บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้า เรื่อง “พฤติกรรมของเกษตรกรในการใช้สารเคมีกำจัดแมลง และศัตรูพืชที่มีผลกระทบต่อคุณภาพดิน และน้ำของชุมชนโดยรอบอุทยานแห่งชาติพุเตย จังหวัดสุพรรณบุรี” ซึ่งผลการศึกษาในงานวิจัยดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าชุมชนที่ทำการศึกษาประกอบอาชีพเกษตรกรรม มีการเพาะปลูกพืชไร่บริเวณพื้นที่สูง และยังมีการใช้สารเคมีทางการเกษตรอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ประกอบกับบริเวณดังกล่าว เป็นแหล่งต้นน้ำ อีกทั้งยังมีระบบนิเวศที่มีความสมบูรณ์ ด้วยความตระหนักถึงปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม และสาธารณสุข อันน่าจะเกิดจากกิจกรรมต่างๆของผู้คนในชุมชน ดังนั้น การศึกษาในส่วนนี้จึงดำเนินการภายใต้สมมุติฐานที่ว่า การใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นเวลานาน น่าจะส่งผลต่อกระทบต่อการพัฒนาแบคทีเรียดื้อยาขึ้น เพราะสารเคมีต่างๆ โดยเฉพาะโลหะหนักซึ่งอาจพบสะสมอยู่ในบริเวณนั้นมีอิทธิพลต่อการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียพัฒนาคุณสมบัติการดื้อยาขึ้นได้ และถ้าเกิดการแพร่กระจายสู่ชุมชนใกล้เคียง โดยเฉพาะตามแหล่งน้ำที่ใช้อุปโภคบริโภค อาจจะส่งผลให้ผู้คนในชุมชนได้รับแบคทีเรียดื้อยาเข้าสู่ร่างกาย ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขตามมาก็เป็นไปได้

สำหรับการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ ได้แบ่งขั้นตอนการดำเนินงานออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่ 1 การศึกษาข้อมูลของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในดินเพาะปลูก และบริเวณชุมชนที่อยู่ใกล้เคียง รวมทั้งคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเหล่านั้น ส่วนที่ 2 การศึกษาถึงการปรากฏลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและการทนทานต่อโลหะหนักร่วมกัน (Co-selection) ในแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก และชุมชนบริเวณใกล้เคียง และ ส่วนที่ 3 ศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง โดยรายละเอียดการดำเนินงานแต่ละส่วนมีดังต่อไปนี้

1. การศึกษาข้อมูลของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในดินเพาะปลูก และบริเวณชุมชนที่อยู่ใกล้เคียง รวมทั้งคุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเหล่านั้น

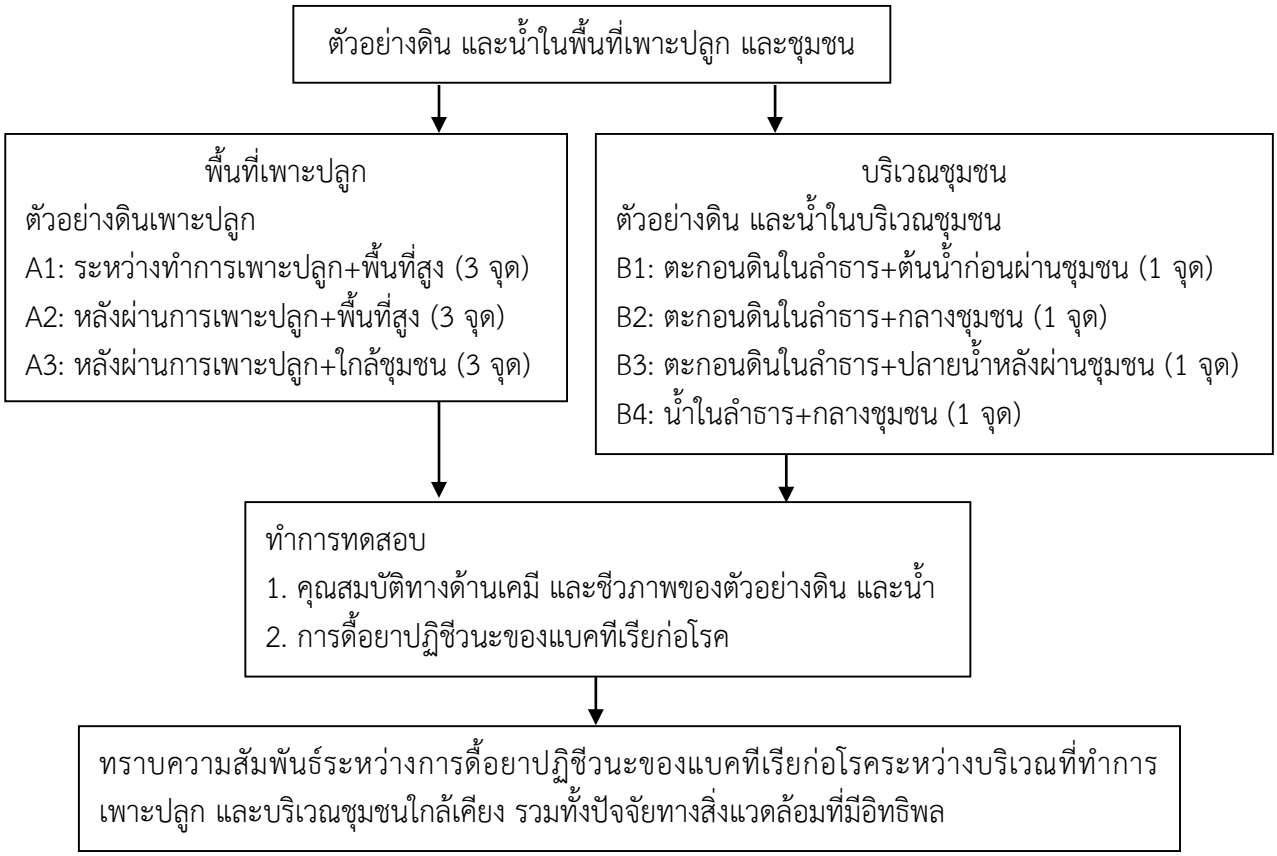
โดยการศึกษาในส่วนนี้มีรูปแบบการเก็บข้อมูลในแต่ละจุด และการดำเนินการทดลอง มีรายละเอียดดังแสดงในภาพที่ 3.1

1.1 การเก็บข้อมูลสำหรับการศึกษา

ตัวอย่างดินที่ทำการเพาะปลูกนั้น ในที่นี้จะทำการเก็บข้อมูลจากบริเวณที่ทำการเพาะปลูกจำนวน 3 แปลง โดยบริเวณพื้นที่สูงซึ่งมีการทำการเกษตรกันอย่างแพร่หลาย จะทำการเก็บข้อมูลจากแปลงเพาะปลูกพืชไร่จำนวน 2 แปลง ซึ่งแบ่งออกเป็นแปลงที่อยู่ระหว่างช่วงที่มีการเพาะปลูก (A1) และแปลงที่อยู่ในช่วงพักแปลง หลังจากการเก็บเกี่ยว (A2) ส่วนแปลงสุดท้ายจะทำการเก็บข้อมูลจากแปลงเพาะปลูกที่อยู่ใกล้ชุมชนที่ต้องการศึกษา โดยแปลงดังกล่าวจัดเป็นแปลงที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้ว (A3) สำหรับการเก็บข้อมูลตัวอย่างดินในแต่ละแปลง จะทำการเก็บข้อมูลจำนวน 3 จุด (ที่ทำการเลือกเก็บข้อมูลพื้นที่เพาะปลูกจำนวน 3 จุด เนื่องจากพื้นที่ในแต่ละแปลง

เพาะปลูกมีบริเวณกว้าง จึงทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อใช้เป็นตัวแทน) โดยทำการเก็บดินที่ระดับความลึก 5-10 เซนติเมตร เมื่อวัดจากผิวหน้าดิน

ตัวอย่างตะกอนดิน และน้ำจากชุมชนบริเวณใกล้เคียง ซึ่งในการศึกษานี้จะเก็บข้อมูลจากลำธารขนาดเล็กที่ไหลผ่านชุมชน โดยแบ่งการเก็บข้อมูลออกเป็น 3 ช่วง ได้แก่ ช่วงแรกต้นน้ำก่อนที่น้ำในลำธารจะไหลผ่านชุมชน (B1), ช่วงที่ 2 ระหว่างน้ำในลำธารไหลผ่านชุมชน (B2), และช่วงที่ 3 ปลายน้ำหลังจากน้ำในลำธารได้ไหลผ่านชุมชน (B3) ส่วนการเก็บข้อมูลจากลำธารทั้ง 3 ช่วง จะเก็บตะกอนดินจากลำธาร ทั้งนี้น้ำในลำธารค่อนข้างไหลเร็ว เนื่องจากเป็นการไหลจากพื้นที่สูงลงสู่พื้นที่ต่ำ ดังนั้น ตะกอนดินจึงน่าจะเป็นตัวแทนข้อมูลที่มีความเหมาะสมกว่าการเก็บข้อมูลจากตัวอย่างน้ำ ซึ่งสำหรับตัวอย่างน้ำนั้นจะทำการเก็บข้อมูลเฉพาะบริเวณกลางชุมชนเท่านั้น (B4)



ภาพที่ 3.1 แสดงรายละเอียดการเก็บข้อมูล และการทดสอบสำหรับการศึกษาในส่วนที่ 1

1.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านเคมี และชีวภาพจากตัวอย่างดิน

คุณสมบัติทางด้านเคมีของดินเพาะปลูก และตะกอนดิน (A1-A3 และ B1-B3) จะทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ที่สำคัญทางด้านเคมี สำหรับการวิเคราะห์โลหะหนักนั้น จะทำการศึกษาจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ สังกะสี (Zinc, Zn), นิเกิล (Nickel, Ni), แคดเมียม (Cadmium, Cd), ทองแดง (Copper, Cu), โครเมี่ยม (Chromium, Cr) (APHA, 2005) โดยโลหะหนักทั้ง 5 ชนิด ที่ทำการ

วิเคราะห์ คัดเลือกมาจากชนิดของโลหะหนักที่มีรายงานการวิจัยพบว่ามีอิทธิพลต่อการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียปรากฏลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมกับการทนทานต่อโลหะหนัก อีกทั้งบางชนิดยังเป็นแหล่งธาตุอาหารรอง (Trace elements) ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (Ji et al., 2012)

ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านชีวภาพของตัวอย่างดิน ตะกอนดิน (A1-A3 และ B1-B3) และน้ำ (B4) จะทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียก่อโรค โดยในที่นี้จะใช้แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) เป็นดัชนีชี้วัด ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) อยู่ในวงศ์ (Family) *Enterobacteriaceae* มีถิ่นอาศัยประจำอยู่ที่บริเวณลำไส้ (Gastrointestinal tract) ของคน และสัตว์เลือดอุ่น โดยทั่วไปนิยมใช้เป็นแบคทีเรียตัวแทนในการศึกษาการปนเปื้อนของสิ่งขับถ่ายจากสิ่งมีชีวิตดังกล่าวสู่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีช่วงกว้างในการเจริญเติบโต สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะกดดัน (Ishii and Sadowsky, 2008; Łuczkiewicz et al., 2010) การศึกษานี้ทำการทดสอบเพื่อหาปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์มโดยใช้วิธีการ Most probable number (MPN) (APHA, 2005)

1.3 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic susceptibility testing)

การศึกษาในส่วนนี้จะใช้อีโคไล (*Escherichia coli*) เป็นตัวแทนของแบคทีเรียก่อโรค โดยอีโคไลนั้นจัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม (Łuczkiewicz et al., 2010) และยังเป็นแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่นิยมใช้ศึกษาเรื่องการดื้อยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะในสิ่งแวดล้อม (Baum and Marre, 2005; Dolejská et al., 2008) รวมถึงในปัจจุบันอีโคไลจัดเป็นแบคทีเรียที่มีปัญหาการดื้อสูงและดื้อยาหลายชนิดซึ่งถือเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข (นิยดา, 2554) เริ่มแรกจะทำการคัดแยกอีโคไลก่อน โดยใช้เทคนิคการกรองผ่านกระดาษกรองฆ่าเชื้อที่มีขนาดรูพรุน (Pore size) 0.45 ไมครอน (Sartorius) ถ้าเป็นตัวอย่างน้ำ (B4) จะใช้น้ำปริมาณ 5-10 มิลลิลิตร ในการกรอง ส่วนตัวอย่างดิน และตะกอนดิน (A1-A3 และ B1-B3) จะทำการเจือจางกับน้ำเกลือ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ ก่อนที่จะทำการกรอง ส่วนกระดาษกรองที่ผ่านการกรองนั้น จะนำไปบ่มบนอาหาร Chromocult Coliform agar ES® (Merck Microbiology) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังการบ่มจะทำการตรวจสอบโคโลนีที่ปรากฏ โดยโคโลนีสีน้ำเงิน คือ อีโคไล และโคโลนีสีชมพู คือ แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มสายพันธุ์อื่น สำหรับโคโลนีของอีโคไลจะทำการตรวจสอบซ้ำ โดยการเขี่ยตัวอย่างเชื้อลงบนอาหาร Methylene Blue agar (EMB, Biomark Laboratory) และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งถ้าปรากฏโคโลนีที่มีลักษณะเลื่อมเงา สีเขียวโลหะ (Metallic sheen) แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวจัดเป็นอีโคไล นอกจากนี้ในแต่ละจุดที่ทำการเก็บข้อมูล จะทำการคัดเลือกอีโคไลจำนวน 20 โคโลนี สำหรับการทดสอบความไวต่อยา

การตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของอีโคไลจะใช้วิธีการ Disk diffusion method โดยใช้แผ่นยา (Kirby–Bauer, KB, BBL) ที่มีความเข้มข้นมาตรฐานตามวิธีการของ Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2012) ซึ่งการศึกษานี้จะใช้ยาในการทดสอบจำนวน 12 ชนิด แบ่งออกเป็นยาจำนวน 8 กลุ่ม โดยรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 3.1 ส่วนการทดสอบเริ่มจากนำโคโลนีเดี่ยวๆของอีโคไลที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy broth (HIMEDIA) และบ่ม

ที่ 37 องศาเซลเซียส จนระดับความขุ่นของอาหารมีค่าเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 ซึ่งคิดเป็นปริมาณเชื้อเทียบเท่า $1.5x10^8$ CFU/ml จากนั้นทำการ Swap อีโคไลที่เตรียมไว้ให้ทั่วอาหารสำหรับทดสอบความไวต่อยา Muller Hinton agar (BBL) ด้วยไม้พันสำลี ทิ้งไว้ให้อาหารแห้งประมาณ 10-15 นาที และทำการวางแผ่นยาปฏิชีวนะลงบนอาหารดังกล่าว นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาอ่านผลการทดสอบ โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดรอบบริเวณแผ่นยาแต่ละชนิดในหน่วยมิลลิเมตร จากนั้นทำการแปรผลเป็นค่า S, I และ R จากการเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (CLSI, 2012) และมีการคำนวนแบ่งกลุ่มความไว และการดื้อยาดังสมการที่ 3.1-3.3

โดย S = Sensitive เชื้อแบคทีเรียไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นๆ
I = Intermediate เชื้อแบคทีเรียอาจมีการพัฒนาจนดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นๆ
R = Resistance เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นๆ

การคำนวณการดื้อยา

$$\%\ \text{การดื้อยา (\% Resistance)} = \frac{\text{จำนวนอีโคไลที่ดื้อยา}}{\text{จำนวนอีโคไลทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\%\ \text{การเริ่มพัฒนาการดื้อยา (\% Intermediate)} = \frac{\text{จำนวนอีโคไลที่เริ่มการพัฒนาการดื้อยา}}{\text{จำนวนอีโคไลทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\%\ \text{ความไวต่อการต้านการดื้อยา (\% Sensitive)} = \frac{\text{จำนวนอีโคไลที่ไวต่อการต้านการดื้อยา}}{\text{จำนวนอีโคไลทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100 \quad (3.3)$$

หมายเหตุ คำว่า “สายพันธุ์อีโคไล” ในที่นี้ คณะผู้วิจัยต้องการสื่อความหมายถึงอีโคไลแต่ละโคโลนีที่ทำการคัดแยก นอกจากนี้ยังมีการหาค่า MAR index (multiple antibiotic resistance index) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกระดับการดื้อยาในภาพรวมของแต่ละตัวอย่าง โดยคำนวณจากสูตร “*a/b*” โดยที่ “*a*” แทนจำนวนแผ่นยาทดสอบทั้งหมดที่แสดงผลว่าอีโคไลดื้อต่อยานั้นๆ และ “*b*” แทนจำนวนแผ่นยาทดสอบทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ (Krumperman 1983) เมื่อค่า *“a/b”* ของตัวอย่างใดเข้าใกล้ 1 แสดงว่าอีโคไลในตัวอย่างนั้นมีระดับการดื้อยารุนแรง คือเป็นอีโคไลที่ดื้อยาหลายชนิดนั่นเอง และการศึกษานี้ยังมีการวิเคราะห์ผลเพิ่มเติม โดยการจัดกลุ่มตามลักษณะความเหมือน ซึ่งจัดแบ่งได้ตาม 2 วิธีการหลัก ดังต่อไปนี้

