



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

ปริญญา

ปฐพีวิทยา

สาขา

ปฐพีวิทยา

ภาควิชา

เรื่อง การแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและการเปลี่ยนแปลงสังคม
จุลินทรีย์ในดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์

Distribution of Tetracycline Resistance Genes and Microbial Community Shift in
Agricultural Soil Through Fertilization with Animal Manure

نامผู้วิจัย นางสาวพรพิมล บัวขาวเกาะ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ศิริลักษณ์ จิตรอักษร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุเทพ ทองแพ, วท.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและการเปลี่ยนแปลงสังคมจุลินทรีย์ใน
ดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์

Distribution of Tetracycline Resistance Genes and Microbial Community Shift in Agricultural
Soil Through Fertilization with Animal Manure

โดย

นางสาวพรพิมล บัวขาวเกาะ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

พ.ศ. 2554

พรมิล บัวขาวเกาะ 2554: การแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและการเปลี่ยนแปลงสังคมจุลินทรีย์ในดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา) สาขาวิชาปฐพีวิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วรรณิการ์ สัจจาพันธ์, Ph.D. 113 หน้า

จากการศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินจำลองที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ ซึ่งผู้วิจัยได้ใช้ปุ๋ยคอกมูลสุกรที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และมูลสุกรที่มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.2, 200 และ 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน) มีการตรวจพบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน *tetC*, *tetD*, *tetA*, *tetG*, *tetL*, *tetM* และ *tetO* ในคำรับการทดลองทั้งที่มีการเติมมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน โดยจะพบยีนดังกล่าวในทุกระยะเวลาหลังจากมีการเติมมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน นอกจากนี้ยังพบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน *tetB*, *tetO*, *tetS*, *tetP* และ *tetX* ในดินที่มีการใส่มูลสุกรทั้งที่เติมและไม่เติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในบางระยะเวลาหลังจากมีการเติมมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีจำนวนชนิดเพิ่มขึ้นในดินหลังจากเติมมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีผลต่อความหลากหลายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ส่วนการเติมมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินเพียงครั้งเดียวหรือมีการใส่ซ้ำ มีผลต่อความหลากหลายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่พบคล้ายคลึงกัน

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มสังคมจุลินทรีย์ในดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ โดยใช้เทคนิค DGGE และจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA เพื่อวิเคราะห์ dendrogram โดยอาศัยรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าระยะเวลาหลังจากการเติมมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสังคมจุลินทรีย์ดินมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่เติมลงไป และสามารถจัดกลุ่มสังคมจุลินทรีย์ที่มีความใกล้เคียงกันจากตัวอย่างดินที่นำมาทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Pornpimon Buachaoko 2011: Distribution of Tetracycline Resistance Genes and Microbial Community Shift in Agricultural Soil Through Fertilization with Animal Manure. Master of Science (Soil Science), Major Field: Soil Science, Department of Soil Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Kannikar Sajjaphan, Ph.D. 113 pages.

The study on the distribution of tetracycline resistance genes in agricultural soil through fertilization of the soil with animal manure was performed using soil microcosms. In this study, the diversity of tetracycline resistant genes (*tet* genes) in the soil microcosms was explored after fertilization of the soil with tetracycline-free swine manure which amended with tetracycline at various concentrations (0 0.2 20 2000 mg/kg soil). The certain tetracycline resistant genes *tetC tetD tetA tetG tetL tetM* and *tetO* were detected in the soil samples collected from the microcosms to which swine manure was amended with tetracycline. However, these genes were detected in almost all soil samples supplemented with tetracycline at all time intervals of soil samplings while these genes were found only in some manured amended soil samples without prior supplementation with tetracycline. In addition to those genes, other genes namely; *tetB tetO tetS tetP* and *tetX* were also detected in the soil samples collected at different time intervals from soil microcosms fertilized with manure either tetracycline-free manure or tetracycline-amended manure. The outcome of this study strongly indicated that an increase in the number of tetracycline resistant genes was detected in the soil fertilized with manure supplemented with tetracycline. The concentrations of tetracycline also affected the diversity of tetracycline resistant genes. For soil fertilized with pig manure with tetracycline supplementation even once or several times, similar diversity of tetracycline resistant genes was observed from soils fertilized with tetracycline-supplemented pig-manure, both single and repeated supplementation.

The study of the shift in the microbial community structure in the agricultural soil fertilized with animal manure was performed using DGGE and the grouping of the outcome of microbial community structure in the soil samples was performed using UPGMA programme. Analysis of the dendrogram based on the major patterns of DNA fingerprints showed 3 major groups of bacteria. Outcomes also revealed that soil samples collected from the same sampling intervals gave almost identical microbial community structure regardless of the different concentration of tetracycline supplemented in the manure.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรรณิการ์ สัจจาพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก และ ดร. ศิริลักษณ์ จิตรอักษร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับ
คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้า วิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์
และขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนุชัย กองแก้ว ประธานการสอบ และผู้ช่วย
ศาสตราจารย์ ดร.นิลวรรณ พงศ์ศิลป์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้มี
ความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการ
อุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

ขอขอบคุณอาจารย์เพชรดา เจริญมิตร นางสาวเบญจมาศ รสโสภา นางสาวภูษณิศา หีบ
เงิน และสมาชิกห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน ภาควิชาปฐพีวิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือ และ
คำแนะนำในการทำการทดลอง และขอขอบพระคุณคณาจารย์และบุคลากรทุกท่านในภาควิชา
ปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พี่น้องชาวสโมสรบัณฑิตปฐพีวิทยา และมิตร
สหายทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนในด้านการเรียนและทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดาและมารดา ตลอดจนญาติพี่น้องของข้าพเจ้าที่คอยสนับสนุน
ช่วยเหลือในการศึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีแก่ข้าพเจ้าตลอดมา คุณค่าและความดีอันใดที่ได้รับจาก
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่บุพการี ญาติ ครู อาจารย์ และมิตรสหายที่มีพระคุณต่อข้าพเจ้า

พรพิมล บัวขาวเกาะ

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	47
อุปกรณ์	47
วิธีการ	48
ผลการทดลองและวิจารณ์	59
สรุปและข้อเสนอแนะ	81
สรุป	81
ข้อเสนอแนะ	82
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	83
ภาคผนวก	107
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	113

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างโครงสร้างของสารปฏิชีวนะที่จำแนกตามโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะ	7
2	กลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะและตัวอย่างแบคทีเรียที่ต้านทานสารปฏิชีวนะที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อสารปฏิชีวนะ	14
3	ตัวอย่างจำนวนแบคทีเรียในมูลสัตว์บางชนิด	28
4	ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียแกรมลบ	36
5	ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียแกรมบวก <i>Mycobacterium Mycoplasma Nocardia Streptomyces</i> และ <i>Ureaplasma</i>	39
6	ตำรับการทดลองในการทดลองที่ 1	51
7	ตำรับการทดลองในการทดลองที่ 2	52
8	primers ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 14 ยีน	55
9	ปริมาตรของสารผสมสำหรับ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	58
10	สมบัติทางเคมีของดินที่นำมาทดลอง	66
11	ชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินที่มีการใส่มูลสุกรและสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 0, 0.2, 20 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และที่ระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง 0, 5, 10, 15 และ 40 วัน	70
12	ชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินที่มีการใส่มูลสุกรและสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินซ้ำที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 20 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทุก 1 สัปดาห์ และเก็บตัวอย่างดินเมื่อครบ 6 สัปดาห์	73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยา	108
2	อินทรีย์วัตถุ	109
3	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	110
4	ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์	111
5	ปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์	112

สารบัญภาพ

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณการใช้สารปฏิชีวนะในประเทศต่างๆ ในปี 2002	3
2	ปริมาณการนำเข้าสารปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมสัตว์ในประเทศไทยในปี 2549	4
3	ปฏิกิริยาและกลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย	13
4	กระบวนการทรานสพอเมชันในเซลล์แบคทีเรีย	21
5	กระบวนการทรานสดักชันในเซลล์แบคทีเรีย	22
6	กระบวนการคอนจูเกชันของแบคทีเรียภายใต้การควบคุมของยีนที่อยู่ในมินิโครโมโซม (minichromosome) ที่เรียกว่า เอฟแฟกเตอร์ (F factor)	23
7	วัฏจักรการทำการเกษตรที่มีการใช้สารปฏิชีวนะ	25
8	วัฏจักรการทำการเกษตรที่มีการใช้สารปฏิชีวนะ	31
9	การป้องกันการการจับกันระหว่างกรดอะมิโนจาก tRNA กับตำแหน่งที่รับบนโครโมโซม	32
10	การปนเปื้อนของยาสู่งแวดล่อม	43
11	ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดินบน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	67
12	จำนวนผลผลิตพีซีอาร์ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน	68
13	จำนวนชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ตรวจพบในดินของแต่ละคำรับการทดลองที่มีการเติมมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างเพียงครั้งเดียว	72
14	จำนวนชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ตรวจพบในดินของแต่ละคำรับการทดลองที่มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินซ้ำๆ	74
15	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจุลินทรีย์ดินบนเจล acrylamide ที่ศึกษาด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)	77
16	ภาพการจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยใช้ Molecular Imager Gel Doc XR System	79

การแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและการเปลี่ยนแปลงสังคม จุลินทรีย์ในดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์

Distribution of Tetracycline Resistance Genes and Microbial Community Shift in Agricultural Soil Through Fertilization with Animal Manure

คำนำ

สารปฏิชีวนะเป็นสารประกอบที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและมีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย มีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งทางการแพทย์และเกษตรกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาโรคติดเชื้อในคนและสัตว์ ในบรรดาสารปฏิชีวนะทั้งหลายเตตราไซคลิน (tetracycline) เป็นสารที่มีการนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะในปริมาณมากในการเลี้ยงสัตว์โดยผสมในอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต ป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ ทั้งนี้ยาปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่สัตว์กินเข้าไปจะถูกดูดซึมในลำไส้ของสัตว์ส่วนหนึ่งและส่วนที่เหลือจะถูกขับถ่ายออกมาพร้อมกับมูลสัตว์ ซึ่งมูลสัตว์เหล่านี้มักถูกนำมาใช้เป็นปุ๋ยในการเกษตร ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะเตตราไซคลินดังกล่าว อาจจะทำให้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีการตกค้างในมูลสัตว์ และเมื่อนำมูลสัตว์ดังกล่าวมาใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ก็อาจจะส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในสิ่งแวดล้อมได้ ในการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ตกค้างในมูลสัตว์ แม้จะมีความเข้มข้นต่ำแต่หากจุลินทรีย์ได้รับอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานจะส่งผลให้จุลินทรีย์เกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน รวมทั้งเพิ่มการแพร่กระจายและความหลากหลายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในจุลินทรีย์ดิน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความกังวลเกี่ยวกับการใช้สารปฏิชีวนะในการเกษตรที่จะส่งผลกระทบต่อส่งเสริมการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในคนและสัตว์ได้

ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มสังคมจุลินทรีย์ดินอันเป็นผลเนื่องจากการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้าง เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในการใช้สารปฏิชีวนะและตระหนักถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและการสาธารณสุขจากการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ในการเกษตร

วัตถุประสงค์

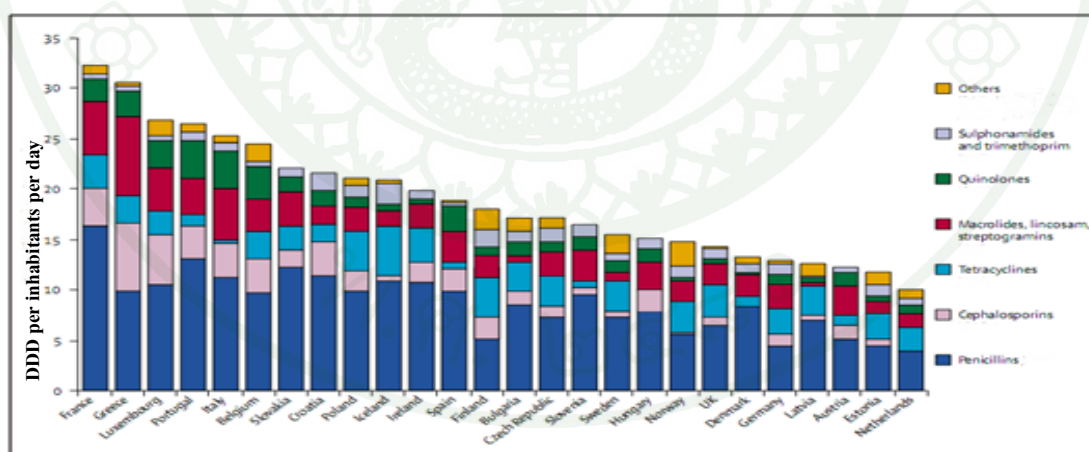
1. เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินจากผลของการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้าง
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มสังคมจุลินทรีย์ดินเนื่องจากผลของการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้าง



การตรวจเอกสาร

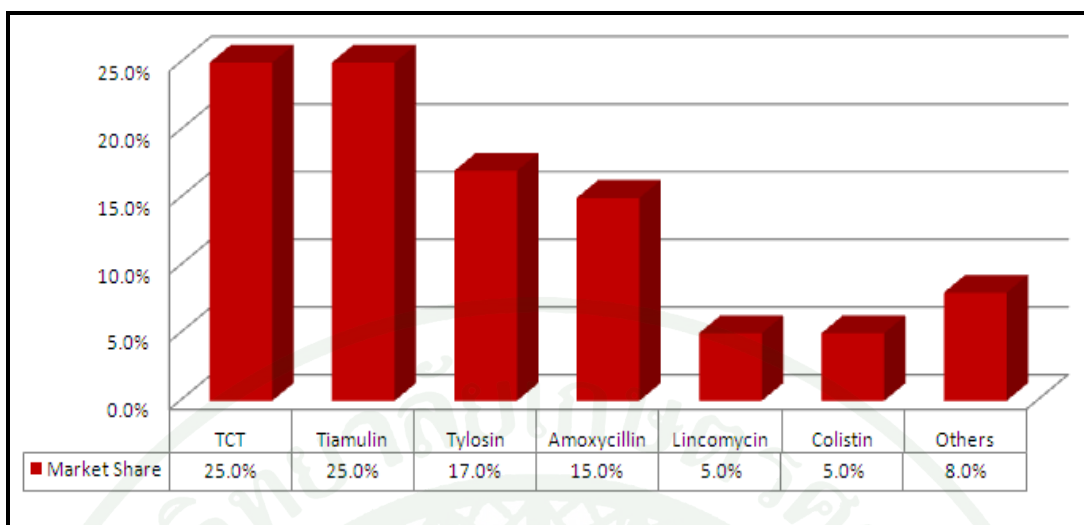
1. สารปฏิชีวนะ

คำว่าสารปฏิชีวนะนั้นเดิมใช้เพื่ออธิบายสารเคมีที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ใช้ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ แต่ในปัจจุบันความหมายของสารปฏิชีวนะจะรวมถึงสารปฏิชีวนะที่เกิดขึ้นจากธรรมชาติ สารปฏิชีวนะกึ่งสังเคราะห์ และสารปฏิชีวนะสังเคราะห์ (Priya and Shiladitya, 2007) ปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลายทั้งในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ และการเกษตรกรรม หลายประเทศมีการนำเข้าสารปฏิชีวนะเป็นจำนวนมาก โดยกลุ่มประเทศฝรั่งเศส กรีซ อุซเบกิสถาน และโปรตุเกส มีปริมาณการนำเข้ายาในกลุ่ม เพนนิซิลิน ไนโตรไลน และเตตราไซคลิน มากในลำดับต้นๆ ดังแสดงในภาพที่ 1 (Herman *et al.*, 2005) ประเทศไทยมีการนำเข้าสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และไทอะมูลิน มากที่สุด มีส่วนแบ่งการตลาด 25 เปอร์เซ็นต์ ของการนำเข้าสารปฏิชีวนะทั้งหมด คิดเป็นมูลค่ากว่า 300 ล้านบาท ดังแสดงในภาพที่ 2 เพื่อนำมาใช้ในในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ (สมาคมผู้ค้าเวชภัณฑ์สำหรับสัตว์, 2549) ในปัจจุบันมีการผลิตสารปฏิชีวนะมากมาย จึงมีการจำแนกสารปฏิชีวนะออกเป็นหลายกลุ่มตามหลักเกณฑ์ต่างๆ ดังนี้



ภาพที่ 1 ปริมาณการใช้สารปฏิชีวนะในประเทศต่างๆ ในปี 2002

ที่มา: Herman *et al.* (2005)



ภาพที่ 2 ปริมาณการนำเข้าสารปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมสัตว์ของประเทศไทย ในปี 2549

ที่มา: สมาคมผู้ค้าเวชภัณฑ์สำหรับสัตว์ (2549)

1.1 จำแนกตามโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะ (chemical structure) ได้แก่

1.1.1 กลุ่มเบตาแลกแตม (beta-lactams) เป็นกลุ่มที่มีสารแลกแตม (lactam) เป็นโครงสร้างวงแหวนแบบ heteroatomic ซึ่งประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 3 อะตอม และอะตอมไนโตรเจน 1 อะตอม ดังแสดงในตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีกหลายกลุ่ม แต่ที่มีใช้แพร่หลายในปัจจุบันมี 4 กลุ่ม คือ

(1) เพนนิซิลลิน (penicillins) เช่น เพนนิซิลลิน จี (penicillin G) แอมพิซิลลิน (ampicillin) เมทิซิลลิน (methicillin) คาร์เบนนิซิลลิน (carbenicillin) เป็นต้น

(2) เซฟาโลสปอริน (cephalosporins) เช่น เซฟาเลกซิน (cephalexin) เซฟาโซลิน (cephazolin) เซฟาโลทิน (cephalothin) เซโฟซิทิน (cefazolin) เซโฟแทกซิม (cefotaxime) เซฟไตรอะโซน (ceftriaxone) เป็นต้น

(3) โมโนแบคแตม (monobactams) เช่น แอซทรีโอนัม (aztreonam) เป็นต้น

(4) คาร์บาเพเนม (carbapenems) เช่น อิมิพีเนม (imipenem) เมอโรพีเนม (meropenem) เป็นต้น

1.1.2 กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) เป็นกลุ่มของสารปฏิชีวนะที่โครงสร้างส่วนหนึ่งของโมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลอะมิโนที่ถูกดัดแปลงซึ่งแสดงในตารางที่ 1 เป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพต่อแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) นีโอไมซิน (neomycin) เจนตามัยซิน (gentamicin) อะมิกาซิน (amikacin) เป็นต้น

1.1.3 กลุ่มเตตราไซคลิน (tetracyclines) โครงสร้างของสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ประกอบด้วยวงแหวนไฮโดรคาร์บอน 4 วง โดยความแตกต่างของสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดในกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับกลุ่มย่อยของโพลีคีไทด์ (polyketides) ที่ติดอยู่กับโครงสร้างของวงแหวนไฮโดรคาร์บอน ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น เตตราไซคลิน (tetracycline) ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ไมโนไซคลิน (minocycline) ดอกซีไซคลิน (doxycycline) เป็นต้น โดยตัวอย่างโครงสร้างของสารปฏิชีวนะที่จำแนกตามโครงสร้างตามเคมีในกลุ่มนี้ แสดงในตารางที่ 1

1.1.4 กลุ่มคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicols) สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยอะตอมคลอรีนและไฮดรอกซีอย่างละ 2 อะตอมจับกับ acetamide ที่ตำแหน่งที่ 2 และโครงสร้างดังกล่าวจะต่อกับ hydroxymethyl ที่ตำแหน่งที่ 1 โดยมี nitrophenyl จับอยู่ที่ตำแหน่งที่ 4 ของ hydroxymethyl ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 1 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ คลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) และไทแอมฟินิคอล (thiamphenicol)

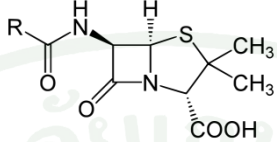
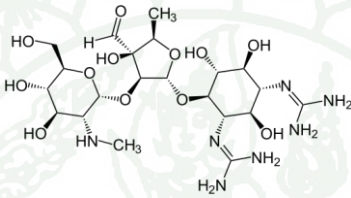
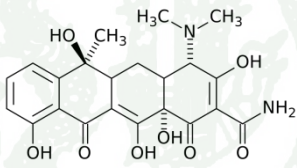
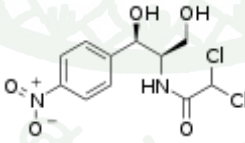
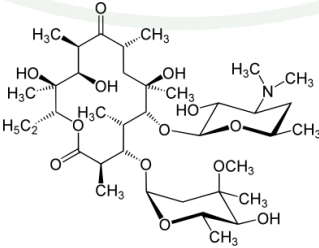
1.1.5 กลุ่มแมกโครไลด์ (macrolides) เป็นกลุ่มของสารปฏิชีวนะ โดยประกอบด้วยวงแหวนแลกโตน (lactone) ขนาดใหญ่ 1 วง หรือมากกว่านั้น และมีโครงสร้างของน้ำตาลคือออกซีซึ่งโดยทั่วไปจะเป็น cladinose และ desosamine จับอยู่กับวงแหวนแลกโตนที่ตำแหน่ง 14 15 หรือ 16 ซึ่งแสดงในตารางที่ 1 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น อิริโทรมัยซิน (erythromycin) สไปราไมซิน (spiramycin) ไมดีคามัยซิน (midecamycin) ร็อกซิโทรมัยซิน (roxithromycin) คลาริโทรมัยซิน (clarithromycin) เป็นต้น

1.1.6 กลุ่มควิโนโลน (quinolones) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ประกอบด้วยวงแหวนหลัก 2 วง โดยชนิดของสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะแตกต่างกันไปตามโครงสร้างของสารที่เข้ามาจับกับวง

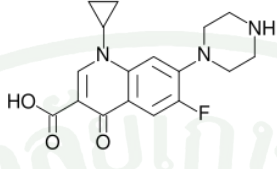
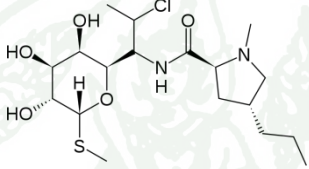
แหวนหลัก ยกตัวอย่างเช่น ฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolones) ซึ่งมีอะตอมฟลูออรีน (fluorine) เข้ามาจับกับวงแหวนหลักบริเวณอะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 หรือ 7 และตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin) ออฟลอกซาซิน (ofloxacin) ไซโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) เพ็ฟลอกซาซิน (pefloxacin) ฟลือรอกซาซิน (fleroxacin) เป็นต้น โดยตัวอย่างโครงสร้างของสารปฏิชีวนะที่จำแนกตามโครงสร้างตามเคมีในกลุ่มนี้ แสดงในตารางที่ 1

1.1.7 กลุ่มอื่นๆ (miscellaneous) เป็นสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างจากกลุ่มของสารปฏิชีวนะที่กล่าวมาในข้างต้น โดยตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น คลินดามัยซิน (clindamycin) ลินโคมัยซิน (lincomycin) วานโคมัยซิน (vancomycin) ไรแฟมพิซิน (rifampicin) กรดฟูซิดิก (fusidic acid) บาซิทรากซิน (bacitracin) โพลีมัยซิน บี (polymyxin B) โคลิสติน (colistin) เมโทรนิดาโซล (metronidazole) เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างโครงสร้างของสารปฏิชีวนะที่จำแนกตามโครงสร้างตามเคมีในกลุ่มนี้ แสดงในตารางที่ 1 (Kucers *et al.*, 1997)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างโครงสร้างของสารปฏิชีวนะที่จำแนกตามโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะ

กลุ่มของสารปฏิชีวนะ	ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะ	ตัวอย่างสารปฏิชีวนะ
beta-lactams	 (penicillin)	penicillin cephalosporin monobactam carbapenem
aminoglycosides	 (streptomycin)	streptomycin neomycin gentamicin amikacin
tetracyclines	 (tetracycline)	tetracycline oxytetracycline minocycline doxycycline
chloramphenicols	 (chloramphenicol)	chloramphenicol thiamphenicol
macrolides	 (erythromycin)	erythromycin spiramycin midecamycin roxithromycin clarithromycin

ตารางที่ 1 (ต่อ)

กลุ่มของสารปฏิชีวนะ	ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะ	ตัวอย่างสารปฏิชีวนะ
quinolones	 (ciprofloxacin)	nalidixic acid norfloxacin ofloxacin ciprofloxacin pefloxacin fleroxacin
miscellaneous	 (clindamycin)	clindamycin lincomycin vancomycin rifampicin polymyxin B colistin metronidazole

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kucers *et al.* (1997)

1.2 จำแนกตามผลของการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ (mode of action) ได้แก่

1.2.1 กลุ่มออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย (bactericidals) หมายถึง สารปฏิชีวนะกลุ่มที่มีผลทำลายแบคทีเรีย ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลกแตม อะมิโนไกลโคไซด์ และฟลูออโรควิโนโลน เป็นต้น

1.2.2 กลุ่มออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacteriostatics) เป็นสารปฏิชีวนะกลุ่มที่มีผลเพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเท่านั้น โดยทั่วไปสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จึงไม่เหมาะที่จะใช้รักษาโรคติดเชื้อที่รุนแรง หรือในคนไข้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือมีตำแหน่งของการติดเชื้ออยู่ในบริเวณที่กลไกการกำจัดเชื้อของร่างกายเองเข้าไปไม่ถึง เช่น ในสมอง หรือเยื่อหุ้มหัวใจที่มีการอักเสบ ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ สารปฏิชีวนะในกลุ่มไมโครไคลด์ เตตราไซคลิน และคลอแรมฟินิคอล เป็นต้น โดยสารปฏิชีวนะเหล่านี้ ในบางภาวะอาจมี

ผลทำลายแบคทีเรียได้ เช่น อิริโทรมัยซิน ถ้าใช้ในปริมาณที่สูงกว่าปกติ หรือคลอแรมฟินิคอล ซึ่งปกติมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตสำหรับแบคทีเรียทั่วไป แต่หากใช้ในปริมาณสูงก็จะมีผลในการทำลายแบคทีเรีย *Neisseria meningitidis* หรือ *Hemophilus influenza* เป็นต้น ในทางตรงข้ามสารปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มทำลายแบคทีเรีย ก็อาจมีผลเป็นเพียงยับยั้งการเจริญเติบโตสำหรับแบคทีเรียบางชนิดได้เช่นกัน

1.3 จำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ (mechanism of action) ได้แก่

1.3.1 กลุ่มออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (inhibition of cell wall synthesis) สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ได้แก่ สารปฏิชีวนะในกลุ่ม เบตาแลกแตม ฟอสโฟมัยซิน วานโคมัยซิน และ บาซิทรากิน เป็นต้น สารปฏิชีวนะเหล่านี้ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียในขั้นตอนที่แตกต่างกัน แต่มีผลที่เหมือนกันคือ ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถทนทานต่อความกดดันภายในเซลล์ที่สูงกว่าความกดดันของสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์มาก และทำให้เซลล์แตกในที่สุด สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์โดยกลไกนี้มีผลทำลายแบคทีเรียและออกฤทธิ์ได้เฉพาะต่อแบคทีเรียที่กำลังมีการเจริญเติบโตแบ่งตัวหรือการสร้างผนังเซลล์อยู่เท่านั้น

1.3.2 กลุ่มออกฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (inhibition of cell membrane function) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ โพลีมัยซิน บี และโคลิสติน เป็นต้น สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย มีผลในการทำลายกลไกการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้มีการสูญเสียโมเลกุลขนาดใหญ่และไอออนต่างๆ ที่สำคัญของเซลล์ออกสู่ภายนอก และแบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ได้ทุกขณะไม่ว่าแบคทีเรียจะกำลังมีการเจริญเติบโตหรือแบ่งตัวอยู่หรือไม่ก็ตาม

1.3.3 กลุ่มออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (inhibition of protein synthesis) สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ สารปฏิชีวนะในกลุ่มแมโครไลด์ เตตราไซคลิน คลอแรมฟินิคอล และอะมิโนไกลโคไซด์ เป็นต้น สารปฏิชีวนะเหล่านี้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียในขั้นตอนที่แตกต่างกันไป เช่น อิริโทรมัยซิน ยับยั้งในขั้นตอนการสังเคราะห์ initiation complex และทรานสโลเคชัน (translocation) หรือเตตราไซคลินยับยั้งในขั้นตอนการสังเคราะห์ aminoacyl-tRNA โดยจะเข้าไปจับกับบริเวณรับ (acceptor site) ของไรโบโซม (ribosome) และคลอแรมฟินิคอลยับยั้งในขั้นตอน transpeptidation เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่

ออกฤทธิ์โดยกลไกนี้โดยทั่วไปให้ผลเพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเท่านั้น ยกเว้นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่ให้ผลในการทำลายแบคทีเรียเนื่องจากสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์อย่างอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องอยู่ด้วย

1.3.4 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (inhibition of nucleic acid synthesis) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ ไรแฟมพิซิน (rifampicin) ฟลูออโรควิโนโลน ควิโนโลน ซึ่งยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) หรือดีเอ็นเอ (DNA) ของแบคทีเรีย เนื่องจากกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) นั้นจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ดังนั้นสารปฏิชีวนะเหล่านี้จึงมักจะให้ผลทำลายแบคทีเรีย โดยขัดขวางกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย เช่น สารปฏิชีวนะในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides) และไตรเมโทพริม (trimethoprim) ซึ่งขัดขวางการสังเคราะห์กรดโฟลิกของแบคทีเรีย เป็นต้น สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้โดยทั่วไปให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่อาจให้ผลทำลายแบคทีเรียได้ในบางสภาวะ เช่น การใช้สารปฏิชีวนะกลุ่มซัลโฟนาไมด์ร่วมกับไตรเมโทพริม เป็นต้น

1.4 จำแนกตามขอบเขตการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ (spectrum of action) ได้แก่

1.4.1 กลุ่มออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ยังออกฤทธิ์ต่อโปรโตซัว และริกเกตเซีย ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น แอมพิซิลิน เตตราไซคลิน คลอแรมฟินิคอล และเมโทนิดาโซล (methronidazole)

1.4.2 กลุ่มออกฤทธิ์ปานกลาง (medium spectrum) เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรีย แกรมบวกและแกรมลบบางชนิดเท่านั้น ได้แก่ ซัลโฟนาไมด์

1.4.3 กลุ่มออกฤทธิ์แคบ (narrow spectrum) เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียบางชนิด มีฤทธิ์จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ คลอกซาซิลลิน (cloxacillin) หรือมีฤทธิ์จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ อะมิโนไกลโคไซด์ (Kucers *et al.*, 1997)

2. การต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย

การต้านทานของแบคทีเรียเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutation) ของแบคทีเรีย โดยการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดขึ้นที่ส่วนของสารพันธุกรรมหลักของแบคทีเรียที่เรียกว่าโครโมโซม (chromosome) ส่วนของโครโมโซมมีขนาดใหญ่ประกอบด้วยยีนที่จะแสดงลักษณะต่างๆ ออกมามากมาย รวมทั้งการต้านทานสารปฏิชีวนะ การพบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะที่บริเวณนี้ไม่มากเท่ากับที่พบในส่วนของยีนนอกเหนือจากโครโมโซมซึ่งเรียกว่า พลาสมิด (plasmid) และทรานสโปซอน (transposon) ซึ่งอาจอยู่บนโครโมโซมหรือพลาสมิด และมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซมมาก ยีนที่ควบคุมการต้านทานสารปฏิชีวนะที่อยู่บน พลาสมิด และทรานสโปซอนของแบคทีเรียชนิดหนึ่ง สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ง่าย ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะได้อย่างรวดเร็ว จากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1980 พบว่า 97 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* ที่คัดแยกได้จากมูลสุกรมีการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดจากทั้งหมด 7 ชนิด (Hanzawa *et al.*, 1984) และจากการศึกษาของ Cotta *et al.* (2003) พบว่าแบคทีเรียที่สามารถคัดเลือกได้จากมูลสุกรส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต ประกอบด้วยแบคทีเรียในกลุ่มคลอสตริเดียม (clostridial) ยูแบคทีเรีย (eubacterial) แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) และสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*)

3. การเกิดการต้านทานสารปฏิชีวนะ

ยีนที่สามารถแปลรหัสโปรตีน หรือไรโบโซมอาร์เอ็นเอ ซึ่งสามารถทำให้แบคทีเรียสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เกิดขึ้นได้ 2 แนวทาง คือ

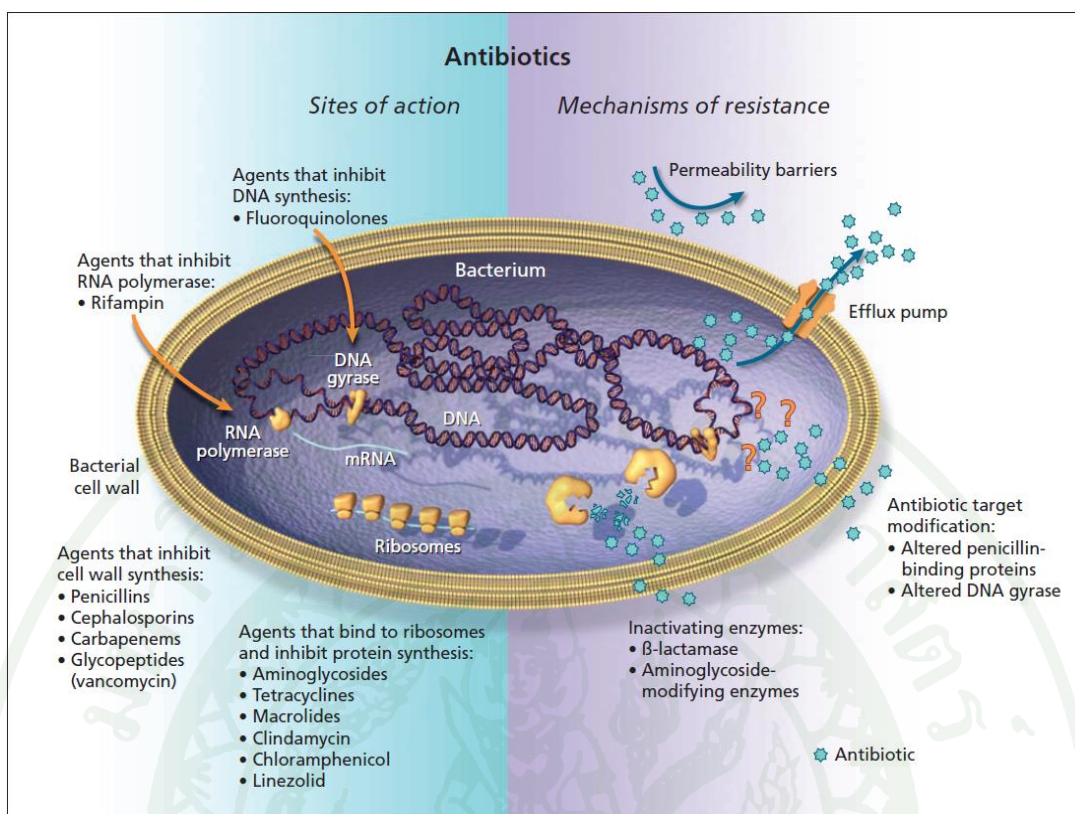
3.1 การต้านทานสารปฏิชีวนะที่เกิดจากการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) แบคทีเรียจะมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะอยู่ในตัวตามธรรมชาติ แต่มีในจำนวนน้อยไม่ว่าจะได้รับสารปฏิชีวนะหรือไม่ แต่เมื่อแบคทีเรียดังกล่าวมีการสัมผัสกับสารปฏิชีวนะในปริมาณมากและในระยะเวลาที่นานขึ้น สารปฏิชีวนะจะทำลายยีนส่วนที่ไวต่อสารปฏิชีวนะให้หมดไปเหลือเพียงยีนส่วนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไว้ จึงทำให้แบคทีเรียมีการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะอย่างสมบูรณ์

3.2 การต้านทานสารปฏิชีวนะที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโดยการใช้สารปฏิชีวนะ แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความไวต่อสารปฏิชีวนะ เมื่อใดที่แบคทีเรียมีโอกาสสัมผัสกับสารปฏิชีวนะ

ในปริมาณและระยะเวลาที่ไม่เหมาะสมพอที่จะทำลายแบคทีเรียได้ แบคทีเรียดังกล่าวก็จะพัฒนาและเปลี่ยนแปลงยีนให้สามารถต้านทานต่อการทำลายของสารปฏิชีวนะได้

4. กลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย

กลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะในแบคทีเรียทำงานโดยการเกิดปฏิกิริยาบริเวณเป้าหมายของแบคทีเรียที่มีความจำเพาะ เช่น การสร้างผนังเซลล์ที่สามารถยับยั้งการผ่านเข้ามาของสารปฏิชีวนะ การสังเคราะห์โปรตีน หรือการจำลองกรดนิวคลีอิก โดยปฏิกิริยาเหล่านี้จะสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสามารถป้องกันไม่ให้สารปฏิชีวนะเข้าไปจับกับบริเวณเป้าหมายของแบคทีเรีย (ภาพที่ 3) ส่งผลให้แบคทีเรียเกิดการต้านทานสารปฏิชีวนะ การต้านทานสารปฏิชีวนะนั้นไม่ว่าจะเกิดขึ้นโดยธรรมชาติหรือการได้รับยีนต้านทานมา ก็จะมีผลจำเพาะต่อกลไกการต้านทานทางชีวเคมีดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2



ภาพที่ 3 ปฏิกริยาและกลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย

ที่มา: Neu (1992)

ตารางที่ 2 กลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะและตัวอย่างแบคทีเรียที่ต้านทานสารปฏิชีวนะที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อสารปฏิชีวนะ

Mechanism	Resistant organism	Antibiotic affected by bacterial resistance
Antimicrobial inactivation		
β -lactamase	• <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Haemophilus influenza</i> • Enterobacteriaceae	• Penicillins • Cephalosporins
Aminoglycoside inactivating enzymes	• Enterobacteriaceae	• Gentamicin • Tobramycin
Altered target site		
Altered penicillin binding proteins	• <i>Streptococcus pneumoniae</i> • Methicillin-resistant • <i>S. aureus</i>	• Penicillin • Methicillin • Cloxacillin
Altered DNA gyrase or topoisomerase	• <i>S. pneumoniae</i> • Enterobacteriaceae • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	• Ciprofloxacin • Levofloxacin • Moxifloxacin
Decreased access to the target site		
Change in outer membrane proteins or porins	• Enterobacteriaceae • <i>P. aeruginosa</i>	• Gentamicin • Tobramycin
Efflux pump	• <i>S. aureus</i> • streptococci	• Tetracycline • Clindamycin • Erythromycin

หมายเหตุ รวมถึงแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. และ *Salmonella* spp.

ที่มา: Mulvey and Simor (2009)

5. ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ

จากการศึกษาและทดสอบพบว่า แบคทีเรียที่เคยไวต่อสารปฏิชีวนะแล้วเกิดการต้านทานในภายหลังนั้นเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ทำให้มียีนส่วนที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะขึ้น โดยยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเหล่านี้อาจปรากฏบนโครโมโซม หรือพลาสมิด (plasmid) ซึ่งยีนบนพลาสมิดนี้พบได้ในจุลินทรีย์บางชนิด และไม่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตปกติของจุลินทรีย์ แต่อาจทำให้จุลินทรีย์แสดงคุณสมบัติพิเศษแตกต่างจากชนิดที่ไม่มีได้ เช่น คุณสมบัติการต้านทานสารปฏิชีวนะ หรือการสร้างสารพิษ เป็นต้น

สำหรับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะโดยเฉพาะของแบคทีเรีย อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นยีนส่วนที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะ หรือเกิดจากแบคทีเรียได้รับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ (transfer of genetic information) จากแบคทีเรียที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะอยู่ก่อนแล้ว ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะที่ได้รับการถ่ายทอดมานี้อาจอยู่ในรูปของดีเอ็นเอเปลือย (naked DNA) ฟาจ (phage) หรือ พลาสมิด แต่เนื่องจากปัจจุบันได้พบพวก transposable element ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งอื่นในส่วนต่างๆ ของดีเอ็นเอได้

5.1 ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในรูปต่างๆ

5.1.1 ดีเอ็นเอเปลือย (naked DNA)

ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในรูปของดีเอ็นเอเปลือยนี้คือ ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในลักษณะที่เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของโครโมโซมหรือพลาสมิดที่อยู่อิสระนอกเซลล์แบคทีเรีย ก่อนถูกถ่ายทอดเข้าเซลล์ตัวรับ (recipient) เมื่อดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าไปในแบคทีเรียจะสามารถสอดแทรกรวมตัวเข้าไปในดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้ แต่การจะเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว การเรียงตัวของเบสในดีเอ็นเอจะต้องมีความคล้ายคลึงกันกับของ insertion sequence เพื่อให้ดีเอ็นเอใหม่จะสามารถเข้าไปแทนที่ และแลกเปลี่ยนกับดีเอ็นเอเดิมของแบคทีเรียได้

5.1.2 ฟาจ (phage)

ยีนด้านทานสารปฏิชีวนะในรูปของดีเอ็นเอในฟาจ คือยีนด้านทานสารปฏิชีวนะในลักษณะที่เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของโครโมโซม พลาสมิด หรือพลาสมิดขนาดเล็ก ก่อนถูกถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์ตัวรับ ซึ่งจะถูกห่อหุ้มอยู่ภายในตัวไวรัสของแบคทีเรีย เรียกว่า แบคเทริโอฟาจ (bacteriophage) หรือฟาจไวรัสดังกล่าวจะมี 2 ชนิดคือไวรัสเลนฟาจ (virulent phage) และเทมเพอเรตฟาจ (temperate phage) ไวรัสชนิดหลังจะเป็นชนิดสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดยีน ทั้งนี้เพราะยีนของเทมเพอเรตฟาจหรือยีนของแบคทีเรียที่บังเอิญถูกห่อหุ้มอยู่ภายในไวรัสชนิดนี้ จะสามารถสอดแทรกเข้าไปในดีเอ็นเอของแบคทีเรีย และเรียกชื่อใหม่ว่า โปรฟาจ (prophage) ซึ่งทำหน้าที่เสมือนเป็นยีนของแบคทีเรียนั้นได้ กล่าวคือสามารถแบ่งตัวไปพร้อมกับยีนเดิมของแบคทีเรียที่ฟาจเข้าไปสอดแทรก โดยไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อแบคทีเรียนั้น อย่างไรก็ตามเมื่อมีสิ่งเร้ามากระตุ้น เช่น แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) โปรฟาจก็จะแยกตัวออกจากดีเอ็นเอของแบคทีเรีย และเริ่มต้นสร้างส่วนประกอบของไวรัส คือ ดีเอ็นเอ และโปรตีนต่างๆ ของไวรัส โดยยับยั้งส่วนประกอบต่างๆ ของแบคทีเรีย ภายหลังจากนั้นดีเอ็นเอและโปรตีนเหล่านี้จะประกอบเป็นตัวไวรัสในลักษณะของโปรตีนหุ้มดีเอ็นเอ เมื่อไวรัสเพิ่มจำนวนจนถึงขนาดหนึ่ง ก็จะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกได้เช่นเดียวกับไวรัสชนิดไวรัสเลนฟาจ และไวรัสสมบูรณ์ที่ถูกปล่อยออกมาจะสามารถเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียใหม่ต่อไป

5.1.3 พลาสมิด (plasmid)

ยีนด้านทานสารปฏิชีวนะที่อยู่บนพลาสมิด ซึ่งมักพบอยู่อย่างอิสระ และแบ่งตัวภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) แต่ก็มีชนิดที่เข้าไปอยู่เป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซมและแบ่งตัวไปพร้อมกับโครโมโซม ในเซลล์หนึ่งๆ อาจมีเพียง 1 พลาสมิดหรือหลายพลาสมิด การถ่ายทอดยีนด้านทานสารปฏิชีวนะในรูปของพลาสมิดจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่ง อาจจะอยู่ในรูปของดีเอ็นเอเปลือย ฟาจ หรือถูกขนถ่ายในลักษณะที่เป็นพลาสมิดทั้งหมด กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดยีนด้านทานสารปฏิชีวนะแบบหลังนี้ เรียกว่า คอนจูเกชัน (conjugation) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพลาสมิด ซึ่งพลาสมิดแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ คอนจูเกทีฟพลาสมิด (conjugative plasmid) หรือทรานสเฟอร์าเบิลพลาสมิด (transferable plasmid) และนอนคอนจูเกทีฟพลาสมิด (nonconjugative plasmid) พลาสมิดชนิดแรกจะถูกขนถ่ายด้วยกระบวนการคอนจูเกชันอย่างเด่นชัด เพราะมีชิ้นส่วนที่สามารถสร้างเซ็กส์ไพล (sex pili) ที่ใช้เพื่อการคอนจูเกชัน ขณะที่พลาสมิดชนิดหลังจะไม่มีชิ้นส่วนนี้ แต่อาจจะถูกขนถ่ายด้วยกระบวนการ

ลักษณะนี้ได้ด้วยกลไกอื่นที่ไม่ใช่เซ็กส์พิล พลาสมิดที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะ เรียกว่า resistance plasmid (R-plasmid หรือ R-factor)

5.1.4 ดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งอื่นในจีโนมได้ (transposable element)

ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในรูปของดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งอื่นในจีโนม (genome) หรือที่เรียกว่า ทรานสโปซอน (transposon) คือ ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในลักษณะที่เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ซึ่งอาจถูกขนถ่ายมาจากเชื้ออื่นในรูปแบบต่างๆ ดังที่กล่าวในข้างต้น แต่จะมีโครงสร้างและลักษณะอื่นๆ ต่างออกไป โดยทั่วไปการสอดแทรกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเดิมเข้าไปในดีเอ็นเอใหม่ได้นั้น ดีเอ็นเอของดีเอ็นเอเดิมและดีเอ็นเอใหม่จำเป็นต้องมีความคล้ายคลึงกัน ทั้งนี้เพราะการแลกเปลี่ยนดังกล่าวถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ GTPase จากยีน เรคเอ (rac A) ของแบคทีเรียที่ได้รับชิ้น ซึ่งจะกำหนดการแลกเปลี่ยนและแทนที่เมื่อมีการเรียงตัวของเบสในดีเอ็นเอที่เข้ามาใหม่ และดีเอ็นเอเดิมใกล้เคียงกัน แต่สำหรับทรานสโปซอนเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ได้เองอย่างอิสระ และสามารถสอดแทรกเข้าไปในบริเวณต่างๆ ของดีเอ็นเอได้ แม้บริเวณนั้นไม่มีการเรียงตัวของ ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน ทั้งนี้เพราะทรานสโปซอน มียีนที่สร้างเอนไซม์ ทรานสโปเซส (transposase) ซึ่งช่วยในการเข้าสอดแทรก เอนไซม์ดังกล่าวสามารถช่วยในการตัดและเชื่อมดีเอ็นเอที่เป็นเป้าหมายกับชิ้นส่วนของทรานสโปซอน อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์นี้จะคัดเลือกและตัดบริเวณที่เหมาะสม การสอดแทรกของทรานสโปซอนจำเป็นต้องมีบริเวณจดจำ (recognition site) โดยพบว่า คือเบสที่ส่วนปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และเมื่อดูการจัดเรียงตัวของเบสเหล่านี้จะเห็นว่ามีความเหมือนกันในสายดีเอ็นเอทั้งคู่ที่อยู่กลับข้างกัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติของทรานสโปซอนอีกอย่างหนึ่งที่ต่างจากดีเอ็นเอทั่วไป

กรณีทรานสโปซอนเป็นยีนบนพลาสมิด เมื่อเคลื่อนที่เข้าไปใกล้โครโมโซม ยีนดังกล่าวสามารถแทรกเข้าไป และทำให้ยีนอื่นบนพลาสมิดรวมกันเป็นหน่วยเดียวกับโครโมโซมได้ จะเห็นว่ายีนต้านทานสารปฏิชีวนะไม่ว่าจะเป็นรูปแบบใด สุดท้ายจะเป็นยีนที่ปรากฏอยู่บนโครโมโซม หรือบน พลาสมิดเท่านั้น เมื่อแบคทีเรียมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะจะทำให้แบคทีเรียนั้นมีคุณสมบัติพิเศษต่างจากแบคทีเรียเดิมที่ไวต่อสารปฏิชีวนะ จึงทำให้ด้านฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่เคยใช้อย่างได้ผล

5.1.5 การต้านทานที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย

(1) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเอง

แบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะจากการกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) คือการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในยีนบนดีเอ็นเอ ไม่จำเป็นต้องมีสารปฏิชีวนะมาเหนี่ยวนำ การเปลี่ยนแปลงนี้สามารถเกิดขึ้นได้แม้ว่าแบคทีเรียไม่เคยสัมผัสสารปฏิชีวนะมาก่อน แต่สารปฏิชีวนะจะเข้ามามีบทบาทในการเป็นตัวคัดเลือกให้แบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะแสดงตัวเด่นชัดขึ้น แบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะที่เกิดจากการกลายพันธุ์มีความถี่การเกิดขึ้น 1 เซลล์แบคทีเรียต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียประมาณ 10^7 - 10^9 เซลล์ ดังนั้นการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกันด้วยวิธีการกลายพันธุ์จึงเกิดขึ้นค่อนข้างยาก เช่น ถ้าแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะ 2 ชนิดพร้อมกัน จำเป็นต้องมีประชากรแบคทีเรียทั้งหมด 10^{14} - 10^{18} เซลล์ จึงจะมีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 2 ชนิดพร้อมกันเพียง 1 เซลล์เท่านั้น แบคทีเรียที่กลายพันธุ์ไปจากแบคทีเรียดั้งเดิมเรียกว่า mutant

(2) การดื้อยาที่เกิดจากการขนถ่ายยีน

แบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะซึ่งเกิดจากการได้รับยีนหรือดีเอ็นเอต้านทานสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียอื่น อาจด้วยกระบวนการทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) ทรานสดักชัน (transduction) หรือคอนจูเกชัน (conjugation) กระบวนการทั้งหมดนี้ส่วนใหญ่จะพบในแบคทีเรีย

(2.1) ทรานสฟอร์มเมชัน (transformation)

เป็นกระบวนการถ่ายถอดยีนที่ไม่มีอะไรห่อหุ้ม จากแบคทีเรียตัวให้ไปยังแบคทีเรียตัวรับ (ภาพที่ 4) ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในรูปของดีเอ็นเอเปลือย จึงเป็นชนิดที่ถูกถ่ายถอดด้วยกระบวนการนี้ ซึ่งดีเอ็นเอที่ถูกถ่ายโอนโดยไม่มีสารมาเหนี่ยวนำ ดังนั้นดีเอ็นเอเปลือยดังกล่าวจะต้องเป็นดีเอ็นเอเปลือยที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่สูงมาก โดยทั่วไปประมาณ 3×10^5 - 3×10^7 ดาลตัน (dalton) ดังนั้นจะมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะเพียง 1-2 ชนิดเท่านั้นที่สามารถถูกถ่ายโอนได้ในครั้งเดียว โดยแบคทีเรียที่ได้รับยีนโดยกระบวนการนี้จะเรียกว่า transformant

ในกระบวนการทรานสฟอร์มเมชัน แบคทีเรียที่สามารถรับยีนเข้ามาได้จะต้องอยู่ในภาวะที่พร้อมจะยอมรับดีเอ็นเอใหม่ (competent cell) เช่น เป็นแบคทีเรียในระยะที่มีการสังเคราะห์ผนังเซลล์ กระบวนการทรานสฟอร์มเมชันเกิดขึ้นได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เพียงแต่แบคทีเรียตัวให้และแบคทีเรียตัวรับจะต้องมียีนที่คล้ายคลึงกัน โดยควรอยู่ในสกุลเดียวกัน (genus) หรือใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เนื่องจากดีเอ็นเอที่รับเข้ามาใหม่จะเกิดการรวมตัวกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวรับได้นั้น บริเวณที่สอดแทรกจะต้องมีการเรียงตัวของเบสใกล้เคียงกัน เว้นแต่ยีนนั้นเป็นทรานสโปซอน สำหรับการต้านทานสารปฏิชีวนะที่เกิดจากกระบวนการทรานสฟอร์มเมชันส่วนใหญ่จะพบในแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Streptococcus*

(2.2) ทรานสดักชัน (transduction)

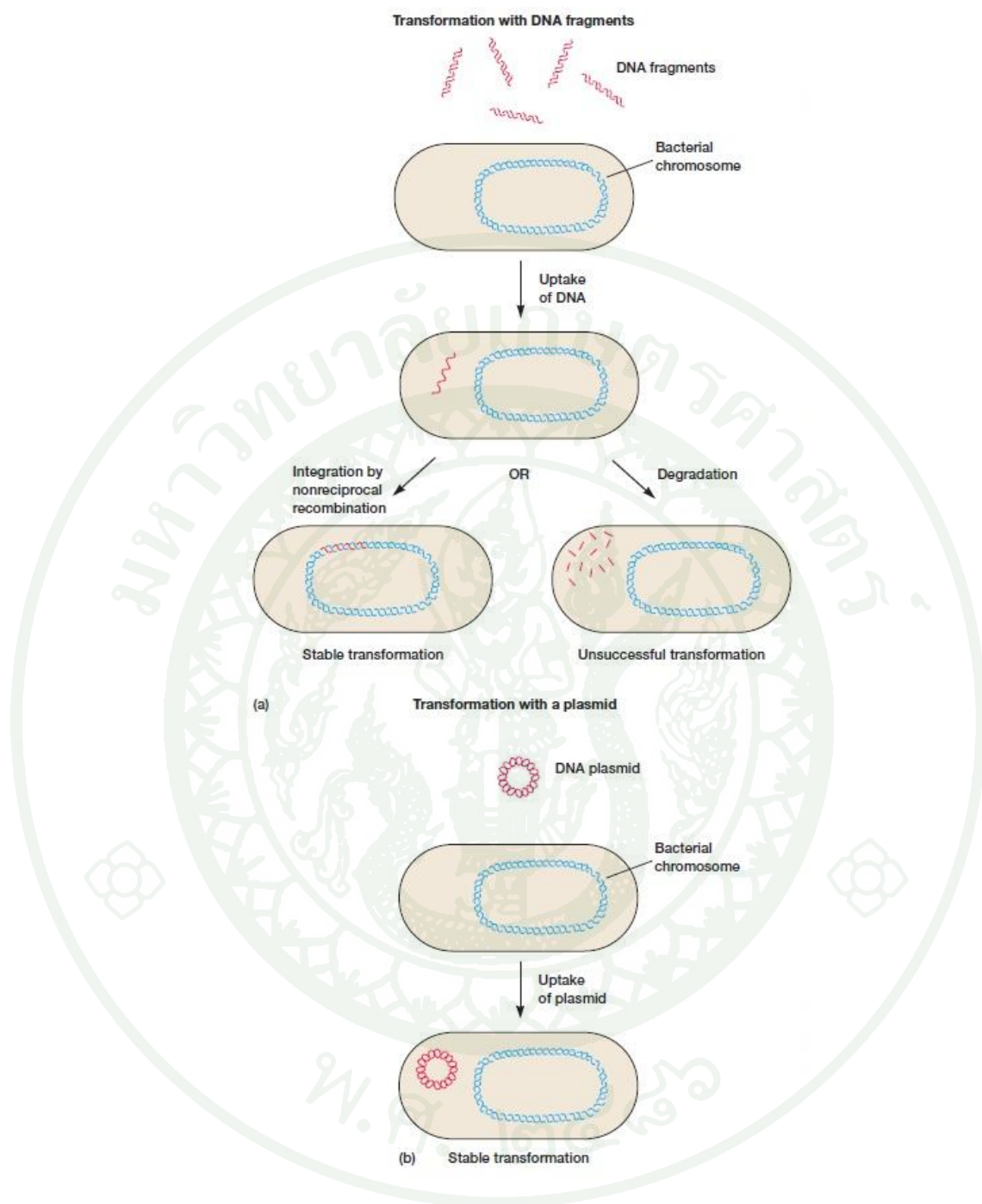
เป็นกระบวนการถ่ายโอนยีนโดยอาศัยไวรัสเป็นตัวนำพาจากแบคทีเรียตัวให้ไปยังแบคทีเรียตัวรับ ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในรูปของดีเอ็นเอในฟาจจะถูกถ่ายทอดโดยวิธีนี้ (ภาพที่ 5) ดีเอ็นเอที่ถูกถ่ายทอดมีขนาดไม่ใหญ่มากและมักจะมีขนาดคงที่เนื่องจากต้องจำกัดอยู่ภายในของเปลือกหุ้มไวรัส โดยทั่วไปจะมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะเพียง 1-2 ชนิดเท่านั้นที่จะถูกถ่ายทอดได้ในครั้งเดียวกัน แบคทีเรียที่ได้รับยีนโดยกระบวนการนี้จะเรียกว่า transductant สำหรับกระบวนการทรานสดักชัน พบเกิดขึ้นทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและ แกรมลบ แต่จะต้องเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไวรัสสามารถเข้าไปอาศัยและเจริญอยู่ได้ ซึ่งมักจะเป็นแบคทีเรียในสกุลเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม กระบวนการนี้มีความสำคัญในการแพร่กระจายการต้านทานสารปฏิชีวนะในแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เช่น การต้านทานสารปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus*

(2.3) คอนจูเกชัน (conjugation)

เป็นกระบวนการถ่ายโอนยีนจากแบคทีเรียตัวให้ไปยังแบคทีเรียตัวรับโดยผ่าน pili ซึ่งเป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์แบคทีเรีย (ภาพที่ 6) ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในรูปของพลาสมิด หรืออาร์พลาสมิด (R-plasmid) ชนิดคอนจูเกทีฟพลาสมิดจึงเป็นชนิดที่ถูกถ่ายทอดด้วยกระบวนการนี้ ดังที่กล่าวในข้างต้นว่าคอนจูเกทีฟอาร์พลาสมิด (conjugative R-plasmid) นอกจากจะมียีน resistance determinant ที่ควบคุมการส่งยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ และยีนที่ควบคุมการแสดงออกของคุณสมบัติอื่นๆ แล้วยังมีปัจจัยที่ควบคุมการส่งยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ (resistance transfer factor หรือ RTF) เรียกว่า tra gene ซึ่งยีนประเภทดังกล่าวสามารถกำหนดให้

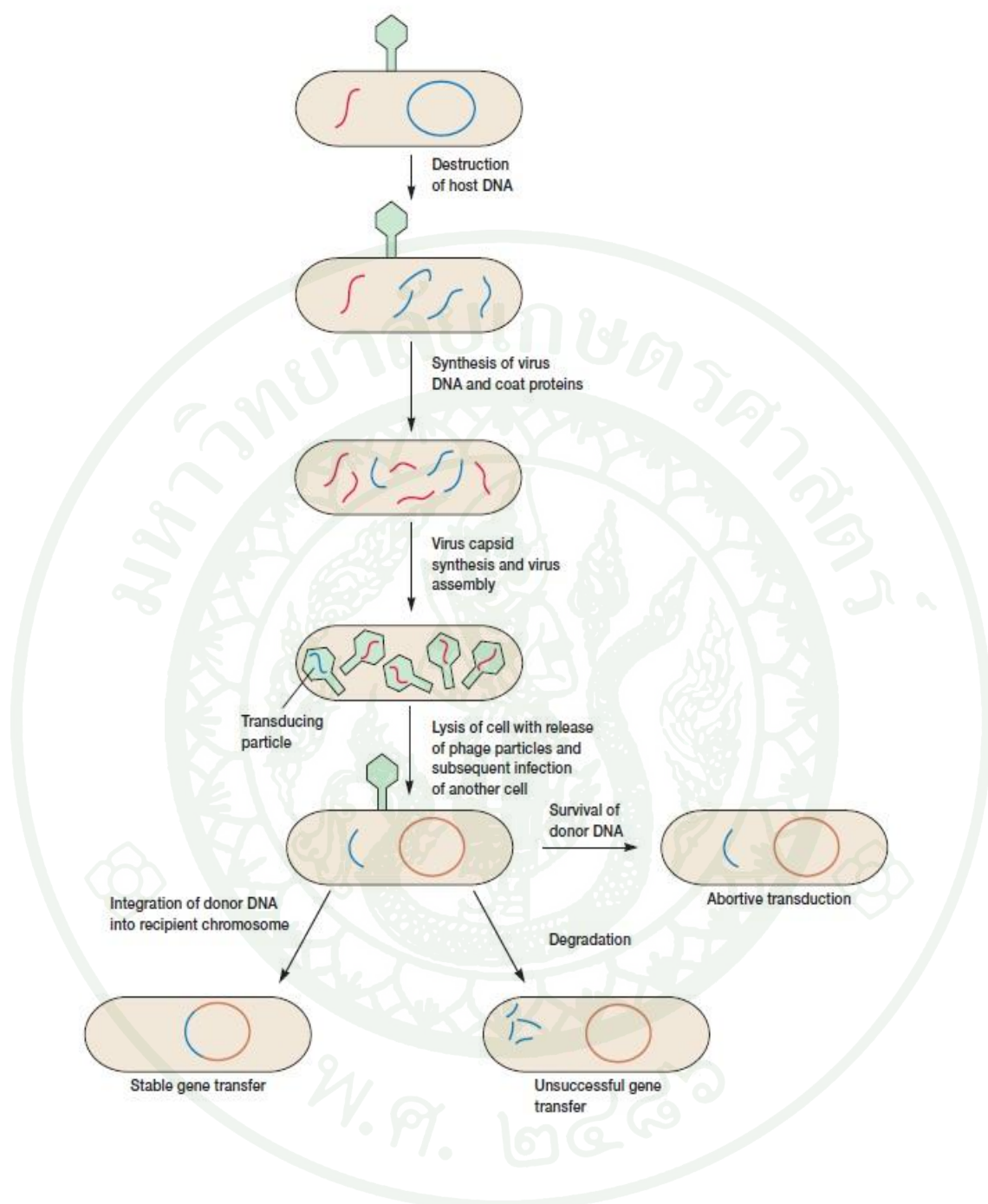
เซลล์แบคทีเรียสร้างพิไลเพื่อให้พลาสมิดผ่านไปยังเซลล์ของแบคทีเรียอีกตัวหนึ่ง การถ่ายทอดยีน ด้านทานสารปฏิชีวนะด้วยกระบวนการนี้ทั้งแบคทีเรียตัวให้และแบคทีเรียตัวรับจะต้องมีคุณสมบัติ ในการต้านทานสารปฏิชีวนะ ซึ่งแตกต่างจากกระบวนการทรานสเฟอร์เมชัน และทรานสดักชัน โดยสองกระบวนการหลังเซลล์แบคทีเรียผู้ให้จะต้องแตกก่อนจึงจะมีการปล่อยยีนออกมา แบคทีเรีย ตัวรับยีนด้วยกระบวนการคอนจูเกชัน เรียกว่า conjugant

R-plasmid มีขนาดตั้งแต่เล็กถึงใหญ่ ประมาณ 4×10^7 ถึง 2×10^8 ดาลตัน จึงอาจมีขึ้นควบคุมการดื้อยาตั้งแต่ 1 ชนิดถึงมากกว่า 10 ชนิด และยีนเหล่านี้ก็สามารถถูกขนถ่ายไปยังตัวรับในเวลาเดียวกัน ด้วยเหตุนี้กระบวนการคอนจูเกชันจึงมีความสำคัญในการถ่ายทอดยีนด้านทานสารปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน แบคทีเรียที่มีอาร์พลาสมิดอยู่แล้วอาจมียีนด้านทานสารปฏิชีวนะปรากฏอยู่บนโครโมโซมได้เช่นกัน สำหรับทรานสเฟอราเบิลอาร์พลาสมิด (transferable R-plasmid) ส่วนใหญ่จะพบในแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) แต่ก็สามารถพบได้ในแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างกลม (cocci shape) เช่น *Neisseria gonorrhoeae* หรือในแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Streptococcus* และ *Clostridium perfringens* (อ้างตาม มาลิน, 2540)



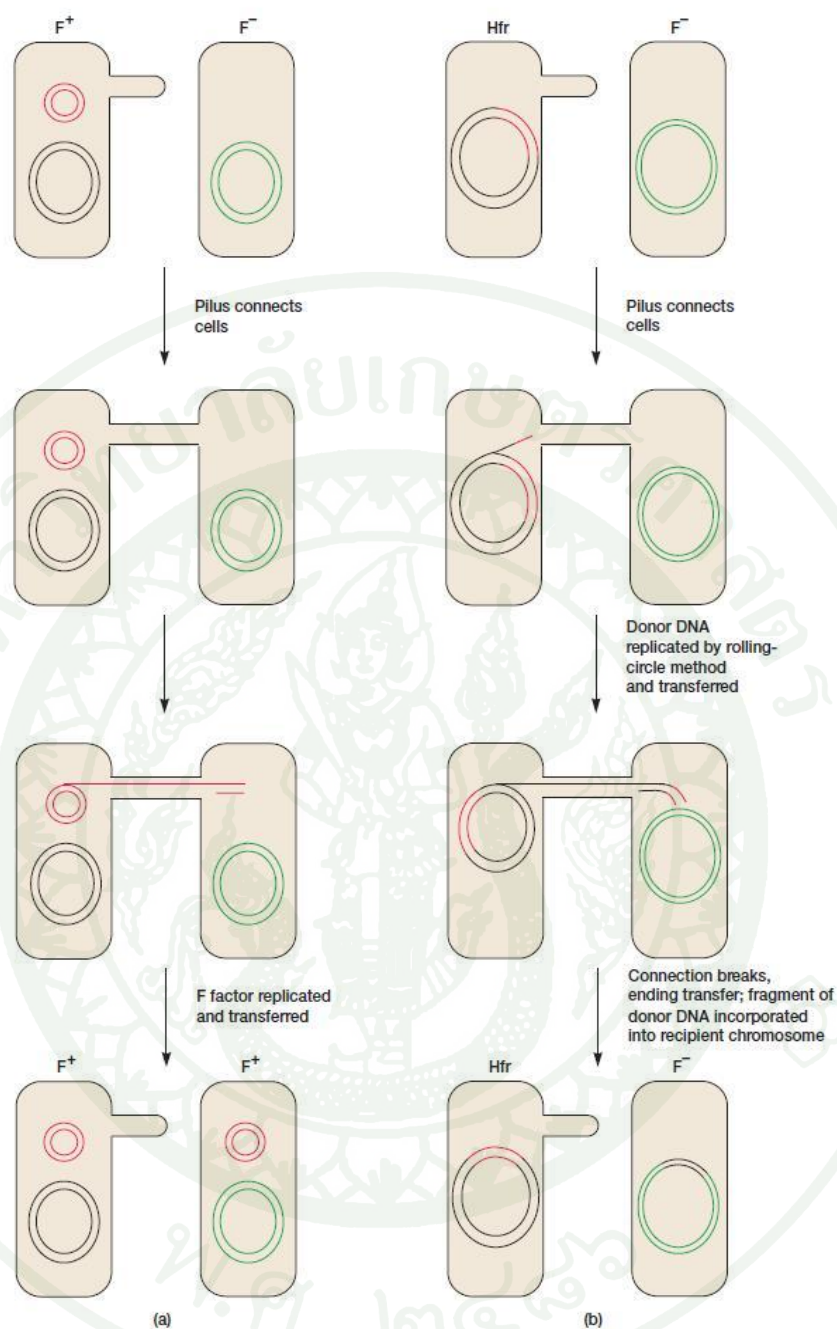
ภาพที่ 4 กระบวนการทรานสฟอร์มเมชันของแบคทีเรีย

ที่มา: Prescott (2002)



ภาพที่ 5 กระบวนการทรานสดักชันของแบคทีเรีย

ที่มา: Prescott (2002)



ภาพที่ 6 กระบวนการคอนจูเกชันของแบคทีเรียภายใต้การควบคุมของยีนที่อยู่ในมินิโครโมโซม (minichromosome) ที่เรียกว่า เอฟแฟกเตอร์ (F factor)

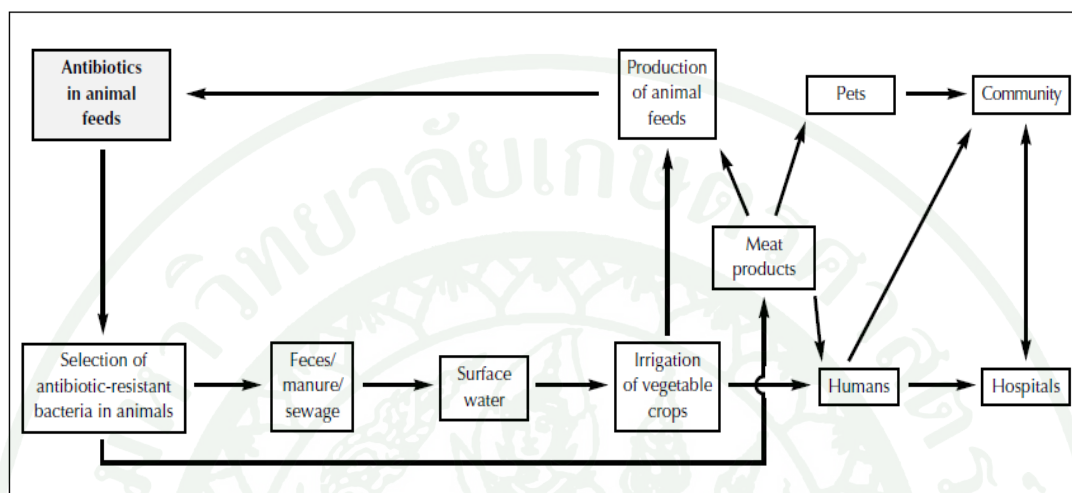
ที่มา: Prescott (2002)

6. การใช้สารปฏิชีวนะในการเกษตร

ในปัจจุบันการใช้สารปฏิชีวนะในการเกษตรนั้นเป็นที่น่าวิตกกังวลเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะ จากภาพที่ 7 ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์เกี่ยวกับการเกษตรที่มีการใช้สารปฏิชีวนะส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งผลที่ตามมาก็คือเกิดผลกระทบต่อง่วงโซ่อาหาร และสุขภาพของมนุษย์ ในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะในจำนวนมาก และหากคิดเป็นจำนวนครั้งของการใช้สารปฏิชีวนะต่อปีมีการใช้สารปฏิชีวนะในสัตว์มากถึง 100-1000 ครั้ง ซึ่งจำนวนครั้งดังกล่าวนี้หมายถึงการใช้สารปฏิชีวนะปริมาณมากในประชากรมนุษย์ด้วยเช่นกัน (Feinmen, 1998; Witte, 1998; Levy, 1998) นอกจากนี้สารปฏิชีวนะยังใช้ในการพ่นใส่พืชผลโดยเฉพาะอย่างยิ่งในไม้ผลเพื่อทำลายแบคทีเรียบนผิวผลไม้อีกด้วย (Chadwick and Goode, 1997; US Office of Technology Assessment, 1995) จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่ามนุษย์มีโอกาสได้รับสารปฏิชีวนะเข้าสู่ร่างกายได้เสมอทั้งทางตรงและทางอ้อม

การใช้สารปฏิชีวนะโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของแบคทีเรียก่อโรค กับมนุษย์ สัตว์ และพืช ทำให้เกิดแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะ จากรายงานของ Hartmann *et al.*, (1999) พบว่าในปี ค.ศ. 1963 *Salmonella typhimurium* ที่แยกได้จากคอกเลี้ยงสัตว์มีการเพิ่มระดับการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะในช่วงระยะเวลา 3 ปี ทั้งนี้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการปศุสัตว์นิยมใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต การป้องกัน และรักษาโรค (Chadwick and Goode, 1997; U.S. Office of Technology Assessment, 1995) ในปี ค.ศ. 1950 สำนักงานคณะกรรมการการประเมิณเทคโนโลยี ประเทศสหรัฐอเมริกา มีการกำหนดปริมาณการใช้สารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ (5-10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เพื่อควบคุมปริมาณการใช้สารปฏิชีวนะที่มากเกินไปจนจำเป็น แต่หลังจากนั้นก็มีการใช้สารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น 10-20 เท่า จากปริมาณที่กำหนด (Levy, 1992; Tenover and McGowan, 1996) มีการเติมสารปฏิชีวนะในความเข้มข้นต่ำในอาหารเพื่อช่วยเพิ่มพลังงานและเสริมสร้างเนื้อ และนม ในวัว แพะ และแกะ เช่นมีการเติม บาซิทราซิน คลอเตตราไซคลิน หรืออีริโทรมัยซิน ปริมาณ 35-100 มิลลิกรัมต่อตัวต่อวัน หรือเติมไทโลซิน (tylosin) หรือนีโอมัยซิน (neomycin) ปริมาณ 7-140 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร และมีการเติมบาซิทราซิน คลอเตตราไซคลิน อีริโทรมัยซิน ลินโคมัยซิน (lincomycin) นีโอมัยซิน ออกซีเตตราไซคลิน เพนนิซิลลิน สเตรปโตมัยซิน ไทโลซิน หรือเวอร์จิเนียมัยซิน (virginiamycin) ในอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสุกร (Gillespie, 1997) การใช้สารปฏิชีวนะในปริมาณน้อยสามารถช่วยกระตุ้นแบคทีเรียให้เกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ และในบางครั้งก็มีการให้สารปฏิชีวนะมากเกินไป

ปริมาณที่สัตว์ต้องการ จากการตรวจสอบอาหารสุกรจำนวน 3328 ตัวอย่าง โดย U.S. National Swine Survey พบว่า มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างอาหารทั้งหมดมีการเติมสารปฏิชีวนะในระดับที่เกินกว่าความต้องการของสุกร (Dewey *et al.*, 1997)



ภาพที่ 7 วัฏจักรการทำการเกษตรที่มีการใช้สารปฏิชีวนะ

ที่มา: George (1998)

7. สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในการเกษตร

สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีการใช้กันมากถึง 6.3 ล้านกิโลกรัมต่อปี ซึ่งนิยมใช้ในการเลี้ยงสัตว์โดยผสมในอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต ป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ สุกัญญาและคณะ (2541) พบว่ามีการใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต ป้องกันและรักษาโรคในการเลี้ยงสุกร สอดคล้องกับ เพชรรัตน์ และคณะ (2549) ซึ่งตรวจพบยาคลอเตตราไซคลินและยาออกซีเตตราไซคลินในอาหารสุกร จากการสำรวจพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี เพชรบุรี โดยในจังหวัดนครปฐมตรวจพบยาคลอเตตราไซคลิน และยาออกซีเตตราไซคลินในอาหารสุกร มากที่สุดถึง 81 เปอร์เซ็นต์ และ 6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณยาที่พบทั้งหมดตามลำดับ Roderick *et al.* (2006) พบว่าในปี ค.ศ. 2001 มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศสหรัฐอเมริกามีการใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเพื่อ กระตุ้นการเจริญเติบโตของสุกรตลอดการผลิต และประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินดังกล่าวจะไม่ดูดซึมในร่างกายสัตว์ แต่จะถูกปลดปล่อยออกมาพร้อมกับมูลและปัสสาวะ นอกจากนี้ยังพบว่าการดูดซึม

ของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจะมีค่าประมาณ 60-90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณทั้งหมดในระบบทางเดินอาหาร และส่วนที่เหลือจะขับถ่ายสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินออกมาพร้อมกับมูลและปัสสาวะ (Sengelov *et al.*, 2003) ซึ่งสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ตกค้างในมูลสัตว์แม้จะมีความเข้มข้นน้อย แต่ก็ยังอยู่ในรูปที่สามารถออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียได้ และถ้าหากจุลินทรีย์ได้รับอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานจะส่งผลให้แบคทีเรียเกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (Pioletti *et al.*, 2001) อีกทั้งมูลสัตว์ที่มีการตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเมื่อมีการใส่ลงสู่ดินจะส่งผลต่อการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินอีกด้วย (Yvonne *et al.*, 2006) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความกังวลเกี่ยวกับการใช้สารปฏิชีวนะในการเกษตรอันจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมการต้านทานสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในคนและสัตว์

8. แบคทีเรียในมูลสัตว์และการอยู่รอดของแบคทีเรียในมูลสัตว์

การอยู่รอดและการกระจายตัวของแบคทีเรียจากมูลสัตว์สู่สิ่งแวดล้อมนั้นขึ้นอยู่กับจำนวนของแบคทีเรียที่มีอยู่ในมูลสัตว์ โดยหลังจากที่เกษตรกรใส่มูลสัตว์ลงในดิน แบคทีเรียจากมูลสัตว์จะปนเปื้อนในดินและดำรงชีวิตได้โดยอาศัย สมบัติทางกายภาพ และเคมีของดิน จากรายงานของ The Ontario Farm Groundwater Quality Survey เกี่ยวกับฟาร์มเกษตรกรที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ พบว่าแบคทีเรียที่พบในมูลสัตว์ซึ่งใช้เป็นปุ๋ยภายในฟาร์มดังกล่าว เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกับที่พบในลำไส้ของสัตว์ โดยส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรีย *Streptococcus* และ *Salmonella* spp. (Goss *et al.*, 1998) โดยความหลากหลายของชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในมูลสัตว์ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ และอายุของสัตว์ วัสดุรองพื้นคอก วิธีการเก็บรักษา และระยะเวลาในการเก็บมูลสัตว์ แสดงในตารางที่ 3 (Lachica, 1990; Nodar *et al.*, 1992) แบคทีเรียในมูลสัตว์สามารถอยู่รอดในมูลสัตว์อย่างน้อยที่สุด 6 วัน (Fenlon *et al.*, 2000) ส่วนในสิ่งแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการอยู่อาศัย แบคทีเรียด้านทานสารปฏิชีวนะพวก *E. coli* และ *Streptococcus faecalis* ยังคงพบจำนวนมากในช่วงระยะเวลาอย่างน้อย 32 วัน ภายใต้สภาพดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (Hagedorn *et al.*, 1978) นอกจากนี้ยังมีการวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า *Escherichia coli* และ *Enterococcus* spp. จากมูลสุกรอาจจะสามารถอยู่รอดได้ในมูลสุกรด้วยระยะเวลาที่ยาวนานถึง 40-68 วัน หลังจากมีการใส่มูลสัตว์ลงไปในดิน (Shrestha *et al.*, 1997; Cools, 2001) อัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียในดินนั้นขึ้นอยู่กับ ชนิดของแบคทีเรีย และวิธีการใส่มูลสัตว์ลงสู่ดิน (Ruprich, 1994) ระหว่างการเก็บรักษามูลสัตว์ก่อนใส่ลงไปในดินนั้นในช่วงแรกแบคทีเรียจะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว และหลังจากนั้นก็จะเพิ่มจำนวนมากขึ้น บางชนิดอาจจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นจากเดิมถึง 5 เท่า ภายในเวลา 14 สัปดาห์ (Nodar *et al.*, 1992) นอกจากนี้ความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิระหว่างภายในและภายนอกของมูลสัตว์ก็ส่งผลการอยู่

รอดของแบคทีเรียแตกต่างกันอีกด้วย โดยแบคทีเรียภายนอกกองมูลจะมีอัตราการอยู่รอดมากกว่า เนื่องจากอุณหภูมิภายนอกกองมูลสัตว์ไม่สูงมากเมื่อเทียบกับอุณหภูมิภายในกองมูลสัตว์ แบคทีเรียบริเวณภายนอกกองมูลสัตว์ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดมากกว่าจึงเป็นกลุ่มสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรียสู่สิ่งแวดล้อม (Sutton, 1983) แบคทีเรียก่อโรคซึ่งพบในมูลสุกรและมูลไก่มากกว่าในมูลวัว เนื่องจากมูลสุกรและมูลไก่มีลักษณะที่เหลวกว่ามูลวัว แบคทีเรียจึงสามารถเคลื่อนที่ได้ดี และมีแนวโน้มทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้มากกว่า วิธีการใส่มูลสัตว์ลงสู่ดินนั้นขึ้นอยู่กับ ลักษณะของมูลสัตว์ ชนิดของดิน และชนิดของพืชปลูก (Goss *et al.*, 2002) เมื่อใส่มูลสัตว์ลงไปในดิน แบคทีเรียที่ตกค้างอยู่บริเวณผิวน้ำดินจะถูกทำลายโดยรังสีอัลตราไวโอเล็ตจากดวงอาทิตย์ ในอีกทางหนึ่งการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ลงสู่ดินนั้นนับว่าเป็นการเพิ่มความชื้นไปได้ของแบคทีเรียที่จะสามารถดำรงอยู่ได้โดยการถูกดูดซับโดยอนุภาคดิน (Patni *et al.*, 1985) การไถพรวนดินโดยทั่วไปอาจจะส่งผลต่อสภาพดิน ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของแบคทีเรีย เช่น กิจกรรมทางชีวภาพ กิจกรรมทางชีวภาพบนผิวน้ำดินที่ไม่มีการไถพรวนจะเกิดขึ้นได้ดีกว่าในดินที่มีการไถพรวน นั้นหมายถึงการไม่ไถพรวนทำให้มีสภาพการอยู่รอดของแบคทีเรียดั้งเดิมได้ดีกว่า (Levanon *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าการใส่มูลสัตว์ลงไปในดินนั้นยังเป็นการเพิ่มแหล่งพลังงาน และแหล่งแร่ธาตุเพื่อส่งเสริมกิจกรรมทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุอาหารในมูลสัตว์ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม สังกะสี และทองแดง ธาตุอาหารในดินเหล่านี้ยังเป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียและสามารถช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียได้อีกด้วย (Rattray *et al.*, 1992) ในทางกลับกัน Tenuta and Lazarovits (2002) พบแอมโมเนีย กรดไนตริก และกรดไขมันที่เป็นพิษจากการใส่อินทรีย์วัตถุที่มีปริมาณไนโตรเจนมาก สารดังกล่าวสามารถฆ่าราสาเหตุโรคพืชที่อยู่ในดินได้

ตารางที่ 3 ตัวอย่างจำนวนแบคทีเรียในมูลสัตว์บางชนิด (CFU ml⁻¹)

Manure type	Faecal coliforms	Faecal streptococci	<i>Salmonella</i> spp.	Protozoa and others	Source
Liquid swine manure	4.3×10^3 to 1.3×10^5	9.3×10^3	0		Unc (1999)
	2.4×10^3	7.2×10^4 to 4.5×10^5	$0 - 5 \times 10^3$		Weigel (1995)
	9.5×10^4 to 1.1×10^6 (<i>E.coli</i>)	(streptococci-D)	(<i>S. infantis</i>)		Rüprich (1994)
Liquid cattle manure	2.4×10^3	9.3×10^3	0		Weigel (1995)
	4.5×10^2 to 1.5×10^6 (<i>E.coli</i>)	4.5×10^2 to 9.5×10^5 (streptococci-D)	0		Rüprich (1994)
Dairy slurry	6.3×10^4 to 1.0×10^7 (enterobacteria) 4.7×10^7	2.7×10^7			Östling and Lindgreen (1991); Crane <i>et al.</i> (1983)
Solid beef manure	2.4×10^5 1.9×10^6 to 6.8×10^6	1.5×10^7	0		Weigel (1995); Unc (1999)
Solid dairy manure	2.0×10^5 to 1.0×10^7 (enterobacteria)				Östling and Lindgreen (1991)
Fresh cow manure	Up to 1.0×10^9		Up to 1.0×10^9	From 25 to 1.8 in healthy animals to 1×10^9 in sick animals (<i>Cryptosporidium parvum</i>)	Mawdsley <i>et al.</i> (1995) Clinton <i>et al.</i> (1979) Scott <i>et al.</i> (1994) Smith <i>et al.</i> (1991)
Sheep	6.0×10^6	6.6×10^5			Crane <i>et al.</i> (1983)
Horse	9.4×10^4	6.3×10^6			Crane <i>et al.</i> (1983)
Poultry	1.3×10^6 to 1.4×10^8	6.2×10^5 to 9.7×10^8			Crane <i>et al.</i> (1983)

ที่มา: Unc and Michael (2004)

ดังนั้นระดับของแอมโมเนียในมูลสัตว์เหลวซึ่งมีปริมาณสูงอาจจะเป็นพิษต่อประชากรแบคทีเรียในดินได้เช่นกัน การเพิ่มขึ้นของธาตุอาหารในดินจากการใส่มูลสัตว์อาจจะส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของประชากรจุลินทรีย์ หรือเกิดการแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ในดินซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่เหนี่ยวนำให้ประชากรแบคทีเรียในดินลดลง (Acea *et al.*, 1988; Recorbet *et al.*, 1992 และ Soda *et al.*, 1998) Murry and Hinckley (1992) พบ *Samonella enteritidis* ลดจำนวนลง 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ร่วมกับไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* และลดลงเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อไม่ได้อยู่ร่วมกับไส้เดือนดิน โดยทั่วไปแล้วจำนวนแบคทีเรียจะลดลงเมื่ออยู่ร่วมกับไส้เดือนดิน จุลินทรีย์ดินอื่นๆ เช่น โปรโตซัว ไส้เดือนฝอย และแบคทีเรียชนิด *Bdellovibrio* ซึ่งพบได้ในมูลสัตว์ (Goss *et al.*, 1996) แบคทีเรียจากลำไส้สัตว์สามารถอยู่รอดได้ดีในดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงเมื่อเปรียบเทียบกับดินแร่ธาตุ เนื่องจากดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีกว่า (Gerba and Bitton, 1984) นั้นแสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำในดินมีความสำคัญต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย รวมถึงค่า pH ด้วย ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองในห้องปฏิบัติการที่แสดงให้เห็นว่า *E. coli* และ Streptococci สามารถอยู่รอดได้เป็นเวลาหลายสัปดาห์ในดินที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบ (pH 5.8–6.8) ในขณะที่สามารถอยู่รอดได้เพียงไม่กี่วันในดินพีท (pH 2.9–4.5) (Cuthbert *et al.*, 1950) การทดลองดังกล่าวทำให้ทราบถึงความสำคัญของค่า pH และปริมาณน้ำ แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้นานในดินที่มีความสามารถอุ้มน้ำได้ดี (Gerba and Bitton, 1984) ค่าพลังงานความดันน้ำที่ต่ำ หรือมีค่าเป็นลบมากซึ่งทำให้เกิดสภาพแห้งในดินและส่งผลต่อการลดความสามารถในการอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรียในดิน (Sjogren, 1994) มีหลายปัจจัยที่กระตุ้นทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์เพื่อความอยู่รอดของแบคทีเรีย เช่น ปริมาณของธาตุอาหารในดินสามารถเพิ่มการต้านทานของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ (Bossier and Verstraete, 1996) แบคทีเรียจะสามารถอยู่รอดในระยะเวลาที่ยาวนานมากขึ้นหลังจากการใส่มูลสัตว์ลงสู่ดินและหากแบคทีเรียดังกล่าวปนเปื้อนไปกับน้ำใต้ดินก็จะทำให้ระยะเวลาการอยู่รอดเพิ่มขึ้นเป็นหลายๆ เดือนได้ (Goss *et al.*, 1996) Sjogren and Gibson (1981) พบว่าแบคทีเรียจากน้ำในบึงสามารถอยู่รอดได้แม้จะมีปริมาณอาหารที่จำกัด แบคทีเรียในดินสามารถอยู่ได้ในอุณหภูมิที่ต่ำและภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น การขาดแคลนอาหารและน้ำโดยแบคทีเรียจะลดกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อความอยู่รอด (Colwell, 1993; Chmielewsky and Frank, 1995; Bogosian *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามถ้าหากสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงให้เอื้อต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย เช่น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิก็จะทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเซลล์เป็นทวีคูณเช่นกัน (Jiang and Chai, 1996)

9. สารปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลิน

สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเป็นสารปฏิชีวนะซึ่งมีการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1948 โดย Benjamin Duggar ผลิตจากแบคทีเรีย *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินและผลิตสารเคมีตามธรรมชาติหลายชนิด ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรียชนิดนี้ สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเป็นสารปฏิชีวนะมีฤทธิ์ในวงกว้างโดยยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ไมโครพลาสมา และแบคทีเรียสาเหตุโรคอีกหลายชนิด จึงใช้อย่างครอบคลุมในการรักษาทั้งในมนุษย์และสัตว์ รวมถึงเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตทั้งในสัตว์บกและสัตว์น้ำ (Chopra and Robert, 2001) มีการทดสอบเป็นยาเมื่อ 60 ปีที่ผ่านมา และปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินให้เป็นประโยชน์ โดยให้สามารถใช้ได้กับเป้าหมายทางชีววิทยาได้อย่างหลากหลาย (Duggar, 1948) สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (ภาพที่ 8)

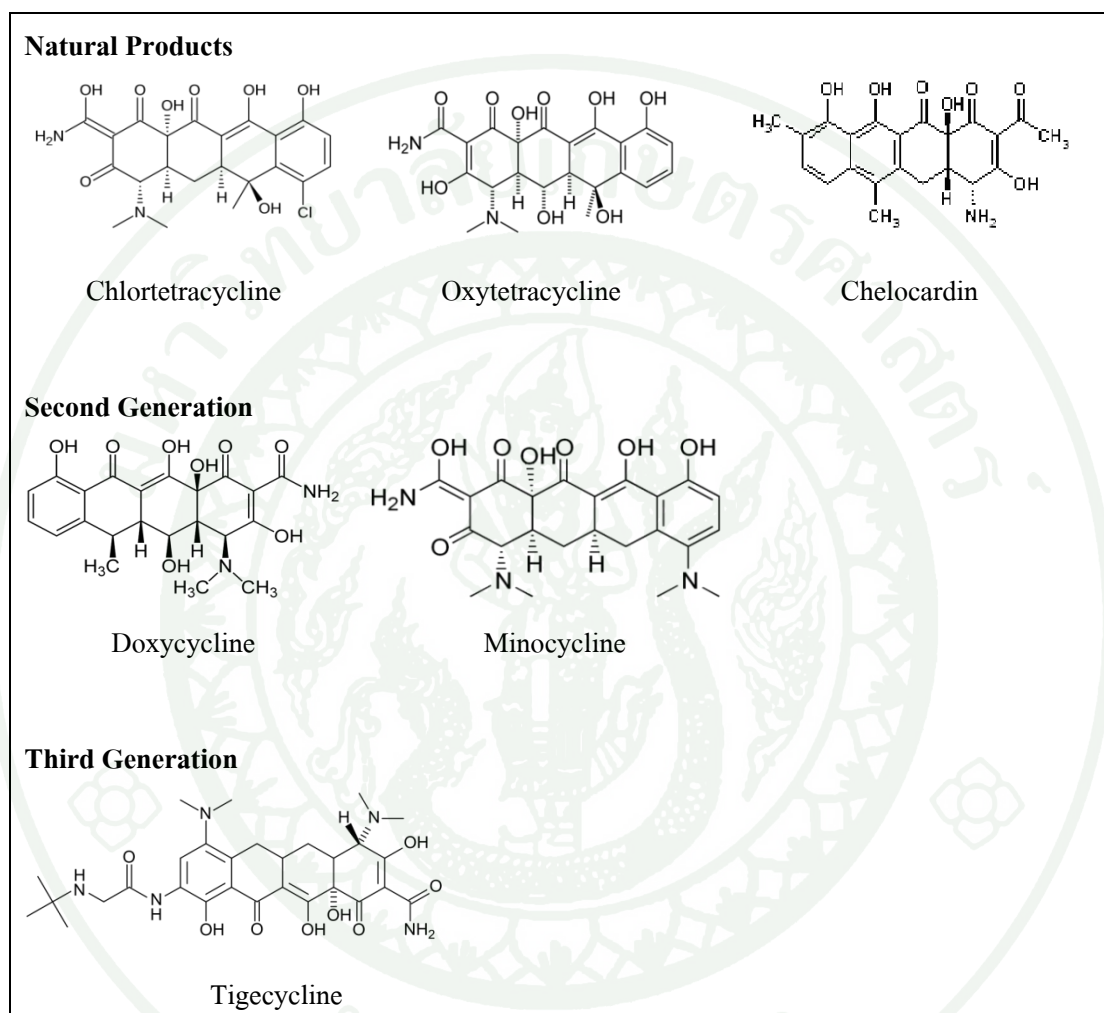
9.1 Natural Products ได้แก่ คลอเตตราไซคลิน (chlortetracycline) ออกซีไซคลิน (oxytetracycline) คีโลคาร์ดิน (chelocardin)

9.2 Second Generation ได้แก่ ดอกซีไซคลิน (doxycycline) ไมโนไซคลิน (minocycline)

9.3 Third Generation ได้แก่ ไทเกซีไซคลิน (tigecycline)

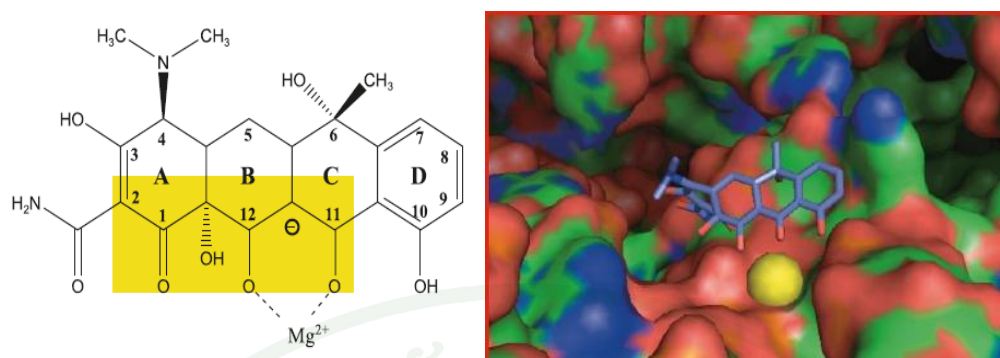
โดยสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในกลุ่มแรกผลิตได้จากธรรมชาติ มีฤทธิ์ต่อการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้งจากร่างกายและจากระบบนิเวศ ซึ่งการผลิตสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีกระบวนการที่ไม่ยุ่งยาก และใช้ต้นทุนการผลิตไม่สูงมากนักจึงทำให้เป็นที่สนใจในอุตสาหกรรมการผลิตสารปฏิชีวนะ (Bijan and Wright, 2008) เตตราไซคลินเป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้ได้อย่างกว้างขวาง และมีผลต่อต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่ไรโบโซมในเซลล์ทุกชนิด แต่จะมีผลต่อแบคทีเรียมากกว่าเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจะไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ ส่วนในเซลล์ของแบคทีเรียนั้นสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินสามารถผ่านเข้าไปได้โดยมีประสิทธิภาพ และจากการศึกษาถึงกลไกการผ่านเข้าสู่เซลล์ของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจึงพบว่าเมกนีเซียมเข้ามามีบทบาทเกี่ยวข้องในกระบวนการนำสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเข้าสู่เซลล์ โดยโมเลกุลของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจะสร้างเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนกับไอออนของเมกนีเซียมซึ่งมีอยู่ในผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นโมเลกุลเชิงซ้อนดังกล่าวจะถูกนำเข้าสู่เซลล์

แบคทีเรียและปลดปล่อยสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินออกสู่ไซโตพลาสซึม ซึ่งสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจะไปทำปฏิกิริยากับไรโบโซมโดยขัดขวางไม่ให้เกิดการจับกันระหว่างกรดอะมิโนจาก tRNA กับตำแหน่งที่รับบน โครโมโซมดังภาพที่ 9 (Bijan and wright, 2008)



ภาพที่ 8 โครงสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราไซคลิน

ที่มา: Bijan and Wright (2008)



ภาพที่ 9 การขัดขวางการจับกันระหว่างกรดอะมิโนจาก tRNA กับตำแหน่งที่รับโครโมโซม

ที่มา: Bijan and Wright (2008)

สารปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราไซคลินมีทั้งหมด 7 ชนิด แต่มีเพียง 2-3 ชนิด เท่านั้นที่ได้รับ ความนิยมนำมาใช้ทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง คือ คลอเตตราไซคลิน และออกซีเตตราไซคลิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการปศุสัตว์ เช่น ใช้ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงลูกไก่ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ กระตุ้นให้สัตว์เกิดความอยากอาหาร และเพื่อให้รักษาน้ำหนักไว้ได้ในระหว่างช่วงเวลาที่สัตว์เกิด ความเครียด ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการให้วัคซีน หรือการให้สัตว์อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิที่ไม่ เหมาะสม ส่วนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง ก็มีการใช้สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้เพื่อรักษาโรคที่ติด เชื้อจากแบคทีเรีย โดยส่วนใหญ่จะใช้ผสมอาหารหรือละลายน้ำแช่ลูกกุ้งเพื่อรักษาโรค

สารปฏิชีวนะกลุ่มเตตราไซคลินสามารถตกค้างในเนื้อเยื่อของไก่ หมู และวัว โดยพบว่ามี การตกค้างมากในกระดูกของสัตว์ดังกล่าว เมื่อมนุษย์รับประทานอาหารที่ปรุงจากเนื้อสัตว์ที่มีการ ตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินก็อาจจะทำให้เกิดพิษต่อกระดูก ฟัน ตับ ไต ระบบทางเดิน อาหาร ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง และถ้าได้รับสารปฏิชีวนะเตตรา ไซคลินเป็นเวลานานอาจจะส่งผลให้ฟันเปลี่ยนเป็นสีเหลือง นอกจากนี้อาจจะทำให้เกิดแบคทีเรีย ดื้อทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในร่างกายได้ อนิรุทธิ์และพรศิริ (2548) รายงานว่า ตรวจพบ *Salmonella* จำนวน 133 ไอโซเลท (isolate) ที่แยกได้จากอุจจาระและน้ำทิ้งฟาร์มสุกรจำนวน 578 ตัวอย่างในเขตจังหวัดพื้นที่ภาคเหนือตอนบนในปี พ.ศ. 2546-2548 และแบคทีเรียที่พบยังสามารถ ดื้อทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในระดับสูง สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินนิยมใช้อย่าง ครอบคลุมในการรักษาทั้งในมนุษย์และสัตว์โดยเฉพาะการเลี้ยงสุกรเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต ซึ่ง เมื่อแบคทีเรียในตัวสุกรได้รับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเข้าสู่เซลล์เป็นเวลานานก็จะทำให้เกิดการ

ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน โดยมี tetracycline resistance genes (*tet* gene) ซึ่งเป็นยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเป็นตัวควบคุมกลไกในการต้านทาน (Bijan and Wright, 2008; Stuart *et al.*, 1999)

10. ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน

ในปี ค.ศ. 1953 พบการต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินใน *Shigella dysenteriae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคบิด และพบแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในจำนวนที่เพิ่มมากขึ้นทั้งชนิดและสายพันธุ์ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา อีกทั้งการใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในปริมาณที่น้อยลงแต่ใช้ในระยะเวลายาวนานมากขึ้นก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเพิ่มมากขึ้น แบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินนั้นสามารถพบได้ทั่วไป ซึ่งแยกได้จากมนุษย์ สัตว์ อาหาร และสิ่งแวดล้อม หรือแม้แต่แบคทีเรียที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุของโรคในระบบนิเวศก็สามารถสะสมยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและกลายเป็นแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินได้เช่นกัน (Roberts, 1996)

สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ในวงกว้าง โดยออกฤทธิ์ในแบคทีเรีย เช่น mycoplasmas chlamydiae mycobacterium rickettsia *Helicobacter* *Listeria* หรือปรสิตของโปรโตซัว เช่น *Entamoeba histolytica* *Giardia lamblia* และ *Plasmodium falciparum* (Levy, 1992; Chopra *et al.*, 1992; Levy, 1988; Klein and Cunha, 1995; Freeman *et al.*, 1994; Roberts, 1989) และเนื่องจากสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ในวงกว้าง รวมถึงเป็นสารปฏิชีวนะที่ค่อนข้างมีความปลอดภัยในการใช้ และมีราคาถูก จึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลกเป็นอันดับที่สองรองจากสารปฏิชีวนะเพนิซิลลิน (penicillin) (Col and O'Connor, 1987) ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมามีการใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในปริมาณที่ลดลงเพื่อรักษาโรคในมนุษย์ลง ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้เกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินของแบคทีเรีย ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และทำให้เกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (Levy, 1992; Chopra *et al.*, 1992; Roberts, 1989) แบคทีเรียสาเหตุโรคในสัตว์ และพืชซึ่งอาจจะเป็นชนิดหรือเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่พบในมนุษย์ พลาสมิดและยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในแบคทีเรียที่มีความจำเพาะในสัตว์จะสามารถถ่ายทอดสู่แบคทีเรียในมนุษย์ได้ และในทางกลับกันพลาสมิดและยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในแบคทีเรียสาเหตุโรคในมนุษย์ก็สามารถถ่ายทอดสู่แบคทีเรียในสัตว์ได้เช่นกัน (Levy, 1992; Roberts, 1989) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแบคทีเรียสามารถแลกเปลี่ยนยีนต้านทาน

สารปฏิชีวนะได้ ดังนั้นแบคทีเรียในอาหารสัตว์ ผลไม้ หรือต้นไม้ที่เป็นโรคก็สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ ตัวอย่างเช่น ผลของการใช้ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ซึ่งสามารถส่งผ่านยีนสู่แบคทีเรียชนิดเดียวกัน แบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และส่งผ่านยีนต้านทานสารปฏิชีวนะสู่แบคทีเรียในมนุษย์ในที่สุด (Levy, 1992; Roberts, 1989)

สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ active transport กระจายตัวเข้าทาง hydrophilic pore ในเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) ชั้นนอก และจากนั้นจึงเข้าสู่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมชั้นในต่อไป (Chopra *et al.*, 1992; Levy, 1992) ทำให้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เซลล์ถูกทำลายและแบคทีเรียตายในที่สุด (Chopra, 1994; Oliva *et al.*, 1992) ในปี ค.ศ. 1955 พบว่าแบคทีเรีย *Shigella* เป็นแบคทีเรียที่ต้านทานทั้งสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และคลอแรมฟินิคอล จากการทดลองในประเทศญี่ปุ่นปี ค.ศ. 1960 พบว่า *Shigella* ที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 5,327 ชนิด มีจำนวนชนิดแบคทีเรียที่มีการต้านทานเพิ่มขึ้นจากเดิม 0.02 เปอร์เซ็นต์เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดภายในระยะเวลา 5 ปี (Falkow, 1975; Watanabe, 1963; Akiba, 1960) อีกทั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะ *Shigella* ยังเป็นที่น่าสนใจและมีงานวิจัยเผยแพร่มาจนถึงปัจจุบัน (Lima *et al.*, 1995) นอกจากนี้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ของ *S. flexneri* ที่แยกได้ระหว่างปี ค.ศ. 1988-1993 ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน สเตรปโตมัยซิน และคลอ-แรมฟินิคอล ต่อมาภายหลังพบว่าแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะที่นำมาเพาะเลี้ยงร่วมกันกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ สามารถถ่ายทอดลักษณะการต้านทานสารปฏิชีวนะทางพันธุกรรมจากแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะสู่แบคทีเรียชนิดอื่นได้โดยตรง (Watanabe, 1963) มีงานวิจัยของชาวญี่ปุ่นซึ่งรายงานเกี่ยวกับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (*tet* gene) บนคอนจูเกทีฟพลาสมิด (conjugative R-plasmid) โดยยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ดังกล่าวทำหน้าที่ขับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินออกนอกเซลล์ และเป็นครั้งแรกที่พบกลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรีย (Roberts, 1989)

การต้านทานสารปฏิชีวนะหลายชนิด รวมถึงสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินนั้น โดยส่วนใหญ่จะพบในแบคทีเรียแกรมบวก จากรายงานในปี ค.ศ. 1994 แสดงให้เห็นว่า ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเมทิซิลลิน (methicillin) เป็น *Staphylococcus aureus* และ 70 เปอร์เซ็นต์ของ *Streptococcus agalactiae* และ *Enterococcus faecalis* สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด และ 60 เปอร์เซ็นต์ของ *S. pneumonia* สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน จากที่กล่าวในข้างต้นจะเห็นได้ว่าการต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่

เดิมพบในแบคทีเรียแกรมบวก สามารถถ่ายโอนสู่แบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้การใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในความเข้มข้นต่ำและเป็นเวลานาน เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตในสัตว์ รวมถึงการรักษาในมนุษย์ ยังส่งผลให้เกิดการคงอยู่ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียอีกด้วย (Levy, 1992)

ผลงานวิจัยหลายงานได้ตีพิมพ์เกี่ยวกับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน หลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติในการควบคุมกลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน เช่น *tetM*, *tetO* และ *tetS* สามารถพบได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนชนิดยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินทั้งหมด ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียอาจจะส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย ผลก็คือทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินทั้ง 16 ชนิด ที่มีกลไกในการควบคุมการต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่แตกต่างกัน สามารถพบได้ในแบคทีเรียภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ในแบคทีเรียแกรมลบพบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* และ *tetE* ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต (Jones *et al.*, 1992a) ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetG*, *tetH* และ *tetI* ซึ่งได้มีการระบุชื่อขึ้นใหม่ตั้งแต่มีการเปลี่ยนแปลงหลักการกำหนดลักษณะของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินใหม่ หนึ่งในแบคทีเรียแกรมลบที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินดังกล่าว คือ *Pseudomonas aeruginosa* (Jones *et al.*, 1992b) ในตารางที่ 4 แสดงถึงแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิดแกรมลบ และยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่พบ

ตารางที่ 4 ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียแกรมลบ^a

Efflux ^b				Ribosomal protection and/ or efflux			
One determinant		Two or more determinants		One determinant		Two or more determinants	
<i>Actinobacillus</i>	<i>tet B</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>tet A, D</i>	<i>Eikenella</i>	<i>tet M</i>	<i>Bacteroides</i> ^c	<i>tet M Q</i>
<i>Moraxella</i>	<i>tet B</i>	<i>Providencia</i>	<i>tet B E I</i> ^c	<i>Fusobacterium</i> ^c	<i>tet M</i>	<i>Veillonella</i> ^c	<i>tet L M Q</i>
<i>Treponema</i> ^d	<i>tet B</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>tet A B D</i>	<i>Kingella</i>	<i>tet M</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>tet B K M</i>
		<i>Citrobacter</i>	<i>tet A B C D</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>tet Q</i>		
		<i>Klebsiella</i>	<i>tet A B C D</i>	<i>Mitsuokella</i>	<i>tet Q</i>		
		<i>Shigella</i>	<i>tet A B C D</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>tet Q</i>		
		<i>Pseudomonas</i>	<i>tet A C E</i>	<i>Prevotella</i> ^c	<i>tet Q</i>		
		<i>Aeromonas</i>	<i>tet A B D E</i>				
		<i>Serratia</i>	<i>tet A B C E</i>				
		<i>Salmonella</i>	<i>tet A B C D</i>				
		<i>Escherichia</i>	<i>tet A B C D E I</i>				
		<i>Vibrio</i>	<i>tet A B C D E G</i>				

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Efflux ^b				Ribosomal protection and/ or efflux			
One determinant		Two or more determinants		One determinant		Two or more determinants	
<i>Yersinia</i>	<i>tet B</i>	<i>Proteus</i>	<i>tet A B C</i>	<i>Neisseria</i>	<i>tet M</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>tet B D H, M</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>tet E</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>tet B C D</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>tet Q</i>		

หมายเหตุ ^a(Mendez *et al.*, 1980; Jones *et al.*, 1992a; Hansen *et al.*, 1993; Morse *et al.*, 1986; Taylor and Courvalin, 1988; Speer *et al.*, 1991; Kisker *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1984; Marshall *et al.*, 1984; Roberts *et al.*, 1991; Sorum *et al.*, 1992; DePaola and Roberts, 1995; Andersen and Sandaa, 1994; Lee *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1991; de Barbeyrac *et al.*, 1991; Roberts and Smith, 1980; Roe *et al.*, 1995; Roberts and Hillier, 1990; Zhao and Aoki, 1992; Aoki *et al.*, 1987; Marshall *et al.*, 1983; DePaola *et al.*, 1988; DePaola *et al.*, 1993; Martinez-Salazar *et al.*, 1986; Kariuki *et al.*, 1992), ^bRibosomal protection genes have not yet been found in enteric genera and when these genes are cloned into *Escherichia coli* the level of resistance conferred is relatively low., ^cAnaerobic species.

^d*T. denticola* is an anaerobic species but not all species in the genus are anaerobes.

^eThis is the first time this gene has been given a letter designation but it does not hybridize with *tetA-E*, G, H and thus should have a new letter designation.

ที่มา: Roberts (1996)

กลไกการยับยั้งสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินออกจากเซลล์พบในยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetK*, *tetL* และ *tetA(P)* ยีนดังกล่าวจะมีรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่มีหน้าที่ขับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินออกจากเซลล์เพื่อลดความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และเพื่อป้องกันสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเข้าไปจับกับไรโบโซม ยีนที่มีหน้าที่ดังกล่าวพบได้ในแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวก ดังแสดงในตารางที่ 4 และตารางที่ 5 โดยยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *tetK*, *tetL* และ *tetA(P)* ส่วนยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *tetA*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG* และ *tetH* ยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียแกรมลบที่มีรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่มีหน้าที่ขับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจะไม่รวมถึงสารปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราไซคลิน ชนิดไมโนไซคลิน ยกเว้น *tetB* ซึ่งเป็นยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถขับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน รวมถึงไมโนไซคลินได้ (Chopra *et al.*, 1992; Mendez *et al.*, 1980)

ตารางที่ 5 ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียแกรมบวกในสกุล *Mycobacterium*
Mycoplasma Nocardia Streptomyces และ *Ureaplasma*^a

Efflux		Ribosomal protection and/ or efflux			
One determinant		Two determinants		Three or more determinants	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>tet M</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>tet L, M</i>	<i>Eubacterium</i> ^b	<i>tet K, M, Q</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>tet M</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>tet M, O</i>	<i>Clostridium</i> ^b	<i>tet K, L, M, P</i>
<i>Gardnerella</i>	<i>tet M</i>	<i>Bacillus</i>	<i>tet K, L</i>	<i>Listeria</i>	<i>tet K, L, M, S</i>
<i>Gemella</i>	<i>tet M</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>tet O, Q</i>	<i>Mycobacterium</i> ^d	<i>tet K, L, Otr A, B</i>
<i>Mycoplasma</i> ^c	<i>tet M</i>	<i>Mobiluncus</i> ^b	<i>tet O, Q</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>tet K, L, M, O</i>
<i>Ureaplasma</i> ^c	<i>tet M</i>			<i>Peptostreptococcus</i> ^b	<i>tet K, L, M, O, Q</i>
<i>Bacterionema</i>	<i>tet M</i>			<i>Enterococcus</i>	<i>tet K, L, M, O, S</i>
<i>Nocardia</i>	<i>tet K</i>			<i>Streptococcus</i>	<i>tet K, L, M, O, Q</i>
				<i>Streptomyces</i> ^c	<i>tet K, L, Otr A, B, C</i>

หมายเหตุ^a Acid-fast bacteria.(Roberts, 1989; Charpentier *et al.*, 1993; Reynes *et al.*, 1988; Dittrich and Schrempf, 1992; Butler *et al.*, 1989; Doyle *et al.*, 1991; Sloan *et al.*, 1994; Sakaguchi and Shishido, 1988; Needham *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1994; Pang *et al.*, 1994; Sanchez-Pescador *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1993; Brown and Roberts, 1987; Roberts and Hillier, 1990; Clewell *et al.*, 1995; Le Bouguenec *et al.*, 1990; Facinelli *et al.*, 1993; Olsvik *et al.*, 1994; Brown and Roberts, 1991; Pang *et al.*, 1994; Roberts and Kenny, 1986; Roberts *et al.*, 1986; Horaud *et al.*, 1991; Charpentier *et al.*, 1994; Lacroix and Walker, 1993; Roberts and Kenny, 1987; Roberts *et al.*, 1992; Buu-Hoi *et al.*, 1989; Fletcher and Daneo-Moore, 1992).^b Anaerobic species.,^c Cell wall-free bacteria with a Gram-positive metabolism., Multicellular bacteria.

ที่มา: Roberts (1996)

ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetM*, *tetO*, *tetS*, *tetB(P)* และ *tetQ* มีกลไกต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินโดยเป็นยีนที่มีรหัสควบคุมโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันไรโบโซมจากปฏิกิริยาของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ทำให้เกิดการต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินรวมถึงดอกซีไซคลิน และไมโนไซคลิน ส่วนกลไกการสร้างเอนไซม์ทำลายโครงสร้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetX* ทำหน้าที่ควบคุมกลไกดังกล่าว ซึ่งยีนควบคุมการต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินหลายชนิดที่กล่าวมานั้น สามารถพบได้ในแบคทีเรียที่แยกได้จากมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันพบแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 32 สายพันธุ์ที่มีกลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH* และ *tetI* สำหรับ *tetI* นั้นจะพบเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ และส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน จากแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมดจำนวน 32 สายพันธุ์ เช่น *Actinobacillus* spp., *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Bacillus* spp., *Nocardia* spp. และ *Treponema denticola* พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetB* มากที่สุดจำนวน 18 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งสามารถพบชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่แตกต่างกันในแบคทีเรียชนิดหนึ่งๆ เช่น แบคทีเรียแกรมลบชนิด *Nocardia* spp. มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะชนิด *tetK* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ขับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินออกจากเซลล์ และ *Bacillus* spp. ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ทำหน้าที่ขับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินออกจากเซลล์ชนิด *tetK* หรือ *tetL* ชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ในแบคทีเรียแกรมบวกพบแบคทีเรียจำนวน 22 สายพันธุ์ ที่สามารถอธิบายถึงกลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ดังแสดงในตารางที่ 4 และจากแบคทีเรียทั้ง 22 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียจำนวน 10 สายพันธุ์มียีนที่ทำหน้าที่ป้องกันไรโบโซมจากฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน โดยในจำนวนนี้มีแบคทีเรียจำนวน 7 สายพันธุ์ มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะชนิด *tetM* ขณะที่แบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะชนิดแกรมบวกมียีนซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไรโบโซมจากฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินได้ถึง 2 ชนิด นอกจากนี้มีแบคทีเรียแกรมบวก 10 สายพันธุ์ ที่สามารถมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะได้ 2 ชนิดร่วมกัน (Charpentier *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1994; Roberts and Hillier, 1990) ในช่วงเวลามากกว่า 40 ปีที่มีการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ (Levy, 1992) การใช้สารปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกวิธีจึงเป็นเรื่องที่น่าวิตกกังวลอันอาจจะก่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียด้านทานสารปฏิชีวนะ ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวอาจจะเกิดการแพร่กระจายสู่มนุษย์ และส่งผลให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคในมนุษย์ต่อไป

11. การตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในสิ่งแวดล้อม

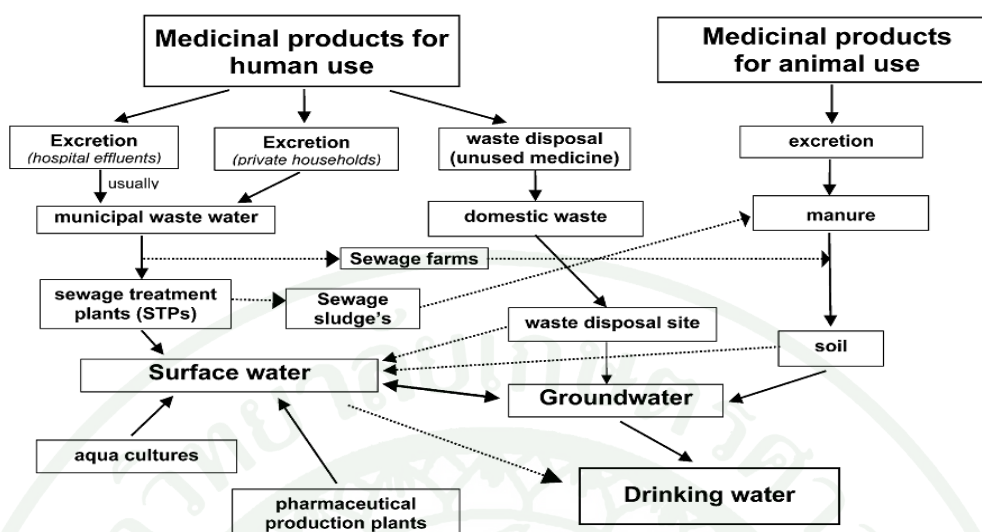
การปนเปื้อนของสารปฏิชีวนะสู่สิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่ทั่วโลกให้ความสนใจ เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะจำนวนมากในมนุษย์ สัตว์ และทางการเกษตร Mellon *et al.* (2001) รายงานว่าในปี ค.ศ. 1996 มีการใช้สารปฏิชีวนะประมาณ 10,200 ตัน ในสหภาพยุโรป โดยใช้ในการปศุสัตว์ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อการรักษาโรคและกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ (European Federation of Animal Health [FEDESA], 1997) ในปี ค.ศ. 1999 ในสหภาพยุโรป และประเทศ สวิตเซอร์แลนด์ มีการใช้สารปฏิชีวนะมากถึง 13,288 ตัน โดยใช้รักษาโรคในมนุษย์ 65 เปอร์เซ็นต์ ใช้ในการปศุสัตว์ 29 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ 6 เปอร์เซ็นต์ (European Federation of Animal Health [FEDESA], 2001) ในปี 2008 สหรัฐอเมริกาผลิตสารปฏิชีวนะ 16,200 ตัน (Union of Concerned Scientists, 2001) โดย 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ผลิตได้ถูกนำมาใช้ในการปศุสัตว์ Wise (2002) ได้ประเมินปริมาณการบริโภคสารปฏิชีวนะทั่วโลกอยู่ที่ระหว่าง 100,000 ถึง 200,000 ตันต่อปี

การใช้สารปฏิชีวนะเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ นั้นมีแนวโน้มทำให้เกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในน้ำ และดิน หากสารปฏิชีวนะดังกล่าวไม่สลายตัวหรือถูกทำลายเมื่อปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม อีกทั้งความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่วัดได้ในน้ำทิ้งจากโรงพยาบาล หรือแม้แต่ น้ำทิ้งจากโรงพยาบาลที่ผ่านการบำบัดทำให้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเจือจางลง นั้นเพียงพอที่จะทำให้เกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (Kummerer and Henninger, 2003) สารปฏิชีวนะที่ใช้เพื่อการปศุสัตว์ จะถูกขับถ่ายออกมาพร้อมมูลสัตว์และตกค้างอยู่ในมูลสัตว์ ซึ่งมูลสัตว์ดังกล่าวอาจจะถูกนำไปใช้เป็นปุ๋ยในการเกษตร ด้วยเหตุนี้สารปฏิชีวนะจึงถูกเพิ่มเติมลงในดินอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการปนเปื้อนในพื้นที่เกษตร (Jorgensen and Halling-Sorensen, 2000) และสิ่งแวดล้อม

หลายปีที่ผ่านมา มีการใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินอย่างแพร่หลายทั้งเพื่อการรักษาโรคในคน และใช้ในการผลิตสัตว์ เนื่องจากสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีพิษน้อย และออกฤทธิ์ในวงกว้าง (broad-spectrum activity) (Madigan *et al.*, 1997) สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีการใช้ทั่วโลกเป็นอันดับที่ 2 รองจากสารปฏิชีวนะในกลุ่มเพนนิซิลิน (Col and O'Connor, 1987) นอกจากนี้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินยังเป็นสารปฏิชีวนะที่พบบ่อยในแหล่งน้ำทิ้ง จากรายงานของ Batt *et al.* (2006) พบสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินประมาณ 0.14-0.56 ไมโครกรัมต่อลิตร จากโรงบำบัดน้ำเสีย และจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินสามารถต้านทานต่อการย่อยสลายทาง

ชีวภาพ (Richardson and Bowron, 1985; Halling-Sorensen *et.al*, 1998; Kummerer, 2001) และเนื่องจากเป็นสารที่ออกฤทธิ์กว้าง สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจึงทำให้มีแนวโน้มในการส่งเสริมโอกาสการพัฒนาความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในจุลินทรีย์หลายชนิด Sengelov *et al.* (2003) รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการพบจุลินทรีย์ต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจำนวนมากเนื่องจากการใช้ปุ๋ยคอกที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างสอดคล้องกับ Salyers *et al.* (1995) พบว่าการถ่ายทอด *tet* gene โดยการใช้ conjugative transposon เกิดขึ้นระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในบริเวณที่มีการตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน เช่นเดียวกันกับ Yvonne *et al.* (2006) ซึ่งรายงานจากการวิจัยในดินจำลอง พบว่า ปุ๋ยมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างส่งผลต่อการแพร่กระจายของแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน นอกจากนี้ยังพบว่า *tet* gene สามารถถ่ายทอดจากแม่สุกรที่ได้รับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินไปสู่ลูกสุกร ดังรายงานของ Haack and Andrews (2000) พบว่า 71 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากมูลของลูกสุกรเพิ่งคลอดต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน

ในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะจำนวนมากในมนุษย์และสัตว์ ทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารปฏิชีวนะผ่านทางดิน และน้ำใต้ดิน เช่น น้ำทิ้งจากการเลี้ยงสัตว์น้ำ หรือการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์เพื่อเพิ่มผลผลิตในพื้นที่การเกษตร ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการตกค้างและเพิ่มเติมสารปฏิชีวนะสู่สิ่งแวดล้อมอย่างต่อเนื่อง (Thomas, 2002) ดังแสดงในภาพที่ 10 Heike *et al.* (2006) รายงานว่าการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเพียงเล็กน้อยหรือมูลสัตว์ที่มีการตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินลงสู่ดินมีผลในการเพิ่มความหลากหลายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ด้วยเหตุนี้จึงมีความวิตกเกี่ยวกับการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินสู่ดินซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตปัจจัยพื้นฐานในการดำรงชีวิตของมนุษย์



ภาพที่ 10 การปนเปื้อนของยาสู่สิ่งแวดล้อม

ที่มา: Thomas (2002)

12. เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลอง ภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis (Bartlett and Stirling, 2003) ปัจจุบันเทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญต่องานด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene synthesis) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอตรวจติดตาม (DNA probe) รวมถึงการหาความหลากหลายของยีน ด้านทฤษฎีชีววิทยา (Pavlov *et al.*, 2006) เป็นต้น

ปฏิกิริยา PCR มีขั้นตอนทั้งหมด 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย denaturing เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิในช่วง 92-95 องศาเซลเซียส ขั้นตอนที่ 2 annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง เพื่อให้ไพรเมอร์ (primers) ซึ่งเป็นดี

เอ็นเอสายสั้นๆ มีลำดับเบสเป็นคู่สมเข้าจับกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ นิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส และขั้นตอนสุดท้าย extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากตำแหน่ง 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) เอนไซม์ดังกล่าวจะสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิในช่วง 72-75 องศาเซลเซียสโดยปฏิกิริยา PCR ทั้ง 3 ขั้นตอนจะเกิดต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ผลผลิตที่ได้จะเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ และเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยา PCR ที่ต่อเนื่องจากขั้นที่ 1 ถึงขั้นตอนที่ 3 ก็จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

การทำปฏิกิริยา PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง โดยมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้สร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ในปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ DNA template primers (sense and anti-sense), Taq polymerase, deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), buffer solution magnesium solution หรือ manganese solution (Joseph and Russel, 2001) สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็ก โดยจะมีปริมาตรสารผสมประมาณ 20-100 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของสารเคมีดังกล่าวในข้างต้นเข้าเครื่องซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา PCR เรียกว่า DNA thermal cycler ซึ่งสามารถปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด PCR และเมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นจนเสร็จสมบูรณ์ก็จะได้ผลผลิต PCR ซึ่งเป็นดีเอ็นเอในขนาดและปริมาณตามต้องการ ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอด PCR จะไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงต้องทำการตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอตามขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้นั้นขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสารซึ่งสามารถแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างเกลียวของดีเอ็นเอและเกิดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต ดังนั้นดีเอ็นเอจะเกิดการเรืองแสงเมื่อทำการส่องกับแสงอัลตราไวโอเล็ต (Pavlov *et al.*, 2004)

ปัจจุบันนี้เทคนิค PCR นับได้ว่าเป็นเทคนิคสำคัญที่ใช้ในงานทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ทั้งงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไปจนถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการเกษตร โดยสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ ทั้งโรคติดเชื้อและโรคจากพันธุกรรม ศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของพันธุกรรมหรือยีน ทำแผนที่ยีนและศึกษาลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด ทางด้านการเกษตรเทคนิค PCR มีบทบาทมากในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การตรวจสอบสายพันธุ์พืช

การตรวจวินิจฉัยโรคหรือสายพันธุ์พืชด้านทานโรค การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรครวมถึงศึกษายีนและการแสดงออกของยีนในพืช ตลอดจนการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากรา แบคทีเรีย และไวรัส หรือเชื้อสาเหตุโรคอื่นๆ

13. เทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

Denaturing gradient gel electrophoresis หรือ DGGE เป็นวิธีการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันเฉพาะเบสเพียง 1 หรือ 2 เบสออกจากกัน โดยการใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอเกลียวคู่บนโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) โดยมีสารที่มีคุณสมบัติในการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturant) เช่น ยูเรียและฟอร์มาไมด์ ผสมอยู่ตามระดับของการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารแบบเส้นตรง (linear gradient) (Helms, 1990) โดยสารที่มีคุณสมบัติในการแยกสายดีเอ็นเอจะมีสัดส่วนความเข้มข้นของสารจากน้อยไปหามาก (gradient) (จากส่วนบนหรือส่วนล่างของเจล) สารดังกล่าวจะทำให้สายพันธุกรรมระหว่างคู่เบส G และเบส C ซึ่งจับกันโดยใช้พันธะไฮโดรเจนจำนวน 3 พันธะ และคู่เบส A และเบส T ซึ่งจับกันโดยใช้พันธะไฮโดรเจนจำนวน 2 พันธะ ซึ่งจำนวนของคู่เบส G และเบส C และคู่เบส A และเบส T ที่มีในดีเอ็นเอแต่ละคู่จะมีปริมาณที่แตกต่างกัน ทำให้ระยะทางการเคลื่อนที่ผ่าน acrylamide gel ของดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันแล้วมีความแตกต่างกันอันเนื่องจากการแยกจากกันของเบสในสายดีเอ็นเอมีปริมาณแตกต่างกัน จึงปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลในระยะทางที่ต่างกัน ดังนั้น DGGE จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถแยกลำดับเบสที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้ แม้สิ่งมีชีวิตดังกล่าวจะมีลำดับเบสต่างกันเพียงหนึ่งตำแหน่งก็ตาม นอกจากนี้ยังสามารถตัดแถบดีเอ็นเอที่สนใจไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อใช้ศึกษาวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรียต่อไป

การศึกษาจำนวนประชากรจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค DGGE เริ่มขึ้นจากการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในดิน (Muyzer *et al.*, 1993) เทคนิค DGGE สามารถทำได้กับยีนที่มีขนาดประมาณ 200 bp และสูงสุดไม่เกิน 500 bp (Muyzer and Smalla, 1998) เทคนิค DGGE สามารถใช้ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ได้โดยลดปัญหาจากการศึกษาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ และสามารถประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น เทคนิค DGGE จึงเป็นวิธีที่ทำให้สามารถเข้าใจโครงสร้าง ชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์อีกทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ หรือตรวจสอบความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ น้ำเสีย หรือของเสียทางอุตสาหกรรมและการเกษตร รวมถึงทางการแพทย์อีกด้วย Sun *et al.* (2004) ได้ใช้

เทคนิค DGGE เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์มาเป็นเวลานาน และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์จะมีความสัมพันธ์กันของกลุ่มสังคมจุลินทรีย์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับดินที่มีการใส่ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ Lai *et al.* (2006) ได้ใช้เทคนิค DGGE เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในตะกอนใต้ทะเลลึกของทะเลจีนใต้ พบแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria Bacteroidetes แบคทีเรียแกรมบวก และ Archaea ซึ่งส่วนใหญ่จะมีลำดับเบสที่สัมพันธ์กับแบคทีเรียในกลุ่ม methanotropic Smalla *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรของแบคทีเรียบริเวณรากสตรอเบอร์รี่ ผักกาดทางหงษ์ และบริเวณหัวของมันฝรั่งที่ปลูกติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 ปี พบว่ากลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณรากพืชทุกชนิด โดยกลุ่มประชากรบริเวณรากของผักกาดทางหงษ์มีความใกล้เคียงกับกลุ่มประชากรบริเวณรอบรากมันฝรั่งมากกว่ากลุ่มประชากรบริเวณรอบรากสตรอเบอร์รี่ นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบของแถบ 16S rRNA ที่ทำการศึกษด้วยเทคนิค DGGE มีความแตกต่างกันตามชนิดของพืช นอกจากนี้ Cindy *et al.* (2000) ยังได้ใช้เทคนิค DGGE ศึกษาความแตกต่างของกลุ่มประชากรแบคทีเรียจากดินในพื้นที่เกษตรประเทศนอร์เวย์ และสหรัฐอเมริกา ทั้งหมด 6 ตัวอย่างดิน ซึ่งเป็นตัวอย่างดินจากพื้นที่การเกษตรที่มีการจัดการที่แตกต่างกัน รวมถึงตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของสาร PAH (polyaromatic hydrocarbons) พบว่าสาร PAH ในดินส่งผลให้มีการลดลงของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในดินอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างดินอื่นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
2. ตู้อบ
3. เครื่องซังไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
4. เครื่องซังไฟฟ้าแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. เครื่อง DNA thermal cyclor TC512 (Techne, UK)
6. เครื่อง mini gel system (Helixx Technologies, Inc., USA)
7. เครื่อง denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Bio-Rad Laboratories, USA)
8. เครื่อง Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories, USA)

วิธีการ

1. ศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

1.1 การเก็บตัวอย่างดินและวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินบางประการ

เก็บตัวอย่างดินบริเวณแปลงทดลองศูนย์วิจัยอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยเก็บดินที่ความลึก 0-10 เซนติเมตร นำตัวอย่างดินผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และ 0.5 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินบางประการ ดังนี้

1.1.1 วัด pH ด้วย pH meter

การวัด pH ทำได้โดยชั่งดินตัวอย่างผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ใช้แท่งแก้วคนตัวอย่างดินและน้ำกลั่นให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ในระหว่างที่ทิ้งไว้ควรคนสารละลายดินเป็นครั้งคราว และเมื่อครบ 30 นาที นำสารละลายดินไปวัดด้วย pH meter

1.1.2 วิเคราะห์อินทรียวัตถุในดิน

ใช้ตัวอย่างดินที่บดละเอียด (ตัวอย่างดินที่ผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร) ทำปฏิกิริยา wet oxidation (Walkley and Black, 1934)

การคำนวณ

$$\% \text{อินทรีย์คาร์บอน} = \frac{(\text{me K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{me FeSO}_4) \times 0.003 \times 100 \times 1.33}{\text{weight of sample in grams}}$$

$$\% \text{อินทรีย์วัตถุ} = \% \text{อินทรีย์คาร์บอน} \times 1.72$$

1.1.3 วิเคราะห์หาไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

การวิเคราะห์หาไนโตรเจนทั้งหมด ใช้วิธี Kjeldahl method (Jackson, 1965; ทศนีย์ และจรงค์, 2542) ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ digestion และ distillation

Digestion เป็นการย่อยตัวอย่างดิน (ตัวอย่างดินที่ผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร) ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส

Distillation เป็นขั้นตอนการกลั่นสารละลายที่ได้จากการย่อย และดักจับไนโตรเจนด้วย H_3BO_3 indicator

การคำนวณ

$$\% \text{ N} = \frac{\text{ml HCl used (sample - blank titration)} \times \text{normality ของ HCl} \times 1.4}{\text{weight of soil sample (grams)}}$$

1.1.4 วิเคราะห์หาฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available phosphorus)

การวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ใช้วิธี Bray II (Bray and Krutz, 1945) สกัดตัวอย่างดินด้วยสารละลาย Bray II จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 2 จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ (filtrate) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร นำค่า OD ที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์

1.1.5 วิเคราะห์หาโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable potassium)

นำตัวอย่างดินมาสกัดด้วยสารละลาย NH_4OAc เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 2 และวิเคราะห์หาปริมาณ K ด้วย Atomic absorption spectrophotometer (Pratt, 1965; ทศนีย์ และ จรงค์, 2542)

1.2 การเตรียมดินจำลอง

1.2.1 การเตรียมมูลสุกที่มีการตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเพื่อใช้ในดินจำลอง (soil microcosm)

ชั่งมูลสุก 12.7 กรัม จากนั้นเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในรูปสารละลายที่เจือจางตามความเข้มข้นดังตารางที่ 6 และตารางที่ 7 คลุกเคล้ามูลสุกและสารละลายปฏิชีวนะเตตราไซคลินเข้าด้วยกันบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อจำลองสภาพของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในในตัวอย่างดิน และเตรียมนำไปคลุกเคล้าผสมกับดินในขั้นตอนต่อไป

1.2.2 การจำลองสภาพของดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้าง

ชั่งดิน 150 กรัม จากนั้นนำไปคลุกเคล้ากับมูลสุกที่มีการตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่เตรียมไว้ จากนั้นบรรจุดินใส่ขวดแก้วขนาด 700 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอบิดขวดแก้วด้วยผ้าขาวบางเพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศ และทำการบันทึกน้ำหนักดินพร้อมขวดเมื่อเริ่มทำการทดลองและหลังจากเก็บตัวอย่างดินทุกครั้งตลอดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างดินจำนวน 5 กรัม ใส่ถุงพลาสติก (โดยเก็บตัวอย่างดินในวันที่ 5, 10, 15, 30 และ 40 ในการทดลองที่ 1 และเก็บตัวอย่างดินทุก 1 สัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ในการทดลองที่ 2) จากนั้นบันทึกน้ำหนักดินพร้อมขวดแก้วทุกครั้งหลังการเก็บตัวอย่างดิน และทำการรักษาระดับความชื้นโดยการเติมน้ำที่ระดับ field capacity (FC) ทำการจำลองสภาพของดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างในการเกษตร เพื่อศึกษาผลของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินต่อการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและการเปลี่ยนแปลงสังกมจุลินทรีย์ในดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเนื่องจากการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้าง โดยมีดำเนินการทดลองทั้งหมด 5 ดำเนินการทดลอง ทุกดำเนินการทดลองมีการใส่ดิน 150 กรัม และมูลสุก 12.7 กรัม ยกเว้นดำเนินการทดลองที่ 1 ซึ่งไม่มีการใส่มูลสุกและสารปฏิชีวนะเนื่องจากใช้เป็นดำเนินการทดลองควบคุม ในส่วนของดำเนินการทดลองที่ 2, 3, 4 และ 5 มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 20 และ 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับดังตารางที่ 6 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างดินใน

วันที่ 5, 10, 15, 30 และ 40 เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน การเปลี่ยนแปลงสังคมจุลินทรีย์ในดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้าง ด้วยเทคนิค PCR และ DGGE

ตารางที่ 6 คำรับการทดลองในการทดลองที่ 1

คำรับการทดลอง	ดิน (กรัม)	มูลสุกร (กรัม)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ สารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน)
1	150	-	-
2	150	12.7	-
3	150	12.7	0.2
4	150	12.7	20
5	150	12.7	2000

การทดลองที่ 2 ศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน เนื่องจากการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างซ้ำ โดยมีคำรับการทดลองทั้งหมด 4 คำรับการทดลอง ทุกคำรับการทดลองมีการใส่ดิน 150 กรัม มูลสุกร 12.7 กรัม และมีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 20 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับดังตารางที่ 6 ในการทดลองที่ 2 ทำการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินซ้ำในคำรับการทดลองที่ 2, 3 และ 4 ตามปริมาณในตารางที่ 7 ทุก 1 สัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน การเปลี่ยนแปลงสังคมจุลินทรีย์ในดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้าง ด้วยเทคนิค PCR และ DGGE

ตารางที่ 7 ดำรับการทดลองในการทดลองที่ 2

ดำรับการทดลอง	ดิน (กรัม)	มูลสุกร (กรัม)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ สารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน)
1	150	12.7	-
2	150	12.7	0.2
3	150	12.7	20
4	150	12.7	200

1.3 การสกัดดีเอ็นเอ

1.3.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ใช้ของ Zhou *et al.* (1996)

โดยเริ่มสกัดด้วยการผสมตัวอย่างดิน 0.1 กรัม กับ soil-extraction buffer (Tris-HCl buffer [pH 8.0] ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติม soil-extraction buffer เพิ่มอีก 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทส่วนละลายใสทิ้ง นำ soil-extraction buffer ปริมาตร 380 ไมโครลิตรผสมลงใน ส่วนตะกอนที่เหลือ และเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อย่อยผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ RNase ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่แข็ง (freeze) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 15 นาที แล้วนำมาละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทำการ freeze และ thaw อีกครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนละลายใสไว้แล้วนำไปผสมด้วย potassium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 3 ส่วนของสารละลายใส แล้วบ่มต่อในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนละลายใส่ผสมด้วย sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 10 ส่วนของสารละลาย และ isopropanol ในปริมาตรที่เท่ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนละลายทิ้ง และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ละลาย DNA ที่ได้จาก TE buffer ปริมาตร 360 ไมโครลิตร ผสมด้วย NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และ CTAB ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 45 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นผสมด้วย equal volume ของ chloroform นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บละลายใส่ไว้แล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำละลายใส่ที่ได้ผสมด้วย equal volume ของ phenol/chloroform นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำละลายใส่ที่ได้ผสมด้วย equal volume ของ isopropanol และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนละลายทิ้ง และปล่อยให้ส่วนตะกอน DNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ละลาย DNA ที่ได้จาก TE buffer 20 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.3.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด SoilMaster™ DNA Extraction Kit (EPICENTRE Biotechnologies, USA)

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินด้วยชุดสกัด SoilMaster™ DNA Extraction Kit (EPICENTRE Biotechnologies, USA) โดยวิธีของ Park and Crowley (2005) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของบริษัทผู้ผลิต และตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการทำ electrophoresis บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TAE buffer

1.3.3 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA)

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินด้วยชุดสกัด PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA) โดยวิธีของ Jareonmit *et al.* (2009) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของบริษัทผู้ผลิต และตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการทำ electrophoresis บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TAE buffer

1.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 1.3 เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย primers ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจำนวน 14 ยีน (ตารางที่ 8) (Ng *et al.*, 2001) การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนที่ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน 14 ยีน ทำได้โดยการนำดีเอ็นเอของตัวอย่างดินที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 2.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, California) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้น initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรุ่น TC512 (Techne, UK)

1.5 การตรวจสอบผลผลิต PCR (PCR product) ด้วย agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบและวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TAE buffer โดยเตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์แล้วนำไปเทใส่ใน gel tray และเสียบหัว (gel comb) ที่จุ่มในเจลแข็งตัวดีแล้วดึงออก จากนั้นก็นำ agarose gel ลงเครื่อง electrophoresis ที่มีสารละลาย 1X TAE buffer อยู่ ผสม 6X loading dye และผลผลิต PCR ในอัตราส่วน 2:5 โดยปริมาตร จากนั้นบรรจุผลผลิต PCR ลงในช่อง agarose gel ใช้ 100 bp plus ladder (Fermentas, Maryland) เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ หลังจากนั้นปล่อยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 V เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำ agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในน้ำสะอาดเพื่อล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออกเป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจสอบเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตพร้อมถ่ายภาพเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 8 primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อการตรวจสอบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน
จำนวน 14 ยีน

Tetracycline resistance gene		PCR primer sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
<i>tetA</i>	F	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	210
	R	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	
<i>tetB</i>	F	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	659
	R	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	
<i>tetC</i>	F	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	418
	R	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC	
<i>tetD</i>	F	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	787
	R	GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC	
<i>tetE</i>	F	AAA CCA CAT CCT CCA TAC GC	278
	R	AAA TAG GCC ACA ACC GTC AG	
<i>tetG</i>	F	GCT CGG TGG TAT CTC TGC TC	468
	R	AGC AAC AGA ATC GGG AAC AC	
<i>tetK</i>	F	TCG ATA GGA ACA GCA GTA	169
	R	CAG CAG ATC CTA CTC CTT	
<i>tetL</i>	F	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC	267
	R	GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG	
<i>tetM</i>	F	GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG	406
	R	CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC	
<i>tetO</i>	F	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC	515
	R	TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	
<i>tetS</i>	F	CAT AGA CAA GCC GTT GAC C	667
	R	ATG TTT TTG GAA CGC CAG AG	
<i>tetP</i>	F	CTT GGA TTG CGG AAG AAG AG	676
	R	ATA TGC CCA TTT AAC CAC GC	
<i>tetQ</i>	F	TTA TAC TTC CTC CGG CAT CG	904
	R	ATC GGT TCG AGA ATG TCC AC	
<i>tetX</i>	F	CAA TAA TTG GTG GTG GAC CC	468
	R	TTC TTA CCT TGG ACA TCC CG	

หมายเหตุ F = forward primer

R = reverse primer

ที่มา: Ng *et al.* (2001)

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลุ่มสังคมจุลินทรีย์ในดินด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินด้วยชุดสกัด PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA) โดยวิธีของ Jareonmit *et al.* (2009) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการผู้ผลิต และตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการทำ electrophoresis บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA โดยการนำดีเอ็นเอของตัวอย่างดินที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTPs (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.40 ไมโครลิตร 10X buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร universal primer (PRBA338F 5'-ACTCCT ACGGGAGGCAGCAG-3' และ PRUN518R 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Cindy *et al.*, 2000) ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 0.75 ไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase (Invitrogen, California) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ทั้งนี้ PRBA338F ซึ่งเป็น forward primer จะมีการเติมเบส G และ C เข้าที่ปลายด้าน 3 ไพรม์ ซึ่งเรียกว่า GC clamp จำนวน 20 bp เพื่อช่วยยึดสายดีเอ็นเอที่แยกจากกันบน acrylamide เจล (Muyzer *et al.*, 1993) สำหรับปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้น initial denaturation อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ดัดแปลงจาก Becker *et al.*, 2006) โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ TC512 (Techne, UK) ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้นำมาวิเคราะห์ บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที โดยใช้ 100bp plus ladder (Fermentas,

Maryland) เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พร้อมถ่ายภาพ

2.3 การทำ Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

การเตรียมอุปกรณ์ในการทำ DGGE เริ่มจากการนำแผ่นกระจก 2 แผ่นขนาด 16×16 เซนติเมตร และขนาด 16×14 เซนติเมตร ทำความสะอาดกระจกด้วย alcohol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ alcohol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เช็ดด้วยกระดาษซับ Kimwipe ระวังอย่าให้มีฝุ่นหรือกระดาษซับติด นำกระจกแผ่นใหญ่ (16×16 เซนติเมตร) วางบนโต๊ะและนำ spacer ที่ทำด้วยวาสลีนเพื่อให้เกิดการยึดระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองดีขึ้น วางที่ขอบกระจก หลังจากนั้นนำกระจกแผ่นเล็ก (16×14 เซนติเมตร) มาประกบพร้อมกับจัดกระจกทั้งสองให้เสมอกันทั้งด้านข้างและด้านล่าง หลังจากนั้นนำกระจกไปประกอบเข้ากับแกนยึด (plate clamps) และประกอบเข้ากับตัวฐาน (pouring stand) เทเจลที่เตรียมได้ลงในแผ่นกระจกตามความเข้มข้นของเจลที่เตรียมไว้ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เมื่อเทเจลจนเต็มแผ่นกระจกแล้วนำหวี (well comb) ไปเสียบระหว่างช่องว่างของกระจก เมื่อเจลแข็งตัวแล้วนำแผ่นกระจกออกจากตัวฐานแล้วนำไปประกอบเข้ากับ gel electrophoresis สำหรับ DGGE ที่บรรจุ 1X TAE buffer ปริมาตร 6 ลิตร และตั้งอยู่บน magnetic stirrer เพื่อให้สารละลาย buffer เกิดการไหลเวียน หลังจากนั้นปิดด้วยฝาที่ต่อกับ power supply และเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

การเตรียมเจลในขั้นตอนแรกทำการเตรียม stock acrylamide ความเข้มข้น 0 และ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำความเข้มข้นทั้ง 2 มาผสมกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ และมีลักษณะเป็นระดับของการเปลี่ยนความเข้มข้น (concentration gradient) เพื่อให้สายคู่ของดีเอ็นเอเกิดการแยกตัวเป็นสายเดี่ยว ในการทดลองนี้เตรียมเจลความเข้มข้น 13 เปอร์เซ็นต์ และใช้ gradient ความเข้มข้นของสารละลายระหว่าง 40 เปอร์เซ็นต์ ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมสารละลายดังตารางที่ 9 และเติม ammonium persulphate (APS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ TEMED ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้เกิดการโพลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) โดยเติมก่อนการเทสารผสมของเจลลงในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้

ตารางที่ 9 ปริมาตรของสารผสมสำหรับ Denaturing gradient gel electrophoresis

สารละลาย	0% acrylamide (มิลลิลิตร)	100% acrylamide (มิลลิลิตร)	10 % APS (ไมโครลิตร)	TEMED (ไมโครลิตร)
70% denaturant	6	14	200	20
40% denaturant	12	8	200	20

หมายเหตุ APS = ammonium persulphate

TEMED = N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine

เมื่อผสมสารละลายเจลดความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ และ 70 เปอร์เซ็นต์ เติม APS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 20 ไมโครลิตรแล้ว เทสารละลายความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ และ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้สารละลายผสมทั้งสองความเข้มข้นผสมไหลเข้าสู่แผ่นกระจก โดยปล่อยสารละลายผสมดังกล่าวให้ไหลลงไปในช่องว่างของแผ่นกระจกทั้งสองอย่างช้าๆ โดยใช้ magnetic stirrer โดยปล่อยสารละลายผสม 70 เปอร์เซ็นต์ก่อนเล็กน้อยเพื่อให้เกิด gradient ปล่อยให้สารผสมไหลเข้าไปใน glass plates จนเกือบเต็มแผ่นกระจก ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นนำหวี (well comb) เสียบเข้าไปใน glass plates ทิ้งไว้ประมาณ 6 ชั่วโมงเพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวแล้วนำผลผลิต PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่เตรียมได้ โดยใช้ไพรเมอร์ PRBA338F และ PRUN518R มาผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ลงไปในช่องเจลปริมาตร 30-40 ไมโครลิตร โดยใส่ 100 bp plus DNA ladder (Fermentas, Maryland) ที่ช่องเจลด้านข้างด้วยเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายอ้างอิงในการวิเคราะห์ผล หลังจากนั้นทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าที่มีศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปแช่น้ำกลั่นพร้อมเขย่าเพื่อล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออกเป็นเวลา 30 นาที นำเจลที่ได้มาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และถ่ายภาพ นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนและแตกต่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม UPGMA โดยใช้ Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories, USA) เพื่อสร้าง dendrogram จัดกลุ่มของกลุ่มสิ่งมีชีวิต

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์

1.1 สมบัติทางเคมีของดินบางประการ

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินบางประการ เพื่อศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของดินก่อนนำมาทำการทดลอง (ตารางผนวกที่ 1-5) พบว่าดินที่นำมาทำการศึกษามีค่า pH 7.3 อยู่ในระดับที่เป็นกลาง มีปริมาณอินทรีย์วัตถุ 1.26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.03 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในระดับต่ำมาก ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน อยู่ในระดับสูงมาก และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 1360 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน อยู่ในระดับที่สูงมาก ดังแสดงในตารางที่ 10

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การศึกษากการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอเป็นลำดับแรก ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการสกัดดีเอ็นเอหลายวิธีด้วยกัน โดยวิธีแรกเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินโดยตรง พบว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากดินด้วยวิธีของ Zhou *et al.* (1996) ซึ่งใช้ DNA extraction buffer (Tris-HCl ($C_4H_{11}NO_3$) pH 8.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ sodium EDTA ($C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8$) pH 8.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ Na_3PO_4 pH 8.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ NaCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ และ Cetyltrimethyl ammoniumbromide (CTAB) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) และ proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากดินโดยวิธีนี้ให้ดีเอ็นเอปริมาณมาก (ภาพที่ 11ก) และดีเอ็นเอที่สกัดได้มีสีน้ำตาลแต่ดีเอ็นเอที่ได้ไม่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR เนื่องจากเมื่อนำดีเอ็นเอดังกล่าวไปทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลผลิต PCR บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบแถบของผลผลิต PCR จึงทดลองสกัดดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินด้วยชุดสกัด SoilMaster™ DNA Extraction Kit (EPICENTRE Biotechnologies, USA) การสกัดด้วยวิธีนี้ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณน้อย (ภาพที่ 11ข) และเมื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลผลิต PCR บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบแถบของผลผลิต PCR และวิธีสุดท้ายคือ การสกัดด้วยชุดสกัด PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO

Laboratories, USA) การสกัดด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการสกัดที่ให้ผลดีที่สุดคือ ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณมาก (ภาพที่ 11ค) และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลผลิต PCR บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบแถบของผลผลิต PCR ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบการ มีอินดินาน สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินได้ จากผลการสกัดดีเอ็นเอดังที่กล่าวมานั้น การสกัดดีเอ็นเอในแบบแรก ดีเอ็นเอที่ได้ อาจมีการเจือปนของสารอื่นรวมถึงกรดฮิวมิคจากอินทรีย์วัตถุในดิน ดีเอ็นเอที่ได้จึงไม่ มีความบริสุทธิ์พอ สังเกตได้จากสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีสีน้ำตาล โดยกรดฮิวมิคที่เจือปนอยู่นั้นจะมีขนาดและลักษณะคล้ายกับดีเอ็นเอ (Holben, 1994) ซึ่งกรดฮิวมิคจะรบกวนกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (Holben *et al.*, 1988; Steffan and Atlas, 1988; Tsai and Olson, 1992) โดยพบว่า 1 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอที่มีการเจือปนของกรดฮิวมิค สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอร์เรส (Tsai and Olson, 1992) จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้การทำปฏิกิริยา PCR ไม่ประสบความสำเร็จ คือไม่ปรากฏแถบของผลผลิต PCR ขณะที่การสกัดดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ในดินด้วยชุด สกัด SoilMaster™ DNA Extraction Kit (EPICENTRE Biotechnologies, USA) ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดนี้มีปริมาณน้อย เนื่องจากในกระบวนการในขั้นแรกของการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด สกัดดังกล่าวใช้เพียง lysozyme ย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียในดิน ทำให้ได้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่ สัมผัสกับเอนไซม์ดังกล่าวเท่านั้น และอาจมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งแตกต่าง จากการสกัดด้วยชุดสกัด PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA) โดย กระบวนการในขั้นแรกของการสกัดด้วยชุดสกัดดังกล่าวมีการใช้เม็ดบีดเพื่อช่วยในการกระแทกเม็ดดิน ให้แตก ทำให้แบคทีเรียทั้งที่อยู่ในดินและที่อาศัยอยู่ในช่องว่างของเม็ดดินสัมผัสกับเอนไซม์ย่อย ผนังเซลล์ การสกัดด้วยวิธีนี้จึงเป็นวิธีการสกัดที่ให้ผลดีที่สุด ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณมาก และ เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา PCR จึงประสบความสำเร็จในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัด ได้จากชุดสกัด PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA)

1.3 ศึกษาการแพร่กระจายของอินดินานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินที่มีการใส่ปุ๋ย มูลสัตว์ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การศึกษการแพร่กระจายของอินดินานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจากดินจำลอง ซึ่งเป็นตัวอย่างดินบริเวณแปลงทดลองศูนย์วิจัยอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยา เขตกำแพงแสน โดยเก็บดินที่ความลึก 0-10 เซนติเมตร เป็นดินที่ไม่มีประวัติการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ นำมาจำลองสภาพแวดล้อมของดินที่มีการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างใน การเกษตรที่ความเข้มข้นต่างๆ การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกมูลสุกรมาเป็นต้นแบบในการศึกษา โดยแบ่ง ออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 0,

0.2, 20 และ 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ทำการเก็บตัวอย่างดินในวันที่ 5, 10, 15, 30 และ 40 การทดลองที่ 2 มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 20 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินซ้ำ ทุก 1 สัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และทำการเก็บตัวอย่างดินในสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นนำตัวอย่างดินมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA) และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์การแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจำนวน 14 ยีน ซึ่งมีความยาวของเบสแตกต่างกัน ร่วมกับการใช้เทคนิค multiplex PCR ซึ่งเป็นเทคนิค PCR ที่สามารถตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินแบบเป็นกลุ่มยีน โดยแบ่งยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินทั้ง 14 ยีน ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *tetB*, *tetC* และ *tetD* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *tetA*, *tetE* และ *tetG* กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO* และ *tetS* กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *tetP*, *tetQ* และ *tetX* พบว่าการทำปฏิกิริยา PCR แบบ multiplex ไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากไม่สามารถตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินแบบหลายชนิดของยีนในครั้งเดียวได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีการตรวจสอบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินโดยการทำปฏิกิริยา PCR แต่ละยีนแยกกัน (ภาพที่ 12) และประสบผลสำเร็จในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน

จากการศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจากดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ในการทดลองที่ 1 พบว่าค่ารับควบคุม (ค่ารับการทดลองที่ 1) ซึ่งเป็นดินเพียงอย่างเดียวนั้น ไม่พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในทุกช่วงระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง และการทดสอบในมูลสุกรที่นำมาทำการศึกษาซึ่งเป็นมูลสุกรจากสุกรที่ไม่มีการใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินนั้น พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetC*, *tetD*, *tetA*, *tetG*, *tetL*, *tetM* และ *tetO* โดยยีนที่พบดังกล่าวอาจมาจากแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะที่มีอยู่เดิมในสุกร แม้ว่าสุกรจะไม่มีการใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมาก่อน ซึ่งอาจเกิดจากการถ่ายทอดยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจากแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแม่สุกรตัวก่อนๆ ที่เคยได้รับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินไปสู่ลูกสุกร แม้ว่าลูกสุกรจะไม่เคยได้รับสารปฏิชีวนะมาก่อน สอดคล้องกับรายงานของ Haack and Andrews (2000) พบว่า 71 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากมูลของลูกสุกรเพิ่งคลอดที่ยังไม่มีการใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินได้ นอกจากนี้ในแบคทีเรียบางชนิดจะมี inherent resistant คือ ลักษณะการต้านทานสารปฏิชีวนะตั้งแต่กำเนิด ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) กล่าวคือเป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในยีนบนดีเอ็นเอ (genomic

DNA) โดยไม่จำเป็นต้องมียาปฏิชีวนะมาเหนี่ยวนำ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถเกิดขึ้นได้ แม้ว่าแบคทีเรียจะไม่เคยสัมผัสกับยาปฏิชีวนะมาก่อน (Bryan, 1984) ในตำรับการทดลองที่มีการเติมมูลสุกรเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเพิ่มเติม (ตำรับการทดลองที่ 2) พบว่าในการเก็บตัวอย่างดินครั้งแรกนั้น พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetL* เพียงยีนเดียว การเก็บตัวอย่างดินในวันที่ 5 พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetC*, *tetG*, *tetL*, *tetM* และ *tetO* การเก็บตัวอย่างดินในวันที่ 15 พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetG*, *tetL*, *tetM*, *tetO* และ *tetX* ขณะที่การเก็บตัวอย่างดินในวันที่ 40 นั้นพบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetB* เพียงยีนเดียว ซึ่งยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิดที่พบในตำรับการทดลองที่มีการเติมมูลสุกรเพียงอย่างเดียว (ตำรับการทดลองที่ 2) ส่วนใหญ่จะเป็นยีนต้านทานสารปฏิชีวนะชนิดเดียวกับที่พบในมูลสุกร อาจเนื่องจากยีนที่พบในตำรับการทดลองดังกล่าวเป็นยีนเดิมที่มีอยู่ในมูลสุกรซึ่งยังคงอยู่ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิดดังกล่าวอาจลดความสำคัญหรือไม่มีการเพิ่มขึ้นของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรีย เนื่องจากในตำรับการทดลองดังกล่าวไม่มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ซึ่งสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจะมีบทบาทในการเป็นตัวคัดเลือก (selective pressure) ให้ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียมีการแพร่กระจายเพิ่มขึ้น เป็นผลทำให้ชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินปรากฏลดลงเมื่อเก็บตัวอย่างดินในวันที่ 40 สำหรับตัวอย่างดินจากตำรับการทดลองที่มีการเติมมูลสุกรและสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 0.2, 20 และ 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน (ตำรับการทดลองที่ 3, 4 และ 5) ในวันที่ 0, 5, 15 และ 40 วัน พบว่ามียีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetC*, *tetD*, *tetA*, *tetG*, *tetL* และ *tetM* ปรากฏขึ้นอย่างค่อนข้างสม่ำเสมอ ซึ่งยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ดังกล่าวเป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในมูลสุกรเช่นกัน แสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่พบในมูลสุกรที่นำมาศึกษานั้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และเมื่อมีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินลงในมูลสุกรเพื่อจำลองสภาพแวดล้อมของการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีการตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในสิ่งแวดล้อม ยังพบว่าเป็นการเพิ่มการกระจายตัวของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน โดยตำรับการทดลองที่มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินนั้น (ตำรับการทดลองที่ 3, 4 และ 5) จะพบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะปรากฏขึ้นในเกือบทุกช่วงเวลาและมีความสม่ำเสมอในการพบมากกว่าดินที่มีการใส่มูลสุกรเพียงอย่างเดียว (ตำรับการทดลองที่ 2) อาจเนื่องจากสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่เติมลงในมูลสุกรนั้นมีบทบาทในการเป็นตัวคัดเลือกให้ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียมีการแพร่กระจายและสามารถคงอยู่ในดินได้เป็นเวลานานขึ้น รวมถึงการต้านทานของแบคทีเรียต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นซึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์แบบเป็นขั้นๆ (adaptive

mutation) ทำให้แบคทีเรียจะค่อยๆ ปรับตัวให้สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะความเข้มข้นสูง (multistep mutational resistance) สำหรับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ เตตราไซคลินชนิด *tetB*, *tetO*, *tetS*, *tetP* และ *tetX* นั้น พบในคำรับการทดลองที่มีการใส่โมดูลสุกร่วมกับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในบางความเข้มข้นเท่านั้น และไม่มีความสม่ำเสมอของการพบในแต่ละช่วงเวลา อาจเป็นไปได้ว่ายีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินดังกล่าวมีอยู่เดิมในแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในโมดูลสุกรแต่ยังไม่มีความสำคัญหรือยังไม่เกิดการแพร่กระจาย แต่เมื่อมีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจึงทำให้เกิดการส่งเสริมทำให้กลุ่มยีนดังกล่าวมีการแพร่กระจาย และแสดงความสำคัญในแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ซึ่งการเกิดการแพร่กระจายของยีนอาจมาจากการถ่ายทอดยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินระหว่างจุลินทรีย์ในโมดูลตัวผู้แบคทีเรียในดินหลังจากมีการเติมโมดูลสุกรที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะและสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินลงไป นอกจากนี้สาเหตุที่แบคทีเรียสามารถเกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ในภายหลังอาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทำให้มียีนส่วนที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะเกิดขึ้นโดยยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรียที่พบอยู่ในโมดูลสุกรเดิมนั้นอาจทำให้เกิดการถ่ายโอนยีน (gene transfer) จากแบคทีเรียที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินอยู่ก่อนแล้วสู่แบคทีเรียที่มีอยู่เดิมในดิน โดยยีนต้านทานที่ได้รับการถ่ายโอนมานี้อาจจะอยู่ในรูปแบบต่างๆ ที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ ฟาจพลาสมิด หรือ transposable element ที่สอดแทรกเข้าไปในส่วนต่างๆ ของจีโนม (genomic DNA) (Levy, 2000) นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าในทุกคำรับการทดลองของการทดลองที่ 1 นั้น จำนวนชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมโมดูลสุกรและสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (ภาพที่ 13) และในการทดลองที่ 1 นี้ไม่พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetE*, *tetK* และ *tetQ* ในทุกคำรับการทดลอง (ตารางที่ 11)

ในการทดลองที่ 2 ซึ่งมีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 20 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ซ้ำทุก 1 สัปดาห์ และทำการเก็บตัวอย่างดินเมื่อครบ 6 สัปดาห์ พบว่าการทดสอบในโมดูลสุกรที่นำมาทำศึกษานั้น พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetC*, *tetD*, *tetA*, *tetG*, *tetL*, *tetM* และ *tetO* เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 และในคำรับการทดลองที่มีการเติมโมดูลสุกรเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเพิ่มเติม (คำรับการทดลองที่ 1) เมื่อระยะเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetB* เพียงยีนเดียวที่ยังคงปรากฏอยู่ อาจเนื่องมาจากเมื่อไม่มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินซึ่งมีบทบาทในการเป็นตัวคัดเลือกยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในแบคทีเรีย (Levy, 1994) ทำให้แบคทีเรียไม่มีความจำเป็นต้องรักษา ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะดังกล่าวไว้ และเมื่อ

แบคทีเรียมีการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ในแบคทีเรียรุ่น (generation) ต่อๆ ไป จึงมีโอกาสนในการสูญเสียยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน เป็นผลให้การแพร่กระจายของยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินลดลงและไม่มีความสำคัญในแบคทีเรียด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ซึ่งการทดลองที่ 2 สอดคล้องกับการทดลองที่ 1 คือ ในตำรับทดลองที่มีการเติมมูลสุกรเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและเก็บตัวอย่างดินในวันที่ 40 ซึ่งจำนวนชนิดของยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีจำนวนลดลงหลังจากวันแรกที่มีการใส่มูลสัตว์ สำหรับตัวอย่างดินจากตำรับการทดลองที่มีการเติมมูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินซ้ำที่ความเข้มข้น 0.2, 20 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน (ตำรับการทดลองที่ 2, 3 และ 4) ที่ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างเมื่อครบ 6 สัปดาห์นั้น พบว่ามียีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetC*, *tetA*, *tetG*, *tetL*, *tetM* และ *tetO* ยังคงอยู่อย่างเห็นได้ชัด โดยยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิดดังกล่าวเป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในมูลสุกรเช่นกัน และการใส่สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินซ้ำในทุก 1 สัปดาห์นั้น ยังแสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินอาจจะยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิดที่พบในมูลสุกรยังคงปรากฏอยู่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ สำหรับยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetB*, *tetQ* และ *tetX* ในตำรับการทดลองที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งเป็นยีนที่ยังคงปรากฏอยู่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์เช่นกัน แต่ยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิดดังกล่าวเป็นชนิดที่ไม่พบในมูลสุกร ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่ายีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเหล่านี้มีอยู่เดิมในแบคทีเรียด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในมูลสุกร และเมื่อมีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินลงไปทุก 1 สัปดาห์ สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่เติมลงไปจะเข้ามามีบทบาทในการคัดเลือกให้ยีนดังกล่าวในแบคทีเรียด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินให้มีความสำคัญมากขึ้น ซึ่งการใส่สารปฏิชีวนะอย่างสม่ำเสมอจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการพัฒนาการด้านทานสารปฏิชีวนะในสิ่งมีชีวิต (Levy, 1994) อีกทั้งยีนด้านทานสารปฏิชีวนะที่พบดังกล่าวอาจจะมาจากแบคทีเรียด้านทานสารปฏิชีวนะซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ที่สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ และเป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในยีนบนจีโนมดีเอ็นเอ กระบวนการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ภายในระยะเวลาตั้งแต่ 1 สัปดาห์ขึ้นไป (Maisnier and Andersson, 2004) นอกจากนี้การเติมสารปฏิชีวนะทุก 1 สัปดาห์ อย่างสม่ำเสมอทำให้เกิดสภาพความกดดันในการอยู่รอดของแบคทีเรีย ส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถสืบทอดและมีการแลกเปลี่ยนยีนด้านทานสารปฏิชีวนะผ่านทางพลาสมิด และสารพันธุกรรมอื่นๆ เพื่อสร้างคุณสมบัติในการด้านทานสารปฏิชีวนะได้อย่างอิสระมากขึ้น (Davies, 1981) จากการศึกษาจำนวนชนิดของยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน พบว่าในทุกตำรับการทดลองในการทดลองที่ 2 จำนวนชนิดของยีนด้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมมูลสุกรและสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินซ้ำทุก 1 สัปดาห์ เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 (ภาพที่ 14)

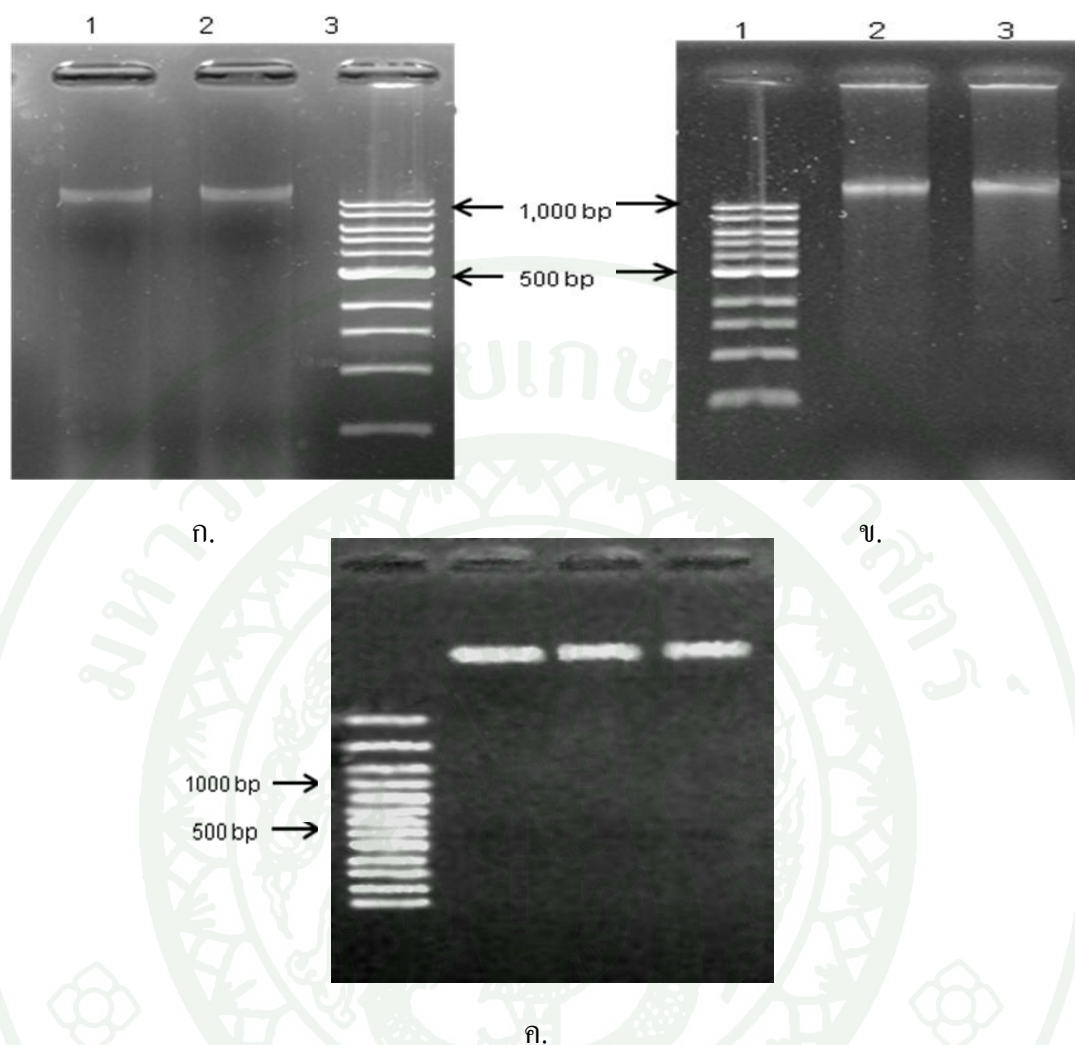
ซึ่งจากผลการทดลองดังที่กล่าวมาในข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการเติมมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างเพียงครั้งเดียวหรือการเติมซ้ำลงไปดิน ส่งผลต่อการเพิ่มการแพร่กระจายและความหลากหลายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเช่นเดียวกัน ในการทดลองที่ 2 ซึ่งเป็นการศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเนื่องจากการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างซ้ำ ไม่พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetE*, *tetK*, *tetS* และ *tetP* ในทุกตำรับการทดลองของการทดลองที่ 2 (ตารางที่ 12) และในการศึกษารั้งนี้ไม่ปรากฏ ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetE* และ *tetK* ในทุกตำรับการทดลองของการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2

จากการศึกษาการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในการทดลองที่ 1 พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetC*, *tetD*, *tetA*, *tetG*, *tetL*, *tetM* และ *tetO* อย่างสม่ำเสมอในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (0, 0.2, 20, 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน) และทุกระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง (0, 5, 15 และ 40 วัน) และในการทดลองที่ 2 ซึ่งมีการเติมสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินซ้ำทุก 1 สัปดาห์และเก็บตัวอย่างดินเมื่อครบ 6 สัปดาห์ พบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetB*, *tetC*, *tetA*, *tetO* และ *tetQ* อย่างสม่ำเสมอในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (0, 0.2, 20, 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน) โดยส่วนใหญ่ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินดังกล่าวจะเป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในมูลสัตว์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิดดังกล่าวเป็นยีนที่มีบทบาททำให้เกิดการคัดเลือกให้ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเกิดเป็นกลุ่มยีนที่มีความสำคัญ จึงพบยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิดดังกล่าวอย่างสม่ำเสมอในทุกช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างดิน นอกจากนี้ชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินยังสามารถบ่งบอกถึงแนวโน้มของกลไกการต้านทานสารปฏิชีวนะในกลุ่มสังคมสังคมจุลินทรีย์ในดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์อีกด้วย

ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetS*, *tetP* และ *tetX* ในการทดลองที่ 1 และยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินชนิด *tetS*, *tetP* และ *tetX* ในการทดลองที่ 2 ซึ่งเป็นยีนที่มีการพบอย่างไม่สม่ำเสมอ ซึ่งการเพิ่มหรือการลดลงของจำนวนชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเหล่านี้เมื่อเปรียบเทียบกับค่าควบคุม เป็นผลมาจากการแพร่กระจาย หรือการถ่ายโอน (gene transfer) ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะด้วยกลไกต่างๆ แสดงให้เห็นถึงการคัดเลือกลักษณะของการต้านทาน (resistance trait) ซึ่งกลไกในการถ่ายโอนยีนต้านทานสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียสู่สิ่งแวดลอมสามารถบ่งบอกถึงศักยภาพในการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะจากสัตว์สู่คนและจากคนสู่สัตว์ได้ (Teale, 2002) นอกจากนี้จำนวนชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะที่ยังคงอยู่ในกลุ่มสังคมจุลินทรีย์ในดินที่ศึกษา ยังสามารถบ่งชี้ถึงปริมาณ ความถี่ และความหลากหลายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่เคลื่อนย้ายสู่สิ่งแวดลอม (gene flow) เมื่อมีการตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นระดับหนึ่งและเป็นระยะเวลาช่วงหนึ่ง

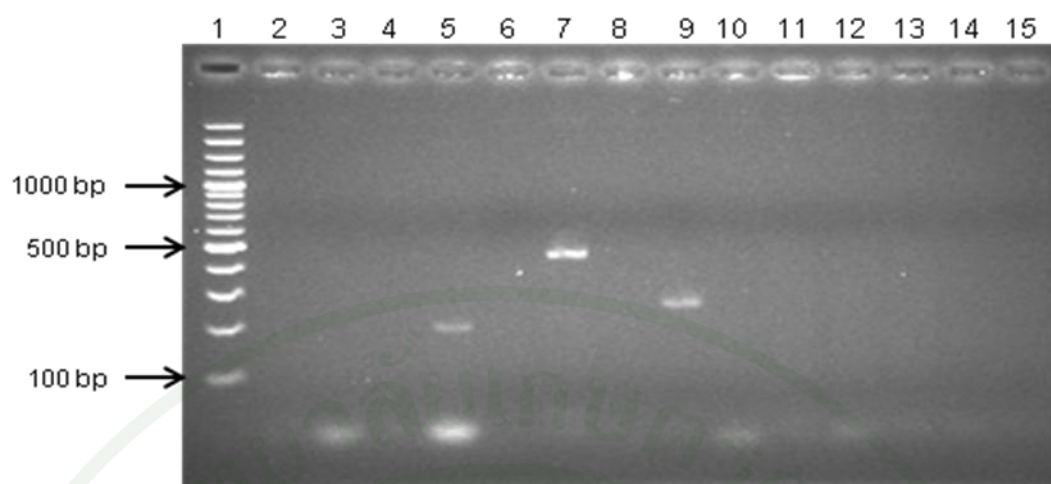
ตารางที่ 10 สมบัติทางเคมีของดินที่นำมาทดลอง

สมบัติทางเคมีที่ทำการวิเคราะห์	ค่าวิเคราะห์
pH (1:1 H ₂ O)	7.3
อินทรีย์วัตถุในดิน (เปอร์เซ็นต์)	1.26
ไนโตรเจนทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)	0.03
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (เปอร์เซ็นต์)	55
โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (เปอร์เซ็นต์)	1361

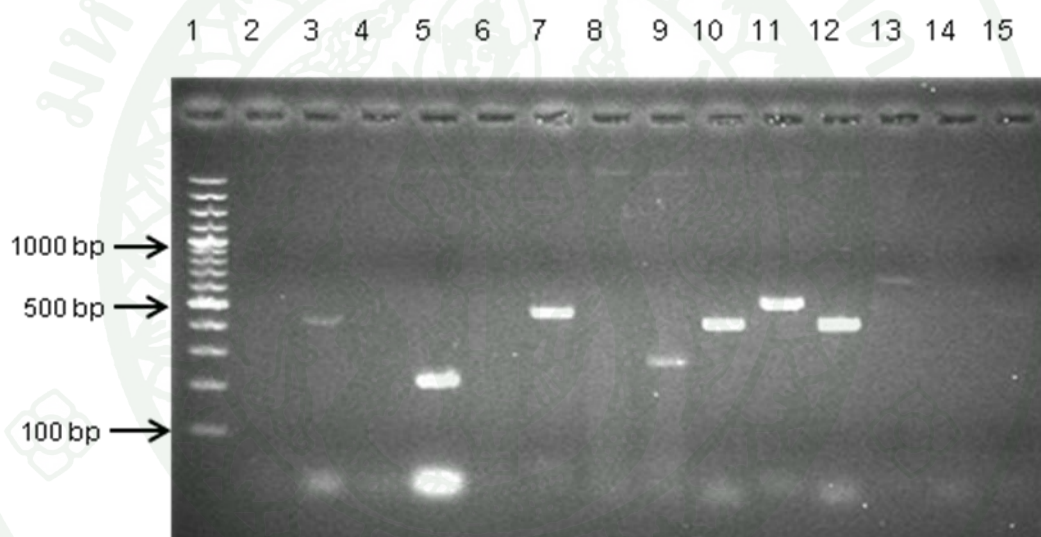


ภาพที่ 11 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดินบน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

- ก. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ใช้ของ Zhou *et al.* (1996) ช่องเจลที่ 1, ตัวอย่างดินที่ 1; ช่องเจลที่ 2, ตัวอย่างดินที่ 2; ช่องเจลที่ 3, ladder 100 bp (Fermentas, Maryland)
- ข. การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด SoilMaster™ DNA Extraction Kit (EPICENTRE Biotechnologies, USA) ช่องเจลที่ 1, ladder 100 bp (Fermentas, Maryland); ช่องเจลที่ 2, ตัวอย่างดินที่ 1; ช่องเจลที่ 3, ตัวอย่างดินที่ 2
- ค. การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA) ช่องเจลที่ 1, ladder 100 bp (Fermentas, Maryland); ช่องเจลที่ 2, ตัวอย่างดินที่ 1; ช่องเจลที่ 3, ตัวอย่างดินที่ 2; ช่องเจลที่ 4, ตัวอย่างดินที่ 3



ก.



ข.

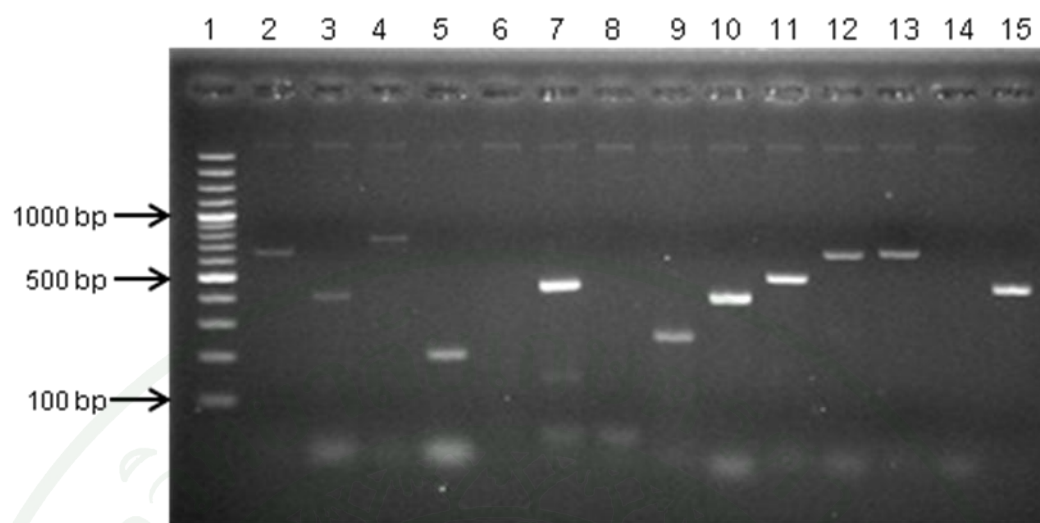
ภาพที่ 12 ผลผลิต PCR ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ช่องเจลที่ 1, ladder 100 bp (Fermentas, Maryland); 2, *tetB*; 3, *tetC*; 4, *tetD*; 5, *tetA*; 6, *tetE*; 7, *tetG*; 8, *tetK*; 9, *tetL*; 10, *tetM*; 11, *tetO*; 12, *tetS*; 13, *tetP*; 14, *tetQ* และ 15, *tetX* โดยที่

ก. ตัวอย่างดินที่ 0 วัน

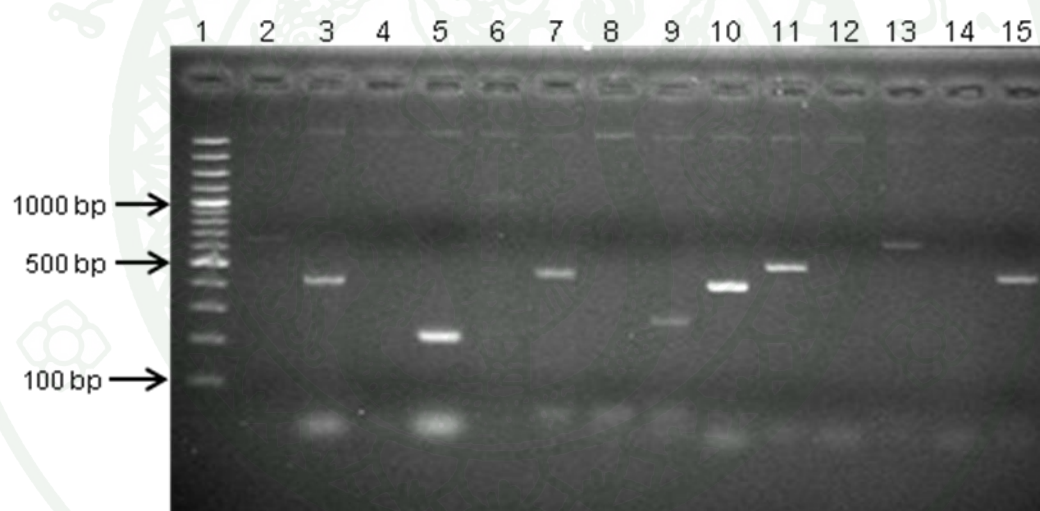
ข. ตัวอย่างดินที่ 5 วัน

ค. ตัวอย่างดินที่ 15 วัน

ง. ตัวอย่างดินที่ 40 วัน



ก.



ง.

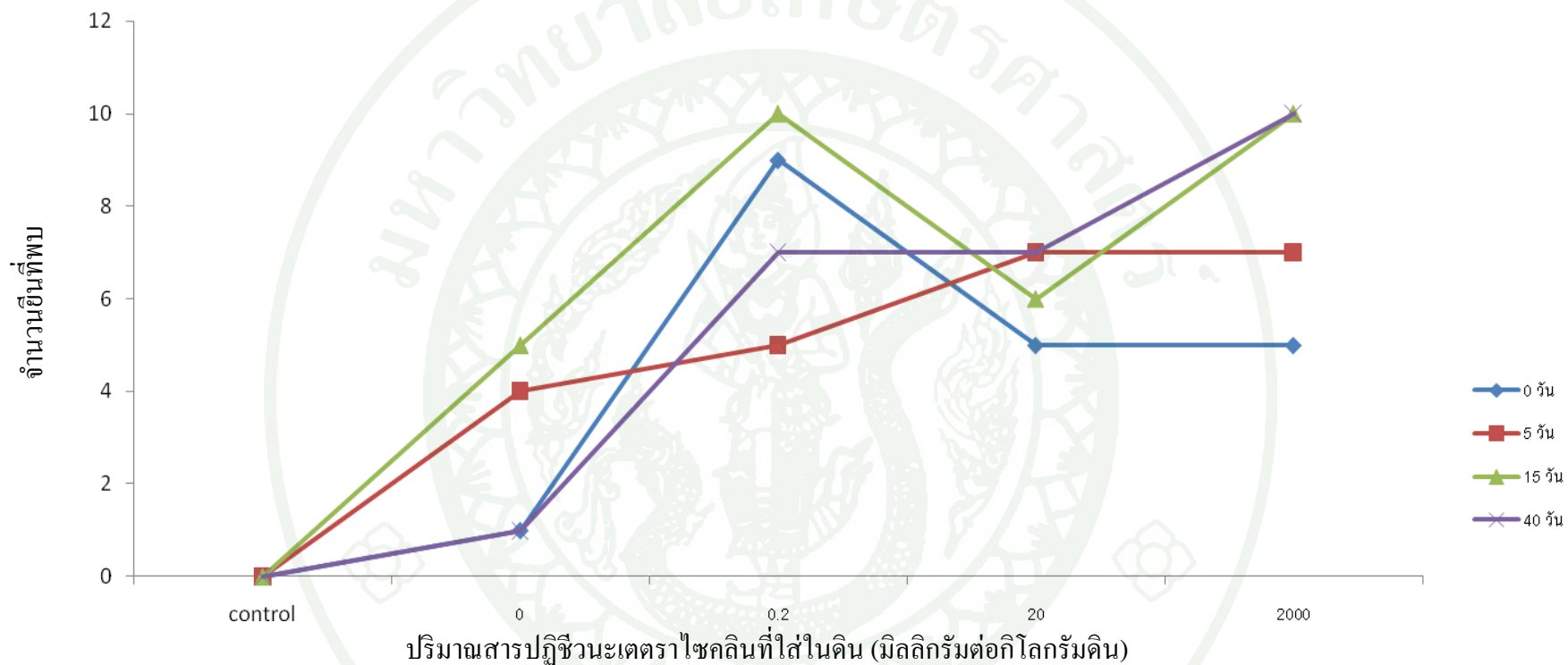
ภาพที่ 12 (ต่อ)

ตารางที่ 11 ชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินที่มีการใส่มูลสุกรและสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 0, 0.2, 20 และ 2000 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง 0, 5, 10, 15 และ 40 วัน

ยีนต้านทานสาร ปฏิชีวนะเตตราไซคลิน	ตัวรับควบคุม				ดิน + มูลสุกร + สารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน)																
	มูลสุกร	ดิน				0				0.2				20				2000			
		0	5	15	40	0	5	15	40	0	5	15	40	0	5	15	40	0	5	15	40
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>tetC</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetD</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>tetA</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetE</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetG</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetK</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetL</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>tetM</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>tetO</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>tetS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-

ตารางที่ 11 (ต่อ)

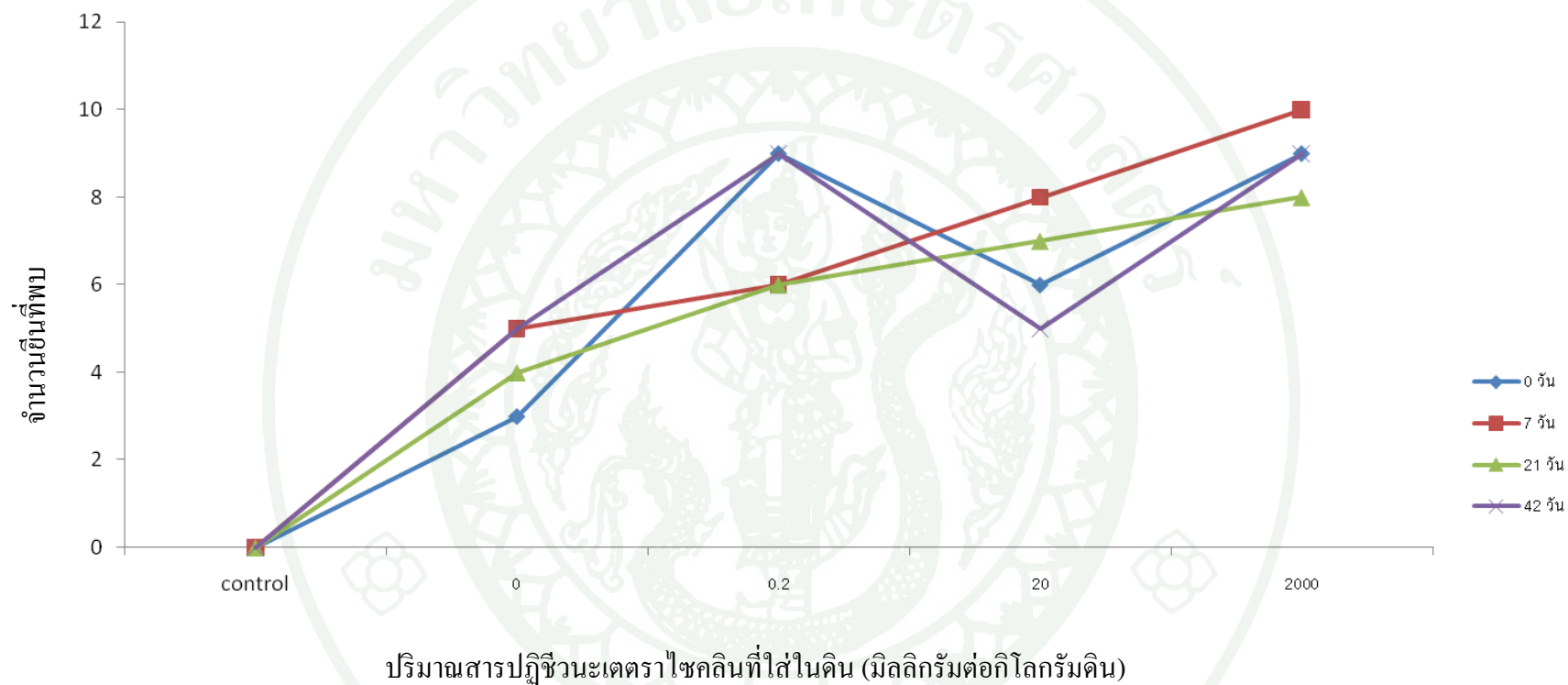
ชนิดต้านทานสาร ปฏิชีวนะเตตราไซคลิน	ตำรับควบคุม				ดิน + มูลสุกร + สารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน)																
	มูลสุกร	ดิน				0				0.2				20				2000			
		0	5	15	40	0	5	15	40	0	5	15	40	0	5	15	40	0	5	15	40
tetP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
tetQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tetX	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+



ภาพที่ 13 จำนวนชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ตรวจพบในดินของแต่ละการทดลองที่มีการเติมมูลสุกรที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างเพียงครั้งเดียว

ตารางที่ 12 ชนิดของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินในดินที่มีการใส่มูลสุกรและสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินซ้ำที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 20 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ทุก 1 สัปดาห์ที่ระยะการเก็บตัวอย่างดินเมื่อครบ 6 สัปดาห์

ยีนต้านทานสาร ปฏิชีวนะ เตตรา ไซคลิน	ตำรับการทดลอง		ดิน + มูลสุกร + สารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน)			
	ควบคุม		0	0.2	20	200
มูลสุกร	ดิน					
<i>tetB</i>	-	-	+	+	+	+
<i>tetC</i>	+	-	-	+	+	+
<i>tetD</i>	+	-	-	-	-	-
<i>tetA</i>	+	-	-	+	+	+
<i>tetE</i>	-	-	-	-	-	-
<i>tetG</i>	+	-	-	+	-	+
<i>tetK</i>	-	-	-	-	-	-
<i>tetL</i>	+	-	-	+	+	+
<i>tetM</i>	+	-	-	+	+	+
<i>tetO</i>	+	-	-	+	-	+
<i>tetS</i>	-	-	-	-	-	-
<i>tetP</i>	-	-	-	-	-	-
<i>tetQ</i>	-	-	-	+	-	+
<i>tetX</i>	-	-	-	+	+	+



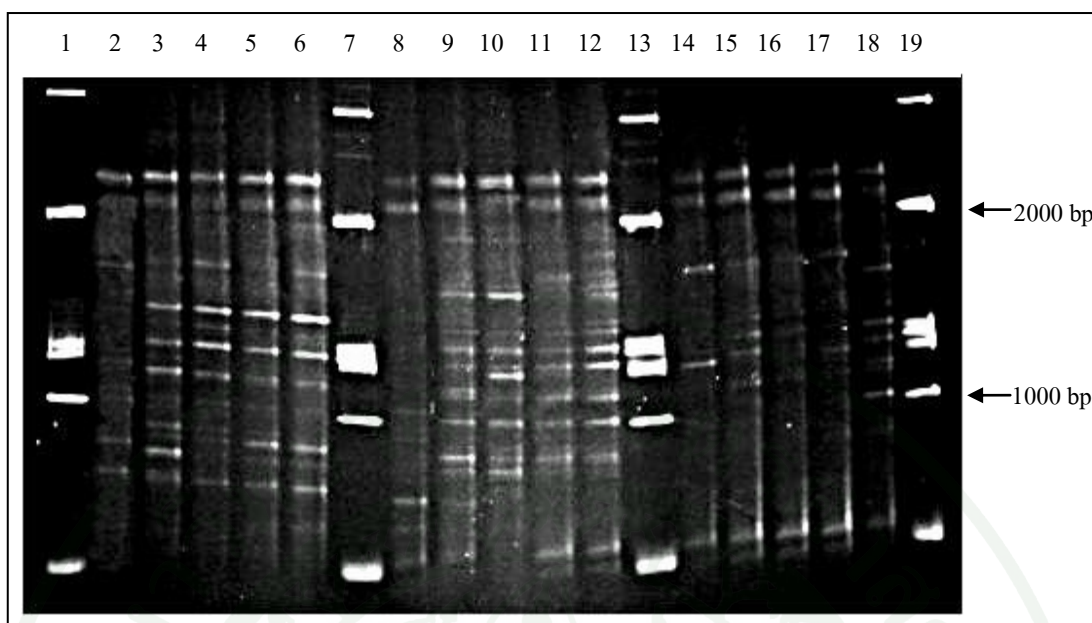
ภาพที่ 14 จำนวนชนิดของยีนต้านทานสารปุ๋ยชีวอะเตตราไซคลินที่ตรวจพบในดินของแต่ละคำรับการทดลองที่มีการเติมสารปุ๋ยชีวอะเตตราไซคลินซ้ำๆ

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์ในดินด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มสังคมจุลินทรีย์ในดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ ด้วยเทคนิค DGGE โดยเลือกดำเนินการทดลองจากระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่คาดว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์ชัดเจน ซึ่งเป็นตัวอย่างดินในคำรับควบคุม และดินที่มีการเติมมูลสุกร ร่วมกับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.2, 20 และ 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดิน ที่ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่ 0, 15 และ 40 วัน รวมจำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบตามระยะเวลาการเก็บตัวอย่างดินแล้ว พบว่าจำนวนแถบของยีน 16S rDNA ที่ปรากฏในระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0 วัน มีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป 15 วัน แต่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อระยะเวลาผ่านไป 40 วัน (ภาพที่ 15) โดยรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าวจะแสดงถึงความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน จำนวนแถบของยีน 16S rDNA ที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป 15 วัน และลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 40 วันนั้น แสดงถึงความหลากหลายของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป 15 วัน และลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 40 วัน และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ยีน 16S rDNA ตามความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่เติมลงไป ในมูลสัตว์แล้ว พบว่าจำนวนแถบของยีน 16S rDNA ที่ปรากฏในแต่ละความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ซึ่งแสดงให้เห็นถึงจำนวนชนิดของประชากรจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินไม่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่เติมลงไปพร้อมกับมูลสุกร

และจากการจัดกลุ่มสังคมจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories, USA) และวิเคราะห์ dendrogram เพื่อหาความสัมพันธ์ความคล้ายคลึงโดยแปลผลข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากภาพลายพิมพ์ยีน 16S rDNA ที่ทำการทดลองด้วยเทคนิค DGGE ซึ่งแถบของยีน 16S rDNA สามารถใช้แยกความแตกต่างของสังคมจุลินทรีย์แต่ละชนิดในตัวอย่างดิน เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มและศึกษาความสัมพันธ์ของสังคมจุลินทรีย์ในแต่ละคำรับการทดลอง โดยสามารถจัดกลุ่มสังคมจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินที่นำมาทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม และพบว่าตัวอย่างดินที่มาจากระยะเวลาการเก็บตัวอย่างเดียวกันจะมีกลุ่มสังคมจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน แม้ว่าจะมีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินแตกต่างกันก็ตาม (ภาพที่ 16)

ผลการศึกษาด้วยเทคนิค PCR ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินร่วมกับ DGGE บ่งบอกให้ทราบถึงการเคลื่อนย้ายและการได้รับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินจากแบคทีเรียในมูลสัตว์สู่แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นปัญหาที่น่าตระหนักถึงความเสี่ยงต่อความปลอดภัยของมนุษย์และสัตว์ต่างๆ ที่อยู่ในห่วงโซ่อาหาร จุลินทรีย์สามารถถ่ายโอนยีนต้านทานสารปฏิชีวนะระหว่างกันได้ง่ายในระบบนิเวศ หรือจากมนุษย์สู่สัตว์ และจากสัตว์สู่ดิน และสามารถเกิดขึ้นได้ในทางกลับกัน สิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ ซึ่งการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของแบคทีเรีย และส่งผลกระทบต่อสังคมจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในดิน (Hill and Top, 1998; Nwosu, 2001) อีกทั้งแบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะสามารถถ่ายโอนยีนผ่านทางพลาสมิด หรือ transposable element ไปยังแบคทีเรียอื่นอย่างต่อเนื่อง และเป็นวงกว้างในสิ่งแวดล้อม (Levy, 2000; Davies, 1994) โดยยีนดังกล่าวสามารถพบได้ในมูลสัตว์ แม้ว่าสัตว์จะไม่เคยได้รับสารปฏิชีวนะมาก่อนก็ตามดังรายงานของ Yvonne *et al.*, (2006) ซึ่งพบว่ามูลสัตว์ที่มีการตกค้างของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินเมื่อมีการใส่ลงสู่ดินจะส่งผลต่อการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินอีกด้วย และสิ่งที่น่าตระหนักก็คือยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะสามารถถูกถ่ายโอนไปยังแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในร่างกายมนุษย์โดยผ่านทางห่วงโซ่อาหาร น้ำดื่ม หรือแม้แต่การสัมผัส และการถ่ายโอนยีนต้านทานสารปฏิชีวนะไปสู่แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค (Endtz *et al.*, 1991; Shoemaker *et al.*, 1992; Bates *et al.*, 1994; Pathak and Gopal, 1994; Bager *et al.*, 1997; Van den Bogaard and Stobberingh 2000; Huffling, 2006)



ภาพที่ 15 รูปแบบลายพิมพ์ชิ้น 16S rDNA ที่ศึกษาด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ช่องเจลที่ 1 คือ ladder 100 bp (Fermentas, Maryland)

ช่องเจลที่ 2 คือ ตัวอย่างดินที่ได้รับการทดลองควบคุม ที่ระยะเวลา 0 วัน

ช่องเจลที่ 3 คือ ตัวอย่างดินจากตำรับการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรเพียงอย่างเดียวที่ระยะเวลา 0 วัน

ช่องเจลที่ 4 คือ ตัวอย่างดินจากตำรับการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินที่ระยะเวลา 0 วัน

ช่องเจลที่ 5 คือ ตัวอย่างดินจากตำรับการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินที่ระยะเวลา 0 วัน

ช่องเจลที่ 6 คือ ตัวอย่างดินจากตำรับการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินที่ระยะเวลา 0 วัน

ช่องเจลที่ 7 คือ ladder 100 bp (Fermentas, Maryland)

ช่องเจลที่ 8 คือ ตัวอย่างดินที่ได้รับการทดลองควบคุม ที่ระยะเวลา 15 วัน

ช่องเจลที่ 9 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรเพียงอย่างเดียว
ที่ระยะเวลา 15 วัน

ช่องเจลที่ 10 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสาร
ปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินที่
ระยะเวลา 15 วัน

ช่องเจลที่ 11 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสาร
ปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน
ที่ระยะเวลา 15 วัน

ช่องเจลที่ 12 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสาร
ปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน
ที่ระยะเวลา 15 วัน

ช่องเจลที่ 13 คือ ladder 100 bp (Fermentas, Maryland)

ช่องเจลที่ 14 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองควบคุม ที่ระยะเวลา 40 วัน

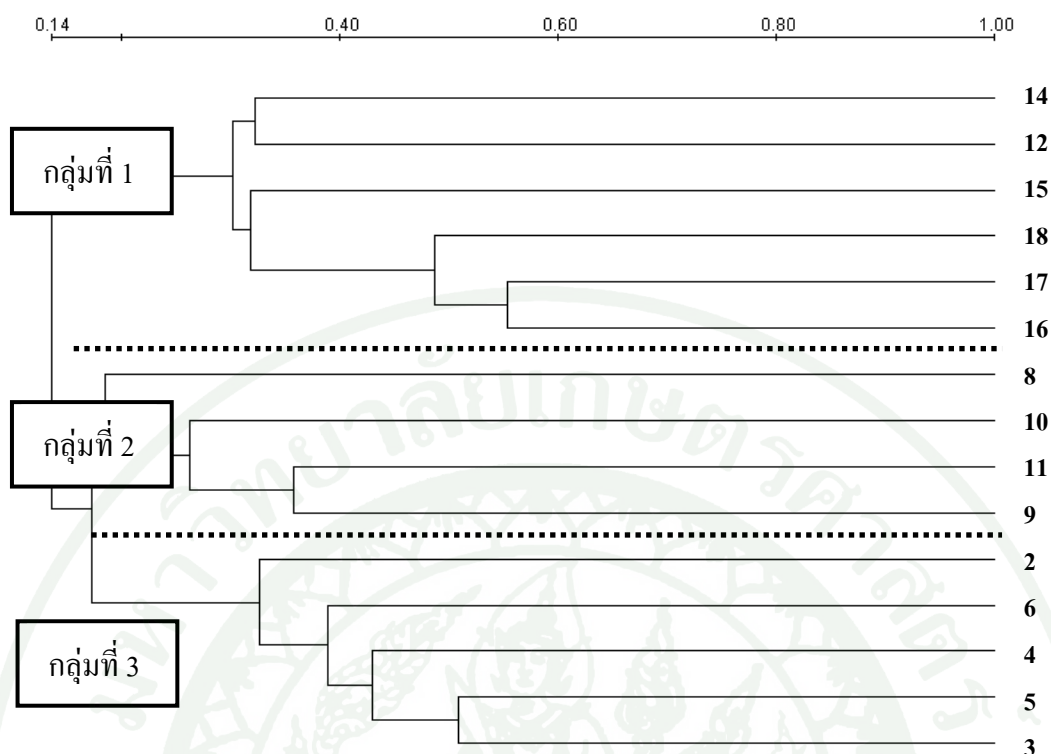
ช่องเจลที่ 15 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรเพียงอย่างเดียว
ที่ระยะเวลา 40 วัน

ช่องเจลที่ 16 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสาร
ปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน
ที่ระยะเวลา 40 วัน

ช่องเจลที่ 17 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสาร
ปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน
ที่ระยะเวลา 40 วัน

ช่องเจลที่ 18 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสาร
ปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน
ที่ระยะเวลา 40 วัน

ช่องเจลที่ 19 คือ ladder 100 bp (Fermentas, Maryland)



ภาพที่ 16 ภาพ dedrogram การจัดกลุ่มสายพันธุ์ 16S rDNA จากการวิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยใช้ Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories, USA) โดยตัวเลขแสดงถึงสายพันธุ์เอ็นเอแต่ละตัวรับการทดลอง ดังนี้

- 1 คือ ladder 100 bp (Fermentas, Maryland)
- 2 คือ ตัวอย่างดินดำรับควบคุม ที่ระยะเวลา 0 วัน
- 3 คือ ตัวอย่างดินจากดำรับการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรเพียงอย่างเดียว ที่ระยะเวลา 0 วัน
- 4 คือ ตัวอย่างดินจากดำรับการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะ เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลา 0 วัน
- 5 คือ ตัวอย่างดินจากดำรับการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะ เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลา 0 วัน
- 6 คือ ตัวอย่างดินจากดำรับการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะ เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลา 0 วัน
- 8 คือ ตัวอย่างดินดำรับการทดลองควบคุม ที่ระยะเวลา 15 วัน
- 9 คือ ตัวอย่างดินจากดำรับการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรเพียงอย่างเดียวที่ระยะเวลา 15 วัน

- 10 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะ
เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลา 15 วัน
- 11 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะ
เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลา 15 วัน
- 12 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะ
เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลา 15 วัน
- 14 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองควบคุม ที่ระยะเวลา 40 วัน
- 15 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรเพียงอย่างเดียว
ที่ระยะเวลา 40 วัน
- 16 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะ
เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลา 40 วัน
- 17 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะ
เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลา 40 วัน
- 18 คือ ตัวอย่างดินจากการทดลองที่มีการใส่มูลสุกรร่วมกับสารปฏิชีวนะ
เตตราไซคลิน ความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ที่ระยะเวลา 40 วัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การเติมปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างในการเกษตรที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 2 และ 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ตั้งแต่ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่ 0 วัน ถึง 40 วัน มีอิทธิพลต่อการเพิ่มความหลากหลายและการแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และการเติมปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินตกค้างในการเกษตรที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 2 และ 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินซ้ำทุก 1 สัปดาห์ มีอิทธิพลต่อการปรากฏอยู่ของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน

2. จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสังคมจุลินทรีย์ในดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ โดยใช้เทคนิค DGGE และจัดกลุ่มสังคมจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน พบว่าระยะเวลาการเก็บตัวอย่างดินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสังคมจุลินทรีย์ดินมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่เติมลงไป (0.2, 2, 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน) และสามารถจัดกลุ่มสังคมจุลินทรีย์ที่มีความใกล้เคียงกันจากตัวอย่างดินที่นำมาทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาต่อไปควรทำการวิเคราะห์และระบุชนิดของจุลินทรีย์จากลายพิมพ์ยีน โดยการ
ทำ 16S rDNA ที่เพิ่มขึ้นจากคำรับควบคุม และคงอยู่เป็นเวลานานที่ระดับความเข้มข้นของสาร
ปฏิชีวนะเตตราไซคลินต่ำที่สุด นอกจากนี้ควรวิจัยเกี่ยวกับความแตกต่างของชนิดดินที่มีผลต่อการ
แพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและการเปลี่ยนแปลงสังคมจุลินทรีย์ในดิน
ที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ รวมถึงศึกษาในสารปฏิชีวนะชนิดอื่นที่มีการใช้ในการเกษตร อีกทั้งการเพิ่ม
ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างดินอาจทำให้การแพร่กระจายของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน
และการเปลี่ยนแปลงสังคมจุลินทรีย์ในดินที่มีการใช้ปุ๋ยมูลสัตว์มีความชัดเจนยิ่งขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548. รายงานการจัดการทรัพยากรดินเพื่อการ
ปลูกพืชเศรษฐกิจหลักตามกลุ่มชุดดิน เล่มที่ 1 ดินบนพื้นที่ราบต่ำ. กรมพัฒนาที่ดิน,
กรุงเทพฯ.
- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2541. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 8. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะ
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และ จงรักษ์ จันท์เจริญสุข. 2542. แบบฝึกหัดและคู่มือปฏิบัติการ:
การวิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.
- เพชรรัตน์ ศักดินันท์, ตระการศักดิ์ พไธสง และ สิริลักษณ์ สายหงษ์. 2549. คลอเตตราไซคลิน
และออกซีเตตราไซคลินในอาหารสัตว์จาก 4 จังหวัดภาคตะวันตก. กรมปศุสัตว์ กระทรวง
เกษตรและสหกรณ์, ราชบุรี.
- มาลิน จุลศิริ. 2540. ยาด้านจุลชีพ ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์. ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- สมาคมผู้ค้าเวชภัณฑ์สำหรับสัตว์. 2549. **Feed Additives (Antimicrobial).** Animal Health
Products Association. แหล่งที่มา: <http://www.thaiahpa.com/main.php>, 1 ตุลาคม 2552.
- สุกัญญา จัตตพรพงษ์, วิไลลักษณ์ ชาวอุทัย, สมโภชน์ ทับเจริญ และ สุเจตน์ ชื่นชม. 2541.
การสำรวจสถานภาพและปัญหาการปนเปื้อนในอาหารสัตว์, น. 64-77. ใน การประชุมทาง
วิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อนิรุช เนืองเม็ก และ พรศิริ พรหมกิ่งแก้ว. 2548. การดื้อยาด้านจุลชีพของเชื้อซัลโมเนลลาจาก
ฟาร์มไก่เนื้อและสุกรในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์
ภาคเหนือ (ตอนบน), ลำปาง.

- Acea, M.J., C.R. Moore and M. Alexander. 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. **Soil Biol. Biochem.** 20: 509-515.
- Akiba, T., K. Koyama, Y. Ishiki, S. Kimura and T. Fukushima. 1960. On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. **Japan J. Microbiol.** 4: 219-227.
- Andersen, S.R. and R.A. Sandaa. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 908-912.
- Aoki, T., T. Satoh and T. Kitao. 1987. New tetracycline resistance determinant on R-plasmids from *Vibrio anguillarum*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 31: 1446-1449.
- Bager, F., M. Madsen, J. Christensen and F.M. Aarestrup. 1997. Avoparcin used as growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *E. faecium* on Danish poultry and pig farms. **Prev. Vet. Med.** 31: 95-112.
- Bartlett, M. and K. Stirling. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. **Methods Mol Biol.** 226: 3-6.
- Bates, J., J.Z. Jordens and D.T. Griffiths. 1994. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin resistant enterococcal infection in man. **J. Antimicrob. Chemother.** 34: 507-516.
- Batt, A.L., I.B. Bruce and D.S. Aga. 2006. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. **Environ. Pollut.** 142: 295-302.

- Bijan, Z., and G.D. Wright. 2008. Chemical biology of tetracycline antibiotics. **Cell Biol.** 86: 124-136.
- Bogosian, G., L.E. Sammons, P.J.L. Morris, J.P. O'Neill, M.A. Heitkamp and D.B. Weber. 1996. Death of *Escherichia coli* K12 strain W3110 in soil and water. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 4114-4120.
- Bossier, P. and W. Verstraete. 1996. Triggers for microbial aggregation in activated sludge. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45: 1-6.
- Bray, R.H. and L.T. Krutz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. **Soil Sci.** 59: 39-45.
- Brown, J.T. and M.C. Roberts. 1987. Cloning and characterization of *tetM* from a *Ureaplasma urealyticum*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 31: 1852-1854.
- Brown, M.B. and M.C. Roberts. 1991. Tetracycline resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland. **Vet. Microbiol.** 29: 173-180.
- Bryan, L.E. 1984. **Antimicrobial Drug Resistance.** Academic Press. London.
- Butler, M.J., E.J. Friend, I.S. Hunter, F.S. Kaczmarek, D.A. Sugden and M. Warren. 1989. Molecular cloning of resistance genes and architecture of a linked gene cluster involved in biosynthesis of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. **Mol. Gen. Genet.** 215: 231-238.
- Buu-Hoi, A., C. Le Bouguenec and T. Horaud. 1989. Genetic basis of antibiotic resistance in *Aerococcus uiridans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 33: 529-534.

- Chadwick, DJ., and J. Goode. 1997. Antibiotic resistance: origins, evolution, selection, and spread, Chap 1-3, 5, 8, 9. In John Wiley and Son, ed. **Ciba Foundation Symposium** 207, New York.
- Charpentier, E., G. Gerbaud and P. Courvalin. 1993. Characterization of a new class of tetracycline-resistance gene *tet(S)* in *Listeria monocytogenes* BM4210. **Gene**. 131: 27-34.
- _____. 1994. Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene *tet(S)* in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 38: 2330-2335.
- Chmielewsky, R.A.N. and J.F. Frank. 1995. Formation of viable but nonculturable *Salmonella* during starvation in chemically defined solutions. **Lett. Appl. Microbiol.** 20: 380-384.
- Chopra, I., and M. Robert. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 65: 232-260.
- _____, P.M. Hawkey and M. Hinton. 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. **J. Antimicrob. Chemother.** 29: 245-277.
- Chopra, I. 1994. Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. **Antimicrob. Agents Chemother.** 38: 637-640.
- Cindy, H.N., V. Torsvik and L.Vres. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 64: 1382-1388.
- Clewell, D.B., S.E. Flannagan and D.D. Jaworski. 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the *Tn916-Tn1545* family of conjugative transposons. **Trends Microbiol.** 3: 229-236.

- Clinton, N.A., R.W. Weaver, L.M. Zibilske and R.J. Hidalgo. 1979. Incidence of salmonellae in feedlot manure. **J. Environ. Qual.** 8: 480-481.
- Col, N.F. and R.W. O'Connor. 1987. Estimating worldwide current antibiotic usage: Report of task force 1. **Rev. Infect. Dis.** 9: 232-243.
- Colwell, R.R. 1993. Nonculturable but still viable and potentially pathogenic. **Zbl. Bakteri.** 279: 154-156.
- Cools, D. 2001. **Manure-derived antibiotic resistant bacteria: survival in soil and contamination of crop roots.** Ph.D. Thesis, Katholieke University.
- Cotta M.A., T.R. Whitehead and R.L. Zeltwanger. 2003. Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. **Environ. Microbiol.** 5:737-745.
- Crane, S.R., J.A. Moore, M.E. Grismer and J.R. Miner. 1983. Bacterial pollution from agricultural sources: A review. **Transactions of the ASAE.** 26: 858-866.
- Cuthbert, W.A., J.J. Panes and E.C. Hill. 1950. Survival of *Bacterium coli* type I and *Streptococcus faecalis* in soil. **J. Appl. Bacteriol.** 18: 408-414.
- Davies, J. 1981. R-Plasmids in hospitals. **Infection.** 9: 66-67.
- _____. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Sci.** 264: 375-382.
- De Barbeyrac, B., B. Dutilh, C. Quentin, H. Renaudin and C. Bebear. 1991. Susceptibility of *Bacteroides ureolyticus* to antimicrobial agents and identification of a tetracycline resistance determinant related to *tetM*. **J. Antimicrob. Chemother.** 27: 721-731.

De Paola, A. and M.C. Roberts. 1995. Class D and E tetracycline resistance determinants in gram-negative catfish pond bacteria. **Mol. Cell. Probes.** 9: 311-313.

De Paola, A., P.A. Flynn, R.A. Mc Pherarson and S.B. Levy. 1988. Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline- and oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. **Appl. Environ. Microb.** 54: 1861-1863.

_____, W.E. Hill and F.M. Harrell. 1993. Oligonucleotide probe determination of tetracycline-resistant bacteria isolated from catfish ponds. **Mol. Cell. Probes.** 7: 345-348.

Dewey, C.E., B.D. Cox, B.E. Straw, E.J. Budh and H.S. Hurd. 1997. Association between offlabel feed additives and farm size, veterinary consultant use and animal age. **Prev. Vet. Med.** 31: 133-146.

Dittrich, W. and H. Schrempf. 1992. The unstable tetracycline resistance gene of *Streptomyces licidans* 1326 encodes a putative protein with similarities to translational elongation factors and *tet*(M) and *tet*(O) proteins. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 1119-1124.

Doyle, D., K.J. McDowall, M.J. Bulter and I.S. Hunter. 1991. Characterization of an oxytetracycline-resistance gene, *otrA*, of *Streptomyces rimosus*. **Mol. Microbiol.** 5: 2923-2933.

Duggar, B.M. 1948. Aureomycin: a product of the continuing search for antibiotics. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 51: 177-181.

Endtz, H.P., G.J. Ruijs, B. van Klingeren, W.H. Jansen, T. van der Reyden and R.P. Mouton.

1991. Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. **J. Antimicrob. Chemother.** 27: 199-208.

European Federation of Animal Health (FEDESA). 1997. Antibiotics and animals. **European Federation of Animal Health.** FEDESA/FEFANA Press release, Brussels.

_____. 2001. Antibiotic use in farm animals does not threaten human health. **European Federation of Animal Health.** FEDESA/ FEFANA Press release, Brussels.

Facinelli, B., M.C. Roberts, E. Giovanetti, C. Casolari, U. Fabio and P.E. Varaldo. 1993. Genetic basis of tetracycline resistance in food borne isolates of *Listeria innocua*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 614-616.

Falkow, S. 1975. **Infectious Multiple Drug Resistance.** Pion Limited, London.

Feinmen, SE. 1998. Antibiotics in animal feed: drug resistance revisited. **ASM News.** 64: 24-30.

Fenlon, D.R., I.D. Ogden, A. Vinten and I. Svoboda. 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. **J. Appl. Microbiol.** 88: 149-156.

Fletcher, H.M. and L. Daneo-Moore. 1992. A truncated *Tn916-like* element in a clinical isolates of *Enterococcus faecium*. **Plasmid.** 27: 155-160.

Freeman, C.D., C.H. Nightingale and R. Quintiliani. 1994. Minocycline: old and new therapeutic uses. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 4: 325-335.

Genetics Home Reference, 2011. **What is DNA.** Available source: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/dna>. February 13, 2011.

George, G. 1998. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **CMAJ.** 159: 1129-1136.

Gerba, C.P. and G. Bitton. 1984. Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater. pp. 66-88. In C.P. Gerba and G. Bitton, ed. **Groundwater Pollution Microbiology.** New York.

Gillespie, JR. 1997. **Modern livestock and poultry production.** Delmar Publishing, New York.

Goss, M.J., D.A.J. Barry and D.L. Rudolph. 1998. Contamination in Ontario farmstead domestic wells and its association with agriculture: 1. Results from drinking water wells. **J. Contamin. Hydrol.** 32: 267-293.

_____, D.P. Stonehouse and J.C. Giraldez. 1996. **Managing Manure for Dairy and Swine-Towards Developing a Decision Support System.** SOS Publications, Fair Haven, New Jersey.

Goss, M.J., K.S. Rollins, K. McEwan, J.R. Shaw and H. Lammers-Helps. 2002. The management of manure in Ontario with respect to water quality. In Ritter L., K. Solomon, P. Sibley, and K. Hall. ed. **Ontario Ministry of the Attorney General.** Queen's Printer for Ontario, Toronto.

Haack B.J. and R.E. Andrews. 2000. Isolation of Tn916-like conjugal elements from swine lot effluent. **Can. J. Microbiol.** 46: 542-549.

- Hagedorn, C., T.D. Hansen and G.H. Simonson. 1978. Survival and movement of fecal indicator bacteria in soil under conditions of saturated flow. **J. Environ. Qual.** 7: 55-59.
- Halling-Sorensen, B., S. N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Luthoft and S.E. Jorgensen. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. **Chemosphere** 36: 357-393.
- Hansen, L.M., L.M. McMurphy, S.B. Levy and D.C. Hirsch. 1993. A new tetracycline resistance determinant, Tet H, from *Pasteurella multocida* specifying active efflux of tetracycline. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37: 2699-2705.
- Hanzawa Y., O.C. Ishiguro and G. Sato. 1984. Antibiotic-resistant coliforms in the waste of piggeries and dairy farms. **Jap. J. Vet. Sci.** 46: 363-372.
- Hartmann, A., E.M. Golet and S. Gartiser. 1999. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital waste waters. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 36: 115-119.
- Heike, S., K. Stoob, G. Hamscher, E. Smit and W. Seinen. 2006. Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. **Micro. Ecol.** 51: 267-276.
- Helms, C. 1990. **Method: denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)**. Available source: http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/dgge/dgge, July 1, 1990.
- Herman G., F. Matus, V.S. Robert and E. Monique. 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. **ESAC Project Group.** 365: 579-587.

Hill, K.E. and E.M. Top. 1998. Gene transfer in soil systems using microcosms.

FEMS Microbiol. Ecol. 25: 319-329.

Holben, W.E., J.K. Jansson, B.K. Chelm and J.M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community.

Appl. Environ. Microbiol. 54: 703-711.

_____. 1994. Isolation and purification of bacterial DNA from soil. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 727-751.

Horaud, T., G. de Cerspedes, D. Clermont, F. David and F. Delbos. 1991. Variability of chromosomal genetic elements in streptococci, pp. 16-20. *In* G.M. Dunne, P.P. Cleary and L.L. McKay, ed. **Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci**. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Huffling, K. 2006. The effects of environmental contaminants on women's health.

J. Midwifery and Women's Health. 51: 19-25.

Jackson, M.L. 1965. **Soil Chemical Analysis-Advanced Course**. Department of Soils, University of Wisconsin.

Jareonmit, P., K. Sajjaphan and Michael J. Sadowsky. 2010. Bacterial community structure and diversity of arsenic resistant bacteria in an old tin mined area of Thailand.

J. Microbiol. Biotechnol. 20: 169-178.

Jiang, X. and T-J. Chai. 1996. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, non-culturable cells. **Appl.**

Environ. Microbiol. 62: 1300-1305.

Jones, C.S., D.J. Osborne and J. Stanley. 1992a. Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. **Mol. Cell. Probes.** 6: 313-317.

_____, _____ and _____. 1992b. Cloning of a probe for a previously undescribed enterobacterial tetracycline resistance gene. **Lett. Appl. Microb.** 15: 106-108.

Jorgensen, S.E. and B. Halling-Sorensen. 2000. Drugs in the environment. **Chemosphere.** 40: 691-699.

Joseph, S. and D.W. Russel. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3rd ed. Cold Spring Harbor, Press, New York.

Kariuki, S., N.B. Mirza, Y. Wasteson, D. Senerwa, J.M. Gathurea and O. Olsvik. 1992. Tetracycline resistance genes in Kenyan hospital isolates of *Salmonella phimurium*. **APMIS.** 100: 629-634.

Kisker, C., W. Hinrichs, K. Tovar, W. Hillen and W. Saenger. 1995. The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg²⁺ reveals mechanism of antibiotic resistance. **J. Mol. Biol.** 247: 260-280.

Klein, N.C. and B.A. Cunha. 1995. Tetracyclines. **Med. Clin. N. Am.** 79: 789-801.

Kucers A, S. M. Crowe, M. L. Grayson and J. F. Hoy. 1997. **The use of antibiotics : a clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs.** Butterworth-Heinemann. Co., London.

Kummerer, K. 2001. **Pharmaceuticals in the Environment; Sources, Fate, Effects and Risks.** Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York.

- _____ and A. Henninger. 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. **Clin. Microbiol. Infect.** 9: 1203-1214.
- Lachica, R.V. 1990. Significance of hydrophobicity in the adhesiveness of pathogenic Gram-negative bacteria, pp. 297-314. In R.J. Doyle and M. Rosenberg, ed. **Microbial Cell Surface Hydrophobicity**. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lacroix, J.M. and C.B. Walker. 1993. Detection and incidence of the tetracycline resistance determinant *tet(M)* in the microflora associated with adult periodontitis. **J. Period.** 66: 102-108.
- Lai, X., X. Zeng, S. Fang, Y. Huang, L. Cao and S. Zhou. 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of bacterial community composition in deep sea sediments of the South China Sea. **World J. Microbiol Biotechnol.** 22: 1337-1345
- Le Bouguenec, C., G. de Cespèdes and T. Horaud. 1990. Presence of chromosomal elements resembling the composite structure *Tn3701* in streptococci. **J. Bacteriol.** 172: 727-734.
- Lee, C., B.E. Langlois and K.L. Dawson. 1993. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1467-1472.
- Levanon, D., D.D. Meisinger, E.E. Codling and J.L. Starr. 1994. Impact of tillage on microbial activity and the fate of pesticides in the upper soil. **Water Air Soil Pollut.** 72: 179-189.
- Levy, S.B., A. Buu-Hoi and B. Marshall. 1984. Transposon Tn/0-like tetracycline resistance determinants in *Haemophilus parainfluenzae*. **J. Bacteriol.** 160: 87-94.

- _____. 1988. Tetracycline resistance determinants are widespread. **ASM News**. 54: 418-421.
- _____. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 695-703.
- _____. 1992. **The Antibiotic Paradox: How Miracle Drugs are Destroying the Miracle**. Plenum Press, New York.
- _____. 1994. Balancing the drug resistance equation. **Trends Microb.** 2: 341-324.
- Levy, S.B. 1998. The challenge of antibiotic resistance. **Sci Am.** 278: 46-53.
- _____. 2000. Antibiotic and antiseptic resistance: Impact on public health. **Ped. Infect. Dis. J.** 19: 120-122.
- Lima, A.A.M., N.L. Lima, M.C. Pinho, E.A. Barros Jr., M.J. Teixeira, M.C.V. Marins and R.L. Guerrant. 1995. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. **Antimicrob. Agents Chemother.** 39: 256-259.
- L. K. Ng, I. Martin, M. Alfa and M. Mulvey. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Mol. Cell. Probes** 15: 209-215.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko and J. Parker. 1997. **Brock Biology of Microorganisms**, 8th ed. Prentice Hall International Inc., USA.
- Maisnier, P.S. and D.I. Andersson. 2004. Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution. **Res. Microbiol.** 155: 360-369.

- Mawdsley, J.L., R.D. Bardgett, R.J. Merry, B.F. Pain and M.K. Theodorou. 1995. Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. **Appl. Soil Ecol.** 2: 1-15.
- Marshall, B., C. Tachibana and S.B. Levy. 1983. Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. **Antimicrob. Agents Chemother.** 24: 835-840.
- _____, M. Roberts, A. Smith and S.B. Levy. 1984. Homogeneity of tetracycline-resistance determinants in *Haemophilus* species. **J. Infect. Dis.** 149: 1028-1029.
- Martinez, S.J.M., G. Alvarez and M.C. Gomez-Eichelmann. 1986. Frequency of four classes of tetracycline resistance determinants in *Salmonella* and *Shigella* spp. clinical isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** 30: 630-631.
- Mellon, M., C. Benbrook and K.L. Benbrook. 2001. **Hogging It: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock.** Union of Concerned Scientists, Washington, D.C.
- Mendez, B., C. Tachibana and S.B. Levy. 1980. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. **Plasmid** 3: 99-108.
- Mulvey M. R. and A. E. Simor. 2009. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?. **CMAJ.** 180: 408-419.
- Morse, S.A., S.R. Johnson, J.W. Biddle and M.C. Roberts. 1986. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* due to the acquisition of the *tetM* determinant. **Antimicrob. Agents Chemother.** 30: 664-670.
- Murry Jr, A.C. and L.S. Hinckley. 1992. Effect of the earthworm *Eisenia foetida* on *Salmonella enteritidis* in horse manure. **Bioresour. Technol.** 41: 97-100.

- Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 695-700.
- _____ and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek.** 73: 127-141.
- Needham, C., M., Rahman, K.G.H. Dyke and W.C. Noble. 1994. An investigation of plasmids from *Staphylococcus aureus* that mediate resistance to mupirocin and tetracycline. **Microbiology** 140: 2577-2583.
- Neu, HC. 1992. The crisis in antibiotic resistance. **Science** 257: 1064-1073.
- Nodar, R., M.J. Acea and T. Carballas. 1992. Poultry slurry microbial population: composition and evolution during storage. **Bioresour. Technol.** 40: 29-34.
- Nwosu, V.C. 2001. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. **Res. Microbiol.** 152: 421-430.
- Oliva, B., G. Gordon, P. McNicholas, G. Ellestad and I. Chopra. 1992. Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 913-919.
- Olsvik, B., I. Olsen and F.C. Tenover. 1994. *tet(Q)* gene in bacteria isolated from patients with refractory periodontal disease. **Oral. Microbiol. Immunol.** 9: 251-255.
- Ostling, C.E. and S.E. Lindgreen. 1991. Bacteria in manure and on manured and NPK fertilised silage crops. **J. Sci. Food Agric.** 55: 579-588.

Pang, Y., B.A. Brown, V.A. Steingrube and R.J. Wallace and M.C. Roberts. 1994. Acquisition of gram-positive tetracycline resistance genes in *Mycobacterium* and *Streptomyces* species. **Antimicrob. Agents Chemother.** 38: 1408-1412.

_____, T. Bosch and M.C. Roberts. 1994. Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline resistant determinants *tetK* and *tetL*. **Mol. Cell. Probes.** 8: 417-422.

Park J.W. and D.E. Crowley. 2005. Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification of target genes by real-time PCR and DGGE. **Bio.Techniques.** 38:579-586.

Pathak, S.P. and K. Gopal. 1994. Antibiotic resistance and metal tolerance among coliform sp. from drinking water in a hilly area. **J. Environ. Biol.** 15: 139-147.

Patni, N.K., H.R. Toxopeus and P.Y. Jui. 1985. Bacterial quality of runoff from manured and non-manured cropland. **Trans. ASAE.** 28: 1871-1877.

Pavlov, A.R., N.V. Pavlova, S.A. Kozyavkin and A.I. Slesarev. 2004. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. **Trends Biotechnol.** 22: 253-260.

_____, _____, _____ and _____. 2006. Thermostable DNA Polymerases for a Wide Spectrum of Applications: Comparison of TopoTaq to other enzymes, pp. 241-257. In Kieleczawa, J., ed. **DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup.** Jones and Bartlett Publishers, New Jersey.

- Pioletti, M., F. Schlunzen, J. Harms, R. Zarivach, M. Gluhmann, H. Avila, A. Bashan, H. Bartels, T. Auerbach, C. Jacobi, T. Hartsch, A. Yonath and F. Franceschi. 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. **EMBO J.** 2: 1829-1839.
- Pratt P.E. 1965. Potassium, pp. 1022-1030. In C.A. Black, ed. **Method of Soil Analysis. Part II. Chemical and Microbiology Properties.** Agron. Amer. Soc. of Agron. Inc., Wisconsin, U.S.A.
- Prescott, L.M. 2002. **Microbiology.** McGraw-Hill Publishing Co., New York.
- Priya and D.S. Shiladitya. 2007. **Antibiotics in Action: teacher's manual with student guide.** Carolina publications Co., North Carolina.
- Rattray, E.A., J.I. Prosser, L.A. Glover and K. Killham. 1992. Matric potential in relation to survival and activity of a genetically modified microbial inoculum in soil. **Soil Biol. Biochem.** 24: 421-425.
- Recorbet, G., C. Steinberg and G. Faurie. 1992. Survival in soil of genetically engineered *Escherichia coli* as related to inoculums density, predation and competition. **FEMS Microbiol. Lett.** 101: 251-260.
- Reynes, J.P., T. Calmels, D. Drocourt and G. Tiragy. 1988. Cloning expression in *Escherichia coli* and nucleotide sequence of a tetracycline-resistance gene from *Streptomyces rimosus*. **J. Gen. Microbiol.** 134: 585-598.
- Richardson, M.L. and J.M. Bowron. 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the environment. **J. Pharm. Pharmacol.** 37: 1-12.

Roberts, M.C. and A.L. Smith. 1980. Molecular characterization of plasmid-free antibiotic resistant *Haemophilus influenzae*. **J. Bacteriol.** 144: 476-479.

_____, B.J. Moncla and S.L. Hillier. 1991. Characterization of unusual tetracycline resistant gram-positive bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** 35: 2655-2657.

_____, L.V. McFarland, P. Mullany and M.E. Mulligan. 1994. Characterization of the genetic basis of antibiotic resistance in *Clostridium difficile*. **J. Antimicrob. Chemother.** 33: 419-429.

_____ and G.E. Kenny. 1986. Dissemination of the *tetM* tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 29:350-352.

Roberts, M.C. and G.E. Kenny. 1987. Conjugal transfer of transposon *Tn916* from *Streptococcus faecalis* to *Mycoplasma hominis*. **J. Bacteriol.** 169: 3836-3839.

_____, R.B. Leonard, A.M. Briselden, F.D. Schoenknecht and M.B. Coyle. 1992. Characterization of antibiotic resistant *Corynebacterium striatum*. **J. Antimicrob. Chemother.** 30: 463-474.

_____, S.L. Hillier, J. Hale, K.K. Holmes and G.E. Kenny. 1986. Tetracycline resistance and *tetM* in pathogenic urogenital bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** 30: 810-812.

Roberts, M.C. and S.L. Hillier. 1990. Genetic basis of tetracycline resistance in urogenital bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** 34: 261-264.

_____, Y. Pang, D.E. Riley, S.L. Hillier, R. Berger and J.N. Krieger. 1993. Detection of *tetM* and *tetO* tetracycline resistance genes by polymerase chain reaction. **Mol. Cell. Probes.** 7: 387-393.

- _____, _____, R.C. Spencer, T.G. Winstanley, B.A. Brown and R.J. Wallace. 1991. Tetracycline resistance in *Moraxella catarrhalis* demonstration of two clonal outbreaks using pulsed-field gel electrophoresis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 35: 2453-2455.
- _____. 1989. Gene transfer in the urogenital and respiratory tract, pp. 347-375. In: S. Levy and R.V. Miller, ed. **Gene Transfer in the Environment**. McGraw-Hill Publishing Co., New York.
- _____. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol. Rev.** 19: 1-24.
- Roderick I., Mackie, K. Satoshi, K. Ivan, C. Joanne, M. Scott Maxwell, I. Rustam and F. Aminov. 2006. Tetracycline Residues and Tetracycline Resistance Genes in Groundwater Impacted by Swine Production Facilities. **Ani. Biotechnol.** 17: 157-176.
- Roe, D.E., M.C. Roberts, P. Braham and A. Weinberg. 1995. Characterization of tetracycline resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immun.** 10: 227-232.
- Ruprich, A. 1994. **Field studies on the infiltration capacity and the viability of faecal germs in soil after Manure fertilization**. Ph.D. Thesis, University of Hohenheim.
- Sakaguchi R. and K. Shishido. 1988. Molecular cloning of a tetracycline-resistance determinant from *Bacillus subtilis* chromosomal DNA and its expression in *Escherichia coli* and *B. subtilis*. **Biochim. Biophys. Acta.** 949: 9-57.

- Salyers, A.A., N.B. Shoemaker, A.M. Stevens and L.Y. Li. 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. **Microbiol. Rev.** 59: 579-590.
- Sanchez, P.R., J.T. Brown, M. Roberts and M.S. Urdea. 1988. Homology of the *tetM* with translational elongation factors: implications for potential modes of *tetM* conferred tetracycline resistance. **Nucleic Acids Res.** 16: 1218.
- Schwarz, S., M. Cardoso and H.C. Wegener. 1992. Nucleotide sequence and phylogeny of *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hvicus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 580-588.
- Scott, C.A., H.V. Smith and H.A. Gibbs. 1994. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckler cows. **Vet. Rec.** 134: 172-175.
- Sengelov, G., Y. Agerso, B. Hilling-Sorensen, S.B. Baloda, J.S. Andersen and L.B. Jensen. 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. **Environ. Int.** 28: 587-595.
- Shoemaker, N.B., G. Wang and A.A. Salyers. 1992. Evidence for the natural transfer of a tetracycline resistance gene between bacteria from the human colon and bacteria from the bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 1313-1320.
- Shrestha, S., R.S. Kanwar, C. Cambardella, T.B. Moorman and T.E. Loynachan. 1997. Effect of swine manure application on nitrogen and bacterial leaching through repacked soil columns. *In* **Asae Annual International Meeting**. St JosephH: American Society of Agricultural Engineers, Inc., Minnesota.
- Sjogren, R.E. and M.J. Gibson. 1981. Bacterial survival in a dilute environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 41: 1331-1336.

- _____. 1994. Prolonged survival of an environmental *Escherichia coli* in laboratory soil microcosms. **Water Air Soil Pollut.** 75: 389-403.
- Sloan, J., L.M. McMurry, D. Lyras, S.B. Levy and J.I. Rood. 1994. The *Clostridium perfringens* *tetP* determinant comprises two overlapping genes: *tetA(P)*, which mediates active tetracycline efflux, and *tetB(P)*, which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants. **Mol. Microbiol.** 11: 403-415.
- Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer and G. Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **AEM.** 67: 4742-4751.
- Smith, J.A., D.M. Tuck, P.R. Jaffe and R.T. Mueller. 1991. Effect of surfactants on the mobility of nonpolar organic contaminants in porous media. pp. 201-230. In R.A. Baker, ed. **Organic Substances and Sediments in Water.** Humics and Soils, Lewis Publishers, Chelsea.
- Soda, S., H. Watatani, M. Ike and M. Fujita. 1998. Factors affecting the survival of exogenous bacteria in microbial ecosystems: existence of indigenous bacteria with antagonistic activity. **Biocontrol Sci.** 3: 63-72.
- Sorum, H., M.C. Roberts and J.H. Crosa. 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 611-615.
- Speer, B.S., L. Bedzyk and A.A. Salters. 1991. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP requiring oxidoreductase. **J. Bacteriol.** 173: 176-183.

- Steffan, R. J. and R.M. Atlas. 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 2185-2191.
- Stuart, B.L., M.M. Laura, M.B.Teresa, V. Burdett, P. Courvalin, W. Hillen, C.R. Marilyn, I.R. Julian and E.T. Diane. 1999. Nomenclature for New Tetracycline Resistance Determinants. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 1523-1524.
- Sun, H. Y., S. P. Deng and W. R. Raun. 2004. Bacterial community structure and diversity in a century old manure treated agroecosystem. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 5868-5874.
- Sutton, M.D. 1983. Phytopathogens and weed seeds in manure. pp. 109-114. **In Nation Research Council of Canada Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality, Farm Animal Manures in the Canadian Environment.** Environmental Secretariat, Ottawa.
- Taylor, D.E and P. Courvalin. 1988. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. **Antimicrob. Agents Chemother.** 32: 1107-1112.
- Teale, C.J. 2002. Antimicrobial resistance and the food chain. **J. Appl. Microbiol. Symposium Suppl.** 92: 85-89.
- Tenover, F.C. and J.E. McGowan. 1996. Reasons for the emergence of antibiotic resistance. **Am. J. Med. Sci.** 311: 9-16.
- Tenuta, M. and G. Lazarovits. 2002. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. **J. Phytopathol.** 92: 255-264.
- Thomas, H. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicol. Lett.** 131: 5-17.

Thomas, T. 2008. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff bases, and a century of β -Lactam synthesis.

Angew. Chem. Int. Ed. 47: 1016-1020.

Tsai, Y.L. and B.H. Olson. 1992. Detection of low numbers of bacterial numbers in soils and sediments by polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 754-757.

Unc, A. and J.G. Michael. 2004. Transport of bacteria from manure and protection of water resources. **Appl. Soil. Ecol.** 25: 1-18.

Unc, A. 1999. **Transport of faecal bacteria from manure through the vadose zone.** M.Sc. Thesis, University of Guelph.

Union of Concerned Scientists. 2001. **70 Percent of all antibiotics given to healthy livestock.** Press release, Cambridge.

U.S. Office of Technology Assessment. 1995. **Impacts of antibiotic-resistant bacteria.** Chap 1, 2, 7. US Government Printing Office, Washington, D.C.

Van den Bogaard, A.E. and E.E. Stobberingh. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics-link between animals and humans. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 14: 327-335.

Walkley, A. and C.A. Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chroma acid titration method. **Soil Sci.** 37: 29-35.

Watanabe, T. 1963. Infectious heredity of multiple drug resistance in bacteria. **Bacteriol. Rev.** 27: 87-115.

Weigel, T. 1995. **Investigations of the infiltration behavior of microorganisms in soils using pits and laboratory tests, and a self-developed prototype for sampling without secondary contamination.** Ph.D. Thesis, University of Hohenheim, Germany.

Wise, R. 2002. Antimicrobial resistance: priorities for action. **J.Antimicrob.Chemoth.** 49: 585-586.

Witte, W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science.** 279: 996-997.

Yvonne A., G. Wulff, E. Vaclavik, B. Halling-Sorensen and L.B. Jensen. 2006. Effect of tetracycline residues in pig manure slurry on tetracycline-resistant bacteria and resistance gene *tet* (M) in soil microcosms. **Environ. Int.** 32: 876-882.

Zhao, J. and T. Aoki. 1992. Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from *Vibrio anguillarum*. **Microbiol. Immunol.** 36: 1051-1060.

Zhao, J., A.N. Mary and M.T. James. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. **AEM.** 62: 316-322.



ตารางผนวกที่ 1 ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยา

ระดับ (rating)	พิสัย (range)
เป็นกรดรุนแรงมากที่สุด (ultra acid)	<3.5
เป็นกรดรุนแรงมาก (extremely acid)	3.5 - 4.5
เป็นกรดจัดมาก (strongly acid)	4.5 - 5.0
เป็นกรดจัด (strongly acid)	5.1 - 5.5
เป็นกรดปานกลาง (moderately acid)	5.6 - 6.0
เป็นกรดเล็กน้อย (slightly alkaline)	6.1 - 6.5
เป็นกลาง (neutral)	6.6 - 7.3
เป็นด่างเล็กน้อย (slightly alkaline)	7.4 - 7.8
เป็นด่างปานกลาง (moderately alkaline)	7.9 - 8.4
เป็นด่างจัด (strongly alkaline)	8.5 - 9.0
เป็นด่างจัดมาก (very strongly alkaline)	>9.0

ที่มา: คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2541)

ตารางผนวกที่ 2 อินทริยวัตถุ (%)

ระดับ (rating)	พิสัย (%)
ต่ำมาก (VL)	<0.5
ต่ำ (L)	0.5 - 1.0
ค่อนข้างต่ำ (ML)	1.0 - 1.5
ปานกลาง (M)	1.5 - 2.5
ค่อนข้างสูง (MH)	2.5 - 3.5
สูง (H)	3.5 - 4.5
สูงมาก (VH)	>4.5

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%)

ระดับ (rating)	พิสัย (%)
ต่ำมาก (VL)	<0.1
ต่ำ (L)	0.1 - 0.2
ปานกลาง (M)	0.2 - 0.5
สูง (H)	0.5 - 0.75
สูงมาก (VH)	>0.75

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Available P) (Bray II)

ระดับ (rating)	ฟิสัย (%)
ต่ำมาก (VL)	<3
ต่ำ (L)	3 – 5
ค่อนข้างต่ำ (ML)	6 – 10
ปานกลาง (M)	11 – 15
ค่อนข้างสูง (MH)	16 – 25
สูง (H)	26 – 45
สูงมาก (VH)	>45

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 5 ปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ (Available K) (NH_4OAc)

ระดับ (rating)	พิสัย (%)
ต่ำมาก (VL)	<30
ต่ำ (L)	30 - 60
ปานกลาง (M)	60 - 90
สูง (H)	91 - 120
สูงมาก (VH)	>120

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวพรพิมล บัวขาวเกาะ
วัน เดือน ปีเกิด	15 เมษายน 2529
สถานที่เกิด	จังหวัดชุมพร
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(เคมีเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยบัณฑิตวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) Student Internship programme for Spring semester 2010 The International Environmental Research Center (IERC) at the Gwangju Institute of Science and Technology (GIST) and UNU & GIST Joint Programme on Science and Technology for Sustainability. Korea