



รายงานโครงการวิจัย เรื่อง

การศึกษารูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรีย (enterobacteria) ที่แยกได้จาก
ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล และการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบชนิดของเชื้อ enterobacteria
อย่างรวดเร็วโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

**Antibiotic Resistance Gene Patterns of Enterobacteria Isolated from Seafood Products and
Development of a Rapid Technique for Species Identification of Enterobacteria
by Using DNA Fingerprints**

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. นีลวรรณ พงศ์ศิลป์

(Associate Professor Dr. Neelawan Pongsilp)

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

และ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ระวี นิ่มน้อย

(Assistant Dr. Pongrawee Nimnoi)

โครงการจัดตั้งสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปี
งบประมาณ พ.ศ. 2557

แบบฟอร์มบทคัดย่อ

ภาษาไทย

ส่วนที่ 1

ชื่อโครงการ การศึกษารูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อเอนเทอโรโรแบคทีเรีย (enterobacteria) ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล และการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบชนิดของเชื้อ enterobacteria อย่างรวดเร็วโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ชื่อผู้วิจัย 1. รองศาสตราจารย์ ดร. นิลวรรณ พงศ์ศิลป์ (หัวหน้าโครงการ)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ระวี นิ่มน้อย (ผู้ร่วมวิจัย)
คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2558

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์

สาขาวิชา (อ้างอิงตามวช.) เกษตรศาสตร์และชีววิทยา

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อและประเมินจำนวนเชื้อเอนเทอโรโรแบคทีเรีย (enterobacteria) ในตัวอย่างอาหารทะเล 35 ตัวอย่างที่จำหน่ายในจังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดระยอง มีตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อ enterobacteria จำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่พบเชื้อ enterobacteria มีจำนวนตั้งแต่ 6.67 ± 5.77 ถึง $2.44 \times 10^5 \pm 5.75 \times 10^4$ colony forming unit (CFU)/กรัม ซึ่งแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จำนวน 96 ไอโซเลต (isolate) จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค ERIC-PCR ซึ่งใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ (strain) พบว่าได้รูปแบบ ERIC-PCR จำนวน 81 รูปแบบ ทำการทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้จำนวน 81 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl สำหรับการเจริญ 2) การสังเคราะห์เอนไซม์ protease, urease, catalase, amylase และ caseinase 3) รูปแบบการหมักน้ำตาล 4) รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation และ 5) การทดสอบ IMViC จากการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด พบว่าร้อยละของจำนวนสายพันธุ์เชื้อ enterobacteria ที่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ penicillin, vancomycin, erythromycin, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, streptomycin, neomycin และ kanamycin มีค่าเป็น 90.12, 76.54, 69.14, 61.73, 22.22, 3.70, 3.70, 2.47 และ 1.23 ตามลำดับ ในขณะที่ไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่ต้านทาน gentamycin เชื้อที่พบว่ามีพลาสมิดมีจำนวน

16 สายพันธุ์ โดยมีพลาสมิด 1-5 ชิ้น ขนาดตั้งแต่ 1.7 ถึง 19.0 กิโลเบส จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค TP-RAPD ซึ่งใช้ในการจำแนกชนิด (species) พบว่าได้รูปแบบ TP-RAPD จำนวน 16 รูปแบบ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อตัวแทนจากแต่ละรูปแบบ TP-RAPD พบว่าเชื้อมีร้อยละของระดับความเหมือน (% identity) เท่ากับ 98%-99% กับยีน 16S rDNA ของเชื้อ enterobacteria ใน 6 สกุล (genus) ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Serratia* และ *Yersinia* จากการศึกษาในด้านทฤษฎีชีววิทยา พบว่าเชื้อในสกุล *Enterobacter* และ *Providencia* มียีน *ampC* เชื้อในสกุล *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia* และ *Serratia* มียีน *blaTEM* เชื้อในสกุล *Enterobacter* และ *Providencia* มียีน *shv* รวมถึงเชื้อในสกุล *Klebsiella* และ *Providencia* มียีน *ermB* เชื้อตัวแทนที่มียีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase มีค่ากิจกรรมตั้งแต่ 1.96 ± 0.88 ถึง 11.30 ± 0.37 ไมโครโมลของ nitrocefin ที่ถูกย่อยสลาย/นาทิ/มิลลิกรัมโปรตีน

คำสำคัญ : เอนเทอร์โรแบคทีเรีย; ลักษณะทางพันธุกรรม; ลักษณะทางชีวเคมี; enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR); two primers-random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD); ยีนด้านทฤษฎีชีววิทยา; ยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA)

ภาษาอังกฤษ

ส่วนที่ 1

Research Title Antibiotic Resistance Gene Patterns of Enterobacteria Isolated from Seafood Products and Development of a Rapid Technique for Species Identification of Enterobacteria by Using DNA Fingerprints

Researcher 1. Associate Professor Dr. Neelawan Pongsilp (Project Leader)
Faculty of Science, Silpakorn University
2. Assistant Professor Dr. Pongrawee Nimnoi (Co-Researcher)
Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University
Kamphaeng Sean Campus

Research Grants Fiscal Year 2015,
Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion 2016

Type of research Applied Research

Subjects (based NRCT) Agriculture and Biology

ส่วนที่ 2 Abstract (ไม่เกิน 250 คำ)

Enterobacteria were isolated from 35 samples of seafood sold in markets in Samutsakhon, Prachuapkhirikhun and Rayong provinces. The numbers of enterobacteria presented in these samples

were enumerated. No enterobacteria was detected in 2 samples, while other samples contained enterobacteria varying from 6.67 ± 5.77 to $2.44 \times 10^5 \pm 5.75 \times 10^4$ colony forming unit (CFU)/gram. The total 96 pure isolates were obtained. Based on DNA fingerprint analysis with ERIC-PCR which has been used in strain characterization, 81 ERIC-PCR patterns were derived. The 81 isolated strains were subjected to physiological and biochemical characterizations including 1) temperatures, pH values and NaCl concentrations for growth 2) syntheses of protease, urease, catalase, amylase and caseinase 3) sugar fermentation patterns 4) decarboxylation reaction patterns and 5) IMViC test. Determination of the resistance to 10 antibiotics revealed that 90.12%, 76.54%, 69.14%, 61.73%, 22.22%, 3.70%, 3.70%, 2.47% and 1.23% of numbers of enterobacterial strains were resistant to penicillin, vancomycin, erythromycin, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, streptomycin, neomycin and kanamycin, respectively, whereas none was resistant to gentamycin. The 16 strains were found to possess plasmids varying from 1 to 5 in number and from 1.7 to 19.0 kilobase in size. Based on DNA fingerprint analysis with TP-RAPD which has been used in species characterization, 16 TP-RAPD patterns were derived. The 16S rDNA sequences of the representative strains from each TP-RAPD pattern exhibited 98%-99% identities to those of enterobacteria in 6 genera including *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Serratia* and *Yersinia*. The *ampC* gene was found in the strains of *Enterobacter* and *Providencia*. The *blaTEM* gene could be detected in the strains of *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia* and *Serratia*. The strains of *Enterobacter* and *Providencia* possessed the *shv* gene. The strains of *Klebsiella* and *Providencia* contained the *ermB* gene. The representative strains possessing β -lactamase genes exhibited β -lactamase activity ranging from 1.96 ± 0.88 to 11.30 ± 0.37 micromole of hydrolysed nitrocefin/min/mg protein.

Key words : enterobacteria; genotypic characteristic; biochemical characteristic; enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR); two primers-random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD); antibiotic resistance gene; 16S ribosomal RNA gene (16S rDNA)

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัยและวิจารณ์	15
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	80
บรรณานุกรม	83
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย	94

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และขนาดของ PCR product จากยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ	11
2: จำนวนเชื้อ enterobacteria ในตัวอย่างอาหารทะเล	16
3: อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl สำหรับการเจริญของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์	20
4: การสังเคราะห์เอนไซม์ protease, urease, catalase, amylase และ caseinase ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์	25
5: รูปแบบการหมักน้ำตาล รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation และการทดสอบ IMViC ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์	30
6: รูปแบบพลาสมิคของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์	34
7: ความต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์	38
8: รูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์	42
9: กลุ่มของรูปแบบ TP-RAPD ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์	49
10: ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อ enterobacteria แต่ละชนิด	51
11: สกุลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแต่ละชนิด	56
12: สกุลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในอาหารทะเลจากตลาดจำหน่ายอาหารทะเลแต่ละแหล่ง	58
13: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 1 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	59
14: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 2 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	60
15: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 3 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	61
16: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 4 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	62
17: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 5 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
18: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 6 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	64
19: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 7 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	65
20: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 8 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	66
21: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 9 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	67
22: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 10 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	68
23: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 11 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	69
24: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 12 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	70
25: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 13 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	71
26: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 14 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	72
27: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 15 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	73
28: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 16 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	74
29: ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเชื้อ enterobacteria	76
30: กิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อ enterobacteria ที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam	79

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1: โคโลนีสีม่วงแดงของเชื้อ enterobacteria ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก VRBG agar	15
2: dendrogram ที่สร้างจากรูปแบบ ERIC-PCR ของเชื้อ enterobacteria ที่แยกได้จากอาหารทะเล จำนวน 96 ไอโซเลต	18
3: clear zone รอบโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร starch agar ที่ย้อมด้วย gram iodine	25
4: clear zone รอบ antibiotic disc ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยสารปฏิชีวนะ	38
5: รูปแบบ RAPD 16 รูปแบบที่ได้จากเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์	48

บทนำ

เชื้อเอนเทอโรแบคทีเรีย (enterobacteria) เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งมีอยู่หลายสกุล (genus) เช่น *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia* และ *Yersinia* เชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรกระบบทางเดินอาหาร เช่น ดับอึกเสบ กระเพาะอึกเสบ และอาหารเป็นพิษ จึงใช้เป็นดัชนีแสดงถึงการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารและน้ำ คุณลักษณะที่สำคัญประการหนึ่งของเชื้อ enterobacteria คือความต้านทานสารปฏิชีวนะ ผลการวิจัยระบุว่าเชื้อ enterobacteria มีความต้านทานสูงต่อสารปฏิชีวนะหลายชนิดสามารถอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่มีสารปฏิชีวนะ (Miyata และคณะ 2011) เชื้อ enterobacteria ต่างชนิดอาจมีรูปแบบความต้านทานสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน มีรายงานการระบาดของเชื้อ enterobacteria ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะต่างชนิดจากหลากหลายแหล่งพื้นที่ทั่วโลก เช่น ในละติน อเมริกา พบ enterobacteria ที่สังเคราะห์เอนไซม์ β -lactamase ซึ่งมีฤทธิ์ย่อยสลายสารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam ส่งผลให้เชื้อมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น cephalosporin, cephamycin และ carbapenem (Lincopan และคณะ 2006) เชื้อ *Morganella morganii* และ *Citrobacter freundii* มีความต้านทานสารปฏิชีวนะ amoxicillin, cefuroxime, gentamicin, ciprofloxacin, ceftazidime และ aztreonam คุณลักษณะที่สำคัญของเชื้อ *Klebsiella* คือความต้านทานต่อ penicillin และสารปฏิชีวนะกลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 3 และรุ่นที่ 4 โดยมีการสังเคราะห์เอนไซม์ extended-spectrum β -lactamase (ESBL) และเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside ซึ่งยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เหล่านี้มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิด (plasmid) คุณลักษณะที่สำคัญของเชื้อ *Enterobacter* คือความต้านทานต่อ ampicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, cefoxitin และสารปฏิชีวนะกลุ่ม cephalosporin รุ่นที่ 1 โดยมีการสังเคราะห์เอนไซม์ AmpC β -lactamase เชื้อ *Klebsiella* และ *Enterobacter* ส่วนมากไม่ต้านทานต่อ fluoroquinolone, trimethoprim-sulfamethoxazole, carbapenem และสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside ดังนั้นการรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจาก *Klebsiella* และ *Enterobacter* จึงนิยมใช้สารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam หรือ fluoroquinolone ร่วมกับสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside (Bouza และ Cercenado 2002) เชื้อ *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* ไม่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam ยกเว้น amoxicillin (Soleimanian และคณะ 2011) การใช้สารปฏิชีวนะก็มีผลกระทบต่อชนิดและจำนวนของเชื้อ enterobacteria ด้วยเช่นกัน (Jernberg และคณะ 2007) นอกจากนี้ยังพบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะอยู่บนโครโมโซมและพลาสมิดของเชื้อ enterobacteria ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทำให้เกิดปัญหาต่อการควบคุมการระบาดของเชื้อโดยใช้สารปฏิชีวนะ (Gazouli และคณะ 1996; Smith และคณะ 1978; Urbina และคณะ 1989) เนื่องจากเชื้อ enterobacteria ส่วนมากต้านทานสารปฏิชีวนะหลายชนิด และพัฒนาความต้านทานต่อสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นการเลือกใช้สารปฏิชีวนะและสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการควบคุมการระบาดของเชื้อ

เชื้อ enterobacteria นั้นพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งในอาหาร น้ำ ผลผลิตทางการเกษตร เนื้อสัตว์ สัตว์น้ำ และผลิตภัณฑ์อาหารทะเล โดยมีความแตกต่างกันในด้านจำนวนและชนิดของเชื้อ จากรายงานของ Center for Food Safety and Applied Nutrition ในปี ค.ศ. 2001 ได้ระบุเชื้อก่อโรคที่พบมากที่สุด ปลา ได้แก่ เชื้อ enterobacteria ในสกุล *Salmonella* และ *Escherichia* นอกจากเชื้อ enterobacteria แล้วยังพบ *Staphylococcus* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens* และ *Clostridium botulinum* (Yagoub 2009)

การประมงเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญและสร้างรายได้ให้กับประเทศ การปนเปื้อนของเชื้อ enterobacteria ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ย่อมส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ทั้งในด้านสุขอนามัยและการเน่าเสีย โครงการวิจัยนี้จะได้ศึกษาถึงจำนวนและชนิดของเชื้อ enterobacteria ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล เชื้อ enterobacteria ที่แยกได้จะคัดเลือกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) จากเทคนิค enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) ศึกษารูปแบบพลาสมิด จัดจำแนกชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค two primers-random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) ระบุสกุลของเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน small subunit ribosomal RNA (16S rDNA) รวมทั้งศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญต่อการจัดจำแนกเชื้อ enterobacteria รูปแบบความต้านทานสารปฏิชีวนะ รูปแบบของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ และการใช้สารยับยั้งการเจริญของเชื้อ ผลการศึกษาสามารถใช้เป็นดัชนีแสดงถึงการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และความเสี่ยงต่อการเกิดโรค สามารถระบุสกุลหรือชนิดของเชื้อ enterobacteria ที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลและทราบสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ สำหรับรูปแบบ TP-RAPD สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงเพื่อระบุชนิดของเชื้อ enterobacteria ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะส่งข้อมูลและวิธีการวิเคราะห์ให้กับหน่วยงานที่ตรวจวิเคราะห์เชื้อ enterobacteria ในตัวอย่างอาหาร เช่น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, ศูนย์ทดสอบมาตรฐานวิทยาศาสตร์ และบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สำหรับรูปแบบความต้านทานสารปฏิชีวนะ รูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ และผลของการใช้สารยับยั้งการเจริญของเชื้อ enterobacteria ซึ่งเชื้อ enterobacteria ที่พบในประเทศต่างๆ อาจจะมีรูปแบบความต้านทานสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน ข้อมูลดังกล่าวจึงจำเป็นต้องการเลือกใช้ชนิดของสารปฏิชีวนะ หรือการใช้สารปฏิชีวนะร่วมกับสารประกอบอื่นๆ เช่น aminoglycoside ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ enterobacteria ได้อย่างเหมาะสม เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา ลดค่าใช้จ่าย และป้องกันการพัฒนาความต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ enterobacteria สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการเลือกใช้สารปฏิชีวนะ เพื่อควบคุมการระบาดของโรคในการใช้อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลและการฆ่าเชื้อโรคที่ติดมากับแม่พันธุ์โดยการแช่สารปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงและการพัฒนาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารทะเล เพื่อเพิ่มมาตรฐานให้เป็นที่ยอมรับสำหรับการส่งออกจำหน่ายในต่างประเทศ

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เชื้อ enterobacteria เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งมีอยู่หลายสกุล เช่น *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia* และ *Yersinia* เชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรกระบบทางเดินอาหาร เช่น ดับ อักเสบ กระเพาะอักเสบ และอาหารเป็นพิษ รวมถึงเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือด และโรค pneumonia จึงใช้เป็นดัชนีแสดงถึงการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหาร และน้ำ การควบคุมเชื้อเหล่านี้ใช้สารปฏิชีวนะเป็นหลัก แต่ก็พบว่าเชื้อมีความต้านทานสารปฏิชีวนะหลายชนิด จากการศึกษาเชื้อ enterobacteria ในประเทศชิลี พบว่าร้อยละ 87 ของเชื้อที่ทดสอบต้านทาน sulphamethoxazole และร้อยละ 34 ต้านทาน trimethoprim (Urbina และคณะ 1989) ในละติน อเมริกา พบเชื้อ enterobacteria ที่สังเคราะห์เอนไซม์ β -lactamase ซึ่งมีฤทธิ์ย่อยสลายสารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam ส่งผลให้เชื้อต้านทานสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น cephalosporin, cephamycin และ carbapenem (Lincopan และคณะ 2006) เชื้อ enterobacteria ที่แยกได้จากผู้ป่วยชาวไนจีเรีย เป็นเชื้อ *M. morganii*, *Cit. freundii*, *Esc. coli* และ *Proteus mirabilis* เชื้อ *M. morganii* และ *Cit. freundii* ต้านทาน amoxicillin, clavulanate, cefuroxime, gentamicin, ciprofloxacin, ceftazidime และ aztreonam ส่วนเชื้อ *Esc. coli* และ *Proteus mirabilis* ต้านทาน amoxicillin (Soleimanian และคณะ 2011) เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* และ *Esc. coli* ที่พบในประเทศกรีซ ต้านทาน cefoxitin (Gazouli และคณะ 1996) เชื้อ *Cit. freundii* and *Enterobacter cloacae* ต้านทาน piperacillin (Kadima และ Weiner 1997) จากการศึกษาเชื้อ enterobacteria สาเหตุของโรคติดเชื้อที่ระบาดในโรงพยาบาล Royal Liverpool ประเทศอังกฤษ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ ต้านทาน tobramycin, gentamicin, neomycin, streptomycin, spectinomycin, ampicillin, cephaloridine, sulphamethoxazole, trimethoprim, tetracycline และ chloramphenicol (Hart และ Gibson 1982) มีรายงานการระบาดของเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhi (ชื่อเดิม *Salmonella typhi*) ในหลายประเทศ ได้แก่ เม็กซิโก อินเดีย เวียดนาม และประเทศไทย *Sal. enterica* serovar Typhi ที่ระบาดในประเทศเหล่านี้ ต้านทาน chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, spectinomycin และ sulphonamide จากการศึกษาของ Newsom และคณะ (1974) พบว่าร้อยละ 80 ของเชื้อ *Esc. coli* และ *Proteus mirabilis* ไม่ต้านทาน penicillin และ cephalosporin ในขณะที่ *Enterobacter*, *Citrobacter* และ *Proteus vulgaris* ต้านทาน cephalosporin จากการศึกษาเชื้อ enterobacteria ที่แยกได้จากโรงพยาบาลในเมือง Toulouse ประเทศฝรั่งเศส และในเมือง Brooklyn รัฐ New York ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าเชื้อ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., และ *Proteus mirabilis* ต้านทาน ampicillin และ carbenicillin ในระดับใกล้เคียงกัน และต้านทาน cephalosporin ในระดับที่แตกต่างกันเล็กน้อย แต่ต้านทานต่อ nalidixic acid ในระดับที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเชื้อ *Salmonella* spp. มีความต้านทาน ampicillin ในระดับที่สูงกว่า *Proteus mirabilis* จากประเทศฝรั่งเศส และ *Shigella* spp. จากรัฐ New York (Cherubin 1986) จากการศึกษาเชื้อ enterobacteria

ที่ต้านทาน carbapenem ในประเทศจีน พบว่าการใช้ polymyxin B ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเหล่านี้ได้ดีกว่าการใช้ tigecycline (Bouza และ Cercenado 2002)

เชื้อ enterobacteria มักพบปนเปื้อนในอาหาร น้ำ เนื้อสัตว์ และผัก มีรายงานการพบเชื้อ enterobacteria ในเนื้อปลาสด โดยพบมากถึงร้อยละ 40 -55 ของตัวอย่างที่ทดสอบ เชื้อ enterobacteria ที่พบมากในเนื้อปลาสด ได้แก่ *Esc. coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ *Proteus* spp. (Yagoub 2009) รายงานของ Center for Food Safety and Applied Nutrition ในปี ค.ศ. 2001 ได้ระบุเชื้อก่อโรคที่พบมากที่สุดในปลา ได้แก่ เชื้อ enterobacteria ในสกุล *Salmonella* และ *Escherichia* นอกจากเชื้อ enterobacteria แล้วยังพบ *Staphylococcus* spp., *V. parahaemolyticus*, *Clo. perfringens* และ *Clo. botulinum* (Yagoub 2009) มีรายงานการพบ *Esc. coli* ในสัตว์ทะเลและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในประเทศต่างๆ The Centers for Disease Control and Prevention ประเทศสหรัฐอเมริกา รายงานการระบาดของเชื้อ *Esc. coli*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล ระหว่างปี ค.ศ. 1973-ปี ค.ศ. 2006 (Iwamoto และคณะ 2010) การพบ *Esc. coli* ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเกิดจากการปนเปื้อนน้ำสกปรก และการขาดสุขอนามัยในระหว่างกระบวนการผลิต (Huss 1993) มีรายงานการพบ *Esc. coli* สายพันธุ์ก่อโรคในอาหารทะเลดังตัวอย่างเช่น พบว่าร้อยละ 5 ของหอยกาบ และร้อยละ 3 ของปลาสดที่จำหน่ายในเมือง Mangalore ประเทศอินเดีย มีการปนเปื้อนเชื้อ *Esc. coli* ที่สังเคราะห์สารพิษ shiga toxin (Kumar และคณะ 2001) และพบเชื้อ *Esc. coli* ที่สังเคราะห์สารพิษ enterotoxin ปนเปื้อนในกุ้ง seabob และในปลากระพงแดงที่จำหน่ายในเมือง Fortaleza ประเทศบราซิล (Teophilo และคณะ 2002) จากการตรวจสอบอาหารทะเล ได้แก่ ปลาแซลมอน กุ้ง และปลานิล ที่นำเข้าจาก 12 ประเทศ และจำหน่ายในเมือง Baton Rouge รัฐ Louisiana ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีการปนเปื้อน *Shigella* spp., *Salmonella* spp. และ *Esc. coli* เท่ากับร้อยละ 32.2, 17.5 และ 9.4 ตามลำดับ (Wang และคณะ 2011) *Sal. enterica* ที่เป็นสาเหตุหลักของการก่อโรคในมนุษย์จากการบริโภคอาหารทะเล ได้แก่ *Sal. enterica* serovar Enteritidis และ Typhimurium (Greig และ Ravel 2009) มีรายงานการพบ non-typhoidal *Salmonella* ในอาหารทะเลในหลายประเทศ เช่น อินเดีย (Bhowmick และคณะ 2011; Shabarinath และคณะ 2007) และสิงคโปร์ (Huang และคณะ 2012a) จากการสำรวจของ The U.S. Food and Drug Administration ที่ได้ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 1990-ปี ค.ศ. 1998 พบว่าเกือบร้อยละ 10 ของผลิตภัณฑ์ของอาหารทะเลนำเข้า และร้อยละ 2.8 ของผลิตภัณฑ์ของอาหารทะเลจากในประเทศ มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* โดย serovar ที่พบบ่อยที่สุดในผลิตภัณฑ์ของอาหารทะเลนำเข้า คือ Weltevreden (Heinitz และคณะ 2000) จากการสำรวจของ The National Food Surveillance System ประเทศญี่ปุ่น พบว่าเชื้อ *Salmonella* ที่พบมากที่สุดในอาหารทะเลที่จำหน่ายในประเทศญี่ปุ่นระหว่างปี ค.ศ. 1998-ปี ค.ศ. 2008 เป็น serotype Infantis (Hara-Kudo และคณะ 2013)

