

บทความวิจัย

การตรวจหาการปนเปื้อน *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดที่จำหน่ายในกรุงเทพและ
การศึกษาการต้านทานความร้อน

Detection of the Contamination of *Vibrio parahaemolyticus* from Raw Seafood Sold in Some
Bangkok Freshfood Market and Thermal Inactivation Study

สุรีย์ นานาสมบัติ^{1*}, นวรัตน์ โพธิราช², ประทุม แสนมา², วรธนนท์ หาเพิ่มพูน² และสิทธิโชค ศิริสรชัย²
Suree Nanasombat^{1*}, Nawarat Potiraj², Pratoom Sanma², Watthanon Hapermpool² and Sittichok Sirisorchai²

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินการปนเปื้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด 50 ตัวอย่าง (กุ้ง ปลา ปลาหมึก หอยนางรม และหอยแมลงภู่) ที่จำหน่ายในตลาดในกรุงเทพ ปริมาณเชื้อนี้ที่พบ (ร้อยละ 80 ของตัวอย่างทั้งหมด) อยู่ในช่วง 24 ถึงมากกว่า 11,000 MPN ต่อกรัม จึงได้แยกเชื้อและจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี การศึกษาผลของการใช้ความร้อนในการทำลาย *V. parahaemolyticus* 3 ไอโซเลตคือไอโซเลต SH1 ที่แยกได้จากกุ้งสด ไอโซเลต GS1 ที่แยกได้จากปลาสดและไอโซเลต MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึกสด โดยหาค่า Decimal reduction time (D value) ที่อุณหภูมิ 55, 75 และ 95 องศาเซลเซียสในกุ้ง ปลาและปลาหมึกตามลำดับพบว่าค่า D ในอาหารทะเลแต่ละชนิดลดลงตามอุณหภูมิของการให้ความร้อนที่เพิ่มขึ้น โดยค่า $D_{55^{\circ}\text{C}}$, $D_{75^{\circ}\text{C}}$ และ $D_{95^{\circ}\text{C}}$ ของเชื้อแต่ละไอโซเลตเท่ากับ 125.02–16.48 วินาทีในกุ้ง 111.76–16.52 วินาทีในปลา และ 107.32–16.13 วินาทีในปลาหมึก

คำสำคัญ: *Vibrio parahaemolyticus* อาหารทะเล การทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน ค่า D

¹รศ.ดร., สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

² นักศึกษา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

*Corresponding author: e-mail: knsuree@kmitl.ac.th

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

Abstract

This study aimed at evaluating the contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in 50 raw seafood samples (shrimps, fish, squids, oysters and mussels) sold in some markets in Bangkok. The number of *V. parahaemolyticus* found in these seafoods (80% of total samples) were in the range of 24 to more than 11,000 MPN/g. They were isolated and identified by morphological and biochemical methods. Then, thermal inactivation of three *V. parahaemolyticus* isolates (isolate SH1 isolated from shrimp, isolate GS1 isolated from fish and isolate MS2 isolated from squid) was studied by determining the decimal reduction times (*D* value) at 55°C, 75°C, and 95°C of each isolates in raw shrimp, fish and squid, respectively. *D* value of this bacterium in each type of seafoods decreased as heating temperature increased. The $D_{55^{\circ}\text{C}}$, $D_{75^{\circ}\text{C}}$ and $D_{95^{\circ}\text{C}}$ of each isolate were 125.02–16.48 sec (in shrimp), 111.76–16.52 sec (in fish), and 107.32–16.13 sec (in squid).

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, seafood, heat inactivation, *D* value

บทนำ

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีแฟลกเจลลาเพียงเส้นเดียวอยู่ที่ขั้วเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 25-44 องศาเซลเซียส ชอบเจริญในที่ที่มีความเค็ม ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เจริญได้คือร้อยละ 1-8 แบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่บริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งทะเล ดังนั้นจึงพบได้บ่อยในน้ำในมหาสมุทรและน้ำแถบชายฝั่งทะเล อาหารทะเลและสิ่งแวดล้อมในทะเลอื่นๆ การพบเชื้อชนิดนี้เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของน้ำโดยจะตรวจไม่พบเชื้อชนิดนี้จนกว่าอุณหภูมิของน้ำทะเลสูงขึ้นถึงประมาณ 19-20 องศาเซลเซียส [1]

เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคอาหารทะเลสดหรือผ่านการปรุงอย่างไม่เหมาะสม การเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1951 ขณะนั้นการเกิดโรคนี้พบน้อยในประเทศสหรัฐอเมริกาและยุโรป แต่พบมากในประเทศแถบทวีปเอเชียซึ่งประชาชนบริโภคอาหารทะเลกันบ่อยครั้งในชีวิตประจำวัน อาหารที่เคยพบว่าเป็นพาหะของเชื้อซึ่งทำให้เกิดโรคระบาดคือ ปลาซาร์ดีนกึ่งแห้ง สลัดปู ปูนึ่ง หอยนางรมดิบ ระยะเวลาของเชื้อมีอยู่ในช่วง 3-76 ชั่วโมง เฉลี่ย 16.7 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการของโรคเป็นเวลา 1-8 วัน เฉลี่ย 4.6 วัน โดยจะมีอาการท้องเสีย เป็นตะคริวที่ท้อง อ่อนเพลีย คลื่นไส้ หนาว ปวดหัวและอาเจียน [2] เชื้อ *V. parahaemolyticus* เคยแยกได้จากอาหารทะเลหลายชนิดเช่น ปลาคอด ปลาซาร์ดีน ปลาแมคคาเรล ปลาตาเดียว หอยนางรม หอยเชลล์ ปลาหมึก กุ้ง และปู [3]

การใช้ความร้อนในการทำลายจุลินทรีย์เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมและสะดวกที่สุด ความร้อนมีผลต่อการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์โดยความร้อนมีผลทำให้โปรตีนภายในเซลล์ของ

จุลินทรีย์เสียสภาพหรือตกตะกอน ทำให้ดีเอ็นเอแตกสลายและมีผลทำให้ชั้นเปปติโดไกลแคนขาดความแข็งแรง ซึ่งอาจจะเพียงพอที่จะป้องกันการเพิ่มจำนวนเซลล์ คราบไคที่เซลล์ของจุลินทรีย์ยังได้รับความร้อนอยู่ องค์ประกอบภายในเซลล์อาจหลุดออกมาและจุลินทรีย์จะถูกทำลายในที่สุด [4] จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านทานความร้อนที่ต่างกัน การหาค่า decimal reduction time (*D* value) ใช้ในศึกษาการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ ค่า *D* เป็นระยะเวลาในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งที่อุณหภูมิเฉพาะระดับหนึ่งให้ลดลงร้อยละ 90 หรือ 1 log cycle ซึ่งถ้าหาค่า *D* สูง แสดงว่าต้องใช้เวลาในการทำลายจุลินทรีย์นานขึ้น การให้ความร้อนอย่างเพียงพอในการประกอบอาหารจะทำให้ปลอดภัยจากการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *V. parahaemolyticus* ได้ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดและศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยความร้อน โดยการหาค่า *D* ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล เพื่อให้ทราบถึงอุณหภูมิและระยะเวลาที่จะสามารถทำลาย *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลได้

วิธีการวิจัย

การวิเคราะห์หาจำนวน *Vibrio parahaemolyticus*

นำตัวอย่างอาหารทะเลสดได้แก่ กุ้ง (*Penaeus merguensis*) ปลา (*Lates calcarifer*) ปลาหมึก (*Loligo formosana*) หอยนางรม (*Saccostrea cucullata*) และหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่างที่ซื้อจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานครระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน พ.ศ. 2552 มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี Most Probable Number [5] ดังนี้ นำอาหารทะเลแต่ละตัวอย่างมาตีปั่น ทำให้เป็นเนื้อเดียวกับ phosphate-buffered saline ถ้าย่อยตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจางไปยัง alkaline peptone water (3 หลอดต่อ 1 ระดับความเจือจาง) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อจากหลอดอาหารที่ขุนลากลงบนอาหาร Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) agar คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะที่น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* คือมีลักษณะกลม สีเขียวหรือน้ำเงินเขียวทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร นำมาแยกให้บริสุทธิ์บนอาหาร TCBS แล้วถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหาร Tryptic soy agar (TSA; pH 7.3 ± 0.2, Difco Laboratories) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ ร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10 การเจริญในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) Agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 การเจริญในอาหาร Lysine Indole Motility (LIM) Medium ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส การสร้างเอนไซม์อะเลสและสร้างเอนไซม์ยูรีเอส รวมทั้งการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E (บริษัท bioMérieux ประเทศฝรั่งเศส) และแปลผลการทดสอบที่ได้โดยใช้โปรแกรมการจำแนกชนิด (APIWEB STAND ALONE V 1.1.0 ของบริษัท bioMérieux) ทำให้ได้ทราบสปีชีส์ของเชื้อที่ทดสอบ

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

parahaemolyticus โดยวิธี Most Probable Number [5] ดังนี้ นำอาหารทะเลแต่ละตัวอย่างมาตีปน ทำให้เป็นเนื้อเดียวกับ phosphate-buffered saline ถ่ายตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจางไปยัง alkaline peptone water (3 หลอดต่อ 1 ระดับความเจือจาง) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เช็ยเชื้อจากหลอดอาหารที่ขุ่นลากลงบนอาหาร Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) agar คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะที่น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* คือมีลักษณะกลม สีเขียวหรือน้ำเงินเขียวทึบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร นำมาแยกให้บริสุทธิ์บนอาหาร TCBS แล้วถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหาร Tryptic soy agar (TSA; pH 7.3 ± 0.2 , Difco Laboratories) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ ร้อยละ 0, 3, 6, 8 และ 10 การเจริญในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) Agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 การเจริญในอาหาร Lysine Indole Motility (LIM) Medium ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส การสร้างเอนไซม์อะคะเตเลสและการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส รวมทั้งการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E (บริษัท bioMérieux ประเทศฝรั่งเศส) และแปลผลการทดสอบที่ได้โดยใช้โปรแกรมการจำแนกชนิด (APIWEB STAND ALONE V 1.1.0 ของบริษัท bioMérieux) ทำให้ได้ทราบสปีชีส์ของเชื้อที่ทดสอบ

การศึกษาการทำลาย *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยความร้อน

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย ทำได้โดยเช็ยเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 3 ไอโซเลตที่แยกได้จากกุ้ง ปลา และปลาหมึกลงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB; pH 7.3 ± 0.2 , Difco Laboratories) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไปแล้วล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเปปโตเนอความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ทำให้เป็นสารแขวนลอยเซลล์ ปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 3 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^{10} CFUต่อมิลลิลิตร

การหาค่า Decimal reduction time (*D* value) การศึกษานี้ได้ทำการหาค่า *D* ของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากกุ้ง ปลา และปลาหมึกที่อุณหภูมิ 55, 75 และ 95 องศาเซลเซียสในกุ้ง ปลา และปลาหมึกบดสดตามลำดับ โดยในการหาค่า *D* ที่แต่ละระดับอุณหภูมิในอาหารทะเลแต่ละชนิดทำตามวิธีการของ Gabriel and Ubana [6] ซึ่งทำได้โดย นำอาหารทะเลบดแต่ละชนิดมาชั่งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่ปลอดเชื้อจำนวน 7 หลอด ปริมาณ 11 กรัมต่อหลอด เติมสารแขวนลอยเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมไว้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหารทะเลบดแต่ละหลอดเพื่อให้มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อกรัม ส่วนอาหารทะเลอีก 1 หลอดใช้เป็นหลอดควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งจะไม่ได้เติมเชื้อ จากนั้นนำหลอดอาหารทะเลทั้งหมดไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่แต่ละระดับอุณหภูมิที่ต้องการหาค่า *D* (55, 75 และ 95 องศาเซลเซียส) ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่แต่ละระดับอุณหภูมิ วัดอุณหภูมิที่กึ่งกลางของอาหารในหลอดควบคุมอุณหภูมิด้วย Thermocouple type T (testo 926) เมื่ออุณหภูมิที่กึ่งกลางอาหารถึงระดับอุณหภูมิที่ต้องการแล้วก็จะเริ่มจับเวลาการให้ความร้อน (0-150 วินาที) เมื่อครบ

ทุกๆ 30 วินาที ดึงหลอดอาหารทะเลออกมาจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ละลายจนครบ 150 วินาที จากนั้นนำหลอดอาหารทะเลแต่ละชนิดที่ผ่านการให้ความร้อนในแต่ละระดับอุณหภูมิ ที่เวลาต่าง ๆ กัน ไปวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ของ *V. parahaemolyticus* ที่รอดชีวิต โดยใช้เทคนิค spread plate บนอาหาร TSA ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU ต่อกรัม) ที่แต่ละช่วงเวลาของการให้ความร้อน แล้วนำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log CFU ต่อมิลลิกรัม) กับระยะเวลาการให้ความร้อน แล้วหาสมการเส้นตรงเพื่อนำมาคำนวณค่า D โดยค่า D เท่ากับ $-1/\text{slope}$

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

การแยกเชื้อและจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* จากอาหารทะเลสด

ในการวิเคราะห์หาจำนวน *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดได้แก่ กุ้ง ปลา ปลาหมึก หอยนางรม และหอยแมลงภู่โดยวิธี MPN ปรากฏว่าพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปริมาณค่อนข้างมากในอาหารทะเลทุกชนิดที่วิเคราะห์ ปริมาณ 24 ถึงมากกว่า 11,000 MPN ต่อกรัม (ตารางที่ 1) โดยตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลจำนวน 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) จากจำนวนทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ในปลา หอยนางรม และหอยแมลงภู่มีแบคทีเรียชนิดนี้ปนเปื้อนมากที่สุดคือพบชนิดละ 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 90) รองลงมาคือ ปลาหมึกพบ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) และกุ้งพบน้อยที่สุดคือ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50) จากนั้นจึงได้แยกเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลทุกชนิด ได้เชื้อทั้งหมด 14 ไอโซเลต แยกได้จากปลาและหอยแมลงภู่มากที่สุดคืออย่างละ 4 ไอโซเลตและเป็นเชื้อจากหอยนางรม ปลาหมึกและกุ้งจำนวน 3, 2 และ 1 ไอโซเลตตามลำดับ เพื่อนำมาจำแนกชนิดในขั้นต่อไป

ตารางที่ 1 จำนวน *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด

ชนิดของ อาหารทะเล	จำนวน ตัวอย่างที่ วิเคราะห์	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>		จำนวนเชื้อ <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> (MPN ต่อกรัม)	จำนวนไอโซเลต ของเชื้อ <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> ที่แยก ได้ (ไอโซเลต)
		ตัวอย่าง	ร้อยละ		
กุ้ง	10	5	50	24 - >11,000	1
ปลา	10	9	90	11,000 - >11,000	4
ปลาหมึก	10	8	80	750 - >11,000	2
หอยนางรม	10	9	90	24 - >11,000	3
หอยแมลงภู่	10	9	90	>11,000	4
รวม	10	40	80	24 - >11,000	14

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

แบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลตได้แก่ ไอโซเลต SH1, GS1, BS1, SP1, SP2, MS1, MS2, OY1, OY2, OY3, GM1, GM2, GM3 และ GM4 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3, 6 และ 8 แต่ไม่เจริญในสภาพที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์และสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 สร้างอินโดลได้ สร้างเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส เอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์อะซิเดสได้ แต่ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส ไม่หมักแลคโตส และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ผลที่ได้ทั้งหมดตรงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus* [5,7] ผลการทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบ API 20E ของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 14 ไอโซเลต พบว่า เชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลตเป็น *V. parahaemolyticus* (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลสดโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E

การทดสอบทางชีวเคมี	รหัสไอโซเลตของเชื้อที่นำมาทดสอบ													
	SH1	GS1	BS1	SP1	SP2	MS1	MS2	OY1	OY2	OY3	GM1	GM2	GM3	GM4
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer test	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Indole production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
ความคล้ายคลึงกับ <i>V. parahaemolyticus</i> (%)	99.9	99.8	98.8	99.8	99.8	92.8	99.8	99.8	92.8	99.8	86.6	98.4	99.8	99.6

คุณสมบัติทางชีวเคมีของไอโซเลต SH1 คล้ายคลึงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus* สูงสุดคือร้อยละ 99.9 ส่วนไอโซเลตที่มีความคล้ายคลึงกับ *V. parahaemolyticus* รองลงมา (ร้อยละ 99.8) ได้แก่ ไอโซเลต GS1 ที่แยกได้จากปลากระพงขาว ไอโซเลต SP1 และ SP2 ที่แยกได้จากปลาจาระเม็ด ไอโซเลต MS2 ที่แยกได้จากปลาหมึกกล้วย ไอโซเลต OY1 และ OY3 ที่แยกได้จากหอยนางรมและไอโซเลต GM3 ที่แยกได้จากหอยแมลงภู่

การต้านทานความร้อนของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล

ค่า *D* ของ *V. parahaemolyticus* ลดลงตามอุณหภูมิของการให้ความร้อนที่เพิ่มขึ้นโดยค่า $D_{55^{\circ}\text{C}}$ ของ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์ในกุ้ง ปลา และปลาหมึกบดสูงกว่าค่า *D* ที่อุณหภูมิ 75 และ 95 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3) ค่า $D_{55^{\circ}\text{C}}$, $D_{75^{\circ}\text{C}}$ และ $D_{95^{\circ}\text{C}}$ ของ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์ (SH1, GS1 และ MS2) ในกุ้ง ปลา และปลาหมึกมีค่าใกล้เคียงกันโดยมีค่า 107.32-125.02, 25.19-27.47 และ 16.13-16.52 วินาที ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่า Decimal reduction time (*D* value) ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55, 75 และ 95 องศาเซลเซียสในอาหารทะเลสด

ชนิดของอาหาร ทะเล	<i>D</i> value ^a (วินาที) ของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหารทะเลสด ^b ± SD		
	$D_{55^{\circ}\text{C}}$	$D_{75^{\circ}\text{C}}$	$D_{95^{\circ}\text{C}}$
กุ้ง	125.02 ± 4.52	26.22 ± 0.48	16.48 ± 0.07
ปลา	111.76 ± 6.34	25.19 ± 0.49	16.52 ± 0.38
ปลาหมึก	107.32 ± 5.47	27.47 ± 0.35	16.13 ± 0.18

^aค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

^bค่า *D* ของ *V. parahaemolyticus* SH1 ในกุ้งสด; *V. parahaemolyticus* GS1 ในปลาสด; *V. parahaemolyticus* MS2 ในปลาหมึกสด

การที่พบว่าในอาหารทะเลสดมี *V. parahaemolyticus* ปนเปื้อนในปริมาณสูง สอดคล้องกับผลการทดลองของ Jakšić *et al.* [8] ซึ่งได้พบเชื้อชนิดนี้ในปลา กุ้ง และหอยที่เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม ปี ค.ศ. 2000 จากตลาดปลาและโรงแรมแถบชายฝั่ง ประเทศโครเอเชียคิดเป็นร้อยละ 9.40 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจสอบ นอกจากนี้ Lhafi and Kühne [9] ได้พบเชื้อ *Vibrio* spp. คิดเป็นร้อยละ 74.4 ของจำนวนตัวอย่างหอยแมลงภู่ทั้งหมด 90 ตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณที่เลี้ยงหอยแมลงภู่ 7 แห่งในทะเล German Wadden ประเทศเยอรมนีระหว่างเดือนมิถุนายน ปี ค.ศ. 2004 ถึง พฤษภาคม ปี ค.ศ. 2005 ในจำนวนนี้พบเชื้อ *Vibrio alginolyticus* มากที่สุด (ร้อยละ 74.4) รองลงมาเป็น *V. parahaemolyticus* (ร้อยละ 39.5) และ *Vibrio vulnificus* (ร้อยละ 3.5) เช่นเดียวกับการรายงานของ Kirs *et al.* [10] ซึ่งได้ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม (Pacific oyster) ที่เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 2008 ถึง เมษายน ปี ค.ศ. 2009 ในบริเวณที่เลี้ยงหอยนางรมที่เกาะเหนือ ประเทศนิวซีแลนด์ คิดเป็นร้อยละ 94.8 ของตัวอย่างหอยนางรมทั้งหมด 58 ตัวอย่าง ซึ่งพบในปริมาณเฉลี่ย 99.3 MPN ต่อกรัม

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

การที่ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ปริมาณสูงในอาหารทะเลสดเนื่องจากเชื้อมีถิ่นอาศัยอยู่แถบชายฝั่งทะเลในเขตร้อน โดยจะอยู่ในแพลงตอนเมื่อสัตว์ทะเลกินแพลงตอนเข้าไปจึงทำให้เชื้อเข้าสู่สัตว์ชนิดนั้นด้วย เชื้อนี้ยังอาจจะปะปนออกมากับสิ่งขับถ่ายของแพลงตอนทำให้แพร่กระจายอยู่ในน้ำทะเล [11] ซึ่งเป็นไปได้ที่เชื้อจะปนเปื้อนในอาหารทะเลได้ เนื่องจากอาหารทะเลมีกรดต่ำ จึงเป็นสาเหตุให้ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเจริญได้ที่ช่วงพีเอช 4.8-11.0 เจริญเติบโตในอาหารทะเลอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจพบเชืชนิดนี้จะเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของน้ำทะเล โดยทั่วไปจะตรวจไม่พบเชืชนิดนี้ที่อุณหภูมิของน้ำทะเลจะสูงขึ้นถึงประมาณ 19-20 องศาเซลเซียส Cheng *et al.* [12] รายงานว่าจะไม่พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส

การที่พบ *V. parahaemolyticus* จำนวนมากในอาหารทะเล ผู้บริโภคจึงมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากการบริโภคอาหารทะเล การติดเชื้อจะเกิดขึ้นเมื่อได้รับเชื้อมากกว่า 10^6 เซลล์ [13] และเนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้เร็วมาก ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าสั้นมากเพียง 8-9 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายก็จะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้และก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร กลไกการเกิดโรคจาก *V. parahaemolyticus* คาดว่าเกิดจาก hemolysin 2 ชนิดคือ Thermostable direct hemolysin (Tdh) และ Tdh-related hemolysin (Trh) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรค การติดเชื้อจะเกิดมากในช่วงฤดูร้อน จากรายงานการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในประเทศไต้หวันและญี่ปุ่นพบว่าเกิดมากในช่วงฤดูร้อนและแหล่งสำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อคือ อาหารทะเลดิบ อาหารที่ปนเปื้อนอีกครั้งหลังผ่านความร้อนและอาหารทะเลที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ [14] ดังนั้นการรับประทานอาหารทะเลสดหรืออาหารทะเลที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอจึงมีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* เข้าไปในร่างกาย ในประเทศญี่ปุ่นพบว่าร้อยละ 50 ถึง 70 ของการเกิดโรคทางเดินอาหารมีสาเหตุมาจากการบริโภคอาหารทะเลดิบหรืออาหารที่ผ่านความร้อนอย่างไม่เพียงพอที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปนเปื้อนอยู่ [15] จากผลการหาค่า D ของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด พบว่าค่า D โดยเฉพาะ $D_{75^{\circ}\text{C}}$ และ $D_{95^{\circ}\text{C}}$ ของ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์ (SH1, GS1 และ MS2) มีค่าค่อนข้างต่ำใช้เวลาไม่ถึง 30 วินาทีก็สามารถทำให้จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงร้อยละ 90 ของจำนวนเซลล์เริ่มต้นซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้ค่อนข้างไวต่อความร้อน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Jay *et al.* [1] ที่ได้กล่าวว่า เซลล์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์หนึ่งจำนวน 500 เซลล์ต่อมิลลิกรัมในกึ่งบด ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายในเวลาเพียง 1 นาที ดังนั้นการให้ความร้อนอย่างเพียงพอในการทำให้อาหารทะเลสุกจะช่วยลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus*

ในการทดลองนี้ ค่า D ของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงมีค่าต่ำกว่า ค่า D ของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำ นั่นคือ เมื่อให้ความร้อนสูงขึ้นทำให้ใช้เวลาในการทำลายจุลินทรีย์สั้นลง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความร้อนทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน ทำให้ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอและเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเสียหาย และมีผลทำให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในของเซลล์ของแบคทีเรีย [4,16] ค่า D สามารถบ่งบอกถึงการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ ปัจจัยดังกล่าวได้แก่ ปริมาณน้ำ ไขมัน เกลือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน จำนวนจุลินทรีย์ อายุของเซลล์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ สารยับยั้งการเจริญ เวลาและ

อุณหภูมิ ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชลล์จุลินทรีย์ และการเจริญในอาหารชักนำการสร้างสปอร์ [1,4] ในอาหารที่มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตสูงจะช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ [1] ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีของอาหารทะเลแต่ละชนิดอาจมีผลต่อการต้านทานความร้อนของ *V. parahaemolyticus* โดยโมเลกุลของสารอาหารเหล่านั้นจะช่วยลดการถ่ายเทความร้อนภายในระบบ จึงช่วยให้การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ดีขึ้น [17]

สรุปผลการวิจัย

อาหารทะเลสดโดยเฉพาะ กุ้ง ปลา ปลาหมึก หอยนางรมและหอยแมลงภู่สด มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปนเปื้อนในปริมาณสูงถึงมากกว่า 11,000 MPN ต่อกรัม ดังนั้นจึงไม่ควรรับประทานอาหารทะเลดิบหรืออาหารทะเลที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ ในการทำให้สุกควรคำนึงถึงอุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อน ควรให้ความร้อนเป็นเวลานานพอที่ทำลายเชื้อชนิดนี้ นอกจากนี้ควรระมัดระวังการปนเปื้อนอีกครั้งหลังผ่านความร้อน

เอกสารอ้างอิง

- [1] Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005). **Modern Food Microbiology**. 7 th edition. New York: Springer Science+Business Media. Inc, USA.
- [2] Oliver, J. D. and Kaper, J. B. (2001). *Vibrio* Species. In Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. (Eds.) **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2nd edition (pp. 263-300). Washington, DC: ASM Press.
- [3] Liston, J. (1990). Microbial hazard of seafood consumption. **Food Technology**. **44** (12), 56-62.
- [4] Banwart, G.J. (1989). **Basic Food Microbiology**. 2 nd edition. New York: Van Nostrand Reinhold.
- [5] Kaysner, C. A. and DePaola, Jr, A. (2004). *Vibrio*. In **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. Retrieved: 16 July 2009 from: [www.fda.gov/Food/ ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManual BAM/ucm070830.htm](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm)
- [6] Gabriel, A.A. and Ubana, M.A. (2007). Decimal reduction times of *Salmonella* Typhimurium in *guinataang kuhol*: An indigenous Filipino dish. **LWT-Food Science and Technology**. **40** (6), 1108-1111.
- [7] Colakoglu, F. A., Samasik, A. and Koseoglu, B. (2006). Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. **Food Control**. **17** (8), 648-652.
- [8] Jakšić, S., Uhitil, S., Petrak, T., Bažulić and Karolyi, L.G. (2002). Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve mollusks harvested from Adriatic sea. **Food Control**. **13** (8), 491-493.

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

- [9] Lhafi, S.K. and Kühne, M. (2007). Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. **International Journal of Food Microbiology**. **116** (2), 297 – 300.
- [10] Kirs, M., DePaola, A., Fyfe, R., Jones, J.L., Krantz, J., Van Laanen, A., Cotton, D. and Castle, M. (2011). A survey of oysters (*Crassostrea gigas*) in New Zealand for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **International Journal of Food Microbiology**. **147** (2), 149-153.
- [11] Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P. and Ramamurthy, T. (2000). Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarilly primed PCR and *toxRS* sequence analyses. **Journal of Clinical Microbiology**. **38**, 578-585.
- [12] Cheng, W., Hsiao, I-S., Hsu, C.-H. and Chen, J.-C. (2004). Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**. **17** (3), 235-243.
- [13] DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J. and Cook, D.W. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). **Applied and Environmental Microbiology**. **66** (11), 4649-4654.
- [14] Daniels, N.S. and Shafaie, A. (2000). A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. **Infections in Medicine**. **17** (10), 665-685.
- [15] Montville, T. J. and Matthews, K. (2005). **Food Microbiology: an Introduction**. Washington, DC: ASM Press.
- [16] Russell, A.D. and Harries, D. (1967). Some aspects of thermal injury in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. **15** (2), 407-410.
- [17] Gabriel, A. A. and Azanna, M.P.V. (2004). Heat resistance of *Acanthamoeba* sp. cysts in green mussel broth and phosphate-buffered saline. **Food Science and Technology Research**. **10** (3), 320-323.