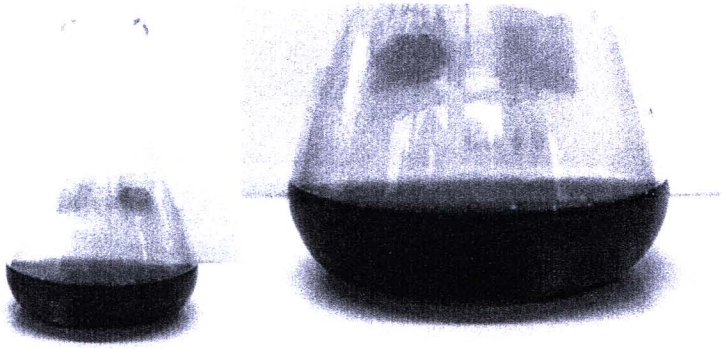
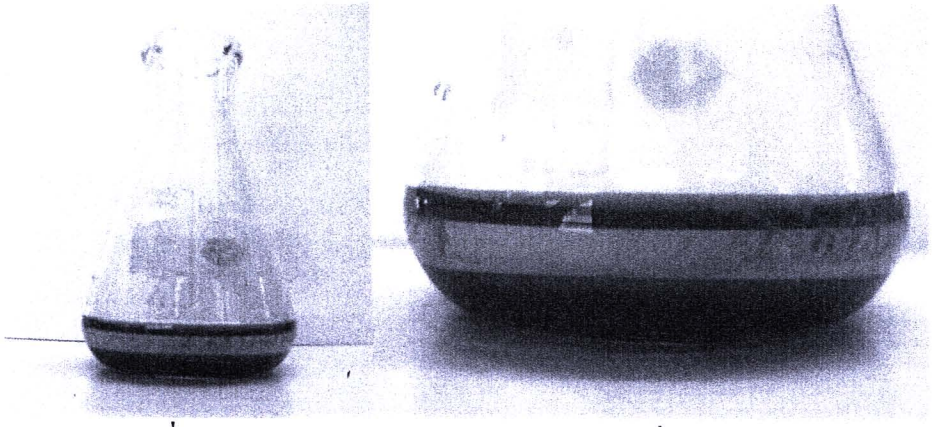
บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน

การสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน (FDS-NPs) โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจล โดยใช้วิธีการสังเคราะห์ของ ธัญภัค สุวรรณชาติ (2551) จากการทดลองพบว่าปัจจัยที่ประกอบด้วย cyclohexane, n-Hexanol, Triton X-100, 20 mM RuBpy dye solution, TEOS และNH_4OH (NH_3 30; wt%) ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ในระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน มีลักษณะเป็นสารสีส้มใสสามารถมองทะลุผ่านได้ และมีความเสถียร คือสามารถคงความเป็นไมโครอิมัลชันได้นานในระบบปิด หลังจากการเติมอะซิโตน (Acetone) เพื่อหยุดปฏิกิริยาทั้งหมดในระบบไมโครอิมัลชัน พบว่าในระบบอิมัลชันที่เสถียร จะเกิดการตกตะกอนของอนุภาค FDS-NPs มีลักษณะคล้ายเจลใสสีส้ม (รูปที่ 4.2)

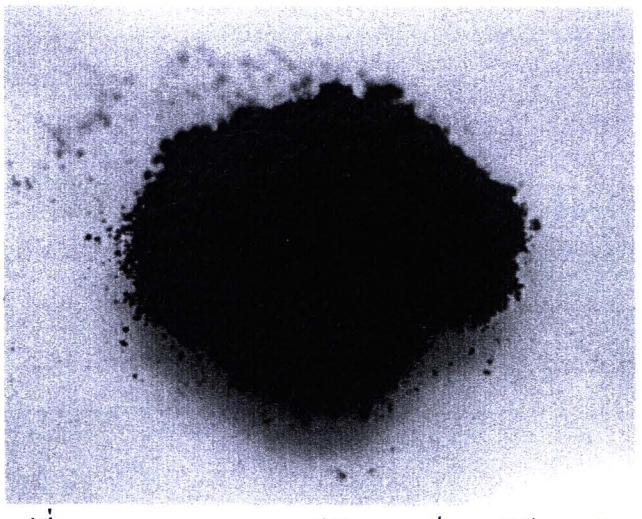


รูปที่ 4.1 การสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ด้วยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน



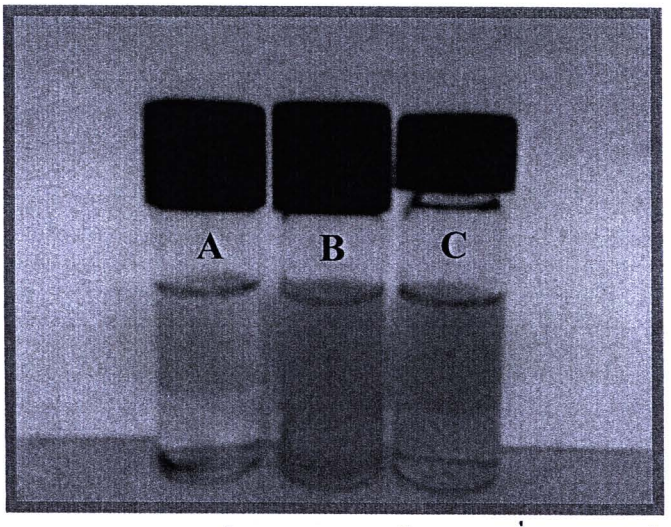
รูปที่ 4.2 อนุภาค FDS-NPs เกิดการตกตะกอนเมื่อเติมอะซิโตน

การปั่นเหวี่ยงตกตะกอน และล้างอนุภาค FDS-NPs เพื่อกำจัดสารลดแรงตึงผิว และสีส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน หรือนำไปอบที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บดให้ละเอียดโดยใช้แท่งแก้ว พบว่าอนุภาค FDS-NPs มีลักษณะเป็นผงสีส้มละเอียด (รูปที่ 4.3)



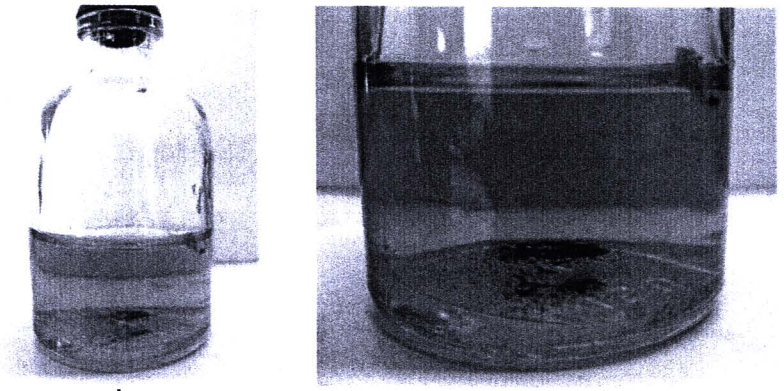
รูปที่ 4.3 อนุภาค FDS-NPs มีลักษณะเป็นผงสีส้มละเอียด

อนุภาค FDS-NPs ก่อนนำไปวิเคราะห์ นำไปละลายใน 95% Ethanol และทำให้กระจายตัวออกจากกัน (Disperse) โดยใช้เครื่อง Ultrasonic probe จะได้อนุภาค FDS-NPs ที่มีความเสถียร กระจายตัวอยู่ใน 95% Ethanol อย่างคงตัว สามารถนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆของอนุภาค FDS-NPs (ดังรูปที่ 4.4)



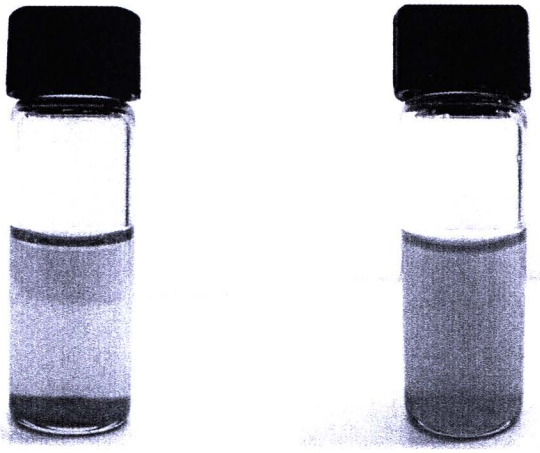
รูปที่ 4.4 อนุภาค FDS-NPs ก่อน (A) และหลัง (B, C) ที่กระจายตัวใน 95% Ethanol

หลังจากนั้นนำอนุภาค FDS-NPs ทำการดัดแปลงพื้นที่ผิวเพื่อให้เกิดหมู่ฟังก์ชันเอมีน, หมู่คาร์บอกซิล หลังจากขั้นตอนการเติมไนโตรเจน (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 อนุภาค FDS-NPs หลังจากเติมก๊าซไนโตรเจน

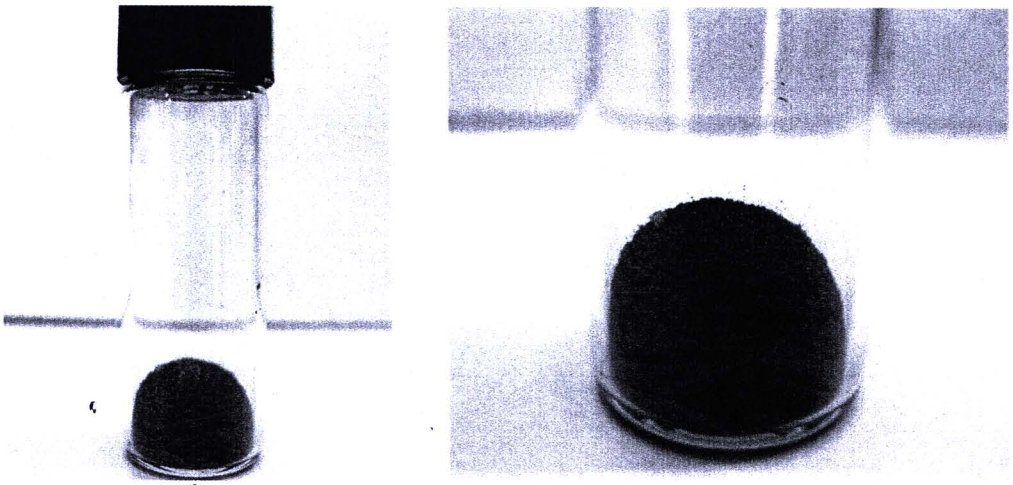
ทำการล้างอนุภาค FDS-NPs ด้วยน้ำ Deionized และเก็บในสารละลาย MES buffer เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ขนาด และการกระจายตัวภายใต้กล้อง TEM และตรวจวิเคราะห์ค่า Zeta potential (รูปที่ 4.6)



(A) (B)

รูปที่ 4.6 การเก็บอนุภาค FDS-NPs ในบับเฟอร์ก่อนการนำไปตรวจวิเคราะห์ (A) ก่อน และ (B) หลังทำให้กระจายใน MES buffer

นำอนุภาค FDS-NPs ไปทำแห้งอีกครั้งโดยการปั่นเหวี่ยง เพื่อให้ได้อนุภาค FDS-NPs ที่เป็นผงและนำไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้าง, วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันและวิเคราะห์ธาตุ (รูปที่ 4.7)

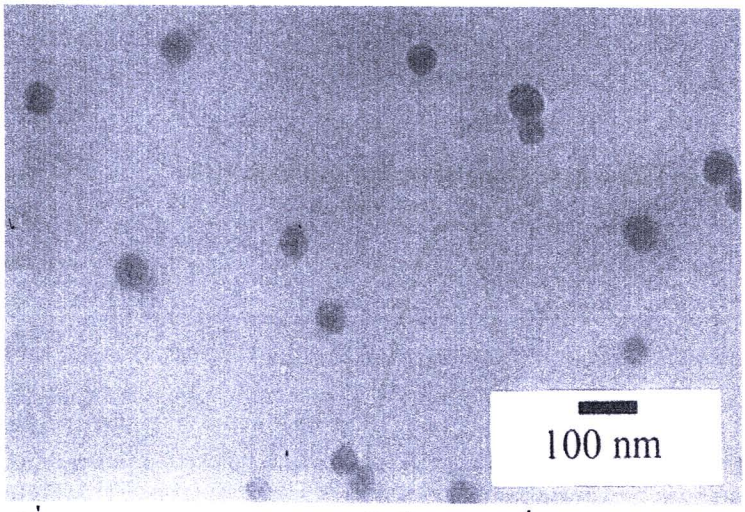


รูปที่ 4.7 อนุภาคแห้งก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์สมบัติของอนุภาค

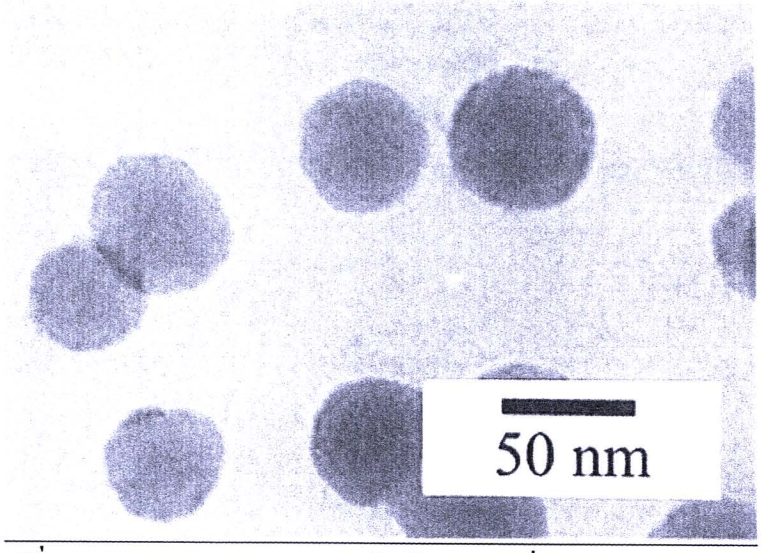
4.2 การวิเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนในด้านต่างๆ

4.2.1 การวิเคราะห์รูปร่างและขนาดของอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน

ผลการวิเคราะห์รูปร่างและขนาดของอนุภาค FDS-NPs โดยใช้วิธีการสังเคราะห์แบบไมโครอิมัลชันร่วมกับเทคนิคโซลเจล เมื่อนำอนุภาค FDS-NPs ไปส่องดูลักษณะอนุภาคกับเครื่อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x และ 100,000x พบว่าลักษณะอนุภาค FDS-NPs มีการกระจายตัวดี เป็นทรงกลม มีขนาดของอนุภาคสม่ำเสมอ และมีสี Rubpy dye แทรกอยู่ภายในอนุภาค ดังรูปที่ 4.8-4.9



รูปที่ 4.8 อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x



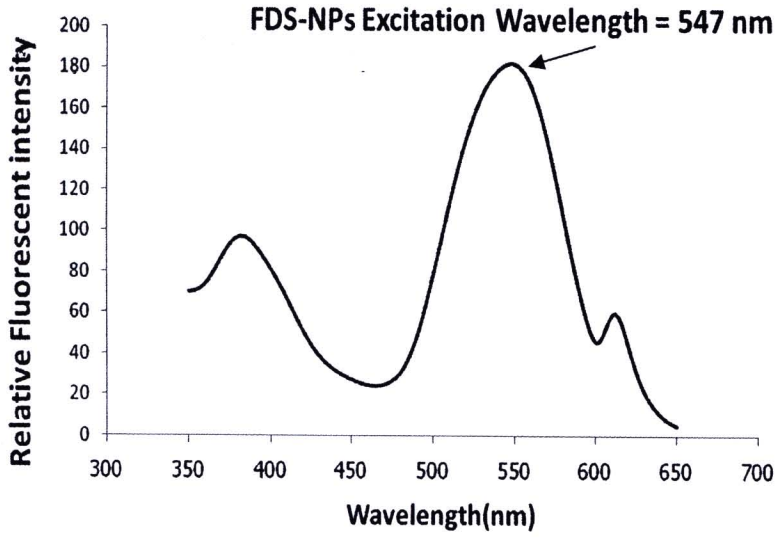
รูปที่ 4.9 อนุภาค FDS-NPs ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 100,000x

ผลการวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs และขนาดของอนุภาค FDS-NP โดยใช้ปัจจัยที่ประกอบด้วย cyclohexane, n-Hexanol, Triton X-100, 20 mM RuBpy dye solution, TEOS และ NH_4OH (NH_3 30 ; wt%) ในการสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs พบว่าการกระจายตัวของเส้นผ่าน

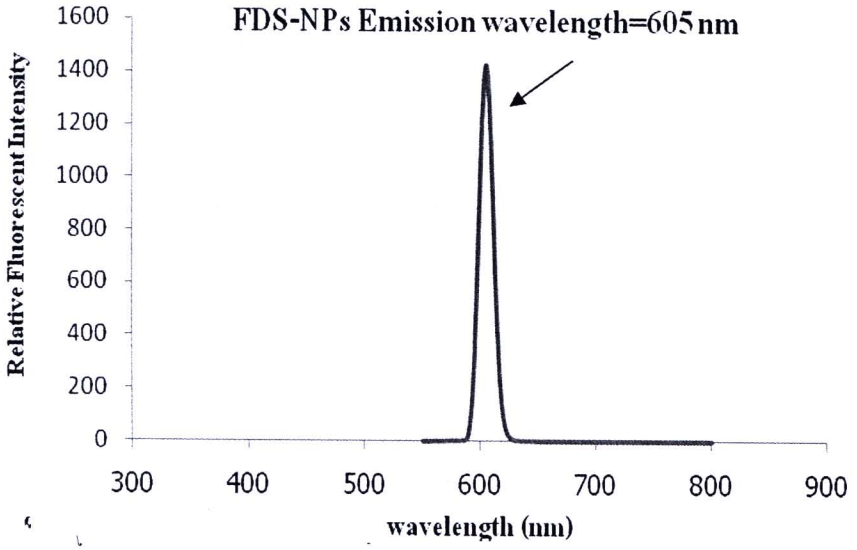
ศูนย์กลางของอนุภาค FDS-NPs อยู่ในช่วง 38 nm ถึง 47 nm ค่าเฉลี่ยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค FDS-NPs มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 43 ± 2 nm

4.2.2 ผลความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น และความยาวช่วงคลื่นที่ใช้ในการเรืองแสง

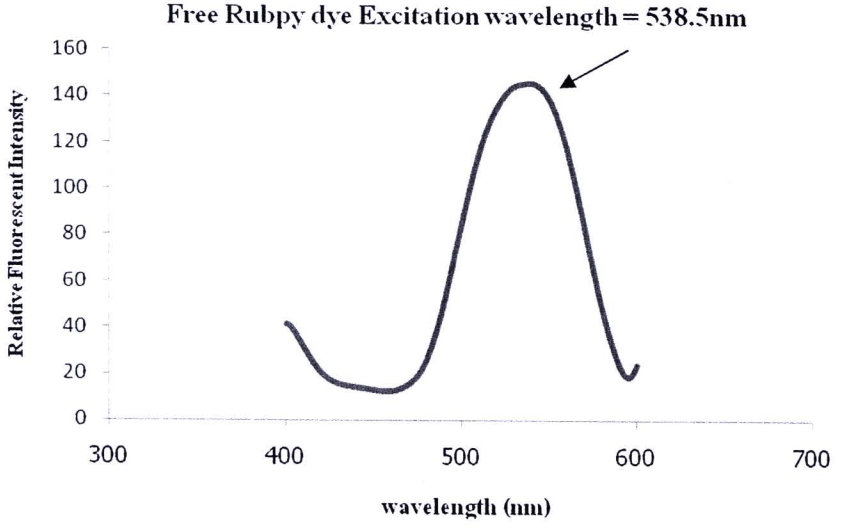
การตรวจวิเคราะห์ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (Excitation wavelength) และความยาวคลื่นที่ใช้ในการเรืองแสง (Emission wavelength) ของอนุภาค FDS-NPs พบว่ามีค่าเท่ากับ 547 nm และ 605 nm ตามลำดับ Free Rubpy dye ที่มีค่าเท่ากับ 538.5 nm และ 595.5 nm ซึ่งมีค่าคลาดเคลื่อนไปเพียง 8.5 nm และ 9.5 nm ตามลำดับ (รูปที่4.10-4.13)



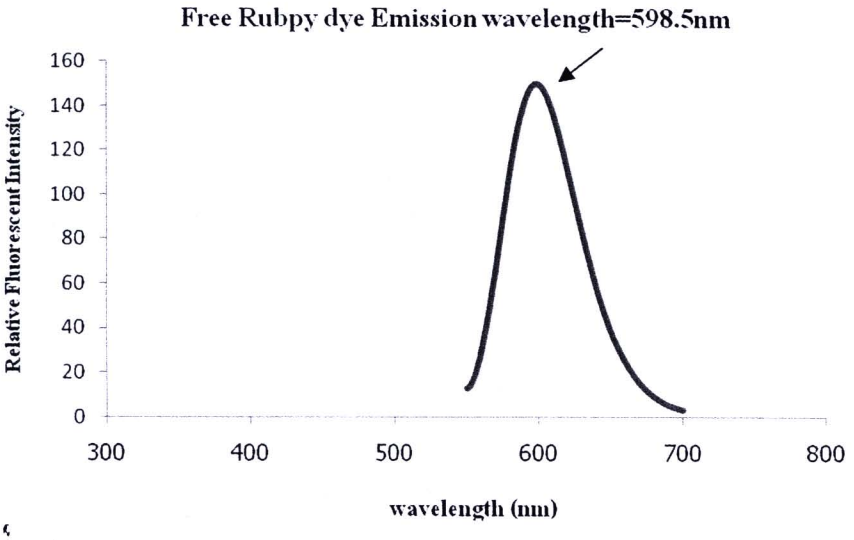
รูปที่ 4.10 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (Excitation wavelength) ของอนุภาค FDS-PNs



รูปที่ 4.11 ความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสง (Emission wavelength) ของอนุภาค FDS-NPs



รูปที่ 4.12 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (Excitation wavelength) ของ Free Rubpy dye

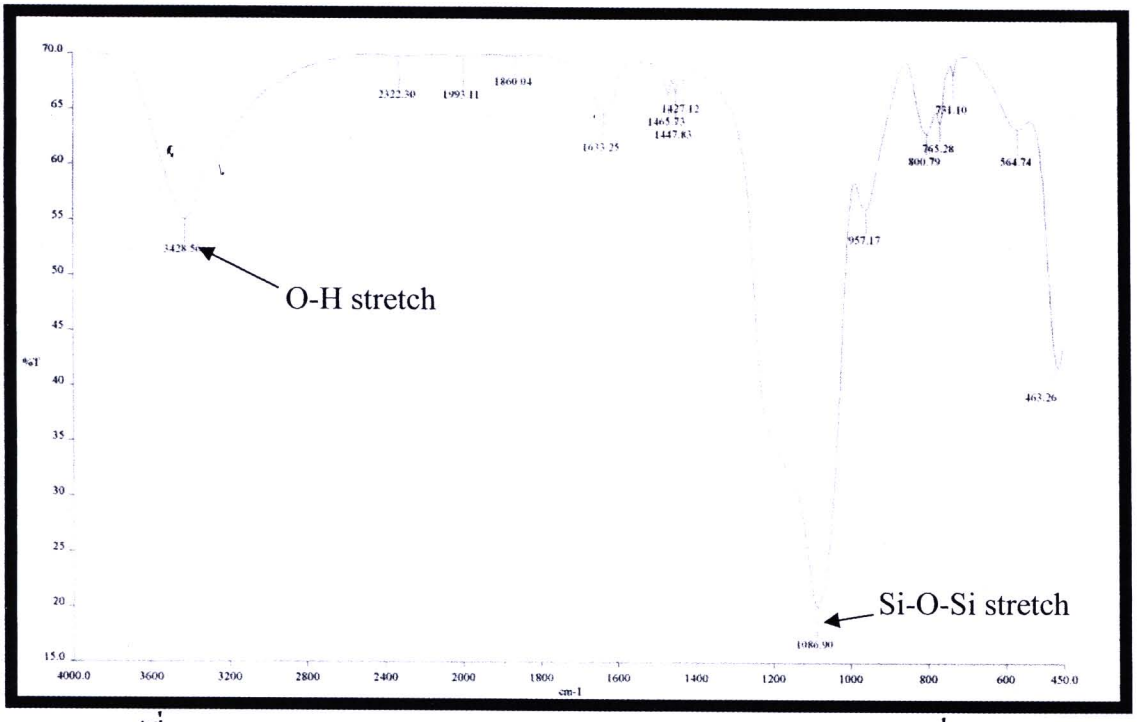


รูปที่ 4.13 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (Emission wavelength) ของ Free Rubpy dye

4.3 การดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน

4.3.1 อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนก่อนดัดแปลงพันธะเคมี

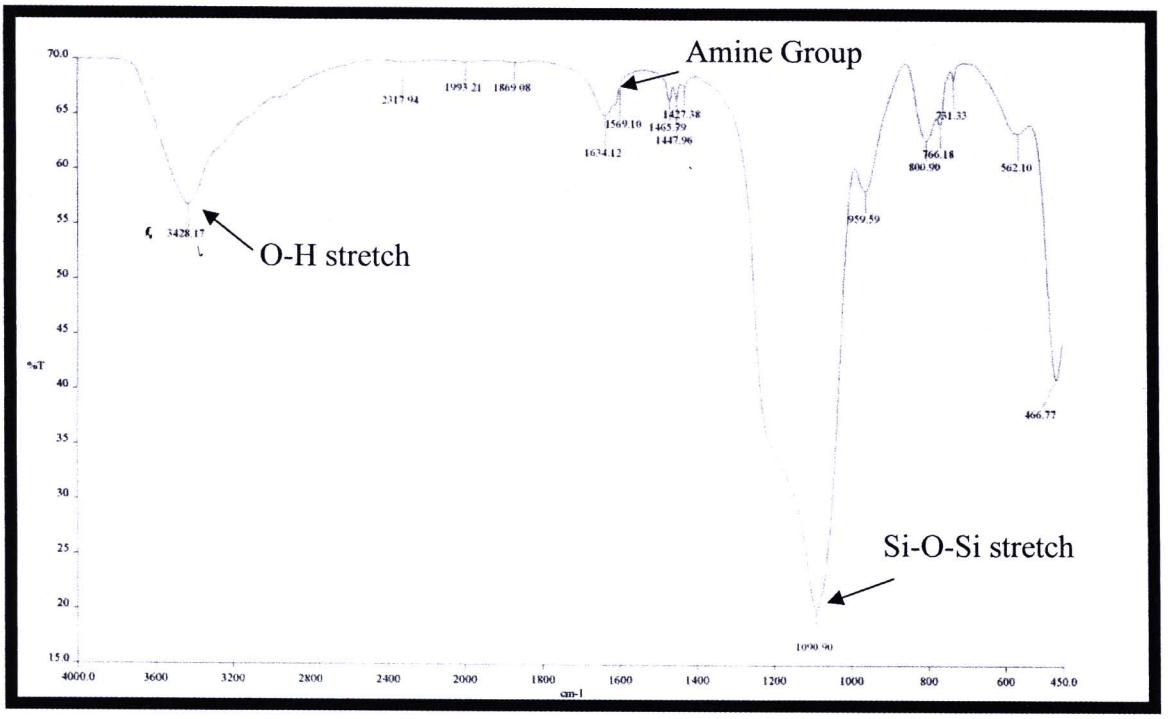
เมื่อนำอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้ และยังไม่ผ่านการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาค มาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง FTIR พบว่าประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 3,600-3,200 cm^{-1} และหมู่ซิลิกา (Si-O-Si) ที่ความยาวคลื่น 1,086.90 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างของซิลิกา (รูปที่ 4.14) (ธัญภัค สุวรรณชาติ, 2551)



รูปที่ 4.14 FTIR spectrum ของอนุภาค FDS-NPs ก่อนดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค

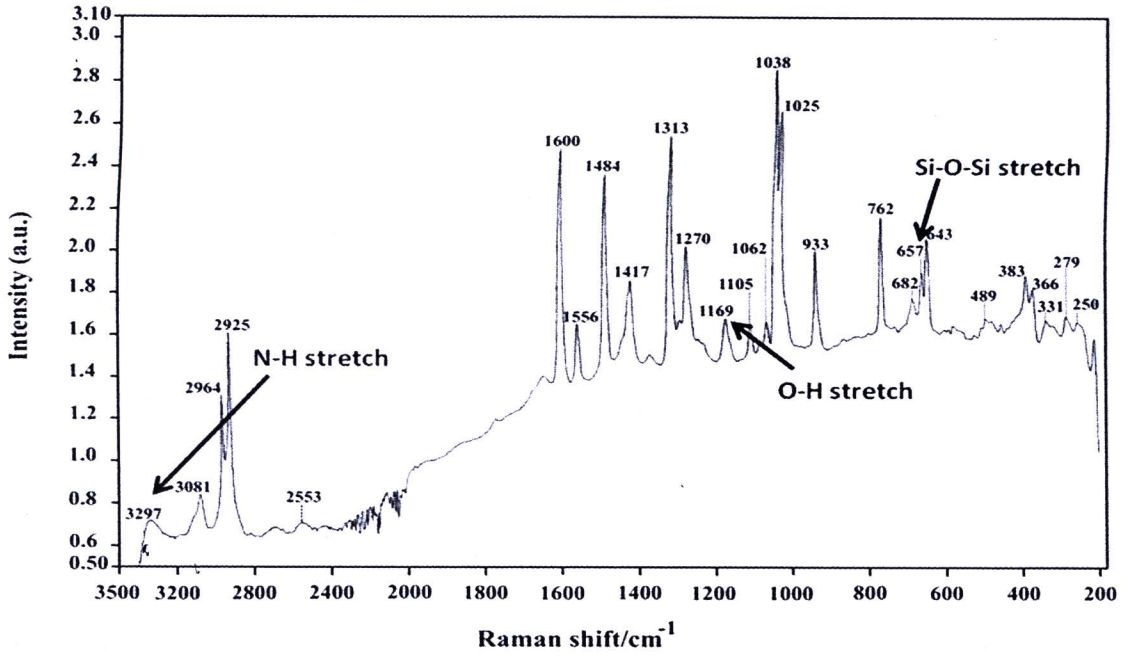
4.3.2 อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนที่ดัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีน

ผลการวิเคราะห์ฟังก์ชันของอนุภาค FDS-NPs หลังจากดัดแปลงหมู่พันธะเคมีที่ผิวของอนุภาค FDS-NPs ด้วย Trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) (รูปที่ 4.15) ซึ่งจะสามารถเปรียบเทียบกับสเปกตัมของอนุภาค FDS-NPs ที่ยังไม่ได้ดัดแปลงพันธะเคมีใดๆ พบว่ามีความแตกต่างของสเปกตัมตรงบริเวณความยาวคลื่น 1,569.10 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งของหมู่เอมีน



รูปที่ 4.15 FTIR spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีน

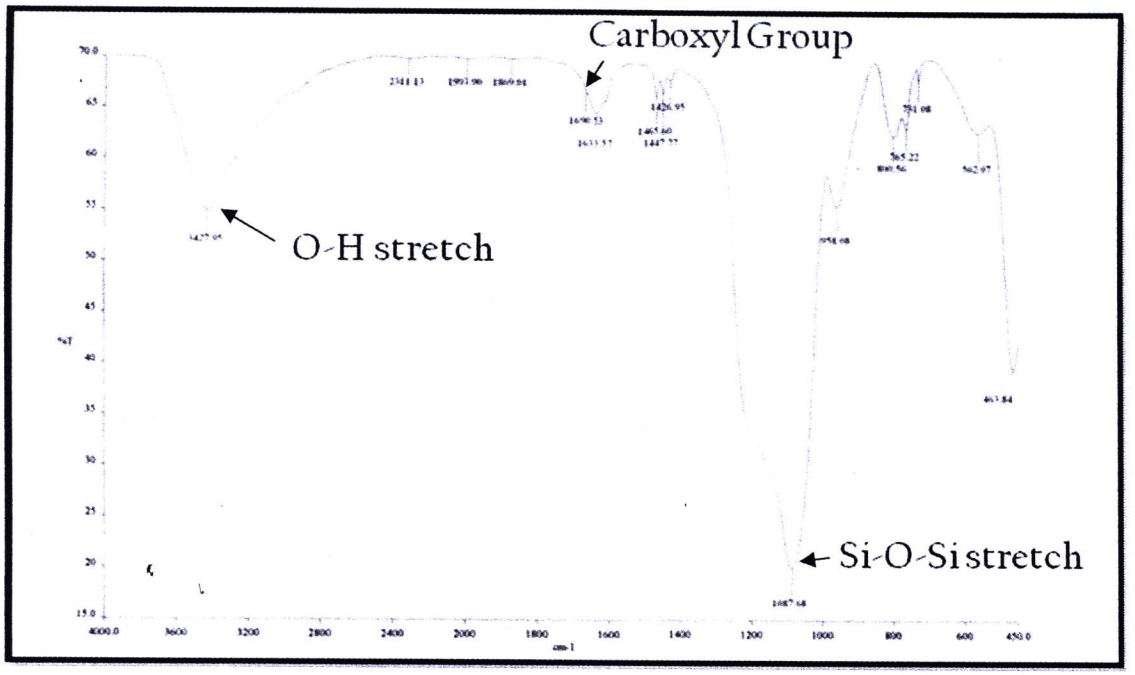
แต่ผลการทดลองดังกล่าวปรากฏ N-H stretch (Amine group) การตรวจวิเคราะห์ของเครื่อง FTIR spectrometer ไม่ชัดเจนจึงทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-Raman spectrometer (รูปที่ 4.16) เพื่อให้พบหมู่ N-H stretch (Amine group) ชัดเจนมากขึ้น โดยพบหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ที่ 1,150-1,170 cm^{-1} หมู่ซิลิกา (Si-O-Si) ที่ 650 cm^{-1} และยังพบหมู่เอมีน (N-H stretch) ที่ 3,297.88cm^{-1} ซึ่งพีคสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Shurvell, 2008; แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2539)



รูปที่4.16 FT-Raman spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีน

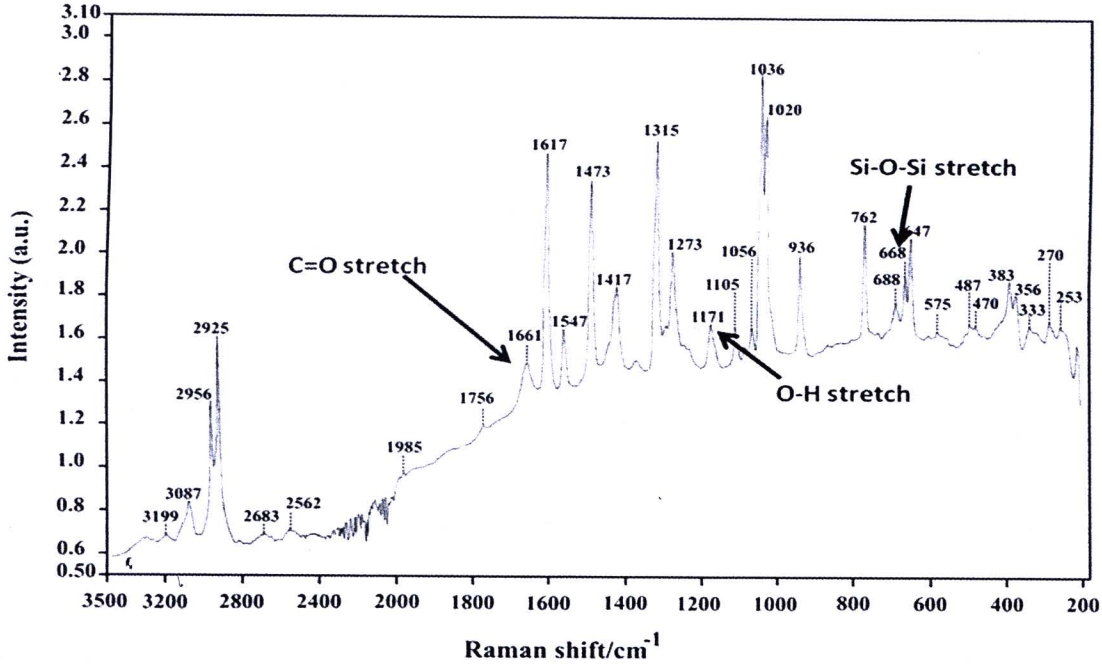
4.3.3 อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนที่ดัดแปลงให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

จากการวิเคราะห์อนุภาค FDS-NPs หลังจากดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวของอนุภาค FDS-NPs ด้วย Trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) เพื่อเป็นการกระตุ้นหมู่เอมีนก่อน หลังจากนั้นใช้ Succinic anhydride เพื่อทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลขึ้นแทนที่หมู่เอมีน (รูป 4.17) พบว่าสเปกตัมที่แสดงมีความแตกต่างออกไป อนุภาค FDS-NPs ที่ยังไม่ดัดแปลงหมู่พันธะเคมี (รูปที่ 4.14) พบพีคเกิดขึ้นที่ความยาวช่วงคลื่น 1,690.53 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคแสดงพันธะเคมีของหมู่คาร์บอกซิลิก (Carboxyl Group) แสดงว่าสามารถติดหมู่คาร์บอกซิลที่ผิวของอนุภาค FDS-NPs ได้



รูปที่ 4.17 FTIR spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

แต่ผลการทดลองดังกล่าวปรากฏ C=O stretch (Carboxyl group) ไม่ชัดเจนในการตรวจวิเคราะห์ของเครื่อง FTIR spectrometer จึงทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-Raman spectrometer (รูปที่ 4.18) เพื่อให้พบหมู่ C=O stretch (Carboxyl group) ชัดเจนมากขึ้น ผลปรากฏว่าพบ หมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ที่ 1,150-1,170 cm^{-1} หมู่ซิลิกา (Si-O-Si) ที่ 688.63 cm^{-1} และยังพบหมู่คาร์บอกซิล (C=O stretch) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 1,617.34cm^{-1}

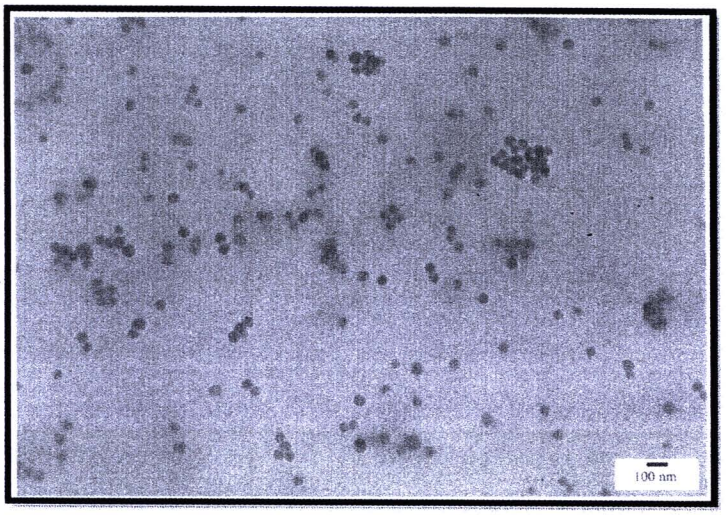


รูปที่ 4.18 FT-Raman spectrum ของอนุภาค FDS-NPs หลังดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

4.4การเกาะกลุ่มของอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน และแอนติบอดี

4.4.1การเกาะกลุ่มระหว่างอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนในการสังเคราะห์อนุภาค

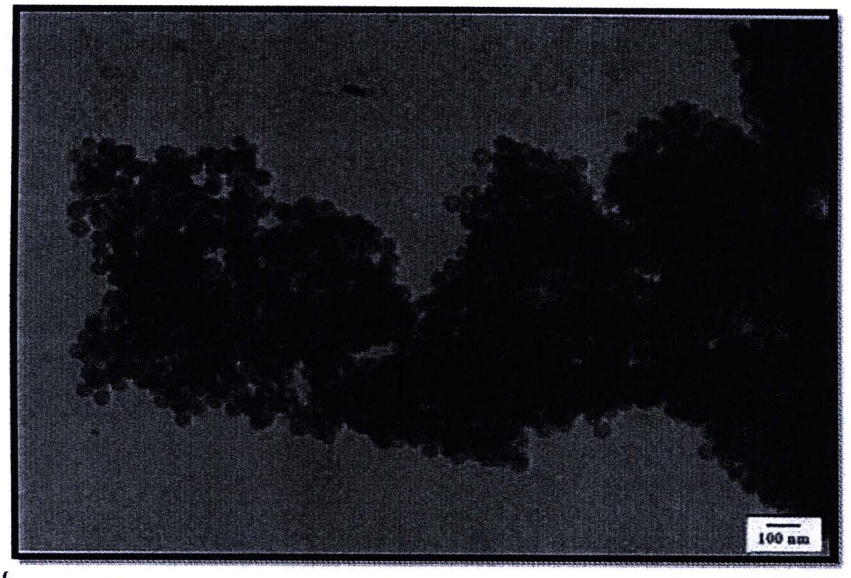
พบว่าการกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคนั้นมีการกระจายตัวสม่ำเสมอดี แต่พบการเกาะกลุ่มบ้าง แต่สามารถทำให้กระจายได้ด้วย sonicate probe (รูปที่4.19)



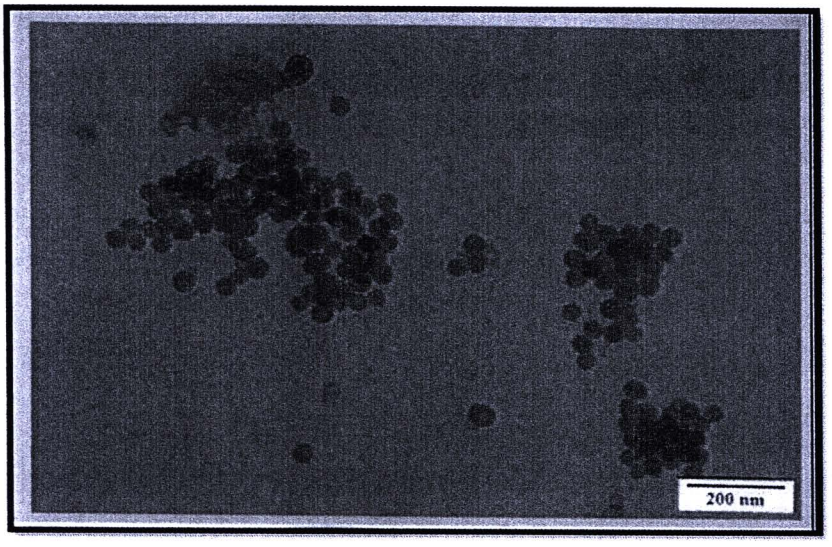
รูปที่4.19 แสดงการกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการสังเคราะห์ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x

4.4.2การเกาะกลุ่มระหว่างอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนในการดัดแปลงพันธะเคมี

พบว่าหลังจากการดัดแปลงพันธะเคมีเกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาค FDS-NPs (รูปที่4.20-4.21) การดัดแปลงพันธะเคมีโดยดัดแปลงให้เกิดหมู่เอมีนโดยใช้ Trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) ซึ่งทำให้ผิวของอนุภาค FDS-NPs เกิดมีประจุบวกเกิดขึ้น ทำให้การเกาะตัวกันของอนุภาค FDS-NPs เกิดขึ้น เนื่องจากการเกิดประจุบวกบริเวณผิวไม่สม่ำเสมอ จึงทำให้ยังมีประจุลบของอนุภาค FDS-NPs หลงเหลือจึงเกิดการเกาะตัวกันระหว่างอนุภาคด้วยพันธะไอออนิก (Ionic bond)



รูปที่4.20 การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการดัดแปลงหมู่เอมีนภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x

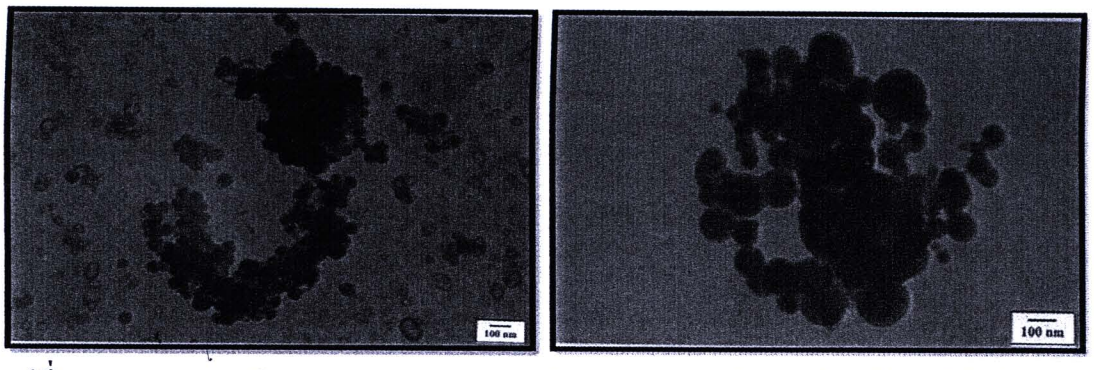


รูปที่4.21 การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิลภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 40,000x

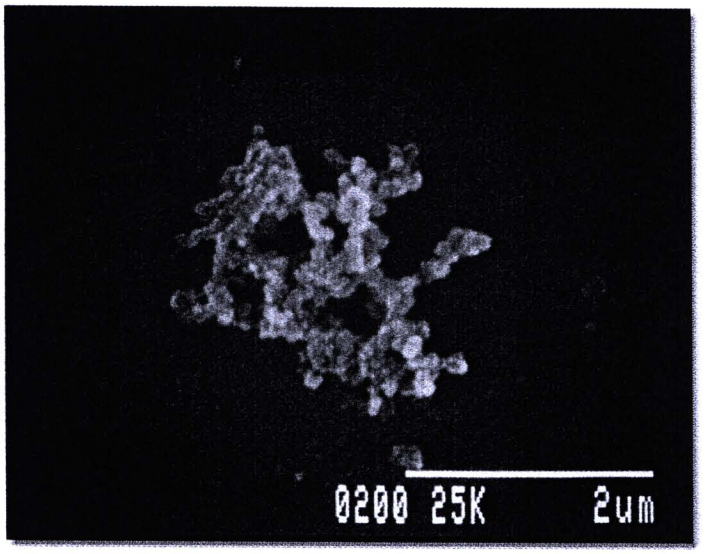
หลังจากผ่านการดัดแปลงหมู่เอมีนยังมีกระบวนการกระจายอนุภาค FDS-NPs โดยใช้เครื่อง sonicate probe และทำการดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิลโดยใช้ Succinic anhydride ซึ่งทำให้บริเวณผิวของอนุภาค FDS-NPs เกิดประจุลบ ซึ่งในขั้นตอนนี้ (รูปที่ 4.21)

4.4.3การเกาะกลุ่มระหว่างอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนในการติดแอนติบอดี

พบว่าหลังจากอนุภาค FDS-NPs ติดแอนติบอดีแล้วเกิดการเกาะตัวกันระหว่างอนุภาคมีมากขึ้น โดยจะมีแอนติบอดีเคลือบอนุภาค FDS-NPs อีกชั้นหนึ่ง (รูปที่4.22)



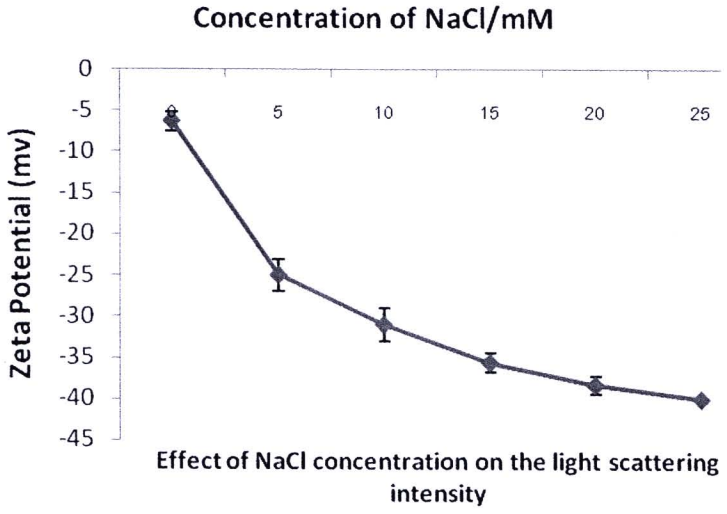
รูปที่4.22 การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการติดแอนติบอดี ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 60,000x



รูปที่4.23 การกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs ในกระบวนการติดแอนติบอดี ภายใต้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 25,000x

4.5การเกาะกลุ่มระหว่างอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนโดยใช้ Zeta potential

การตรวจสอบความกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs โดยเทียบจากความเข้มข้นตัวอย่างมาตรฐานกับความเข้มข้นของ NaCl ให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 mM ใน PBS buffer ในทุกสารละลายที่มี PBS buffer เกี่ยวข้อง ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Nano-sizer (Light scattering detector) (รูปที่ 4.24) พบว่าความเข้มข้นตัวอย่างมาตรฐานมีค่า zeta-potential เท่ากับ -6mv อยู่ในช่วง 30 ถึง-30 mV ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสารแขวนลอยที่ยังไม่เสถียร (ไม่เกิดแรงผลักระหว่างอนุภาค FDS-NPs) แต่ความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 10 mM ถึง 25 mM มีค่า zeta-potential น้อยกว่า -30 mV ซึ่งค่าดังกล่าวจะสามารถแสดงให้เห็นการเกาะตัวระหว่างอนุภาค FDS-NPs เป็นสารแขวนลอยที่มีความเสถียร (เกิดแรงผลักระหว่างอนุภาค FDS-NPs) ซึ่งค่าที่ให้ผลดีที่สุดคือค่า 10mM NaCl ใน PBS buffer ซึ่งใช้ในการเก็บอนุภาค FDS-NPs ที่ติดแอนติบอดีแล้ว ทำให้ลดการเกาะตัวกันของอนุภาค FDS-NPs ลงได้ และยังสามารถคงการทำงานของแอนติบอดีได้ ส่วนความเข้มข้นมากกว่านี้จะมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดี (Baoan, 2007)

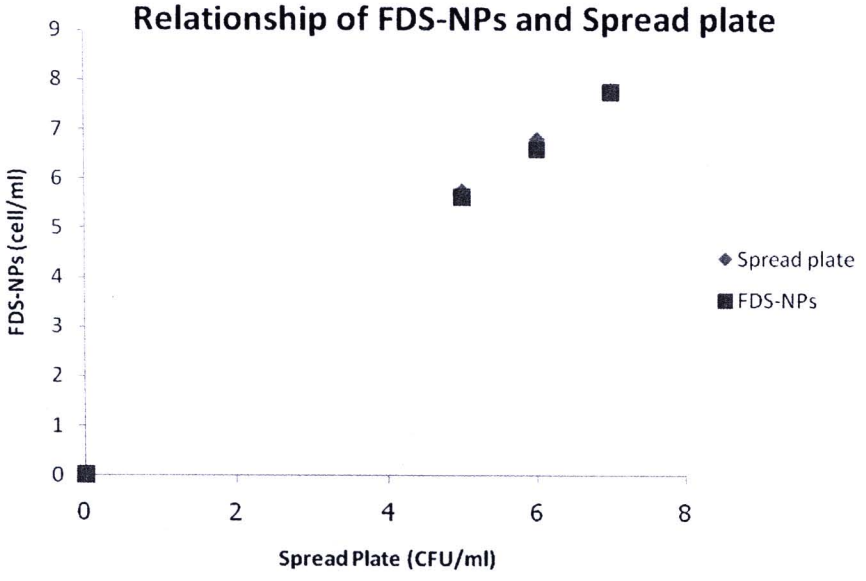


รูปที่4.24 แสดงความเข้มข้นของ NaCl ในระดับต่างๆ ตั้งแต่ 5 mM – 25 mM โดยกำหนดที่ 0 mM เป็นความเข้มข้นตัวอย่างมาตรฐาน

4.6 การตรวจประสิทธิภาพอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนกับตัวอย่างเชื้อ *C. jejuni* ในห้องปฏิบัติการ

4.6.1การเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน และวิธี spread plate กับตัวอย่างเชื้อ *C. jejuni* บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

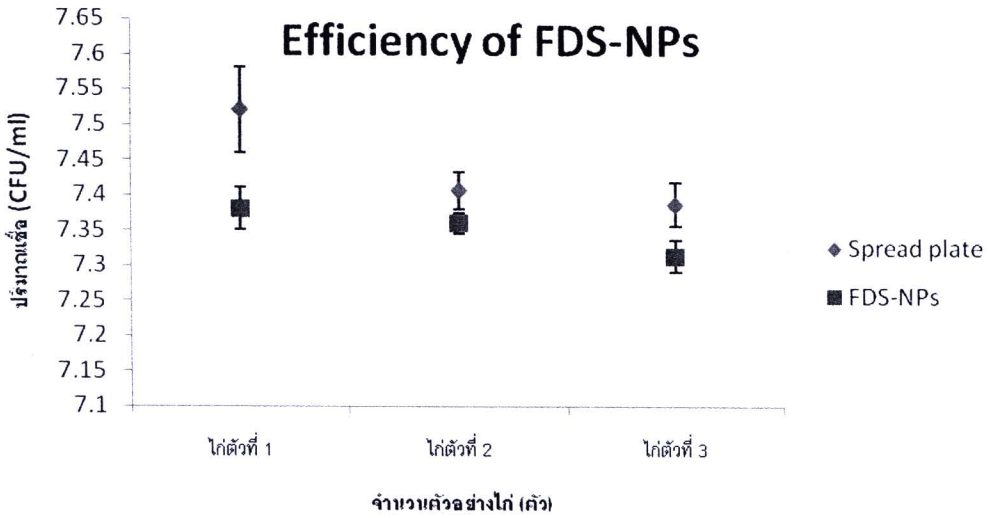
ผลการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาค FDS-NPs และวิธี Spread plate กับตัวอย่างเชื้อ *C. jejuni* บริสุทธิ์ โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ log 5 CFU/ml, log 6 CFU/ml, และlog 7 CFU/ml ตามลำดับ และทำการตรวจอนุภาค FDS-NPs โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Epifluorescence ร่วมกับ Petroff – Hausser counting chamber เพื่อใช้ทำการนับเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าผลการนับเชื้อวิธี Spread plate ที่ log 5 CFU/ml, log 6 CFU/ml, และ log 7 CFU/ml พบเชื้อเฉลี่ยปริมาณ (n=3) log 5.70±0.05, log 6.72±0.08 และ log 7.85±0.07 CFU/ml ตามลำดับ ส่วนอนุภาค FDS-NPs ตรวจพบเชื้อเฉลี่ยปริมาณ (n=3) log 5.66±0.03, log 6.60±0.03 และ log 7.76±0.07 CFU/ml ตามลำดับ



รูปที่ 4.25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอนุภาค FDS-NPs และวิธี Spread plate โดยใช้กับตัวอย่าง *C. jejuni* บริสุทธิ์

4.6.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน และวิธี spread plate กับเชื้อ *C. jejuni* ในตัวอย่างไก่ในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาค FDS-NPs และวิธี Spread plate กับเชื้อ *C. jejuni* ในตัวอย่างไก่ โดยทำการทดลองกับตัวอย่างไก่ 3 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณเชื้อ *C. jejuni* ในตัวอย่างไก่จะอยู่ในช่วง log 7.2 CFU/ml – log 7.6 CFU/ml จะเห็นว่าผลการทดลองวิธีอนุภาค FDS-NPs และวิธี Spread plate มีแนวโน้มสัมพันธ์กันในตัวอย่างไก่ที่ 2 (รูปที่ 4.26) ส่วนตัวอย่างไก่ที่ 1 และตัวอย่างไก่ที่ 3 มีแนวโน้มที่สัมพันธ์กันในตัวอย่างทั้งสอง แต่วิธีทั้งสองไม่มีความเกี่ยวข้องกัน ซึ่งผลจากรูปที่ 4.26 จะสอดคล้องกับตารางที่ 1 ที่แสดงความสัมพันธ์ในเชิงสถิติ โดยใช้ T-test ในการเปรียบเทียบวิธีอนุภาค FDS-NPs และวิธี Spread plate พบว่าในตัวอย่างไก่ที่ 1 และที่ 3 โดยใช้วิธีทั้งสองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ในตัวอย่างที่ 2 พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 4.26 แสดงแนวโน้มประสิทธิภาพของ FDS-NPs กับวิธี Spread plate (วิธีดั้งเดิม) ในตัวอย่างไก่

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบผลของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Spread plate และ อนุภาค FDS-NPs) ต่อจำนวน *C. jejuni* ในไก่ตัวที่ 1, 2 และ 3

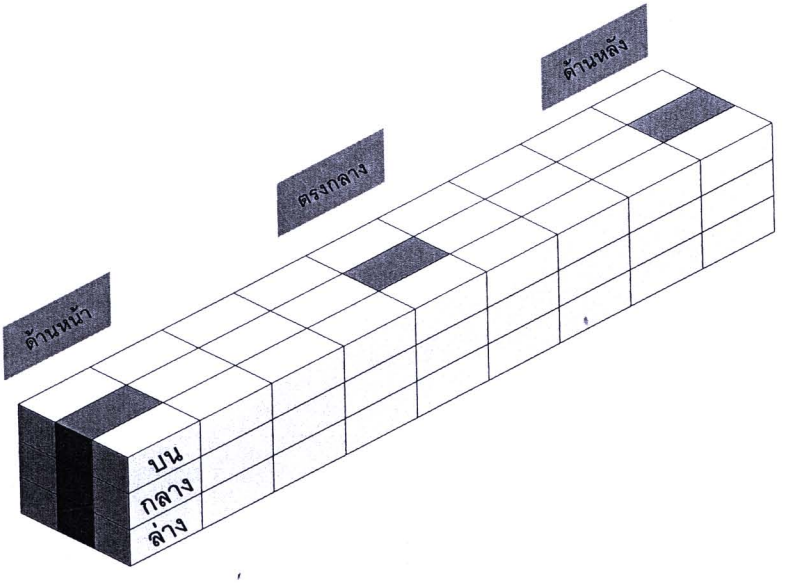
เทคนิค	จำนวน*C.jejuni* (log cfu/g)		
	ไก่ตัวที่ 1	ไก่ตัวที่ 2	ไก่ตัวที่ 3
Spread plate	7.52^{a}±.03	7.40^{a}±.02	7.38^{a}±.02
FDS-NPs	7.38^{b}±.06	7.36^{a}±.02	7.31^{b}±.03

* ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

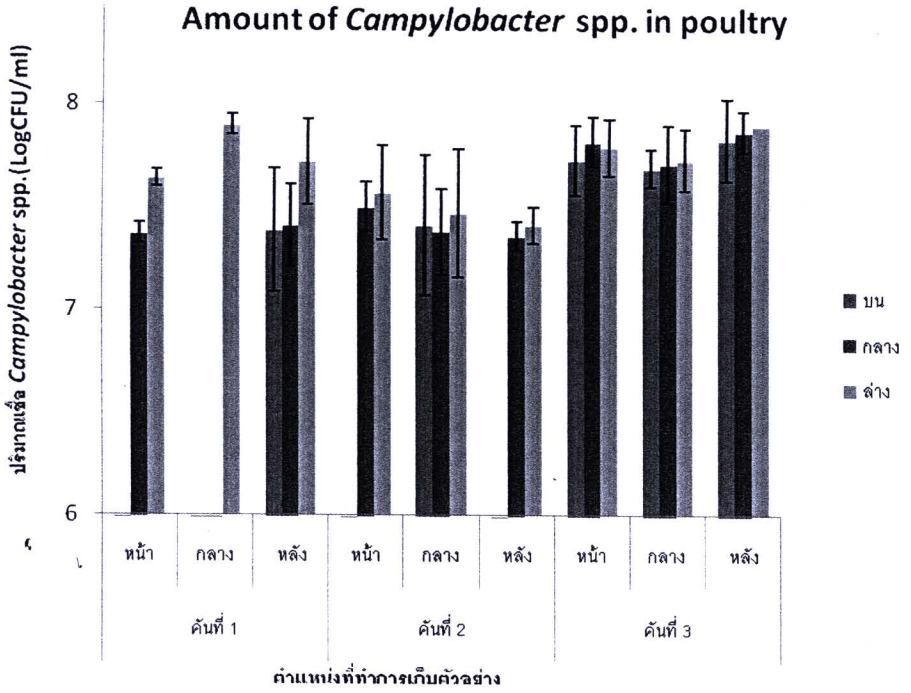
4.7 การตรวจประสิทธิภาพอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนกับเชื้อ *C. jejuni* ในตัวอย่างไกในโรงงานอุตสาหกรรม

4.7.1 การตรวจประสิทธิภาพอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนกับเชื้อ *Campylobacter* spp. ในตัวอย่างไก่

จากการเก็บตัวอย่างไก่ (clocal swab) จากโรงงานอุตสาหกรรมบนรถบรรทุกไก่ โดยทำการเก็บตัวอย่างคันละ 9 จุด คือ บน, กลาง, ล่าง, หน้า, กลาง และหลัง (แนวตั้ง และแนวนอน) ของรถบรรทุกไก่ ทั้งหมด 3 คัน (รูปที่ 4.27) โดยมีความต้องการที่จะจัดเรียงรถรถบรรทุกไก่ก่อน-หลังเข้าสู่กระบวนการผลิต พบว่าปริมาณเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่ก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตมีปริมาณสูงในตำแหน่งด้านล่างของรถในแต่ละคัน ส่วนด้านบน และด้านกลางของรถจะพบปริมาณเชื้อไม่สูงมากในบางคัน ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าในขณะบรรจุ หรือขนส่งไก่ ไก่ด้านบนอุจาระลงมาสู่ด้านล่างเป็นจำนวนมากทำให้ไก่ได้รับเชื้อ *Campylobacter* spp. ในปริมาณที่สูงกว่าตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งจากรูปที่ 4.28 พบว่าการจัดลำดับของรถบรรทุกไก่ ควรจัดให้คันที่ 1 เข้าสู่กระบวนการผลิตก่อน เพราะจากปริมาณเชื้อที่พบ มีปริมาณที่น้อยกว่ารถอีกสองคันที่เหลือ แล้วหลังจากนั้นนำรถคันที่ 2 และ3 ตามลำดับ จึงสามรถลดการปนเปื้อนจากที่มีความเข้มข้นของปริมาณเชื้อ *Campylobacter* spp. ที่มากสู่ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ *Campylobacter* spp.ที่มีปริมาณน้อยได้

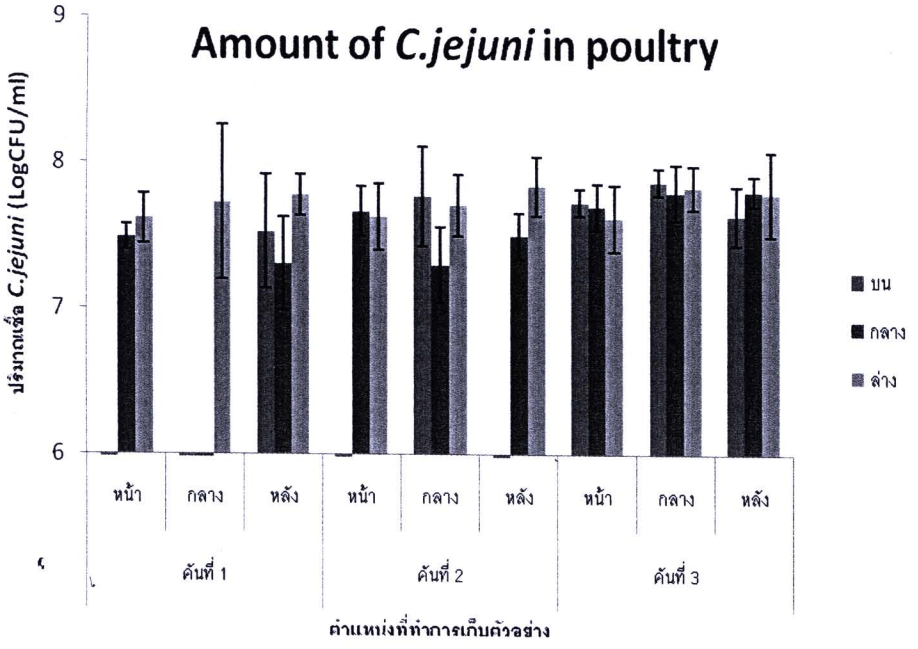


รูปที่ 4.27 แบบจำลองของรถบรรทุก ที่ทำการเก็บตัวอย่างไก่ (สีแดง: ตำแหน่งบน, กลาง และล่าง ส่วนสีฟ้า: ตำแหน่งหน้า, กลาง และหลัง)



รูปที่4.28 ปริมาณเชื้อ *Campylobacter* spp. (LogCFU/ml) ในแต่ละตำแหน่งของรถบรรทุก

และหลังจากนั้นทำการแยกเชื้อที่สนใจคือ *C. jejuni* ออกจาก *Campylobacter* spp. เพื่อต้องศึกษาปริมาณเชื้อ *C. jejuni* ที่ได้จากไก่ก่อนเข้าสู่การผลิตจริง พบว่าปริมาณเชื้อ *C. jejuni* มีทิศทางไปในทางเดียวกับ *Campylobacter* spp. ซึ่งจะมีอัตราส่วน *Campylobacter* spp./*C. jejuni* เท่ากับ 0.94 จะพบว่ามีปริมาณสูงใกล้เคียงกันมาก และในตำแหน่งด้านล่างของรถบรรทุก ของทุกคันพบว่ามีปริมาณเชื้อ *C. jejuni* ในปริมาณมากเช่นกัน (รูปที่ 4.29)

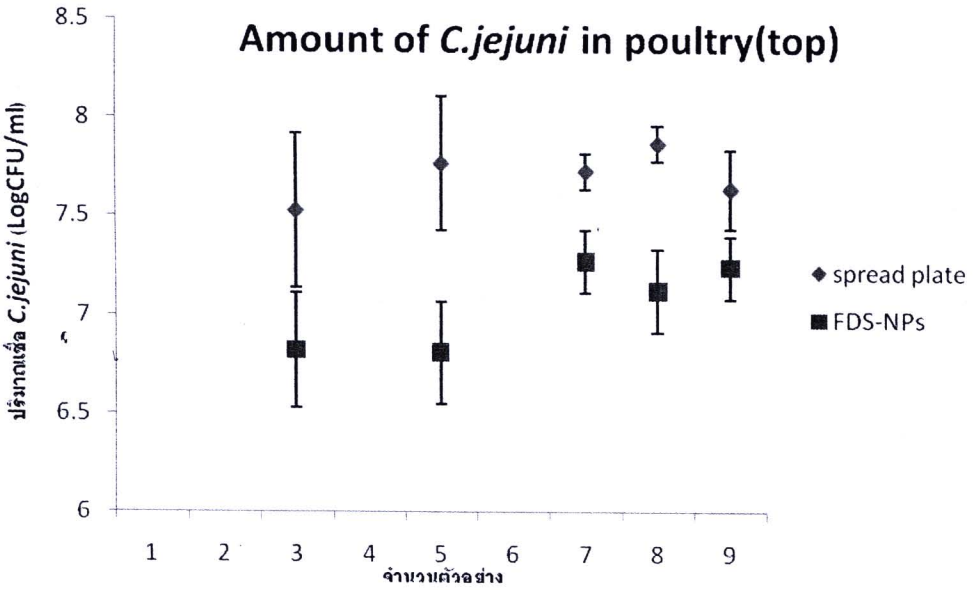


รูปที่4.29 แสดงปริมาณเชื้อ *Campylobacter jejuni* (LogCFU/ml) ในแต่ละตำแหน่งของรถบรรทุก

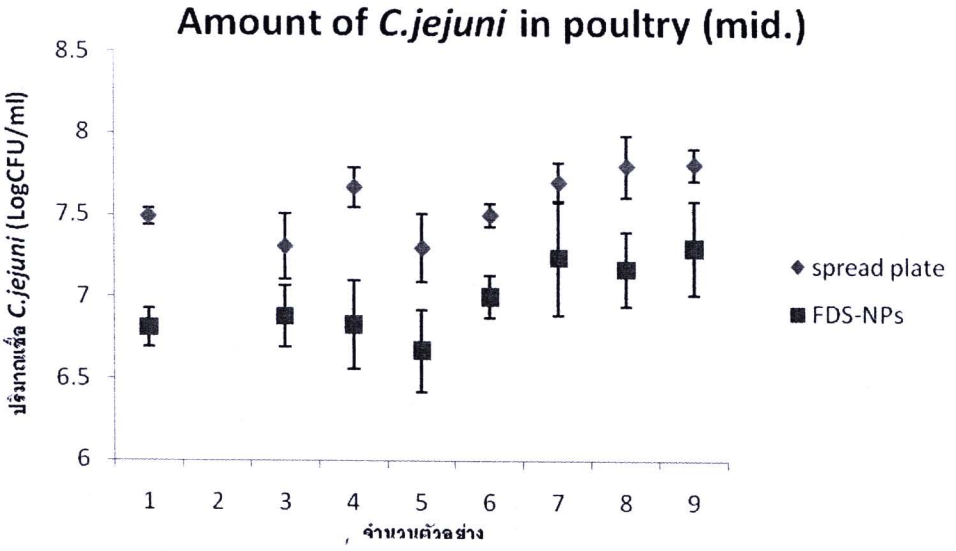
4.7.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน และวิธี spread plate กับเชื้อ *C. jejuni* ในตัวอย่างไก่ในโรงงานอุตสาหกรรม

จากผลการนับเชื้อ *C. jejuni* ในตำแหน่ง บน, กลาง, ล่าง และหน้า, กลาง, หลัง ของรถบรรทุกไก่จะสามารถแยก หรือประเมินในแต่ละตำแหน่งจำนวนเฉลี่ยของเชื้อ *C. jejuni* (CFU/ml) ในแต่ละตำแหน่ง ในส่วนของตำแหน่งหน้า กลาง และหลังของรถบรรทุกทั้ง 3 นั้น ไม่มีความเชื่อมโยงหรือไม่มีความเกี่ยวข้องกัน เป็นเพราะว่าในตำแหน่งทั้ง 3 มีการปนเปื้อนข้ามจากอุจจาระไก่ในแต่ละตำแหน่งแตกต่างไม่มากนัก ซึ่งอาจจะพบในตำแหน่งส่วนล่างเท่านั้น ส่วนในตำแหน่ง บน กลาง และล่างของรถบรรทุกทั้ง 3 คันนั้น แสดงให้เห็นถึงมีแนวโน้ม หรือมีความเกี่ยวข้องไปในทิศทางเดียวกัน คือจะพบปริมาณเชื้อ *C. jejuni* มากในส่วนกลาง และล่างของรถบรรทุกทั้ง 3 คัน ตำแหน่งของไก่ (บน กลาง และล่าง) มีผลต่อการปนเปื้อนข้ามของเชื้อ *C. jejuni* จึงนำไปสู่การเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาค FDS-NPs และวิธี spread plate กับเชื้อ *C. jejuni* ในตัวอย่างไก่ในโรงงานอุตสาหกรรม โดยทำการเปรียบเทียบตำแหน่งด้านบน, กลาง และล่างของรถบรรทุก และทำการตรวจอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Epifluorescence ร่วมกับ Petroff – Hausser counting chamber เพื่อใช้ทำการนับเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 4.30) พบว่าวิธีอนุภาค FDS-NPs มีประสิทธิภาพสามารถตรวจหาเชื้อ *C. jejuni* ในไก่ด้านบนของรถบรรทุก อยู่ที่ค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 91.4 เมื่อเทียบกับวิธี spread plate ส่วนในตำแหน่งกลาง (รูปที่ 4.31) ของรถบรรทุกพบประสิทธิภาพตรวจหาเชื้อ *C. jejuni* ของวิธีอนุภาค FDS-NPs อยู่ที่ค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 92.3 และในส่วนตำแหน่งด้านล่าง (รูปที่ 4.32) ของรถบรรทุกพบปริมาณเชื้อ *C. jejuni* ของวิธีอนุภาค

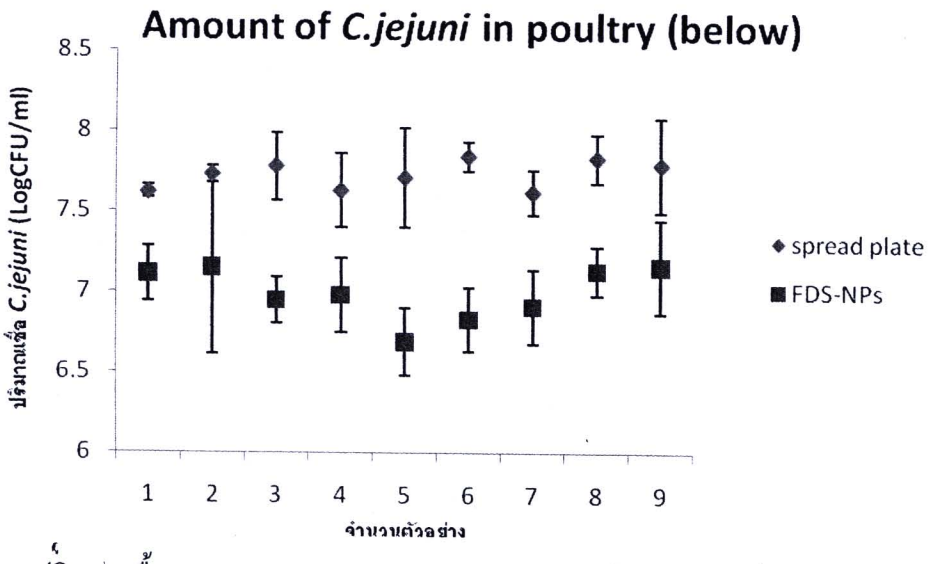
FDS-NPs อยู่ที่ค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 90.4 จากผลที่ได้จะแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพวิธีอนุภาค FDS-NPs ลดลงเมื่อเทียบกับการตรวจเชื้อ *C. jejuni* ที่บริสุทธิ์ เป็นผลมาจากในตัวอย่างไก่ มีทั้งปริมาณโปรตีน, คาร์โบไฮเดตร และไขมันต่างๆ เป็นจำนวนมากไปบดบัง หรือขัดขวางอนุภาค FDS-NPs จึงทำให้การเกิดแสง และทำให้ประสิทธิภาพของแอนติบอดีลดลงได้



รูปที่ 4.30 แสดงปริมาณเชื้อ *Campylobacter jejuni* (LogCFU/ml) ในตำแหน่งด้านบนของรถบรรทุกไก่ก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิต

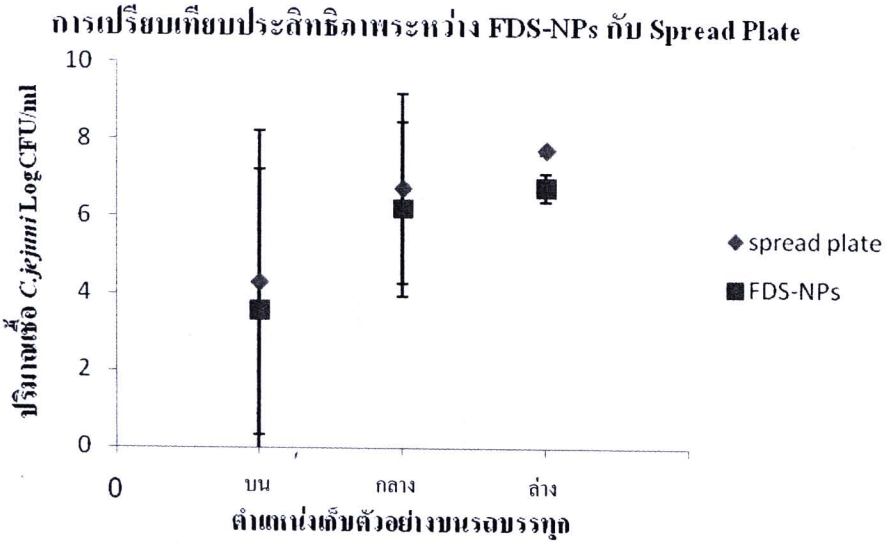


รูปที่ 4.31 ปริมาณเชื้อ *Campylobacter jejuni* (LogCFU/ml) ในตำแหน่งตรงกลางของรถบรรทุกไก่ก่อนเข้าสู่กร ะบวนการผลิต



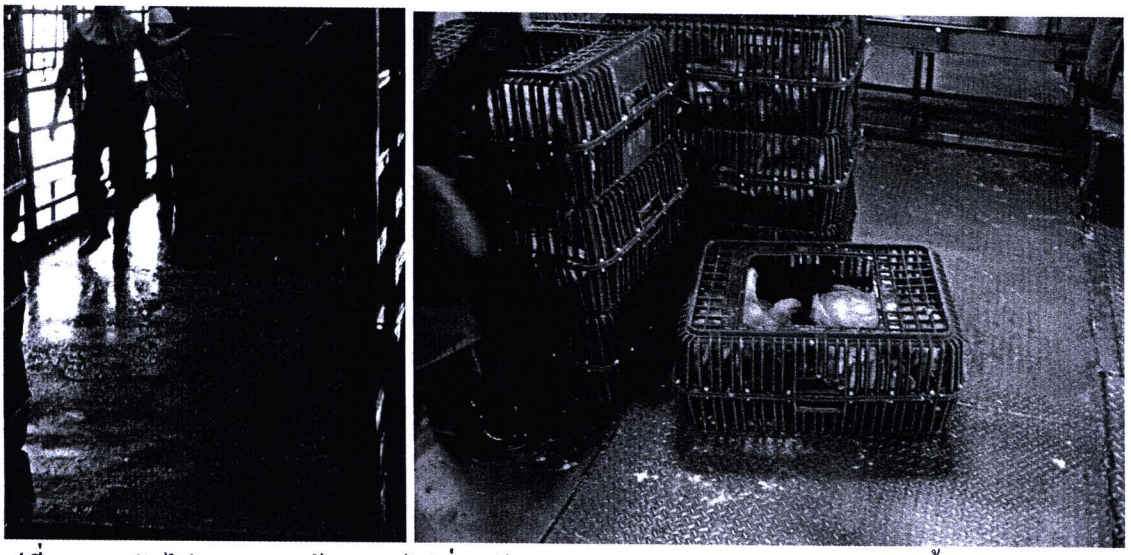
รูปที่ 4.32 ปริมาณเชื้อ *Campylobacter jejuni* (LogCFU/ml) ในตำแหน่งด้านล่างของรถบรรทุกไก่ก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิต

จากการทดลองทั้ง 3 ตำแหน่งบนรถบรรทุก (บน กลาง และล่าง) ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของอนุภาค FDS-NPs และวิธี spread plate (รูปที่ 4.33) พบว่าในตำแหน่งบน และกลาง ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างในทั้ง 2 วิธี แต่ในตำแหน่งด้านล่าง พบว่ามีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าประสิทธิภาพการจับเชื้อของอนุภาค FDS-NPs ลดลง และมีปริมาณโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต และไขมันต่างๆ เป็นจำนวนมากในอุจจาระไก่

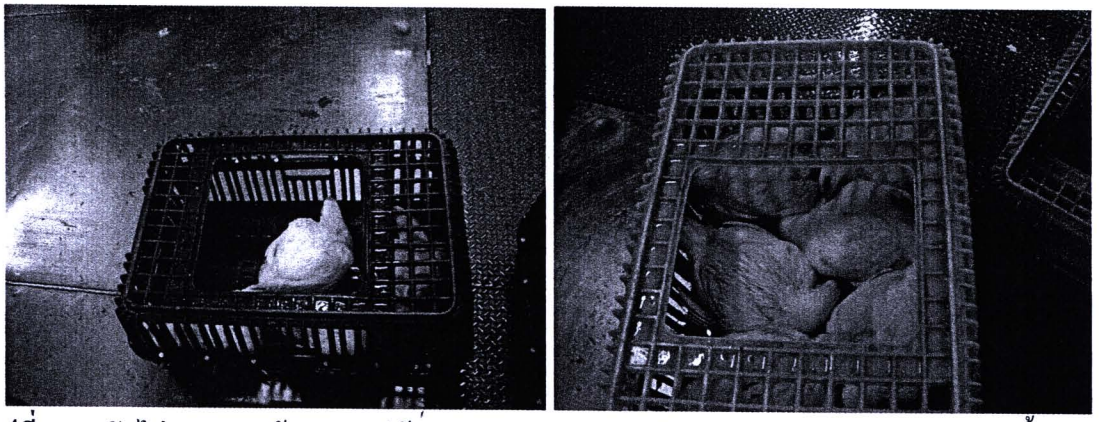


รูปที่ 4.33 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างอนุภาค FDS-NPs และวิธี spread plate ในตำแหน่งบน กลาง และล่างของรถบรรทุก

จากผลการทดลองที่ได้ทำการศึกษามาพบว่า ในกระบวนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาค FDS-NPs และวิธี spread plate กับเชื้อ *C. jejuni* ในตัวอย่างไก่ภายในโรงงานอุตสาหกรรมมีแนวโน้มจะพบเชื้อ *C. jejuni* ปริมาณมากในด้านล่างของรถบรรทุก (รูปที่ 4.34) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการที่ได้พบอุจจาระไก่ในปริมาณมากบนพื้นของรถบรรทุก และในส่วนของตะกร้าบรรจุไก่ (6ตัว/ตะกร้า) ที่มีปริมาณอุจจาระไก่ปนเปื้อนอยู่ ในส่วนด้านบนของรถบรรทุกซึ่งไม่มีสิ่งสกปรก หรืออุจจาระไก่มาปนเปื้อนจึงพบปริมาณเชื้อน้อยกว่าด้านล่าง (รูปที่ 4.35)

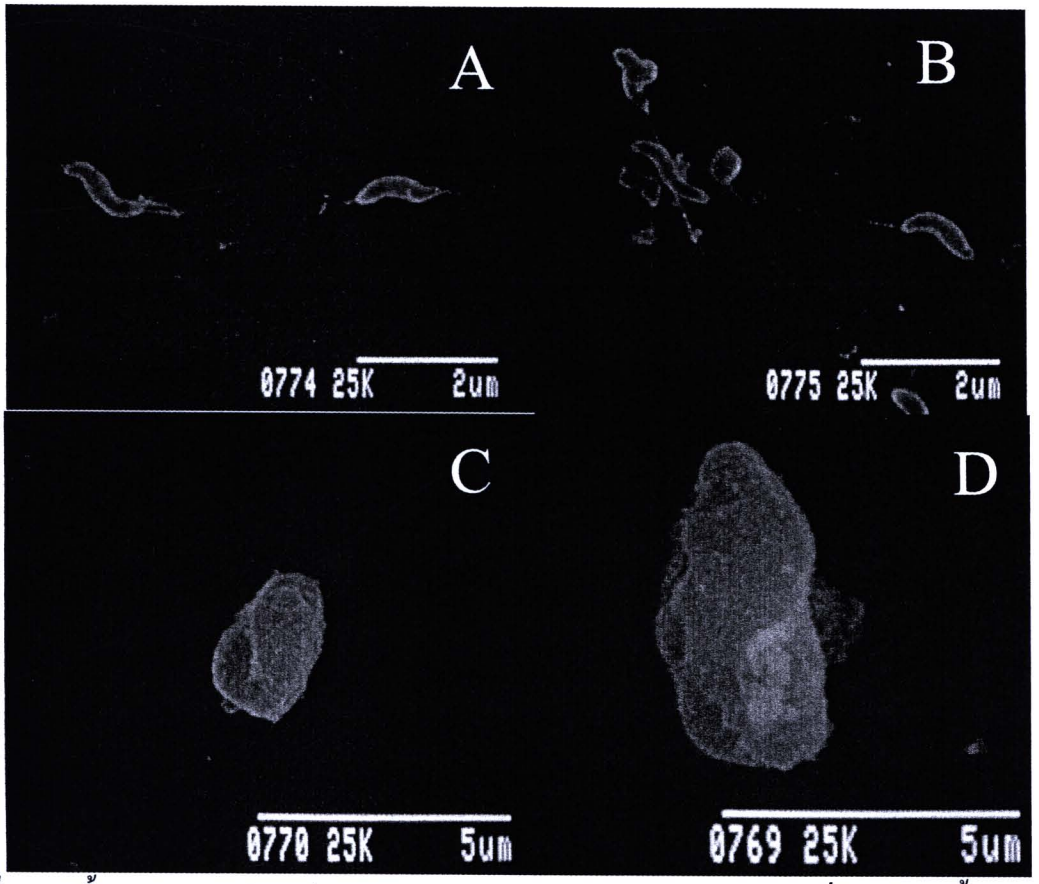


รูปที่ 4.34 ตัวไก่ และตะกร้าบรรจุไก่ที่อยู่ด้านล่างของรถบรรทุก มีอุจจาระบนพื้นรถบรรทุกและบริเวณขอบตะกร้าบรรจุไก่ในปริมาณมาก



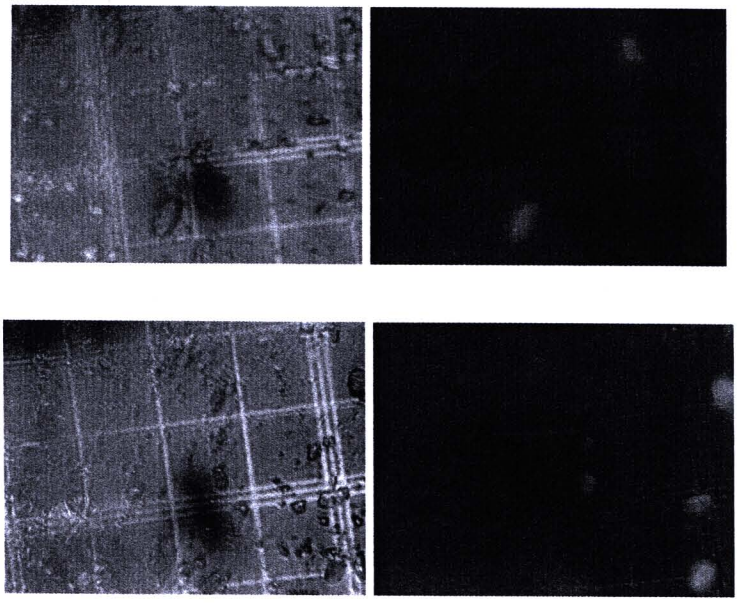
รูปที่ 4.35 ตัวไก่ และตะกร้าบรรจุอยู่ด้านบนของรถบรรทุก มีความสะอาด ปราศจากการปนเปื้อนจากอุจจาระไก่

จากการเก็บตัวอย่างจากไก่ (clocal swab) โดยทำการศึกษาจากการจับกันของอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. jejuni* กับเซลล์ของเชื้อ *C. jejuni* ภายใต้กล้อง Scanning electron microscope (SEM) พบว่าเซลล์ของเชื้อ *C. jejuni* ที่ไม่มีอนุภาค FDS-NPs เกาะอยู่ลักษณะของเซลล์จะมีรูปร่างเป็นเกลียว (Helix) (รูปที่ 4.36 A, B) มีการกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs อย่างสม่ำเสอดีในการจับบนผิวของเชื้อ *C. jejuni* ภายใต้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 25,000x ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบระหว่างอนุภาค FDS-NPs บนผิวเชื้อ *C. jejuni* กับเซลล์ของเชื้อ *C. jejuni* ได้ชัดเจน (รูปที่ 4.36 C, D)

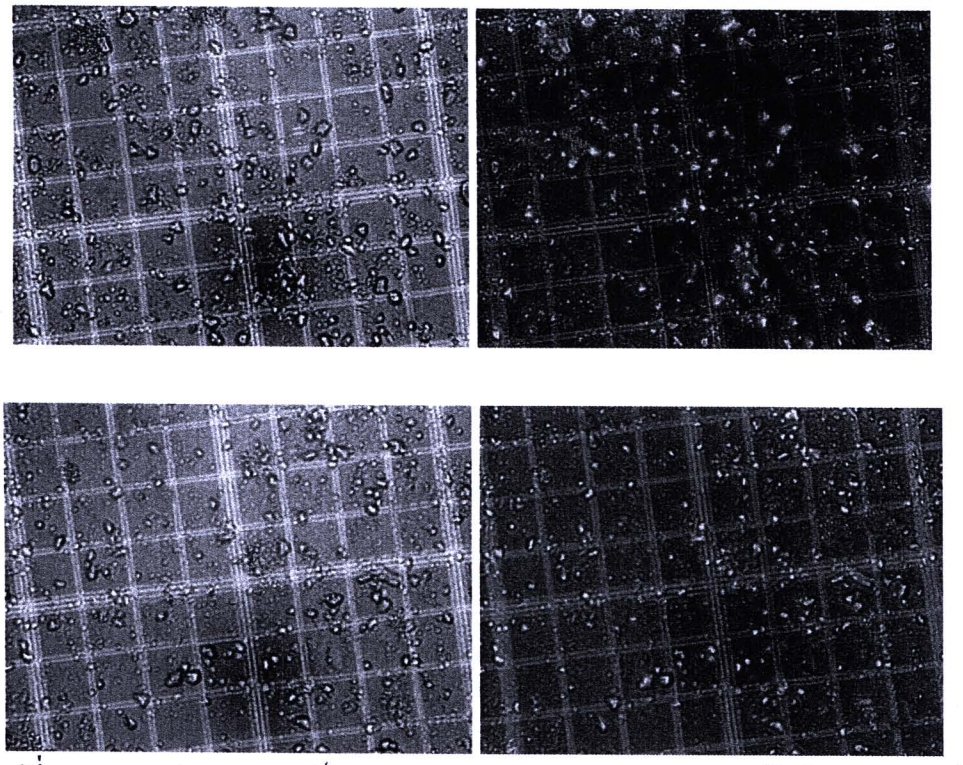


รูปที่ 4.36 เชื้อ *C. jejuni* บริสุทธ์ (AและB) และอนุภาค FDS-NPs (C และD) ที่จับอยู่บนเชื้อ *C. jejuni* ภายใต้กล้อง SEM

ส่วนผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาค FDS-NPs กับเชื้อ *C. jejuni* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Epifluorescence ร่วมกับ Petroff – Hausser counting chamber พบว่ามีความจำเพาะกับเชื้อ *C. jejuni* พอสมควร ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นภายใต้กำลังขยาย 300x และ600x เท่า (รูปที่ 4.37-4.38) พบว่าอนุภาค FDS-NPs สามารถมีความจำเพาะกับ *C. jejuni* และมีบางส่วนที่ถูกขัดขวางโดยโมเลกุลต่างๆ ภายในอุจจาระไก่ แต่จะไม่เห็นใน mode phase contrast ซึ่งแสดงให้เห็นอนุภาค FDS-NPs ที่ไปจำเพาะปริมาณที่น้อยกว่าเชื้อเป้าหมาย (*C. jejuni*)



รูปที่ 4.37 ความจำเพาะระหว่างอนุภาค FDS-NPs กับ *C. jejuni* ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Epifluorescence ร่วมกับ Petroff – Hausser counting chamberที่กำลังขยาย 600x



รูปที่ 4.38 ความจำเพาะระหว่างอนุภาค FDS-NPs กับ *C. jejuni* ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Epifluorescence ร่วมกับ Petroff – Hausser counting chamber ที่กำลังขยาย 300x

จากรูปที่ 4.37-4.38 แสดงถึงความจำเพาะอนุภาค FDS-NPs กับ *C. jejuni* ที่กำลังขยาย 300x และ600x พบว่าที่กำลังขยาย 600x สามารถแสดงความจำเพาะได้ชัดเจน และไม่พบอนุภาค FDS-NPs ที่เกิดการเกาะกลุ่มกัน (false positive) เป็นเพราะว่า Petroff – Hausser counting chamber มีความลึกประมาณ 0.2mm ทำให้ผู้ใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Epifluorescence สามารถไปโฟกัสอนุภาค FDS-NPs กับ *C. jejuni* จึงทำให้ตำแหน่งที่อยู่ลึกกว่าไม่สามารถมองเห็นได้ และทำให้เห็นอนุภาค FDS-NPs กับ *C. jejuni* ใหญ่ขึ้นกว่าปกติ