การใช้สารปฏิชีวนะก็มีผลกระทบต่อชนิดและจำนวนของเชื้อ enterobacteria ด้วยเช่นกัน (Jernberg และคณะ 2007) ความต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียถูกควบคุมโดยยีน สำหรับเชื้อ enterobacteria นั้น มีรายงานว่ายีนต้านทานสารปฏิชีวนะมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมและพลาสมิด เช่น ยีนต้านทาน trimethoprim ที่อยู่บนพลาสมิด และเกิดการถ่ายโอนร่วมกับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะอื่นๆ ได้โดยกระบวนการ conjugation (Urbina และคณะ 1989) ยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ β -lactamase Class I มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมของเชื้อ *Enterobacter cloacae*, *Cit. freundii*, *Proteus vulgaris*, *M. morganii* และ *Serratia marcescens* (Yang และ Livermore 1988) เอนไซม์ β -lactamase ทำหน้าที่ย่อยสลายสารประกอบกลุ่ม β -lactam ซึ่งรวมถึงสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น ampicillin, amoxicillin, cephalixin, cefoxitin, penicillin, cephalosporin, carbapenem และ piperacillin (Kamida และ Weiner 1997; Lincopan และคณะ 2006) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ β -lactamase มีอยู่หลายยีน เช่น *bla_{CMY}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{PER-2}* ESBL, *bla_{IMP-1}*, *bla_{IMP-2}*, *bla_{IMP-11}*, *bla_{VIM-1}*, *bla_{VIM-2}* MBL และ *ampC* (Carattoli และคณะ 2002; Gootz และคณะ 1984; Lincopan และคณะ 2005; Takahashi และคณะ 2010) ตัวอย่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside ได้แก่ *acc*, *aadA*, *aph*, *strA/B* และ *ksgA* (Huang และคณะ 2012b) ในบรรดาอินเหล่านี้ มีข้อสังเกตว่าบางยีนเป็นยีนที่พบได้ทั่วไปในเชื้อ enterobacteria ในพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่ง เช่น พบว่าเชื้อ enterobacteria หลายชนิดในทวีปแอฟริกาที่มียีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับยีน *bla_{CTX-M}* (Soleimanian และคณะ 2011) เชื้อ *Salmonella* ที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการสังเคราะห์เอนไซม์ β -lactamase ที่ควบคุมโดยยีน *cmy-2* ซึ่งยีนนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันใน *Salmonella* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจาก *Salmonella* ที่แยกได้ในประเทศแอลจีเรีย (Carattoli และคณะ 2002) จากการคัดเลือกเชื้อ *Enterobacter cloacae* ที่ต้านทาน cefotaxime, ceftazidime หรือ aztreonam ที่แยกได้ในประเทศญี่ปุ่น พบว่ามียีน *bla_{IMP-1}* หรือ *bla_{IMP-11}* หรือ *bla_{CTX-M3}* หรือ *bla_{CTX-M14}* หรือ ESBL (Takahashi และคณะ 2010) สำหรับเชื้อ enterobacter ที่แยกได้ในประเทศอิรัก พบว่าต้านทานสารปฏิชีวนะหลายชนิด โดยมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะอยู่บนพลาสมิดขนาดประมาณ 52–100 กิโลเบส (kilobase: kb) ประกอบด้วยยีน *acc*, *aadA*, *aph*, *strA/B*, *ksgA*, *bla_{TEM1}*, *bla_{AMPC}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{VIM-2}*, *bla_{SHV}*, sulfamethoxazole/trimethoprim (*sul/dfr*), ยีนต้านทาน tetracycline (*tet*) และยีนต้านทาน chloramphenicol (*cat*) (Huang และคณะ 2012b) เชื้อ *Sal. enterica* serovar Typhimurium มียีน *aadA2*, *sul1*, *tetA* และ *bla_{CARB-2}* ซึ่งควบคุมความต้านทานต่อ streptomycin, sulfonamides, tetracycline และ ampicillin ตามลำดับ ยีนเหล่านี้ตำแหน่งยีนเรียงกันอยู่บนโครโมโซม (Briggs และ Fratamico 1999) จากการศึกษาของ Gazouli และคณะ (1996) พบว่ายีนต้านทาน cefoxitin ของเชื้อ *Kle. pneumoniae* และ *Esc. coli* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิด เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ β -lactamase พบการถ่ายโอนยีนนี้ไปยังเชื้อ *Enterobacter aerogenes* พลาสมิดที่มียีนนี้ยังพบในเชื้ออื่นๆ อีก เช่น *Cit. freundii* (Fosberry และคณะ 1994; Tzouveleakis และคณะ 1994) และ *Enterobacter cloacae* (Papanicolaou และคณะ 1990)

พบการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ cephalosporinase จากเชื้อ *Cit. freundii* ไปยังเชื้อ *Esc. coli* และ *Enterobacter aerogenes* นอกจากนี้ยังมียีน *cat* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิด เป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ chloramphenicol acetyltransferase ซึ่งทำให้เชื้อ enterobacteria ด้านทานต่อ chloramphenicol (Proctor และ Rownd 1982) สำหรับยีน *cmy-2* ที่มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดของเชื้อ *Salmonella* สามารถถ่ายโอนได้ทั้งใน *Salmonella* ด้วยกัน และสามารถถ่ายโอนไปยังเชื้อ *Esc. coli* ในการถ่ายโอนพลาสมิดจาก *Salmonella* สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อ ampicillin, ceftriaxone, ceftiofur และ cefoxitin นั้น พบว่าการได้รับพลาสมิดของ *Salmonella* บางสายพันธุ์ มีผลให้ *Esc. coli* ด้านทานสารปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิด แต่การได้รับพลาสมิดของ *Salmonella* บางสายพันธุ์ มีผลให้ *Esc. coli* ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam เท่านั้น (Carattoli และคณะ 2002) มีรายงานว่าพลาสมิดที่มียีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ESBL ซึ่งพบในเชื้อ *Enterobacter*, *Kle. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* และ *Esc. coli* สามารถถ่ายโอนได้ระหว่างเชื้อแบคทีเรียทั้งในสกุลเดียวกันและต่างสกุล ทั้งนี้การสังเคราะห์เอนไซม์ ESBL มีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียด้านทานสารปฏิชีวนะกลุ่ม cephalosporin, ampicillin, amoxicillin, penicillin และ monobactam (เช่น aztreonam) (Bouza และ Cercenado 2002) ยีนด้านทานสารปฏิชีวนะหลายชนิดอาจมีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดเดียวกัน เช่น ใน *Sal. enterica* serovar Typhi มียีนด้านทาน tetracycline, streptomycin, spectinomycin, sulphonamide และ chloramphenicol อยู่บนพลาสมิดเดียวกัน (Smith และคณะ 1978) เช่นเดียวกับ *Esc. coli* ซึ่งมียีน *tet(A)*, *sulI* และ *bla_{TEM}* อยู่บนพลาสมิดเดียวกัน (Bonnet และคณะ 2009) ยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ESBL มักมีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดที่มียีนด้านทานสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside และ sulfonamide (Bouza และ Cercenado 2002; Paterson 2006) นอกจากการถ่ายโอนพลาสมิด ยีนด้านทานสารปฏิชีวนะที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมก็สามารถถ่ายโอนระหว่างเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกันโดยกระบวนการ conjugation (Corso และคณะ 2005)

มีข้อสันนิษฐานว่าการใช้สารปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์ เป็นปัจจัยสำคัญในชักนำให้เกิดการพัฒนาความต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ด้านทานต่อ tetracycline มีจำนวนลดลง เมื่อประเทศในทวีปยุโรปมีการห้ามใช้ tetracycline เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในอาหารสัตว์ (van Leeuwen และคณะ 1979) นอกจากเชื้อ enterobacteria แล้ว ยังพบการพัฒนาความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ จากการใช้สารปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในอาหารสัตว์ ตัวอย่างเช่น พบว่า avoparcin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม glycopeptide เป็นปัจจัยชักนำให้เชื้อ *Enterococcus faecium* ด้านทาน vancomycin (Bager และคณะ 1997; del Grosso และคณะ 2000) การยกเลิกการใช้ avoparcin ในฟาร์มปศุสัตว์มีผลลดการปนเปื้อนของ *Enterococcus faecium* ที่ด้านทาน vancomycin ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยเฉพาะในสัตว์ปีก มีลดการปนเปื้อนของเชื้อจากร้อยละ 18.8 เหลือร้อยละ 9.6 (del Grosso และคณะ 2000) นอกจาก avoparcin แล้ว ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างการพัฒนาความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อ *Enterococcus* กับการใช้สารปฏิชีวนะอื่นๆ ในอาหาร

สัตว์ เช่น avilamycin, bacitracin spiramycin, tylosin และ virginiamycin (Aarestrup และคณะ 2000) Bywater และคณะ (2005) รายงานว่าการเลิกใช้ bacitracin, spiramycin, tylosin และ virginiamycin เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในอาหารสัตว์ มีผลทำให้จำนวนของ *Enterococcus faecium* ที่ต้านทาน spiramycin, tylosin และ virginiamycin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

สารบางชนิด เช่น clavulanic acid, sulbactam และ tazobactam เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase มีการใช้สารเหล่านี้ในทางการแพทย์เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ enterobacteria พบว่า tazobactam สามารถยับยั้งความต้านทานของเชื้อ *Cit. freundii* และ *Enterobacter cloacae* ต่อ piperacillin ได้ (Kamida และ Weiner 1997) แต่สารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ดังกล่าวกลับไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ cephalosporinase ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม AmpC β -lactamase (Bouza และ Cercenado 2002)

การประมงเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญและสร้างรายได้ให้กับประเทศ การปนเปื้อนของเชื้อ enterobacteria ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ย่อมส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ทั้งในด้านสุขอนามัยและการเน่าเสีย ดังนั้นการศึกษาและสำรวจเชื้อ enterobacteria ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเล จึงมีความน่าสนใจ เพราะจะทำให้ทราบถึงการปนเปื้อนของเชื้อ enterobacteria ซึ่งมีผลกระทบต่อสุขอนามัย และการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค ERIC-PCR สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์และประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ การศึกษารูปแบบ TP-RAPD สามารถจำแนกชนิดของเชื้อ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีสามารถใช้ในการจัดจำแนกสกุลหรือชนิดของเชื้อ และจัดทำฐานข้อมูลอ้างอิงสำหรับการระบุชนิดของเชื้ออย่างรวดเร็ว รูปแบบความต้านทานสารปฏิชีวนะและรูปแบบของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ รวมถึงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ มีประโยชน์ต่อการควบคุมการระบาดของเชื้อ และประเมินความเป็นไปได้ของการถ่ายโอนยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในธรรมชาติ

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อและประเมินจำนวนเชื้อ *enterobacteria* ในอาหารทะเล

เก็บตัวอย่างอาหารทะเลสดจากตลาดจำหน่ายอาหารทะเล 3 แห่ง ได้แก่ 1) ตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร 2) ตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ และ 3) ตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง รวม 35 ตัวอย่าง บรรจุตัวอย่างในกล่องปลอดเชื้อ แช่ในน้ำแข็งเพื่อเก็บตัวอย่างที่ 0°C -4°C แยกเชื้อจากตัวอย่างภายใน 6 ชั่วโมงหลังจากการเก็บตัวอย่าง ล้างเศษสิ่งสกปรกจากส่วนนอกของตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ใช้ไบโอมิคริปลอดเชื้อตัดส่วนชิ้นเนื้อโดยตัดเนื้อบริเวณส่วนกลางระหว่างด้านบนและด้านล่างจากหลายๆ ตำแหน่งของตัวอย่าง นำมารวมคลุกเคล้าให้เข้ากันก่อน แล้วใช้ช้อนปลอดเชื้อตักตัวอย่าง 25 กรัมใส่ลงใน stomacher plastic bag ปลอดเชื้อ เติมน้ำ peptone water (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA) 225 มิลลิลิตร ตีตัวอย่างอาหารให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง stomacher [Seward stomacher 400 circulator (Seward Ltd., West Sussex, UK)] ที่ 200 รอบต่อนาที (round per minute: rpm) เป็นเวลา 2 นาที ทำ serial dilution โดยใช้ peptone water ถึงระดับความเจือจาง (dilution factor) 10^{-3} ปิเปตสารแขวนลอยตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตรจากทุกระดับความเจือจาง ใส่ลงในจานอาหารเปล่า นำอาหารคัดเลือก violet red bile glucose (VRBG) agar (Titan Biotech. Ltd., Delhi, India) 15 มิลลิลิตร ที่หลอมที่ 100°C แล้วแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 45°C มา pour plate หมุนจานอาหารให้สารแขวนลอยตัวอย่างอาหารกระจายตัวทั่วจานอาหาร เททับผิวหน้าอาหารด้วย VRBG agar ที่แช่ไว้ที่ 45°C บ่มจานอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน แยกโคโลนีเดี่ยวสีม่วงแดงซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *enterobacteria* (da Silva และคณะ 2013) นำมาศึกษาคุณลักษณะ ได้แก่ รูปร่างเซลล์ การติดสีแกรม (Gram's stain) และการสังเคราะห์เอนไซม์ oxidase คัดเลือกเชื้อที่มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมลบ และไม่สังเคราะห์เอนไซม์ oxidase ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *enterobacteria* (Walker และคณะ 2014) เก็บเชื้อใน nutrient agar (NA) slant ที่ 4°C และใน 15% glycerol แช่แข็งที่ -80°C จำนวนจำนวนเชื้อ *enterobacteria* ในตัวอย่างอาหารทะเล (หน่วยเป็น CFU/กรัม)

2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *enterobacteria* จากเทคนิค ERIC-PCR

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ให้มีการเจริญถึงระยะ mid-log phase ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นสกัด total genomic DNA โดยใช้ GF-1 bacterial DNA extraction kit (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) นำ total genomic DNA ที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์รูปแบบ ERIC-PCR โดยใช้ primer ERIC2 (5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3') และ ERIC1R (5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TAC C 3') ตามวิธีการที่บรรยายโดย Ogutcu และคณะ (2009); Versalovic และคณะ (1991) หลังจากนั้นตรวจผลของปฏิกิริยา PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis นำรูปแบบ ERIC-PCR มาสร้าง dendrogram โดยโปรแกรม Image Master 1D Elite

Software version 5.20 (Amersham, Buckinghamshire, UK) ตามวิธีการที่บรรยายไว้ใน Nimnoi และคณะ (2010); Nimnoi และ Pongsilp (2009) คัดเลือกเชื้อที่มีรูปแบบ ERIC-PCR แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์ไว้สำหรับการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี รูปแบบพลาสมิด รูปแบบความต้านทานสารปฏิชีวนะ รูปแบบของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ และการจำแนกชนิดของเชื้อ enterobacteria ด้วยเทคนิค TP-RAPD

3. การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์ ลักษณะที่ทำการศึกษาได้แก่ 1) อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ 2) การสังเคราะห์เอนไซม์ protease, urease, catalase, amylase และ caseinase 3) รูปแบบการหมักน้ำตาล 4) รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation และ 5) การทดสอบ IMViC (Krieg และ Lockhart 1966)

4. การศึกษารูปแบบพลาสมิด

เลี้ยงเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB ให้มีการเจริญถึงระยะ mid-log phase ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที สกัดพลาสมิดจากตะกอนเซลล์โดยใช้ GF-1 plasmid extraction kit (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) ตรวจสอบรูปแบบพลาสมิดใน 1% agarose gel electrophoresis คำนวณหาขนาดของพลาสมิดเปรียบเทียบกับพลาสมิดของ *Esc. coli* V517 โดยใช้โปรแกรม Image Master 1D Elite Software version 5.20 (Amersham, Buckinghamshire, UK)

5. การศึกษารูปแบบความต้านทานสารปฏิชีวนะ

ทดสอบความต้านทานของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์ต่อสารปฏิชีวนะชนิด 10 ชนิด ได้แก่ ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamycin (10 µg), kanamycin (30 µg), neomycin (30 µg), penicillin G (10 units), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg) และ vancomycin (30 µg) โดย spread สารแขวนลอยเชื้อบนอาหาร NA วางแผ่นสารปฏิชีวนะ (antibiotic disc) (Oxoid, Basingstoke, UK) ลงบนผิวหน้าของอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C จนกระทั่งเชื้อเจริญ บันทึกลงใส (clear zone) รอบ antibiotic disc ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสารปฏิชีวนะ (Pongsilp และคณะ 2010)

6. การศึกษารูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ

นำ total genomic DNA ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์ มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ ได้แก่ ยีน *ampC*, *blaCTX*, *blaTEM*, *blaZ*, *ermB*, *mecA*,

mrsA, *oxa1*, *oxa9*, *shv* และ *vanA* ดังแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และขนาดของ PCR product ในตารางที่ 1 หลังจากนั้นตรวจผลของปฏิกิริยา PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis

7. การจำแนกชนิดของเชื้อ *enterobacteria* ด้วยเทคนิค TP-RAPD

นำ total genomic DNA ของเชื้อ *enterobacteria* แต่ละสายพันธุ์มาวิเคราะห์รูปแบบ TP-RAPD โดยใช้ primer 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') และ 1522R (5' AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA 3') (R = C/T; N = A/G/C/T) ตามวิธีการที่บรรยายโดย Rivas และคณะ (2002) คัดเลือกเชื้อที่มีรูปแบบ TP-RAPD แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นเชื้อต่างชนิดไว้สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้านทานสารปฏิชีวนะ การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase และการศึกษาผลของการใช้สารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

นำ total genomic DNA ของเชื้อ *enterobacteria* แต่ละชนิด มาทำการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA โดยใช้ primer Un 16S 926f (5' AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG 3') และ Un 16S 1392r (5' ACG GGC GGT GTG TRC 3') (Y = C/T; K = G/T; K = G/T; R = A/G) โดยเทคนิค PCR หลังจากนั้นตรวจผลของปฏิกิริยา PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis (Pongsilp และคณะ 2002) ทำการสกัดแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ออกจาก agarose gel โดยใช้ QIA Quick gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) นำแถบดีเอ็นเอที่แยกได้มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (BioBasic Inc., Markham, Canada) และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

9. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้านทานสารปฏิชีวนะ

ทำการสกัดแถบดีเอ็นเอของยีนด้านทานสารปฏิชีวนะที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของเชื้อ *enterobacteria* แต่ละชนิดออกจาก agarose gel โดยใช้ QIA Quick gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) นำแถบดีเอ็นเอที่แยกได้มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (BioBasic Inc., Markham, Canada) และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

ตารางที่ 1: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และขนาดของ PCR product จากยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	ขนาดของ PCR product [คู่เบส (base pair: bp)]	เอนไซม์ที่สังเคราะห์	ความต้านทานต่อสาร ปฏิชีวนะ	เอกสารอ้างอิง
<i>ampC</i>	ampCf 5' ATT CGT ATG CTG GAT CTC GCC ACC 3' ampCr 5' CAT GAC CCA GTT CGC CAT ATC CTG 3'	395	extended spectrum β - lactamase	กลุ่ม β -lactam เช่น ampicillin และ penicillin	Hanson และคณะ (1999)
<i>blaCTX</i>	CTXMU1 5' ATG TGC ACC AGT AAR CT 3' CTXMU2 5' TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA 3' (R = A/G; S = C/G)	593	β -lactamase	กลุ่ม β -lactam เช่น ampicillin และ penicillin	Moghaddam และคณะ (2014)
<i>blaTEM</i>	blaTEMf 5' ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG 3' blaTEMr 5' GTG ACA GTT ACC AAT GCT TA 3'	863	β -lactamase	กลุ่ม β -lactam เช่น ampicillin และ penicillin	Bert และคณะ (2002)
<i>blaZ</i>	blaZf 5' TTA AAG TCT TAC CGA AAG CAG 3' blaZr 5' TAA GAG ATT TGC CTA TGC TT 3'	277	β -lactamase	กลุ่ม β -lactam เช่น ampicillin และ penicillin	Olsen และคณะ (2006)

ตารางที่ 1: (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และขนาดของ PCR product จากยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	ขนาดของ PCR product [คู่เบส (base pair: bp)]	เอนไซม์ที่สังเคราะห์	ความต้านทานต่อสาร ปฏิชีวนะ	เอกสารอ้างอิง
<i>ermB</i>	ermBf 5' GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA 3' ermBr 5' AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC 3'	654	erythromycin ribosome methylase	กลุ่ม macrolide, lincosamide และ streptogramin B เช่น erythromycin	Okitsu และคณะ (2005)
<i>mecA</i>	mecAf 5' CCT AGT AAA GCT CCG GAA 3' mecAr 5' CTA GTC CAT TCG GTC CA 3'	314	penicillin-binding protein	penicillin และ oxacillin	Duran และคณะ (2012)
<i>msrA</i>	msrAf 5' TCC AAT CAT TGC ACA AAA TC 3' msrAr 5' AAT TCC CTC TAT TTG GTG GT 3'	163	methionine sulfoxide reductase	erythromycin	Duran และคณะ (2012)
<i>oxa1</i>	oxa1f 5' AGC AGC GCC AGT GCA TCA 3' oxa1r 5' ATT CGA CCC CAA GTT TCC 3'	708	β -lactamase	ampicillin	Onyango และคณะ (2014)
<i>oxa9</i>	oxa9f 5' CGT CGC TCA CCA TAT CTC CC 3' oxa9r 5' CCT CTC GTG CTT TAG ACC CG 3'	314	oxacillinase	กลุ่ม β -lactam เช่น ampicillin และ penicillin	Hanson และคณะ (1999)
<i>shv</i>	shvf 5' GGG AAA CGG AAC TGA ATG AG 3' shvr 5' ATC GTC CAC CAT CCA CTG CA 3'	151	β -lactamase	กลุ่ม β -lactam เช่น ampicillin และ penicillin	Hanson และคณะ (1999)

ตารางที่ 1: (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และขนาดของ PCR product จากยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	ขนาดของ PCR product [คู่เบส (base pair: bp)]	เอนไซม์ที่สังเคราะห์	ความต้านทานต่อสาร ปฏิชีวนะ	เอกสารอ้างอิง
<i>vanA</i>	vanAf 5' CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT 3' vanAr 5' CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA 3'	1,030	D-Ala:D-Lac ligase	vancomycin	Clark และคณะ (1993)

10. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase

นำเชื้อ enterobacteria แต่ละชนิดที่มีถิ่นอาศัยในอาหารสัตว์ สารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase โดย inoculate เชื้อลงในอาหารเหลว Tryptone Soya Broth (TSB) ปริมาตร 18 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อจนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 640 นาโนเมตร (nanometer: nm) ของสารแขวนลอยเชื้อเท่ากับ 0.5 ± 0.02 เติม imipenem ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มเชื้อต่ออีก 4 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยง เก็บตะกอนเซลล์ ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) เติม 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator ปั่นเหวี่ยง นำ cell lysate ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 0.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มาทำปฏิกิริยากับ nitrocefin 83 ไมโครกรัม, BSA 167 ไมโครกรัม, 10% glycerol เติม 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร วัดกิจกรรมของเอนไซม์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 390 nm ที่ลดลงภายในเวลา 10 นาที ที่ 28°C มีหน่วยเป็นไมโครโมล (micromole: μmol) ของ nitrocefin ที่ถูกย่อยสลาย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน (Sharma และคณะ 2004)

11. การศึกษาผลของการใช้สารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase

นำเชื้อ enterobacteria แต่ละชนิดที่มีถิ่นอาศัยในอาหารสัตว์ มาทดสอบผลของสารยับยั้ง clavulanic acid ต่อการยับยั้งความต้านทานของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam โดยทำการทดลองตามที่บรรยายในข้อที่ 10 แต่เติม clavulanic acid ลงในปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิกรัม/ลิตร (Sharma และคณะ 2004)

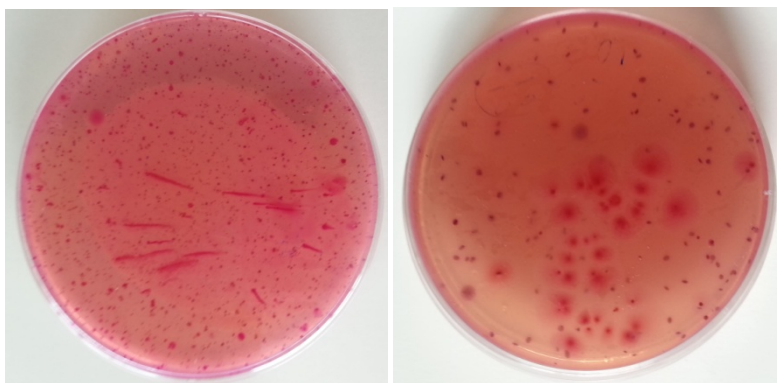
12. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติและความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ SPSS program version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อและประเมินจำนวนเชื้อ *enterobacteria* ในอาหารทะเล

แยกเชื้อ *enterobacteria* ในอาหารทะเลสดจากตลาดจำหน่ายอาหารทะเล 3 แห่ง ได้แก่ 1) ตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร 2) ตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ และ 3) ตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง รวม 35 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารคัดเลือก VRBG agar คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีม่วงแดง ดังแสดงในภาพที่ 1 และประเมินจำนวนเชื้อ *enterobacteria* ในตัวอย่างอาหารทะเล ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 จากตัวอย่างอาหารทะเล 35 ตัวอย่าง มี 2 ตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อ *enterobacteria* ได้แก่ ปูม้าจากตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ และหมึกกล้วยจากตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง ตัวอย่างที่มีเชื้อ *enterobacteria* เป็นจำนวนมากที่สุด คือ ปลากระพงจากตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ $2.44 \times 10^5 \pm 5.75 \times 10^4$ CFU/กรัม คัดเลือกเชื้อที่มีรูปร่างเป็นท่อน ดิสเกรมลบ และไม่สังเคราะห์เอนไซม์ oxidase จำนวน 96 ไอโซเลท กำหนดรหัสเชื้อ *enterobacteria* ที่แยกได้เป็น ENT ตามด้วยลำดับที่ของตัวอย่างตามตารางที่ 1 ตามด้วย - และลำดับของไอโซเลท เก็บเชื้อใน NA slant ที่ 4°C และใน 15% glycerol แช่แข็งที่ -80°C



ภาพที่ 1: โคโลนีสีม่วงแดงของเชื้อ *enterobacteria* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก VRBG agar

ตารางที่ 2: จำนวนเชื้อ enterobacteria ในตัวอย่างอาหารทะเล

ลำดับที่	แหล่งเก็บตัวอย่าง (วันที่เก็บตัวอย่าง)	รหัสของร้านค้า	ชนิดอาหารทะเล	จำนวนเชื้อ enterobacteria (CFU/กรัม)*
1	ตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร (7 ส.ค. 2557)	สส 1	กุ้งแชบ๊วย	70.00 ± 52.92
2		สส 2	กุ้งแชบ๊วย	833.33 ± 665.83
3		สส 3	กุ้งลายเสือ	13.33 ± 5.77
4		สส 2	หอยแครง	6.67 ± 5.77
5		สส 2	หอยหวาน	50.00 ± 36.06
6		สส 2	หอยเชลล์	2.10 x 10 ⁴ ± 1.76 x 10 ³
7		สส 2	ปูทะเล	5.33 x 10 ³ ± 4.93 x 10 ³
8		สส 2	ปูม้า	106.67 ± 5.77
9		สส 4	ปูม้า	166.67 ± 57.74
10		สส 1	ปลาหมึกกล้วย	16.67 ± 11.55
11		สส 4	หมึกกระดอง	466.67 ± 57.44
12		สส 4	หมึกหอม	20.00 ± 10.00
13		สส 1	ปลาทุ	46.67 ± 25.17
14		สส 1	ปลากระเมียด	50.00 ± 45.87
15		สส 3	ปลาแดงใหญ่	1.10 x 10 ³ ± 9.00 x 10 ²
16	ตลาดบ้านเขา ตะกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ (18 ส.ค. 2557)	ปค 1	ปูม้า	0.00 ± 0.00
17		ปค 1	หมึกกล้วย	140.00 ± 52.92
18		ปค 1	กุ้งแชบ๊วย	2.23 x 10 ⁴ ± 1.31 x 10 ⁴
19		ปค 1	หอยเชลล์	73.33 ± 5.77
20		ปค 2	หอยหวาน	2.47 x 10 ³ ± 2.23 x 10 ³
21		ปค 2	กุ้งลายดำ	63.33 ± 28.87
22		ปค 2	หมึกหอม	6.00 x 10 ³ ± 5.33 x 10 ³
23		ปค 2	ปลาทุ	2.54 x 10 ⁴ ± 9.54 x 10 ³
24		ปค 2	ปลากระพง	2.44 x 10 ⁵ ± 5.75 x 10 ⁴
25		ปค 2	ปูม้า	633.33 ± 472.58

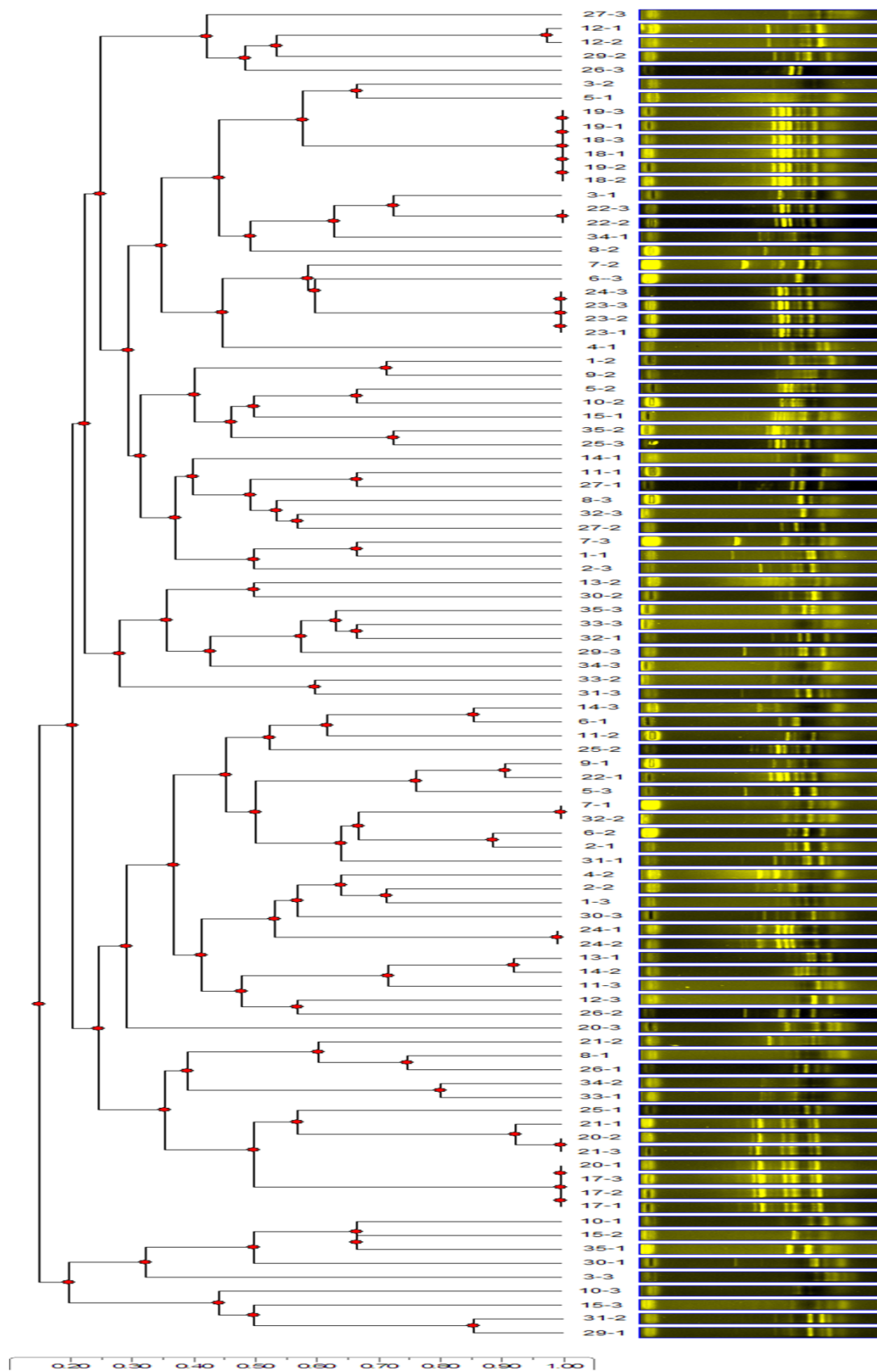
ตารางที่ 2: (ต่อ) จำนวนเชื้อ enterobacteria ในตัวอย่างอาหารทะเล

ลำดับที่	แหล่งเก็บตัวอย่าง (วันที่เก็บตัวอย่าง)	รหัสของร้านค้า	ชนิดอาหารทะเล	จำนวนเชื้อ enterobacteria (CFU/กรัม)*
26	ตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง (25 ส.ค. 2557)	รย 1	หอยเชลล์	45.00 ± 21.21
27		รย 1	กุ้งแชบ๊วย	20.00 ± 14.14
28		รย 1	หมึกกล้วย	0.00 ± 0.00
29		รย 1	ปูม้า	113.33 ± 23.09
30		รย 2	ปลาจะระเม็ด	200.00 ± 100.00
31		รย 2	ปลากระพง	3.30 x 10 ³ ± 1.11 x 10 ³
32		รย 3	หอยหวาน	1.70 x 10 ³ ± 3.30 x 10 ²
33		รย 3	หมึกกล้วย	46.67 ± 46.19
34		รย 3	กุ้งแชบ๊วย	155.00 ± 63.64
35		รย 3	ปูม้า	43.33 ± 20.82

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่า standard deviation

2. การศึกษาสายพันธุ์ดีเอ็นเอของเชื้อ enterobacteria จากเทคนิค ERIC-PCR

จากการวิเคราะห์รูปแบบ ERIC-PCR ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 96 ไอโซเลท พบว่าได้รูปแบบ ERIC-PCR จำนวน 81 รูปแบบ ซึ่งมีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 1-8 แถบ และมีขนาดตั้งแต่ 100 bp - 5.0 kb ไอโซเลทที่มีรูปแบบ ERIC-PCR เหมือนกัน มี 7 กลุ่ม ได้แก่ 1) ENT 7-1 และ ENT 32-2; 2) ENT 17-1, ENT 17-2, ENT 17-3 และ ENT 20-1; 3) ENT 18-1, ENT 18-2, ENT 18-3, ENT 19-1, ENT 19-2 และ ENT 19-3; 4) ENT 20-2 และ ENT 21-3; 5) ENT 22-2 และ ENT 22-3; 6) ENT 23-1, ENT 23-2, ENT 23-3 และ ENT 24-3; 7) ENT 24-1 และ ENT 24-2 จาก dendrogram ที่สร้างจากรูปแบบ ERIC-PCR แสดงว่าประชากรเชื้อ enterobacteria ที่แยกได้จากอาหารทะเลมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากมีค่า % similarity ประมาณ 10% ดังแสดงในภาพที่ 2 เชื้อที่มีรูปแบบ ERIC-PCR แตกต่างกันแสดงว่าเป็นเชื้อต่างสายพันธุ์กัน ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ 81 สายพันธุ์ สำหรับใช้ในการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี รูปแบบพลาสมิด รูปแบบความต้านทานสารปฏิชีวนะ รูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ และการจำแนกชนิดของเชื้อ enterobacteria ด้วยเทคนิค TP-RAPD



ภาพที่ 2: dendrogram ที่สร้างจากรูปแบบ ERIC-PCR ของเชื้อ enterobacteria ที่แยกได้จากอาหารทะเล
จำนวน 96 ไอโซเลต

ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ enterobacteria และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ สามารถใช้เทคนิค ERIC-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ERIC sequence เป็นหนึ่งใน intergenic repeated sequence ที่พบในเชื้อ enterobacteria นอกเหนือจาก repetitive extragenic palindromic (REP) sequence สำหรับ ERIC sequence นั้น เริ่มแรกพบในเชื้อ *Esc. coli* และ *Sal. enterica* serovar Typhimurium (ชื่อเดิม *Salmonella typhimurium*) (Gilson และคณะ 1984; Hulton และคณะ 1991; Sharples และ Lloyd 1990; Stern และคณะ 1984) ERIC sequence ที่พบในเชื้อต่างชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แทบจะเหมือนกัน แต่มีจำนวนและการกระจายของ ERIC sequence แตกต่างกัน หน้าที่ของ ERIC sequence นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับการคงความเสถียรของ messenger RNA (mRNA) หรือเกี่ยวข้องในกระบวนการ homologous recombination การจัดโครงสร้างของโครโมโซม รวมถึงการจับกับ HU protein (DNA binding protein) เอนไซม์ DNA gyrase และเอนไซม์ DNA polymerase I (Rashid และคณะ 2009) เทคนิค ERIC-PCR เป็นการนำหลักการของ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของยีนซึ่งอยู่ระหว่าง ERIC sequence โดยใช้ primer 1 คู่ที่จำเพาะกับ ERIC sequence ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากเชื้อต่างสายพันธุ์จะมีจำนวนชิ้นและขนาดที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1 ถึง 15 ชิ้น ขนาดประมาณ 100 bp ถึง 5.0 kb เทคนิค ERIC-PCR สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรแบคทีเรีย

3. การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ที่มีรูปแบบ ERIC-PCR แตกต่างกัน ลักษณะที่ทำการศึกษาได้แก่ 1) อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ 2) การสังเคราะห์เอนไซม์ protease, urease, catalase, amylase และ caseinase 3) รูปแบบการหมักน้ำตาล 4) รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation และ 5) การทดสอบ IMViC (Krieg และ Lockhart 1966)

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ enterobacteria ที่อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้น NaCl ระดับต่างๆ โดยเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร NB เพื่อใช้เป็น inoculum แล้วนับจำนวนเซลล์โดยวิธี standard total plate count ปิเปิด inoculum ลงในอาหาร NB สำหรับการศึกษาการเจริญของเชื้อที่ระดับอุณหภูมิและความเข้มข้น NaCl ปรับค่า pH ของอาหาร NB เท่ากับ 7.0 สำหรับการศึกษาการเจริญของเชื้อที่ระดับค่า pH ควบคุมค่า pH ของอาหาร NB ให้คงที่โดยเติมสารละลาย MES ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ (millimolar: mM) กำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^7 CFU/มิลลิลิตร เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1-2 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ซึ่งแสดงถึงการเจริญของเชื้อ อุณหภูมิ, ค่า pH และความเข้มข้น NaCl สำหรับการศึกษาการเจริญของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่าส่วนใหญ่ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์เจริญที่อุณหภูมิ 20°C-40°C ยกเว้น 18

สายพันธุ์ที่เจริญที่อุณหภูมิ 15°C และ 5 สายพันธุ์ที่เจริญที่อุณหภูมิ 45°C ส่วนใหญ่ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์เจริญที่ค่า pH 4.0-9.0 ยกเว้น 1 สายพันธุ์ที่เจริญที่ค่า pH 3.0, 3 สายพันธุ์ที่เจริญที่ค่า pH 8.0, 1 สายพันธุ์ที่เจริญที่ค่า pH 10.0 และ 20 สายพันธุ์ที่เจริญที่ค่า pH 11.0 ในขณะที่เชื้อ enterobacteria จำนวน 56, 10 และ 5 สายพันธุ์ เจริญที่ความเข้มข้นของ NaCl สูงสุดเท่ากับร้อยละ 3, 5 และ 7 ตามลำดับ

ตารางที่ 3: อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl สำหรับการเจริญของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	สภาวะสำหรับการเจริญ		
	อุณหภูมิ	ค่า pH	ความเข้มข้นของ NaCl
ENT 1-1	20°C-45°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 1-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-5%
ENT 1-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 2-1	15°C-45°C	4.0-11.0	0%-7%
ENT 2-2	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 2-3	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 3-1	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-5%
ENT 3-2	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 4-1	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 4-2	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 5-1	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 5-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-7%
ENT 5-3	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 6-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-7%
ENT 6-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 6-3	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-5%
ENT 7-1	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-5%
ENT 7-2	20°C-45°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 7-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 8-1	20°C-45°C	4.0-9.0	0%-7%

ตารางที่ 3: (ต่อ) อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl สำหรับการเจริญของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	สภาวะสำหรับการเจริญ		
	อุณหภูมิ	ค่า pH	ความเข้มข้นของ NaCl
ENT 8-2	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 8-3	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-5%
ENT 9-1	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 9-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 10-1	20°C-40°C	3.0-11.0	0%-3%
ENT 10-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 10-3	20°C-40°C	4.0-10.0	0%-3%
ENT 11-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 11-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 11-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 12-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 12-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-7%
ENT 12-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 13-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 13-2	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 13-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 14-1	15°C-40°C	4.0-8.0	0%-3%
ENT 14-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 14-3	20°C-40°C	4.0-11.0	0%-3%
ENT 15-1	15°C-40°C	4.0-11.0	0%-7%
ENT 15-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-5%
ENT 15-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 17-1	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 18-1	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 20-2	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 20-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-7%

ตารางที่ 3: (ต่อ) อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl สำหรับการเจริญของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	สภาวะสำหรับการเจริญ		
	อุณหภูมิ	ค่า pH	ความเข้มข้นของ NaCl
ENT 21-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 21-2	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-5%
ENT 22-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 22-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 23-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 24-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 25-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 25-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 25-3	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-7%
ENT 26-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 26-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 26-3	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-7%
ENT 27-1	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-7%
ENT 27-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 27-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-5%
ENT 29-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 29-2	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 29-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-7%
ENT 30-1	15°C-40°C	4.0-9.0	0%-7%
ENT 30-2	15°C-45°C	4.0-11.0	0%-7%
ENT 30-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 31-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-5%
ENT 31-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 31-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 32-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 32-3	15°C-40°C	4.0-11.0	0%-7%

ตารางที่ 3: (ต่อ) อุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl สำหรับการเจริญของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	สภาวะสำหรับการเจริญ		
	อุณหภูมิ	ค่า pH	ความเข้มข้นของ NaCl
ENT 33-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 33-2	15°C-45°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 33-3	15°C-45°C	4.0-11.0	0%-7%
ENT 34-1	20°C-40°C	4.0-8.0	0%-5%
ENT 34-2	20°C-40°C	4.0-8.0	0%-3%
ENT 34-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 35-1	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 35-2	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%
ENT 35-3	20°C-40°C	4.0-9.0	0%-3%

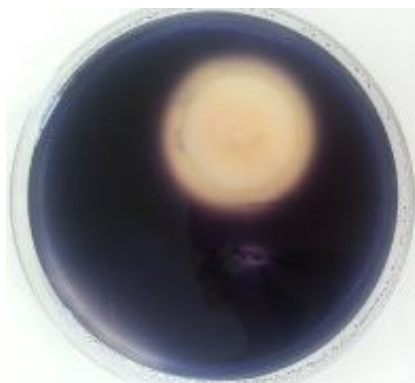
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ protease ซึ่งย่อยสลายโปรตีนได้กรดอะมิโนของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร skim milk broth เขย่าที่อัตราเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน ให้เจริญถึงระยะ mid-log phase วัดกิจกรรมของเอนไซม์ protease โดยวิธีการ azocasein protease assay (Secades และ Guijarro 1999) ซึ่งกำหนดค่า 1 unit เท่ากับเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm เท่ากับ 0.01 จากการบ่มเอนไซม์กับ azocasein ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (substrate) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30°C กิจกรรมของ protease ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์มีตั้งแต่ไม่สามารถตรวจพบ ถึง 14.56 ± 1.08 unit/มิลลิลิตร supernatant เชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงสุด มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ENT 6-1 (14.56 ± 1.08 unit/มิลลิลิตร supernatant) และ ENT 14-3 (13.08 ± 0.51 unit/มิลลิลิตร supernatant) ซึ่งให้ค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 4

จากการทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ urease ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Christensen urea agar (pH 6.8) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน บันทึกการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเหลืองเป็นสีชมพู เนื่องจากการที่เอนไซม์ urease ย่อยสลาย urea ในอาหารได้แอมโมเนีย (ammonia: NH_3) ทำให้ค่า pH ของอาหารเพิ่มขึ้น เปลี่ยนสีของ phenol red ซึ่งเป็น pH indicator เอนไซม์ urease ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วยและมีนิกเกิล (nickel: Ni) เป็นองค์ประกอบ (nickel-containing, multisubunit enzyme) ทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการย่อยสลาย (hydrolysis) urea ได้

แอมโมเนียและกรดคาร์บอนิก (carbonic acid) (Morou-Bermudez และ Burne 1999) กิจกรรมของเอนไซม์ urease ของเชื้อแบคทีเรียมักจะถูกลบคุมโดยเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม เช่น ปริมาณไนโตรเจนที่นำไปใช้ได้ (nitrogen availability) และค่า pH (Mobley และคณะ 1995) ในบรรดาเชื้อ enterobacteria นั้น *Proteus* เป็นสกุลที่มีรายงานว่ามีการสังเคราะห์เอนไซม์ urease อย่างรวดเร็ว ในขณะที่ *Enterobacter*, *Klebsiella* และ *Serratia* บางชนิดก็มีการสังเคราะห์เอนไซม์ urease เช่นกัน แต่มีอัตราการสังเคราะห์ที่ช้ากว่า (Guentzel 1996) จากการทดสอบพบว่าเชื้อที่สังเคราะห์เอนไซม์ urease มีจำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ENT 12-2, ENT 15-2, ENT 18-1, ENT 26-3, ENT 27-3, ENT 30-1, ENT 30-2, ENT 32-2 และ ENT 33-3 ผลการทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ urease ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 4

จากการทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ catalase โดยป้ายเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ แล้วหยด 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) hydrogen peroxide (H_2O_2) บันทึกการเกิดฟองอากาศ เนื่องจากเอนไซม์ catalase ย่อยสลาย H_2O_2 ได้น้ำและก๊าซออกซิเจน ในการพัฒนาวิธีการใช้การทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ catalase เพื่อช่วยในการจัดจำแนกเชื้อ enterobacteria โดย Taylor และ Achanzar (1972) รายงานว่า *Proteus*, *Providencia* และ *Serratia* ให้ผลการทดสอบเป็นบวกในระดับสูง *Enterobacter* ส่วนใหญ่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกในระดับต่ำ *Klebsiella* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มเท่าๆ กัน ได้แก่ กลุ่มที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกในระดับต่ำและกลุ่มที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบ *Escherichia* และ *Shigella* ส่วนใหญ่ให้ผลการทดสอบเป็นลบ และน้อยกว่า 1 ใน 3 ให้ผลการทดสอบเป็นบวกในระดับต่ำ จากการทดสอบพบว่าเชื้อที่สังเคราะห์เอนไซม์ catalase มีจำนวน 68 สายพันธุ์ ผลการทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ catalase ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 4

จากการทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ amylase โดย point inoculate เชื้อบนอาหาร starch agar บ่มที่อุณหภูมิ $35^{\circ}C$ เป็นเวลา 5 วัน หยด gram iodine: H_2O (1:2) บนอาหาร บันทึก clear zone รอบโคโลนีของเชื้อซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายแป้งโดยเอนไซม์ amylase ดังแสดงในภาพที่ 3 เอนไซม์ amylase กระตุ้นการแตกพันธะ α -1,4, glycosidic ในโมเลกุลแป้งได้ glucose หรือโพลิเมอร์ของ glucose เช่น maltose และ maltotriose (de Souza และ de Oliveira e Magalhaes 2010) เชื้อ enterobacteria ที่มีรายงานการสังเคราะห์เอนไซม์ amylase เช่น *Citrobacter aerogenes* (Umeh และ Odibo 2014), *Enterobacter cloacae* (Kumar และ Das 2000) และ *Klebsiella aerogenes* (Umeh และ Odibo 2014) จากการทดสอบพบว่าเชื้อที่สังเคราะห์เอนไซม์ amylase มีจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ ENT 1-2 ซึ่งมีค่าดัชนี (index) คำนวณจากเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone (มิลลิเมตร)/เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร) เป็น 28/25 เท่ากับ 1.12 ผลการทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ amylase ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 3: clear zone รอบโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร starch agar ที่ย้อมด้วย gram iodine

จากการทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ caseinase โดย point inoculate เชื้อบนอาหาร NA ที่เททับผิวหน้าอาหารด้วยน้ำมันใน melted agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน บันทึกการเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อซึ่งแสดงถึงการย่อยสลาย casein ซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำมันจากกิจกรรมของเอนไซม์ caseinase เชื้อ enterobacteria ที่มีรายงานการสังเคราะห์เอนไซม์ caseinase เช่น *Kle. pneumoniae* และ *Ser. marcescens* (Goncalves และคณะ 2007) จากการทดสอบพบว่าไม่มีเชื้อ enterobacteria สายพันธุ์ใดสังเคราะห์เอนไซม์ caseinase ดังแสดงผลในตารางที่ 4

ตารางที่ 4: การสังเคราะห์เอนไซม์ protease, urease, catalase, amylase และ caseinase ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	การสังเคราะห์เอนไซม์				
	protease (unit/มิลลิลิตร supernatant)*	urease	catalase	amylase	caseinase
ENT 1-1	0.25 ± 0.28	-	-	-	-
ENT 1-2	4.90 ± 0.36	-	+	+	-
ENT 1-3	0.00 ± 0.00	-	+	-	-
ENT 2-1	0.21 ± 0.13	-	+	-	-
ENT 2-2	0.04 ± 0.07	-	+	-	-
ENT 2-3	0.25 ± 0.23	-	+	-	-
ENT 3-1	0.33 ± 0.19	-	+	-	-
ENT 3-2	0.46 ± 0.13	-	+	-	-
ENT 4-1	0.19 ± 0.19	-	+	-	-

ตารางที่ 4: (ต่อ) การสังเคราะห์เอนไซม์ protease, urease, catalase, amylase และ caseinase ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	การสังเคราะห์เอนไซม์				
	protease (unit/มิลลิลิตร supernatant)*	urease	catalase	amylase	caseinase
ENT 4-2	0.48 ± 0.10	-	+	-	-
ENT 5-1	1.17 ± 0.25	-	+	-	-
ENT 5-2	0.19 ± 0.06	-	+	-	-
ENT 5-3	0.04 ± 0.07	-	+	-	-
ENT 6-1	14.56 ± 1.08	-	+	-	-
ENT 6-2	2.25 ± 1.07	-	+	-	-
ENT 6-3	1.21 ± 0.16	-	+	-	-
ENT 7-1	1.08 ± 0.22	-	-	-	-
ENT 7-2	1.50 ± 0.29	-	+	-	-
ENT 7-3	1.94 ± 0.50	-	-	-	-
ENT 8-1	0.38 ± 0.13	-	+	-	-
ENT 8-2	0.38 ± 0.19	-	+	-	-
ENT 8-3	3.04 ± 0.41	-	+	-	-
ENT 9-1	1.35 ± 0.58	-	-	-	-
ENT 9-2	0.60 ± 0.19	-	+	-	-
ENT 10-1	0.27 ± 0.24	-	+	-	-
ENT 10-2	0.81 ± 0.23	-	-	-	-
ENT 10-3	0.21 ± 0.10	-	-	-	-
ENT 11-1	0.35 ± 0.16	-	-	-	-
ENT 11-2	0.21 ± 0.04	-	-	-	-
ENT 11-3	0.17 ± 0.13	-	-	-	-
ENT 12-1	0.92 ± 0.22	-	-	-	-
ENT 12-2	0.60 ± 0.38	+	-	-	-
ENT 12-3	0.46 ± 0.10	-	-	-	-

ตารางที่ 4: (ต่อ) การสังเคราะห์เอนไซม์ protease, urease, catalase, amylase และ caseinase ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	การสังเคราะห์เอนไซม์				
	protease (unit/มิลลิลิตร supernatant)*	urease	catalase	amylase	caseinase
ENT 13-1	0.67 ± 0.26	-	-	-	-
ENT 13-2	0.50 ± 0.23	-	-	-	-
ENT 13-3	0.29 ± 0.20	-	+	-	-
ENT 14-1	1.58 ± 0.34	-	+	-	-
ENT 14-2	9.19 ± 0.76	-	-	-	-
ENT 14-3	13.08 ± 0.51	-	+	-	-
ENT 15-1	0.02 ± 0.04	-	+	-	-
ENT 15-2	0.31 ± 0.18	+	+	-	-
ENT 15-3	0.72 ± 0.54	-	+	-	-
ENT 17-1	3.06 ± 0.23	-	+	-	-
ENT 18-1	0.40 ± 0.13	+	+	-	-
ENT 20-2	0.40 ± 0.16	-	+	-	-
ENT 20-3	1.35 ± 0.32	-	+	-	-
ENT 21-1	0.35 ± 0.34	-	+	-	-
ENT 21-2	0.29 ± 0.16	-	+	-	-
ENT 22-1	0.60 ± 0.25	-	+	-	-
ENT 22-2	2.75 ± 1.60	-	+	-	-
ENT 23-1	0.56 ± 0.22	-	+	-	-
ENT 24-1	3.77 ± 0.30	-	+	-	-
ENT 25-1	0.52 ± 0.04	-	+	-	-
ENT 25-2	1.88 ± 0.53	-	+	-	-
ENT 25-3	0.83 ± 0.32	-	+	-	-
ENT 26-1	0.42 ± 0.07	-	-	-	-
ENT 26-2	0.60 ± 0.35	-	+	-	-

ตารางที่ 4: (ต่อ) การสังเคราะห์เอนไซม์ protease, urease, catalase, amylase และ caseinase ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	การสังเคราะห์เอนไซม์				
	protease (unit/มิลลิลิตร supernatant)*	urease	catalase	amylase	caseinase
ENT 26-3	0.63 ± 0.23	+	+	-	-
ENT 27-1	0.17 ± 0.04	-	+	-	-
ENT 27-2	3.50 ± 0.62	-	+	-	-
ENT 27-3	1.23 ± 0.13	+	+	-	-
ENT 29-1	2.75 ± 0.60	-	+	-	-
ENT 29-2	0.48 ± 0.10	-	+	-	-
ENT 29-3	0.29 ± 0.13	-	+	-	-
ENT 30-1	0.31 ± 0.19	+	+	-	-
ENT 30-2	0.58 ± 0.17	+	-	-	-
ENT 30-3	1.31 ± 0.57	-	+	-	-
ENT 31-1	2.02 ± 0.51	-	+	-	-
ENT 31-2	0.77 ± 0.16	-	+	-	-
ENT 31-3	1.21 ± 0.53	-	+	-	-
ENT 32-1	0.50 ± 0.23	-	-	-	-
ENT 32-3	0.44 ± 0.17	+	+	-	-
ENT 33-1	0.13 ± 0.06	-	+	-	-
ENT 33-2	0.40 ± 0.10	-	+	-	-
ENT 33-3	0.79 ± 0.20	+	-	-	-
ENT 34-1	1.60 ± 0.47	-	+	-	-
ENT 34-2	3.56 ± 0.39	-	+	-	-
ENT 34-3	12.47 ± 0.67	-	+	-	-
ENT 35-1	3.04 ± 0.87	-	+	-	-
ENT 35-2	0.83 ± 0.30	-	+	-	-

ตารางที่ 4: (ต่อ) การสังเคราะห์เอนไซม์ protease, urease, catalase, amylase และ caseinase ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	การสังเคราะห์เอนไซม์				
	protease (unit/มิลลิลิตร supernatant)*	urease	catalase	amylase	caseinase
ENT 35-3	0.50 ± 0.27	-	-	-	-

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่า standard deviation

+: มีการสังเคราะห์เอนไซม์; -: ไม่มีการสังเคราะห์เอนไซม์

ทดสอบรูปแบบการหมักน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ glucose, lactose และ sucrose โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร carbohydrate fermentation broth (pH 7.4) ที่เติมน้ำตาลแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 1.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน บันทึกการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง เนื่องจากเกิดการหมักน้ำตาลได้กรดอินทรีย์ทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง เปลี่ยนสีของ phenol red ซึ่งเป็น pH indicator และบันทึกการเกิดฟองอากาศใน Durham tube ซึ่งแสดงถึงการเกิดก๊าซระหว่างการหมักน้ำตาล รูปแบบการหมักน้ำตาลของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 5

ทดสอบรูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่ arginine, lysine และ ornithine โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร decarboxylase broth base (pH 6.0) ที่เติมกรดอะมิโนแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 1.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน บันทึกสีของอาหารกลับมาเป็นสีม่วง เนื่องจากเกิดการหมัก glucose ได้กรดอินทรีย์ ทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง แล้วเอนไซม์ decarboxylase ย่อยสลายกรดอะมิโนได้เอมีน (amine) ทำให้ค่า pH ของอาหารเพิ่มขึ้น ทำให้ bromcresol purple ซึ่งเป็น pH indicator กลับมาเป็นสีม่วง รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดอะมิโนของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 5

การทดสอบ IMViC ประกอบด้วยการทดสอบการสังเคราะห์ indole (indole production) การทดสอบ methyl red (MR) การทดสอบ Voges-Proskauer (VP) และการทดสอบการใช้ citrate (citrate utilization) การทดสอบ indole ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร tryptone broth (pH 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วหยด Kovac's tryptone reagent บันทึกการเกิดวงสีม่วงแดงของการเกิดปฏิกิริยาของ indole กับ p-dimethylaminobenzaldehyde ใน Kovac's indole reagent เนื่องจากเชื้อสังเคราะห์เอนไซม์ tryptophanase ย่อยสลาย tryptophan ในอาหารได้ ammonia และ indole pyruvic acid การทดสอบ MR ทำ

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MR-VP broth (pH 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วหยด MR reagent บันทึกการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีแดง เนื่องจากเกิดการหมักแบบ mixed acid fermentation ได้กรดอินทรีย์ ทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง เปลี่ยนสี methyl red ใน MR reagent เป็นสีแดง การทดสอบ VP ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MR-VP broth (pH 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วหยด potassium hydroxide (KOH) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ 1-naphthol บันทึกการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีชมพู-แดง เนื่องจากเกิดการหมักแบบ butanediol fermentation ได้ acetoin และ butanediol ซึ่งรวมตัวกับ guanidine ใน peptone การทดสอบการใช้ citrate ทำโดย streak เชื้อบนอาหาร Simon's citrate agar (pH 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1-2 วัน บันทึกการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานและมี ammonia เกิดขึ้น ทำให้ pH ของอาหารเพิ่มขึ้น จึงเปลี่ยนสี bromthymol blue ซึ่งเป็น pH indicator ผลการทดสอบ IMViC ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5: รูปแบบการหมักน้ำตาล รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation และการทดสอบ IMViC ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์ เชื้อ	รูปแบบการหมักน้ำตาล			รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation			การทดสอบ IMViC			
	GLU	LAC	SUC	ARG	LYS	ORN	IND	MR	VP	CIT
ENT 1-1	AG	A	AG	-	+	-	-	+	-	+
ENT 1-2	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-
ENT 1-3	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-
ENT 2-1	A	A	A	+	-	+	-	+	-	+
ENT 2-2	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-
ENT 2-3	AG	A	A	+	-	+	-	-	+	-
ENT 3-1	A	Alk	Alk	-	-	-	+	+	-	+
ENT 3-2	A	Alk	Alk	-	-	-	+	+	-	+
ENT 4-1	AG	AG	A	-	+	+	-	+	-	-
ENT 4-2	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-
ENT 5-1	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-

ตารางที่ 5: (ต่อ) รูปแบบการหมักน้ำตาล รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation และการทดสอบ IMViC ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์ เชื้อ	รูปแบบการหมักน้ำตาล			รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation			การทดสอบ IMViC			
	GLU	LAC	SUC	ARG	LYS	ORN	IND	MR	VP	CIT
ENT 5-2	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-
ENT 5-3	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-
ENT 6-1	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 6-2	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-
ENT 6-3	AG	A	Alk	-	-	+	-	+	-	+
ENT 7-1	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 7-2	A	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 7-3	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 8-1	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 8-2	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 8-3	AG	A	AG	-	+	+	-	+	+	-
ENT 9-1	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 9-2	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 10-1	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-
ENT 10-2	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 10-3	AG	A	AG	-	+	-	-	+	-	+
ENT 11-1	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 11-2	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 11-3	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 12-1	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 12-2	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 12-3	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 13-1	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 13-2	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-

ตารางที่ 5: (ต่อ) รูปแบบการหมักน้ำตาล รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation และการทดสอบ IMViC ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์ เชื้อ	รูปแบบการหมักน้ำตาล			รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation			การทดสอบ IMViC			
	GLU	LAC	SUC	ARG	LYS	ORN	IND	MR	VP	CIT
ENT 13-3	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 14-1	AG	AG	AG	-	+	+	-	+	+	-
ENT 14-2	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 14-3	AG	A	AG	-	+	+	-	+	+	-
ENT 15-1	A	A	A	-	+	+	-	+	-	+
ENT 15-2	AG	A	A	-	+	-	-	+	+	+
ENT 15-3	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 17-1	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 18-1	A	Alk	A	-	-	-	+	+	-	-
ENT 20-2	A	Alk	A	-	-	-	+	+	-	-
ENT 20-3	A	A	A	-	-	+	-	+	-	-
ENT 21-1	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 21-2	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 22-1	A	Alk	A	-	-	-	+	+	-	+
ENT 22-2	A	Alk	A	-	-	-	+	+	-	+
ENT 23-1	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 24-1	A	Alk	Alk	-	-	-	+	+	-	+
ENT 25-1	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 25-2	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 25-3	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 26-1	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 26-2	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 26-3	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 27-1	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-

ตารางที่ 5: (ต่อ) รูปแบบการหมักน้ำตาล รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation และการทดสอบ IMViC ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์ เชื้อ	รูปแบบการหมักน้ำตาล			รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation			การทดสอบ IMViC			
	GLU	LAC	SUC	ARG	LYS	ORN	IND	MR	VP	CIT
entero- bacteria										
ENT 27-2	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 27-3	AG	AG	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 29-1	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 29-2	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 29-3	A	A	A	-	+	-	-	+	-	-
ENT 30-1	A	AG	A	-	+	-	+	+	-	-
ENT 30-2	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 30-3	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 31-1	A	A	A	-	-	+	+	+	-	-
ENT 31-2	A	AG	A	-	+	-	+	+	-	-
ENT 31-3	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 32-1	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 32-3	AG	Alk	Alk	-	-	+	-	-	+	+
ENT 33-1	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 33-2	A	Alk	Alk	-	-	-	+	+	-	+
ENT 33-3	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-
ENT 34-1	A	Alk	Alk	-	-	-	+	+	-	+
ENT 34-2	AG	A	AG	-	+	+	-	+	-	-
ENT 34-3	A	Alk	Alk	-	-	-	+	+	-	+
ENT 35-1	A	A	A	-	-	+	-	+	-	-
ENT 35-2	A	Alk	Alk	-	-	-	+	+	-	+
ENT 35-3	AG	AG	AG	-	+	-	-	+	-	-

GLU: glucose; LAC: lactose; SUC: sucrose; ARG: arginine; LYS: lysine; ORN: ornithine; IND: การสังเคราะห์ indole; MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer; CIT: การใช้ citrate

A: เกิดการหมักน้ำตาลได้กรดอินทรีย์เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลือง; AG: เกิดการหมักน้ำตาลได้กรดอินทรีย์เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองและเกิดก๊าซใน durham tube; Alk: ไม่เกิดการหมักน้ำตาล อาหารคงเป็นสีแดง
 +: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

4. การศึกษารูปแบบพลาสมิด

จากการวิเคราะห์รูปแบบของพลาสมิดของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่มีพลาสมิดมีจำนวน 16 สายพันธุ์ โดยมีพลาสมิด 1-5 ชิ้น ขนาดตั้งแต่ 1.7 ถึง 19.0 kb ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6: รูปแบบพลาสมิดของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบพลาสมิด	
	จำนวน	ขนาด (kb)
ENT 1-1	5	2.2, 3.1, 4.2, 7.3 และ 16.4
ENT 1-2	-	-
ENT 1-3	-	-
ENT 2-1	-	-
ENT 2-2	-	-
ENT 2-3	-	-
ENT 3-1	-	-
ENT 3-2	-	-
ENT 4-1	-	-
ENT 4-2	-	-
ENT 5-1	-	-
ENT 5-2	-	-
ENT 5-3	-	-
ENT 6-1	-	-
ENT 6-2	-	-
ENT 6-3	-	-
ENT 7-1	3	2.0, 5.9 และ 19.0
ENT 7-2	-	-

ตารางที่ 6: (ต่อ) รูปแบบพลาสมิดของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบพลาสมิด	
	จำนวน	ขนาด (kb)
ENT 7-3	-	-
ENT 8-1	1	4.4
ENT 8-2	2	4.2
ENT 8-3	1	2.6
ENT 9-1	-	-
ENT 9-2	-	-
ENT 10-1	-	-
ENT 10-2	-	-
ENT 10-3	-	-
ENT 11-1	2	2.0 และ 3.5
ENT 11-2	-	-
ENT 11-3	-	-
ENT 12-1	-	-
ENT 12-2	-	--
ENT 12-3	3	2.7, 3.7 และ 4.9
ENT 13-1	-	-
ENT 13-2	-	-
ENT 13-3	-	-
ENT 14-1	-	-
ENT 14-2	-	-
ENT 14-3	-	-
ENT 15-1	-	-
ENT 15-2	1	5.6
ENT 15-3	-	-
ENT 17-1	-	-
ENT 18-1	2	1.7 และ 7.2
ENT 20-2	-	-

ตารางที่ 6: (ต่อ) รูปแบบพลาสมิดของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

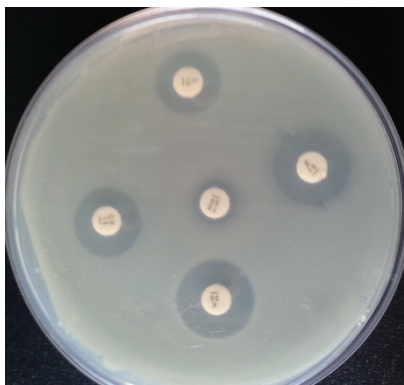
สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบพลาสมิด	
	จำนวน	ขนาด (kb)
ENT 20-3	1	9.4
ENT 21-1	-	-
ENT 21-2	-	-
ENT 22-1	2	1.7 และ 7.2
ENT 22-2	-	-
ENT 23-1	2	1.7 และ 7.2
ENT 24-1	2	1.9 และ 6.7
ENT 25-1	1	4.2
ENT 25-2	-	-
ENT 25-3	-	-
ENT 26-1	-	-
ENT 26-2	-	-
ENT 26-3	-	-
ENT 27-1	3	2.3, 2.8 และ 3.5
ENT 27-2	-	-
ENT 27-3	-	-
ENT 29-1	2	2.3 และ 2.7
ENT 29-2	-	-
ENT 29-3	-	-
ENT 30-1	-	-
ENT 30-2	-	-
ENT 30-3	-	-
ENT 31-1	-	-
ENT 31-2	-	-
ENT 31-3	-	-
ENT 32-1	-	-
ENT 32-3	-	-

ตารางที่ 6: (ต่อ) รูปแบบพลาสมิดของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบพลาสมิด	
	จำนวน	ขนาด (kb)
ENT 33-1	-	-
ENT 33-2	-	-
ENT 33-3	-	-
ENT 34-1	-	-
ENT 34-2	-	-
ENT 34-3	-	-
ENT 35-1	-	-
ENT 35-2	-	-
ENT 35-3	-	-

5. การศึกษารูปแบบความต้านทานสารปฏิชีวนะ

จากการศึกษาความต้านทานสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ได้แก่ ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamycin (10 µg), kanamycin (30 µg), neomycin (30 µg), penicillin G (10 units), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg) และ vancomycin (30 µg) พบว่าร้อยละ 90.12, 76.54, 69.14, 61.73, 22.22, 3.70, 3.70, 2.47 และ 1.23 ของจำนวนสายพันธุ์เชื้อ enterobacteria ด้านทานต่อ penicillin, vancomycin, erythromycin, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, streptomycin, neomycin และ kanamycin ตามลำดับ ในขณะที่ไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่ต้านทาน gentamycin ทั้งนี้ ไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่ต้านทานสารปฏิชีวนะทุกชนิดและไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่ไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิด เชื้อ 3 สายพันธุ์ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด ด้านทานสารปฏิชีวนะ 6 ชนิด ได้แก่ สายพันธุ์ ENT 8-2 ซึ่งต้านทาน ampicillin, erythromycin, kanamycin, penicillin, tetracycline และ vancomycin สายพันธุ์ ENT 31-1 ซึ่งต้านทาน ampicillin, erythromycin, penicillin, streptomycin, tetracycline และ vancomycin และสายพันธุ์ ENT 34-2 ซึ่งต้านทาน ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, penicillin, tetracycline และ vancomycin ภาพที่ 4 แสดง clear zone รอบ antibiotic disc ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสารปฏิชีวนะ ผลการทดสอบความต้านทานสารปฏิชีวนะ 10 ชนิดของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 7



ภาพที่ 4: clear zone รอบ antibiotic disc ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 7: ความต้านทานสารปฏิชีวนะ 10 ชนิดของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	ความต้านทานสารปฏิชีวนะ									
	AMP	CHL	ERY	GEN	KAN	NEO	PEN	STR	TET	VAN
ENT 1-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 1-2	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
ENT 1-3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ENT 2-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 2-2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 2-3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ENT 3-2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ENT 4-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
ENT 4-2	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
ENT 5-1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 5-2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 5-3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 6-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 6-2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 6-3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 7-1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
ENT 7-2	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
ENT 7-3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+

ตารางที่ 7: (ต่อ) ความต้านทานสารปฏิชีวนะ 10 ชนิดของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	ความต้านทานสารปฏิชีวนะ									
	AMP	CHL	ERY	GEN	KAN	NEO	PEN	STR	TET	VAN
ENT 8-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 8-2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
ENT 8-3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 9-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 9-2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ENT 10-1	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
ENT 10-2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 10-3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 11-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 11-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 11-3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 12-1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
ENT 12-2	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
ENT 12-3	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
ENT 13-1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ENT 13-2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 13-3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 14-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ENT 14-2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 14-3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 15-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 15-2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ENT 15-3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 17-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 18-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 20-2	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
ENT 20-3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+

ตารางที่ 7: (ต่อ) ความต้านทานสารปฏิชีวนะ 10 ชนิดของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	ความต้านทานสารปฏิชีวนะ									
	AMP	CHL	ERY	GEN	KAN	NEO	PEN	STR	TET	VAN
ENT 21-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 21-2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 22-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 22-2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 23-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
ENT 24-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 25-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 25-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 25-3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 26-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 26-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 26-3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 27-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 27-2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ENT 27-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 29-1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ENT 29-2	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ENT 29-3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ENT 30-1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ENT 30-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 30-3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 31-1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
ENT 31-2	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ENT 31-3	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
ENT 32-1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
ENT 32-3	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ENT 33-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-

ตารางที่ 7: (ต่อ) ความต้านทานสารปฏิชีวนะ 10 ชนิดของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	ความต้านทานสารปฏิชีวนะ									
	AMP	CHL	ERY	GEN	KAN	NEO	PEN	STR	TET	VAN
ENT 33-2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
ENT 33-3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
ENT 34-1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
ENT 34-2	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
ENT 34-3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
ENT 35-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ENT 35-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ENT 35-3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+

AMP: ampicillin (10 µg); CHL: chloramphenicol (30 µg); ERY: erythromycin (15 µg); GEN: gentamycin (10 µg); KAN: kanamycin (30 µg); NEO: neomycin (30 µg); PEN: penicillin G (10 units); STR: streptomycin (10 µg); TET: tetracycline (30 µg); VAN: vancomycin (30 µg)

+: เชื้อต้านทานสารปฏิชีวนะ; -: เชื้อไม่ต้านทานสารปฏิชีวนะ

6. การศึกษารูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ

ศึกษารูปแบบของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ จากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ ได้แก่ ยีน *ampC*, *blaCTX*, *blaTEM*, *blaZ*, *ermB*, *mecA*, *mrsA*, *oxa1*, *oxa9*, *shv* และ *vanA* รายงานการเกิด positive band ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8: (ต่อ) รูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	positive band ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ										
	<i>ampC</i>	<i>blaCTX</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaZ</i>	<i>ermB</i>	<i>mecA</i>	<i>mrsA</i>	<i>oxa1</i>	<i>oxa9</i>	<i>shv</i>	<i>vanA</i>
ENT 12-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 12-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 12-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 13-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 13-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 13-3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ENT 14-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 14-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 14-3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 15-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 15-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 15-3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ENT 17-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 18-1	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
ENT 20-2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8: (ต่อ) รูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	positive band ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ										
	<i>ampC</i>	<i>blaCTX</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaZ</i>	<i>ermB</i>	<i>mecA</i>	<i>mrsA</i>	<i>oxa1</i>	<i>oxa9</i>	<i>shv</i>	<i>vanA</i>
ENT 20-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 21-1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 21-2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ENT 22-1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
ENT 22-2	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
ENT 23-1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 24-1	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
ENT 25-1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ENT 25-2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ENT 25-3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ENT 26-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 26-2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ENT 26-3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 27-1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ENT 27-2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

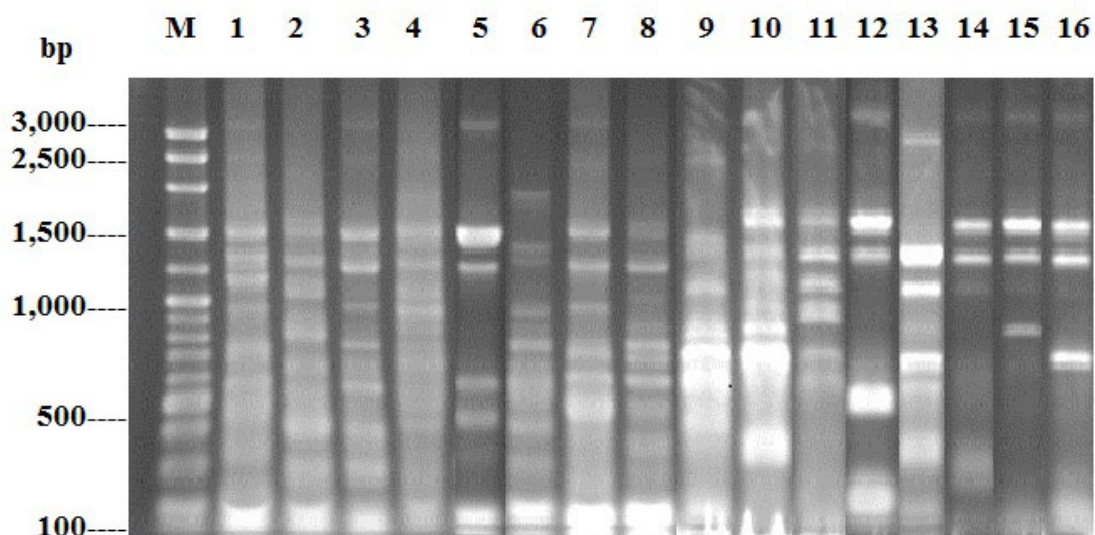
ตารางที่ 8: (ต่อ) รูปแบบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	positive band ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ										
	<i>ampC</i>	<i>blaCTX</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaZ</i>	<i>ermB</i>	<i>mecA</i>	<i>mrsA</i>	<i>oxa1</i>	<i>oxa9</i>	<i>shv</i>	<i>vanA</i>
ENT 34-1	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
ENT 34-2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
ENT 34-3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ENT 35-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 35-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT 35-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: มี positive band ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ; -: ไม่มี positive band ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ

7. การจำแนกชนิดของเชื้อ *enterobacteria* ด้วยเทคนิค TP-RAPD

จากการวิเคราะห์รูปแบบ TP-RAPD ของเชื้อ *enterobacteria* จำนวน 81 สายพันธุ์ พบว่ามีรูปแบบ TP-RAPD 16 รูปแบบ รูปแบบ TP-RAPD มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 4-11 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 100 bp-3.0 kb ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยสายพันธุ์ของเชื้อ *enterobacteria* ที่มีรูปแบบ TP-RAPD เหมือนกัน แสดงว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 เทคนิค TP-RAPD เป็นการใช้หลักการของเทคนิค PCR โดยใช้ primer 1 คู่ primer แต่ละสายมีขนาด 20 bp รูปแบบ TP-RAPD มีความสัมพันธ์กับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบ TP-RAPD เหมือนกัน (Rivas และคณะ 2001; 2004; Valverde และคณะ 2006) เชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ถึงแม้จะมีรูปแบบพลาสติกต่างกันก็มีรูปแบบ TP-RAPD เหมือนกัน (Rivas และคณะ 2001) คัดเลือกเชื้อที่มีรูปแบบ TP-RAPD แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นเชื้อต่างชนิดไว้สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase และการศึกษาผลของการใช้สารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase



ภาพที่ 5: รูปแบบ RAPD 16 รูปแบบที่ได้จากเชื้อ *enterobacteria* จำนวน 81 สายพันธุ์

Lane M: 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia); 1-16: รูปแบบ RAPD ที่ 1-16

ตารางที่ 9: กลุ่มของรูปแบบ TP-RAPD ของเชื้อ enterobacteria แต่ละสายพันธุ์

รูปแบบ TP-RAPD	จำนวน สายพันธุ์	สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria
1	2	ENT 1-1 และ ENT 10-3
2	10	ENT 1-2, ENT 1-3, ENT 2-2, ENT 4-2, ENT 5-1, ENT 5-2, ENT 5-3, ENT 6-2, ENT 10-1 และ ENT 29-3
3	1	ENT 2-1
4	1	ENT 2-3
5	25	ENT 4-1, ENT 6-1, ENT 8-1, ENT 8-2, ENT 9-2, ENT 13-3, ENT 15-3, ENT 17-1, ENT 21-1, ENT 21-2, ENT 23-1, ENT 25-1, ENT 25-2, ENT 25-3, ENT 26-2, ENT 26-3, ENT 27-1, ENT 27-2, ENT 27-3, ENT 29-1, ENT 29-2, ENT 30-3, ENT 31-3, ENT 33-1 และ ENT 34-2
6	1	ENT 6-3
7	18	ENT 7-1, ENT 7-3, ENT 9-1, ENT 10-2, ENT 11-1, ENT 11-2, ENT 11-3, ENT 12-1, ENT 12-2, ENT 12-3, ENT 13-1, ENT 13-2, ENT 14-2, ENT 26-1, ENT 30-2, ENT 32-1, ENT 33-3 และ ENT 35-3
8	1	ENT 7-2
9	3	ENT 8-3, ENT 14-1 และ ENT 14-3
10	1	ENT 15-1
11	1	ENT 15-2
12	11	ENT 3-1, ENT 3-2, ENT 18-1, ENT 20-2, ENT 22-1, ENT 22-2, ENT 24-1, ENT 33-2, ENT 34-1, ENT 34-3 และ ENT 35-2
13	2	ENT 20-3 และ ENT 35-1
14	2	ENT 30-1 และ ENT 31-2
15	1	ENT 31-1
16	1	ENT 32-3

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อ enterobacteria 16 ชนิด ซึ่งเป็นเชื้อตัวแทนจากแต่ละรูปแบบ TP-RAPD เพื่อระบุสกุลของเชื้อโดยเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR หลังจากนั้นตรวจผลของปฏิกิริยา PCR พบว่าได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ขนาดประมาณ 500 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละชนิดมาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTN พบว่าเชื้อ enterobacteria มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับเชื้อ enterobacteria ใน 6 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Serratia* และ *Yersinia* ซึ่งมีร้อยละของระดับความเหมือน (% identity) เท่ากับ 98%-99% ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อ enterobacteria 16 ชนิด แสดงในตารางที่ 10

การระบุสกุลหรือชนิดของแบคทีเรียตามลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีอาจมีข้อจำกัด เนื่องจากเชื้อในหลายสกุลหรือชนิดมีลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่หลากหลายและซ้ำซ้อนกัน ในปัจจุบันการจำแนกเชื้อแบคทีเรียใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นหลัก โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.5 kb ประกอบด้วยบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันในเชื้อต่างสกุล เรียกว่า conserved region และบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันเฉพาะในเชื้อสกุลเดียวกัน เรียกว่า variable region ในการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA สามารถใช้ primer ที่จำเพาะต่อบริเวณที่ขนาบข้าง variable region และเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ในส่วน variable region ได้ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ variable region กับข้อมูลยีนในฐานข้อมูลต่างๆ เช่น Genbank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/), Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) และ European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (www.ebi.ac.uk/embl/) ทำให้ระบุสกุลของเชื้อแบคทีเรียได้ ทั้งนี้ มีรายงานว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ variable region ขนาดประมาณ 500 bp สามารถใช้ในการระบุสกุลของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ไม่เหมาะสมในการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากยีน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียต่างชนิดในสกุลเดียวกันมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (Pongsilp 2012)

ตารางที่ 10: ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อ enterobacteria แต่ละชนิด

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบ TP-RAPD	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (Genbank accession number)	% identity
ENT 1-1	1	<i>Kle. pneumoniae</i> สายพันธุ์ KPNIH31 (CP009876) (Conlan และคณะ 2014) <i>Kle. pneumoniae</i> สายพันธุ์ blaNDM-1 (CP009114) (van Duin และคณะ 2014) Uncultured <i>Klebsiella</i> sp. clone DVWSW_J383 (KF 722620) (Patel และคณะ 2014)	99%
ENT 5-3	2	<i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ SM1 (AB858357) (Koenig และคณะ 2014) <i>Kle. oxytoca</i> สายพันธุ์ 127 (C4Plas(d)) (KF254665) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015) <i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ JO143 (Habibi และคณะ 2014)	99%
ENT 2-1	3	<i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ SI-1 (KC211308) (Kang และคณะ 2014) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ 128A (3DVM) (KF254749) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ R2A5 (KF938666) (Lade และคณะ 2014)	99%
ENT 2-3	4	<i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ 189 (P21Ms) (KF254602) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015) <i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ DT-1 (JX885522) (Subudhi และคณะ 2013) <i>Enterobacter</i> sp. สายพันธุ์ S10 (HF572841) (Mandal และคณะ 2013)	99%
ENT 8-2	5	<i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ 189 (P21Ms) (KF254602) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015) <i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ DT-1 (JX885522) (Subudhi และคณะ 2013) <i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ Bio103 (JX495602) (Rabiei และคณะ 2013)	99%

ตารางที่ 10: (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อ enterobacteria แต่ละชนิด

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบ TP-RAPD	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (Genbank accession number)	% identity
ENT 6-3	6	<i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ R2A5 (KF938666) (Lade และคณะ 2014) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ 128A (3DVM) (KF254749) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ harit D11 (KC344791) (Meruvu และ Donthireddy 2013)	99%
ENT 7-1	7	<i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0888 (KR190424) (Zhang และคณะ 2015) <i>Kle. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> สายพันธุ์ 234-12 (CP011313) (Becker และคณะ 2015) <i>Kle. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> สายพันธุ์ KPNIH31 (CP009876) (Conlan และคณะ 2014)	99%
ENT 7-2	8	<i>Serratia</i> sp. สายพันธุ์ INBio_4052O (KM242496) (Vargas-Asensio และคณะ 2014) Uncultured <i>Serratia</i> sp. clone T1-23 (KC253894) (Vicente และคณะ 2013) <i>Ser. marcescens</i> สายพันธุ์ Ki (JN201947) (Terenius และคณะ 2012)	99%
ENT 8-3	9	<i>Enterobacter cloacae</i> clone CC3 (AB576083) (Benskin และคณะ 2010) <i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ DT-1 (JX885522) (Subudhi และคณะ 2013) <i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ ECNIH5 (CP009854) (Conlan และคณะ 2014)	99%
ENT 15-1	10	<i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ UIWRF0888 (KR190424) (Zhang และคณะ 2015) <i>Kle. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> สายพันธุ์ 234-12 (CP011313) (Becker และคณะ 2015) <i>Kle. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> สายพันธุ์ KPNIH31 (CP009876) (Conlan และคณะ 2014)	98%

ตารางที่ 10: (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อ enterobacteria แต่ละชนิด

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบ TP-RAPD	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (Genbank accession number)	% identity
ENT 15-2	11	<i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ SM1 (AB858357) (Koenig และคณะ 2014) <i>Kle. oxytoca</i> สายพันธุ์ 127 (C4Plas(d)) (KF254665) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015) <i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ JO143 (Habibi และคณะ 2014)	98%
ENT 33-2	12	<i>Providencia</i> sp. สายพันธุ์ KT7 (KJ734010) (Yu และคณะ 2014) <i>PtProvidencia rettgeri</i> สายพันธุ์ SSR4 (KC634310) (Marathe และคณะ 2013) Uncultured <i>Providencia</i> sp. clone ORM_056R (JN423869) (Chandler และคณะ 2011)	99%
ENT 20-3	13	<i>Yersinia enterocolitica</i> สายพันธุ์ FE81536 (HE803738) (Sihvonen และคณะ 2012) <i>Y. enterocolitica</i> สายพันธุ์ GYPB27 (JF346893) (Miao และคณะ 2013) <i>Y. enterocolitica</i> สายพันธุ์ 280 (FJ641888) (Stenkova และคณะ 2011)	99%
ENT 30-1	14	<i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ SM1 (AB858357) (Koenig และคณะ 2014) <i>Kle. oxytoca</i> สายพันธุ์ 127 (C4Plas(d)) (KF254665) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015) <i>Klebsiella</i> sp. สายพันธุ์ JO143 (Habibi และคณะ 2014)	98%
ENT 31-1	15	<i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ SI-1 (KC211308) (Kang และคณะ 2014) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ 128A (3DVM) (KF254749) (Maleki-Ravasan และคณะ 2015) <i>Cit. freundii</i> สายพันธุ์ R2A5 (KF938666) (Lade และคณะ 2014)	98%

ตารางที่ 10: (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากเชื้อ enterobacteria แต่ละชนิด

สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบ TP-RAPD	ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (Genbank accession number)	% identity
ENT 32-3	16	<i>Enterobacter aerogenes</i> สายพันธุ์ UIWRF 0709 (KR190152) (Zhang และคณะ 2015) <i>Enterobacter aerogenes</i> สายพันธุ์ 250 (LN623623) (Montagna และคณะ 2015) <i>Enterobacter aerogenes</i> ไอโซเลต S21 (HF562873) (Marasco และคณะ 2013)	99%

จากตัวอย่างอาหารทะเลที่ตรวจสอบ 15 ชนิด ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย กุ้งลายดำ กุ้งลายเสือ หมึกกล้วย หมึกกระดอง หมึกหอม หอยแครง หอยหวาน หอยเชลล์ ปูม้า ปูทะเล ปลาหู ปลาแดงใหญ่ ปลาจะระเม็ด และปลากะพง *Klebsiella* เป็นสกุลของเชื้อ enterobacteria ที่พบได้ทั่วไปในอาหารทะเลเกือบทุกชนิด โดยพบในอาหารทะเล 13 ชนิด ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย หมึกกล้วย หมึกกระดอง หมึกหอม หอยแครง หอยหวาน หอยเชลล์ ปูม้า ปูทะเล ปลาหู ปลาแดงใหญ่ ปลาจะระเม็ด และปลากะพง *Enterobacter* พบในอาหารทะเล 11 ชนิด ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย กุ้งลายดำ หมึกกล้วย หอยแครง หอยหวาน หอยเชลล์ ปูม้า ปลาหู ปลาแดงใหญ่ ปลาจะระเม็ด และปลากะพง *Providencia* พบในอาหารทะเล 7 ชนิด ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย กุ้งลายเสือ หมึกกล้วย หมึกหอม หอยหวาน ปูม้า และปลากะพง *Citrobacter* พบในอาหารทะเล 3 ชนิด ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย หอยเชลล์ และปลากะพง *Yersinia* พบในอาหารทะเล 2 ชนิด ได้แก่ หอยหวานและปูม้า สำหรับ *Serratia* พบเฉพาะในปูทะเล ตารางที่ 11 แสดงสกุลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแต่ละชนิด

เชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลจากตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร มี 12 ชนิด ใน 5 สกุล ได้แก่ *Klebsiella* (5 ชนิด), *Enterobacter* (3 ชนิด), *Citrobacter* (2 ชนิด), *Providencia* (1 ชนิด) และ *Serratia* (1 ชนิด) เชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลจากตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ มี 3 ชนิด ใน 3 สกุล ได้แก่ *Enterobacter* (1 ชนิด), *Providencia* (1 ชนิด) และ *Yersinia* (1 ชนิด) เชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลจากตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง มี 8 ชนิด ใน 5 สกุล ได้แก่ *Klebsiella* (3 ชนิด), *Enterobacter* (2 ชนิด), *Citrobacter* (1 ชนิด), *Providencia* (1 ชนิด) และ *Yersinia* (1 ชนิด) ดังที่แสดงสกุลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในอาหารทะเลจากตลาดจำหน่ายอาหารทะเลแต่ละแหล่งในตารางที่ 12

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สามารถระบุสกุลของเชื้อ enterobacteria แต่ละชนิดที่มีรูปแบบ TP-RAPD แตกต่างกัน แล้วจึงเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ได้แก่ รูปแบบการหมักน้ำตาล, รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation, ผลการทดสอบ IMViC และการย่อยสลาย urea กับเชื้อ enterobacteria ชนิดต่างๆ ในสกุลเดียวกัน เพื่อระบุชนิดของเชื้อ enterobacteria ที่มีความเป็นไปได้สำหรับเชื้อในแต่ละรูปแบบ TP-RAPD การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 1-16 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกันแสดงในตารางที่ 13-27 ตามลำดับ

ตารางที่ 11: สก๊กลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแต่ละชนิด

ชนิดอาหารทะเล	สก๊กลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเล
กุ้งแช่บ๊วย	<i>Citrobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 3)
	<i>Enterobacter</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 4 และ TP-RAPD 5)
	<i>Klebsiella</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 1 และ TP-RAPD 2)
	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)
กุ้งลายดำ	<i>Enterobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5)
กุ้งลายเสือ	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)
หมึกกล้วย	<i>Enterobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5)
	<i>Klebsiella</i> 3 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 1, TP-RAPD 2 และ TP-RAPD 7)
	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)
หมึกกระดอง	<i>Klebsiella</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 7)
หมึกหอม	<i>Klebsiella</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 7)
	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)
หอยแครง	<i>Enterobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5)
	<i>Klebsiella</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 2)
หอยหวาน	<i>Enterobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 16)
	<i>Klebsiella</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 2 และ TP-RAPD 7)
	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)
	<i>Yersinia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 13)
หอยเชลล์	<i>Citrobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 6)
	<i>Enterobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5)
	<i>Klebsiella</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 2 และ TP-RAPD 7)
ปูม้า	<i>Enterobacter</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5 และ TP-RAPD 9)
	<i>Klebsiella</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 2 และ TP-RAPD 7)
	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)
	<i>Yersinia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 13)
ปูทะเล	<i>Klebsiella</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 7)
	<i>Serratia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 8)

ตารางที่ 11: (ต่อ) สกูลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเลแต่ละชนิด

ชนิดอาหารทะเล	สกูลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเล
ปลาทู	<i>Enterobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5)
	<i>Klebsiella</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 7)
ปลาแดงใหญ่	<i>Enterobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5)
	<i>Klebsiella</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 10 และ TP-RAPD 11)
ปลาจะระเม็ด	<i>Enterobacter</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5 และ TP-RAPD 9)
	<i>Klebsiella</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 7 และ TP-RAPD 14)
ปลากระพง	<i>Citrobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 15)
	<i>Klebsiella</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 14)
	<i>Enterobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5)
	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)

ตารางที่ 12: สก๊กลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในอาหารทะเลจากตลาดจำหน่ายอาหารทะเลแต่ละแห่ง

ตลาดจำหน่ายอาหารทะเล	สก๊กลของเชื้อ enterobacteria ที่พบในตัวอย่างอาหารทะเล
ตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	<i>Citrobacter</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 3 และ TP-RAPD 6)
	<i>Enterobacter</i> 3 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 4, TP-RAPD 5 และ TP-RAPD 9)
	<i>Klebsiella</i> 5 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 1, TP-RAPD 2, TP-RAPD 7, TP-RAPD 10 และ TP-RAPD 11)
	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)
	<i>Serratia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 8)
ตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์	<i>Enterobacter</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5)
	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)
	<i>Yersinia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 13)
ตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง	<i>Citrobacter</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 15)
	<i>Enterobacter</i> 2 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 5 และ TP-RAPD 16)
	<i>Klebsiella</i> 3 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 2, TP-RAPD 7 และ TP-RAPD 14)
	<i>Providencia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 12)
	<i>Yersinia</i> 1 ชนิด (กลุ่ม TP-RAPD 13)

ตารางที่ 13: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 1 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 1 (<i>Klebsiella</i> spp.)	ชนิดของ <i>Klebsiella</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน			
		<i>K. oxytoca</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i> subsp. ozaenae	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i> subsp. pneumoniae
การหมักน้ำตาล					
glucose	AG	100	100	100	100
lactose	A	100	100	30	97
sucrose	AG	100	100	20	99
ปฏิกิริยา decarboxylation					
arginine	-	0	0	6	0
lysine	+	99	100	40	98
ornithine	-	0	0	3	0
การทดสอบ IMViC					
การสังเคราะห์ indole	-	99	20	0	0
MR	+	20	100	98	10
VP	-	95	98	0	98
การใช้ citrate	+	95	100	30	98
การย่อยสลาย urea	-	90	98	10	95

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล; AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 14: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 2 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 2 (<i>Klebsiella</i> spp.)	ชนิดของ <i>Klebsiella</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน		
		<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. ozaenae	<i>K. pneumoniae</i> subsp. pneumoniae
การหมักน้ำตาล				
glucose	A	100	100	100
lactose	A	100	30	97
sucrose	A	100	20	99
ปฏิกิริยา decarboxylation				
arginine	-	0	6	0
lysine	+	99	40	98
ornithine	-	0	3	0
การทดสอบ IMViC				
การสังเคราะห์ indole	-	99	0	0
MR	+	20	98	10
VP	-	95	0	98
การใช้ citrate	+	95	30	98
การย่อยสลาย urea	-	90	10	95

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 15: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 3 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 3 (<i>Citrobacter</i> sp.)	ชนิดของ <i>Citrobacter</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน		
		<i>C. braakii</i>	<i>C. koseri</i>	<i>C. youngae</i>
การหมักน้ำตาล				
glucose	A	100	100	100
lactose	A	80	50	25
sucrose	A	7	40	20
ปฏิกิริยา decarboxylation				
arginine	+	67	80	50
lysine	-	0	0	0
ornithine	+	93	99	5
การทดสอบ IMViC				
การสังเคราะห์ indole	-	33	99	15
MR	+	100	100	100
VP	-	0	0	0
การใช้ citrate	+	87	99	75
การย่อยสลาย urea	-	47	75	80

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 16: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 4 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 4 (<i>Enterobacter</i> sp.)	ชนิดของ <i>Enterobacter</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	
		<i>E. amnigenus</i>	<i>E. hormaechei</i>
การหมักน้ำตาล			
glucose	AG	100	100
lactose	A	70	9
sucrose	A	100	100
ปฏิกิริยา decarboxylation			
arginine	+	9	78
lysine	-	0	0
ornithine	+	55	91
การทดสอบ IMViC			
การสังเคราะห์ indole	-	0	0
MR	-	7	57
VP	+	100	100
การใช้ citrate	+	70	96
การย่อยสลาย urea	-	0	87

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล; AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 17: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 5 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 5 (<i>Enterobacter</i> spp.)	ชนิดของ <i>Enterobacter</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	
		<i>E. aerogenes</i>	<i>E. pyrinus</i>
การหมักน้ำตาล			
glucose	AG	95	100
lactose	A	95	14
sucrose	AG	100	100
ปฏิกิริยา decarboxylation			
arginine	-	0	0
lysine	+	98	100
ornithine	+	98	100
การทดสอบ IMViC			
การสังเคราะห์ indole	-	0	0
MR	+	5	20
VP	-	98	86
การใช้ citrate	-	95	0
การย่อยสลาย urea	+/-	2	86

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล; AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 18: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 6 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 6 (<i>Citrobacter</i> sp.)	ชนิดของ <i>Citrobacter</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน		
		<i>C. braakii</i>	<i>C. koseri</i>	<i>C. youngae</i>
การหมักน้ำตาล				
glucose	AG	100	100	100
lactose	A	80	50	25
sucrose	Alk	7	40	20
ปฏิกิริยา decarboxylation				
arginine	-	67	80	50
lysine	-	0	0	0
ornithine	+	93	99	5
การทดสอบ IMViC				
การสังเคราะห์ indole	-	33	99	15
MR	+	100	100	100
VP	-	0	0	0
การใช้ citrate	+	87	99	75
การย่อยสลาย urea	-	47	75	80

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล; AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube; Alk: ไม่เกิดการหมักน้ำตาล

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 19: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 7 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 7 (<i>Klebsiella</i> spp.)	ชนิดของ <i>Klebsiella</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน		
		<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. ozaenae	<i>K. pneumoniae</i> subsp. pneumoniae
การหมักน้ำตาล				
glucose	AG	100	100	100
lactose	AG	100	30	97
sucrose	AG	100	20	99
ปฏิกิริยา decarboxylation				
arginine	-	0	6	0
lysine	+	99	40	98
ornithine	-	0	3	0
การทดสอบ IMViC				
การสังเคราะห์ indole	-	99	0	0
MR	+	20	98	10
VP	-	95	0	98
การใช้ citrate	-	95	30	98
การย่อยสลาย urea	+/-	90	10	95

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 20: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 8 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 8 (<i>Serratia</i> sp.)	ชนิดของ <i>Serratia</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน			
		<i>S. fonticola</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i> biogroup 1
การหมักน้ำตาล					
glucose	A	100	100	100	100
lactose	A	97	10	2	4
sucrose	AG	21	98	99	100
ปฏิกิริยา decarboxylation					
arginine	-	0	0	0	4
lysine	+	100	95	99	55
ornithine	+	97	95	99	65
การทดสอบ IMViC					
การสังเคราะห์ indole	-	0	1	1	0
MR	+	100	93	20	100
VP	-	9	93	98	60
การใช้ citrate	-	91	90	98	30
การย่อยสลาย urea	-	13	3	15	0

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล; AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 21: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 9 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 9 (<i>Enterobacter</i> spp.)	ชนิดของ <i>Enterobacter</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน		
		<i>E. aerogenes</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>E. pyrinus</i>
การหมักน้ำตาล				
glucose	AG	100	100	100
lactose	A/AG	95	55	14
sucrose	AG	100	98	100
ปฏิกิริยา decarboxylation				
arginine	-	0	0	0
lysine	+	98	90	100
ornithine	+	98	100	100
การทดสอบ IMViC				
การสังเคราะห์ indole	-	0	0	0
MR	+	5	5	29
VP	+	98	100	86
การใช้ citrate	-	95	99	0
การย่อยสลาย urea	-	0	93	86

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล; AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 22: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 10 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 10 (<i>Klebsiella</i> sp.)	ชนิดของ <i>Klebsiella</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน
		<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>
การหมักน้ำตาล		
glucose	A	100
lactose	A	30
sucrose	A	20
ปฏิกิริยา decarboxylation		
arginine	-	6
lysine	+	40
ornithine	+	3
การทดสอบ IMViC		
การสังเคราะห์ indole	-	0
MR	+	98
VP	-	0
การใช้ citrate	+	30
การย่อยสลาย urea	-	10

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 23: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 11 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 11 (<i>KL</i> eb <i>siella</i> sp.)	ชนิดของ <i>Klebsiella</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน		
		<i>K. oxytoca</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. pneumoniae
การหมักน้ำตาล				
glucose	AG	100	100	100
lactose	A	100	100	98
sucrose	A	100	100	99
ปฏิกิริยา decarboxylation				
arginine	-	0	0	0
lysine	+	99	100	98
ornithine	-	0	0	0
การทดสอบ IMViC				
การสังเคราะห์ indole	-	99	20	0
MR	+	20	100	10
VP	+	95	98	98
การใช้ citrate	+	95	100	98
การย่อยสลาย urea	+	90	98	95

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล; AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 24: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 12 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

คุณลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 12 (<i>Providencia</i> spp.)	ชนิดของ <i>Providencia</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน	
		<i>P. rettgeri</i>	<i>P. stuartii</i>
การหมักน้ำตาล			
glucose	A	100	100
lactose	Alk	5	2
sucrose	A/Alk	15	50
ปฏิกิริยา decarboxylation			
arginine	-	0	0
lysine	-	0	0
ornithine	-	0	0
การทดสอบ IMViC			
การสังเคราะห์ indole	+	99	98
MR	+	93	100
VP	-	0	0
การใช้ citrate	+/-	95	93
การย่อยสลาย urea	+/-	98	30

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล; Alk: ไม่เกิดการหมักน้ำตาล

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 25: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 13 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 13 (<i>Yersinia</i> spp.)	ชนิดของ <i>Yersinia</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน		
		<i>Y. bercovieri</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. mollaretii</i>
การหมักน้ำตาล				
glucose	A	100	100	100
lactose	A	20	5	40
sucrose	A	100	95	100
ปฏิกิริยา decarboxylation				
arginine	-	0	0	0
lysine	-	0	0	0
ornithine	+	80	95	80
การทดสอบ IMViC				
การสังเคราะห์ indole	-	0	50	0
MR	+	100	97	100
VP	-	0	2	0
การใช้ citrate	-	0	0	0
การย่อยสลาย urea	-	60	75	20

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C;

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 26: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 14 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 14 (<i>Klebsiella</i> spp.)	ชนิดของ <i>Klebsiella</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน		
		<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	<i>K. terrigena</i>
การหมักน้ำตาล				
glucose	A	100	100	100
lactose	AG	100	98	100
sucrose	A	100	99	100
ปฏิกิริยา decarboxylation				
arginine	-	0	0	0
lysine	+	99	98	100
ornithine	-	0	0	20
การทดสอบ IMViC				
การสังเคราะห์ indole	-	99	0	0
MR	+	20	10	60
VP	+	95	98	100
การใช้ citrate	-	95	98	40
การย่อยสลาย urea	-	90	95	0

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล; AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C;

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 27: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 15 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 15 (<i>Citrobacter</i> sp.)	ชนิดของ <i>citrobacter</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน				
		<i>C. amalo- naticus</i>	<i>C. braakii</i>	<i>C. farmeri</i>	<i>C. koseri</i>	<i>C. youngae</i>
การหมักน้ำตาล						
glucose	A	100	100	100	100	100
lactose	A	35	80	15	50	25
sucrose	A	9	7	100	40	20
ปฏิกิริยา decarboxylation						
arginine	-	85	67	85	80	50
lysine	-	0	0	0	0	0
ornithine	+	95	93	100	99	5
การทดสอบ IMViC						
การสังเคราะห์ indole	+	100	33	100	99	15
MR	+	100	100	100	100	100
VP	-	0	0	0	0	0
การใช้ citrate	-	95	87	10	99	75
การย่อยสลาย urea	-	85	47	59	75	80

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

A: เกิดการหมักน้ำตาล

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C;

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

ตารางที่ 28: การเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มรูปแบบ TP-RAPD 16 กับเชื้อชนิดที่มีลักษณะสอดคล้องกัน

ลักษณะ	เชื้อในกลุ่ม รูปแบบ TP-RAPD 16 (<i>Enterobacter</i> spp.)	ชนิดของ <i>Enterobacter</i> ที่มีลักษณะสอดคล้องกัน		
		<i>E. cancerogenus</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. gergoviae</i>
การหมักน้ำตาล				
glucose	AG	100	100	100
lactose	Alk	10	93	55
sucrose	Alk	0	97	98
ปฏิกิริยา decarboxylation				
arginine	-	94	97	0
lysine	-	0	0	90
ornithine	+	99	96	100
การทดสอบ IMViC				
การสังเคราะห์ indole	-	0	0	0
MR	-	5	5	5
VP	+	100	100	100
การใช้ citrate	+	100	100	99
การย่อยสลาย urea	-	1	65	93

MR: การทดสอบ methyl red; VP: การทดสอบ Voges-Proskauer

AG: เกิดการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซใน durham tube; Alk: ไม่เกิดการหมักน้ำตาล

+: ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C; -: ให้ผลการทดสอบเป็นลบภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C

ค่าตัวเลขแสดงถึง %ของจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกภายใน 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C (ข้อมูลจาก Walker และคณะ 2014)

9. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้านทานสารปฏิชีวนะ

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้านทานสารปฏิชีวนะจากเชื้อ enterobacteria แต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTN ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 29 เชื้อในสกุล *Enterobacter* และ *Providencia* มียีน *ampC* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase โดยมี % identity เท่ากับ 99% กับยีน *ampC* ของ *Enterobacter cloacae* (Lahiri และคณะ 2014; Lee และคณะ 2003; Porres-Osante และคณะ 2014) เชื้อในสกุล *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia* และ *Serratia* มียีน *blaTEM* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase โดยมี % identity เท่ากับ 99% กับยีน *blaTEM* ของเชื้อหลายชนิด เช่น *Esc. coli* (Pitart และคณะ 2015), *Haemophilus ducreyi* (Gangaiah และคณะ 2015) และ *Kingella kingae* (Banerjee และคณะ 2013) เชื้อในสกุล *Enterobacter* และ *Providencia* มียีน *shv* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase โดยมี % identity เท่ากับ 96% กับยีน *shv* ของเชื้อชนิดต่างๆ เช่น *Esc. coli* และ *Kle. pneumoniae* (Barisic และคณะ 2014; Nemoy และคณะ 2005; Prinarakis และคณะ 1996) เชื้อในสกุล *Klebsiella* และ *Providencia* มียีน *ermB* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ erythromycin ribosome methylase โดยมี % identity เท่ากับ 99% กับยีน *ermB* ของ *Staphylococcus lentus* และ *Gamella haemolysans* (Werckenthin และคณะ 1996; Zolezzi และคณะ 2007)

ยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase ที่พบในเชื้อ enterobacteria มีตัวอย่างเช่น *Kle. pneumoniae* ซึ่งด้านทานสารปฏิชีวนะหลายชนิด มียีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase อย่างน้อย 5 ยีน ได้แก่ ยีน *blaTEM-1*, *shv-1*, *shv-2*, *shv-5*, *oxa9* และ *ampC* โดยยีน *blaTEM-1* มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดที่สามารถถ่ายโอนได้ขนาด 17 kb และ 90 kb และยีน *shv* มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดที่สามารถถ่ายโอนได้ขนาด 90 kb (Hanson และคณะ 1999) จากการตรวจหา ยีน *blaPSE-1*, *blaTEM* และ *oxa1* ซึ่งควบคุมความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam ในเชื้อ *Sal. enterica* serotype Choleraesuis จำนวน 95 ไอโซเลท พบว่าร้อยละ 1.1 ของจำนวนเชื้อที่ทดสอบมียีน *blaPRE-1* และร้อยละ 1.1 ของจำนวนเชื้อที่ทดสอบมียีน *oxa1* (Onyango และคณะ 2014) จากการตรวจหา ยีน *blaTEM*, *blaSHV* และ *blaCTX-M* ในเชื้อ enterobacteria ที่แยกได้จากซากไก่และลำไส้ไก่ จำนวน 78 ไอโซเลท ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Esc. coli* พบยีน *blaCTX-M*, *blaSHV* และ *blaTEM* เป็นร้อยละ 89, 47 และ 27 ของจำนวนเชื้อ ตามลำดับ (Reiche และคณะ 2013) สำหรับยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ AmpC β -lactamase นั้นมักพบได้ทั่วไปในเชื้อ enterobacteria เช่น *Cit. freundii*, *Enterobacter*, *Esc. coli*, *M. morganii*, *Providencia*, *Ser. marcescens* และ *Shigella* (Coudron และคณะ 2000) El-Hady และ Adel (2015) รายงานการตรวจหา ยีน *ampC* ในเชื้อ enterobacteria ที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์ AmpC β -lactamase จำนวน 50 ไอโซเลท ได้แก่ *Esc. coli*, *Kle. pneumoniae* และ *Proteus mirabilis* พบว่าร้อยละ 92 ของเชื้อเหล่านี้มียีน *ampC*

ตารางที่ 29: ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเชื้อ enterobacteria

ยีนต้านทาน สารปฏิชีวนะ	สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบ TP-RAPD	สกุลที่มีความ ใกล้เคียงของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rDNA	ตัวอย่างยีนที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Genbank accession number)	% identity
<i>ampC</i>	ENT 23-1	5	<i>Enterobacter</i>	ยีน AmpC β -lactamase ของ <i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ MS22.1 (JX440356)	99%
	ENT 22-1	12	<i>Providencia</i>	(Porres-Osante และคณะ 2014) ยีน classC β -lactamase ของ <i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ 5705 (KJ949129) (Lahiri และคณะ 2014) ยีน β -lactamase AmpC precursor ของ <i>Enterobacter cloacae</i> สายพันธุ์ K0073 (AF411148) (Lee และคณะ 2003)	
<i>blaTEM</i>	ENT 1-1	1	<i>Klebsiella</i>	ยีน <i>blaTEM</i> ของ <i>H. ducreyi</i> สายพันธุ์ GU9 (CP011231) (Gangaiah และคณะ	99%
	ENT 9-2	5	<i>Enterobacter</i>	2015)	
	ENT 7-2	8	<i>Serratia</i>	ยีน <i>blaTEM</i> ของ <i>Esc. coli</i> สายพันธุ์ HC105 (KM598665) (Pitart และคณะ 2015)	
	ENT 8-3	9	<i>Enterobacter</i>	ยีน <i>blaTEM</i> -1 ของ <i>Kin. kingae</i> สายพันธุ์ KKC2005004457 (NG_041620)	
	ENT 20-2	12	<i>Providencia</i>	(Banerjee และคณะ 2013)	
	ENT 31-2	14	<i>Klebsiella</i>		

ตารางที่ 29: (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบ % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเชื้อ enterobacteria

ยีนต้านทาน สารปฏิชีวนะ	สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	รูปแบบ TP-RAPD	สกุลที่มีความ ใกล้เคียงของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rDNA	ตัวอย่างยีนที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Genbank accession number)	% identity
<i>ermB</i>	ENT 7-1	7	<i>Klebsiella</i>	ยีน <i>ermB</i> ของ <i>Sta. lentus</i> (SLU35228) (Werckenthin และคณะ 1996)	99%
	ENT 34-3	12	<i>Providencia</i>	ยีน <i>ermB</i> ของ uncultured bacterium clone WS-CL-9 (EU168330) (Koike และคณะ 2010)	
				ยีน <i>ermB</i> ของ <i>G. haemolysans</i> (DQ304775) (Zolezzi และคณะ 2007)	
<i>shv</i>	ENT 23-1	5	<i>Enterobacter</i>	ยีน <i>shv</i> ของ <i>Kle. pneumoniae</i> สายพันธุ์ AKH11/53 (JX268732) (Barisic และคณะ 2014)	96%
	ENT 18-1	12	<i>Providencia</i>	ยีน <i>shv</i> ของ <i>Esc. coli</i> ไอโซเลท 143 (AY833001) (Nemoy และคณะ 2005) ยีน <i>shv</i> ของ <i>Kle. pneumoniae</i> , พลาสมิด pK318-2 (NG_034800) (Prinarakis และคณะ 1996)	

10. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase โดยวัดการย่อยสลายสารตั้งต้น nitrocefin มีหน่วยเป็น μmol ของ nitrocefin ที่ถูกย่อยสลาย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน (Sharma และคณะ 2004) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 30 ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 1.96 ± 0.88 ถึง $11.30 \pm 0.37 \mu\text{mol}$ /นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน เชื้อที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase สูงสุด คือ ENT 22-1 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับ *Providencia* และพบว่ามียีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase ได้แก่ ยีน *ampC* และ *blaTEM*

ยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase มีหลายยีนด้วยกัน เช่น *ampC* (Hanson และคณะ 1999), *blaCTX* (Moghaddam และคณะ 2014), *blaTEM* (Bert และคณะ 2002), *blaZ* (Olsen และคณะ 2006), *oxa1* (Onyango และคณะ 2014), *oxa9* (Hanson และคณะ 1999) และ *shv* (Hanson และคณะ 1999) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้านทาสารปฏิชีวนะ พบว่า *Klebsiella* และ *Serratia* มียีน *blaTEM* เชื้อในสกุล *Enterobacteria* พบว่ามียีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase มากกว่า 1 ยีน ได้แก่ ยีน *ampC*, *blaTEM* และ *shv* เช่นเดียวกับเชื้อในสกุล *Providencia* ซึ่งมียีน *ampC* และ *blaTEM*

11. การศึกษาผลของการใช้สารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase

ผลของสารยับยั้ง clavulanic acid ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase เมื่อไม่เติม clavulanic acid ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 30 พบว่าสำหรับสายพันธุ์เชื้อที่พบว่ามีเฉพาะยีน *blaTEM* หรือ *shv* ได้แก่ ENT 1-1, ENT 7-2, ENT 8-3 และ ENT 18-1 นั้น clavulanic acid มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase เมื่อเติม clavulanic acid ลดลงจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase เมื่อไม่เติม clavulanic acid อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ ENT 23-1 ซึ่งมียีน *ampC*, *blaTEM* และ *shv* รวมทั้งเชื้อสายพันธุ์ ENT 22-1 ซึ่งมียีน *ampC* และ *blaTEM* นั้น clavulanic acid ไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase เมื่อเติม clavulanic acid และเมื่อไม่เติม clavulanic acid ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ข้อสันนิษฐาน อาจเป็นเพราะเชื้อสายพันธุ์ ENT 22-1 และ ENT 23-1 มียีน *ampC* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ AmpC β -lactamase ซึ่งจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase โดยวิธี combined disc method พบว่า clavulanic acid มีผลยับยั้งเอนไซม์ TEM และ SHV β -lactamase แต่ไม่มีผลยับยั้งหรือมีผลน้อยมากต่อเอนไซม์ AmpC β -lactamase (Carter และคณะ 2000) เช่นเดียวกับ Bouza และ Cercenado (2002) รายงานว่าสารบางชนิด เช่น clavulanic acid, sulbactam และ tazobactam เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase แต่สารยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase เหล่านี้กลับไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ cephalosporinase ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม AmpC β -lactamase

ตารางที่ 30: กิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase ของเชื้อ enterobacteria ที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam

รูปแบบ TP- RAPD	สายพันธุ์เชื้อ enterobacteria	สกุลที่มีความ ใกล้เคียงของ ลำดับ นิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rDNA	ยีนต้านทาน สารปฏิชีวนะ กลุ่ม β -lactam	กิจกรรมของ เอนไซม์ β -lactamase ($\mu\text{mol/นาที่/}$ มิลลิกรัม โปรตีน)*	กิจกรรมของ เอนไซม์ β -lactamase เมื่อ เติมสารยับยั้ง ($\mu\text{mol/นาที่/}$ มิลลิกรัม โปรตีน)*
1	ENT 1-1	<i>Klebsiella</i>	<i>blaTEM</i>	1.96 ± 0.88	0.59 ± 0.22
5	ENT 23-1	<i>Enterobacter</i>	<i>ampC</i> , <i>blaTEM</i> และ <i>shv</i>	7.70 ± 0.50	6.81 ± 0.63
8	ENT 7-2	<i>Serratia</i>	<i>blaTEM</i>	3.00 ± 0.12	0.76 ± 0.32
9	ENT 8-3	<i>Enterobacter</i>	<i>blaTEM</i>	4.09 ± 0.60	1.25 ± 0.42
11	ENT 18-1	<i>Providencia</i>	<i>shv</i>	2.59 ± 0.74	1.43 ± 0.26
12	ENT 22-1	<i>Providencia</i>	<i>ampC</i> และ <i>blaTEM</i>	11.30 ± 0.37	10.95 ± 0.79
14	ENT 31-2	<i>Klebsiella</i>	<i>blaTEM</i>	4.18 ± 1.05	1.68 ± 0.59

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ $\pm$ ค่า standard deviation

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ enterobacteria ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล 15 ชนิดที่จำหน่ายในประเทศ ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ในแนวทางต่างๆ เช่น การเลือกใช้สารปฏิชีวนะในการควบคุมการระบาดของโรค การติดตามแนวโน้มความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะในบรรดาเชื้อ enterobacteria และการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค TP-RAPD ซึ่งมีความละเอียดและชัดเจนมากเพียงพอที่จะเป็นมาตรฐานในการระบุเชื้อ enterobacteria ใน 6 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Serratia* และ *Yersinia* แทนการใช้คุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ที่ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ และมีความซ้ำซ้อนของคุณลักษณะที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกสกุลของเชื้อ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. จากการแยกเชื้อ enterobacteria ในอาหารทะเลสดจากตลาดจำหน่ายอาหารทะเล 3 แห่ง ได้แก่ 1) ตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร 2) ตลาดบ้านเขาตะเกียบ อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์ และ 3) ตลาดบ้านเพ อ. เมือง จ. ระยอง รวม 35 ตัวอย่าง มี 2 ตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อ enterobacteria สำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อ enterobacteria เป็นจำนวนมากที่สุด มีจำนวนเท่ากับ $2.44 \times 10^5 \pm 5.75 \times 10^4$ CFU/กรัม

2. แยกเชื้อ enterobacteria จากอาหารทะเลได้ 96 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์รูปแบบ ERIC-PCR ของเชื้อ พบว่าได้รูปแบบ ERIC-PCR จำนวน 81 รูปแบบ แสดงว่ามีจำนวน 81 สายพันธุ์ และประชากรเชื้อ enterobacteria ที่แยกได้จากอาหารทะเลมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากมีค่า % similarity ประมาณ 10%

3. เทคนิค ERIC-PCR มีความเหมาะสมในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ enterobacteria เนื่องจาก ERIC sequence เป็นหนึ่งใน intergenic repeated sequence ที่พบในเชื้อ enterobacteria และผลผลิตของปฏิกิริยา PCR มีจำนวนชิ้นและขนาดที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1-15 ชิ้น ขนาดประมาณ 100 bp ถึง 5.0 kb

4. ส่วนใหญ่ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ เจริญที่อุณหภูมิ 20°C - 40°C ค่า pH 4.0-9.0 และความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับร้อยละ 3 อุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่เชื้อ enterobacteria บางสายพันธุ์เจริญได้ คือ 15°C และ 45°C ตามลำดับ ค่า pH ต่ำสุดและสูงสุดที่เชื้อ enterobacteria บางสายพันธุ์เจริญได้ คือ 3.0 และ 11.0 ตามลำดับ และความเข้มข้นของ NaCl สูงสุดที่เชื้อ enterobacteria บางสายพันธุ์เจริญได้ คือร้อยละ 7

5. กิจกรรมของ protease ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์มีตั้งแต่ไม่สามารถตรวจพบ ถึง 14.56 ± 1.08 unit/มิลลิลิตร supernatant

6. จากการทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ พบว่ามีเชื้อ enterobacteria ที่สังเคราะห์เอนไซม์ catalase, urease และ amylase เป็นจำนวน 68, 9 และ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่มีสายพันธุ์ใดสังเคราะห์เอนไซม์ caseinase

7. จากการวิเคราะห์รูปแบบของพลาสมิดของเชื้อ enterobacteria จำนวน 81 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่มีพลาสมิดมีจำนวน 16 สายพันธุ์ โดยมีพลาสมิด 1-5 ชิ้น ขนาดตั้งแต่ 1.7 ถึง 19.0 kb

8. จากการทดสอบความต้านทานสารปฏิชีวนะของเชื้อ *enterobacteria* จำนวน 81 สายพันธุ์ พบว่าร้อยละ 90.12, 76.54, 69.14, 61.73, 22.22, 3.70, 3.70, 2.47 และ 1.23 ของจำนวนสายพันธุ์ต้านทาน ต่อ penicillin, vancomycin, erythromycin, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, streptomycin, neomycin และ kanamycin ตามลำดับ ในขณะที่ไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่ต้านทาน gentamycin ทั้งนี้ ไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่ต้านทานสารปฏิชีวนะทุกชนิดและไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดที่ไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิด สายพันธุ์ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด ต้านทานสารปฏิชีวนะ 6 ชนิด

9. จากการวิเคราะห์รูปแบบ TP-RAPD ของเชื้อ *enterobacteria* จำนวน 81 สายพันธุ์ พบว่ามีรูปแบบ TP-RAPD 16 รูปแบบ แสดงว่ามีจำนวน 16 ชนิด รูปแบบ TP-RAPD มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 4-11 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 100 bp-3.0 kb ซึ่งสามารถใช้เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับการตรวจสอบเชื้อ *enterobacteria* ได้

10. เชื้อ *enterobacteria* จำนวน 16 ชนิด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับเชื้อ *enterobacteria* ใน 6 สกุล ได้แก่ *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Serratia* และ *Yersinia* ซึ่งมี % identity เท่ากับ 98%-99% โดยชนิดของเชื้อในสกุล *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Serratia* และ *Yersinia* มี 6, 4, 3, 1, 1 และ 1 ชนิด ตามลำดับ จำนวนสายพันธุ์ของเชื้อในสกุล *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Citrobacter*, *Yersinia* และ *Serratia* เป็น 34 (ร้อยละ 41.98), 30 (ร้อยละ 37.04), 11 (ร้อยละ 13.58), 3 (ร้อยละ 3.70), 2 (ร้อยละ 2.47) และ 1 (ร้อยละ 1.23) ตามลำดับ

11. จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ เชื้อในสกุล *Enterobacter* และ *Providencia* มียีน *ampC* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase เชื้อในสกุล *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia* และ *Serratia* มียีน *blaTEM* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase เชื้อในสกุล *Enterobacter* และ *Providencia* มียีน *shv* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase โดยเชื้อในสกุล *Enterobacteria* พบว่ามียีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase มากกว่า 1 ยีน ได้แก่ ยีน *ampC*, *blaTEM* และ *shv* เช่นเดียวกับเชื้อในสกุล *Providencia* ซึ่งมียีน *ampC* และ *blaTEM* เชื้อในสกุล *Klebsiella* และ *Providencia* มียีน *ermB* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ erythromycin ribosome methylase

12. เชื้อที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase สูงสุด คือ ENT 22-1 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับ *Providencia* และพบว่ามียีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่ม β -lactamase ได้แก่ ยีน *ampC* และ *blaTEM*

13. สำหรับเชื้อ enterobacteria ที่ไม่พบว่ามียีน *ampC* ได้แก่ *Klebsiella* สายพันธุ์ ENT 1-1 และ ENT 31-2, *Serratia* สายพันธุ์ ENT 7-2, *Enterobacter* สายพันธุ์ ENT 8-3 และ *Providencia* สายพันธุ์ ENT 18-1 นั้น clavulanic acid มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase ในขณะที่ *Enterobacter* สายพันธุ์ ENT 23-1 ซึ่งมียีน *ampC*, *blaTEM* และ *shv* รวมทั้ง *Providencia* สายพันธุ์ ENT 22-1 ซึ่งมียีน *ampC* และ *blaTEM* นั้น clavulanic acid ไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ β -lactamase

บรรณานุกรม

- Aarestrup, F.M., F. Bager and J.S. Andersen. 2000. Association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers: epidemiological study and changes over time. *Microb. Drug Resist.* 6: 71–75.
- Bager, F., M. Madsen, J. Christensen and F.M. Aarestrup. 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prevent. Vet. Med.* 31: 95–112.
- Barisic, I., D. Mitteregger, A.M. Hirschl, C. Noehammer and H. Wiesinger-Mayr. 2014. High diversity of beta-lactamases in the General Hospital Vienna verified by whole genome sequencing and statistical analysis. *Infect. Genet. Evol.* 27: 408-417.
- Becker, L., B. Bunk, C. Eller, M. Steglich, Y. Pfeifer, G. Werner and U. Nubel. 2015. Complete genome sequence of a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak strain from multilocus sequence type 514. *Genome Announc.* 3: e00742-15.
- Benskin, C.M., G. Rhodes, R.W. Pickup, K. Wilson and I.R. Hartley. 2010. Diversity and temporal stability of bacterial communities in a model passerine bird, the zebra finch. *Mol. Ecol.* 19: 5531-5544.
- Bert, F., C. Bramger and N. Lambert-Zochovsky. 2002. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 11-18.
- Bhowmick, P.P., D. Devegowda, H.A.D. Ruwandeepika, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2011. Presence of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes in seafood-associated *Salmonella* serovars and the role of the *sseC* gene in survival of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in epithelial cells. *Microbiol.* 157: 160-168.
- Bonnet, C., F. Diarrassouba, R. Brousseau, L. Masson, E. Topp and M.S. Diarra. 2009. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6955-6962.
- Bouza, E. and E. Cercenado. 2002. *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. *Semin. Respir. Infect.* 17: 215-230.
- Briggs, C.E. and P.M. Fratamico. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 846-849.

- Bywater, R., M. McConville, I. Phillips and T. Shryock. 2005. The susceptibility to growth-promoting antibiotics of *Enterococcus faecium* isolates from pigs and chickens in Europe. J. Antimicrob. Chemother. 56: 538-543.
- Carattoli, A., F. Tosini, W.P. Giles, M.E. Rupp, S.H. Hinrichs, F.J. Angulo, T.J. Barrett and P.D. Fey. 2002. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 1268-1272.
- Carter, M.W. K.J. Oakton, M. Warner and D.M. Livermore. 2000. Detection of extended-spectrum β -lactamases in klebsiellae with the Oxoid combination disk method. J. Clin. Microbiol. 38: 4228-4232.
- Chandler, J.A., J. M. Lang, S. Bhatnagar, J.A. Eisen and A. Kopp. 2011. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. PLoS Genet. 7: E1002272.
- Cherubin, C.E. 1986. Resistance of *Salmonella* other than *S. typhi* from the United States to beta-lactam antibiotics. J. Anim. Sci. 62: 56-63.
- Clark, N.C., R.C. Cooksey, B.C. Hill, J.M. Swenson and F.C. Tenover. 1993. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 2311-2317.
- Conlan, S., P.J. Thomas, C. Deming, M. Park, A.F. Lau, J.P. Dekker, E.S. Snitkin, T.A. Clark, K. Luong, Y. Song, Y.C. Tsai, M. Boitano, J. Dayal, S.Y. Brooks, B. Schmidt, A.C. Young, J.W. Thomas, G.G. Bouffard, R.W. Blakesley, J.C. Mullikin, J. Korlach, D.K. Henderson, K.M. Frank, T.N. Palmore and J.A. Segre. 2014. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Sci. Transl. Med. 6: 254RA126.
- Corso, A., D. Faccone, P. Gagetti, A. Togneri, H. Lopardo, R. Melano, V. Rodriguez, M. Rodriguez and M. Galas. 2005. First report of vanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. Int. J. Antimicrob. Agents. 25: 51-56.
- Coudron, P., E. Moland and K. Thomson. 2000. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. J Clin. Microbiol. 26: 1791-1796.

- da Silva, N., M.H. Taniwaki, V.C.A. Junqueira, N.F.A. Silveira, M.S. do Nascimento and R.A.R. Gomes. 2013. Microbiology Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual. CRC Press, Boca Raton.
- de Souza, P.M. and P. de Oliveira e Magalhaes. 2010. Application of microbial α -amylase in industry- a review. Braz. J. Microbiol. 41: 850-861.
- del Grosso, M., A. Caprioli, P. Chinzari, M.C. Fontana, G. Pezzotti, A. Manfrin, E. di Giannatale, E. Goffredo and A. Pantosti. 2000. Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. Microb. Drug Resist. 6: 313-318.
- Duran, N., B. Ozer, G.G. Duran, Y. Onlen and C. Demir. 2012. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. Indian J. Med. Res. 135: 389-396.
- El-Hady, S.A. and L.A. Adel. 2015. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates from patients at Ain Shams University Hospital. Egypt. J. Med. Hum. Genet. 16: 239-244.
- Fosberry, A.P., D.J. Payne, E.J. Lawlor and J.E. Hodgson. 1994. Cloning and sequence analysis of *bla*_{BIL-1}, a plasmid-mediated class C β -lactamase gene in *Escherichia coli* BS. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1182-1185.
- Gangaiah, D., K.M. Webb, T.L. Humphreys, K.R. Fortney, E. Toh, A. Tai, S.S. Katz, A. Pillay, C. Y. Chen, S.A. Roberts, R.S. Munson, Jr. and S.M. Spinola. 2015. *Haemophilus ducreyi* cutaneous ulcer strains are nearly identical to class I genital ulcer strains. PLoS. Negl. Trop. Dis. 9: E0003918.
- Gazouli, M., L.S. Tzouvelekis, E. Prinarakis, V. Miriagou and E. Tzelepi. 1996. Transferable cefoxitin resistance in enterobacteria from Greek hospitals and characterization of a plasmid-mediated group 1 β -lactamase (LAT-2). Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1736-1740.
- Gilson, E., J.M. Clement, D. Brutlag, M. Hofnung. 1984. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. EMBO J. 3: 1417-1421.
- Goncalves, M.O., W.P. Coutinho-Filho, F.P. Pimenta, G.A. Pereira, J.A.A. Pereira, A.L. Mattos-Guaraldi and R. Hirata, Jr. 2007. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. Lett. Appl. Microbiol. 44: 488-494.
- Gootz, T.D., D.B. Jackson and J.C. Sherris. 1984. Development of resistance to cephalosporins in clinical strains of *Citrobacter* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 25: 591-595.
- Greig, J.D. and A. Ravel. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. Int. J. Food Microbiol. 130: 77-87.

- Guentzel, M.N. 1996. *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. In S. Baron (Ed.). Medical Microbiology 4th Ed. University of Texas Medical Branch at Galveston. Texas.
- Habibi, S., S. Djedidi, K. Prongjunthuek, M.F. Mortuza, N. Ohkama-Ohtsu, H. Sekimoto and T. Yokoyoma. 2014. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant Soil*. 379: 51-66.
- Hanson, N.D., K.S. Thomson, E.S. Moland, C.C. Sanders, G. Berthold and R.G. Penn. 1999. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 377-380.
- Hara-Kudo, Y., H. Konuma, Y. Kamata, M. Miyahara, K. Takatori, Y. Onoue, Y. Sigita-Konishi and T. Ohnishi. 2013. Prevalence of the main food-borne pathogens in retail food under the national food surveillance system in Japan. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 30: 1450-1458.
- Hart, C. and M.F. Gibson. 1982. Comparative epidemiology of gentamicin-resistant enterobacteria: persistence of carriage and infection. *J. Clin. Pathol.* 35: 452-457.
- Heinitz, M.L., R.D. Ruble, D.E. Wagner and S.R. Tatini. 2000. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *J. Food Prot.* 63: 579-592.
- Huang, Y., V. Ghate, L. Phua and H.G. Yuk. 2012a. Prevalence of *Salmonella* and *Vibrio* spp. in seafood products sold in Singapore. 75: 1320-1323.
- Huang, X.Z., J.G. Frye, M.A. Chahine, L.M. Glenn, J.A. Ake, W. Su, M.P. Nikolich and E.P. Lesho. 2012b. Characteristics of plasmids in multi-drug-resistant Enterobacteriaceae isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq. *PLoS ONE*. 7: e40360.
- Hulton, C.S.J., C.F. Higgins and P.M. Sharp. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 825-834.
- Huss, H.H. 1993. Assurance of Seafood Quality. FAO Fisheries Technical Paper No. 334, FAO, Rome. 169 p.
- Iwamoto M., T. Ayers, B.E. Mahon and D.L. Swerdlow. 2010. Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 399-411.
- Jernberg, C., S. Lofmark, C. Edlund and J.K. Jansson. 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 1: 56-66.

- Kadima, T.A. and J.H. Weiner. 1997. Mechanism of suppression of piperacillin resistance in enterobacteria by tazobactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2177-2183.
- Kang, C.H., J.H. Choi, J. Noh, D.Y. Kwak, S.H. Han and J.S. So. 2014. Microbially induced calcite precipitation-based sequestration of strontium by *Sporosarcina pasteurii* WJ-2. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174: 2482-2491.
- Koenig, J.C., K.D. Groissmeier and M.J. Manefield. 2014. Tolerance of anaerobic bacteria to chlorinated solvents. *Microbes Environ.* 29 : 23-30.
- Koike, S., R.I. Aminov, A.C. Yannarell, H.D. Gans, I.G. Krapac, J.C. Chee-Sanford and R.I. Mackie. 2010. Molecular ecology of macrolide-lincosamide-streptogramin B methylases in waste lagoons and subsurface waters associated with swine production. *Microb. Ecol.* 59: 487-498.
- Krieg, R.E. and W.R. Lockhart. 1966. Classification of enterobacteria based on overall similarity. *J. Bacteriol.* 92: 1275-1280.
- Kumar, N. and D. Das. 2000. Production and purification of α -amylase from hydrogen producing *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Bioprocess Eng.* 23: 205-208.
- Kumar, H.S., S.K. Otta, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2001. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 334-338.
- Lade, H., D. Paul and J. H. Kweon. 2014. Isolation and molecular characterization of biofouling bacteria and profiling of quorum sensing signal molecules from membrane bioreactor activated sludge. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 2255-2273.
- Lee, S.H., J.Y. Kim, S.H. Shin, Y.J. An, Y.W. Choi, Y.C. Jung, H.I. Jung, E.S. Sohn, S.H. Jeong and K.J. Lee. 2003. Dissemination of SHV-12 and characterization of new AmpC-type beta-lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter* species in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2477-2482.
- Lincopan, N., J.A. McCulloch, C. Reinert, V.C. Cassettari, A.C. Gales and E.M. Mamizuka. 2005. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 43: 516-519.
- Lincopan, N., R. Leis, M.A. Vianello, M.R.E de Araujo, A.S. Ruiz and E.M. Mamizuka. 2006. Enterobacteria producing extended-spectrum β -lactamases and IMP-1 metallo- β -lactamases isolated from Brazilian hospitals. *J. Med. Microbiol.* 55: 1611-1613.

- Maleki-Ravasan, N., M. Oshaghi, D. Afshar, M. Arandian, S. Hajikhani, A. Akhavan, B. Yakhchali, M. Shirazi, R. Jafari, K. Aminian, R. Fazeli-Varzaneh, R. Durvasula and Y. Rassi. 2015. Aerobic bacterial flora of biotic and abiotic compartments of a hyperendemic Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) focus. *Parasit. Vectors*. 8: 63.
- Mandal, S.M., S. Sharma, A.K. Pinnaka, A. Kumari and S. Korpole. 2013. Isolation and characterization of diverse antimicrobial lipopeptides produced by *Citrobacter* and *Enterobacter*. *BMC Microbiol*. 13: 152.
- Marasco, R., E. Rolli, M. Fusi, A. Cherif, A. Abou-Hadid, U. El-Bahairy, S. Borin, C. Sorlini and D. Daffonchio. 2013. Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *Biomed. Res. Int*. 2013. 491091.
- Marathe, N.P., V.R. Regina, S.A. Walujkar, S.S. Charan, E.R. Moore, D.G. Larsson and Y.S. Shouche. 2013. A treatment plant receiving waste water from multiple bulk drug manufacturers is a reservoir for highly multi-drug resistant integron-bearing bacteria. *PLoS ONE* 8: E77310.
- Meruvu, H. and S.R.R. Donthireddy. 2013. Biochemical and molecular taxonomy of chitinolytic *Citrobacter freundii* str. nov. haritD11, isolated from Indian marine environment. *Int. J. Pharma. Bio. Sci*. 4: B1168-B1175.
- Miao, Y.Z., H. Xu, B.J. Fei, D.R. Qiao and Y. Cao. 2013. PCR-RFLP analysis of the diversity of phytate-degrading bacteria in the Tibetan Plateau. *Can. J. Microbiol*. 59: 245-251.
- Miyata, M., H. Yamakawa, M. Hamatsu, H. Kuribayashi, Y. Takamatsu and Y. Yamazoe. 2011. Enterobacteria modulate intestinal bile acid transport and homeostasis through apical sodium dependent bile acid transporter (SLC10A2) expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 336: 188-196.
- Mobley H.L., M.D. Island and R.P. Hausinger. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev*. 59: 451-480.
- Moghaddam M.N., M.H. Beidokhti, S.A. Jamehdar, M. Ghahraman. 2014. Genetic properties of *bla*_{CTX-M} and *bla*_{PER} β -lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. *Iran J. Basic Med. Sci*. 17: 378-383.
- Montagna, M., B. Chouaia, G. Mazza, E.M. Prosdocimi, E. Crotti, V. Mereghetti, V. Vacchini, A. Giorgi, A. de Biase, S. Longo, R. Cervo, G.C. Lozzia, A. Alma, C. Bandi and D. Daffonchio. 2015. Effects of the diet on the microbiota of the red palm weevil (coleoptera: dryophthoridae). *PLoS ONE* 10: E0117439.

