การศึกษาการทนต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าแมลงของ *Sinorhizobium meliloti*

จิตติมา กอหรั่งกูล[1*]

บทคัดย่อ

Multidrug resistance efflux pumps (MDR) เป็นกลไกลที่สำคัญของแบคทีเรียซึ่งเกี่ยวข้องกับการขับสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ออกจากเซลล์ทำให้แบคทีเรียนั้นๆ สามารถอยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ สำหรับ *Sinorhizobium meliloti* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินและมีโอกาสที่จะสัมผัสกับสารพิษทั้งจากการเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม MDR ก็เป็นกลไกหนึ่งซึ่งเกี่ยวข้องกับการป้องกันเซลล์จากสารที่เป็นพิษ ในการทดลองนี้ทำจะการทดสอบหาค่า minimal inhibition concentration (MIC) โดยทำการทดสอบกับ *Sinorhizobium meliloti* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของยีน *Smc03167* และ *Smc03168* ซึ่งเป็นยีนที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ MDR ชนิดหนึ่งของ *Sinorhizobium meliloti* ซึ่งในการทดลองจะใช้ยาปฏิชีวนะทั้งหมด 6 ชนิดคือ tetracycline, chloramphenicol, nalidixic acid, neomycin, kanamycin และ carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) และใช้ยาฆ่าแมลงทั้งหมด 3 ชนิด คือ bentazol, chlorpyrifos และ pentachlorophenol ผลการทดลองพบว่า ค่า MIC มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของยีนเมื่อทำการทดสอบกับยาฆ่าแมลง แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของยีนเมื่อทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ

คำสำคัญ : *Sinorhizobium meliloti,* Multidrug resistance efflux pumps (MDR), ยาฆ่าแมลง, ยาปฏิชีวนะ

[1]*หลักสูตรการจัดการสถานพยาบาล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี e-mail: jittimakho@gmail.com*

** ผู้นิพนธ์หลัก e-mail: jittimakho@gmail.com*

THE STUDY OF ANTIBIOTIC AND PESTICIDE RESITANCE IN *Sinorhizobium meliloti*

Jittima Khorungkul[1*]

Abstract

Multidrug resistance efflux pumps (MDR) is one of the major mechanisms of bacteria resistance by extrusion of drugs from cells. This mechanism helps the cell to be survived in the unfavorable conditions. For *Sinorhizobium meliloti,* the soil bacteria that voluntarily expose to xenobiotic released from both industrial and agriculture, MDR is also the mechanism that protect the cell from toxic compounds. The minimal inhibition concentration (MIC) tests are performed with wild type strain and *Smc03167* and *Smc03168* deletion mutation strain. *Smc03167* and *Smc03168* are the genes that control a system of MDR pumps in *Sinorhizobium meliloti.* In this experiment 6 antibiotics, namely tetracycline, chloramphenicol, nalidixic acid, neomycin, kanamycin and carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) and 3 pesticide, bentazol, chlorpyrifos and pentachlorophenol are used. The MICs test found that the MIC test with pesticide shown sensitivities change between wild type strain and deletion mutation strain, but no sensitivities change between wild type strain and deletion mutation strain were found in the test with antibiotics.

Keywords : *Sinorhizobium meliloti,* Multidrug resistance efflux pumps (MDR), pesticide, antibiotics

[1] *Hospital Management Program, Faculty of science and technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage* e-mail: *jittimakho@gmail.com*

**corresponding author, e-mail: jittimakho@gmail.com*

บทนำ

การดื้อยาในแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะหลายๆ ชนิดกำลังเป็นที่สนใจในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการดื้อยาในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีการศึกษามากมายเกี่ยวกับปัจจัยและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของแบคทีเรีย กลไกเหล่านี้มักจะเกี่ยวข้องกับการที่แบคทีเรียป้องกันไม่ให้ยาปฏิชีวนะผ่านเข้าไปในเซลล์และการขับยาออกจากเซลล์ ดังนั้นกลไกที่สำคัญสำหรับกับการดื้อยาของแบคทีเรียคือการขับยาเหล่านั้นออกจากเซลล์โดยใช้ multidrug resistance efflux pumps (MDR pumps) (Alekshum, M.N. and S.B. Levy. 2007, Li, X. Y., and H. Nikaido. 2009) โดยMDR pumps แบ่งออกตามจำนวนของส่วนประกอบของปั๊ม, บริเวณของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ transporter protein อยู่, แหล่งพลังงานของปั๊ม และชนิดของซับสเตรต ได้เป็น 5 กลุ่ม คือ ATP-binding cassette (ABC) family, major facilitator superfamily (MFS), resistance-nodulation-cell division (RND) family, small multidrug resistance (SMR) family และ multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family (Borges-Walmsley, M. *et al*. 2003, Piddock J.V. 2006, Poole K. 2007) เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเป็นปัญหาที่สำคัญต่อระบบสาธารณสุข จึงมีการศึกษาที่เกี่ยวกับหน้าที่บทบาท MDR pumps เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก และจากการศึกษาในปัจจุบันยังพบว่า MDR pumps พบได้ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิดและพบได้มากในกลุ่มของแบคทีเรียในดินและกลุ่มที่มีความเกี่ยวข้องกับพืช (Konstantinidis and Tiedje. 2004) และการทำงานของ MDR pumps ในแบคทีเรียไม่ได้จำกัดอยู่แค่เพียงยาปฏิชีวนะ แต่ยังรวมถึงโลหะหนัก สารตัวทำละลาย สารทำความสะอาด และสารพิษอื่นๆ ดังนั้นจึงเชื่อว่า MDR pumps มีวิวัฒนาการมาตั้งแต่อดีตกาลและอาจจะมีส่วนในการทำให้แบคทีเรียสามารถหลีกเลี่ยงผลกระทบของสารพิษที่ปนเปื้อนในบริเวณที่มันอาศัยอยู่ (Martinez J. L. *et al*. 2009)

Sinorhizobium meliloti เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในปมรากพืชตะกูลถั่ว เนื่องจาก *S.meliloti* เป็นแบคทีเรียที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในดินและอยู่ใกล้ชิดกับพืช จึงทำให้มีโอกาสสัมผัสกับสารพิษที่อาจปนเปื้อนอยู่ในดิน เช่นยาฆ่าแมลงต่างๆ จึงทำให้ *S.meliloti* ต้องมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ จากการศึกษาของ Shima E. *et al*, 2011 พบว่า *S. meliloti* ประกอบด้วย MDR pumps จำนวน 14 ชุด คือ 1 ชุด จาก ABC family, 3 ชุด จาก MFS family และ 10 ชุด จาก RND family โดยในแต่ละชนิดของปั๊มจะมียีนที่เกี่ยวข้องที่ทำการควบคุมการทำงานของปั๊มที่แตกต่างกันไป ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้สายพันธุ์ของ *S.meliloti* ลักษณะดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์ที่ทำการทำการ ทำการกลายพันธุ์ให้ยีน *Smc03167* และ *Smc03168* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ MDR pump ชนิดหนึ่งของ *S. meliloti* เสียสภาพ ซึ่งทำได้การสร้างขึ้นเพื่อทำการศึกษาความสามารถของแต่ละสายพันธุ์ในการทนต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าแมลงบางชนิดโดยใช้การทดลอง Minimal inhibition concentration และดูความเกี่ยวข้องของยีนที่ควบคุม MDR pump ในสภาวะที่ทำงานตามปกติ (ในกรณีสายพันธุ์ดั้งเดิม) และในสภาวะถูกทำให้เสียสภาพ โดยเปรียบความแตกต่างของค่า MIC ที่วัดได้ เนื่องจากยีนที่ควบคุมการทำงานของ MDR pump จะทำให้ปั๊ม ทำงานโดยการสั่งการให้ปั๊ม จับกับซับสเตรตซึ่งในที่นี้ก็คือสารที่เป็นพิษต่อเซลล์และขับออกจากเซลล์ ในทางตรงกันข้ามเมื่อยีนเหล่านี้ถูกทำให้เสียสภาพก็จะไม่สามารถสั่งการให้ pump ทำงานได้ ทำให้เกิดการสะสมของสารพิษในเซลล์และทำให้เซลล์ทนต่อความเข้มข้นของสารพิษได้น้อยลง ในการทดลองนี้ได้เลือกยาปฏิชีวนะมา 6 ชนิด ซึ่งเป็นชนิดที่มีการใช้โดยทั่วไปประกอบด้วย tetracycline, chloramphenicol, nalidixic acid, neomycin, kanamycin และ carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) ซึ่งเป็นชนิดที่มีการใช้กันโดยทั่วไปและมีรายงานการดื้อยาเหล่านี้จากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Jingjing S. *et al*. 2014) ส่วนยาฆ่าแมลงที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เป็นยาฆ่าแมลงที่นิยมใช้หาซื้อได้ทั่วไปได้แก่ bentazol และ chlopyrifos ส่วนในกรณีของ pentachlorophenol ถึงแม้ว่าจะ

เป็นยาฆ่าแมลงที่ห้ามใช้แล้วในปัจจุบันแต่เนื่องจากในอดีตนิยมใช้กันเป็นจำนวนมากจึงอาจจะทำให้มีการสะสมอยู่ในบริเวณดินที่เคยมีการใช้ยาฆ่าแมลงชนิดนี้ (Ronald L. C. 2007)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงการทนต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าแมลงของ *S. meliloti* เพื่อทำการทดสอบ

1. การทำงานของ MDR pump ของ *S. meliloti* ต่อยาปฏิชีวนะและยาฆ่าแมลง
2. หาความเกี่ยวข้องระหว่างการทำงานของ MDR pump ในการป้องกันตัวเองจากสารพิษของ *S. meliloti* กับยีนที่ควบคุม MDR pumps

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์

Sinorhizobium meliloti ทั้งสองสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ทำการเพาะเลี้ยงแบบใช้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) ที่มี 2.5 mM $MgCl_2$ และ 2.5 mM $CaCl_2$ โดยบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศา และเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองจะนำหัวเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนมาทำการ subculture เลี้ยงและวัดค่า A_{600} คำนวณให้ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การทำ Minimal Inhibition Concentraions (MICs)

ยาปฏิชีวนะและยาฆ่าแมลงที่ใช้ในการทดลองจะนำมาทำการเจือจางความเข้มข้นลงไปครั้งละ 2 เท่า โดยใช้ LB ในหลอดทดลอง จากนั้นทำการบ่มเชื้อที่เตรียมไว้แต่ละสายพันธุ์กับสารที่ทำการเจือจางในแต่ละความเข้มข้นที่อุณหภูมิ 28 องศา เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการณ์เจริญเติบโต ของแบคทีเรียในแต่ละหลอด (โดยเปรียบเทียบค่า A_{600}) ซึ่งค่า MIC สามารถวัดได้จากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าแมลงที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วย

1. Tetracycline ความเข้มข้น 500 μg/mL, 250 μg/mL, 125 μg/mL, 62.5 μg/mL, 31.25 μg/mL และ 15.6 μg/mL
2. Chloramphenicol 500 μg/mL, 250 μg/mL, 125 μg/mL, 62.5 μg/mL, 31.25 μg/mL และ 15.6 μg/mL
3. Nalidixic acid 500 μg/mL, 250 μg/mL, 125 μg/mL, 62.5 μg/mL, 31.25 μg/mL และ 15.6 μg/mL
4. Neomycin 500 μg/mL, 250 μg/mL, 125 μg/mL, 62.5 μg/mL, 31.25 μg/mL และ 15.6 μg/mL
5. Kanamycin 500 μg/mL, 250 μg/mL, 125 μg/mL, 62.5 μg/mL, 31.25 μg/mL และ 15.6 μg/mL
6. carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) ความเข้มข้น 500 μg/mL, 250 μg/mL, 125 μg/mL, 62.5 μg/mL, 31.25 μg/mL และ 15.6 μg/mL

และยาฆ่าแมลงที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่

1. Bentazol ความเข้มข้น 200 μM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12.5 μM และ 6.25 μM
2. chlorpyrifos ความเข้มข้น 200 μM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12.5 μM และ 6.25 μM
3. pentachlorophenol (PCP) ความเข้มข้น 200 μM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12.5 μM และ 6.25 μM

ผลการวิจัย

การวิเคราะห์ค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะ

การวัดหาค่า MIC ของ *Sinorhizobium meliloti* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์ให้เกิดเสียสภาพของยีน *Smc03167* และ *Smc03168* ให้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า MIC ของ *Sinorhizobium meliloti* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์ให้เกิดเสียสภาพของยีน *Smc03167* และ *Smc03168* ต่อยาปฏิชีวนะ

สายพันธุ์	MIC (μg/mL)					
	TET	CAM	NAl	NEO	KAM	CCCP
S. meliloti สายพันธุ์ดั้งเดิม	31.25	62.5	125	62.5	100	250
S. meliloti ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์	31.25	62.5	125	62.5	100	250

หมายเหตุ TET: tetracyclin CAM: chloramphenicol NAL: nalidixic acid NEO: neomycin KAM: kanamycin CCCP: carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone

จากตารางที่ 1 จะพบว่าค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะไม่มีความแตกต่างระหว่าง *Sinorhizobium meliloti* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์ให้เกิดเสียสภาพของยีน *Smc03167* และ *Smc03168* สำหรับยีน *Smc03167* และ *Smc03168* เป็นยีนที่ควบคุมการทำงานของ MDR pumps ระบบ MFS จากการศึกษาของ Lomovskava O. and Kim L.. 1992 และ Furukawa H. *et al*., 1993 พบว่า ชุดของโปรตีน EmrAB ซึ่งเป็น MDR ระบบ MFS ใน *E. coli* มีผลต่อการทนต่อยา nalidixic acid และ CCCP ในการศึกษาของ Shima E. *et al*., 2011 *Smc00563* และ *Smc00564* ยีนควบคุม MDR ระบบ MFS อีกระบบหนึ่งใน *S. meliloti* เมื่อถูกทำให้เสียสภาพก็ไม่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของความไวต่อยาปฏิชีวินะชนิดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นจากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า ระบบ MFS ของ MDR ใน *S. meliloti* ไม่ได้มีความเกี่ยวข้องกับการขับออกของยาปฏิชีวนะ ในอีกกรณีหนึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามียาปฏิชีวนะชนิดอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับ MDR ระบบนี้ แต่ไม่ได้เลือกมาใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งผลที่ได้นี้แตกต่างจากระบบ MFS ใน *E. coli* เป็นแบคทีเรียก่อโรคชนิดหนึ่ง ซึ่งมีโอกาสสัมผัสกับยาปฏิชีวนะมากกว่า และมีการศึกษาจำนวนมากที่รายงานถึงการดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ MDR ระบบ RND ซึ่งเป็นระบบที่พบมากในแบคทีเรียก่อโรค เช่น MexAB-OprM ใน *Pseudomonas aeruginosa* (Li X. Z. *et al*. 1994 และ Poole K.. *et al*., 1993) ArcAB-tolC ใน *Samonella enterica* servoar Typhimurium (Eaves, D. J., et al., 2004) และ CmeABC ใน *Campylobacter jejuni* (Pumbwe, L., *et al*., 2004) ซึ่งเมื่อทำให้ยีนที่ควบคุมระบบเหล่านี้เสียสภาพพบว่าจะมีความไวต่อ Chloramphenicol และ Tetracycline มากขึ้น

การวิเคราะห์ค่า MIC ต่อยาฆ่าแมลง

การวัดหาค่า MIC ของ *Sinorhizobium meliloti* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์ให้เกิดเสียสภาพของยีน *Smc03167* และ *Smc03168* ต่อยาฆ่าแมลงให้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า MIC ของ *Sinorhizobium meliloti* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์ให้เกิดเสียสภาพของยีน *Smc03167* และ *Smc03168* ต่อยาฆ่าแมลง

สายพันธุ์	MIC (μM)		
	Bentazol	Chlorpyrifos	PCP
S. meliloti สายพันธุ์ดั้งเดิม	100	200	50
S. meliloti ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์	50	100	12.5

จากตารางที่ 2 พบว่า *S. meliloti* สายพันธุ์ทีทำให้เกิดการกลายพันธุ์จะมีความไวต่อยาฆ่าแมลงมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยมีความไวต่อ Bentazol และ chlorpyrifos มากกว่าพันธุ์ดั้งเดิม 2 เท่า และมีความไวต่อ PCP มากกว่าพันธุ์ดั้งเดิมถึง 4 เท่า ดั้งนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า MDR pump ใน *S. meliloi* ซึ่งถูกควบคุมยีน *Smc03167* และ *Smc 03168* มีความสำคัญในการช่วยทำให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่ถิ่นที่อยู่อาศัยมีการปนเปื้อนด้วยสารที่เป็นพิษ ในกรณีของ *Rhizobium etli* ระบบ MDR ซึ่งถูกควบคุมโดย *RmrAB* ก็มีความจำเป็นในการป้องกันเซลล์จากสาร phytoalexin, narginie และ coumaric acid ซึ่งพืชสร้างขึ้นและเป็นพิษต่อเซลล์ของ *R. etli* โดยเมื่อทำการกลายพันธุ์ให้ *RmrAB* เสียสภาพในการทำงานพบว่า *R. etli* มีความไวต่อสารเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น (Ramon G. and Esperanza M., 2000) *Agrobacterium tumefaciens* แบคทีเรียก่อโรคในพืชเมื่อถูกเข้ารุกรานพืชจะสร้างสาร coumestrol เพื่อป้องกันตัวเอง และสารนี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ของ *A. tumefaciens* ซึ่งระบบที่ช่วยทำให้เซลล์อยู่รอดคือ LfeAB MDR (Palumbo, J.D., *et al*., 1998) ใน *Pseudomonas aeruginnosa* ระบบ MexAB-OprM จะทำหน้าที่ในการป้องกันความเป็นพิษจาก pentachlophenol และเมื่อถูกทำให้เสียสภาพจะทำให้เซลล์มีความไวต่อ PCP มากขึ้น (Jocelyn et. al., 2007) *chpAB* ยีนใน *S.meliloti* มีการตอบสนองต่อการสัมผัสกับ chlopyrifos (Wirongrong W. *et al*. 2010)

สรุป

จากการศึกษาการทนต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิดคือ tetracycline, chloramphenicol, nalidixic acid, neomycin, kanamycin และ carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) และยาฆ่าแมลง 3 ชนิดคือ Bentazol, chlorpyrifos และ pentachlorophenol โดยใช้เทคนิค Minimal inhibition concentration (MICs) พบว่าเมื่อทำการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะ ไม่พบความแตกต่างระหว่าง *S. meliloti* สายพันธุ์ดั้งเดิมกับสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดกลายพันธุ์ แต่เมื่อทดสอบกับยาฆ่าแมลงพบว่ามีความแตกต่างระหว่างสองสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์จะมีความไวต่อยาฆ่าแมลงมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม จากผลการทดลองที่ได้อาจกล่าวได้ว่ายาปฏิชีวนะไม่ใช่ซับเสตรตสำหรับระบบ pump ของ MDR ใน *S. meliloti* ที่เลือกมาทำการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากระบบ MDR ใน *S. meliloti* มีหลายระบบจึงเป็นไปได้ว่าระบบที่เลือกมาทำการทดลองซึ่งควบคุมด้วยยีน *Smc03167* และ *Smc03168* ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการป้องกันเซลล์จากยาปฏิชีวนะและอาจเป็นไปได้ว่ามีระบบอื่นๆ ซึ่งไม่ได้นำมาศึกษาในการทดลองนี้เป็นระบบที่เกี่ยวข้องกับการขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ ส่วนในกรณีของยาฆ่าแมลงอาจกล่าวได้ว่า MDR pump ระบบที่นำมาศึกษานี้เกี่ยวข้องกับการขับสารพิษ เช่น ยาฆ่าแมลงออกจากจากเซลล์เพื่อทำให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้

ข้อเสนอแนะ

1. ช่วงห่างของความเข้มข้นที่ใช้ในการทำ MIC ของยาปฏิชีวนะควรมีการปรับเพื่อให้มีความละเอียดมากขึ้น
2. เพิ่มชนิดของสารที่นำมาทดสอบหาค่า MIC เพื่อหาความเกี่ยวข้องของ MDR กับสารชนิดอื่นๆ
3. ใช้เทคนิคอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อยืนยันความเกี่ยวข้องกันของระบบ MDR กับสารพิษชนิดต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

หนึ่ง เตียอำรุง และ นันทกรบุญเกิด. (2539). ความสัมพันธ์ระหว่างไรโซเบียมกับพืชตะกูลถั่วในเชิงพันธุกรรมระดับโมโลกุล. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี. 3: 15-20.

Alekshun M. N. and S. B. Levy. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell. 128: 1037-1050

Li X. Z. and Nikaido H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. Drugs. 69: 1555-1623.

Borges-Walmsley *et al*. (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. Biochem. J. 376: 313-338.

Piddock J. V. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance. Microbiology. 4: 629-636.

Poole K., (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Ann. Med. 39: 162-176

Konstantinidis KT. And Tiedje JM. (2004). Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. P Natl Acad Sci USA. 101: 3160-3165

Martinez J. L. *et al*. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. FEMS Microbiol. Rev. 33: 430-449.

Shima Eda. *et al*. (2011). Involvement of the SmeAB multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti.* Applied and Environmental Microbiology. 77: 2855-2862.

Jingjing S. *et al*. (2014). Bacterail multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysical Research Communications. 453: 254-267.

Lomovskaya 0. and K. Lewis. (1992). emr, an Escherichia coli locus for Multidrug Resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:8938-8942.

Furukawa H. *et al*. (1993). Thiolactomycin Resistance in Escherichia coli Is Associated with the Multidrug Resistance Efflux Pump Encoded by emrAB. J. Bacterid. 175:3723- 3729.

Li X. Z. *et al*. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1732-1741.

Poole K. *et al*. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. J. Bacteriol. 175: 7363-7372.

Eaves D. J. *et al*. (2004). Expression of *arcB, arcF, arcD, mprA* and *soxS* in *Samonella enterica* serovar Typhimurium: role in multiple antibiotic resistance. Antimicrob. Agents. Chemother. 48: 1145-1150.

Pumbwe *et al*. (2004). Expression of the efflux pump genes *cmeB, cmeF* and the porin gene *porA* in multiply antibiotic resistant *Campylobacter spp.* J. Antimicrob. Chemother. 54: 341-347.

Ramon G. and Esperanza M. (2000). Multiresistance Genes of *Rhizobium etli* CFN42. Mol. Plant. Microbe Interact. 13:572-577.

Palumbo J. D. *et al*. (1998). An isoflavonoid inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefarciens* is involvein competitive colonization of roots. J. Bacteriol. 180: 3107-3113.

Jocelyn *et al*. (2007). Transcriptome analysis reveals that Multidrug Efflux Genes are unregulated to protect *Pseudomonas aeruginos* from pentachlorophenol stress. Applied and environmental microbiology. 73: 4550-4558.

Wirongrong w. *et al*. (2010). ChrR is a Chlopyrifos-responsive transcription regulator in *Sinorhizobium meliloti.* J Mol Microbiology Biotechnol. 18:141-147.