1) การจัดแบ่งตามจุดเก็บข้อมูลทั้ง 6 จุด

การจัดกลุ่มการดื้อยาปฏิชีวนะของอีโคไลตามแต่ละบริเวณที่ทำการศึกษา (6 จุด) เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงของอีโคไลในแต่ละบริเวณ โดยใช้ค่าร้อยละของการดื้อยา (%R) ในการแบ่งกลุ่ม ด้วยวิธีการ Hierarchical cluster ซึ่งภายใต้วิธีการนี้ใช้การจับคู่ความเหมือนของชุด

ข้อมูลด้วย Squared Euclidean Distance (SED) และ Ward's method ควบคู่กัน (SPSS program) (Berge et al., 2003)

ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาของอีโคไล

ยาปฏิชีวนะ	ตัวย่อ	ความเข้มข้นในแผ่นยา (μg)	ค่ามาตรฐาน (CLSI, 2012)		
			S	I	R
Aminoglycoside					
- Gentamicin	GM	10	≥15	13-14	≤12
- Streptomycin	S	10	≥15	12-14	≤11
Tetracycline					
- Tetracycline	TC	30	≥15	12-14	≤11
Phenicol					
- Chloramphenicol	CP	5	≥18	13-17	≤12
Fluoroquinolone					
- Norfloxacin	NOR	10	≥17	13-16	≤12
- Ciprofloxacin	CIP	5	≥21	16-20	≤15
Folate pathway inhibitors					
- Trimethoprim/Sulfamethoxazole	ST	1.25/23.75	≥16	11-15	≤10
- Trimethoprim	TMP	5	≥16	11-15	≤10
Cephem					
- Cefotaxime	CTX	30	≥26	23-25	≤22
- Cetazidime	CAZ	30	≥21	18-20	≤17
Penicillin					
- Ampicillin	AMP	10	≥17	14-16	≤13
Beta-lactamase inhibitor combination					
- Amoxicillin/clavulanic acid	AMC	20/10	≥18	14-17	≤13

หมายเหตุ ยา Cephem, Penicillin, และ Beta-lactamase inhibitor combination จัดอยู่ในกลุ่ม beta-lactam เช่นเดียวกัน

2) การจัดแบ่งกลุ่มอีโคไลทั้ง 260 สายพันธุ์

ในที่นี้ทำการจัดแบ่งอีโคไลทั้ง 260 สายพันธุ์ ตามลักษณะความคล้ายกันของรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะที่ปรากฏ โดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone รอบแผ่นยาของยาทั้ง 12 ชนิด เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดกลุ่ม และใช้วิธีการ k-means cluster ในการ

ประมวลผล (SPSS program) (ที่ใช้วิธีการนี้เนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้กับกลุ่มตัวอย่างมากกว่า 200 ตัวอย่างขึ้นไป) โดยทำการคัดเลือกจำนวน cluster ที่เหมาะสม (ค่า k) ด้วยการใช้แผนภูมิ Dendrogram ของ Hierarchical cluster จากนั้นเมื่อได้ค่า k ที่เหมาะสมแล้วจึงทำการจัดแบ่ง cluster ด้วนวิธีการ k-means ต่อไป (Berge et al., 2003; Sarstedt and Mooi, 2011)

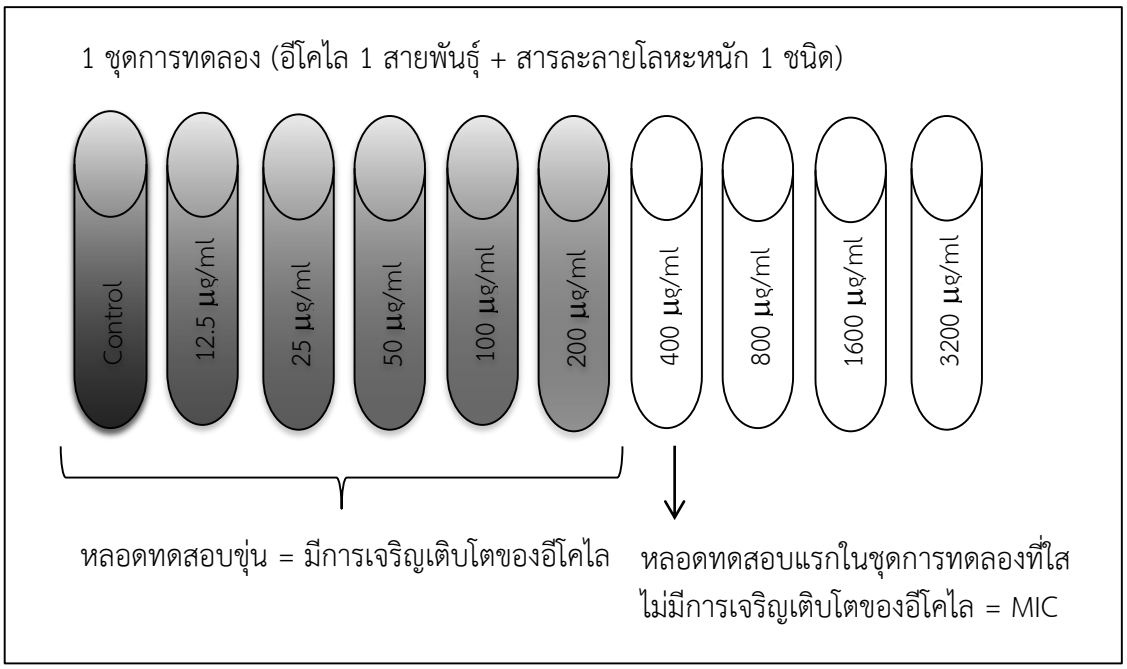
1.4 การทดสอบการผลิตเอนไซม์เบต้าแลคตาเมสชนิด Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) ในอีโคไลที่คัดแยก

อีโคไลที่ทำการคัดแยกทั้งหมดจำนวน 260 โคโลนี เพื่อใช้ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะในหัวข้อก่อนหน้า (1.3) จะนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์ Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) ควบคู่กันไป โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะพบมากในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* และสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม beta-lactam เช่น penicillin, cephalosporin และ aztreonam โดยการย่อยสลายวงแหวนของยา (Mesa et al., 2006; Rupp and Fey, 2003) ในการทดสอบนั้น วิธีการเตรียมอีโคไลก่อนการ Swap ลงบนอาหาร Muller Hinton agar ใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับหัวข้อ 1.3 ส่วนแผ่นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วยแผ่นยา AMC (20/10 µg), CTX (30 µg) และ CAZ (30 µg) โดยแผ่นยา AMC จะวางตำแหน่งตรงกลางจานเพาะเชื้อ ส่วนแผ่นยา CTX และ CAZ วางห่างจากจุดศูนย์กลางของยา AMC ประมาณ 15-20 เซนติเมตร ทำการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาอ่านผลการทดสอบจาก Clear zone รอบแผ่นยา AMC กับแผ่นยา CTX หรือ CAZ ที่ออกฤทธิ์เสริมกัน ซึ่งถ้าพบปรากฏการณ์ดังกล่าว แสดงว่าเกิดการผลิตเอนไซม์ ESBL ขึ้น (Jarlier et al., 1988)

2. การศึกษาถึงการปรากฏลักษณะการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและการทนทานต่อโลหะหนักร่วมกันในแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกจากดินเพาะปลูก และชุมชนบริเวณใกล้เคียง

จากผลการศึกษาในส่วนที่ 1 จะทำการคัดเลือกอีโคไลมาทดสอบการทนทานต่อโลหะหนักเพิ่มเติม โดยคัดเลือกอีโคไลจากดินเพาะปลูกบนพื้นที่สูงทั้งช่วงระหว่างการเพาะปลูก และหลังการเก็บเกี่ยว (A1 และ A2) รวมทั้งอีโคไลจากตะกอนดินแหล่งน้ำกลางชุมชนใกล้เคียง (B2) จำนวนจุดละ 10 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะที่ปรากฏ ซึ่งในที่นี้สนใจศึกษาอีโคไลสายพันธุ์ที่มีการดื้อยาหลายกลุ่ม สำหรับเกลือของโลหะในการทดสอบประกอบไปด้วยสังกะสี (Zn^{2+}, $Zn(O_2CCH_3)_2$), นิเกิล (Ni^{2+}, $NiCl_2.6H_2O$), แคดเมียม (Cd^{2+}, $CdCl_2.5H_2O$), ทองแดง (Cu^{2+}, $CuSO_4$), โครเมี่ยม (Cr^{3+}, $K_2Cr_2O_7$) ทำการทดสอบหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของโลหะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของอีโคไล (MIC, Minimum inhibitory concentration) ด้วยวิธีการ Double dilution ในอาหารเหลว โดยความเข้มข้นของโลหะที่ทดสอบอยู่ในช่วงระหว่าง 12.5-3,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Matyar et al., 2008) วิธีการเริ่มจากนำอีโคไลสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษามาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy broth และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ค้างคืน จากนั้นนำมาใช้เป็นแหล่งอีโคไลเริ่มต้นในการทดสอบหาค่า MIC โดยเติมอีโคไลเริ่มต้นลงในอาหาร Luria-bertani broth

