



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ความหลากหลายและความทนต่อแคดเมียมและ
สังกะสี ของแบคทีเรียในดินปนเปื้อนโลหะ

**Bacterial diversity and resistance to cadmium and zinc
in metal- contaminated soil**

โดย ดร. ปิ่นสุรางค์ ดีวงษ์

มิถุนายน 2557

สัญญาเลขที่ MRG5480213

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ความหลากหลายและความทนต่อแคดเมียมและ
สังกะสี ของแบคทีเรียในดินปนเปื้อนโลหะ

**Bacterial diversity and resistance to cadmium and zinc
in metal- contaminated soil**

ผู้วิจัย ดร. ปิ่นสุรางค์ ดีวงศ์

สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ: MRG5480213

ชื่อโครงการ: ความหลากหลายและความทนต่อแคดเมียมและสังกะสีของแบคทีเรียในดินปนเปื้อนโลหะ

ชื่อนักวิจัย: ดร. ปิ่นสุรางค์ ดีวงศ์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อีเมล: fsciprd@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (2554 - 2555)

บทคัดย่อ

ดินที่มีโลหะหนักจัดเป็นสิ่งแวดลอมวิกฤตที่มีสังคมจุลินทรีย์ที่หลากหลายและซับซ้อน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายและความทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียในบริเวณเหมืองสังกะสี การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียอาศัยทั้งวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีปราศจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในการวิจัยได้เก็บตัวอย่างดิน 9 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างน้ำ 3 ตัวอย่าง จากบริเวณต่างๆ ในเหมืองสังกะสี ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 7.5-8.3 จากนั้นแบคทีเรียในแต่ละตัวอย่างถูกนับจำนวนและคัดแยกบนอาหาร trypticase soil agar (TSA) ที่เติมและไม่เติม 0.5 mM ZnSO₄ ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีต่างกันในแต่ละตัวอย่างได้ทั้งหมด 396 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้เหล่านี้ถูกนำไปย้อมสีแบบแกรมเพื่อจำแนกและศึกษาลักษณะพื้นฐานของเซลล์ และทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีลักษณะแตกต่างกันได้ทั้งหมด 167 ไอโซเลต เพื่อใช้ในการทดสอบความทนโลหะหนัก จากผลการทดลองพบไอโซเลตที่สามารถทนโลหะหนักได้สูงถึง 77 mM ZnSO₄, 11 mM CdSO₄, 3 mM CuSO₄ และ 4 mM HgCl₂ โดยพบว่าไอโซเลตที่ทนแคดเมียมสูง (Cd²⁺) มีความใกล้ชิดกับ *Klebsiella* และ *Enterobacter* ด้วยความเหมือนของยีน 16S rRNA ที่ 99% and 98% ตามลำดับ นอกจากนี้หลายไอโซเลตทนสังกะสีสูง (Zn²⁺) และส่วนใหญ่มีความใกล้ชิดกับ *Ralstonia* ด้วยความเหมือนของยีน 16S rRNA มากกว่า 98% ส่วนการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียได้เลือกศึกษาตัวอย่างดินบ่อเหมือง S2 ซึ่งเป็นดินตามธรรมชาติที่พบแบคทีเรียจำนวนมากและมีลักษณะพื้นฐานที่หลากหลาย จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยวิธีการโคลนและการวิเคราะห์ T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) เมื่ออาศัยหลักการความเหมือนของยีน 16S rRNA ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 98% จะจัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน พบว่ามีแบคทีเรียในดินตัวอย่างหลายกลุ่ม คือ *Ralstonia* (เป็นกลุ่มเด่นด้วยจำนวน >85% ของเชื้อทั้งหมดในดิน), *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacterium* TG161 และ *Streptomyces* การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า *Ralstonia* เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่มีปริมาณมากในดินบ่อเหมืองสังกะสีนี้และความทนต่อโลหะหนักซึ่งอาจมีบทบาทในการบำบัดทางชีวภาพ ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้จัดเป็นองค์ความรู้ใหม่และเป็นการค้นพบแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่มีประโยชน์ในการบำบัดโลหะหนักทางชีวภาพในอนาคต

คำสำคัญ: ความหลากหลายของแบคทีเรีย, โครงสร้างประชากร, เหมืองสังกะสี, ความทนโลหะหนัก, 16S rRNA, terminal- restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

Project code: MRG5480213

Project title: Bacterial diversity and resistance to cadmium and zinc in metal- contaminated soil

Investigator : Dr. Pinsurang Deevong, Kasetsart University

E-mail Address: fsciprd@ku.ac.th

Project Period: 2 years (2011 - 2012)

Abstract

Heavy metal contaminated soils have become an extreme environment for the development and evolution of complex microbial communities. This study aims to investigate the diversity and heavy metal resistance of bacteria in zinc-mine areas. Bacterial diversity was studied using culture-dependent and culture-independent approaches. In the research experiment, 9 soil samples and 3 water samples were collected from different areas in zinc-mine. The pH of the samples is between 7.5-8.3. Bacterial colonies were count on trypticase soil agar (TSA) with 0.5 mM ZnSO₄ and without ZnSO₄. In total 396 isolates were collected based on macroscopic study. The isolates were characterized their morphology using Gram's stain and 167 selected isolates will be used for the test of heavy metal tolerance. Interestingly, the results showed isolates resisted to high heavy metal concentrations of 77 mM ZnSO₄, 11 mM CdSO₄, 3 mM CuSO₄ and 4 mM HgCl₂. The highly Cd²⁺ resistant isolate was closely related to *Klebsiella* and *Enterobacter* with 99% and 98% nucleotide identity of 16S rRNA gene, respectively. Many isolates exhibited high resistance to Zn²⁺ and most of them were closely related to *Ralstonia* with more than 98% nucleotide identity. To study the bacterial diversity and community structure, the natural mining soil sample S2 which showed high bacterial number and diversity of isolated bacteria was selected. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and clonal analyses of 16S rRNA gene revealed diverse bacteria in the soil community. Based on 98% sequence identical, the 16S rRNA gene sequences were assigned into groups: *Ralstonia* (dominant genus with >85% of total sequences), *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacterium* TG161 and *Streptomyces*. This study suggested that, *Ralstonia* would be majority in this zinc mine soil and the isolated bacteria may have the potential for heavy metal bioremediation. The results supplied new knowledge and potential bacterial materials for bioremediation of heavy metals in future.

Key words: Bacterial diversity, community structure, zin mine, heavy-metal resistance, 16S rRNA, terminal- restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

บทนำ

ดินเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีหลากหลายทั้งทางกายภาพและทางชีวภาพสูง ลักษณะและองค์ประกอบของดินในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติมีความแตกต่างกันขึ้นกับแต่ละพื้นที่ ซึ่งโครงสร้างอันซับซ้อนของดินนี้จะส่งผลก่อให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในดินทั้งในแง่ชนิดและปริมาณ สิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสูงในดินคือจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบได้ในเกือบทุกสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียถูกจัดเป็นผู้ย่อยสลายในห่วงโซ่อาหารและเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดวัฏจักรของสารต่างๆ ในดิน ซึ่งทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุในระบบนิเวศตามธรรมชาติ ความหลากหลายของแบคทีเรียมักถูกใช้เป็นตัวแปรในการคาดเดาลักษณะและความอุดมสมบูรณ์รวมถึงบ่งบอกความเปลี่ยนแปลงเปลี่ยนแปลงในดิน การมีแร่ธาตุบางชนิดโดยเฉพาะธาตุโลหะหนักที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต เช่น แคดเมียม สังกะสี ทองแดง ปรอทตะกั่ว เป็นปัจจัยหนึ่งในการกำหนดชนิดของแบคทีเรียในดิน ซึ่งธาตุโลหะหนักเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนรูปและหมุนเวียนอยู่ในระบบนิเวศ เกิดการสะสมและก่อให้เกิดโรคในพืช สัตว์และมนุษย์ได้ แบคทีเรียที่เจริญในดินที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักในปริมาณสูง มักมีคุณสมบัติพิเศษที่ช่วยให้สามารถทนต่อความเป็นพิษของโลหะหนัก (heavy-metal tolerance or resistance) มีบทบาทในการลดปริมาณหรือเปลี่ยนแปลงธาตุโลหะหนักรวมถึงธาตุอื่นๆ ภายใต้สภาวะความเป็นพิษ โดยอาศัยกิจกรรมของเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีโลหะหนัก อีกทั้งมีองค์ประกอบและผลผลิตของเซลล์ที่สามารถลดปริมาณหรือเปลี่ยนแปลงสารประกอบโลหะหนักได้ จากการตระหนักถึงความสำคัญของแบคทีเรียเหล่านี้ จึงมีรายงานการศึกษาแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนโลหะหนัก รวมถึงความพยายามนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ในการลดปริมาณโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมและโรงงานอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างเช่นการศึกษาด้วยการตัดแยกเชื้อที่ทนต่อโลหะหนัก การทดสอบความทนต่อโลหะหนัก การทดสอบความสามารถในการลดปริมาณโลหะหนัก รวมถึงการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนโลหะหนักโดยไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Konstantinidis *et al.*, 2003; Chien *et al.*, 2008; Ellis *et al.*, 2003)

ปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในแหล่งดินและแหล่งน้ำในประเทศไทยมีมายาวนาน โดยบริเวณ อ. แม่สอด จ. ตาก เป็นหนึ่งในแหล่งทำเหมืองแร่สังกะสี ที่มีรายงานอย่างต่อเนื่องถึงการปนเปื้อนของธาตุโลหะหนักแคดเมียม (Cd) และสังกะสี (Zn) ในแหล่งดิน น้ำ และพืช ในปริมาณสูงถึงขั้นวิกฤต (อ้างอิงจากหนังสือพิมพ์มติชน 2547) ดินในพื้นที่สำหรับการเกษตรถูกตรวจพบว่ามีสารปนเปื้อนธาตุโลหะหนัก โดยเฉพาะแคดเมียมในดินปริมาณสูงเกินค่ามาตรฐาน มีการสะสมของธาตุแคดเมียมในร่างกายของคนในพื้นที่ในระดับแสดงความเป็นพิษ จึงกล่าวได้ว่าบริเวณ อ. แม่สอด จ. ตาก จัดเป็นบริเวณตัวอย่างที่มีคุณค่าต่อการศึกษา และในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยที่มุ่งทำการศึกษาจุลินทรีย์ในบริเวณดังกล่าว ตัวอย่างคือการคัดเลือกแบคทีเรียที่ทนต่อแคดเมียมจากดินเหมืองและนอกเหมือง (แสงเดือน, 2549) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเหล่านี้เป็นเพียงการศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อเท่านั้น โดยไม่มีการศึกษาทางพันธุกรรมแต่อย่างใด อีกทั้งมีการกำหนดแหล่งเก็บตัวอย่างที่จำกัด จึงยังขาดการศึกษารวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ และขาดข้อมูลความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ครอบคลุมอย่างแท้จริงและปัจจุบันยังไม่มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติแต่อย่างใด สืบเนื่องมาจากข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเชื้อใน

ห้องปฏิบัติการ การวิจัยครั้งนี้จึงอาศัยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-dependent method) และวิธีปราศจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-independent method) ควบคู่กัน โดยจะทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อการศึกษาและการอนุรักษ์ทรัพยากรจุลินทรีย์ร่วมกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคและวิธีการทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ทำให้สามารถศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเจริญที่มีความเหมาะสมตรงกับความต้องการของจุลินทรีย์บางชนิดที่ต้องการวิธีการเพาะเลี้ยงที่จำเพาะได้ เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ นอกจากจะถูกนำไปศึกษาเพื่อการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อม ชยะหรือของเสียที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักแล้ว แบคทีเรียที่มีบทบาทต่อโลหะหนักเหล่านี้สามารถเป็นต้นแบบในการศึกษาอื่นต่อไปในอนาคต ตัวอย่างเช่น การศึกษาด้านพันธุกรรมหรือยีนที่มีบทบาทต่อการทนหรือลดปริมาณโลหะหนัก การศึกษาโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ทำให้เซลล์ทนต่อสารพิษโลหะหนัก เป็นต้น

การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในปัจจุบันนิยมใช้วิธี Culture-independent method เพื่อช่วยให้ทราบถึงความหลากหลายที่แท้จริง โดยเทคนิคที่ใช้แพร่หลายคือ การโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอ (cloning and sequencing) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถระบุชนิด (species) และปริมาณ (relative abundance) ของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มประชากรได้ แต่เนื่องจากข้อจำกัดด้านต้นทุนที่ค่อนข้างสูง จึงนิยมวิเคราะห์ผลการทดลองควบคู่กับเทคนิคอื่น เช่น Restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) โดยงานวิจัยนี้เลือกศึกษาด้วยเทคนิค T-RFLP ซึ่งเป็นวิธีการที่ถูกใช้อย่างแพร่หลาย มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว อีกทั้งเป็นวิธีการที่เป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ ทำให้ทราบความหลากหลายและโครงสร้างของประชากรแบคทีเรีย (bacterial-community structure) ในสิ่งแวดล้อมซึ่งจะเป็นองค์ความรู้ใหม่อันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาแบคทีเรียในดินปนเปื้อนโลหะหนักของประเทศไทย ทั้งนี้ได้เคยมีรายงานการใช้วิธีการโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอร่วมกับวิธี T-RFLP ในการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ใน สิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น ดิน ทะเล บ่อน้ำเค็ม บ่อน้ำบาดาล ลำไส้ปลวก เป็นต้น จากการได้รับรายงานพบว่าการศึกษานี้เป็นงานวิจัยส่วนน้อยในประเทศไทยที่จะมีการนำเทคนิค T-RFLP มาใช้ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม โดยสามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่าง ระหว่าง T-RFLP profiles ได้ด้วยวิธีทางสถิติ อีกทั้งข้อมูล T-RFLP profiles ที่ได้จากการศึกษานี้จะถูกจัดเก็บเป็นฐานข้อมูลของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการศึกษา เปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป หรือทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาในสิ่งแวดล้อมอื่นในอนาคตได้

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายและความทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียในบริเวณเหมืองสังกะสีของประเทศไทยใน อ.แม่สอด จ.ตาก โดยการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียอาศัยทั้งวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีปราศจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้จัดเป็นองค์ความรู้ใหม่และเป็นการค้นพบแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่มีประโยชน์ในการบำบัดโลหะหนักทางชีวภาพในอนาคต

วัตถุประสงค์การทดลอง

- 1) เพื่อศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนโลหะหนัก ในเขต อ. แม่สอด จ. ตาก
- 2) เพื่ออนุรักษ์ทรัพยากรจุลินทรีย์และข้อมูลพันธุกรรมของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนโลหะหนัก ในเขต อ. แม่สอด จ. ตาก
- 3) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการทนต่อโลหะหนักแคดเมียมและสังกะสีในปริมาณสูง

วิธีการทดลอง

1. การลงพื้นที่เพื่อสำรวจและเก็บตัวอย่าง

ทำการศึกษารวบรวมข้อมูลทางภูมิศาสตร์ ข้อมูลทางธรณีวิทยา รวมถึงข้อมูลการมีธาตุโลหะหนัก ในบริเวณเหมืองสังกะสี อ.แม่สอด จ.ตาก (บริษัทผาแดงอินดัสทรี จำกัด มหาชน) จากนั้นลงพื้นที่เพื่อสำรวจและวางแผนการเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากบริเวณต่างๆ ของเหมือง ในกรณีตัวอย่างดินจะถูกเก็บที่บริเวณผิวดินและที่ความลึกไม่เกิน 10 ซม. ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่อยู่ในดินระดับความลึกนี้จะมีปริมาณมากและจัดอยู่ในกลุ่ม aerobes ดินสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจะถูกเก็บที่อุณหภูมิต่ำจนกว่าจะทำการทดลอง โดยการเก็บตัวอย่างจะทำ 2 ครั้ง คือ

ครั้งที่ 1 คือ การเก็บตัวอย่างดินภายในเหมือง (ดินบ่อเหมือง) และพื้นที่ต่างๆ บริเวณรอบเหมือง เป็นจำนวน 7 จุดเก็บตัวอย่าง

ครั้งที่ 2 คือ การเก็บตัวอย่างดินและน้ำในพื้นที่เหมือง จำนวน 12 ตัวอย่าง ครอบคลุมทุกส่วนที่มีความสำคัญ

2. การตรวจสอบลักษณะดิน

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานของดินและน้ำ โดยการตรวจวัดค่า pH ของดินทำได้โดยการละลายดินในน้ำในอัตราส่วนเท่ากัน จากนั้นนำไปเขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 20 นาทีและวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH-meter ส่วนการวัดปริมาณธาตุในตัวอย่างโดยเฉพาะโลหะหนักแคดเมียมและสังกะสีนั้นจะทำได้โดยวิธี ICP-OES หรือ ICP-AES หรือวิธีอื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับในทางธรณีเคมี

3. การคัดแยกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำ

นำแต่ละตัวอย่างมาทำการเจือจางในสารละลาย normal saline (0.85% NaCl) อัตราส่วน 1 ต่อ 10 จากนั้นเขย่าเพื่อให้เม็ดดินแตกตัวและแบคทีเรียหลุดออกสู่สารละลายด้วยเครื่อง Shaker เป็นเวลาประมาณ 20 นาที จึงดูดเฉพาะส่วนของสารละลายไปทำการเจือจางอย่างเป็นลำดับในอัตราส่วนของปริมาตร 1:10 (10-fold serial dilution) ต่อไป สารละลายที่ระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-3} ถึง 10^{-8} ถูกนำไปแยกเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ทั้งที่เติม (0.5 mM) และไม่เติม $ZnSO_4$ เป็น

จำนวน 2-3 ซ้ำ หลังจากการบ่มจึงทำการนับจำนวนโคโลนี (colony forming unit, CFU) ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร โดยช่วงของจำนวนโคโลนีที่สามารถนับได้ อยู่ในช่วงระหว่าง 30-300 CFU/plate มาทำการคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างโดยมีหน่วยเป็น CFU/g หรือ CFU/ml จากนั้นสังเกตและตรวจสอบลักษณะสัณฐานของโคโลนี (colony morphology) เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันนี้ไปทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak เชื้อแบคทีเรียถูกศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป เช่น การศึกษารูปร่าง การเรียงตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์และวิธีการย้อมสี

4. การทดสอบความทนโลหะหนักของแบคทีเรีย

แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตถูกทดสอบความทนต่อโลหะหนักชนิดต่างๆ คือ $ZnSO_4$ และ $CdSO_4$ อีกทั้งมีการเพิ่มชนิดโลหะหนัก เพื่อการนำเชื้อไปประยุกต์ใช้ได้มากขึ้น คือ $CuSO_4$ และ $HgCl_2$ ซึ่งเติมในอาหาร TSA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทำการคัดกรองด้วยการขีดเชืบบนอาหารและสังเกตการเจริญหลังการบ่ม นอกจากนี้ยังทำการยืนยันผลการทดสอบด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB เขย่าที่ 120-150 rpm นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดการเจริญด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 600 nm และทำการปรับค่า OD ให้ได้เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นจึงหยดสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 3-5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อที่ทนต่อความเข้มข้นโลหะหนักในอาหาร โดยเปรียบเทียบการเจริญกับอาหาร TSA ที่ไม่เติมโลหะหนัก ทั้งนี้จะทำการทดสอบ 2-3 ซ้ำ

5. การศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในดินบ่อเหมือง

ทำการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียจากดินบ่อเหมือง เนื่องจากเป็นดินจากแหล่งตัวอย่างที่มีแบคทีเรียที่หลากหลายสูง

5.1 การสกัดดีเอ็นเอจากดิน

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากดินบ่อเหมือง ซึ่งเป็นดินจากแหล่งตัวอย่างที่มีแบคทีเรียที่หลากหลายสูง ทั้งนี้การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้วิธีที่มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับ งานวิจัยนี้จึงสกัดดีเอ็นเอจากดินด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) ซึ่งวิธีการได้ถูกระบุไว้ในคู่มือ และทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคุณภาพดีเอ็นเอถูกวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis

5.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA (PCR amplification)

5.2.1) การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA เพื่อการโคลน

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers สำหรับแบคทีเรีย คือ 616V (universal primer for

bacteria; 5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC-3') (Rinke *et al.*, 2006) และ 1492R (universal primer for bacteria and archaea; 5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Juretschko *et al.*, 1998; Tanner *et al.*, 2000) เมื่อ M= A+C และ Y= C+T โดย PCR program คือ 95°C, 3 นาที ตามด้วย 25-30 cycles ของ 95°C, 40 วินาที; 52°C, 40 วินาทีและ 72°C, 90 วินาที และสิ้นสุดด้วย 72°C, 10 นาที จากนั้น PCR product ซึ่งมีความยาวประมาณ 1.5 kb ถูกตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel purification kit (QIAgen) ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer

5.2.2) การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA เพื่อการวิเคราะห์ T-RFLP

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทำ T-RFLP โดยอาศัยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primers สำหรับแบคทีเรียโดย forward primer ถูกติดสลาด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence dyes) forward primer คือ 616V-FAM ส่วน reverse primer คือ 907R-HEX (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') โดย PCR program คือ 95°C, 3 นาที ตามด้วย 30-35 cycles ของ 95°C, 40 วินาที; 54°C, 40 วินาทีและ 72°C, 90 วินาที และสิ้นสุดด้วย 72°C, 10 นาที โดย PCR product ซึ่งมีความยาวประมาณ 0.9 kb จะถูกตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick gel extraction kit (QIAgen) ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer และมีการป้องกันการถูกแสงในทุกขั้นตอน

5.3 การโคลนและการหาลำดับดีเอ็นเอ (Cloning and sequencing)

ยีน 16S rRNA ที่ได้จากขั้นตอน PCR (จากข้อ 5.2.1) ถูกโคลนเข้าไปใน TOPO-TA cloning vector จาก TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corporation) และทำการถ่ายโอนเวกเตอร์เข้าไปใน *E. coli* TOP10-cells (Invitrogen Corporation) ด้วยวิธี Heat-Shock โดยดูวิธีการจากคู่มือแนะนำ หลังจาก *E. coli* ใน SOC medium ถูกบ่มที่ 37°C นาน 1 ชม. จะถูกนำมา spread บนอาหาร LB agar (ผสม 100 µg/mL ampicillin และผ่านการ spread ผิวน้ำ ด้วย X-gal ก่อนใช้งาน) บ่มจนเพาะเชื้อดังกล่าวที่ 37°C นาน 16-24 ชม. (overnight) ทำการสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญและใช้ไม้จิ้มฟัน (colony picking) ทำ replica plating บน LB plate และทำ colony PCR โดยอาศัย M13F primer (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G -3') และ M13R primer (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') ซึ่งมี PCR program คือ 95°C, 3 นาที ตามด้วย 30 cycles ของ 95°C, 30 วินาที; 60°C, 30 วินาทีและ 72°C, 1.45 นาที และสิ้นสุดด้วย 72°C, 10 นาที ทำการตรวจสอบ PCR product ด้วย Agarose gel electrophoresis จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีขนาดของ DNA insert ถูกต้องจำนวน 100 โคลน/ตัวอย่าง (การศึกษาด้วยวิธีโคลนและหาลำดับเบสจะเลือกทำเฉพาะตัวอย่างดินที่พบที่มีความหลากหลายของกลุ่มประชากรสูง ซึ่งตรวจสอบได้จาก T-RFLP) จากนั้น PCR product จะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (QIAgen) และทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ก่อนนำส่งหน่วยงานอื่นเพื่อหาลำดับดีเอ็นเอ (sequencing) ต่อไป

5.4 Sequencing and phylogenetic analysis

การหาลำดับดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ทำโดยใช้เครื่อง DNA Sequencer Applied Biosystems 3130 (ABI) รวมทั้งส่งบางตัวอย่างให้หน่วยงานอื่นเป็นผู้วิเคราะห์ด้วย โดย Sequencing primers ที่ใช้ คือ TopoSeq-F (5'- AGC TTG GTA CCG AGC T -3') และ TopoSeq-R (5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3') ลำดับดีเอ็นเอที่ได้ถูกตรวจสอบแบบ manual ด้วย Finch TV program (v. 1.4.0) และทำการเชื่อมต่อยีนดีเอ็นเอ (assemble) ด้วย DNA Baser program จากนั้นลำดับดีเอ็นเอสายสมบูรณ์ (full-length sequence) ถูกเทียบหาจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงใน Blastn ของฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ทั้งหมดถูกเทียบเคียงความเหมือนและจัดกลุ่มเข้าในแต่ละ OTU ด้วย DOTUR program โดยอาศัย 98% similarity นอกจากนี้มีการทำ sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W และสร้าง phylogenetic tree ด้วย MEGA program แต่เนื่องจากปัจจุบันมีการพัฒนาโปรแกรมต่างๆ อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการใช้โปรแกรมเพื่องานวิจัยนี้จึงอาจเปลี่ยนแปลงใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ทันสมัยกว่าและเป็นที่ยอมรับมากกว่าตามความเหมาะสม

5.5 Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

ยีน 16S rRNA ที่ถูกตัดสลายด้วยสัฟลูออเรสเซนต์บริเวณส่วนปลายจากขั้นตอน PCR (จากข้อ 5.2.2) จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) คือ *MspI* (C/CGG) และ *AluI* (AG/CT) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง PCR จากนั้น Terminal-restriction fragments (T-RFs) ใน DNA digests จะถูกตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการของ gel electrophoresis ด้วยเครื่อง DNA Sequencer Applied Biosystems 3130 และ 5'- และ 3'-T-RFLP profile ที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย Peak Scanner Software v.1.0 (ABI) จากการใช้ GS1000-size standard ทำให้สามารถวิเคราะห์ T-RF ที่มีขนาดหลากหลายความยาวไม่เกิน 1000 bp ซึ่งครอบคลุมความยาวทั้งหมดของ PCR product (ประมาณ 0.9 kb)

หลังจากเทียบเคียงลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้จากขั้นตอนการโคลนและการหาลำดับเบสข้างต้นกับยีนใน database แล้วนั้น ยีน 16S rRNA นี้จะถูกนำมาหาขนาดของชิ้นส่วนด้านปลาย 5' และ 3' (terminal-fragment length, T-RF; หน่วยเป็น bp) ด้วยการตรวจหา (searching) ตำแหน่งของเบสที่จำเพาะกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ (recognition site) แบบ *in silico* โดยใช้โปรแกรม Finch TV (v.1.4.0) จากนั้นขนาดของ T-RF ที่ค้นหาได้นี้จะถูกนำมาเทียบเคียงกับขนาดของ T-RFs ที่ปรากฏใน 5' และ 3'-T-RFLP profiles โดยอาศัย Peak Scanner software v.1.0 การเทียบเคียงจะทำการระบุกลุ่มแบคทีเรียในแต่ละ T-RF ซึ่งจะอยู่ในรูปของพีค (peak) ทั้งนี้โครงสร้างประชากรของแบคทีเรีย (bacterial community structure) จากแต่ละตัวอย่างจะเปรียบเสมือนลายพิมพ์ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะที่สามารถนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างกันได้ ด้วยการอาศัยความแตกต่างของจำนวน T-RF, ขนาดของ T-RF (bp) และ intensity ของ T-RF ในแต่ละ T-RFLP profiles

6. การระบุชนิดของแบคทีเรียที่เรียกว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ทนโลหะหนักสูงเพื่อระบุชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อและเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี PCR เมื่อทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์แล้วจึงหาลำดับเบสของยีนด้วยการทำ sequencing เมื่อได้ลำดับเบสของยีนแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (ข้อ 5)

ผลการทดลอง

1. การลงพื้นที่เพื่อสำรวจและเก็บตัวอย่าง

หลังจากการศึกษารวบรวมข้อมูลทางภูมิศาสตร์ ข้อมูลทางธรณีวิทยา รวมถึงข้อมูลการมีธาตุโลหะหนักในบริเวณ อ.แม่สอด จ.ตาก จึงได้ลงพื้นที่เก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง (รูปที่ 1) คือ

ครั้งที่ 1 เก็บตัวอย่างในเมือง (ดินบ่อเหมือง) และบริเวณรอบเหมืองที่เคยมีรายงานว่าพบโลหะหนักสูง โดยรวบรวมข้อมูลการปนเปื้อนและการกระจายของโลหะหนักในพื้นที่บริเวณแอ่งตะกอนแม่สอด อ.แม่สอด จ.ตาก จากนั้นลงพื้นที่เพื่อสำรวจและวางแผนการเก็บตัวอย่างดิน ทำการเก็บตัวอย่างทั้งดินจากเหมือง บริเวณห้วยแม่ดาว และพื้นที่ทำการเกษตร โดยอ้างอิงข้อมูลจากรายงานการพบการปนเปื้อนของโลหะหนักแคดเมียมและ/หรือสังกะสีในปริมาณสูง

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างดินทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ซึ่งชื่อตัวอย่างที่แสดงขึ้นกับตำแหน่งในการเก็บตัวอย่าง โดยตัวอักษร P คือ ดินที่เก็บใน ต. พระธาตุผาแดง ส่วนตัวอักษร M คือ ดินที่เก็บใน ต. แม่ดาว

โดยข้อมูลของแหล่งตัวอย่างและผลจากการสังเกตตัวอย่างในขั้นต้น มีดังนี้

Pmine ตัวอย่างดินที่เก็บได้จากบริเวณบ่อเหมือง บริษัทผาแดงอินดัสทรี อ.แม่สอด จ.ตาก

P1 ตัวอย่างดินที่เก็บได้จากบริเวณดินข้างลำห้วยแม่ดาว ลักษณะเป็นดินร่วนปนทราย ชุ่มน้ำมาก

P2 ดินจากบริเวณพื้นที่ทำไร่ไถ่ ซึ่งมีการขุดปรับหน้าดิน แต่ยังไม่มีการเพาะปลูก โดยผิวหน้าดินมีลักษณะแห้งแข็ง และชั้นใต้ดินมีความชื้นต่ำ

P3 ดินข้างบริเวณด้านบนของฝายทดน้ำคอนกรีตซึ่งเป็นแอ่งน้ำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เมตร โดยฝายทดน้ำนี้กั้นห้วยแม่ดาว ต.พระธาตุผาแดง และมีความสูงประมาณ 1.8 เมตร บริเวณข้างฝาย มีต้นหญ้าปกคลุมอยู่ จึงทำให้ดินบริเวณนี้มีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างสูง

M1 ดินบริเวณ ต. แม่ดาว โดยดินมีความอุดมสมบูรณ์ และชุ่มน้ำดี บริเวณนี้มีการทำนาข้าวสลับกับการปลูกถั่วเหลืองอยู่ และขณะเก็บตัวอย่างอยู่ในช่วงการเก็บเกี่ยวถั่วเหลือง ตัวอย่างนี้คือ M1-1 ส่วนตัวอย่าง M1-3 นั้นไม่ได้ทำการทดลองต่อ

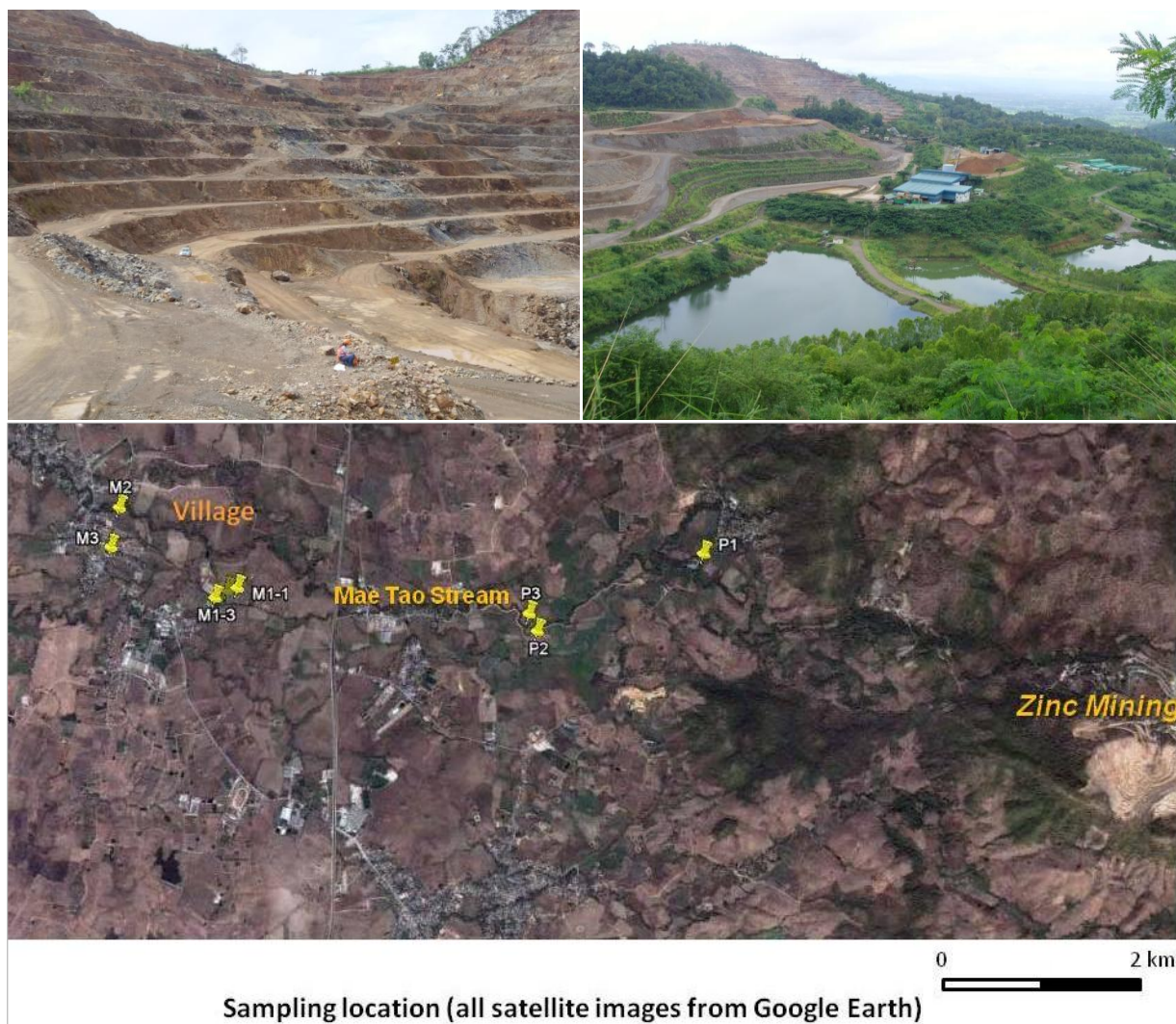
M2 ดินบริเวณที่ห่างจากบริเวณ M1 ประมาณ 1 กิโลเมตร โดยมีความอุดมสมบูรณ์ และ

ชุ่มน้ำดีขณะเก็บตัวอย่างบริเวณนี้มีการทำไร่อ้อย

M3 ดินบริเวณที่ห่างจากบริเวณ M2 ประมาณ 400 เมตร โดยดินมีสภาพสมบูรณ์ และดินบริเวณนี้ใช้สำหรับทำนาข้าว แต่ในปัจจุบันดินบริเวณนี้ได้มีการเก็บเกี่ยวแล้วเหลือแต่ตอซังข้าว และผิวหน้าดินยังไม่มีมีการขุดปรับใหม่ จึงมีวัชพืชเตี้ยปกคลุมอยู่จำนวนมาก

ครั้งที่ 2 เก็บตัวอย่างภายในบริเวณเหมืองสังกะสี บริษัทผาแดง อินดัสทรี ได้ดำเนินการขออนุญาตจากบริษัทในการลงพื้นที่เพื่อสำรวจและเก็บตัวอย่าง โดยในครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณต่างๆ คือ ดินบ่อเหมือง, ดินแร่, ตะกอนดินจากบ่อหางแร่, น้ำและตะกอนดินจากบ่อกักเก็บน้ำ รวมจำนวน 12 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

กรณีตัวอย่างดินจะเก็บที่บริเวณผิวดินและที่ความลึกไม่เกิน 10 ซม. ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่อยู่ในดินระดับความลึกนี้จะมีปริมาณมากและจัดอยู่ในกลุ่ม aerobes ดินสำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจะถูกเก็บที่อุณหภูมิต่ำจนกว่าจะทำการทดลอง และถูกใช้ทำการทดลองภายใน 24 ชั่วโมง หลังการเก็บตัวอย่าง



รูปที่ 1 แสดงบริเวณเก็บตัวอย่าง คือ บริเวณบ่อเหมือง (ภาพบนซ้าย), บริเวณโดยรวมของเหมือง บริษัทผาแดงอินดัสทรี (ภาพบนขวา) และบริเวณอื่นๆ ภายนอกเหมือง (ภาพล่าง)

2. การตรวจสอบลักษณะและคุณสมบัติดิน

การตรวจสอบลักษณะดินและปริมาณธาตุโลหะในดิน โดยการตรวจวัดค่า pH ของดินจะทำได้ด้วยการละลายดินในน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นนำไปเขย่าด้วย shaker แล้วจึงวัดค่า pH โดยใช้ pH meter ส่วนค่า pH ของน้ำสามารถวัดได้โดยตรง โดยพบว่าตัวอย่างดินและน้ำจากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และ 2 มีค่า pH ก่อนข้างเป็นกลางถึงด่าง คือ 6.60- 8.05 และ 7.5- 8.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 1.1 และ 1.2) โดยพบว่าแร่เปอร์เซนต์สูงผ่านการลอยแร่และน้ำจากหางแร่มีความเป็นด่างสูงที่สุด ในการวิจัยไม่ได้วัดปริมาณธาตุจากตัวอย่างดินและน้ำที่นำมาศึกษา เนื่องจากผลการศึกษามุ่งเน้นผลผลิตคือ องค์ความรู้ใหม่อันเป็นประโยชน์ด้านความหลากหลายของแบคทีเรียและการคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งได้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความทนโลหะสูงแม้จะไม่ทราบปริมาณโลหะหนักในดินก็ตาม แต่อย่างไรก็ตามพื้นที่เก็บตัวอย่างจัดเป็นแหล่งที่เคยมีรายงานค่าปริมาณโลหะหนักและเป็นอันตรายต่อการปนเปื้อนของโลหะหนักสูงโดยเฉพาะสังกะสีและเคยมีรายงานว่ามีการปนเปื้อนแคดเมียมด้วยเช่นกัน

3. การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียจากดินและน้ำ

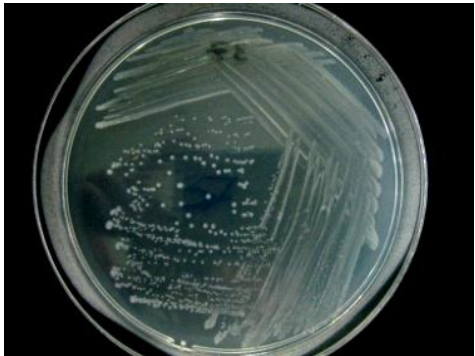
ทำการเจือจางดินน้ำหนัก 10 กรัม หรือน้ำปริมาตร 10 มล. ในสารละลาย normal saline (0.85% NaCl) ปริมาตร 90 มล. จากนั้นเขย่าเพื่อให้เม็ดดินแตกตัวและแบคทีเรียหลุดออกสู่สารละลาย ด้วยเครื่อง Shaker เป็นเวลานาน 20 นาที จึงตูดเฉพาะส่วนของสารละลายไปทำการเจือจางอย่างเป็นลำดับในอัตราส่วนของปริมาตร 1:10 (10-fold serial dilution) ต่อไป สารละลายที่ระดับความเจือจางต่างๆ จะถูกนำไปแยกเชื้อด้วยวิธี spread plate ซึ่งผลการคัดแยกเชื้อพบว่าการเจริญของเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่หลากหลาย ทำการนับจำนวนโคโลนี โดยช่วงของจำนวนโคโลนีที่สามารถนับได้ อยู่ในช่วงระหว่าง 30-300 CFU/plate มาทำการคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างโดยมีหน่วยเป็น CFU/g หรือ ml พบว่าจำนวนแบคทีเรียจากดินและน้ำมีความแตกต่างกันตั้งแต่หลักพันถึงหลักสิบล้าน ทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะและความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งตัวอย่าง นอกจากนี้พบว่าจำนวนแบคทีเรียบนอาหาร TSA ที่เติม ZnSO_4 (0.5 mM) มีความใกล้เคียงกับบนอาหารที่ไม่เติม ZnSO_4 จึงอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถเจริญหรือทนต่อ ZnSO_4 ความเข้มข้นต่ำได้ จากนั้นได้ทำการสังเกตและตรวจสอบลักษณะโคโลนี (colony morphology) เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันนี้ไปทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak โดยเชื้อแบคทีเรียจะถูกศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป เช่น การศึกษารูปร่าง การเรียงตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์และวิธีการย้อมสีแบบแกรม พบว่า ตัวอย่างจากการเก็บครั้งที่ 1 สามารถแยกเชื้อได้ 134 ไอโซเลต ส่วนการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นจากการสังเกตเฉพาะลักษณะโคโลนีด้วยตาเปล่าได้ 396 ไอโซเลต จากนั้นเมื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อได้จำนวนรวม 167 ไอโซเลต (ตาราง 1.1 และ 1.2) โดยพบว่ามีบางไอโซเลตเป็นแบคทีเรียเลี้ยงยาก ซึ่งต้องใช้เวลานานในการเจริญ เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์จากแต่ละตัวอย่างแล้วแบคทีเรียเหล่านี้จะถูกศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและความทนต่อโลหะ

ตารางที่ 1.1 ตารางแสดงค่า pH ของดิน จำนวนแบคทีเรียต่อกรัมดิน และจำนวนไอโซเลตที่แยกได้จากแต่ละตัวอย่างดิน จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1

ดินตัวอย่าง	pH	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ กรัมดิน)	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้
Pmine	7.45	9.1×10^5	17
P1	8.03	2.3×10^7	19
P2	7.00	4.1×10^7	13
P3	8.05	6.4×10^7	17
M1	7.95	1.2×10^7	17
M2	6.60	8.4×10^7	21
M3	7.71	8.9×10^7	30
			รวม 134

ตารางที่ 1.2 แสดงข้อมูลของตัวอย่างดินและน้ำจากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 จำนวนแบคทีเรียที่นับได้ และจำนวนไอโซเลตที่คัดแยกได้

ลำดับ	รหัส ตัวอย่าง	ลักษณะแหล่งเก็บ ตัวอย่าง	pH (ดิน: น้ำ = 1:1 ส่วน)	จำนวน แบคทีเรีย ที่แยกได้	จำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างที่นับได้ (CFU/g หรือ CFU/ml)	
					TSA	TSA + ZnSO ₄ (0.5 mM)
1	A2	ดินจากบ่อกักน้ำ A2	7.51	16	1.035×10^4	2.075×10^4
2	B1	ดินจากบ่อกักน้ำ B1	7.89	20	9.85×10^4	7.15×10^4
3	B1W	น้ำจากบ่อกักน้ำ B1	7.35	20	1.69×10^3	1.13×10^3
4	C1	ดินจากบ่อกักน้ำ C1	7.62	17	6.25×10^4	8.45×10^4
5	C1W	น้ำจากบ่อกักน้ำ C1	7.26	4	2.685×10^4	2.605×10^4
6	S1	ดินบ่อเหมืองจุดที่ 1	7.75	21	5.6×10^4	6.15×10^4
7	S2	ดินบ่อเหมืองจุดที่ 2	7.96	15	2.26×10^6	2.375×10^6
8	CO1	ดินแร่เปอร์เซนต์ ตามธรรมชาติ	7.85	7	5.7×10^3	5.2×10^3
9	CO2	ดินแร่เปอร์เซนต์สูง ผ่านการลอยแร่	8.33	4	2.035×10^4	2.325×10^4
10	T	ดินจากหางแร่	7.88	24	1.395×10^4	9.4×10^3
11	TW	น้ำจากหางแร่	8.26	3	1.44×10^7	1.545×10^7
12	W	ดินจากลานทิ้งดิน	7.96	16	1.695×10^4	1.31×10^4
				รวม 167		

	
Color : ขาวขุ่นเล็กน้อย Form : Circular Elevation : Convex Margin : Entire Surface : Smooth Consistency : Butyrous Optical character: Translucent Diameter: 0.10cm.	Shape : Long rod การติดสี : Gram positive Endospores : -

รูปที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างไอโซเลตซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบ่อเหมือง

4. ความทนต่อโลหะหนักของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นบริเวณภายนอกเหมืองนั้น มีความทนโลหะสังกะสีและแคดเมียมต่ำ ยกเว้นตัวอย่างดินจากบ่อเหมือง แต่อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างดินบ่อเหมืองในการเก็บครั้งที่ 2 ด้วยเช่นกัน ดังนั้นผลงานวิจัยที่ได้แสดงต่อจากนี้จะได้จากการเก็บตัวอย่างในครั้งที่ 2 ส่วนเชื้อแบคทีเรียและดีเอ็นเอจากตัวอย่างครั้งที่ 1 จะถูกเก็บรักษาไว้เพื่อการต่อยอดงานวิจัยในอนาคต

จากตัวอย่างในการเก็บครั้งที่ 2 ซึ่งมีตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่างสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 167 ไอโซเลต ถูกใช้ในการทดสอบความทนโลหะหนัก 4 ชนิด ซึ่งผลการทดลองในขณะนี้พบไอโซเลตที่สามารถทนโลหะหนักสูงสุดถึง 77 mM ZnSO_4 , 11 mM CdSO_4 , 3 mM CuSO_4 และ 4 mM HgCl_2 ได้แสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองพบว่ามีบางไอโซเลตที่ทนโลหะสูงแต่เจริญในสภาวะทั่วไปได้ยากหรือใช้เวลานานมากในการเจริญ และบางไอโซเลตจะแสดงความทนโลหะสูงในช่วงแรกที่คัดแยกใหม่จากดินจากนั้นความทนโลหะจะลดลง อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่แสดงในตารางนี้ได้จากการทดลอง 2-3 ซ้ำ จึงเป็นระดับความทนที่เชื้อสามารถทนได้ในสภาวะทั่วไป ซึ่งในอนาคตเชื้อเหล่านี้จะถูกหาสภาวะที่เหมาะสมที่ช่วยเหลืย่นำให้มีความทนโลหะสูงขึ้นได้ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่มีความทนต่อสังกะสีมากกว่าโลหะหนักทดสอบอื่นๆ ซึ่งอาจเนื่องจากโลหะหนักแต่ละชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนไอโซเลตที่ทนโลหะหนัก ZnSO_4 , CdSO_4 , CuSO_4 และ HgCl_2 ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ZnSO_4

ความเข้มข้นโลหะหนัก (mM)	จำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่ เจริญได้ที่ความเข้มข้นนี้	จำนวนไอโซเลตที่มีความทนสูงสุดที่ความเข้มข้นนี้	
		จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
0	167	13	
5	154	17	
10	137	45	
15	92	21	
20	71	19	
25	52	6	
30	46	26	
32	20	1	
34	19	2	
35	17	3	T-28, B1W-15, C1-14
40	14	0	
45	14	2	CO2-1, T-6
50	12	3	CO1-12, T-1, T-5
55	9	1	T-4
60	8	3	CO1-4, CO1-5, T-7
61	5	1	T-8
62	4	1	S1-15
63	3	1	T-11
64	2	1	S1-17
77	1	1	TW-1
78	0	0	

CdSO_4

ความเข้มข้นโลหะหนัก (mM)	จำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่ เจริญได้ที่ความเข้มข้นนี้	จำนวนไอโซเลตที่มีความทนสูงสุดที่ความเข้มข้นนี้	
		จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
0	167	89	
0.5	78	11	
1.0	67	10	
1.25	57	1	
1.5	56	6	
1.75	50	2	
2.0	48	11	

2.5	37	10	
3.0	27	4	
3.5	23	3	
4.0	20	2	
4.5	18	3	
5.0	15	5	S1-1, A2-21, B1-10, B1W-10, C1-18
5.5 , 6.0, 6.5, 7.0	10	0	-
8.0	10	4	B1-1, B1W-15, C1-14, C1W-1
9.0	6	2	C1-11, C1-17
10.0	4	3	S1-4, S1-12, S1-17
11.0	1	1	S1-15
12.0	0	0	

CuSO₄

ความเข้มข้นโลหะหนัก (mM)	จำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่ เจริญได้ที่ความเข้มข้นนี้	จำนวนไอโซเลตที่มีความทนสูงสุดที่ความเข้มข้นนี้	
		จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
0	167	6	
0.5	161	11	
1.0	150	60	
1.5	90	53	
2.0	37	35	
2.5	2	1	S1-20
3.0	1	1	B1W-11
4.0	0	0	

HgCl₂

ความเข้มข้นโลหะหนัก (mM)	จำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่ เจริญได้ที่ความเข้มข้นนี้	จำนวนไอโซเลตที่มีความทนสูงสุดที่ความเข้มข้นนี้	
		จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
0	167	61	
0.2	106	36	
0.4	70	21	
0.6	49	32	
0.8	17	0	
1.0	17	5	
1.2	12	2	
1.4	10	3	
1.6	7	0	

1.8	7	1	
2.0	6	0	
2.2	6	3	
2.4	3	0	
2.6	3	2	TW-4, W-10
2.8, 3.0	1	0	-
4.0	1	1	S2-19
5.0	0	0	

5. การศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของแบคทีเรีย

การทดลองนี้ได้คัดเลือกดินบ่อเหมืองมาศึกษา สืบเนื่องจากผลการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างทั้งหมด พบว่า ดินบ่อเหมือง S2 ซึ่งเป็นดินตามธรรมชาติที่มีจำนวนและความหลากหลายของแบคทีเรียสูงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น โดยการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียโดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยวิธีการ cloning และ DNA sequencing และการศึกษาโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) ได้ทำการทดลองเสร็จสิ้นแล้ว

5.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างดินบ่อเหมืองถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วย Powersoil-DNA kit จากการวัดปริมาณ ดีเอ็นเอด้วย spectrophotometer โดยดีเอ็นเอที่ได้ถูกทำให้มีปริมาตร 50-100 μ l และมีความเข้มข้น 3.23 ng/ μ l DNA (ตารางที่ 3) แม้ว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอจะไม่สูงมาก ซึ่งอาจเนื่องมาจากความอุดมสมบูรณ์ของดินมีต่ำ แต่ปริมาณดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในระดับดี และสามารถให้ผลการทดลองที่ดีในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ ซึ่งขั้นตอนนี้จัดเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการยืนยันคุณภาพดีเอ็นเอได้เช่นกัน อีกทั้งวิธีการสกัดด้วยชุดสกัด Powersoil-DNA kit นั้นถือเป็นที่ยอมรับและเคยถูกใช้ในงานวิจัยที่มีคุณภาพแล้วมากมาย ด้วยเหตุผลที่ว่าชุดสกัดนี้สามารถสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียหลากหลายชนิดที่ปะปนอยู่ในดิน ทำให้สามารถเพิ่มโอกาสในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในดินได้อย่างครอบคลุม อีกทั้งสามารถลดการปนเปื้อนของโพลีแซคคาไรด์และสารต่าง ๆ จากดินในดีเอ็นเอ ซึ่งสารเหล่านี้มักไปยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอน PCR นั่นเอง

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าความเข้มข้นและคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง

ชื่อตัวอย่าง	ng/ μ l DNA	A260	A280	A260/A280	A260/ A230
S2	3.23	0.065	0.041	1.59	0.52

5.2 การหาความหลากหลายของแบคทีเรียด้วย Cloning และ sequencing

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียได้อาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของยีน 16S rRNA ด้วยวิธีการ cloning และ DNA sequencing จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ไปสร้าง phylogenetic

tree และวิเคราะห์ Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) ซึ่งได้ทำการทดลองในตัวอย่างดินจากบ่อเหมือง

ดีเอ็นเอที่สกัดจากดินบ่อเหมืองถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers สำหรับแบคทีเรีย คือ 616V (universal primer for bacteria; 5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC-3') (Rinke et al., 2006) และ 1492R (universal primer for bacteria and archaea; 5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Juretschko et al., 1998; Tanner et al., 2000) เมื่อ M= A+C และ Y= C+T โดย PCR program คือ 95°C, 3 นาที ตามด้วย 25-30 cycles ของ 95°C, 40 วินาที; 52°C, 40 วินาทีและ 72°C, 90 วินาที และสิ้นสุดด้วย 72°C, 10 นาที จากนั้น PCR product ซึ่งมีความยาวประมาณ 1.5 kb ผลผลิตจากขั้นตอน PCR ถูกนำมาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้น band ที่แสดงผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ที่ถูกต้องถูกสกัดแยกจากเจลด้วย gel extraction kit

ยีน 16S rRNA ที่ได้จากขั้นตอน PCR จะถูกโคลนเข้าใน TOPO-TA cloning vector จาก TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corporation) และทำการถ่ายโอนเวกเตอร์เข้าใน *E. coli* TOP10-cells (Invitrogen Corporation) ด้วยวิธี Heat-Shock โดยดูวิธีการจากคู่มือแนะนำ หลังจาก *E. coli* ใน SOC medium ถูกบ่มที่ 37°C นาน 1 ชม. จะถูกนำมา spread บนอาหาร LB agar (ผสม 100 µg/mL ampicillin และผ่านการ spread ผิวน้ำ ด้วย X-gal ก่อนใช้งาน) บ่มจนเพาะเชื้อดังกล่าวที่ 37°C นาน 16-24 ชม. (overnight) ทำการสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญและใช้ไม้จิ้มฟัน (colony picking) ทำ replica plating บน LB plate และทำ colony PCR โดยอาศัย M13F primer (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G -3') และ M13R primer (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') ซึ่งมี PCR program คือ 95°C, 3 นาที ตามด้วย 30 cycles ของ 95°C, 30 วินาที; 60°C, 30 วินาทีและ 72°C, 1.45 นาที และสิ้นสุดด้วย 72°C, 10 นาที ทำการตรวจสอบ PCR product ด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่ามี 54 โคลนที่ให้ขนาดชิ้นส่วน insert ที่ถูกต้อง จากนั้นจึงนำผลผลิต PCR ไปทำให้บริสุทธิ์ และส่งให้หน่วยงานอื่นหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ต่อไป เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA แล้วจึงนำมาตรวจสอบแบบ manual ด้วย Finch TV program (v. 1.4.0) และเชื่อมต่อดำดับดีเอ็นเอ (assemble) ด้วย DNA Baser program จากนั้น ลำดับดีเอ็นเอสายสมบูรณ์ (full-length sequence) จะถูกเทียบหาจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงใน Blastn ของฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ทั้งหมดจะถูกเทียบเคียงความเหมือนและจัดกลุ่มเข้าในแต่ละ OTU ด้วย DOTUR program โดยอาศัย 98% similarity มีการทำ sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W และสร้าง phylogenetic tree ด้วย MEGA4 program

จากการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างดินบ่อเหมือง (รูปที่ 3) ด้วยการสร้าง phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ที่มีความยาวประมาณ 1.5 kb เมื่อจัดกลุ่มออกเป็นแต่ละ phylotype โดยอาศัยความเหมือนของลำดับเบสมากกว่า 98% พบว่า จากจำนวนทั้งหมด 54 โคลน ประกอบด้วยแบคทีเรีย 5 phylotypes โดยเรียงตามจำนวนประชากรดังนี้

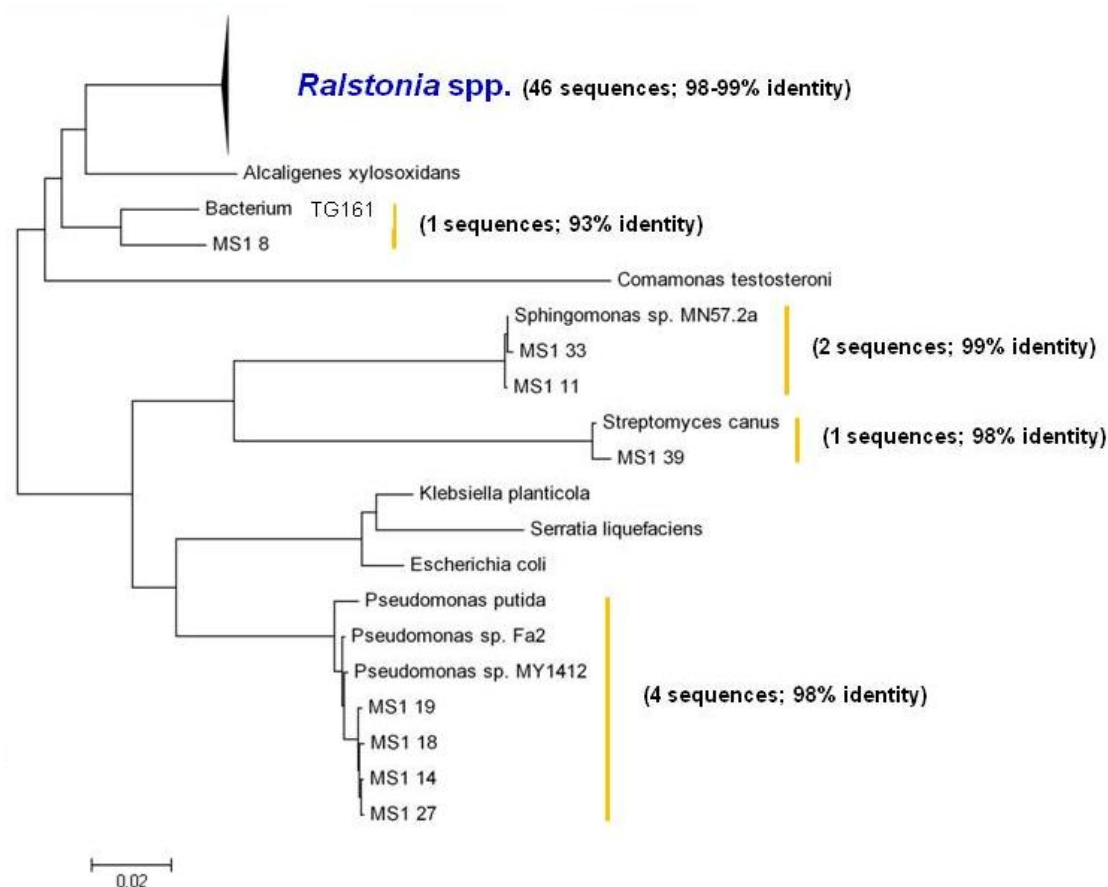
- (1) กลุ่มเด่นที่สุดคือ *Ralstonia* sp. ซึ่งมีทั้งหมด 46 โคลน คิดเป็น 85.2 % ของประชากร

แบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง โดยทั้งหมดในกลุ่มนี้ใกล้เคียงกันมากด้วยความเหมือนลำดับเบส 98-99 %

(2) กลุ่มที่ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* sp. ซึ่งมีทั้งหมด 4 โคลน คิดเป็น 7.4 % ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง โดยทั้งหมดนี้มีความใกล้เคียงกันมากด้วยความเหมือนของลำดับเบส 98%

(3) กลุ่มที่ใกล้เคียงกับ *Sphingomonas* sp. MN57.2a ซึ่งมีเพียง 2 โคลน คิดเป็น 3.7 % ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง โดยมีความใกล้เคียงกันมากด้วยความเหมือนของลำดับเบส 99%

(4) จำนวน 1 โคลนคิดเป็น 1.85 % ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง ที่มีความใกล้เคียงกับ *Bacterium* TG161 ซึ่งเป็น Unclassified bacteria มากที่สุด ด้วยความเหมือนของลำดับเบสที่ค่อนข้างต่ำคือ 93% จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็นแบคทีเรียสปีชีส์หรือสายพันธุ์ใหม่



รูปที่ 3 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่ได้จากดีเอ็นเอที่สกัดจากดินบ่อเหมือง

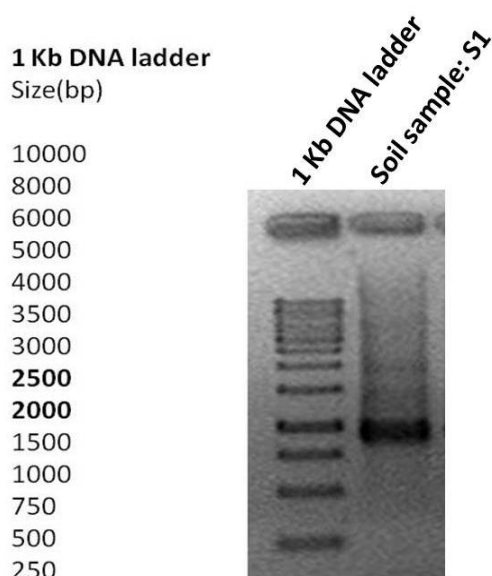
(5) จำนวน 1 โคลนคิดเป็น 1.85 % ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces canus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีต ด้วยความเหมือนของลำดับเบส 98% จึงกล่าวได้ว่าแอคติโนมัยซีตเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในสังคมประชากรในดินปนเปื้อนโลหะหนัก การพยายามคัดแยกและเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีตในงานวิจัยนี้จึงเป็นหัวข้อที่ยังคงความน่าสนใจ เนื่องจากอาจมีอีกหลายสายพันธุ์ที่ยังไม่เคยถูกคัดแยกได้มาก่อน อีกทั้งการศึกษาเกี่ยวกับแอคติโนมัยซีตสามารถต่อยอดงานวิจัย

ได้อีกมากมายโดยเฉพาะความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อกลุ่มนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในด้านการแพทย์และสาธารณสุข การศึกษาแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคทีเรียในดินบ่อเหมืองและจะถูกนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยการทำ phylogenetic tree ร่วมกับยีน 16S rRNA จากไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงได้

5.3 การศึกษาโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียด้วย T-RFLP analysis

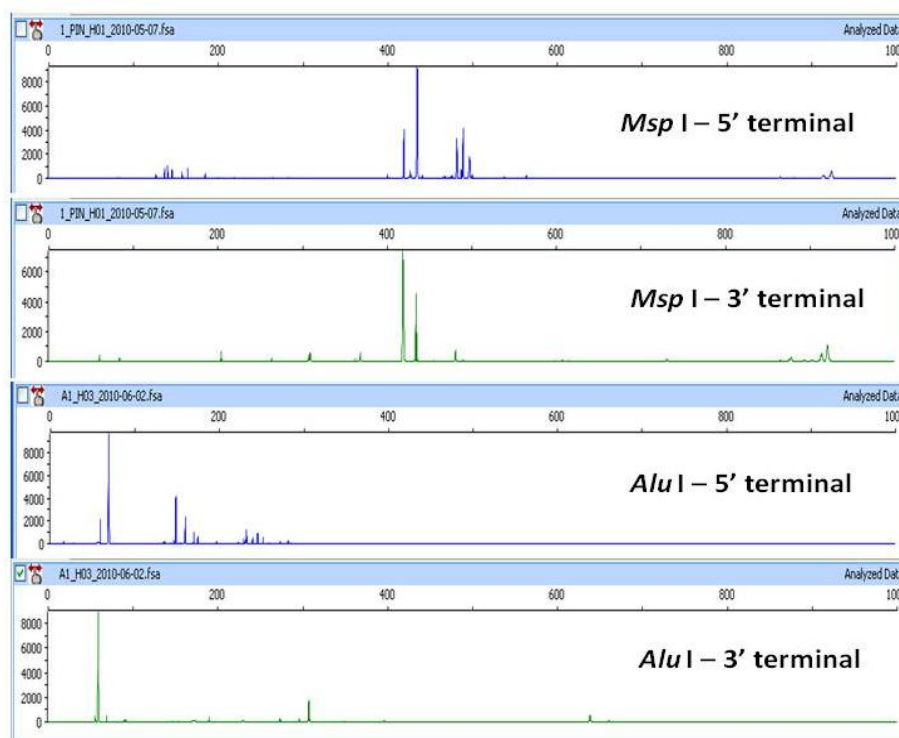
การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการศึกษา Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) อาศัยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primers สำหรับแบคทีเรีย โดย primers ถูกติดสลาด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence dyes) โดย forward primer คือ 616V-FAM ส่วน reverse primer คือ 907R-HEX (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') (ทั้งนี้ได้ปรับปรุงจากแผนวิจัยเดิม ซึ่งเคยระบุว่ามีเพียง forward primer เท่านั้นที่ถูกติดสลาด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ โดยได้เพิ่มเติมให้ติดสลาทั้ง forward และ reverse primer เพื่อจะได้ผลการทดลองที่สามารถทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบจากทั้งด้าน 5'- และ 3' terminals) ส่วน PCR program คือ 95°C, 3 นาที ตามด้วย 30 cycles ของ 95°C, 40 วินาที; 54°C, 40 วินาทีและ 72°C, 90 วินาที และสิ้นสุดด้วย 72°C, 10 นาที โดย PCR product ซึ่งมีความยาวประมาณ 0.9 kb จะถูกตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis (รูปที่ 4) และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตัดเจลไปสกัดด้วย QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer และมีการป้องกันการถูกแสงในทุกขั้นตอน

จากนั้นยีน 16S rRNA ที่ถูกติดสลาด้วยสารฟลูออเรสเซนต์บริเวณส่วนปลายจากขั้นตอน PCR จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ตัวอย่างเช่น *MspI* (C/CGG) และ *AluI* (AG/CT) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง PCR จากนั้นชิ้นส่วนด้านปลายคือ Terminal-restriction fragments (T-RFs; หน่วยเป็น bp) ใน DNA digests จะถูกตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DNA Sequencer Applied Biosystems 3130 และ T-RFLP profile ที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย Peak Scanner Software v.1.0 (ABI) จากการใช้ GS1000-size standard ทำให้สามารถวิเคราะห์ T-RF ที่มีขนาดหลากหลายความยาวไม่เกิน 1000 bp ซึ่งครอบคลุมความยาวทั้งหมดของ PCR product (ประมาณ 0.9 kb) โดยได้ผลออกมาในรูป T-RFLP profile ดังตัวอย่างในรูปที่ 5 พบว่าผลการวิเคราะห์ T-RFLP จากด้าน 5'-terminal แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของกลุ่มแบคทีเรียได้มากกว่าผลจากด้าน 3'-terminal ซึ่งเกิดขึ้นได้ในกรณีที่บริเวณ 5'-terminal มีตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่หลากหลายกว่า โดยกลุ่มประชากรที่ถูกแสดงในรูปของพีคจะถูกระบุชื่อด้วยผลการทดลองจากขั้นตอน cloning and DNA sequencing จึงได้เลือก 5'-T-RFLP profiles ใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป



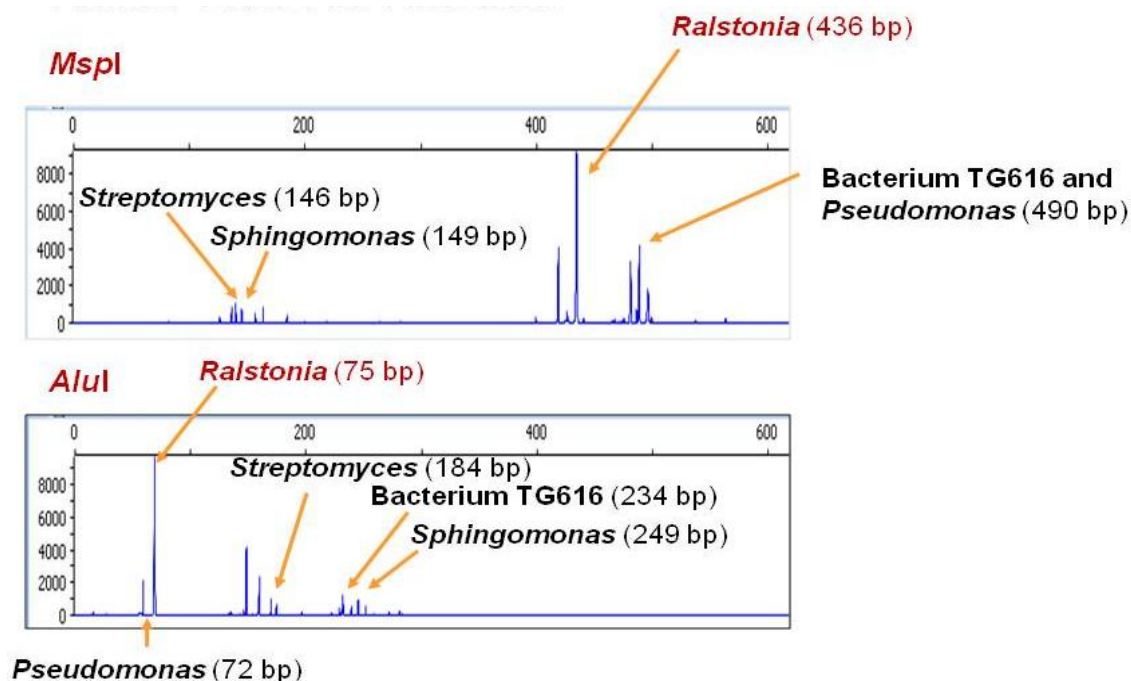
รูปที่ 4 ผลการตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ขนาดประมาณ 0.9 kb ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

หลังจากเทียบเคียงลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้จากขั้นตอนการโคลนและการหาลำดับเบส ข้างต้นกับยีนทั้งหมดใน database แล้วนั้น ยีน 16S rRNA นี้จะถูกนำมาหาขนาดของ T-RF ด้วยการตรวจหา (*In Silico* searching) ตำแหน่งของเบสที่จำเพาะกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ (recognition site) โดยใช้โปรแกรม Finch TV (v.1.4.0) จากนั้นขนาดของ T-RF ที่ตรวจหาได้นี้จะถูกนำมาเทียบเคียงกับขนาดของ T-RFs ที่ปรากฏใน T-RFLP profile โดยอาศัย Peak Scanner software v.1.0 การเทียบเคียงจะทำการระบุกลุ่มแบคทีเรียในแต่ละ T-RF ซึ่งจะอยู่ในรูปของพีค (peak) ทั้งนี้โครงสร้างประชากรของแบคทีเรีย (bacterial community structure) จากแต่ละตัวอย่างจะเปรียบเสมือนลายพิมพ์ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะที่สามารถนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างกันได้ ด้วยการอาศัยความแตกต่างของจำนวน T-RF, ขนาดของ T-RF (bp) และ ความสูงของ T-RF ในแต่ละ T-RFLP profiles



รูปที่ 5 แสดง T-RFLP profiles ของยีน 16S rRNA จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* และ *AluI* พบว่าผลการวิเคราะห์ T-RFLP จากด้าน 5'- terminal แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของกลุ่มแบคทีเรียได้มากกว่าผลจากด้าน 3'-terminal

ผลการศึกษาโครงสร้างประชากรด้วยวิธี Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) โดยใช้ restriction enzymes คือ *MspI* และ *AluI* พบว่า T-RFLP profiles ซึ่งแสดงในรูปที่ 6 มีความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียและให้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยวิธีการโคลนและหาลำดับเบส โดยสามารถพบ T-RFs หรือพีคที่ครอบคลุมแบคทีเรียทั้ง 5 กลุ่ม และขนาดของ T-RF ของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มได้ถูกแสดงในวงเล็บ (รูปที่ 6) อีกทั้งเมื่อสังเกตโดยคร่าวๆ แล้วยังพบว่าความสูงของแต่ละ T-RF มีความสอดคล้องกันกับจำนวนโคลนในแต่ละกลุ่มด้วย โดย T-RFLP profiles สนับสนุนผลการทดลองที่ว่า *Ralstonia* sp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่น และมีประชากรกลุ่มย่อยอีกมากกว่า 4 กลุ่ม ซึ่งบางกลุ่มไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีการโคลนและหาลำดับเบส เนื่องจากมีจำนวนน้อยมากในตัวอย่าง ในขั้นตอนต่อไป T-RFs ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จะถูกระบุใน profiles และจากนั้น profiles ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาเปรียบเทียบกันให้ผลเป็นค่าทางสถิติ



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียจากดินบ่อเหมืองด้วย T-RFLP profiles ของยีน 16S rRNA จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* และ *AluI*

ผลวิจัยในครั้งนี้มีความน่าสนใจ เนื่องจากการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับกลุ่มประชากรของแบคทีเรียที่พบในเหมืองของไทย (ดินจากบ่อเหมือง) ที่ศึกษาด้วยวิธี T-RFLP โดย *Ralstonia* sp. เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Proteobacteria ที่เคยถูกพบในดินและน้ำที่ถูกปนเปื้อนด้วยมลพิษ เช่น *R. detusculanense* และ *Ralstonia* sp. APF11 พบในน้ำที่ปนเปื้อนโลหะหนัก ส่วน *R. pickettii* 12D พบใน Copper-contaminated sediment จากทะเลสาบใน Michigan ส่วน *Bacterium TG616* เป็นแบคทีเรียที่ยังไม่ถูกระบุสายพันธุ์ที่ถูกแยกได้จาก freshwater sediment สำหรับ *Sphingomonas* sp. MN57.2a จัดเป็น hexane-degrading microorganisms ที่แยกได้จาก waste gas biofilters ส่วน *Pseudomonas* sp. Fa2 เป็น Epiphytic microorganisms ถูกแยกได้ครั้งแรกจากต้นสตรอเบอรี่ และสุดท้ายคือ *Streptomyces canus* เป็นแอคติโนมัยซิสสกุลที่พบได้ทั่วไป และมีบทบาทในการสร้างสารปฏิชีวนะให้กับวงการแพทย์ จากผลเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสพบว่ายีน 16S rRNA จากการศึกษานี้มีลำดับเบส (full length sequences) ที่มีความแตกต่างกับแบคทีเรียที่มีใน database จึงกล่าวได้ว่า นอกจากการมีความหลากหลายของแบคทีเรียสูงแล้ว ยังมีโอกาสพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่หรือมีคุณลักษณะที่น่าสนใจที่สามารถนำไปศึกษาต่อไปในอนาคตได้

6. การระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

จากผลการทดลองพบไอโซเลตที่สามารถทนโลหะหนักได้สูงถึง 77 mM ZnSO₄, 11 mM CdSO₄, 3 mM CuSO₄ และ 4 mM HgCl₂ โดยพบว่าไอโซเลตที่ทนแคดเมียมสูง (Cd²⁺) มีความใกล้เคียงกับ

Klebsiella และ *Enterobacter* ด้วยความเหมือนของยีน 16S rRNA ที่ 99% and 98% ตามลำดับ นอกจากนี้หลายไอโซเลตทนสังกะสีสูง (Zn^{2+}) และส่วนใหญ่มีความใกล้ชิดกับ *Ralstonia* ด้วยความเหมือนของยีน 16S rRNA มากกว่า 98%

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างทั้งจากภายนอกและภายในเหมือง พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ที่เก็บจากภายนอกเหมืองนั้นสามารถทนโลหะหนักได้ต่ำกว่า จึงได้ทำการศึกษานำหนักไปที่ตัวอย่างที่เก็บจากภายในเหมือง ซึ่งมีตัวอย่างดินและน้ำจากเหมืองสังกะสีจำนวน 12 ตัวอย่าง (ตัวอย่างดิน 9 ตัวอย่างและตัวอย่างน้ำ 3 ตัวอย่าง) ที่มีความหลากหลายของแบคทีเรีย อีกทั้งคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างมีความแตกต่างกัน โดยตัวอย่างมีค่า pH เป็นกลางถึงด่าง ระหว่าง 7.5- 8.3 ซึ่งในการวิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียตามความแตกต่างทางลักษณะพื้นฐานของโคโลนีได้จำนวนมากถึง 167 ไอโซเลต จากการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งบนอาหาร TSA ที่เติมและไม่เติม 0.5 mM $ZnSO_4$ ซึ่งแสดงจำนวนแบคทีเรียไม่แตกต่างกันนั้นพบว่าจำนวนแบคทีเรียในดินและน้ำมีความแตกต่างกันตั้งแต่หลักพันถึงหลักสิบล้าน โดยดินบ่อเหมือง S2 มีจำนวนแบคทีเรียที่มีลักษณะหลากหลาย จากการทดลองศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในดินบ่อเหมือง S2 ด้วยวิธี culture- independent methods พบว่า มีกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่หลากหลาย (จากจำนวนพีคหรือ T-RF ของ T-RFLP profile) และสามารถระบุสมาชิกบางกลุ่มได้จากการวิเคราะห์ควบคู่กับลำดับเบสของยีน 16S rRNA จากโคลนจำนวน 54 โคลน โดยมีกลุ่มเด่นที่สุด คือ *Ralstonia* sp. ซึ่งมีทั้งหมด 46 โคลน คิดเป็น 85.2 % ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบ *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacterium* TG161 และ *Streptomyces* การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า *Ralstonia* เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่มีปริมาณมากในดินบ่อเหมืองสังกะสีนี้และมีความทนต่อโลหะหนักซึ่งอาจมีบทบาทในการบำบัดทางชีวภาพ

แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตถูกศึกษาความทนต่อโลหะหนักชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคดเมียมและสังกะสี รวมทั้งปรอทและทองแดง จากผลการทดลองพบไอโซเลตที่สามารถทนโลหะหนักได้สูงถึง 77 mM $ZnSO_4$, 11 mM $CdSO_4$, 3 mM $CuSO_4$ และ 4 mM $HgCl_2$ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นค่าที่สูงมากโดยเฉพาะค่าความทนสังกะสี เมื่อเปรียบเทียบกับหลายผลงานวิจัยที่เคยมีรายงาน นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลตที่ทนแคดเมียมสูง (Cd^{2+}) มีความใกล้ชิดกับ *Klebsiella* และ *Enterobacter* ด้วยความเหมือนของยีน 16S rRNA ที่ 99% and 98% ตามลำดับ และมีหลายไอโซเลตที่ทนสังกะสีสูง (Zn^{2+}) และส่วนใหญ่มีความใกล้ชิดกับ *Ralstonia* ด้วยความเหมือนของยีน 16S rRNA มากกว่า 98% จึงกล่าวได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้เป็นประชากรกลุ่มเด่นทั้งในแง่จำนวนที่มากและการมีความทนโลหะหนักที่สูงในดินเหมืองสังกะสี จึงจัดเป็นข้อได้เปรียบในการนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้หรือศึกษาต่อเนื่องในทุกๆ ด้าน ตัวอย่างเช่น การศึกษาสารพันธุกรรมหรือยีนของแบคทีเรีย ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และโลหะ การนำแบคทีเรียไปบำบัดโลหะหนักในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เป็นต้น

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ในโอกาสอันใกล้ ควรมีการทดลองเพิ่มเติมจากแผนการทดลอง เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น โดยเชื้อที่คัดเลือกได้ซึ่งมีจำนวน 167 ไอโซเลตจะถูกสกัดดีเอ็นเอทุกไอโซเลต จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR และทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น *HhaI* เพื่อทำการจัดกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบ RFLP (restriction fragment length polymorphism) จากนั้นเลือกไอโซเลตตัวแทนของแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปหาลำดับดีเอ็นเอ (sequencing) ต่อไป โดยขั้นตอนเหล่านี้จะช่วยลดงบประมาณและระยะเวลาในการศึกษา อีกทั้งผลการทดลองยังคงครอบคลุมจำนวนไอโซเลตซึ่งมีจำนวนมากได้

ในการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ทนโลหะหนักในอนาคตเพื่อเป็นการต่อยอดงานวิจัยในครั้งนี้จะมีความสำคัญจะทำทั้งระดับยีน ระดับโปรตีน และระดับเซลล์ ในระดับเซลล์จะมีการทดสอบความสามารถในการกำจัดโลหะในอาหารและในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำทิ้งจากโรงงาน บ่อบำบัด เป็นต้น โดยตรวจวัดปริมาณโลหะที่หายไปจากตัวอย่างและที่มีอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังทดสอบความสามารถของเชื้อในการผลิตสารต่างๆ เช่น การผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะกดดันโดยโลหะหนัก อีกทั้งมีการศึกษาระดับยีนและการแสดงออกของยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือมีบทบาทในสภาวะที่มีโลหะหนัก

เอกสารอ้างอิง

- Bong, C.W., Malfatti F., Azam F, Obayashi Y. and Suzuki S. 2010. The Effect of zinc exposure on the bacteria abundance and proteolytic activity in seawater, p. 57–63. In N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe (eds), *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry- Biological Responses to Contaminants*. TERRAPUB.
- Chien, C., Y. Kuo, C. Chen, C. Hung, C. Yeh and W. Yeh. 2008. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *J. Environ Sci.* 20: 359–363.
- Ellis, R.J., Morgan P., Weightman A.J. and Fry J.C. 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 69 (6) 3223–3230.
- Freya, B., M. Stemmerb, F. Widmerc, J. Lusterd and C. Sperisena. 2006. Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. *Soil Biol Biochem.* 38: 1745–1756.

- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Roser, H. P. Koops and M. Wagner. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*- like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol.* 64(8): 3042-3051.
- Konstantinidis, K.T., N. Isaacs, J. Fett, S. Simpson, D.T. Long and T.L. Marsh. 2003. Microbial diversity and resistance to copper in metal-contaminated lake sediment. *Microb Ecol.* 45:191–202.
- Lazzaro, A., F. Widmer, C. Sperisen and B. Frey. 2008. Identification of dominant bacterial phylotypes in a cadmium-treated forest soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 63: 143–155.
- Rinke C., S. Schmitz-Esser, K. Stoecker, A. D.Nussbaumer, D. A. Molnar, K. Vanura, M. Wagner, M. Horn, J. A.Ott and M. Bright. 2006. “*Candidatus* Thiobios zoothamnicoli,” an ectosymbiotic bacterium covering the giant marine ciliate *Zoothamnium niveum*. *Appl Environ Microbiol.* 72: 2014–2021.
- Tanner M. A., C. L. Everett, W. J. Coleman, M. M. Yang and D. C. Youvan. 2000. Complex Microbial communities inhabiting sulfide-rich black mud from marine coastal environments. *Biotechnology.* 8: 1-16.
- Wyszkowska, J., J. Kucharski, A. Borowik and E. Boros. 2008. Response of bacteria to soil contamination with heavy metals. *J. Elemental.* 13(3): 443-453.
- Zhang, Y., H. Zhang, X. Li, Z. Su and C. Zhang. 2008. The *cadA* gene in cadmium-resistant bacteria from cadmium-polluted soil in the Zhangshi area of Northeast China. *Curr Microbiol.* 56:236–239.
- Zhang Y., X. Zhang, H. Zhang, Q. He, Q. Zhou, Z. Su and C. Zhang. 2009. Responses of soil bacteria to long-term and short-term cadmium stress as revealed by microbial community analysis. *Bull Environ Contam Toxicol.* 82: 367-372.
- Zhou, J., M. A. Bruns and J. M. Tiedje (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol.* 62: 316-322.
-

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และ หน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
กำลังตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจบุคคลทั่วไป) ไม่มี
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน) ไม่มี
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง) ไม่มี
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
 - 1) องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน : องค์ความรู้ใหม่ด้านความหลากหลายของแบคทีเรียซึ่งอยู่ในรูปเชื้อและสารพันธุกรรมในสิ่งแวดล้อมวิฤตอันเนื่องมาจากมีโลหะหนัก
 - 2) สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์: แบคทีเรียที่คัดแยกได้และสายพันธุ์ของแบคทีเรียทนโลหะหนักจากเหมืองสังกะสีของไทย
 - 3) การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิสิตปริญญาตรี 3 คน, ปริญญาโท 1 คน, ปริญญาเอก 0 คน
 - 4) สนับสนุนการศึกษาปัญหาพิเศษ.....4.....เรื่อง (ระบุ)
 - การจำแนกและทดสอบความทนต่อสารประกอบแคดเมียมของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินเหมืองและแหล่งน้ำใกล้เคียง ในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก
 - สายพันธุ์แบคทีเรียทนโลหะสูงจากดินและน้ำ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก
 - การศึกษาแอคติโนมัยสิทที่คัดแยกจากดินปนเปื้อนโลหะหนัก
 - ความหลากหลายและความทนโลหะหนักของแบคทีเรียจากเหมืองสังกะสีวิทยานิพนธ์.....1.....เรื่อง (ระบุ)
 - ความหลากหลายและความทนโลหะหนักของแบคทีเรียจากเหมืองสังกะสี
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
ร่วมนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ จำนวน 6 เรื่อง (ตั้งภาคผนวก)

ภาคผนวก

ผลงานการเข้าร่วมประชุมวิชาการ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท.38)
ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติเอ็มเพลส จ. เชียงใหม่
17-19 ตุลาคม 2555

1) Pinsurang Deevong, Pattaraporn Rattanawaree, Krit Won-in, Alexander Loy, Michael Pester and Napavarn Noparatnaraporn. 2012. DIVERSITY AND COMMUNITY STRUCTURE OF BACTERIA FROM ZINC MINE. 38th Congress on Science and Technology of Thailand. Chiangmai.

2) Pinsurang Deevong, Thitipa Panrangsee, Jumpon Watcharakasemsin, Alexander Loy, Michael Pester and Napavarn Noparatnaraporn. 2012. HEAVY METAL RESISTANT *Streptomyces* ISOLATED FROM A ZINC MINE. 38th Congress on Science and Technology of Thailand. Chiangmai.

ผลงานการเข้าร่วมประชุมวิชาการ
นักวิจัยรุ่นใหม่..พบ..เมธีวิจัยอาวุโส สกว.
16-18 ตุลาคม 2556

รางวัล: ได้รับเกียรติบัตรเสนอผลงานวิจัยดีเยี่ยมแบบโปสเตอร์

3) Deevong, P., Won-in, K., Rattanawaree, P., Padungrat, C., Watcharakasemsin, J., Loy, A., Pester, M., Wagner, M. and Noparatnaraporn, N. 2013. Bacterial Community and Heavy Metal Resistant Bacteria from Zinc Mine. The 13th annual TRF meeting organized by Office of The Higher Education Commission and The Thailand Research Fund, Oct. 16-19, Cha-am, Phetchaburi. (ได้รับรางวัล The Best Poster Presentation Award)

ผลงานการเข้าร่วมประชุมวิชาการอื่นๆ คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์

4) Pamorn Kupsinchai and Pinsurang Deevong. 2011. Screening Heavy Metals Tolerance Bacterial Composition in Cadmium and Zinc Contaminated Soils and Water around Zinc Mining and Huay Mae Tao Area, Thailand.การประชุมวิชาการระดับปริญญาตรี ครั้งที่ 3. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

5) Mallika Kittithammaruk and Pinsurang Deevong. 2012. Identification and Characterization of Bacteria from Heavy- Metal Contaminated Soil and Water. การประชุมวิชาการระดับปริญญาตรี ครั้งที่ 4. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

6) Thitipa Panrangsee and Pinsurang Deevong. 2012. Study of Actinomycetes Isolated from Heavy - Metal Contaminated Soil. การประชุมวิชาการระดับปริญญาตรี ครั้งที่ 4. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.