

การประเมินปริมาณจุลินทรีย์และการจำแนกชนิดเชื้อ *Vibrio* spp. ในอาหารทะเลสดและดองด้วยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA เพื่อการเฝ้าระวังความปลอดภัยด้านอาหารทะเล

ปริญญช ใจหาญ¹, ธเนศ นนท์ศรีราช²

(วันที่รับบทความ: 18 กันยายน 2568, วันที่แก้ไข: 6 พฤศจิกายน 2568, วันที่ตอบรับ 6 พฤศจิกายน 2568)

บทคัดย่อ

อาหารทะเลสดและดองเป็นที่นิยมบริโภคในหลายพื้นที่ของประเทศไทย แต่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์รวมในอาหารทะเลสดและอาหารทะเลดอง รวมถึงการจำแนกชนิดเชื้อ *Vibrio* spp. โดยใช้การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA เก็บตัวอย่างกุ้งขาว ปูม้า และหอยแครงจากตลาดในอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ในสภาพสด และดอง 24 และ 48 ชั่วโมง (n = 3) วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ด้วยวิธีมาตรฐานเพลทเพาะเชื้อ และจำแนกชนิดเชื้อด้วยอาหารคัดเลือก TCBS ร่วมกับการย้อมแกรมและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบว่าอาหารทะเลสดมีปริมาณจุลินทรีย์สูงที่สุด โดยหอยแครงสดมีค่า 3.19×10^6 CFU/g และปูม้าสด 1.86×10^5 CFU/g ซึ่งเกินเกณฑ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขณะที่การดองช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ โดยกลุ่มดอง 48 ชั่วโมงมีค่าน้อยที่สุด เช่น กุ้งขาวดองมีค่า 2.85×10^2 CFU/g ค่าเฉลี่ยปริมาณจุลินทรีย์รวม $\log_{10}$ (CFU/g) ของสภาพสด ดอง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 5.536 ± 0.865 , 4.449 ± 0.588 และ 3.387 ± 0.876 ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ากลุ่มอาหารทะเลสดแตกต่างจากกลุ่มดอง 48 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การจำแนกชนิดเชื้อพบ *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *Aeromonas* sp. และ *Shewanella* sp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะ *V. cholerae* ที่มีความสำคัญเชิงการระบาดในอนามัยสิ่งแวดล้อม ผลการศึกษาชี้ว่าการดองสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังคงคำนึงถึงคุณภาพวัตถุดิบและสุขลักษณะการผลิตเพื่อลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของผู้บริโภค

คำสำคัญ: ความปลอดภัยอาหาร, อาหารทะเลสด, อาหารทะเลดอง, *Vibrio* spp., 16S rRNA

¹ ภาควิชาการจัดการเรียนรู้, คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ²สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 ขอนแก่น

Corresponding author, ปริญญช ใจหาญ e-mail: piyanoot.jaihan05@gmail.com

Evaluation of the Microbiological Quality and Identification of *Vibrio* spp. in Fresh and Fish Sauce Marinated Seafood by 16S rRNA Gene Analysis for Seafood Safety Surveillance

Piyanoot Jaihan¹, Thanade Nonsrirach²

(Received 18th September 2025; Revised : 6th November 2025; Accepted 6th November 2025)

ABSTRACT

Fresh and fish sauce-marinated seafood are popular in many areas of Thailand but are prone to contamination by pathogenic microorganisms. This study aimed to compare total microbial counts in fresh and marinated seafood and to identify *Vibrio* spp. using 16S rRNA gene analysis. Samples of white shrimp, blue swimming crab, and bloody cockle were collected from a market in Mueang District, Chonburi Province, in fresh condition and after marination in fish sauce for 24 and 48 hours (n = 3). Total microbial counts were determined using the standard plate count method, and bacterial species were identified using TCBS selective agar, Gram staining, and nucleotide sequencing. Results showed that fresh seafood had the highest microbial loads, with bloody cockle at 3.19×10^6 CFU/g and blue swimming crab at 1.86×10^5 CFU/g, exceeding the Department of Medical Sciences standards. Marination reduced microbial loads, with the lowest counts found in the 48-hour group; for example, marinated shrimp had 2.85×10^2 CFU/g. The mean total microbial counts ($\log_{10}$ CFU/g) for fresh, 24-hour, and 48-hour marinated samples were 5.536 ± 0.865 , 4.449 ± 0.588 and 3.387 ± 0.876 , respectively. Statistical analysis showed that fresh seafood differed significantly from 48-hour marinated seafood ($p < 0.05$). Identified bacteria included *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *Aeromonas* sp., and *Shewanella* sp., all of which are gastrointestinal pathogens. In particular, *V. cholerae* is of epidemiological importance in environmental health. The presence of these bacteria in seafood indicates a potential risk to consumers. The study demonstrates that marination significantly reduces microbial contamination, but raw material quality and hygienic processing remain essential to minimize microbial risks to consumers.

Keywords: food safety, fresh seafood, fish sauce marinated seafood, *Vibrio* spp.,

16S rRNA

¹ Department of Learning Management, Faculty of Education, Burapha, ²The Office of Disease Prevention and Control 7 Khon Kaen.



