รายงานวิจัย

การตรวจแยกแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ

Identification of *Vibrio parahaemolyticus* in *Anadara granosa* at Pattani Bay by use monoclonal antibodies specific to *Vibrio* spp.

โดย

วารุณี หะยีมะสาและ

สายใจ แก้วอ่อน

นิสาพร มูหะมัด

ลักขณา รักขพันธ์

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปีการศึกษา 2559

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

หัวข้อวิจัย การตรวจแยกแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ

ชื่อผู้วิจัย วารุณี หะยีมะสาและ สายใจ แก้วอ่อน นิสาพร มูหะมัด ลักขณา รักขพันธ์

คณะ/หน่วยงาน วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร

มหาวิทยาลัย ราชภัฏยะลา

ปีงบประมาณ 2559

บทคัดย่อ

Vibrio parahaemolyticus หรือ วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส เป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) และสามารถพบได้ในอาหารทะเล การตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแครง (*Anadara granosa*) ในอ่าวปัตตานี จำนวน 160 ตัว ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม 2559 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนตีบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* และโมโนโคลนอลแอนตีบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Vibrio spp. ชนิดต่างๆ และทำการทดสอบด้วยวิธี dot blotting พบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงในเดือนมิถุนายน มีปริมาณเชื้อประมาณ $4x10^3$ CFU ml^{-1} ซึ่งเกินเกณฑ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นอกจากนี้ตรวจพบการปนเปื้อน *V. vulnificus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด หรือพบการติดเชื้อที่บาดแผลในมนุษย์ และ *V. harveyi* ที่เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ จากการตรวจพบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงจากอ่าวปัตตานี สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษได้

Research Title	Identification of *Vibrio parahaemolyticus* in *Anadara granosa* at Pattani Bay by use monoclonalantibodies specific to *Vibrio* spp.
Researcher	Warunee Hajimasalaeh Saijai Kaew-on Nisaporn Muhamad Lakkana Rakkaphan
Faculty/Section	Science Technology and Agriculture
University	Yala Rajabhat
Year	2016

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus, the bacterium is a seafood-borne pathogen that causes food poison in human. The investigation of *V. parahaemolyticus contamination* of in cockle (*Anadara granosa*) at Pattani Bay, Pattani province during May to August, 2016 was determined. Using monoclonal antibody (MAbs) specific to *V. parahaemolyticus* and MAbs specific to Vibrio spp. were used and detected by dot blotting. In June, *V. parahaemolyticus* was found in cockle and it was yielded $4x10^{3}$ CFU ml^{-1} and it exceeded the standard of the department of Medical Sciences Thailand. Moreover, the result revealed that contamination of pathogenic *V. vulificus*, a cause of septicemia and wound infection and *V. harveyi*, a cause of vibriosis in aquatic animal, was also found. Eventually, this study attempts to highlights on the carefulness and paying attention on epidemic of food poisoning.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในการอนุเคราะห์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ และเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็น positive control และให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำในระหว่างการดำเนินการทดลอง นอกจากนี้ขอขอบคุณคณาจารย์ในหลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ในการให้คำแนะนำเกี่ยวกับเครื่องมือในห้องปฏิบัติการตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องในรายงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาชายแดนภาคใต้ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ที่สนับสนุนเงินวิจัย

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ลักษณะทั่วไปของหอยแครง	3
สภาพพื้นที่ของอ่าวปัตตานี	5
ชีววิทยาของ *Vibrio parahaemolyticus*	6
ลักษณะทั่วไป	6
การก่อโรค	7
การกระจายของ *V. parahaemolyticus* ในประเทศไทย	8
การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกัน	9
โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)	9
เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	11
กลุ่มตัวอย่าง	11
แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย	11
โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการวิจัย	11
วิธีดำเนินการวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการวิจัย	14
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	19
บรรณานุกรม	22
ประวัติผู้วิจัย	26

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blotting	11
4.1	การตรวจสอบการปนเปื้อนในหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด และทดสอบด้วยวิธี dot blotting ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2559	14

YALA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะหอยแครง *(Anadara granosa)* (Linnaeus, 1758)	4
2.2	สภาพพื้นที่ของอ่าวปัตตานี	5
2.3	ลักษณะของ *V. parahaemolyticus* มีโพลาร์แฟลกเจลล่าที่ช่วยในการเคลื่อนที่	6
2.4	โคโลนีของ *V. parahaemolyticus* มีสีเขียวอมน้ำเงินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS agar)	7
2.5	กระบวนการในการทดสอบด้วยวิธี dot blotting	10
4.1	ผลการตรวจสอบการปนเปื้อน *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด และทดสอบด้วยวิธี dot blotting ในเดือนพฤษภาคม 2559 โดยกำหนดให้ หมายเลข 1-25 เป็นโคโลนีสีเขียวที่ต้องการทดสอบ ส่วนหมายเลข 26-30 เป็น Vibrio ที่ทราบชนิดใช้เป็น positive control ซึ่ง VP คือ *V. parahaemolyticus,* VA คือ *V. alginolyticus*, VC คือ *V. cholera*, VV คือ *V. vulnificus* และ VH คือ *V. harveyi* ตามลำดับ	16
4.2	ผลการตรวจสอบการปนเปื้อน *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด และทดสอบด้วยวิธี dot blotting ในเดือนมิถุนายน 2559 โดยกำหนดให้ ช่องหมายเลข 1-25 เป็นโคโลนีสีเขียวที่ต้องการทดสอบ ส่วนช่องหมายเลข 26-30 เป็น Vibrio ที่ทราบชนิดใช้เป็น positive control ซึ่ง VP คือ *V. parahaemolyticus,* VA คือ *V. alginolyticus*, VC คือ *V. cholera*, VV คือ *V. vulnificus* และ VH คือ *V. harveyi* ตามลำดับ	17
4.3	ผลการตรวจสอบการปนเปื้อน *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด และทดสอบด้วยวิธี dot blotting ในเดือนสิงหาคม 2559 โดยกำหนดให้ ช่องหมายเลข 1-25 เป็นโคโลนีสีเขียวที่ต้องการทดสอบ ส่วนช่องหมายเลข 26-30 เป็น Vibrio ที่ทราบชนิดใช้เป็น positive control ซึ่ง VP คือ *V. parahaemolyticus,* VA คือ *V. alginolyticus*, VC คือ *V. cholera*, VV คือ *V. vulnificus* และ VH คือ *V. harveyi* ตามลำดับ	18

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันคนไทยนิยมรับประทานอาหารทะเล โดยเฉพาะหอยแครง เนื่องจากมีรสชาติดีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งอุดมไปด้วยโปรตีน ธาตุเหล็กและฟอสฟอรัส สามารถรับประทานได้หลายรูปแบบ เช่น ลวก ยำ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการรับประทานหอยแครง นิยมบริโภคแบบสุกๆ ดิบๆ ทำให้เกิดภาวะอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากเชื้อโรคที่ปนเปื้อนในหอยแครงที่รับประทานเข้าไป จากข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า การบริโภคหอยที่ปรุงไม่สุก หรือผ่านกระบวนการปรุงที่ไม่สะอาด มีความเสี่ยงก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษสูงและเกิดได้ตลอดทั้งปี ซึ่งเชื้อที่พบในหอยแครงส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียในสกุล Vibrio ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคในทางเดินอาหารของมนุษย์ เช่น โรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โรคอหิวาต์ (cholera) และเกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) ซึ่งอาจมีอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ (Angela *et al*., 2005) โดยเฉพาะแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียหลักที่ก่อโรคลำไส้อักเสบแบบเฉียบพลัน (gastroenteritis) ในคน ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารทะเล และสามารถแยกได้จากอาหารทะเล โดยเฉพาะหอย (Cheng and Chengchu, 2007; Twedt, 1989)

สำหรับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15-42 องศาเซลเซียส สามารถอาศัยใน pH ในช่วง 4.4-11 แพร่กระจายอยู่บริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งทะเล พบบ่อยในมหาสมุทร แถบชายฝั่งทะเล อาหารทะเลและสิ่งแวดล้อมในทะเล เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS agar) จะให้โคโลนีสีเขียวอมน้ำเงินเนื่องจากไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ และให้ผลออกซิเดสเป็นบวก โดยในช่วงปี ค.ศ. 1965-1974 มีรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ มีสาเหตุมาจากเชื้อนี้ คิดเป็นร้อยละ 24 ของการระบาดทั้งหมดที่เกิดจากแบคทีเรีย และจากรายงานการระบาดในปี ค.ศ. 1971 ในประเทศญี่ปุ่น มีสาเหตุมาจากการบริโภคปลาซาร์ดีนที่ต้มและตากแดดเพียงเล็กน้อย มีผู้ป่วย 272 คน ตาย 20 คน ส่วนการระบาดในสหรัฐฯ ที่เกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1971 มีสาเหตุมาจากปูนึ่งและสลัดปู มีผู้ป่วย 425 คน จากผู้เกี่ยวข้องประมาณ 745 คน ส่วนการระบาดในประเทศไทยที่สำคัญคือการระบาดของเชื้อในอาหารเรียกน้ำย่อยที่มีเนื้อปูเป็นส่วนประกอบ ซึ่งบริการบนเครื่องบินจากกรุงเทพฯไปลอนดอน เป็นเหตุให้ผู้โดยสารและลูกเรือ 9 คนต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล เป็นต้น (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550)

สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นการสำรวจการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี เนื่องจากอ่าวปัตตานีเป็นอ่าวที่มีการเลี้ยงหอยแครงเป็นจำนวนมาก รวมทั้งสภาพพื้นที่ของอ่าวปัตตานีที่เป็นหาดโคลนและมีน้ำกร่อยเหมาะแก่การเจริญของ *V. parahaemolyticus* ทำให้มีแนวโน้มสูงที่จะพบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ใน

หอยแครงได้ ดังนั้นจะทำการแยกเชื้อเพื่อจำแนกการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting ซึ่งผลจากการสำรวจการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านสุขอนามัย รวมทั้งเป็นแนวทางป้องกันและเฝ้าระวังการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารสำหรับผู้ที่บริโภครับประทานหอยแครงต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี
2. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ

ขอบเขตของการวิจัย

การตรวจแยกการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี โดยมีขอบเขตการวิจัย ดังนี้

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างหอยแครงในแหล่งเลี้ยงธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี
2. ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงในแหล่งเลี้ยงธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี ซึ่งทดสอบโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงปริมาณของ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในหอยแครงบริเวณแหล่งเลี้ยงธรรมชาติในอ่าวปัตตานี
2. สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแก่ประชาชนเพื่อทำให้เกิดความตระหนักในการบริโภคอาหารทะเลอย่างปลอดภัยและถูกสุขลักษณะ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปของหอยแครง

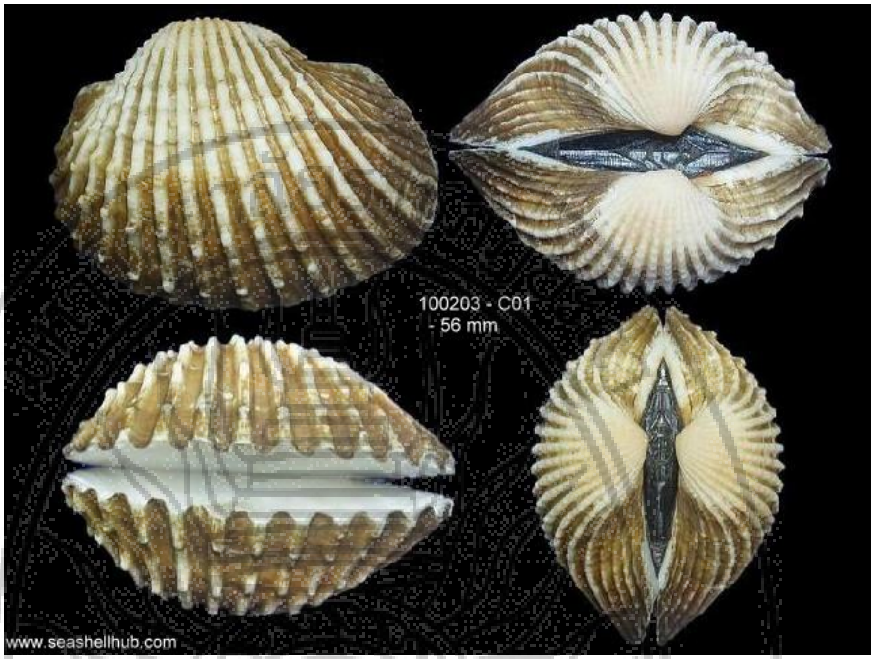
หอยแครง (*Anadara granosa*) เป็นอาหารทะเลที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย อีกทั้งเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าสูงทั้งทางเศรษฐกิจและโภชนาการ การเลี้ยงหอยแครงจะเป็นการรวบรวมพันธุ์หอยจากแหล่งลูกหอยในธรรมชาติเพื่อหว่านลงเลี้ยงในบริเวณที่เหมาะสม มีการกั้นคอกแสดงอาณาเขตที่เลี้ยงไว้ สำหรับในประเทศไทย พบว่ามีเลี้ยงครั้งแรกที่ ต.บางตะพูน อ.บ้านแหลม จ.เพชรบุรี ในเนื้อที่ 5-10 ไร่ ใช้เวลาเลี้ยง 1-2 ปี จึงเก็บเกี่ยวไปขายได้และต่อมาขยายการเลี้ยงไปในพื้นที่ใกล้เคียงและจังหวัดต่างๆ ทำให้ปัจจุบันมีการขยายพื้นที่เลี้ยงไปยังชายฝั่งที่มีสภาพที่เหมาะสมทั้งฝั่งอันดามันและอ่าวไทย (นิพนธ์ ศิริพันธ์, 2543)

หอยแครงเป็นหอย 2 ฝา มีขนาดและลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 ฝา ไม่มีแผงฟัน (radula) ในช่องปาก เหงือกมีขนาดใหญ่ไว้สำหรับหายใจและกรองอาหาร เป็นแบบ lamellibranch มีแมนเติลคลุมตัว ขอบของแมนเติลซ้ายและขวาไม่เชื่อมติดกัน หรืออาจเชื่อมเฉพาะจุด เปลือกมี 2 ฝา ฝาทั้งสองยึดติดกันด้วยบานพับ มีเพศผู้และเพศเมีย การผสมพันธุ์เป็นแบบภายนอกตัว และระยะที่เป็นตัวอ่อนเป็นแพลงก์ตอน จัดอยู่ในอนุกรมวิธานดังนี้ (Vaught, 1989)

Phylum Mollusca
Class Bivalvia
Subclass Pteriomorphia
Order Arcoida
Family Arcidae
Genus: Anadara
Species: *Anadara granosa*

หอยแครงมีเปลือกค่อนข้างหนา กลม มีสัน และร่องในแนวตั้งเห็นชัดเจน ทำให้ตามขอบเปลือกเป็นรอยหยักไปด้วย (ภาพที่ 2.1) เป็นหอยที่มักฝังตัวอยู่ตามหาดเลนหรือโคลนละเอียดในบริเวณชายฝั่ง ทะเลจนถึงแนวที่อยู่ห่างจากฝั่งออกไปประมาณ 2 กิโลเมตร หอยแครงชอบฝังตัวอยู่ตามผิวดินโคลนลึกตั้งแต่ 1-12 นิ้ว โดยจะสังเกตเห็นเป็นรูจำนวน 2 รูที่ผิวดินซึ่งเป็นช่องสำหรับทางน้ำเข้า-ออก และสามารถเห็นรอยการเคลื่อนที่ของหอยเป็นร่องๆ สำหรับการเคลื่อนที่จะอาศัยการพัดพาของน้ำทะเล และกล้ามเนื้อเท้าในการเคลื่อนที่เพื่อหาอาหาร ขุดดินฝังตัวเพื่อหลบหลีกศัตรูและเพื่อหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม หอยแครงจะขึ้นมาที่ผิวดินเมื่อน้ำขึ้นเพื่อหาอาหาร และจะฝังตัวใต้ผิวดินเมื่อน้ำลงเพื่อป้องกันน้ำออกภายนอกตัวหอย แต่จะเปิดฝาทั้งสองเล็กน้อย โดยจะยังมีสภาวะการไหลเวียนของน้ำและการหายใจเกิดขึ้นเป็นปกติภายในเปลือก ในเลือดมีสารฮีโมโกลบิล

(haemoglobin) ซึ่งเมื่อรวมกับอากาศจะเป็นสีแดง จึงได้ชื่อว่า blood clam (นิพนธ์ ศิริพันธ์, 2543; วงแข ยุติธรรม, 2547)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะหอยแครง *(Anadara granosa)* (Linnaeus, 1758)
ที่มา (http://www.seashellhub.com/Arcidae.html)

สภาพพื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของหอยแครง เป็นพื้นดินบริเวณหาดเลนละเอียดบริเวณปากแม่น้ำ หรือป่าชายเลน ซึ่งบริเวณดังกล่าวควรเป็นอ่าวที่กำบังคลื่นลมได้ดี ควรมีแม่น้ำลำคลองไหลลงสู่อ่าว เพื่อพัดพาธาตุอาหารที่เป็นอาหารของหอยแครงไปกองรวมกัน โดยหาดต้องเป็นหาดเลนหรือโคลนละเอียดไม่มีเม็ดทรายเจือปน ชั้นของเลนบริเวณหาดไม่ควรต่ำกว่า 0.5-1.0 เมตร และชั้นของเลนไม่ควรมีกลิ่นเหม็น และควรมีระยะเวลาน้ำลงไม่นานเกินกว่า 6 ชั่วโมง (วงแข ยุติธรรม, 2547)

ระบบการเลี้ยงหอยแครงในประเทศไทยอาจแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบคือ ระบบการเลี้ยงแบบดั้งเดิม และการเลี้ยงแบบพัฒนา ซึ่งการเลี้ยงแบบดั้งเดิมเป็นการทำฟาร์มขนาดเล็กในครอบครัว เนื้อที่ 5-30 ไร่ต่อครอบครัว โดยใช้ไม้ไผ่กั้นคอกล้อมแปลงเลี้ยง การเลี้ยงแบบดั้งเดิมนิยมเลี้ยงแถบอ่าวไทยตอนในโดยเฉพาะแถบชายฝั่ง จังหวัดเพชรบุรีและสมุทรสงคราม เป็นต้น ส่วนการเลี้ยงแบบพัฒนาเป็นการเลี้ยงหอยแครงแบบธุรกิจขนาดใหญ่ เนื้อที่ 200-1,000 ไร่/ราย มีการปักเขตเช่นเดียวกับแบบดั้งเดิม การเลี้ยงระบบนี้นิยมในจังหวัดชายฝั่งทะเลภาคใต้ทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน (นิพนธ์ ศิริพันธ์, 2543)

