การปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำทะเลและหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) บริเวณอ่าวไทยตอนใน

นายกิจฐาพัฒน์ ศุภกานต์มงคล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTAMINATION OF *Staphylococcus aureus* IN SEAWATER AND GREEN MUSSEL (*Perna viridis*) FROM THE INNER GULF OF THAILAND

Mr. Kitthaphat Supakanmongkol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2015
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำทะเลและหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) บริเวณอ่าวไทยตอนใน
โดย	นายกิจฐาพัฒน์ ศุภกานต์มงคล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา วัฒยากร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเนตร ชุตินธรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา วัฒยากร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สุริษา สุวรรณรังษี)

กิจฐาพัฒน์ ศุภกานต์มงคล : การปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำทะเลและหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) บริเวณอ่าวไทยตอนใน (CONTAMINATION OF *Staphylococcus aureus* IN SEAWATER AND GREEN MUSSEL (*Perna viridis*) FROM THE INNER GULF OF THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.กัลยา วัฒยากร, 96 หน้า.

ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว (บางแสน พัทยา ชะอำ และหัวหิน) และในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) จากแหล่งเลี้ยงหอย (อ่าวชลบุรี อ่างศิลา ศรีราชา บางตะบูน คลองด่าน และปากแม่น้ำแม่กลอง) โดยเก็บตัวอย่าง 6 ครั้งในระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน 2557 และตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่ม Staphylococci (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*) โดยวิธี Petrifilm พบว่าน้ำทะเลบริเวณหาดหัวหินมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* สูงที่สุด (เฉลี่ย 2.72×10^3 CFU/mL) รองลงมาได้แก่ หาดบางแสน หาดพัทยา และหาดชะอำตามลำดับ สำหรับบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่พบว่าปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหอยมีค่าสูงสุดที่แหล่งเลี้ยงหอยบางตะบูน (เฉลี่ย 2.01×10^3 CFU/g) รองลงมา ได้แก่ ศรีราชา อ่าวชลบุรี อ่างศิลา คลองด่านและปากแม่น้ำแม่กลองตามลำดับ โดยหอยแมลงภู่เกือบทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนสูงกว่าเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ การศึกษาถึงยีนเอนเทอโรท็อกซินจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากหอยแมลงภู่จากแหล่งเลี้ยง (อ่าวชลบุรี อ่างศิลาและศรีราชา) ทำการศึกษาลักษณะของเชื้อก่อโรค บนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar จากการศึกษาพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นเชื้อก่อโรคคิดเป็นร้อยละ 40 ของตัวอย่างหอยแมลงภู่ทั้งสามแหล่ง คัดแยกเชื้อก่อโรคทั้งสิ้น 13 โคโลนีเพื่อหายีนเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่ามีเพียงโคโลนีเดียวของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยแมลงภู่อ่างศิลาในเดือนกันยายนที่มียีน SEA

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5587106120 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE
KEYWORDS: STAPHYLOCOCCUS AUREUS / GREEN MUSSEL / INNER GULF OF THAILAND / ENTEROTOXIN

KITTHAPHAT SUPAKANMONGKOL: CONTAMINATION OF *Staphylococcus aureus* IN SEAWATER AND GREEN MUSSEL (*Perna viridis*) FROM THE INNER GULF OF THAILAND. ADVISOR: ASSOC. PROF.WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.GULLAYA WATTAYAKORN, Ph.D., 96 pp.

A study was carried out on the contamination of *Staphylococcus aureus* in beach water from four beaches (Bangsaen, Pattaya, Cha-am, Hua-Hin) and in green mussel (*Perna viridis*) from six mussel-culture farms (Cholburi, Angsila, Sriracha, Bangtaboon, Klongdan, Maeklong) during January to November 2014. Staphylococci (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*) were analyzed by using the Petrifilm method. It was found that the beach water at Hua-Hin was the most contaminated by *Staphylococcus aureus* (average $2.72x10^3$ CFU/mL), followed by Bangsaen, Pattaya and Cha-am, respectively. Mussels from Bangtaboon farming area were found to be the most contaminated by *Staphylococcus aureus* (average $2.01x10^3$ CFU/g), followed by Sriracha Cholburi Angsila, Klongdan and Maeklong respectively. Most mussel samples were found to be contaminated at the levels above the permissible limits of microbiological criteria for human consumption of seafood. The study of gene enterotoxin from *Staphylococcus aureus* was isolated from mussel- culture farms (Cholburi, Angsila and Sriracha). The Characteristic of pathogens had been studied by using Mannitol Salt Agar. From this study, the result showed that 40 percent of the total sample at the place of three sources was *Staphylococcus aureus*. Moreover, 13 colonies of *Staphylococcus aureus* were selected to determine the type of enterotoxin by using Polymerase chain reaction, only one colony *Staphylococcus aureus* isolated from Angsila in September has gene SEA.

Field of Study: Environmental Science Student's Signature .....
Academic Year: 2015 Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความสนับสนุนและช่วยเหลือจากรองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและตรวจทานรายละเอียดต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา วัฒยากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อคิดเห็นตลอดจนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจจนงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา ที่กรุณามาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง ดร. สุริษา สุวรรณรังษี ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็น ที่มีส่วนสำคัญในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ขอขอบคุณ ภาควิชาสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม สำหรับความช่วยเหลือ ทุนสนับสนุนและกำลังใจที่ดีจากเจ้าหน้าที่ทุกคน รวมถึง พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆในภาควิชาทุกคน

ขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ ให้ความช่วยเหลือ และเป็นแรงผลักดันให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

ท้ายสุดนี้ขอขอบคุณ คุณแม่ ภรรยา ลูกชายและครอบครัวทุกคน ที่คอยให้กำลังใจ ให้ความรัก ความเอาใจใส่ สนับสนุน ผลักดัน และความห่วงใยเสมอมาแก่ข้าพเจ้า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฐ
สารบัญรูปภาพ ..... ฑ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ 3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย 4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 5
2.1 อ่าวไทยตอนใน 5
2.1.1 แหล่งทำการประมงบริเวณอ่าวไทยตอนใน 5
2.1.2 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง 6
2.2 หอยแมลงภู่ 7
2.2.1 ลักษณะทางกายภาพของหอยแมลงภู่ 7
2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหอยแมลงภู่ 8
2.2.2.1 อาหารจากธรรมชาติ 8
2.2.2.2 ความขุ่นของน้ำ 8
2.2.2.3 ภาวะน้ำจืดไหลลงในทะเล 8
2.2.2.4 ภาวะน้ำเสีย 8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.2.2.5 ความเค็มของน้ำ 8
2.2.2.6 ระยะเวลาที่หอยอยู่ในน้ำ 9
2.2.2.7 กระแสน้ำและคลื่นลม 9
2.2.2.8 อุณหภูมิของน้ำ 9
2.2.2.9 พื้นที่สำหรับการยึดเกาะ 9
2.2.2.10 ศัตรูของหอยแมลงภู่ 9
2.3 *Staphylococcus aureus* 10
2.3.1 ลักษณะทั่วไปของ *Staphylococcus aureus* 10
2.3.2 การจำแนก *Staphylococcus* 12
2.3.3 เอนไซม์นอกเซลล์ (Extracellular Enzyme) 13
2.3.3.1 โคแอกกูเลส (Coagulase) 13
2.3.3.2 ลิเพส (Lipase) 13
2.3.3.3 ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase) 13
2.3.3.4 สแตฟฟิโลไคเนส (Staphylokinase) 14
2.3.3.5 นิวคลีเอส (Nuclease) 14
2.3.4 ทอกซิน (Toxin) 14
2.3.4.1 ไซโทไลติกทอกซิน 14
2.3.4.1.1 แอลฟาฮีโมไลซิน 14
2.3.4.1.2 บีตาฮีโมไลซิน 14
2.3.4.1.3 เดลตาฮีโมไลซิน 15
2.3.4.1.4 แกมมาฮีโมไลซิน 15
2.3.4.1.5 ลิวโคซิติน (Leukocidin) 15
2.3.4.2 เอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) 15

หน้า

2.3.4.3 เอกซ์โฟลิเอทีฟทอกซิน (Exfoliative toxin) 15
2.3.4.4 ทอกซินชอคซินโดรม (Toxic shock syndrom toxin: TSST-1) 16
2.3.5 คุณสมบัติของเอนเทอโรท็อกซิน 16
2.3.5.1 ชนิดของเอนเทอโรท็อกซิน 17
2.3.5.1.1 เอนเทอโรท็อกซินชนิด A (SEA) 17
2.3.5.1.2 เอนเทอโรท็อกซินชนิด B (SEB) 17
2.3.5.1.3 เอนเทอโรท็อกซินชนิด C (SEC) 18
2.3.5.1.4 เอนเทอโรท็อกซินชนิด D (SED) 18
2.3.5.1.5 เอนเทอโรท็อกซินชนิด E (SEE) 19
2.3.5.2 ความทนทานของเอนเทอโรท็อกซินต่อสภาพแวดล้อม 19
2.3.5.2.1 ความต้านทานต่อความร้อน 19
2.3.5.2.2 ความทนทานต่อรังสี 20
2.3.5.2.3 ความทนทานต่อเอนไซม์ 20
2.3.5.3 โรคที่เกิดจากเชื้อ Staphylococcus aureus 20
2.3.5.3.1 อาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning) 20
2.3.5.3.2 อาการช็อก (Toxic shock syndrome,TSS) 21
2.3.5.3.3 ลำไส้อักเสบ (Enteritis) 21
2.3.6 การตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินในอาหาร 22
2.3.6.1 การวิเคราะห์ทางชีวภาพ 22
2.3.6.2 การวิเคราะห์ทางอิมมูโนวิทยา 22
2.3.6.2.1 Double Gel Immunodiffusion 22
2.3.6.2.2 Radioimmunoassay (RIA) 23
2.3.6.2.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 23

2.3.6.2.4 Nucleic Acid-Based Detection Methods 23
2.3.6.3 Diagnostic Kits 24
2.3.6.3.1 Mini-VIDAS 24
2.3.6.3.2 Staphylococcal Enterotoxin- Reverse Passive Latex Agglutination (SET-RPLA) 24
2.4 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 28
3.1 จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและหอยแมลงภู่ 28
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย 28
3.2.1 การกำหนดจุดเก็บตัวอย่างและเก็บตัวอย่าง 28
3.2.2 การตรวจเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยและตัวอย่างหอยแมลงภู่ 29
3.2.3 การวิเคราะห์เอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่ 30
3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างหอยแมลงภู่ 30
3.2.3.2 การนับจำนวนเชื้อ Staphylococcus aureus 30
3.2.3.3 การคัดแยกเชื้อ Staphylococcus aureus 30
3.2.3.4 การศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อ Staphylococcus aureus ที่คัดแยกได้ 30
3.2.3.5 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ Staphylococcus aureus 30
3.2.3.6 การตรวจการสร้างเอ็นเทอโรท็อกซินของเชื้อ Staphylococcus aureus ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 31
3.2.3.6.1 ไพรเมอร์ 31
3.2.3.6.2 กระบวนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 31

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย 33
4.1 ผลการตรวจเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยและตัวอย่างหอยแมลงภู่ 33
4.1.1 ผลการตรวจเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว 33
4.1.2 ผลการตรวจเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่และในหอยแมลงภู่ 35
4.2 ผลการคัดแยกและศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่ 39
4.2.1 ผลการคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหอยแมลงภู่ 39
4.2.2 การศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้ 40
4.3 ผลการวิเคราะห์ยีนเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่ 42
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล 44
5.1 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย 44
5.2 ข้อเสนอแนะ 48
รายการอ้างอิง 49
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 58
ภาคผนวก ข ชายหาดท่องเที่ยวและแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ 62
ภาคผนวก ค ลักษณะตัวอย่างหอยแมลงภู่ 67
ภาคผนวก ง ข้อมูลสถิติ 72
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง 80
ภาคผนวก ฉ การคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Baird Parker Agar 83

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

ภาคผนวก ช การศึกษาลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Mannitol Salt Agar 87

ภาคผนวก ซ ปริมาณดีเอ็นเอ 92

ภาคผนวก ฌ Petrifilm Staph Express 94

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 96

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลจำกัดการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* 10

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* 13

ตารางที่ 3.1 จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวและแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ 28

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ ของ Staphylococcus enterotoxin A และ B..... 31

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมสารและความเข้มข้นในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ที่ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 32

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ย±SD ของคุณภาพน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 33

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวในช่วงที่ทำการศึกษา 34

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ย±SD ของคุณภาพน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 36

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยในช่วงที่ทำการศึกษา 36

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเลี้ยงหอยในช่วงที่ทำการศึกษา 37

ตารางที่ 4.6 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Baird Parker Agar 40

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ก่อโรค..... 41

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Baird Parker Agar 11

รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Mannitol Salt Agar 11

รูปที่ 4.1 ค่าปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเล บริเวณหาดท่องเที่ยว 34

รูปที่ 4.2 ค่าปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเล บริเวณแหล่งเลี้ยงหอย 37

รูปที่ 4. 3 ค่าปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างหอยแมลงภู่ . 38

รูปที่ 4.4 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เอนเทอโรท็อกซิน SEA ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* 42

รูปที่ 4.5 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เอนเทอโรท็อกซิน SEB ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* 43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อ่าวไทยตอนในเป็นส่วนบนของอ่าวไทยมีรูปร่างเป็นอ่าวสี่เหลี่ยมรูปอักษร ก มีอาณาบริเวณตั้งแต่ชายฝั่งของจังหวัดสมุทรสงคราม สมุทรสาคร และสมุทรปราการลงไปจนถึงเส้นโยงระหว่างอำเภอหัวหินกับอำเภอสัตหีบ เขตชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนในเป็นบริเวณที่มีศักยภาพทั้งเป็นแหล่งท่องเที่ยว แหล่งประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญของไทย

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะเวลาไม่เกินสิบปีที่ผ่านมา โดยมีค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตอยู่ที่ร้อยละ 10 ต่อปีตั้งแต่ปี 1984 (FAO, 2005) เนื่องจากแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมักกระจายอยู่ตามชายฝั่งและปากแม่น้ำ ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนน้ำเสีย โดยเฉพาะเมื่อทำการเพาะเลี้ยงอยู่ใกล้กับแหล่งชุมชนขนาดใหญ่ อีกทั้งเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคสามารถพบเจอได้ในน้ำเสีย การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มาจากหลายแหล่ง เช่น ของเสียที่ยังไม่ได้บำบัดรวมกับฝนที่ตกลงมาแล้วชะเอาของเสียไหลลงมารวมกัน และมาจากแม่น้ำลำธารที่มีการทำเกษตรกรรมรวมถึงน้ำเสียจากชุมชน ทำให้มีปัญหาทางสาธารณสุขตามมา (Oliveira และคณะ, 2011)

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยยังพบปัญหาในหลายส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณอ่าวไทย พบปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียอยู่ในระดับที่สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานเพื่อการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง (การจัดการทรัพยากรชายฝั่งทะเลและมหาสมุทร กรมประมง, 2543) อ่าวไทยเป็นพื้นที่ชายฝั่งที่มีความสำคัญของประเทศไทยเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีความสำคัญ สัตว์น้ำที่นิยมทำการเพาะเลี้ยงได้แก่พวกหอยโดยเฉพาะหอยแมลงภู่ หอยแมลงภู่จัดเป็นหอยสองฝา ลำตัวหอยเป็นส่วนที่อ่อนนุ่มอยู่ภายในเปลือก ประกอบด้วยเยื่อหุ้มลำตัวคลุมอวัยวะภายในทั้งสองด้านซึ่งอยู่ติดกับฝาทั้งสองข้าง เท้ามีขนาดเล็กและมีต่อมสร้างเส้นใยยึดติด เหงือกขนาดใหญ่ยาวเท่ากับลำตัวหอย ภายในลำตัวหอยแมลงภู่ประกอบด้วย หัวใจอยู่เหนืออวัยวะภายในเป็นระบบเลือกเปิด เลือดของหอยแมลงภู่จะไม่มีสี อวัยวะที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนก๊าซคือเหงือก อวัยวะที่ใช้ในการกรองอาหารคือเหงือก (กรมประมง, 2548)

หอยกินอาหารโดยการกรอง จะดูดน้ำเข้ามาในตัวหอยทำให้มีการสะสมของสารพิษและเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในบริเวณแหล่งเพาะเลี้ยง (Ripabelli และคณะ, 1999, Topic และคณะ, 2010) หอยเป็นสัตว์น้ำที่มีค่าวอเตอร์แอคทีวิตี้สูง (A_w > 0.95) และมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 6.7-7.1 ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญในตัวของหอยได้ มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ

เมื่อมีการรับประทานเนื้อหอยที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เข้าไป (Jay, 1996) เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบในสัตว์น้ำและทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Escherichia.coli* และเชื้อที่พบในธรรมชาติ เช่น *Vibrio* sp. (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio cholerae*) (Oliveira และคณะ, 2011) โดยเฉพาะสัตว์น้ำที่มีเปลือกจะมีความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียที่บ่งชี้ความสกปรกอยู่สูง เมื่ออาศัยอยู่ในน้ำบริเวณที่มีเชื้อกระจายตัวอยู่ (De Donno และคณะ, 2008) หอยสองฝา เช่น หอยแมลงภู่จึงมีการสะสมของเชื้อก่อโรคเป็นจำนวนมากอยู่ในเนื้อของหอย และเชื้อแบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงเมื่ออาศัยอยู่ในหอยสองฝา (Solic และคณะ, 1999)

Staphylococcus aureus เป็นจุลินทรีย์ใน Family Micrococcaceae ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe คือ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน ซึ่งมีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก เป็นแบคทีเรีย ที่มีลักษณะกลม (0.5 – 1.0 ไมครอน) เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่อาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ (โดยมากไม่เกิน 4 เซลล์) อยู่ปะปนด้วยกันเสมอเวลาย้อมแกรม *Staphylococcus aureus* ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนีกลม (Murray และคณะ, 1998) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ส่วนมากพบเป็นเชื้อก่อโรคในอาหารและยังเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากมนุษย์ จากข้อมูลของ United States Department of Agriculture (USDA) จากปี 1993 ถึงปี 1997 พบผู้ป่วยจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* 1413 ราย (เสียชีวิต 1 ราย) และพบการระบาดของโรค 41 ครั้ง เชื้อ *Staphylococcus aureus* ไม่ได้พบเจอเฉพาะแต่ในอาหารที่ปรุงสุกแต่ยังสามารถพบเจอในอาหารสด เช่น ในเนื้อปลาหรือเนื้อหอยได้อีกด้วย (HAARD, 1992) อาหารทะเลเน่าเปื่อยได้ง่ายเมื่อเทียบกับอาหารประเภทอื่นและสามารถปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคจากแหล่งเพาะเลี้ยง คุณภาพความสะอาดของอาหารทะเลลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากหลายแหล่ง (Gram และ Huss, 1996)

โรคที่เกิดจากอาหารเป็นปัญหาหลักของสาธารณสุขทั่วโลก (Balaban และ Rasooly, 2000) WHO ได้ให้คำนิยามของโรคที่เกิดจากอาหาร คือ “โรคที่เกิดจากการติดเชื้อหรือจากสารพิษโดยสาเหตุของการติดโรคมาจากการบริโภคอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อโรคหรือสารพิษเจือปนอยู่” (Loir และคณะ, 2003) ในแต่ละปีประเทศสหรัฐอเมริกามีผู้ป่วย 76 ล้านคนที่ป่วยด้วยโรคที่เกิดจากอาหาร เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล 325,000 ราย และมีผู้เสียชีวิต 5,000 รายต่อปี (Mead และคณะ, 1999)

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อก่อโรคในอาหารที่มีความสำคัญ โดยพบผู้ป่วยประมาณ 241,000 รายต่อปีในประเทศสหรัฐอเมริกาที่ป่วยเป็นโรคที่เกิดจากอาหารโดยมีเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อก่อโรค (Scallan และคณะ, 2011) แต่ในความเป็นจริงโรคที่เกิดจากอาหารโดยมีเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อก่อโรค (*Staphylococcus aureus* food-

borne disease: SFD) มีจำนวนผู้ป่วยสูงกว่าที่มีการรายงานในประเทศสหรัฐอเมริกา (Bennett และคณะ, 2013) *Staphylococcus aureus* สามารถผลิตเอนไซม์และสารพิษได้หลายชนิด เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่สร้างเอนไซม์ coagulase ซึ่งจะเป็นเชื้อก่อโรค นอกจากนี้บางตัวยังผลิต Staphylococcal Enterotoxin (SEs) มี 12 ชนิดได้แก่ SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SHE, SEI, SEJ (Balaban และ Rasooly, 2000) และ SEK (Orwin และคณะ, 2001) SEs เป็นต้นเหตุในการเกิด Staphylococcal food poisoning ทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย ระยะเวลาที่ทำให้เกิดอาการอยู่ที่ 1-6 ชั่วโมงหลังจากทานอาหารที่ปนเปื้อน (Lelievre และคณะ, 1999)

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษา เรื่อง การปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเอนเทอโรท็อกซินในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) จากบริเวณอ่าวไทยตอนใน โดยมีจุดประสงค์เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวและบริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ และตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) และวิเคราะห์ยีนเอนเทอโรท็อกซินจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยแมลงภู่ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อประโยชน์ในการประเมินคุณภาพของน้ำทะเลในการเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนในของประเทศไทย ตลอดจนเป็นแนวทางในการบริหารจัดการคุณภาพการเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างน้ำทะเลและหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนใน

2. เพื่อตรวจหายีนเอนเทอโรท็อกซินจากหอยแมลงภู่ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบแนวโน้มปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวและแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวไทยตอนใน และปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหอยแมลงภู่ที่เพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตอนใน

2. ผลการตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มียีนเอนเทอโรท็อกซินจากหอยแมลงภู่สามารถใช้เป็นข้อมูลให้แก่ผู้เพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ ในการบริหารจัดการพื้นที่เพาะเลี้ยงให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

3. ทำให้ทราบถึงสภาพแวดล้อมทางทะเลของประเทศไทย และนำผลการศึกษามาใช้เป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมทางทะเลต่อไป

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาปริมาณของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวและแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ บริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตอนใน ศึกษาปริมาณของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่เพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตอนใน วิเคราะห์ยีนเอนเทอโรท็อกซิน A และยีนเอนเทอโรท็อกซิน B ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่เพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตอนใน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 อ่าวไทยตอนใน

อ่าวไทยตอนในเป็นส่วนบนของอ่าวไทยมีรูปร่างเป็นอ่าวสี่เหลี่ยมรูปอักษร ก มีอาณาบริเวณตั้งแต่ชายฝั่งของจังหวัดสมุทรสงคราม สมุทรสาคร และสมุทรปราการลงไปจนถึงเส้นโยงระหว่างอำเภอหัวหินกับอำเภอสัตหีบ อ่าวไทยตอนในมีระดับความลึกเฉลี่ย 20 เมตร มีพื้นที่ผิวทั้งหมดประมาณ 10,360 ตารางกิโลเมตร อ่าวไทยตอนในยังเป็นบริเวณรับน้ำจืดจากแม่น้ำ 4 สายคือ แม่น้ำแม่กลอง แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำบางปะกง การหมุนเวียนของน้ำในบริเวณส่วนบนของอ่าวถูกควบคุมโดยอิทธิพลของน้ำขึ้นน้ำลงและกระแสลม เขตชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนในเป็นบริเวณที่มีศักยภาพทั้งเป็นแหล่งท่องเที่ยว มีหาดท่องเที่ยวที่สำคัญคือ หาดบางแสน หาดพัทยา หาดชะอำและหาดหัวหิน อีกทั้งอ่าวไทยตอนในยังเป็นแหล่งประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญของไทย

2.1.1 แหล่งทำการประมงบริเวณอ่าวไทยตอนใน

การทำประมงในบริเวณอ่าวไทยตอนในจะครอบคลุมบริเวณชายฝั่งด้านตะวันออก คือตั้งแต่ จังหวัดชลบุรี ไปจนถึงทางด้านตะวันตก จังหวัดเพชรบุรี โดยแหล่งทำการประมงสามารถแบ่งได้ตามบริเวณจังหวัดทั้ง 5 จังหวัดดังนี้

1) บริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี แบ่งออกเป็น 3 แหล่ง คือตำบลศรีราชา อยู่บริเวณรอบเกาะสีชัง ตำบลบางเสร่ อยู่ในบริเวณระหว่างเกาะล้านกับเกาะไผ่ และตำบลสัตหีบ อยู่ในบริเวณหน้าสัตหีบ

2) บริเวณชายฝั่งจังหวัดสมุทรปราการ แนวบริเวณกลางอ่าวไทย

3) บริเวณชายฝั่งจังหวัดสมุทรสาคร ตำบลมหาชัย บริเวณแนวกลางคลองและบริเวณทิศตะวันออกร่องเรือใหญ่

4) บริเวณจังหวัดสมุทรสงคราม ตำบลแม่กลองและแนวบริเวณก้นโป๊ะเยื้องไปทางตำบลมหาชัย จังหวัดสมุทรสาคร

5) บริเวณจังหวัดเพชรบุรี บริเวณชายฝั่งแนวปะการัง หน้าหาดเจ้าสำราญและ บริเวณหน้าหาดบางแก้ว

2.1.2 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (อรเอม ตั้งกิจงามวงศ์, 2553, สุทธิชัย ฤทธิธรรม, 2555)

ลักษณะการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม พื้นทะเล และคุณภาพน้ำของบริเวณชายฝั่งแต่ละแห่ง โดยในจังหวัดชลบุรีพบว่า มีการเลี้ยงกุ้งและหอยทะเลกระจายตัวตามบริเวณชายฝั่งทะเล ครอบคลุม 5 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเมือง บางละมุง ศรีราชา เกาะสีชัง และสัตหีบ ส่วนใหญ่พื้นที่เพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ หอยแครง และหอยนางรม จะอยู่ในบริเวณอ่าวชลบุรี ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลตำบลอ่างศิลาจนถึงตำบลหนองไม้แดง ส่วนในจังหวัดฉะเชิงเทรา ส่วนใหญ่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลกระจายตัวอยู่เกือบทุกพื้นที่ ยกเว้นอำเภอท่าตะเกียบและสนามชัยเขต ส่วนการเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเล อำเภอบางปะกงเท่านั้น ในขณะที่บริเวณปากแม่น้ำบางปะกงยังมีการเลี้ยงปลากะพงในกระชังอีกด้วย

บริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดสมุทรปราการมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง หอยแครง และหอยแมลงภู่ ในบริเวณเขตอำเภอเมือง อำเภอพระสมุทรเจดีย์ และอำเภอบางบ่อ มีพื้นที่เป็นชายฝั่งทะเลยาวประมาณ 47 กิโลเมตร เนื่องจากพื้นที่นี้อยู่ในบริเวณปากน้ำเจ้าพระยาจึงส่งผลให้มีความอุดมสมบูรณ์ด้วยธาตุอาหารเป็นอย่างมาก เหมาะที่จะเป็นแหล่งที่อยู่อาศัย และแหล่งอาหารของสัตว์น้ำชายฝั่งหลายชนิด ปัจจุบันทางราชการได้ประกาศที่อนุญาตเลี้ยงหอยแมลงภู่เพียงอำเภอเดียวคือ อำเภอพระสมุทรเจดีย์ ส่วนการเลี้ยงปลากะพงขาว มีเลี้ยงมากในเขตอำเภอบางบ่อ รองลงมาในเขตอำเภอพระสมุทรเจดีย์ และอำเภอเมือง ในขณะที่กรุงเทพมหานคร มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งทะเลในบริเวณเขตบางขุนเทียนเป็นพื้นที่เดียวที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล หอยแครง ปู และปลา

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในจังหวัดสมุทรสาครเดิมเป็นพื้นที่ที่ดำเนินกิจกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างกว้างขวาง แต่หลังจากเกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ปัจจุบันพื้นที่เพาะเลี้ยงกุ้งแถบชายฝั่งเป็นเพียงการเก็บเกี่ยวสัตว์น้ำด้วยการเปิดน้ำเข้าน้ำออกตามธรรมชาติเท่านั้น อาจมีการปล่อยลูกหอยแครงเสริมเพื่อเป็นรายได้เสริมประจำปีเท่านั้น พื้นที่เลี้ยงกุ้งบางพื้นที่ยังคงถูกปล่อยให้รกร้างและรอการใช้ประโยชน์ด้านอื่นที่ได้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจสูงกว่าการเลี้ยงกุ้ง และไม่พบกิจการเลี้ยงปูนิ่มในพื้นที่ชายฝั่งสมุทรสาครแล้ว อาชีพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ยังคงดำเนินกิจการอยู่ส่วนใหญ่อยู่ในเขตอำเภอบ้านแพ้ว โดยจำนวนฟาร์มสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสถานการณ์ของราคาผลผลิตและปัจจัยการผลิต การปักหลักเลี้ยงหอยแมลงภู่มีอยู่ริมบริเวณชายฝั่งทะเลแถบตำบลพันท้ายนรสิงห์

จังหวัดสมุทรสงครามมีลักษณะการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งคล้ายกับจังหวัดสมุทรสาคร กล่าวคือพื้นที่ชายฝั่งทะเลเกือบทั้งหมดถูกเปลี่ยนให้เป็นพื้นที่เลี้ยงกุ้ง แต่ในปัจจุบันนี้พื้นที่เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่ถูกปล่อยให้รกร้าง จะมีเฉพาะบางพื้นที่เท่านั้นที่ยังเลี้ยงกุ้งอยู่ หรือบางรายอาจเปลี่ยนไปเลี้ยงปูหรือปลาแทน ในขณะที่พื้นที่ในทะเลยังมีการเพาะเลี้ยงหอยแครงและหอยแมลงภู่ กระจายตัวตลอด

แนวชายฝั่ง จังหวัดสมุทรสงครามยังมีพื้นที่ดอนหอยหลอด มีหอยเศรษฐกิจอาศัยอยู่หลายชนิด ได้แก่ หอยลาย หอยแครง หอยหลอด เป็นต้น โดยเฉพาะหอยหลอดมีมากที่สุด ดอนหอยหลอดนี้ซึ่งเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าทั้งในแง่นิเวศวิทยาและเป็นแหล่งรายได้ให้กับคนในท้องถิ่น

จังหวัดเพชรบุรีพบว่าพื้นที่เพาะเลี้ยงกุ้งทะเลกระจายตัวอยู่ในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะที่อำเภอเมืองและอำเภอเขาย้อยมีปริมาณพื้นที่เพาะเลี้ยงมากกว่าสองพันไร่ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงหอยทะเลมีอยู่เฉพาะในอำเภอบ้านแหลมเท่านั้น

2.2 หอยแมลงภู่

2.2.1 ลักษณะทางกายภาพของหอยแมลงภู่

หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) จัดอยู่ในไฟลัมมอลลัสคาเป็นหอยสองฝา สีของเปลือกเปลี่ยนไปตามสภาพการอยู่อาศัย กล่าวคือ ถ้าอยู่ใต้น้ำตลอดเวลามีสีเขียวอมดำ ถ้าอยู่บริเวณน้ำขึ้นน้ำลง ถูกแดดบ้างเปลือกจะออกเหลือง เปลือกด้านนอกมีสีเขียว ส่วนท้ายจะกว้างกว่าส่วนหน้า เนื้อหอยมีสีเหลืองนวลหรือสีส้ม มีหนวดหรือเส้นใยเหนียวสำหรับเกาะหลักเรียกว่า เกสร หรือ ซัง

หอยแมลงภู่ มีความยาวตั้งแต่ 4-20 เซนติเมตร ขนาดความยาวของเปลือกหอยที่สามารถสืบพันธุ์ได้มีความยาวตั้งแต่ 2-3 เซนติเมตรขึ้นไป เป็นหอยที่กระจายพันธุ์ทั่วไปในทะเลแถบอินโดแปซิฟิก กินอาหารโดยการกรองอาหารจากมวลน้ำทะเล อวัยวะที่ใช้ในการกรองอาหารคือ เหงือก หอยจะดูดน้ำทะเลผ่านเข้ามาในเปลือก และเหงือกจะกรองอาหารและส่งเข้าปาก ผ่านทางเดินอาหาร ส่วนกากอาหารและตะกอนจะถูกขับออกทางทวารหนัก ซึ่งเปิดออกทางท้ายลำตัว อาหารส่วนใหญ่เป็นแพลงก์ตอนพืชและสัตว์ขนาดเล็ก โปรโตซัว และอินทรีย์วัตถุที่แขวนลอยในน้ำทะเล ทำให้หอยแมลงภู่มีการสะสมการปนเปื้อนที่แตกต่างกันจากน้ำในบริเวณที่เพาะเลี้ยง เช่น แบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต สารพิษ โลหะหนัก ยาฆ่าแมลงหรือยาปฏิชีวนะ (Topic และคณะ, 2010) De Donno และคณะ (2008) พบว่าสัตว์น้ำที่มีเปลือก เช่น หอยจะมีความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียที่บ่งชี้ความสกปรกอยู่สูงโดยเฉพาะเมื่ออาศัยอยู่ในน้ำบริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียกระจายตัวอยู่ ดังนั้นจึงเป็นการบอกคุณภาพของน้ำได้เป็นอย่างดี และทำให้เข้าใจได้ว่าหอยสองฝา เช่น หอยแมลงภู่มีเชื้อก่อโรคเป็นจำนวนมากอยู่ในเนื้อของหอยและเชื้อแบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้นเมื่ออาศัยอยู่ในหอยสองฝา (Solic และคณะ, 1999) หอยแมลงภู่มีทั้งเพศแยก และมีสองเพศในตัวเดียวกัน มีการผสมพันธุ์นอกลำตัว หอยเพศผู้จะมีลำตัวหรือที่ห่อหุ้มตัวสีครีมหรือขาว ส่วนเพศเมียจะมีสีส้ม มีช่วงฤดูสืบพันธุ์อยู่ 2 ช่วงในรอบ 1 ปี คือช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม และช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน-กุมภาพันธ์

2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหอยแมลงภู่ (กรมประมง, 2553)

2.2.2.1 อาหารจากธรรมชาติ

อาหารของหอยแมลงภู่ส่วนใหญ่เป็นสัตว์และพืชขนาดเล็กที่เรียกว่า "แพลงก์ตอน" ซึ่งลอยปะปนอยู่ในน้ำทะเล หอยแมลงภู่จะกินโดยการดูดน้ำเข้าไปแล้วกรองเอาอาหารโดยใช้การโบกพัดของขนตามซี่เหงือก ถ้าบริเวณเลี้ยงหอยมีอาหารอุดมสมบูรณ์หอยจะเจริญเติบโตเร็ว

2.2.2.2 ความขุ่นของน้ำ

ถ้าน้ำขุ่นมากตะกอนจะไปเกาะตามซี่เหงือกของหอย ทำให้ระบบหายใจและการกรองอาหารทำงานไม่ปกติ นอกจากนี้ยังมีผลทำให้แพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของหอยแมลงภู่มีน้อยลง เนื่องจากไปบังแสงแดดซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์แสง

2.2.2.3 ภาวะน้ำจืดไหลลงในทะเล

เป็นผลให้น้ำทะเลมีความเค็มต่ำเป็นครั้งคราว ทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่มีอยู่ลดลง ทำให้สภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป และถ้าหอยแมลงภู่อยู่ในน้ำที่มีความเค็มต่ำนานไปจะทำให้หอยชะงักการเจริญเติบโต อัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นเป็นผลให้ได้ผลผลิตน้อยลง

2.2.2.4 ภาวะน้ำเสีย

ภาวะน้ำเสียที่ผู้เลี้ยงหอยประสบมักเป็นน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งประกอบด้วยสารพิษและโลหะหนักต่าง ๆ ถ้าแหล่งเลี้ยงหอยอยู่ใกล้โรงงานอุตสาหกรรม หอยแมลงภู่จะได้รับสารพิษและโลหะหนักต่าง ๆ เหล่านี้ และทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้

2.2.2.5 ความเค็มของน้ำ

หอยแมลงภู่จะเจริญเติบโตได้ในแหล่งน้ำกร่อยและน้ำเค็ม ความเค็มที่เหมาะสมในการเลี้ยงหอยแมลงภู่จะอยู่ในช่วง 25-33 ส่วนในพันส่วน (ppt) ถ้าน้ำมีความเค็มสูงหรือต่ำกว่านี้จะเป็นผลให้อัตราการกรองอาหารของหอยแมลงภู่ช้าลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.2.6 ระยะเวลาที่หอยอยู่ในน้ำ

หอยที่อยู่ในน้ำตลอดเวลาจะโตได้ดีกว่าหอยที่อยู่ในน้ำบางช่วงเวลา เนื่องจากหอยที่อยู่ในน้ำตลอดเวลาจะได้รับอาหารตลอดเวลา

2.2.2.7 กระแสน้ำและคลื่นลม

หอยแมลงภู่เป็นหอยที่เกาะอยู่กับที่ ดังนั้นต้องอาศัยกระแสน้ำที่ไหลเวียนอย่างช้าและสม่ำเสมอพัดพาอาหารธรรมชาติมาให้

2.2.2.8 อุณหภูมิของน้ำ

บริเวณเลี้ยงหอยแมลงภู่ของประเทศไทยส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่เป็นอ่าวและชายฝั่งทะเล ซึ่งมีอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส แต่ในบางแหล่งที่เลี้ยงในเขตน้ำตื้น อุณหภูมิของน้ำจะสูงมากในช่วงเวลาเที่ยงถึงบ่าย โดยเฉพาะในช่วงหน้าร้อนเมื่อระดับน้ำทะเลต่ำสุด จะเป็นผลให้หอยแมลงภู่ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงเป็นระยะเวลานานได้ จึงทำให้หอยมีอัตราการตายสูง

2.2.2.9 พื้นที่สำหรับการยึดเกาะ

เมื่อหอยแมลงภู่มีขนาดโตขึ้นก็มีความต้องการพื้นที่ยึดเกาะเพิ่มขึ้นด้วย ถ้าหากหอยแมลงภู่มีปริมาณความหนาแน่นมาก หอยที่ตัวโตกว่าแข็งแรงกว่าจะเบียดหอยที่อ่อนแอกว่าร่วงหล่นไป นอกจากนี้ถ้าปริมาณหอยแมลงภู่ที่เกาะมีความหนาแน่นมาก จะทำให้การเจริญเติบโตช้ากว่าในพื้นที่ที่มีปริมาณความหนาแน่นของหอยแมลงภู่ที่เหมาะสม

2.2.2.10 ศัตรูของหอยแมลงภู่

ศัตรูของหอยแมลงภู่ในธรรมชาติได้แก่ ปลา โดยเฉพาะพวกที่มีฟันแหลม เช่น ปลากระเบน นอกจากนี้ยังมีสัตว์กลุ่มอื่น ๆ เช่น ดาวทะเล เม่นทะเล ปูใบ้ ส่วนสัตว์ที่แย่งที่อยู่ของหอยแมลงภู่ได้แก่ เพรียงหิน ฟองน้ำ เป็นต้น

2.3 *Staphylococcus aureus*

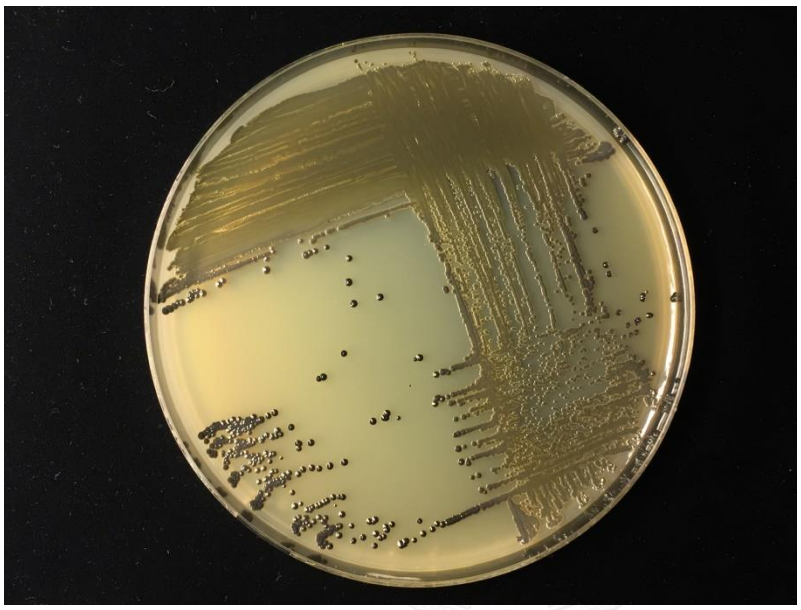
2.3.1 ลักษณะทั่วไปของ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus จัดอยู่ใน Family Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5-1.5 ไมโครเมตร เรียงตัวกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) .ให้ผลคะตะเลส (Catalase) เป็นบวก (Eley, 1996) มีการสร้างแคปซูล และเมือกในบางสายพันธุ์เพิ่มความรุนแรงในการก่อโรคมากขึ้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2545) โคโลนีบนอาหารแข็ง เช่น Trypticase Soy Agar (TSA) มีลักษณะขอบเรียบ กลมนูน เป็นมันเงา มีสีขาวเทา หรือเทาจนถึงสีเหลืองทองและสีส้ม ส่วนลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ เช่น Baird Parker Agar (BPA) ที่มีส่วนผสมของ lithium chloride และ potassium tellurite เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นยกเว้นเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถเปลี่ยน tellurite เป็น telluride ทำให้โคโลนีของเชื้อจะมีสีเทาเข้มถึงดำเป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบ มีเส้นตะกอนสีขาวขุ่นล้อมรอบโคโลนี (รูปที่ 2.1) และบนอาหาร Mannitol Salt Agar (MSA) อาหารชนิดนี้มีส่วนผสมของ sodium chloride สูงถึงร้อยละ 7.5 เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และในอาหารยังมีส่วนผสมของน้ำตาลแมนนิทอล เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่สามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้จะทำให้มีโคโลนีสีเหลืองเป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบ (รูปที่ 2.2) (Capita และคณะ, 2002)

Staphylococcus aureus โดยทั่วไปสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่หลากหลายตั้งแต่ 7-47 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4-9.8 แต่จะเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างที่ 6-7 และมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ เช่น ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (Water Activity: a_w) ที่สามารถเจริญได้ในช่วง 0.83-0.99 และเจริญได้ดีที่สุดที่ 0.99 (Bremer และคณะ, 2004) ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลจำกัดการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Bremer และคณะ, 2004)

Min. Temp (°C)	Max. Temp (°C)	Min. pH	Max. pH	Max. % Salt	Min a_w	Oxygen Requirement
6-7	45-47	4.0	9.8	7-10 up to 20	0.83	Facultative Anaerobe



รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Baird Parker Agar (Capita และคณะ, 2002)

รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Mannitol Salt Agar (Capita และคณะ, 2002)

Staphylococcus aureus เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินหายใจส่วนบน ผิวหนัง จมูก มือ เป็นต้น ดังนั้นการสัมผัสจึงมีโอกาสในการแพร่เชื้อได้ เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีและเป็นเชื้อที่สามารถพบเจอได้ทั่วไปบนผิวหนังตามร่างกาย ทำให้ร่างกายมนุษย์เป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน

2.3.2 การจำแนก *Staphylococcus* (Bergdoll, 1989)

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Micrococcaceae ที่ก่อให้เกิดโรคเป็นแบคทีเรียทรงกลมซึ่งแบ่งออกได้ 2 ลักษณะ คือ อยู่รวมกันเป็นสายยาว เรียกว่า *Streptococcus* และอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า *Staphylococcus* สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* มีโคโลนีสีเหลืองและ *Staphylococcus albus* มีโคโลนีสีขาว ยังมี *Staphylococcus* ชนิดอื่นอีกแต่ถูกจัดไว้ในกลุ่มของ *Micrococcus* แต่ต่อมาถูกแยกออกมาอย่างชัดเจนเนื่องจาก *Staphylococcus* สามารถเจริญและผลิตกรดจากกลูโคสในสภาวะไม่มีออกซิเจนได้ในขณะที่ *Micrococcus* ไม่สามารถผลิตได้บางครั้งอาจพบเป็นเซลล์เดียว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ *Staphylococcus* จากนั้นจึงได้มีการศึกษาเพิ่มเติมทำให้สามารถจำแนกสปีชีส์ของ *Staphylococcus* ได้เพิ่มมากขึ้น (Bergdoll, 1989)

แต่เดิมจำแนกระหว่าง *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus albus* จากสีของโคโลนีแต่ต่อมาพบว่าวิธีที่ใช้จำแนกนี้ไม่เป็นที่ยอมรับเพราะสีของโคโลนีมีโอกาสเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม โดยพบว่า *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus albus* เป็นเชื้อชนิดเดียวกัน ต่อมาหลังจากค้นพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ก็ได้มีการรายงานถึงเชื้ออันดับที่สอง คือ *Staphylococcus epidermidis* และอันดับที่สาม คือ *Staphylococcus saprophyticus* ในการจำแนกเชื้อทั้งสามชนิดออกจากกันอาศัยการเกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลส จากนั้นวิธีนี้จึงเป็นที่นิยมในการใช้จำแนกเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* ทำให้ในปัจจุบันพบ *Staphylococcus* ถึง 13 ชนิด และทั้งหมดให้ผลโคแอกกูเลสเป็นลบ ยกเว้น *Staphylococcus intermedius* และ *Staphylococcus hyicus* ที่ให้ผลโคแอกกูเลสเป็นได้ทั้งบวกหรือลบ โดยก่อนจะพบเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีเพียงเชื้อ *Staphylococcus aureus* เท่านั้นที่ให้ผลโคแอกกูเลสเป็นบวกและสามารถผลิตทีเอ็นเอส (Thermonuclease: TNase) ได้ (Bergdoll, 1989) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2545)

คุณสมบัติ	ชนิดของ Staphylococcus				
	S.aureus	*S.intermedius*	*S.hyicus*	*S.epidermidis*	*S.saprophyticus*
การสร้างเม็ดสี	+	-	-	-	-
โคแอกกูเลส	+	+	+/-	-	-
ทีเอ็นเอส	+	+	+	-	-
ฮีโมไลซิส	+	+	-	+/-	-
หมักน้ำตาลแมนนิทอล*	+	-	-	-	-

*หมักในสภาวะไร้ออกซิเจน

2.3.3 เอนไซม์นอกเซลล์ (Extracellular Enzyme) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2545)

2.3.3.1 โคแอกกูเลส (Coagulase)

เป็นเอนไซม์ที่ทำให้พลาสมาแข็งตัวโดยเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) เป็นไฟบริน (Fibrin) โดยการทำงานของโคแอกกุเลสจะทำให้เกิดไฟบรินมาล้อมรอบเชื้อ ทำให้ป้องกันกระบวนการฟาโกไซโตซิส

2.3.3.2 ลิเพส (Lipase)

เอนไซม์ลิเพสใช้สำหรับย่อยซับสเตรต เช่น พลาสมา ไขมัน ที่สะสมอยู่ที่ผิวหนัง การที่เชื้อใช้เอนไซม์ชนิดนี้ได้ทำให้เชื้อสามารถที่จะอยู่รอดและอธิบายถึงการอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (Colonization) ของเชื้อที่ต่อมเหงื่อ การที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ลิเพสจึงทำให้เชื้อสามารถเข้าสู่ผิวหนังได้

2.3.3.3 ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase)

เชื้อ *Staphylococcus aureus* มากกว่าร้อยละ 90 สามารถที่จะผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ย่อยกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic Acid) ที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายไปตามเนื้อเยื่อได้ง่ายขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.3.4 สแตฟฟิโลไคเนส (Staphylokinase)

เป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายไฟบรินทำให้เลือดไม่แข็งตัว มีคุณสมบัติทางแอนติเจน ซึ่งแตกต่างจากสเตรปโตไคเนส (Streptokinase) ที่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดย *Streptococcus* เชื้อ *Staphylococcus aureus* ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์นี้ได้

2.3.3.5 นิวคลีเอส (Nuclease)

เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อน จะถูกปล่อยออกมาระหว่างการเจริญของ *Staphylococcus aureus* เมื่อให้ความร้อนถึง 65 องศาเซลเซียสจะทำลายโครงสร้างของเอนไซม์นี้ได้ แต่ยังมีการรายงานว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถที่จะอยู่รอดในน้ำเดือดได้นานถึง 30 นาที โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ได้ลดลง

2.3.4 ทอกซิน (Toxin) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2545)

2.3.4.1 ไซโทไลติกทอกซิน

ไซโทไลติกทอกซินที่สร้างโดยเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้แก่ ฮีโมไลซิน (Hemolysin) และลิวโคซิติน (Leukocidin) ซึ่งฮีโมไลซินยังจำแนกได้ 4 ชนิด คือ แอลฟาฮีโมไลซิน บีตาฮีโมไลซิน เดลตาฮีโมไลซิน และแกมมาฮีโมไลซิน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.4.1.1 แอลฟาฮีโมไลซิน

มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 34,000 ดาลตัน สามารถทำลายเกล็ดเลือด (platelets) ของคน และเม็ดเลือดแดงของกระต่าย หากฉีดเข้าหลอดเลือด จะทำให้สัตว์ทดลองตายได้ถ้าฉีดใต้ผิวหนังกระต่ายจะทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงทำให้เนื้อเยื่อส่วนนั้นเน่าได้

2.3.4.1.2 บีตาฮีโมไลซิน

มีคุณสมบัติเป็น sphingomyelinase น้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดาลตัน ทำให้เม็ดเลือดแดงของแกะ วัว กระต่าย และคนเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ในอาหาร sheep blood agar เมื่อบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส จะเกิดโซนที่ไม่มีสีรอบโคโลนี การทำลายเม็ดเลือดจะเกิดได้ดีเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่ำ (10-20 องศาเซลเซียส) จึงเรียก hemolysin ชนิดนี้ว่า hot–cold hemolysin

2.3.4.1.3 เดลตาฮีโมไลซิน

มีคุณสมบัติเป็น phospholipase น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน จะเกิด clear zone ขนาดเล็กรอบๆ โคโลนีที่เลี้ยงบนอาหาร human, rabbit monkey, sheep, horse, rat, mouse และ guinea pig blood agar ฮีโมไลซินชนิดนี้จะย่อยเม็ดเลือดแดงแบบ β- hemolysin ล้อมรอบโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* ที่เจริญบนอาหาร blood agar และมีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวและต่อเนื้อเยื่ออื่นๆ หลายชนิด

2.3.4.1.4 แกมมาฮีโมไลซิน

ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดสามารถทำหน้าที่ร่วมกันทำลายเม็ดเลือดแดงของคน กระต่าย และ แกะ hemolysin ชนิดนี้มีฤทธิ์น้อยกว่าชนิดอื่นๆและไม่ค่อยสำคัญในการก่อโรค

2.3.4.1.5 ลิวโคซิติน (Leukocidin)

เป็นสารพิษที่ขับออกมานอกเซลล์ มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน และมีความเป็นพิษต่อกระต่ายและคน ละลายน้ำได้ง่าย ไม่ทนร้อน สามารถออกฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด polymorphonuclear และ macrophage แต่ไม่มีผลกับเซลล์ชนิดอื่นๆ

2.3.4.2 เอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin)

เอนเทอโรท็อกซินที่สร้างจาก *Staphylococcus aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Gomez Lucia และคณะ, 1992) เอนเทอโรท็อกซินเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 28,000-35,000 ดาลตัน มีทั้งหมด 10 ชนิดได้แก่ A, B, C_1, C_2, C_3, D, E, G, H, และ I เอนเทอโรท็อกซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้นานประมาณ 30 นาที เอนเทอโรท็อกซินเป็นสารพิษที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหารเนื่องจากเอนเทอโรท็อกซินสามารถทนต่อน้ำย่อยในทางเดินอาหาร การรับเอนเทอโรท็อกซินปริมาณเพียง 1 ไมโครกรัม เข้าสู่ร่างกายเป็นสาเหตุให้กระเพาะและลำไส้อักเสบได้ (Martin และคณะ,2001)

2.3.4.3 เอกซ์โฟลิเอทีฟทอกซิน (Exfoliative toxin)

ทำให้เกิดโรคผิวหนังลอกหลุด (staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS) หรือ Ritter's disease จะพบ exfoliative toxin ได้ 2 รูปแบบคือ ETA (Exfoliative toxin A) และ ETB (Exfoliative toxin B) ETA ทนต่อความร้อน ยีนจะอยู่บนโครโมโซม ส่วน ETB จะไม่ทนความร้อน

และยีนอยู่บนพลาสมิด กลไกการก่อโรคยังไม่ทราบแน่นอน แต่คาดว่า ETA และ ETB จะจับกับ GM4 ที่จับอยู่กับ glycolipid ส่วนใหญ่โรค SSSS จะพบในเด็กเล็ก ส่วนเด็กโต และผู้ใหญ่จะพบน้อยมาก (Murray และคณะ, 2002; Humphrey, 2002)

2.3.4.4 ทอกซินชอคซินโดรม (Toxic shock syndrom toxin: TSST-1)

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่สร้างสารพิษชนิดนี้ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ไวต่อ phage type 29 หรือ 52 และมักมียีนที่ดื้อต่อแคดเมียม สารหนูและเพนิซิลลินร่วมอยู่ด้วย TSST-1 ทำให้เกิดกลุ่มอาการ เช่น ไข้สูงความดันลดลง ช็อค หมดสติ ที่เรียกว่า Toxic Shock Syndrome ส่วนใหญ่จะเกิดกับหญิงที่ใช้ผ้าอนามัยแบบสอด ซึ่งสามารถดูดซับได้มากและทิ้งไว้ในช่องคลอดเป็นเวลานาน เชื้อจึงเจริญและสร้างสารพิษได้ สารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดทางช่องคลอดหรือจากบาดแผลที่มีการติดเชื้อ สารพิษมีบทบาทเป็น superantigen ทำให้เกิดกลุ่มอาการต่างๆมากมาย คือ ไข้สูง อาเจียน ท้องเสียปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เกิดการช็อคเนื่องจากสูญเสียน้ำ มีผื่นแดง และการหลุดลอกของผิวหนังคล้ายกับ scald skin syndrome แต่มักจะรุนแรงกว่า (Tsen และคณะ, 1998; Dinges และคณะ, 2000; Schlievert และคณะ, 2000)

2.3.5 คุณสมบัติของเอนเทอโรท็อกซิน

เอนเทอโรท็อกซินที่บริสุทธิ์ มีลักษณะเป็นผงยุ่ยๆ (fluffy) สีขาว ดูดความชื้นได้ง่ายละลายได้ดีในน้ำ และสารละลายของเกลือ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าโมเลกุลของเอนเทอโรท็อกซินเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างโมเลกุลอย่างง่าย (simple protein) ประกอบด้วย single polypeptide chain ที่มีกรดอะมิโน 19 ตัว มีปริมาณ lysine, aspartic acid และ tyrosine ค่อนข้างสูง มีรูปร่างเป็นแบบ prolate ellipsoid ไม่พบว่ามี sulfhydryl groups ที่เป็นอิสระ และพบว่ามี disulfide bridge เพียงอันเดียวแต่ไม่มีความสำคัญต่อการทำให้เกิดพิษ นอกจากนี้ยังไม่พบส่วนประกอบของสารเหล่านี้เลย คือ carbohydrate, nucleic acid, lipid, coagulase, fibrinogen, proteolytic enzyme, α-hemolysin, β-hemolysin และยังพบว่า เอนเทอโรท็อกซินทนทานต่อ proteolytic enzyme หลายชนิด เช่นrennin, papain, trypsin, chymotrypsin แต่สำหรับ pepsin มีผลต่อประสิทธิภาพของเอนเทอโรท็อกซินที่ pH ต่ำกว่า 2 เท่านั้น (Schantz และคณะ, 1965; Chu และคณะ, 1966; Casman และคณะ, 1967; Chang และ Bergdoll, 1979)

2.3.5.1 *ชนิดของเอนเทอโรท็อกซิน*

2.3.5.1.1 เอนเทอโรท็อกซินชนิด A (SEA)

มีน้ำหนักโมเลกุล 27,100 ดาลตัน สัมประสิทธิ์การตกตะกอน (sedimentation coefficient, $S°_{20,W}$) 3.04 S สัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (Diffusion coefficient, $D°_{20,W}$) 7.94 X 10^{-7} cm^2sec^{-1} ปริมาณของไนโตรเจน (Nitrogen content) ร้อยละ16.5, Reduction viscosity (dl/g) มีค่า 0.0407 เดซิลิตรต่อกรัม Isoelectric point มีค่า 6.8 Partial specific volume เท่ากับ 0.726 ผลกระทบของความร้อนที่มีต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของเอนเทอโรท็อกซินชนิด A คือ เมื่อได้รับความร้อน 80 องศาเซลเซียส และ100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และ 1 นาที ตามลำดับ สารพิษจะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี แต่ถ้า SEA ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 0.05 M sodium phosphate, pH 6.85 เมื่อได้รับความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีจะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีไปเพียงร้อยละ 50 เท่านั้น เมื่อป้อน SEA บริสุทธิ์ให้สัตว์กินในปริมาณ 5 ไมโครกรัมจะทำให้สัตว์อาเจียนถึงร้อยละ50 (ED_{50}; effective dose เท่ากับ 5 ไมโครกรัม) นอกจากนี้ เพื่อหลีกเลี่ยงการเสื่อมสภาพ (Denaturation) และเพื่อลดกิจกรรมของเอนไซม์ของเอนเทอโรท็อกซินชนิด A ควรเก็บไว้ในตู้เย็นหรือในลักษณะที่แห้ง ถึงแม้ว่าจะตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease) ในระหว่างการทำให้เอนเทอโรท็อกซินบริสุทธิ์ก็ตาม (Chu และคณะ, 1966 ; Renolds และคณะ, 1988)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.5.1.2 เอนเทอโรท็อกซินชนิด B (SEB)

มีน้ำหนักโมเลกุล 28,366 ดาลตัน สัมประสิทธิ์การตกตะกอน (sedimentation coefficient, $S°_{20,W}$) 2.89S สัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (Diffusion coefficient, $D°_{20,W}$) 7.72 X 10-7 cm2sec-1 ปริมาณของไนโตรเจน (Nitrogen content) ร้อยละ16.1 Reduction viscosity (dl/g) มีค่า 0.0392 เดซิลิตรต่อกรัม Isoelectric point มีค่า 8.6 Partial specific volume เท่ากับ 0.743 มี Glutamic acid และ lysine เป็น N-terminal และ C-terminal ตามลำดับผลกระทบของความร้อนที่มีต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของเอนเทอโรท็อกซินชนิด B คือ เมื่อได้รับความร้อน 60 องศาเซลเซียส และที่ pH 7.3 เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมงไม่สามารถทำลายความรุนแรงของสารพิษนี้ได้ และการให้ความร้อนมากกว่า 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีน้อยกว่าร้อยละ 50 (Schantz และคณะ, 1965)

2.3.5.1.3 เอนเทอโรท็อกซินชนิด C (SEC)

มี 3 ชนิด คือ SEC1 และ SEC2 มีน้ำหนักโมเลกุล 27,531 SEC3 มีน้ำหนักโมเลกุล 27,563 ดาลตัน สัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (Diffusioncoefficient, $D°_{20}$,W) 8.10 X 10-7 cm2sec-1 ปริมาณของไนโตรเจน (Nitrogen content) ร้อยละ16.2 (Strain 137) หรือร้อยละ 16.0 (Strain 361) Instrinsic viscosity 3.4 มิลลิลิตรต่อกรัม (Strain 137) หรือ 3.7 มิลลิลิตรต่อกรัม (Strain 361) Isoelectric point มีค่า 8.6 ใน veronal buffer (Strain 137) หรือ 7.0 ใน sodium phosphate buffer (Strain 361) มี glutamic acid และ glycine เป็น N- terminal และ C-terminal ตามลำดับ ผลกระทบของความร้อนที่มีต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของเอนเทอโรท็อกซินชนิด C คือ เมื่อได้รับความร้อน 52 องศาเซลเซียสจะทำให้ความขุ่นเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามระดับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และเมื่อได้รับความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีประมาณร้อยละ 20 เมื่อฉีด SEC บริสุทธิ์ปริมาณ 5 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง จะทำให้สัตว์อาเจียนถึงร้อยละ 50 (ED_{50} , effective dose เท่ากับ 5 ไมโครกรัม) คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของเอนเทอโรท็อกซินชนิด C ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ถ้าหากเก็บไว้ในลักษณะที่แห้ง ที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บไว้ได้นาน 4 เดือน เมื่อเอนเทอโรท็อกซินอยู่ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer, pH5.5-7.5 เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1เดือน จะทำให้คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนสูญเสียไปเล็กน้อย เมื่อบ่มสารละลายไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนจะสูญเสียไป ถ้าหากบ่มสารละลายที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจะทำให้สารละลายขุ่นได้ (Huang และคณะ, 1967)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.5.1.4 เอนเทอโรท็อกซินชนิด D (SED)

มีน้ำหนักโมเลกุล 26,360 ดาลตัน Isoelectric point มีค่า 7.4 มี serine และ lysine เป็น N-terminal และ C-terminal ตามลำดับ ผลกระทบของความร้อนที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนเทอโรท็อกซินชนิด D คือ ประมาณร้อยละ 50 ของปฏิกิริยาทางซีรั่มวิทยาจะสูญเสียไปอย่างรวดเร็วในช่วง 2-3 นาทีแรก เมื่อได้รับความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส และ 100องศาเซลเซียส แต่หลังจากนั้นการสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจะอยู่ในอัตราที่ช้าลง เมื่อได้รับความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง การสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจะลดลงร้อยละ 65 และร้อยละ 85 ตามลำดับ เมื่อได้รับความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง การสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจะลดลงร้อยละ 85 และร้อยละ 95 ตามลำดับเมื่อฉีด SED บริสุทธิ์ ปริมาณ 5-10 ไมโครกรัม เข้าทางช่องท้อง จะทำให้เกิดสัตว์อาเจียนถึงร้อยละ 50 (ED_{50} , effective dose เท่ากับ 5-10 ไมโครกรัม) สารพิษชนิดนี้จะ

เสถียร (stable) เป็นเวลา 1 ปี เมื่อเก็บรักษาไว้ในลักษณะที่แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือในสภาวะที่แช่แข็ง สารพิษชนิดนี้จะเสถียรที่ pH อยู่ในช่วง 1.2-10.7 และจะเสื่อมสภาพเมื่อ pH สูงกว่า 11.2 ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจะสูญเสียอย่างสมบูรณ์หลังจากบ่มทิ้งไว้ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่ pH 12.8 (Chang และคณะ, 1979)

2.3.5.1.5 เอนเทอโรท็อกซินชนิด E (SEE)

มีน้ำหนักโมเลกุล 26,425 ดาลตัน สัมประสิทธิ์การตกตะกอน (sedimentation coefficient,$S°_{20}$,W) 2.6S Isoelectric point มีค่า 7.0 มี serine และ threonine เป็น N-terminal และ C-terminal ตามลำดับ ผลกระทบของความร้อนที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนเทอโรท็อกซินชนิด E คือ เมื่อได้รับความร้อนที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงในwater bath จะไม่มีการสูญเสียคุณสมบัติทางอิมมูโนวิทยา ถ้าให้ความร้อนที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะทำให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีลดลง ร้อยละ 5 แต่เมื่อได้รับความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 80องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และที่ 100องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จะทำให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีลดลง ร้อยละ 38, ร้อยละ 40ร้อยละ 55, ร้อยละ 85 และ ร้อยละ 95 ตามลำดับ เมื่อฉีด SEE บริสุทธิ์ เข้าเส้นเลือดสัตว์ทดลองในปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม จะทำให้สัตว์อาเจียนได้ร้อยละ 50 (ED_{50} ,effective dose เท่ากับ 0.5ไมโครกรัม) เมื่อเก็บเอนเทอโรท็อกซินชนิด E ใน phosphate buffer, pH 7.0 ที่ 2-5 องศาเซลเซียสจะคงสภาพอยู่ได้นาน 6 เดือน หรือเมื่อเก็บที่ pH 11.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 2สัปดาห์ และเมื่อเก็บที่ pH 12 และ 4.5 จะเก็บรักษาได้เพียง 24 ชั่วโมง แต่ถ้าเก็บที่ pH 2.0 จะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีอย่างสมบูรณ์

2.3.5.2 ความทนทานของเอนเทอโรท็อกซินต่อสภาพแวดล้อม

2.3.5.2.1 ความต้านทานต่อความร้อน

ความสามารถในการทนความร้อนของสารพิษขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของสารพิษ ชนิดของสารพิษ ปริมาณเริ่มต้นของสารพิษ pH การให้ความร้อนกับของเหลวที่เป็นตัวทำละลาย และวิธีในการตรวจสอบ SEB ยังไม่เสียสภาพแม้ใช้เวลามากกว่า 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 7.3 โดยทั่วไปแล้วความสามารถในการทนความร้อนของ SEC จะมากกว่า และ SEB สามารถทน

ความร้อนได้มากกว่า SEA ตามลำดับ (Martin และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เอนเทอโรท็อกซินยังสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Murray และคณะ, 2002)

2.3.5.2.2 ความทนทานต่อรังสี

พบว่าต้องใช้รังสีแกมมามากกว่า 2.7 และ 9.7 เมกะแรด (Megarad, Mrad) ในการลดปริมาณ SEB ลงเป็น 10 เท่าใน buffer และนม มีการตรวจสอบประสิทธิภาพของรังสีต่อ SEA โดยใช้ ELISA การใช้รังสี 8 กิโลเกรย์ (Kilogray, KGY) จะทำลาย SEA ใน gelatin phosphate buffer ได้อย่างสมบูรณ์ (Martin และคณะ, 2001)

2.3.5.2.3 ความทนทานต่อเอนไซม์

สารพิษที่ได้จากแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus aureus* มีความทนทานต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) เช่น trypsin, chymotrypsin, rennin และ papain (pH>2) อย่างไรก็ตาม pepsin สามารถย่อยเอนเทอโรท็อกซิน ในสภาพที่มี pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 แต่สภาวะความเป็นกรดเช่นนี้ไม่ใช่สภาวะปกติของกระเพาะอาหารที่ทำให้เอนเทอโรท็อกซินสามารถผ่านเข้าสู่ลำไส้ได้ และกระตุ้นให้อาเจียนและท้องเสียได้ (Cliver และ Riemann, 2002)

2.3.5.3 โรคที่เกิดจากเชื้อ Staphylococcus aureus

2.3.5.3.1 อาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning)

พยาธิสภาพเกิดขึ้นเนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเอนเทอโรท็อกซินที่สร้างโดยเชื้อ *Staphylococcus aureus* เข้าไปสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ และก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมักเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์coagulase ได้ การสร้างเอนไซม์ coagulase มักมีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนเทอโรท็อกซินในอาหารถ้าอาหารนั้นๆ อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญ สารพิษที่จะทำให้เกิดโทษกับผู้บริโภคได้นั้นต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่า 0.1-1.0 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมอาหาร ซึ่งปริมาณเชื้อจะต้องมากถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร แม้ว่าเชื้อจะสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้แต่ถ้ามีเซลล์ปริมาณต่ำกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ก็จะไม่ทำให้เกิดอันตราย ตามมาตรฐานอาหารกำหนดว่า ต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรครวมทั้ง *Staphylococcus aureus* ด้วย

เมื่อเอนเทอโรท็อกซินถูกดูดซึมที่กระเพาะอาหารจะไปกระตุ้นเส้นประสาท vagus และ sympathetic nerves ไปยัง subcortical vomiting center ที่สมองทำให้เกิดการอาเจียนขึ้น ดังนั้นเอนเทอโรท็อกซินของ *Staphylococcus aureus* จัดเป็น emetic enterotoxin ในขณะเดียวกันทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณ cAMP ในเยื่อบุผนังลำไส้เป็นผลทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงเป็นน้ำ อาการของโรคเกิดขึ้นภายใน 1-6 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่มี เอนเทอโรท็อกซินของ *Staphylococcus aureus* อาการที่เกิดขึ้น คือ คลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเดิน และเป็นตะคริวอาเจียนอย่างรุนแรง มักไม่มีอาการไข้ ปวดบิดในท้อง ถ่ายเป็นน้ำ อุจจาระร่วง ปวดศรีษะ เหงื่อออกหนาวสั่นในรายที่รุนแรงอาจช็อคหรือมีมูก และเลือดปนในอุจจาระ แต่ส่วนใหญ่อาการจะหายเป็นปกติภายใน 1-3 วัน หลังจากขับถ่ายเอาเชื้อ และสารพิษออกไปหมดแล้ว ถ้าเกิดในเด็กเล็กและผู้สูงอายุอาการอาจรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้โรคอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus aureus* มักเกิดจากมือที่มีเชื้อของคนที่เป็นพาหะมาประกอบอาหาร มือของผู้ที่เป็นพาหะติดเชื้อมาจากสารคัดหลั่งจากจมูก อาหารที่รับประทานนั้นดิบ หรือปรุง/อุ่นที่ความร้อนน้อยหรือทำในเวลาสั้นๆ ซึ่งไม่สามารถทำลายเอนเทอโรท็อกซินที่ทนทานต่อการต้มเป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่าได้ ดังนั้นการป้องกันและควบคุมโรคอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus aureus* คือ ผู้ที่เป็นพาหะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ไม่ควรสัมผัสอาหาร หรือใช้มือในการหยิบหรือจับอาหารที่ปรุงแล้ว ไม่ควรตั้งอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานก่อนรับประทาน ควรเก็บอาหารไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิต่ำ เพื่อไม่ให้เชื้อ *Staphylococcus aureus* เจริญเพิ่มจำนวนก่อนที่จะนำไปประกอบหรือเสิร์ฟ (Bhatia, 2007)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.5.3.2 อาการช็อก (Toxic shock syndrome,TSS)

เกิดจาก Toxic shock syndrome toxin-1 ที่เชื้อสร้างขึ้น ทำให้เกิดกลุ่มอาการต่าง ๆ คือ มีไข้สูง ท้องเดิน ความดันลดลง มีผื่นตามผิวหนัง ช็อกและหมดสติ มักพบในเด็ก สตรีขณะมีประจำเดือน (Mahon และ Manuselies, 2000)

2.3.5.3.3 ลำไส้อักเสบ (Enteritis)

ตามปกติไม่ค่อยพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในลำไส้มากนัก แต่หากกินสารปฏิชีวนะอาจทำให้สมดุลของเชื้อเสียไป ส่งผลให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้ อาการที่พบคือท้องเดินเฉียบพลัน มีไข้สูง อาเจียน สูญเสียน้ำและเกลือแร่ (Murray และคณะ, 2002)

2.3.6 การตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินในอาหาร (Su และ Wong, 1997)

การตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินสามารถทำได้หลายวิธีทั้งการหาด้วยวิธีการทางชีวภาพ (Biological Assay) และวิธีการทางด้านอิมมูโน โดยวิธีการทางอิมมูโนนั้นมีความไวและจำเพาะมากกว่าวิธีทางชีวภาพ แต่อย่างไรก็ตามการเกิดความเป็นพิษขึ้นอยู่กับความไวในการตอบสนองของผู้ที่ได้รับเอนเทอโรท็อกซิน ซึ่งปริมาณน้อยที่สุดที่พบการระบาดของเอนเทอโรท็อกซินมีค่าประมาณ 0.5-0.75 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการตรวจวัดจึงจำเป็นต้องมีความไวต่อเอนเทอโรท็อกซินที่มีปริมาณน้อยกว่า 0.5 นาโนกรัมหรือมิลลิลิตรของอาหาร

2.3.6.1 การวิเคราะห์ทางชีวภาพ

ในอดีตการตรวจเอนเทอโรท็อกซินทุกชนิดวัดจากกิจกรรมการเกิดโรคเมื่อสัตว์ทดลองบริโภคอาหารเข้าไป โดยตัวอย่างจะมีผลต่อระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทดลองภายใน 5 ชั่วโมงหลังจากรับอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป ข้อเสียของวิธีการวิเคราะห์ทางชีวภาพคือใช้ระยะเวลาในการทดสอบเป็นเวลานา และต้องการปริมาณในการเกิดโรคช่วงกว้าง 5-20 ไมโครกรัม เนื่องจากการตอบสนองของสัตว์ทดลองมีความแตกต่างกัน

2.3.6.2 การวิเคราะห์ทางอิมมูโนวิทยา

เป็นการจำแนกชนิดของเอนเทอโรท็อกซินโดยอาศัยความจำเพาะของแอนติบอดีกับเอนเทอโรท็อกซินแต่ละชนิด ทำให้สามารถจำแนกเอนเทอโรท็อกซินที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกันได้

2.3.6.2.1 Double Gel Immunodiffusion

เป็นเทคนิคที่ตรวจวัดเอนเทอโรท็อกซินจากระบบน้ำเหลือง โดยทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่กระจายไปในแผ่นเจลแต่ละแผ่น เกิดการตกตะกอนเป็นแถบ ซึ่งตำแหน่งที่ตกตะกอนจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นและอัตราการแพร่ของสาร 2 ชนิดที่ทำปฏิกิริยากัน มีความไวต่อเอนเทอโรท็อกซินประมาณ 0.1-0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

2.3.6.2.2 Radioimmunoassay (RIA)

วิธีนี้เป็นวิธีแรกที่ถูกพัฒนาขึ้นแล้วมีความไวต่อเอนเทอโรท็อกซินในระดับที่น้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์นี้อาศัยการแข่งกันจับตำแหน่งที่จำเพาะบนโมเลกุลของแอนติบอดีระหว่างแอนติบอดีที่ติดฉลากกับแอนติเจนที่ไม่ได้ติดฉลากของตัวอย่าง วิธีวิเคราะห์นี้สามารถตรวจวัดเอนเทอโรท็อกซินได้ในตัวอย่างอาหารที่ไม่ต้องมีความเข้มข้นเอนเทอโรท็อกซินสูง ไม่ต้องเกิดปฏิกิริยาแบบจำเพาะแต่ข้อเสียของวิธีนี้คือจำเป็นต้องใช้เอนเทอโรท็อกซินที่มีความบริสุทธิ์สูงและต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะ

2.3.6.2.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

เป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* อีกวิธีหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้กันมาก วิธี ELISA เป็นวิธีที่มีการพัฒนากันมาก มีความจำเพาะ มีความไว และมีการผลิตชุดทดสอบสำเร็จรูป (kit test) ออกมาขายกันทั่วไป (Park และคณะ, 1996) ซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ การทดสอบมีทั้งวิธี Double-antibody-sandwich ELISA และ Indirect ELISA อย่างไรก็ตามวิธี ELISA ยังมีข้อจำกัดคืออาจเกิดผลลบปลอม (false negative) และอาจเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ได้ (Rasooly และ Rasooly, 1998)

2.3.6.2.4 Nucleic Acid-Based Detection Methods

วิธีนี้พัฒนามาจากเทคนิคริคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ เป็นวิธีใหม่สำหรับตรวจจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร โดยเมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีนที่ก่อโรคจะสังเคราะห์ไพรเมอร์ขึ้นมาสำหรับตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์นั้นโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อย ใช้ปริมาณตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ตรวจวัดเอนเทอโรท็อกซินให้ผลเป็นบวกยังสามารถบ่งชี้ได้ว่ามีเซลล์อยู่ในตัวอย่าง แต่ไม่ได้หมายความว่ามีเอนเทอโรท็อกซินในตัวอย่าง เพราะการผลิตเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหารต้องมีภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนเทอโรท็อกซิน ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง วอเตอร์แอกทิวิตี แต่วิธีนี้สามารถใช้ในการบ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างอาหารนั้นมีการปนเปื้อนมากน้อยเพียงใด (Su และ Wong, 1997)

2.3.6.3 Diagnostic Kits

2.3.6.3.1 Mini-VIDAS

เป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารอัตโนมัติด้วยวิธี ELFA (Enzyme Linked Fluorescence Assay) โดยอาศัยหลักการ ELISA แบบแซนวิช โดยการเคลือบโซลิดเฟสด้วยแอนติบอดีแล้วให้ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างที่ต้องการตรวจและแอนติบอดีที่ติดด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับฟลูโอเรสเซนต์สับสเตรต ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยหัวอ่านคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 370 และ 450 นาโนเมตร (Meyrand และคณะ, 1998)

2.3.6.3.2 Staphylococcal Enterotoxin- Reverse Passive Latex Agglutination (SET-RPLA)

หลักการ คือ อนุภาคของ Polystyrene Latex ที่เชื่อมต่ออยู่กับแอนติเซรั่ม (Antiserum) สำหรับเอนเทอโรท็อกซินแต่ละชนิด (SEA, SEB, SEC และ SED) ในชุดควบคุมเป็นการเชื่อมต่อกับ Non-Immuno Rabbit Globulin ปฏิกิริยาจะเกิดเมื่อแอนติเซรั่มเกิดโครงสร้างตาข่ายกับเอนเทอโรท็อกซินทำให้ตกตะกอน (Soriano และคณะ, 2002) ชุดทดสอบสำเร็จรูปนี้มีความไวต่อปริมาณเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C และ D ที่ความเข้มข้น 0.12, 0.07, 0.17 และ 0.1 นาโนกรัมต่อกรัมตามลำดับ (Delbes, Alomar, Chougui, Martin และ Montel, 2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ayulo และคณะ (1994) ได้ศึกษาเชื้อ *Escherichia coli* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในปลาและอาหารทะลที่มาจากทางตอนใต้ของประเทศบราซิล ได้เก็บตัวอย่างปลา กุ้ง หอย และปู จำนวนทั้งหมด 175 ตัวอย่างพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ทั้งสิ้นคิดเป็น 20% ของตัวอย่างทั้งหมดโดย 60% ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้มาจากเนื้อหอย และมีเพียง 9 สายพันธุ์จากทั้งหมด 109 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีการสร้างเอนเทอโรท็อกซิน ได้แก่ เอนเทอโรท็อกซิน A 4 สายพันธุ์ เอนเทอโรท็อกซิน D 1 สายพันธุ์และเอนเทอโรท็อกซิน AB 4 สายพันธุ์

Solic และ Krstulovic (1994) พบว่าการมีอยู่ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จะสัมพันธ์กับตัวบ่งชี้มลพิษทำการศึกษาในบริเวณชายฝั่งของเมือง Split ระหว่างหน้าร้อน พบว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบได้ที่ทุกจุดที่ทำการศึกษา การอยู่รอดของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จะยาวนานกว่าตัวบ่งชี้มลพิษอย่างมีนัยสำคัญภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง

ความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างเชื้อกับตัวบ่งชี้จะอยู่ในพื้นที่ๆมีการปนเปื้อนสูง ในพื้นที่ๆมีน้ำเสียน้อยหรือไม่ค่อยปนเปื้อนจะมีความเข้มข้นของตัวบ่งชี้มลพิษต่ำแต่ยังคงมีความเข้มข้นของ *Staphylococcus aureus* สูง เนื่องจากเชื้อมาจากการอาบน้ำชำระร่างกายของคนและ/หรือเนื่องจากเชื้อมีการอยู่รอดได้ยาวนานกว่าตัวบ่งชี้มลพิษ

Solic และคณะ (1999) พบว่าหอยสองฝา เช่น หอยแมลงภู่อาจจะมีเชื้อก่อโรคเป็นจำนวนมากอยู่ในเนื้อของหอยและเชื้อแบคทีเรียอาจมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงเมื่ออาศัยอยู่ในหอยสองฝา

Gabutti และคณะ (2000) ได้ทดสอบเปรียบเทียบดูการรอดชีวิตของ faecal coliform (FC), faecal streptococci (FS), *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ที่เจริญในทะเล (ความเค็ม 35%) และน้ำกร่อย (ความเค็ม 27%) ในที่มืด อุณหภูมิห้อง (22 +/- 2 °C) ในน้ำทะเลพบว่า *Staphylococcus aureus* > FS > *Salmonella* spp. > FC ส่วนการอยู่รอดในน้ำกร่อยพบว่าเหมือนกับในน้ำทะเลแต่มีปริมาณที่สูงกว่า ที่ความเค็มต่ำพบว่าไม่ส่งผลต่ออัตราการอยู่รอดของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่มีการปรับตัวเข้ากับสภาวะได้ดี อย่างไรก็ตามดูเหมือนว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถที่จะเป็นตัวบ่งชี้ที่มีประสิทธิภาพของมลพิษที่เกิดจากมนุษย์และยังเป็นพารามิเตอร์ที่นำมาใช้เพื่อควบคุมน้ำทะเลที่ควรให้ความสนใจอีกด้วย

Cole และคณะ (2001) พบว่าการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในหอยสองฝายังทำให้เกิดโรคที่มาจากอาหารได้โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเชื้อก่อโรคที่สำคัญได้แก่ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่เป็นต้นเหตุให้เกิดโรคหลายชนิดและส่วนใหญ่เป็นโรคที่เกิดกับคนและเป็นโรคติดต่อ

Baris Bingol และคณะ (2008) ได้วิเคราะห์จุลินทรีย์จากอาหารพร้อมทาน (หอยยัดไส้) ที่ขายในเมืองอิสตันบูล ประเทศตุรกี โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง 168 ตัวอย่างในระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนตุลาคม 2006 พบเชื้อ Coliform ในตัวอย่างอาหาร 130 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 77.38 เชื้อ Escherichia coli ในตัวอย่างอาหาร 37 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 22.02 และเชื้อ Staphylococcus aureus ในตัวอย่างอาหาร 40 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 23.80 ตามลำดับ โดยงานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ทำการวิเคราะห์จุลินทรีย์นอาหารที่ขายในเมืองอิสตันบูล ประเทศตุรกี

De Donno และคณะ (2008) พบว่าสัตว์น้ำที่มีเปลือกจะมีความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียที่บ่งชี้ความสกปรกอยู่สูงโดยเฉพาะเมื่ออาศัยอยู่ในน้ำบริเวณที่มีเชื้อกระจายตัวอยู่ เป็นการบอกคุณภาพของน้ำได้เป็นอย่างดี

Topic และคณะ (2010) พบว่าหอยสองฝาเป็นสิ่งมีชีวิตที่กินอาหารโดยการกรอง มีการสะสมการปนเปื้อนที่แตกต่างกันจากน้ำในบริเวณที่เพาะเลี้ยง เช่น แบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต สารพิษโลหะหนัก ยาฆ่าแมลงหรือยาปฏิชีวนะ

Oliveira และคณะ (2011) พบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบในสัตว์ทะเลที่มีเปลือกและทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Escherichia coli* และเชื้อที่พบในธรรมชาติ เช่น *Vibrio* sp. (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio cholerae*)

Plano และคณะ (2011) ได้เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อโพรงจมูกจากผู้ใช้บริการห้องอาบน้ำและตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากสระว่ายน้ำสองแห่งเพื่อนำมาหาเชื้อ MSSA และ MRSA ที่มาจากคนที่ล้างตัวก่อนจะลงไปทะเล โดยใช้วิธีทางชีวเคมีและเทคนิค PCR ในการบ่งชี้ลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและจากคน พบว่า 12 จาก 15 MRSA ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำมีลักษณะเดียวกันกับที่แยกได้จากตัวอย่างคน ในขณะที่ MRSA อีก 3 isolates นั้นไม่ตรงกับตัวอย่างที่เก็บมาจากเนื้อเยื่อโพรงจมูกของคน ปริมาณของ *Staphylococcus aureus* ที่ถูกล้างออกมาจากคนหนึ่งคนจะอยู่ที่ประมาณ 10^5 ถึง 10^6 CFU/คน/15 นาทีในการอาบน้ำ และ 15 ถึง 20% ของปริมาณที่พบนี้เป็น MRSA งานนี้เป็นงานแรกที่ได้มีการรายงานเปรียบเทียบโคโลนีของเชื้อที่อยู่ในคนกับเชื้อที่ออกจากคนไปยังน้ำทะเลโดยพยายามที่จะยืนยันว่าคนเป็นคนที่นำเอาเชื้อ MSSA และ MRSA จากตัวเองไปสู่น้ำที่ใช้อาบ ซึ่งการทดลองนี้ทำให้เห็นชัดเลยว่าคนเป็นคนนำเอาเชื้อลงไปสู่น้ำทะเลและเชื้อที่ลงไปยังทะเลคือ *Staphylococcus aureus* และ MRSA ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค

Viau และคณะ (2011) ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำน้ำบริเวณชายฝั่งฮาวาย เพื่อที่จะทำความเข้าใจถึงการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค 5 ชนิดได้แก่ *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio parahaemolyticus* ในลำน้ำบริเวณชายฝั่ง O'ahu โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากลำน้ำ 22 แห่ง พบว่ามีลำน้ำ 12 แห่งที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 ชนิด

Almeida และ Soares (2012) พบว่ามลพิษที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัญหาหลักของบริเวณชายฝั่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณฟาร์มเลี้ยงหอย บทความนี้แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของเชื้อในหอยสองฝาจาก Ria Formosa Lagoon (ชายฝั่งด้านใต้ของโปรตุเกส) ตลอดระยะเวลา 20 ปี (1990-2009) ค่าที่สูงที่สุดของเชื้อ *Escherichia coli* ในหอยสองฝาพบในระหว่างยุค 90s เนื่องมาจากน้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านการบำบัดและน้ำจากการทำเกษตรกรรม ในช่วงยุค 2000s ค่าการปนเปื้อนลดลง 83% ของกลุ่มประชากรมาจากระบบบำบัดที่ทำขึ้นใหม่หรือที่มีการปรับปรุงของเดิม ค่าที่สูงที่สุดพบในหอยสองฝาที่เลี้ยงใกล้กับเมืองใหญ่ๆ ส่วนหอยสองฝาที่มาจากพื้นที่ๆได้รับผลกระทบน้อยจะมีการปนเปื้อนที่ต่ำ ฤดูกาลที่มีการปนเปื้อนสูงจะอยู่ในช่วงฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาว ซึ่งตรงข้ามกับฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อนที่อุณหภูมิและความเค็มสูงขึ้นจะส่งผลต่อเชื้อแบคทีเรีย

Goodwin และคณะ (2012) ได้ศึกษาการกระจายตัวของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำทะเลและหาดทรายทางตอนใต้ของแคลิฟอร์เนีย ซึ่งพบว่าโดยส่วนมากจะพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั้งในตัวอย่างน้ำทะเล (59%, n = 328) และในตัวอย่างทราย (53%, n = 358) ที่เก็บมาศึกษาโดยจำนวนเชื้อที่พบจะสัมพันธ์กับตัวแปรอื่นๆ เช่น สถานที่ อุณหภูมิ และจำนวนคนที่มาเล่นน้ำ

Pomykala และคณะ (2012) ได้ศึกษาหอยสองฝาที่มีอยู่ในประเทศโปแลนด์ การทดสอบทางจุลชีววิทยาเพื่อศึกษา *Salmonell* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, สปอร์ของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ และ *Staphylococcus* sp. ที่สร้างเอนไซม์ coagulase และเพื่อตรวจวัดเชื้อ *Escherichia coli* ใช้ ELISA ในการวิเคราะห์สารพิษในทะเล พิษจากหอยที่ทำให้เป็นอัมพาต (paralytic shellfish poisoning; PSP) พิษจากหอยที่ทำให้ความจำเสื่อมชั่วคราว (amnesic shellfish poisoning; ASP) และพิษจากหอยที่ทำให้ท้องเสีย (diarrhoeic shellfish poisoning; DSP) การวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์เป็นไปตามมาตรฐานของประเทศโปแลนด์ พบการศึกษาพบว่าไม่พบเชื้อ *Salmonella* sp. ในทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบ พบเชื้อ staphylococci ที่สร้างเอนไซม์ coagulase 9% ของตัวอย่าง *Vibrio parahaemolyticus* คัดแยกได้ 17% ของตัวอย่างหอย ส่วนใหญ่สัตว์ทะเลที่มีเปลือกจะปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียชนิดไม่ใช้อากาศ ซึ่งคัดแยกได้ถึง 68% ของตัวอย่าง จำนวนของเชื้อ *Escherichia coli* จะอยู่ในช่วง $<2.0 \times 10^{1}$ จนถึง $>1.8 \times 10^{4}$ MPN/100 กรัม ตัวอย่างหอยที่ทำการตรวจพบว่ามีระดับการก่อให้เกิดพิษทางทะเลต่ำกว่าระดับมาตรฐานที่กำหนดดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าหอยที่ขายอยู่ในประเทศโปแลนด์นั้นปลอดภัยต่อผู้บริโภค

Ahani และ Eskandani (2013) ได้ศึกษาเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินในปลา *Schizothorax zarudnyi* ด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างปลา 35 ตัวอย่าง พบว่า 37.2% ของตัวอย่างมีการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ด้วย PCR พบว่า 14.3% ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้สร้างเอนเทอโรท็อกซิน A 8.5% สร้างเอนเทอโรท็อกซิน B และ 5.7% สร้างเอนเทอโรท็อกซิน AB

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและหอยแมลงภู่

กำหนดจุดเก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 10 จุดในบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนในรูปตัว ก (Lat. 12°40′– 13°36′N และ Long. 99°57′-101°00′E) (ตารางที่ 3.1) ประกอบด้วยบริเวณหาดท่องเที่ยว 4 แห่ง และบริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ 6 แห่ง ระยะเวลาที่ทำการศึกษาระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 เดือน

ตารางที่ 3.1 จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวและแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่

หาดท่องเที่ยว	แหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่
1. หาดบางแสน	1. อ่าวชลบุรี
2. หาดพัทยา	2. อ่างศิลา
3. หาดชะอำ	3. ศรีราชา
4. หาดหัวหิน	4. บางตะบูน
	5. คลองด่าน
	6. ปากแม่น้ำแม่กลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การกำหนดจุดเก็บตัวอย่างและเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลและหอยแมลงภู่ทุกสองเดือน ในระหว่างเดือนมกราคม 2557 ถึงพฤศจิกายน 2557 รวมทั้งสิ้น 6 ครั้ง มีรายละเอียดการดำเนินงานดังนี้

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว 4 แห่ง คือ หาดบางแสน หาดพัทยา หาดชะอำ และหาดหัวหิน ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทะเลพื้นฐาน ได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำด้วยเครื่องมือตรวจวัดคุณภาพน้ำภาคสนาม(ยี่ห้อ YSI) เก็บตัวอย่างน้ำทะเลหาดละ 3 สถานีๆละ 3 ตัวอย่าง โดยการสวมถุงมือยางที่สะอาดจ้วงตักใต้น้ำ ระมัดระวังมิให้มี

การติดเชื้อจากสิ่งอื่นขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ ที่ระดับความลึกใต้ผิวน้ำประมาณ 30 เซนติเมตร บรรจุในขวดพลาสติกขนาด 150 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และเก็บตัวอย่างน้ำใส่ขวดแก้วสีชาสถานีละ 1 ตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความสกปรกในรูปบีโอดี (APHA, 2005) แช่ตัวอย่างน้ำในลังโฟมที่เก็บความเย็นด้วยน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพน้ำตัวอย่าง และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทันทีเมื่อกลับถึงห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่และน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอย 6 แหล่งคือ อ่าวชลบุรี อ่างศิลา อ่าวศรีราชา อ่าวบางตะบูน คลองด่านและปากแม่น้ำแม่กลองมาวิเคราะห์ความชุกของปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยขนาดของหอยแมลงภู่ที่นำมาศึกษาจะใช้หอยที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (ขนาดความยาวของเปลือกหอยประมาณ 4-6 เซนติเมตร) ทุกจุดเก็บตัวอย่าง

3.2.2 การตรวจเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยและตัวอย่างหอยแมลงภู่

การวิเคราะห์เชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลส (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus hyicus, Staphylococcus intermrdius*) ในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยและตัวอย่างหอยแมลงภู่ในน้ำทะเลตัวอย่าง ดำเนินการโดยใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดน้ำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนแผ่น Petrifilms™ Staph Express (3M™, St. Paul, MN) จำนวน 3 แผ่น (วิเคราะห์ 3 ซ้ำ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง จากนั้นนำมานับโคโลนีด้วยวิธี Colonies Forming Unit (CFU)

การวิเคราะห์เชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่ โดยนำตัวอย่างหอยแมลงภู่สดที่เก็บจากแหล่งเลี้ยงหอยแหล่งละ 10 ตัวอย่าง มาล้างทำความสะอาดเปลือกภายนอก วัดขนาดความยาวเปลือก แกะเปลือกหอยและนำเนื้อหอยแมลงภู่น้ำหนักโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3-12 กรัม (ขึ้นกับขนาดตัวหอย) ใส่ลงในหลอดแก้วที่บรรจุ phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน และทำการวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธี Petrifilm เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทะเล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำข้อมูลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสกับตัวแปรคุณภาพน้ำกับเพื่อดูปัจจัยที่ส่งผลต่อเชื้อในบริเวณหาดเล่นน้ำและแหล่งเลี้ยงหอย และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำบริเวณหาดท่องเที่ยวและในหอยแมลงภู่จากแหล่งเลี้ยงหอยต่างๆ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS ที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.0$

3.2.3 การวิเคราะห์เอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่

3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างหอยแมลงภู่

ล้างทำความสะอาดตัวอย่างหอยแมลงภู่และทำการวัดขนาด แกะหอยแมลงภู่ด้วยวิธี aseptic technique ชั่งน้ำหนักเนื้อหอย 10 กรัมและใส่ลงใน Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 90 มิลลิลิตรปั่นให้เข้ากัน

3.2.3.2 การนับจำนวนเชื้อ Staphylococcus aureus

ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 3.2.3.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน Baird Parker Agar เกลี่ยตัวอย่างด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับโคโลนีที่มีสีดำ เป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบ (Capita และคณะ, 2002)

3.2.3.3 การคัดแยกเชื้อ Staphylococcus aureus

โคโลนีที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.3.2 นำมาเขี่ยลงบน Trypticase Soy Agar (TSA) เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นจึงทำการเก็บรักษาไว้เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3.2.3.4 การศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อ Staphylococcus aureus ที่คัดแยกได้

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เก็บรักษาไว้จากข้อ 3.2.3.3 นำมาศึกษาหาลักษณะของเชื้อก่อโรคบนอาหาร Mannitol Salt Agar ซึ่งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสและมีการใช้น้ำตาลแมนนิทอล จะทำปฏิกิริยากับฟีนอลเรดเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลืองพร้อมทั้งมีโคโลนีสีเหลืองเป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบ (Capita และคณะ, 2002)

3.2.3.5 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ Staphylococcus aureus

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เก็บรักษาไว้จากข้อ 3.2.3.4 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิเปตเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใช้ชุดสกัด Bacterial DNA kit (OMEGA Bio-Tek, USA) ในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากนั้นทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3.2.3.6 การตรวจการสร้างเอ็นเทอโรท็อกซินของเชื้อ Staphylococcus aureus ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.2.3.6.1 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ Staphylococcus enterotoxin A และ B (Johnson และคณะ, 1991) ได้ถูกนำมาใช้ตามตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ ของ Staphylococcus enterotoxin A และ B

Sl. No.	PRIMERS	SEQUENCE	EXPECTED PRODUCT SIZE (bp)
1	SEA1	5’ TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA 3’	120
2	SEA2	5’ GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA 3’	
3	SEB1	5’ TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG 3’	478
4	SEB2	5’ GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC 3’	

SEA – Staphylococcal enterotoxin A

SEB – Staphylococcal enterotoxin B

3.2.3.6.2 กระบวนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2.3.5 ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) โดยมีส่วนผสมของสารต่างๆตามตารางที่ 3.3 ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ ประกอบด้วย initial denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วินาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นดีเอนเอโดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมสารและความเข้มข้นในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ที่ปริมาณ 50 ไมโครลิตร

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย
MyTaq HS Red (Mix dNTPs และ DNA polymerase)	2X
ไพรเมอร์ Forward	10 µM
ไพรเมอร์ Reverse	10 µM
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1.0 µg

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการตรวจเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยและตัวอย่างหอยแมลงภู่

4.1.1 ผลการตรวจเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว

ค่าเฉลี่ยของคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ทั่วไป ได้แก่อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ความเค็ม ออกซิเจนละลายน้ำและค่าความสกปรกในรูปบีโอดี บริเวณหาดท่องเที่ยวทั้ง 4 แห่งแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าโดยทั่วไปคุณภาพน้ำโดยเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ดี มีค่าเป็นไปตามมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งประเภทที่ 4 (เพื่อการนันทนาการว่ายน้ำ) โดยน้ำทะเลชายฝั่งทุกแห่งมีค่าออกซิเจนละลาย >2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าบีโอดี <4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ 2540)

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ย±SD ของคุณภาพน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

สถานที่	T(°C)	pH	S (‰)	DO (mg/L)	BOD mg/L)
บางแสน	31.5±3.9	8.1±0.3	27.6±2.5	4.5±0.4	1.3±0.8
พัทยา	30.2±2.5	8.0±0.2	29.3±0.7	4.2±0.4	0.6±0.2
ชะอำ	31.9±3.3	8.0±0.2	28.5±1.4	4.9±0.8	0.7±0.5
หัวหิน	30.9±3.5	8.0±0.1	28.4±1.8	5.8±0.7	0.6±0.2

รายละเอียดตัวย่อ: T(°C) = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

pH = ค่าความเป็นกรด-ด่าง

S (‰) = ค่าความเค็มของน้ำ (ส่วนในหนึ่งพันส่วน)

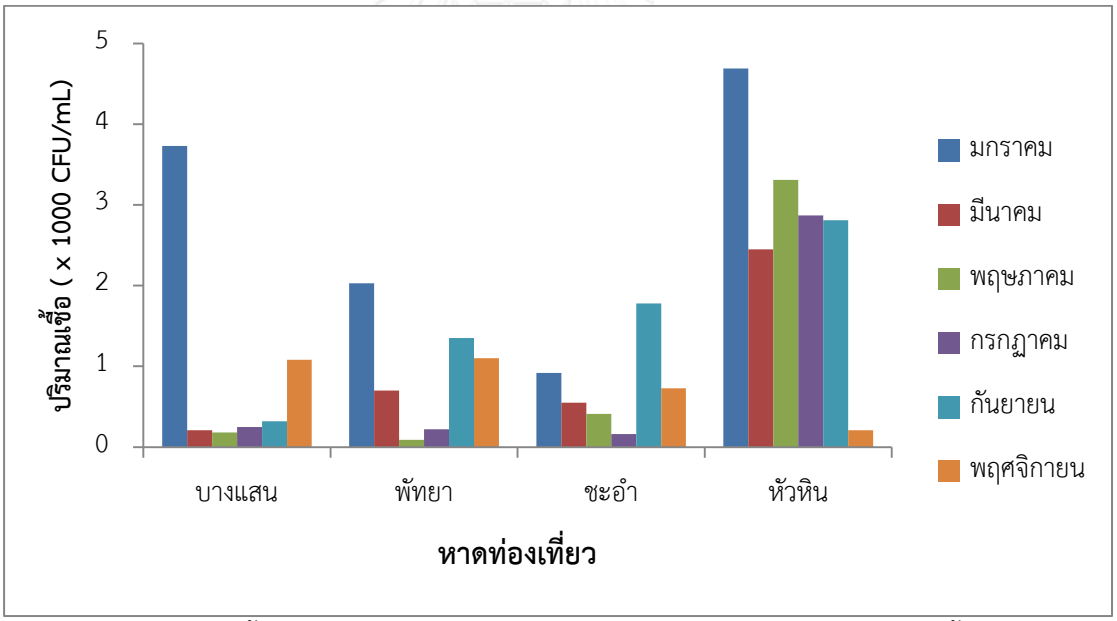
DO (mg/L) = ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

BOD (mg/L) = ไบโอเคมิคอล ออกซิเจน ดีมานด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวในช่วงที่ทำการศึกษา

เดือน	เชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในน้ำทะเล ($x10^3$ CFU/mL)			
	บางแสน	พัทยา	ชะอำ	หัวหิน
มกราคม	3.73±1.17	2.03±1.81	0.92±0.64	4.69±1.72
มีนาคม	0.21±0.05	0.70±0.40	0.55±0.51	2.45±0.31
พฤษภาคม	0.18±0.06	0.09±0.03	0.41±0.58	3.31±0.39
กรกฎาคม	0.25±0.17	0.22±0.07	0.16±0.09	2.87±2.80
กันยายน	0.32±0.16	1.35±0.40	1.78±1.37	2.81±0.70
พฤศจิกายน	1.08±0.53	1.10±0.54	0.73±0.88	0.21±0.04
ค่าเฉลี่ย±SD	0.96±1.40	0.92±0.73	0.76±0.56	2.72±1.46

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 3



รูปที่ 4.1 ค่าปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว

ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ย±SD ของปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลส (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus hyicus, Staphylococcus intermrdius*) ในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวสี่แห่ง (บางแสน, พัทยา,

ชะอำและหัวหิน) ในช่วงที่ทำการศึกษา พบว่าน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวทั้งสี่แห่งในแต่ละเดือนมีปริมาณเชื้อที่แตกต่างกัน โดยชายหาดหัวหินมีการปนเปื้อนของเชื้อสูงที่สุดในทุกๆเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่าง ในเดือนมกราคมมีการปนเปื้อนของเชื้อสูงที่สุด ($4.69x10^3$ CFU/mL) ปริมาณเชื้อที่พบในน้ำทะเลนอกจากคุณภาพของน้ำแล้วยังมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นเกี่ยวข้องด้วย เช่น สถานที่เก็บตัวอย่าง ช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง ปริมาณของนักท่องเที่ยวที่มาเล่นน้ำ กิจกรรมต่างๆที่อยู่บริเวณรอบจุดที่เก็บตัวอย่างต่างก็ส่งผลถึงปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Goodwin และคณะ (2012) ที่ศึกษาการกระจายตัวของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำทะเลและหาดทรายทางตอนใต้ของแคลิฟอร์เนีย พบว่าจำนวนเชื้อที่พบจะสัมพันธ์กับตัวแปรอื่นๆ เช่น สถานที่ อุณหภูมิ และจำนวนคนที่มาเล่นน้ำ ทั้งนี้จากข้อมูลในตารางที่ 4.2 บ่งชี้ว่าการปนเปื้อนของของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำทะเลมีความแตกต่างตามฤดูกาล

ทำการทดสอบทางสถิติด้วยโปรแกรม spss โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทางระหว่างสถานที่ (หาดท่องเที่ยว) และช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างพบว่าสถานที่และช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างมีผลต่อปริมาณเชื้อในน้ำทะเลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ (ภาคผนวก จ ตาราง จ-1) แสดงให้เห็นว่าหาดท่องเที่ยวทั้งสี่แห่ง ได้แก่ บางแสน พัทยา ชะอำและหัวหิน รวมทั้งช่วงระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 มีผลต่อปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดได้แตกต่างกัน

4.1.2 ผลการตรวจเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่และในหอยแมลงภู่

ค่าเฉลี่ยของคุณภาพน้ำทะเลบริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่จากตารางที่ 4.3 พบว่าโดยเฉลี่ยคุณภาพน้ำเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำทะเลชายฝั่งประเภทที่ 3 (เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง) อย่างไรก็ตามมีบางบริเวณที่พบค่าบางพารามิเตอร์ในน้ำทะเลไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานฯ เช่นค่าเฉลี่ยของออกซิเจนละลายในน้ำทะเลต่ำกว่าเกณฑ์ฯเล็กน้อย (<4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ทั้ง 6 แห่ง (กรมควบคุมมลพิษ 2540)

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ย±SD ของคุณภาพน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

สถานที่	T(°C)	pH	S (‰)	DO (mg/L)	BOD (mg/L)
อ่างศิลา	30.7±3.8	7.8±0.2	27.3±5.4	3.6±0.4	1.0±1.0
ชลบุรี	30.8±4.1	7.6±0.4	22.5±10.5	3.5±1.2	1.5±0.8
ศรีราชา	30.5±2.7	8.0±0.3	28.3±2.0	3.8±0.7	0.9±0.6
บางตะบูน	31.2±3.2	7.6±0.3	17.9±6.7	3.2±0.7	2.0±1.0
คลองด่าน	30.3±1.1	7.2±0.3	15.8±12.3	2.0±0.67	1.7±1.5
แม่กลอง	31.6±1.5	7.6±0.2	9.1±7.4	3.2±0.7	1.0±0.5

รายละเอียดตัวย่อ: T(°C) = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

pH = ค่าความเป็นกรด-ด่าง

S (‰) = ค่าความเค็มของน้ำ (ส่วนในหนึ่งพันส่วน)

DO (mg/L) = ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

BOD (mg/L) = ไบโอเคมิคอล ออกซิเจน ดีมานด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยในช่วงที่ทำการศึกษา

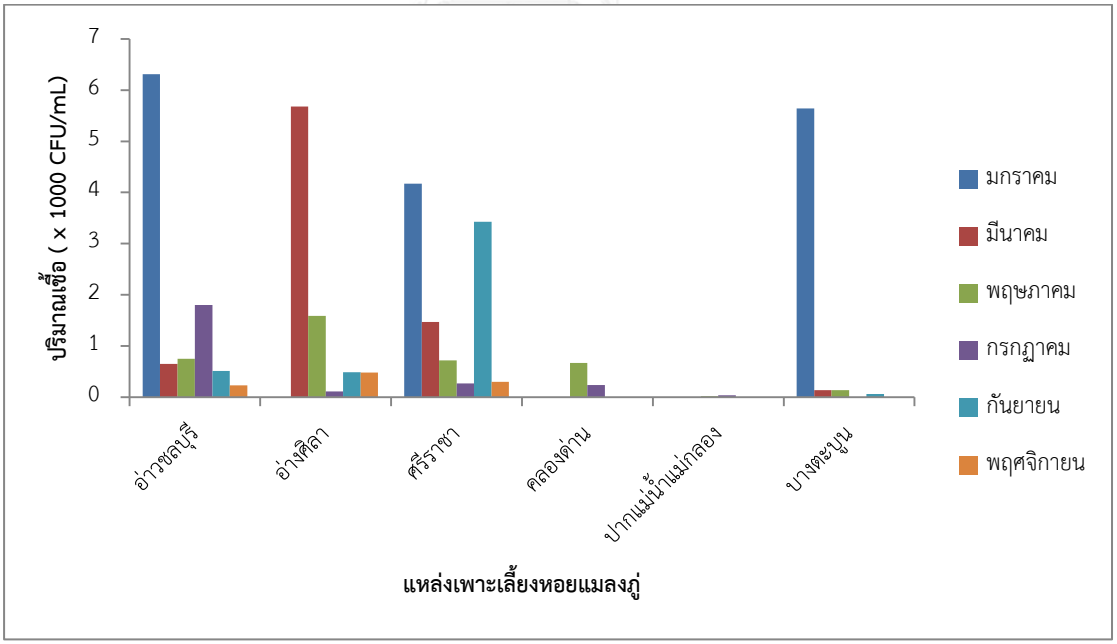
เดือน	เชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในน้ำทะเล ($x10^3$ CFU/mL)					
	อ่าวชลบุรี	อ่างศิลา	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	6.31±0.59	nd	4.17±4.24	5.64±1.14	nd	nd
มีนาคม	0.65±0.56	5.68±2.75	1.47±0.79	0.14±0.03	nd	nd
พฤษภาคม	0.75±0.24	1.59±0.06	0.72±0.14	0.14±0.09	0.66±0.08	0.02±0.01
กรกฎาคม	1.80±2.55	0.11±0.02	0.27±0.10	nd	0.24±0.03	0.04±0.03
กันยายน	0.51±0.14	0.49±0.37	3.43±5.43	0.06±0.01	nd	nd
พฤศจิกายน	0.23±0.17	0.48±0.16	0.30±0.06	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	1.71±2.32	1.67±2.31	1.73±1.68	1.50±2.76	0.46±0.30	0.03±0.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 3, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

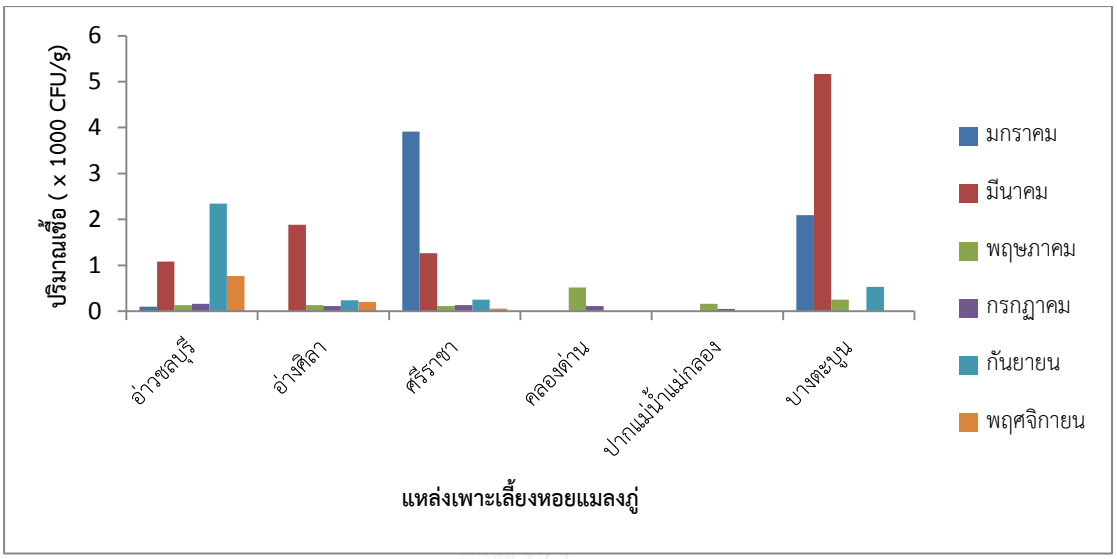
ตารางที่ 4.5 ปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเลี้ยงหอยในช่วงที่ทำการศึกษา

เดือน	เชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในหอยแมลงภู่ ($x10^3$ CFU/g)					
	อ่าวชลบุรี	อ่างศิลา	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	0.10±0.06	nd	3.91±2.75	2.09±1.48	nd	nd
มีนาคม	1.08±0.72	1.88±1.67	1.26±0.36	5.17±4.03	nd	nd
พฤษภาคม	0.13±0.07	0.13±0.06	0.11±0.06	0.25±0.15	0.52±0.43	0.16±0.12
กรกฎาคม	0.16±0.11	0.11±0.06	0.13±0.13	nd	0.11±0.06	0.05±0.03
กันยายน	2.34±1.35	0.24±0.32	0.25±0.27	0.53±0.60	nd	nd
พฤศจิกายน	0.77±0.59	0.20±0.08	0.06±0.03	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	0.76±0.87	0.51±0.77	0.95±1.52	2.01±2.26	0.32±0.29	0.11±0.08

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 10, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง



รูปที่ 4.2 ค่าปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอย



รูปที่ 4. 3 ค่าปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างหอยแมลงภู่

ค่าเฉลี่ย±SD ของเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลส (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus hyicus, Staphylococcus intermrdius*) ในตัวอย่างน้ำทะเลและหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเลี้ยงหอยหกแห่ง (อ่าวชลบุรี, อ่างศิลา, ศรีราชา, บางตะบูน, ปากแม่น้ำแม่กลองและคลองด่าน) แสดงในตารางที่ 4.4 และตาราง 4.5 โดยพบว่าการปนปื้อนของเชื้อในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยทั้งหกแห่งมีค่าแตกต่างกันในแต่ละเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่าง เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว (รูปที่ 4.2) การที่ปริมาณของเชื้อจากแหล่งเลี้ยงหอยปากแม่น้ำแม่กลองและคลองด่านมีค่าต่ำ เนื่องจากจุดเก็บตัวอย่างทั้งสองจุดเป็นปากแม่น้ำทำให้มีน้ำจืดไหลเข้ามารวมกับน้ำทะเล ค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำทะเลที่วัดได้จากทั้งสองจุดนี้จึงมีค่าที่แตกต่างจากจุดเก็บตัวอย่างอื่นๆ อีกทั้งน้ำทะเลบริเวณนี้มีการเคลื่อนที่ตลอดเวลาต่างจากจุดเก็บตัวอย่างอื่นๆที่น้ำทะเลจะนิ่งทำให้ปริมาณของเชื้อในบริเวณจุดเก็บตัวอย่างทั้งสองจุดนี้มีค่าต่ำกว่าจุดเก็บตัวอย่างอื่นๆ เพราะน้ำทะเลที่เคลื่อนที่จะทำการกระจายเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำไปยังจุดอื่นๆต่างกับตรงบริเวณที่น้ำนิ่งจะมีการสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณที่สูงกว่า ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อในตัวอย่างหอยแมลงภู่ทำโดยนำตัวอย่างหอยแมลงภู่สดที่เก็บจากแหล่งเลี้ยงหอยแหล่งละ 10 ตัวอย่างมาวิเคราะห์พบว่าการปนเปื้อนของเชื้อในหอยแมลงภู่ที่แหล่งเลี้ยงหอยทั้งหกแห่งต่างก็มีค่าที่แตกต่างกันในแต่ละเดือนเช่นเดียวกับค่าปริมาณเชื้อที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอย (รูปที่ 4.3) หอยแมลงภู่ในแต่ละแห่งต่างก็มีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆที่ส่งผลต่อปริมาณของเชื้อที่สะสมอยู่ในหอย จากรูปที่ 4.3 พบว่าหอยแมลงภู่ที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่บริเวณที่ใกล้เคียงกัน (อ่าวชลบุรี อ่างศิลาและศรีราชา) มีการปนเปื้อนของเชื้อที่ใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมรวมถึงการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยในบริเวณที่ใกล้เคียงกันมีผล

ต่อการสะสมของเชื้อในตัวหอยแมลงภู่ เช่นเดียวกับ Topic และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาสัตว์น้ำจำพวกหอยที่มีการกินอาหารโดยการกรองจะมีการสะสมของแบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต สารพิษ โลหะหนัก และยาฆ่าแมลงหรือยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันขึ้นกับคุณภาพของน้ำในบริเวณที่เพาะเลี้ยง และพบการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำทะเลรอบบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยทั้งหกแห่ง ในช่วงฤดูแล้ง (มกราคม-พฤษภาคม 2557) มีค่าสูงกว่าในช่วงฤดูฝน (กรกฎาคม-พฤศจิกายน 2557) สำหรับการปนเปื้อนของเชื้อในหอยแมลงภู่พบว่าในช่วงฤดูแล้ง (มกราคม-พฤษภาคม 2557) มีค่าสูงกว่าในช่วงฤดูฝน (กรกฎาคม-พฤศจิกายน 2557) เช่นเดียวกับในน้ำทะเล

สำหรับการปนเปื้อนของเชื้อในหอยแมลงภู่จากแหล่งเลี้ยงหอยหกแหล่งจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม spss โดยใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบสองทางเปรียบเทียบปริมาณเชื้อกับสถานที่เก็บตัวอย่าง (ฟาร์มเลี้ยงหอย) และช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างพบว่าสถานที่และช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างมีผลต่อปริมาณเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ (ภาคผนวก จ ตาราง จ-2) แสดงให้เห็นว่าแหล่งเลี้ยงหอยทั้งหกแห่ง ได้แก่ อ่าวชลบุรี อ่างศิลา ศรีราชา บางตะบูน คลองด่าน และปากแม่น้ำแม่กลอง รวมทั้งช่วงระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 มีผลต่อปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดได้แตกต่างกันเช่นเดียวกับหาดท่องเที่ยว

4.2 ผลการคัดแยกและศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2.1 ผลการคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหอยแมลงภู่

จากการศึกษาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหอยแมลงภู่ โดยเก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่จากแหล่งเลี้ยงหอยบริเวณอ่าวชลบุรี อ่างศิลาและศรีราชา ในระหว่างเดือน มีนาคม ถึง เดือนพฤศจิกายน 2557 เป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยบรรจุตัวอย่างหอยในถุงพลาสติกแช่น้ำแข็ง ซึ่งหอยแมลงภู่ที่นำมาวิเคราะห์จะเลือกตัวอย่างที่มีขนาดประมาณ 6-8 เซนติเมตร แกะเนื้อหอยแต่ละแห่งชั่งน้ำหนัก 10 กรัมและใส่ลงใน Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 90 มิลลิลิตรปั่นให้เข้ากัน จากนั้นเกลี่ยตัวอย่างบนอาหาร Baird Parker Agar พบโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มีสีดำ เป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบ (Capita และคณะ, 2002) จากนั้นนับจำนวนเชื้อ

Staphylococcus aureus โดยใช้วิธีนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหาร (Plate Count Agar) (ภาคผนวก ฉ)

ตารางที่ 4.6 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Baird Parker Agar

	อ่าวชลบุรี	อ่างศิลา	ศรีราชา
มกราคม	nd	nd	nd
มีนาคม	27	31	30
พฤษภาคม	7	13	21
กรกฎาคม	14	10	23
กันยายน	36	22	27
พฤศจิกายน	16	16	12
รวม	100	92	113

หมายเหตุ nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

จากตารางที่ 4.6 พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้จากตัวอย่างหอยแมลงภู่จากทั้งสามแห่ง ตัวอย่างหอยแมลงภู่ศรีราชาคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้มากที่สุด 113 โคโลนี รองลงมาคือตัวอย่างหอยแมลงภู่อ่าวชลบุรีคัดแยกได้ 100 โคโลนีและตัวอย่างหอยแมลงภู่อ่างศิลา 92 โคโลนี ตามลำดับ รวมจากทั้งสามแห่งคัดแยกได้ทั้งหมด 305 โคโลนี ทั้งนี้การปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างหอยแมลงภู่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมบริเวณแหล่งที่ทำการเพาะเลี้ยง ดังนั้นสัตว์น้ำจำพวกหอยจึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสกปรกของแหล่งน้ำได้ (De Donno และคณะ, 2008)

4.2.2 การศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้

จากการวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากหอยแมลงภู่ในระหว่างเดือน มีนาคม ถึง เดือนพฤศจิกายน 2557 เป็นจำนวน 305 โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar นำมาศึกษาต่อเพื่อคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสและสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้ โดยใช้อาหารที่จำเพาะคือ Mannitol Salt Agar (MSA)

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ก่อโรค

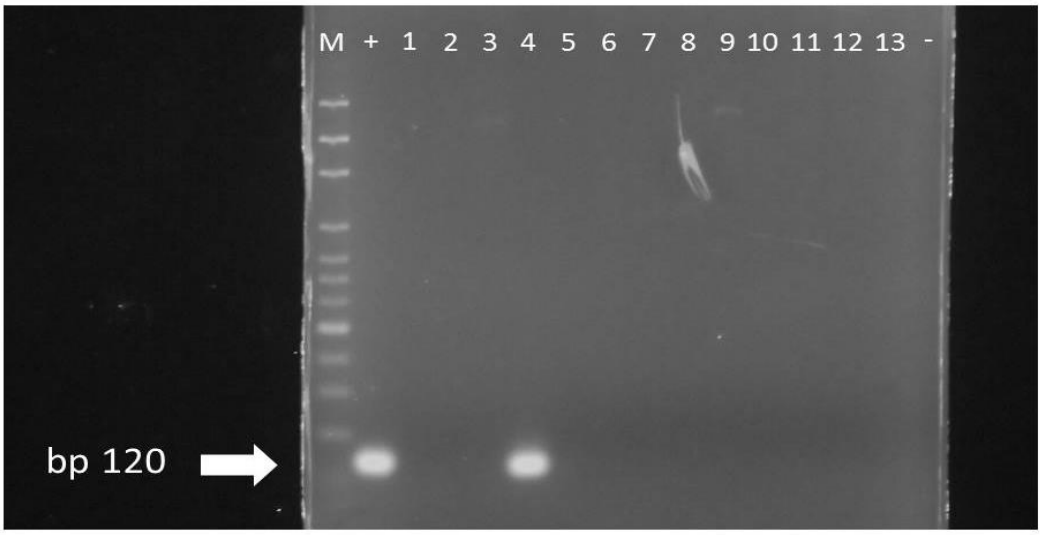
	อ่าวชลบุรี	อ่างศิลา	ศรีราชา
มกราคม	nd	nd	nd
มีนาคม	+ (1)	-	+ (1)
พฤษภาคม	-	-	-
กรกฎาคม	+ (1)	+ (4)	-
กันยายน	-	+ (4)	-
พฤศจิกายน	-	-	+ (2)

<u>หมายเหตุ</u> nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง, (+) = พบเชื้อก่อโรค, (-) = ไม่พบเชื้อก่อโรค, (ตัวเลข) = จำนวนโคโลนีที่พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค

ในการวิเคราะห์ลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นเชื้อก่อโรคจะอาศัยคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสและการใช้น้ำตาลแมนนิทอลของเชื้อ โดยในการวิเคราะห์จะนำเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากหอยแมลงภู่มาตรวจบนอาหาร Mannitol Salt Agar ซึ่งเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคจะสามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้และจะทำการใช้น้ำตาลแมนนิทอลจากอาหาร ทำปฏิกิริยากับฟีนอลเรดที่อยู่ในอาหารเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลืองพร้อมทั้งมีโคโลนีสีเหลืองเป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบเกิดขึ้น ในขณะที่เชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาโคแอกูเลสจะไม่มีการใช้น้ำตาลแมนนิทอล ถึงแม้ว่าเชื้อจะสามารถเจริญได้บนอาหาร MSA แต่จะไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและโคโลนีจะเป็นสีชมพู (Capita และคณะ, 2002) จากตารางที่ 4.7 พบว่าเจอเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคจากหอยแมลงภู่ทั้งสามแหล่ง คิดเป็นร้อยละ 40 จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 5 ครั้งตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 โดยพบในตัวอย่างหอยแมลงภู่จากอ่าวชลบุรีในเดือนมีนาคมและเดือนกรกฎาคมอย่างละ 1 โคโลนี ในตัวอย่างหอยแมลงภู่จากอ่างศิลาในเดือนกรกฎาคมและเดือนกันยายนอย่างละ 4 โคโลนี และในตัวอย่างหอยแมลงภู่จากศรีราชาในเดือนมีนาคม 1 โคโลนีและในเดือนพฤศจิกายน 2 โคโลนี รวมทั้งสิ้น 13 โคโลนีคิดเป็นร้อยละ 4.26 ของตัวอย่างทั้งหมด 305 โคโลนีที่คัดแยกได้บนอาหาร Baird Parker Agar

4.3 ผลการวิเคราะห์ยีนเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่

เชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคที่คัดแยกได้จากข้อ 4.2.2 ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth จากนั้นใช้ชุดสกัด Bacterial DNA kit (OMEGA Bio-Tek, USA) ในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ ทำการเช็คปริมาณดีเอ็นเอ (ภาคผนวก ซ) ก่อนนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Staphylococcus enterotoxin A, และ B, ตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้ง 13 ตัวอย่างมี พบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวที่มียีนเอนเทอโรท็อกซินชนิด A (รูปที่ 4.4) คิดเป็นร้อยละ 7.7 โดยเป็นตัวอย่างของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยแมลงภู่จากแหล่งเพาะเลี้ยงอ่างศิลาในเดือนกันยายน ในขณะที่ไม่พบยีนเอนเทอโรท็อกซินชนิด B ใน 13 ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ (รูปที่ 4.5)



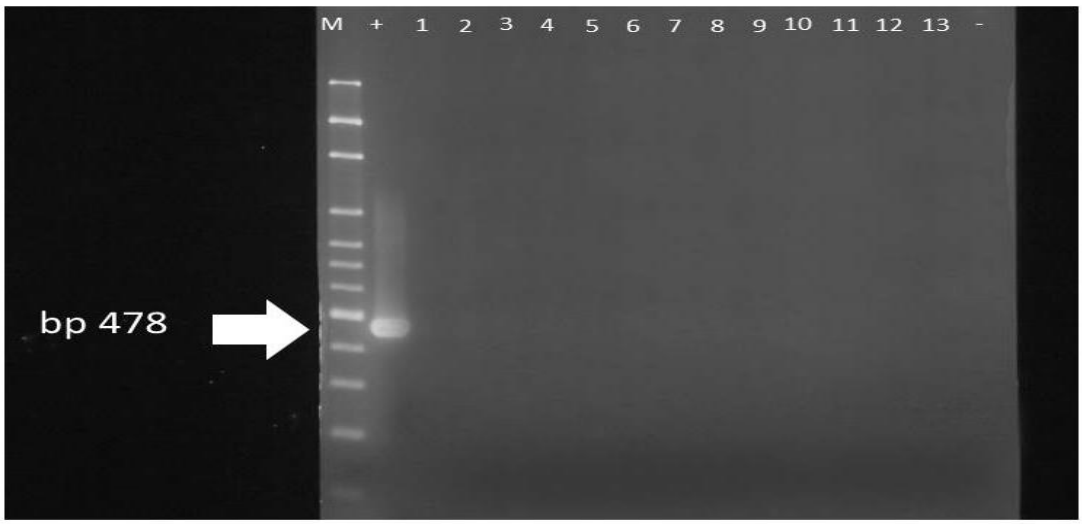
รูปที่ 4.4 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เอนเทอโรท็อกซิน SEA ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

รายละเอียดตัวย่อ: (M) = DNA Marker 100 – 3000 bp

(+) = Positive control: *Staphylococcus aureus* ATCC 13565

(-) = Negative control: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

(1-13) = ตัวอย่างเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกจากหอยแมลงภู่



รูปที่ 4.5 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เอนเทอโรท็อกซิน SEB ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

รายละเอียดตัวย่อ: (M) = DNA Marker 100 – 3000 bp

(+) = Positive control: *Staphylococcus aureus* ATCC 14458

(-) = Negative control: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

(1-13) = ตัวอย่างเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกจากหอยแมลงภู่

จากการวิจัยในครั้งนี้พบเชื้อ *Staphylococcus aureus* มีการปนปื้อนอยู่ในตัวอย่างหอยแมลงภู่จากแหล่งเพาะเลี้ยงหอยทุกแห่ง และยังพบสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคที่มียีนเอนเทอโรท็อกซิน ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ayulo และคณะ (1994) ที่ทำการศึกษาตัวอย่างสัตว์ทะเลในประเทศบราซิลพบว่าเจอเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างหอยคิดเป็นร้อยละ 60 แต่พบเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อโรคที่มียีนเอนเทอโรท็อกซินเพียง 9 สายพันธุ์เท่านั้น ในปี 2013 Ahani และ Eskandani ได้ทำการวิเคราะห์ยีนเอนเทอโรท็อกซินด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากตัวอย่างปลา *Schizothorax zarudnyi* พบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ร้อยละ 37.2 และพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคที่มียีนเอนเทอโรท็อกซิน A ร้อยละ14.3 ยีนเอนเทอโรท็อกซิน B ร้อยละ 8.5 และยีนเอนเทอโรท็อกซิน AB ร้อยละ 5.7 จากงานวิจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสามารถพบเจอเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ทั่วไป ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ได้ก่อโรค ซึ่งการผลิตเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อจำเป็นต้องมีสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมด้วย (Normanno และคณะ, 2005)

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

5.1 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ในการทำการศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว 4 แห่ง ได้แก่ หาดบางแสน หาดพัทยา หาดชะอำ และหาดหัวหิน เป็นระยะเวลา 1 ปีโดยทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม 2557 จนถึงเดือนพฤศจิกายน 2557 ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 เดือน ทุกครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ความเค็ม ออกซิเจนละลายน้ำและค่าความสกปรกในรูปบีโอดี บริเวณหาดท่องเที่ยวทั้ง 4 แห่ง พบว่าโดยทั่วไปคุณภาพน้ำโดยเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ดี มีค่าเป็นไปตามมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งประเภทที่ 4 (เพื่อการนันทนาการว่ายน้ำ) โดยน้ำทะเลชายฝั่งทุกแห่งมีค่าออกซิเจนละลาย >2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าบีโอดี <4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ 2540) ในการตรวจหาปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลส ในงานวิจัยนี้ตรวจด้วยแผ่น Petrifilms™ Staph Express (3M™, St. Paul, MN) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปโดยดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อเชื้อและสามารถแยกความแตกต่างสำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus* แต่อาจยังสามารถระบุเชื้อ *Staphylococcus hyicus* และเชื้อ *Staphylococcus intermedius* ได้อีกด้วย ผลการทดสอบด้วยแผ่น Petrifilm เชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสจะมีโคโลนีสีม่วงแดงเกิดขึ้น จากการศึกษาปริมาณเชื้อในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว 4 แห่ง พบว่าน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวทั้ง 4 แห่งในแต่ละเดือนมีปริมาณเชื้อที่แตกต่างกัน บ่งชี้ว่าการปนเปื้อนของของเชื้อในน้ำทะเลมีความแตกต่างตามฤดูกาล โดยส่วนใหญ่แล้วปริมาณเชื้อในฤดูแล้งจะมีค่าสูงกว่าในฤดูฝนเนื่องจากในฤดูแล้งน้ำจะนิ่งกว่าในฤดูฝนทำให้มีการสะสมของเชื้อที่สูงกว่าและยังเป็นฤดูที่นักท่องเที่ยวนิยมมาเล่นน้ำกันเป็นจำนวนมาก ทำให้ปริมาณเชื้อที่พบในน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวทั้ง 4 แห่งในฤดูแล้งมีปริมาณเชื้อสูงกว่าในฤดูฝน นอกจากฤดูกาลแล้วยังมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นเกี่ยวข้องด้วย เช่น ช่วงเวลาน้ำขึ้นน้ำลง สถานที่เก็บตัวอย่าง ช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง ปริมาณของนักท่องเที่ยวที่มาเล่นน้ำ กิจกรรมต่างๆที่อยู่บริเวณรอบจุดที่เก็บตัวอย่างต่างก็ส่งผลถึงปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Goodwin และคณะ (2012) ที่ศึกษาการกระจายตัวของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำทะเลและหาดทรายทางตอนใต้ของแคลิฟอร์เนีย พบว่าจำนวนเชื้อที่พบจะสัมพันธ์กับตัวแปรอื่นๆ เช่น สถานที่ อุณหภูมิ และจำนวนคนที่มาเล่นน้ำ โดยทำการทดสอบทางสถิติด้วยโปรแกรม spss โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทางระหว่างสถานที่ (หาดท่องเที่ยว) และช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง

พบว่าสถานที่และช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างมีผลต่อปริมาณเชื้อในน้ำทะเลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ แสดงให้เห็นว่าหาดท่องเที่ยวทั้งสี่แห่ง ได้แก่ บางแสน พัทยา ชะอำและหัวหิน รวมทั้งช่วงระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 มีผลต่อปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดได้แตกต่างกัน

การทำการวิจัยในครั้งนี้นอกจากทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวแล้วยังทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่พร้อมทั้งตัวอย่างหอยแมลงภู่ด้วย โดยทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งเลี้ยงหอยทั้งหมด 6 แห่ง ได้แก่ อ่าวชลบุรี อ่างศิลา ศรีราชา บางตะบูน คลองด่านและปากแม่น้ำแม่กลอง มีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทะเลเช่นเดียวกับน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว พบว่าโดยเฉลี่ยคุณภาพน้ำเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำทะเลชายฝั่งประเภทที่ 3 (เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง) อย่างไรก็ตามมีบางบริเวณที่พบค่าบางพารามิเตอร์ในน้ำทะเลไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานฯ เช่นค่าเฉลี่ยของออกซิเจนละลายในน้ำทะเลต่ำกว่าเกณฑ์ฯเล็กน้อย (<4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ทั้ง 6 แห่ง (กรมควบคุมมลพิษ 2540) การปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลและหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเลี้ยงหอยหกแห่ง พบว่าการปนปื้อนของเชื้อในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยทั้งหกแห่งมีค่าแตกต่างกันในแต่ละเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่าง เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยว ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อในตัวอย่างหอยแมลงภู่ทำโดยนำตัวอย่างหอยแมลงภู่สดที่เก็บจากแหล่งเลี้ยงหอยแหล่งละ 10 ตัวอย่างมาวิเคราะห์พบว่าการปนเปื้อนของเชื้อในหอยแมลงภู่ที่แหล่งเลี้ยงหอยทั้งหกแห่งต่างก็มีค่าที่แตกต่างกันในแต่ละเดือนเช่นเดียวกับค่าที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอย หอยแมลงภู่ในแต่ละแห่งต่างก็มีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆที่ส่งผลต่อปริมาณของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่สะสมอยู่ในหอย พบว่าหอยแมลงภู่ที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่บริเวณที่ใกล้เคียงกัน (อ่าวชลบุรี อ่างศิลาและศรีราชา) มีการปนเปื้อนของเชื้อที่ใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมรวมถึงการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยในบริเวณที่ใกล้เคียงกันมีผลต่อการสะสมของเชื้อในตัวหอยแมลงภู่ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Topic และคณะ (2010) ได้ศึกษาสัตว์น้ำจำพวกหอยที่มีการกินอาหารโดยการกรองพบว่ามีการสะสมของแบคทีเรียไวรัส ปรสิต สารพิษ โลหะหนัก และยาฆ่าแมลงหรือยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันขึ้นกับคุณภาพของน้ำในบริเวณที่เพาะเลี้ยง ในการทำการทดลองในครั้งนี้ยังพบว่าในช่วงฤดูแล้ง (มกราคม-พฤษภาคม 2557) ปริมาณเชื้อในน้ำทะเลรอบบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยและตัวอย่างหอยแมลงภู่ทั้งหกแห่งมีค่าสูงกว่าในช่วงฤดูฝน (กรกฎาคม-พฤศจิกายน 2557)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม spss โดยใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบสองทางเปรียบเทียบปริมาณเชื้อกับสถานที่เก็บตัวอย่าง (ฟาร์มเลี้ยงหอย) และช่วงเวลาที่เก็บ

ตัวอย่างพบว่าสถานที่และช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างมีผลต่อปริมาณเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ (ภาคผนวก จ) แสดงให้เห็นว่าแหล่งเลี้ยงหอยทั้งหกแห่ง ได้แก่ อ่าวชลบุรี อ่างศิลา ศรีราชา บางตะบูน คลองด่านและปากแม่น้ำแม่กลอง รวมทั้งช่วงระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 มีผลต่อปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดได้แตกต่างกัน เช่นเดียวกับหาดท่องเที่ยว

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาถึงยีนเอนเทอโรท็อกซินจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยแมลงภู่จากแหล่งเลี้ยงหอย 3 แห่งได้แก่ อ่าวชลบุรี อ่างศิลาและศรีราชาในระหว่างเดือน มีนาคม ถึง เดือนพฤศจิกายน 2557 เป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยในการศึกษานี้ได้ใช้อาหารที่มีความจำเพาะต่อเชื้อในกลุ่ม Staphylococci ได้แก่ Baird Parker Agar อาหารชนิดนี้ใช้ในการคัดแยกเชื้อในกลุ่ม Staphylococci จากผลิตภัณฑ์อาหาร ส่วนผสมที่สำคัญคือ lithium chloride และ potassium tellurite ทำให้ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นยกเว้นแต่เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่จะสามารถเจริญได้และยังสามารถเปลี่ยน tellurite ไปเป็น telluride ทำให้เกิดโคโลนีสีดำ เป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบ (Capita และคณะ, 2002) พบว่าคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มีลักษณะโคโลนีสีดำ เป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบจากตัวอย่างหอยแมลงภู่ทั้งสามแห่งได้ทั้งสิ้น 305 โคโลนี การปนเปื้อนของเชื้อขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมบริเวณแหล่งที่ทำการเพาะเลี้ยง ดังนั้นสัตว์น้ำจำพวกหอยจึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสกปรกของแหล่งน้ำได้ (De Donno และคณะ, 2008) จากนั้นนำเชื้อที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาต่อโดยศึกษาถึงลักษณะของสายพันธุ์ที่ก่อโรค ทำการศึกษาบนอาหารแข็ง Mannitol Salt Agar ซึ่งเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคจะเกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสและสามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้โดยสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคจะมีการใช้น้ำตาลแมนนิทอลที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและทำปฏิกิริยากับฟีนอลเรดเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลืองพร้อมทั้งมีโคโลนีสีเหลืองเป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบเกิดขึ้น แต่เชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ไม่เป็นเชื้อก่อโรคที่ไม่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสและไม่ใช้น้ำตาลแมนนิทอลก็สามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้แต่จะไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและโคโลนีที่เกิดขึ้นจะเป็นสีชมพู (Capita และคณะ, 2002) จากการศึกษาพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสและใช้น้ำตาลแมนนิทอล มีโคโลนีสีเหลืองเป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบจากหอยแมลงภู่ทั้งสามแหล่ง คิดเป็นร้อยละ 40 จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 5 ครั้ง ตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 โดยพบในตัวอย่างหอยแมลงภู่จากอ่าวชลบุรีในเดือนมีนาคมและเดือนกรกฎาคมอย่างละ 1 โคโลนี ในตัวอย่างหอยแมลงภู่จากอ่างศิลาในเดือนกรกฎาคมและเดือนกันยายนอย่างละ 4 โคโลนี และในตัวอย่างหอยแมลงภู่จากศรีราชาในเดือนมีนาคม 1 โคโลนีและในเดือน

พฤศจิกายน 2 โคโลนี รวมทั้งสิ้น 13 โคโลนีคิดเป็นร้อยละ 4.26 ของตัวอย่างทั้งหมด 305 โคโลนีที่คัดแยกได้บนอาหาร Baird Parker Agar จากนั้นนำมาทำการศึกษาเพื่อหายีนเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยทำการศึกษาประเภทของเอนเทอโรท็อกซินทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ SEA, และ SEB เนื่องจากในงานวิจัยนี้สามารถหา positive control ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้เพียง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 ทำให้สามารถตรวจยีนเอนเทอโรท็อกซินได้เพียงสองชนิดคือ SEA และ SEB จากตัวอย่างทั้ง 13 ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์หาชนิดของยีนเอนเทอโรท็อกซิน พบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวที่มียีน SEA คิดเป็นร้อยละ 7.7 โดยเป็นตัวอย่างของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างหอยแมลงภู่จากแหล่งเพาะเลี้ยงอ่างศิลาในเดือนกันยายน ในขณะที่ไม่พบยีนเอนเทอโรท็อกซินชนิด B ใน 13 ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ayulo และคณะ (1994) ที่ทำการศึกษาตัวอย่างสัตว์ทะเลในประเทศบราซิลพบว่าเจอเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างหอยคิดเป็นร้อยละ 60 แต่พบเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อโรคที่มียีนเอนเทอโรท็อกซินเพียง 9 สายพันธุ์เท่านั้น ในปี 2013 Ahani และ Eskandani ได้ทำการวิเคราะห์ยีนเอนเทอโรท็อกซินด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากตัวอย่างปลา *Schizothorax zarudnyi* พบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ร้อยละ 37.2 และพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคที่มียีนเอนเทอโรท็อกซิน A ร้อยละ14.3 ยีนเอนเทอโรท็อกซิน B ร้อยละ 8.5 และยีนเอนเทอโรท็อกซิน AB ร้อยละ 5.7 จากงานวิจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสามารถพบเจอเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ทั่วไป ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ได้ก่อโรค ซึ่งการผลิตเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อจำเป็นต้องมีสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมด้วย (Normanno และคณะ, 2005)

จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าคุณภาพน้ำบริเวณหาดท่องเที่ยวและแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่จัดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลประเภทที่ 3 และประเภทที่ 4 (กรมควบคุมมลพิษ, 2540) โดยส่วนใหญ่ปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลส (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus hyicus, Staphylococcus intermrdius*) ทั้งในหาดท่องเที่ยว แหล่งเพาะเลี้ยงหอยและในหอยแมลงภู่มีปริมาณสูงในฤดูแล้งมากกว่าฤดูฝน ในปัจจุบันยังไม่มีมาตรฐานของปริมาณเชื้อในกลุ่ม Staphylococci ของเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลทั้งประเภทที่ 3 และประเภทที่ 4 ในขณะเดียวกันมีมาตรฐานของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในอาหารสดจำพวกหอยอยู่ที่ไม่เกิน 100 CFU/g พบว่าปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในหอยแมลงภู่ในงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่เกินเกณฑ์มาตรฐาน สามารถคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้จากตัวอย่างหอยแมลงภู่ทั้ง 3 แห่ง (อ่าวชลบุรี, อ่างศิลา, ศรีราชา) จำนวน 305 โคโลนี นำไปศึกษาต่อเพื่อหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคด้วยอาหาร Mannitol Salt Agar พบว่าใน 305 โคโลนีที่คัดแยกได้มีเพียง 13

โคโลนีที่แสดงให้เห็นว่าเป็นสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรค คิดเป็นร้อยละ 4.26 จากตัวอย่างทั้งหมด ทำการตรวจหายีนเอนเทอโรท็อกซินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ SEA และ SEB พบว่ามีเพียงโคโลนีเดียวจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากหอยแมลงภู่อ่างศิลาในเดือนกันยายนที่มียีน SEA คิดเป็นร้อยละ 7.7 จากตัวอย่างทั้งหมด 13 โคโลนีและไม่พบยีน SEB ในทุกตัวอย่างที่นำมาทำการวิเคราะห์

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลส (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*) ด้วยแผ่น Petrifilm Staph Express จากน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวและแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ ในปัจจุบันค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล (กรมควบคุมมลพิษ, 2540) ยังไม่ได้มีการกำหนดเกณฑ์ของเชื้อในกลุ่ม Staphylococci จึงควรมีการศึกษาการกระจายตัวของเชื้อในกลุ่ม Staphylococci โดยเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* เพราะเป็นเชื้อในกลุ่มที่ก่อโรคในคนเพื่อที่จะสร้างเป็นมาตรฐานต่อไปในอนาคต

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาเพียงเพื่อดูยีนเอนเทอโรท็อกซินเท่านั้นแต่ไม่ได้ดูถึงการแสดงออกของยีน ทำให้งานวิจัยนี้บอกได้เพียงแค่ว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคมีหรือไม่มียีนเอนเทอโรท็อกซินแต่ไม่สามารถบอกได้ว่าก่อโรคหรือไม่ก่อโรค เพราะการที่จะแสดงอาการของโรคนั้นจะต้องตรวจดูปัจจัยอื่นด้วย เช่น มีปริมาณเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อโรคมากเพียงพอที่จะทำให้เกิดโรคหรือไม่ และต้องตรวจดูโปรตีนของสารพิษว่ามีการแสดงออกหรือไม่ถึงจะสามารถตอบได้ว่าก่อโรคหรือไม่ก่อโรค จากตัวอย่างทั้ง 13 ตัวอย่างที่นำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการทดลองนี้แล้วไม่พบยีนเอนเทอโรท็อกซิน จากการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าไม่มียีน เพราะจากการตรวจสอบด้วยอาหาร MSA พบว่าทั้ง 13 ตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสและมีการใช้น้ำตาลเมนนิทอล เป็นลักษณะของสายพันธุ์ที่ก่อโรค แต่ในงานวิจัยนี้สามารถหา positive control ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้เพียง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 ทำให้สามารถตรวจยีนเอนเทอโรท็อกซินได้เพียงสองชนิดคือ SEA และ SEB ในการศึกษาต่อไปควรทำการทดสอบหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสก่อนที่จะใช้ในการตรวจหายีนเอนเทอโรท็อกซิน

รายการอ้างอิง

Adesiyun, A., Eschbach, M., Lenz, W., and Schaal, K. 1992. Detection of enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains: a comparative use of the modifed Ouchterlony precipitation test, reversed passive latex agglutination test, and avidin-biotin ELISA. *Canadian journal of microbiology.* 38(11): 1097-1101.

Ahani, N., and Alipour-Eskandani, M. 2014. Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in *Schizothorax zarudnyi* Using PCR Method. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences.* 16(4): 29-31.

Association, A. P. H. (1994). Water Environment Federation (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater: Washington, Dc.

Ayulo, A. M. R., Machado, R. A., and Scussel, V. M. 1994. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International journal of food microbiology.* 24(1): 171-178.

Bailey, W. R., and Scott, E. G. 1966. Diagnostic microbiology; a textbook for the isolation and identification of pathogenic microorganisms.

Balaban, N., and Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology.* 61(1): 1-10.

Bankes, P., and Rose, S. A. 1989. Rapid detection of staphylococcal enterotoxins in foods with a modification of the reversed passive latex agglutination assay. *Journal of applied bacteriology.* 67(4): 395-399.

Baris Bingol, E., Colak, H., Hampikyan, H., and Muratoglu, K. 2008. The microbiological quality of stuffed mussels (*Midye dolma*) sold in Istanbul. *British Food Journal.* 110(11): 1079-1087.

Bartelt, M. A. (2000). *Diagnostic bacteriology: a study guide*. FA Davis.

Bennett, R., and Lancette, G. (2011). *Staphylococcus aureus*. Bacteriological analytical manual online.

Bennett, S. D., Walsh, K. A., and Gould, L. H. 2013. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. *Clinical infectious diseases.* 57(3): 425-433.

Bergdoll, M. S. 1990. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *International journal of food microbiology.* 10(2): 91-99.

BERGDOLL, M. S., CRASS, B. A., REISER, R. F., ROBBINS, R. N., LEE, A. C.-M., CHESNEY, P. J., DAVIS, J. P., VERGERONT, J. M., and WAND, P. J. 1982. An enterotoxin-like protein in *Staphylococcus aureus* strains from patients with toxic shock syndrome. *Annals of internal medicine.* 96(6_Part_2): 969-971.

Bhatia, A., and Zahoor, S. 2007. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. *J Clin Diag Res.* 3(1): 188-197.

Bremer, P., Fletcher, G., and Osborne, C. 2004. *Staphylococcus aureus*. *New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited. Private Bag.* 4704: 1-6.

Bryan, F. L. 1976. Staphylococcus aureus. *Food microbiology: public health and spoilage aspects*: 12-128.

Capita, R., Alonso-Calleja, C., Garcia-Fernandez, M., and Moreno, B. 2002. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat in Spain. *Poultry science.* 81(3): 414-421.

Casman, E., Bennett, R., Dorsey, A., and Issa, J. 1967. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *Journal of bacteriology.* 94(6): 1875-1882.

Chang, H.-C., and Bergdoll, M. S. 1979. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Biochemistry.* 18(10): 1937-1942.

Cheung, W., Chang, K., Hung, R., and Kleevens, J. 1990. Health effects of beach water pollution in Hong Kong. *Epidemiology and infection.* 105(01): 139-162.

Chu, F. S., Thadhani, K., Schantz, E. J., and Bergdoll, M. S. 1966. Purification and Characterization of Staphylococcal Enterotoxin A*. *Biochemistry.* 5(10): 3281-3289.

Cole, A. M., Tahk, S., Oren, A., Yoshioka, D., Kim, Y.-H., Park, A., and Ganz, T. 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 8(6): 1064-1069.

De Donno, A., Liaci, D., Bagordo, F., Lugoli, F., and Gabutti, G. 2008. *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of microbiological pollution of coastal waters: A study conducted in the Salento Peninsula (Italy). *Journal of Coastal Research.* 24(sp1): 216-221.

Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.-F., and Montel, M.-C. 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *Journal of Food Protection®.* 69(9): 2161-2167.

Dinges, M. M., Orwin, P. M., and Schlievert, P. M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews.* 13(1): 16-34.

Eley, A. (1996). *Microbial food poisoning*. Springer Science & Business Media.

Fujikawa, H., and Igarashi, H. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Applied and environmental microbiology.* 54(10): 2345-2348.

Gabutti, G., De Donno, A., Bagordo, F., and Montagna, M. 2000. Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as an effective indicator of human pollution. *Marine Pollution Bulletin.* 40(8): 697-700.

Gómez-Lucía, E., Goyache, J., Orden, J. A., Domenech, A., Hernandez, F. J., Ruiz-Santa Quiteria, J. A., Lopez, B., Blanco, J. L., and Suárez, G. 1992. Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *Journal of dairy science.* 75(1): 19-26.

Goodwin, K. D., McNay, M., Cao, Y., Ebentier, D., Madison, M., and Griffith, J. F. 2012. A multi-beach study of *Staphylococcus aureus*, MRSA, and enterococci in seawater and beach sand. *water research.* 46(13): 4195-4207.

Gram, L., and Huss, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International journal of food microbiology.* 33(1): 121-137.

Haard, N. F. 1992. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food research international.* 25(4): 289-307.

Hart, M. E. 2015. CURRENT ISSUES IN FOODBORNE ILLNESS CAUSED BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. *Emerging Issues, Technologies, and Systems*: 159.

Huang, I.-Y., Shih, T., Borja, C. R., Avena, R. M., and Bergdoll, M. 1967. Amino Acid Composition and Terminal Amino Acids of Staphylococcal Enterotoxin C*. *Biochemistry.* 6(5): 1480-1484.

Hui, Y., Gorham, J., Murrell, K., and Cliver, D. (1994). Foodborne Disease Handbook Volume 1: Diseases Caused by Bacteria: Marcel Dekker, Inc.: New York.

Janelidze, N., Jaiani, E., Lashkhi, N., Tskhvediani, A., Kokashvili, T., Gvarishvili, T., Jgenti, D., Mikashavidze, E., Diasamidze, R., and Narodny, S. 2011. Microbial water quality of the Georgian coastal zone of the Black Sea. *Marine pollution bulletin.* 62(3): 573-580.

Jay, J. M. (2012). *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.

Jay, J. M., Loessner, M. J., and Golden, D. A. (2008). *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.

Johnson, W., Tyler, S., Ewan, E., Ashton, F., Pollard, D., and Rozee, K. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology.* 29(3): 426-430.

Kawabata, A., Ichiyama, S., Iinuma, Y., Hasegawa, Y., Ohta, M., and Shimokata, K. 1997. Exfoliative toxin detection using reversed passive latex agglutination: clinical and epidemiologic applications. *Journal of clinical microbiology.* 35(8): 1984-1987.

Kramer, J., Gilbert, R., and Doyle, M. (1989). Foodborne bacterial pathogens: Marcel Dekker, New York.

Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2(1): 63-76.

Lelièvre, H., Lina, G., Jones, M. E., Olive, C., Forey, F., Roussel-Delvallez, M., Nicolas-Chanoine, M.-H., Bébéar, C. M., Jarlier, V., and Andremont, A. 1999. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *Journal of clinical microbiology.* 37(11): 3452-3457.

Chulalongkorn University

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases.* 5(5): 607.

Meyrand, A., Boutrand-Loei, S., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Gaspard, C., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., and Vernozy-Rozand, C. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *Journal of applied microbiology.* 85(3): 537-544.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., and Pfaller, M. A. (1994). *Medical microbiology*. Mosby.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., and Bolzoni, G. 2005. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International journal of food microbiology.* 98(1): 73-79.

Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F., Romalde, J., and Pereira, M. 2011. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives–A mini-review. *Food Control.* 22(6): 805-816.

Organization, W. H. (2003). *Guidelines for safe recreational water environments: Coastal and fresh waters* (Vol. 1). World Health Organization.

Orwin, P. M., Leung, D. Y., Donahue, H. L., Novick, R. P., and Schlievert, P. M. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infection and immunity.* 69(1): 360-366.

Park, C., and Szabo, R. 1986. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D in foods. *Canadian journal of microbiology.* 32(9): 723-727.

Park, C., Warburton, D., and Laffey, P. 1996. A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxins in foods by an enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN®). *International journal of food microbiology.* 29(2): 281-295.

Peterson, L. R., Bailey, W. R., Scott, E. G., Finegold, S. M., and Baron, E. J. (1994). *Diagnostic microbiology*. Mosby.

Plano, L. R., Garza, A. C., Shibata, T., Elmir, S. M., Kish, J., Sinigalliano, C. D., Gidley, M. L., Miller, G., Withum, K., and Fleming, L. E. 2011. Shedding of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from adult and pediatric bathers in marine waters. *Bmc Microbiology.* 11(1): 1.

Pomykała, R., Michalski, M., Jó**Ź**wik, A., and Osek, J. 2012. Microbiological and Marine Biotoxins Contamination of Raw Bivalve Molluscs Commercially Available in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.* 56(4): 563-568.

Rasooly, A., and Rasooly, R. S. 1998. Detection and analysis of staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. *International journal of food microbiology.* 41(3): 205-212.

Reynolds, D., Tranter, H. S., Sage, R., and Hambleton, P. 1988. Novel method for purification of staphylococcal enterotoxin A. *Applied and environmental microbiology.* 54(7): 1761-1765.

Ripabelli, G., Sammarco, M. L., Grasso, G. M., Fanelli, I., Caprioli, A., and Luzzi, I. 1999. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *International Journal of Food Microbiology.* 49(1): 43-48.

Salán, E. O., Galvão, J. A., Furlan, É. F., Porto, E., Gallo, C. R., and Oetterer, M. 2008. Quality of mussels cultivated and commercialized in Ubatuba, SP, Brazil: monitoration *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* growth after post-harvest processing. *Food Science and Technology (Campinas).* 28(1): 152-159.

Scallan, E., Jones, T. F., Cronquist, A., Thomas, S., Frenzen, P., Hoefer, D., Medus, C., and Angulo, F. J. 2006. Factors associated with seeking medical care and submitting a stool sample in estimating the burden of foodborne illness. *Foodbourne Pathogens & Disease.* 3(4): 432-438.

Schantz, E. J., Roessler, W. G., Wagman, J., Spero, L., Dunnery, D. A., and Bergdoll, M. S. 1965. Purification of Staphylococcal Enterotoxin B*. *Biochemistry.* 4(6): 1011-1016.

Schlievert, P. M., Jablonski, L. M., Roggiani, M., Sadler, I., Callantine, S., Mitchell, D. T., Ohlendorf, D. H., and Bohach, G. A. 2000. Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. *Infection and immunity.* 68(6): 3630-3634.

Šolić, M., and Krstulović, N. 1994. Presence and survival of *Staphylococcus aureus* in the coastal area of Split (Adriatic Sea). *Marine pollution bulletin.* 28(11): 696-700.

Šolić, M., Krstulović, N., Jozić, S., and Curać, D. 1999. The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. *Environment international.* 25(8): 991-1000.

Son, N. T., and Fleet, G. H. 1980. Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, Crassostrea commercialis, during depuration, re-laying, and storage. *Applied and Environmental Microbiology.* 40(6): 994-1002.

Soriano, J., Font, G., Rico, H., Molto, J., and Manes, J. 2002. Incidence of enterotoxigenic staphylococci and their toxins in foods. *Journal of Food Protection®.* 65(5): 857-860.

Strunjak-Perovic, I., Kozacinski, L., Jadan, M., and Brlek-Gorski, D. 2010. Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia. *Veterinarni Medicina.* 55(5): 233-241.

Su, Y.-C., and Lee Wong, A. C. 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *Journal of Food Protection®.* 60(2): 195-202.

Thompson, N., Razdan, M., Kuntsmann, G., Aschenbach, J., Evenson, M., and Bergdoll, M. 1986. Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays and radioimmunoassays: comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. *Applied and environmental microbiology.* 51(5): 885-890.

Tille, P. (2013). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. Elsevier Health Sciences.

Towner, K., Talbot, D., Curran, R., Webster, C., and Humphreys, H. 1998. Development and evaluation of a PCR-based immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology.* 47(7): 607-613.

Tsen, H., Yu, G., Wang, K., Wang, S., Chang, M., and Lin, L. 1998. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin I (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food microbiology.* 15(1): 33-41.

Viau, E. J., Goodwin, K. D., Yamahara, K. M., Layton, B. A., Sassoubre, L. M., Burns, S. L., Tong, H.-I., Wong, S. H., Lu, Y., and Boehm, A. B. 2011. Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams—associations with fecal indicators, land cover, and water quality. *water research.* 45(11): 3279-3290.

Wagman, J., Edwards, R. C., and Schantz, E. J. 1965. Molecular Size, Homogeneity, and Hydrodynamic Properties of Purified Staphylococcal Enterotoxin B*. *Biochemistry.* 4(6): 1017-1023.

Wong, A., Bergdoll, M., Cliver, D., and Riemann, H. 2002. Staphylococcal food poisoning. *Foodborne diseases*(Ed. 2): 231-248.

Zhang, S., Iandolo, J. J., and Stewart, G. C. 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiology Letters.* 168(2): 227-233.

คุ้มหอม, พ. 2550. การปนเปื้อนและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อปูม้าต้มสุก. (มหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยบูรพา, กรุงเทพฯ.

ภานุกิจ กันหาจันทร์. 2546. การแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินและทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าในโรงพยาบาลในกรุงเทพมหานคร. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวรรณพินิจ, น. (2545). แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. กรุงเทพฯ: โนเบิลพรินท์.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. Baird-Parker medium

Tryptone	10g
Beef extract	5g
Yeast extract	1g
Sodium pyruvate	12g
Glycine	12g
$LiCl.6H_2O$	5g
Agar	15g
DW	1 litre

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Mannitol Salt Agar

Beef extract	1g
Peptone	10g
Mannitol	10g
NaCl	75g
Phenol red	0.025g
Agar	15g
DW	1 litre

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.4 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. Phosphate Buffer Saline

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na_2HPO_4	1.44g
KH_2PO_4	0.24g
DW	1 litre

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.2 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Trypticase Soy Broth

Casein peptone (pancreatic)	17g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5g
Glucose	2.5g
NaCl	5g
Soya peptone (papain digest)	3g
DW	1 litre

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. Trypticase Soy Agar

Casein peptone (pancreatic)	15g
NaCl	5g
Soya peptone (papainic)	5g
Agar	15g
DW	1 litre

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข
ชายหาดท่องเที่ยวและแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ ข-1 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสน

รูปที่ ข-2 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสน

รูปที่ ข-3 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดพัทยา

รูปที่ ข-4 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดพัทยา

รูปที่ ข-5 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดชะอำ

รูปที่ ข-6 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดชะอำ

รูปที่ ข-7 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดหัวหิน

รูปที่ ข-8 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดหัวหิน

ภาคผนวก ค
ลักษณะตัวอย่างหอยแมลงภู่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ ค-1 สถานที่เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงศรีราชา

รูปที่ ค-2 สถานที่เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงอ่างศิลา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ ค-3 สถานที่เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงอ่าวชลบุรี

ตาราง ค-1 ค่าเฉลี่ยขนาดหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเลี้ยงหอยในช่วงที่ทำการศึกษา

เดือน	ขนาดหอยแมลงภู่ (cm.)					
	อ่าวชลบุรี	อ่างศิลา	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	7.90±0.69	nd	5.90±0.32	5.43±0.44	nd	nd
มีนาคม	8.52±0.42	6.51±0.16	7.53±0.53	6.89±0.45	nd	nd
พฤษภาคม	7.06±0.62	7.92±0.39	6.82±0.32	5.88±0.38	5.97±0.49	6.39±0.43
กรกฎาคม	6.85±0.42	7.38±0.41	7.45±0.40	nd	7.76±0.53	7.30±0.45
กันยายน	6.59±0.33	6.52±0.28	6.63±0.15	6.32±0.31	nd	nd
พฤศจิกายน	7.54±0.35	7.21±0.41	8.09±0.74	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	7.41±0.72	7.11±0.60	7.07±0.78	6.13±0.62	6.87±1.27	6.85±0.64

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 10, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

ตาราง ค-2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเลี้ยงหอยในช่วงที่ทำการศึกษา

เดือน	น้ำหนักหอยแมลงภู่ (g)					
	อ่าวชลบุรี	อ่างศิลา	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	10.79±2.48	nd	4.38±0.41	4.48±0.99	nd	nd
มีนาคม	12.81±1.52	5.81±0.60	10.44±1.90	4.70±0.90	nd	nd
พฤษภาคม	6.69±1.84	7.37±1.47	9.11±2.09	5.23±0.97	5.64±0.74	6.13±0.99
กรกฎาคม	5.46±0.90	6.67±1.45	7.22±1.12	nd	7.59±0.98	7.92±1.61
กันยายน	5.24±1.04	6.03±1.39	7.47±0.88	5.08±1.08	nd	nd
พฤศจิกายน	6.68±1.38	6.97±1.30	9.50±2.81	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	7.95±3.11	6.57±0.65	8.02±2.16	4.87±0.34	6.62±1.38	7.03±1.27

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 10, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

ภาคผนวก ง
ข้อมูลสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง ง-1 ค่าออกซิเจนละลายในน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสนและพัทยาระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

DO (mg/L)				
เดือน	บางแสน	พัทยา	ชะอำ	หัวหิน
มกราคม	5.25±0.19	4.87±0.31	5.01±0.19	5.33±0.29
มีนาคม	4.25±0.36	3.96±0.12	3.79±0.14	6.08±0.08
พฤษภาคม	4.08±0.24	4.15±0.16	4.35±0.56	4.63±0.30
กรกฎาคม	4.12±0.45	4.47±0.55	4.71±1.13	6.20±0.50
กันยายน	4.55±0.59	3.86±0.55	5.91±0.61	6.60±0.45
พฤศจิกายน	4.67±0.10	4.15±0.25	5.78±1.10	5.80±0.12
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด±SD	4.48±0.44	4.24±0.37	4.93±0.82	5.77±0.70

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 3

ตาราง ง-2 ค่าอุณหภูมิในน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสนและพัทยาระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

Temp (°C)				
เดือน	บางแสน	พัทยา	ชะอำ	หัวหิน
มกราคม	23.6±0.26	25.4±0.15	26.1±0.55	24.4±0.42
มีนาคม	33.5±0.53	30.8±0.35	32.7±0.42	31.8±0.21
พฤษภาคม	34.2±0.40	31.0±0.68	36.2±0.45	35.2±0.15
กรกฎาคม	32.7±0.50	32.4±0.81	32.8±0.57	31.1±0.46
กันยายน	32.7±0.36	31.0±0.23	32.4±0.32	31.3±0.23
พฤศจิกายน	32.0±0.15	30.8±0.06	31.5±0.06	31.7±0.06
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด±SD	31.5±3.92	30.2±2.47	31.9±3.29	30.9±3.53

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 3

ตาราง ง-3 ค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสนและพัทยาระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

pH				
เดือน	บางแสน	พัทยา	ชะอำ	หัวหิน
มกราคม	8.1±0.06	8.0±0.06	7.9±0.06	7.9±0.06
มีนาคม	8.3±0.06	8.0±0.06	8.1±0.00	8.1±0.00
พฤษภาคม	7.7±0.06	7.7±0.12	7.7±0.06	7.8±0.06
กรกฎาคม	8.4±0.08	8.1±0.05	8.1±0.08	8.0±0.02
กันยายน	8.2±0.15	8.0±0.04	8.1±0.04	8.1±0.03
พฤศจิกายน	8.0±0.02	8.1±0.08	8.0±0.03	7.9±0.02
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด±SD	8.1±0.26	8.0±0.15	8.0±0.15	8.0±0.12

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 3

ตาราง ง-4 ค่าความเค็มในน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสนและพัทยาระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

Salinity (‰)				
เดือน	บางแสน	พัทยา	ชะอำ	หัวหิน
มกราคม	29.5±0.12	29.1±0.29	27.0±0.81	27.0±1.33
มีนาคม	28.6±0.00	29.3±0.15	29.0±0.21	29.1±0.10
พฤษภาคม	29.3±0.21	30.3±0.20	29.6±0.12	29.7±0.00
กรกฎาคม	27.7±0.38	29.7±0.35	29.7±0.32	29.5±0.15
กันยายน	22.8±0.00	28.1±0.00	29.3±0.00	29.7±0.00
พฤศจิกายน	27.4±0.06	29.1±0.06	26.4±0.06	25.4±0.06
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด±SD	27.6±2.48	29.3±0.73	28.5±1.42	28.4±1.77

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 3

ตาราง ง-5 ค่าบีโอดีในน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสนและพัทยาระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

BOD (mg/L)				
เดือน	บางแสน	พัทยา	ชะอำ	หัวหิน
มกราคม	0.30±0.37	0.32±0.06	1.05±0.77	0.52±0.05
มีนาคม	2.45±0.45	0.30±0.05	0.99±0.22	0.83±0.18
พฤษภาคม	0.82±0.66	0.68±0.57	1.45±0.19	0.92±0.48
กรกฎาคม	2.06±0.34	0.89±0.84	0.19±0.02	0.48±0.17
กันยายน	1.12±0.54	0.60±0.52	0.29±0.09	0.54±0.33
พฤศจิกายน	1.12±0.54	0.60±0.52	0.29±0.09	0.54±0.33
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด±SD	1.31±0.80	0.56±0.22	0.71±0.52	0.64±0.19

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 3

ตาราง ง-6 ปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวในช่วงที่ทำการศึกษา

เดือน	เชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในน้ำทะเล ($x10^3$ CFU/mL)			
	บางแสน	พัทยา	ชะอำ	หัวหิน
มกราคม	3.73±1.17	2.03±1.81	0.92±0.64	4.69±1.72
มีนาคม	0.21±0.05	0.70±0.40	0.55±0.51	2.45±0.31
พฤษภาคม	0.18±0.06	0.09±0.03	0.41±0.58	3.31±0.39
กรกฎาคม	0.25±0.17	0.22±0.07	0.16±0.09	2.87±2.80
กันยายน	0.32±0.16	1.35±0.40	1.78±1.37	2.81±0.70
พฤศจิกายน	1.08±0.53	1.10±0.54	0.73±0.88	0.21±0.04
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด±SD	0.96±1.40	0.92±0.73	0.76±0.56	2.72±1.46

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 3

ตาราง ง-7 ค่าออกซิเจนละลายในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

DO (mg/L)						
เดือน	อ่างศิลา	อ่าวชลบุรี	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	nd	5.66	4.85	4.09	nd	nd
มีนาคม	3.33	4.02	3.82	3.22	nd	nd
พฤษภาคม	3.22	3.06	3.77	2.25	2.68	3.04
กรกฎาคม	3.24	2.77	2.79	nd	1.59	4.17
กันยายน	3.94	2.67	3.95	2.66	nd	nd
พฤศจิกายน	3.71	2.62	3.65	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	3.60±0.39	3.47±1.19	3.81±0.66	3.24±0.70	2.04±0.67	3.16±0.70

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 6, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

ตาราง ง-8 ค่าอุณหภูมิในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

Temp (°C)						
เดือน	อ่างศิลา	อ่าวชลบุรี	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	nd	22.8	25.2	25.8	nd	nd
มีนาคม	33.1	33.4	31.9	32.2	nd	nd
พฤษภาคม	32.5	33.4	31.4	35.5	31.7	33.7
กรกฎาคม	30.3	30.4	31.2	nd	29.8	31.5
กันยายน	32	33.3	32.7	31.5	nd	nd
พฤศจิกายน	33	31.3	30.8	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	30.7±3.84	30.8±4.10	30.5±2.69	31.2±3.15	30.3±1.12	31.6±1.49

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 6, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

ตาราง ง-9 ค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

pH						
เดือน	อ่างศิลา	อ่าวชลบุรี	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	nd	8.1	8.1	7.6	nd	nd
มีนาคม	8	7.8	8.1	7.8	nd	nd
พฤษภาคม	7.5	6.8	7.5	7.2	6.8	7.5
กรกฎาคม	8	7.64	8.14	nd	7.18	7.86
กันยายน	7.88	7.53	8.1	7.51	nd	nd
พฤศจิกายน	7.8	7.49	8.04	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	7.8±0.18	7.6±0.43	8.0±0.25	7.6±0.28	7.2±0.31	7.6±0.20

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 6, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

ตาราง ง-10 ค่าความเค็มในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

Salinity (‰)						
เดือน	อ่างศิลา	อ่าวชลบุรี	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	nd	28.6	29.3	20.8	nd	nd
มีนาคม	28.4	27.8	28.5	24.3	nd	nd
พฤษภาคม	28.6	27.7	30.2	11.1	25	1.8
กรกฎาคม	32.9	23.9	28.4	nd	7.9	13
กันยายน	17	1.4	24.4	7.9	nd	nd
พฤศจิกายน	27.7	25.3	29.2	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	27.3±5.36	22.5±10.46	28.3±2.03	17.9±6.67	15.8±12.25	9.1±7.44

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 6, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

ตาราง ง-11 ค่าบีโอดีในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

BOD (mg/L)						
เดือน	อ่างศิลา	อ่าวชลบุรี	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	nd	1.92	0.45	1.97	nd	nd
มีนาคม	0.43	1.23	0.86	1.59	nd	nd
พฤษภาคม	0.09	2.34	1.97	2.5	3.61	0.78
กรกฎาคม	0.38	0.12	0.53	nd	0.07	0.31
กันยายน	2.17	1.54	0.8	2.85	nd	nd
พฤศจิกายน	2.17	1.54	0.8	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	0.95±0.95	1.45±0.75	0.90±0.55	1.99±1.01	1.72±1.45	0.96±0.52

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 6, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

ตาราง ง-12 ค่าปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในน้ำทะเลบริเวณแหล่งเลี้ยงหอยแมลงภู่ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

เดือน	เชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในน้ำทะเล ($x10^3$ CFU/mL)					
	อ่าวชลบุรี	อ่างศิลา	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	6.31±0.59	nd	4.17±4.24	5.64±1.14	nd	nd
มีนาคม	0.65±0.56	5.68±2.75	1.47±0.79	0.14±0.03	nd	nd
พฤษภาคม	0.75±0.24	1.59±0.06	0.72±0.14	0.14±0.09	0.66±0.08	0.02±0.01
กรกฎาคม	1.80±2.55	0.11±0.02	0.27±0.10	nd	0.24±0.03	0.04±0.03
กันยายน	0.51±0.14	0.49±0.37	3.43±5.43	0.06±0.01	nd	nd
พฤศจิกายน	0.23±0.17	0.48±0.16	0.30±0.06	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	1.71±2.32	1.67±2.31	1.73±1.68	1.50±2.76	0.46±0.30	0.03±0.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 3, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

ตาราง ง-13 ค่าปริมาณเชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในหอยแมลงภู่ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557

เดือน	เชื้อกลุ่ม Staphylococci ที่เกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสในหอยแมลงภู่ ($x10^3$ CFU/g)					
	อ่าวชลบุรี	อ่างศิลา	ศรีราชา	บางตะบูน	คลองด่าน	แม่กลอง
มกราคม	0.10±0.06	nd	3.91±2.75	2.09±1.48	nd	nd
มีนาคม	1.08±0.72	1.88±1.67	1.26±0.36	5.17±4.03	nd	nd
พฤษภาคม	0.13±0.07	0.13±0.06	0.11±0.06	0.25±0.15	0.52±0.43	0.16±0.12
กรกฎาคม	0.16±0.11	0.11±0.06	0.13±0.13	nd	0.11±0.06	0.05±0.03
กันยายน	2.34±1.35	0.24±0.32	0.25±0.27	0.53±0.60	nd	nd
พฤศจิกายน	0.77±0.59	0.20±0.08	0.06±0.03	nd	nd	nd
ค่าเฉลี่ย±SD	0.76±0.87	0.51±0.77	0.95±1.52	2.01±2.26	0.32±0.29	0.11±0.08

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, N = 10, nd = ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง จ-1 ค่าความแปรปรวนแบบสองทางของปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำทะเลบริเวณหาดท่องเที่ยวกับช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	360842479[a]	23	15688803.42	5.957	.000
Intercept	387471812	1	387471812.0	147.130	.000
Site (หาดท่องเที่ยว)	139016658	3	46338886.09	17.596	.000
Time (ช่วงเวลาที่เก็บ)	111171632	5	22234326.39	8.443	.000
Site * Time	110654189	15	7376945.902	2.801	.001
Error	505637804	192	2633530.230		
Total	1253952095	216			
Corrected Total	866480283	216			

[a.] R Squared = .416 (Adjusted R Squared = .347)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง จ-2 ค่าความแปรปรวนแบบสองทางของปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหอยแมลงภู่จากแหล่งต่างๆกับช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	407695658[a]	24	16987319.08	13.104	.000
Intercept	1944892922	1	194892922.0	150.340	.000
Site (ฟาร์มเลี้ยงหอย)	25785909.5	5	5157181.908	3.978	.002
Time (ช่วงเวลาที่เก็บ)	139370824	5	27874164.71	21.502	.000
Site * Time	191076136	14	13648295.44	10.528	.000
Error	291678612	225	1296349.346		
Total	888275768	250			
Corrected Total	699374270	249			

[a] R Squared = .583 (Adjusted R Squared = .538)

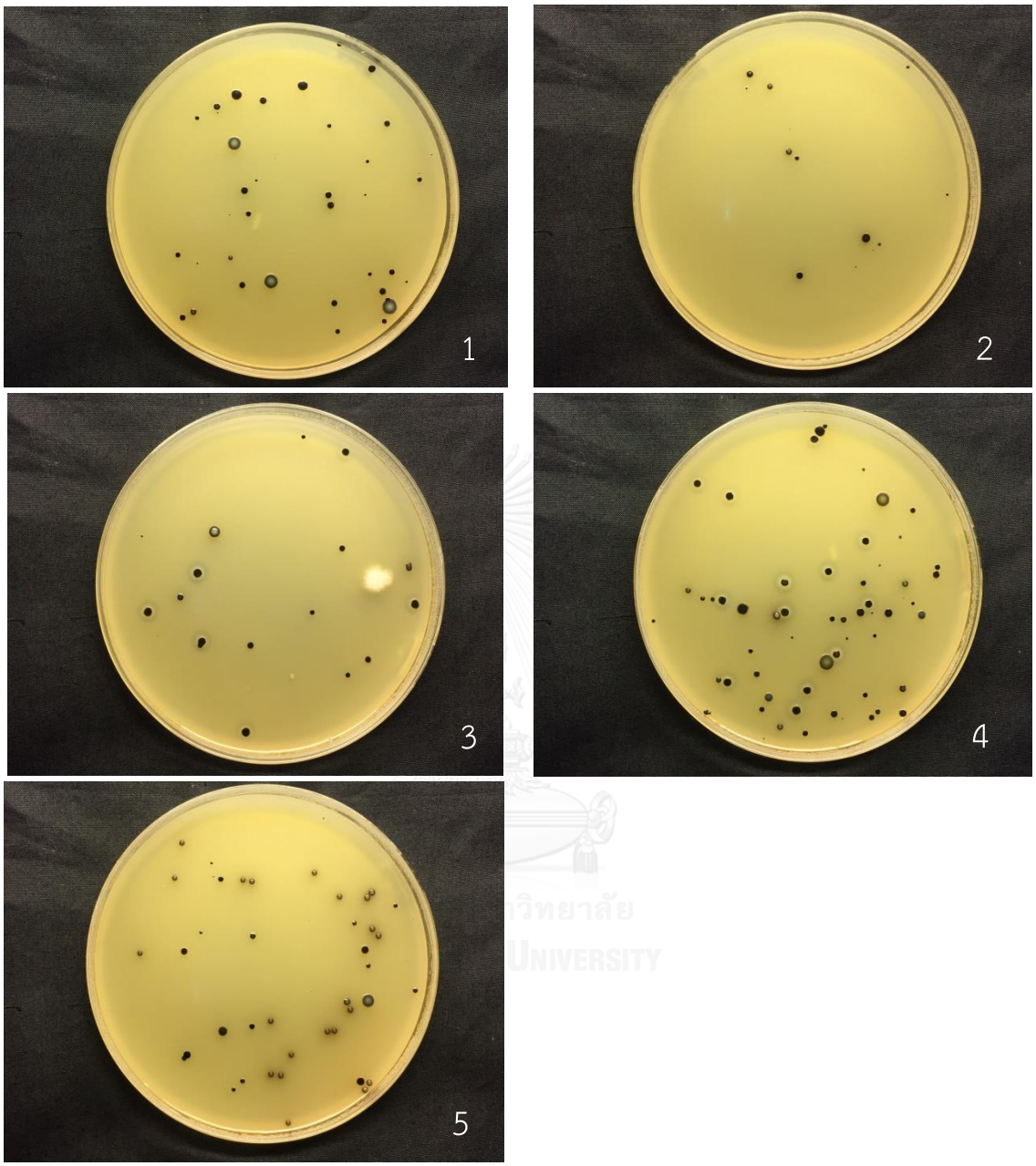
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฉ

การคัดแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Baird Parker Agar

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ ฉ-1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร BPA จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวชลบุรี



รายละเอียดรูปภาพ

1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวชลบุรีเดือนมีนาคม

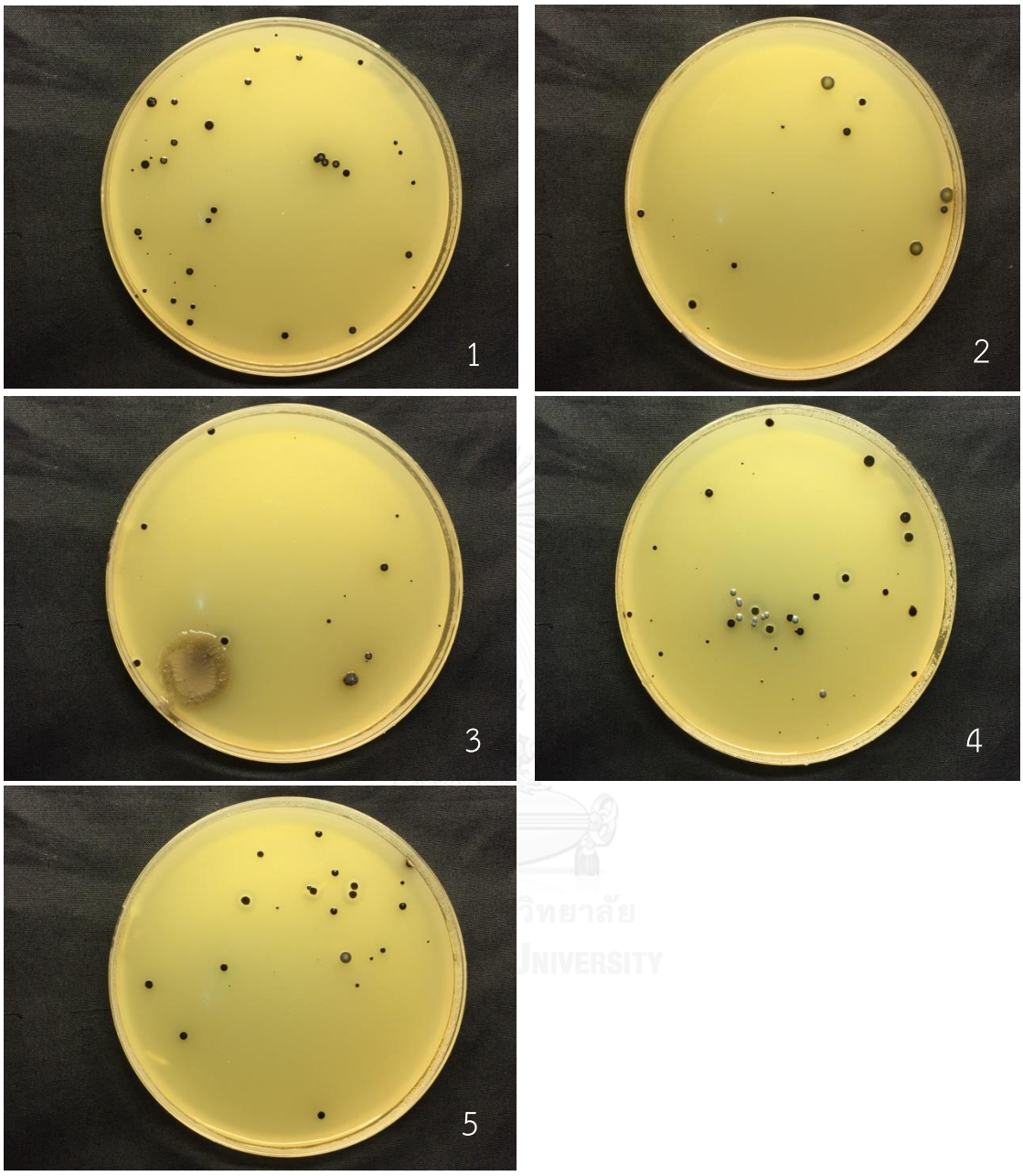
2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวชลบุรีเดือนพฤษภาคม

3 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวชลบุรีเดือนกรกฎาคม

4 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวชลบุรีเดือนกันยายน

5 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวชลบุรีเดือนพฤศจิกายน

รูปที่ ฉ-2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร BPA จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลา



รายละเอียดรูปภาพ

1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนมีนาคม

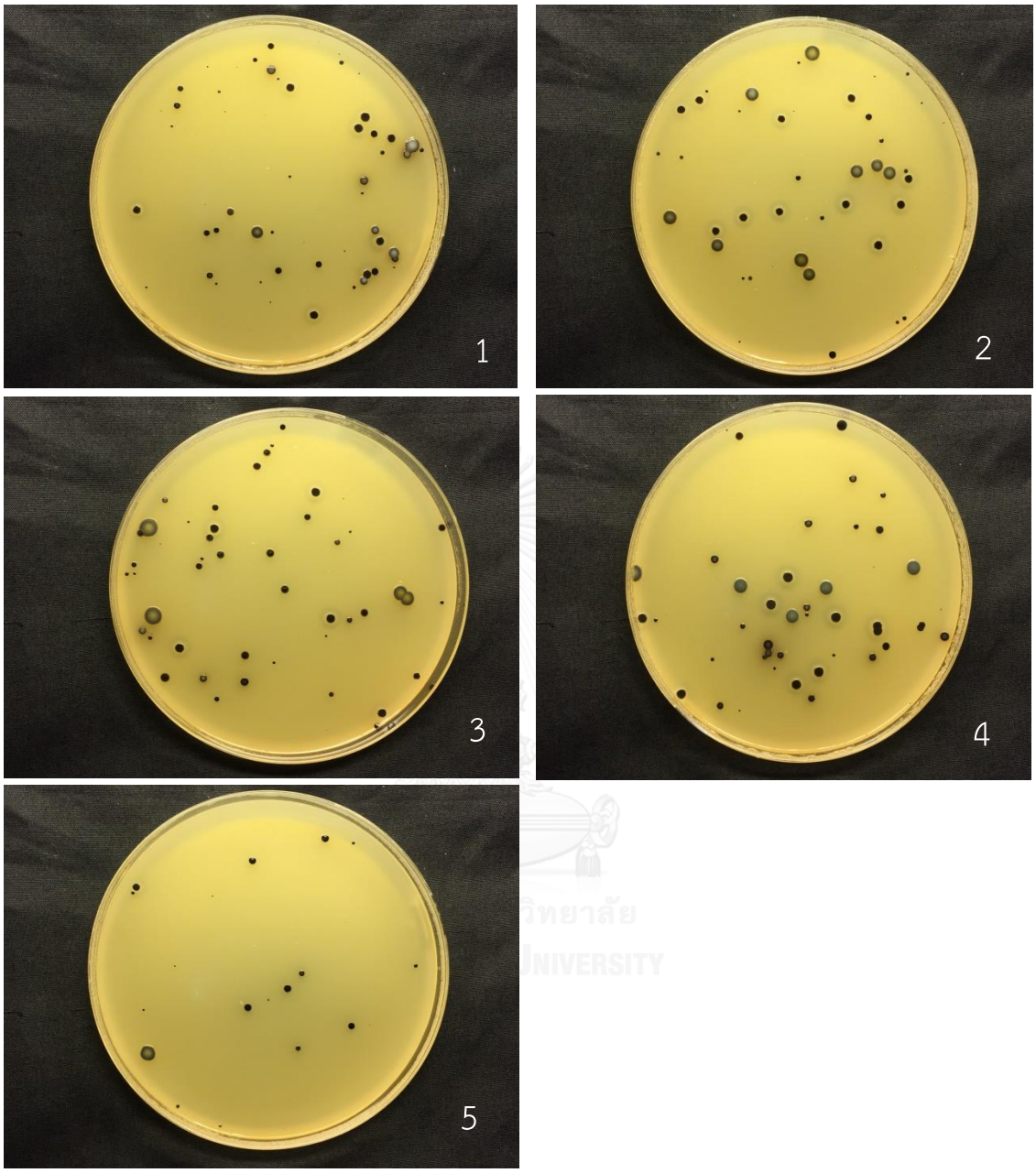
2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนพฤษภาคม

3 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกรกฎาคม

4 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกันยายน

5 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนพฤศจิกายน

รูปที่ ฉ-3 เชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร BPA จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชา



รายละเอียดรูปภาพ

1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชาเดือนมีนาคม

2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชาเดือนพฤษภาคม

3 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชาเดือนกรกฎาคม

4 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชาเดือนกันยายน

5 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชาเดือนพฤศจิกายน

ภาคผนวก ช

การศึกษาลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Mannitol Salt Agar

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ ช-1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร MSA จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวชลบุรี

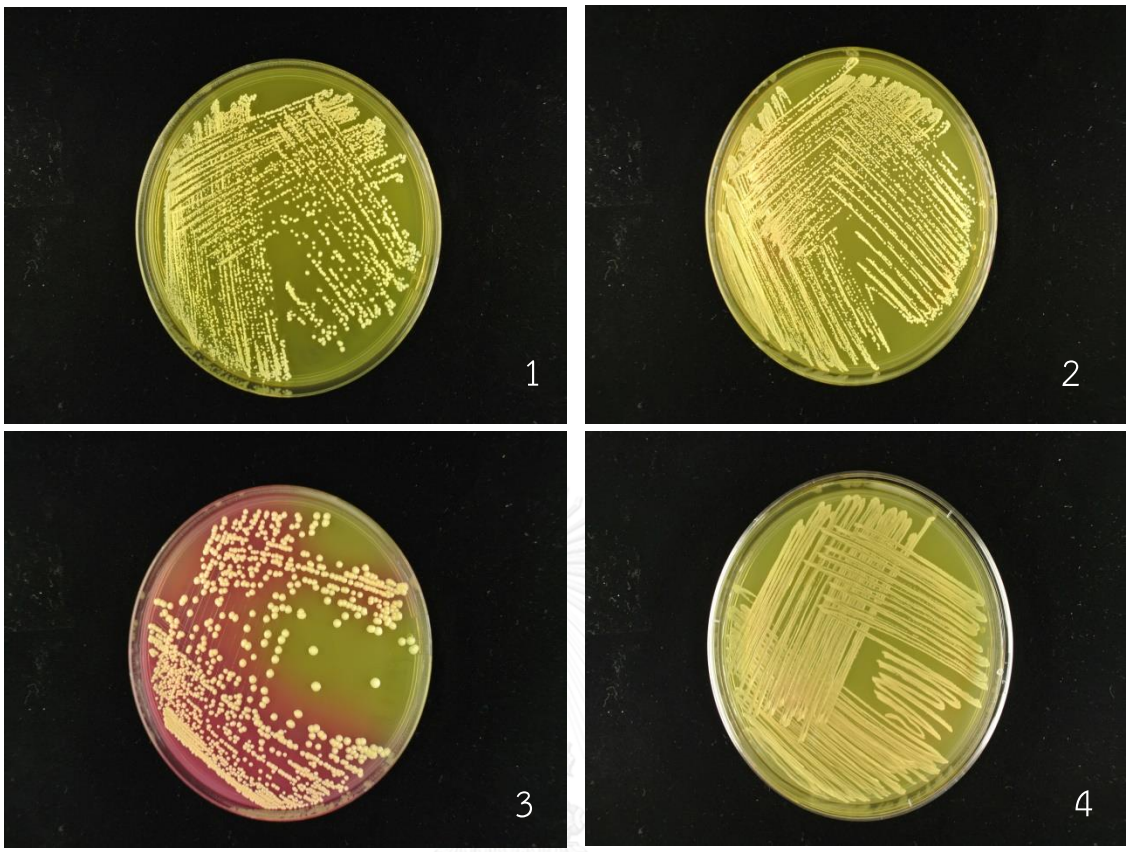
รายละเอียดรูปภาพ

1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวชลบุรีเดือนมีนาคม

2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่าวชลบุรีเดือนกรกฎาคม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ ช-2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร MSA จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลา



รายละเอียดรูปภาพ

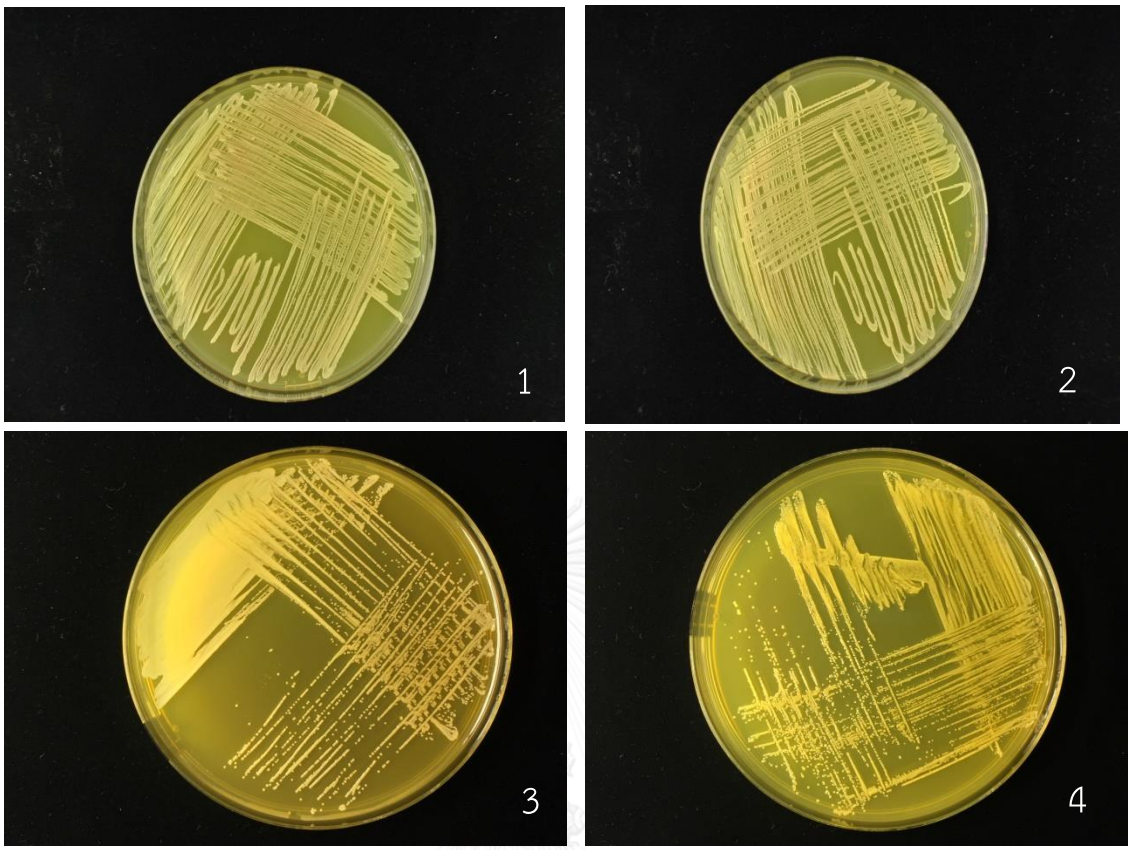
1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกรกฎาคม

2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกรกฎาคม

3 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกรกฎาคม

4 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกรกฎาคม

รูปที่ ช-3 เชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร MSA จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลา



รายละเอียดรูปภาพ

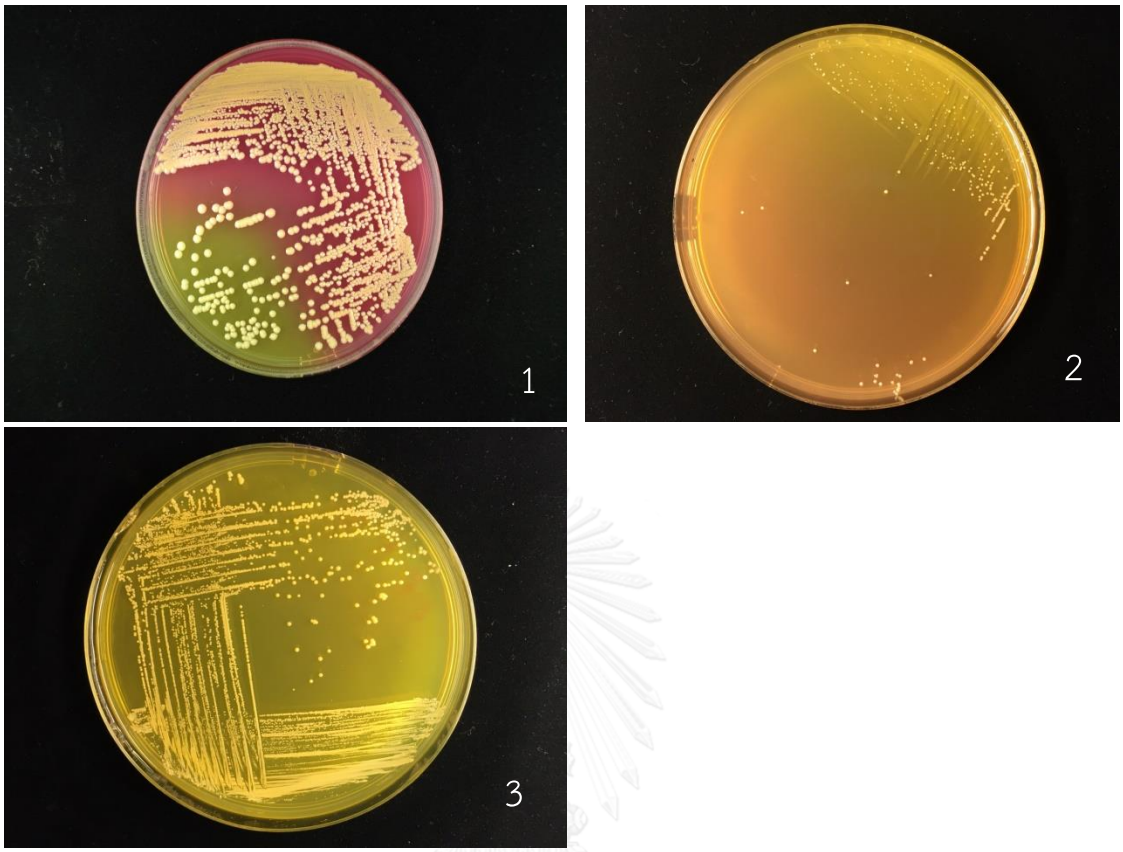
1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกันยายน

2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกันยายน

3 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกันยายน

4 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลาเดือนกันยายน

รูปที่ ช-4 เชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร MSA จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชา



รายละเอียดรูปภาพ

1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชาเดือนมีนาคม

2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชาเดือนพฤศจิกายน

3 เชื้อ *Staphylococcus aureus* จากหอยแมลงภู่บริเวณศรีราชาเดือนพฤศจิกายน

ภาคผนวก ซ

ปริมาณดีเอ็นเอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง ซ-1 ปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ก่อโรค

Sample Read	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/L
BLANK	A2	0.045	0.043	0.04	0	0	1	0
SAMPLE 1	A3	0.085	0.071	0.054	0.027	0.014	1.925	27.412
SAMPLE 2	B2	0.064	0.054	0.043	0.016	0.007	2.232	16.211
SAMPLE 3	B3	0.128	0.096	0.06	0.066	0.034	1.944	65.778
SAMPLE 4	C2	0.103	0.074	0.043	0.058	0.029	2	57.983
SAMPLE 5	C3	0.107	0.083	0.055	0.05	0.026	1.93	49.703
SAMPLE 6	D2	0.186	0.128	0.062	0.125	0.066	1.895	124.79
SAMPLE 7	D3	0.071	0.059	0.045	0.023	0.011	2.088	22.573
SAMPLE 8	E2	0.077	0.062	0.045	0.028	0.014	2.038	28.15
SAMPLE 9	E3	0.059	0.053	0.043	0.012	0.007	1.873	12.479
SAMPLE 10	F2	0.073	0.061	0.045	0.024	0.013	1.879	24.352
SAMPLE 11	F3	0.136	0.115	0.088	0.044	0.024	1.814	44.292
SAMPLE 12	G2	0.123	0.086	0.045	0.077	0.04	1.937	76.762
SAMPLE 13	G3	0.068	0.058	0.046	0.018	0.008	2.154	17.778

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฌ

Petrifilm Staph Express

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(TH) (ภาษาไทย)

วันที่ออก: 2015-09

3M

Petrifilm™ คำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์

Staph Express System

คำอธิบายผลิตภัณฑ์และจุดมุ่งหมายการใช้

ระบบ 3M™ Petrifilm™ Staph Express (STX) ประกอบด้วย แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count (STX) และ แผ่นดิสก 3M™ Petrifilm™ Staph Express (STX) ซึ่งบรรจุหีบห่อแยกกัน แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX เป็นระบบอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่มีสารก่อเจลที่ละลายได้ในน้ำเย็น อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker ดัดแปลงแบบโครโมเจนิกในแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อเชื้อและสามารถแยกความแตกต่างสำหรับเชื้อ*Staphylococcus aureus* แต่อาจยังสามารถระบุเชื้อ *Staphylococcus hyicus* (*S. hyicus*) หรือเชื้อ *Staphylococcus intermedius* (*S. intermedius*) ได้อีกด้วย แผ่นดิสก 3M Petrifilm STX ประกอบด้วย toluidine blue-O ที่ช่วยให้สามารถมองเห็นการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีออกซิไรโบนิวคลีเอส (DNase) ได้ง่าย เชื้อแบคทีเรียที่มีเอนไซม DNase จะถูกตรวจพบบน แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX รวมทั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX และ แผ่นดิสก 3M Petrifilm STX ใช้สำหรับการนับจำนวนสปีชีส์ของเชื้อ*Staphylococcus* ที่มีเอนไซม DNase ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ส่วนประกอบของ แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX และ แผ่นดิสก 3M Petrifilm STX ได้รับการกำจัดการปนเปื้อนแล้ว แต่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ

ความปลอดภัยด้านอาหารของ 3Mได้รับการรับรองจากองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (ISO) 9001 สำหรับการออกแบบและการผลิต ระบบ 3M Petrifilm STX System ยังไม่ผ่านการประเมินกับผลิตภัณฑ์อาหาร กระบวนการแปรรูปอาหาร เกณฑ์วิธีการทดสอบ หรือกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เป็นไปได้

ความปลอดภัย

ผู้ใช้ควรอ่าน ทำความเข้าใจและปฏิบัติตามข้อมูลด้านความปลอดภัยทั้งหมดในคำแนะนำสำหรับ แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX และ แผ่นดิสก์ 3M Petrifilm STX เก็บคำแนะนำด้านความปลอดภัยนี้ไว้สำหรับใช้อ้างอิงในอนาคต

⚠**คำเตือน:** แสดงสถานการณ์ที่เป็นอันตราย ซึ่งหากไม่หลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตหรือการบาดเจ็บรุนแรงและ/หรือความเสียหายต่อทรัพย์สิน

การเพาะเชื้อ

1. วางแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX บนพื้นผิวเรียบและอยู่ในแนวราบ
2. เปิดแผ่นฟิล์มที่อยู่ด้านบนขึ้นและหยดสารละลายตัวอย่างในแนวตั้งฉากด้วยปิเปตต์ 1 มล. ลงตรงกลางของก้นฟิล์ม
3. ค่อยๆ ม้วนฟิล์มที่อยู่ด้านบนลงบนตัวอย่างเพื่อป้องกันไม่ให้มีการกักฟองอากาศไว้ภายใน
4. วางตัวกดแบบเรียบ 3M™ Petrifilm™ (หมายเลขแคตตาล็อก #6425) ด้วยด้านที่เรียบลงตรงกลางของแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ กดเบาๆ บริเวณส่วนกลางของตัวกดแบบเรียบเพื่อให้ตัวอย่างกระจายอย่างสม่ำเสมอ กระจายสารละลายเชื้อให้ทั่วทั้งบริเวณที่เชื้อเจริญเติบโตบนแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STXก่อนที่เจลจะก่อตัวขึ้น หามเลื่อนตัวกดแบบเรียบไปมาบนเนื้อฟิลม
5. นำตัวกดแบบเรียบออกและปล่อยแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX ทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อยหนึ่งนาทีเพื่อให้เจลก่อตัว

การบ่มเชื้อ

บ่มแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX ในแนวนอนโดยหันด้านใสขึ้น ไม่ควรให้แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX ซ้อนกันเกิน 20 แผน

บ่มแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35ºC ± 1ºC หรือ 37ºC ± 1ºC (อุณหภูมิที่ใช้ได้มาจากข้อมูลอ้างอิงที่ได้รับการตรวจสอบความถูกต้อง) ดูในส่วน **"คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีการที่ได้รับการตรวจสอบความถูกต้อง"** สำหรับข้อกำหนดเฉพาะ

การแปลผลการตรวจวิเคราะห์

1. นับจำนวนเชื้อบนแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX โดยใช้เครื่องนับโคโลนีมาตรฐานหรือเครื่องขยายขนาดภาพที่มีการส่องสว่างประเภทอื่นๆ อย่าตรวจนับโคโลนีบนขอบโฟมเนื่องจากเป็นบริเวณที่ไม่สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. สังเกตสีของโคโลนี

   ก. หากไม่มีโคโลนีหรือมีเพียงโคโลนีสีม่วงแดงเท่านั้นหลังจากผ่านไป 24 ± 2 ชั่วโมง ให้นับจำนวนโคโลนีสีม่วงแดงเป็น *S. aureus*, *S. hyicus*, หรือ *S. intermedius*; การทดสอบเสร็จเรียบร้อย ไม่จำเป็นต้องใช้ แผ่นดิสก 3M Petrifilm STX

   ข. หากจำเป็นต้องมีการตรวจยืนยันหรือหากมีสีโคโลนีอื่นๆ นอกเหนือจากสีม่วงแดง เช่น สีดำหรือสีเขียวแกมฟ้า ให้ใช้ แผ่นดิสก์ 3M Petrifilm STX (ดูขั้นตอนที่ 3-11) โคโลนีสีดำอาจเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้ภาวะเครียด (stressed microorganisms)

   หมายเหตุ: หากมีระดับของเอนไซม์ฟอสฟาเตสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในอาหารบางอย่าง เช่น ผลิตภัณฑ์นมดิบ ในปริมาณสูง อาจทำให้ให้แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ 3M Petrifilm STX ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีชมพูและสามารถบดบังโคโลนีสีม่วงแดงได้ หากเกิดเหตุการเช่นนี้ ให้เจือจางตัวอย่างเพิ่ม

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย กิจฐาพัฒน์ ศุภกานต์มงคล เกิดเมื่อวันที่ 19 เมษายน พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา พ.ศ. 2549 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม หลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา พ.ศ. 2555 และได้เผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ทางทะเล ครั้งที่ 4 เมื่อวันที่ 10-12 มิถุนายน พ.ศ. 2557 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University