

Isolation and Molecular Identification of *Vibrio* and Enteropathogenic Bacteria from Street Seafood Restaurants in Buriram Province

Worrawat Promden¹, Arunrussamee Sangsila¹, Kittipat Sopitthummakhun²
and Panthip Rattanasinganchan^{3*}

¹Faculty of Education, Buriram Rajabhat University, Buriram Province, Thailand

²Faculty of Science & Technology, Huachiew Chalermprakiet University,
Samut Prakan Province, Thailand

³Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University,
Samut Prakan Province, Thailand

Abstract

Screening and identification of *Vibrio* and enteropathogenic bacteria in seafood were carried out. Seafood samples were randomly collected from five street food restaurants in Muang district, Buriram province. The bacterial selective medium thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar was employed for the isolation of bacterial colonies. Amplification of 16S rRNA genes of each isolated bacterial colony was accomplished using polymerase chain reaction (PCR) and the purified amplicons obtained were subject to further analysis using bioinformatic strategies. Assignment of the amplicon sequences to genus and/or species level was based on BLASTN. The results were compared to the information in GenBank database using percent identity and total score in the priority parameters. The BLASTN results indicated that bacteria from six genera were found and categorized into two groups. The first group was pathogenic bacteria that were the causative agents of food poisoning in human, including *Vibrio*, *Aeromonas*, and *Shewanella*. The second group included *Kluyvera*, *Providencia* and *Klebsiella*, which were commonly found and caused food contamination during food processing, preservation process, transportation, and unhygienic cooking in street food restaurants. Based on the phylogenetic tree, it was found that *Aeromonas* was evolutionarily different from *Vibrio*, *Shewanella*, *Kluyvera*, *Providencia* and *Klebsiella*. The phylogenetic tree manifesting the evolutionary relationships among the isolated bacterial strains implied a wide diversity of

*Corresponding author E-mail address: r_panthip@hotmail.com

Received: 24 June 2022

Revised: 14 August 2022

Accepted: 8 September 2022

bacterial contamination that caused food poisoning, with their sources being from seafood and environmental contamination. The information obtained from this study should be of use for epidemiological surveillance of seafood poisoning caused by bacterial contamination in the future.

Keywords: Seafood, Phylogenetic tree, Enteropathogenic bacteria, *Vibrio*, 16S rRNA

การคัดแยก และระบุชนิดด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาของเชื้อไวรัสโอ และแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร จากร้านอาหารทะเลริมทาง จังหวัดบุรีรัมย์

วรวัฒน์ พรหมเด่น¹ อรุณรัชมี แสงศิลา¹ กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ²
และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ^{3*}

¹คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์

²คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

³คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

บทคัดย่อ

การคัดแยกและระบุเชื้อไวรัสโอ และแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล ใช้วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทะเลจากร้านค้าริมทาง จำนวน 5 ร้านค้าในอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ การแยกโคลนนิ่งของแบคทีเรียใช้วิธีเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น TCBS ที่มีความจำเพาะต่อการเจริญเติบโต ของชนิดแบคทีเรีย การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ในแต่ละโคลนนี้ใช้ปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอร์ส และ วิเคราะห์ด้วยวิธีชีวสารสนเทศ การกำหนดสายพันธุ์ และสปีชีส์ของแบคทีเรีย ใช้วิธีการ BLASTN และ อ้างอิงฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้ค่าร้อยละความเหมือน และคะแนนรวมจาก BLASTN จากการ วิเคราะห์พบแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ และสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรก คือ แบคทีเรีย ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Vibrio*, *Aeromonas* และ *Shewanella* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สายพันธุ์ *Kluyvera*, *Providencia* และ *Klebsiella* ซึ่งตรวจพบจากการ ปนเปื้อนในขั้นตอนการแปรรูป การเก็บรักษา การขนส่งลำเลียง และการปรุงที่ไม่ถูกสุขลักษณะของร้านค้า ข้อมูลจากแผนภูมิต้นไม้พบว่าสายพันธุ์ *Aeromonas* มีความแตกต่างทางวิวัฒนาการเมื่อเทียบกับ สายพันธุ์ *Vibrio*, *Shewanella*, *Kluyvera*, *Providencia* และ *Klebsiella* ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่ได้จากแผนภูมิต้นไม้ แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของการปนเปื้อนแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของ การเกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทั้งจากเชื้อที่มาจากแหล่งอาหารทะเล และการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม ข้อมูล ที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังในเชิงระบาดวิทยาจากโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุ มาจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจากอาหารทะเลต่อไป

คำสำคัญ: อาหารทะเล แผนภูมิต้นไม้ แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ไวรัสโอ 16 เอส โรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: r_panthip@hotmail.com

รับบทความ: 24 มิถุนายน 2565

แก้ไขบทความ: 14 สิงหาคม 2565

รับตีพิมพ์บทความ: 8 กันยายน 2565

บทนำ

อาหารทะเลเป็นอาหารที่นิยมบริโภคในทุกจังหวัดของประเทศไทย โดยเฉพาะอาหารประเภทปลาที่เสิร์ฟสดเป็นสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอยแครง หอยนางรม แต่ด้วยข้อจำกัดของบางพื้นที่ในประเทศไทยที่ห่างไกลจากแหล่งอาหารทะเล จึงทำให้ต้องใช้วิธีขนส่งวัตถุดิบอาหารทะเลด้วยการแช่เย็น เพื่อคงความสดของอาหารทะเลไว้ให้ได้มากที่สุดก่อนถึงมือผู้บริโภค การควบคุมอุณหภูมิในขณะที่มีการขนส่งที่ไม่ได้มาตรฐานเป็นสาเหตุหนึ่งของการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับอาหารทะเล อีกทั้งการปรุงอาหารที่ไม่ถูกสุขอนามัย นำไปสู่ปัญหาการติดเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) จากข้อมูลเฝ้าระวังโรคของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม ถึง 24 ธันวาคม พ.ศ. 2561 โดยมีการเก็บข้อมูลของผู้ป่วยในช่วงอายุ 15-24, 45-54 และมากกว่า 65 ปีขึ้นไป จากข้อมูลของทั้ง 77 จังหวัดทั่วประเทศไทย พบผู้ป่วยจากโรคอาหารเป็นพิษจำนวน 115,095 ราย โดยพบว่าภาคตะวันออกเจียงเหนือพบจำนวนผู้ป่วยจากโรคอาหารเป็นพิษมากที่สุด คือ 20,020 ราย⁽¹⁾ สำหรับอาหารทะเลประเภทปลาที่นิยมรับประทานของคนไทย ได้แก่ ยำกุ้งสด ยำหอยแครง ยำทะเลรวมมิตร ด้วยลักษณะนิสัยที่นิยมบริโภคอาหารทะเลแบบไม่ปรุงสุก จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่การเกิดโรคอาหารเป็นพิษ เนื่องจากอาหารทะเลเป็นแหล่งปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*⁽²⁻⁶⁾ การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ มักพบได้ในกลุ่มคนจำนวนมากที่รับประทานอาหารร่วมกัน และพบว่ามีอาการอย่างรวดเร็วหลังจากรับประทานอาหารแล้ว โดยมีหลากหลายสาเหตุ เช่น การได้รับสารพิษจากแบคทีเรียที่เจริญเติบโตปนเปื้อนในอาหาร และการได้รับสารพิษ

(toxin) จากการรับประทานสัตว์ทะเลที่กินสาหร่ายบางสายพันธุ์ เช่น พิษปลาทะเลชิกัวทรา (ciguatera fish poisoning) พิษอัมพาต (paralytic shellfish poisoning) และการได้รับพิษจากปลาปักเป้า แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่พบได้ในมนุษย์คือ แบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ *Vibrionaceae* ในสกุล *Vibrio* ซึ่งมีจำนวนมากกว่า 72 สปีชีส์ โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบว่าเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข ได้แก่ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*⁽⁷⁾ แบคทีเรียเหล่านี้สามารถพบได้ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ แหล่งน้ำกร่อย และน้ำทะเล โดยพบการปนเปื้อนในพวกแพลงก์ตอนสัตว์ และสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็งหุ้มลำตัว เช่น หอย ปู กุ้ง⁽⁸⁾ การเก็บตัวอย่างส่งตรวจและวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในสัตว์ทะเลที่นำมาประกอบอาหารเหล่านี้ ถือเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญ เพื่อกำหนดแนวทางการรักษา การติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ อีกทั้งยังมีส่วนสำคัญต่อการสอบสวนโรค กำหนดแนววิธีการรักษาที่ถูกต้อง มีประสิทธิภาพ และลดการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษได้

งานวิจัยนี้ ได้ตรวจคัดแยก และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารทะเลที่นำมาประกอบอาหาร ด้วยวิธีสุ่มเก็บตัวอย่างจากอาหารทะเลประเภทปลาปรุงสำเร็จ จากร้านอาหารริมทาง อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ โดยใช้เทคนิคการแยกเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate technique) บนอาหารเพาะแยกเชื้อ thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) เพื่อคัดแยกและเลือกเก็บโคลนเชื้อที่แตกต่างกัน นำไปวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (polymerase chain reaction, PCR) ในส่วนของยีน 16S rRNA หลังจากตรวจวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอแล้วนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบ

ความคล้ายคลึงกันของลำดับดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย
ในฐานข้อมูล ด้วยกระบวนการทางชีวสารสนเทศ
(bioinformatics) การใช้ฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์
GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) ร่วมกับการสร้างความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน
ของเชื้อแบคทีเรียที่พบ โดยวิธีสร้าง แผนภูมิต้นไม้
(phylogenetic tree) ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้
จะเป็นส่วนสำคัญในการระบุชนิดสายพันธุ์แบคทีเรีย
ที่ปนเปื้อนมาในวัตถุดิบอาหารทะเล เพื่อเป็นแนวทาง
การป้องกัน และเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษ โดยเฉพาะในกลุ่มคนที่นิยมบริโภคอาหารทะเลประเภทยำ
ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง และการเพาะแยกเชื้อ แบคทีเรีย

สุ่มเก็บตัวอย่างวัตถุดิบอาหารทะเลจาก
อาหารปรุงสำเร็จ ประเภทยำทะเลจากร้านอาหาร
ริมทาง จำนวน 5 ร้านค้า (ร้านค้า A, B, C, D และ
E) อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ระหว่างเดือนเมษายน
- เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2564 ได้แก่ กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) หอยแครง (*Anadara gramosa*)
และหอยนางรม (*Saccostrea commercialis*) ซึ่ง
น้ำหนักตัวอย่างละ 50 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปิดเชื้อ
เติมสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
บดผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำของเหลวที่ได้
มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl โดยใช้การเจือจาง 10,
100 และ 1,000 เท่า จากนั้นหยดสารละลายตัวอย่าง
ที่เจือจางไว้แล้ว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร
รูน TCBS ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างให้
กระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนี
เดี่ยว (single colony) ที่มีลักษณะแตกต่างกัน
ในแต่ละจานเพาะเชื้อ ย้ายมาเลี้ยงต่อในอาหารรูน

TCBS แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการเก็บรักษาตัวอย่างเชื้อ
ในระยะยาว จะเก็บเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ลงใน
0.85% NaCl ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพื่อเตรียม
เป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) เก็บรักษาที่
อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อบริการวิเคราะห์ใน
ขั้นตอนต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแต่ละ
โคโลนีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
มาต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา
5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ความเร็ว
10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส
มาใช้เป็น DNA template สำหรับเพิ่มปริมาณของ
ยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เรส
(PCR) ดัดแปลงจากวิธีการของ Lane DJ.⁽⁹⁾ โดยใช้
DNA template ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์
(primer) สำหรับปฏิกิริยานี้ คือ FD1 (forward
primer) 5'-ACGGYTACCTTGTTAC-
GACTT-3' และ RP2 (reverse primer) 5'-AC-
GGYTACCTTGTTACGACTT-3' ความเข้มข้น
10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม 50
มิลลิโมลาร์ MgCl₂ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร 10X
PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10 มิลลิโมลาร์
dNTPs mixed ปริมาตร 10 ไมโครลิตร DMSO 2.5
ไมโครลิตร และ Platinum[®] Taq DNA Polymerase
(Invitrogen[™]; Thermo-Fisher Scientific)
ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (2 Unit/reaction) ปรับ
ปริมาตรสุดท้ายด้วย น้ำบริสุทธิ์สูง (ultrapure water)
เป็น 50 ไมโครลิตร การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
(ดีเอ็นเอ) ใช้เครื่อง Thermal Cycler (T100[™];

BIO-RAD) ตั้งค่าการทำงาน ดังนี้ ขั้นตอน preheating ที่ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที ขั้นตอน denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ ขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตั้งค่าให้วนการทำงานซ้ำตั้งแต่ขั้นตอน denaturation ถึง extension จำนวน 38 รอบ และในรอบสุดท้าย (รอบที่ 39) คือ ขั้นตอน final extension ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำ PCR products ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ย้อมสีแถบดีเอ็นเอ ด้วย SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™; Thermo-Fisher Scientific) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1,502 bp ภายใต้เครื่องกำเนิดแสง LED transilluminator (Blupad Bio-Helix) นำ PCR products ที่เหลือไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR Clean-Up kit (PureDireX; Bio-Helix) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ต่อไป

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยใช้ PCR products 100 นาโนกรัม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ sequencing primer คือ FD1 และ RP2 ด้วยเทคนิค Sanger sequencing (chain termination) ร่วมกับการแยกชิ้นส่วนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค capillary electrophoresis โดยใช้บริการของ MacroGen, Inc. (ประเทศเกาหลีใต้) ได้ลำดับของนิวคลีโอไทด์จาก PCR products 1,502 คู่เบส นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) ร่วมกับการวิเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน 16S

rRNA ด้วยโปรแกรม BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยใช้ค่า parameter เดิมที่ระบุในโปรแกรม (default parameter) สำหรับฐานข้อมูลใช้ nucleotide collection (nr/nt) และกำหนดให้ค่า optimization เป็น highly similar sequence (megablast) ในการวิเคราะห์ความใกล้ชิดของสายพันธุ์แบคทีเรียแต่ละชนิด ใช้วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลนิต่าง ๆ เปรียบเทียบความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี multiple alignment และสร้างความเชื่อมโยงโดยใช้โปรแกรม Muscle5 (<http://www.drive5.com/muscle>) การแสดงแผนภูมิต้นไม้ใช้โปรแกรม iTOL interactive (web-based: <https://itol.embl.de/index.shtml>) การคำนวณค่าความใกล้ชิดหรือไกลของแต่ละเป้าหมายแสดงในแผนภูมิต้นไม้

ผลการวิจัย

1. ลักษณะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารเพาะแยกเชื้อ TCBS

การคัดแยกลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียจากวัตถุดิบอาหารทะเลจากร้านค้าต่าง ๆ ด้วยการแยกบนอาหารวุ้น TCBS พบว่าโคโลนีที่ได้มีลักษณะที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีโทนเหลือง-เขียว ซึ่งมีทั้งสีเหลืองเข้ม สีเหลืองขาวขุ่น เหลืองปนเขียว และมีสีเขียวขุ่น ลักษณะโคโลนีแบนราบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.1-0.5 เซนติเมตร ได้แก่ โคโลนีหมายเลข A1, A8, A10, A12 (ร้านค้า A), C2, C5 (ร้านค้า C), D2 (ร้านค้า D) และ E1, E3, E6, E9, E10 (ร้านค้า E) กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองเข้ม และมีลักษณะนูนขนาดเล็ก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.1-0.2 เซนติเมตร ได้แก่ โคโลนีหมายเลข A9 (ร้านค้า A), B2, B5

(ร้านค้า B), C9 (ร้านค้า C) และ E5, E7 (ร้านค้า E) กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวเข้ม และมีลักษณะนูน ขนาดเล็ก มีขนาดตั้งแต่ 0.1-0.2 เซนติเมตร ได้แก่ โคโลนีหมายเลข A4, A13 (ร้านค้า A), B4, B6, (ร้านค้า B) และ C3 (ร้านค้า C) กลุ่มที่ 4 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองเข้ม และสีเหลืองนูน ขนาดโคโลนีปานกลาง ตั้งแต่ 0.1-0.3 เซนติเมตร ได้แก่ โคโลนีหมายเลข D3 (ร้านค้า D) กลุ่มที่ 5 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวขุ่น ลักษณะนูนมีขนาดเล็ก ประมาณ 0.1 เซนติเมตร ได้แก่ โคโลนีหมายเลข D6 (ร้านค้า D) และกลุ่มที่ 6 แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ มีสีเหลืองเข้ม ไปจนถึงสีเขียว มีขนาด 0.3 เซนติเมตร ได้แก่ โคโลนีหมายเลข A14 และ A16 (ร้านค้า A)

2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียทั้งหมด 27 โคโลนี ใช้วิธีทางชีววิทยาเชิงโมเลกุล และชีวสารสนเทศ ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เพื่อระบุสายพันธุ์หรือสายพันธุ์ย่อยใช้ค่าร้อยละความเหมือนของยีน (% gene identity) เป็นเกณฑ์พิจารณาลำดับแรก และใช้ total score จากผลที่ได้จากการทำ BLASTN (nucleotide) เป็นเกณฑ์พิจารณาในลำดับถัดไป (Table 1) จากผลที่ได้พบว่าตัวอย่างวัตถุดิบอาหารทะเลจากร้านค้าต่างๆ มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ได้แก่ *V. parahaemolyticus* strain MC32 (A1), *Vibrio* sp. strain BB6 (A8), *Vibrio* sp. strain A2 (A10), *Vibrio harveyi* strain XSH1 (A12), *V. parahaemolyticus* strain 20-082A3 (C2), *V. parahaemolyticus* strain SSP3C17 (C5), *V. harveyi* strain LG353

(D2), *V. vulnificus* strain H1 (E1), *V. neocaledonicus* strain CGJ02-2 (E3), *Vibrio* sp. strain 201709CJKOP-32 (E6), *V. harveyi* strain 2011V-1164 (E9) และ *V. alginolyticus* strain SXV3 (E10) กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* ได้แก่ *A. caviae* strain BNA243 (A9), *A. veronii* strain CB51 (B2), *A. hydrophila* strain njp1 (B5) และ *A. enteropelogenes* strain FDAARGOS_1510 (C9), *A. dhakensis* strain 71453 (E5) และ *A. hydrophila* strain B11 (E7) กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียในกลุ่ม *Shewanella* ได้แก่ *S. algae* strain 2NE11 (A4), *S. carassii* TUM17387 (A13), *S. baltica* strain CW2 (B4), *S. litorisediminis* strain H3M1 (B6) และ *S. algae* strain CASMM4 (C3) กลุ่มที่ 4 แบคทีเรียในกลุ่ม *Kluyvera* ได้แก่ *K. georgiana* strain 25B1D1-A4 (D3) กลุ่มที่ 5 แบคทีเรียในกลุ่ม *Providencia* ได้แก่ *Providencia* sp. 927B6_12ASS (D6) และกลุ่มที่ 6 แบคทีเรียในกลุ่ม *Klebsiella* ได้แก่ *Klebsiella* sp. STW0522-44 (A14 และ A16) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงในการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียที่ศึกษา อ้างอิงด้วย Accession no. (Table 1) ซึ่งเชื่อมโยงกับฐานข้อมูล NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

การวิเคราะห์ความใกล้ชิดของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่พบและระบุสายพันธุ์ในการทดลองนี้ พิจารณาด้วยการใช้ส่วนของบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของยีน 16S rRNA เพื่อสร้างความสัมพันธ์รูปแบบแผนภูมิต้นไม้ แผนภาพใน Fig. 1 แสดงค่าตัวเลขที่บอกถึงความใกล้ชิดของแต่ละสปีชีส์ โดยพิจารณาจากผลรวมของตัวเลขที่อยู่บนกิ่งก้าน (branch) พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* มีความแตกต่างทางวิวัฒนาการกับแบคทีเรียในกลุ่ม

Table 1 16S rRNA sequence alignment of PCR products from isolated bacterial colony.

Restaurant	Colony no.	Description (BLASTN results) [#]	% Gene Identity [*]	Total score ^{**}	Accession no. [§]
A	A1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain MC32 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	98.59	1,631	MT534026.1
	A4	<i>Shewanella algae</i> strain 2NE11 (information from complete genome)	99.57	16,687	CP055159.1
	A8	<i>Vibrio</i> sp. BB6 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	99.31	2,085	KF446245.1
	A9	<i>Aeromonas caviae</i> strain BNA243 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	96.95	1,264	MT271886.1
	A10	<i>Vibrio</i> sp. strain A2 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	95.04	1,956	KX356388.1
	A12	<i>Vibrio harveyi</i> strain XSH1 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	99.90	1,816	MT071600.1
	A13	<i>Shewanella carassii</i> TUM17387 (information from complete genome)	99.18	15,810	AP024618.1
	A14	<i>Klebsiella</i> sp. STW0522-44 (information from complete genome)	97.37	16,279	AP022419.1
	A16	<i>Klebsiella</i> sp. STW0522-44 (information from complete genome)	99.10	15,896	AP022419.1
	B2	<i>Aeromonas veronii</i> strain CB51 (information from complete genome)	95.00	5,797	CP015448.1
B	B4	<i>Shewanella baltica</i> strain CW2 (information from complete genome)	95.13	18,416	CP028355.1
	B5	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain njp1 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	96.74	1,519	KU992678.1
	B6	<i>Shewanella litorisediminis</i> strain H3M1 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	99.44	1,960	KX966518.1

[#]Data from sequence alignment (BLASTN) were interpreted in May 2022.

^{*}% gene identity is defined as the highest percent identity for a set of aligned segments (nucleotide) to the same subject sequence.

^{**}Total score (BLASTN) is defined as the sum of alignment scores of all segments from the same subject sequence.

[§]Accession no. is defined as a unique identifier assigned to records in the NCBI databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Table 1 16S rRNA sequence alignment of PCR products from isolated bacterial colony. (Cont.)

Restaurant	Colony no.	Description (BLASTN results) [#]	% Gene Identity [*]	Total score ^{**}	Accession no. ^{\$}
C	C2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain 20-082A3 (information from complete genome)	98.97	22,871	CP065369.1
	C3	<i>Shewanella algae</i> strain CASMM4 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	98.52	2,139	CP068229.1
	C5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain SSP3C17 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	98.87	2,194	MG525109.1
	C9	<i>Aeromonas enteropelogenes</i> strain FDAARGOS_1510 (chromosome, complete genome)	99.09	21,508	CP083625.1
D	D2	<i>Vibrio harveyi</i> strain LG353 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	99.82	2,041	KY303767.1
	D3	<i>Kluyvera georgiana</i> strain 25B1D1-A4 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	98.91	1,956	MN249622.1
	D6	<i>Providencia</i> sp. 927B6_12ASS (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	99.56	2,073	KU644502.1
	E1	<i>Vibrio vulnificus</i> strain H1 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	98.42	1,334	MK229005.1
E	E3	<i>Vibrio neocaledonicus</i> strain CGJ02-2 (chromosome 1, complete sequence)	98.68	22,011	CP032213.1
	E5	<i>Aeromonas dhakensis</i> strain 71453 (information from complete genome)	99.47	20,453	CP084349.1
	E6	<i>Vibrio</i> sp. strain 201709CJKOP-32 (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	99.91	2,036	MG867483.1
	E7	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain B11 (information from complete genome)	99.64	20,313	CP053859.1
	E9	<i>Vibrio harveyi</i> strain 2011V-1164 (chromosome 1, complete sequence)	99.64	22,269	CP035693.1
	E10	<i>Vibrio alginolyticus</i> strain SXV3 (chromosome 1, complete sequence)	99.91	21,908	CP082317.1

[#]Data from sequence alignment (BLASTN) were interpreted in May 2022.

^{**}% gene identity is defined as the highest percent identity for a set of aligned segments (nucleotide) to the same subject sequence.

^{**}Total score (BLASTN) is defined as the sum of alignment scores of all segments from the same subject sequence.

^{\$}Accession no. is defined as a unique identifier assigned to records in the NCBI databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

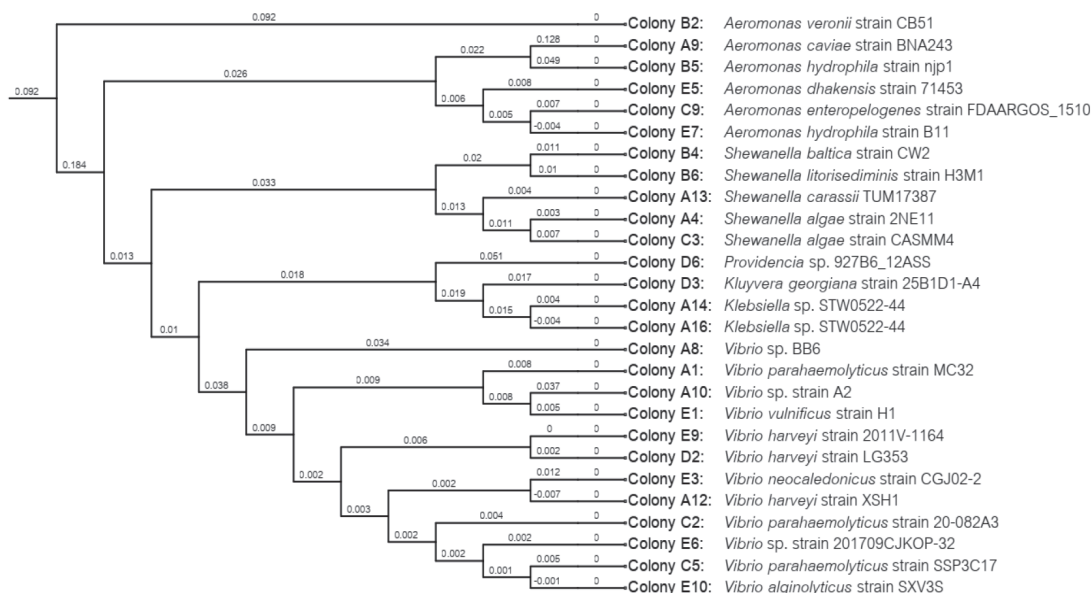


Fig. 1 Phylogenetic tree (unscaled or non-display branch length) representing the evolutionary relationships among 16S rRNA amplification fragments from the isolated bacterial colonies. Genus, species, and sub-species (strain) of bacteria were referred to BLASTN results and corresponded to the highest percent identity. Phylogenetic tree is performed by iTOL software. (<https://itol.embl.de/itol.cgi>)

Vibrio, *Shewanella*, *Kluyvera*, *Providencia* และ *Klebsiella* โดยมีค่าที่คำนวณได้ คือ 0.337, 0.322, 0.353, 0.368 และ 0.351 ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ค่าความใกล้ชิดกันภายในกลุ่มของแบคทีเรีย *Vibrio*, *Shewanella*, *Kluyvera*, *Providencia* และ *Klebsiella* จะมีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการโดยจะมีค่าตัวเลขที่น้อยกว่า 0.112 เมื่อนำไปเทียบกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* ดังตารางสรุปค่าตัวเลขเปรียบเทียบความใกล้ชิดระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียใน Table 2

วิจารณ์และสรุป

การติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารและลำไส้ที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* บางชนิดส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบหรือ

ปรุงไม่สุก การศึกษานี้ได้นำวัตถุดิบอาหารทะเลจากร้านค้าประเภทยาทะเลในอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ มาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการเลี้ยงในอาหารเพาะแยกเชื้อ TCBS ซึ่งจำเพาะต่อการแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Vibrio*⁽¹⁰⁾ ร่วมกับการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนด้วยวิธีทางชีววิทยาเชิงโมเลกุล และวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะใช้ในการระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย^(11, 12) ผลการวิเคราะห์พบว่ามี การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดใน กุ้งขาว หอยแครง และหอยนางรม คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio* ตรวจพบในวัตถุดิบอาหารทะเลจากร้านค้า A, C, D และ E โดยมีความหลากหลายของสายพันธุ์ย่อย (strain) ได้แก่ *V. parahaemolyticus* (strain MC32, 20-082A3, SSP3C17) และ *V. vulnificus* (strain

Table 2 Calculation results for the distance values among isolated bacterial colonies (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Shewanella*, *Kluyvera*, *Providencia*, *Klebsiella*).

Genus	<i>Aeromonas</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Providencia</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Vibrio</i>	0.337	0.081	0.092	0.107	0.090
<i>Aeromonas</i>		0.322	0.353	0.368	0.351
<i>Shewanella</i>			0.097	0.112	0.095
<i>Kluyvera</i>				0.087	0.032
<i>Providencia</i>					0.085

H1) โดยเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสปีชีส์ เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal disease) และโลหิตเป็นพิษร้ายแรง (highly fatal septicemia.)^(13, 14) การตรวจพบสายพันธุ์ *V. harveyi* และ *V. neo-caledonicus* แม้ว่าจะไม่ได้เป็นสาเหตุหลักของเชื้อก่อโรคในมนุษย์ แต่ก็เป็สาเหตุการตายของกึ่ง และเม่นทะเลที่เลี้ยงในแหล่งน้ำธรรมชาติ การเก็บอาหารทะเลภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโต แต่สามารถเจริญเติบโตได้อีกครั้งเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิห้อง^(15, 16) จึงสามารถพบการปนเปื้อนแบคทีเรียในวัตถุดิบที่นำไปปรุงเป็นอาหารที่รับประทานดิบได้ เช่น อาหารประเภทยำทะเลที่ใส่กุ้งขาว หอยแครง และหอยนางรม การวิจัยในครั้งนี้ยังตรวจพบ *Vibrio* sp. ที่ยังไม่มีรายงาน และระบุชนิดสปีชีส์ ได้แก่ strain A2, 201707CJKOPY-39 และ 201709CJKOP-32 ส่วนในกลุ่มของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Aeromonas* พบในร้านค้า A, B, C และ E ได้แก่ *A. caviae*, *A. dhakensis*, *A. hydrophila* และ *A. veronii* ทั้งสี่สายพันธุ์เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคท้องร่วง (diarrhea) และการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร โดยมีกลไกเกี่ยวข้องกับการสร้างสารในกลุ่ม cyto-

toxic enterotoxin ของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์^(17, 18) แบคทีเรียสายพันธุ์ *Shewanella* ที่ตรวจพบได้ในร้านค้า A, B และ C ได้แก่ *S. algae* พบว่ากลไกการก่อโรคในมนุษย์เกี่ยวข้องกับการสร้าง cytotoxic enterotoxin ที่สัมพันธ์กับภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) โดยพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นคล้ายกับที่มีการศึกษาใน *S. putrefaciens*⁽¹⁹⁾ ในส่วนของ *S. baltica* และ *S. carassii* ทั้งสองสปีชีส์นี้ยังไม่ได้มีรายงานการเกิดโรคในมนุษย์ที่เป็นปัญหาในระดับสาธารณสุข สำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม *Kluyvera*, *Providencia* และ *Klebsiella* พบในสัดส่วนที่น้อยกว่าสายพันธุ์ *Vibrio*, *Aeromonas* และ *Shewanella* (Table 1) แบคทีเรีย *K. georgiana*, *P. rettgeri* และ *Klebsiella* sp. (การศึกษานี้พบสายพันธุ์ย่อย STW0522-44) แบคทีเรียเหล่านี้พบได้ตามสิ่งแวดล้อม น้ำทิ้งจากโรงพยาบาล และในสัตว์บางชนิด ส่วนในมนุษย์เชื้อเหล่านี้จัดเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้ในระบบทางเดินอาหาร ระบบหายใจและระบบปัสสาวะ แต่สามารถพบการติดเชื้อ *Kluyvera* ในผู้ป่วยทั้งเด็กและผู้ใหญ่ในโรงพยาบาลโดยเฉพาะเชื้อ *K. ascorbate* ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในระบบปัสสาวะ⁽²⁰⁾ การติดเชื้อในกระแสเลือดในทารกโดยเชื้อ

P. rettgeri⁽²¹⁾ และการติดเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* จากการรับประทานแฮมเบอร์เกอร์ ทำให้เกิดภาวะกระเพาะและลำไส้อักเสบเฉียบพลัน และอวัยวะต่างๆ ในร่างกายล้มเหลว⁽²²⁾ การตรวจพบแบคทีเรียเหล่านี้ อาจเกิดจากการปนเปื้อนของโรงงานที่มีการแปรรูปอาหารทะเลสด รวมทั้งร้านค้ารายย่อยที่ซื้ออาหารทะเล โดยมีขั้นตอนขนส่งวัตถุดิบและจัดเก็บที่ไม่ได้มาตรฐาน

การศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่คัดแยก และระบบสายพันธุ์ครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารทะเล ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย และกำหนดแนวทางรักษาผู้ป่วยที่มีอาการของโรคอาหารเป็นพิษ ที่เป็นผลจากแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนมาในรายการอาหารทะเล แต่สิ่งสำคัญคือการใช้แนวทางการป้องกันโรคเหล่านี้ เช่น การบริโภคอาหารที่ปรุงสุก เลือกร้านอาหารที่มีมาตรฐานในเรื่องความสะอาดและถูกสุขอนามัย รวมทั้งผู้บริโภคเองก็ควรต้องปรับเปลี่ยนพฤติกรรม โดยรับประทานอาหารที่ผ่านการปรุงสุก สิ่งเหล่านี้ก็จะนำไปสู่การลดปัญหาทางสาธารณสุข โดยเฉพาะโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในอาหารทะเล

เอกสารอ้างอิง

1. Food Poisoning [homepage on the Internet]. Department of disease control, Thailand. © 2019 [cited 2022 May 2]. Available from: https://ddc.moph.go.th/disease_detail.php?d=10.
2. Thongjun J, Mittraparp-arthorn P, Yingkajorn M, Kongreung J, Nishibuchi M, Vuddhakul V. The trend of *Vibrio parahaemolyticus* infections in Southern Thailand from 2006-2010. Trop Med Int Health 2013; 41: 151-6.
3. Pumipuntu N, Indrawattana N. *Vibrio parahaemolyticus*: a seafood-borne pathogen. J Trop Med Parasitol 2007; 40: 50-62.
4. Iwamoto M, Ayers T, Mahon BE, Swerdlow DL. Epidemiology of seafood-associated infections in United States. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 399-411.
5. Moon HJ, Min KJ, Park NY, Park HJ, Yoon KS. Survival of *Staphylococcus aureus* in dried fish products as a function of temperature. Food Sci Biotechnol 2017; 26: 823-8.
6. Wen Q, McClane BA. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 2685-91.
7. Tarr CL, Patel JS, Puhf ND, et al. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. J Clin Microbiol 2007; 45: 134-40.
8. Yano Y, Kaneniwa M, Satomi M, Oikawa H, Chen SS. Occurrence and density of *Vibrio parahaemolyticus* in live edible crustaceans from markets in China. J Food Prot 2006; 69: 2742-6.

9. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., Nucleic acid technique in bacterial systematic. John Wiley and Sons, New York; 1991; 115-75.
10. Tagliavia M, Salamone M, Bennici C. A modified culture medium for improved isolation of marine vibrios. Microbiolopen 2019; 8: e835: 1-9.
11. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol Diagn 2001; 6: 313-21.
12. Peker N, Garcia-Croes S, Dijkhuizen B, *et al.* A comparison of three different bioinformatics analyses of the 16S-23S rRNA encoding region for bacterial identification. Front Microbiol 2019; 10: 1-13.
13. Letchumanan V, Chan KG, Lee LH. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. Front Microbiol 2014; 5: 1-13.
14. Heng SP, Letchumanan V, Deng CY, *et al.* *Vibrio vulnificus*: An environmental and clinical burden. Front Microbiol 2017; 8: 1-14.
15. Zhang XH, He X, Austin B. *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. Mar Life Sci Technol 2020; 3: 1-15.
16. Sun J, Liu L, Song J, *et al.* Characterization of two strains of *Vibrio* sp. from cultured sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius* in China. Aquac 2021; 20: 1-9.
17. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 35-73.
18. Chen PL, Wu CJ, Chen CS, Tsai PJ, Tang HJ, Ko WC. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *A. hydrophila* isolated in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. Clin Microbiol Infect 2014; 20: 428-34.
19. Janda JM, Khashe S. Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*. J Clin Microbiol 1998; 36: 783-7.
20. Lee J, Hwang JH, Jo DS, Lee HS, Hwang JH. *Kluyvera ascorbate* as a pathogen in adults and children: clinical features and antibiotic susceptibilities in a single center study. Jpn J Infect Dis 2019; 72: 142-8.
21. Sharma D, Sharma P, Soni P. First case report of *Providencia rettgeri* neonatal sepsis. BMC Res Notes 2017; 10: 536-46.
22. Sabota JM, Hoppers WL, Ziegler JR, DuPont H, Mathewson J, Rutecki GW. A new variant of food poisoning: enteroinvasive *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* sepsis from a contaminated hamburger. Am J Gastroenterol 1998; 93: 118-9.