Corresponding author, Piyanoot Jaihan email: piyanoot.jaihan05@gmail.com

บทนำ

อาหารทะเลเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูงที่มีคุณค่าทางโภชนาการและเป็นส่วนหนึ่งของวัฒนธรรมการบริโภคของคนไทย ปัจจุบันยังคงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย จากรายงานอัตราการบริโภคสัตว์ทะเลในปี พ.ศ. 2559 พบว่ามีการบริโภคเฉลี่ย 33.73 กิโลกรัมต่อคนต่อปี และในปี พ.ศ. 2560 ความต้องการบริโภคเพิ่มขึ้นร้อยละ 10.95⁽¹⁾ แม้ในบางภูมิภาคที่ไม่มีพรมแดนติดทะเลต้องพึ่งพาการนำเข้าอาหารทะเล แต่กระบวนการขนส่งที่ใช้เวลานานอาจทำให้วัตถุดิบเสื่อมคุณภาพหรือปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการเน่าเสียและคงคุณค่าทางอาหาร จึงมีการใช้วิธีถนอมอาหารหลายรูปแบบ โดยหนึ่งในวิธีที่นิยมคือ การดอง ซึ่งเป็นวิธีการถนอมอาหารแบบธรรมชาติ นอกจากช่วยเพิ่มรสชาติ เช่น ปูดอง หอยดอง และกุ้งดองแช่น้ำปลาแล้ว ยังสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น อย่างไรก็ตาม ผู้บริโภคมักมองข้ามความเสี่ยงจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โรคอหิวาต์ (cholera) และโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis)⁽²⁾

จากรายงานการสุ่มตรวจอาหารทะเลสดในตลาดสดกรุงเทพมหานคร พบการปนเปื้อน *Vibrio parahaemolyticus* ในปริมาณ 24-1,100 MPN/กรัม โดยพบในกุ้ง 5/10 ตัวอย่าง ปลา 9/10 ตัวอย่าง หมึก 8/10 ตัวอย่าง

หอยแมลงภู่ 9/10 ตัวอย่าง และหอยนางรม 9/10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 40/50 ตัวอย่าง อีกทั้งตรวจพบเชื้อดังกล่าวในปูไข่ดองครบทุกตัวอย่าง⁽³⁾ นอกจากนี้ยังพบเชื้อสกุล *Vibrio* มีอีก 8 สปีชีส์ ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. furnissii*, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. vulnificus* และ *V. cholerae* คิดเป็นร้อยละ 52 และพบเชื้อ *Salmonella* จำนวน 7 ซีโรไทป์ ได้แก่ Typhimurium, Derby, Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B, Infantis และ Abortus equi คิดเป็นร้อยละ 10 ของตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด 150 ตัวอย่าง⁽⁴⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁵⁾ ที่กำหนดค่าจุลินทรีย์รวมในอาหารทะเลดิบไม่เกิน 1×10^6 CFU/g จะเห็นว่าตัวอย่างจำนวนมากที่มีปริมาณเชื้อเกินเกณฑ์ และมีความเสี่ยงเพียงพอที่จะก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในปี พ.ศ. 2562 ว่ามีผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ 105,672 ราย และเสียชีวิต 1 ราย โดยมีอาการสำคัญ เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย และภาวะขาดน้ำ⁽⁶⁾

ตลาดในอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เป็นแหล่งจำหน่ายอาหารทะเลสดและแปรรูปที่สำคัญของภาคตะวันออก มีตลาดอาหารทะเลขนาดใหญ่ซึ่งเป็นศูนย์กลางกระจายสินค้าสู่จังหวัดใกล้เคียง และเป็นจุดที่นักท่องเที่ยวและผู้บริโภค

ทั่วไปนิยมเลือกซื้ออาหารทะเลสด รวมถึงผลิตภัณฑ์ต้องแบบพื้นบ้านที่ผลิตและจำหน่ายโดยอาศัยภูมิปัญญาท้องถิ่น ซึ่งอาจมีความแตกต่างจากกระบวนการควบคุมคุณภาพในระดับอุตสาหกรรม การเลือกพื้นที่ดังกล่าวเป็นกรณีศึกษาจึงสะท้อนบริบทจริงของกระบวนการจำหน่ายและบริโภคอาหารทะเลที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามยังมีรายงานเกี่ยวกับการปนเปื้อนเชื้อ *Vibrio* spp. ในอาหารทะเลสดในประเทศไทย^(3,4) และขาดข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างอาหารทะเลสดและอาหารทะเลดอง รวมถึงผลของกระบวนการดองต่อปริมาณจุลินทรีย์รวมและชนิดของเชื้อก่อโรค

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียในปัจจุบันนิยมใช้เทคโนโลยีชีวโมเลกุลควบคู่กับการตรวจลักษณะสัณฐานวิทยา เนื่องจากข้อมูลพันธุกรรมมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด⁽⁷⁾ การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพราะมีความแม่นยำและรวดเร็ว ยีนนี้มีความแปรผันทางวิวัฒนาการต่ำและเป็นบริเวณอนุรักษ์สูงที่พบในแบคทีเรียทุกชนิด⁽⁸⁾ จากงานวิจัยที่มีรายงานมาก่อนยืนยันว่าการใช้วิธีดังกล่าวสามารถระบุชนิดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(9,10) ดังนั้นจากข้อมูลและสถานการณ์ข้างต้น ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญในการศึกษาการปนเปื้อนและประเมินปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวมในอาหารทะเลสดและอาหารทะเลดอง พร้อมทั้งจำแนกชนิดเชื้อ *Vibrio* spp. โดยใช้การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA เพื่อเป็นข้อมูล

พื้นฐานด้านความปลอดภัยอาหาร และเป็นแนวทางเฝ้าระวังและป้องกันโรคจากการบริโภคอาหารทะเล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อประเมินปริมาณจุลินทรีย์รวมในอาหารทะเลสดและดอง
2. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณจุลินทรีย์รวมระหว่างอาหารทะเลสด และอาหารทะเลที่ผ่านกระบวนการถนอมด้วยวิธีการดองเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง
3. เพื่อจำแนกชนิดเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในอาหารทะเลสดและดอง โดยใช้การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

สมมุติฐานการศึกษา

1. กระบวนการดองมีผลต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารทะเล โดยสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์รวมเมื่อเทียบกับอาหารทะเลสด
2. ระยะเวลาการดองที่แตกต่างกันมีอิทธิพลต่อระดับการลดลงของจุลินทรีย์ในอาหารทะเล

วิธีการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (Experimental Laboratory Study) โดยออกแบบเพื่อศึกษาการเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์รวมในอาหารทะเลสดและอาหารทะเลดอง รวมถึงการจำแนกชนิดเชื้อ *Vibrio* spp. ด้วยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง
ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทะเลสด 3 ชนิด เลือกใช้วิธีการสุ่มแบบเจาะจง (purposive

sampling) เพื่อความโปร่งใสและสามารถทำซ้ำได้ ได้แก่ กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*), ปูม้า (*Portunus armatus*), และ หอยแครง (*Anadara granosa*) แต่ละชนิดจำนวน 3 ซ้ำ ($n=3$) ในช่วงวันและเวลาเดียวกัน จากตลาดแห่งหนึ่งในอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทั้งนี้ตัวอย่างแต่ละชนิดถูกบรรจุในถุงพลาสติกปิดเชื้อ ปิดปากถุงด้วยยางรัดและติดฉลากระบุชนิดและวันที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นบรรจุถุงตัวอย่างลงในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 4°C และนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 4 ชั่วโมง

สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการดองทำการล้างทำความสะอาด ขจัดคราบโคลน แล้วใส่ภาชนะสะอาดปราศจากเชื้อ น้ำดองประกอบด้วย น้ำเปล่า 920 มิลลิลิตร น้ำปลา 230 มิลลิลิตร และน้ำตาลทราย 70 กรัม เคี่ยวจนน้ำตาลละลาย พักให้เย็นแล้วราดลงบนตัวอย่างอาหารทะเล ทำการดองเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงในตู้เย็นอุณหภูมิ

4°C ก่อนนำไปวิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์รวมใช้วิธีดัดแปลงจาก US FDA-BAM กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, Andrews & Hammack^(11,12) โดยชั่งตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ถุง stomacher พร้อม Butterfield's phosphate buffer 450 มิลลิลิตร บดด้วยเครื่อง Stomacher รุ่น BagMixer (Interscience) เจือจางเป็นลำดับ 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เพื่อใช้ในการเพาะเชื้อในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์รวม (Total viable count: TVC)

ใช้วิธีมาตรฐาน US FDA-BAM(11-13) โดยปิเปตสารละลายเจือจางแต่ละระดับ 1 มิลลิลิตร หยอดบน Plate Count Agar (PCA) และเกลี่ยด้วยแท่งแก้วรูปตัว L จากนั้นคว่ำจานและบ่มที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง เลือกจานที่มีจำนวนโคโลนี 25–250 โคโลนีเพื่อนำมาคำนวณ CFU/g ตามสูตรดังนี้

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

โดยที่ N คือ จำนวนโคโลนีต่อกรัม

$\sum C$ คือ ผลรวมของจำนวนโคโลนีที่นับได้ทุกจานเพาะเชื้อ

n_1 คือ จำนวนจานเพาะเชื้อของระดับความเจือจางแรกที่นับ

n_2 คือ จำนวนจานเพาะเชื้อของระดับความเจือจางถัดมาที่นับ

d คือ dilution factor แรกที่นับ

ค่าที่คำนวณได้รายงานผลเป็นตัวเลข 2 ลำดับ โดยปัดตัวเลขลำดับที่ 2 เพิ่มขึ้น 1 ค่า ถ้าเลขลำดับที่ 3 มากกว่า 5 และถ้าเลขลำดับที่ 3 น้อยกว่า 5 ให้ปรับตัวเลขในลำดับที่ 3 เป็นศูนย์ แต่ถ้าเลขในลำดับที่ 3 มีค่าเท่ากับ 5 จะพิจารณาตัวเลขลำดับที่ 2 ถ้าเป็นเลขคี่ให้ปัดตัวเลขลำดับที่ 2 ขึ้น 1 ค่า แต่

