

การสำรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดก่อโรคจากนากุ้ง

Investigation of Pathogenic Bacteria from Shrimp Farms

พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์ จุไรรัตน์ นิลกุล จัทรชัย ศรีไชย
ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช และเกศรา เกษมสุขสกุล¹

Pimpan Leangphibul, Churairat Nilakul, Chatchai Sornchai,
Srisurang Tantimavanich and Kesara Kasemsuksakul

ABSTRACT

The isolation and enumeration of pathogenic bacteria from shrimp farms in Samutprakarn Province were carried out from October 1983 to December 1984. A total of 306 specimens including 139 samples of water, 144 samples of sediments and 23 samples of shrimp were investigated. The enteropathogenic bacteria isolated were *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *Non 01 Vibrio cholerae*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* and *Plesiomonas shigelloides*, but the numbers were not higher than the standard level. The result may be used as a composition to indicate the water quality and the quality of natural water resources effecting to the safety for consumer and also exportation.

บทคัดย่อ

ได้ทำการเพาะแยกเชื้อและหาปริมาณของแบคทีเรียชนิดก่อโรคจากน้ำ ดินตะกอน และกุ้ง ในนากุ้งเขตจังหวัดสมุทรปราการ รวมทั้งจากดินและน้ำในคลองและชายฝั่งทะเลซึ่งมีทางติดต่อกับนากุ้ง ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2526 ถึงธันวาคม 2527 เป็นน้ำ 139 ตัวอย่าง ดินตะกอน 144 ตัวอย่าง และกุ้ง 23 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่าได้พบเชื้อแบคทีเรียชนิดก่อโรคในน้ำได้ คือ *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *Non 01 Vibrio cholerae*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *A. Sobria* และ *Plesiomonas shigelloides* แต่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในกุ้งไม่สูงกว่ามาตรฐานและคุณภาพของน้ำอยู่ในเกณฑ์ดี

คำนำ

ปัญหาที่มาของการวิจัยนี้ เนื่องมาจากแนวโน้มของความเสื่อมโทรมทั้งในด้านคุณภาพสิ่งแวดล้อมในทะเล เช่น การลดลงของประชากรด้านการประมง การปนเปื้อนจากสารมลพิษ แบคทีเรีย และพยาธิในสัตว์ทะเล ปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ได้สะสมและเพิ่มขึ้นจนอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพอนามัยของประชาชนและส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ การวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยคุณภาพน้ำและคุณภาพทรัพยากรมีชีวิตในทะเล โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะสำรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดก่อโรคจากนากุ้งเพื่อเป็นข้อมูลทางด้านจุลชีววิทยาในการพิจารณาแก้ไขปัญหานี้หรือปรับปรุงให้ผลผลิตจากนากุ้งเพิ่มขึ้น รวมทั้งป้องกันการทำให้เกิดโรคในกุ้ง

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก, คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยมหิดล
Dept. of Clinical Microbiology, Faculty of Medical Technology, Mahidol Univ.

และ/หรือผู้บริโภคน

การศึกษาจากเอกสารพบว่า สิ่งมีชีวิตที่ทำให้กุ้งเกิดโรคนั้น ส่วนมากเป็นสัตว์ขนาดเล็กที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า แต่เมื่อเข้าสู่ตัวกุ้งและแพร่ขยายพันธุ์เป็นจำนวนมากแล้ว จะทำให้กุ้งมีส่วนที่ผิดปกติหรือแสดงอาการที่ผิดปกติไป และอาจทำให้กุ้งตายหรือโคซ้า แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งทะเล บางชนิดเข้าสู่เลือดและ body fluid บางชนิดอยู่ตามเหงือก เปลือก และระยางค์ของกุ้ง กุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียในระยะเริ่มแรกจะมีการเคลื่อนไหวช้าลง กล้ามเนื้อตามลำตัวและเหงือกเปลี่ยนสี แบคทีเรียบางชนิดทำให้เปลือกเป็นแผล ส่วนของเปลือกบริเวณนั้นหลุดหายไป และตามขอบของแผลเป็นสีเข้ม แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *Vibrio spp.* ซึ่งส่วนมากจะเป็น *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. anguillarum* นอกจากนี้อาจเป็น *Vibrio* ชนิดอื่น ๆ, *Pseudomonas spp.* และ *Aeromonas spp.* (Johnson, 1978 และ Sindermann, 1977) เชื้อเหล่านี้ก่อให้เกิดโรคในคนดังนี้

Vibrio parahaemolyticus เป็น *halophilic vibrio* ซึ่งเป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่าเป็นสาเหตุของ gastroenteritis โดยการรับประทานอาหารทะเลที่มีเชื้อปนอยู่ สามารถพบการติดเชื้อนี้ได้ทั่วโลกทั้งการระบาดและประปราย ถึงแม้การติดเชื้อจะไม่รุนแรงและหายได้เอง แต่ก็อาจทำให้ผู้ป่วยตายได้ พบว่าการทำให้เกิดโรคมีความสัมพันธ์กับการทดสอบ Kanagawa ที่ให้ผลบวก (ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้าง hemolysin) ประมาณ 96% ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย gastroenteritis ให้ผลการทดสอบ Kanagawa เป็นบวก แต่มีเพียง 1% ของเชื้อนี้ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ ให้ผลการทดสอบเป็นบวก อย่างไรก็ตาม กลไกของการทำให้เกิดโรคของเชื้อนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน เพราะอาจมีสารพิษหรือ virulence factors อื่น ๆ เกี่ยวข้องด้วย

Vibrio alginolyticus เป็นชนิดที่พบได้เป็นประจำในทะเล แต่ที่พบในผู้ป่วย มักแยกมาได้จากแผลที่ติดเชื้อตาและหู ซึ่งมีแผลอยู่แล้วมีการ

สัมผัสกับน้ำทะเล ส่วนกลไกการทำให้เกิดโรคก็ยังไม่ทราบแน่ชัด

Vibrio fluvialis เป็นชนิดใหม่ที่พบว่าเป็นสาเหตุซึ่งทำให้เกิดอุจจาระร่วง สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ และแยกเชื้อนี้ได้จากผู้ป่วยที่เป็น gastroenteritis ซึ่งมักมีอาการคล้ายอหิวาต์ ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ อาเจียน ปวดท้อง และมีไข้ ส่วนกลไกการทำให้เกิดอุจจาระร่วงยังไม่ทราบแน่นอน

Vibrio cholerae non-01 สามารถพบได้ทั่วไปทั้งจากคนและสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะจากน้ำ เชื้อนี้จะทำให้เกิดโรคในคนได้หลายแบบ คือ ทำให้เกิดอุจจาระร่วงคล้ายอหิวาต์ หรืออุจจาระร่วงไม่รุนแรง (mild diarrhea) ซึ่งอาจเกิดจาก cholera-like toxin, enterotoxin หรือเป็นแบบ invasive (Farmer et al, 1984) แต่บางสายพันธุ์ก็ไม่มีคุณสมบัติเหล่านี้เลย นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดโรคอื่น ๆ นอกเหนือจาก gastroenteritis เช่น สามารถแยกเชื้อนี้ได้จากเลือดของผู้ป่วย septicemia ซึ่งมีโรคตับแข็งหรือโรคอื่น ๆ ร่วมด้วย หรืออาจแยกเชื้อนี้ได้จาก หู, แผล, ระบบทางเดินหายใจและปัสสาวะ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อนี้กับ *V. cholerae 01* แล้วจะพบว่า *V. cholerae non-01* ทำให้เกิด extraintestinal infections มากกว่า

Aeromonas พบได้ทั่วไปในน้ำ รวมทั้งน้ำทะเลและสัตว์ทะเล *A. hydrophila* ทำให้เกิดโรคในคนได้หลายแบบ ตั้งแต่การติดเชื้อของแผล การติดเชื้อในเลือด และอื่น ๆ อีก รวมทั้ง gastroenteritis ส่วน *A. sobria* มีรายงานการทำให้เกิดการติดเชื้อในคนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และอาจพบบ่อยกว่า *A. hydrophila* (Finegold and Martin, 1982)

แบคทีเรียดังกล่าวนี้รวมทั้ง *Vibrio spp.* อาจพบได้ในกุ้งปกติในจำนวนน้อย โดยพบได้ใน hemolymph ซึ่งเป็นผลมาจากการที่กุ้งมีอาการ stress เมื่อต้องอยู่ร่วมกันอย่างแออัด (crowding), handling และ/หรือ จากการจับ (capture) ทำให้แบคทีเรียเข้าสู่ hemolymph หากกุ้งมีอาการ stress เพียงชั่วคราว เมื่อหายจากอาการดังกล่าว กุ้งก็จะ

สามารถกำจัดแบคทีเรียจำนวนน้อย ๆ เหล่านี้ได้โดย defense mechanism ของกึ่งเอง แต่เมื่อใดก็ตาม ถ้ากึ่งถูก infected ด้วยแบคทีเรียชนิดก่อโรคเหล่านี้ ก็จะทำให้กึ่งตายเกือบ 100% ของจำนวนกึ่งที่ได้รับการติดเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

ช่วงระยะเวลา 15 เดือน ตั้งแต่ตุลาคม 2526 ถึงธันวาคม 2527 ได้เก็บตัวอย่าง คือ น้ำ ดินตะกอน และกึ่ง จากนา 5 แห่งในเขตจังหวัดสมุทรปราการ และเก็บน้ำและดินตะกอนจากคลองและบริเวณชายฝั่งทะเลที่ติดต่อกับนาเหล่านี้ โดยเก็บเดือนละ 2 ครั้ง (รวมทั้งหมด 306 ตัวอย่าง เป็นน้ำ 139 ตัวอย่าง, ดินตะกอน 144 ตัวอย่าง และกึ่ง 23 ตัวอย่าง) ตัวอย่างทั้งหมดเก็บในภาชนะที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปยังห้องปฏิบัติการโดยแช่ในถังน้ำแข็ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการได้เก็บตัวอย่างที่ลบ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการตรวจ ซึ่งการตรวจกระทำภายใน 24 ชั่วโมงหลังเก็บตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างทั้งหมดนี้มาเพาะแยกเชื้อและนับจำนวนแบคทีเรีย โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ

1. ตัวอย่างน้ำ

1.1 Direct plate : Blood agar, MacConkey agar, SS agar และ TCBS agar

1.2 Enrichment : Selenite F, APW (Alkaline peptone water) และ 3% NaCl Alkaline peptone water

incubate ที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง แล้ว subculture จาก selenite F ลง MacConkey และ SS agar จาก APW และ 3% NaCl APW ลง blood agar และ TCBS

1.3 ทา MPN (Most Probable Number) ของ coliform

1.4 Bacterial count (spread plate) โดยใช้ TPC (total plate count agar) แล้วนับโคโลนีหลังจาก incubate ที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

2. ตัวอย่างดินตะกอน

2.1 Direct plate

2.2 Enrichment

Direct plate และ Enrichment มีรายละเอียดเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำ

3. ตัวอย่างกึ่ง บดให้ละเอียด

3.1 Direct plate

3.2 Enrichment

3.3 Bacterial count

Direct plate, Enrichment และ Bacterial count มีรายละเอียดเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำ

วิธีพิสูจน์ชนิดของเชื้อ (identification) ทำโดยอาศัยการย้อมสีกรัม ลักษณะโคโลนี ปฏิกิริยาทางชีวเคมีและอิมมูโนวิทยา (Lennette et al 1980; Finegold and Martin, 1982; Ohashi et al, 1978)

ผลและวิจารณ์

ผลการสำรวจพบว่า ตัวอย่างตรวจเกือบทั้งหมดไม่ว่าจะเป็นน้ำ ดินตะกอน และกึ่ง สามารถพบเชื้อแบคทีเรียชนิดก่อโรคในลำไส้ (ตารางที่ 1) โดยพบเชื้อหลายชนิดอยู่ร่วมกันในแต่ละตัวอย่าง เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำและดินตะกอน เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อย คือ *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio parahemolyticus*, Non 01 *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Salmonella* group B, *Plesiomonas shigelloides* และ *Salmonella* group E แต่จากดินตะกอน ไม่พบ *Salmonella* Group E แต่พบ *Edwardsiella tarda* และ *Salmonella typhi* เพิ่มขึ้น

จากกึ่ง เชื้อแบคทีเรียที่พบเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย คือ *Vibrio parahemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio alginolyticus*, Non 01 *Vibrio cholerae* และ *Vibrio fluvialis*

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียชนิดก่อโรค และชนิดของเชื้อ (พบเชื้อหลายชนิดร่วมกันในแต่ละตัวอย่าง)

ตัวอย่างตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย											จำนวน ตัวอย่าง ที่ตรวจ ไม่พบเชื้อ
	<i>Vibrio parahemo- lyticus</i>	<i>Vibrio algino- lyticus</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Non O1 Vibrio cholerae</i>	<i>Aero- monas hydro- phila</i>	<i>Aero- monas sobria</i>	<i>Plesio- monas shigel- loides</i>	<i>Salmo- nella gr. B</i>	<i>Salmo- nella gr. E</i>	<i>S. typhi</i>	<i>Edward- siella tarda</i>	
น้ำ	50/139 (35.97%)	30/139 (21.58%)	20/139 (14.38%)	33/139 (23.74%)	74/139 (53.23%)	62/139 (44.60%)	4/139 (2.87%)	6/139 (4.31%)	1/139 (0.71%)	-	-	1/139 (0.71%)
ดินตะกอน	65/144 (45.13%)	29/144 (20.13%)	19/144 (13.19%)	35/144 (24.30%)	77/144 (53.47%)	71/144 (49.30%)	4/144 (2.77%)	2/144 (1.38%)	-	1/144 (0.69%)	2/144 (1.38%)	0/144 (0%)
กุ้ง	16/23 (69.65%)	6/23 (26.08%)	3/23 (13.04%)	6/23 (26.08%)	11/23 (47.82%)	10/23 (43.47%)	-	-	-	-	-	0/23 (0%)

จำนวนแบคทีเรียในกุ้ง อยู่ระหว่าง $10-2.3 \times 10^5/g$

จำนวนแบคทีเรียในน้ำ อยู่ระหว่าง $0-8.9 \times 10^4/ml$
ซึ่งยังอยู่ในมาตรฐาน ส่วน coliform มีค่า $2.4 \times 10^4 MPN/100 ml$

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนแบคทีเรียในน้ำทะเลในบริเวณที่ศึกษาพบว่าอยู่ในสภาพปกติ ดังนั้นสภาพน้ำจึงอยู่ในเกณฑ์สะอาด ส่วนปริมาณของแบคทีเรียในดินและกุ้งก็อยู่ในระดับปกติ แต่ปริมาณแบคทีเรียที่พบสูงในอาหารทะเลที่จำหน่ายตามท้องตลาดส่วนใหญ่จะเกิดจากการปนเปื้อนเนื่องจากการขนถ่ายและการใช้น้ำในแม่น้ำหรือท่าเรือซึ่งสกปรกชะล้าง ส่วนชนิดของแบคทีเรียที่พบในกุ้งแม้ส่วนใหญ่จะเป็นชนิดก่อโรค แต่ก็อยู่ในปริมาณที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภคและจะมีความปลอดภัยยิ่งขึ้นหากปรุงให้สุกก่อนบริโภค

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ข้อมูลทั้งหมดนี้จะได้บ่งชี้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งนี้เป็นสาเหตุโดยตรงในการทำให้กุ้งตาย หรือโตช้า หรือทำให้เกิดโรคในผู้บริโภค แต่เมื่อประกอบกับข้อมูลอื่น ๆ ที่เกี่ยวกับคุณภาพของน้ำทะเลหรือน้ำกร่อยในนาุ้ง เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณของโลหะหนักและยาฆ่าแมลง เป็นต้น ก็จะมีประโยชน์ในการชี้ถึงคุณภาพน้ำและคุณภาพทรัพยากรมีชีวิตในน่านน้ำไทยได้ นอกจากนี้ยังอาจใช้เป็นข้อมูลสำหรับการปรับปรุงการเลี้ยงกุ้งทะเลหรือช่วยแก้ปัญหาเมื่อมีการตายของกุ้งเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้

ช่วยวินิจฉัยชนิดของเชื้อ *Vibrio* บางสายพันธุ์ รวมทั้ง serotypes ของเชื้อ *Salmonella*

เอกสารอ้างอิง

- Farmer III, J.J., F.W. Hickman-Brenner and M.T. Kelly. 1984. *Vibrio*, pp. 282 – 301. In E.H. Lennette (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*. 4 th ed., American society for Microbiology, Washington D.C.
- Finegold, S.M. and W.J. Martin. 1982. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 6 th ed., The C.V. Mosby Company, St. Louis. 705 p.
- Johnson, S.K. 1978. *Handbook of Shrimp Diseases*. Texas A & M University, Texas. 23 p.
- Lennette E.H., A. Balows, W.J. Haurler, Jr. and J.P. Truant. 1980. *Manual of Clinical Microbiology*. 3 rd ed., American society for Microbiology. Washington D.C. 1044 p.
- Ohashi M., H. Murakami, Y. Kudoh and S. Sakai. 1978. *Manual for the laboratory diagnosis of bacterial food poisoning and the assessment of the sanitary quality of food*. SEAMIC, Tokyo. 123 p.
- Sindermann, C.J. 1977. *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.