สภาพพื้นที่ของอ่าวปัตตานี

อ่าวปัตตานีตั้งอยู่ทางชายฝั่งอ่าวไทย ครอบคลุมพื้นที่ 3 อำเภอ ได้แก่ อำเภอหนองจิก อำเภอเมืองปัตตานี และอำเภอยะหริ่ง (ครองชัย หัตถา. 2541) (ภาพที่ 2.2) โดยมีเนื้อที่รวมประมาณ 74 ตารางกิโลเมตร สามารถแบ่งออกเป็นสองส่วน คืออ่าวปัตตานีตอนใน พื้นที่ประมาณ 54 ตารางกิโลเมตร อยู่ในเขตพื้นที่อำเภอยะหริ่งและอำเภอเมืองปัตตานี ส่วนอ่าวปัตตานีตอนนอก มีพื้นที่ประมาณ 20 ตารางกิโลเมตร อยู่ในเขตพื้นที่อำเภอเมืองและอำเภอหนองจิก น้ำในอ่าวปัตตานีมีลักษณะเป็นน้ำกร่อย เนื่องจากแม่น้ำปัตตานีและแม่น้ำยะหริ่งพัดพาตะกอนมาทับถมภายในอ่าว ทำให้อ่าวค่อนข้างตื้นเขินและบริเวณปากแม่น้ำมีน้ำค่อนข้างขุ่น ทำให้มีลักษณะเป็นหาดโคลนกว้างใหญ่ และบริเวณปากแม่น้ำยะหริ่งเป็นป่าชายเลนที่อุดมสมบูรณ์ และตะกอนจากปากแม่น้ำที่ทับถมบริเวณชายฝั่งทำให้เกิดระบบนิเวศหาดโคลน และระบบนิเวศชายเลนกระจายตลอดแนวชายฝั่งปัตตานี ส่งผลให้พื้นที่รอบอ่าวปัตตานีมีความอุดมสมบูรณ์เป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเช่น กุ้ง หอย ปลา และสาหร่ายชนิดต่างๆ ทำให้บริเวณโดยรอบอ่าวปัตตานีมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งส่วนใหญ่เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจ เช่น กุ้ง ปลากะพงหรือปลากะรัง หอยแครง และหอยแมลงภู่ (ฮัสสัน ดูมาลี, 2555; กันทิมา เหาะเจริญ และคณะ, 2540)

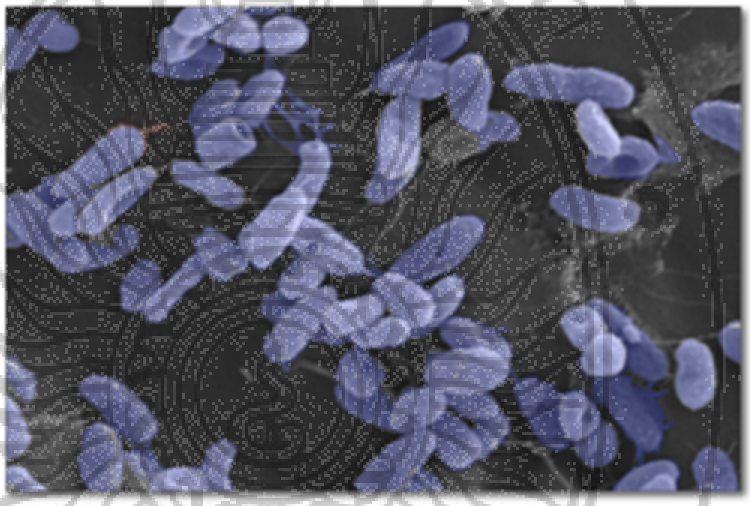
ภาพที่ 2.2 สภาพพื้นที่ของอ่าวปัตตานี

ที่มา (http://share.psu.ac.th/blog/sttoutreach/20441)

ชีววิทยาของ *Vibrio parahaemolyticus*

ลักษณะทั่วไป

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15-42 องศาเซลเซียส สามารถอาศัยอยู่ในค่า pH ตั้งแต่ 4.4-11 พบแพร่กระจายอยู่บริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งทะเล พบบ่อยในมหาสมุทร แถบชายฝั่งทะเล อาหารทะเลและสิ่งแวดล้อมในทะเล สามารถพบเชื้อนี้ในสภาวะว่ายน้ำได้อิสระ เนื่องจากมีโพลาร์แฟลกเจลล่าที่ช่วยในการเคลื่อนที่ และเกาะที่ผิวของแพลงก์ตอนสัตว์ ปลา หอย หรือพบในตะกอนใต้น้ำ (Gode-Potratz *et al*., 2011) (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของ *V. parahaemolyticus* มีโพลาร์แฟลกเจลล่าที่ช่วยในการเคลื่อนที่
ที่มา (https://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2013/germo_elij/interactions.htm)

เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS agar) จะให้โคโลนีสีเขียวอมน้ำเงินเนื่องจากไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ (ภาพที่ 2.4) และให้ผลออกซิเดสเป็นบวก *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน (acute gastroenteritis) ในคน (Newton *et al*., 2012; Zarei *et al*., 2012) ซึ่งเกิดจากการรับประทานทะเลที่ปรุงไม่ถูกสุขลักษณะ โดยมีรายงานการระบาดครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น เกิดจากการรับประทานปลาซิระสุ ซึ่งทำให้มีผู้ป่วย 272 ราย และมีผู้เสียชีวิต 20 ราย (Fujino *et al*., 1953) และพบเชื้อชนิดนี้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษในประเทศญี่ปุ่นและทำให้เกิดโรคในคนที่รับประทานอาหารทะเลในหลายประเทศของเอเชีย (Alam *et al*., 2002) ดังนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (กันยายน 2553) ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพทางจุล

ชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 โดยกำหนดว่า (1) อาหารดิบ (อาหารพร้อมปรุงและอาหารแช่เย็นและแช่แข็ง) (2) อาหารพร้อมบริโภค (อาหารทะเล) (3) อาหารปรุงสุกทั่วไป มีค่ามาตรฐานของ *V. parahaemolyticus* คือ ต้องไม่พบในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553)

ภาพที่ 2.4 โคโลนีของ *V. parahaemolyticus* มีสีเขียวอมน้ำเงินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar ที่มา (http://www.microbiologyinfo.com/thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose-tcbs-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/)

การก่อโรค

สำหรับการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* เกิดจากปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงหรือระดับความสามารถในการทำให้เกิดโรค (virulence factor) เช่น ยีน adhesins, thermo stable direct hemolysin (*tdh*) และ TDH related hemolysin (*trh*) (Makino *et al*., 2003) โดยเฉพาะ *tdh* และ *trh* เป็นสารพิษที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) และมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง เมื่อเป็นโรคทางเดินอาหารอักเสบซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (Nishibuchi *et al*., 1989) นอกจากนี้ทำให้มีอาการท้องร่วงรุนแรง มีอุจจาระเหลวเป็นน้ำ มีกลิ่นเหม็น มักมีอาการปวดเกร็งที่ท้อง อาจมีอาการอาเจียนร่วมด้วย มีระยะฟักตัวค่อนข้างสั้น คืออาจเกิดอาการในประมาณ 15-24 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหารทะเลซึ่งปนเปื้อนเชื้อนี้ อาการ

อาจคงอยู่นานถึง 10 วัน แต่ส่วนใหญ่จะทุเลาลงภายใน 3 วัน โดยไม่ต้องรักษา บางรายคล้ายเป็นบิด อุจจาระมีมูกเลือด มีไข้ต่ำ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน อาการอาจเกิดเฉียบพลัน อาการที่เป็นอาจหายเองภายใน 2 ถึง 5 วัน (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550)

การกระจายของ *V. parahaemolyticus* ในประเทศไทย

สุดสายชล หอมทอง และธดาภรณ์ วงศ์พุฒ (2549) จากการสำรวจการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. ในหอยนางรมที่เพาะเลี้ยงบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม ถึงเดือนธันวาคม 2546 พบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. 73.33 เปอร์เซ็นต์ และซึ่งสามารถแยก Vibrio ได้ 6 ชนิด 41 ไอโซเลท คือ *V. parahaemolyticus* จำนวน 13 ไอโซเลท, *V. alginolyticus* จำนวน 9 ไอโซเลท, *V. vulnificus* จำนวน 7 ไอโซเลท, *V. fluvialis* จำนวน 5 ไอโซเลท, *V. damsel* จำนวน 3 ไอโซเลท และ *V. hollisae* จำนวน 4 ไอโซเลท ดังนั้นจากการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าการบริโภคหอยนางรมสดอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารลำไส้อักเสบได้

วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ (2553) ศึกษาความชุกของ *V. cholera* และ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างหอยแครงโดยแบ่งเป็นหอยแครงที่ส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว หอยแครงที่จำหน่ายในจังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่น ซึ่งตรวจวิเคราะห์หาเชื้อด้วยวิธี duplex PCR เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อมาตรฐาน พบว่า ความชุกของ *V. parahaemolyticus* สูงสุด คิดเป็นร้อยละ 86.3 เมื่อตรวจโดยวิธี duplex PCR และร้อยละ 65.2 เมื่อตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อ ส่วนความชุกของ *V. cholerae* คิดเป็นร้อยละ 71.4 เมื่อตรวจโดยวิธี uniplex PCR และร้อยละ 18.6 เมื่อตรวจโดยวิธี duplex PCR และร้อยละ 1.9 เมื่อตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อ แสดงให้เห็นว่าความชุกของการพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงหรืออาหารเป็นพิษในหอยแครงมีสูง โดยเฉพาะ *V. parahaemolyticus* ที่ตรวจพบจากทุกตัวอย่าง

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และจิณห์วิภา แก้วท่าไม้ (2555) ตรวจสอบการปนเปื้อนของ *V. cholera* และ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาวสด (*Litopenaeus vannamei*) จากตลาดในเขตธนบุรี ได้แก่ ตลาดพรานนก ตลาดบางแค และตลาดวงเวียนใหญ่ และเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานด้านจุลชีววิทยาของกุ้งสด ปรากฏว่าไม่พบการปนเปื้อนของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างจากตลาดทั้ง 3 แห่ง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหาร selective media และทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

สุรีย์ นานาสมบัติ และคณะ (2556) ทำการประเมินการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสด ได้แก่ กุ้ง (*Penaeus merguiensis*) ปลา (*Lates calcarifer*) ปลาหมึก (*Loligo formosana*) หอยนางรม (*Saccostrea cucullata*) และหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ที่จำหน่ายในตลาดในกรุงเทพ โดยอาศัยวิธี Most Probable Number พบว่าปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 24 ถึงมากกว่า 11,000 MPN ต่อกรัม โดยพบการปนเปื้อนในปลา หอยนางรม และหอยแมลงภู่มากที่สุด คือพบชนิดละ 9 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ

90) รองลงมาคือปลาหมึกพบ 8 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) และกุ้งพบน้อยที่สุดคือ 5 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50)

การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกัน

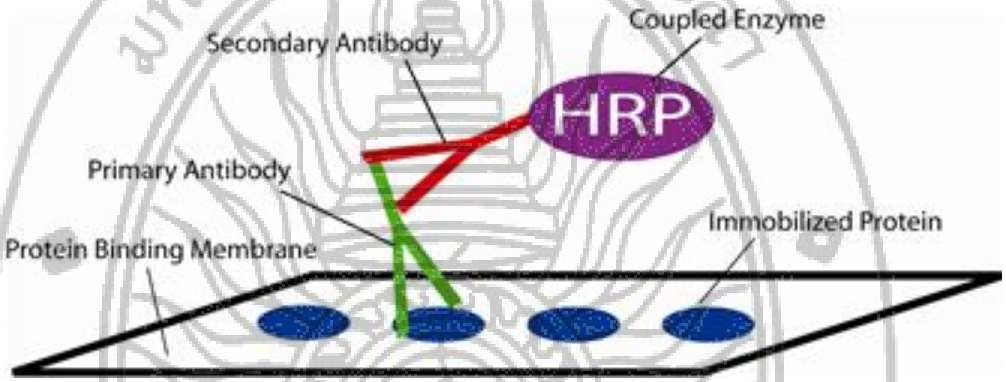
โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมา ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์เซลล์เดียว จึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอิพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้น การตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอิพิโทป รวมอยู่ด้วยกันในซีรัม เรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่างๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำ การตอบสนองในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก 1 โคลนของบีเซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

เป็นวิธีการตรวจวัดหรือตรวจหาความเข้มข้นของสารในสารละลายโดยอาศัยความสามารถของแอนติบอดีที่จดจำและมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ผสมอยู่ในสารผสม เช่น นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์และวินิจฉัยโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) ตัวอย่างเช่น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* สามารถนำมาใช้จำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลสดที่ประกอบด้วย กุ้ง หอยแมลงภู่ หอยแครง และหอยนางรมได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting และมีความไวในการตรวจเชื้อ *V. parahaemolyticus* บริสุทธิ์ อยู่ในช่วง 10^{8}-10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร (Prompamorn *et al*., 2013) การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. cholerae* ในการจำแนกซีโรกรุ๊ปของเชื้อโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp. อื่นๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี VC-93, VC-82 และ VC-223 มีความจำเพาะต่อ *V. cholerae* O1 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี VC-812 และ VC-191 มีความจำเพาะต่อ *V. cholerae* O139 และ O141 ตามลำดับ

และโมโนโคลนอลแอนติบอดี VC-26 สามารถจับกับ *V. cholerae* ทั้ง 3 ซีโรกรุ๊ป ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบอาหารและในสัตว์ติดเชื้อได้ โดยไม่ต้องทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Pengsuk *et al*., 2011) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในหอยแครง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting (ภาพที่ 2.5) ซึ่งเป็นการตรวจสอบแอนติเจนในสารผสมที่ทำได้ง่ายและทราบผลรวดเร็ว เพียงแต่นำสารที่ต้องการตรวจสอบมาหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เพื่อตรึงให้แอนติเจนติดกับเมมเบรน แล้วบ่มกับแอนติบอดี นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบแอนติเจนที่มีขนาดเล็ก หรือ แฮปเทน (hapten) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกในการตรวจสอบ ความจำเพาะของแอนติบอดีกับแอนติเจนต่างๆ



ภาพที่ 2.5 กระบวนการในการทดสอบด้วยวิธี dot blotting
ที่มา (http://www.gbiosciences.com/EducationalProducts/products.aspx?productid)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มประชากร คือ หอยแครงในแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี

กลุ่มตัวอย่าง คือ หอยแครงในแหล่งธรรมชาติ อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็น positive control ในการทดสอบด้วยวิธี dot blotting โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ศิวาพร ลงยันต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดังนี้ *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus, V. cholera*, *V. vulnificus* **และ***V. harveyi*

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการวิจัย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ศิวาพร ลงยันต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blotting

ชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทดสอบด้วยวิธี dot blotting (CFU ml^{-1})	ความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรีย
VP-516[a]	10^{7}	*V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus*
VP-618[a]	10^{7}	*V. parahaemolyticus*
VA-165[b]	10^{6}	*V. alginolyticus* *V. vulnificus*

ตารางที่ 3.1 ความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blotting (ต่อ)

ชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทดสอบด้วยวิธี dot blotting (CFU ml $^{-1}$)	ความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรีย
VH-9B11[c]	10^{7}	*V. harveyi*
VC-63[d]	10^{7}	*V. cholerae*
VV20D1[e]	10^{7}	*V. vulnificus*
VC-201[d]	10^{7}	*Vibrio* spp.

หมายเหตุ [a] โมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก Prompamorn et al. (2013)

[b] โมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก Sithigorngul et al. (2006)

[c] โมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก Thongkao et al. (2009)

[d] โมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก Pengsuk et al. (2011)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างหอยแครง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยแครงในแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี ทำการเก็บทุกเดือนๆ ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 40 ตัว ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2559 โดยตัวอย่างหอยแครงจะทำการเก็บบริเวณอำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี

2. การแยก *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างหอยแครง

นำตัวอย่างหอยแครง 25 กรัม มาบดให้ละเอียดใน glass homogenizer จากนั้นชั่งตัวอย่างหอยแครงบด 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% NaCl alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบ tenfold serial dilution ที่ความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-5} ต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละความเข้มข้น มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS AGAR) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับปริมาณ

โคโลนีและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเขียวจำนวน 25 โคโลนี เขี่ยใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ

นำตัวอย่างแบคทีเรียจากข้อ 2 และเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ทราบชนิดเพื่อใช้เป็น positive control มาหยดลงบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตร/จุด อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto (นมพร่องมันเนย 5% ที่ละลายในสารละลาย PBS) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิดตามตารางที่ 3.1 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำไปบ่มต่อใน GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) เจือจาง 1:1500 ในสารละลาย 5% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต 0.03% Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.006% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ในสารละลาย PBS จะปรากฏจุดสีดำ (immunereactivity) บนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส แล้วนำมาเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์ผล

YALA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การปนเปื้อน *Vibrio parahaemolyticus* ในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี

ทำการตรวจสอบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงจากบริเวณอ่าวปัตตานี จำนวน 40 ตัวต่อเดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2559 พบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* เพียงเดือนมิถุนายนเท่านั้น โดยมีปริมาณเชื้อ $4x10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.1) นอกจากนี้ตรวจพบการปนเปื้อนของ Vibrio ชนิดอื่นๆ ได้แก่ *V. vulnificus* และ *V. harveyi* ซึ่ง *V. vulnificus* สามารถตรวจพบทุกเดือนที่ทำการทดสอบ และมีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง $3x10^2$-$2x10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วน *V. harveyi* ตรวจพบในเดือนพฤษภาคมและมิถุนายน และมีปริมาณเชื้อ $2x10^4$ และ $2x10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนในหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด และทดสอบด้วยวิธี dot blotting ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2559

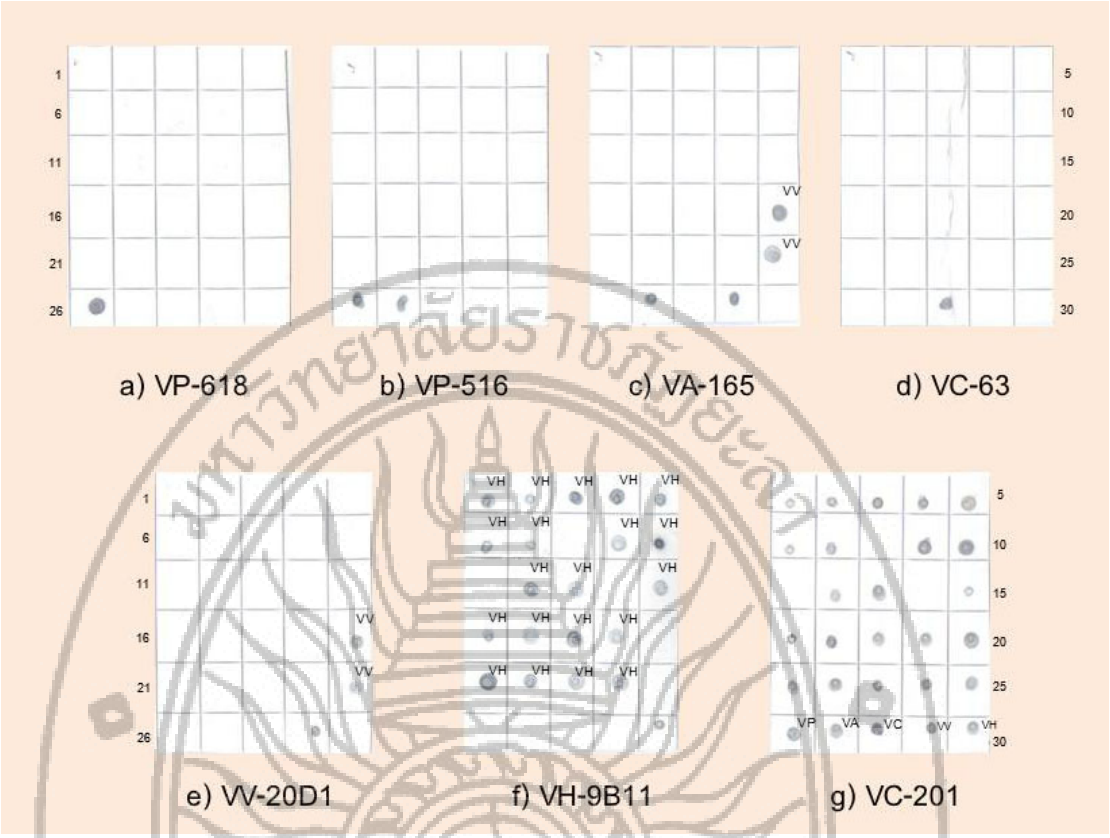
เดือน	ชนิดของแบคทีเรีย	ปริมาณเชื้อ (CFU ml^{-1})
พฤษภาคม	*V. parahaemolyticus*	ไม่พบ
	V. harveyi	$2x10^4$
	V. vulnificus	$2x10^3$
มิถุนายน	*V. parahaemolyticus*	$4x10^3$
	V. vulnificus	$2x10^3$
	V. harveyi	$2x10^3$
กรกฎาคม	*V. parahaemolyticus*	ไม่พบ
	V. vulnificus	$3x10^2$
	V. harveyi	ไม่พบ
สิงหาคม	*V. parahaemolyticus*	ไม่พบ
	V. vulnificus	$2x10^3$
	V. harveyi	ไม่พบ

2. การพัฒนาวิธีการตรวจหา *V. parahaemolyticus* ในหอยแครง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ

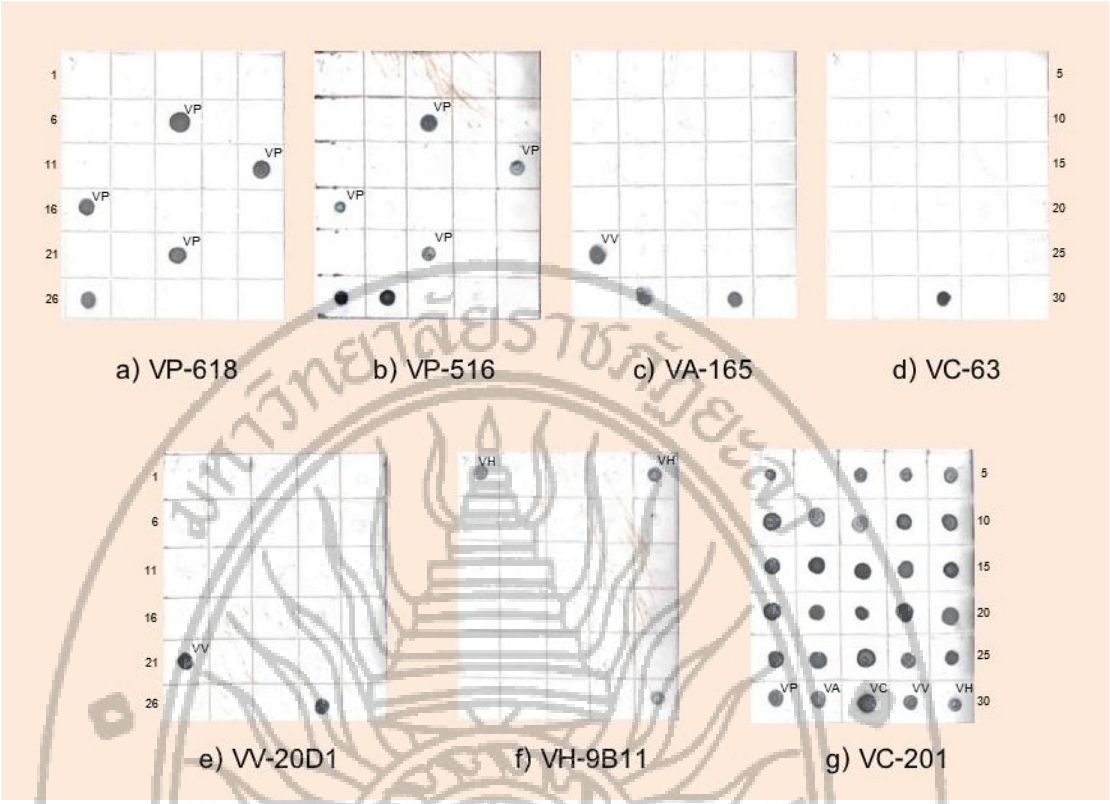
ผลการตรวจหาการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี เกิดจากการพัฒนาวิธีการตรวจสอบโดยประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ และทดสอบด้วยวิธี dot blotting (ตารางที่ 4.1) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี จำนวน 7 ชนิด ที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี dot blotting สามารถตรวจหาการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* spp. ได้ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี VP-516 และ VP-618 ที่มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* สามารถจับกับ *V. parahaemolyticus* ในหอยแครงได้อย่างจำเพาะ โดยเกิด immunoreactivity ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.2a,b) รวมทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดี VA-165, VH-9B11, VC-63 และ VV20D1 สามารถแยก *V. vulnificus และ V. harveyi* จาก *V. parahaemolyticus* ตามลำดับ ในหอยแครงได้อย่างจำเพาะเช่นกัน (ภาพที่ 4.2c,e,f) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี VC-201 สามารถจับกับ *Vibrio* spp. ได้อย่างจำเพาะ (ภาพที่ 4.1-4.3)

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบแต่ละเดือน พบว่าในเดือนพฤษภาคมไม่พบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* แต่พบการปนเปื้อนของ *V. harveyi* (ภาพที่ 4.1f) และ *V. vulnificus* (ภาพที่ 4.1c, e)

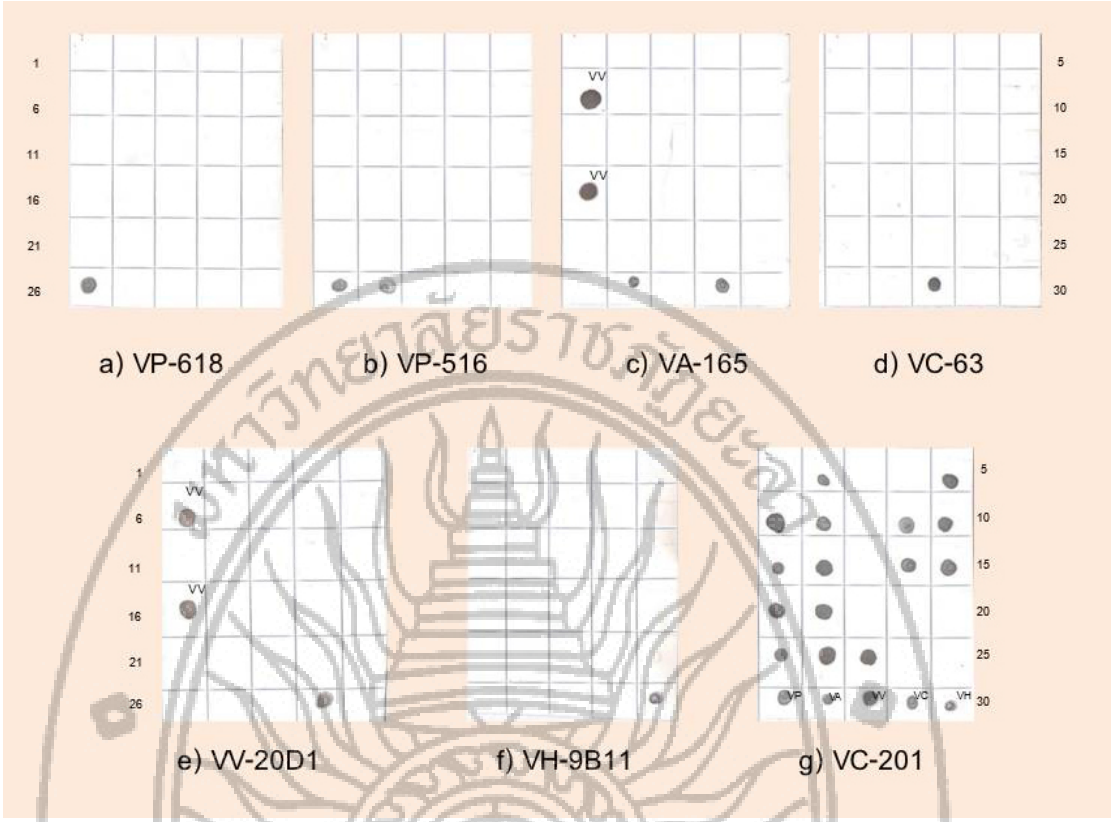
ส่วนเดือนมิถุนายน พบการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* (ภาพที่ 4.2a, b) และตรวจพบการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* (ภาพที่ 4.2c, e) และ *V. harveyi* (ภาพที่ 4.2f) สำหรับเดือนกรกฎาคม พบโคโลนีสีเขียวเพียง 6 โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS และเมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting พบเพียงการปนเปื้อน *V. vulnificus* และในเดือนสิงหาคมพบเพียงการปนเปื้อน *V. vulnificus* (ภาพที่ 4.3c, e)



ภาพที่ 4.1 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อน *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด และทดสอบด้วยวิธี dot blotting ในเดือนพฤษภาคม 2559 โดยกำหนดให้ หมายเลข 1-25 เป็นโคโลนีสีเขียวที่ต้องการทดสอบ ส่วนหมายเลข 26-30 เป็น Vibrio ที่ทราบชนิดใช้เป็น positive control ซึ่ง VP คือ *V. parahaemolyticus*, VA คือ *V. alginolyticus*, VC คือ *V. cholera*, VV คือ *V. vulnificus* และ VH คือ *V. harveyi* ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อน *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด และทดสอบด้วยวิธี dot blotting ในเดือนมิถุนายน 2559 โดยกำหนดให้ ช่องหมายเลข 1-25 เป็นโคโลนีสีเขียวที่ต้องการทดสอบ ส่วนช่องหมายเลข 26-30 เป็น Vibrio ที่ทราบชนิดใช้เป็น positive control ซึ่ง VP คือ *V. parahaemolyticus,* VA คือ *V. alginolyticus*, VC คือ *V. cholera*, VV คือ *V. vulnificus* และ VH คือ *V. harveyi* ตามลำดับ



ภาพที่ 4.3 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อน *Vibrio* spp. ในหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด และทดสอบด้วยวิธี dot blotting ในเดือนสิงหาคม 2559 โดยกำหนดให้ ช่องหมายเลข 1-25 เป็นโคโลนีสีเขียวที่ต้องการทดสอบ ส่วนช่องหมายเลข 26-30 เป็น Vibrio ที่ทราบชนิดใช้เป็น positive control ซึ่ง VP คือ *V. parahaemolyticus,* VA คือ *V. alginolyticus*, VC คือ *V. cholera*, VV คือ *V. vulnificus* และ VH คือ *V. harveyi* ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัย เรื่อง การตรวจแยกแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ทำการตรวจสอบการปนเปื้อนในหอยแครงในอำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2559 ในเบื้องต้นทำการแยกเชื้อ *Vibrio* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar เพื่อทำการแยกโคโลนีสีเขียวและสีเหลือง จากนั้นนับโคโลนีสีเขียวและนำโคโลนีสีเขียว 25 โคโลนี มาทดสอบด้วยวิธี dot blotting ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 7 ชนิด ประกอบด้วย 1) โมโนโคลนอลแอนติบอดี VP-516 ที่จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* 2) โมโนโคลนอลแอนติบอดี VP-618 ที่จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* 3) โมโนโคลนอลแอนติบอดี VA-165 ที่จำเพาะต่อ *V. alginolyticus* และ *V. vulnificus* 4) โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH-9B11 ที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* 5) โมโนโคลนอลแอนติบอดี VC-63 ที่จำเพาะต่อ *V. cholerae* 6) โมโนโคลนอลแอนติบอดี VV20D1 ที่จำเพาะต่อ *V. vulnificus* 7) โมโนโคลนอลแอนติบอดี VC-201 ที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. สามารถใช้ในการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในหอยแครงได้ เช่นเดียวกับการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จาก *Vibrio* spp. ที่พบในอาหารทะเลจากตลาดสด เช่น หอยแมลงภู่ หอยแครง หอยนางรม และกุ้ง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* (Prompamorn *et al*., 2013)

จากการตรวจแยกแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ และทดสอบด้วยวิธี dot blotting พบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* เพียงเดือนมิถุนายนเท่านั้น โดยมีปริมาณเชื้อ $4x10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร และพบการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* ในทุกเดือนที่ทำการตรวจสอบ (เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม) มีปริมาณเชื้อ $2x10^3$, $2x10^3$, $3x10^2$ และ $2x10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่ง *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในน้ำทะเลหรือบริเวณน้ำกร่อยชายฝั่งและเป็นแบคทีเรียก่อโรคเช่นเดียวกับ *V. parahaemolyticus* โดยเป็นเชื้อที่ทำให้ผู้ป่วยตายสูง เนื่องจากเชื้อนี้ทำให้มีการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งเชื้อจะผ่านผนังลำไส้และเข้าสู่กระแสเลือดภายใน 20-40 ชั่วโมง ทำให้มีอาการหนาวสั่น มีไข้และอ่อนเพลีย บางครั้งมีอาการท้องเสียและอาเจียน โดยมีอัตราการตายสูงถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์ มักพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหาร และโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง สามารถพบเชื้อนี้ในอาหารทะเลดิบ (ศรีวรรณา หัทยานนท์, 2549) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Izumiya et al. (2011) ได้รายงานว่าเมื่อเชื้อ *V. vulnificus* เข้าสู่ร่างกายก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (primary septicemia) หรือพบการติดเชื้อที่บาดแผล (wound infection) ซึ่งอาจพบอาการรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตสูงในผู้ป่วยที่มีปัญหาระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคตับอักเสบเรื้อรัง และนอกจากนี้ในผลจากการทดสอบการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp.

ในหอยแครง ด้วยวิธี dot blotting พบการปนเปื้อนของ *V. harveyi* ในเดือนพฤษภาคมและมิถุนายน โดยมีปริมาณเชื้อ $2x10^4$ และ $2x10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่ง *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียที่พบในทะเล ปากแม่น้ำ ชายฝั่ง และสามารถก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้ง ถ้ามีปริมาณเชื้อมาก กุ้งจะไม่กินอาหาร ลำตัวมีสีขุ่น ตับอักเสบและตับอ่อนมีสีซีด ทั้งนี้จะเห็นกุ้งเกิดการเรืองแสงสีเขียวในเวลากลางคืนได้ ซึ่งเป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างมากต่อโรงเพาะฟักและบ่อดิน (Thaithongnum *et al*., 2006)

ในการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* มีหลากหลายวิธี เช่น วิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารคัดเลือก แล้วระบุเชื้อโดยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical method) เช่น การทดสอบความชอบเกลือ, oxidase test, hemolysis test, motility test, indole test และ lysine decarboxylase test เป็นต้น (Alcaide, 1999) ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยอุปกรณ์และสารเคมีเป็นจำนวนมาก ใช้ระยะเวลานานในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ รวมทั้งผลการวิเคราะห์อาจมีความผิดพลาดเนื่องจากคุณสมบัติทางชีวเคมีที่คล้ายคลึงกับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นได้ ทั้งนี้ *V. parahaemolyticus* มีลักษณะสัณฐานและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่คล้ายคลึงกับ *Vibrio* spp. ชนิดอื่นๆ ใน Vibrionaceae (Nishibuchi, 2006) เช่น คุณสมบัติการหมักซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ทำให้ *V. parahaemolyticus* มีโคโลนีสีเขียวเนื่องจากไม่สามารถหมักซูโครสเช่นเดียวกับ *V. vulnificus, V. mimicus* และ *V. hollisae* เป็นต้น นอกจากนี้ได้มีการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล เช่น วิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยการตรวจหายีน *toxR, tdh* หรือ *trh* ซึ่งเป็นปัจจัยก่อความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นต้น (Bilung et al., 2005; Kanjanasopa et al., 2011) เป็นวิธีที่รวดเร็ว แต่ต้องอาศัยเครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพงและต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง แต่จากงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์วิธีการในตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในหอยแครง โดยการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ และตรวจสอบด้วยวิธี dot blotting ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ทำให้ทราบชนิดของ *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ที่ก่อโรค โดยใช้ระยะเวลาสั้นในการตรวจวิเคราะห์ประมาณ 11 ชั่วโมง มีความแม่นยำ และใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีราคาไม่สูงมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการดั้งเดิมและวิธีทางชีวโมเลกุล ซึ่งจัดเป็นอีกหนึ่งวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในตัวอย่างได้ โดยไม่จำเป็นต้องทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อยืนยันผล

ดังนั้นผลจากการตรวจแยกแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในหอยแครงบริเวณอ่าวปัตตานี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ สามารถระบุได้ว่าหอยแครงจากแหล่งธรรมชาติบริเวณอ่าวปัตตานีมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* และพบปริมาณเชื้อ $4x10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 ดังนี้ 1) อาหารดิบ ประเภทอาหารพร้อมปรุงและประเภทอาหารแช่เย็นและแช่แข็ง 2) อาหารพร้อมบริโภค ประเภทอาหารทะเลและประเภทอาหารปรุงสุกทั่วไป ต้องไม่พบ *V. parahaemolyticus* ใน

ตัวอย่างอาหาร 25 กรัม (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) ดังนั้นหอยแครงดิบจากอ่าวปัตตานีมีการปนเปื้อน *V. parahaemolyticus* เกินค่ากำหนด ควรระมัดระวังในการบริโภคหอยแครงดังกล่าว โดยทำให้ถูกสุขลักษณะด้วยการทำให้สุกด้วยความร้อน ซึ่งเชื้อถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557) จากข้อมูลนี้คาดว่าสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานในการรับประทานหอยแครงได้อย่างถูกสุขลักษณะและป้องกันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
YALA RAJABHAT UNIVERSITY

บรรณานุกรม

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2550). สาระน่ารู้เกี่ยวกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*. สืบค้นจาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=890. สืบค้นเมื่อ 1 ตุลาคม 2559.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2553). ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2. ลงวันที่ 28 กันยายน 2553.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2557). Fact Sheet เรื่อง *Vibrio parahaemolyticus*. ลงวันที่ 25 ธันวาคม 2553.

กันทิมา เหาะเจริญ, ซุกรี หะยีสาแม, นิยม กำลังดี และ วรรณชไม การถนัด. (2541). การสำรวจข้อมูลชีวภาพอ่าวปัตตานี (Biological data of Pattani bay). คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ครองชัย หัตถา. (2541). การสำรวจสภาพปัญหามลพิษทางน้ำบริเวณพื้นที่รอบอ่าวปัตตานี/ครองชัย หัตถา. ปัตตานี: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต, ระพีพร เรืองช่วย, กาญจนา กุลชาติ, จันธิรา แก้วสีทอง, น้ำยี่ ยิ่งดำนุ่น และยศถกล โกศลเหมมณี. (2541). แพลงก์ตอนพืชในอ่าวปัตตานี. *รายงานการวิจัยโครงการวิจัยอ่าวปัตตานี ระยะที่ 2*. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต, ระพีพร เรืองช่วย, จันธิรา แก้วสีทอง, ยศถกล โกศลเหมมณี, กาญจนา กุลชาติและน้ำยี่ ยิ่งดำนุ่น. (2541). แพลงก์ตอนสัตว์ในอ่าวปัตตานี. *รายงานการวิจัยโครงการวิจัยอ่าวปัตตานี ระยะที่ 2*. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิพนธ์ ศิริพันธ์. (2543). *คู่มือการเลี้ยงหอยทะเลเศรษฐกิจ*. กรุงเทพมหานคร: กรมประมง, กองส่งเสริมการประมง.

บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ และคณะ. (2527). *โรคแบคทีเรียที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคน*. บัณฑิตการพิมพ์: กรุงเทพมหานคร.

ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). *วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย*. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

วงแข ยุติธรรม. (2547). ชนิด ปริมาณ และการกระจายของสัตว์ทะเลหน้าดินขนาดใหญ่ บริเวณหาดเลน ตำบลบางขุนไทร อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี. *วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา).* บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร. ถ่ายเอกสาร.

วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ. (2553). การเฝ้าระวังเชื้อสกุลวิบริโอ ซัลโมเนลลา และชิเกลลาในหอยแครงส่งออกสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว โดยวิธีโมเลกูลาร์เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ. *รายงานการวิจัย*. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศรีวรรณา หัทยานนท์ และคณะ. (2549). มหัตภัยจากเชื้อ *V. vulnificus*. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

สุรีย์ นานาสมบัติ และคณะ. (2556). การตรวจหาการปนเปื้อน *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดที่จาหน่ายในกรุงเทพและการศึกษาการต้านทานความร้อน. *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ, ปีที่ 16* (3), 175-184.

สุดสายชล หอมทอง และธดาภรณ์ วงศ์พุฒ. (2549). ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Vibrio* spp. จากหอยนางรมบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี. *วารสารวิชาการ ม.อบ., ปีที่ 8* (1), 41-50.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และ จิณห์วิภา แก้วท่าไม้. (2555). การตรวจสอบแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในกุ้งขาวสดจากตลาดในเขตธนบุรี. *วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์, ปีที่ 12* (1), 85-96.

ฮัสสัน ดูมาลี. (2555). ขบวนการเคลื่อนไหวทางสังคมแบบใหม่ในการจัดการทรัพยากรชายฝั่งทะเลอ่าวปัตตานี กรณีศึกษากลุ่มเครือข่ายอนุรักษ์อ่าวปัตตานี. *วิทยานิพนธ์ ร.ม. (วิชาการเมืองและการปกครอง).* เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

Alam, M.J., Tomochika, K.I., Miyoshi, S.I., and Shinoda, S. (2002). Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-InlandSea, Japan. *FEMS Microbiology Letters, 208*, 83–87.

Alcaide, E., Amaro, C., Todoli, R., and Oltra, R. (1999). Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing infection in Iberian toothcarp *Aphanius iberus*. *Diseases of Aquatic Oganisms*, 35, 77-80.

Angela, D.P., Giuseooina, C.F., Maria, Valentina, T., and Giuseppina, T. (2005). Detection of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish samples using collagenase-targeted multiplex PCR. *Journal of Food Safety, 26*, 150-159.

Bilung, L.M., Radu, S., Bahaman, A.R., Rahim, R.A., Napis, S., Vui Ling M.W.C., Tanil, G.B., and Nishibuchi, M. (2005). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) by PCR. *FEMS Microbiology Letter*. *252,* 85-88.

Cheng, S.Y., and Liub, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology, 24,* 549–558.

Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruse, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P.M., and Slutsker, L. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* infection in the United states, 1973–1998. *The Journal of Infectious Diseases, 181,* 1661–1666.

Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Mukai T., and Ueho, T. (1953). On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Medical journal of Osaka University, 4*, 299–304.

Gode-Potratz, C.J., Kustusch, R.J., Breheny, P.J., Weiss, D.S., and McCarte,r L.L. (2011). Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. *Molecular Microbiology, 79,* 240-263.

Izumiya, H., Matsumoto, K., Yahiro, S., Lee, J., Morita, M., Yamonaoto, S., Arakawa, E., and Ohnishi, M. (2011). Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Molecular and Cellular Probes, 25*, 174-176.

Kanjanasopa, D., Pimpa, B., Chow, P.S. (2011). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) harvested from the south coast of Thailand. *Songklanakarin Journal Science Technology. 33,* 295-300.

Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda T., and Tagomori, K., (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *Lancet, 361,* 743–749.

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 arbitrarity primed PCR and toxRS sequence analyses. *Journal of Clinical Microbiology, 38,* 578-585.

McLaughlin, J.B., DePaola, A., Bopp, C.A., Martinek, K.A., and Napol, N.P. (2005) Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *The New England Journal of Medicine, 353,* 1463–1470. Newton, A., Kendall, M., Vugia, D.J., Henao, O.L., and Mahon, B.E. (2012). Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from systems. *Clinical Infectious Diseases, 54,* S391–S395.

Nishibuchi, M., Taniguchi, T., Misawa, T., Khaeomanee-Iam, V., Honda, T., and Miwatano, T. (1989). Cloning and nucleotide sequence of the gene (trh) encoding thenemo lysine related to the thermo stable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity, 57,* 2677–2691.

Nishibuchi, M. (2006). The biology of Vibrios: molecular identification. *American Society for Microbiology, 4*, 44–64.

Pengsuk, C., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., Sridulyakul, P., and Sithigorngul, P. (2011). Differentiation among the *Vibrio cholerae* serotypes O1, O139, O141 and non-O1, non-O139, non-O141 using specific monoclonal antibodies with dot blotting. *Journal of Microbiological Methods, 87,* 224–233.

Prompamorn, P., Longyant, S., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., and Chaivisuthangkura, P. (2013). Rapid identification and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* from *Vibrio* spp. in seafood samples using developed monoclonal antibodies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29,* 721–731.

Sithigorngul, W., Rengpipat, S., Tansirisittikul, A., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., and Sithigorngul, P. (2006). Development of monoclonal antibodies for simple identification of *Vibrio alginolyticus. Letters in Applied Microbiology*, *43*, 436-442.

Thaithongnum, S., Ratanama, P., Weeradechapol, K., Sukhoom, A. and Vuddhakul, V. 2006. Detection of *Vibrio harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture, 261*(1), 1-9.

Thonhkao, K., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Rukpratanporn, S., Sridulyakul, P., and Sithigorngul, P. (2009). Production of monoclonal antibodies specific to *Vibrio harveyi.* In: *The 35th congress on science and technology of Thailand (ST22S).* (pp. 94-95). Thailand.

Twedt, R. (1989). *Vibrio parahaemolyticus*. In: Doyle MP (ed) *Foodborne bacterial pathogens.* (pp. 543–56). Marcel Decker Inc., New York.

Zarei, M., Borujeni, M.P., Jamnejad, A., and Khezrzadeh, M. (2012). Sea-sonal prevalence of Vibrio species in retail shrimps with an emphasison *Vibrio parahaemolyticus. Food Control, 25,* 107–109.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล

นางสาววารุณี หะยีมะสาและ

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำหลักสูตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 133 ถนนเทศบาล ตำบลสะเตง อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000

โทรศัพท์ 073-229628 ต่อ 73000 โทรสาร 073-229629

e-mail: warunee.h@yru.ac.th

ประสบการณ์วิจัย

Sithigorngul, P., Hajimasalaeh, W., Longyant, S., Sridulyakul, P., Rukpratanporn, S., and Chaivisuthangkura, P. (2009). Simple immunoblot detection of Penaeus stylirostris densovirus (PstDNV) using monoclonal antibodies to heterologously expressed viral capsid protein. *Journal of Virological Methods, 162*, 126–132.

Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Hajimasalaeh, W., Sridulyakul, P., Rukpratanporn, S., and Sithigorngul, P. (2010). Improved sensitivity of Taura syndrome virus immunodetection with a monoclonal antibody against the recombinant VP2 capsid protein. *Journal of Virological Methods, 163,* 433–439.

Hajimasalaeh, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., and Sithigorngul, P. (2013). Improved immunodetection of Taura syndrome virus using a monoclonal antibody specific for heterologously expressed VP1 capsid protein. *Archives of Virology, 158*, 77-85.

วิพัฒน์ ถาวโรฤทธิ์, ศศิธร พังสุบรรณ, สายใจ แก้วอ่อน, วารุณี หะยีมะสาและ, อลภา ทองไชย และลักขณา รักขพันธ์. (2558). พืชสมุนไพรท้องถิ่นกับการประยุกต์ใช้และการอนุรักษ์อย่างยั่งยืนในตำบลทรายขาว อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

2. ชื่อ-นามสกุล

นางสาวสายใจ แก้วอ่อน

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำหลักสูตรชีววิทยา

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 133 ถนนเทศบาล ตำบลสะเตง อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000

โทรศัพท์ 073-229628 ต่อ 73000 โทรสาร 073-229629

e-mail: jamp.sa@hotmail.com

ประสบการณ์วิจัย

สายใจ แก้วอ่อน และอาอีเสาะห์ เบ็ญหาวัน. (2559). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดดาหลา (*Etlingera elatior* L.) ต่อแบคทีเรียก่อโรคในพืช. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

วิพัฒน์ ถาวโรฤทธิ์, ศศิธร พังสุบรรณ, สายใจ แก้วอ่อน, วารุณี หะยีมะสาและ, อลภา ทองไชย และลักขณา รักขพันธ์. (2558). พืชสมุนไพรท้องถิ่นกับการประยุกต์ใช้และการอนุรักษ์อย่างยั่งยืนในตำบลทรายขาว อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

สายใจ แก้วอ่อน. (2558). การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดย *Bacillus* spp. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

ฉันทนา รุ่งพิทักษ์ไชย, ลักขณา รักขพันธ์, อลภา ทองไชย, สายใจ แก้วอ่อน และศศิธร พังสุบรรณ. (2557). ความหลากหลายของไลเคนในมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา: ดัชนีชีวภาพชี้วัดภาวะมลพิษทางอากาศ. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

วิพัฒน์ ถาวโรฤทธิ์, ศศิธร พังสุบรรณ, สายใจ แก้วอ่อน, อลภา ทองไชย และลักขณา รักขพันธ์. (2557). ความหลากหลายทางชีวภาพบริเวณระบบนิเวศรอยต่อในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำตกทรายขาว อำเภอโคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

สายใจ แก้วอ่อน. (2550). การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากปลาน้ำจืด. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

สายใจ แก้วอ่อน. (2549). การคัดแยกจุลินทรีย์และสมบัติบางประการของลูกแป้งข้าวหมากในจังหวัดยะลา. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

สายใจ แก้วอ่อน. (2548). การคัดแยกและคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารหมักดองพื้นบ้าน อำเภอเมือง จังหวัดยะลา. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

สายใจ แก้วอ่อน. (2558). การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและความทนต่อกรด-ด่างจากอาหารหมัก. ใน*งานประชุมวิชาการฯ ระดับชาติ ครั้งที่ 4 ประจำปี 2558 การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาท้องถิ่นสู่ประชาคมอาเซียน มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*. 5 สิงหาคม 2558. (100-107) นราธิวาส: มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์.

สายใจ แก้วอ่อน และนูรุลฮูดา เจ๊ะกาเดร์. (2549). ความหลากหลายของแบคทีเรียแลกติกในอาหารหมักดองพื้นบ้าน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา, 10*(1), 91-95.

สายใจ แก้วอ่อน, นูรมา ดือราแม และแอเสาะ ดิงลูกา. (2549). การใช้พืชท้องถิ่นทดแทนมันฝรั่งในการเพาะเลี้ยงเห็ดเป๋าฮื้อ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา, 10*(1), 80-84

Kaew-on, S. (2013). Probiotics in aquaculture. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา, 19*(1), 110-120.

Kaew-on, S. and Wanchaitanawong, P. (2014). *Bacillus subtilis* as a probiotic in Nile tilapia. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา, 18*(1), 11-23.

Kaew-on, S. Areechon, N. and Wanchaitanawong, P. (2015). Effects of *Pediococcus pentosaceus* PKWA-1 and *Bacillus subtilis* BA04 on Growth Performances, Immune Responses and Disease Resistance against *Aeromonas hydrophila* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) inpress.

Saichai Kaew-on. (2015). Antagonistic Activity against Fish Pathogens and In vitro Probiotics Properties of Lactic Acid Bacteria. In Proceeding of *International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Sciences 2015*, 17-19 May 2015 (59-68). Yogyakarta: Yogyakarta State University.

3. ชื่อ-นามสกุล

นางสาวนิสาพร มูหะมัด

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำหลักสูตรหลักสูตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 133 ถนนเทศบาล ตำบลสะเตง อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000

โทรศัพท์ 073-229628 ต่อ 73000 โทรสาร 073-229629

e-mail: ss4420171@hotmail.com

ประสบการณ์วิจัย

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ในเซลล์แขวนลอยยางพารา ได้รับรางวัลการนำเสนองานวิจัยแบบโปสเตอร์ในระดับดีเด่น จากงานประชุมวิชาการ TSB 2010 International Conference on Biotechnology for Healthy Living ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตตรัง

การศึกษาองค์ประกอบต่างๆ ของสารสกัดจากเปลือกกล้วยหินเพื่อการนำไปใช้ ในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์คณิตศาสตร์ในโรงเรียนครั้งที่ 22 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี 2558

องค์ประกอบต่างๆ ของสารสกัดจากเปลือกกล้วยหิน ในงานประชุมวิชาการ ราชภัฏวิจัยครั้งที่ 3 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ปี 2558

4. ชื่อ-นามสกุล

นางสาวลักขณา รักขพันธ์

ตำแหน่งปัจจุบัน

นักวิทยาศาสตร์ (สาขาชีววิทยา)

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 133 ถนนเทศบาล ตำบลสะเตง อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000

โทรศัพท์ 073-229628 ต่อ 73000 โทรสาร 073-229629

e-mail: hi_nammy@hotmail.com

ประสบการณ์วิจัย

สีย้อมเซลล์ที่สกัดจากพืชท้องถิ่น (อัญชัน : *Clitoria ternatea* L.) (2552)

สีย้อมเซลล์ที่สกัดจากดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) แห้ง (2553)

ชนิดจุลินทรีย์จากน้ำหมักชีวภาพและความถี่ของการใช้น้ำหมักชีวภาพกับผักกวางตุ้ง (2554)

ความหลากหลายทางชีวภาพของป่าชายเลนยะหริ่งหลังเกิดพายุดีเปรสชัน (2554)

การเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของมอส ซึ่งเกิดขึ้นจากอิทธิพลของช่วงเวลาได้รับแสง (2555)

สีย้อมเซลล์ที่สกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) (2555)

ความหลากหลายของไลเคนในมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา: ดัชนีชีวภาพชี้วัดภาวะมลพิษทางอากาศ (2557)