ถ้าเป็นเลขคู่ให้ปรับตัวเลขลำดับที่ 3 เป็นศูนย์ และรายงานผลเป็น $\log_{10}$ (CFU/g) สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติ

การแยกและจำแนกชนิดเชื้อ *Vibrio* spp. และการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

นำตัวอย่างเจือจาง (10^{-1} – 10^{-3}) หยดบน

Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS agar) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วและบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนีโดยพิจารณาถึงขนาด รูปร่าง ขอบโคโลนี ระดับความนูน ลักษณะทางด้านแสง สีของโคโลนี ลักษณะผิวหน้าของโคโลนี⁽¹⁴⁾ ทำการย้อมแกรมแบคทีเรีย และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์⁽¹⁵⁾

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว (NB) และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Bacterial DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ fd1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC-3) และ rP2 (5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3') โดยใช้ไพรเมอร์ fd1 และ rP2 มีความยาวประมาณ 1,500 bp ซึ่งเป็นยีนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อนุกรมวิธาน (phylogenetic analysis) และระบุชนิด (species) ของจุลินทรีย์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ⁽¹⁶⁾

ปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 50 μ L ประกอบด้วย 10X Taq buffer, $MgCl_2$, dNTPs, ไพรเมอร์ทั้งคู่, Taq DNA polymerase, DNA template และน้ำปราศจาก DNase โปรแกรม PCR ประกอบด้วย denaturation 94°C, annealing 50–57°C, และ extension 72°C ตามรอบที่กำหนด ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis และถ่ายภาพด้วย Gel documentation system (GE-ImageQuant LAS 500, Sweden) ผลผลิต PCR ทำให้บริสุทธิ์

ด้วย GF-1 PCR Clean-Up Kit (Vivantis, Malaysia) และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ MACROGEN (Korea) ลำดับที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST และจัดเรียงลำดับด้วย ClustalW⁽¹⁷⁾ ในโปรแกรม BioEdit v7.2.⁽¹⁸⁾ จากนั้นสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการด้วย MEGA X โดยใช้วิธี Neighbor-joining ตาม Kimura 2-parameter model⁽¹⁸⁾

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ค่าปริมาณจุลินทรีย์รวม (CFU/g) แปลงเป็น $\log_{10}$ ก่อนการวิเคราะห์ ตรวจสอบความเป็นปกติของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk test และความเท่ากันของความแปรปรวนด้วย Levene's test วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย One-way ANOVA และเปรียบเทียบรายคู่ด้วย Tukey's HSD test กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 วิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป ผลการวิจัย

ปริมาณจุลินทรีย์รวมในอาหารระหว่าง

กระบวนการถนอมอาหารด้วยวิธีการดอง

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์รวม (Total viable count: TVC) ของตัวอย่างอาหารทะเลสด และดอง ได้แก่ กุ้งขาว ปูม้า และหอยแครงในสภาพสด ดอง 24 ชั่วโมง และดอง 48 ชั่วโมง พบว่า กลุ่มตัวอย่างสดมีค่าปริมาณจุลินทรีย์รวมสูงที่สุด โดยเฉพาะหอยแครงสด (3.19×10^6 CFU/g; $\log_{10} = 6.503$) รองลงมาคือปูม้าสด (1.86×10^5 CFU/g; $\log_{10} = 5.270$) และกุ้งขาวสด (6.86×10^4 CFU/g; $\log_{10} = 4.836$) ในขณะที่กลุ่มดองมี

ปริมาณจุลินทรีย์ลดลงตามระยะเวลาการดอง โดย กุ้งขาวดอง 48 ชั่วโมงมีค่าต่ำที่สุด (2.85×10^2 CFU/g; $\log_{10} = 2.454$) (ตารางที่ 1) ผลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าการดองสามารถลดปริมาณ

จุลินทรีย์รวมได้อย่างชัดเจน และเมื่อเพิ่ม ระยะเวลาการดองจาก 24 ชั่วโมงเป็น 48 ชั่วโมง ปริมาณจุลินทรีย์มีแนวโน้มลดลงมากขึ้น

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารทะเล

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/g)	$\log_{10}$ (CFU/g)
กุ้งสด	6.86×10^4	4.836
หอยแครงสด	3.19×10^6	6.503
ปูม้าสด	1.86×10^5	5.270
กุ้งดองน้ำปลากวน 24 ชั่วโมง	6.30×10^3	3.799
หอยแครงดองน้ำปลากวน 24 ชั่วโมง	8.80×10^4	4.944
ปูม้ามดองน้ำปลากวน 24 ชั่วโมง	4.03×10^4	4.605
กุ้งดองน้ำปลากวน 48 ชั่วโมง	2.85×10^2	2.454
หอยแครงดองน้ำปลากวน 48 ชั่วโมง	1.56×10^4	4.193
ปูม้ามดองน้ำปลากวน 48 ชั่วโมง	3.26×10^3	3.513

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของ ปริมาณจุลินทรีย์รวม

การทดสอบสมมติฐานเบื้องต้นด้วย Shapiro-Wilk test พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัว เป็นปกติ ($p > 0.05$) และการทดสอบความ แปรปรวนด้วย Levene's test พบว่ามีความ แปรปรวนเท่ากัน ($p > 0.05$) จึงใช้การวิเคราะห์ One-way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ผล การวิเคราะห์พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติระหว่างอย่างน้อยหนึ่งคู่ของ กลุ่มตัวอย่าง ($p < 0.05$) การวิเคราะห์ด้วย Tukey's HSD พบว่ากลุ่มตัวอย่างสดมีค่าปริมาณ จุลินทรีย์รวมสูงกว่ากลุ่มดอง 48 ชั่วโมงอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ ความ แตกต่างระหว่างกลุ่มสดกับดอง 24 ชั่วโมง และ ระหว่างดอง 24 ชั่วโมงกับดอง 48 ชั่วโมง แตกต่าง กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2- 4)



ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย ($\pm$ SD) ของปริมาณจุลินทรีย์รวม $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ และค่า CFU/g ตามสภาวะ ตัวอย่าง ($n=3$)

ตัวอย่าง	$\text{Log}_{10}(\text{CFU/g})$ (เฉลี่ย $\pm$ SD)	กลุ่มตัวอักษร*	CFU/g
สด	5.536 ± 0.865	b	3.44×10^5
ดอง 24 ชม.	4.449 ± 0.588	ab	2.81×10^4
ดอง 48 ชม.	3.387 ± 0.876	a	2.44×10^3

* อักษรเดียวกันในคอลัมน์เดียวกันหมายถึง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Tukey HSD, $\alpha=0.05$)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของปริมาณจุลินทรีย์รวม $\log_{10}(\text{CFU/g})$ ตามสภาวะ ตัวอย่าง

ความแปรปรวน	df	SS	MS	F	p-value
ระหว่างกลุ่ม	2	6.932	3.466	5.585	0.043*
ภายในกลุ่ม	6	3.724	0.621		
รวม	8	10.656			

* $p < 0.05$ = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบจับคู่ ของปริมาณจุลินทรีย์รวมตามสภาวะตัวอย่าง

การเปรียบเทียบคู่	Mean Difference (I-J)	Std. Error	p-value	95% CI Lower	95% CI Upper
สด - ดอง 24 ชม.	1.087	0.643	0.284	-0.887	3.066
สด - ดอง 48 ชม.	2.150	0.643	0.036*	0.176	4.123
ดอง 24 ชม. - ดอง 48 ชม.	1.063	0.643	0.297	-0.910	3.036

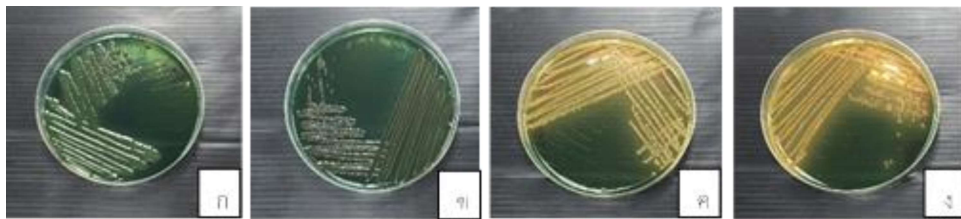
* $p < 0.05$ = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



ผลศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียในตัวอย่างอาหารทะเล และการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด พบว่าสามารถแยกเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar ได้รวมทั้งสิ้น 8 ไอโซเลต การจำแนกโดยสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อบน TCBS พบว่า เชื้อที่ได้สามารถจัดกลุ่มตามลักษณะโคโลนีได้ 4 ลักษณะ

คือ โคโลนีสีเขียวทึบแสงกลมมน จำนวน 3 ไอโซเลต โคโลนีสีเขียวเข้มทึบแสงขอบเรียบ จำนวน 2 ไอโซเลต โคโลนีสีเหลืองโปร่งแสงขอบเรียบ จำนวน 2 ไอโซเลต และ โคโลนีกลมสีเหลืองสะท้อนแสงขนาดเล็กขอบเรียบ จำนวน 1 ไอโซเลต (ภาพที่ 1) การทดสอบด้วยการย้อมแกรมพบว่า เชื้อทั้ง 8 ไอโซเลตติดสีแดงของสีย้อมซาฟรานิน แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น โค้งหรือแท่ง และมีแฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารทะเล ที่เจริญบนอาหาร TCBS

- (ก) โคโลนีสีเขียว ทึบแสง กลมมน (ข) โคโลนีสีเขียวเข้ม ทึบแสง ขอบเรียบ
(ค) โคโลนีสีเหลืองโปร่งแสง ขอบเรียบ (ง) โคโลนีกลมสีเหลืองสะท้อนแสง ขนาดเล็ก ขอบเรียบ

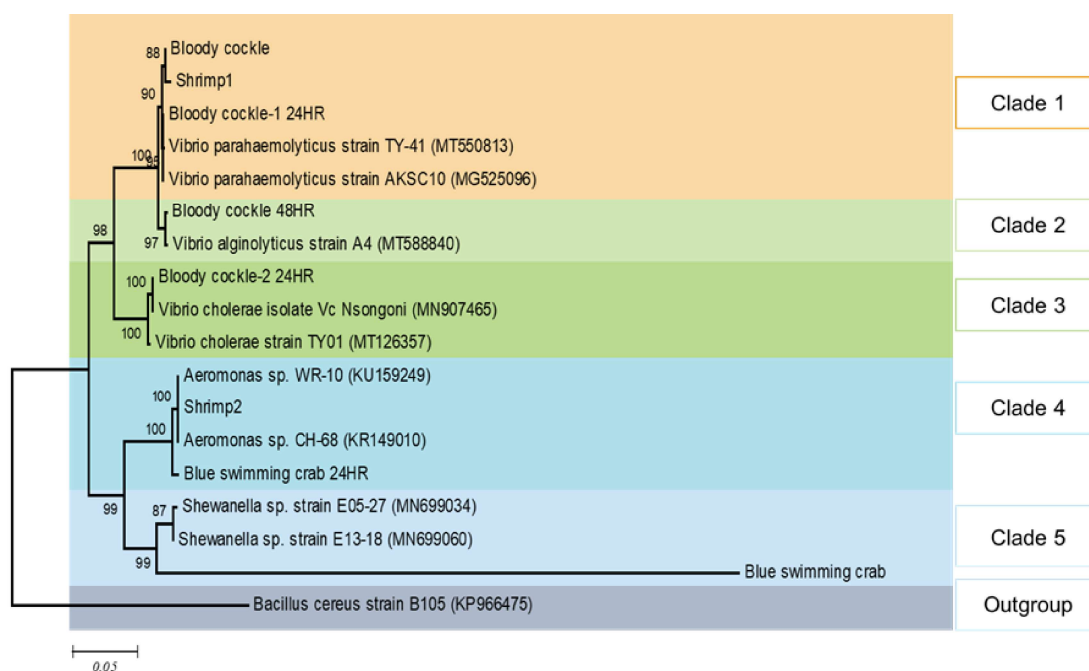
เชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตที่แยกได้บริสุทธิ์นำมาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ FD1 และ rP2 ผลการตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าการขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 bp ในทุกไอโซเลต เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST search พบว่า เชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ Shrimp1,

Bloody cockle และ Bloody cockle1 24HR มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเชื้อในกลุ่ม *V. parahaemolyticus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 97–98 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ Bloody cockle 48HR มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *V. alginolyticus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ และเชื้ออีก 1 ไอโซเลต ได้แก่ Bloody cockle-2 24HR มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *V. cholerae* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความ

เหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้ออีก 2 ไอโซเลต ได้แก่ Blue swimming crab 24HR และ Shrimp2 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเชื้อในกลุ่ม *Aeromonas* sp. โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่าง 97-98 เปอร์เซ็นต์ และเชื้ออีก 1 ไอโซเลต ได้แก่ Blue swimming crab (3-3) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเชื้อในกลุ่ม *Shewanella* sp. โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตและเชื้อที่ใกล้เคียงใน

ฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA X โดยใช้วิธี Neighbor-joining และการคำนวณค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง ตามวิธี Kimura 2-parameter model พบว่า สามารถจำแนกเชื้อที่แยกได้ออกเป็น 5 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่ม *V. parahaemolyticus* จำนวน 3 ไอโซเลต กลุ่ม *V. alginolyticus* จำนวน 1 ไอโซเลต กลุ่ม *V. cholerae* จำนวน 1 ไอโซเลต กลุ่ม *Aeromonas* sp. จำนวน 2 ไอโซเลต และกลุ่ม *Shewanella* sp. จำนวน 1 ไอโซเลต (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงสายวิวัฒนาการร่วมกับเชื้อตัวอื่นที่มีการรายงานในฐานข้อมูล Genbank (Bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง ตามวิธีของ Kimura 2-parameter model)

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการถนอมอาหารทะเลด้วยวิธีการดองมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ โดยจากการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์รวม (Total viable count; TVC) ตามมาตรฐาน US FDA-BAM พบว่า อาหารทะเลสดมีปริมาณจุลินทรีย์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ผ่านการดอง 24 และ 48 ชั่วโมง แม้สัดส่วนตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนในทั้งสามกลุ่มจะเท่ากัน (ร้อยละ 33.33 ต่อกลุ่ม) แต่ในเชิงปริมาณ กลุ่มดอง 48 ชั่วโมงมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.036$) เมื่อเทียบกับกลุ่มสด ซึ่งสะท้อนถึงบทบาทของกระบวนการดองในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับหลักการถนอมอาหารที่ระบุว่าการลดค่า water activity (aw) ด้วยเกลือและน้ำปลา รวมถึงการปรับค่า pH ให้อยู่นอกช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค จะทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนได้ยาก⁽²⁰⁾ นอกจากนี้ *V. harveyi* เจริญได้ดีที่สุดในความเค็ม 30–40 ส่วนในพันส่วน ที่อุณหภูมิ 20°C และจำนวนเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องหลังผ่านไป 48 ชั่วโมง⁽²¹⁾ เช่นเดียวกับรายงานวิจัยที่ตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์รวมในอาหารทะเลสด⁽²²⁾ ในช่วง $1 \times 10^4 - 9.95 \times 10^4$ CFU/g และ $1 \times 10^4 - 7.74 \times 10^4$ CFU/g ซึ่งอยู่ในระดับใกล้เคียงกับค่าที่พบในงานวิจัยนี้ ทั้งนี้ การปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในกุ้ง ปลา หมึก หอยแมลงภู่ และหอยนางรมจากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร โดยมีปริมาณตั้งแต่ 24–1,100

MPN/g แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนในอาหารทะเลสดสามารถพบได้ในหลายพื้นที่และหลายชนิดสัตว์น้ำ⁽³⁾

การตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคในงานวิจัยนี้พบการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *Aeromonas* sp., *Shewanella* sp. โดย *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อที่พบมากที่สุดและเป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคอาหารทะเลดิบหรือสุกไม่ทั่วถึง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบเชื้อในสกุล *Vibrio* 8 สปีชีส์ และพบ *Salmonella* ถึง ร้อยละ 10 ของตัวอย่างอาหารทะเลทั้งหมด การพบ *V. cholerae* แม้เพียง 1 ไอโซเลตก็มีความสำคัญเชิงสาธารณสุข เนื่องจากเป็นสาเหตุของโรคอหิวาตกโรค (*cholera*) ซึ่งอาจนำไปสู่การระบาดได้ ขณะที่ *Aeromonas* sp. และ *Shewanella* sp. แม้จะเป็นเชื้อฉวยโอกาส⁽⁴⁾ แต่ก็มีรายงานว่าสามารถก่อโรครุนแรงในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง⁽²³⁾ และมีการตรวจพบในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักหรือดองในประเทศ⁽²⁴⁾ นอกจากนี้ผลการศึกษายังสอดคล้องกับรายงานที่ตรวจพบเชื้อในสกุล *Vibrio* ถึง 8 สปีชีส์ และเชื้อ *Salmonella* 7 ซี โรไทป์ จากตัวอย่างอาหารทะเล 150 ตัวอย่าง⁽⁴⁾ รวมถึงรายงานการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* และ *Lactobacillus* spp. ในกุ้งจ่อม ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักพื้นบ้านในไทย⁽²⁴⁾ ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการถนอมอาหารด้วยวิธีการดองสามารถลดปริมาณเชื้อได้ แต่ยังไม่สามารถ

กำจัดเชื้อก่อโรคทั้งหมดออกไปได้อย่างสมบูรณ์จากการศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างจากตลาดเพียงแห่งเดียวในช่วงเวลาเดียว ซึ่งอาจไม่สะท้อนความแปรปรวนของพื้นที่อื่น ดังนั้น การศึกษาในอนาคตควรขยายพื้นที่และเพิ่มจำนวนตัวอย่างเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์

การดองอาหารทะเลเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณจุลินทรีย์รวมได้จริง แต่ยังควรตรวจพบเชื้อก่อโรคบางชนิดจึงควรเน้นการควบคุมสุขลักษณะในทุกขั้นตอนตั้งแต่กระบวนการจับ การขนส่ง การแปรรูป ไปจนถึงการจำหน่ายอาหารทะเล รวมถึงการเลือกซื้อจากแหล่งที่มีมาตรฐานตามกฎหมายกระทรวงว่าด้วยสุขลักษณะของสถานที่จำหน่ายอาหาร (พ.ศ. 2561) เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการเฝ้าระวัง การให้ความรู้ผู้ประกอบการ และการกำหนดมาตรการควบคุมความปลอดภัยของอาหารทะเลในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่า อาหารทะเลสดที่จำหน่ายในพื้นที่ศึกษามีปริมาณจุลินทรีย์รวมสูงกว่าอาหารทะเลที่ผ่านการถนอมด้วยวิธีการดองทั้งในระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการดอง 48 ชั่วโมงสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์รวมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับอาหารทะเลสด ($p=0.036$) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการดองมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แม้จะไม่สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคได้ทั้งหมด จากการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยา

รวมกับการใช้เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในการระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ พบเชื้อก่อโรคและเชื้อฉวยโอกาสรวม 5 กลุ่ม ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *Aeromonas* sp. และ *Shewanella* sp. ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขและมีรายงานเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนในอาหารทะเลจากงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศ การตรวจพบเชื้อเหล่านี้แม้ในอาหารทะเลที่ผ่านการดองแล้ว สะท้อนให้เห็นถึงความจำเป็นของการจัดการสุขลักษณะในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิต การขนส่ง และการจำหน่าย

การดองอาหารทะเลจะสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์รวมได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังคงพบเชื้อก่อโรคและเชื้อฉวยโอกาสที่มีศักยภาพในการก่อโรคในมนุษย์ ดังนั้น ควรมีมาตรการเฝ้าระวังและควบคุมคุณภาพอาหารทะเลอย่างต่อเนื่อง รวมถึงการให้ความรู้แก่ผู้ประกอบการและผู้บริโภค เพื่อป้องกันความเสี่ยงต่อการเกิดโรคจากการบริโภคอาหารทะเลดิบหรือดองที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการกำหนดมาตรการด้านความปลอดภัยอาหารทะเลทั้งในเชิงป้องกันและเชิงนโยบาย

ข้อเสนอแนะทั่วไป

1) ควรควบคุมสุขลักษณะในทุกขั้นตอนของการผลิต การขนส่ง และการจำหน่ายอาหารทะเล รวมถึงกำหนดระยะเวลาและสภาวะการดองที่เหมาะสม เพื่อให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

2) ควรศึกษาการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคในอาหารทะเลเพิ่มเติมในพื้นที่และฤดูกาลที่หลากหลาย พร้อมใช้เทคนิคระดับโมเลกุลที่มีความไวสูงเพื่อระบุชนิดเชื้ออย่างแม่นยำ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านเครื่องมือสถานที่ และอุปกรณ์

เอกสารอ้างอิง

1. กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง, กรมประมง. สถานการณ์การผลิตและการบริโภคสัตว์น้ำทะเล. กรุงเทพฯ: กรมประมง; 2566.
2. Su YC, Liu C. *V. parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.* 2007;24(6):549–58.
3. สุรีย์ นานาสมบัติ, นวรัตน์ โพธิราช, ประทุมแสนมา, สิทธิโชค ศิริศรีชัย. การตรวจหาการปนเปื้อน *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดที่จำหน่ายในกรุงเทพฯ และการศึกษาการต้านทานความร้อน. *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ.* 2556;16 (3 ฉบับพิเศษ).
4. Bakr WMK, Hazzah WA, Abaza AF. Detection of Salmonella and Vibrio species in some seafood in Alexandria. *J Am Sci.* 2011;7(9):663–8.
5. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร.

กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2550.

6. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. รายงานผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษประจำปี 2562. กรุงเทพฯ: กรมควบคุมโรค; 2563.
7. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สุเมตต์ ปุจฉาการ. ความหลากหลายทางชนิดและลักษณะทางพันธุกรรมของจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล หมูเกาะแสมสาร. *ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2558.*
8. Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, et al. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS One.* 2015;10(2): e0117617.
9. ละอาด อัญชลี. การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกโดยการหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA [วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2544.
10. นฤมล ศรีสวัสดิ์, คณะ. การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากน้ำพริกด้วยยีน 16S rRNA. *Thai J Sci Technol.* 2559;5(2): 160–8.
11. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานผลการดำเนินงานโครงการบูรณาการความปลอดภัย (Food Safety) ประจำปี 2562. กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2562.



12. Andrews WH, Hammack TS. BAM: Food sampling/preparation of sample homogenate. Rockville (MD): US FDA; 2003.
13. Maturin L, Peeler JT. BAM: Aerobic plate count. Silver Spring (MD): US FDA; 2001.
14. นฤมล มาแทน. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร. นครศรีธรรมราช: มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์; 2560.
15. Colco R. Gram Staining. *Curr Protoc Microbiol.* 2005;00(1): Appendix 3C.
16. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991;173(2):697-703.
17. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment... *Nucleic Acids Res.* 1994;22(11):4673-80.
18. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41: 95-8.
19. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9.
20. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Modern Food Microbiology.* 7th ed. New York: Springer; 2005.
21. นนทวิทย์ อารีย์ชน, สุภาวดี โกยกุล, นิลบล กิจอันเจริญ. ผลของความเค็มและอุณหภูมิต่อความอยู่รอดของ *Vibrio harveyi*. *วิทยาศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์.* 2536;27(1):67-73.
22. อีสมีย์ อาลี, ซามีลา คูมีแด, พูรกอนนี สาและ, ชูไต้ะ หะยิวาเงะ, คอสียาร์ สะลี, นุรฮัยนี หะยิโยชะ, อับดุลลาห์ โตลาห์ ดาลี. การปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดที่จำหน่ายในเขตเทศบาลยะลาและเมืองปัตตานี. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ มรณ.นครศรีธรรมราช; 2560.
23. วรวัฒน์ พรหมเด่น. การตรวจคัดแยกและระบุสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในอาหารทะเล. บุรีรัมย์: มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์; 2562.
24. Prachasitthisak Y, Eamsiri J, Sajjabut S, Rojekittikhun W. Improving the hygiene of fermented shrimp (*kung chom*) using gamma irradiation. *J Trop Med Parasitol.* 2009;32(1):9-16.