- Morou-Bermudez, E. and R.A. Burne. 1999. Genetic and physiologic characterization of urease of *Actinomyces naeshlundii*. Infect. Immun. 67: 504-512.
- Nemoy, L.L., M. Kotetishvili, J. Tigno, A. Keefer-Norris, A.D. Harris, E.N. Perencevich, J.A. Johnson, D. Torpey, A. Sulakvelidze, J.G. Morris, Jr. and O.C. Stine. 2005. Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. J. Clin. Microbiol. 43: 1776-1781.
- Newsom, S.W.B., M.J. Marshall and A.M. Harris. 1974. Enterobacteria β -lactam antibiotics and β -lactamases in clinical practice. J. Med. Microbiol. 7: 473-482.
- Nimnoi, P. and N. Pongsilp. 2009. Genetic diversity and plant-growth promoting ability of the indole-3-acetic Acid (IAA) synthetic bacteria isolated from agricultural soil as well as rhizosphere, rhizoplane and root tissue of *Ficus Religiosa* L., *Leucaena Leucocephala* and *Piper Sarmentosum* Roxb. Res. J. Agric. Biol. Sci. 5: 29-41.
- Nimnoi, P., N. Pongsilp and S. Lumyong. 2010. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. World J. Microbiol. Biotechnol. 26: 193-203.
- Ogutcu, H., M. Adiguzel, M. Gulluce, M. Karadayi and F. Sahin. 2009. Molecular characterization of *Rhizobium* strains isolated from wild chickpeas collected from high altitudes in Erzurum-Turkey. Rom. Biotechnol. Lett. 14: 4294-4299.
- Okitsu, N., S. Kaieda, H. Yano, R. Nakano, Y. Hosaka, R. Okamoto, T. Kobayashi and M. Inoue. 2005. Characterization of *ermB* gene transposition by Tn1545 and Tn917 in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. J. Clin. Microbiol. 43: 168-173.
- Olsen, J.E., H. Christensen and F.M. Aarestrup. 2006. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J. Antimicrob. Chemother. 57: 450-460.
- Onyango, D.M., V.M. Ndeda, S.A. Wandili, S.A. Wawire and D. Ochieng. 2014. Antimicrobial profile of *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis from free-range swine in Kakamega fish market, western Kenya. J. Infect. Dev. Ctries. 8: 1381-1390.
- Papanicolaou, G.A., A.A. Medeiros and G.A. Jacoby. 1990. Novel plasmidmediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and a-methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 2200-2209.

- Patel, V., H. Munot, Y.S. Shouche and D. Madamwar. 2014. Response of bacterial community structure to seasonal fluctuation and anthropogenic pollution on coastal water of Alang-Sosiya ship breaking yard, Bhavnagar, India. *Bioresour. Technol.* 161C: 362-370.
- Paterson, D.L. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Amer. J. Med.* 119: S20-S28.
- Pongsilp, N. 2012. Phenotypic and Genotypic Diversity of Rhizobia. Bentham Science Publishers, UAE. 194 p.
- Pongsilp, N., N. Teaumroong, A. Nuntagij, N. Boonkerd and M.J. Sadowsky. 2002. Genetic structure of indigenous non-nodulating and nodulating populations of *Bradyrhizobium* in soils from Thailand. *Symbiosis* 33: 39-58.
- Pongsilp, N., C. Leelahawong, A. Nuntagij, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 2010. Characterization of *Pueraria mirifica*-nodulating rhizobia present in Thai soil. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4: 1307-1313.
- Prinarakis, E.E., E. Tzelepi, M. Gazouli, A.F. Mentis and L.S. Tzouvelekis. 1996. Characterization of a novel SHV beta-lactamase variant that resembles the SHV-5 enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* 139: 229-234.
- Proctor, G.N. and R.H. Rownd. 1982. Rosanilins: indicator dyes for chloramphenicol-resistant enterobacteria containing chloramphenicol acetyltransferase. *J. Bacteriol.* 150: 1375-1382.
- Rabiei, A., M. Sharifinik, A. Niazi, A. Hashemi and S. Ayatollahi. 2013. Core flooding tests to investigate the effects of IFT reduction and wettability alteration on oil recovery during MEOR process in an Iranian oil reservoir. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 5979-5991.
- Rashid, M.H., M.A. Sattar, M.I. Uddin and J.P.W. Young. 2009. Molecular characterization of symbiotic root nodulating rhizobia isolated from lentil (*Lens culinaris* Medik.). *EJEAFChe.* 8: 602-612.
- Reich, F., V. Atanassova and G. Klein. 2013. Extended spectrum β -lactamase and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 1253-1259.
- Rivas, R., E. Velazquez, A. Valverde, P.F. Mateos and E. Martinez-Molina. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22: 1086-1089.
- Rivas, R. E. Velazquez, J.L. Palomo, P.F. Mateos, P. Garcia-Benavides and E. Martinez-Molina. 2002. Rapid identification of *Clabibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 179-184.

- Rivas, R., A. Abril, M.E. Trujillo and E. Velazquez. 2004. *Sphingomonas phyllosphaerae* sp. nov., from the phyllosphere of *Acacia caven* in Argentina. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2147-2150.
- Secades P. and J.A. Guijarro. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3969-3975.
- Shabarinath, S., K.H. Sanath, R. Khushiramani, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2007. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 227–233.
- Sharma, S., P. Ramnani and J.S. Viridi. 2004. Detection and assay of β -lactamases in clinical and non-clinical strains of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 401-405.
- Sharples, G.J. and R.G. Lloyd. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 18: 6503-6508.
- Sihvonen, L.M., K. Jalkanen, E. Huovinen, S. Toivonen, J. Corander, M. Kuusi, M. Skurnik, A. Siitonen and K. Haukka. 2012. Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A represent two phylogenetic lineages with differing pathogenicity-related properties. *BMC Microbiol.* 12: 208.
- Smith, H.W., Z. Parsell and P. Green. 1978. Thermosensitive antibiotic resistance plasmids in enterobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 109: 37-47.
- Soleimanian, S., N.C. Gordon and D.W. Wareham. 2011. Polymicrobial necrotizing fasciitis involving enterobacteria producing CTX-M-15 extended spectrum β -lactamases. *J. Med. Microbiol.* 60: 135-137.
- Stenkova, A.M., M.P. Isaeva, F.N. Shubin, V.A. Rasskazov and A.V. Rakin. 2011. Trends of the major porin gene (*ompF*) evolution: insight from the genus *Yersinia*. *PLoS ONE* 6: E20546.
- Stern, M.J., G.F.L. Ames, N.H. Smith, E.C. Robinson and C.F. Higgins. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37: 1015-1026.
- Subudhi, S., T. Nayak, N.R. Kumar, P. Vijayananth and B. Lal. 2013. Impact of regulated pH on proto scale hydrogen production from xylose by an alkaline tolerant novel bacterial strain, *Enterobacter cloacae* DT-1. *Int. J. Hydrogen Energy* 38: 2728-2737.
- Takahashi, N., F. Yamaguchi, G. Chen, T. Yasuhara, R. Ito, R. Wakuta and K. Fukuchi. 2010. Analysis of the antibiotic resistant gene in multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* isolated at Showa University Hospital. *Rinsho Byori.* 58: 442-447.

- Taylor, W.I. and P. Achanzar. 1972. Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae. *Appl. Microbiol.* 24: 58-61.
- Teophilo, G.N.D., R.H.S.F. Vieira, D.P. Rodrigues and F.G.R. Menezes. 2002. *Escherichia coli* isolated from seafood: toxicity and plasmid profiles. *Int. Microbiol.* 5: 11-14.
- Terenius, O., J.M. Lindh, K. Eriksson-Gonzales, L. Bussiere, A.T. Laugen, H. Bergquist, K. Titanji and I. Faye. 2012. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80: 556-565.
- Tzouvelekis, L.S., E. Tzelepi and A.F. Mentis. 1994. Nucleotide sequence of a plasmid-mediated cephalosporinase gene (*bla_{LAT-1}*) found in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2207-2209.
- Umeh, S.O. and F.J.C. Odibo. 2014. Amylase activity during retting cassava tubers for wet fufu mash production. *Sci-Afric. J. Sci. Issues Res. Essays.* 2: 132-137.
- Urbina, R., V. Prado and E. Canelo. 1989. Trimethoprim resistance in enterobacteria isolated in Chile. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 143-149.
- Valverde, A., J.M. Igual, A. Peix, E. Cervantes and E. Velazquez. 2006. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2631-2637.
- van Duin, D., F. Perez, S.D. Rudin, E. Cober, J. Hanrahan, J. Ziegler, R. Webber, J. Fox, P. Mason, S.S. Richter, M. Cline, G.S. Hall, K.S. Kaye, M.R. Jacobs, R.C. Kalayjian, R.A. Salata, J.A. Segre, S. Conlan, S. Evans, V.G. Fowler, Jr. and R.A. Bonomo. 2014. Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 4035-4041.
- van Leeuwen, W.J., J. van Embden, P.A. Guinee, E.H. Kampelmacher, A. Manten, M. van Schothorst and C.E. Voogd. 1979. Reduction of the number of tetracycline-resistant strains of *Salmonella* in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskde* 104: 923-927.
- Vargas-Asensio, G., A. Pinto-Tomas, B. Rivera, M. Hernandez, C. Hernandez, S. Soto-Montero, C. Murillo, D.H. Sherman and G. Tamayo-Castillo. 2014. Uncovering the cultivable microbial diversity of costa rican beetles and its ability to break down plant cell wall components. *PLoS ONE* 9: E113303.
- Versalovic, J., T. Koeuth and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-31.

- Vicente, C.S., F.X. Nascimento, M. Espada, P. Barbosa, K. Hasegawa, M. Mota and S. Oliveira. 2013. Characterization of bacterial communities associated with the pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis*, the insect vector of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. FEMS Microbiol. Lett. 347: 130-139.
- Walker, K.E., C.R. Mahon, D.C. Lehman and G. Manuselis. 2014. Enterobacteriaceae. In C.R. Mahon, D.C. Lehman and G. Manuselis (Eds.). Textbook of Diagnostic Microbiology 5th Ed. Saunders, Missouri, pp. 420-454.
- Wang, F., L. Jiang, Q. Yang, F. Han, S. Chen, S. Pu, A. Vance and B. Ge. 2011. Prevalence and antimicrobial susceptibility of major foodborne pathogens in imported seafood. J. Food Prot. 74: 1451-1461.
- Werckenthin, C., S. Schwarz and K. Dyke. 1996. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Staphylococcus lentus* results from the integration of part of a transposon into a small plasmid. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2224-2225.
- Yagoub, S.O. 2009. Isolation of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. from raw fish sold in fish market in Khartoum state. J. Bacteriol. Res. 1: 85-88.
- Yang, Y. and D.M. Livermore. 1988. Activity of temocillin and other penicillins against β -lactamase-inducible and -stably derepressed enterobacteria. J. Antimicrob. Chemother. 22: 299-306.
- Yu, X., Y. Li, C. Zhang, H. Liu, J. Liu, W. Zheng, X. Kang, X. Leng, K. Zhao, Y. Gu, X. Zhang, Q. Xiang and Q. Chen. 2014. Culturable heavy metal-resistant and plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzhihua, China. PLoS ONE 9: E106618.
- Zolezzi, P.C., P.G. Cepero, J. Ruiz, L.M. Laplana, C.R. Calvo and R. Gomez-Lus. 2007. Molecular epidemiology of macrolide and tetracycline resistances in commensal *Gemella* sp. isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 1487-1490.
- Zhang, Y., P.Y. Hong, M.W. LeChevallier and W.T. Liu. 2015. Phenotypic and phylogenetic identification of coliform bacteria obtained using 12 coliform methods approved by the U.S. Environmental Protection Agency. Appl. Environ. Microbiol. 81: 6012-6023.

ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. นีลวรรณ พงศ์ศิลป์ (Associate Professor Dr. Neelawan Pongsilp)

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

โทรศัพท์ 034-245337, 034-245300 ต่อ 28815, 28823

โทรสาร 034-245336

e-mail pongsilp_n@su.ac.th

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สถาบัน	ปี พ.ศ. ที่จบ
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง	2536
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2540
วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	2545

ประวัติการทำงาน

นักวิจัยหลังปริญญาเอก Department of Agronomy, College of Agricultural & Life Sciences University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA.

อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สาขาวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

Biological Nitrogen Fixation, Plant-Microbe Interaction, Plant-Associated Microorganisms, Microbial Ecology, Microbial Diversity, Molecular Microbiology

หนังสือ-ตำรา

นีลวรรณ พงศ์ศิลป์. 2557. อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 159 หน้า.

Pongsilp, N. 2012. Phenotypic and Genotypic Diversity of Rhizobia. Bentham Science Publishers, UAE. 194 p.

นิลวรรณ พงศ์ศิลป์. 2555. จุลชีววิทยาทางการเกษตร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 220 หน้า.

ผลงานวิจัย

- Pongsilp, N., P. Nimnoi and S. Lumyong.** 2016. Community structure of total bacterial DNA, cultivable bacteria and prototrophs in bulk soil and rhizospheres. *Malaysian Journal of Microbiology*. 12(1): 1-14.
- Nimnoi, P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2015. Utilization of agro-industrial products for increasing red pigment production of *Monascus purpureus* AHK12. *Chiang Mai Journal of Science*. 42(2): 331-338.
- Nimnoi, P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2014. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with *Actinomycetes* and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. *Journal of Plant Nutrition*. 37(3): 432-446.
- Tungao, W., P. Nimnoi, S. Lumyong and **N. Pongsilp**. 2012. Determination of bacterial diversity in bulk soil and rhizospheres using molecular fingerprintings and phenotypic features. *World Applied Science Journal*. 19(11): 1613-1620.
- Pongsilp, N., P. Nimnoi and S. Lumyong.** 2012. Genotypic diversity among rhizospheric bacteria of three legumes assessed by cultivation-dependent and cultivation-independent techniques. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 28(2): 615-626.
- Pongsilp, N.** and N. Boonkerd. 2011. Transposon mutant of *Vigna radiata*-nodulating *Bradyrhizobium* sp. impaired in both resistance to stress conditions and symbiotic performance. *African Journal of Microbiology Research*. 5(25): 4303-4309.
- Nimnoi, P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2011. Actinobacterial community and diversity in rhizosphere soils of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by RT-PCR and PCR DGGE. *Biochemical Systematics & Ecology*. 39(4-6): 509-519.
- Chuntanom, S. and **N. Pongsilp**. 2011. Environmental parameters affecting urease production and ammonification in *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia and *Vigna radiata*-nodulating rhizobia. *International Journal of Microbiological Research*. 2(3): 222-232.
- Nimnoi, P., S. Lumyong and **N. Pongsilp**. 2011. Impact of rhizobial inoculants on rhizosphere bacterial communities of three medicinal legumes assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Annals of Microbiology*. 61(2): 237-245.

- Noisangiam, R., A. Nuntagij, **N. Pongsilp**, N. Boonkerd, J. Denduangboripant, C. Ronson and N. Teaumroong. 2010. Heavy metal tolerant *Metalliresistens boonkerdii* gen. nov., sp. nov., a new genus in the family *Bradyrhizobiaceae* isolated from soil in Thailand. *Systematic & Applied Microbiology*. 33(7): 374-382.
- Nimnoi, P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2010. Genetic diversity and community of endophytic actinomycetes within the roots of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by *Actinomycetes*-specific PCR and PCR-DGGE of 16S rRNA gene. *Biochemical Systematics & Ecology*. 38(4): 595-601.
- Pongsilp, N.**, C. Leelahawong, A. Nuntagij, N. Teaumroong and N. Boonkerd. 2010. Characterization of *Pueraria mirifica*-nodulating rhizobia present in Thai soil. *African Journal of Microbiology Research*. 4(12): 1307-1313.
- Pantujit, S. and **N. Pongsilp**. 2010. Phosphatase activity and affects of phosphate-solubilizing bacteria on yield and uptake of phosphorus in corn. *World Applied Science Journal*. 8(4): 429-435.
- Leelahawong, C., A. Nuntagij, N. Teaumroong, N. Boonkerd and **N. Pongsilp**. 2010. Characterization of root-nodule bacteria isolated from the medicinal legume *Indigofera tinctoria*. *Annals of Microbiology*. 60(1): 65-74.
- Pongsilp, N.** and C. Leelahawong. 2010. Root-nodule symbionts of *Derris elliptica* Benth. are members of three distinct genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium*. *International Journal of Integrative Biology*. 9(1): 37-42.
- Nimnoi, P., **N. Pongsilp** and S. Lumyong. 2010. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 26(2): 193-203.
- Leelahawong, C. and **N. Pongsilp**. 2009. Phosphatase activities of root-nodule bacteria and nutritional factors affecting production of phosphatases by representative bacteria from three different genera. *KMITL Science & Technology Journal*. 9(2): 65-83.
- Pongsilp, N.** and A. Nuntagij. 2009. Genetic diversity and metabolites production of root-nodule bacteria isolated from medicinal legumes *Indigofera tinctoria*, *Pueraria mirifica* and *Derris elliptica* Benth. grown in different geographic origins across Thailand. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*. 6(1): 26-34.
- Leelahawong, C., A. Nuntagij and **N. Pongsilp**. 2009. Factors influencing indole-3-acetic acid biosynthesis of root-nodule bacteria isolated from various leguminous plants. *Thammasat International Journal of Science & Technology*. 14(2): 1-12.

- Nimnoi, P. and N. **Pongsilp**. 2009. Genetic diversity and plant-growth promoting ability of the indole-3-acetic acid (IAA) synthetic bacteria isolated from agricultural soils as well as rhizosphere, rhizoplane and root tissue of *Ficus religiosa* L., *Leucaena leucocephala* and *Piper sarmentosum* Roxb. Research Journal of Agriculture & Biological Sciences. 5(1): 29-41.
- Sudto, A., Y. Punyathiti and N. **Pongsilp**. 2008. The use of agricultural wastes as substrates for cell growth and carboxymethyl cellulase (CMCase) production by *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Rhizobium* sp. KMITL Science & Technology Journal. 8(2): 84-92.
- Pongsilp, N.** and N. Boonkerd. 2007. Research techniques for estimating phenotypic and genotypic diversity of root- and stem-nodule bacteria. Suranaree Journal of Science & Technology. 14(3): 297-308.
- Pongsilp, N.** and A. Nuntagij. 2007. Selection and characterization of mungbean root nodule bacteria based on their growth and symbiotic ability in alkaline conditions. Suranaree Journal of Science & Technology. 14(3): 277-286.
- Pongsilp, N.,** E.W. Triplett and M.J. Sadowsky. 2005. Detection of homoserine lactone-like quorum sensing molecules in *Bradyrhizobium* strains. Current Microbiology. 51(4):250-254.
- Pongsilp, N.,** N. Teaumroong, A. Nuntagij, N. Boonkerd and M.J. Sadowsky. 2002. Genetic structure of indigenous non-nodulating and nodulating populations of *Bradyrhizobium* in soils from Thailand. Symbiosis 33: 39-58.

2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ระวี นิ่มน้อย (Dr. Pongrawee Nimnoi)

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ

โครงการจัดตั้งสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน

โทรศัพท์ 081-9936648

โทรสาร 034-281057

e-mail umco_perra@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สถาบัน	ปี พ.ศ. ที่จบ
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศิลปากร	2551
วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2555

ประวัติการทำงาน

อาจารย์ โคร่งการจัดตั้งสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตร-
ศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

สาขาวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

Microbial Ecology, Microbial Diversity, Molecular Microbiology

หนังสือ-ตำรา

พงษ์ระวี นิมน้อย. 2558. แอคติโนมัยซีท. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 276 หน้า.

ผลงานวิจัย

Pongsilp, N., **P. Nimnoi** and S. Lumyong. 2016. Community structure of total bacterial DNA, cultivable bacteria and prototrophs in bulk soil and rhizospheres. *Malaysian Journal of Microbiology*. 12(1): 1-14.

Nimnoi, P., N. Pongsilp and S. Lumyong. 2015. Utilization of agro-industrial products for increasing red pigment production of *Monascus purpureus* AHK12. *Chiang Mai Journal of Science*. 42(2): 331-338.

Nimnoi, P., N. Pongsilp and S. Lumyong. 2014. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with *Actinomyces* and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. *Journal of Plant Nutrition*. 37(3): 432-446.

Tungao, W., **P. Nimnoi**, S. Lumyong and N. Pongsilp. 2012. Determination of bacterial diversity in bulk soil and rhizospheres using molecular fingerprintings and phenotypic features. *World Applied Science Journal*. 19(11): 1613-1620.

Pongsilp, N., **P. Nimnoi** and S. Lumyong. 2012. Genotypic diversity among rhizospheric bacteria of three legumes assessed by cultivation-dependent and cultivation-independent techniques. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 28(2): 615-626.

Nimnoi, P., N. Pongsilp and S. Lumyong. 2011. Actinobacterial community and diversity in rhizosphere soils of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by RT-PCR and PCR DGGE. *Biochemical Systematics & Ecology*. 39(4-6): 509-519.

Nimnoi, P., S. Lumyong and N. Pongsilp. 2011. Impact of rhizobial inoculants on rhizosphere bacterial communities of three medicinal legumes assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Annals of Microbiology*. 61(2): 237-245.

- Nimnoi, P.,** N. Pongsilp and S. Lumyong. 2010. Genetic diversity and community of endophytic actinomycetes within the roots of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by *Actinomycetes*-specific PCR and PCR-DGGE of 16S rRNA gene. *Biochemical Systematics & Ecology*. 38(4): 595-601.
- Nimnoi, P.,** N. Pongsilp and S. Lumyong. 2010. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 26(2): 193-203.
- Nimnoi, P.** and N. Pongsilp. 2009. Genetic diversity and plant-growth promoting ability of the indole-3-acetic acid (IAA) synthetic bacteria isolated from agricultural soils as well as rhizosphere, rhizoplane and root tissue of *Ficus religiosa* L., *Leucaena leucocephala* and *Piper sarmentosum* Roxb. *Research Journal of Agriculture & Biological Sciences*. 5(1): 29-41.