พร้อมทั้งปรับให้มีปริมาณอีโคไลเริ่มต้นเทียบเท่าค่า McFarland Standard เบอร์ 0.5 หรือเทียบเท่าค่าจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างในช่วง 600 นาโนเมตร ซึ่งต้องอยู่ระหว่างค่า 0.05-0.10 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายเกลือของโลหะที่ความเข้มข้นต่างๆลงไป แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาอ่านผลการทดสอบเพื่อหาค่า MIC โดยการสังเกตจากความขุ่นของหลอดทดสอบเมื่อมองด้วยตาเปล่า ซึ่งหลอดทดสอบแรกจากทั้งชุดการทดลองที่ไม่ปรากฏการเจริญเติบโตของอีโคไล (ตัวอย่างมีลักษณะใส) แล้วนั้น ถือว่าเป็นค่า MIC ของชุดการทดลองนั้นๆ (ภาพที่ 3.2) ส่วนในภาพรวมการศึกษามีชุดการทดลองหาค่า MIC จำนวน 150 ชุด (อีโคไลจำนวน 30 สายพันธุ์ x เกลือของโลหะจำนวน 5 ชนิด)



ภาพที่ 3.2 แสดงชุดการทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC)

3. การศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง

เมื่อเสร็จสิ้นการดำเนินงานทั้ง 2 ส่วน จะมีการวิเคราะห์ข้อมูลในภาพรวมเพื่อประเมินสถานการณ์การดื้อยาจากแหล่งกำเนิดประเภทพื้นที่เพาะปลูกที่มีการใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งจะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในดินกับคุณสมบัติความต้านทานโลหะหนักว่าจะเป็นจริงตามข้อสมมติฐานหรือไม่ โดยข้อสมมติฐานประกอบด้วย 1) แบคทีเรียในดินเพาะปลูกที่มีความต้านทานต่อโลหะหนัก จะมีคุณสมบัติในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยหรือไม่, 2) มีโอกาสที่จะพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในดินเพาะปลูกหรือไม่, และ 3) มีโอกาสหรือไม่ที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะจากบริเวณที่ทำการเพาะปลูกจะแพร่กระจาย ไปยังบริเวณใกล้เคียง

ซึ่งผลการศึกษาคาดว่าพื้นที่ที่ศึกษาน่าจะเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่ส่งเสริมให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น รวมถึงน่าจะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพจากการปนเปื้อนของเชื้อดื้อยาดังกล่าวออกสู่ชุมชนใกล้เคียง และแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม รวมทั้งหาแนวทางที่เหมาะสมในการลดปัญหาดังกล่าว เนื่องจากบริเวณดังกล่าวถือเป็นบริเวณที่ระบบนิเวศมีความอุดมสมบูรณ์และเป็นแหล่งต้นน้ำที่สำคัญ พร้อมทั้งมีการเผยแพร่ผลงานสู่สาธารณชนในรูปผลงานทางวิชาการ เอกสารเผยแพร่แก่ผู้ที่ได้รับผลกระทบ หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และผู้ที่สนใจทั่วไป

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. สถานที่ในการเก็บข้อมูล คือ บริเวณพื้นที่เพาะปลูก และบริเวณใกล้เคียงที่คาดว่าน่าจะมีการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ ณ ชุมชนชาวกะเหรี่ยง หมู่บ้านตะเพินคี่ จังหวัดสุพรรณบุรี
2. สถานที่สำหรับวิเคราะห์ข้อมูล คือ ห้องปฏิบัติการของศูนย์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต