บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ฟูราโซลิโดนเป็นสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์กว้างขวาง ซึ่งภายหลังพบว่ามีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อการกลายพันธุ์ ดังนั้นจึงถูกระงับมิให้ใช้กับสัตว์ที่จะนำมาใช้เป็นอาหาร วิธีการวิเคราะห์หาฟูราโซลิโดนในปัจจุบันได้แก่ ELISA HPLC และ LC-MS-MS เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและแม่นยำ แต่มีราคาแพง มีความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่าง และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ดังนั้นแนวทางของงานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์โดยใช้จุลินทรีย์เป็นตัวตรวจหาการปนเปื้อนในอาหารสัตว์ เพื่อให้ได้ชุดตรวจที่ราคาถูก ใช้ง่าย ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำที่เกษตรกรสามารถใช้ตรวจได้เอง

ในการคัดกรองแบคทีเรียที่ทนต่อฟูราโซลิโดนความเข้มข้นต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อมและห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา พบว่ามีแบคทีเรียที่ทนฟูราโซลิโดยความเข้มข้น 0.1-1 1-10 และมากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 10 10 และ 18 isolates ตามลำดับ แบคทีเรียที่สนใจในการศึกษานี้คือแบคทีเรียที่ทนฟูราโซลิโดนที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุด คือ 0.1–1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเลือกแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α γpir เพื่อเป็นแบคทีเรียทดสอบ เนื่องจากเจริญเติบโตเร็วและเป็นสายพันธุ์ที่สะดวกในการนำไปทำการทดลองต่อไป และให้ชื่อแบคทีเรียนี้ว่า "แบคทีเรีย CK" แบคทีเรีย CK นั้นเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีพลาสมิด (จากรูปที่ 4.1) นั่นแสดงว่าความสามารถในการทนสารฟูราโซลิ-โดนถูกควบคุมโดยยีนบนโครโมโซม นำแบคทีเรีย CK ไปทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะบางชนิดที่นิยมใช้ในการรักษาสัตว์ พบว่าแบคทีเรีย CK ไม่สามารถเจริญได้เมื่อมียา ampicillin chloramphenicol tetracycline nitrofurantoin ciprofloxacin norfloxacin sulfamethoxazole ร่วมกับ trimethoprim piperacillin ร่วมกับ tazobactan gentamicin และ streptomycin กล่าวคือถ้าในอาหารสัตว์มียาเหล่านี้ปนเปื้อนอยู่จะทำให้แบคทีเรีย CK ไม่เจริญ แต่แบคทีเรีย CK สามารถเจริญได้เมื่อมียา clindamycin cephalothin oxacillin penicillin G novobiocin vancomycin erythromycin และ bacitracin ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียเจริญได้โดยไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าในอาหารสัตว์มีการปนเปื้อนฟู-ราโซลิโดนหรือยาต่าง ๆ เหล่านี้ ดังนั้นยาทั้ง 8 ชนิดนี้จึงเป็นข้อจำกัดของแบคทีเรีย CK ในการใช้เป็นตัววิเคราะห์ แต่เนื่องจากยาต่าง ๆ ดังกล่าวมีราคาแพงไม่เหมาะสมในการผสมในอาหารสัตว์ซึ่งต้องใช้ในปริมาณมาก จึงไม่น่าเป็นปัญหาในการใช้แบคทีเรีย CK

เนื่องจากในการใช้สารปฏิชีวนะผสมในอาหารสัตว์ของเกษตรกรนั้นไม่ได้ใช้ยาเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงต้องเพิ่มขีดความสามารถของชุดตรวจสอบและตัดผลบวกลวงเนื่องจากสารปฏิชีวนะอื่น ๆ ที่เกษตรกรนิยมใช้ จึงนำแบคทีเรีย CK มาเพิ่มความสามารถในการต้านสารปฏิชีวนะเอมพิซิลิน หรือ เตตร้าไซคลิน หรือ คลอแรมฟินิคอล โดยการส่งผ่านพลาสมิด pGEM-3Zf pBR322 และ pBluescrip-SK จะได้แบคทีเรีย CK-pGEM แบคทีเรีย CK-pBR322 และ แบคทีเรีย CK-pBC ตามลำดับ ซึ่งยาคลอแรมฟินิคอลนี้เป็นยาที่ห้ามมิให้ใช้และห้ามตรวจพบการตกค้างในสัตว์ที่จะนำมาเป็นอาหาร ส่วนยาแอมพิซิลิน และเตตร้าไซคลินนั้นเป็นยาที่อนุญาตให้ใช้ได้ แต่มีการกำหนดปริมาณยาที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ไม่เกิน 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียทั้งสามจะมีความสามารถทนฟูราโซลิโดนที่ระดับความเข้มข้น 0.1–1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถทนสารปฏิชีวนะอื่น ๆ ดังนี้ แบคทีเรีย CK-pGEM ทนแอมพิซิลิน แบคทีเรีย CK-pBR322 ทนแอมพิซิลิน และเตตร้าไซคลิน และ แบคทีเรีย CK-pBC ทนคลอแรมฟินิคอล

เมื่อนำแบคทีเรีย CK มาศึกษาผลของฟูราโซลิโดนต่อการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าในช่วง 0 – 4 ชั่วโมงแรกจะเป็นช่วงที่แบคทีเรียมีการเจริญเร็วมากและให้ผลเหมือนกันทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีและไม่มีฟูราโซลิโดน เนื่องจากฟูราโซลิโดนจะมีผลต่อเชื้อเมื่อโมเลกุลของฟูราโซลิโดนแพร่เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียและเกิดปฏิกิริยา reduction โดยหมู่ไนโตรจะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์รีดักเตส ซึ่งสามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ใน *E. coli* (Morozov และคณะ, 1994) แต่ในระหว่างการเจริญอย่างรวดเร็วนั้นเอนไซม์ต่าง ๆ จะถูกใช้ในกิจกรรมการแบ่งเซลล์ การสร้างเซลล์ทำให้ฟูราโซลิโดนยังไม่มีผลต่อเซลล์แบคทีเรียมากนัก แต่เมื่อเวลาผ่านไปแบคทีเรียเจริญได้น้อยลงและเข้าสู่ stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 10 โดยในอาหารที่มีฟูราโซลิโดนการเจริญของแบคทีเรียจะน้อยกว่าในอาหารที่ไม่มีฟูราโซลิ-โดนอย่างชัดเจนและมีการเจริญไปจนถึง 24 ชั่วโมง แสดงว่าการยับยั้งของยาเป็นแบบ irreversible ซึ่งสังเกตได้จากรูปที่ 4.2 เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมงแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีฟูรา-โซลิโดนยังคงเจริญต่อไปในรูปแบบเดียวกันกับการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปกติ ไม่มีการลดลงของเส้นกราฟกล่าวคือฟูราโซลิโดนที่มีใน NB ถูกใช้ในการฆ่าแบคทีเรียจำนวนหนึ่งหมดแล้ว นั่นแสดงว่าฟูราโซลิโดนที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณน้อยเกินกว่าจะยับยั้งแบคทีเรีย CK ได้ทั้งหมด และในการทดลองต่อไปจะเลือกใช้แบคทีเรียที่มีอายุ 10 ชั่วโมง เตรียมหัวเชื้อเนื่องจากเป็นชั่วโมงที่มีจำนวนแบคทีเรียมากและยังเป็นช่วง log phase

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีและไม่มีฟูราโซลิโดนทำให้ทราบว่าฟูราโซลิโดนมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงทำการศึกษาหาว่าความสัมพันธ์

ระหว่างจำนวนแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ในสภาวะเลี้ยงเชื้อใน NB นับโคโลนีบน NA ที่มีฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากรูปที่ 4.3 ซึ่งเป็นสภาวะเหมือนจริงที่จะเกิดขึ้นในการทดสอบกับชุดตรวจสอบ จึงให้สมการเส้นตรงของสภาวะนี้ในการคำนวณเพื่อเตรียมเชื้อแบคทีเรียในการทดลองต่อไป นั่นคือสมการ $y = 0.0134x$

ระดับความเข้มข้นของฟูราโซลิโดนที่สนใจที่จะใช้ในการตรวจหาฟูราโซลิโดนตกค้างในอาหารสัตว์คือต่ำกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงศึกษาหาจุดสมมูลระหว่างฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับจำนวนแบคทีเรีย CK ทั้ง 4 ชนิด คือ แบคทีเรีย CK แบคทีเรีย CK-pGEM แบคทีเรีย CK-pBR322 และ แบคทีเรีย CK-pBC พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ให้ค่าจุดสมมูลที่จำนวนแบคทีเรียเท่ากับ $1x10^6$ CFU/มิลลิลิตร กล่าวคือเมื่อเตรียมเชื้อแบคทีเรีย CK จำนวน $1x10^6$ CFU/มิลลิลิตร เพื่อไปทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง แล้วเติมตัวบ่งชี้ TTC ความเข้มข้น 0.0025 % แล้วบ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.01 แต่ปริมาณเชื้อยังไม่เพียงพอที่จะสามารถมองเห็นสีแดงของ formazan ด้วยตาเปล่าเป็นค่าสุดท้าย จึงถือว่าจำนวนแบคทีเรีย $1x10^6$ CFU/มิลลิลิตร คือความเข้มข้นสุดท้ายที่ไม่สามารถเจริญได้ในฟูราโซลิโดนความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในด้านของค่า MIC ของยาชนิดอื่น ๆ ต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ จำนวน $1x10^6$ CFU/มิลลิลิตร คือ แบคทีเรีย CK-pGEM ทนแอมพิซิลินได้มากกว่า 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรีย CK-pBR322 ทนแอมพิซิลินและเตตร้าไซคลินได้มากกว่า 512 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ แบคทีเรีย CK-pBC ทนคลอแรมฟินิคอลได้ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาค่า MIC ของยาต่าง ๆ เพื่อที่จะสามารถบอกขีดจำกัดของแบคทีเรีย CK ชนิดต่าง ๆ ว่ามีความสามารถทนต่อยาดังกล่าวได้ที่ระดับความเข้มข้นที่เท่าไหร่ ค่า MIC ของแบคทีเรียแต่ละตัวถ้ายิ่งมีค่าสูงจะเป็นผลดีต่อชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น กล่าวคือถ้าในอาหารสัตว์มียาแอมพิซิลิน เตตร้าไซคลิน หรือ คลอแรมฟลินิคอล สูงกว่าค่า MIC จะทำให้การอ่านผลผิดพลาดได้ แต่ในทางปฏิบัติปริมาณยาที่ใช้ในการผสมในอาหารสัตว์นั้นจะมีค่าน้อยกว่าค่า MIC ของยาแต่ละชนิด เช่น แอมพิซิลินจะนิยมใช้ในการผสม 2-50 มิลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นต้น จึงไม่เป็นอุปสรรค์ในการใช้ชุดตรวจสอบในการอ่านผล

เมื่อได้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการและภาวะที่เหมาะสมแล้วจะนำมาประเมินการเจริญของแบคทีเรีย CK แบคทีเรีย CK-pGEM แบคทีเรีย CK-pBR322 และแบคทีเรีย CK-pBC ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่มีฟูราโซลิโดน เตตร้าไซคลิน แอมพิซิลิน และคลอแรมฟินิคอล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.2 พบว่าฟูราโซลิโดนที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย CK เมื่อมียาอื่นเพิ่มขึ้นมาจะมีผลยับยั้งเสริมกัน หรือยาแต่ละชนิดต่างก็ออกฤทธิ์ (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547) ดังนั้นจึงเลือกใช้ฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับทดสอบต่อไป การที่ใช้ฟูราโซลิโดนร่วมกับยาเอมพิซิลิน เตตร้าไซคลิน และคลอแรมฟินิคอล ทำให้สามารถบอกได้ว่ามียาดังกล่าวในอาหารสัตว์หรือไม่ เนื่องจากในการอ่านผลจะต้องอ่านแบคทีเรียทั้งสี่ชนิดพร้อมกัน

ในการนำอาหารไก่และอาหารกุ้งมาทดสอบกับชุดตรวจสอบจะต้องมีการละลายอาหารด้วยน้ำ พบว่าเปอร์เซ็นการดูดซับสารละลายฟูราโซลิโดนของอาหารสัตว์คิดเป็น 86-88% หรือเหลือฟูราโซลิโดนหลังจากถูกดูดซับและสกัดออกมาคิดเป็นความเข้มข้นที่เหลือ 12-14% แล้วนำฟูราโซลิโดนที่เหลือจากการดูดซับของอาหารไก่และอาหารกุ้งมาเจือจางเป็นความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบกับแบคทีเรียพบว่าให้รูปแบบตรงกับการทดสอบฟูราโซลิโดนที่ยังไม่ผสมกับอาหารไก่ และอาหารกุ้ง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเมื่อนำฟูราโซลิโดนผสมกับอาหารสัตว์ ฟูราโซลิโดนยังคงมีคุณสมบัติต่อเชื้อแบคทีเรียเช่นเดิม และยังสรุปได้ว่าชุดตรวจสอบฟูราโซลิโดนในอาหารสัตว์นี้มีขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารสัตว์เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.1 ppm

เนื่องจากฟูราโซลิโดนไวต่อแสง การนำไปใช้อาจให้ผลคลาดเคลื่อน จึงทดสอบการคงทนต่อแสงชนิดต่าง ๆ พบว่าในภาวะที่ทำการทดลอง ฟูราโซลิโดนสลายตัวไป 0.2% ต่อชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Nikolaos and Dimitrios ในปี 2001 ว่า 5–ไนโตรฟูรัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญในการออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียนั้นไม่เสถียรและมีความไวต่อแสง และการสลายตัวของฟูราโซ-ลิโดนพบว่าเร็วที่สุดหากได้สัมผัสแสงอาทิตย์ซึ่งจะสลายตัวไป 34.83% ภายใน 30 นาที

ดังนั้นในการศึกษานี้จะได้แนวปฏิบัติในการใช้แบคทีเรียหรือหลักการทางด้านจุลชีววิทยาในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ฟูราโซลิโดนที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ด้วยชุดตรวจที่มีความไวสูง ใช้งานง่าย ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือหรือแถบเทียบสีในการอ่านผล และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้สะดวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย