บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นยาฟูราโซลิโดน (furazolidone, Fz) ในระดับต่าง ๆ

จากการแยกแบคทีเรียจำนวน 114 isolates จากดินและน้ำในแหล่งธรรมชาติ 9 แห่ง และห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา พบว่ามีแบคทีเรีย 38 isolates ที่สามารถทนต่อฟูราโซลิโดนได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 10 10 และ 18 isolates สามารถทนสารฟูราโซลิ-โดนที่ระดับ 0.1-1 1-10 และมากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คัดเลือกแบคทีเรียที่ทนต่อฟูราโซลิโดนในระดับ 0.1 – 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจริญเติบโตเร็ว และมีแนวโน้มที่จะนำไปทำในขั้นตอนต่อไปได้สะดวก ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียลำดับที่ 9 ในตารางที่ 4.1 ให้ชื่อว่าแบคทีเรีย CK เพื่อมาทำการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกต่อยาชนิดต่าง ๆ ดังนี้ ampicillin (10μg) chloramphenicol (30 μg) tetracycline (30 μg) และ สารปฏิชีวนะอื่นที่ใช้ในการรักษาสัตว์ ได้แก่ nitrofurantoin (300μg) clindamycin (2μg) cephalothin (30 μg) ciprofloxacin (5 μg) norfloxacin (10 μg) sulfamethoxazole รวมกับ trimethoprim (25μg) penicillin G (10 unit) oxacillin (1 μg) piperacillin รวมกับ tazobactan (10μg) novobiocin (5μg) vancomycin (30 μg) gentamicin (10 μg) streptomycin (10 μg) erythromycin (15 μg) bacitracin (0.05 unit) และ amikacin (30μg) โดยวิธี disc diffusion ให้ผลดังตารางที่ 4.2 พบว่าแบคทีเรีย CK มีความไวต่อสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ ยกเว้น Clindamycin Cephalothin Penicillin G Oxacillin Novobiocin Vancomycin Erythromycin และ Bacitracin ทั้งนี้เนื่องมาจากสารปฏิชีวนะเหล่านี้ออกฤทธิ์กับแบคทีเรียแกรมบวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นยาฟูราโซลิโดน (ฟูราโซลิโดน, Fz) ในระดับต่าง ๆ

ลำดับที่	แหล่งที่มา	ลักษณะโคโลนี / ชื่อแบคทีเรีย	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ความเข้มข้นของฟูราโซลิโดน (µg/ml)			ระดับความทนฟูราโซลิโดน (µg/ml)
			10	1	0.1	
1	ดินก้นบ่อกุ้ง (นครปฐม)	ขนาดกลาง/สีขาว/ขอบเรียบ	0	0	0.112	0.1 - 1.0
2	ดินรอบบ่อกุ้ง (นครปฐม)	ขนาดเล็ก/สีขาวอมเหลือง/ขอบหยัก	0	0	0.298	0.1 - 1.0
3	ดินจากสนาม (เชียงใหม่)	ขนาดกลาง/สีขาว/ขอบเรียบ	0	0	0.132	0.1 - 1.0
4	ดินรอบบ่อกุ้ง (นครปฐม)	ขนาดเล็ก/สีขาวอมเหลือง/ขอบเรียบ	0	0	0.369	0.1 - 1.0
5	ภาควุลชีววิทยา	*Bacillus subtilis*	0	0	0.123	0.1 - 1.0
6	ภาควุลชีววิทยา	*Bacillus megaterium*	0	0	0.126	0.1 - 1.0
7	ภาควุลชีววิทยา	*Micrococcus luteus*	0	0	0.043	0.1 - 1.0
8	ภาควุลชีววิทยา	*Escherichia coli JM109 + pUC12*	0	0	0.235	0.1 - 1.0
9	ภาควุลชีววิทยา	*Escherichia coli DH5α λpir*	0	0	0.134	0.1 - 1.0
10	ภาควุลชีววิทยา	*Escherichia coli DH5α* ที่มียีน Km^r	0	0	0.155	0.1 - 1.0
11	ดินจากภูเขา (สระบุรี)	ขนาดกลาง/ขาวอมเหลือง/ขอบหยัก	0	0.163	0.342	1.0 - 10.0

ตารางที่ 4.1 แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นยาฟูราโซลิโดน (ฟูราโซลิโดน, Fz) ในระดับต่าง ๆ (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งที่มา	ลักษณะโคโลนี / ชื่อเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm			ระดับความทนฟูราโซลิโดน (µg/mล)
			ความเข้มข้นของฟูราโซลิโดน (µg/ml)			
			10	1	0.1	
12	ดินจากภูเขา (สระบุรี)	ขนาดใหญ่/ขาวอมเหลือง/ของหยักโค้ง	0	0.039	0.110	1.0 - 10.0
13	ดินจากภูเขา (สระบุรี)	ขนาดกลาง/ขาวอมเหลือง/ของเรียบ	0	0.177	0.281	1.0 - 10.0
14	ดินจากภูเขา (สระบุรี)	ขนาดใหญ่/ขาว/ขอบหยัก	0	0.126	0.151	1.0 - 10.0
15	ภาควุลชีววิทยา	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	0	0.545	0.736	1.0 - 10.0
16	ภาควุลชีววิทยา	*Bacillus cureus*	0	0.223	0.324	1.0 - 10.0
17	ภาควุลชีววิทยา	*Escherichia coli* (Lab Medical bacteriology)	0	0.524	0.768	1.0 - 10.0
18	ภาควุลชีววิทยา	*Escherichia coli* (Lab General bacteriology)	0	1.052	1.335	1.0 - 10.0
19	ภาควุลชีววิทยา	*Escherichia coli* JM109 + pUC18	0	0.754	0.946	1.0 - 10.0
20	ภาควุลชีววิทยา	*Escherichia coli* ATCC 25922	0	0.961	1.237	1.0 - 10.0
21	น้ำจากลำธาร (เชียงใหม่)	ขนาดกลาง/สีขาวอมเหลือง/ขอบไม่เรียบ	0.621	0.828	0.954	≥ 10.0
22	ดินจากชายหาด (ชลบุรี)	ขนาดใหญ่เยิ้มแผ่/สีขาว/ขอบไม่เรียบ	0.967	0.896	0.720	≥ 10.0

ตารางที่ 4.1 แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นยาฟูราโซลิโดน (ฟูราโซลิโดน, Fz) ในระดับต่าง ๆ (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งที่มา	ลักษณะโคโลนี / ชื่อเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ความเข้มข้นของฟูราโซลิโดน (µg/m)			ระดับความทนฟูราโซลิโดน (µg/m)
			10	1	0.1	
23	ดินจากภูเขา (สระบุรี)	ขนาดกลาง/ขาว/ขอบเรียบ	0.954	0.825	0.697	≥ 10.0
24	ดินจากชายหาด (ชลบุรี)	ขนาดใหญ่เยิ้มแผ่/สีขาว/ขอบเรียบ	0.693	0.548	0.402	≥ 10.0
25	น้ำจากบ่อกุ้ง (ชลบุรี)	ขนาดใหญ่/สีขาว/ขอบเรียบ	0.768	0.598	0.426	≥ 10.0
26	น้ำจากบ่อกุ้ง (ชลบุรี)	ขนาดกลางใหญ่/สีขาว/ขอบเรียบ	1.025	0.958	0.799	≥ 10.0
27	น้ำจากบ่อกุ้ง (ชลบุรี)	ขนาดใหญ่/สีขาว/ขอบไม่เรียบ	1.335	0.961	0.781	≥ 10.0
28	น้ำจากลำธาร (เชียงใหม่)	ขนาดกลาง/สีขาวอมเหลือง/ขอบเรียบ	0.621	0.728	0.854	≥ 10.0
29	น้ำจากบ่อกุ้ง (ชลบุรี)	ขนาดใหญ่/สีส้มอ่อน/ขอบเรียบ	0.402	0.449	0.501	≥ 10.0
30	ดินจากใต้ต้นไผ่ (เชียงใหม่)	ขนาดกลางใหญ่/สีขาว/ขอบไม่เรียบ	0.611	0.754	0.889	≥ 10.0
31	ดินจากชายหาด (ชลบุรี)	ขนาดกลาง/ใส/ขอบเรียบ	0.667	0.746	0.844	≥ 10.0
32	ดินจากสนาม (เชียงใหม่)	ขนาดใหญ่/สีส้มอ่อน/ขอบเรียบ	0.109	0.122	0.134	≥ 10.0
33	ดินจากใต้ต้นไผ่ (เชียงใหม่)	ขนาดใหญ่/สีเหลืองใส/ขอบเรียบ	0.288	0.341	0.401	≥ 10.0

ตารางที่ 4.1 แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นยาฟูราโซลิโดน (ฟูราโซลิโดน, Fz) ในระดับต่าง ๆ (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งที่มา	ลักษณะโคโลนี / ชื่อเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ความเข้มข้นของฟูราโซลิโดน (µg/ml)			ระดับความทนฟูราโซลิโดน (µg/ml)
			10	1	0.1	
34	ภาควุลชีววิทยา	*Klebsiella pneumonae*	0.502	1.108	1.405	≥ 10.0
35	ภาควุลชีววิทยา	*Pseudomonas aeruginosa*	0.654	0.721	0.895	≥ 10.0
36	ภาควุลชีววิทยา	*Seratia marcescen*	0.348	0.761	0.925	≥ 10.0
37	ภาควุลชีววิทยา	*Klebsiella* sp.	1.033	1.373	1.496	≥ 10.0
38	ภาควุลชีววิทยา	*Proteus mirabilis*	0.607	0.753	1.098	≥ 10.0

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบความไวของแบคทีเรีย CK ได้ต่อสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการรักษาสัตว์ โดยวิธี disc diffusion

ชื่อสารปฏิชีวนะ	ชื่อย่อและความเข้มข้น (µg)	ผลการทดสอบ
Ampicillin	Am10	S
Chloramphenicol	C30	S
Tetracycline	Te30	S
Nitrofurantoin	N300	S
Clindamycin	CC2	R
Cephalothin	KF30	R
Ciprofloxacin	CIP5	S
Norfloxacin	NOR10	S
Sulfamethoxazole & Trimethoprim	SXT25	S
Penicillin G	P10	R
Oxacillin	OX1	R
Piperacillin & Tazobactan	TZP10	S
Novobiocin	NV5	R
Vancomycin	VA30	R
Gentamicin	CN10	S
Streptomycin	S10	S
Erythromycin	E15	R
Bacitracin	B0.05	R
Amikacin	AK30	S

S = Susceptible (มีความไวต่อสารปฏิชีวนะ)

I = Intermediate

R = Resistance (ทนต่อสารปฏิชีวนะ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

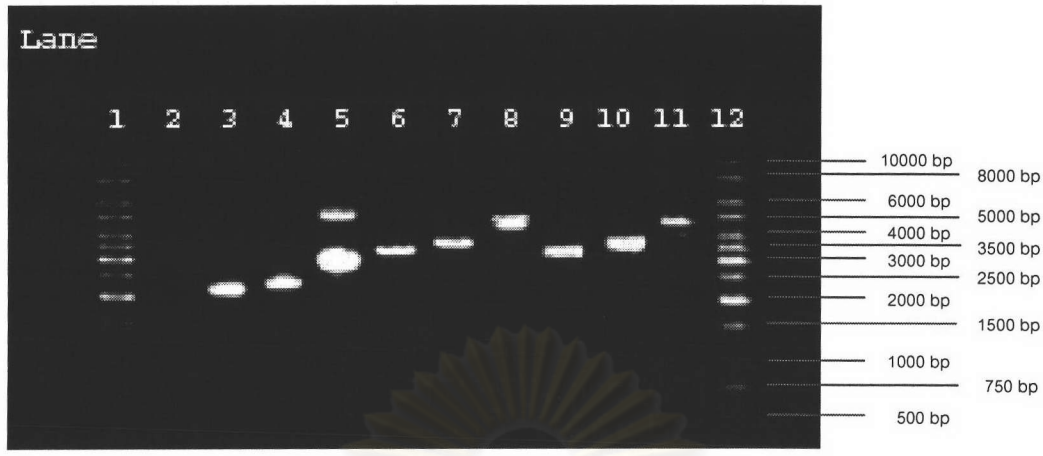
4.2 ผลการเพิ่มความสามารถในการต้านสารปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน หรือ เตตร้าไซคลิน หรือ คลอแรมฟินิคอล ในแบคทีเรียที่คัดกรองได้

เนื่องจากการใช้สารปฏิชีวนะของเกษตรกรมักเป็นการใช้ยาร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิด การใช้แบคทีเรียที่ต้านยาเพียงชนิดเดียวอาจทำให้การแปลผลผิดพลาดได้ การทดลองนี้จึงพยายามเพิ่มความสามารถในการต้านยาให้แบคทีเรียโดยเลือกยาที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย ได้แก่ แอมพิซิลิน เตตร้าไซคลิน และคลอแรมฟินิคอล

ทำการเพิ่มความสามารถของแบคทีเรีย CK ในการต้านสารปฏิชีวนะที่เลือกไว้ โดยการส่งผ่านพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังต่อไปนี้

- .ส่งผ่านพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) เข้าสู่แบคทีเรีย CK จะได้แบคทีเรีย CK-pGEM ที่มีความสามารถต้านยาแอมพิซิลิน และฟูราโซลิโดน
- ส่งผ่านพลาสมิด pBR322 เข้าสู่แบคทีเรีย CK จะได้แบคทีเรีย CK-pBR322 ที่มีความสามารถต้านยาแอมพิซิลิน เตตร้าไซคลิน และฟูราโซลิโดน
- ส่งผ่านพลาสมิด pBluescrip SK (+/-) เข้าสู่แบคทีเรีย CK จะได้แบคทีเรีย CK-pBC ที่มีความสามารถต้านยาคลอแรมฟินิคอล และฟูราโซลิโดน

หลังจากนั้นตรวจสอบผลการส่งผ่านพลาสมิดโดยวิธีเจลอิเลกโตรโฟริซิสของแบคทีเรีย CK-pGEM แบคทีเรีย CK-pBR322 และแบคทีเรีย CK-pBC โดยสกัดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ให้ผลดังรูปที่ 4.1 ในเลนที่ 6 และ 9 เป็นพลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) ที่สกัดจาก *E.coli* DH5α และแบคทีเรีย CK- pGEM ตามลำดับ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ได้เกิดแถบขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันคือ 3199 bp ในเลนที่ 7 และ 10 เป็นพลาสมิด pBluescrip SK (+/-) ที่สกัดจาก *E.coli* DH5α และแบคทีเรีย CK-pBC ตามลำดับ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ได้เกิดแถบขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันคือ 3400 bp ในเลนที่ 8 และ 11 เป็นพลาสมิด pBR322 ที่ได้จากบริษัท Promega และแบคทีเรีย CK-pBR322 ตามลำดับ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ได้เกิดแถบขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันคือ 4361 bp ดังนั้นในขั้นตอนนี้สรุปได้ว่า ได้แบคทีเรีย CK แบคทีเรีย CK-pGEM แบคทีเรีย CK-pBR322 และ แบคทีเรีย CK-pBC ที่มีความสามารถในการทน Fz, Fz+Amp, Fz+Tet+Amp และ Fz+Cm เพื่อที่จะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป



lane 1 1 Kb marker

lane 2 plasmid ดั้งเดิมของ bacteria ที่ screen (แบคทีเรีย CK) ได้

lane 3 plasmid pGEM-3Zf (+/-) จาก *E.coli* DH5α

lane 4 plasmid pBluescrip-SK (+/-) จาก *E.coli* DH5α

lane 5 plasmid pBR322

lane 6 plasmid pGEM-3Zf (+/-) จาก *E.coli* DH5α ตัดด้วย *Eco*RI

lane 7 plasmid pBluescrip-SK (+/-) จาก *E.coli* DH5α ตัดด้วย *Eco*RI

lane 8 plasmid pBR322 ตัดด้วย *Eco*RI

lane 9 plasmid pGEM-3Zf (+/-) จาก แบคทีเรีย CK-pGEM ตัดด้วย *Eco*RI

lane 10 plasmid pBluescrip-SK (+/-) จาก แบคทีเรีย CK-pBC ตัดด้วย *Eco*RI

lane 11 plasmid pBR322 จาก แบคทีเรีย pBR322 ตัดด้วย *Eco*RI

lane 12 1 Kb marker

หมายเหตุ : plasmid pGEM-3Zf (+/-) มีขนาด 3199 bp

plasmid pBluescrip-SK (+/-) มีขนาด 3400 pb

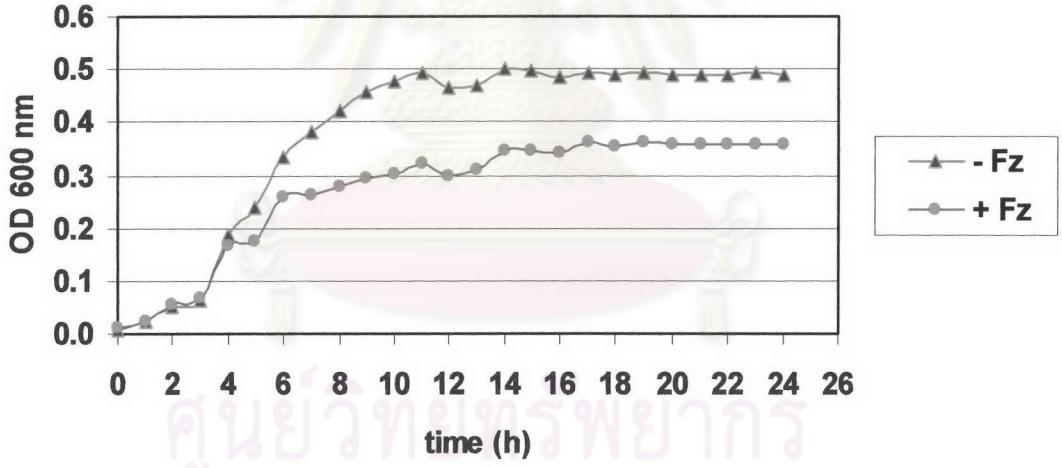
plasmid pBR322 มีขนาด 4361 pb

รูปที่ 4.1 แสดงการยืนยันผลการส่งผ่านพลาสมิดโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การเจริญของแบคทีเรีย CK ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมฟูราโซลิโดน

เนื่องจากฟูราโซลิโดนสลายตัวเร็ว (McCraken และคณะ, 1997) ดังนั้นการตรวจหาจึงต้องเลือกใช้ความเข้มข้นต่ำคือ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามที่ใส่ในการคัดแยกแบคทีเรียตั้งแต่ต้น เพื่อใช้หาเวลาเหมาะสมที่จะใช้ในการบ่มเพื่ออ่านผลจึงทดลองจึงนำแบคทีเรีย CK มาหาอัตราการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB ที่มีและไม่มีฟูราโซลิโดนที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าฟูราโซลิโดนความเข้มข้นต่ำขนาด 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เชื้อเจริญได้น้อยลงแต่ยังเจริญได้ และมีรูปแบบการเจริญเหมือนกันใน 4 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการเจริญของแบคทีเรีย CK ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่ผสมฟูราโซลิโดนจึงลดลง อย่างไรก็ตามการเจริญในอาหารทั้งสองชนิดเข้าสู่ stationary phase พร้อมกันที่ 10 ชั่วโมง ในอาหารที่มีฟูราโซลิโดนยังมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึง 24 ชั่วโมง แสดงว่าฟูราโซลิโดนมีปริมาณน้อยเกินกว่าจะยับยั้งแบคทีเรีย CK ได้ทั้งหมด และที่เวลา 10 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแบคทีเรียเพื่ออ่านผลการเจริญได้และไม่แตกต่างกับที่ 24 ชั่งโมง

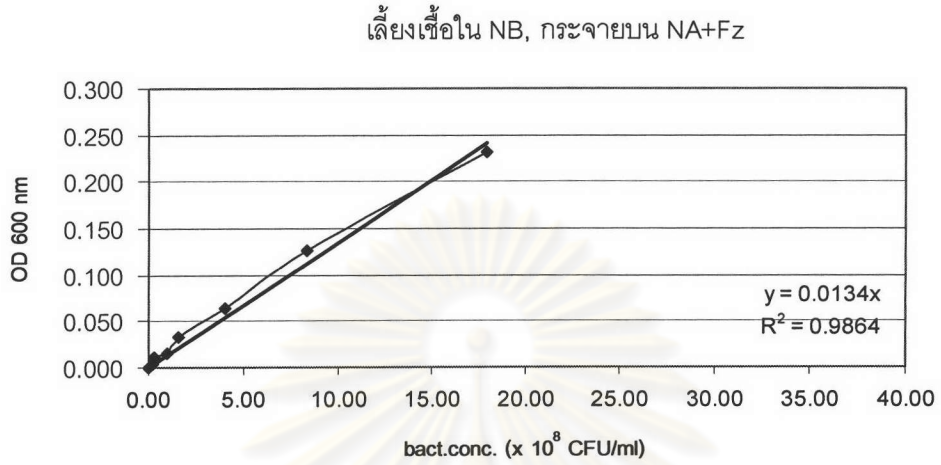


รูปที่ 4.2 แสดงกราฟการเจริญของ แบคทีเรีย CK

4.4 ผลความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

นำแบคทีเรีย CK ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB มาเจือจาง วัดค่าการดูดกลืนแสง และกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ที่มีฟูราโซลิโดน นับจำนวนโคโลนีแล้วนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียและค่าการดูดกลืนแสงที่ได้

จะให้สมการเส้นตรง y = 0.0134x ความสัมพันธ์นี้จะนำไปใช้ในการเตรียมเชื้อแบคทีเรียจำนวนที่ต้องการต่อไป



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

4.5 ผลการหาจุดสมมูลระหว่างปริมาณแบคทีเรียกับฟูราโซลิโดนความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำแบคทีเรีย CK แบคทีเรีย CK-pGEM แบคทีเรีย CK-pBC และแบคทีเรีย CK-pBR322 มาทดสอบกับฟูราโซลิโดนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ TTC เป็น indicator เพื่อหาจุดสมมูลคือปริมาณแบคทีเรียที่จะถูกยับยั้งการเจริญอย่างสมบูรณ์ด้วยฟูราโซลิโดนความเข้มข้นดังกล่าว โดยการวัดการเกิด formazan จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Bochner และ Savageau, 1976) รวมทั้งสังเกตการเกิดสีแดงของ formazan ในหลอดทดลอง ในการทดลองนี้มีชุดควบคุมผลบวกเป็นแบคทีเรีย CK จำนวน 10^1 10^2 10^3...10^9 CFU/มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB 4.5 CFU/มิลลิลิตร ใส่ TTC 0.5 มิลลิลิตร ผลแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งพบว่าเมื่อบ่มครบเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรีย 10^5 CFU/มิลลิลิตร ขึ้นไปจะให้ OD_{600} เพิ่มตามปริมาณ CFU อย่างชัดเจน สรุปได้ว่าจุดสมมูลที่แบคทีเรียจะถูกฟูราโซลิโดน 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งทั้งหมดคือ 10^4 CFU/มิลลิลิตร แต่เนื่องจากเริ่มเห็นตะกอนสีแดงของ formazan ได้ที่ 10^7 CFU/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.4) จึงเลือกความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรีย 10^6 CFU/มิลลิลิตร เป็นตัวทดสอบต่อไปทั้งนี้เพื่อจะได้อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า

ตารางที่ 4.3 จุดสมมูลระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

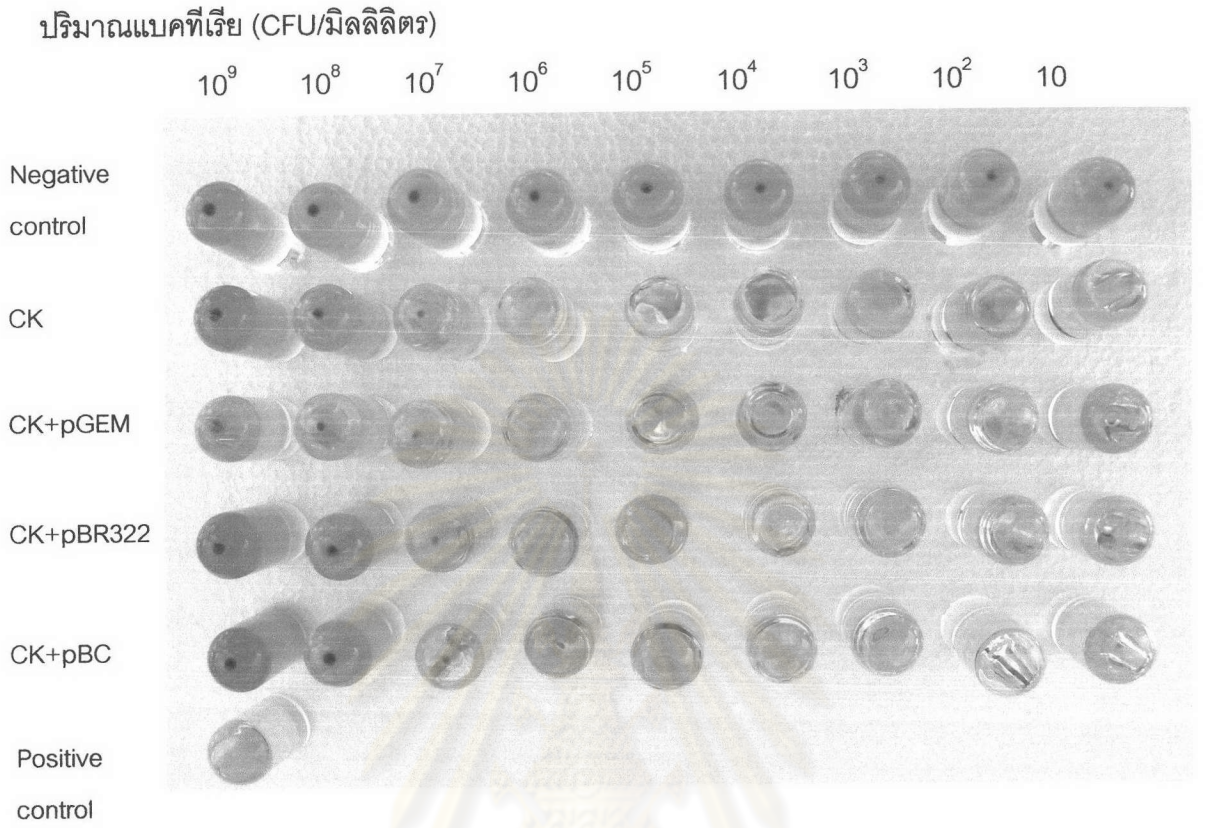
จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)	ก่อนบ่ม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรหลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง				
		pos ctrl	แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ			
			CK	CK-pGEM	CK-pBR322	CK-pBC
10^1	0.000	0.324	0.000	0.000	0.000	0.000
10^2	0.000	0.326	0.000	0.000	0.000	0.000
10^3	0.000	0.356	0.000	0.000	0.000	0.000
10^4	0.001	0.358	0.000	0.000	0.000	0.000
10^5	0.001	0.384	0.001	0.001	0.005	0.002
10^6	0.002	0.422	0.009	0.010	0.017	0.010
10^7	0.004	0.477	0.119	0.031	0.057	0.092
10^8	0.018	0.502	0.354	0.114	0.353	0.253
10^9	0.154	0.834	0.796	0.363	0.681	0.427

หมายเหตุ: blank = อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB+Fz 4.5 มิลลิลิตร + TTC 0.5 มิลลิลิตร

pos ctrl = positive control (ไม่มี Fz)

จากตารางที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรียที่ต้านสารปฏิชีวนะอื่น เจริญได้น้อยกว่าแบคทีเรีย CK ตั้งแต่ความเข้มข้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร ขึ้นไป โดยแบคทีเรีย CK > CK-pBC > CK-pBR322 > CK-pGEM ตามลำดับ ส่วนที่ 10^8 10^9 CFU/มิลลิลิตร นั้นผลไม่ชัดเจน เนื่องจากความขุ่นของเซลล์สูงเกินไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 แสดงการเกิด formazan เนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้และจุดสมมูลที่แบคทีเรียไม่สามารถขึ้นได้เมื่อมีฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.6 ผลการประเมินการเจริญของแบคทีเรียในสารมาตรฐานฟูราโซลิโดน แอมพิซิลิน เตตร้าไซคลิน และคลอแรมฟินิคอล

เนื่องจากสารปฏิชีวนะอื่นมีผลเสริมกันกับฟูราโซลิโดน ดังนั้นอาจลดความเข้มข้นของฟูราโซลิโดนได้อีก ซึ่งยิ่งเป็นผลดีเพราะทำให้สามารถวัดฟูราโซลิโดนได้ในระดับต่ำลง จึงทดลองลดความเข้มข้นของฟูราโซลิโดนโดยดูผลร่วมกับสารปฏิชีวนะที่เลือกไว้ (ตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.6) พบว่าเห็นผลจากสารปฏิชีวนะชัดเจน กล่าวคือแบคทีเรียที่มีพลาสมิดดื้อยาขึ้นได้แต่หากไม่มีพลาสมิดก็ไม่ขึ้น แต่แบคทีเรีย CK ยังคงเจริญขึ้นได้ที่ฟูราโซลิโดน 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจหาฟูราโซลิโดนด้วยแบคทีเรีย CK จึงยังคงเป็น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับสารปฏิชีวนะต่าง ๆ

ยาที่ใช้ในการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ			
	CK	CK + pGEM	CK + pBR322	CK + pBC
ไม่มียา	0.374	0.310	0.372	0.365
Amp	0	0.281	0.352	0
Cm	0	0	0	0.273
Tet	0	0	0.304	0
Amp+Cm	0	0	0	0
Amp+Tet	0	0	0.322	0
Cm+Tet	0	0	0	0
Amp+Cm+Tet	0	0	0	0

ตารางที่ 4.5 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะต่าง ๆ

ยาที่ใช้ในการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ			
	CK	CK + pGEM	CK + pBR322	CK + pBC
Fz 0.05 ppm	0.121	0.083	0.112	0.123
Fz+Amp	0	0.080	0.107	0
Fz+Cm	0	0	0	0.103
Fz+Tet	0	0	0.092	0
Fz+Amp+Cm	0	0	0	0
Fz+Amp+Tet	0	0	0.080	0
Fz+Cm+Tet	0	0	0	0
Fz+Amp+Cm+Tet	0	0	0	0

ตารางที่ 4.6 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะต่าง ๆ

ยาที่ใช้ในการทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ			
	CK	CK + pGEM	CK + pBR322	CK + pBC
Fz 0.1 ppm	0	0	0	0
Fz+Amp	0	0	0	0
Fz+Cm	0	0	0	0
Fz+Tet	0	0	0	0
Fz+Amp+Cm	0	0	0	0
Fz+Amp+Tet	0	0	0	0
Fz+Cm+Tet	0	0	0	0
Fz+Amp+Cm+Tet	0	0	0	0

หมายเหตุ Amp = Ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ppm

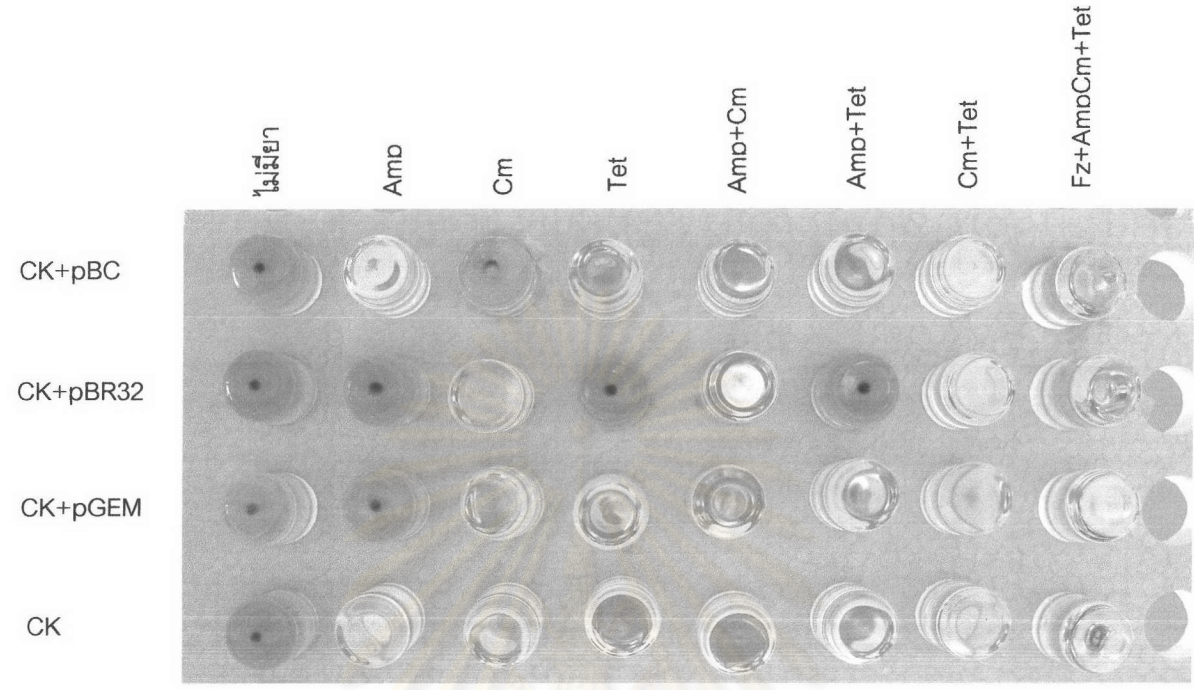
Cm = Chloramphenicol ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ppm

Tet = Tetracycline ความเข้มข้นสุดท้าย 30 ppm

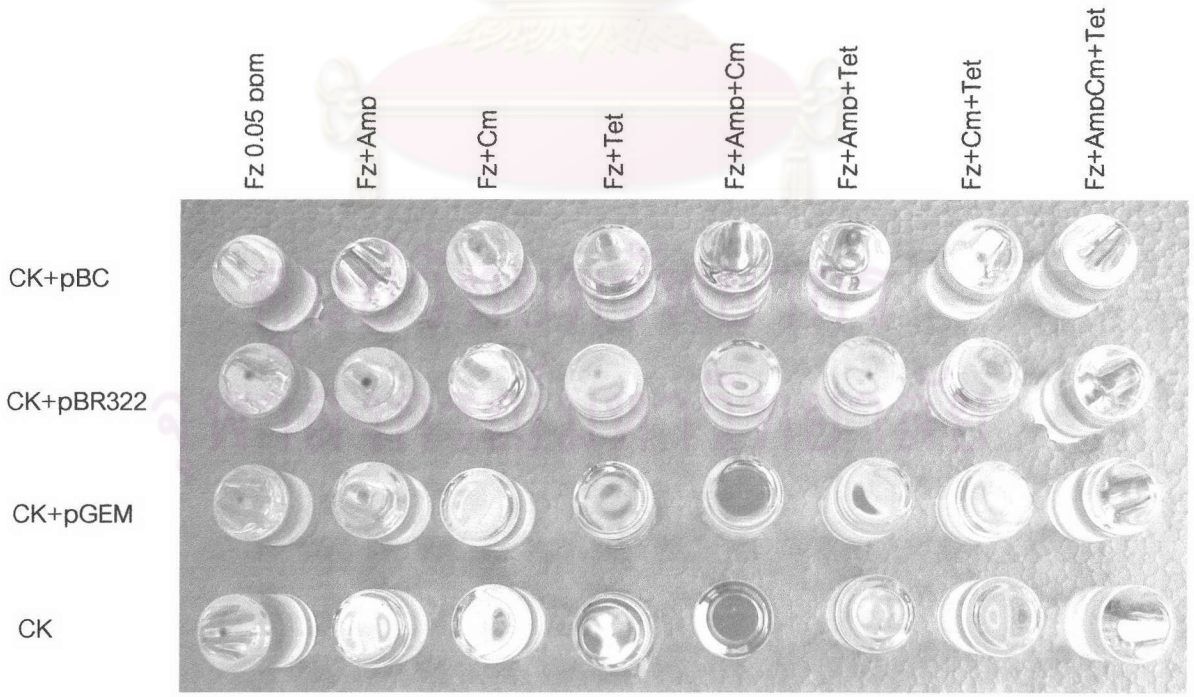
Positive control = แบคทีเรีย 10^6 CFU/มิลลิลิตร + Fz 0.1 ppm (0.6 มิลลิลิตร)

Negative control = แบคทีเรีย 10^6 CFU/มิลลิลิตร + sterile DW (0.6 มิลลิลิตร)

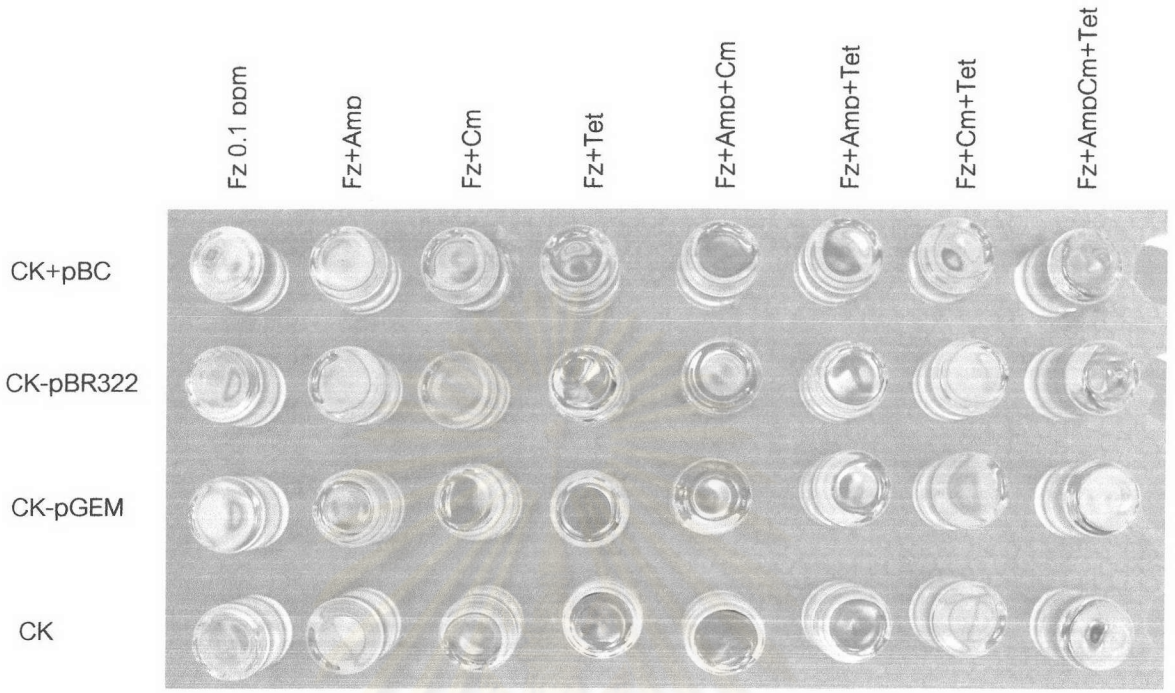
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 แสดงเม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ทดสอบกับสารปฏิชีวนะต่างๆ



รูปที่ 4.6 แสดงเม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการเจริญของแบคทีเรียกับฟูราโซลิโดน ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะต่าง ๆ



รูปที่ 4.7 แสดงเม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการเจริญของแบคทีเรียกับฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะต่างๆ

จากตารางที่ 4.5 จะเห็นว่าการใช้แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ พร้อมกันจะช่วยบอกว่ามีสารปฏิชีวนะอื่นปนอยู่ด้วยหรือไม่

ฟูราโซลิโดนที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (เทียบกับตัวควบคุม) เมื่อมียาอื่นเพิ่มขึ้นมาจะมีผลยับยั้งเสริมกัน หากว่าฟูราโซลิโดนที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียทดสอบไม่สามารถเจริญได้เลยดังนั้นจึงเลือกใช้ฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นขีดจำกัดของแบคทีเรียทดสอบนี้ การที่ใช้ฟูราโซลิโดนร่วมกับสารปฏิชีวนะตัวอื่น ๆ และในขณะเดียวกันยังสามารถบอกได้ว่ามีสารปฏิชีวนะอื่น ๆ ในอาหารสัตว์หรือไม่พร้อมกันไปด้วย

4.7 ผลการตรวจหาฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์

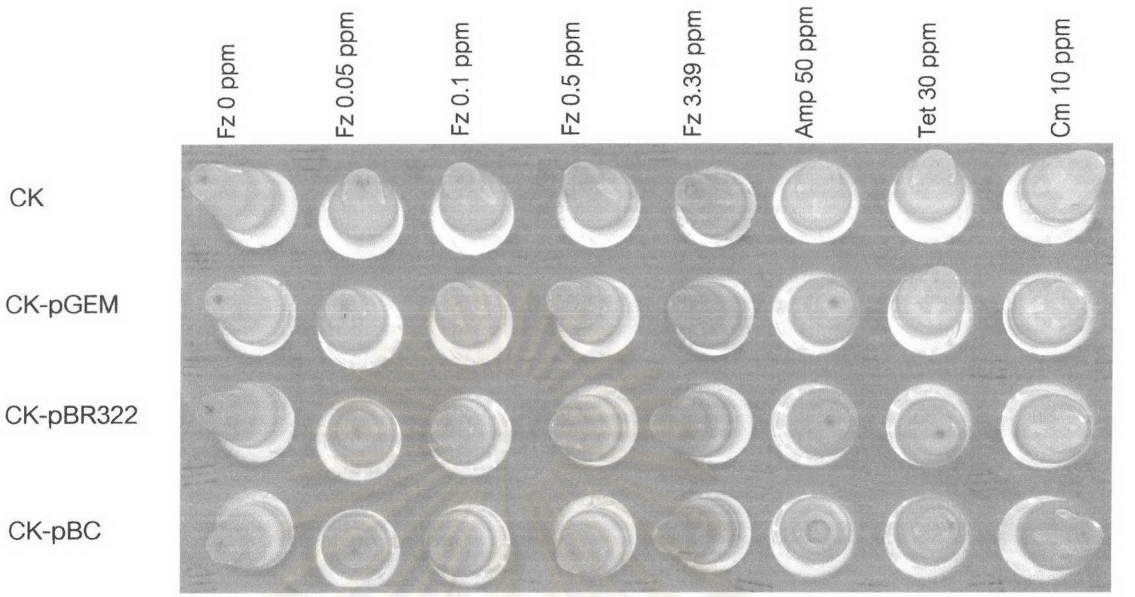
การตรวจสอบหาฟูราโซลิโดนที่ใช้จริงในอาหารสัตว์นั้นทำได้ยาก เนื่องจากปัจจัย 2 ประการ คือ การสลายตัวหรือการเปลี่ยนรูป และการถูกดูดซับอยู่ในอาหารสัตว์ การทดลองนี้จึง

ต้องการตรวจสอบว่าฟูราโซลิโดนจะถูกลดประสิทธิภาพในการฆ่าแบคทีเรียกลุ่ม CK หลังจากการผสมกับอาหารสัตว์หรือไม่

เตรียมฟูราโซลิโดนมาตรฐาน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำฟูราโซลิโดนที่เตรียมได้ใส่ลงในอาหารไก่และกุ้ง แล้วส่งวิเคราะห์ที่กรมปศุสัตว์ พบว่าในเวลา 14 วัน หลังจากที่เตรียม กรมปศุสัตว์ตรวจพบฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 24.35 3.39 และ 3.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าอาหารไก่และกุ้งจะดูดซับฟูราโซลิโดนไปร้อยละ 86.08 และ 87.49 หรือคิดเป็นความเข้มข้นที่เหลือร้อยละ 13.92 และ 12.57 พบว่าเมื่อใส่ฟูราโซลิโดนลงในอาหารไก่และกุ้งความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วสกัดออกมาทันทีและทำการเจือจางและทดสอบกับแบคทีเรีย และผลพบว่าได้รูปแบบตรงกับการทดสอบฟูราโซลิโดนที่ยังไม่ผสมกับอาหารสัตว์ คือแบคทีเรียทนฟูราโซลิโดนได้ถึง 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และ 4.8 รูปที่ 4.8 และ 4.9 สรุปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่ม CK สามารถใช้ทดสอบฟูราโซลิโดนในอาหารไก่และกุ้งได้ถึงระดับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในภาวะที่กล่าวมาแล้ว

ตารางที่ 4.7 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับฟูราโซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับด้วยอาหารไก่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

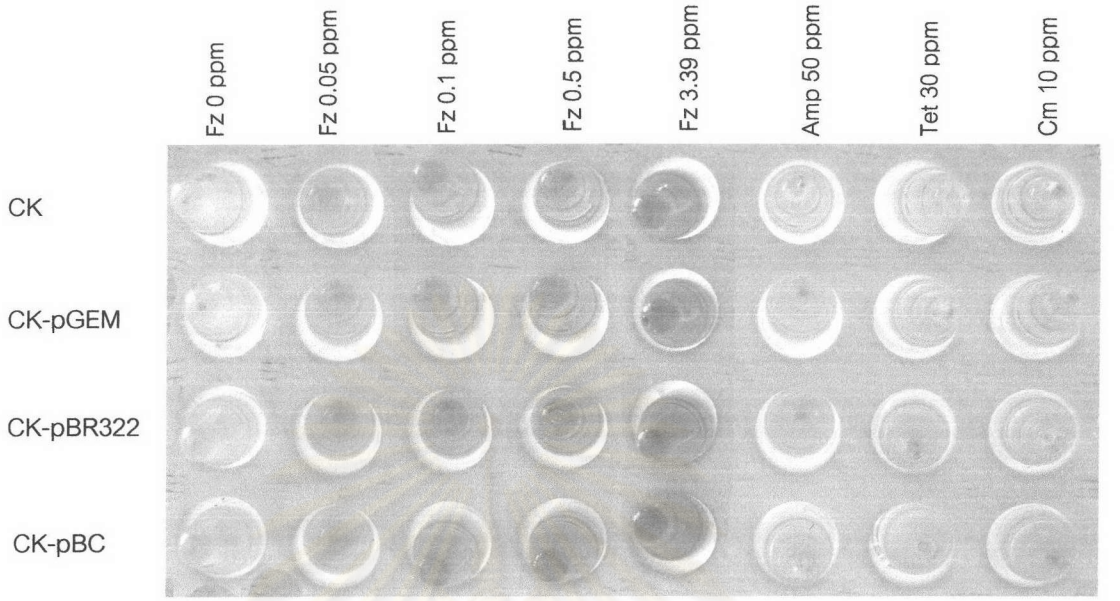
สารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ณ ความเข้มข้นสุดท้าย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร			
	แบคทีเรียทดสอบ			
	CK	CK-pGEM	CK-pBR322	CK-pBC
Fz 0 (ควบคุมผลลบ)	0.231	0.168	0.230	0.197
Fz 0.05	0.077	0.078	0.110	0.109
FZ 0.1	0	0	0	0
Fz 0.5	0	0	0	0
Fz 3.39	0	0	0	0
Amp 50	0	0.156	0.210	0
Tet 30	0	0	0.162	0
Cm 10	0	0	0	0.187



รูปที่ 4.8 แสดงเม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการเจริญของแบคทีเรียกับฟูราโซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับด้วยอาหารไก่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 4.8 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับฟูราโซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับด้วยอาหารกุ้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

สารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ณ ความเข้มข้นสุดท้าย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร			
	แบคทีเรียทดสอบ			
	CK	CK-pGEM	CK-pBR322	CK-pBC
Fz 0 (ควบคุมผลลบ)	0.215	0.159	0.201	0.192
Fz 0.05	0.078	0.075	0.074	0.069
FZ 0.1	0	0	0	0
Fz 0.5	0	0	0	0
Fz 3.06	0	0	0	0
Amp 50	0	0.149	0.199	0
Tet 30	0	0	0.129	0
Cm 10	0	0	0	0.173



รูปที่ 4.9 แสดงเม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการเจริญของแบคทีเรียกับฟูราโซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับด้วยอาหารกุ้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

4.8 ผลการศึกษาปัจจัยแสงที่มีผลต่อการสลายตัวของฟูราโซลิโดน

เมื่อนำstock standard solution Fz ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งใส่ขวดขนาดเล็กจำนวน 5 ขวด ขวดที่ 1 นำไปตั้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อเหมือนสภาวะที่ใช้ในการทำการทดลอง ขวดที่ 2 และ 3 นำไปตั้งภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์นาน 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ขวดที่ 4 และ 5 นำไปตั้งภายใต้แสงอาทิตย์นาน 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นนำทั้ง 5 ขวด มาวิเคราะห์หาปริมาณฟูราโซลิโดนด้วย HPLC ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 ซึ่งพบว่า ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมือนกับการทำการทดลองต่าง ๆ ในตู้เขี่ยเชื้อที่ไม่เปิดไฟเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือสภาวะที่มีแสงสลัว รวมถึงสภาวะภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นเวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ปริมาณฟูราโซลิโดนจะมีการสลายตัวน้อยมาก ๆ ไม่ถึง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟูราโซนเมื่อสัมผัสแสง

สารตัวอย่าง	พื้นที่ใต้ peak (mAU*s)		ปริมาณ Fz ที่เหลือ (ppm)
	RT 1.621 ±0.065 min	RT 5.761 ±0.017 min	
Stock Fz ภายใต้ภาวะใช้งาน 1 ชั่วโมง	-	1028.01	29.94
Stock Fz ภายใต้แสงนีออน 30 นาที	-	1027.21	29.91
Stock Fz ภายใต้แสงนีออน 1 ชั่วโมง	-	1010.09	29.41
Stock Fz ภายใต้แสงอาทิตย์ 30 นาที	36.06	671.47	19.55
Stock Fz ภายใต้แสงอาทิตย์ 1 ชั่วโมง	61.52	559.93	16.30

แต่เมื่อนำฟูราโซลิโดนไปไว้ภายใต้แสงอาทิตย์นาน 30 นาที และ 1 ชั่วโมง จะทำให้ปริมาณสารลดลงถึง 10.45 และ 13.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นแสดงว่าชนิดของแสงและเวลาสัมผัสแสงมีผลต่อการสลายตัวของฟูราโซลิโดน โดยเมื่ออยู่ภายใต้แสงไฟนีออนสารจะค่อย ๆ สลายตัวลงทีละน้อย แต่เมื่ออยู่ภายใต้แสงอาทิตย์สารนี้จะสลายตัวเร็วมาก โดยค่าความเข้มข้นของฟูราโซลิโดนอ่านจากกราฟมาตรฐานฟูราโซลิโดน (ภาคผนวก ง)

ดังนั้นภาวะที่ทำการทดลองจึงไม่มีผลจากการสลายตัวของฟูราโซลิโดนมากนัก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย