

การพัฒนาชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา



นางสาวกุลกานต์ ชูชัยยะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-1857-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF THE TEST KIT FOR FURAZOLIDONE IN ANIMAL FEED BY  
MICROBIOLOGICAL METHOD



Miss Kunlakarn Chuchaiya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology  
Department of Microbiology

Faculty of Science  
Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-1857-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การพัฒนาชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา  
โดย                              นางสาวกุลกานต์ ชูชัยยะ  
สาขาวิชา                      จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม  
อาจารย์ที่ปรึกษา              ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาการแทน  
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

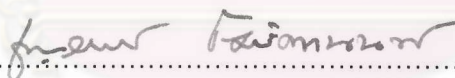
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธรพวงษ์ วิจิตรสานต์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



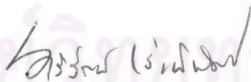
ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจีน)



อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา)

กุลกานต์ ชูชัยยะ : การพัฒนาชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา (DEVELOPMENT OF THE TEST KIT FOR FURAZOLIDONE IN ANIMAL FEED BY MICROBIOLOGICAL METHOD) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ 89 หน้า. ISBN 974-14-1857-4

จากแบคทีเรีย 114 สายพันธุ์ ที่แยกจากตัวอย่างน้ำและดิน มี 10 สายพันธุ์ที่สามารถทนฟูราโซลิโดนที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญเร็วคือ CK นำไปเพิ่มความสามารถในการทนยาแอมพิซิลิน หรือเตตราไซคลิน หรือคลอแรมฟินิคอล โดยการส่งผ่านพลาสมิดที่มียีนต้านยาดังกล่าวเพื่อใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ จุดสมมูลระหว่างจำนวนแบคทีเรีย CK ทั้งสี่ชนิด และฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ  $1 \times 10^6$  CFU/ml นำแบคทีเรียทดสอบทั้งสี่ชนิดมาทดสอบกับสารมาตรฐานฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งยาแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตตราไซคลิน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมฟินิคอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียทดสอบจะเจริญเมื่อมีความเข้มข้นฟูราโซลิโดนต่ำกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการทดลองกับอาหารสัตว์พบว่าอาหารสัตว์จะมีการดูดซับสารฟูราโซลิโดนร้อยละ 86 และนำสารฟูราโซลิโดนที่เหลือร้อยละ 14 มาทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบทั้งสี่ ซึ่งให้ผลการทดลองเหมือนกับการทดสอบกับสารมาตรฐาน ดังนั้นชุดตรวจสอบนี้มีค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์สารตกค้างฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา .....ลายมือชื่อนิสิต.....กุลกานต์ ชูชัยยะ.....  
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม .....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา 2548 .....

# # 4672526323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: NITROFURAN / FURAZOLIDONE / TTC

KUNLAKARN CHUCHAIYA : DEVELOPMENT OF THE TEST KIT FOR  
FURAZOLIDONE IN ANIMAL FEED BY MICROBIOLOGICAL METHOD. THESIS  
ADVISOR : ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., 89 pp.  
ISBN 974-14-1857-4

From one hundred and fourteen bacteria isolated from water and soil samples, ten isolates which resist up to 1 ppm of furazolidone were obtained. The fast growing bacteria, CK, was chosen to add the resistance to ampicillin or tetracycline or chloramphenicol by plasmid transformation. All four CK strains at  $1 \times 10^6$  CFU/ml were inhibited by 0.1 ppm furazolidone. Bacteria were tested with standard furazolidone at 0.05, 0.1 and 0.5 ppm, including other antibiotics, synergistic effect of furazolidone and antibiotics were found. In animal feed, furazolidone was absorbed into the feed by 86%. 14% remained furazolidone was tested and gave the same result as previously tested. The result shown that the limit of detection is 0.1 ppm in animal feed and could be applied as an effective furazolidone detection kit.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....Microbiology..... Student's signature.....*K. Chuchaiya*.....  
Field of study.....Industrial Microbiology..... Advisor's signature.....*C. Kositanont*.....  
Academic year...2005

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำและข้อคิดต่างๆในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจีน รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และรองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา ที่กรุณารับเป็นประธานและคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรู้ คำปรึกษา และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบคุณอาจารย์ประจำวิชา Medical Bacteriology และ General Bacteriology ที่กรุณาเอื้อเฟื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆน้องๆทุกคนในห้องวิจัย 453 และที่อยู่บนแผนก ที่ช่วยให้มีกำลังใจและกำลังกายในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณสิริภัทร พฤษะไพบุลย์ คุณกิตติภัทร ลัมประเสริฐ คุณไปรมา แก้วสามศรี และเพื่อนๆร่วมรุ่นที่น่ารักทุกคน รวมถึงคุณพี่ระไทย พัวพันธ์ คุณศักดิ์ดา ไยน้อย และเพื่อน ๆ มหิดลวิทยานุสรณ์ทุกคนที่คอยเอาใจช่วย และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องชาย ที่คอยสนับสนุนเอาใจช่วยและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป .....	ฎ
คำย่อ.....	ฏ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	6
2.1 สารต้านจุลชีพ.....	6
2.2 ไนโตรฟูแรน (nitrofurans).....	9
2.3 ฟูราโซลิโดน (furazolidone).....	14
2.3.1 ความรู้ทั่วไป.....	14
2.3.2 กลไกการออกฤทธิ์ของฟูราโซลิโดน.....	15
2.3.3 ความเป็นพิษของฟูราโซลิโดน.....	16
2.3.4 สถานการณ์ของฟูราโซลิโดนและแนวทางการแก้ไขของประเทศไทย	19
2.3.5 ผลกระทบของฟูราโซลิโดนต่อสิ่งมีชีวิต สิ่งแวดล้อม และเศรษฐกิจ...	27
2.3.6 วิธีการตรวจวิเคราะห์ฟูราโซลิโดน หรือสารกลุ่มไนโตรฟูแรนตัวอื่น ๆ	29
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง .....	34
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	34
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	35
3.3 พลาสมิด.....	36
3.4 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	36
3.5 แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นฟูราโซลิโดน (furazolidone, Fz) ในระดับต่าง ๆ.....	37

3.6	เพิ่มความสามารถในการต้านยาแอมพิซิลิน หรือ เตตราไซคลิน หรือ คลอแรมฟินิคอล ในแบคทีเรียที่คัดกรองได้.....	39
3.7	ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร.....	43
3.8	ผลการหาจุดสมมูลระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับฟูราไซลิโดนความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	43
3.9	การประเมินการเจริญของแบคทีเรียในสารมาตรฐานฟูราไซลิโดน แอมพิซิลิน เตตราไซคลิน คลอแรมฟินิคอล.....	44
3.10	การทดสอบการตรวจหาฟูราไซลิโดนในอาหารสัตว์.....	47
3.11	ศึกษาปัจจัยแสงที่มีผลต่อการสลายตัวของฟูราไซลิโดน.....	48
4.	ผลการทดลอง .....	49
4.1	ผลการแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นยาฟูราไซลิโดน (furazolidone, Fz) ในระดับต่าง ๆ.....	49
4.2	ผลการเพิ่มความสามารถในการต้านสารปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน หรือ เตตราไซคลิน หรือ คลอแรมฟินิคอล ในแบคทีเรียที่คัดกรองได้.....	55
4.3	การเจริญของแบคทีเรีย CK ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมฟูราไซลิโดน.....	57
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร.....	57
4.5	ผลการหาจุดสมมูลระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับฟูราไซลิโดนความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	58
4.6	ผลการประเมินการเจริญของแบคทีเรียในสารมาตรฐานฟูราไซลิโดน แอมพิซิลิน เตตราไซคลิน คลอแรมฟินิคอล.....	60
4.7	ผลการตรวจหาฟูราไซลิโดนในอาหารสัตว์.....	64
4.8	ผลการศึกษาปัจจัยแสงที่มีผลต่อการสลายตัวของฟูราไซลิโดน.....	67
5.	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	69
	รายการอ้างอิง .....	73
	ภาคผนวก .....	77
	ภาคผนวก ก .....	78
	ภาคผนวก ข .....	80
	ภาคผนวก ค .....	85



ภาคผนวก ง.....	87
ภาคผนวก จ.....	88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	89



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงมาตรฐานสารปนเปื้อนในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ประกาศ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2546).....	22
2.2 แสดงรายชื่อยาที่ห้ามใช้ในการผสมในการผลิตอาหารสัตว์ตามพระราชบัญญัติควบคุม คุณภาพอาหารสัตว์ 2525 ฉบับปรับปรุงปี 2542 ( <a href="http://www.dld.go.th">http://www.dld.go.th</a> ).....	25
2.3 แสดงกลุ่มยาปฏิชีวนะที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (สมพงษ์ และอธิภู, 2547)	26
3.1 พลาสมิดที่ใช้ในการวิจัย.....	36
4.1 แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเข้มข้นยาฟูราโซลิโดน (Furazolidone, Fz) ในระดับต่าง ๆ.....	50
4.2 แสดงผลการทดสอบความไวของแบคทีเรีย CK ได้ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการ รักษาสัตว์ โดยวิธี disc diffusion.....	54
4.3 จุดสมมูลระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร.....	59
4.4 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับยามาตรฐานชนิดต่าง ๆ .....	61
4.5 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับสารฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะต่าง ๆ.....	61
4.6 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับสารฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะต่าง ๆ.....	62
4.7 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับสารฟูราโซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับด้วยอาหาร ไก่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ.....	65
4.8 แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับสารฟูราโซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับด้วยอาหาร กึ่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ.....	66
4.9 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟูราโซนเมื่อสัมผัสแสง.....	68

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 สูตรโครงสร้างของ nitrofurantoin antimicrobial drug ชนิด furazolidone (parent drug) และ metabolite (AOZ) (Leitner และคณะ, 2001)	2
2.1 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพต่อจุลินทรีย์ (Michele, 2005).....	7
2.2 แสดงสูตรโครงสร้างหลักของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน ซึ่งจะประกอบด้วย หมูไนโตร เกาะอยู่กับวงแหวนฟูแรน และไนโตรฟูแรน (parent drugs) ชนิดต่าง ๆ (Hugo และ Russell, 1998 ; Masahiko, 2003) .....	10
2.3 แสดงสูตรโครงสร้างของไนโตรฟูราโซน (Masahiko, 2003).....	10
2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของไนโตรฟูแรนโทอิน (Masahiko, 2003).....	11
2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของฟูราลทาโดน (Masahiko, 2003).....	12
2.6 แสดงสูตรโครงสร้างของฟูราโซลิโดน (Masahiko, 2003).....	12
2.7 แสดงสูตรโครงสร้างของสารกลุ่มไนโตรฟูแรน (parent drugs) และเมตาบอไรต์ (metabolite) ของแต่ละตัว (Masahiko, 2003).....	14
2.8 แสดงกลไกการเปลี่ยนแปลงของฟูราโซลิโดนทั้งในรูปสารเดี่ยวและ protein-bound metabolite ไปเป็นสารไฮโดรราซีน (Homogenboom และคณะ, 2002).....	18
2.9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของยาคลอแรมฟินิคอล ( <a href="http://opbs.okstate.edu">http://opbs.okstate.edu</a> ).....	23
2.10 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของยา ampicillin ( <a href="http://en.wikipedia.org">http://en.wikipedia.org</a> ).....	24
2.11 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของยา tetracycline ( <a href="http://en.wikipedia.org">http://en.wikipedia.org</a> ).....	26
2.12 แสดงเส้นทางสำคัญที่สิ่งแวดล้อมจะสัมผัสกับยาที่ใช้ในการรักษามนุษย์และสัตว์ (Silvia และคณะ, 2003).....	28
2.13 แสดงโครงสร้างและปฏิกิริยารีดักชันของ TTC.....	33
3.1 แสดงการ streak แบคทีเรียเพื่อการทำทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะโดยวิธี disc sensitivity test ( <a href="http://cosmos.ucdavis.edu">http://cosmos.ucdavis.edu</a> ).....	39
4.1 แสดงการยืนยันผลการส่งผ่านพลาสมิดโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	56
4.2 แสดงกราฟการเจริญเติบโตของ แบคทีเรีย CK.....	57
4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร.....	58

รูปที่	หน้า
4.4 แสดงการเกิด formazan เนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้และจุดสมมูลที่แบคทีเรียไม่สามารถขึ้นได้เมื่อมีฟูราไซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร .....	60
4.5 แสดงเม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่างกันตามความเข้มข้นของยา.....	63
4.6 แสดงเม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการเจริญของแบคทีเรียกับฟูราไซลิโดนความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะต่าง.....	63
4.7 แสดงเม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการเจริญของแบคทีเรียกับฟูราไซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะต่าง.....	64
4.8 เม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับสารฟูราไซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับด้วยอาหารไก่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ.....	66
4.9 เม็ดกระดุมสีแดงที่แสดงการทดสอบแบคทีเรียทดสอบกับสารฟูราไซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับด้วยอาหารกุ้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ.....	67

### ตัวย่อ

AOZ	=	3-amino-2-oxazolidinone
Amp	=	Ampicillin
Cm	=	Chloramphenicol
ELISA	=	Enzyme-linked Immunosorbent assay
Fz	=	furazolidone
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS-MS	=	Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Mass Spectrometry
Tet	=	Tetracycline
µg/ml	=	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย