิษในคนได้ (Saavedra et al., 2007) และจากระบุชนิดด้วยยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียโคโลนีสีเหลือง กลม ขนาดเล็ก ที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง RN3 พบว่าเป็น *Enterococcus* sp. แต่ผลวิเคราะห์จากชุดทดสอบ API 20 E พบว่าเป็น *E. cloacae* เนื่องจาก *Enterococcus* sp. และ *E. cloacae* ให้ผลทดสอบทางเคมีเหมือนกันในหลายปฏิกิริยา (Manero and Blanch, 1999) และชุดทดสอบ API 20 E ไม่ครอบคลุมถึงการระบุชนิดของ *Enterococcus* sp. จึงสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบ คือ *Enterococcus* sp. ซึ่งมีรายงานว่า สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ (Fisher and Phillips, 2009) จากผลการคัดแยกและระบุชนิดของเชื้อที่พบในตัวอย่างหอยกันจากทั้งฤดูร้อนและฤดูฝน พบเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. algae*, *A. allosaccharophila* และ *Enterococcus* sp. โดยไม่พบเชื้อก่อโรคกลุ่ม *Vibrio* spp. เป็นไปตามข้อกำหนดของเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารทะเลที่บริโภคดิบ ซึ่งกำหนดว่าต้องไม่พบเชื้อ *V. cholera* และ *V. parahaemolyticus*

การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม *Salmonella* spp. จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างหอยกันที่เก็บจากบริเวณคลองควายทั้ง 3 จุด ในฤดูร้อนและฤดูฝน ไม่พบการเจริญของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar จึงสรุปได้ว่า ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในหอยกันและเป็นไปตามข้อกำหนดของเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารทะเลที่บริโภคดิบ ซึ่งกำหนดว่าต้องไม่พบเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. สอดคล้องกับการศึกษาของ พรพงษ์ สุทธิรักษ์, ชัชวาล โชติมากร และส่าหรี บุญประสพ (2552) ที่ได้ทำการศึกษาคุณภาพของหอยแครงจากแหล่งเลี้ยงในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. ในตัวอย่างหอยแครง

การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนและฤดูฝนมีเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง SM1 และ RN1 คือ *B. cereus* ซึ่งเป็นเชื้อที่มักพบปนเปื้อนในอาหาร สามารถทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารได้ (กฤติยา วนิชจิวพันธ์, 2545) และเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง SM1 และ RN1 คือ *E. faecalis* ซึ่งผลมาจากการระบุชนิดด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เนื่องจากไม่สามารถระบุชนิดด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB ได้ทั้งนี้เนื่องจากชุดทดสอบไม่ครอบคลุมถึงการระบุชนิดของ เชื้อกลุ่ม *Enterococcus* sp. ส่วนเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง SM1 ผลจากระบุชนิดด้วยยีน 16S rDNA และ ชุดทดสอบ API 50 CHB พบว่าคือ *R. aquatilis* ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถพบได้ตามแหล่งน้ำ ดิน และในคน สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินปัสสาวะ (Harrell, Cameron and Ohara, 1989) จึงสรุปได้ว่าเชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่พบคือ *B. cereus* ซึ่งมีรายงานจาก Son and Fleet (1980) ศึกษาพฤติกรรมของแบคทีเรียก่อโรคในหอยนางรมในออสเตรเลีย พบเชื้อ *B. cereus* ในหอยนางรมจำนวนระหว่าง 100 ถึง 500 เซลล์/กรัม นอกจากนี้ยังมีการพบ *B. cereus* ปนเปื้อนในอาหารทะเลในสหรัฐอเมริกาที่ปริมาณน้อยกว่า 10^2 CFU/กรัม (Rahmati and Labbe, 2008) โดย *B. cereus* เป็นเชื้อก่อโรคที่ไม่อยู่ในข้อระบุในเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารทะเลที่บริโภคดิบ และเมื่อเทียบกับเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารที่มีอาหารดิบเป็นส่วนประกอบหรือส่วนผสมและอาหารพร้อมปรุงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งกำหนดว่า *B. cereus* ต้องน้อยกว่า 1,000 CFU/กรัม โดยในการศึกษานี้พบจำนวนเชื้อ *B. cereus* สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด

การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp. จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างหอยกันในฤดูร้อนไม่พบเชื้อกลุ่มนี้ ส่วนตัวอย่างหอยกันจากฤดูฝนพบเชื้อ *Clostridium* sp. ซึ่งสามารถระบุชนิดได้เพียง 2 โคโลนี พบว่าคือ *C. bifermentans* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคได้ในคน ทำให้เกิดเยื่อบุโพรงมดลูกอักเสบ พบได้ในดิน ตะกอนทะเล และน้ำ เป็นต้น (Hale, Kirby and Albrecht, 2016) จึงมีโอกาสที่จะพบการปนเปื้อนในหอยกันได้

การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ มนัสชยา (2561) ศึกษาตรวจติดตามแบคทีเรียบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับวิเคราะห์ผลกระทบสิ่งแวดล้อมและสุขภาพ ในแหล่งน้ำผิวดิน อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ในปีพ.ศ. 2561 ซึ่งพบการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม Coliform, *Bacillus* spp. และ

Clostridium spp. และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. ในตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณคลองควายทั้งในฤดูร้อนและฤดูฝน ส่วนการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. และ *E.coli* ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน โดยพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* spp. และ *E.coli* ในตัวอย่างดินจากทั้งฤดูร้อนและฤดูฝน แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้ในตัวอย่างหอยกัน ทั้งนี้เชื้อทั้ง 2 ชนิดที่ปนเปื้อนในตัวอย่างดินมีปริมาณค่อนข้างน้อย จึงอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่พบการปนเปื้อนในตัวอย่างหอย

สรุปผล

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค 5 กลุ่มในตัวอย่างหอยกัน ที่สุ่มเก็บระหว่างฤดูร้อนเดือนเมษายน และฤดูฝนเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม Coliform ทั้งในฤดูร้อนและฤดูฝน จำนวนเฉลี่ย 6.7×10^4 CFU/ml และ 4.1×10^4 CFU/ml ตามลำดับ และพบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างหอยกันจากฤดูร้อนและฤดูฝน โดยพบจำนวนเฉลี่ย 6.7×10^3 CFU/ml และ 40 CFU/ml ตามลำดับ อีกทั้งยังพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Clostridium* sp. ในตัวอย่างหอยกันจากฤดูฝน จำนวนเฉลี่ยมากกว่า 1.6×10^3 MPN/ml แต่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่มนี้ในตัวอย่างหอยกันจากฤดูร้อน ทั้งนี้ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม *E.coli* และ *Salmonella* spp.ในตัวอย่างหอยกันทั้ง 2 ฤดู นอกจากนี้พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคได้ คือ *A. allosaccharophila, S. algae, Enterococcus* sp. และ *R. aquatilis* จากข้อมูลนี้คาดว่าสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับผู้บริโภค เพื่อแนวทางป้องกันและลดความเสี่ยงในการเกิดโรคที่อาจเกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนได้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2560. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร. 3. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์บริษัทพีทู ดีไซน์ แอนด์ พริ้นท์ จำกัด.

กฤติยา วนิชจิวพันธ์. 2545. มหันตภัยชีวภาพ. วารสารศูนย์บริการวิชาการ 2 : 17-20.

จุฑามาศ จิวาลักษณ์, พิชิต พรหมประศรี และอรภา นาคจินดา. 2550. หอยกาบน้ำจืดของไทย. 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ทนิฐ หงษ์ดุสิต. 2551. เชื้อ *Salmonella* ในอุตสาหกรรมการแปรรูปเนื้อสัตว์เพื่อการส่งออก. 3M Microbulletin 14 : 2-4.

ธีรพง กงบังเกิด. 2546. จุลชีววิทยาอาหาร. พิษณุโลก : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

นฤมล ธนานันต์ และ ธีระชัย ธนานันต์. 2555. การตรวจสอบแบคทีเรียสแตปฟิโลคอคคัสออเรียส ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส. Thai Journal of Science and Technology 2 : 121-126.

พรพงษ์ สุทธิรักษ์, ชัชวาล โชติมากร, และส่าหรี บุญประสพ. 2552. คุณภาพของหอยแครงจากแหล่งเลี้ยงในจังหวัดสุราษฎร์ธานี. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2552 หน้า 188-199. ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภาวิน ผดุงทศ. 2547. แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2 : 51-65.

มณีย์ กรรณรงค์, อนุวัฒน์ รัตนโชติ และ สุพาภร ทศพร้อม. 2551. การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในหอยสองฝา บริเวณอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www.fisheries.go.th/quality/%E0%B8%AB%E0%B8%AD%E0%B8%A2%E0%B8%AA%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%9D%E0%B8%B2.pdf [10 ตุลาคม 2561]

มนัสชยา เนื่องจุ้ย. 2561. การตรวจติดตามแบคทีเรียบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับวิเคราะห์ผลกระทบสิ่งแวดล้อมและสุขภาพ ในแหล่งน้ำผิวดิน อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2540. อนุกรมวิธานสัตว์ อักษร ก ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. 1. กรุงเทพมหานคร : อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด.

วันทนา อยู่สุข และ ธีระพงศ์ ด้วงดี. 2536. หอยในทะเลไทย. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว 36 : 184-185.

วินัย วนานุกูล. 2551. โรคโบทูลิซึม (Botulism). ใน จารุวรรณ ศรีอาภา, ยาต้านพิษ ๒, หน้า 31-35. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร.

สมคิด รื่นภาควุฒิ. 2548. จุลินทรีย์ในอาหารและการรับรองคุณภาพ. 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

สุขุม เร้าใจ, กาญจนา พัฒธนานุรักษ์ และ อิสริยา วุฒิสินธุ์. 2550. การปนเปื้อนของโลหะหนักและแบคทีเรียในหอยแครงและหอยแมลงภู่บริเวณชายฝั่งจังหวัดสมุทรปราการ. วารสารการประมง 60 : 20-26.

สาธารณสุข กระทรวง. กรมควบคุมโรค. 2557. บาซิลัส ซีเรียส แบคทีเรียที่มากับอาหาร [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://thaigcd.ddc.moph.go.th/informations/view/355 [10 ตุลาคม 2561]

สาธารณสุข, กระทรวง. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2559. มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://food.fda.moph.go.th/data/tradermain/Manual_Of_Law364(Update30-6-16) [23 มกราคม 2562]

Anany, H., Brovko, L.Y., El-Arabi, T.F., and Griffiths, M.W. 2015. Bacteriophages as antimicrobials in food products: applications against particular pathogens. Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality, pp.89-116. Cambridge : Woodhead Publishing.

Beyhan, S. and Yildiz, F.H. 2007. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signaling pathway. Molecular Microbiology 63 : 995-1007.

Biomerieux. 2017. API reference guide [online]. Available from : https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/18_api-ref-guide_v4 [2018,October 10]

Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., and Baird, R.M. 1995. Culture media for food microbiology. 34. Amsterdam : Elsevier Science Publishers B.V.

Daniels, N.A. and Shafaie, A. 2000. A review of pathogenic *Vibrio* infection for clinicians. Infections in Medicine 17 : 665-685.

Downes, F.P. and Ito, K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington D.C. : American public health association.

Eng, S., Pusparajah, P., Mutalib, N. A., Ser, H., Chan, K., and Lee, L. 2015. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Frontiers in Life Science 8 : 284-293.

Fisher, K. and Phillips, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology 155 : 1749-1757.

Gerardi, M. H. and Zimmerman, M.C. 2005. Wastewater pathogens. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc Publication.

Hale, A., Kirby, J.E., and Albrecht, M. 2016. Fetal spontaneous *Clostridium bifermentans* necrotizing endometritis: a case report and literature review of pathogen. Open Forum Infectious Diseases 3 : 1-3.

Harrell, L.J., Cameron, M.L., and Ohara, C.M. 1989. *Rahnella aquatilis* an unusual gram-negative rod isolated from the bronchial washing of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Journal of Clinical Microbiology 27 : 1671-1672.

Holt, H.M., Gahrn-Hansen, B. and Bruun, B. 2005. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. Clinical Microbiology and Infection 11 : 347-357.

Janda, J.M. and Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA Gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, pitfalls. Journal of Clinical Microbiology 45 : 2761-2764.

Khashe, S. and Janda J.M. 1998. Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella alga* and *Shewanella putrefaciens*. Journal of Clinical Microbiology 36 : 783-787.

Manero, A. and Blanch, A.R. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. Applied and Environmental Microbiology 65 : 4425–4430.

Matner, R.R., Fox, T.L., Mciver, D.E., and Curiale, M.S., 1990. Efficacy of petrifilm™ *E. coli* count plates for *E. coli* and coliform enumeration. Journal of Food Protection 53 : 145-150.

Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Lorén, J.G. and Fusté M.C. 2002. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. Journal of Applied Microbiology 93 : 420-430.

Navarro, J.M. and Thompson, R.J. 1997. Biodeposition by the horse mussel *Modiolus modiolus* (Dillwyn) during the spring diatom bloom. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 209 : 1-13.

Percival, S.L. and Williams, D.W. 2014. *Vibrio*. Microbiology of waterborne diseases, pp.237-248. London : Academic Press.

Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R.R., and Donelli, G. 2005. Pathogenic *Vibrio* species in the marine and Estuarine environment. Oceans and health: pathogens in the marine environment, pp.217-252. New York : Springer.

Public Health England. 2015. Identification of *Clostridium* Species. UK Standards for Microbiology Investigations 4 : 1-27.

Rahmati, T. and Labbe, R. 2008. Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood. Journal of Food Protection 71 : 1178-1185.

Ruiz, J., Nunez, M. L., Diaz, J., Lorente, I., Perez, J., and Gomez, J. 1996. Comparison of five plating media for isolation of *Salmonella* species from human stools. Journal of Clinical Microbiology 34 : 686-688.

Saavedra, M.J., Perea, V., Fontes, M.C., Martins, C. and Martínez-Murcia, A. 2007. Phylogenetic identification of *Aeromonas* strains isolated from carcasses of pig as new members of the species *Aeromonas allosaccharophila*. Antonie Van Leeuwenhoek 91 : 159-167.

Silva, N.D., et al. 2013. Microbiological examination methods of food and water. London : CRC Press.

Son, T.N. and Fleet, G.H. 1980. Behavior of Pathogenic Bacteria in the Oyster, *Crassostrea commercialis*, During Depuration, Re-laying, and Storage. Applied and Environmental Microbiology 40 : 994-1002.

Tallent, S.M., Kotewicz, K.M., Strain, E.A., and Bennett, R.W. 2012. Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. Journal of AOAC International 95 : 446-451.

Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., Tse, H., and Yuen, K.Y. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clinical Microbiology and Infection 14 : 908-934.