สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น UNILUX-12 บริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
2. เครื่อง Microplate reader รุ่น ELX800 บริษัท BioTek
3. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
4. เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex, U.S.A.
5. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.
6. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Scientific, U.S.A.
7. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
10. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, U.S.A.
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น V530 PC UV-VIS Spectrometer บริษัท PerkinElmer Instrument, USA
13. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, U.S.A.
14. เครื่อง Sonicator รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท สยามแอนด์โก, กรุงเทพ, ประเทศไทย
15. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific supply Co., Ltd., Thailand
16. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20°C รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
17. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –80°C รุ่น ULT1786 บริษัท Form Scientific, U.S.A.
18. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE800, Germany

19. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
20. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
21. ไมโครเพลท (microplate) ขนาด 96 หลุม
22. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf AG, Germany
23. อุปกรณ์นับเซลล์ (hemacytometer) บริษัท Schott Duran, Germany
24. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TW 20 บริษัท Kubota, Japan

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
3. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organics, Inc., U.S.A.
4. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany
5. คลอโรฟอร์ม (chloroform) บริษัท Merck, Germany
6. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl2.2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
7. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
9. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
10. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
11. ไตรบูไทริน (Tributyrin) บริษัท Fluka, Switzerland
12. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
13. แบคโตเปบโทน (Bacto peptone broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
14. เปปโตน (peptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
15. ผงวุ้น
16. ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

17. ผงสกัดจากมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

18. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

19. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany

20. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany

21. ฟูราโซลิโดน (Furazolidone; FZ) บริษัท Sigma, USA

22. เมทานอล (CH_3OH) HPLC grade บริษัท Merck, Germany

23. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, France

24. 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) บริษัท Merck, Germany

25. อะซิโตไนไทรต์ (Acetonitrile) HPLC gradeบริษัท Merck, Germany

26. เอธานอล ของบริษัท J.T. Baker, U.S.A.

27. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท E. Merck, Germany

28. เฮกเซน (Hexane) HPLC gradeบริษัท Merck, Germany

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

E.Coli สายพันธุ์ DH5α λpir ที่ได้จากการวิจัยของกุลกานต์ ชูชัยยะ (2548)

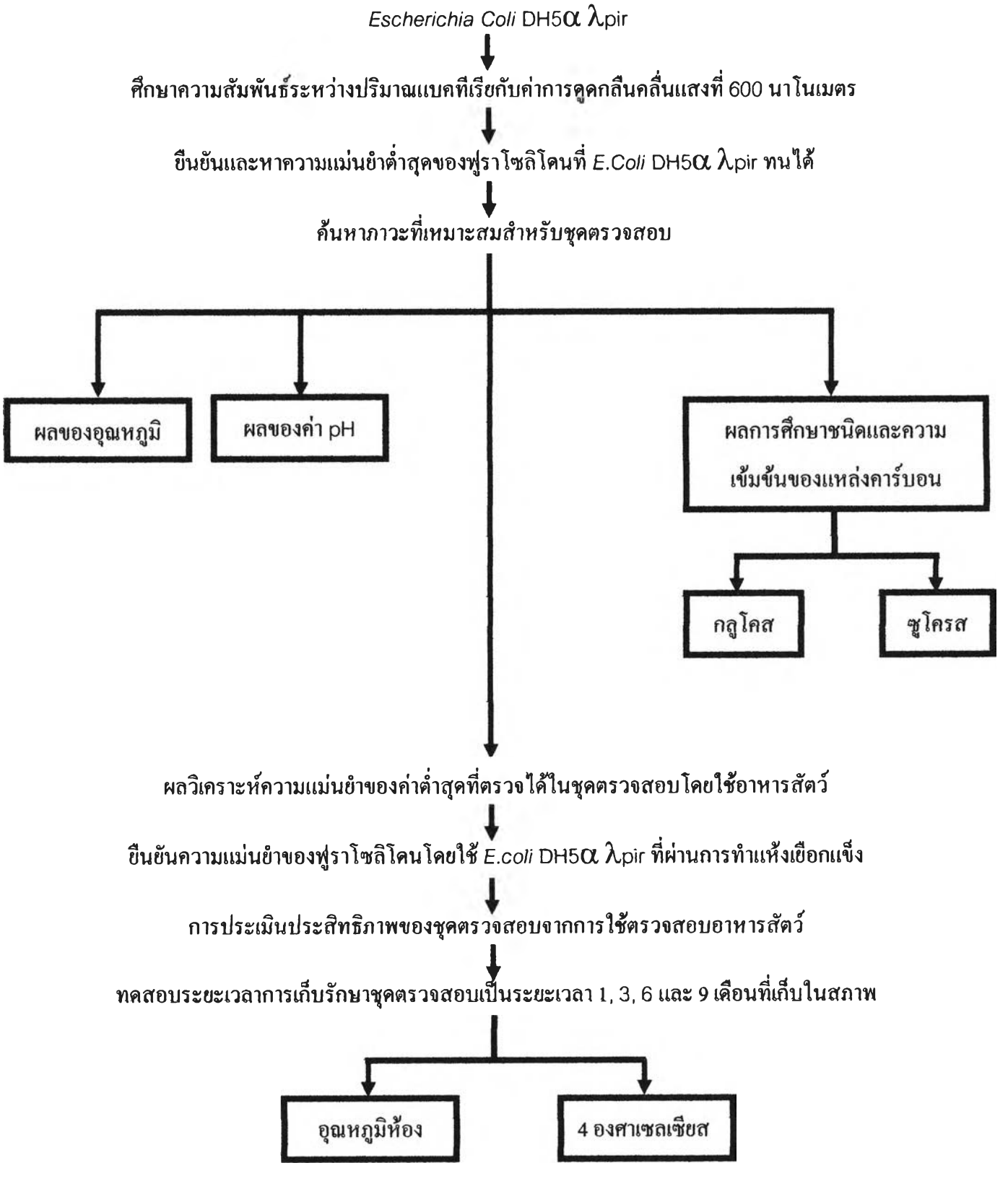
3.4 การเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กรณีทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.4.2 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB นำมาผสมกับกลีเซอรอล ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3:7 โดยปริมาตร บรรจุลงหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

I 26761782

แผนผังงานวิจัย



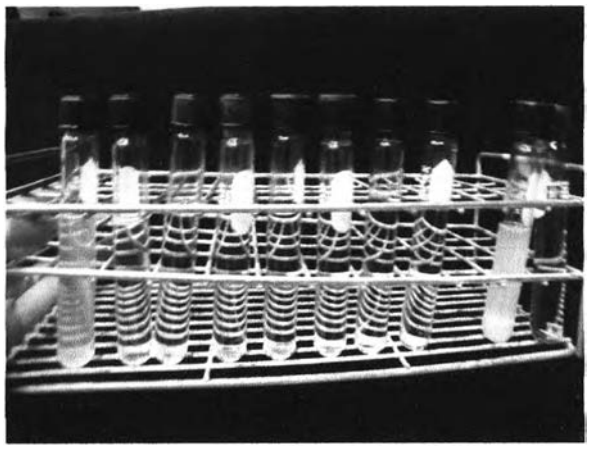
การดำเนินการวิจัย

3.5 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร

นำ *E.Coli* DH5α λ*pir* ที่เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสมา 1 ลูป (*loop*) โดยวิธีปลอดเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร เขย่าในขวดเขย่าให้เชื้อกระจายตัวในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในการเก็บตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง จะใช้ปิเปตดูดตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ 9 มิลลิลิตร ซึ่งเซลล์จะถูกเจือจางลง 10^{-1} เท่า เมื่อเก็บตัวอย่างเสร็จให้นำขวดที่มีเชื้อใส่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นทำขั้นตอนดังกล่าวซ้ำทุกๆ 1 ชั่วโมงเพื่อเก็บตัวอย่าง แล้วแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ใช้ตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำมาวัดค่า *optical density* ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 600 *nm* (ขณะเก็บตัวอย่างต้องใช้ *aseptic technique* แต่ขณะที่วัด O.D. ไม่ต้องใช้ aseptic technique)

ส่วนที่สองนำมาเจือจางเชื้อลงจนถึงระดับการเจือจาง 10^{8} ดูดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ที่ระดับการเจือจาง 10^{2} - 10^{6} มา *spread* บน *Nutrient agar* (NA) ทำระดับการเจือจางละ 2 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง เลือกระดับการเจือจางที่มีโคโลนี 30-300 โคโลนี มานับจำนวน

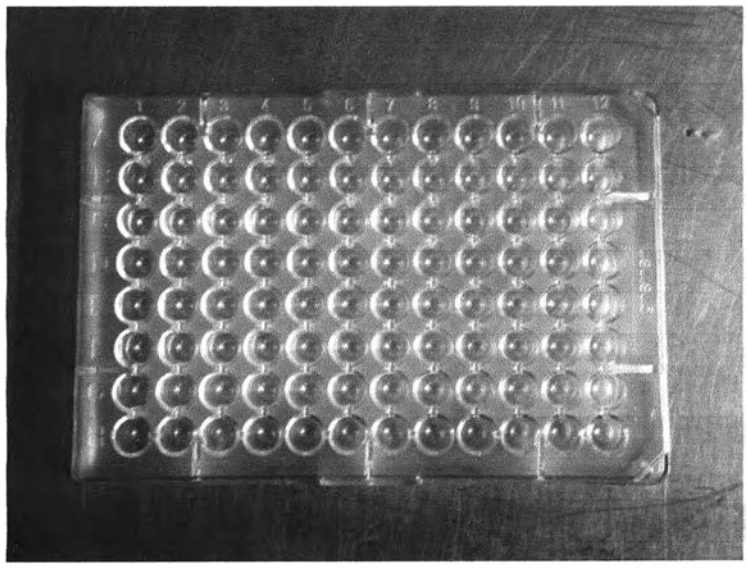
นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่เวลาต่างๆมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log O.D. ที่ 600 นาโนเมตร กับเวลาที่เพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นคำนวณหา log จำนวน CFU/มิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ แล้วเขียนกราฟระหว่างค่า log ของจำนวน CFU/มิลลิลิตร กับเวลาที่เพาะเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)



รูปที่ 3.1 แสดงการเจือจาง *E.Coli* DH5α λ*pir* ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์

3.6 ยืนยันและหาความแม่นยำต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้

3.6.1 ใช้หลอดทดลอง ขนาด 12x100 มิลลิเมตร จำนวน 96 หลอด ตามตัวอย่างที่จะทดสอบและเพิ่มอีก 2 หลอดเพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม คือหลอดไม่ใส่เชื้อ *E.Coli* DH5α λpir (Negative control) และหลอดไม่ใส่ฟูราโซลิโดน (Positive control) โดยทำควบคู่กับถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ขนาด 96 หลุมที่มีจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบและเพิ่มอีก 2 หลุมเพื่อใช้เป็นหลุมควบคุม คือหลุมไม่ใส่เชื้อ *E.Coli* DH5α λpir (Negative control) และหลุมไม่ใส่ฟูราโซลิโดน (Positive control)

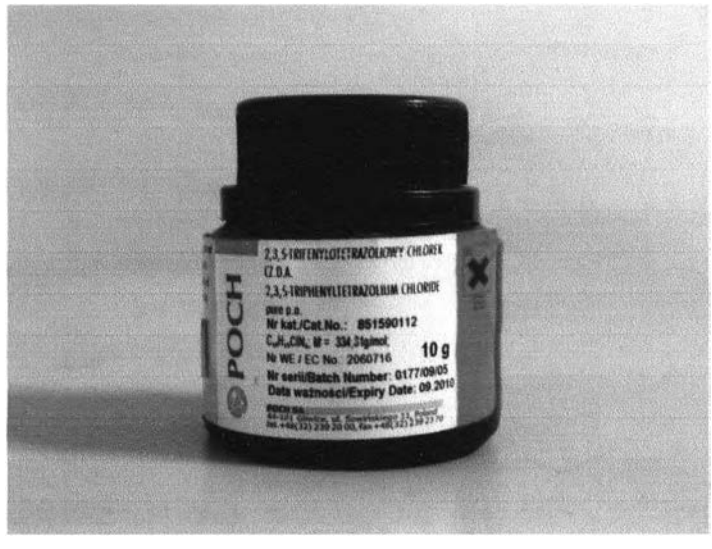


รูปที่ 3.2 แสดงถาดหลุมพลาสติก

3.6.2 เลี้ยง *E.Coli* DH5α λpir ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ออกให้หมด นำส่วนของเชื้อมาเจือจางโดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 *nm* เพื่อให้ได้เชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยวิธี Serial Dilution นำไปใส่ในถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ขนาด 96 หลุมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่10-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 3.3 แสดงสารฟูราโซลิโดนที่ใช้ในการวิจัย

3.6.3 นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Double NB และ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย ใส่ในหลอดทดลองและถาดหลุมพลาสติก ตามอัตราส่วนดังตาราง ที่ 3.1



รูปที่ 3.4 แสดง2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนประกอบที่ใช้ในชุดตรวจสอบ

อัตราส่วน	อาหารเลี้ยงเชื้อ NB	*E.Coli* DH5α λpir	TTC	Furazolidone
ปริมาตรที่ใช้ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 5 มิลลิลิตร	2 มิลลิลิตร	2 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร
ปริมาตรที่ใช้ใน 96 well plate 200 ไมโครลิตร	80 ไมโครลิตร	80 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร

3.6.4 เตรียมยาฟูราโซลิโดน เพื่อใช้ในการทดสอบหาความสามารถในการตรวจพบยาฟูราโซลิโดนในปริมาณต่ำที่สุด (Detection limits) ของชุดตรวจสอบโดยแปรผันความเข้มข้นสารละลายยาฟูราโซลิโดนที่ 0.1-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองและถาดหลุมพลาสติกในแนวนอน 1-10 ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และแนวตั้ง A-H แทนความเข้มของ *E.Coli* DH5α λpir ที่ 10-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร

3.6.5 นำหลอดทดลอง และหลุมทดสอบ เข้าบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดสีและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยเทียบกับหลุมควบคุม คือ หลุมไม่มีเชื้อ *E.Coli* DH5α λpir (Negative control) และหลุมไม่มีฟูราโซลิโดน (Positive control)

3.6.6 จากนั้นนำหลอดทดลองหลังผ่านการบ่มไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectrophotometry และนำถาดหลุมทดสอบไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ดังแสดงในรูป 3.5

ตารางที่ 3.2 แสดงตำแหน่งความแม่นยำต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ *E.Coli* DH5α λpir ทนได้ ในถาดหลุมพลาสติก

[FZ]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[MO] (ppm) (CFU/ml)		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	QC+	QC-
A	10^8											NB + *E.coli* + TTC	NB + TTC + FZ
B	10^7												
C	10^6												
D	10^5												
E	10^4												
F	10^3												
G	10^2												
H	10												

รูปที่ 3.5 แสดงเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ รุ่น ELX 800 ที่ใช้ในการวิจัย

3.7 หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจสอบ

3.7.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อชุดทดสอบโดยการใช้กลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

นำ *E.Coli* DH5α λpir ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ออกให้หมด นำส่วนของเชื้อมาเจือจางโดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อให้ได้เชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยวิธี *Serial Dilution* นำไปใส่ในถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ขนาด 96 หลุมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร พร้อมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ชนิด Double Strange และ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย ตามอัตราส่วนดังตารางที่ 3.3

โดยแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนของชุดตรวจสอบ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1 – 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปใส่ในถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ตามตารางที่ 3.3 โดยแต่ละชุดแทนความเข้มข้นของกลูโคส หรือซูโครส ที่แต่ละความเข้มข้น ตรวจดูสีที่เกิดขึ้น แล้ววัดด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

ตารางที่ 3.3 แสดงอัตรส่วนประกอบที่ใช้ในชุดตรวจสอบโดยแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส และซูโครส

อัตราส่วน	อาหารเลี้ยงเชื้อ NB	แหล่งคาร์บอน	*E.Coli* DH5$\alpha\lambda$pir	TTC	Furazolidone
ปริมาตรที่ใช้ใน 96 well plate 200 ไมโครลิตร	40 ไมโครลิตร	40 ไมโครลิตร	80 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร

3.7.2 ผลของอุณหภูมิและค่าpH ที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจสอบ

นำ *E.Coli* DH5α λpir ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ออกให้หมด นำส่วนของเชื้อมาเจือจางโดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 *nm* เพื่อให้ได้เชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยวิธี Serial Dilution นำไปใส่ในถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ขนาด 96 หลุมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร พร้อมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ชนิด Double Strange และ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย ตามอัตราส่วนดังตารางที่ 3.1

โดยแปรผันอุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจสอบที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช ที่ 4 5 6 และ 7 ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB จากนั้นนำไปใส่ในถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ตามตารางที่ 3.2 ซึ่งแต่ละชุดแทนแต่ละค่าพีเอช โดยทำ 3 ซ้ำ ปมที่อุณหภูมิต่างๆกัน ตรวจดูสีที่เกิดขึ้น แล้ววัดด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

3.8 ผลวิเคราะห์ความแม่นยำของค่าต่ำสุดที่ตรวจได้ในชุดตรวจสอบโดยใช้อาหารสัตว์

3.8.1 เตรียมตัวอย่าง (Spiked sample) โดยชั่งอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับไก่เล็ก ไก่ใหญ่ หมู และ กุ้ง ที่ผ่านการตากแดดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้ได้อาหารสัตว์ที่มีความเข้มข้นฟูราโซลิโดนที่ 0 ppm ให้ได้ 25 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10-15 นาที จะได้ตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (Negative control) และเติมสารละลายฟูราโซลิโดนปริมาตร 25 มิลลิลิตรให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 ppm นำมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

3.8.2 นำ *E.Coli* DH5α λpir ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาอาหารเลี้ยง

เชื้อเหลว NB ออกให้หมด นำส่วนของเชื้อมาเจือจางโดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อให้ได้เชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยวิธี Serial Dilution นำไปใส่ในถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ขนาด 96 หลุมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร พร้อมกับอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับไก่เล็ก ไก่ใหญ่ หมู และ กุ้ง เพื่อใช้แทนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB และ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย ตามอัตราส่วนดังตารางที่ 3.4 โยทำ 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.8.3 นำถาดหลุมทดสอบ เข้าบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เกิดสีและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยเทียบกับหลุมควบคุม คือหลุมไม่ใส่เชื้อ *E.Coli* DH5α λpir (Negative control) และหลุมไม่ใส่ยาฟูราโซลิโดน (Positive control)

3.8.4 จากนั้นนำถาดหลุมทดสอบหลังผ่านการบ่มไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

ตารางที่ 3.4 แสดงอัตราส่วนประกอบที่ใช้ในชุดตรวจสอบโดยใช้อาหารสัตว์

อัตราส่วน	อาหารสัตว์	*E.Coli* DH5$\alpha\lambda$pir	TTC	Furazolidone
ปริมาตรที่ใช้ใน 96 well plate 200 ไมโครลิตร	40 ไมโครลิตร	80 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร

3.9 ผลการยืนยันความแม่นยำของฟูราโซลิโดนโดยใช้ *E.Coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง

3.9.1 นำ *E.Coli* DH5α λpir ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในหลอดไม

โครฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ออกให้หมด นำส่วนของเชื้อมาเจือจางโดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์

3.9.2 หลังจากนั้นเก็บเชื้อไว้ในสภาพที่เย็นจัด จะทำให้กิจกรรมของ จุลินทรีย์หยุดอย่างทันที แต่ไม่ตาย เพื่อทำ Lyophilization เนื่องจากสามารถเก็บเชื้อไว้ได้นานและเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่าง

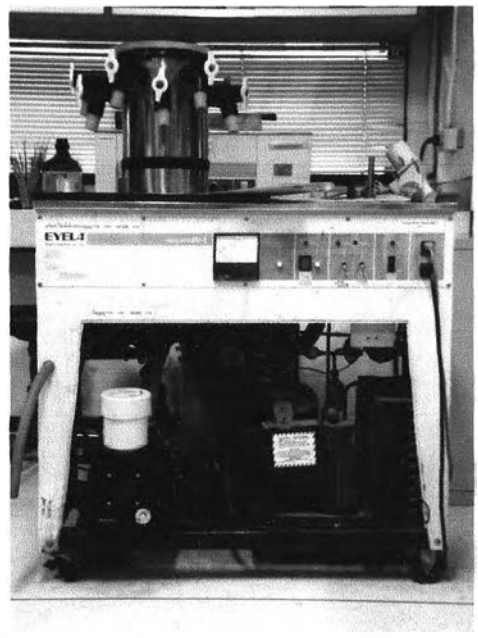
วิธีทำ Lyophilization โดยนำแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ที่ต้องการเก็บรักษาใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็ก แช่ในน้ำแข็งแห้งผสมแอลกอฮอล์ ซึ่งมีอุณหภูมิ -78 องศาเซลเซียส แล้วนำไปใส่ฟลาสก์ซึ่งมีส่วนหนึ่งเชื่อมต่อกับ condenser ที่บรรจุอยู่ใน Dewer flask ภายใน Dewer flask มีน้ำแข็งแห้งผสมแอลกอฮอล์อยู่ ส่วน condenser จะมีส่วนหนึ่งต่อกับ Vaccum pump ซึ่งจะใช้ดึงน้ำออกจากเซลจุลินทรีย์ด้วยการใช้แรงดัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือจนกว่าเชื้อจุลินทรีย์จนแห้งสนิท จากนั้นปิดหลอดโดยการใช้จุกยางแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.9.3 นำมาเจือจางโดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร โดยการทำ Plate count และ Pour plate ด้วยอาหารแข็ง NA จากนั้นนำไปใส่ในถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ขนาด 96 หลุม พร้อมกับอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับไก่เล็ก ไก่ใหญ่ หมู และ กุ้ง และ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย ตามอัตราส่วนดังตารางที่ 3.4

3.9.4 นำมาเจือจางโดยใช้อาหารเหลว NB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร โดยการวัดค่า OD 600 นาโนเมตร จากนั้นนำไปใส่ในถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ขนาด 96 หลุม พร้อมกับอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับไก่เล็ก ไก่ใหญ่ หมู และ กุ้ง และ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย ตามอัตราส่วนดังตารางที่ 3.4

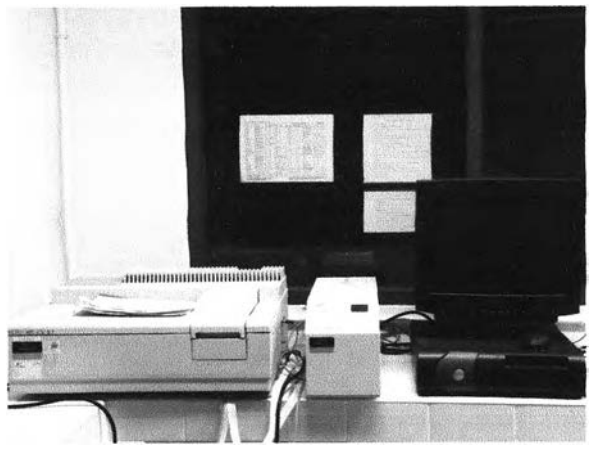
3.9.5 นำถาดหลุมทดสอบหลังผ่านการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เกิดสีและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยเทียบกับหลุมควบคุม คือหลุมสำหรับปลอด

เชื้อ *E.Coli* DH5α λpir (Negative control) และหลุมสำหรับปลอดยาฟูราโซลิโดน (Positive control) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์



รูปที่ 3.6 แสดงเครื่อง Lyophilization ที่ใช้ในการวิจัย

3.10 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบจากการใช้ตรวจสอบอาหารสัตว์เปรียบเทียบกับวิธี UV-Visible spectrophotometry



รูปที่ 3.7 แสดงเครื่อง UV-Visible spectrophotometry ที่ใช้ในการวิจัย

3.10.1 ชั่งอาหารกุ้งลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-10 ใบละ 25 กรัม ที่มีสารละลายฟูราโซลิโดนเข้มข้นที่ 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 และ 1 ppm ตามลำดับ ลงในแต่ละบีกเกอร์ใบละ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟูราโซลิโดนที่ 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 และ0.1 ppm ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน กำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนเฮกเซนทิ้งไป ทำซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่ตรวจได้

บีกเกอร์ใบที่ 11 มีเฉพาะอาหารกุ้งเพื่อเป็น Blank เติมน้ำกลั่นปริมาตร 225 มิลลิลิตร กำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนเฮกเซนทิ้งไป ทำซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่ตรวจโดยวิธี UV-Visible spectrophotometry

รูปที่ 3.8 แสดงตัวอย่างอาหารกุ้งที่ใช้ในการทดลอง

3.10.2 ชั่งอาหารไก่เล็กลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-10 ใบละ 25 กรัม ที่มีสารละลายฟูราโซลิโดนเข้มข้นที่ 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 และ 1 ppm ตามลำดับ ลงในแต่ละบีกเกอร์ใบละ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟูราโซลิโดนที่ 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 และ0.1 ppm ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน กำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนเฮกเซนทิ้งไป ทำซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอนและทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่ตรวจได้

บีกเกอร์ใบที่ 11 มีเฉพาะอาหารไก่เล็กเพื่อเป็น Blank เติมน้ำกลั่นปริมาตร 225 มิลลิลิตร กำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนเฮกเซนทิ้งไป ทำซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่ตรวจโดยวิธี UV-Visible spectrophotometry

รูปที่ 3.9 แสดงตัวอย่างอาหารไก่เล็กที่ใช้ในการทดลอง

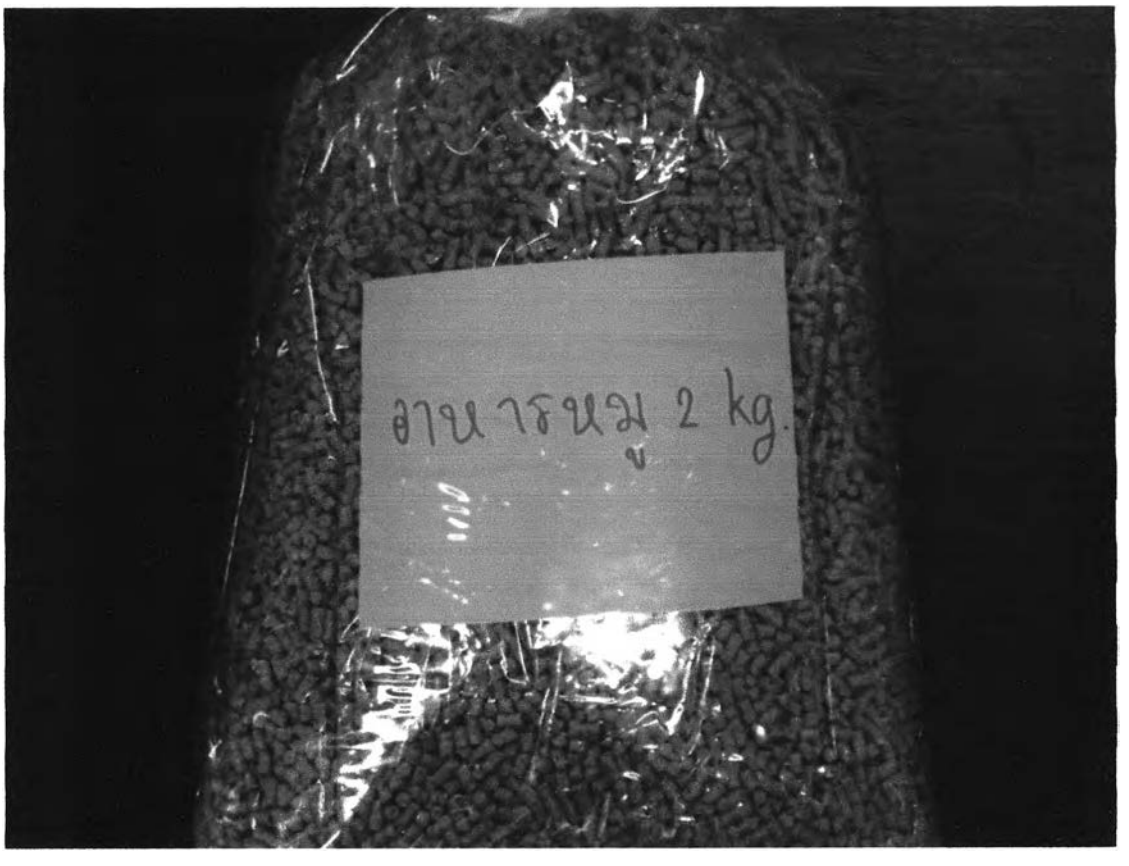
3.10.3 ชั่งอาหารไก่ใหญ่ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-10 ใบละ 25 กรัม ที่มีสารละลายฟูราโซลิโดนเข้มข้นที่ 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 และ 1 ppm ตามลำดับ ลงในแต่ละบีกเกอร์ใบละ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟูราโซลิโดนที่ 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 และ0.1 ppm ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน กำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนเฮกเซนทิ้งไป ทำซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอนและทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่ตรวจได้

บีกเกอร์ใบที่ 11 มีเฉพาะอาหารไก่ใหญ่เพื่อเป็น Blank เติมน้ำกลั่นปริมาตร 225 มิลลิลิตรกำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนเฮกเซนทิ้งไป ทำซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอนและทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่ตรวจโดยวิธี UV-Visible spectrophotometry

รูปที่ 3.10 แสดงตัวอย่างอาหารไก่ใหญ่ที่ใช้ในการทดลอง

3.10.4 ชั่งอาหารหมูลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-10 ใบละ 25 กรัม ที่มีสารละลายฟูราโซลิโดนเข้มข้นที่ 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 และ 1 ppm ตามลำดับ ลงในแต่ละบีกเกอร์ใบละ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟูราโซลิโดนที่ 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 และ0.1 ppm ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน กำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนเฮกเซนทิ้งไป ทำซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอนและทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่ตรวจได้

บีกเกอร์ใบที่ 11 มีเฉพาะอาหารไก่หมูเพื่อเป็น Blank เติมน้ำกลั่นปริมาตร 225 มิลลิลิตรกำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนเฮกเซนทิ้งไป ทำซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอนและทดสอบเพื่อหาค่าต่ำสุดที่ตรวจโดยวิธี UV-Visible spectrophotometry



รูปที่ 3.11 แสดงตัวอย่างอาหารหมูที่ใช้ในการทดลอง

3.10.5 ปิเปตสารละลายที่ได้จากการกรอง และ blank ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างอาหารกุ้ง อาหารไก่เล็ก อาหารไก่ใหญ่ และอาหารหมู นำไปตรวจสอบทุกระดับความเข้มข้นด้วย ชุดตรวจสอบเพื่อตรวจหาค่าต่ำสุดที่ตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ *E.Coli* DH5α λpir เป็นดัชนี

3.10.6 นำ *E.Coli* DH5α λpir มาเจือจางโดยใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร โดยการวัดค่า OD 600 นาโนเมตร จากนั้นนำไปใส่ในถาดหลุมพลาสติกปลอดเชื้อ (Microtirtre Plate) ขนาด 96 หลุม พร้อมกับอาหารสัตว์สำเร็จรูปสำหรับไก่เล็ก ไก่ใหญ่ หมู และ กุ้ง และ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย ตามอัตราส่วนดังตารางที่ 3.4

3.10.7 นำถาดหลุมทดสอบหลังผ่านการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เกิดสีและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยเทียบกับหลุมควบคุม คือหลุมสำหรับปลอดเชื้อ *E.Coli* DH5α λpir (Negative control) และหลุมสำหรับปลอดยาฟูราโซลิโดน (Positive control) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

3.11 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ โดยวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบผลการตรวจฟูราโซลิโดน ระหว่างวิธีทาง UV-Visible spectrophotometry กับชุดตรวจสอบเพื่อตรวจหาค่าต่ำสุดที่ตรวจสอบโดยใช้ *E.Coli* DH5α λpir เป็นดัชนีที่พัฒนาขึ้น โดยการตรวจอาหารสัตว์ (unknown samples) ที่ได้จากผู้ขาย จำนวน 100 ตัวอย่างแล้วนำมาค่าที่ได้วิเคราะห์ค่าสถิติได้แก่ ค่าความแม่นยำ (relative accuracy) ความไว (relative sensitivity) ความจำเพาะ (relative specificity) และวิเคราะห์ค่าสถิติ Kappa coefficient (k) (Cohen, 1960) เพื่อประเมินระดับของการยอมรับหรือ ความน่าเชื่อถือ (Landis and Koch, 1977)

การทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบจะทำการวิเคราะห์จากผลการตรวจของ ชุดตรวจสอบอาหารสัตว์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา แล้วคำนวณค่าโดยใช้ตารางแจกแจงความถี่แบบ 2 ทาง ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 แสดงการเปรียบเทียบผลระหว่างวิธีทาง UV-Visible spectrophotometry กับชุดตรวจสอบเพื่อตรวจหาค่าต่ำสุดที่ตรวจสอบโดยใช้ *E.Coli* DH5α λpir เป็นดัชนี

ผลการตรวจสอบอาหารสัตว์		วิธี UV-Visible spectrophotometry	
		ผลบวก	ผลลบ
ชุดตรวจสอบ	ผลบวก	true positive TP (a)	false positive FP(c)
	ผลลบ	false negative FN (b)	true negative TN (d)

True Positive (a) คือ ได้ผลบวกจากชุดตรวจสอบตรงกับค่าที่ได้จากวิธี UV-Visible spectrophotometry

False Negative (b) คือ ได้ผลบวกจากชุดตรวจสอบแต่ไม่ตรงกับค่าจากจากวิธี UV-Visible spectrophotometry

False Positive (c) คือ ได้ผลลบจากชุดตรวจสอบแต่ไม่ตรงกับค่าจากวิธี UV-Visible spectrophotometry

True Negative (d) คือ ได้ผลลบจากชุดตรวจสอบตรงกับวิธี UV-Visible spectrophotometry

ความแม่นยำสัมพัทธ์ (Relative Accuracy) ซึ่งหมายถึง ความแม่นยำของชุดตรวจสอบ

$$\text{ความแม่นยำสัมพัทธ์ (Relative Accuracy)} = \frac{(TP + TN) \times 100\ \%}{(TP + FP + FN + TN)}$$

ค่าความไวสัมพัทธ์ (Relative Sensitivity) ซึ่งหมายถึง ความสามารถของชุดตรวจสอบในการตรวจพบยาต้านจุลชีพตกค้างถ้ามีการให้แก่สัตว์จริง

$$\text{ความไวสัมพัทธ์ (Relative Sensitivity)} = \frac{TP \times 100\ \%}{TP + FN}$$

ค่าความจำเพาะสัมพัทธ์ (Relative Specificity) ซึ่งหมายถึง ความสามารถของชุดตรวจสอบในการตรวจไม่พบยาต้านจุลชีพตกค้างถ้าไม่มีการให้แก่สัตว์จริง

$$\text{ความจำเพาะสัมพัทธ์ (Relative Specificity)} = \frac{TN \times 100\ \%}{TN+FP}$$

ค่าสถิติ Kappa coefficient (k) (เพื่อประเมินการยอมรับ หรือ ความน่าเชื่อถือของชุดทดสอบ

$$\text{Kappa coefficient (k)} = \frac{2\ (ad - bc)}{(a + b)\ (b + d) + (a + c)(c + d)}$$

3.12 ทดสอบระยะเวลาการเก็บรักษาชุดตรวจสอบเป็นระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9 เดือนที่เก็บในสภาพอุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส

3.10.1 วิเคราะห์ความแม่นยำของค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ตรวจได้จากตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบและปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบหลังการเก็บรักษา *E.Coli* DH5α λpir ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งเป็นระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9 เดือน ตามวิธีข้อ 3.6

3.10.2 วิเคราะห์ความแม่นยำของค่าต่ำสุดของฟูราโซลิโดนที่ตรวจได้จากตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบและปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบหลังการเก็บรักษา 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ในรูปสารละลายตามภาคผนวก ค เป็นระยะเวลา 1, 3, 6 และ 9 เดือน ตามวิธีข้อ 3.6