สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะในงานวิจัย

5.1 สรุปผลการศึกษา

การศึกษาการประเมินประสิทธิภาพ *E.coli* DH5α λpir ที่ใช้เป็นดัชนีในชุดตรวจยาฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ สรุปผลได้ดังนี้

1. ผลการศึกษาการทำปฏิกิริยาการเกิดสี (Colorimetric)ของฟูราโซลิโดนโดยใช้สารประกอบ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) จะให้ตะกอนสีแดงของฟอร์มาซาน (Formazan) เนื่องจากการเจริญหรือหายใจของแบคทีเรีย พบว่าช่วง 0-4 ชั่วโมงแรกการเจริญของเชื้อให้ค่า OD ที่ 600 นาโนเมตรใกล้เคียงกันทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟูราโซลิโดนและปราศจากฟูราโซลิโดน เนื่องจากฟูราโซลิโดนจะมีผลต่อเชื้อโดยการแพร่เข้าสู่เซลล์และเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นโดยหมู่ไนโตรเจนรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์รีดักเตส (Morozov และคณะ, 1974) แต่ในระหว่างการเจริญอย่างรวดเร็วนั้นเอนไซม์ต่างๆจะถูกใช้ในกิจกรรมการแบ่งเซลล์ และการสร้างเซลล์ทำให้ฟูราโซลิโดนยังไม่มีผลในการยับยั้งอย่างชัดเจน เมื่อเข้าสู่ log phase ในช่วง 4-24 ชั่วโมงเชื้อมีการเจริญอย่างต่อเนื่องพบว่าฟูราโซลิโดนยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสังเกตได้จากค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณของเชื้อที่ 10^6 CFUต่อมิลลิลิตรเกิดตะกอนสีแดงที่ระดับความเข้มข้นของฟูราโซลิโดนเท่ากับ 0.3 ppm เมื่อบ่มที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการอ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของฟูราโซลิโดน

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจสอบพบว่าปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างฟูราโซลิโดนที่ระดับความเข้มข้นของ *E.coli* DH5α λpir เท่ากับ 10^6 CFU/ml เมื่อใช้กลูโคส หรือซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนของชุดตรวจสอบ พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในกลูโคสที่ 0-4% โดยมีอัตราความเข้มของ TTC ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าแปรผกผันกับความเข้มข้นของกลูโคส และกลูโคสที่มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์จะยับยั้งการเจริญของเชื้อเนื่องจากความเข้นข้นของกลูโคสมีผลต่อปริมาณน้ำอิสระที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้(aw)ลดลงจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ อีกทั้งยังพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้เมื่อมีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้เนื่องจาก *E.coli* DH5α λpir เป็นจุลินทรีย์ที่ออกแบบขึ้นเพื่อการโคลนยีนส์แบคทีเรียจึงประกอบด้วย DH5α accepter ซึ่งรองรับ blue/white screening ทำให้เชื้อปราศจากความสามารถใน

การย่อยน้ำตาลบางชนิด เช่น กาแลคโตส ฟรักโทส เป็นต้น (Woodcock และคณะ, 1989) ส่งผลให้ไม่สามารถย่อยซูโครส ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสได้

เมื่อศึกษาความเป็นกรดด่างในช่วงพีเอช 4-7 พบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบคือ *E.coli* DH5α λpir สามารถเจริญได้ดีทั้งในพีเอชที่ 4 5 6 และ 7 ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าค่าพีเอชที่นำมาทดสอบทั้ง 4 ค่า นั้นไม่ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของการเจริญของเชื้อ *E.coli* DH5α λpir ในส่วนของอุณหภูมิ จากการบ่มชุดตรวจสอบที่อุณหภูมิ 3 อุณหภูมิ คือ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจสอบผลการเกิดตะกอนสีแดงในชุดตรวจสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส สามารถอ่านค่าการดูดกลืนแสงออกมาได้ใกล้เคียงกัน ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเวลาต่างๆต่ำกว่าที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ *E.coli* DH5α λpir (Woodcock และคณะ, 1989) ทำให้อัตราการเจริญของเชื้ออยู่ในระดับต่ำ ส่งผลให้การเกิดตะกอนสีแดงของ formazan เกิดได้ช้ากว่าการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส และนอกจากนั้นตะกอนสีแดงที่เกิดขึ้นยังมีระดับความเข้มของสีแดงที่จางกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส

3. ผลการหาค่าความแม่นยำต่ำสุดของฟูราโซลิโดน โดยทดสอบด้วยอาหารสัตว์ได้แก่ อาหารไก่เล็ก อาหารไก่ใหญ่ อาหารกุ้ง และอาหารหมู ผลการทดลองการอ่านค่าด้วย Micro plate reader ซึ่งสอดคล้องกับการอ่านค่าด้วยตาเปล่า พบว่าค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่แบคทีเรียสามารถทนได้ เท่ากับ 0.3 ppm โดยในอาหารไก่เล็ก อาหารไก่ใหญ่ และอาหารกุ้ง มีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญของ *E.coli* DH5α λpir โดยไม่ต้องเติมแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถอ่านผลได้อย่างชัดเจนในอาหารหมู ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *E.coli* DH5α λpir ไม่สามารถเจริญได้เมื่อมียา แอมพิซิลิน เตตร้าซัยคลิน คลอแรมฟินิคัล ไนโตรฟูแรนโทอิน นอร์ฟลอกซาซิน และ สเตรปโตมัยซิน ซึ่งเป็นข้อจำกัดของ *E.coli* DH5α λpir (กุลกานต์ ชูชัยยะ, 2548)

4. ผลการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบจากการใช้ตรวจสอบอาหารสัตว์เปรียบเทียบกับวิธี UV-Visible spectrophotometry พบว่าชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์ที่พัฒนาขึ้น มีค่าความแม่นยำ (relative accuracy) 90.3 % ความไว (relative sensitivity) 84.4 % ความจำเพาะ (relative

specificity) 97.5 % และมีค่า Kappa coefficient (k) เท่ากับ 0.77 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่ามีค่าการยอมรับหรือมีความน่าเชื่อถือในระดับดี (Landis and Koch, 1977)

5.ผลวิเคราะห์ความแม่นยำของค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ตรวจได้จากตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบเมื่อใช้ *E.coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง พบว่าระดับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการอ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่สามารถทนได้คือ 10^6 CFU/ml โดยค่าต่ำของฟูราโซลิโดนที่แบคทีเรียสามารถทนได้ เท่ากับ 0.3 ppm เมื่อบ่มที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาผลกระทบต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบหลังการเก็บรักษา 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เมื่อเก็บรักษา TTC ไว้ที่ 1 3 6 และ 9 เดือนที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถมองเห็นสีของฟอร์มาซานได้ด้วยตาเปล่า ที่ 1 และ 3 เดือน ทั้งที่เก็บอุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเก็บจนครบ 6 เดือน TTC แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีตรวจสอบฟูราโซลิโดน มีการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ไม่เกิดสีแดงของฟอร์มาซาน เนื่องจาก TTC เสื่อมสภาพ และให้ถือว่ามีอายุการเก็บรักษาที่ 3 เดือน

จากนั้นศึกษาผลกระทบต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบหลังการเก็บรักษา *E.coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อเก็บรักษา TTC ไว้ที่ 1 3 6 และ 9 เดือนที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส พบว่า *E.coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งเจือจางโดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ ไม่สามารถทนฟูราโซลิโดนได้ที่ความเข้มข้น 0.1 ppm ในขณะที่เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน เจือจางโดยเจือจางโดยใช้อาหารเหลว NB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 10^6 CFU/ml ค่าต่ำของฟูราโซลิโดนที่แบคทีเรียสามารถทนได้ เท่ากับคือ 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อหลังผ่านการทำแห้งเยือกแข็งยากต่อการกำหนดความเข้มข้นที่ต้องการ อีกทั้งเชื้อผ่านการทำแห้งเยือกแข็งจำเป็นต้องแอคทิเวตก่อนการใช้งานเพื่อให้มีกิจกรรมของเชื้อเช่นเดียวกับก่อนการทำแห้งเยือกแข็ง จึงถือว่าเชื้อมีระยะการเก็บรักษาที่ 1 เดือน

5.2 ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

1. ควรหาวิธีปรับปรุงเสถียรภาพของชุดตรวจสอบให้มีระยะการเก็บรักษานานขึ้น หรือเก็บรักษาได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง

2. ควรหาวิธีกำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างอาหารสัตว์ เช่น อาหารหมู เพื่อให้สีที่เกิดขึ้นหลังทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ มีความแตกต่างจากสีที่เกิดจากสารละลายมาตรฐานน้อยที่สุด และควรหาวิธีปรับปรุงเพื่อลดผลบวกลวงให้สามารถใช้ได้กับยาหรือตัวอย่างกรณีที่มีการผสมสี หรือมีสีตรงกับสีที่เกิดกับชุดตรวจสอบ

3. เนื่องจากชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ตรวจยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

4. ควรมีการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบกับยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น โดยควรมีคุณสมบัติที่ใช้งานง่าย ให้ผลเร็ว มีราคาถูก และเกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้ด้วยตนเอง