

การประเมินความเป็นพิษและการจัดโลหะหนักด้วยโพรโทซัวที่มีเซนเซลล์คัดแยกจากน้ำทิ้ง
อุตสาหกรรมและโรงบำบัดน้ำเสีย



นางสาวศุภสิณี ผุดผ่อง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TOXICITY ASSESSMENT AND REMOVAL OF HEAVY METALS BY CILIATED
PROTOZOA ISOLATED FROM INDUSTRIAL EFFLUENTS AND WASTEWATER
TREATMENT PLANTS

Miss Supasinee Phudpong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การประเมินความเป็นพิษและการกำจัดโลหะหนักด้วยโพร
โทซัวที่มีขนเซลล์คัดแยกจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมและโรง
บำบัดน้ำเสีย

โดย

นางสาวศุภสิณี ผุดผ่อง

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.นพดล กิตนะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประหยัด โภคฐิติยุกต์)

ศุภสิณี ผุดผ่อง : การประเมินความเป็นพิษและการกำจัดโลหะหนักด้วยโปรโตซัวที่มีขนเซลล์ คัดแยกจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมและโรงบำบัดน้ำเสีย (TOXICITY ASSESSMENT AND REMOVAL OF HEAVY METALS BY CILIATED PROTOZOA ISOLATED FROM INDUSTRIAL EFFLUENTS AND WASTEWATER TREATMENT PLANTS) อ.ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี, 87 หน้า.

ซีเลียตเป็นยูแคริโอตเซลล์เดียวที่มีอัตราการสืบพันธุ์สูงและไม่มีผนังเซลล์ ทำให้สามารถตอบสนองต่อความเป็นพิษของสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้จึงสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของคุณภาพน้ำได้ นอกจากนี้ซีเลียตยังมีศักยภาพในการกำจัดโลหะหนัก ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยการดูดซับและนำโลหะหนักเข้าไปเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารละลายโลหะหนักของแดง ตะกั่ว สังกะสี และ แคดเมียม ต่อซีเลียตน้ำจืดที่คัดแยกได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bresslauides* sp., *Paramecium multimicronucleatum*, *Telotrochidium* sp. (BKK), *Telotrochidium* sp. (RY) และ *Tetrahymena pyriformis* ในห้องปฏิบัติการ จากค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซีเลียตตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีโพรบิท พบว่า โลหะหนักที่มีความเป็นพิษต่อซีเลียตสูงสุด คือ แคดเมียม รองลงมาคือ ทองแดง ตะกั่ว และสังกะสี ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงความไวของซีเลียตต่อความเป็นพิษของโลหะหนัก พบว่า *Telotrochidium* sp. (BKK) มีความไวต่อความเป็นพิษของทองแดงมากที่สุด ($LC_{50} = 0.32$ mg/l) ในขณะที่ *Telotrochidium* sp. (RY) มีความไวต่อความเป็นพิษของตะกั่ว (0.50 mg/l) และสังกะสี (1.25 mg/l) มากที่สุด และ *Bresslauides* sp. มีความไวต่อความเป็นพิษของแคดเมียม (0.09 mg/l) มากที่สุด ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการทดสอบศักยภาพของซีเลียตในการกำจัดโลหะหนัก พบว่า ซีเลียตที่ใช้ศึกษาสามารถกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยงได้ โดย *T. pyriformis* สามารถกำจัดทองแดงได้ 30.04%, *P. multimicronucleatum* กำจัดตะกั่วได้ 31.17% และ *Telotrochidium* sp. (RY) กำจัดได้ทั้งสังกะสี (53.89%) และแคดเมียม (41.88%) แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำซีเลียตเหล่านี้ไปใช้ในการกำจัดโลหะหนักที่พบปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเพื่อการบำบัดทางชีวภาพในอนาคตต่อไป

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5472122523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: CILIATE / BIOINDICATOR / BIOREMEDIATION / POLLUTANT / HEAVY METALS

SUPASINEE PHUDPONG: TOXICITY ASSESSMENT AND REMOVAL OF HEAVY METALS BY CILIATED PROTOZOA ISOLATED FROM INDUSTRIAL EFFLUENTS AND WASTEWATER TREATMENT PLANTS. ADVISOR: DR.CHITTHAI CHANTANGSI, 87 pp.

Ciliates are unicellular eukaryotes with high reproduction rate and no cell wall; thus, making them respond quickly to toxicity of chemical contaminants in environments. This particular group of microbes can then be used as biological indicators of water qualities. In addition, ciliates possess a capability of removing heavy metals through biological processes of cellular biosorption and bioaccumulation. This study examined the toxicity of soluble compounds of four heavy metals – copper, lead, zinc, and cadmium – to five isolates of freshwater ciliates, namely *Bresslauides* sp., *Paramecium multimicronucleatum*, *Telotrochidium* sp. (BKK), *Telotrochidium* sp. (RY), and *Tetrahymena pyriformis* under laboratory conditions. Based on the median lethal concentration (LC₅₀) using Probit analysis, the result indicated that cadmium was the most toxic to all tested ciliates, followed by copper, lead, and zinc, respectively. Considering the ciliates' sensibilities to the treated metals, *Telotrochidium* sp. (BKK) showed the highest sensitivity to copper (LC₅₀ = 0.32 mg/l) while *Telotrochidium* sp. (RY) demonstrated the greatest susceptibilities to lead (0.50 mg/l) and zinc (1.25 mg/l) and *Bresslauides* sp. exhibited such responsiveness to cadmium (0.09 mg/l). Furthermore, this study revealed the ability of the examined ciliates to uptake the heavy metals from the culture media. The experimented ciliates that showed the highest capabilities of removing the metals were *T. pyriformis* for copper (30.04%), *P. multimicronucleatum* for lead (31.17%), and *Telotrochidium* sp. (RY) for both zinc (53.89%) and cadmium (41.88%), suggesting the feasibility of utilizing these isolated ciliates in removing metals found contaminated in environments for future bioremediation purposes.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อชี้แนะ ให้ความรู้ ความเข้าใจ รวมทั้งให้คำปรึกษา ทั้งในขณะวางแผนการศึกษา การออกปฏิบัติงานในภาคสนาม การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ การวิเคราะห์และสรุปผล ตลอดจนตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.นพดล กิตนะ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำทางด้านวิชาการที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภاطر กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำเพื่อการปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประหยัด โภคฐิติยุกต์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาอันมีค่าเดินทางเพื่อมาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า และให้คำแนะนำสำหรับการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่สนับสนุนเงินทุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณวินัส มณีวงษ์ คุณธนาภรณ์ ธรรมธิ เจ้าหน้าที่ประจำโรงควบคุมคุณภาพน้ำสี่พระยา คุณชูเกียรติ ศรีคลหนู เจ้าหน้าที่บริษัทไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) และคุณเกียรติศักดิ์ ตั้งเจริญสุทธิชัย เจ้าของโรงงานยางพารา ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ทรงความรู้ทุก ๆ ท่าน ที่ได้ริเริ่มและวางรากฐานในการศึกษาเรื่องซีลีเอต ตลอดจนนำเสนอข้อมูลและบทความวิชาการอันเป็นประโยชน์มาเผยแพร่ต่อสาธารณะ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อันเป็นสถานที่ศึกษา และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้การศึกษาและความรู้ ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ คุณอา และเพื่อน ๆ ที่ดูแลและให้กำลังใจจนทำให้วิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
ขอบเขตการศึกษา	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ซิลิเกต	4
โลหะหนัก	5
การศึกษาพิษและการกำจัดโลหะหนักโดยใช้สิ่งมีชีวิตในประเทศไทย.....	6
ซิลิเกตกับการใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ	7
ซิลิเกตกับโลหะหนัก	9
ซิลิเกตกับการกำจัดโลหะหนัก	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	17
การปฏิบัติงานในภาคสนาม	17
การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ	20

ก.	การเตรียมอาหารเลี้ยง (medium preparation)	20
ข.	การเพาะเลี้ยงเบื้องต้น (crude culturing).....	20
ค.	การแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ (pure culturing)	21
ง.	การศึกษาพื้นฐานวิทยาของซิติเอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง (light microscope)	22
จ.	การศึกษาพื้นฐานวิทยาของซิติเอดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope).....	22
ฉ.	การระบุชนิดของซิติเอดโดยอาศัยข้อมูลทางอนุชีววิทยาระดับดีเอ็นเอ	22
ช.	การหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (generation time)	31
ซ.	การทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ต่อเซลล์ซิติเอด.....	32
ฌ.	การทดสอบศักยภาพในการกำจัดโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ปนเปื้อนออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซิติเอด.....	33
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....		35
	การศึกษาพื้นฐานวิทยาของซิติเอด	35
	การระบุชนิดของซิติเอดโดยอาศัยลักษณะทางอนุชีววิทยา.....	41
	การระบุอัตลักษณ์โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของซิติเอดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	49
	การทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ต่อเซลล์ซิติเอด	53
	การทดสอบศักยภาพในการกำจัดโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ปนเปื้อนออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซิติเอด	59
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ		63
	การทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ต่อเซลล์ซิติเอด	64
	การทดสอบศักยภาพในการกำจัดโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ปนเปื้อนออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซิติเอด.....	73

สรุปผลการศึกษา.....	77
ข้อเสนอแนะ.....	78
รายการอ้างอิง.....	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	87



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซิลิเกตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบ	9
ตารางที่ 2 คู่มือและโปรแกรมที่ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนไรโบโซมอลดีเอ็นเอของซิลิเกตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	25
ตารางที่ 3 โปรแกรมที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์	30
ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>Breslauides</i> sp. เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม	53
ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>P. multimicronucleatum</i> เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม	54
ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>Telotrochidium</i> sp. (BKK) เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม	55
ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>Telotrochidium</i> sp. (RY) เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม	56
ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ <i>T. pyriformis</i> เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม	57
ตารางที่ 9 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ของ <i>Breslauides</i> sp.	59
ตารางที่ 10 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ของ <i>P. multimicronucleatum</i>	60
ตารางที่ 11 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ของ <i>Telotrochidium</i> sp. (BKK)	61

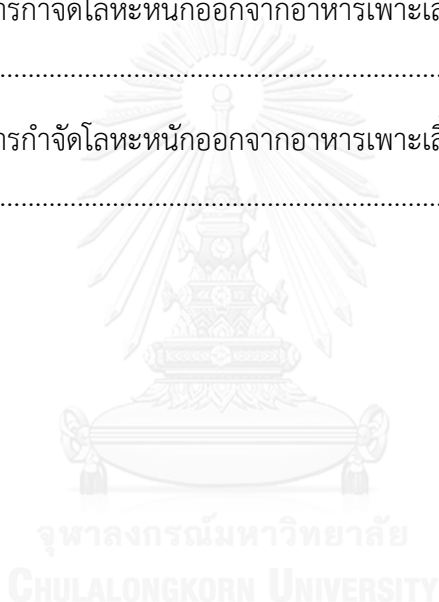
ตารางที่ 12 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ของ *Telotrochidium* sp. (RY)61

ตารางที่ 13 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ของ *T. pyriformis*62

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซิลิเกตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบที่เคยมีรายงานและผลจากการศึกษาในครั้งนี้.....68

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซิลิเกตที่เวลา 24 ชั่วโมง.....75

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซิลิเกตที่ระยะเวลาต่าง ๆ77



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงซิติเอดสกุลพารามีเซียม.	4
ภาพที่ 2	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ของซิติเอดสายพันธุ์ <i>Uronema nigricans</i> แสดงการเรืองแสงจากสารเรืองแสง TSO ที่มีความจำเพาะต่อสังกะสี หลังการทดสอบการสะสมสังกะสีภายในเซลล์ผ่านไป 24 ชั่วโมง.....	15
ภาพที่ 3	การเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อรวมน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำสี่พระยา เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร	17
ภาพที่ 4	พื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำ บ่อเก็บน้ำหลังการบำบัดของโรงงานยางพารา จังหวัดระยอง	18
ภาพที่ 5	พื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำ บ่อน้ำทิ้งที่บำบัดแล้วจากบริษัท ไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) จังหวัดระยอง	19
ภาพที่ 6	พื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำ คลองบริเวณหน้าตึกฟุตบอลสนาม หอพักนิสิตหญิงจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร	20
ภาพที่ 7	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดง <i>Bresslauides</i> sp.	35
ภาพที่ 8	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดง <i>P. multimicronucleatum</i>	37
ภาพที่ 9	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดง <i>Telotrochidium</i> sp. (BKK).....	38
ภาพที่ 10	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดง <i>Telotrochidium</i> sp. (RY).....	39
ภาพที่ 11	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดง <i>T. pyriformis</i>	40
ภาพที่ 12	แถบผลิตภัณฑ์ฟิซีอาร์ที่ปรากฏบนเจลหลังจากนำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide	41

- ภาพที่ 13 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของซีลิเอต *Bresslauides* sp., *P. multimicronucleatum*, *Telotrochidium* sp. (BKK), *Telotrochidium* sp. (RY) และ *T. pyriformis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้.....52
- ภาพที่ 14 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และ แคดเมียม ที่ทำให้ซีลิเอตทั้ง 5 สายพันธุ์ตายไปครั้งหนึ่ง58



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

กิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ทั้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น การทิ้งน้ำเสียจากโรงงาน อุตสาหกรรม หรือการปล่อยสารเคมีที่ใช้ในการเกษตรลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ได้ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และทำให้เกิดปัญหามลพิษทั้งทางน้ำ ทางอากาศ หรือมลพิษจากขยะของเสียเหลือทิ้ง ปัญหาเหล่านี้ได้สร้างผลกระทบทั้งกับมนุษย์เองและสิ่งมีชีวิตอื่นในระบบนิเวศ อันเป็นผลมาจากสารพิษต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้ระบบนิเวศเสื่อมโทรมเกินกว่าที่สิ่งมีชีวิตจะอาศัยอยู่ได้ อีกทั้งยังเป็นการทำลายห่วงโซ่อาหารและมีอันตรายกับร่างกายหากนำน้ำนั้นไปใช้เพื่อการอุปโภคบริโภค โลหะหนักเป็นหนึ่งในมลพิษที่พบปนเปื้อนมากในแหล่งน้ำและมีความเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างปัญหามลพิษทางน้ำครั้งสำคัญเกิดขึ้นเมื่อมีการปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำเมื่อปี พ.ศ. 2493 ในเขตโทยามา ลุ่มน้ำจินชู ประเทศญี่ปุ่น เนื่องมาจากการทำเหมืองแร่ ก่อให้เกิดการปนเปื้อนแคดเมียมในระบบชลประทานและนาข้าวที่เพาะปลูกเพื่อการบริโภคในบริเวณดังกล่าว เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอิไต อิไต (itai-itai) จากการสะสมของแคดเมียมในกระดูก ทำให้กระดูกผุและมีอาการปวดอย่างรุนแรง (Kasuya et al., 1992) เพื่อแก้ไขปัญหาคadmiumปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำได้มีการพัฒนาวิธีการทางกายภาพเพื่อกำจัดโลหะหนักออกจากน้ำเสียขึ้น ตัวอย่างเช่น การตกตะกอน (precipitation) การแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) และการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ (activated carbon) (Dean, Bosqui, and Lanouette, 1972) แต่วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดในเรื่องของเงินทุนและค่าใช้จ่ายจากการทำงานของระบบที่สูงจึงถูกใช้แค่เฉพาะในอุตสาหกรรมที่มีขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังมีปัญหาที่เกิดจากตัวระบบบำบัดเอง เช่น ตะกอนปริมาณมากที่เกิดจากกระบวนการตกตะกอน (Kumar, 2006) ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้สนใจนำเอาสิ่งมีชีวิตมาใช้ในการบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) เพื่อกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำ เนื่องจากมีต้นทุนที่ต่ำกว่าวิธีการทางกายภาพ โดยทำการศึกษาในสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลชีพ เช่น รา แบคทีเรีย และโพรทิสต์ (Gadd, 1990; Rehman et al., 2005; Yan and Viraraghavan, 2003)

ซิลิเอนเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวในกลุ่มโพรทิสต์ มีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายขน เรียกว่า ซีเลีย (cilia) ใช้ในการเคลื่อนที่และกินอาหาร สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้มีความหลากหลายของสายพันธุ์สูงและพบได้ทั่วไปทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และในดิน เนื่องจากซิลิเอนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ อีกทั้งยังสามารถตอบสนองต่อการปนเปื้อนของมลพิษในสิ่งแวดล้อมได้อย่าง

รวดเร็วกว่า เพราะมีอัตราการสืบพันธุ์สูงและมีความจำเพาะต่อสภาพที่อยู่อาศัย ทำให้สามารถติดตามผลได้ในระยะเวลาไม่นาน (Madoni, 2005) จึงมีผู้นิยมศึกษาการใช้ชีลิเอดเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (biological indicator) ของคุณภาพน้ำ (Madoni, 1993; Madoni, 2005) อีกทั้งยังพบว่าชีลิเอดสามารถกำจัดโลหะหนักในรูปของสารละลายที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงได้ โดยชีลิเอดจะนำโลหะหนักเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ (Rehman et al., 2005; Rehman, Shakoori, and Shakoori, 2006) อย่างไรก็ตามการศึกษาในปัจจุบันเกี่ยวกับการนำโพรโทซัวไปใช้ยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในราและแบคทีเรีย และด้วยศักยภาพของชีลิเอดที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ชีลิเอดเป็นอีกหนึ่งตัวเลือกที่สามารถนำไปใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักและกระบวนการบำบัดโลหะหนักทางชีวภาพได้ ผู้ดำเนินโครงการจึงเล็งเห็นความสำคัญของการศึกษาศักยภาพของโพรโทซัวกลุ่มชีลิเอดซึ่งพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำเสีย โดยหวังว่าชีลิเอดจะเป็นอีกหนึ่งตัวเลือกที่ดีเพื่อนำไปใช้ในการประเมินความเป็นพิษและกระบวนการบำบัดโลหะหนักทางชีวภาพต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดแยกชีลิเอดที่มีความทนต่อความเป็นพิษของโลหะทองแดง (copper: Cu) ตะกั่ว (lead: Pb) สังกะสี (zinc: Zn) และแคดเมียม (cadmium: Cd)
2. ทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงต่อเซลล์ชีลิเอด
3. ทดสอบความสามารถของชีลิเอดในการกำจัดโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ออกจากอาหารเพาะเลี้ยง

ขอบเขตการศึกษา

เก็บตัวอย่างน้ำจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำสีพระยา กรุงเทพมหานคร บ่อเก็บน้ำหลังการบำบัดของโรงงานยางพารา จังหวัดระยอง และบ่อน้ำทิ้งที่บำบัดแล้วจากบริษัท ไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) จังหวัดระยอง และคัดแยกชีลิเอดจำนวน 5 สายพันธุ์ (isolate) เพื่อการทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงต่อเซลล์ชีลิเอด และทดสอบความสามารถของชีลิเอดในการกำจัดโลหะข้างต้นออกจากอาหารเพาะเลี้ยง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ชีลิเอดและความสามารถของเซลล์ชีลิเอดในการกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยง และนำศักยภาพดังกล่าวไปใช้ในกระบวนการบำบัดโลหะหนักทางชีวภาพ

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

- ก. คำศัพท์หลักที่ปรากฏทั้งในเล่มวิทยานิพนธ์และในหนังสือของราชบัณฑิตยสถาน
อ้างอิงตามหนังสือศัพท์วิทยาศาสตร์ อังกฤษ-ไทย ไทย-อังกฤษ ฉบับราชบัณฑิตยสถาน

(2546)

1. โพรโทซัว (protozoa) หรือสัตว์เซลล์เดียว
2. ซีเลีย (cilia)

- ข. คำศัพท์เฉพาะที่ปรากฏในเล่มวิทยานิพนธ์

โดยเป็นคำศัพท์ที่ไม่ปรากฏข้อมูลในหนังสือศัพท์วิทยาศาสตร์ อังกฤษ-ไทย ไทย-อังกฤษ ฉบับราชบัณฑิตยสถาน (2546) และมีการให้ความหมายเบื้องต้นโดยผู้วิจัย

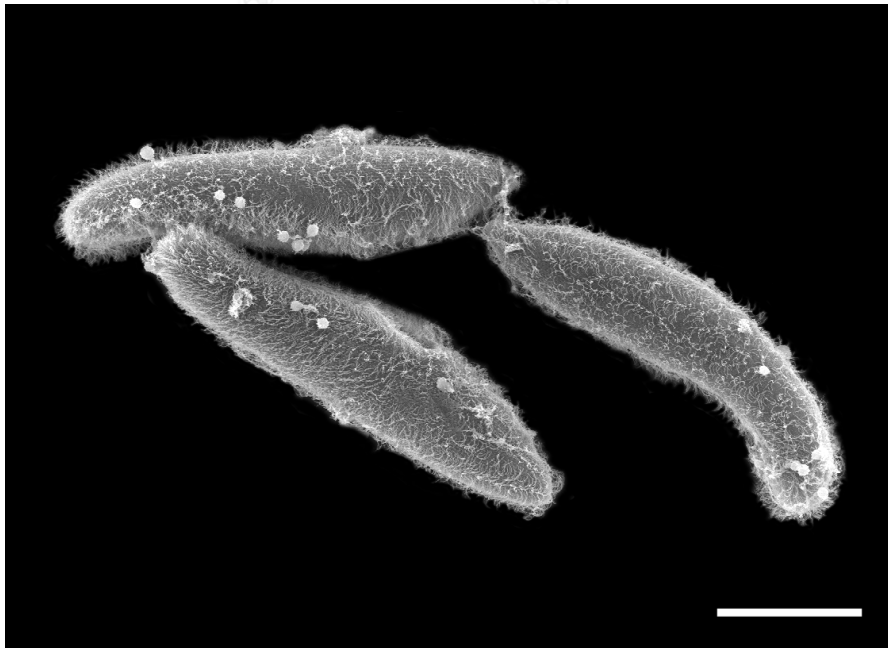
1. ซิลิเอต (ciliate) คือ สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่มีซีเลีย
2. ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (biological indicator) คือ สิ่งมีชีวิตที่สามารถบ่งชี้สภาวะของสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ได้ เนื่องมาจากความสามารถในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่
3. การบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) คือ การบำบัดฟื้นฟูคุณภาพของสิ่งแวดล้อมโดยใช้สิ่งมีชีวิต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ซิติเอต

ซิติเอตเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวในกลุ่มโพรโทซัว มีขนาดเล็กและไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ พบในแหล่งที่อยู่อาศัยที่ชื้นแฉะ ในทะเล ดิน และน้ำจืด ซิติเอตบางชนิดสามารถแปรสภาพเป็นซีสต์ (cyst) เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ซิติเอตทุกชนิดมีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายขน เรียกว่า ซีเลีย (cilia) ยื่นออกจากเซลล์ ซึ่งอาจมีความยาวสม่ำเสมอหรือมีความยาวต่างกันแล้วแต่ตำแหน่งของซีเลีย ซีเลียทำหน้าที่เป็นอวัยวะรับสัมผัส รวมถึงใช้ในการเคลื่อนที่และการกินอาหาร ซิติเอตมีนิวเคลียสสองแบบ คือ แมโครนิวเคลียส (macronucleus) ทำหน้าที่ควบคุมการดำรงชีวิต และไมโครนิวเคลียส (micronucleus) ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ การสืบพันธุ์ของซิติเอตพบได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่พบเป็นแบบคอนจูเกชัน (conjugation) แต่โดยส่วนใหญ่ซิติเอตมักใช้การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น การแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง (binary fission) ซึ่งพบในซิติเอตที่มีการเคลื่อนที่อย่างอิสระหรือการแตกหน่อ (budding) ที่พบในซิติเอตกลุ่มที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ตัวอย่างของซิติเอตที่พบได้ทั่วไป ได้แก่ พารามีเซียม (ภาพที่ 1) (Lynn, 2008)



ภาพที่ 1 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) แสดงซิติเอตในสกุลพารามีเซียม จำนวน 3 เซลล์ ซึ่งมีซีเลียปกคลุมทั่วทั้งเซลล์ แถบเทียบขนาด 50 μm

โลหะหนัก

โลหะหนัก หมายถึง โลหะที่มีความหนาแน่นเกินกว่า 5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตและสะสมในระดับหนึ่ง จะทำให้เกิดความเป็นพิษและส่งผลต่อกลไกในระดับเซลล์ โดยอาจทำให้เซลล์ตายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ สร้างความเสียหายต่อโครโมโซมก่อให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม อีกทั้งยังก่อให้เกิดมะเร็งได้ (ขนิษฐ พานขวงค์, 2550) โดยโลหะหนักที่พบบ่อย คือ ตะกั่ว สารหนู แคดเมียม สังกะสี ทองแดงปรอท โครเมียม และแมงกานีส นอกจากผลกระทบต่อมนุษย์แล้ว โลหะหนักยังมีพิษต่อสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำเสียที่เกิดการปนเปื้อนของโลหะหนักจากโรงงานอุตสาหกรรม (Nriagu and Pacyna, 1988) เนื่องจากโลหะหนักไม่สามารถสลายไปได้เองตามกระบวนการทางธรรมชาติ บางส่วนจึงตกตะกอนและสะสมอยู่ในดินหรือน้ำ ส่งต่อไปยังสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีช่วงชีวิตยาว และสุดท้ายจะสะสมอยู่ในห่วงโซ่อาหาร (Hickey, Vanderwielen, and Switzenbaum, 1989; Kong et al., 1995)

โลหะหนักที่พบบนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมากที่สุดชนิดหนึ่ง คือ ตะกั่ว เนื่องจากเป็นโลหะที่ใช้ในอุตสาหกรรมหลากหลายประเภท เช่น การทำเหมืองตะกั่ว โรงงานผลิตแบตเตอรี่ โรงงานผลิตชิ้นส่วนอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์ พิษของตะกั่วทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ก่อให้เกิดโรคโลหิตจาง (anemia) อีกทั้งยังส่งผลต่อการทำงานของตับ หลอดเลือดหัวใจ ภาวะเจริญพันธุ์ และทำให้พัฒนาการทางสมองของเด็กแฉ่งลง มีอาการหงุดหงิดง่าย ภาวะวุ่นวาย หากมีอาการรุนแรงอาจชัก หมดสติ และเสียชีวิตได้ (Duruibe, Ogwuegbu, and Egwurugwu, 2007) ในประเทศไทยสำนักกระบาดวิทยารายงานการได้รับพิษจากสารตะกั่วเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในกลุ่มเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปี ผ่านการสัมผัสจากสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ หรือการได้รับจากการทำงานของบิดามารดาที่รับงานมาทำที่บ้าน เช่น งานเซรามิก การทาสี เป็นต้น

นอกจากตะกั่วแล้วสังกะสียังเป็นโลหะหนักอีกชนิดหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการใกล้เคียงกับอาการที่เกิดจากพิษของตะกั่ว โดยปกติแล้วสังกะสีเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกายโดยเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อีกกว่า 100 ชนิด ช่วยในกระบวนการส่งผ่านกระแสประสาท (neurotransmission) รวมไปถึงการมีส่วนช่วยในด้านพัฒนาการของเด็ก โดยทั่วไปพบได้ในอาหาร เช่น ผัก ผลไม้ นม และเนื้อแดง แต่อยู่ในปริมาณที่ไม่เป็นอันตราย อย่างไรก็ตามร่างกายของมนุษย์ยังมีความต้องการสังกะสีอยู่ในระดับต่ำ ดังนั้นหากได้รับสังกะสีมากเกินไป ปริมาณที่ร่างกายต้องการจะทำให้เป็นพิษได้ ก่อให้เกิดอาการอ่อนเพลีย วิงเวียนศีรษะ ท้องร่วง ภูมิคุ้มกันในร่างกายทำงานลดลงและโลหิตจาง (Fosmire, 1990) นอกจากอาการที่กล่าวมาแล้ว การศึกษาในหนูทดลองยังพบว่าสังกะสีส่งผลให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง ทำให้หัวใจทำงานมากขึ้น

จนเกิดอาการหัวใจโตและทำให้หนูเจอร์มิเดบโตช้า (Yanagisawa et al., 2004) การใช้ภาชนะเคลือบสังกะสีใส่อาหาร เป็นแหล่งที่มาของสังกะสีที่ก่อให้เกิดพิษโดยมักมาจากการนำภาชนะประเภทนี้ไปใส่อาหารที่เป็นกรด หรือการใช้สังกะสีในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋องทำให้สังกะสีละลายออกมาปนกับอาหาร

โลหะหนักอีกชนิดที่มีความเป็นพิษสูงแม้ว่าจะได้รับในปริมาณน้อยก็ตาม คือ แคดเมียม ซึ่งเป็นโลหะที่ร่างกายไม่ต้องการในการดำรงชีวิต แต่เป็นผลพลอยได้ (by product) จากการทำเหมืองสังกะสี แคดเมียมถูกใช้ในอุตสาหกรรมยาสูบและบุหรี่ยุติ อุตสาหกรรมพลาสติกและยาง การผลิตแบตเตอรี่และเครื่องใช้ไฟฟ้า ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยาของประเทศไทยระบุว่า แคดเมียมในปริมาณมากกว่า 300 มิลลิกรัมส่งผลถึงแก่ชีวิต และหากได้รับแคดเมียมในปริมาณตั้งแต่ 10 มิลลิกรัมขึ้นไป จะก่อให้เกิดอาการพิษอย่างชัดเจน ซึ่งอาจพบได้ตั้งแต่อาการปวดกระดูกสันหลัง แขน ขา หากสะสมในร่างกายในปริมาณมากจะก่อให้เกิดมะเร็งและไตทำงานผิดปกติ เป็นสาเหตุของโรคความดันโลหิตสูง และทำให้เกิดอาการไตวายได้ โดยส่วนใหญ่โรคที่เกิดจากแคดเมียมมักเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากการได้รับแคดเมียมติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน โดยสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ โรคปอดเรื้อรังที่เกิดจากการอักเสบของหลอดลมและโรคไตอักเสบ (Duruibe et al., 2007)

โลหะหนักบางชนิด เช่น ทองแดง มีความจำเป็นต่อร่างกาย โดยเป็นองค์ส่วนประกอบที่สำคัญในกระดูกและกล้ามเนื้อ เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์หลายตัวในร่างกาย ทองแดงพบได้ในสมอง หัวใจ ตับและไต โดยทั่วไปร่างกายของผู้ใหญ่ต้องการทองแดงประมาณ 2-3 มิลลิกรัมต่อวัน ทองแดงจัดอยู่ในกลุ่มของแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อร่างกายแต่ในปริมาณน้อย ดังนั้นหากได้รับทองแดงในปริมาณมากเกินไปจะก่อให้เกิดอันตรายได้เช่นเดียวกัน (Duruibe et al., 2007) ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยาของประเทศไทยได้ระบุถึงอาการที่เกิดจากพิษของทองแดงไว้ว่า ในคนที่ได้รับทองแดงมากเกินไปจะมีอาการอักเสบในช่องท้องและกล้ามเนื้อ ท้องเสีย หัวใจทำงานผิดปกติ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกกดไว้ และเมื่อได้รับพิษติดต่อกันเวลานานจะทำให้เกิดกลุ่มอาการ Wilson' diseases คือ ร่างกายสันเทาอยู่ตลอดเวลา กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง และควบคุมการพูดลำบาก ทองแดงมีการแพร่กระจายลงสู่สิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากถูกใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตลวด สายไฟ ท่อน้ำ รวมถึงใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์รบกวนทางเกษตร

การศึกษาพิษและการกำจัดโลหะหนักโดยใช้สิ่งมีชีวิตในประเทศไทย

โลหะหนักไม่เพียงส่งผลต่อมนุษย์ แต่ยังสร้างผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในระบบนิเวศ เช่น พิษของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ของไร่น้ำแดง (*Moina macrocopa*) ทำให้จำนวนลูกและจำนวนครั้งในการสืบพันธุ์น้อยลง (โชคชัย ยะชูศรี, 2535) จากการศึกษาสภาพพิษของแคดเมียม ทองแดง สังกะสี ตะกั่ว และปรอท ที่มีต่อหอยกินได้ 8 ชนิด ในพื้นที่ชุ่มน้ำบึงจืด

จังหวัดขอนแก่น โดยลำไย ณีรัตน์พันธุ์ (2552) พบว่าโลหะหนักเข้าไปทำลายเซลล์ไตของหอยขม (*Filopaludina martensi*) และยังมีผลต่อเอนไซม์ esterase ซึ่งเป็นตัวเร่งในกระบวนการไฮโดรไลซิส โดยทำให้เอนไซม์ชนิดนี้ทำงานได้ลดลง นอกจากนี้ อาภาศรี ชัยกุล (2528) ยังได้ศึกษาผลของโลหะหนักต่ออ้อมบริโอไค้ พบว่า นิกเกิล แมงกานีส และสังกะสี ทำให้โครโมโซมเกิดความผิดปกติ และส่งผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ โดยนิกเกิลและสังกะสีทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลง ในขณะที่แมงกานีสส่งผลให้อัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น

จากผลกระทบเหล่านี้ จึงนำไปสู่การศึกษาเพื่อหาวิธีแก้ไขการปนเปื้อนของโลหะหนักที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การฟื้นฟูทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ดีทางหนึ่ง เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ค่าใช้จ่ายต่ำ และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยการนำเอาสิ่งมีชีวิตมาใช้ในการกำจัดโลหะหนัก ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Sphingomonas paucimobilis* ซึ่งทนต่อพิษของแคดเมียมได้สูงถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถดูดซับโลหะชนิดนี้ได้ถึง 84% โดยการดูดซับส่วนใหญ่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาเพียง 50 นาที (จันทนา ตั้งอารมณ์สุข, 2544) เชื้อราผลิตเห็ดนางรมสีเทา *Pleurotus ostreatus* สามารถดูดซับทองแดงได้ 15.33-25.53% และดูดซับโครเมียมได้ 23.40-31.00% (พจนีย์ โลมรัตน์ และคณะ, 2549) นอกจากนี้ยังมีสาหร่ายสีเขียวแกมแดง (*Ulva intestinalis*) ที่สามารถดูดซับตะกั่ว สังกะสี สารหนู แคดเมียม และปรอทได้ (กมลพรรณ ไชยทอง, 2552) ทินพันธุ์ เนตรแพ (2552) ได้ทดลองเลี้ยงหอยทวาย *Corbicular* sp. ในตู้ที่มีสารละลายทองแดง (0-4 mg/L) และตะกั่ว (0-10 mg/L) ตั้งแต่ 0 ถึง 168 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโลหะลดลง ในขณะที่ความเข้มข้นของโลหะในเนื้อหอยทวายมีเพิ่มมากขึ้น โดยพบตะกั่วสะสมอยู่มากกว่าทองแดง โดยพิษของโลหะทั้งสองชนิด ทำให้หอยทวายเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ป้องกันอนุมูลอิสระในเหงือกเพิ่มมากขึ้นต่างจากการทดลองชุดควบคุม ศิริรัตน์ เดชมนต์ (2555) คัดแยกเชื้อรา *Aspergillus terreus* เพื่อทดสอบการดูดซับตะกั่วในน้ำทิ้งจากการฟอกย้อมสีสังเคราะห์เคมีที่เวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-168 ชั่วโมง พบว่า *A. terreus* สามารถดูดซับตะกั่วได้สูงสุด 95.94% ที่เวลา 168 ชั่วโมง

ชิลีเอตกับการใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ

ชิลีเอตเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และในดิน มีความหลากหลายของสายพันธุ์สูง แต่มีความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่ในลักษณะที่อยู่อาศัยที่มีความจำเพาะเจาะจง กล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันเราจะพบกลุ่มหรือชนิดของชิลีเอตที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ชิลีเอตยังสามารถตอบสนองต่อการปนเปื้อนของมลพิษในสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว เพราะมีอัตราการสืบพันธุ์สูงและมีความจำเพาะต่อสภาพที่อยู่อาศัย ทำให้สามารถติดตามผลได้ในระยะเวลาไม่นาน (Madoni, 2005)

ด้วยคุณสมบัติเช่นนี้เองซิเลียเอตจึงสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพถึงสภาพและสภาวะของสิ่งแวดล้อมได้ (Madoni, 1993; Madoni, 2005)

Madoni (1993) ศึกษาซิเลียเอตที่เก็บจากตะกอนดินในแม่น้ำปาร์มา 7 บริเวณ ในปี 1989 และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่รวบรวมไว้ในปี 1978 จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพและทางเคมีของพื้นที่ศึกษาพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของซิเลียเอตอย่างเด่นชัดใน 2 ช่วงเวลาดังกล่าว โดยซิเลียเอตที่พบได้ทั่วไปบางชนิดได้สูญหายไปอันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของสารอินทรีย์ในแหล่งน้ำบริเวณนั้น แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมมีผลกระทบต่อซิเลียเอต นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่าโพรโทซัวหลายชนิดสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของสภาวะในระบบของโรงบำบัดน้ำเสีย ตัวอย่างเช่น *Vorticella campanula* มีความสัมพันธ์กับปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายอินทรีย์ (biological oxygen demand: BOD) ในน้ำเสียที่ต่ำลง ในขณะที่ *Chilodonella uncinata* สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพที่ดีของน้ำทิ้งได้ การเพิ่มขึ้นของ *Arcella* sp. ยังสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย *Carchesium* sp. และ *Opercularia microdiscus* สามารถบ่งบอกถึงสภาวะการขาดออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำของบ่อเติมอากาศ (aeration tank) *Litonotus lamella* และ *Amphileptus* sp. สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสภาวะของอัตราส่วนอาหารต่อจำนวนจุลินทรีย์และระยะเวลาที่จุลินทรีย์หมุนเวียนอยู่ในระบบ (sludge retention time) ของดินตะกอนในระบบบำบัด (sludge) ได้ (Lee et al., 2004)

นอกจากซิเลียเอตน้ำจืดแล้ว ซิเลียเอตที่พบในดินและน้ำทะเลยังสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพได้เช่นกัน Forge และคณะ (1993) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *Colpoda steinii* ซึ่งเป็นซิเลียเอตที่พบในดินระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนกรกฎาคมปี 1991 พบว่าซิเลียเอตชนิดนี้มีจำนวนลดลงสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของสังกะสีและนิกเกิล (nickel: Ni) Jiang et al. (2011) ศึกษากลุ่มประชากรซิเลียเอตจาก 5 พื้นที่ที่มีสภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน โดยพื้นที่ทั้งหมดอยู่ในบริเวณอ่าวเจียวโจวของประเทศจีน เก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมิถุนายนปี 2008 จนถึงเดือนพฤษภาคมปี 2009 จากการวิเคราะห์พบว่าลักษณะกลุ่มประชากรของซิเลียเอตมีความแตกต่างกันในทุกพื้นที่ รูปแบบการกระจายตัวของประชากรมีความสัมพันธ์กับปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะปริมาณสารอาหารในกลุ่มของไนเตรต ไนโตรเจน (nitrate nitrogen: NO₃-N) และปริมาณฟอสเฟตที่ละลายอยู่ (soluble reactive phosphates: SRP) ซึ่งสัมพันธ์กับซิเลียเอต 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Rimostrombidium veniliae*, *Strombidium capitatum*, *Mesodinium pupula* และ *Strombidinopsis acutum*

ซิลิเกตกับโลหะหนัก

การทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเกตสามารถบ่งชี้ถึงความสามารถในการเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของซิลิเกต โดยประเมินได้จากค่าความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซิลิเกตตายไปครึ่งหนึ่ง (lethal concentration 50: LC₅₀) หลังเริ่มทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งความสามารถนี้จะแตกต่างกันตามชนิดของซิลิเกตและชนิดของโลหะหนักที่นำมาใช้ในการทดสอบ (ตารางที่ 1) (ตรีประภา เกรือบคนโท, 2553; วรณภา คงมาก, 2553; ศิริอร สดสร้อย, 2553; Díaz, Martín-González, and Gutiérrez, 2006; Forge et al., 1993; Madoni, Davoli, and Gorbi, 1994; Madoni et al., 1996; Madoni, Esteban, and Gorbi, 1992; Madoni and Romeo, 2006; Martín-González et al., 2006; Parker, 1979; Rico et al., 2009) โดยซิลิเกตที่ให้ค่า LC₅₀ น้อย แสดงว่าซิลิเกตชนิดนั้นมีความไวต่อความเป็นพิษของโลหะหนักสูงและเหมาะต่อการเป็นเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซิลิเกตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมง หลังเริ่มทดสอบ

สายพันธุ์ซิลิเกต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่ง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	อ้างอิง
<i>Aspidisca cicada</i>	0.31	2.35	0.02	0.07	1.26	ND*	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Aspidisca cicada</i>	1.81	138	1.82	ND*	ND*	ND*	50	Madoni et al., 1996
<i>Aspidisca lynceus</i>	2.21	145	1.82	ND*	3.78	ND*	50	Madoni et al., 1996
<i>Blepharisma americanum</i>	1.4	ND*	0.001	0.02	ND*	ND*	ND*	Madoni et al., 1992

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 1 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซีลิเอตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบ

สายพันธุ์ซีลิเอต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Chilodonella uncinata</i>	<0.13	10.6	0.39	ND*	<1.50	ND*	<0.17	Madoni et al., 1996
<i>Colpidium colpoda</i>	0.89	108	0.05	ND*	0.23	1.19	ND*	Madoni and Romeo, 2006
<i>Colpoda inflata</i>	1.8	ND*	7.1	ND*	ND*	ND*	94.7	Díaz et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i>	0.22	ND*	0.25	ND*	ND*	0.10	0.85	Forge et al., 1993
<i>Colpoda steinii</i> (Madrid, Spain)	0.5	ND*	5.5	ND*	ND*	ND*	78.7	Díaz et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i> (Rome, Italy)	4.2	ND*	8.1	ND*	ND*	ND*	33.9	Díaz et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i> (Seville, Spain)	5	ND*	5.4	ND*	ND*	ND*	147.4	Díaz et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i>	2.5	ND*	5.5	ND*	ND*	ND*	78.7	Rico et al., 2009
<i>Cyrtolophosis elongata</i>	4.4	ND*	13.3	ND*	ND*	ND*	132.3	Díaz et al., 2006
<i>Dexiostoma campylum</i>	0.2	3.29	0.01	ND*	1.1	1.05	ND*	Madoni et al., 1992, 1994

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 1 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซีลิเอตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบ

สายพันธุ์ซีลิเอต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Dexiotricha granulosa</i>	0.3	110	0.17	ND*	0.12	1	ND*	Madoni and Romeo, 2006
<i>Drepanomonas revoluta</i>	ND*	0.05	ND*	ND*	0.88	ND*	ND*	Madoni et al., 1994
<i>Drepanomonas revoluta</i>	7.7	ND*	6.7	ND*	ND*	ND*	52.3	Martín-González et al., 2006
<i>Euplotes aediculatus</i>	0.59	0.1	0.01	ND*	0.5	0.03	ND*	Madoni and Romeo, 2006
<i>Euplotes affinis</i>	0.4	2.73	0.06	0.19	2.32	ND*	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Euplotes moebiusi</i>	2.65	9.47	0.01	ND*	2.18	7.7	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Euplotes moebiusi</i>	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	1.28	ND*	Madoni, 2000

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 1 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซีลิเอดตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบ

สายพันธุ์ซีลิเอด	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Euplotes</i> sp.	2.66	38.6	1.45	ND*	<1.50	ND*	2.39	Madoni et al., 1996
<i>Euplotes</i> sp.	0.7	ND*	4.8	ND*	ND*	ND*	110.2	Martin-González et al., 2006
<i>Euplotes</i> sp.	0.7	ND*	4.8	ND*	ND*	ND*	110.2	Martin-González et al., 2006
<i>Halteria grandinella</i>	0.07	0.1	0.01	ND*	0.12	0.61	ND*	Madoni and Romeo, 2006
<i>Opercularia coarctata</i>	3.75	211	ND*	ND*	3.28	ND*	10.3	Madoni et al., 1996
<i>Opercularia minima</i>	5.55	164	ND*	ND*	5	ND*	84.7	Madoni et al., 1996
<i>Opisthonecta minima</i>	0.23	ND*	3.53	ND*	4.05	ND*	ND*	ศิริอร สดสร้อย, 2553

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 1 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซีลิเอตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบ

สายพันธุ์ซีลิเอต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Paramecium caudatum</i>	0.18	2.57	0.02	0.02	2.26	0.49	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Spirostomum teres</i>	0.46	3.23	0.004	ND*	1.08	0.17	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Stylonychia pustulata</i>	0.31	ND*	0.65	ND*	36.24	ND*	ND*	ตรีประภา เครือบคนโท, 2553
<i>Tetrahymena</i> sp.	0.52	ND*	3.3	ND*	ND*	ND*	196.0	Rico et al., 2009
<i>Trochilia minuta</i>	0.27	9.25	0.31	ND*	<1.50	ND*	0.20	Madoni et al., 1996
<i>Uronema</i> sp.	0.08	ND*	0.32	ND*	0.76	ND*	ND*	วรรณภา คงมาก, 2553
<i>Uronema marinum</i>	ND*	ND*	ND*	ND*	45	ND*	ND*	Parker, 1979
<i>Uronema nigricans</i>	0.62	2.18	0.01	0.004	1.62	ND*	ND*	Madoni et al., 1992, 1994

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 1 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซีลิเอตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบ

สายพันธุ์ซีลิเอต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่ง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	อ้างอิง
<i>Uronema nigricans</i>	0.9	ND*	4.5	ND*	ND*	ND*	135.1	Martín-González et al., 2006
<i>Vorticella convallaria</i>	3.81	101	ND*	ND*	2.29	ND*	3.79	Madoni et al., 1996
<i>Vorticella octava</i>	3.24	80	2.05	ND*	2.81	ND*	0.57	Madoni et al., 1996

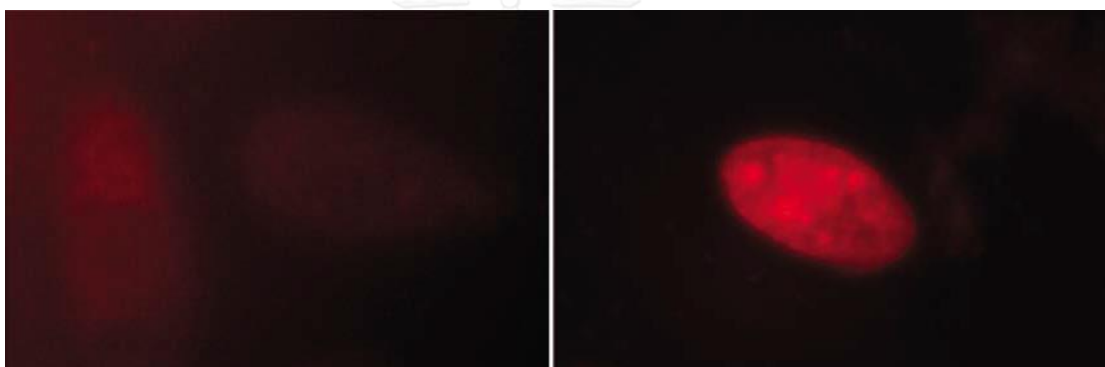
*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ในปี 1998 Twagilimana และคณะ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้ *Spirostomum teres* ซึ่งเป็นซีลิเอตที่พบได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในการทดสอบทางชีวภาพ (microbiotest) เพื่อบ่งบอกความเป็นพิษของโลหะหนักและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้ถึง 14 ชนิด โดยซีลิเอตชนิดนี้มีความไวต่อความเป็นพิษของสารที่ทำการทดสอบสูงกว่า Microtox assays ซึ่งเป็นชุดผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายเพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษของสารปนเปื้อนในน้ำโดยใช้แบคทีเรีย *Vibrio fischeri* เป็นสิ่งมีชีวิตตรวจสอบ

ซีลิเอตกับการกำจัดโลหะหนัก

Rehman และคณะ (2005, 2006) วัดความเข้มข้นตั้งต้นของสารละลายโลหะหนักที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นที่เหลืออยู่ ณ เวลาต่าง ๆ ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer หลังใส่ซีลิเอตที่เพาะเลี้ยงไว้ลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสารละลายโลหะหนักผสมอยู่ พบว่าซีลิเอตหลายชนิด เช่น *Euplotes mutabilis*, *Stylonychia mytilus*, *Tachysoma pellationella* และ *Vorticella microstoma* สามารถลดความเข้มข้นของโลหะหนักได้ตั้งแต่ 48-99.2% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะหนักและระยะเวลาที่ใช้ทดสอบ (Rehman et al., 2005; Rehman et al., 2006) ซีลิเอตบางชนิด เช่น *Colpoda inflata*, *Oxytricha granulifera*,

Oxytricha nova, *Tetrahymena pigmentosa*, *Tetrahymena pyriformis*, *Tetrahymena thermophila* และ *Tetrahymena rostrata* มีการสร้างเมทัลโลไธโอนีน (metallothioneins) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่ำและมีกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) สูง ช่วยรักษาสมดุลภายในเซลล์ ป้องกันเซลล์จากโลหะหนัก โดยจับตัวกับโลหะหนัก (Gutiérrez et al., 2003; Martín-González et al., 2006) แล้วนำเข้าไปเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ เรียกกระบวนการนี้ว่าการสะสมทางชีวภาพ (bioaccumulation) ซึ่งเป็นกระบวนการพื้นฐานที่เกิดขึ้นในซิลิเอต (Martín-González et al., 2006) การสะสมโลหะหนักภายในเซลล์สามารถติดตามผลได้โดยการใส่สารเรืองแสง (fluorophore) ที่มีความจำเพาะกับโลหะหนักที่ต้องการ และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) หากซิลิเอตมีการสะสมโลหะหนักเอาไว้จะพบการเรืองแสงเกิดขึ้นภายในเซลล์ (ภาพที่ 2) (Martín-González et al., 2006)



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ของซิลิเอตสายพันธุ์ *Uronema nigricans* แสดงการเรืองแสงจากสารเรืองแสง TSQ [N-(6-methoxy-8-quinoly)-p-toluenesulfonamide] ที่มีความจำเพาะต่อสังกะสี หลังการทดสอบการสะสมสังกะสีภายในเซลล์ผ่านไป 24 ชั่วโมง ภาพด้านซ้ายเป็นชุดควบคุมที่ไม่มีการผสมสังกะสีลงในอาหารเพาะเลี้ยง ภาพด้านขวาแสดงชุดการทดลองที่ผสมสังกะสี 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยง (Martín-González et al., 2006)

การสะสมโลหะหนักภายในเซลล์เป็นหนึ่งในกลไกสำคัญของซิลิเอต ช่วยป้องกันเซลล์จากพิษของโลหะหนัก เกิดขึ้นโดยการจับตัวกันระหว่างโลหะหนักกับโปรตีนที่เรียกว่า metallothioneins โปรตีนที่จับกับโลหะหนักแล้วจะไปสะสมอยู่ในแวคิวโอล ก่อนถูกส่งออกนอกเซลล์ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งไม่มีความเป็นพิษ (Gutiérrez et al., 2011) metallothioneins เป็นโปรตีนมวลโมเลกุลต่ำที่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) สูง ทำหน้าที่รักษาสมดุลภายในเซลล์ โดยการป้องกันพิษของโลหะหนัก สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งสัตว์ พืช และจุลชีพ (Gutiérrez, Amaro, and Martín-González, 2009) ในซิลิเอตมีรายงานการพบ metallothioneins ในซิลิเอต

สองสกุล คือ *Paramecium* และ *Tetrahymena* โดย metallothioneins ที่พบในซีเลียต มีลักษณะแตกต่างจาก metallothioneins ที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น คือ มีมวลโมเลกุลและความยาวมากกว่า อีกทั้งยังมีบริเวณที่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนมากกว่า โดยบริเวณดังกล่าวจะเป็นองค์ประกอบหลักของ metallothioneins เนื่องจากเป็นบริเวณที่ไอออนของโลหะหนักจะเข้ามาจับตัวเป็น metal-thiolate clusters เพราะมีหมู่ซัลไฟไฮไดรล (-SH) ทำให้สามารถสร้างพันธะคู่เพื่อจับกับไอออนประจุบวกของโลหะหนักได้ (Henkel and Krebs, 2004)

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับการนำโปรโตซัวไปใช้เพื่อการทดสอบความเป็นพิษและการกำจัดโลหะหนักยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับราและแบคทีเรีย ในขณะที่การใช้ราและแบคทีเรียมีข้อจำกัดที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ ความไม่แน่นอนของการแพร่ผ่านผนังเซลล์ทำให้เกิดตอบสนองได้น้อยลงหรือช้าลง เพื่อแก้ไขปัญหาจึงต้องใช้กระบวนการทางกายภาพ หรือทางเคมีเพื่อให้โมเลกุลขนาดเล็กแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างอิสระ การใช้ซีเลียตซึ่งไม่มีผนังเซลล์จะสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวได้อีกทั้งยังตอบสนองต่อมลพิษในสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย (Gutiérrez et al., 2003) นอกจากนี้ซีเลียตยังมีความคล้ายคลึงกับเซลล์ของมนุษย์มากกว่าราและแบคทีเรีย โดยยีนที่พบใน *Tetrahymena* และ *Paramecium* มีส่วนคล้ายกับยีนของมนุษย์มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Dessen et al., 2001; Turkewitz, Orias, and Kapler, 2002) ด้วยศักยภาพของซีเลียตที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ซีเลียตเป็นอีกหนึ่งตัวเลือกที่สามารถนำไปใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักและกระบวนการบำบัดโลหะหนักทางชีวภาพได้

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

การปฏิบัติงานในภาคสนาม

ซิลิเกตเป็นจุลชีพที่สามารถพบได้ในแหล่งน้ำหลายประเภททั้งน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำเสีย บางชนิดสามารถปรับตัวให้อยู่รอดได้ในแหล่งที่อยู่อาศัยที่มีสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม โดยเฉพาะซิลิเกตที่พบในน้ำเสีย เนื่องจากงานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกซิลิเกตที่มีความทนต่อความเป็นพิษ และสามารถใช้ในการกำจัดโลหะหนักออกจากน้ำเสียได้ จึงเลือกพื้นที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งรวมน้ำทั้งจากบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อให้ได้ซิลิเกตที่มีสายพันธุ์หลากหลายและสามารถอาศัยในแหล่งน้ำที่มีคุณภาพต่ำได้ โดยมีพื้นที่เก็บตัวอย่าง 4 แห่ง ดังนี้

ก. บ่อรวมน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำสีพระยา เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร (ภาพที่ 3) พิกัด $13^{\circ}43'47.9''\text{N}$ $100^{\circ}30'50.7''\text{E}$ โรงควบคุมคุณภาพน้ำสีพระยาทำหน้าที่รองรับและบำบัดน้ำเสียจากบ้านเรือนคิดเป็นร้อยละ 0.2 ของพื้นที่ในกรุงเทพมหานคร โดยกรองเก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 5 ลิตร ผ่านถุงลากลากแพลงก์ตอนขนาดตา 20 ไมครอน น้ำตัวอย่างที่เก็บมามีสีค่อนข้างใส แต่มีตะกอนสีน้ำตาลลอยอยู่มาก



ภาพที่ 3 การเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อรวมน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำสีพระยา เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร และกรองผ่านถุงลากลากแพลงก์ตอน

ข. บ่อเก็บน้ำหลังการบำบัดของโรงงานยางพารา จังหวัดระยอง (ภาพที่ 4) พิกัด $12^{\circ}53'30.2''\text{N}$ $101^{\circ}37'17.8''\text{E}$ เป็นแหล่งรวมของน้ำทิ้งจากวัสดุธรรมชาติและสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตแผ่นยาง โดยทำการเก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 1 ลิตร กรองผ่านถุงลากลากแพลงก์ตอน ขนาดตา 20 ไมครอน น้ำตัวอย่างที่เก็บมามีตะกอนสีดำจำนวนมากและมีกลิ่นเหม็น



ภาพที่ 4 พื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำ บ่อเก็บน้ำหลังการบำบัดของโรงงานยางพารา จังหวัดระยอง

ค. บ่อน้ำทิ้งที่บำบัดแล้วจากบริษัท ไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) จังหวัดระยอง (ภาพที่ 5) พิกัด 12°39'45.0"N 101°18'29.2"E ซึ่งเป็นผู้ประกอบการอุตสาหกรรมปิโตรเคมีขนาดใหญ่ของภาคตะวันออก โดยทำการกรองเก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 1 ลิตร ผ่านถุงลากลากเพลิงก่ตอนขนาดตา 20 ไมครอน น้ำตัวอย่างที่เก็บมามีลักษณะค่อนข้างขุ่นและมีสีออกน้ำตาลแดง



ภาพที่ 5 พื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำ บ่อน้ำทิ้งที่บำบัดแล้วจากบริษัท ไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) จังหวัดระยอง

ง. คลองบริเวณหน้าตึกพุดตาน หอพักนิสิตหญิงจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร (ภาพที่ 6) พิกัด 13°44'25.7"N 100°31'41.2"E โดยกรองเก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 600 มิลลิลิตร ผ่านถุงลากลากแพลงก์ตอนขนาดตา 20 ไมโครเมตร น้ำตัวอย่างที่เก็บมามีลักษณะใส และมีตะกอนขุ่นสีน้ำตาลลอยอยู่เล็กน้อย



ภาพที่ 6 พื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำ คลองบริเวณหน้าตึกพุดตาน หอพักนิสิตหญิงจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร

การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

ก. การเตรียมอาหารเลี้ยง (medium preparation)

ต้มฟางข้าว 5 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้เดือดเป็นเวลาประมาณ 5 นาที สังเกตสีน้ำต้มฟางจนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม ทิ้งให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 จากนั้นเทน้ำต้มฟางลงหลอดทดลองฝาเกลียวหลอดละ 6 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาอย่างหลวม ๆ นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข. การเพาะเลี้ยงเบื้องต้น (crude culturing)

แบ่งน้ำต้มฟางใส่ลงในจานพลาสติกชนิด 24 หลุม หยดน้ำตัวอย่างที่เก็บมา 4-6 หยด ลงในจานพลาสติกที่มีน้ำต้มฟาง จากนั้นเติมเบเกอรี่ีสต์ (baker yeast) ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน จะพบซิลิเกตและโปรตีนหลายชนิดเพิ่มขึ้นจำนวนมาก

ค. การแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ (pure culturing)

1. ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างเซลล์จากการเพาะเลี้ยงเบื้องต้นหยดลงบนสไลด์หลุม นำปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งปลายให้แหลมโดยใช้ความร้อนจากตะเกียงแอลกอฮอล์ ดูดเซลล์ซิลิเอตที่สนใจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมาเพียง 1 เซลล์ ล้างเซลล์ซิลิเอตด้วยน้ำต้มฟางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง

2. นำเซลล์ซิลิเอตที่ล้างสะอาดแล้วใส่ลงในจานพลาสติกชนิด 96 หลุม เต็มอาหารเลี้ยงที่เตรียมไว้ และเติมยีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. ทำการตรวจดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์ซิลิเอตที่คัดแยกไว้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอทุกวัน ติดตามสังเกตปริมาณของเซลล์ซิลิเอต ทำการย้ายเซลล์ซิลิเอตไปเลี้ยงในจานพลาสติกขนาด 24 หลุม และหลอดทดลองฝาเกลียว หรือจานเลี้ยงเชื้อแก้ว (petri dish) ตามลำดับเมื่อพบว่ามีความหนาแน่นของเซลล์ซิลิเอตหนาแน่นในแต่ละหลุม

4. จากพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้ง 4 แห่ง สามารถคัดแยกซิลิเอตได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ดังนี้
Bresslauides sp. คัดแยกจากคลองบริเวณหน้าตึกพุดตาน หอพักนิสิตหญิง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร

Paramecium multimicronucleatum คัดแยกจากบ่อเก็บน้ำหลังการบำบัดของโรงงานยางพารา จังหวัดระยอง

Telotrochidium sp. (BKK) คัดแยกจากบ่อรวมน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำสีพระยา เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร

Telotrochidium sp. (RY) คัดแยกจากบ่อน้ำทิ้งที่บำบัดแล้วจากบริษัท ไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) จังหวัดระยอง

Tetrahymena pyriformis คัดแยกจากบ่อน้ำทิ้งที่บำบัดแล้วจากบริษัท ไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) จังหวัดระยอง

ในการเพาะเลี้ยงซิลิเอตทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ ซิลิเอตแต่ละสายพันธุ์มีช่วงระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนที่แตกต่างกัน และควรได้รับการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงใหม่เมื่อจำนวนเซลล์ลดลงหรือมีการตายเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เหมาะสม โดย *Bresslauides* sp. สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและมีจำนวนคงที่ได้อยู่ได้ในระยะเวลาประมาณ 3-4 วัน ในขณะที่ *P. multimicronucleatum* มีชีวิตอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 7 วัน สำหรับ *Telotrochidium* sp. (BKK), *Telotrochidium* sp. (RY) และ *T. pyriformis* สามารถอยู่ได้ประมาณ 14 วัน โดย *P. multimicronucleatum*, *Telotrochidium* sp. (BKK), *Telotrochidium* sp. (RY) และ *T. pyriformis* สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในหลอดทดลองฝาเกลียว สำหรับ *Bresslauides* sp. ซึ่งเป็น

ซิลิเกตที่มักเคลื่อนที่อยู่บริเวณพื้นผิวด้านล่างของภาชนะ จึงเพิ่มจำนวนได้ดีเมื่อเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อแก้วซึ่งมีพื้นที่ผิวมากกว่าหลอดทดลอง

ง. การศึกษาสัณฐานวิทยาของซิลิเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง (light microscope)

ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างเซลล์จากการเพาะเลี้ยง หยดลงบนสไลด์แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงพร้อมบันทึกภาพ

จ. การศึกษาสัณฐานวิทยาของซิลิเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) (Chantangsi, Esson, and Leander, 2008)

1. เตรียมตัวอย่างซิลิเกต โดยการกรองผ่าน millipore membrane filter ขนาดรูพรุน 10 ไมครอน

2. รักษาสภาพเซลล์ซิลิเกตด้วยสารละลายออสเมียมเตตระออกไซด์ 4% ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายในตู้ดูดควัน

3. ล้างเซลล์ที่รักษาสภาพแล้วด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งแช่เซลล์ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที

4. กำจัดน้ำภายในเซลล์ออกโดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 10% 20% 30% 50% 70% 85% 95% และ 100% ตามลำดับ แต่ละความเข้มข้นทำ 1 ครั้ง ยกเว้นที่ความเข้มข้น 100% ทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งแช่เซลล์ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที

5. ทำให้เซลล์ซิลิเกตแห้งโดยการแทนที่ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว โดยใช้เครื่อง Autosamdri-814 critical point dryer (Samdri® 780, Tousimis)

6. นำแผ่น membrane filter ที่มีตัวอย่างไปติดลงบนแท่นสำหรับวางตัวอย่าง (stub)

7. นำตัวอย่างไปฉาบทองที่ความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง SCD040 Balzers sputter coater (Liechtenstein) แล้วส่องดูพร้อมบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดรุ่น JEOL JSM-5410 LV

ฉ. การระบุชนิดของซิลิเกตโดยอาศัยข้อมูลทางอนุชีววิทยาระดับดีเอ็นเอ

เพื่อเป็นข้อมูลช่วยในการระบุสายพันธุ์ของซิลิเกตที่คัดแยกได้ ร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA หรือ rDNA) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้

เป็นลายเซ็นโมเลกุล (molecular signature) ช่วยในการระบุอัตลักษณ์ของซิติเอตแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Chantangsi and Leander, 2010)

1. ใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วดูดเซลล์ซิติเอตที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลองฝาเกลียวประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิว์กขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้งไป ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติย้ายส่วนที่เหลือใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิว์กขนาด 0.2 มิลลิลิตร

2. สกัดดีเอ็นเอด้วย QuickExtract™ DNA Extraction Solution (EPICENTRE Mandison, WI, USA, Cat. No. QE09050) โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูด QuickExtract solution ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิว์กที่มีเซลล์ซิติเอตอยู่ให้ได้ปริมาตรสุทธิเป็น 50 ไมโครลิตร

3. นำหลอดตัวอย่างไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. เพิ่มจำนวนไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเลือกใช้ไพรเมอร์และโปรแกรมตามที่แสดงในตารางที่ 2 โดยผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์คู่นี้มีขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส (base pair: bp) ครอบคลุมบริเวณ ribosomal DNA (rDNA) ที่ประกอบด้วยยีน 18S หรือ SSU rDNA (small subunit ribosomal DNA), ช่วงลำดับ ITS1 (internal transcribed spacer 1), ยีน 5.8S, ช่วงลำดับ ITS2 (internal transcribed spacer 2) และยีน 28S หรือ LSU rDNA (large subunit ribosomal DNA)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มจำนวนโดยใช้ OneTaq® Hot Start DNA Polymerase (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA, Cat. No. M0481G) โดยใส่สารต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้

(1) OneTaq® Standard Reaction Buffer (5X)	5	ไมโครลิตร
(2) dNTP mix (10 มิลลิโมลาร์ต่อแบบ)	0.5	ไมโครลิตร
(3) forward primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.5	ไมโครลิตร
(4) reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.5	ไมโครลิตร
(5) OneTaq® Hot Start DNA Polymerase (5,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	0.125	ไมโครลิตร
(6) สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.	2	ไมโครลิตร
(7) น้ำกลั่นชนิด molecular grade	16.375	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	25	ไมโครลิตร

ใส่สารข้างต้นลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวซ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำหลอดไปใส่ลงในเครื่อง T100™ Thermo cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ที่ตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้

โปรแกรม EM 45-50

	Heat	94 °C	4	นาที
5 รอบ	{	denaturation	94 °C	30 วินาที
		annealing	45 °C	1 นาที
		extension	72 °C	105 วินาที
35 รอบ	{	denaturation	94 °C	30 วินาที
		annealing	50 °C	1 นาที
		extension	72 °C	105 วินาที
		final extension	72 °C	10 นาที

โปรแกรม NBC1

	heat	94 °C	4	นาที
40 รอบ	{	denaturation	94 °C	30 วินาที
		annealing	62.6 °C	1 นาที
		extension	68 °C	225 วินาที
		final extension	68 °C	10 นาที

โปรแกรม NBCIL3E

	heat	94 °C	5	นาที
40 รอบ	{	denaturation	94 °C	30 วินาที
		annealing	64 °C	1 นาที
		extension	68 °C	150 วินาที
		final extension	68 °C	10 นาที

ตารางที่ 2 คู่ไพรเมอร์และโปรแกรมที่ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนไรโบโซมอลดีเอ็นเอของซิลิเกตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

สายพันธุ์ซิลิเกต	คู่ของไพรเมอร์		โปรแกรม	ขนาดผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)
	forward primer	reverse primer		
<i>Bresslauides</i> sp.	SSU-RPF1	28S-25F1R	EM45-50	2,367
	SSU-1580F	28S-1316R	NBCIL3E	2,068
<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	SSU-RPF1	28S-25F1R	EM45-50	2,161
	SSU-1580F	28S-1316R	NBCIL3E	1,809
<i>Telotrochidium</i> sp. (BKK)	SSU-NPF1	28S-25F1R	EM45-50	2,139
	SSU-1580F	28S-1316R	NBCIL3E	1,786
<i>Telotrochidium</i> sp. (RY)	SSU-NPF1	28S-1316R	NBC1	3,449
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	SSU-NPF1	28S-25F1R	EM45-50	2,151
	SSU-1580F	28S-1316R	NBCIL3E	1,821

5. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 4 โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ตามขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียม agarose gel 0.8% โดยละลายผง agarose 0.24 กรัมใน TAE buffer (Tris Acetate EDTA) 30 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในเตาไมโครเวฟจนผงวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทสารละลายเจลลงบนแม่พิมพ์ของเครื่อง Horizon[®] 58 (LIFE TECHNOLOGIES[™], Gaithersburg, MD, USA, Cat. Series 41060) และวางซีทรีพลาสติกลงบนเจลขณะเจลยังไม่แข็งตัวเพื่อให้เกิดช่อง (well) สำหรับเติมดีเอ็นเอตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆ ดึงซีทรีออก เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TAE จนท่วมแผ่นเจล

(2) ใช้ปิเปตต์อัดโนมิตีดูด molecular marker ชนิด 1 kb plus (Invitrogen, Grand Island, NY, USA, Cat. No. 10787-018) 6 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องแรกบนเจล เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้กับสีย้อม electrophoresis Loading dye, 6X (Research Organics, Cleveland, Ohio, USA, Cat. No.3017E) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมในแต่ละตัวอย่างเป็น 1 เท่า แล้วใช้ปิเปตต์อัดโนมิตีดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงช่องบนเจล

(3) ต่อดวงจรไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง Horizon® 58 โดยตั้งค่าแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปิดดวงจรไฟฟ้า

(4) หลังจากครบ 30 นาที นำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide (EtBr) เป็นเวลา 10 นาที โดยสารละลาย EtBr ที่ใช้เตรียมจาก EtBr ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร

(5) ล้างสารละลาย EtBr ส่วนเกินออกโดยนำแผ่นเจลไปแช่ในน้ำกลั่น 5-10 นาที

(6) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง BioDoc-It™ Imaging System (UVP, Inc., Upland, CA, USA) พร้อมบันทึกภาพ

6. ทำซ้ำในข้อ 4. เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาณทั้งหมดประมาณ 150 ไมโครลิตร และมีปริมาณมากพอในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ นำแผ่นเจลไปตรวจดูภายใต้แสง UV แล้วใช้ใบมีดตัดเอาเฉพาะเจลในส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ และเก็บวุ้นไว้ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7. ทำความสะอาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วย UltraClean™ 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA, Cat. No. 12100-300) ตามขั้นตอนดังนี้

(1) เติม ULTRA SALT ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์ที่บรรจุแถบดีเอ็นเอผสมให้เข้ากัน นำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์ไปตั้งบนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าวุ้นจะละลายหมด โดยกลับหลอดไปมาเป็นระยะ เมื่อวุ้นละลายหมด นำหลอดออกจากเครื่องและตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

(2) เติม ULTRA BIND ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

(3) นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,600 g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และเก็บส่วนตะกอนดีเอ็นเอซึ่งจับกับ ULTRA BIND ไว้

(4) ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ULTRA WASH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดสารขึ้นลงให้ผสมเข้ากันดี

(5) นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,600 g เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และเก็บส่วนตะกอนดีเอ็นเอซึ่งจับกับ ULTRA BIND ไว้ ทำซ้ำข้อ (4) และ (5) อีกครั้ง

(6) นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,600 g เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูด ULTRA WASH ที่เหลือออกให้หมด

(7) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำปราศจากเชื้อ (ultrapure water) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร แล้วใช้ปิเปตต์อัตโนมัติผสมสารให้เข้ากัน ตั้งหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,600 g เป็นเวลา 2 นาที

(8) ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดส่วนน้ำใส่ที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ ย้ายลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 0.5 ไมโครลิตร โดยระวังไม่ให้มีตะกอน ULTRA BIND ติดมาด้วย เก็บดีเอ็นเอที่แยกได้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์หรือใช้ในปฏิกิริยาขั้นต่อไป

8. การโคลนยีนและช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ ด้วยชุดโคลนนิ่ง Strata Clone™ PCR Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, CA, Cat. No. 240205) โดยใช้แบคทีเรีย Strata Clone™ competent cells โดยทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน ดังนี้

(1) เตรียมสารผสมเพื่อทำการต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้กับพลาสมิด โดยเติมองค์ประกอบต่าง ๆ ตามลำดับ ดังนี้

(ก) StrataClone™ Cloning Buffer ปริมาตร 3 ไมโครลิตร

(ข) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

(ค) StrataClone™ Vector Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันเบา ๆ โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ

(2) ตั้งหลอดปฏิกิริยาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยวางหลอดลงบนน้ำแข็ง โดยก่อนที่จะครบ 5 นาที ให้นำหลอด Strataclone SoloPack competent cells ออกจากตู้ทำความเย็นที่ -80 องศาเซลเซียส และวางให้ละลายบนน้ำแข็ง

(3) เติมสารผสมจากหลอดปฏิกิริยาในข้อ (2) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด Strataclone competent cells ผสมให้เข้ากันเบา ๆ (ห้ามใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดสารชั้นลง)

(4) จากนั้นวางหลอด transformation mixture ในข้อ (3) ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

(5) นำหลอด transformation mixture มา heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที

(6) วางหลอด transformation mixture ไว้บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที

(7) เติม SOC medium (ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดปฏิกิริยา บ่มและเขย่าหลอดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

(8) ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียในหลอดปฏิกิริยา ปริมาตร 100 และ 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ และเกลี่ย (spread) หน้าแต่ละจานให้ทั่ว โดยจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ จะบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LB agar) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin และเกลี่ยหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ไว้เรียบร้อยแล้ว

(9) บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมง

(10) ทำการเลือกโคโลนีแบคทีเรียสีขาว สำหรับนำไปสกัดแยกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่ต่อไป

9. ทำการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีพลาสมิดซึ่งบรรจุยีนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB (LB broth) อย่างน้อย 12 ชั่วโมง และสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีนที่ต้องการด้วย FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan, Cat. No. FAPDE100) ตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

(1) เทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวกซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

(2) นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,300 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำใสทิ้ง และเก็บส่วนตะกอนแบคทีเรียที่ก้นหลอดไว้

(3) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ FAPD1 (ที่เติมเอนไซม์ RNase A แล้ว) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด และใช้ปิเปตต์อัดโนมิตูดูดสารขึ้นลงเพื่อละลายตะกอนแบคทีเรีย

(4) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ FAPD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดและผสมเบา ๆ ด้วยการกลับหลอดขึ้นลงจำนวน 10 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตก จากนั้นตั้งหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

(5) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ FAPD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และกลับหลอดขึ้นลงอย่างเบา ๆ 10 ครั้ง ทันที

(6) นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,300 g เป็นเวลา 5 นาที ในระหว่างนี้ทำการวาง FAPD column ลงใน collection tube

(7) ดูดส่วนน้ำใสใส่ลงใน FAPD column โดยระวังการปนเปื้อนของตะกอนสีขาวมากับส่วนน้ำใส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาที เทสารที่ไหลผ่าน FAPD column ทิ้ง จากนั้นวาง FAPD column กลับลงใน collection tube อีกครั้ง

(8) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน FAPD column จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาที เทสารที่ไหลผ่าน FAPD column ทิ้ง และวาง FAPD column กลับลงใน collection tube อีกครั้ง

(9) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน FAPD column จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาที เทสารที่ไหลผ่าน FAPD column ทิ้ง และวาง FAPD column กลับลงใน collection tube อีกครั้ง

(10) นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง

(11) วาง FAPD column ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

(12) เติมน้ำ molecular grade ปริมาตร 50-60 ไมโครลิตร ลงบริเวณเยื่อกรองที่อยู่ใน FAPD column ตั้งหลอดทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที

(13) นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอพลาสמידออกจาก column

(14) เก็บส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอพลาสמידไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

(15) ตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอพลาสמידที่ได้ ด้วยการสกัดแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามข้อ 5. และส่งดีเอ็นเอพลาสמידที่มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

10. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติแบบธรรมดา (normal automatic sequencing) ด้วยเครื่อง 3730XL DNA sequencer โดยส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จากข้อ 7. หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการโคลนนิ่ง จากข้อ 9. ไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละครั้งจะใช้ไพรเมอร์ครั้งละ 1 ชนิด เข้าจับที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 3) และทำการอ่านลำดับทั้งไปและกลับจนได้ลำดับเบสคู่สมครบทั้งสองสายดีเอ็นเอ

11. ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) เวอร์ชัน 6 (Tamura et al., 2013) และตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจากส่วนของพาหะออก จากนั้นรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการอ่านด้วยไพรเมอร์แต่ละสายเข้าด้วยกัน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในขั้นต่อไป

12. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากซิลิเกตมาวิเคราะห์เบื้องต้นด้วย Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) กับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ร่วมกับซิลิเกตใกล้เคียงกลุ่มและสกุลอื่น ๆ ซึ่งได้รวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ NCBI โดยเริ่มจากการสร้างไฟล์ alignment ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากซิลิเกต ด้วยโปรแกรม MAFFT เวอร์ชัน 7 (Katoh and Standley, 2013) โดยไฟล์ alignment ที่สร้างประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 53 สาย 5 สายมาจากซิลิเกตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 46 สายมาจากซิลิเกตที่เป็นตัวแทนจากชั้น (class) ต่าง ๆ ในไฟลัมซิลิโอฟอรา (phylum Ciliophora) ทั้ง 11 ชั้น ได้แก่ Karyorelictea, Heterotrichea, Spirotrichea, Litostomatea, Armophorea, Nassophorea, Colpodea, Phyllopharyngea, Oligohymenophorea, Prostomatea และ Plagiopyrea รวมถึงซิลิเกตในสกุลที่ใกล้เคียงกับซิลิเกตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และอีก 2 สายจาก

ไดโนแฟลกเจลเลท เพื่อใช้เป็น outgroup รวมตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 1,565 ตำแหน่ง

13. นำไฟล์ alignment ที่สร้างไปวิเคราะห์ความห่างทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6 โดยใช้แบบจำลองในการคำนวณ ได้แก่ number of base differences per site (p -distance) และ Kimura two-parameter (K2P) (Kimura, 1980)

14. ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) ของซีลีเอตที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับซีลีเอตกลุ่มและสกุลอื่น ๆ ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6 (Tamura et al., 2013) และ PhyML เวอร์ชัน 3.0 (Guindon et al., 2010) โดยใช้ชุดข้อมูลที่สร้างไว้ในข้อ 12

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษาครั้งนี้

ไพรเมอร์	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ตำแหน่งที่เกาะโดยประมาณ
ยีน 18S			
SSU-NPF1 (ก)	ไปข้างหน้า	TGCGCTACCTGGTTGATCC	1-19
SSU-RPF1 (ข)	ไปข้างหน้า	ACCTGGTTGATCCTGCCAGT	7-26
SSU-MCil-rII (ค)	ถอยกลับ	TCTRATYGTCKTBGATCCCYTA	~964-985
SSU-1580F (จ)	ไปข้างหน้า	CCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGT	1580-1604
18S-R1513 Hypo (ง)	ถอยกลับ	TGATCCTTCYGCAGGTTTC	~1500-1517

ก. Chantangsi and Leander (2010); ข. Leander, Clopton, and Keeling (2003); ค. Lara et al. (2007); ง. Petroni et al. (2002); จ. ออกแบบโดย อาจารย์ ดร. ชิตชัย จันทร์ตั้งสี (ข้อมูลยังไม่ได้ตีพิมพ์); ฉ. Moreira et al. (2007); ช. Takano and Horiguchi (2006); ซ. Vilgalys (2005); ฌ. ไพรเมอร์สากล (universal primer)

ตารางที่ 3 (ต่อ) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษาครั้งนี้

ไพรเมอร์	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ตำแหน่งที่เกาะโดยประมาณ
ยีน 28S			
28S-1FM (ฉ)	ไปข้างหน้า	ACCYGCTGAAYTTAAGCATAT	-1-19
28S-25F1R (ช)	ถอยกลับ	ATATGCTTAAATTCAGCGG	45-27
28S-LR3R (ซ)	ไปข้างหน้า	GTCTTGAAACACGGACC	663-679
28S-1316R (จ)	ถอยกลับ	ATTCGGCAGGTGAGTTGTTACAC	1316-1294
Vector pSC-A			
T3 (ฉ)	ไปข้างหน้า	ATTAACCCTCACTAAAG	
T7 (ฉ)	ถอยกลับ	AATACGACTCACTATAG	

ก. Chantangsi and Leander (2010); ข. Leander, Clopton, and Keeling (2003); ค. Lara et al. (2007); ง. Petroni et al. (2002); จ. ออกแบบโดย อาจารย์ ดร. ชิตชัย จันทร์ตั้งสี (ข้อมูลยังไม่ได้ตีพิมพ์); ฉ. Moreira et al. (2007); ช. Takano and Horiguchi (2006); ซ. Vilgalys (2005); ฅ. ไพรเมอร์สากล (universal primer)

ช. การหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (generation time)

1. นำปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ติงปลายให้แหลมโดยใช้ความร้อนจากตะเกียงแอลกอฮอล์ ดูดเซลล์ซิลิเกตที่แยกให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ ค. ภายใต้อ่างจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมาเพียง 1 เซลล์ ใส่ลงบนสไลด์ที่หยดอาหารเพาะเลี้ยงเตรียมไว้ จากนั้นใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์ดังกล่าวพร้อมอาหารเพาะเลี้ยงปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานพลาสติกขนาด 96 หลุม เติมยีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. หลังผ่านไป 24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ซิลิเกตในแต่ละหลุมภายใต้อ่างจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ นำไปหาค่าเฉลี่ยเพื่อคำนวณเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นตามสูตรดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Number of generations (n)} &= \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2} \\ \text{Generation time (g)} &= \frac{\text{Time of growth}}{\text{Number of generations}} \end{aligned}$$

เมื่อ N_0 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น

N_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง

Time of growth เท่ากับ 24 ชั่วโมง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้จำนวนเซลล์ที่เวลาเริ่มต้นเป็น 1 เซลล์ ยกเว้น *P. multimicronucleatum* ใช้จำนวนเซลล์ที่เวลาเริ่มต้นเป็น 10 เซลล์

ข. การทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ต่อเซลล์ซิลิเกต

1. เพาะเลี้ยงซิลิเกตให้ได้ประมาณ 700-1,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
2. เตรียมสารประกอบโลหะหนักของทองแดง (CuSO_4) ตะกั่ว ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) สังกะสี (ZnSO_4) และแคดเมียม (CdCl_2) เพื่อใช้ทำการทดสอบ
3. เตรียมโลหะหนักที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารประกอบโลหะหนักในน้ำต้มฟางที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ 7 ความเข้มข้น โดยความเข้มข้นที่สูงสุดที่ใช้ในการทดสอบต้องทำให้เซลล์ตายมากกว่าครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) และความเข้มข้นที่ต่ำสุดต้องไม่ทำให้เซลล์ตาย
4. สุ่มนับจำนวนเซลล์ซิลิเกตที่จะใช้ในการทดลองโดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดซิลิเกตที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง 20 ไมโครลิตร 3 ครั้ง หยดลงบนสไลด์ ทำการนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ คำนวณปริมาณเซลล์ต่ออาหารเลี้ยง 1 มิลลิลิตร
5. ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดซิลิเกตจากหลอดทดลองที่นับจำนวนแล้ว ใส่ลงในจานพลาสติกชนิด 24 หลุม หลุมละ 500 ไมโครลิตร แล้วเติมโลหะหนักที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการที่เตรียมไว้อีกหลุมละ 500 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นทำทั้งหมด 4 ซ้ำ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. การทดลองชุดควบคุมใช้น้ำต้มฟางแทนน้ำต้มฟางที่มีโลหะหนัก ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ เช่นเดียวกัน
7. นับจำนวนเซลล์หลังทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการสุ่มใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดตัวอย่างจากแต่ละหลุมมาหลุมละ 20 ไมโครลิตร 3 ครั้งต่อหลุม นับจำนวนเซลล์ภายใต้

กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของซิติเอดในแต่ละความเข้มข้นของโลหะหนักเทียบกับการทดลองชุดควบคุม โดยคำนวณจากจำนวนเซลล์ที่อยู่รอด/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) $\times 100$ ทำการนับเช่นเดียวกันในชุดการทดลองซ้ำทั้ง 4 ชุด (Martín-González et al., 2006)

8. ทำการทดลองซ้ำในข้อ 4-7 ทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง โดยเว้นช่วงในแต่ละชุดการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์

9. วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิติเอดตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธีโพรบิท (Probit analysis) โดยใช้โปรแกรม Statplus software (2009) (AnalystSoft Inc., CA)

ณ. การทดสอบศักยภาพในการกำจัดโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ปนเปื้อนออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซิติเอด

1. เพาะเลี้ยงซิติเอดในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร
2. สุ่มนับจำนวนซิติเอดก่อนเริ่มทำการทดสอบ โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์ซิติเอดที่เลี้ยงไว้ ครั้งละ 20 ไมโครลิตร 3 ครั้ง หยดลงบนสไลด์ นับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

3. แบ่งซิติเอดในขวดรูปชมพู่ที่นับแล้วใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ล้างด้วยกรดไนตริก (HNO_3) ความเข้มข้น 10% แล้ว ขวดละ 100 มิลลิลิตร

4. ควบน้ำดื่มฟางออกและเติมสารละลายโลหะหนักลงในปริมาณที่เท่ากับลงในขวดรูปชมพู่ที่ใช้เพาะเลี้ยงซิติเอดซึ่งนับจำนวนแล้ว ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า LC_{50} ของแต่ละโลหะ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบในโลหะหนักแต่ละชนิดทั้งหมด 3 ครั้ง

5. การเตรียมการทดลองชุดควบคุม

ชุดที่ 1 ใส่อาหารเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์ซิติเอดที่นับจำนวนแล้ว แต่ไม่เติมสารละลายโลหะหนักและไม่เติมเบเกอร์ยีสต์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชุดที่ 2 ใส่อาหารเพาะเลี้ยง เบเกอร์ยีสต์ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว และเติมสารละลายโลหะหนักให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า LC_{50} ของแต่ละโลหะ โดยไม่มีเซลล์ซิติเอด

ชุดที่ 3 ใส่อาหารเพาะเลี้ยง และเติมสารละลายโลหะหนักให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า LC_{50} ของแต่ละโลหะ โดยไม่มีเซลล์ซิติเอด

6. แยกกรองสารละลายทั้งหมดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 93 โดยเก็บสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วส่งไปตรวจวัดความเข้มข้นของโลหะหนักที่เหลืออยู่ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (atomic absorption spectrophotometer) ที่ศูนย์

เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รักษาสภาพตัวอย่างโดยการเติมกรดไนตริกเข้มข้น 3-4 หยด

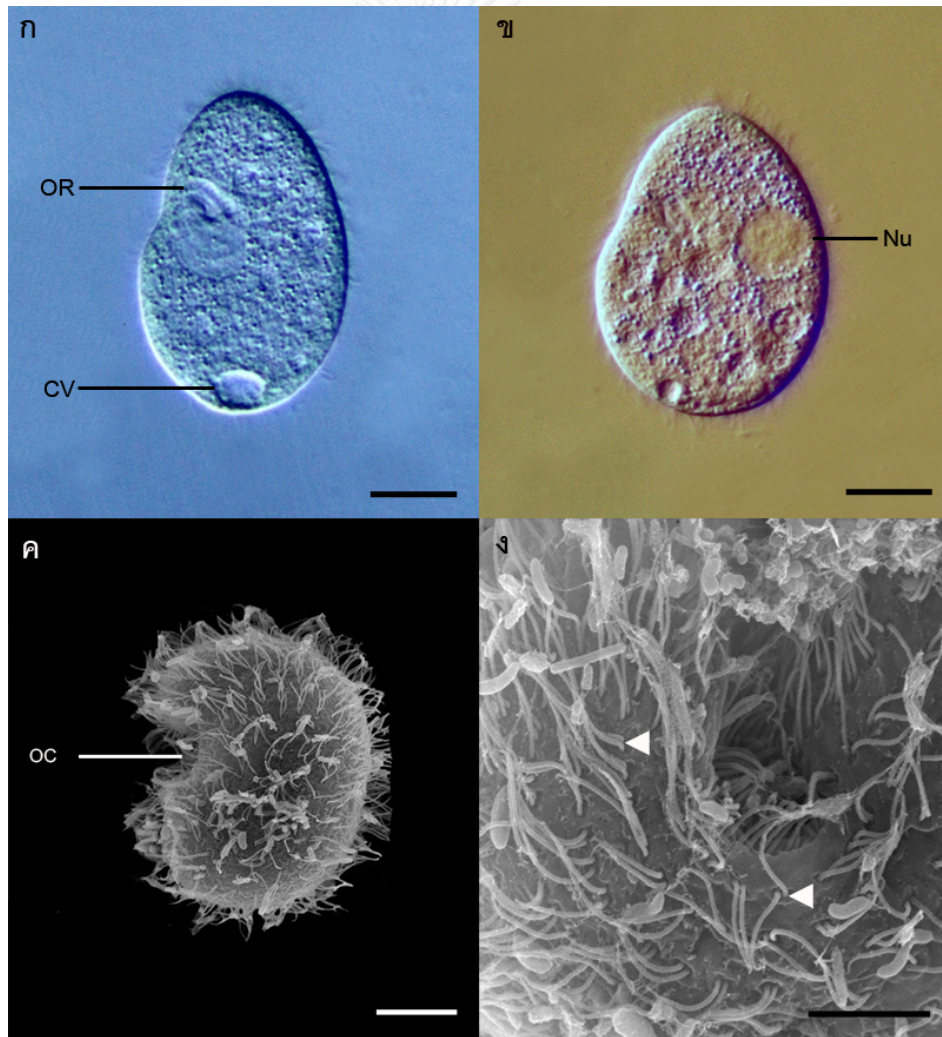
7. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักในอาหารเลี้ยงเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักในอาหารเลี้ยงหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง (paired-samples *t*-test) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17 พิจารณาค่าความเชื่อมั่นที่ $P \leq 0.05$ (Softonic[®], Spain)



บทที่ 4 ผลการศึกษา

การศึกษาสัณฐานวิทยาของซิลิเอต

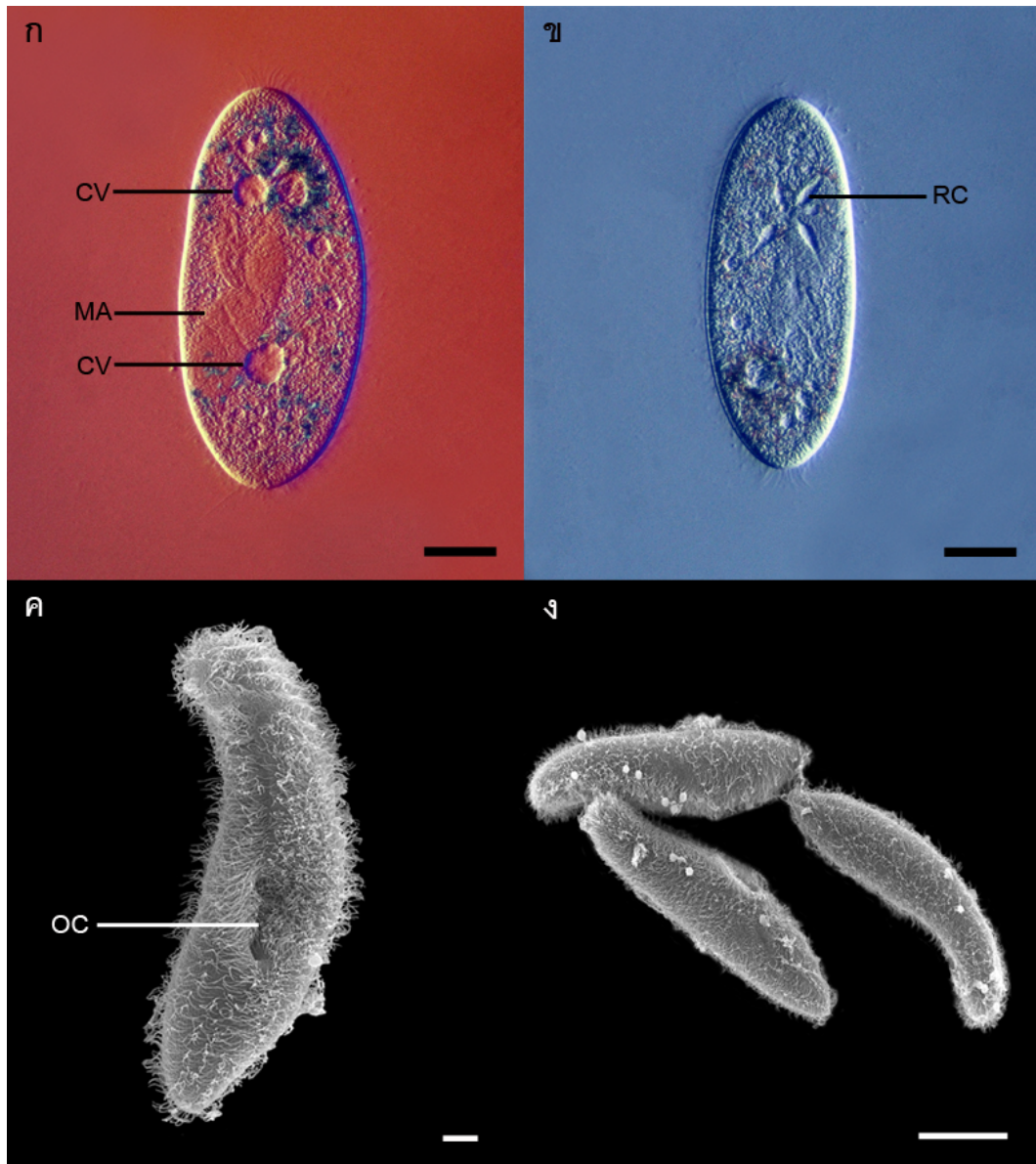
ก. *Bresslauides* sp. เซลล์มีรูปร่างคล้ายไต (kidney-shaped) ตัวเซลล์ปกคลุมไปด้วยซีเลียเรียงตัวเป็นคู่อยู่ทั่วเซลล์ เซลล์มีขนาดกว้างประมาณ 40 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 60 ไมโครเมตร ว่ายน้ำอย่างอิสระ ขอบเซลล์ด้านหลัง (dorsal) มีลักษณะโค้ง ในขณะที่ด้านตรงข้ามมีช่องปากขนาดใหญ่ (oral region) อยู่บริเวณกึ่งกลางก่อนไปทางด้านหน้าของตัวเซลล์ (ภาพที่ 7) โดย *Bresslauides* sp. ใช้เวลาในแต่ละช่วงชีวิต 7 ชั่วโมง 21 นาที 36 วินาที



ภาพที่ 7 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง (ก และ ข) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ค และ ง) แสดง *Bresslauides* sp. ที่คัดแยกจากคลองบริเวณหน้าตึก

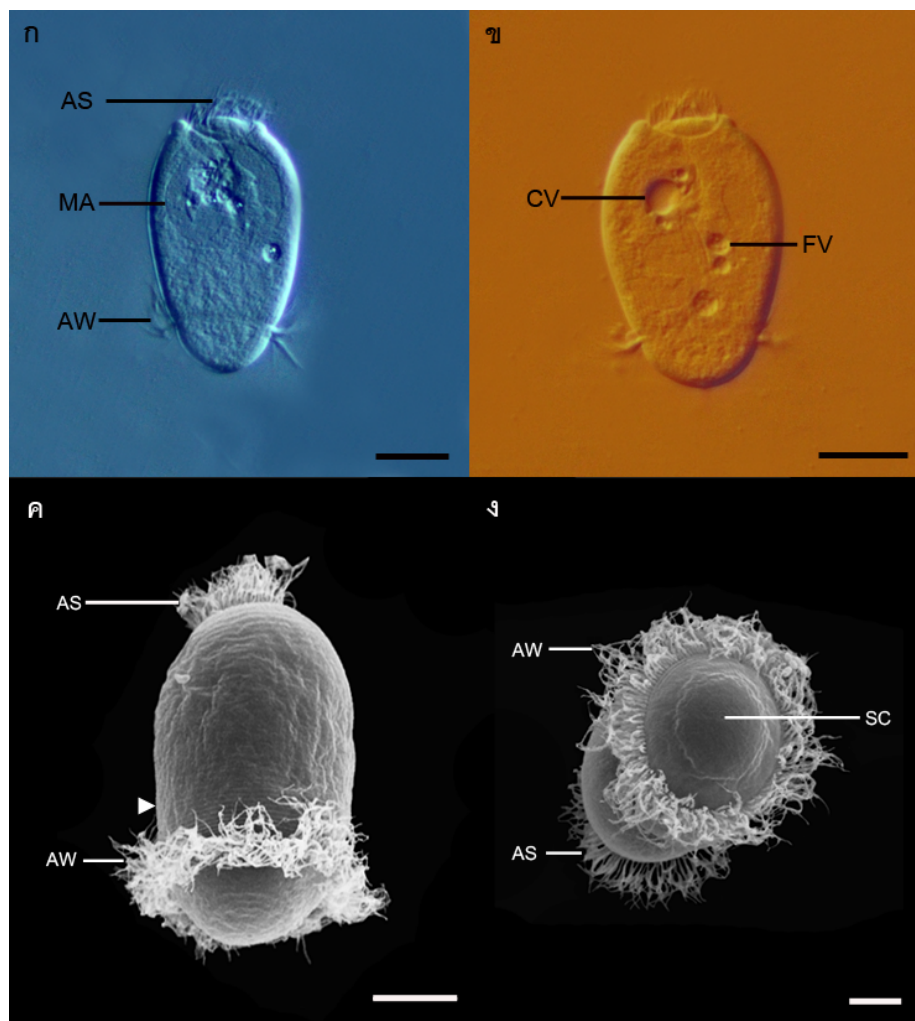
พุดตาน หอพักนิสิตหญิงจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก. ปากเซลล์ (oral region: OR) ทางด้านหน้า และคอนแทรกไทล์แควคิวโอล (contractile vacuole: CV) ทางด้านซ้ายของตัวเซลล์ที่อยู่บริเวณกึ่งกลางค่อนข้างไปทางด้านหน้าของเซลล์ ข. นิวเคลียส (nucleus: N) ค. เซลล์ *Bresslauides* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีช่องปาก (oral cavity: OC) อยู่กลางเซลล์ ง. แสดงภาพขยายบริเวณช่องปาก และการเรียงตัวเป็นคู่ของซีเลีย (หัวลูกศร) (แถบเทียบขนาด ก. และ ข. = 20 μm ; ค. = 10 μm ; ง. = 5 μm)

ข. *P. multimicronucleatum* เซลล์มีรูปร่างยาว ด้านหน้านมน ด้านท้ายเรียว ว่ายน้ำอย่างอิสระ ผิวเซลล์ด้านข้างบุเป็นร่องลึกเข้าไปในเซลล์เป็นร่องปาก (oral groove) ขนาดตัวเซลล์กว้างประมาณ 30 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 130 ไมโครเมตร ภายในเซลล์มีแมโครนิวเคลียสรูปไข่ เซลล์มีคอนแทรกไทล์แควคิวโอล (contractile vacuole) 2 อัน ที่บริเวณปลายด้านหน้าและด้านท้ายของเซลล์ และมีท่อรวมน้ำเห็นเป็นแขนงรัศมี (radiating canal) เซลล์มีซีเลียปกคลุมตลอดทั่วทั้งเซลล์ (ภาพที่ 8) โดย *P. multimicronucleatum* ใช้เวลาในแต่ละช่วงชีวิต 18 ชั่วโมง 28 นาที 36 วินาที



ภาพที่ 8 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง (ก และ ข) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ค และ ง) แสดง *P. multimicronucleatum* ที่ตัดแยกจากบ่อเก็บน้ำหลังการบำบัดของโรงงานยางพารา ก. แมโครนิวเคลียส (macronucleus: MA) บริเวณกลางเซลล์ และคอนแทรกไทล์แควิวโอล (contractile vacuole: CV) ที่บริเวณด้านหน้าและด้านท้ายของเซลล์ ข. ท่อรวมน้ำที่ปรากฏเป็นแขนงรัศมี (radiating canal: RC) ทำหน้าที่รวบรวมน้ำเข้าสู่คอนแทรกไทล์แควิวโอล ค. แสดง *P. multimicronucleatum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีช่องปาก (oral cavity: OC) บริเวณกึ่งกลางก่อนมาด้านท้ายของเซลล์ ง. กลุ่มเซลล์ *P. multimicronucleatum* จำนวน 3 เซลล์ (แถบเทียบขนาด ก. และ ข. = 20 μm ; ค. = 10 μm ; ง. = 50 μm)

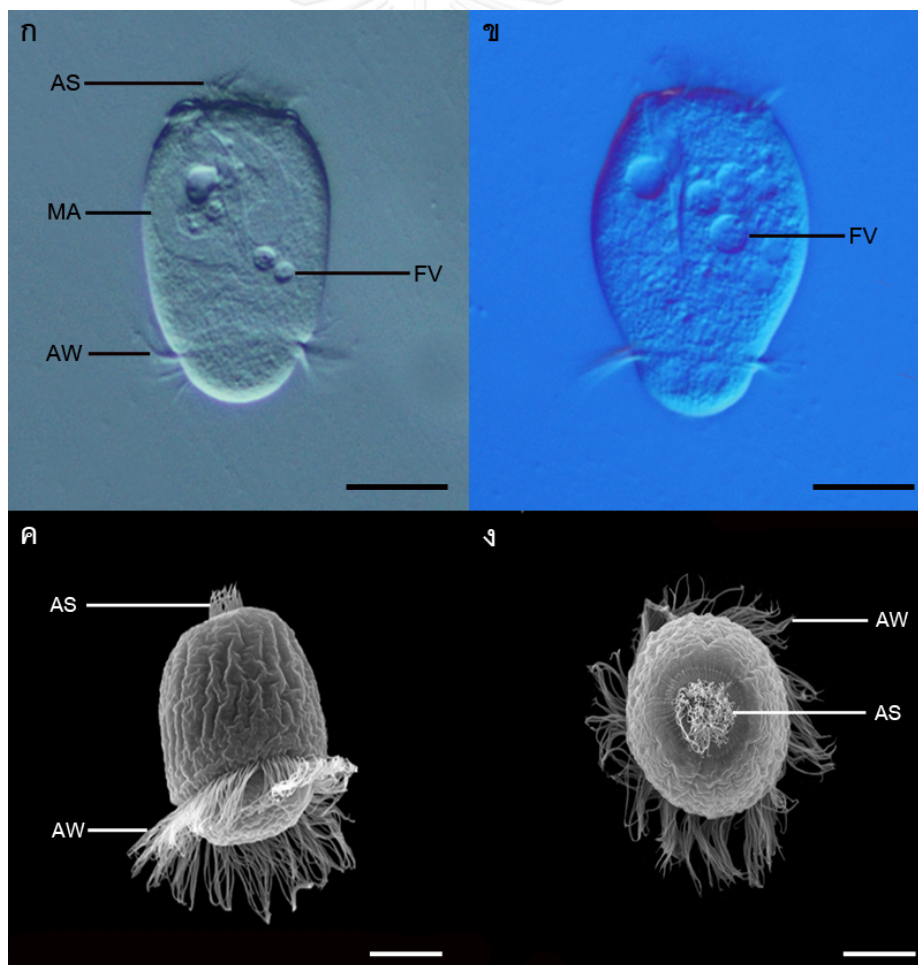
ค. *Telotrochidium* sp. (BKK) เซลล์มีรูปร่างคล้ายถัง (barrel-shaped) กว้างประมาณ 40 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 70 ไมโครเมตร ว่ายน้ำอย่างอิสระ ซิลิเอตสกุลนี้ไม่มีการสร้างก้านเซลล์ (stalk) ใช้ยึดเกาะกับพื้นผิว เซลล์มีวงของเส้นขน 2 วง วงที่ 1 อยู่บริเวณรอบปาก เรียกว่า adoral ciliary spiral และวงที่ 2 เป็นวงรอบตัวที่บริเวณส่วนท้ายของเซลล์ เรียกว่า aboral ciliary wreath ภายในเซลล์มีนิวเคลียสลักษณะเป็นแถบ จัดเรียงตัวเป็นรูปตัวอักษร C เซลล์มีรูเปิดที่บริเวณส่วนท้ายของตัวเซลล์ เรียกว่า scopula รวมไปถึงมีลายริ้ว (striae) เป็นวงรอบลำตัว (ภาพที่ 9) โดย *Telotrochidium* sp. (BKK) ใช้เวลาในแต่ละช่วงชีวิต 12 ชั่วโมง 52 นาที 36 วินาที



ภาพที่ 9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง (ก และ ข) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ค และ ง) แสดง *Telotrochidium* sp. (BKK) ที่คัดแยกจากบ่อรวมน้ำเสียโรงควบคุมคุณภาพน้ำสีพระยา ก. แมโครนิวเคลียสรูปตัวอักษร C (macronucleus: MA) กับวงของเส้นขน 2 วง บริเวณรอบปาก (adoral ciliary spiral: AS) และบริเวณส่วนท้ายของเซลล์ (aboral ciliary wreath: AW) ข. คอนแทรกไทล์แวกิวโอล (contractile vacuole: CV) และแวกิวโอลอาหาร

(food vacuole: FV) ภายในตัวเซลล์ ค. เซลล์ *Telotrochidium* sp. (BKK) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีลายริ้วเป็นวงรอบลำตัว (หัวลูกศร) ง. รูเปิดที่บริเวณส่วนท้ายของตัวเซลล์ (scopula: SC) (แถบเทียบขนาด ก. และ ข. = 20 μm ; ค. และ ง. = 10 μm)

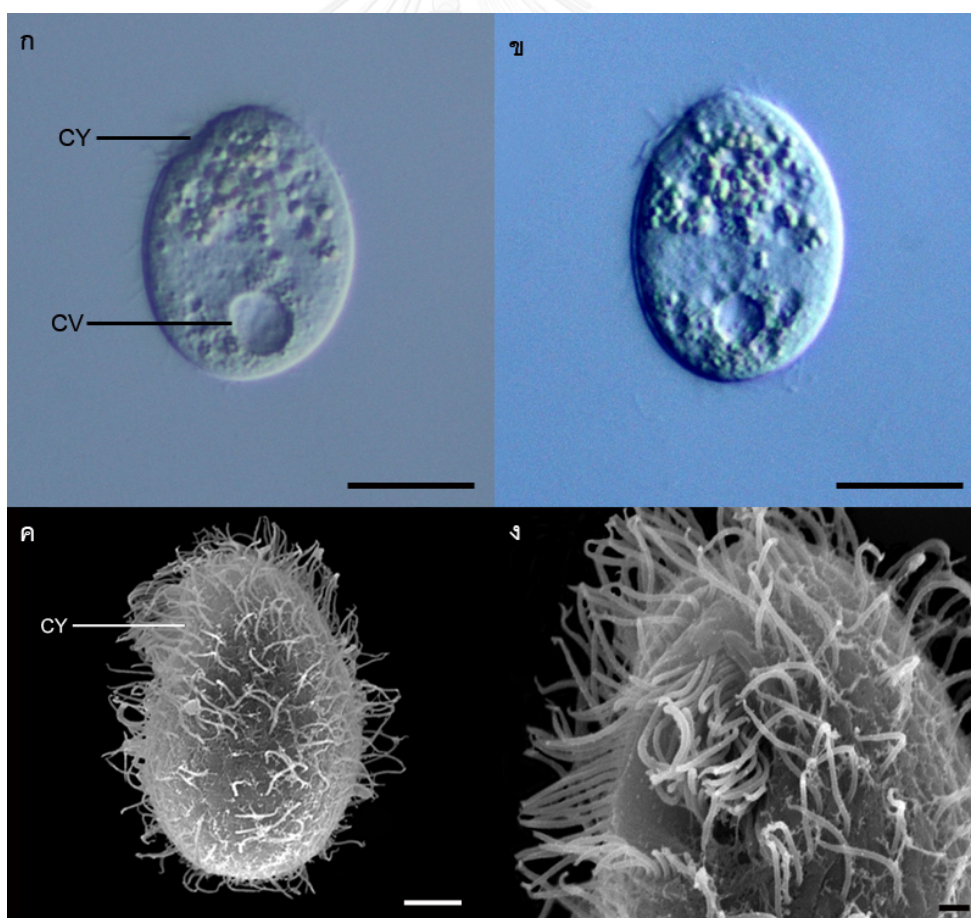
ง. *Telotrochidium* sp. (RY) เซลล์มีรูปร่างคล้ายถัง มีวงของเส้นขน 2 วง ได้แก่ adoral ciliary spiral และ aboral ciliary wreath ภายในเซลล์มีนิวเคลียสลักษณะเป็นแถบ จัดเรียงตัวเป็นรูปตัวอักษร C เช่นเดียวกับ *Telotrochidium* sp. (BKK) เพราะเป็นซิติเลียตในสกุล *Telotrochidium* sp. เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามเซลล์ของ *Telotrochidium* sp. (RY) มีขนาดเล็กกว่า *Telotrochidium* sp. (BKK) เล็กน้อย กล่าวคือ มีขนาดเซลล์กว้างประมาณ 30 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 60 ไมโครเมตร (ภาพที่ 10) โดย *Telotrochidium* sp. (RY) ใช้เวลาในแต่ละช่วงชีวิต 14 ชั่วโมง 24 นาที



ภาพที่ 10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง (ก และ ข) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ค และ ง) แสดง *Telotrochidium* sp. (RY) ที่คัดแยกจากบ่อน้ำทิ้งที่

บำบัดแล้วของบริษัท ไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) ก. แมโครนิวเคลียสรูปตัวอักษร C (macronucleus: MA) กับวงของเส้นขน 2 วง บริเวณรอบปาก (adoral ciliary spiral: AS) และบริเวณส่วนท้ายของเซลล์ (aboral ciliary wreath: AW) ข. แสดงแควิวโกลอาหาร (food vacuole: FV) บริเวณกลางภายในเซลล์ ค. ภาพถ่าย ด้านข้าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดซึ่งมีวงของเส้นขนจำนวน 2 วง ง. ภาพถ่ายเซลล์ *Telotrochidium* sp. (RY) จากทางด้านบน (แถบเทียบขนาด ก. และ ข. = 20 μm ; ค. และ ง. = 10 μm)

จ. *T. pyriformis* เซลล์มีขนาดเล็กรูปร่างรี ขนาดตัวเซลล์กว้างประมาณ 30 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 40 ไมโครเมตร ว่ายน้ำอย่างอิสระ เซลล์มีช่องปากขนาดเล็ก เรียกว่า cytostome อยู่ต่ำลงมาจากปลายด้านหน้าเล็กน้อยและมีขนอยู่โดยรอบ ตัวเซลล์มีซีเลียเรียงเป็นแนวยาวจากด้านหน้าไปยังด้านหลังของเซลล์ (ภาพที่ 11) โดย *T. pyriformis* ใช้เวลาในแต่ละช่วงชีวิต 9 ชั่วโมง 28 นาที 12 วินาที

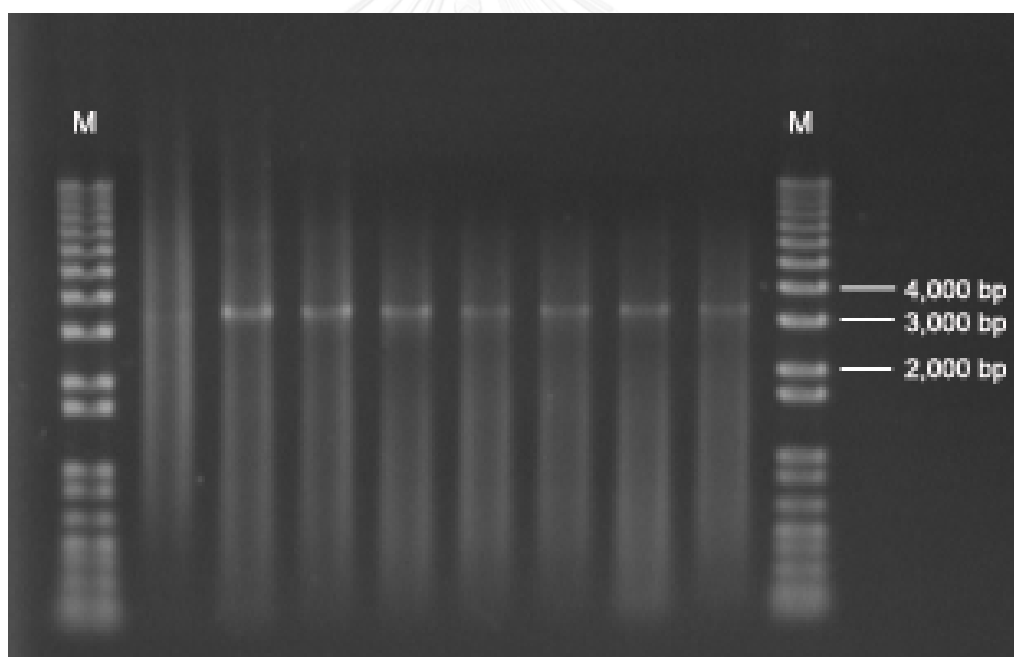


ภาพที่ 11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง (ก และ ข) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ค และ ง) แสดง *T. pyriformis* ที่คัดแยกจากบ่อน้ำทิ้งที่บำบัดแล้วของ

บริษัท ไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) ก. ช่องปากขนาดเล็ก (cytostome: CY) ทางด้านหน้า และคอนแทรกไทล์แควิวอล (contractile vacuole: CV) ทางด้านท้ายของตัวเซลล์ ข. แกรนูลสะสมภายในตัวเซลล์ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดกลมปรากฏภายในเซลล์จำนวนมาก ค. เซลล์ *T. pyriformis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงตำแหน่งของช่องปากที่อยู่ต่ำลงมาจากปลายด้านหน้าเซลล์เล็กน้อยและมีขนอยู่โดยรอบ ง. ภาพขยายบริเวณช่องปากที่มีซีเลียเรียงอัดตัวเป็นแถวแน่น (แถบเทียบขนาด ก. และ ข. = 20 μm ; ค. และ ง. = 5 μm)

การระบุชนิดของซิลิเอตโดยอาศัยลักษณะทางอนุชีววิทยา

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้ผลิตพันธุ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส (ภาพที่ 12) ขึ้นอยู่กับชนิดของซิลิเอต ครอบคลุมบริเวณยีน 18S หรือ SSU rDNA, ช่วงลำดับ ITS1, ยีน 5.8S, ช่วงลำดับ ITS2 และช่วงต้นของยีน 28S หรือ LSU rDNA



ภาพที่ 12 แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ปรากฏบนเจลหลังจากนำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และบันทึกภาพภายใต้แสงยูวี M คือ เครื่องหมายโมเลกุลใช้ในการเทียบขนาด ชนิด 1 kb plus และช่องที่ 3-9 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จาก *Telotrochidium* sp. (RY) ซึ่งมีขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI, 2013a: Online) ได้ผลการเปรียบเทียบของซีลีเอตทั้ง 5 ชนิด ดังนี้

ก. *Bresslauides* sp. ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 3,787 คู่เบส (นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งของไพรเมอร์)

```

ACCTGGTTGA TCCTGCCAGT AGTCATATGC TTGTCTTAAA GACTAAGCCA 50
TGCATGTCTA AGTATAAGTA TTATACAGCG AAACCTGCGAA TGGCTCATTA 100
AAACAGTTAT AGTTTATTCG ATTATTTTCT TCTACATGGA TAACCGTAGT 150
AATTC TAGAG CTAATACATG CTGTCAAACC TGACTTTTGC GGAAGGGTTG 200
TATTTATTAG ATATAAAACC AACACTCCTC ACGGAGTTTT GTGATGATTC 250
ATAATAACTG AACGGATCGC GGCCTTGCCG CGACGAATCG TTCAAGTTTC 300
TGCCCTATCA GCTTTCGATG GTAGTGTATT GGACTACCAT GGCGATCACG 350
GGTAACGGGG AATTAGGGTT CGATTCCGGA GAGGGAGCCT GAGAAATGGC 400
TACCACATCT AAGGAAGGCA GCAGGC CGT AAATTACCCA ATCCTAATTC 450
AGGGAGGTAG TGACAAGAAA TAACAACCTC GACCTCACAC GAGGTTACGA 500
GATTGCAATG AGAACAAATTT AAACCTCTTA TCGAGTAACA ATTTGGAGGGC 550
AAGTCTGGTG CCAGCAGCCG CGGTAATTC AGCTCCAATA GCGTATATTA 600
AAGTTGTTGC AGTTAAAAAG CTCGTAGTTG AATATCTGGC CGGTGCTGTT 650
CTCGGCTCCC GTAGTCGGTT CAGCGCCTGG TTATCCGTAT GGGAAACTAG 700
CTCGACCTTC ACTGTGTCGG TTAGTGGATC ATACACTTTA CTTTGAAAAA 750
ATTAGAGTGT TTCAGGCAGG CAATTGCTTG GATACTGTAG CATGGAATAA 800
TGGAATAGGA CTTTGACCTA TTTGTTGGTT TCTCGAGGTC AGAGTAATGA 850
TTAATAGGGA TGGTTGGGGG CATTTCGTATT TAATTGTCAG AGGTGAAATT 900
CTTGGATTTT TTAAGACGA ACTTATGCGA AAGCATTTC CAAGGATGTT 950
TTCATTAATC AAGAACGAAA GTTAGGGGAT CAAAGACGAT CAGATACCGT 1000
CCTAGTCTTA ACCATAAACT ATACCGACTA GGGATTGGTG AGGTCTCTAA 1050
AGCCTCATCA GCACCTTATG AGAAATCAAA GTCTTTGGGT TCTGGGGGGA 1100
GTATGGTCGC AAGGCTGAAA CTTAAAGGAA TTGACGGAAG GGCACCACTA 1150
GGAGTGGAGC CTGCGGCTTA ATTTGACCCA ACACGGGGAA ACTTACCAGG 1200
TCCAGACATA GTTAGGATTG ACAGATTGAG AGCTCTTTCT TGATTCTATG 1250
GGTGGTGGTG CATGGCCGTT CTTAGTTGGT GGAGTGATTT GTCTGGTTAA 1300
TTCCGTTAAC GAACGAGACC TTAACCTGCT AAC TAGTTAC TCTTAGGAA 1350
ATAGGGTACT AACTTCTTAG AGGGACTTTA TGTGCAAGCA TAAGGAAGTT 1400
TGAGGCAATA ACAGGTCTGT GATGCCCTTA GATGTCCTGG GCCGCACGCG 1450
CGCTACACTG ACACATGCAA CAAGTTTATT TTTCCCTGACT CGGAAGGGTT 1500
CGGGTAATCT TGTATAATGT GTGTCGTGCT AGGGATAGAT CTTTGGAAAT 1550
ATAGATCTTG AACAAAGGAAT TCCCAGTAAG CATAAGTCAT CAGCTTGTGC 1600
TGATTACGTC CCTGCCCTTT GTACACACCG CCCGTCGCTC CTACCGATTT 1650
TGAGTGATCC GGTGAACCTT CTGGACTGTA GCTGGGCTCG ACTCAGCCGT 1700
GGGAAGTTAA GTAAACCTTA TCACCTTAGAG GAAGGAGAAG TCGTAACAAG 1750
GTTTCCGTAG GTGAACCTGC GGAAGGATCA TTAACACAAT CTAAATACTC 1800
ACAACAYATG GTAGTTCCTT TATAGGACTA TGCATGGACA GGTGCAAAC 1850
GGCATGTAGG TCGAGGGAGG GGGATAAGAG AATGAGAARG GGATGGCACC 1900
AACAAAACAT CCTAAGTAAC ATTGTCCTTAT TTCAATCCTT TGAAGTTAAA 1950
ACCACCGACC TATATGTGTT TCATTTTTTA ATGAAACCCC AACCTTTTTG 2000
CCTTAGATTA CTAAGTCAA AAAAAAATT AAAC TAAGAA AATTTTCAAC 2050
GATGGATATC TTGGTTCCCA TAACGATGAA GAGCGCAGCA AAGTGCGATA 2100
AGCAATGCGA ATTGCAGAA TCCGCGAATC ATCAGATCCT TGAACGCAAC 2150
TGGCGTAGG GGGCTCTCTC CCTAGCATGT CTGTTTCAGT GTCTGAAAAC 2200
ATCATAATAA TCTTAATGTG ATTGACAAAG GATAGAAAGG TGATAATAAT 2250

```

GGTAGTTTCT ACCTTATTGT TTAATAATTT CTATTACTAA GTCTTTCATG 2300
 AAAATATGTAC ATGTGAGTCT TTGGACTCCT CATCGAATTT TGGTCACTGT 2350
 TTACAGTGAT TTCGATAGGG GAGTGTCTT TCGAGAACA AACTCAATTA 2400
 CTCGAAATTA CATGTAAGAA TCATCTGATA GTTCTTTTGA GCTATCTTAA 2450
 TCATCAAACCT CTGCATCTGA AATCAGGCAA GATCACCCGC TGAACCTAAG 2500
 CATATTACTA AGCGGAGGAA AAGAAATCAA CGAAGATTGC CTCAGTAGCG 2550
 GCGAGTGAAG CGGCAATAGC TCAAGTTTAG AATCTGCAGT CGTTTCGGCT 2600
 GCCGAATTGT AATCTAAAGG GGTTAACAAA AGGGGAGGTA GAGGCATAAG 2650
 TTCCTTGGAA CAGGACGTCA AAGAGGGTGA AAACCCCGTA TGCAGCCTTC 2700
 ACCGAACCGA ATGTTAATTT TCTGAGATC GGGTTGTTTGGGATTCAGC 2750
 CCTAAATGGG AGATAAATTT CTTCTAAGGC TAAATATCTA TGGGAAACCG 2800
 ATAGCGAACA AGTACTGTGA AGGAAAGGTG AAAAGAACCT TGAAAAGAGG 2850
 GTTAAAAGAC TTGAAATCGT TGAGAAGGAA GCAGTAAAAG TGGATTTGAA 2900
 TTAGCTATGA GGCAAACCTAG GTAAGGAACC ATCTTCCATT GGACACAGTA 2950
 CGTCAAAGGC TGTGCTGGTG ACAAGAAATG GCACTTTCTG GTCCTACTCA 3000
 TAGTTAAAGG GCAGAACCAG GTCTTTACTT GTTGGAATCA GCTAGGGTGA 3050
 CGTGTACATC TTGGCAAAAC AATAAGCTGG CCTGAGGAAA ATGAGGTTCT 3100
 GCCACAACGG CTTTTACTGA CCCGTCTTGA AACACGGACC AAGGAGTCTA 3150
 TCACATATGC GAGTTTGC GA TGCAAAAAC TCATAGGCTT AATGAAAGTA 3200
 AGTATAAGGT GCCAAGGAGG GAGGTACGCC TTTTTCCCGC AGCATCGACC 3250
 GACCATGATC TTCTGTGAAA GGTTCCGAGTA AGAGCATATT TGGTAGGACC 3300
 CGAAAGATGG TGAACATATGC TTGAGTAGGG TGAAGCCAGG GGAAACTCTG 3350
 GTGGAGGCTC GTAGCGATAC TGACGTGCAA ATCGTTCGTC AAACCTTGAGT 3400
 ATAGGGGCGA AAGACTAATC GAACCATCTA GTAGCTGGTT CCCTCTGAAG 3450
 TTTCTCTCAG GATAGCTGGA ACGTATAATG CAGTTTTTATT AGGTAAAGCG 3500
 AATGATTAGA GGCATCAGAG GTGAAACACC TTTGACCTAT TCTCAAACCT 3550
 TAAATTTGGTA AGAACCCTGTA GTTGTGTGCTT AAAATTTCATG AACTATAGGG 3600
 AAGAAATGCAT CGTTCTAAGT GGGCCGTTTT TGGTAAGCAG AACTGGCGAT 3650
 GAGGGATGAA CCTAACGTTG AGTTAAGGTG CCCAAATGTA CACTCATCAG 3700
 ATACCATAAA AGGTGTTGAT TCATAAAGAC AGCAGGACGG TGGCCATGGA 3750
 AGTCGGAATC CGCTAAGGAG TGTGTAACAA CTCACCT 3787

เมื่อนำลำดับที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับสมอลซ์บูนิโตรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Bresslauides discoideus* (GenBank accession no. EU039885.1) ในฐานข้อมูลของ NCBI มากที่สุด พบความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้ถึง 99%

ข. *P. multimicronucleatum* ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 3,495 คู่เบส (นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งของไพรเมอร์)

ACCTGGTTGA TCCTGCCAGA AGTCATATGC TTGTCTTAAA GATTAAGCCA 50
 TGCATGTCTA AGTATAAATA GTATACAGTG AAACCTGCGAA TGGCTCATTA 100
 AAACAGTTAT AGTTTTATTTG ATAGTGCAAA TTACATGGAT AACCGTGGTA 150
 ATTCTAGAGC TAATACATGC GCAAAATACCG GACGCAAGAA TGGTAGCATT 200
 TATTAGATTT AACCATCACA TGGTGAATCA TAGTAACTTA GCTGACCCGC 250
 CGCAAGCGTG GTAAATCATT CAAGTTTCTG CCCTATCAGC TTTCCGATGGT 300
 AGTGTATTGG ACTACCATGG CAGTCACGGG TAACGGAGAA TTAGGGTTCTG 350
 ATTCGGGAGA GGGAGCCTGA GAAACGGCTA CCACATCTAA GGAAGGCAGC 400
 AGGCGGTAA ATTACCCAAT CCCGATTCGG GGAGGTAGTG ACAAGAAATA 450
 GCAACTCGGG CGGTTATCCG TTACGGGATT GCAATGAGAT AAGTCCAAAT 500
 CCGTAAACGA TTAACAATTG GAGGGCAAGT CTGGTGCCAG CAGCCCGGGT 550

AATTCCAGCT CCAATAGCGT AACTTAAAGT TGTTGCAGTT AAAAAGCTCG 600
TAGTTGAAAT TCGAATTAGC TGATAGAGGG CTTAGGCTAT CTAGCAGTTG 650
GTTCTCCGTC TACAATCCCT CTTGGGCTTC AGGGTTGCAG AGGGCTGAGT 700
AGACAAATTA CCTTGAAAAA ATTAGAGTGT TCCAGGCAGG TTTTCGCCGG 750
AATACATTAG CATGGAATAA TGGAATAGGA CTTAGGTCTT TTGTTGGTTT 800
TAGGACTTGA GTAATGATTA ATAGGGACAG ATGGGGGCAT TAGTATTTAA 850
TTGTCAGAGG TGAATTTCTT GGATTTATTA AAGACTAACT TATGCGAAAAG 900
CATTTGCCAA GGATGTTTTT ATTAATCAAG AACGAAAAGT AGGGGATCAA 950
AGACGATCAG ATACCGTCGT AGTCTTAACT ATAAACTATA CCGACTCGGG 1000
ATCGGAAGGG TAAATATTTAA GGCCCTTTCG GCACCGTAAG AGAAATCAAA 1050
GTCTTTAGGGT TCTGGGGGGA GTATGGTTCG AAGGCTGAAA CTTAAAGGAA 1100
TTGACGGAAG GGCACCACCA GGATGGGAGC CTGCGGCTTA ATTTGACTCA 1150
ACACGGGGAA ACTTACCAGG TCAAAACATG GATGGGATTG ACAGATTGAA 1200
AGCTCTTCTT TGATTCTATG GGTGGTGGTG CATGGCCGTT CTTAGTTGGT 1250
GGAGTGATTT GTCTGGTTAA TTCCGATAAC GAACGAGACC TTAACCTGCT 1300
AACTAGTTTG CTCTGCATA AGGGGTATAA CTTCTTAGAG GGACTATGTA 1350
TGTTAAATAC ATGGAAGTTT AAGGCAATAA CAGGTCTGTG ATGCCCTAG 1400
ACGTCCGTTG CCGCACGCGC GCTACACTGA CACGTTTCAGC GAGCTTATTT 1450
ACCTGTCTCG AAAGAGTATG GGAAATCTTG TTAGGACGTG TCGTGCTGGG 1500
GATAGATCTT TGCAATTATA GATCTTGAAC GAGGAATTCC TTGTAAGCAT 1550
AGGTCAATCAG CCTGTGCTGA ATACGTCCCT GCCCTTTGTA CACACCGCCC 1600
GTCGCTCCTA CCGATTTTCA GTGATGTGGT GAACTATCTG GACTGCGATT 1650
GGGCTTGAAC CAGTTGCGGG AAGTTTCGTA AACCTTATCA CTTAGAGGAA 1700
GGAGAAGTCG TAACAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA AGGATCATT 1750
ACACATTCGA TCTTAAACCT TAGATTAGTG TTTGGTGTGC TTCTGTACTA 1800
ACAGTAGTTA GGCAGAAGTT CAATAAACCT ATCTATCTAA TTTTATTTA 1850
ATATATTTTC TAAACTCAGA AAATTTTCAA CGATGGATAT CTGGGTCTCC 1900
ATAACGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT ACGCAATGCG AATAGCAGAT 1950
CCGCGAGACA TTAGATTTTC GAACGCACCT GGCGCTAGTT TACTAGCATG 2000
TTTGTTTTAG TGTGTTTGA GAGATTCTAA TCATCAAAAA GAATGTGATT 2050
GAGGCTTCGG CTTCTTTCAT TAAATAAGAG AGTGATGAG TTTTCATACAC 2100
AAAAATGAAG TAGTCACAGT CATGTGATCT CTTTTTTGTC GATTCTCTAA 2150
ATAAACACTC TATCTTTTCT CTTTTTTTGA CACCTGAAAT CAAGCAAGAT 2200
CACCCGCTGA ACTTAAGCAT ATCAGTAAGC GGAGGAAAAG AAACCTAACAA 2250
GGATTGCCTT AGTAGTGGC AATGAACCG CAATAGCTCA AAGTGTAAT 2300
CTGAGGCATC AAGTCTTAGA ATTGTAATCT ATAGGCCTTT TAGGGAAGCC 2350
ATGGTTCTAG CATAAGTTCC TTGAAAAGGG ATGCCAAAGA GGGTAAAAGC 2400
CCCGTATTTG GTTAGAAGT GGTGTACCGA AGGGTTCCAA GAGTCGGGTT 2450
GTTTGGGATT GCAGCCTAAA ATGGGAGATA AACTTCTTCT AAAGCTAAAT 2500
ATTTATGGGA AACCGATAGC AAACAAGTAC TACGAAGGAA AGATGAAAAG 2550
AACTTTGAAA AGAGGGTTAA AAGACTTGAA ATCGTTGAGA AGAAAAGCGG 2600
TAGAAGAGAA ATGATTTCTG CTAGAAGTAT GTGGCGTTGT AGTCGTCTTC 2650
TGCGGTAATG GTACTTCATA GGGCCTAGCT GTAGACCGGC GGCGCATAGT 2700
TGCTTTTTCT AGGCGAAGTG CAAAATGAGG TTTTGTTTAC GGAAACGTCT 2750
CTAGGGAAGA CTCTGGCCTT GATGCTAGAA GCCCTGGTCT CCAACGTAAA 2800
CTTAGCCTGA GGGCTGCATC TGCAGATTTT GCAAAAAAGG CTTCTACTGA 2850
CCCGTCTTGA AACACGGACC AAGGAGTCTA CCACAAGTGC GAGTTTTAGG 2900
GTGGAAAAAC CCGACGGCGC AACGAAAGTG AGTATAAGGT GCGAATCCGT 2950
AAGGAGGCAG CATCGGCCAA CCTTGATTTT CGAATGAAAG GATTGAGCAA 3000
GAGCATTTCT GGTAGGACCC GAAAGATGGT GAACTACGCT TGAGTAGGGC 3050
GAAGCCAGGG GAAACTCTGG TGGAGGCTCG AAGCGTTACT GACGTGCAAA 3100
TCGTTCTGCA AACTTGAGTG TAGGGGCGAA AGACTAATCG AACCATCTAG 3150
TAGCTGGTTC CCTCTGAAGT TTCTCTCAGG ATAGCTGGAA CAATATCGCA 3200
GTTTTATTAG GTAAAGCGAA TGATTAGAGG AATCGGAGGT CCTAGACCTT 3250
TGACCTATTC TCAAACTTTA AATTGGTAAG AGCTTGGCGT TTCTTAATTG 3300
AACGCTGAGG TAGAATGCGT TGTTCCAAGT GGGCCGTTTT TGGTAAGCAG 3350
AACTGGCGAT GAGGGATGAA CCTAACGCTG AGCTAAGGTG CAAAAATTC 3400
CGCTCATCAG ATACCATAAA AGGTGTTGGT TCATTTAGAC AGCAGGACGG 3450

TGGCCCTGGA AGTCGGAATC CGCTAAGGAG TGTGTAACAA CTCAC 3495

เมื่อนำลำดับที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *P. multimicronucleatum* strain MB1-1 (GenBank accession no. JF741212.1) ในฐานข้อมูลของ NCBI มากที่สุด พบความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้สูงสุด คือ 100%

ค. *Telotrochidium* sp. (BKK) และ *Telotrochidium* sp. (RY) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 3,449 คู่เบส (นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งของไพรเมอร์ โดยนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันแสดงด้วยจุด และนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันแสดงตามสัญลักษณ์ของนิวคลีโอไทด์นั้น ๆ)

BKK	<u>TGGCCTACCT</u>	<u>GGTTGATCCT</u>	GCCAGTAGTC	ATATGCTTGT	CTTAAAGATT	50
RY	50
BKK	<u>AATCCATGCA</u>	<u>TGTGTAAGTA</u>	<u>TAAGTATTGT</u>	ACAGCGAAAC	TGCGAATGGC	100
RY	100
BKK	<u>TCATTACATC</u>	<u>AGTTATAAAT</u>	<u>TATTTGATAA</u>	<u>TCGAAAGTTA</u>	<u>CATGGATAAC</u>	150
RYC.....	150
BKK	<u>CGTGACAAAT</u>	<u>TACAGCTAAT</u>	<u>ACATGCAGTC</u>	<u>AGACCTGGTC</u>	<u>CAAGGGTCGT</u>	200
RY	200
BKK	<u>AATTATTAGT</u>	<u>ATTAAACCAT</u>	<u>TTCCGAAAAG</u>	<u>AGTGTGATGA</u>	<u>ATCATAATAA</u>	250
RY	250
BKK	<u>TCGAACGAAT</u>	<u>CGCCTGGTGT</u>	<u>GCGATAAAATC</u>	<u>ATTCAAGTTT</u>	<u>CTGCCCTATC</u>	300
RY	300
BKK	<u>AGCTTTGGAT</u>	<u>GGTAGTGAT</u>	<u>TGGACTACCA</u>	<u>TGGCAGTCAC</u>	<u>GGGTAACGGA</u>	350
RY	350
BKK	<u>GAATTAGGGT</u>	<u>TCGATTCCGG</u>	<u>AGAGGGAGCC</u>	<u>TGAGAAACGG</u>	<u>CTACCACATC</u>	400
RY	400
BKK	<u>TACGGAAGGC</u>	<u>AGCAGGAGCG</u>	<u>AAAAATTGCC</u>	<u>AATCCCGACA</u>	<u>CGGGGAGGCA</u>	450
RY	450
BKK	<u>GTGACGAGAA</u>	<u>ATAACAACCTC</u>	<u>TTGGTTATTC</u>	<u>TAAGAAGTGT</u>	<u>AATGAGGATA</u>	500
RY	500
BKK	<u>ATTTAAAACC</u>	<u>CTTACCAGAA</u>	<u>GCAATTGGAG</u>	<u>GGCAAGTCTG</u>	<u>GTGCCAGCAG</u>	550
RY	550
BKK	<u>CCGCGTAAT</u>	<u>TCCAGCTCCA</u>	<u>ATAGCGTATA</u>	<u>TTAAAGTTGT</u>	<u>TGCAGTCAAA</u>	600
RYG.....T.....	600
BKK	<u>AGGCTCGTAG</u>	<u>TTGAAGTTCT</u>	<u>GGCTGTTTCA</u>	<u>TCCTCGAGCT</u>	<u>CTGTAGCCGA</u>	650
RY	.A.....	650
BKK	<u>GGACTCGACA</u>	<u>GTCAATCCGCT</u>	<u>TGCAAAATATA</u>	<u>TGTTCCGCTT</u>	<u>TAACCGGGTG</u>	700
RY	700
BKK	<u>GCTGTATGAG</u>	<u>TAAGCAATTT</u>	<u>ACCTTGAGAA</u>	<u>AAACAGAGTG</u>	<u>TTCCAGGCAG</u>	750
RY	...A.....	...G.....	750
BKK	<u>GTTTGTCCGG</u>	<u>AATGCATTAG</u>	<u>CATGGAATAA</u>	<u>TAGAATATGA</u>	<u>CTGAAGTCGA</u>	800
RY	800
BKK	<u>TTTATTGGTT</u>	<u>TGAGGCTTTA</u>	<u>GTAATGATTA</u>	<u>ATAGGAACAG</u>	<u>TCGGGGGCAT</u>	850
RY	850
BKK	<u>TGGTACTTGA</u>	<u>CAGTCAGAGG</u>	<u>TGAAAATCTA</u>	<u>GGATTTGTCA</u>	<u>AAGACTAACA</u>	900
RY	900
BKK	<u>AATGCGAAAG</u>	<u>CATTTGCCAA</u>	<u>GGATGTTTTC</u>	<u>ATTAAATCAAG</u>	<u>AACGAAAGTT</u>	950
RY	950
BKK	<u>AGGGGATCAA</u>	<u>AGACGATCAG</u>	<u>ATACCGTCC</u>	<u>AGTCTTAACT</u>	<u>ATAAACTATA</u>	1000

RY 1000
 BKK CCGACTCGGA TTCAGATGAA TCATAAAGTT CATTTGGGAC CGTAGGAGAA 1050
 RY 1050
 BKK ATCAAAGTTT TTGGGTTCTG GGGGAAGTA TGGTCGCAAG GCTGAAACTT 1100
 RY 1100
 BKK AAAGGAATTG ACGGTTTTGC ACCACCATGG AGTGGAGTCT GCGGCCTAAT 1150
 RY 1150
 BKK TTGACTCAAC ACTGGGAAAC TCATCAGGGC AAGGAGATTG TAGGATTGAC 1200
 RYA..... 1200
 BKK AGATTGAGAG TTCCTTCTTG ATTGGTCTAG TGGTGGTGCA TGGCCGTTCT 1250
 RY 1250
 BKK TAGTTGGTGG AGTGATTTGT CTGGTTAATT CCGTTAACGA ACGAGACCTT 1300
 RY 1300
 BKK AACCTGCTAA CTAGTACACA GATGACAAAT CTGTGATACT TCTTAGAGGG 1350
 RY 1350
 BKK ACTATGTGGT GTAATCACAT GGAAGTTTGA GGCAATAACA GGTCTGTGAT 1400
 RYA..... 1400
 BKK GCCCTTAGAT GTCCTGAGCT GCACGCGTAC TACAATGGTG CTTTCAACGA 1450
 RY 1450
 BKK GCTTTTCTTG ATCCGAAAGG ATTTGGGTAA TCTTTTtagT GAGCACCGTG 1500
 RY 1500
 BKK CTTGGGATAG ATCTTTGTAA TTATGGATCT TGAACTAGGA ATTCCTAGTA 1550
 RY 1550
 BKK AGCGCGCGTC ATCAGCGCGT GCTGATTACG CCCCTGCAAA ATGTACACAC 1600
 RYT..... 1600
 BKK CGTCCGTCGC TATTACCGAT TGAGTGTAAA GGTGAACCTT CTCGATAGAC 1650
 RYC..... 1650
 BKK GCAAGTCCAG AAATTAAGTA AACCTTTGCA CTTAGKGGAA ATAAAAGTCG 1700
 RYA..... 1700
 BKK TAACAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA AGGATCATTG ATAATTTTGT 1750
 RY 1750
 BKK AATGTTCTTC TTTAATTAAC GTTCATTTGT TAAGGCCTCG GCCATAACAA 1800
 RY 1800
 BKK AGTATACCTA TTTCATAGGT TTTAATGGTT ACTAAATATC CTAAAAATTA 1850
 RY 1850
 BKK ATAAATTTTC AACGATGGAT ATCTAGGCTC CAATAACGAT GAAGAACGCA 1900
 RY 1900
 BKK GCGAAGTGCg ATAAGCAATG CGAATTGCAG AACCGCGAGT CATCAGATTT 1950
 RY 1950
 BKK TTGAACGCAA GTGGCGGCTG CCTCGGCAGT CATGTTTGTTC TCAGTGTGTC 2000
 RY 2000
 BKK CGGTTAATTA CATCAAAGAG TATAATGTGA TTGAAGAAAT TCTCTCACAA 2050
 RYR..... 2050
 BKK AATATGGAAT AATGTCAATG AAGACTCCAA ACGAAATAGT CACTAAATGG 2100
 RYR..... 2100
 BKK TGATAGTCGT TYGAGGATCG GAATTGGTGA ATCATTATTC AAAAACAAAT 2150
 RY 2150
 BKK TATCCAATTA TGGCACCTGA AATAAGCAAG AGTACCCGCT GAACTTAAGC 2200
 RY 2200
 BKK ATATCAGTAA GCGGAGGAAA AGAAAAAATC AATGATTACC TTAGTAGCGG 2250
 RY 2250
 BKK CGAGTGAATA GGTAAAAGCC CAAGATGTTA ATCTGGTATA AAGTACTAGA 2300
 RY 2300
 BKK ATTGTAATCT ATGGAGTAGA TCGGAAGGTG GAGACTCATC ATAAGTGCCCT 2350
 RY 2350
 BKK TGGAAAAGGA CGCCAGAGAA GGTGAAAGCC CTGTCTTAGG ATGAGTCGAA 2400
 RY 2400

BKK	GCGATACGAG	ATATTTCTAA	GAGTCGGGTA	GTTTGGGAAT	GCTGCCCTAA	2450
RY	2450
BKK	TTGGGAGGTA	AACTTCCT	AAGGCTAAAT	ATTTATTGGA	GACCGATAGC	2500
RY	2500
BKK	ATACAAGTAC	TGCGAAGGAA	AGATGAAAAG	AACTTTGAAA	AGAGGGTTAA	2550
RY	2550
BKK	AAGACTTGAA	ATCGTTGAAA	AGGAAGCGAT	AGAAGAGAAA	TGATTCCCTG	2600
RY	2600
BKK	CAAAATAGCA	AATTGAGCTA	AGTTGCGCGG	TGGAGAAATAT	CTAACAGAGT	2650
RY	2650
BKK	TCTTGCCGTG	TAATGAAAAT	CAAGAGGCGG	TTTGCAGGAG	AAAGGCAAGA	2700
RY	2700
BKK	TGAGGTGGGG	TTGCAAGAAT	AAGGTGAAGA	GTGTACTCTC	GATCCAAAAG	2750
RY	2750
BKK	TTGCAATCCT	GCCTGAGGGA	TCAGATGATG	ATCTTGCCAA	AATGGCTTTT	2800
RY	2800
BKK	ATCGACCCGT	CTTGAAACAC	GGACCAAGGA	GCTTACCTAT	TATGCGAGTG	2850
RY	2850
BKK	TTAAGGTGGA	GAAACCTAAA	CGCGTACCGA	AAGGGATGTA	AGATGTGAGG	2900
RY	2900
BKK	CGAAAGCTGC	AACATCAACC	AATCTTGACT	CTATGAGGAA	GGACTTGAGT	2950
RY	2950
BKK	AAGAGCATAA	TCGGTAGGAC	CCGAAAAGATG	GTGAACTACG	GTTGAATAGG	3000
RY	3000
BKK	GCGAAGCCAG	GGGAAACTCT	GGTGGAGGCT	CGAAGCGGTA	CTGACGTGCA	3050
RY	3050
BKK	AATCGTTCGT	CAAAATTTGAC	TGTAGGGGCG	AAAGACTAAT	CGAACCATCT	3100
RY	3100
BKK	AGTAGCTGGT	TCCCTCTGAA	ATTTCTCTCA	GGATAGCAGG	AACAGATCAT	3150
RY	3150
BKK	GCAATTTTAT	CAGGTAAAAGC	TAATGATTAG	TGGACTCGGG	GGCCCCGTGC	3200
RY	3200
BKK	CCTTGACCAA	TTCTCAAACT	TTAAATTTGGT	AAGAACTTCA	AGTTATCTTA	3250
RY	3250
BKK	ATTGAACTTG	GAGAAGGAAT	GCGTTGTTCT	TAGTGGGCCA	TTTTTTGGTAA	3300
RY	3300
BKK	GCGAAGCTGG	CGATGAGGGA	TGAACCTAAC	GTCGAGCTAA	GGTGCCCAA	3350
RY	3350
BKK	TTCACGCTCA	TCAGACACCA	TAAAAGGTGT	TGGTTAGTAT	AAACAGCCGG	3400
RY	3400
BKK	ACTGTGGCCA	TGGAAGTCGG	CACCAGCTAA	GGAGTGTGTA	ACAACCTCAC	3449
RY	3449

เมื่อนำลำดับที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *O. minima* (GenBank accession no. EF417834.1) ในฐานข้อมูลของ NCBI โดยมีความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้ 99% แต่เนื่องจากเซลล์ซิลิเกตที่เพาะเลี้ยงได้และใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่มีพูชนบริเวณปาก (epistomial membrane) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะในซิลิเกตสกุล *Opisthonecta* จึงระบุจำแนกว่าเป็นซิลิเกตในสกุล *Telotrochidium* sp.

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนโรโบโซมอลดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไปยัง 3' ของ *Telotrochidium* sp. ที่คัดแยกได้จาก 2 พื้นที่ พบความแตกต่างจำนวนทั้งหมด 13 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 3,449 คู่เบส คิดเป็นค่าความห่างทางพันธุกรรมเพียง 0.3% เมื่อคำนวณโดยใช้แบบจำลอง *p*-distance และ Kimura 2-parameter model

ง. *T. pyriformis* ได้ผลิตพันธ์พีซีอาร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 3,499 คู่เบส (นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งของไพรเมอร์)

```

GGTTGATCCCT GCCAGTTACA TATGCTTGTC TTAAATATTA ACCCATGCAT 50
GTGCCAGTTC AGTATTGAAC AGCGAAACTG CGAATGGCTC ATTA AACACAG 100
TTATAGTTTTA TTTGATAATT AAAGATTACA TGGATAACCG AGCTAATTGT 150
TGGGCTAATA CATGCTTAAA ATTCCGTGTC CTGCGACCCG AACGTATTTA 200
TTAGATATTA GACCAATCGC AGCAATGTGA TTGAGATGAA TCAAAGTAAAC 250
TGATCGAATC GAAGCTTGCT TCGATAAATC ATCTAAGTTT CTGCCCTATC 300
AGCTCTCGAT GGTAGTGTAT TGGACTACCA TGGCAGTCAC GGGTAACGGA 350
GAATTAGGGT TCGATTCCGG AGAAGGAGCC TGAGAAACGG CTACTACAAC 400
TACGGTTCGG CAGCAGGGAA GAAAATTGGC CAATCCTAAT TCAGGGAGCC 450
AGTGACAAGA AATAGCAAGC TGGGAAACTT AGTTTCTACG GCATTGAAAT 500
GAGAAAAGTG TAAATCTCTT AGCGAGGAAC AATTGGAGGG CAAGTCATGG 550
TGCCAGCAGC CGCGGTAATT CCAGCTCCAA TAGCGTATAT TAAAGTTGTT 600
GCAGTTAAAA AGCTCGTAGT TGAACCTCTG TTCAGGTTCA TTTCGACTCG 650
TCGAGTGAAG CTGGACATAC GTTTGCAAAC TAAAATCGGC CTTCACTGGT 700
TCGACTTAGG GAGTAAACAT TTTACTGTGA AAAAAATTAGA GTGTTCCAGG 750
CAGGTTTTAG CCCGAATACA TTAGCATGGA ATAATGGAAT AGGCAAGAT 800
CCATTTTTATT GGTCTTTGGA TTTGGTAATG ATTAATAGGG ACAGTTGGGG 850
GCATTAGTAT TTAATAGTCA GAGGTGAAAT TCTTGGATTT ATTAAGGACT 900
AACTAATGCG AAAGCATTTC CCAAAGATGT TTTCAATTAAT CAAGAACGAA 950
AGTTAGGGGA TCAAAGACGA TCAGATACCG TCGTAGTCTT AACTATAAAC 1000
TATACCGACT CGGGATCGGC TGGAAATAAT GTCCAGTCGG CACCGTATGA 1050
GAAATCAAAG TCTTTGGGTT CTGGGGGAAG TATGGTACGC AAGTCTGAAA 1100
CTTAAAGGAA TTGACGGAAC AGCACACCAG AAGTGGAAAC TCGGGCTTAA 1150
TTTGACTCAA CACGGGGAAA CTCACGAGCG CAAGACAGAG AAGGGATTGA 1200
CAGATTGAGA GCTCTTTCTT GATTCTTTGG GTGGTGGTGC ATGGCCGTTT 1250
TTAGTTGGTG GAGTGATTTG TCTGGTTAAT TCCGTTAACG AACGAGACCT 1300
TAACCTGCTA ACTAGTCTGC TTGTGAACAA CAGGTTGTAC TTCTTAGAGG 1350
GACTATTGTG CAAGAAGCCA ATGGAAGTTT AAGGCAATAA CAGGCTGTGT 1400
ATGCCCCTAG ACGTGCTCGG CCGCACGCGC GTTACAATGA CTGGCGCAGA 1450
AAGTATTTCC TGTCCTGGGA AGGTACGGGT AATCTTATTA ATACCAGTCG 1500
TGTTAGGGAT AGTTCTTTGG AATTGTGGAT CTTGAACGAG GAATTTCTAG 1550
TAAGTGCAAG TCATCAGCTT GCGTTGATTA TGTCCTTACC GTTTGTACAC 1600
ACCGCCCGTC GCTTGTAGTA ACGAATGGTC TGGTGAACCT TCTGGACTGC 1650
GGTAGCAATA CTGCGGGAAA ATAAGTAAAC CCTACCATTT GGAACAACAA 1700
GAAGTCGTAA CAAGGTATCT GTAGGTGAAC CTGCAGATGG ATCATTAACA 1750
CAATTAACAA ACCTTAACTT ATGTACTTTT GAAGATAGCT TCGGCTAGCT 1800
TCGAGGTTTT ATTGTACAC C TAGTGTGAA TAAAAATTTT TCATATGTCT 1850
AAGATCTGGA TAACATCCAA AAAACGAAAA GAAAATTTTC AACGGTGGAT 1900
ATCTAGGTTT CCGTGACGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATACGCAATG 1950
CGAATTGCAG AACCGCGAGT CATCAGATCT TTGAACGCAA GTGGTGGAGG 2000
TGTA AAAACC TTCATGTTTG TATCAGTGTG GAAAGGAATC ACGCATCTTA 2050
ATGCGATTGA AGTTTACTTC TCTCGTTAAA CGTGATGGGT GGTCGAGCAA 2100
TCGCCGCCAG AACGAAGTAG TCACATTCGT GCAATGTGAA CATTTCGTTCA 2150
GGCATTAAAG GTGAATGTTT AACATGCTAC TCATAGAGAA AATTACTTTT 2200

```

TCTCACTACA CCTGATACAA GCAAGATTAC CCGCTGAAC TAAGCATATC 2250
 AGTAAGCGGA GAAAAAGAAA CTAAC TAGGA TAGCCCCAGT AATGGCGAAT 2300
 GAACAGGCTA AAGCTCAAAG TGAAAATCTG GAAACAGAAT TGTAATCTAA 2350
 AGAGTTAACC CAAAGCTAAG CTCTCGCAT AAGTTCCCTT GAACAGGACG 2400
 TCAAAGAGGG TGACAACCCC GTAGTCGGTG AGGAATGCTG GTGAAGGGAA 2450
 GGCTTCAAAG AGTCGGGTTG TTTGGGATTG CAGCCCTAAG TGGGAGATAA 2500
 ACTTCTTCTA AAGCTAAATA TACACGGGAG ACCGATAGCG AACAACTACT 2550
 GCGAAGGAAA GATGAAAAGA ACTTTGAAAA GAGGGTTAAA AGACTTGAAA 2600
 CCGTTGAGAA GGAAGCTGTA GAAGAGCAAT AAAGTGGACG GCGCATTAAGG 2650
 GGAAGTGTT ACTCACTGCG GAGTCGATAC GAAAGGTCGA TGAGTAAGGA 2700
 AAGACACAG AACTTGCTAC GCCGGTCAGA AGACAAAATG AGTTCAGATT 2750
 GAAGGAGTCA CCTGAGATTG GGGGTCAAAC CAGATCAAAC GGGAAACTTC 2800
 AGACTGGACT GAGGGGCCA AGGGCGATTT TGTCAAATG GCTTCTACTG 2850
 ACCCGTCTTG AAACACGGAC CAAGGAGTCT ATCAATTAAG CGAGTGATAG 2900
 GGTGGAGAAA CCCGTCCGCG AAACGAAAGT GAGTACAAGG TGCCAAGCCG 2950
 CAAGGTAGCA GCATCACCCG ACCTAGATT TCCGAAGAAG GGTTTCGAGGA 3000
 AGAGCTTAAT TGTTAGGACC CGAAAGATGG TGAAC TACGC TTGAATAGGG 3050
 TGAAGCCAGG GGAAC TCTG GTGGAAGCTC GTAGCGATAC TGACGTGCAA 3100
 ATCGTTTCGTC AAATTTGAGT GTAGGGGCGA AAGACTAATC GAACCATCTA 3150
 GTAGCTGGTT CCTCCGAAG TTTCTCTCAG GATAGCAAGA GCAAGTACGC 3200
 AGTTTTATTA GGTAAAGCGA ATGATTAGAG GACTCGGGGT TCCAAGAATC 3250
 TCGACCTATT CTCAAAC TTT AAATTTGGTAA GAGCCGCGGA GTTTTCTTAA 3300
 ATGAACTCTC GGGTAGAATG CAGTGCTCTT AGTGGGCCAT TTTTGGTAAG 3350
 CAGAACTGGC GATGAGGGAT GAACCTAACG TTGAGATAAG GCGCCCAAT 3400
 GCACGCTCAT CAGATACCAC AAAAGTGTT GGTTCATATG GACAGCAGGA 3450
 CCGTGGCTAT GGAAGTTAGA ATCCGCTAAG GAGTGTGTAA CAACTCACC 3499

เมื่อนำลำดับที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับสมอลซ์ยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอของ *T. pyriformis* strain FL191 (GenBank accession no. EF070254.1) ในฐานข้อมูลของ NCBI มากที่สุด พบความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้ถึง 100%

การระบุอัตลักษณ์โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของซิลิเอตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอความยาวประมาณ 3,500 คู่เบสของซิลิเอต *Bresslauides* sp., *P. multimicronucleatum*, *Telotrochidium* sp. (BKK), *Telotrochidium* sp. (RY) และ *T. pyriformis* จำนวนทั้งหมด 5 สาย เมื่อนำเฉพาะส่วนของสมอลซ์ยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอมาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างซิลิเอตทั้ง 5 สายพันธุ์ กับซิลิเอตสายพันธุ์อื่น ๆ อีกจำนวน 46 สายพันธุ์ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI และครอบคลุมซิลิเอตทุกชั้นที่มีรายงานอยู่ในปัจจุบัน เพื่อช่วยในการระบุอัตลักษณ์ของซิลิเอตทั้ง 5 สายพันธุ์ดังกล่าว โดยทำการสร้างไฟล์ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 51 สาย พร้อมกับสิ่งมีชีวิตที่ใช้เป็น outgroup คือ ไดโนแฟลกเจลเลต 2 ชนิด ได้แก่ *Prorocentrum micans* [GenBank accession number M14649] และ *Symbiodinium pilosum* [X62650] อีก 2 สาย รวมทั้งหมด 53 สาย โดยก่อนทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ได้ทำการตัดส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สามารถใช้ใน

การวิเคราะห์ที่ได้ เหลือความยาวสุทธิของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ในไฟล์ alignment เท่ากับ 1,565 ตำแหน่ง

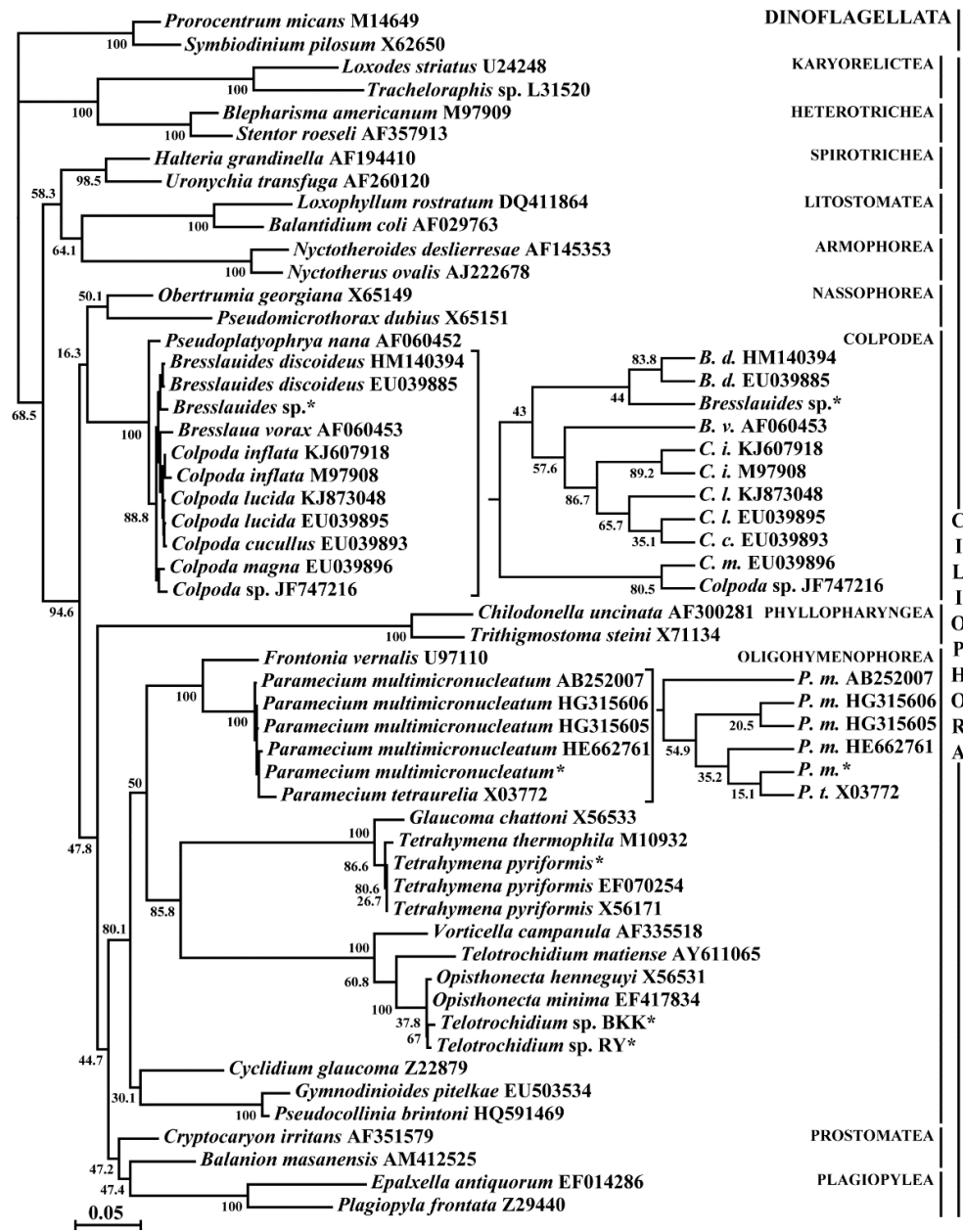
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของซีลิเอตทั้ง 5 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม phyML 3.0 โดยใช้แบบจำลองของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution model) คือ General Time Reversible (GTR) model ร่วมกับ gamma distribution ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 ช่วง (category) แล้วนำผลการวิเคราะห์มาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ (ภาพที่ 13) พบว่า *Bresslauides* sp. ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ จับกลุ่มอยู่กับซีลิเอตในชั้น Colpodea ด้วยค่าสนับสนุน (support value) สูงสุด คือ ค่า Bootstrap 100% โดย *Bresslauides* sp. แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับซีลิเอตในสกุล *Bresslauides* 2 สายพันธุ์ คือ *Bresslauides discoideus* [EU039885] และ *B. discoideus* [HM140394] ด้วยค่าสนับสนุน 44% และแตกแขนงแยกออกมาจากซีลิเอตสกุล *Colpoda* สายพันธุ์อื่น ๆ กับ *Bresslauides vorax* [AF060453] เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของสมอลซัยยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 1,665 คู่เบส ของ *Bresslauides* sp. กับ *B. discoideus* [EU039885] และ *B. discoideus* [HM140394] 2 สายพันธุ์ ในแผนภูมิวิวัฒนาการ มาคำนวณหาความห่างทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าความห่างระหว่าง *Bresslauides* sp. กับ *B. discoideus* 2 สายพันธุ์ เมื่อคำนวณโดยใช้แบบจำลอง *p*-distance และ K2P เพียง 1.2-1.3% แต่เมื่อนำ *Bresslauides* sp. ไปเปรียบเทียบกับ *Colpoda* ทั้ง 7 สายพันธุ์ ในแผนภูมิวิวัฒนาการ พบว่ามีค่าความห่างถึง 1.9-2.5% เมื่อคำนวณโดยใช้แบบจำลองเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า *Bresslauides* sp. ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ เป็นสมาชิกในสกุล *Bresslauides* สอดคล้องกับความสัมพันธ์ที่ปรากฏในแผนภูมิวิวัฒนาการที่แสดงไว้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *P. multimicronucleatum*, *Telotrochidium* sp. (BKK), *Telotrochidium* sp. (RY) และ *T. pyriformis* มีตำแหน่งอยู่กับซีลิเอตในชั้น Oligohymenophorea ด้วยค่าสนับสนุนถึง 80.1% โดย *P. multimicronucleatum* แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับซีลิเอตในสกุล *Paramecium* 5 สายพันธุ์ คือ *P. multimicronucleatum* [AB252007; HG315605; HG315606; HE662761] และ *Paramecium tetraurelia* [X03772] ด้วยค่าสนับสนุน 100% เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของสมอลซัยยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 1,711 คู่เบส ของ *P. multimicronucleatum* กับ *Paramecium* 5 สายพันธุ์ ในแผนภูมิวิวัฒนาการ มาคำนวณหาความห่างทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าความห่างระหว่าง *P. multimicronucleatum* กับ *P. multimicronucleatum* 4 สายพันธุ์ เมื่อคำนวณโดยใช้แบบจำลอง *p*-distance และ K2P เพียง 0.1-1.8% แต่เมื่อนำ *P. multimicronucleatum* ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ไปเปรียบเทียบกับ *P. tetraurelia* ในแผนภูมิวิวัฒนาการ พบว่ามีค่าความห่างถึง

3.3% และ 3.4% เมื่อคำนวณโดยใช้แบบจำลอง *p*-distance และ K2P ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *Paramecium* ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ เป็นชนิด *P. multimicronucleatum*

แผนภูมิต้นไม้ไม่ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดที่ชิดกันของ *Telotrochidium* sp. ที่คัดแยกจากทั้งสองพื้นที่ โดยมีค่าสนับสนุน 67% อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับซิลิเอตในสกุล *Opisthonecta* 2 สายพันธุ์ คือ *Opisthonecta minima* [EF417834] และ *Opisthonecta henneguyi* [X56531] ด้วยค่าสนับสนุน 100% เนื่องจากซิลิเอตในสองสกุลนี้มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ

T. pyriformis ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับซิลิเอตในสกุล *Tetrahymena* 3 สายพันธุ์ คือ *T. pyriformis* [EF070254; X56171] และ *Tetrahymena thermophila* [M10932] ด้วยค่าสนับสนุน 86.6% เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 1,635 คู่เบส ของ *T. pyriformis* กับ *Tetrahymena* 3 สายพันธุ์ ในแผนภูมิวิวัฒนาการ มาคำนวณหาความห่างทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าความห่างระหว่าง *T. pyriformis* กับ *T. pyriformis* 2 สายพันธุ์ เมื่อคำนวณโดยใช้แบบจำลอง *p*-distance และ K2P เพียง 0.1% แต่เมื่อนำ *T. pyriformis* ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ไปเปรียบเทียบกับ *T. thermophila* ในแผนภูมิวิวัฒนาการ พบว่ามีค่าความห่างถึง 1.2% เมื่อคำนวณโดยใช้แบบจำลองเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า *Tetrahymena* ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ เป็นชนิด *T. pyriformis*



ภาพที่ 13 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของซิลิเอต *Breslauiodes* sp., *P. multimicronucleatum*, *Telotrochidium* sp. (BKK), *Telotrochidium* sp. (RY) และ *T. pyriformis* (*) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แผนภูมินี้ถูกสร้างด้วยโปรแกรม phyML ($\ln L = -16061.507683$) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลติเอ็นเอทั้งหมด 53 สาย 1,565 ตำแหน่ง ประกอบด้วย 2 สายที่เป็นไดโนแฟลกเจลเลต outgroup และ 51 สายที่เป็นซิลิเอต ซึ่งครอบคลุมตัวแทนทั้ง 11 ชั้น ค่าสนับสนุน Bootstrap บนกิ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากการวิเคราะห์ 1,000 ซ้ำ (ความยาวของขีดที่กำกับด้วยเลข 0.05 แสดงความยาวที่ใช้เปรียบเทียบกับความยาวกิ่งของแผนภูมิเพื่อประมาณการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อ 1 ตำแหน่งในสายวิวัฒนาการ) [กลุ่ม Colpodea และ *Paramecium* มีการขยายกิ่งเพื่อให้สามารถแสดงค่าสนับสนุน Bootstrap บนกิ่งได้

อย่างชัดเจน: *B. d.* = *Bresslauides discoideus*; *B. v.* = *Bresslaua vorax*; *C. c.* = *Colpoda cucullus*; *C. i.* = *Colpoda inflata*; *C. l.* = *Colpoda lucida*; *P. m.* = *Paramecium multimicronucleatum* และ *P. t.* = *Paramecium tetraurelia*]

การทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ต่อเซลล์ซีลีเอต

ก. *Bresslauides* sp.

จากการทดสอบโดยใช้สารละลายโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยทำการทดสอบซ้ำด้วยเงื่อนไขเดียวกันทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน (independent test) และนำค่าความเข้มข้นของแต่ละโลหะหนักที่ใช้ในการทดสอบและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของซีลีเอตโดยเฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 4 ไปใช้หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซีลีเอตตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธีโพรบิท ได้ค่า LC_{50} ของทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เท่ากับ 1.91 mg/l, 10.03 mg/l, 3.66 mg/l และ 0.09 mg/l ตามลำดับ โดยแคดเมียมมีความเป็นพิษต่อ *Bresslauides* sp. มากที่สุด รองลงมาคือ ทองแดง สังกะสี และตะกั่ว ตามลำดับ

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Bresslauides* sp. เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 7 ความเข้มข้น ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำใน 1 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง [ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (standard deviation)]

ทองแดง		ตะกั่ว		สังกะสี		แคดเมียม	
ความเข้มข้น (mg/l)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/l)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/l)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/l)	การอยู่รอด (%)
1.40	96.36 \pm 2.05	2.00	95.59 \pm 4.61	3.00	94.21 \pm 4.19	0.06	94.34 \pm 4.55
1.60	77.26 \pm 4.86	5.00	78.07 \pm 3.17	3.20	80.54 \pm 7.41	0.07	85.46 \pm 7.74
1.80	59.05 \pm 0.54	8.00	54.81 \pm 3.08	3.40	65.43 \pm 9.58	0.08	73.35 \pm 10.78
2.00	42.45 \pm 1.16	11.00	37.88 \pm 11.43	3.60	53.10 \pm 10.36	0.09	52.91 \pm 10.58
2.20	24.29 \pm 1.51	14.00	30.87 \pm 8.56	3.80	39.85 \pm 9.46	0.10	33.56 \pm 7.41
2.40	17.17 \pm 1.73	17.00	15.97 \pm 17.50	4.00	29.42 \pm 4.86	0.11	17.67 \pm 4.24
2.60	5.72 \pm 1.00	20.00	12.27 \pm 18.82	4.20	19.57 \pm 2.63	0.12	9.58 \pm 1.27

ข. *P. multimicronucleatum*

จากการทดสอบโดยใช้สารละลายโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยทำการทดสอบซ้ำด้วยเงื่อนไขเดียวกันทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน และนำค่าความเข้มข้นของแต่ละโลหะหนักที่ใช้ในการทดสอบและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของซิลิเกตโดยเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 5 ไปใช้หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิลิเกตตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธีโพรบิท ได้ค่า LC_{50} ของทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เท่ากับ 0.85 mg/L, 1.88 mg/L, 4.47 mg/L และ 0.30 mg/L ตามลำดับ โดยแคดเมียมมีความเป็นพิษต่อ *P. multimicronucleatum* มากที่สุด รองลงมาคือ ทองแดง ตะกั่ว และสังกะสี ตามลำดับ

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *P. multimicronucleatum* เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 7 ความเข้มข้น ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำใน 1 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย means±SD)

ทองแดง		ตะกั่ว		สังกะสี		แคดเมียม	
ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)
0.50	95.30±8.65	0.50	96.64±6.14	3.60	98.81±0.62	0.22	93.71±1.28
0.60	79.87±9.67	1.00	85.10±5.09	3.80	88.82±4.82	0.24	82.35±3.59
0.70	71.69±9.84	1.50	69.60±13.02	4.00	80.02±4.36	0.26	76.59±5.52
0.80	57.18±11.04	2.00	54.85±23.02	4.20	68.07±7.34	0.28	68.66±5.72
0.90	45.99±14.12	2.50	42.74±29.26	4.40	55.49±11.84	0.30	58.88±3.98
1.00	29.69±25.11	3.00	32.58±22.09	4.60	40.47±12.14	0.32	37.48±3.55
1.10	26.59±14.63	3.50	26.78±20.62	4.80	28.33±10.92	0.34	4.52±0.66

ค. *Telotrochidium* sp. (BKK)

จากการทดสอบโดยใช้สารละลายโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยทำการทดสอบซ้ำด้วยเงื่อนไขเดียวกันทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน และนำค่าความเข้มข้นของแต่ละโลหะหนักที่ใช้ในการทดสอบและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของซิติเอดโดยเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 6 ไปใช้หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิติเอดตายไปครึ่งหนึ่ง ด้วยวิธีโพรบิท ได้ค่า LC_{50} ของทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เท่ากับ 0.32 mg/L, 0.50 mg/L, 1.66 mg/L และ 0.57 mg/L ตามลำดับ โดยทองแดงมีความเป็นพิษต่อ *Telotrochidium* sp. (BKK) มากที่สุด รองลงมาคือ ตะกั่ว แคดเมียม และสังกะสี ตามลำดับ

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Telotrochidium* sp. (BKK) เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 7 ความเข้มข้น ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำใน 1 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\text{means} \pm \text{SD}$)

ทองแดง		ตะกั่ว		สังกะสี		แคดเมียม	
ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)
0.15	121.6 \pm 32.5	0.5	94.94 \pm 9.4	0.30	96.88 \pm 2.10	0.20	86.08 \pm 18.9
0.20	78.75 \pm 1.6	1.0	67.63 \pm 29.5	0.60	87.23 \pm 1.42	0.40	69.15 \pm 16.1
0.25	69.25 \pm 12.5	1.5	38.12 \pm 30.6	0.90	77.30 \pm 3.34	0.60	51.97 \pm 20.9
0.30	52.17 \pm 16.2	2.0	23.49 \pm 17.1	1.20	67.67 \pm 3.63	0.80	34.97 \pm 11.1
0.36	48.02 \pm 14.3	2.5	14.09 \pm 2.1	1.50	59.66 \pm 6.99	1.00	1.64 \pm 0.3
0.41	19.70 \pm 4.4	3.0	2.46 \pm 1.3	1.80	44.23 \pm 5.01	1.20	0.1 \pm 0.2
0.46	11.15 \pm 2.3	3.5	0.20 \pm 0.1	2.10	32.59 \pm 2.18	1.40	0 \pm 0.0

ง. *Telotrochidium* sp. (RY)

จากการทดสอบโดยใช้สารละลายโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยทำการทดสอบซ้ำด้วยเงื่อนไขเดียวกันทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน และนำค่าความเข้มข้นของแต่ละโลหะหนักที่ใช้ในการทดสอบและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของซิติเอดโดยเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 7 ไปใช้หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิติเอดตายไปครึ่งหนึ่ง ด้วยวิธีโพรบิท ได้ค่า LC_{50} ของทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เท่ากับ 10.32 mg/L, 0.50 mg/L, 1.25 mg/L และ 0.36 mg/L ตามลำดับ โดยแคดเมียมมีความเป็นพิษต่อ *Telotrochidium* sp. (RY) มากที่สุด รองลงมาคือ ตะกั่ว สังกะสี และทองแดง ตามลำดับ

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Telotrochidium* sp. (RY) เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 7 ความเข้มข้น ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำใน 1 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย means±SD)

ทองแดง		ตะกั่ว		สังกะสี		แคดเมียม	
ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)
9.00	94.35±2.39	0.10	89.87±4.57	0.30	93.56±2.45	0.25	93.57±5.05
9.50	75.51±1.37	0.20	78.43±5.17	0.60	79.20±2.73	0.28	79.72±6.60
10.00	56.32±3.09	0.30	69.50±2.87	0.90	64.11±2.29	0.30	72.07±5.22
10.50	39.99±2.78	0.40	58.68±3.29	1.20	54.59±1.04	0.33	62.74±13.59
11.00	29.13±4.17	0.50	50.81±5.05	1.50	40.58±2.26	0.35	52.61±11.41
11.50	19.35±4.54	0.60	41.59±5.68	1.80	23.30±2.19	0.38	44.52±10.37
12.00	11.60±3.20	0.70	31.79±4.45	2.10	12.14±1.67	0.40	32.59±10.32

จ. *T. pyriformis*

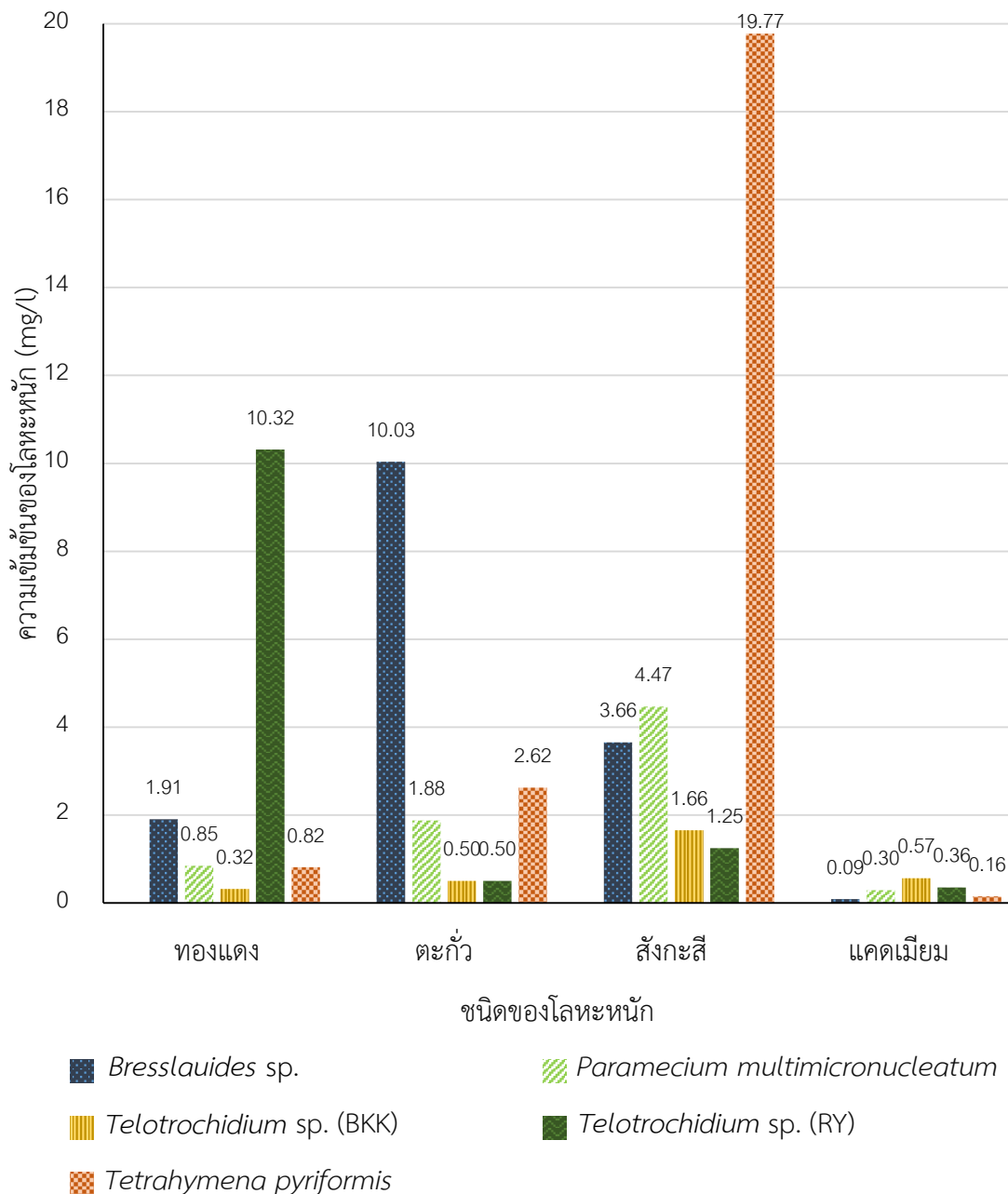
จากการทดสอบโดยใช้สารละลายโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยทำการทดสอบซ้ำด้วยเงื่อนไขเดียวกันทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน และนำค่าความเข้มข้นของแต่ละโลหะหนักที่ใช้ในการทดสอบและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของซิติเอดโดยเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 8 ไปใช้หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิติเอดตายไปครึ่งหนึ่ง ด้วยวิธีโพรบิท ได้ค่า LC_{50} ของทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เท่ากับ 0.82 mg/L, 2.62 mg/L, 19.77 mg/L และ 0.16 mg/L ตามลำดับ โดยแคดเมียมมีความเป็นพิษต่อ *T. pyriformis* มากที่สุด รองลงมาคือ ทองแดง ตะกั่ว และสังกะสี

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *T. pyriformis* เมื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 7 ความเข้มข้น ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำใน 1 ชุดการทดลอง และแต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย means±SD)

ทองแดง		ตะกั่ว		สังกะสี		แคดเมียม	
ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/L)	การอยู่รอด (%)
0.20	92.39±1.44	0.50	93.15±5.40	16.00	96.61±4.41	0.05	97.88±1.42
0.40	79.64±5.56	1.00	84.80±10.10	17.00	84.23±2.82	0.08	84.43±3.01
0.60	66.36±3.09	1.50	63.93±25.79	18.00	73.94±2.70	0.11	67.44±6.95
0.80	57.32±6.05	2.00	58.90±24.82	19.00	61.45±2.03	0.14	55.51±3.39
1.00	44.34±2.66	2.50	50.39±22.68	20.00	49.36±3.38	0.17	46.89±6.45
1.20	31.01±7.41	3.00	37.51±11.51	21.00	32.71±8.65	0.20	35.99±3.50
1.40	21.26±7.28	3.50	31.50±12.57	22.00	23.54±8.62	0.25	25.55±0.98

เมื่อนำค่า LC_{50} ของซิติเอดทั้ง 5 ชนิด มาเปรียบเทียบ และพิจารณาความเป็นพิษและความไวของซิติเอดต่อโลหะหนัก พบว่า *Telotrochidium* sp. (BKK) มีความไวต่อความเป็นพิษของทองแดงมากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.32 mg/L ในขณะที่ *Telotrochidium* sp. (RY) มีความไวต่อพิษของตะกั่ว (0.50 mg/L) และสังกะสี (1.25 mg/L) *Bresslauides* sp. (0.09 mg/L) มีความไวต่อความเป็นพิษของแคดเมียมมากที่สุด ในทางกลับกันเมื่อพิจารณาความทนของซิติเอดต่อความเป็นพิษของ

โลหะหนัก พบว่า *Telotrochidium* sp. (RY) สามารถทนต่อความเป็นพิษของทองแดงได้ดีที่สุด (10.31 mg/l) โดย *Bresslauides* sp. (10.03 mg/l), *T. pyriformis* (19.77 mg/l) และ *Telotrochidium* sp. (BKK) (0.57 mg/l) มีความทนต่อความเป็นพิษของตะกั่ว สังกะสี และ แคดเมียมได้ดีที่สุด ตามลำดับ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และ แคดเมียม ที่ทำให้ซิลิเกตทั้ง 5 สายพันธุ์ตายไปครึ่งหนึ่ง (LC₅₀)

การทดสอบศักยภาพในการกำจัดโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ปนเปื้อนออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของชิลิเอด

จากค่าความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ชิลิเอดตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ของชิลิเอดแต่ละชนิดที่ได้ นำไปใช้เป็นค่าความเข้มข้นเริ่มต้น สำหรับการทดสอบศักยภาพในการกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยง และเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักในอาหารเพาะเลี้ยงหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลดังต่อไปนี้

ก. *Bresslauides* sp.

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ในอาหารเลี้ยงมีปริมาณลดลง 8.76%, 16.12%, 29.64% และ 16.67% ตามลำดับ โดยเมื่อวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง (paired-samples *t*-test) ด้วยโปรแกรม SPSS และพิจารณาค่าความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักทั้งหมดที่ลดลง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักในอาหารเลี้ยงเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ของ *Bresslauides* sp.

โลหะหนัก	ความเข้มข้น (mg/l)			เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนัก	โลหะหนักที่ลดลง (mg/100 เซลล์)
	LC_{50}	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ทองแดง	1.91	1.75	1.60	8.76	8.3×10^{-5}
ตะกั่ว	10.03	9.68	8.12	16.12	56.7×10^{-5}
สังกะสี	3.66	3.43	2.41	29.64	58.8×10^{-5}
แคดเมียม	0.09	0.08	0.07	16.67	0.57×10^{-5}

ก. *P. multimicronucleatum*

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ในอาหารเลี้ยงมีปริมาณลดลง 25.93%, 31.17%, 49.16% และ 35.90% ตามลำดับ โดยเมื่อวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างด้วยโปรแกรม SPSS

และพิจารณาค่าความเชื่อมั่นที่ $P \leq 0.05$ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว และสังกะสี ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนัก ทั้ง 4 ชนิด ของ *P. multimicronucleatum*

โลหะหนัก	ความเข้มข้น (mg/l)			เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนัก	โลหะหนักที่ลดลง (mg/100 เซลล์)
	LC ₅₀	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ทองแดง	0.85	0.81	0.60	25.93*	2.47×10^{-4}
ตะกั่ว	1.88	1.85	1.27	31.17*	1.15×10^{-4}
สังกะสี	4.47	4.17	2.12	49.16*	25.1×10^{-4}
แคดเมียม	0.30	0.26	0.17	35.90	1.10×10^{-4}

*ความเข้มข้นของโลหะที่ลดลงมีความแตกต่างจากค่าความเข้มข้นเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ

ก. *Telotrochidium* sp. (BKK)

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ในอาหารเลี้ยงมีปริมาณลดลง 25.49%, 10.90%, 50.97% และ 37.98% ตามลำดับ โดยเมื่อวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างด้วยโปรแกรม SPSS และพิจารณาค่าความเชื่อมั่นที่ $P \leq 0.05$ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายทองแดงและสังกะสี ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ของ *Telotrochidium* sp. (BKK)

โลหะหนัก	ความเข้มข้น (mg/L)			เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนัก	โลหะหนักที่ลดลง (mg/100 เซลล์)
	LC ₅₀	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ทองแดง	0.32	0.34	0.25	25.49*	0.83×10^{-4}
ตะกั่ว	0.50	0.52	0.46	10.90	1.32×10^{-4}
สังกะสี	1.66	1.55	0.76	50.97*	7.41×10^{-4}
แคดเมียม	0.57	0.43	0.27	37.98	1.50×10^{-4}

*ความเข้มข้นของโลหะที่ลดลงมีความแตกต่างจากค่าความเข้มข้นเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ

ง. *Telotrochidium* sp. (RY)

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ในอาหารเลี้ยงมีปริมาณลดลง 6.15%, 31.46%, 53.89% และ 41.88% ตามลำดับ โดยเมื่อวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างด้วยโปรแกรม SPSS พิจารณา ค่าความเชื่อมั่นที่ $P \leq 0.05$ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายสังกะสีและแคดเมียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ของ *Telotrochidium* sp. (RY)

โลหะหนัก	ความเข้มข้น (mg/L)			เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนัก	โลหะหนักที่ลดลง (mg/100 เซลล์)
	LC ₅₀	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ทองแดง	10.32	9.87	9.26	6.15	4.75×10^{-4}
ตะกั่ว	0.50	0.42	0.29	31.46	1.19×10^{-4}
สังกะสี	1.25	1.20	0.55	53.89*	5.13×10^{-4}
แคดเมียม	0.36	0.39	0.23	41.88*	1.40×10^{-4}

*ความเข้มข้นของโลหะที่ลดลงมีความแตกต่างจากค่าความเข้มข้นเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ

ก. *T. pyriformis*

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ในอาหารเลี้ยงมีปริมาณลดลง 30.04%, 29.50%, 35.88% และ 24.44% ตามลำดับ โดยเมื่อวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างด้วยโปรแกรม SPSS พิจารณาค่าความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง และสังกะสีลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ความเข้มข้นของสารละลายทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม เมื่อเริ่มต้นการทดลอง, ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนัก ทั้ง 4 ชนิด ของ *T. pyriformis*

โลหะหนัก	ความเข้มข้น (mg/L)			เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนัก	โลหะหนักที่ลดลง (mg/100 เซลล์)
	LC ₅₀	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ทองแดง	0.82	0.81	0.57	30.04*	1.21×10^{-4}
ตะกั่ว	2.62	2.52	1.78	29.50	0.21×10^{-4}
สังกะสี	19.77	17.96	11.52	35.88*	31.9×10^{-4}
แคดเมียม	0.16	0.15	0.11	24.44	0.20×10^{-4}

*ความเข้มข้นของโลหะที่ลดลงมีความแตกต่างจากค่าความเข้มข้นเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ

จากการเก็บตัวอย่างน้ำในพื้นที่ศึกษา 4 แห่ง สามารถคัดแยกซิลิเอตได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bresslauides* sp. จากคลองบริเวณหน้าตึกฟุตบอล หอพักนิสิตหญิงจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, *P. multimicronucleatum* จากบ่อเก็บน้ำหลังการบำบัดของโรงงานยางพารา, *Telotrochidium* sp. (BKK) จากบ่อรวมน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำสี่พระยา, *Telotrochidium* sp. (RY) และ *T. pyriformis* จากบ่อน้ำทิ้งที่บำบัดแล้วของบริษัท ไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) เมื่อนำซิลิเอตที่คัดแยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนัก พบว่า แคดเมียมมีความเป็นพิษต่อซิลิเอตสูงที่สุด รองลงมาคือ ทองแดง ตะกั่ว และสังกะสี ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงความไวของซิลิเอตแต่ละสายพันธุ์ต่อความเป็นพิษของโลหะหนัก พบว่า *Telotrochidium* sp. (BKK) มีความไวต่อความเป็นพิษของทองแดงมากที่สุด ในขณะที่ *Telotrochidium* sp. (RY) มีความไวต่อความเป็นพิษของตะกั่วและสังกะสีมากที่สุด และ *Bresslauides* sp. มีความไวต่อความเป็นพิษของแคดเมียมมากที่สุด ด้วยความไวหรือการตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อความเป็นพิษของโลหะหนักนี้เอง ทำให้ซิลิเอตเป็นอีกหนึ่งตัวเลือกที่สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพได้เช่นเดียวกับจุลชีพกลุ่มอื่น ๆ เช่น แบคทีเรีย, เห็ดรา และ โพรโทซัว (Gammoudi et al., 2010; Madoni and Romeo, 2006; Wang et al., 2008)

ในทางกลับกันเมื่อพิจารณาถึงความทนของซิลิเอตต่อความเป็นพิษของทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม พบว่าซิลิเอตที่มีความทนต่อโลหะข้างต้นมากที่สุดคือ *Telotrochidium* sp. (RY), *Bresslauides* sp., *T. pyriformis* และ *Telotrochidium* sp. (BKK) ตามลำดับ เนื่องจากซิลิเอตบางกลุ่มบางชนิดสามารถดูดซับและนำโลหะหนักเข้าไปเก็บสะสมไว้ในเซลล์ (Rehman, Shakoori, and Shakoori, 2008) จึงสามารถนำศักยภาพของซิลิเอตนี้มาใช้ในการกำจัดโลหะหนักได้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ซิลิเอตที่สามารถกำจัดทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ได้สูงที่สุด คือ *T. pyriformis* (30.04%), *P. multimicronucleatum* (31.17%) และ *Telotrochidium* sp. (RY) (กำจัดสังกะสีได้ 53.89% และกำจัดแคดเมียมได้ 41.88%) ตามลำดับ การกำจัดโลหะหนักโดยใช้จุลชีพ เป็นส่วนหนึ่งในการบำบัดทางชีวภาพซึ่งเริ่มเป็นที่สนใจอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากจุลชีพมีขนาดเล็ก จึงมีพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับโลหะซึ่งเปื้อนปนอยู่ในสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นได้มาก อีกทั้งยังมีต้นทุนที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่น กอปรกับวิธีการบำบัดแบบนี้ยังไม่เป็นการทำลายหรือก่อให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Rehman et al., 2008)

การทดสอบความเป็นพิษของโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ต่อเซลล์ซิลิเกต

จากการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเกต พบว่าโลหะหนักมีความเป็นพิษต่อซิลิเกตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะหนักรวมทั้งชนิดของซิลิเกต ความเป็นพิษสูงสามารถแสดงโดยค่า LC_{50} ที่ต่ำ โดยซิลิเกตที่มีค่า LC_{50} ต่ำแสดงว่ามีความไวต่อความเป็นพิษของโลหะหนักชนิดนั้น ๆ สูง *P. multimicronucleatum* และ *T. pyriformis* มีความไวต่อความเป็นพิษของโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด เหมือนกัน คือ แคดเมียม > ทองแดง > ตะกั่ว > สังกะสี เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Martín-González และคณะ (2006) ซึ่งพบว่าแคดเมียมมีความเป็นพิษมากกว่าทองแดงและสังกะสี เมื่อทดสอบกับซิลิเกต 3 ชนิด ได้แก่ *D. revoluta*, *Euplotes* sp. และ *U. nigricans* นอกจากนี้ลำดับความเป็นพิษของโลหะหนักต่อ *Bresslauides* sp. ยังมีรูปแบบคล้ายคลึงกัน โดยแคดเมียมมีความเป็นพิษสูงที่สุดรองลงมาคือ ทองแดง สังกะสี และตะกั่วตามลำดับ สำหรับความเป็นพิษของสังกะสีและตะกั่วนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของซิลิเกตที่ใช้ทดสอบ Madoni และคณะ (1996) พบว่า สังกะสีมีความเป็นพิษมากกว่าตะกั่วเมื่อทดสอบโลหะทั้งสองกับ *C. uncinata* และ *T. minuta* อย่างไรก็ตาม นอกจากชนิดของซิลิเกตที่ตอบสนองต่อความเป็นพิษของโลหะหนักแตกต่างกันแล้ว ยังมีปัจจัยในเรื่องของสภาวะแวดล้อมที่คัดแยกซิลิเกตร่วมด้วย Madoni (1992, 1994) รายงานว่าทองแดงมีความเป็นพิษสูงกว่าแคดเมียมเมื่อทดสอบกับ *U. nigricans* ที่คัดแยกจากโรงบำบัดน้ำเสียในประเทศอิตาลี ต่างจาก *U. nigricans* ที่คัดแยกจากโรงบำบัดน้ำเสียในประเทศสเปน ในงานวิจัยของ Martín-González และคณะ (2006) ซึ่งพบว่าแคดเมียมมีความเป็นพิษสูงกว่าทองแดง ในการศึกษครั้งนี้ได้มีการคัดแยก *Telotrochidium* จาก 2 พื้นที่ ได้แก่ จากโรงควบคุมคุณภาพน้ำสีพระยา กรุงเทพมหานคร และจากบริษัทไออาร์พีซี จำกัด (มหาชน) จังหวัดระยอง *Telotrochidium* ที่แยกจากทั้งสองพื้นที่มีการตอบสนองต่อความเป็นพิษของโลหะหนักต่างกันอย่างสิ้นเชิง กล่าวคือ *Telotrochidium* sp. (BKK) มีความไวต่อความเป็นพิษของทองแดงมากที่สุด รองลงมาคือ ตะกั่ว, แคดเมียม และสังกะสี ตามลำดับ โดยลำดับความเป็นพิษของสามโลหะแรกในลักษณะนี้ได้มีการรายงานไว้ในการทดสอบโลหะทั้งสามต่อ *C. colpoda*, *D. granulosa*, *E. aediculatus*, *E. moebiusi* และ *U. nigricans* (Madoni et al., 1992, 1994; Madoni and Romeo, 2006) ในขณะที่ *Telotrochidium* sp. (RY) มีความไวต่อแคดเมียมมากที่สุด รองลงมาคือตะกั่ว, สังกะสี และทองแดง ตามลำดับ

การศึกษานี้ได้รายงานความเป็นพิษของมีโลหะหนักต่อ *Bresslauides* sp. เป็นครั้งแรก โดยแคดเมียมมีความเป็นพิษต่อ *Bresslauides* sp. มากที่สุด ($LC_{50} = 0.09$ mg/l) และมีความไวต่อความเป็นพิษของโลหะชนิดนี้สูงเป็นอันดับสามรองจาก *H. grandinella* (0.07 mg/l) และ *Uronema* sp. (0.08 mg/l) ตามลำดับ (ตรีประภา เครือบคณโท, 2553; Madoni and Romeo,

2006) *Bresslauides* sp. มีความไวต่อความเป็นพิษของแคดเมียมและทองแดง (1.91 mg/l) สูงที่สุดในกลุ่มของซิลิเกตในสกุลใกล้เคียงที่เคยมีการรายงาน (Díaz et al., 2006; Forge et al., 1993; Rico et al., 2009) นอกจากนี้เมื่อเทียบกับซิลิเกตชนิดอื่นที่มีผู้ศึกษาไว้ (ตารางที่ 14) *Bresslauides* sp. ที่คัดแยกได้นี้ยังสามารถทนต่อความเป็นพิษของตะกั่วได้ดี (10.03 mg/l) โดยมีเพียง *U. marinum* (45 mg/l) และ *S. pustulata* (36.24 mg/l) ที่สามารถทนต่อความเป็นพิษของตะกั่วได้มากกว่า (วรรณภา คมมาก, 2553; Parker, 1979) *Bresslauides* sp. มีความทนต่อตะกั่วเป็นอันดับสองรองจาก *S. Pustulata* ในบรรดาซิลิเกตน้ำจืดที่มีรายงานไว้ทั้งหมด เนื่องจาก *U. marinum* เป็นซิลิเกตสายพันธุ์น้ำเค็ม และมีผู้รายงานไว้ว่าโดยทั่วไปแล้วซิลิเกตน้ำเค็มจะสามารถทนต่อความเป็นพิษของโลหะหนักได้ดีกว่าซิลิเกตน้ำจืด อย่างไรก็ตาม ซิลิเกตในสกุล *Colpoda* ซึ่งอยู่ในชั้น Colpodea ร่วมกับ *Bresslauides* sp. มีการตอบสนองต่อความเป็นพิษของสังกะสีแตกต่างกันอย่างมาก โดย *C. steinii* ที่คัดแยกโดย Forge และคณะ (1993) มีค่า LC₅₀ ของโลหะชนิดนี้ต่ำสุดเพียง 0.85 mg/l ในขณะที่ *C. steinii* ซึ่งคัดแยกโดย Díaz และคณะ (2006) มีค่า LC₅₀ ของโลหะเดียวกันสูงถึง 147.4 mg/l จากการศึกษาของ Campbell และคณะ (1997) พบว่า ทองแดงและสังกะสีมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. steinii*

P. multimicronucleatum มีความไวต่อความเป็นพิษของแคดเมียมสูงที่สุดจากโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด โดยมีค่า LC₅₀ เท่ากับ 0.30 mg/l ซึ่งมีความทนต่อโลหะชนิดนี้มากกว่าสมาชิกในสกุลเดียวกัน คือ *P. caudatum* ที่มีค่า LC₅₀ ของแคดเมียมเท่ากับ 0.18 mg/l ในการศึกษาครั้งนี้ได้รายงานความเป็นพิษของสังกะสีต่อซิลิเกตสกุลนี้เป็นครั้งแรก และยังพบว่าในบรรดาโลหะทั้ง 4 ชนิดที่ได้ทำการทดสอบ *P. multimicronucleatum* มีความทนต่อพิษของสังกะสีได้ดีที่สุด (4.47 mg/l) นอกจากนี้ *P. multimicronucleatum* ยังสามารถทนต่อความเป็นพิษของทองแดง (0.85 mg/l) ได้ดีกว่า *P. caudatum* (0.02 mg/l) ซึ่งคัดแยกโดย Madoni และคณะ (1992) ถึงมากกว่า 40 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้กับซิลิเกตชนิดอื่นที่เคยมีรายงานไว้ (ตารางที่ 14) พบว่า *P. multimicronucleatum* ไม่ได้แสดงความไวหรือความทนต่อความเป็นพิษของตะกั่วที่เด่นชัด โดยมีค่า LC₅₀ เท่ากับ 1.88 mg/l ซึ่งอยู่ในช่วงค่า LC₅₀ ที่ 0.12 mg/l ของ *D. granulosa* (Madoni and Romeo, 2006) กับ ค่า LC₅₀ ที่ 45.0 mg/l ของ *U. marinum* (Parker, 1979) Bernal และ Ruvalcaba (1996) ได้ศึกษาผลของโลหะหนักที่ความเข้มข้น 100 µM ต่อ *Paramecium calkinsi* พบว่าทองแดง โคบอลต์ และนิกเกิล ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของ *P. calkinsi* ช้าลง ในขณะที่ตะกั่วมีผลในทางตรงกันข้ามโดยทำให้ *P. calkinsi* เคลื่อนที่เร็วขึ้น โดยโลหะหนักจะมีผลไปยับยั้งหรือลดการสร้าง adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ ตลอดจนใช้ในการเคลื่อนที่ของซีเลีย (Bouquignau and Gilles, 1979)

จากการศึกษาพบว่า *T. pyriformis* สามารถความทนต่อความเป็นพิษของสังกะสีได้สูงที่สุด (19.77 mg/l) ในบรรดาซิลิเอตทั้ง 5 ชนิดที่ทำการศึกษ แต่ยังคงมีความทนต่อความเป็นพิษของโลหะชนิดนี้ได้น้อยกว่า *Tetrahymena* sp. ที่คัดแยกโดย Rico และคณะ (2009) ถึงกว่า 10 เท่า (196.0 mg/l) ในทางกลับกัน *T. pyriformis* ที่คัดแยกได้มีความไวต่อความเป็นพิษของแคดเมียม (0.16 mg/l) มากกว่าซิลิเอตชนิดนี้ของ Rico และคณะ (2009) เกือบ 3 เท่า (0.52 mg/l) โดย Carter และ Cameron (1973) ได้รายงานความเป็นพิษที่สูงที่สุดของแคดเมียมไว้ เมื่อทดสอบสารประกอบโลหะหนัก 5 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม พรอท โคบอลต์ สังกะสี และตะกั่ว ต่อซิลิเอตชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตาม *T. pyriformis* ที่ใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้ไม่ได้แสดงความไวหรือความทนต่อความเป็นพิษของทองแดงและตะกั่วที่เด่นชัด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.82 mg/l และ 2.62 mg/l ตามลำดับ ซึ่งค่า LC_{50} ของโลหะทั้งสองนี้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่พบรายงานไว้ในซิลิเอตชนิดอื่น (ตารางที่ 14) Nicolau และคณะ (1999) รายงานว่า ทองแดงและสังกะสีมีผลยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของ *T. pyriformis* เมื่อทดสอบในสารละลายคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 200 mg/l และสารละลายซิงค์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 120 mg/l ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นสารประกอบเลดอะซิเตตที่ความเข้มข้น 4mM ส่งผลทำให้ซิลิเอตสกุลนี้มีการสร้างแควิวโอลอาหารลดลงและหยุดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Nilsson, 1979) นอกจากนี้ในการศึกษาถึงผลกระทบของโลหะหนักต่อ *Tetrahymena* ชนิดอื่น พบว่า โลหะหนักยังส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase และยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ *Tetrahymena geleii* (Seaman and Houlihan, 1951)

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ได้รายงานความเป็นพิษของสังกะสีต่อ *Telotrochidium* sp. รวมถึงเปรียบเทียบความไวและความทนต่อความเป็นพิษของโลหะหนักต่อ *Telotrochidium* sp. ที่คัดแยกออกมาจาก 2 พื้นที่เป็นครั้งแรก โดย *Telotrochidium* sp. เป็นซิลิเอตที่พบได้ทั่วไปในระบบบำบัดน้ำเสีย (Serrano et al., 2008) จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Telotrochidium* ซึ่งคัดแยกจากพื้นที่ศึกษาสองแห่ง พบว่า *Telotrochidium* ทั้งสองชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 13 คู่เบส แต่จากสภาวะแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกัน ทำให้ซิลิเอตทั้งสองมีการปรับตัวและตอบสนองต่อความเป็นพิษของโลหะหนักแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดย *Telotrochidium* sp. (BKK) มีความไวต่อความเป็นพิษของทองแดงสูงที่สุด (0.32 mg/l) จากซิลิเอตทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ นอกจากนี้ *Telotrochidium* sp. (BKK) ยังสามารถทนต่อความเป็นพิษของแคดเมียมได้มากที่สุด ในบรรดาซิลิเอตที่ถูกทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.57 mg/l ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับซิลิเอตสกุล *Opercularia* และ *Vorticella* (Madoni et al., 1996) ซึ่งเป็นซิลิเอตในกลุ่ม Peritrichia เช่นเดียวกัน พบว่า *Telotrochidium* sp. (BKK) มีความไวต่อพิษของตะกั่วสูงที่สุด (0.50 mg/l) และมีความไวต่อพิษของสังกะสี (1.66 mg/l) รองจาก *V. octava* (0.57 mg/l) และ *Telotrochidium* sp. (RY) (1.25 mg/l) เท่านั้น จาก

การศึกษาของ Sartory และ Lloyd (1976) ถึงผลของปรอท ตะกั่ว และสังกะสี ต่อซิลิเอต *Vorticella convallaria* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Peritrichia ชนิดที่มีก้านยึดเกาะระหว่างเซลล์กับแหล่งที่อยู่อาศัย พบว่าเมื่อซิลิเอตได้รับความเข้มข้นของสารประกอบโลหะหนักทั้งสาม จะมีการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ โดยในช่วงแรกการเคลื่อนไหวของซีเลียจะช้าลง จำนวนและความแข็งแรงในการยึดหดของก้านเซลล์ลดลง หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มกลมและบวม จนไม่มีการเคลื่อนไหวของซีเลีย การยึดหดของก้านเซลล์หยุด และเซลล์แตกสลายไป โดยการยับยั้งหรือลดการสร้างพลังงาน ATP ภายในเซลล์ของโลหะหนักนั้น อาจส่งผลต่อกระบวนการลำเลียงสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (active transport) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงาน ATP ทำให้เซลล์ซิลิเอตไม่สามารถรักษาสมดุลของน้ำระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ได้ เป็นสาเหตุให้เซลล์แตกสลายได้มากที่สุด (Bouquignau and Gilles, 1979)

Telotrochidium sp. (RY) สามารถทนต่อความเป็นพิษของทองแดงได้สูงที่สุดที่ LC₅₀ เท่ากับ 10.32 mg/l จากซิลิเอตทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และเมื่อเปรียบเทียบกับซิลิเอตชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานมาก่อน พบว่า *Telotrochidium* sp. (RY) สามารถทนต่อความเป็นพิษของทองแดงรองจาก *C. elongata* ที่มีค่า LC₅₀ เท่ากับ 13.3 mg/l เท่านั้น (Díaz et al., 2006) ตรงข้ามกับ *Telotrochidium* sp. (BKK) ที่มีความไวต่อความเป็นพิษของทองแดงสูงที่สุด นอกจากนี้ *Telotrochidium* sp. (RY) ยังมีความไวต่อความเป็นพิษของตะกั่ว (0.50 mg/l) และสังกะสี (1.25 mg/l) สูงที่สุดในบรรดาซิลิเอตที่ได้ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยมีความไวต่อความเป็นพิษของตะกั่ว เท่ากับ *Telotrochidium* sp. (BKK) และมีความไวต่อความเป็นพิษของสังกะสีใกล้เคียงกับ *Telotrochidium* sp. (BKK) อย่างไรก็ตาม *Telotrochidium* sp. (RY) มีความไวต่อความเป็นพิษของแคดเมียมมากกว่า *Telotrochidium* sp. (BKK) อีกทั้งยังไวต่อพิษของโลหะชนิดนี้สูงที่สุดรองจาก *O. minima* (0.23 mg/l) เมื่อพิจารณาถึงซิลิเอตที่อยู่ในกลุ่ม Peritrichia ที่เคยมีรายงานข้อมูลไว้ ได้แก่ *Opercularia* (3.75-5.55 mg/l) และ *Vorticella* (3.24-3.81 mg/l) (Madoni et al., 1996)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Bresslauides* sp. ซึ่งเป็นซิลิเอตเพียงชนิดเดียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีความไวต่อพิษของโลหะหนักสูงสุดในบรรดาซิลิเอตที่ทำการศึกษา แสดงให้เห็นว่าซิลิเอตที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติสามารถตอบสนองต่อพิษของโลหะหนักได้ดีกว่าซิลิเอตที่อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำเสีย เนื่องจากซิลิเอตสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่อยู่อาศัย ดังนั้นซิลิเอตที่คัดแยกจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรม และโรงบำบัดน้ำเสียจึงมีความทนต่อพิษของโลหะหนักมากกว่า *Bresslauides* sp. ที่คัดแยกจากธรรมชาติ

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซิวลิเอตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมง หลังเริ่มทดสอบที่เคยมีรายงานและผลจากการศึกษาในครั้งนี้

สายพันธุ์ซิวลิเอต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Aspidisca cicada</i>	0.31	2.35	0.02	0.07	1.26	ND*	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Aspidisca cicada</i>	1.81	138	1.82	ND*	ND*	ND*	50	Madoni et al., 1996
<i>Aspidisca lynceus</i>	2.21	145	1.82	ND*	3.78	ND*	50	Madoni et al., 1996
<i>Blepharisma americanum</i>	1.4	ND*	0.001	0.02	ND*	ND*	ND*	Madoni et al., 1992
<i>Bresslauides sp.</i>	0.09	ND*	1.91	ND*	10.03	ND*	3.66	การศึกษาครั้งนี้
<i>Chilodonella uncinata</i>	<0.13	10.6	0.39	ND*	<1.50	ND*	<0.17	Madoni et al., 1996
<i>Colpidium colpoda</i>	0.89	108	0.05	ND*	0.23	1.19	ND*	Madoni and Romeo, 2006
<i>Colpoda inflata</i>	1.8	ND*	7.1	ND*	ND*	ND*	94.7	Diaz et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i>	0.22	ND*	0.25	ND*	ND*	0.10	0.85	Forge et al., 1993

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 14 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซีลิเอตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบที่เคยมีรายงานและผลจากการศึกษาในครั้งนี้

สายพันธุ์ซีลิเอต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Colpoda steinii</i> (Madrid, Spain)	0.5	ND*	5.5	ND*	ND*	ND*	78.7	Díaz et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i> (Rome, Italy)	4.2	ND*	8.1	ND*	ND*	ND*	33.9	Díaz et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i> (Seville, Spain)	5	ND*	5.4	ND*	ND*	ND*	147.4	Díaz et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i>	2.5	ND*	5.5	ND*	ND*	ND*	78.7	Rico et al., 2009
<i>Cyrtolophosis elongata</i>	4.4	ND*	13.3	ND*	ND*	ND*	132.3	Díaz et al., 2006
<i>Dexiostoma campylum</i>	0.2	3.29	0.01	ND*	1.1	1.05	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Dexiotricha granulosa</i>	0.3	110	0.17	ND*	0.12	1	ND*	Madoni and Romeo, 2006
<i>Drepanomonas revoluta</i>	ND*	0.05	ND*	ND*	0.88	ND*	ND*	Madoni et al., 1994
<i>Drepanomonas revoluta</i>	7.7	ND*	6.7	ND*	ND*	ND*	52.3	Martín-González et al., 2006

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 14 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซีลิเอตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบที่เคยมีรายงานและผลจากการศึกษาในครั้งนี้

สายพันธุ์ซีลิเอต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Euplotes aediculatus</i>	0.59	0.1	0.01	ND*	0.5	0.03	ND*	Madoni and Romeo, 2006
<i>Euplotes affinis</i>	0.4	2.73	0.06	0.19	2.32	ND*	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Euplotes moebiusi</i>	2.65	9.47	0.01	ND*	2.18	7.7	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Euplotes moebiusi</i>	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	1.28	ND*	Madoni, 2000
<i>Euplotes sp.</i>	2.66	38.6	1.45	ND*	<1.50	ND*	2.39	Madoni et al., 1996
<i>Euplotes sp.</i>	0.7	ND*	4.8	ND*	ND*	ND*	110.2	Martín-González et al., 2006
<i>Halteria grandinella</i>	0.07	0.1	0.01	ND*	0.12	0.61	ND*	Madoni and Romeo, 2006

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 14 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซิลิเกตตายไปครั้งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบที่เคยมีรายงานและผลจากการศึกษาในครั้งนี้

สายพันธุ์ซิลิเกต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Opercularia coarctata</i>	3.75	211	ND*	ND*	3.28	ND*	10.3	Madoni et al., 1996
<i>Opercularia minima</i>	5.55	164	ND*	ND*	5	ND*	84.7	Madoni et al., 1996
<i>Opisthonecta minima</i>	0.23	ND*	3.53	ND*	4.05	ND*	ND*	ศิริอร สดสร้อย, 2553
<i>Paramecium caudatum</i>	0.18	2.57	0.02	0.02	2.26	0.49	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Paramecium multimicro-nucleatum</i>	0.30	ND*	0.85	ND*	1.88	ND*	4.47	การศึกษาครั้งนี้
<i>Spirostomum teres</i>	0.46	3.23	0.004	ND*	1.08	0.17	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Stylonychia pustulata</i>	0.31	ND*	0.65	ND*	36.24	ND*	ND*	ตรีประภา เครือบคนโท, 2553
<i>Telotrochidium</i> sp. (BKK)	0.57	ND*	0.32	ND*	0.50	ND*	1.66	การศึกษาครั้งนี้

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 14 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซิวลิเอตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบที่เคยมีรายงานและผลจากการศึกษาในครั้งนี้

สายพันธุ์ซิวลิเอต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Telotrochidium</i> sp. (RY)	0.36	ND*	10.32	ND*	0.50	ND*	1.25	การศึกษาครั้งนี้
<i>Tetrahymena</i> sp.	0.52	ND*	3.3	ND*	ND*	ND*	196.0	Rico et al., 2009
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0.16	ND*	0.82	ND*	2.62	ND*	19.77	การศึกษาครั้งนี้
<i>Trochilia minuta</i>	0.27	9.25	0.31	ND*	<1.50	ND*	0.20	Madoni et al., 1996
<i>Uronema</i> sp.	0.08	ND*	0.32	ND*	0.76	ND*	ND*	วรรณภา คงมาก, 2553
<i>Uronema marinum</i>	ND*	ND*	ND*	ND*	45	ND*	ND*	Parker, 1979
<i>Uronema nigricans</i>	0.62	2.18	0.01	0.004	1.62	ND*	ND*	Madoni et al., 1992, 1994
<i>Uronema nigricans</i>	0.9	ND*	4.5	ND*	ND*	ND*	135.1	Martín-González et al., 2006
<i>Vorticella convallaria</i>	3.81	101	ND*	ND*	2.29	ND*	3.79	Madoni et al., 1996

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ตารางที่ 14 (ต่อ) ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ทำให้ซิลิเกตตายไปครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มทดสอบที่เคยมีรายงานและผลจากการศึกษาในครั้งนี้

สายพันธุ์ซิลิเกต	24-h LC ₅₀ (mg/l)							แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Zn	
<i>Vorticella octava</i>	3.24	80	2.05	ND*	2.81	ND*	0.57	Madoni et al., 1996

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

ชลธิศศักดิ์ ชาวปากน้ำ และคณะ (2555) ได้ทำการสำรวจปริมาณโลหะหนักในแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยพบโลหะในระดับที่ไม่เกินกว่าค่ามาตรฐาน แต่เมื่อตรวจปริมาณโลหะหนักในปลาชนิดและปลากดก กลับพบว่าปริมาณซีลีเนียม (Se) สูงกว่าค่ามาตรฐานในเนื้อปลาธรรมชาติถึง 255.06% และ 198.44% ตามลำดับ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรของปลาและสามารถถ่ายทอดไปสู่ผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการปนเปื้อนโลหะหนักในน้ำและตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน โดยพบการปนเปื้อนตะกั่ว แคดเมียม และทองแดง เกินมาตรฐานในบางพื้นที่ (สารโรจน์ เริ่มดำรง และคณะ, 2552) เพื่อรับมือและแก้ไขปัญหาผลกระทบที่เกิดจากการปนเปื้อนโลหะหนัก จึงควรมีมาตรการเพื่อการตรวจสอบในเบื้องต้น โดยสามารถนำซิลิเกตที่มีความไวต่อพิษของโลหะหนักสูงไปใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ หรือการนำซิลิเกตที่ทนต่อความเป็นพิษของโลหะหนักไปใช้ในการดูดซับสารปนเปื้อนเหล่านี้ เพื่อการบำบัดทางชีวภาพต่อไป

การทดสอบศักยภาพในการกำจัดโลหะทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม ที่ปนเปื้อนออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซิลิเกต

Rehman และคณะ (2008) ได้ทดสอบการกำจัดโลหะหนักโดยทำให้ซิลิเกตตายก่อนโดยใช้ความร้อน พบว่าซิลิเกตที่ตายแล้วไม่สามารถกำจัดโลหะหนักได้ ดังนั้นจึงต้องใช้ซิลิเกตที่ยังมีชีวิตเท่านั้นเพื่อการบำบัดทางชีวภาพ กระบวนการกำจัดโลหะหนักของซิลิเกตเกิดขึ้นโดยการดูดซับโลหะหนัก (biosorption) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์รวมถึงการสะสมภายในเซลล์และสร้างแควิวโอลหรือถุงขนาดเล็กขึ้นมาหุ้ม จากนั้นโปรตีน metallothioneins ที่อยู่ภายในเซลล์จะจับตัวกับโลหะหนัก ทำให้ความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ลดลง (Martin-González et al., 2006; Rehman et al., 2008) โดยโปรตีนชนิดนี้ถูกพบในซิลิเกตบางชนิด เช่น *Paramecium* และ *Tetrahymena* (Piccinni et al., 1999; Shuja and Shakoori, 2009) หลังการทดลองเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารที่มีการผสมสารละลายโลหะหนัก พบว่าซิลิเกตทั้ง 5 ชนิดมีความสามารถในการกำจัดโลหะหนักที่แตกต่างกัน

อีกทั้งในซิวลิเอตชนิดเดียวกันยังมีความสามารถในการกำจัดโลหะหนักแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของโลหะหนักที่ลดลงอยู่ในช่วงระหว่าง 6.15-53.89% ซิวลิเอตที่สามารถกำจัดโลหะหนักในอาหารเพาะเลี้ยงได้สูงที่สุด คือ *Telotrochidium* sp. (RY) โดยสามารถกำจัดสังกะสีออกจากอาหารเพาะเลี้ยงได้มากถึง 53.89% และยังสามารถกำจัดแคดเมียมออกจากอาหารเลี้ยงได้ 41.88% ซึ่งมากที่สุด ในซิวลิเอตทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบศักยภาพในการกำจัดสังกะสีที่ปนเปื้อนออกจากอาหารเพาะเลี้ยงกับซิวลิเอตชนิดอื่นซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสังกะสีอยู่ในช่วง 20-96% (Díaz et al., 2006; Martín-González et al., 2006) (ตารางที่ 15) พบว่า ศักยภาพในการกำจัดโลหะชนิดนี้ของ *Telotrochidium* sp. (RY) ยังมีไม่สูงมากนัก (53.89%) แต่เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การกำจัดแคดเมียม พบว่า *Telotrochidium* sp. (RY) สามารถกำจัดแคดเมียมได้ค่อนข้างดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดแคดเมียมรองลงมาจาก *D. revoluta* (79.2%), *C. steinii* (Madrid, Spain) (71.7%) และ *C. steinii* (Rome, Italy) (60%) (Díaz et al., 2006; Martín-González et al., 2006) เมื่อเปรียบเทียบกับซิวลิเอตสกุลเดียวกันแต่คัดแยกออกมาจากคนละพื้นที่ พบว่า *Telotrochidium* sp. (BKK) มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสังกะสีใกล้เคียงกับ *Telotrochidium* sp. (RY) โดยสามารถกำจัดได้ 50.97% โดย *Telotrochidium* sp. (BKK) มีความสามารถกำจัดทองแดงได้เพียงเล็กน้อย (25.49%) เมื่อเทียบกับซิวลิเอตชนิดอื่นที่เคยมีการศึกษาไว้ ได้แก่ *U. nigricans* (95%), *C. inflata* (45%) และ *C. elongata* (40%) (Díaz et al., 2006; Martín-González et al., 2006)

T. pyriformis สามารถกำจัดทองแดงได้สูงที่สุดจากซิวลิเอตทั้ง 5 ชนิดในการศึกษาครั้งนี้ถึง 30.04% นอกจากนี้ *T. pyriformis* ยังสามารถกำจัดสังกะสีได้มากที่สุด (35.88%) ในโลหะทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับซิวลิเอตชนิดอื่นที่มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดสังกะสีในช่วง 20-96% (Díaz et al., 2006; Martín-González et al., 2006) พบว่า *T. pyriformis* ยังมีศักยภาพในการกำจัดสังกะสีไม่สูงมากนัก (ตารางที่ 15)

จากซิวลิเอตทั้ง 5 ชนิด ที่ทำการศึกษา *P. multimicronucleatum* เป็นซิวลิเอตเพียงชนิดเดียวที่สามารถกำจัดตะกั่วได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอยู่ที่ 31.17% ถึงแม้ว่าปริมาณที่ผสมอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงในซิวลิเอตชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลองจะลดลงหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง แต่ปริมาณที่ลดลงนี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มชุดการทดลองควบคุม จากการสืบค้นยังไม่พบรายงานการทดสอบศักยภาพในการกำจัดตะกั่วที่เวลา 24 ชั่วโมง ของซิวลิเอตชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม Rehman และคณะ (2005, 2006) ได้ทำการทดสอบศักยภาพในการกำจัดโลหะชนิดนี้ของ *S. mytilus* และ *T. pellionella* โดยวัดผลที่เวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า *S. mytilus* สามารถกำจัดตะกั่วได้ 80%, 84% และ 88% ตามลำดับ ในขณะที่ *T. pellionella* สามารถกำจัดตะกั่วได้ 68%, 80% และ 88% ตามลำดับ (ตารางที่ 16) นอกจากนี้ *P. multimicronucleatum* ยังมี

เปอร์เซ็นต์การกำจัดทองแดงและสังกะสีได้ใกล้เคียงกับ *Telotrochidium* sp. (BKK) คือสามารถกำจัดทองแดงได้ 25.93% และสังกะสีได้ 49.16%

จากการทดลอง พบว่า *Bresslauides* sp. ไม่สามารถกำจัดโลหะหนักชนิดใดได้เลย เนื่องจากความเข้มข้นสุดท้ายของโลหะหนักหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นของโลหะหนักเมื่อเริ่มต้นการทดลอง *Bresslauides* sp. จึงเป็นซีลิเอตเพียงชนิดเดียวจากทั้ง 5 ชนิด ที่ไม่มีศักยภาพในการกำจัดโลหะหนัก อย่างไรก็ตาม การเพิ่มระยะเวลาในการทดลองอาจเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะหนักของซีลิเอตได้ Rehman และคณะ (2008) ทดลองกำจัดทองแดงโดยใช้ *E. mutabilis* และวัดผลที่เวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า *E. mutabilis* สามารถกำจัดทองแดงได้ 60%, 82% และ 95% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ *V. microstoma* ซึ่งสามารถกำจัดสังกะสีได้ 80%, 96% 98% และ 99.2% หลังเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีสังกะสีปนเปื้อนเป็นเวลา 48, 96, 144 และ 192 ชั่วโมง ตามลำดับ (Shakoori, Rehman, and Riaz, 2004) (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซีลิเอตที่เวลา 24 ชั่วโมง

สายพันธุ์ซีลิเอต	เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนัก				แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cu	Pb	Zn	
<i>Bresslauides</i> sp.	16.67**	8.76**	16.11**	29.64**	การศึกษาครั้งนี้
<i>Drepanomonas revoluta</i>	79.2	10	ND*	76.7	Martin-González et al., 2006
<i>Euplotes</i> sp. BQ3	18.5	23.6	ND*	90	Martin-González et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i> (Madrid, Spain)	41.3	12.6	ND*	79.4	Díaz et al., 2006
<i>Colpoda steinii</i> (Rome, Italy)	71.7	ND*	ND*	94	Díaz et al., 2006
	62.5	ND*	ND*	59.9	
	60	14	ND*	47	Díaz et al., 2006
	56	7.6	ND*	88	

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

**ความเข้มข้นสุดท้ายของโลหะหนักที่ลดลงหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นของโลหะหนักเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

ตารางที่ 15 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซีลิเอตที่เวลา 24 ชั่วโมง

สายพันธุ์ซีลิเอต	เปอร์เซ็นต์การกำจัดโลหะหนัก				แหล่งอ้างอิง
	Cd	Cu	Pb	Zn	
<i>Colpoda steinii</i> (Seville, Spain)	40 70	35 23.9	ND* ND*	96 96	Díaz et al., 2006
<i>Colpoda inflata</i>	10 70 ND*	45 34 ND*	ND* ND* ND*	20 80 80	Díaz et al., 2006
<i>Cyrtolophosis elongata</i>	24 40	24 40	ND* ND*	89 70.3	Díaz et al., 2006
<i>Paramecium multimicro-nucleatum</i>	35.90**	25.93	31.17	49.16	การศึกษาครั้งนี้
<i>Telotrochidium</i> sp. (BKK)	37.98**	25.49	10.90**	50.97	การศึกษาครั้งนี้
<i>Telotrochidium</i> sp. (RY)	41.88	6.15**	31.75**	53.89	การศึกษาครั้งนี้
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	24.44**	30.04	29.50**	35.88	การศึกษาครั้งนี้
<i>Uronema nigricans</i>	24 37	95 ND*	ND* ND*	77 77	Martin-González et al., 2006

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

**ความเข้มข้นสุดท้ายของโลหะหนักที่ลดลงหลังการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นของโลหะหนักเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

ตารางที่ 16 เปอร์เซนต์การกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยงของซิลิเอดที่ระยะเวลาต่าง ๆ

สายพันธุ์ซิลิเอด	เปอร์เซนต์การกำจัดโลหะหนัก				แหล่งอ้างอิง
	Cu	Cr	Pb	Zn	
<i>Euplotes mutabilis</i>					Rehman et al., 2008
48 ชั่วโมง	60	ND*	ND*	ND*	
72 ชั่วโมง	82	ND*	ND*	ND*	
96 ชั่วโมง	95	ND*	ND*	ND*	
<i>Stylonychia mytilus</i>					Rehman et al., 2005
48 ชั่วโมง	ND*	52	80	ND*	
72 ชั่วโมง	ND*	76	84	ND*	
96 ชั่วโมง	ND*	80	88	ND*	
<i>Tachysoma pellionella</i>					Rehman et al., 2006
48 ชั่วโมง	ND*	77	68	ND*	
72 ชั่วโมง	ND*	85	80	ND*	
96 ชั่วโมง	ND*	92	88	ND*	
<i>Vorticella microstoma</i>					Shakoori et al., 2004
48 ชั่วโมง	ND*	36	ND*	80	
96 ชั่วโมง	ND*	40	ND*	96	
144 ชั่วโมง	ND*	45	ND*	98	
192 ชั่วโมง	ND*	48	ND*	99.2	

*ND = ไม่มีข้อมูล (no data)

สรุปผลการศึกษา

ซิลิเอดทั้ง 5 ชนิดที่คัดแยกได้มีความไวและความทนต่อความเป็นพิษของโลหะหนักแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยซิลิเอดที่มีความไวต่อพิษของทองแดง ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม มากที่สุดคือ *Telotrochidium* sp. (BKK), *Telotrochidium* sp. (RY) ต่อพิษของตะกั่ว และสังกะสี และ *Bresslauides* sp. ต่อพิษของแคดเมียม ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินของกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่กำหนดค่ามาตรฐานของปริมาณโลหะหนักที่ยอมให้มีได้ในน้ำ ดังนี้ ทองแดงอนุญาตให้มีได้ไม่เกิน 0.1 mg/l ตะกั่วอนุญาตให้มีได้ไม่เกิน 0.05 mg/l, สังกะสีมีได้ไม่เกิน 1 mg/l และแคดเมียมมีได้ไม่เกิน 0.05 หรือ 0.005 mg/l ขึ้นอยู่กับความ

กระด้างของน้ำ และ แสดงว่าซิติโอตทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความทนต่อพิษของโลหะหนักสูงกว่าค่ามาตรฐาน จึงไม่สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของคุณภาพน้ำผิวดินได้ อย่างไรก็ตาม ซิติโอตเหล่านี้มีศักยภาพในการกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยง โดย *T. pyriformis* สามารถกำจัดทองแดงได้มากที่สุด *P. multimicronucleatum* สามารถกำจัดตะกั่วได้มากที่สุด *Telotrochidium* sp. (RY) สามารถกำจัดสังกะสีและแคดเมียมได้มากที่สุด การทดสอบศักยภาพในการกำจัดโลหะหนักที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการนำซิติโอตไปใช้เพื่อการบำบัดทางชีวภาพ ในพื้นที่ที่อาจมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เพื่อการบำบัดที่ยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดสอบศักยภาพการกำจัดโลหะหนักของซิติโอตในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าซิติโอตบางชนิดสามารถกำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยงได้ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง แต่ผลการทดสอบยังไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองควบคุมเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองยังสั้นเกินไปกว่าที่ซิติโอตจะนำโลหะหนักเข้าไปสะสมภายในเซลล์ได้ ดังนั้นจึงควรเพิ่มระยะเวลาของการทดลองให้นานขึ้น ดังงานวิจัยของ Rehman และคณะ (2005, 2006, 2008) หรือ Shakoori และคณะ (2004) ที่ทำการศึกษากำจัดโลหะหนักออกจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เวลา 48 ถึง 196 ชั่วโมง เพื่อให้ซิติโอตมีช่วงเวลายาวนานพอในการกำจัดโลหะหนักได้มากขึ้น และควรดูแนวโน้มความเข้มข้นของโลหะหนักที่ลดลง ณ เวลาต่าง ๆ เมื่อทำการทดลอง นอกจากนี้อาจทำการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของโลหะหนักที่ใช้ในการทดสอบให้ต่ำกว่าค่า LC_{50} เพื่อจะได้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นช่วยในการกำจัดโลหะหนักมากเพียงพอ

จากการศึกษาความเป็นพิษของโลหะหนักต่อซิติโอต พบว่า ซิติโอตแต่ละชนิดมีความไวในการตอบสนองต่อพิษของโลหะหนักได้แตกต่างกัน โดย *Bresslauides* sp. มีความไวต่อพิษของโลหะหนักสูงสุดในบรรดาซิติโอตที่ทำการศึกษา โดยมีความไวต่อพิษของแคดเมียม ในขณะที่ *Telotrochidium* sp. (BKK) มีความไวต่อพิษของทองแดง ต่างจาก *Telotrochidium* sp. (RY) ที่มีความไวต่อพิษของตะกั่ว และสังกะสีมากที่สุด ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ซิติโอตเป็นอีกหนึ่งตัวเลือกในการใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของโลหะหนักในเบื้องต้น โดยการนำน้ำตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซิติโอตทั้ง 5 ชนิด เพาะเลี้ยงอยู่ จากนั้นจึงตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของซิติโอต โดยเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของซิติโอตแต่ละชนิดที่ต่างกันจะแสดงถึงชนิดและปริมาณของโลหะหนักที่ปนเปื้อน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษา

เพิ่มเติมถึงการใช้ซิลิเกตทั้ง 5 ชนิดร่วมกัน เพื่อให้ผลการตรวจสอบมีประสิทธิภาพถูกต้องแม่นยำมากที่สุด



รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- โชคชัย ยะชูศรี. 2535. พิษรอนเจียบปล้นของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ในสภาพสารละลาย
เดี่ยวต่อไร่น้ำแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สหสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- กมลพรรณ ไชยทอง. 2552. ประสิทธิภาพของสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulya intestinalis*) ในการดูดซับโลหะ
หนักในระบบการเลี้ยงกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, วิทยาศาสตร์การประมง
กรุงเทพมหานคร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนิษฐ พานชูวงศ์. 2550. ปรอท ตะกั่ว สารหนูโลหะหนักภัยใกล้ตัว, นิตยสารหมอชาวบ้าน 334
- จันทนา ตั้งอารมณ์สุข. 2544. การดูดซับแคดเมียมโดยใช้แบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต
วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ชลธิศักดิ์ ชาวปากน้ำ, จงกล บุญงาม, และ สิริทิพย์ พลละเจริญ. 2555. โลหะหนักในแม่น้ำบางปะกง
สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ตรีประภา เครือบคนโท. 2553. ความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์สกุติโคซิลิเอตที่สกัดแยกจาก
คลองผดุงกรุงเกษม กรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ชีววิทยา จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.
- ทินพันธุ์ เนตรแพ. 2552. การสะสมทางชีวภาพและการทำลายดีเอ็นเอที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ทองแดง
และตะกั่วใน หอยทราเย (*Corbicula* sp.) จากบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ประเทศไทย.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พจนีย์ โลมรัตน์, สุรวดี จิตรประเสริฐ, นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์, อมรรัตน์ พรหมบุญ, และ ญัฐกานต์
นิตยพัทธ์. 2549. การกำจัดสีย้อมและโลหะหนักที่ใช้ในการย้อมผ้าไหมโดย *Pleurotus*
ostreatus. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขา
วิศวกรรมศาสตร์ สาขาสถาปัตยกรรมศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 683-690.
- ลำไย ณีรัตน์พันธุ์. 2552. การสะสมและสภาพพิษของโลหะหนักที่มีต่อหอยที่กินได้จากพื้นที่ชุ่มน้ำ
บึงโจด จังหวัดขอนแก่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- วรรณภา คงมาก. 2553. ความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์สดีโคทริคซิลิเอตที่สกัดจากคลองผดุงกรุงเกษม กรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต, ชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศิริอร สดสร้อย. 2553. ความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเอต *Opisthonecta* sp. ที่สกัดแยกจากโรงควบคุมคุณภาพน้ำสีพระยา กรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต, ชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศิริรัตน์ เดชมนต์. 2555. การบำบัดตะกั่วในน้ำทิ้งจากการฟอกย้อมสีสังเคราะห์เคมีโดย *Aspergillus terreus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สาโรจน์ เริ่มดำริห์, สาวิตรี แก้วเรียส, และ เกริก วงศ์สอนธรรม. 2552. การปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำและตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 221-228.
- อากาศรี ชัยกุล. 2528. พิษของโลหะหนักบางชนิดต่อสารพันธุกรรมในเอมบริโอไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

- Bernal, J., and Ruvalcaba, S. 1996. Pharmacological prevention of acute lead poisoning in *Paramecium*. Toxicology 108: 165-173.
- Bouquegnau, J.M., and Gilles, R. 1979. Osmoregulation and pollution of aquatic medium. Metabolism of osmoregulation in animals, pp. 563-580. New York.
- Campbell, C.D., Warren, A., Cameron, C.M., and Hope S. J. 1997. Direct toxicity assessment of two soils amended with sewage sludge contaminated with heavy metals using a protozoan (*Colpoda steinii*) bioassay. Chemosphere 34: 501-514.
- Carter, J.W., and Cameron I. L. 1973. Toxicity bioassay of heavy metals in water using *Tetrahymena pyriformis*. Water Res 7: 951-961.
- Chantangsi, C., Esson, H.J., and Leander, B.S. 2008. Morphology and molecular phylogeny of a marine interstitial tetraflagellate with putative endosymbionts: *Auranticordis quadrivirberis* n. gen. et sp. (Cercozoa). BMC Microbiol 8: 123.

- Chantangsi, C., and Leander, B.S. 2010. An SSU rDNA barcoding approach to the diversity of marine interstitial cercozoans, including descriptions of four novel genera and nine novel species. Int J Syst Evol Microbiol 60: 1962-1977.
- Dean, J.G., Bosqui, F.L., and Lanouette, K.H. 1972. Removing heavy metals from wastewater. Environ Sci Technol 6: 518-524.
- Dessen, P., et al. 2001. *Paramecium* genome survey: a pilot project. Trends Genet 17: 306-308.
- Díaz, S., Martín-González, A., and Gutiérrez, J.C. 2006. Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. Environ Int 32: 711-717.
- Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.D.C., and Ekwurugwu, J.N. 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. Int J Phys Sci 2: 112-118.
- Forge, T.A., Berrow, M.L., Darbyshire, J.F., and Warren, A. 1993. Protozoan bioassays of soil amended with sewage sludge and heavy metals, using the common soil ciliate *Colpoda steinii*. Biol Fertil Soils 16: 282-286.
- Fosmire, G.J. 1990. Zinc toxicity. Am J Clin Nutr 51: 225-227.
- Gadd, M.G. 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. Cell Mol Life Sci 51: 225-227.
- Gammoudi, I., et al. 2010. Love-wave bacteria-based sensor for the detection of heavy metal toxicity in liquid medium. Biosens Bioelectron 26: 1723-1726.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. Syst Biol 59: 307-321.
- Gutiérrez, J.C., Amaro, F., Díaz, S., Francisco, P., Cubas, L.L., and Martín-González, A. 2011. Ciliate metallothioneins: unique microbial eukaryotic heavy-metal-binder molecules. J Biol Inorg Chem 16: 1025-1034.
- Gutiérrez, J.C., Amaro, F., and Martín-González, A. 2009. From heavy metal-binders to biosensors: ciliate metallothioneins discussed. Bioessays 31: 805-816.
- Gutiérrez, J.C., Martín-González, A., Díaz, S., and Ortega, R. 2003. Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. Europ J Protistol 39: 461-467.

- Henkel, G., and Krebs, B. 2004. Metallothioneins: zinc, cadmium, mercury, and copper thiolates and selenolates mimicking protein active site features--structural aspects and biological implications. Chem Rev 104: 801-824.
- Hickey, R.F., Vanderwielen, J., and Switzenbaum, M.S. 1989. The effect of heavy metals on methane production and hydrogen and carbon monoxide levels during batch anaerobic sludge digestion. Water Res 23: 267-273.
- Jiang, Y., Xu, H., Hu, X., Zhu, M., Al-Rasheid, K.A., and Warren, A. 2011. An approach to analyzing spatial patterns of planktonic ciliate communities for monitoring water quality in Jiaozhou Bay, northern China. Mar Pollut Bull 62: 227-235.
- Kasuya, M., et al. 1992. Water pollution by cadmium and the onset of itai-itai disease. Water Sci Technol 25: 149-156.
- Katoh, K., and Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol 30: 772-780.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16: 111-120.
- Kong, I.C., Bitton, G., Koopman, B., and Jung, K.H. 1995. Heavy metal toxicity testing in environmental samples. Rev Environ Contam Toxicol 142: 119-147.
- Kumar, U. 2006. Agricultural products and by-products as a low cost adsorbent for heavy metal removal from water and wastewater: A review. Sci Res Essays 1: 33-37.
- Lee, S., Basu, S., Tyler, C.W., and Wei, I.W. 2004. Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. Adv Environ Res 8: 371-378.
- Lynn, D.H. 2008. The ciliated protozoa: Characterization, classification, and guide to the literature. 3rd. New York: Springer.
- Madoni, P. 1993. Ciliated protozoa and water quality in the Parma River (Northern Italy): Long-term changes in the community structure. Hydrobiologia 264: 129-135.

- Madoni, P. 2005. Ciliated protozoan communities and saprobic evaluation of water quality in the hilly zone of some tributaries of the Po River (Northern Italy). Hydrobiologia 264: 129-135.
- Madoni, P., Davoli, D., and Gorbi, G. 1994. Acute toxicity of lead, chromium, and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants. Bull Environ Contam Toxicol 53: 420-425.
- Madoni, P., Davoli, D., Gorbi, G., and Vescovi, L. 1996. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. Water Res 30: 108-118.
- Madoni, P., Esteban, G., and Gorbi, G. 1992. Acute toxicity of cadmium, copper, mercury, and zinc to ciliates from activated sludge plants. Bull Environ Contam Toxicol 49: 900-905.
- Madoni, P., and Romeo, M.G. 2006. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. Environ Pollut 141: 1-7.
- Martín-González, A., Díaz, S., Borniquel, S., Gallego, A., and Gutiérrez, J.C. 2006. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. Res Microbiol 157: 108-118.
- Nicolau, A., Mota, M., and Lima, N. 1999. Physiological responses of *Tetrahymena pyriformis* to copper, zinc, cycloheximide and Triton X-100. FEMS Microbiol Ecol 30: 209-216.
- Nilsson, J.R. 1979. Phagotrophy in *Tetrahymena*. In M. Levandowsky and S.H. Hutner (ed.), Biochemistry and physiology of protozoa, pp. 339-379. New York: Academic Press.
- Nriagu, J.O., and Pacyna, J.M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature 333: 134-139.
- Parker, J.G. 1979. Toxic effects of heavy metals upon cultures of *Uronema marinum* (Ciliophora: Uronematidae). Mar Biol 54: 17-24.
- Piccinni, E., Bertaggia, D., Santovito, G., Miceli, C., and Kraev, A. 1999. Cadmium metallothionein gene of *Tetrahymena pyriformis*. Gene 234: 51-59.
- Rehman, A., Ashraf, S., Qazi, J.I., and Shakoori, A.R. 2005. Uptake of lead by a ciliate, *Stylonychia mytilus*, isolated from industrial effluents: potential use in bioremediation of wastewater. Bull Environ Contam Toxicol 75: 290-296.

- Rehman, A., Shakoori, F.R., and Shakoori, A.R. 2006. Uptake of heavy metals by a ciliate, *Tachysoma pellionella*, isolated from industrial effluents and its potential use in bioremediation of toxic wastewater. Bull Environ Contam Toxicol 77: 469-476.
- Rehman, A., Shakoori, F.R., and Shakoori, A.R. 2008. Heavy metal resistant freshwater ciliate, *Euplotes mutabilis*, isolated from industrial effluents has potential to decontaminate wastewater of toxic metals. Bioresour Technol 99: 3890-3895.
- Rico, D., Martín-González, A., Díaz, S., Lucas, P., and Gutiérrez, J.C. 2009. Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 149: 90-96.
- Sartory, D.P., and Lloyd, B.J. 1976. The toxic effects of selected heavy metals on unadapted populations of *Vorticella convallaria* vat. *similis*. Water Res 10.
- Seaman, G.R., and Houlihan, R.K. 1951. Enzyme systems in *Tetrahymena geleii* S. II. Acetylcholinesterase activity; its relation to motility of the organism and to coordinated ciliary action in general. J Cell Physiol 37: 309-321.
- Serrano, S., Arregui, L., Perez-Uz, B., Calvo, P., and Guinea, A. 2008. Guidelines for the identification of ciliates in wastewater treatment plants. London: IWA.
- Shakoori, A.R., Rehman, A., and Riaz ul, H. 2004. Multiple metal resistance in the ciliate protozoan, *Vorticella microstoma*, isolated from industrial effluents and its potential in bioremediation of toxic wastes. Bull Environ Contam Toxicol 72: 1046-1051.
- Shuja, R.N., and Shakoori, A.R. 2009. Identification and cloning of first cadmium metallothionein like gene from locally isolated ciliate, *Paramecium* sp. Mol Biol Rep 36: 549-560.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol 30: 2725-2729.
- Turkewitz, A.P., Orias, E., and Kapler, G. 2002. Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. Trends Genet 18: 35-40.

- Wang, H., Wang, X.J., Zhao, J.F., and Chen, L. 2008. Toxicity assessment of heavy metals and organic compounds using CellSense biosensor with *E.coli*. Chin Chem Let 19: 211-214.
- Yan, G., and Viraraghavan, T. 2003. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. Water Res 37: 4486-4496.
- Yanagisawa, H., Sato, M., Nodera, M., and Wada, O. 2004. Excessive zinc intake elevates systemic blood pressure levels in normotensive rats--potential role of superoxide-induced oxidative stress. J Hypertens 22: 543-550.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศุภลิสณี ผุดผ่อง เกิดวันที่ 7 ตุลาคม พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดระยอง สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทบัณฑิต ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2554

ได้รับทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 23 ครั้งที่ 1/2557

