

<b>Thesis Title</b>	Development of Test Kit for Screening of Tetracycline Group Residues in Longan Honey by Microbial Inhibition Assay	
<b>Author</b>	Miss Chuleeporn Saksangawong	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Food Science and Technology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Dr. Pilairuk Intipunya	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Renu Pinthong	Co-advisor
	Dr. Chartchai Khanongnuch	Co-advisor

### ABSTRACT

Honey bees can be infected by many bacterial pathogens. Beekeepers usually administer antibiotics for the control and treatment of bacterial infections. An extensive use of antibiotics in honey bee colonies can cause an accumulation of residues in honey and become a public health hazard. Analysis of antibiotic residues, therefore, is essential for consumer protection purpose.

This study aimed to evaluate screening test kit for detection of tetracycline group residues in honey which can be used as a simple, rapid and cheap screening test kit. Honey from Chiang Mai, Thailand was diluted with or without antibiotic. The optimal indicator and media for detection of antibiotic in honey were studied for storage time and validated against HPLC method. A microbial inhibition assay was carried out using spores of *Geobacillus stearothermophilus* (DMST 8041) in optimal medium and bromocresol purple indicator. 0.1 ml of 30% honey solution was incubated at  $65 \pm 1^\circ\text{C}$  for 2-3 hours in a water bath. A positive reaction to the test indicated the presence of some substance that can prevent the growth of the test organism with no change or only

a little change of colour from purple to yellow. A negative reaction showed propagation of bacteria which changed the pH value of total culture medium, leading to a change from purple to complete yellow colour. The shelf-life of the test kit kept at 4-8°C was 9 months. The test kit has a detection limit for tetracycline group residues of 10 µg/kg. From the validity study, it was found that the test kit had sensitivity of 100%, specificity of 98% and accuracy of 99%. 120 honey samples were collected from bee farms, honey factories and markets in Chiang Mai province during June-August 2010. Out of these samples, 30 samples were randomly selected and subjected to antibiotic residue test using HPLC technique. Only one sample was found to contain chlortetracycline at 8.85 µg/kg. Tetracycline screening test using the new test did not show any positive result in all 120 samples.

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์**

การพัฒนาชุดตรวจสอบคัดกรองยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน  
ตกค้างในน้ำผึ้งลำไยด้วยเทคนิค Microbial Inhibition Assay

**ผู้เขียน**

นางสาวชุลีพร ศักดิ์สว่างษ์

**ปริญญา**

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

ดร. พิไลรัก อินธิปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
รศ. ดร. เรณู ปิ่นทอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
ดร. ชชาติชาย โชนงนุช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

**บทคัดย่อ**

ผึ้งสามารถติดเชื้อโรคแบคทีเรีย ผู้เลี้ยงผึ้งจึงใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษา  
การติดเชื้อแบคทีเรียหลากหลายชนิด การแพร่หลายของการใช้ยาปฏิชีวนะในผึ้งทำให้เกิดการตกค้างใน  
น้ำผึ้งจนกลายเป็นปัญหาด้านสาธารณสุข ดังนั้นการวิเคราะห์หายาปฏิชีวนะจึงจำเป็น

งานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบคัดกรองยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน ใน  
น้ำผึ้งลำไยที่สามารถใช้ได้ง่าย รวดเร็วและราคาถูก ด้วยเทคนิค microbial inhibition assay ซึ่งเป็นชุด  
ตรวจสอบคัดกรอง มีสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* (DMST 8041) พร้อม  
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารอินดิเคเตอร์ Bromocresol purple ที่เหมาะสม วิธีการใช้ชุดตรวจสอบต้องใช้  
น้ำผึ้งลำไยความเข้มข้น 30% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงในชุดตรวจสอบแล้วบ่มที่อุณหภูมิ  $65 \pm 1$   
องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง ในกรณีผลบวก (ตัวอย่างมียาปฏิชีวนะ) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี หรือ  
มีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองบางส่วน แต่กรณีผลลบ (ตัวอย่างไม่มียาปฏิชีวนะ) จะมีการ  
เปลี่ยนแปลงสีเป็นสีเหลืองทั้งหมด เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโต จะมีการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่างภายใน  
อาหารเลี้ยงเชื้อ ชุดตรวจสอบมีอายุการเก็บรักษา 9 เดือน ที่สภาวะอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน คือ ยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน อ็อกซีเตตราไซคลิน และคลอเตตราไซคลิน ต่ำสุดที่ระดับ 10 ไมโครกรัม/กิโลกรัม จากการทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบพบว่าชุดตรวจสอบมีค่าความไว 100% ความจำเพาะ 98% และความแม่นยำ 99% จากการสุ่มตัวอย่างน้ำผึ้งจากฟาร์ม โรงงานแปรรูปและตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ ช่วงเดือนมิถุนายน-สิงหาคม 2553 พบเพียงยาปฏิชีวนะ คลอเตตราไซคลิน 8.85 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ในน้ำผึ้ง จำนวน 1 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง โดยเทคนิค HPLC และไม่พบยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลินในน้ำผึ้ง 120 ตัวอย่าง โดยชุดตรวจสอบกึ่งครื่อง