การตรวจสอบแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในกุ้งขาวสด จากตลาดในเขตธนบุรี

(Detection of Enteropathogenic Bacteria in White-leg Shrimps from Markets in Dhonburi District)

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์* จิณห์วิภา แก้วท่าไม้*

*สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในกุ้งขาวสด (*Litopenaeus vannamei*) จากตลาดพรานนก ตลาดบางแค และตลาดวงเวียนใหญ่ และเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานด้านจุลชีววิทยาของกุ้งสด การตรวจวัดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดใช้วิธีเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งพีซีเอ (plate count agar, PCA) ตรวจจำนวน *Escherichia coli* ปนเปื้อนในตัวอย่างใช้วิธีทดสอบเอ็มพีเอ็น (MPN test) และคุณสมบัติทางชีวเคมี การปนเปื้อนด้วย *Staphylococcus aureus Vibrio cholera* และ *Vibrio parahaemolyticus* ตรวจสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดแยก (selective media) และสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่า จำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมดและ *E. coli* ในกุ้งขาวตัวอย่างจากตลาดพรานนก ตลาดบางแค และตลาดวงเวียน-ใหญ่ มีค่าเป็นไปตามมาตรฐานกำหนด อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบพบจำนวนเฉลี่ยของ *S. aureus* ในตัวอย่าง จากทั้ง 3 ตลาด เกินมาตรฐาน คือ มีค่าอยู่ระหว่าง 2.10×10^3–1.63×10^4 CFU/mL และไม่พบการปนเปื้อนของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างจากตลาดทั้ง 3 แห่ง

คำสำคัญ: กุ้งขาว/ *Vibrio cholerae*/ *Vibrio parahaemolyticus*

Abstract

The objectives of this research were to determine the amount of food borne disease bacteria contaminating in white-leg shrimps (*Litopenaeus vannamei*) from 3 markets (Phrannok, Bangkhae and Wongwianyai) and compare with microbiological standard of shrimp. Total plate count technique was used to investigate microbial types with their amounts. The enumeration of *Escherichia coli* was determined by MPN test and biochemical characteristics. *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus* were distinguished by using the selective media and biochemical tests. The results revealed that average numbers of total microorganism and *E. coli* were equal to standard. However, the average amounts of *S. aureus* in the samples from 3 markets were between $2.10x10^3$–$1.63x10^4$ CFU/mL, which were exceeded standard. The contaminations of *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* were not found in all shrimp samples.

Keywords: White-leg shrimp/ *Vibrio cholerae/ Vibrio parahaemolyticus*

บทนำ

กุ้งเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยมีขอบเขตติดกับทะเลและมีการประมงมากติดอันดับ 1 ใน 10 ของโลก ผลิตภัณฑ์จากการประมงต่างๆ ที่ทำจากกุ้ง เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ และสามารถทำรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมาก อาหารทะเลมีส่วนประกอบทางเคมี ดังนี้ มีความชื้นเฉลี่ยประมาณร้อยละ 80 ปริมาณไขมันประมาณร้อยละ 1-2 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 15 แร่ธาตุต่างๆ ร้อยละ 3 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 2 กุ้งมีประโยชน์และคุณค่าในทางเศรษฐกิจมาก แต่มักพบจุลินทรีย์อยู่ตามเปลือกกุ้ง (อาทินันท์ ประสมพงศ์, 2546) ซึ่งจากการสำรวจแบคทีเรียในกุ้งที่นำเข้าโรงงานอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทย พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 10^6-10^8 เซลล์ต่อกรัม ถ้าตัดหัวกุ้งทันที จะทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลงร้อยละ 45 โดยก่อนนำไปแช่เยือกแข็งแบคทีเรียจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย หลังการเยือกแข็งจำนวนแบคทีเรียจะลดลงมาก และลดลงอีกในขณะเก็บรักษา ซึ่งพบว่าเมื่อเก็บกุ้งแช่แข็งไว้ 70 วัน จะมีจำนวนแบคทีเรียอยู่ระหว่าง $5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ เซลล์ต่อกรัม และจากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกุ้งที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีแบคทีเรียปนเปื้อนพวก *Micrococcus* และ *Staphylococcus* เป็นส่วนใหญ่ และที่ 20 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียพวก *Acinetobacter Moraxella* และ *Flavobacterium* การเน่าเสียของกุ้งแช่เย็นส่วนใหญ่มาจากการเจริญของเชื้อ *Acinetobacter* มากกว่าชนิดอื่น และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่พบ เช่น *Pseudomonas* พบมากในบางครั้ง โดยทั่วไป *Flavobacterium*

Micrococcus Staphylococcus และ *Bacillus* จะมีจำนวนน้อย (Adams and Moss, 2002; Varnam and Evans, 1991) ตัวอย่างกุ้งที่มักพบแบคทีเรียปนเปื้อนมาก คือ กุ้งขาว ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีการเลี้ยงกันมากในประเทศไทย และปัญหาที่พบในกุ้งขาว คือ ปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่ทำให้โรค ที่ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Vibrio* โดยเฉพาะ *V. harveyi* ที่ก่อโรคเรืองแสงในกุ้ง และก่อโรคในมนุษย์ (Reilly and Twiddy, 1992) มีอีกชนิดหนึ่งที่สามารถก่อโรคในกุ้งและในคนได้เช่นกัน คือ *V. parahaemolyticus* โดยทั่วไปโรงงานอุตสาหกรรมมักตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในอาหารทะเลได้แก่ *V. parahaemolyticus S. aureus Escherichia coli* และพวกคอลิฟอร์ม (coliform) เป็นต้น การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่มากับเนื้อกุ้ง อาจมาจากทางอากาศ น้ำแข็งที่ใช้แช่ ภาชนะที่ใส่กุ้ง จากการสัมผัสด้วยมือของผู้ขาย และผู้บริโภคเอง หรือติดมาจากตัวกุ้งตั้งแต่อยู่ในทะเล ดังนั้นการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจึงสามารถเกิดขึ้นได้ ตลอดเวลา (ณัฏสรัณย์ วีรพลพัฒน์กุล, 2550; Dalsgaard *et al.*, 1995)

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหา เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารปนเปื้อนในตัวอย่างกุ้งขาวสด (*Litopenaeus vannamei*) จากตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli Staphylococcus aureus Vibrio parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งขาวจาก 3 ตลาดในเขตธนบุรี โดยเก็บตัวอย่างตลาดละ 3 แผงค้ากุ้ง และสุ่มตัวอย่าง 3 ซ้ำจากแต่ละแผงค้ากุ้ง

2. วิธีการตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

ชั่งตัวอย่างกุ้ง 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกใหม่ที่สะอาด แล้วเติมสารละลายเพปโทนในน้ำ (peptone water) ร้อยละ 0.1ปริมาตร 230 มิลลิลิตร ตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher) นาน 2 นาที ทำการเจือจางให้ได้ระดับที่ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} แล้วใช้ปิเปตดูดตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร จากระดับความเจือจางที่ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ลงในจานเพาะเชื้อ โดยทำ 3 ซ้ำ ทุกระดับความเจือจาง หลังจากนั้นเทอาหารพีซีเอ (plate count agar, PCA) ประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร โดยวิธีเทลงในจานเพาะเชื้อ (pour plate) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง จึงนับจำนวนคอโลนีในจานเพาะเชื้อระหว่าง 30 – 300 คอโลนี รายงานผลจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อกุ้ง 1 กรัม (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2545)

3. การตรวจหาเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

นำตัวอย่างกุ้ง 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกใหม่ที่สะอาดแล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline, PBS) 230 มิลลิลิตร ตีบดด้วยเครื่องตีบดอาหาร นาน 2 นาที ทำการเจือจางให้ได้ระดับที่ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} แล้วจึงใช้ปิเปตดูดตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร จากระดับ

เจือจางที่ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ลงในสารละลายเพปโทนในน้ำที่เป็นเบส (alkaline peptone water) โดยทำ 3 ซ้ำ ทุกระดับเจือจาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) แตะเชื้อจากหลอดที่เจริญมาลาก (streak) ลงบนอาหารทีซีบีเอส (thiosulfate citrate bile salt sucrose, TCBS) บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่เป็นลักษณะของ *V. parahaemolyticus* จะมีสีเขียวขุ่น อาหารไม่เปลี่ยนสี นำมาลากลงบนอาหารแข็งที$_1$เอ็น$_1$ (T_1N_1 agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อมาทดสอบสมบัติทางชีวเคมี โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) เขี่ยเชื้อเดี่ยว ๆ บนอาหารแข็งที$_1$เอ็น$_1$ นำเชื้อมาลาก และแทง (stab) ลงในอาหารเอียงอาร์จินีนกลูโคส ที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ลักษณะของ *V. parahaemolyticus* จะให้ผล K/A ไม่สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)

4. การตรวจเชื้อ *Vibrio cholerae*

ชั่งตัวอย่างกุ้ง 25 กรัม ตีตัวอย่างในสารละลายเพปโทนในน้ำที่เป็นเบส ปริมาณ 230 มิลลิลิตร นาน 1 นาที แล้วนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อแตะเชื้อบริเวณผิวหน้าอาหาร ห้ามเขย่า มาลากบนอาหารทีซีบีเอส บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง คัดเลือกคอโลนีที่มีสีเหลือง คอโลนีใหญ่ เรียบ ค่อนข้างแบน ตรงกลางคอโลนีขุ่นแต่รอบคอโลนีใส แตะเชื้อมาลากบนอาหารแข็งที$_1$เอ็น$_1$ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อเดี่ยวๆ บนอาหารแข็งที$_1$เอ็น$_1$ ใส่ลงในอาหารเอียงแอร์จินีนกลูโคส (arginine glucose slant) อาหารทริปโตน (tryptone) ร้อยละ 1 (T_1N_0) และ อาหารทริปโตน ร้อยละ 1 ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 3 (T_1N_3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อมาตรวจสอบด้วยวิธีสตริง (string test) โดยการเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งที$_1$เอ็น$_1$ หยดด้วยโซเดียมดีออกซีโคเลต (sodium deoxycholate) ในน้ำกลั่น ร้อยละ 0.5 บนกระจกสไลด์ (slide) ผสมให้เข้ากัน ภายใน 60 วินาที เซลล์ของ *V. cholerae* จะสลาย และดีเอ็นเอ (DNA) จับกันเป็นสายเมื่อยกลวดเขี่ยเชื้อขึ้น

5. การตรวจหาเชื้อ *Staphylococus aureus* (Baeck *et al.*, 2006)

เตรียมกุ้งขาว 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกใหม่ที่สะอาดแล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาณ 230 มิลลิลิตร บดตัวอย่างด้วยเครื่องตีบด นาน 2 นาที ทำการเจือจางให้ได้ระดับเจือจางที่ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} แล้วใช้ปิเปตดูดตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร จากระดับเจือจางที่ 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ลงในอาหารเหลวทริปติกซอย (tryptic soy broth, TSB) โดยทำ 3 ซ้ำ ทุกระดับเจือจาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วลากเชื้อลงบนอาหารแข็งเบียร์ด-พาร์เกอร์ (Baird–Parker agar) นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพร้อมทั้งบันทึกผลหลอดขุ่น จากนั้นคัดเลือกคอโลนีของ *S. aureus* มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ มีสีเทาดำ อาจมีขอบขาวหรือไม่มีก็ได้ อาจมีโซนรอบคอโลนีหรือไม่มีก็ได้ จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวเบรน-ฮาร์ทอินฟิวชัน (brain heart infusion broth) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วดูดเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในพลาสมาของกระต่าย (plasma rabbit) 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ้าพลาสมาแข็งตัวเป็นก้อน แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสได้ ให้ผลบวก แต่ถ้าพลาสมาเหลวเหมือนเดิม ให้ผลลบ

6. การตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli* เชื้อคอลิฟอร์ม (coliform) และเชื้อฟีคัลคอลิ-ฟอร์ม (faecal coliforms)

6.1 การตรวจวิเคราะห์ขั้นแรก (presumptive test)

นำตัวอย่างกุ้ง 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกใหม่ที่สะอาดแล้วเติมน้ำเพปโทน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ปริมาณ 230 มิลลิลิตร ตีบดตัวอย่างด้วยเครื่องตีบด นาน 2 นาที ทำการเจือจางให้ได้ระดับเจือจางที่ 10^{-2} 10^{-3} และ10^{-4} แล้วใช้ปิเปตดูดตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร จากระดับเจือจางที่ 10^{-2} 10^{-3} และ10^{-4} ลงในอาหารเหลวลอริลซัลเฟตทริปโตส (Lauryl sulfate tryptose broth, LST) โดยทำ 3 ซ้ำ ทุกระดับเจือจาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง อ่านผลครั้งแรกหลังจากบ่มครบ 24 ± 2 ชั่วโมง โดยหลอดที่ขุ่นมีก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่า ผลเป็นบวก หลังจากอ่านผลครั้งแรกให้นำหลอดที่ให้ผลลบไปบ่มต่ออีก 24 ± 2 ชั่วโมง แล้วตรวจผลซ้ำอีกครั้ง

6.2 การตรวจวิเคราะห์ขั้นยืนยัน (confirm test)

ถ่ายเชื้อจากหลอดที่เจริญในแอลเอสที (LST) ลงในอาหารเหลวบีจีเอลบี (brilliant green lactose bile broth, BGLB) หลอดต่อหลอด บ่มที่ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลหลอดอาหารบีจีเอลบี เข้มข้นร้อยละ 2 นับจำนวนคอลิฟอร์มในหน่วย เอ็มพีเอ็นต่อกรัม (MPN/g or Most Probable Number/g) แล้วถ่ายเชื้อจากหลอดที่เจริญของแอลเอสที ลงในอาหารเหลวอีซี (EC broth) หลอดต่อหลอด บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อยังไม่เจริญบ่มต่อจนถึง 48 ชั่วโมง บันทึกผลในหลอดอาหารเหลวอีซี นับจำนวนฟีคัลคอลิฟอร์ม (faecal coliforms) เป็นในหน่วย เอ็มพีเอ็นต่อกรัม

6.3 การตรวจวิเคราะห์ขั้นสมบูรณ์ (complete test)

ลากเชื้อจากหลอดอาหารเหลวอีซี ที่เจริญ ลงบนอาหารแข็งอีเอ็มบี (eosin–methylene-blue lactose sucrose agar, EMB) บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง แล้วนำคอโลนีที่มีลักษณะแบน สีเข้มตรงกลาง มีหรือไม่มีเมทัลลิกชีน (metallic sheen) มาลากลงบนอาหารพีซีเอ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง นำไปทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

6.4 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบในอาหารทีเอสไอ (triple sugar iron agar, TSI) การทดสอบเอ็มอาร์-วีพี (MR–VP) การทดสอบการใช้ซิเทรต (Simmon's citrate utilization test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease test) การทดสอบการเคลื่อนที่ในอาหารโมทิลิตี อินโดล ไลซีน ดีคาร์บอซิเลส (motility indole lysine decarboxylase) การทดสอบในอาหารเหลวพื้นฐานฟีนอลเรด (phenol red broth base) การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส (coagulase test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (catalase test) และการทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test)

7. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ทำทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ONE-WAY ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ ที่ $p \leq 0.05$ และเปรียบเทียบกับตารางดัชนีเอ็มพีเอ็น (MPN index)

ผลการวิจัย

การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ในกุ้งขาวสด

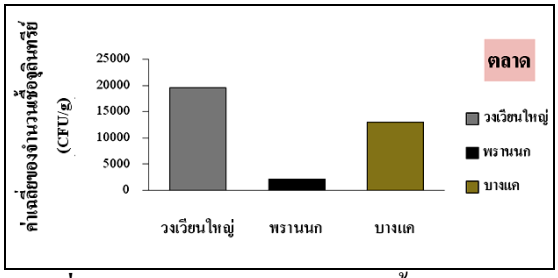
จากการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ในกุ้งขาวสด ที่จำหน่ายในตลาดเขตธนบุรีจำนวน 3 ตลาด และเก็บตัวอย่างกุ้งขาวสดที่แผงค้ากุ้ง 3 ร้านๆ ละ 3 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาเจือจางแบบอนุกรม 10 เท่า และเพาะเลี้ยงในอาหารพีซีเอ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในกุ้งขาวสดจากตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค

ตลาด	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/g)*
ตลาดพรานนก	2.10×10^3 a
ตลาดบางแค	1.31×10^4 b
ตลาดวงเวียนใหญ่	1.96×10^4 c

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 1 และภาพที่ 1 พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของกุ้งขาวสดจากตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของตลาดวงเวียนใหญ่ มีค่ามากที่สุดคือเท่ากับ 1.96×10^4 CFU/g



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในกุ้งขาวสดจากตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค

การตรวจหาปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* ที่พบในกุ้งขาวสด

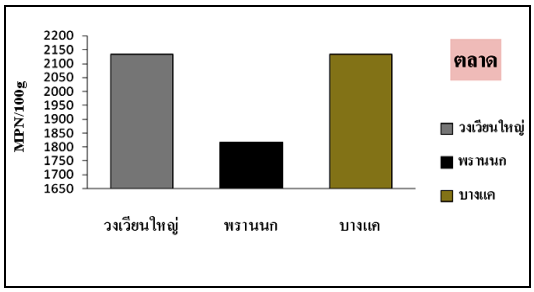
จากการตรวจหาปริมาณเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธีการ MPN ในกุ้งขาวสดจาก 3 ตลาด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวลอริลซัลเฟต (Lauryl sulfate broth) อาหารเลี้ยงเชื้ออีซี และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเลวีนอีโอซินเมทิลีนบลู (Levine's eosin-methylene blue agar) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง พบเชื้อ *E. coli* ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณ *E. coli* ที่พบในกุ้งขาวสดจากตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค

ตลาด	จำนวนเชื้อ ***E. coli*** **(MPN/g)** *
ตลาดพรานนก	18.18 a
ตลาดบางแค	21.33 b
ตลาดวงเวียนใหญ่	21.33 b

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

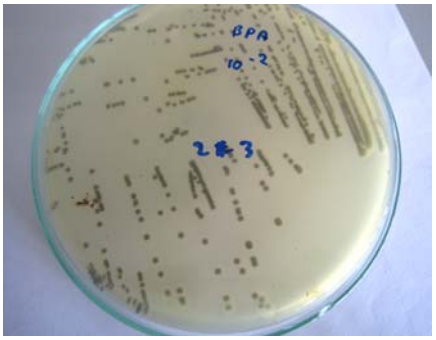
จากตารางที่ 2 และภาพที่ 2 พบว่าจำนวนเชื้อ *E. coli* ของกุ้งขาวสดจากตลาดวงเวียนใหญ่และตลาดบางแค ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สำหรับตลาดพรานนก มีปริมาณ *E. coli* ต่ำที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ คือ มีค่าเท่ากับ 18.18 MPN/g



ภาพที่ 2 ค่า MPN ของเชื้อ *E. coli* ต่อกุ้งสด 100 กรัม จากตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค

การตรวจหาปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่พบในกุ้งขาวสด

จากการตรวจหาปริมาณเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *S. aureus* ในกุ้งขาวสด 3 ตลาด ด้วยวิธีการ ลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (streak plate) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเบียร์ด-พาร์เกอร์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ปรากฏผลว่า ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในทุกตัวอย่างจาก 3 ตลาด พบลักษณะคอโลนีของเชื้อ *S. aureus* มีสีดำ และเกิดวงใส (clear zone) อยู่รอบคอโลนี (ภาพที่ 3)



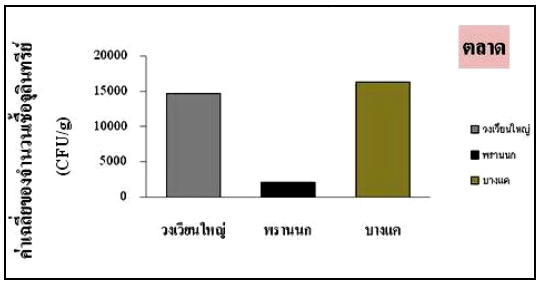
ภาพที่ 3 ลักษณะคอโลนีของเชื้อ *S. aureus*

ตารางที่ 3 จำนวนเชื้อ *S. aureus* ในกุ้งขาวสดจากตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค

ตลาด	จำนวนเชื้อ *S. aureus* (CFU/g)*
ตลาดพรานนก	2.10×10^3 a
ตลาดวงเวียนใหญ่	1.47×10^4 b
ตลาดบางแค	1.63×10^4 b

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 3 และภาพที่ 4 พบว่าจำนวนเชื้อ *S. aureus* ของกุ้งขาวสดจากตลาดวงเวียนใหญ่ และตลาดบางแค ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สำหรับตลาดพรานนก มีปริมาณ *S. aureus* ต่ำสุด (แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 2.10×10^3 CFU / g



ภาพที่ 4 ปริมาณเชื้อ *S. aureus* ในกุ้งขาวสดจากตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค

การตรวจหาปริมาณเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่พบในกุ้งขาวสด

จากการตรวจหาปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาวสด 3 ตลาด ด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อบนอาหาร (spread plate) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทีซีบีเอส ปรากฏผลว่า ตรวจไม่พบเชื้อ*V. parahaemolyticus* ในทุกตัวอย่างจาก 3 ตลาด ไม่พบคอโลนีของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

การตรวจหาปริมาณเชื้อ *Vibrio cholerae* ที่พบในกุ้งขาวสด

จากการตรวจหาปริมาณเชื้อ *V. cholerae* ในกุ้งขาวสด 3 ตลาด ด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อบนอาหาร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทีซีบีเอส ปรากฏผลว่า ตรวจไม่พบเชื้อ *V. cholerae* ในทุกตัวอย่างจาก 3 ตลาด ไม่พบลักษณะคอโลนีของเชื้อ *V. cholerae*

สรุปและอภิปรายผล

จากการวิเคราะห์ตรวจสอบปริมาณเชื้อ *E. coli* ในกุ้งขาวสด ที่วางจำหน่ายอยู่ในตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค โดยสุ่มตัวอย่างจากตลาด ๆ ละ 3 ร้าน พบว่า ตัวอย่างกุ้งขาวสดมีปริมาณเชื้อ *E. coli* เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ (ตารางที่ 4) การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารอาจจะเกิดขึ้นได้ในระหว่างการขนส่งกุ้งขาว การปนเปื้อนของเชื้อที่มาจากน้ำแข็งที่ใช้แช่กุ้ง หรืออาจจะมีการปนเปื้อนมาจากตัวผู้ขาย โดยเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ ปกติจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะทำให้เกิดโรคได้ถ้าเชื้ออยู่นอกลำไส้ เช่น ในท่อปัสสาวะ ท่อน้ำดี ปอด เยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังในเด็กแรกเกิด เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในคนและสัตว์ (Suwansonthichai and Rengpipat, 2003) และเมื่อตรวจหาปริมาณเชื้อ *S. aureus* พบว่า ตัวอย่างกุ้งขาวสดมีปริมาณเชื้อ *S. aureus* เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ (ตารางที่ 4) เชื้อ *S. aureus* ที่พบอยู่ตามตัวกุ้งอาจมีการปนเปื้อนในขณะการจับกุ้งของชาวประมง การปนเปื้อนจากผู้ขาย และผู้บริโภคเอง ซึ่งเชื้อนี้พบได้ตามร่างกายของมนุษย์ โดยจะทำให้เกิดโรคฝีและฝีฝักบัว โรคผิวหนังเป็นตุ่มพอง โรคผิวหนังหลุดลอก โรคปอดบวม โรคไขกระดูกอักเสบและโพรงข้อต่อมีหนอง การติดเชื้อที่กระแสเลือด เยื่อบุหัวใจอักเสบ โรคอาหารเป็นพิษ และโรคลำไส้อักเสบ

ตารางที่ 4 คุณภาพทางจุลชีววิทยาของกุ้งขาวสดเปรียบเทียบกับมาตรฐานตามประกาศในราชกิจจานุเบกษา

รายการวิเคราะห์	มาตรฐานตามประกาศในราชกิจจานุเบกษา CFU/g	ผลทางจุลชีววิทยา (จำนวน 9 ตัวอย่าง)* CFU / g
จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด	5×10^6 (CFU/g)	2.10×10^3 - 1.96×10^4 (ค่าเฉลี่ย = 1.16×10^4 CFU/g)
Escherichia coli	$\leq$ 100 ต่อ กรัม (MPN/g)	18.18 – 21.33 (ค่าเฉลี่ย = 20.28 MPN/g)
Staphylococcus aureus	$\leq 1 \times 10^2$ (CFU/g)	2.10×10^3 - 1.63×10^4 (ค่าเฉลี่ย = 1.10×10^4 CFU/g)
Vibrio parahaemolyticus	ไม่พบเชื้อในตัวอย่าง 50 g	ไม่พบ
Vibrio cholerae	ไม่พบเชื้อในตัวอย่าง 50 g	ไม่พบ

* หมายถึง จำนวนตัวอย่างกุ้งขาวสดจาก 3 ตลาด (9 ตัวอย่าง) ได้แก่ ตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค

ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* จากตลาดวงเวียนใหญ่ ตลาดพรานนก และตลาดบางแค โดยสุ่มตัวอย่างจากตลาด ๆ ละ 3 ร้าน โดยทุกตัวอย่างตรวจไม่พบ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ (ตารางที่ 4) การตรวจสอบไม่พบเชื้อนี้ อาจเนื่องจากเชื้อตายในระหว่างการขนส่ง หรืออาจจะเกิดจากปัจจัยด้านต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ หรือมีการใช้สารปฏิชีวนะป้องกันเชื้อสกุล *Vibrio* ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว ลักษณะคอโลนีของเชื้อ *Vibrio* ที่เจริญบนอาหารทีซีบี-เอส (TCBS) ในกรณีของ *V. cholerae* จะมีสีเหลือง และ *V. parahaemolyticus* มีสีเขียวมะกอก เชื้อ *Vibrio* ก่อให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์น้ำหลายชนิด โดยเฉพาะสัตว์ที่อาศัยอยู่ในทะเลและน้ำกร่อย โดยจะทำให้เกิดโรคแบบเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดและแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย (septicemia) เชื้อ *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่โดยทั่วไปในน้ำกร่อยและจะเข้าทำอันตรายกุ้งได้เมื่อกุ้งไม่แข็งแรง ซึ่งมีผลทำให้กุ้งป่วยและตายในที่สุด แต่ถ้ากุ้งไม่ตาย แข็งแรงพอก็จะกำจัดเชื้อแบคทีเรียนี้ออกไปได้หรือกลายเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (Iyer and Varma, 1990) โรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* มีหลายลักษณะ เช่น รุนแรงเฉพาะที่หรือเข้าไปในระบบเลือด เรื้อรังเฉพาะที่ ซึ่งส่วนใหญ่มักเกิดการติดเชื้อภายใน มักจะพบกุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงบริเวณขอบบ่อ โดยมีอาการอ่อนเพลีย ไม่กินอาหาร สีผิดจากกุ้งปกติโดยทั่วไป สีจะเปลี่ยนไปเป็น

สีแดงหรือฟ้า ในอเมริกาใต้และอเมริกากลาง ได้มีรายงานที่เกี่ยวกับโรควิบริโอซิสหลายโรค เช่น โบลิทอสซินโดรม (bolitos syndrome) และ ซีกูลซินโดรม (seagull syndrome) (Brock and Main, 1994; Saulnier, *et al.*, 2000)

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการรักษาความสะอาดของแผงค้ากุ้ง และให้คำแนะนำกับผู้ค้ากุ้งในเรื่องของสุขลักษณะการขายกุ้งสด จากหน่วยงานของรัฐบาลที่รับผิดชอบโดยตรง เพื่อป้องกันโรคทางเดินอาหารที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร เช่น *E. coli S. aureus V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ซึ่งอาจเกิดกับผู้บริโภคที่รับประทานอาหารไม่สุกได้ รวมทั้งควรเพิ่มการประชาสัมพันธ์เรื่องอันตรายจากการบริโภคกุ้งขาวสุกๆ ดิบๆ ที่อาจเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ

เอกสารอ้างอิง

ช่อเพชร เชี่ยงม้า. (2550). **ประสิทธิภาพสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi***. ปริญญานิพนธ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

ไพโรจน์ วิริยจารี. (2545). **หลักการวิเคราะห์จุลินทรีย์**. จังหวัดเชียงใหม่: คณะอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อาทินันท์ ประสมพงศ์. (2546). **เทคนิคการเลี้ยงกุ้งขาวหรือแวนนาไม**. สืบค้นเมื่อวันที่ 23 ธันวาคม 2554 จาก http://en.wikipedia.org/wiki/Whiteleg_shrimp

Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K. and Park, S.C. (2006). Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju island. **Journal of Veterinary Science**, 7:53–58.

Brock, J.A. and Main, K.L. (1994). **A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei***. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society.

Dalsgaard, A., Huss, H.H., H-Kittikun, A. and Larsen, J.L. (1995). Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, 28(1): 101–113.

Iyer, T.S.G. and Varma, P.R.G. (1990). Sources of contamination with *Salmonella* during processing of frozen shrimp. **Fishery Technology**, 27: 60–63.

Reilly, P.J.A. and Twiddy, D. R. (1992). *Salmonella* and *Vibrio cholerae* in brackishwater cultured tropical

prawns. **International Journal of Food Microbiology**, 16(4): 293–301.

Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P. and Ansquer, D. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, 191:133–144.

Suwansonthichai, S. and Rengpipat, S. (2003). Enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in frozen black tiger shrimp *Penaeus monodon* by conventional and rapid methods. **International Journal of Food Microbiology**, 81: 113–121.

Varnam, A.H. and Evans, M.G. (1991). **Food Borne Pathogens**. London, UK: Wolfe Publishing.