



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลกระทบของโลหะหนักที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของ
สาบเสือด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์

Effect of Heavy Metal Contaminated Rhizosphere of *Chromolaena odorata* (L.) on
Microbial Community Structure Using Metagenomics

นามผู้วิจัย นางสาวชนยาภรณ์ เรืองเดช

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์กรณีการ์ ตั้จจาพันธ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ศรีลักษณ์ จิตรอักษร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรัตน์ บัวเลิศ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลกระทบของโลหะหนักที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ
ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์

Effect of Heavy Metal Contaminated Rhizosphere of *Chromolaena odorata* (L.) on Microbial
Community Structure Using Metagenomics

โดย

นางสาวรัชยาภรณ์ เรืองเดช

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

พ.ศ. 2557

ชั้นยากรณี เรื่องเลข 2557: ผลกระทบของโลหะหนักที่มีผลต่อโครงสร้างประชากร
จุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ภาควิชา
วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์
กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, Ph.D. 99 หน้า

การศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสีที่ปนเปื้อนดินต่อโครงสร้างประชากรของ
จุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์โดยใช้วิธีเมตาจีโนมิกส์ โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์ 12
ตัวอย่าง จากตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก มาวิเคราะห์โครงสร้างประชากร
จุลินทรีย์โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง V6 hypervariable ของยีน 16S rDNA และ
วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Illumina sequencing พบว่า สามารถจำแนกจุลินทรีย์ได้ 54,026 OTUs
โดยพบแบคทีเรีย 99.74% อาร์เคีย 0.26% และ 0.0001% ไม่สามารถจำแนกได้ และยังพบไฟลัมที่มี
ลักษณะเด่น 5 ไฟลัม ที่มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดคือ *Proteobacteria* *Actinobacteria*
Acidobacteria *Fimicutes* และ *Bacteroidetes* ซึ่งใน 5 ไฟลัมนี้มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 89.17%
จากนั้นทำการวิเคราะห์ดัชนีความหลากหลายทางชีวภาพด้วย ค่า Nonparametric Shannon และ
Shannon diversity index แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของแบคทีเรียในดินที่มีแคดเมียม
ปนเปื้อนในระดับต่ำ (0.1-9.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีมากกว่าความหลากหลายของแบคทีเรียในดิน
ที่มีแคดเมียมปนเปื้อนในระดับสูง (72.9-898.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การ
วิเคราะห์การแพร่กระจายและความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสี ด้วย
วิธีการ MICs พบว่า จากแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกมาศึกษาทั้งหมด 1,152 ไอโซเลต มีแบคทีเรียที่
สามารถต้านทานแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 320 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 26.7 และพบ
แบคทีเรียสามารถต้านทานสังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 3,200 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 2.3
และพบว่าความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีลดลงเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียม
และสังกะสีเพิ่มขึ้น การตรวจสอบยีนด้านทานแคดเมียมและสังกะสี *czcD*, *czcR*, *nccA*, *cadA* และ
cadB พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ไม่สามารถตรวจสอบยีนที่ด้านทานแคดเมียมและสังกะสีในกลุ่มนี้ได้

Thanyaporn Ruangdech 2014: Effect of Heavy Metal Contaminated Rhizosphere of *Chromolaena odorata* (L.) on Microbial Community Structure Using Metagenomics.
Master of Science (Environmental Science), Major Field: Environmental Science,
Department of Environmental Science. Thesis Advisor: Associate Professor
Kannika Sajjaphan, Ph.D. 99 pages.

A metagenomics approach was used to assess the impacts of cadmium and zinc contamination on rhizobacterial population of *Chromolaena odorata* (L.). Twelve rhizosphere soil samples were obtained from Phra That Pha Daeng District, Mae Sot, Tak Province. Bacterial communities were characterized using the V6 hypervariable region of the 16S rDNA gene using Illumina next-generation sequencing technology. Among 54,026 unique OTUs identified, 99.74% were classified as bacteria, 0.26% were classified as archaea and 0.0001% could not be assigned to a kingdom. At all sites, several dominant phyla were observed including *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Fimicutes* and *Bacteroidetes*. These five Phyla accounted for 89.17% of all OTUs identified among all sites, and only two OTUs could not be classified in a Phylum. Nonparametric Shannon and Shanon diversity index indicated that the low Cd contaminated soil had higher species diversity than the high Cd contaminated soil at significant level ($P < 0.05$). Bacteria resistant to Cd and Zn (a total of 96 isolates) were obtained from each sample and were used to analyze patterns of gene function by using MICs. All 1,152 MIC values of individual isolates were analyzed by using BioNumeric software. The results showed that more than 26.7% of the bacteria were resistant to cadmium at concentrations up to 320 mg/L and only 2.3% of bacteria were resistant to zinc at concentration up to 3,200 mg/L. The MICs analyses indicated that cadmium and zinc resistance decreased with increasing cadmium and zinc concentrations and those bacteria resistant to Cd and Zn at the same level of concentration may contain the same group of genes. PCR reactions were performed to identify *czcD*, *czrC*, *nccA*, *cadA* and *cadB*. However, the genes were not detected.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กรรณิการ์ สัจจาพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ซึ่งคอยให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และให้คำปรึกษาในเรื่องการเรียน การวางแผนการทดลอง ตลอดจนให้คำปรึกษาในเรื่องของการดำเนินชีวิต และเป็นแบบอย่างที่ดีของความอดทน มุ่งมั่น ในการทำงานอย่างจริงจัง ขอขอบพระคุณ ดร.ศิริลักษณ์ จิตรอักษร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำ การวางแผนการทดลองตลอดจนการแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Michael J. Sadowsky นายมนุษยศักดิ์ วงศ์พัชรชัย และสมาชิกห้องปฏิบัติการ Sadowsky Lab มหาวิทยาลัยมินเนโซต้า ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับการอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือสำหรับการทดลอง รวมถึงการให้คำปรึกษา แนะนำในเรื่องการค้นคว้าวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน บุคลากร และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง อาคารวชิราวุฒินันท์ ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาปฐพีวิทยา และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ได้อนุเคราะห์ให้ใช้อุปกรณ์ และสถานที่ขอขอบพระคุณอาจารย์วุฒิดา รัตนพิไชย นางสาวริษา คุณจตุรัส และสมาชิกห้องปฏิบัติการ จุลชีววิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในเรื่องต่างๆ และขอขอบพระคุณอาจารย์ และเพื่อนๆ คณะสิ่งแวดล้อม ที่ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาในเรื่องการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ดาวัลย์ เข้มอาจ น้องสาว และน้องชาย ที่ให้ความรักความห่วงใย และเป็นกำลังใจที่ดีที่สุดเสมอมา จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์นี้ขอมอบแด่ บพการี ครู อาจารย์ และมิตรสหายที่มีพระคุณต่อข้าพเจ้า

ธัญภรณ์ เรืองเดช

กันยายน 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	36
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
สรุป	51
ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	67
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	99

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตำแหน่งพิกัดของบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างดินใน อ.แม่สอด จ.ตาก	25
2	Reverse primers ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบยีน 16S rDNA ตำแหน่ง V6 region ของตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง	31
3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาชั้นดินดานแคดเมียมและสังกะสี	35
4	สมบัติทางเคมีและทางฟิสิกส์บางประการของดิน ปริมาณแคดเมียมและสังกะสี ในดินที่เก็บตัวอย่างจากตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก	40
5	ดัชนีชี้วัดความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแต่ละตัวอย่าง	44
ตารางผนวกที่		
1	ส่วนประกอบของอาหารแข็ง R2A	68
2	ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาดิน	70
3	ค่าการนำไฟฟ้าของดิน	71
4	มาตรฐานอินทรีย์วัตถุในดิน	71
5	ระดับความสามารถในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนของดิน	72
6	สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์ ในการศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสี ที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ <i>C. odorata</i> (L.) ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์	72
7	อุณหภูมิ ระยะเวลา และจำนวนรอบในการตั้งค่าเครื่องพีซีอาร์	73
8	สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์ ในการศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายของยีนดินดานแคดเมียมและสังกะสีในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม	73
9	อุณหภูมิ ระยะเวลา และจำนวนรอบในการตั้งค่าเครื่องพีซีอาร์	74
10	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA1	75

[illegible]

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
24 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA8	89
25 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA8 (ต่อ)	90
26 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA9	91
27 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA9 (ต่อ)	92
28 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA10	93
29 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA10 (ต่อ)	94
30 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA11	95
31 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA11 (ต่อ)	96
32 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA12	97
33 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA12 (ต่อ)	98

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไกที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโลหะหนัก และการแพร่กระจายของโลหะหนัก ในพืช non-hyperaccumulating plant และพืช hyperaccumulating plant	8
2	ลักษณะวิทยาของสาบเสือ <i>Chromolaena odorata</i> (L.)	10
3	ผู้ป่วยโรค อีไต อีไต (Itai Itai disease)	11
4	Efflux transporters ประกอบด้วย 3 กลุ่มความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการ ต้านทานโลหะหนัก	15
5	แผนที่จังหวัดตาก	24
6	อัตราร้อยละของแบคทีเรียในโพลีเมอร์ที่มีลักษณะเด่น	41
7	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน sequences (number of sequences) และ จำนวนสปีชีส์ (number of OTUs observed)	42
8	ภาพ PCoA ของโครงสร้างประชากรในแต่ละตัวอย่าง	45
9	Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมและสังกะสีของ ตัวอย่างดิน THA1-THA6	49
10	Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมและสังกะสีของ ตัวอย่างดิน THA7-THA12	50
ภาพผนวกที่		
1	ไคอะแกรมสามเหลี่ยมแสดงประเภทของเนื้อดิน (soil texture triangle) ตาม สัดส่วนโดยมวลของอนุภาคขนาดทราย (sand) อนุภาคขนาดทรายแป้ง (silt) และ และอนุภาคขนาดดินเหนียว (clay)	69

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CdCl_2	=	cadmium chloride
CEC	=	cation exchange capacity
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
EC	=	electrical conductivity
HCl	=	hydrochloric acid
HClO_4	=	perchloric acid
HNO_3	=	nitric acid
MICs	=	Minimum inhibitory Concentrations
NaCl	=	sodium chloride
NaOH	=	sodium hydroxide
NH_4OAc	=	ammonium acetate
PCoA	=	principal coordinated analysis
PCR	=	Polymerase chain reaction
R2A medium	=	Reasoner's 2A medium
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution
ZnCl_2	=	zinc chloride

ผลกระทบของโลหะหนักที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของ สาบเสือด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์

Effect of Heavy Metal Contaminated Rhizosphere of *Chromolaena odorata* (L.) on Microbial Community Structure Using Metagenomics

คำนำ

ปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมทวีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น ทั้งจากการกระทำของมนุษย์ และการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ปัญหาการปนเปื้อนของโลหะหนักแคดเมียมเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญระดับโลก ในประเทศไทยมีการปนเปื้อนแคดเมียมในสิ่งแวดล้อม เช่น ข้าว สัตว์น้ำ และน้ำที่ใช้สำหรับอุปโภคบริโภค ในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยแม่ตาบ ตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ผลกระทบที่เกิดขึ้นได้สร้างความเดือดร้อนให้กับประชาชนที่อาศัยอยู่บริเวณโดยรอบทั้งในด้าน การประกอบอาชีพ การอุปโภคบริโภค รวมทั้งวิถีชีวิตและความเป็นอยู่ต่างๆ มีนักวิชาการจากกรมวิชาการเกษตร ทำการตรวจวัดระดับสารแคดเมียมในดินและเมล็ดข้าว บริเวณอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 154 ตัวอย่าง รวมทั้งศึกษาแหล่งกำเนิดของสารแคดเมียม ระหว่างปี พ.ศ. 2541-2544 พบว่า แปลงนาบริเวณ ตำบลพะเด๊ะ ซึ่งอยู่ใกล้บริเวณแหล่งแร่สังกะสีที่มีปริมาณสารแคดเมียมในดินสูงกว่าค่ามาตรฐานของ EU ถึง 1,800 เท่า มีแคดเมียมปนเปื้อนในปริมาณที่มากกว่าค่าที่พบในข้าวที่ปลูกในประเทศไทยบริเวณอื่น สูงที่สุดถึง 100 เท่า ซึ่งปริมาณสารแคดเมียมที่พบนี้มีค่าในพืชเดียวกับข้าวที่ก่อโรคอิตา อิตา ในประเทศญี่ปุ่น จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า แคดเมียมที่ปนเปื้อนอยู่ในพื้นที่ดังกล่าวส่งผลกระทบ และอันตรายต่อประชาชนบริเวณใกล้เคียง นอกจากนี้แล้วการปนเปื้อนของแคดเมียมในดินยังส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในดินอีกด้วย จากรายงานของ Wang *et al.* (2011) ทำการศึกษาผลกระทบของแคดเมียมต่อความหลากหลายทางชีวภาพของประชากรจุลินทรีย์บริเวณรากของต้นปอปลี โดยปลูกในดิน 2 ชุดดิน ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม พบว่า โครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลง โดยหากปริมาณแคดเมียมต่ำ จะเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีด และรา แต่ถ้าปริมาณแคดเมียมสูง ปริมาณแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีด และราลดลง และจากงานวิจัยของ Roane and Kellogg (1996) ได้ศึกษาลักษณะของสังคมจุลินทรีย์ในดินที่ปนเปื้อนโลหะหนักพบว่า ตะกั่ว สังกะสี และโลหะหนักอื่นๆ มีผลกระทบต่อสังคมจุลินทรีย์ ทำให้กิจกรรมภายในเซลล์ ชีวมวล

และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ลดลง และยังพบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถต้านทานตะกั่วและแคดเมียมได้ จะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของแคดเมียมส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ดิน แต่ก็ยังพบจุลินทรีย์บางชนิดที่มีความสามารถในการต้านทานแคดเมียม ดังรายงานของ Laila *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียต้านทานโลหะหนักในดินของประเทศอียิปต์ พบว่ามีแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus*) และแกรมลบ 2 ชนิด (*Pseudomonas sp.* และ *Bordetella sp.*) มีความสามารถในการต้านทานแคดเมียม และโคบอลต์ และยังพบว่าการต้านทานโลหะหนัก มีอิทธิพลมาจากกลไกการแสดงออกของยีนบางชนิด ยีนและกลไกการต้านทานโลหะหนักจะพบในพลาสมิด เช่น ยีนต้านทาน โปรท สารหนู ทองแดง แคดเมียม โครเมียม และเงิน (Silver and Ji, 1994) โดยมีการศึกษาของ Trajanovska *et al.* (1997) ทำการค้นหายีนต้านทานโลหะหนักในแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ จากพื้นที่เหมืองผลิตแบตเตอรี่พบว่า แบคทีเรียแกรมบวก (*Arthrobacter* และ *Corynebacterium*) และแกรมลบ (*Alcaligenes*) สามารถต้านทาน ตะกั่ว โปรท แคดเมียม โคบอลต์ สังกะสี ทองแดง และพบการแพร่กระจายของยีนต้านทานโปรท และทองแดง ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ นอกจากนี้ยังพบยีน *czc* (cobalt-zinc-cadmium resistance) และ *chr* (chromate resistance) อีกด้วย

การศึกษาด้านพันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่ในอดีตมุ่งเน้นศึกษาจุลินทรีย์ที่ต้องมีการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งถือได้ว่าเป็นเพียงจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ทั้งหมดในธรรมชาติ เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนั้นยังไม่สามารถศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาแนวทางใหม่ คือ เมตาจีโนมิกส์ (metagenomics) ซึ่งเป็นการศึกษาสารพันธุกรรมทั้งหมดของสังคมจุลินทรีย์ในแต่ละสิ่งแวดล้อม เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากร และวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบในความหลากหลายของระบบนิเวศ หรืออาจเรียกได้ว่าเป็นการศึกษาดิเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid) ของจุลินทรีย์ในสังคมสภาพธรรมชาติ (natural communities) โดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสีที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์ ในสาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.) ซึ่งเป็น hyperaccumulating plant ในการทดลอง รวมถึงทำการศึกษากการแพร่กระจาย และความหลากหลายของยีนต้านทานแคดเมียมและสังกะสี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสี ที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์สาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.)
2. เพื่อศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายของยีนต้านทานแคดเมียมและสังกะสี ในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม



การตรวจเอกสาร

1. แคดเมียมและสังกะสี

1.1 สมบัติทั่วไป

แคดเมียมเป็นธาตุที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ อยู่ในชั้นเปลือกโลก เป็นโลหะหนักชนิดหนึ่งที่มีลักษณะสีขาวเงินอยู่ในหมู่ IIB ของตารางธาตุ มีจุดหลอมเหลว 320.9 องศาเซลเซียส จุดเดือด 769 องศาเซลเซียส แคดเมียมเป็นธาตุที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในกรดไนตริก (HNO_3) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) โดยทั่วไปไม่ค่อยพบแคดเมียมในรูปของแคดเมียมบริสุทธิ์ แต่มักพบอยู่ในรูปของสารประกอบของเกลือ เช่น แคดเมียมซัลเฟต (CdSO_4) แคดเมียมไนเตรท ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) แคดเมียมคลอไรด์ (CdCl_2) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่มีสีและละลายได้ดีในน้ำ (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2008) และยังเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงสามารถสะสมในร่างกายและสามารถถ่ายทอดทางห่วงโซ่อาหารได้ (Chi *et al.*, 2007)

สังกะสีเป็นธาตุที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ อยู่ในชั้นเปลือกโลก เป็นโลหะหนักมีลักษณะสีขาวเงินเป็นมันวาว อยู่ในหมู่ IIB ของตารางธาตุ มีจุดหลอมเหลว 419.5 องศาเซลเซียส จุดเดือด 907 องศาเซลเซียส ละลายได้ในกรดและด่างที่ร้อนจัด เป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี สังกะสีจะพบในรูปของแร่หลายชนิดคือ แร่เฮมิมอไฟต์ ($\text{Zn}_4\text{Si}_2\text{O}_7(\text{OH})_2\text{H}_2\text{O}$) แร่สมิทซอนไนต์ (ZnCO_3) แร่ซิงค์ไคต์ (ZnO) และแร่สฟาเลอไรต์ (ZnS) (ATSDR, 1995) ปกติสังกะสีเป็นธาตุที่จำเป็นต่อพืชและสัตว์รวมทั้งมนุษย์ด้วย แต่ถ้ามีปริมาณมากเกินไปก็ทำให้เกิดเป็นพิษได้

1.2 การปนเปื้อนแคดเมียมและสังกะสีในดิน

แคดเมียมเป็นธาตุหนึ่งที่พบการปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม มักพบเกิดร่วมกับแร่ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะแร่สังกะสีและตะกั่ว ดังนั้นจึงมักพบแคดเมียมปนเปื้อนจากเหมืองสังกะสีปริมาณสูง โดยมีอัตราส่วนแคดเมียมต่อสังกะสีในช่วงประมาณ 1:100 ถึง 1:1000 (ศุภมาส, 2545) การปนเปื้อนของสังกะสีในดินสามารถส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและสุขภาพของประชาชน โดยมีผลต่อผลผลิตของดิน การปนเปื้อนของน้ำใต้ดิน การยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ เป็นต้น (Olivier, 2008) สำหรับการปนเปื้อนของแคดเมียมพบว่าส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

เช่น พบการปนเปื้อนแคดเมียมในระบบการปลูกข้าวในประเทศญี่ปุ่น และจีน เนื่องจากการใช้น้ำชลประทานที่ปนเปื้อนแคดเมียมและจากการไหลบ่าผิวหน้าดินตามธรรมชาติหรือมาจากเหมืองแร่ (Kobayashi *et al.*, 2002; Nordberg, 2003) และหลายพื้นที่ในยุโรปพบว่ามียุโรปพบว่ามีระดับแคดเมียมเพิ่มสูงขึ้นบนผิวดินในบริเวณใกล้เหมืองแร่ (Vassilev *et al.*, 2002) ในประเทศไทยก็พบการปนเปื้อนแคดเมียมในจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งเป็นเหมืองตะกั่ว และในพื้นที่ลุ่มน้ำแม่ตา อำเภอมะสอ จังหวัดตาก ซึ่งใกล้กับแหล่งทำเหมืองสังกะสี เดิมพื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่ปลูกข้าว ปัจจุบันได้มีการห้ามทำการเกษตรเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของแคดเมียม (Simmons *et al.*, 2003; 2005) Simmons *et al.* (2005) รายงานว่าความเข้มข้นของสังกะสีและแคดเมียมในดินมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกในพื้นที่ลุ่มน้ำแม่ตา อำเภอมะสอ จังหวัดตาก กล่าวคือ บริเวณที่พบสังกะสีปริมาณมากก็จะพบแคดเมียมปริมาณมากตามไปด้วย ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ทั้งที่อาศัยอยู่ในดิน และบริเวณโดยรอบ และจากการศึกษาของ Phaenark *et.al.* (2009) ได้ทำการศึกษาพืชที่มีการสะสมโลหะแคดเมียมและสังกะสีทั้งหมด 5 พื้นที่เก็บตัวอย่าง ในอำเภอมะสอ จังหวัดตาก โดยทำการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของดินพบว่า ตัวอย่างดินทั้ง 5 ตัวอย่างมีการปนเปื้อนแคดเมียมทั้งหมดในปริมาณ 63.5-1,458.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีการปนเปื้อนสังกะสีทั้งหมดในปริมาณ 2,732.7-57,011.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของแคดเมียมในปริมาณที่สูงเกินค่ามาตรฐาน (37 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามประกาศของคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ปี 2547

1.3 ปฏิกิริยาในดิน

แคดเมียมในดินจะพบอยู่ร่วมกับสังกะสีเสมอ แต่ในสภาพดินเป็นกรด แคดเมียมจะมีสภาพเคลื่อนที่ดีกว่าสังกะสี และแคดเมียมมีรูปสารประกอบได้เช่นเดียวกับกลุ่มแคดไอออน Zn^{2+} Co^{2+} Ni^{2+} และ Mg^{2+} (ศุภมาส, 2545) โดยทั่วไปดินที่มีค่า pH ต่ำ แคดเมียมในดินจะละลายมากขึ้นมีโอกาสแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมมาก พืช และคณะ (2543) ศึกษาการดูดซับแคดเมียมในดินที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการดูดซับ หรือความสามารถในการต้านการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (buffering capacity) ของแคดเมียมแตกต่างกันมากในดินแต่ละตัวอย่าง โดยความสามารถในการดูดซับแคดเมียมของดิน และปริมาณแคดเมียมที่ดูดซับจะสูงขึ้นเมื่อดินมี pH อินทรีย์วัตถุ และอนุภาคดินเหนียวมากขึ้น ในการสลายตัวของหินและแร่ แคดเมียมในดินอยู่ในสภาวะละลายได้ง่าย โดยจะอยู่ในรูป Cd^{2+} เป็นส่วนใหญ่ โดยอาจอยู่ในรูปไอออนเชิงซ้อน (complex ion) และสารประกอบได้ดังนี้

แคตไอออน : CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO^{3+}

แอนไอออน : CdCl_3^- , CdCl_4^{2-} , Cd(OH)_3^- , Cd(OH)_4^{2-}

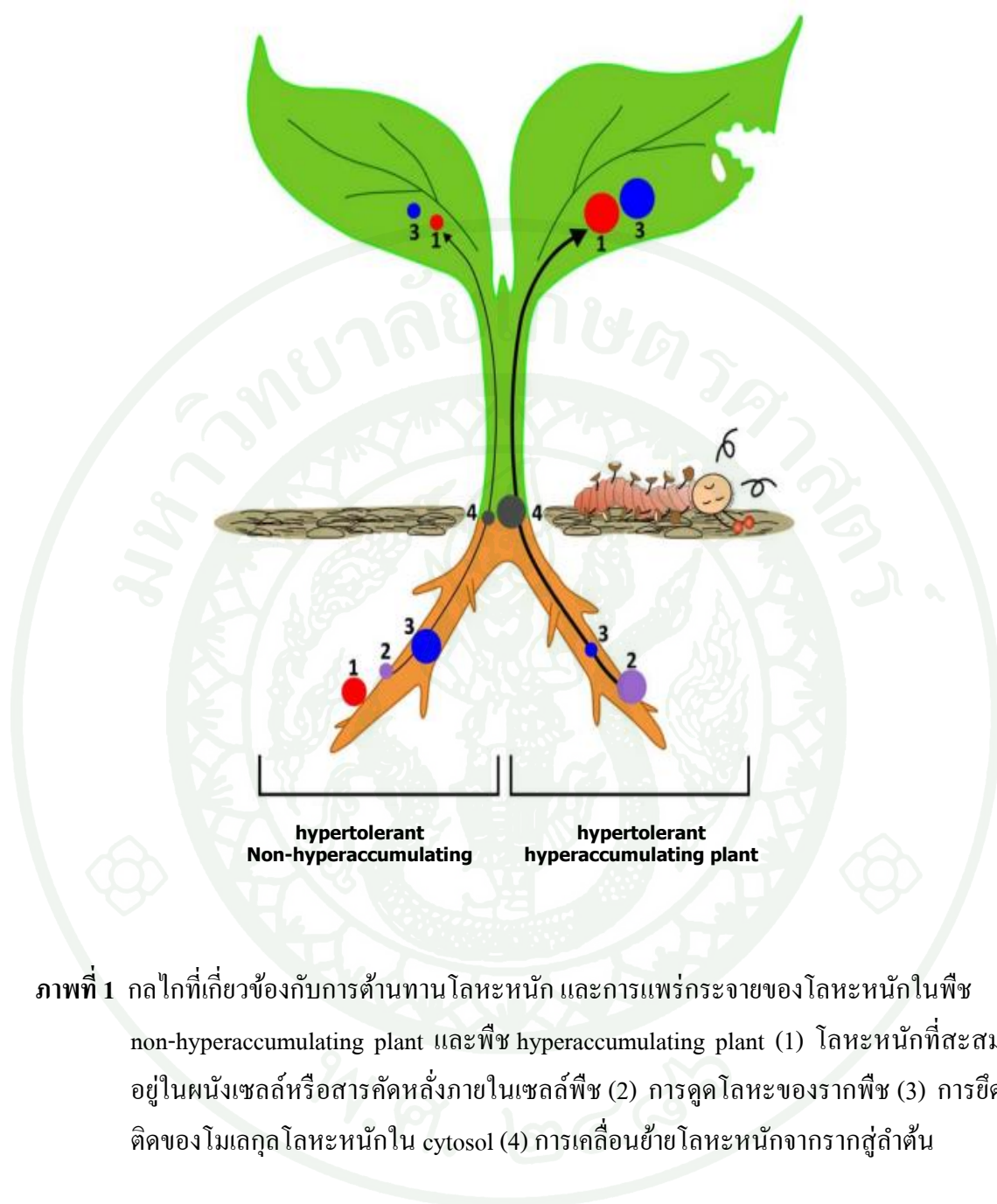
สารประกอบ : CdO , CdCO_3

2. ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ ดิน และพืช

ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด จุลินทรีย์มีชีวิตอย่างอิสระในดิน มีประโยชน์ต่อพืชเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะบทบาทในการย่อยสลาย โดยจุลินทรีย์จะช่วยให้การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินจนกลายเป็นฮิวมัส ซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของพืช และการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถตรึงไนโตรเจน ช่วยในการเจริญเติบโตของพืชได้ จุลินทรีย์แพร่กระจายอยู่ในดิน ทั้งในส่วนที่ใกล้กับรากพืช และบริเวณที่ไกลออกไป จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช หรือเรียกว่า ไรโซสเฟียร์ (rhizosphere) และมีการพึ่งพาอาศัยกันระหว่างรากพืชกับจุลินทรีย์ เนื่องจากรากมีการดูดน้ำ และแร่ธาตุ การหลั่งสารของราก (root exudate) การหายใจของราก (root respiration) จึงทำให้มีกิจกรรมของจุลินทรีย์สูง (Darrah, 1993) เนื่องจากสารที่หลั่งออกมาจากรากพืชประกอบไปด้วย ไอออน น้ำ เมือก และออกซิเจน (Bais *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ ช่วยกระตุ้นกิจกรรมและการเจริญของจุลินทรีย์ได้ การหายใจของรากทำให้เกิดแก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจำเป็นต่อการสร้างส่วนต่างๆ ของเซลล์จุลินทรีย์ (Lloyd and Taylor, 1994) บริเวณพื้นผิวของรากพืชเรียกว่าไรโซพแลน (rhizoplane) ซึ่งมีอนุภาคของดิน แบคทีเรีย และเส้นใยราเกาะติดอยู่ (Kowalchuk *et al.*, 2002) นอกจากนี้บริเวณที่อยู่ไกลออกไปจากรากเรียกว่า bulk soil เป็นดินที่ไม่มีความสัมพันธ์กับรากโดยตรงหรือดินที่อยู่นอกเหนือจากบริเวณไรโซสเฟียร์ โดยดินบริเวณนี้จะมีสารประกอบอินทรีย์ และประชากรจุลินทรีย์ ต่ำกว่าดินบริเวณไรโซสเฟียร์ (Wang and Zabowski, 1998) โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์อาศัยอยู่ทั่วไปในดินแต่จะพบจุลินทรีย์จำนวนมาก และมีความหลากหลายสูงบริเวณไรโซสเฟียร์

3. พืชที่มีความสามารถในการสะสมโลหะในปริมาณสูง (Hyperaccumulating plants)

พืชบางชนิดเป็นพืชที่มีความสามารถทนต่อปริมาณโลหะหนักได้ในปริมาณที่สูง หรือสามารถสะสมโลหะหนักไว้ในส่วนต่างๆ ของพืชได้ เราเรียกพืชเหล่านี้ว่า hyperaccumulating plant หรือหมายถึง พืชที่มีความสามารถในการสะสมโลหะหนักไว้ในปริมาณที่มากกว่าปกติ หรือเป็นพืชที่สามารถสะสมโลหะหนักได้สูงกว่าพืชทั่วไป 10-500 เท่า (Shah and Nongkynrih, 2007) การสะสมโลหะหนักนั้นจะพบบ่อยในพืชบกที่มีมวลชีวภาพต่ำ และจะสะสมโลหะหนักได้มาก โดยพืชเหล่านี้จะมีการพัฒนากลไกการนำโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ เพื่อปกป้องตัวเองจากความเป็นพิษของโลหะหนัก (Sheoran *et al.*, 2011) โลหะหนักนั้นจะไม่สามารถเก็บไว้ที่รากแต่จะถูกเคลื่อนย้ายไปสู่ลำต้น และสะสมในส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในใบ โดยที่มีความเข้มข้น 100 - 1,000 เท่า เมื่อเทียบกับพืชที่ไม่สามารถสะสมโลหะในปริมาณสูง (Nicoletta and Flavia, 2011) พืชที่สามารถสะสมโลหะในปริมาณสูง มีกลไกการสะสมโลหะหนัก และการแพร่กระจายของโลหะที่แตกต่างจากพืชธรรมดา ในสภาวะที่ดินมีการปนเปื้อนของโลหะหนักปริมาณสูง พืชที่สามารถสะสมโลหะในปริมาณสูงจะมีการสะสมโลหะหนักบริเวณผนังเซลล์ ลำต้น ใบ และมีการดูดโลหะจากรากได้ในปริมาณสูง อีกทั้งโมเลกุลของโลหะหนักยังสามารถยึดติดกันใน cytosol บริเวณใบมากกว่าปกติ ในขณะที่พืชทั่วไปหรือพืชไม่สามารถสะสมโลหะในปริมาณสูง จะมีการตอบสนองต่อโลหะหนักในปริมาณที่ต่ำ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ความเข้มข้นของโลหะหนักที่มีปริมาณสูงในพืช ที่สามารถสะสมโลหะได้ จะทำให้ใบเป็นพิษต่อสัตว์กินพืช



ภาพที่ 1 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโลหะหนัก และการแพร่กระจายของโลหะหนักในพืช non-hyperaccumulating plant และพืช hyperaccumulating plant (1) โลหะหนักที่สะสมอยู่ในผนังเซลล์หรือสารคัดหลั่งภายในเซลล์พืช (2) การดูดโลหะของรากพืช (3) การยัดตักของโมเลกุลโลหะหนักใน cytosol (4) การเคลื่อนย้ายโลหะหนักจากรากสู่ลำต้น

ที่มา: Nicoletta and Flavia (2011)

3.1 ลักษณะของพืชที่สามารถสะสมโลหะหนักได้สูง

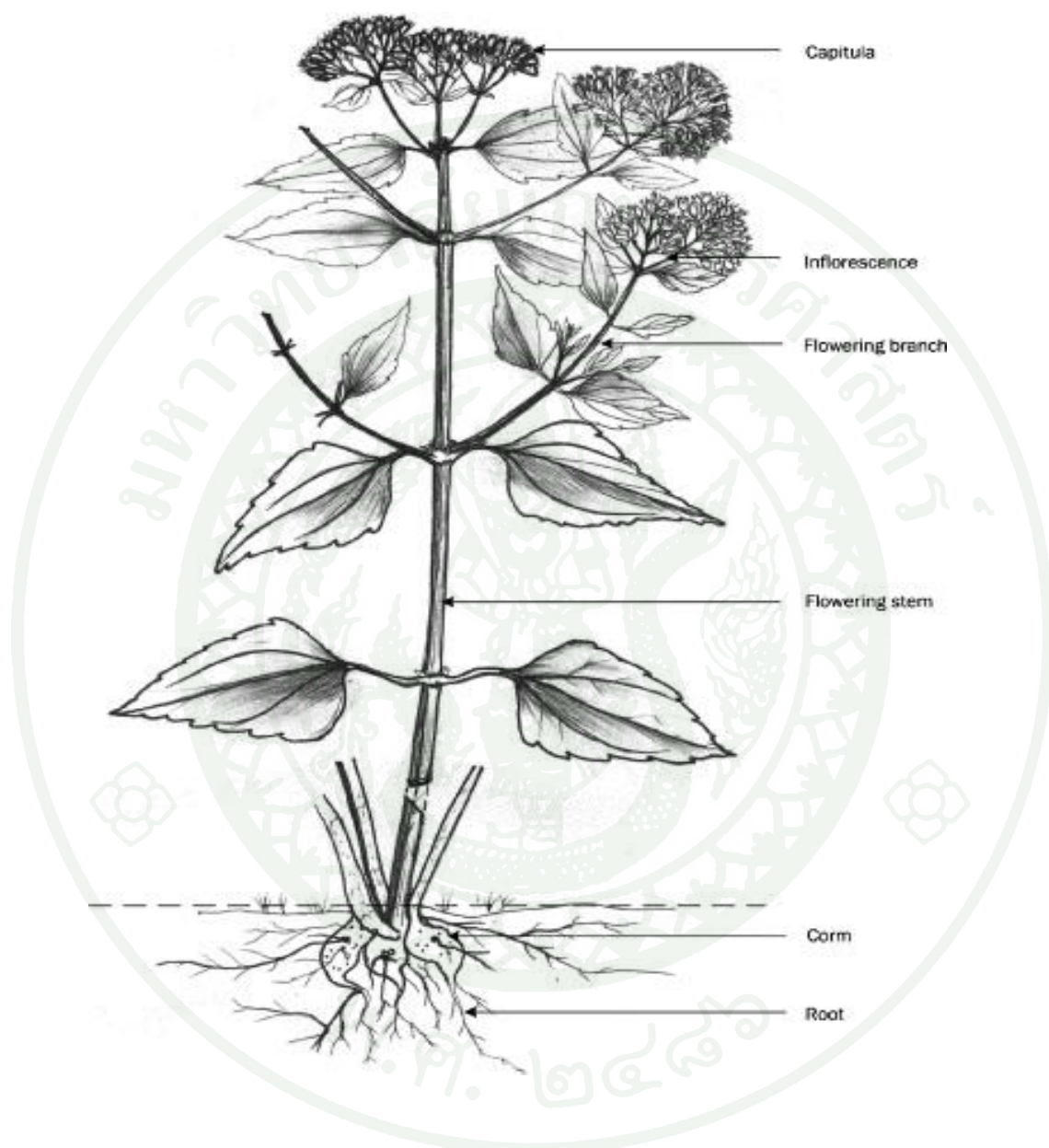
พืชที่สามารถสะสมโลหะหนักได้สูงต้องมีความสามารถในการดึงดูดโลหะหนักในปริมาณมากเข้าไปภายในรากของพืชได้ และสะสมไว้ในส่วนต่างๆ โดยเฉพาะส่วนที่อยู่เหนือดิน

ของพืชนั้น และยังสามารถเคลื่อนย้ายโลหะหนักจากรากไปสู่ส่วนเหนือดินได้ในอัตราที่สูง รวมถึงต้องทนทานต่อความเข้มข้นของสารปนเปื้อนในระดับที่สูงกว่าปกติ (Hypertolerance) มีพืชมากกว่า 400 ชนิด ในโลกที่สามารถสะสมโลหะหนักได้สูง (Baker *et al.*, 2000) พืชที่สามารถสะสมโลหะหนักได้สูงที่มีการสะสมของแคดเมียมได้แก่ *Chamomilla recutita*, *Helianthus annuus*, *Arabidopsis halleri*, *Brassica juncea*, *Thlaspi caerulescens*, *Salsola kali*, *Hypericum perforatum* และพืชที่มีการสะสมสังกะสีได้แก่ *Sedum alfredii*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. rapa*, *Avena sativa*, *A. halleri*, *Viola calaminaria*, *T. calaminare*, *T. areulescens* (Sheoran *et al.*, 2011)

3.2 สาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.)

สาบเสือนั้นชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Chromolaena odorata* (L.) อยู่ในวงศ์ Asteraceae ชื่อสามัญคือ Siam weed สาบเสือเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ จัดเป็นวัชพืชที่มีคุณสมบัติทางยา มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลาง แพร่ระบาดเข้ามาในประเทศไทยมากกว่า 50 ปีขึ้นไป สาบเสือเป็นไม้ล้มลุกอายุปีเดียว ลำต้นตั้งตรงแตกกิ่งก้านสูงได้ประมาณ 1-2 เมตร ใบออกตรงกันข้าม ลักษณะค่อนข้างเป็นรูปสามเหลี่ยม ขอบใบมีรอยหยัก มีขนปกคลุม ดอกออกเป็นช่อ ลักษณะเป็นกระจุกคล้ายร่ม ดอกสีขาวอมม่วง (ภาพที่ 2) สาบเสือจะออกดอกในฤดูหนาวช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม ในธรรมชาติสามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ชอบขึ้นตามที่ที่มีแสงแดดมาก บริเวณทุ่งกว้าง ที่รกร้าง ริมถนน เป็นต้น สาบเสือนั้นมีสรรพคุณทางยามากมายทั้งจาก ต้น ใบ ดอก ซึ่งมีสรรพคุณในการเป็นยาห้ามเลือด รักษาแผลสด แก้อ่อนในกระหายน้ำ บำรุงร่างกาย เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นสารฆ่าแมลงได้อีกด้วย

สาบเสือนั้นนอกจากจะมีประโยชน์ต่อมนุษย์ในเรื่องของสรรพคุณทางยาแล้ว ยังเป็นพืช hyperaccumulating plant ที่สามารถสะสมโลหะหนักได้ จากรายงานของ Phaenark *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาพืชที่มีการสะสมโลหะแคดเมียมและสังกะสี จำนวน 36 ชนิด ในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก พบว่า สาบเสือเป็นหนึ่งในพืช 4 ชนิด ที่มีการสะสมโลหะหนักไว้ในรากและลำต้นในปริมาณที่สูง



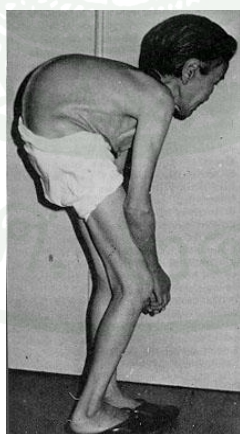
ภาพที่ 2 สัณฐานวิทยาของสาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.)

ที่มา: Chudamani *et al.* (2006)

4. ผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสีต่อสิ่งมีชีวิต

4.1 ผลกระทบต่อมนุษย์

แคดเมียมถือเป็นโลหะหนักที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและร่างกายมนุษย์ สัตว์ พืช และ จุลินทรีย์ โดยสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 2 ทางคือ ทางหายใจ และทางอาหารที่กินเข้าไป ก่อให้เกิดอันตรายต่ออวัยวะภายในร่างกาย เช่น ไต ปอด กระดูก (Domino, 1994) ตับ และอวัยวะ (Damek and Sawicka, 2003) อาการพิษนั้นสามารถเกิดได้ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันจะเกิดการระคายเคืองบางอวัยวะหลังจากได้รับแคดเมียม และมีอาการอื่นๆ เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น อาการพิษจากแคดเมียมที่เกิดกับคนส่วนใหญ่มักเป็นแบบเรื้อรัง ซึ่งเกิดจากร่างกายได้รับแคดเมียมเป็นระยะเวลานานติดต่อกัน และส่งผลให้เกิดโรคร้ายแรงถึงชีวิต อาการพิษจากแคดเมียมมีรายงานเป็นครั้งแรก จากพื้นที่ฝั่งแม่น้ำจินซู ประเทศญี่ปุ่น ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยพบว่าประชาชน มีอาการปวดตามกระดูก น่อง และซี่โครง ชาวญี่ปุ่นเรียกโรคนี้ว่า โรคอิไต อิไต ซึ่งมีการสะสมแคดเมียมในร่างกายเป็นระยะเวลามากกว่า 30 ปี (ภาพที่ 3) สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่มีโอกาสที่จะสะสมแคดเมียม เนื่องจากแคดเมียมมีสมบัติทางเคมีที่คล้ายคลึงกับสังกะสี จึงทำให้แคดเมียมสามารถเข้าไปแทนที่สังกะสีในเอ็นไซม์บางชนิด จึงทำให้การทำหน้าที่ทางกระบวนการทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (ศุภมาส, 2545)



ภาพที่ 3 ผู้ป่วยโรค อิไต อิไต (Itai Itai disease)

ที่มา: ศูนย์วิจัยและพัฒนาการป้องกันและจัดการภัยพิบัติ (2012)

ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่า แคดเมียมชักนำให้เกิดมะเร็งปอด และมะเร็งเต้านมในเพศหญิง โดยแคดเมียมจะทำให้เกิดความผิดปกติของยีนบางกลุ่ม ยับยั้งการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ยับยั้งการเกิด apoptosis และสามารถทำให้ดีเอ็นเอกลายพันธุ์ (Pius, 2009) จากงานวิจัยของ Michael (2003) พบว่าแคดเมียมจัดเป็นสารก่อมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งปอด และการสัมผัสกับแคดเมียมยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับมะเร็งต่อมลูกหมากและไตแต่ไม่ส่งผลกระทบเท่ากับมะเร็งปอด ส่วนที่อวัยวะอื่นๆ เช่น ตับ ตับอ่อน และช่องท้อง ยังไม่สามารถสรุปได้

สังกะสีมีความจำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนและเอ็นไซม์หลายชนิดในร่างกาย สังกะสีจะเกิดผลกระทบอย่างเฉียบพลันต่อร่างกายมนุษย์ก็ต่อเมื่อได้รับสังกะสีเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากเกินไป สังกะสีสามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยการหายใจและจากอาหารที่กินเข้าไป ทำให้เกิดพิษต่อระบบร่างกายหลายระบบ เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบหัวใจ และหลอดเลือด ปอด ตับ ไต สมอ เป็นต้น (Jerome, 2011)

4.2 ผลกระทบต่อพืช

แคดเมียมเป็นธาตุที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่รากพืชสามารถดูดดึงแคดเมียม จากนั้นจึงเคลื่อนย้ายไปสู่ส่วนต่างๆ ของพืช ได้ แคดเมียมมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชโดยมีผลกระทบต่อการกระบวนการสังเคราะห์แสงด้วยการเกิด chlorophyll fluorescence และการดูดธาตุอาหารอื่นๆ ของพืช ยับยั้งความยาวของราก และความยาวของหน่อ นอกจากนี้แคดเมียมสามารถถูกดูดดึง และเคลื่อนย้ายในพืชไปสู่ส่วนที่กินได้ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อพืช สำหรับสังกะสีในความเข้มข้นต่ำเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามในความเข้มข้นสูงก็เป็นพิษต่อพืชและยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชด้วย Chugh and Sawhney (1996) ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วลิสงที่กำลังงอก พบว่าถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญโดยแคดเมียมที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.25 มิลลิโมลาร์ และอัตราการหายใจของเมล็ดยังถูกยับยั้งอย่างรวดเร็ว

4.3 ผลกระทบต่อจุลินทรีย์

โลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในดินส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ดิน โดยสามารถเกิดผลกระทบได้หลายทาง เช่น การย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ลดลง การ

ตรึงไนโตรเจนลดลง การหมุนเวียนธาตุอาหารมีประสิทธิภาพลดลง (Baath, 1989) โลหะที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำ เช่น โคบอลต์ ทองแดง นิกเกิล และ สังกะสี มีความจำเป็นต่อหลายกระบวนการในเซลล์แบคทีเรีย แต่ถ้ามีความเข้มข้นสูงจะพบว่าเป็นพิษต่อแบคทีเรีย โลหะหนักอื่นๆ รวมถึง ตะกั่ว แคดเมียม ปรอท เงิน และ โครเมียม ไม่มีประโยชน์ต่อเซลล์แบคทีเรียและยังเป็นพิษ ถึงแม้ว่าจะมีความเข้มข้นในปริมาณต่ำก็ตาม Nwuche and Ugoji (2008) ทำการศึกษาการปนเปื้อนโลหะหนักที่มีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน พบว่า อัตราการหายใจของประชากรจุลินทรีย์ดิน และการตรึงไนโตรเจนลดลง การที่แบคทีเรียจะมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักได้นั้น แบคทีเรียต้องมีกลไกการต้านทานโลหะหนักได้ กลไกเหล่านี้จะมีการสะสมและเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของไอออนของโลหะหนักที่อยู่ภายในเซลล์และก่อให้เกิดพิษน้อยลง (Nies, 1999) และยังขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของโครงสร้างเซลล์ การปรับตัวทางพันธุกรรม รวมถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Wuertz and Mergeay, 1997) การปนเปื้อนโลหะหนักในดินทำให้จุลินทรีย์ในดินเกิดความเครียด ส่งผลให้จุลินทรีย์มีการเพิ่มความทนทานต่อโลหะหนัก และมีการเกิดแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีการต้านทานต่อโลหะหนัก โดยมีการโอนถ่ายยีนต้านทาน (Coombs and Barkay, 2004; Oger *et al.*, 2003)

อย่างไรก็ตามช่วง 20 ปี ที่ผ่านมามีงานวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจเกี่ยวกับการศึกษาโลหะหนักที่มีผลต่อจุลินทรีย์ โดยมีการศึกษาในระดับโมเลกุล จากรายงานของ Qing *et al.* (2007) ทำการศึกษาแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในดินของประเทศจีน โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE และทำการศึกษาลำดับเบสพบว่า มีแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่มีความสามารถในการต้านทานแคดเมียมได้ดี ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Enterobacter cloacae*

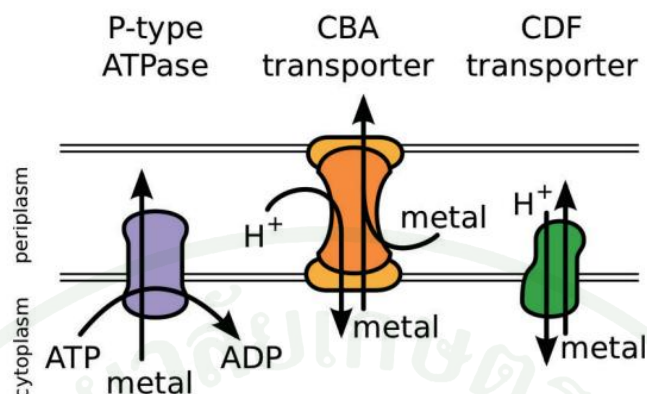
Kanazawa and Meri (1996) ทำการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมในตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมพบว่า ในจำนวน 14 ไอโซเลต มีเพียง 5 ไอโซเลต (*Flavobacterium sp.*, *Comamonas testosteronii*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Alcaligenes piechaudii* และ *Alcaligenes xylosoxidans*) ที่เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่สามารถต้านทานแคดเมียมได้

Rathnayake *et al.* (2010) ทำการศึกษาแบคทีเรียแกรมบวกที่ต้านทานโลหะหนักในดินพบว่า สามารถไอโซเลตแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *Paenibacillus sp.* และ *Bacillus thuringiensis* ที่สามารถต้านทาน Cd^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} โดย *Paenibacillus sp.* มีการต้านทานต่อ Cu^{2+} สูงที่สุด แต่ *B. thuringiensis* สามารถต้านทานต่อ Cd^{2+} และ Zn^{2+} ได้สูงที่สุด

Nies (1999) ได้อธิบายแนวทางที่เป็นไปได้ในการศึกษาโลหะหนักในทางชีวภาพไว้ ดังนี้ (1) การศึกษาโลหะหนักสามารถเติมจุลินทรีย์เพื่อที่จะส่งเสริมกระบวนการชีวภาพ (2) แบคทีเรียด้านทานโลหะหนักสามารถใช้ในเหมืองเพื่อลดปริมาณโลหะหนักได้ (3) แบคทีเรียด้านทานโลหะหนักสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายทางชีวภาพของการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม

4.3.1 ยีน และกลไกการต้านทานโลหะหนัก

ยีนเป็นหน่วยข้อมูลที่เก็บไว้บนดีเอ็นเอ การศึกษาการต้านทานโลหะหนักของแบคทีเรียควรศึกษาในระดับพันธุกรรมเพื่อศึกษาถึงยีนที่แสดงออกหรือเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโลหะหนักของแบคทีเรีย มีแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสีหลายชนิดที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อน (Kermanshahi *et al.*, 2007; Qing *et al.*, 2007) ซึ่งพบว่าในกลไกการต้านทานนั้นจะมีกลไก Efflux transporters เป็นหลัก มียีนที่เกี่ยวข้องกับกลไก Efflux transporters หลายยีนด้วยกัน เช่น *czc* (cadmium-zinc-cobalt) จาก *Pseudomonas putida* (Canovas *et al.*, 2003) *ncc* (nickel-cobalt-cadmium) จาก *Achromobacter xylosoxidans* (Schmidt and Schlegel, 1994) เป็นต้น Efflux transporters ประกอบด้วย 3 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโลหะหนัก คือ P-type ATPases จะใช้พลังงาน ATP ป้อนไอออนของโลหะหนักจาก cytoplasm ออกสู่ periplasm (Nucifora *et al.*, 1989; Rensing *et al.*, 1997) CBA transporters ประกอบด้วย 3 ส่วนประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกทำหน้าที่ขับไอออนของโลหะหนักจาก cytoplasm และ periplasm ออกสู่ภายนอกเซลล์ โดยใช้ chemiosmotic gradient (Nies and Silver, 1989; Hassan *et al.*, 1999; Franke *et al.*, 2003) CDF transporters เป็นการนำไอออนของโลหะหนักจาก cytoplasm ออกสู่ periplasm โดยการขับเคลื่อนด้วย proton motive force (Xiong and Jayaswal, 1998; Anton *et al.*, 1999; Grass *et al.*, 2001) (ภาพที่ 4) โดยทั่วไป P-type ATPases และ CDF transporters จะพบโดยทั่วไปในแบคทีเรียสปีชีส์ต่างๆ แต่ CBA transporters จะมีหน้าที่ลดความเป็นพิษจาก periplasm หรือขับโลหะออกสู่ภายนอกเซลล์ กล่าวคือ CDF transporters จะกำจัดไอออนของโลหะจาก periplasm โดย P-type ATPases และ CDF transporters หรือก่อนที่จะไอออนของโลหะหนักจะเข้ามาใน cytoplasm นอกจากนี้ P-type ATPases และ CDF transporters สามารถทำหน้าที่แทนกันได้แต่ไม่สามารถทำหน้าที่แทน CBA transporters (Scherer and Nies, 2009)



ภาพที่ 4 Efflux transporters ประกอบด้วย 3 กลุ่มความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทาน โลหะหนัก

ที่มา: Hynninen (2010)

ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับยีนต้านทานโลหะหนัก ตัวอย่างเช่น Zhang *et al.* (2008) ทำการศึกษายีน *cadA* ในแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมจากพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมทางตอนเหนือของประเทศไทย โดยทำการศึกษายีน *cadA* ใน *Bacillus* 4 สายพันธุ์ และ *Flavobacterium* 1 สายพันธุ์ พบว่าจากการวิเคราะห์ลำดับเบสยีน *cadA* 93-99 เปอร์เซ็นต์ ของการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดในแบคทีเรียทั้ง 5 และยังพบว่ายีน *cadA* มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการแพร่กระจายของลักษณะที่แสดงออกของกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่ต้านทานแคดเมียม Kamizono *et al.* (1989) ทำการศึกษายีน *zrc1* ซึ่งเป็นยีนต้านทานสังกะสีใน *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า มียีนต้านทานสังกะสีและแคดเมียม ซึ่งพบอยู่บนพลาสมิด จากการศึกษาของ Abou-Shanab *et al.* (2007) ได้พบยีนที่มีอิทธิพลต่อการต้านทานโลหะหนัก ซึ่งทำการศึกษาโดยทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อ สารหนู แคดเมียม โครเมียม สังกะสี ตะกั่ว ดินบุก โคบอลต์ ทองแดง และนิกเกิล ของแบคทีเรีย 46 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการวิเคราะห์ MICs พบว่า มีแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Arthrobacter rhombi* AY509239, *Clavibacter xyli* AY509235, *Microbacterium arabinogalactanolyticum* AY509226, *Rhizobium mongolense* AY509209 and *Variovorax paradoxus* AY512828 สามารถต้านทานโลหะหนักทั้ง 9 ชนิด และพบว่า ยีน *czc chr ncc* และ *mer* มีอิทธิพลต่อการต้านทานโลหะหนัก

5. เมตาจีโนมิกส์ (metagenomics)

5.1 ความสำคัญของเมตาจีโนมิกส์

ในอดีตการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมมีการใช้เทคนิค DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ช่วยให้เราสามารถศึกษาและประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้ (Ruamkuson and Ketudat-Cairns, 2009) ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงและไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ แต่มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ลำดับเบสที่สามารถหาลำดับเบสได้โดยการตัดหรือสกัดสายดีเอ็นเอที่แยกได้บน DGGE-gel ไปวิเคราะห์ลำดับเบสได้จำกัด และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง แต่ในปัจจุบันการใช้วิธีการที่เรียกว่า เมตาจีโนมิกส์ จะช่วยให้สามารถวิเคราะห์ถึงความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ทั้งหมดในสิ่งแวดล้อมที่เราสนใจได้

เมตาจีโนมิกส์เป็นการศึกษาสารพันธุกรรมทั้งหมดของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีทั้งที่สามารถเพาะเลี้ยงและไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ (Hugenholtz *et al.*, 1998) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างสายวิวัฒนาการของประชากรจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมต่างๆ ทั้งในน้ำจืด (Breitbart *et al.*, 2009) น้ำทะเล (Kennedy *et al.*, 2010) และในดิน (Liles *et al.*, 2003; Rondon *et al.*, 2000) เป็นต้น โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ที่พบในโลกนั้นมีประมาณ 2 ใน 3 ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ในแต่ละสิ่งแวดล้อมจะมีจุลินทรีย์ประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานทั่วไปได้ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างประชากร และบทบาทหน้าที่ทางนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ที่สำคัญ จึงต้องอาศัยวิธีการเมตาจีโนมิกส์นี้เข้ามาช่วยในการศึกษา (Amann *et al.*, 1995; Riesenfeld *et al.*, 2004)

5.2 หลักการของเมตาจีโนมิกส์

หลักการของเมตาจีโนมิกส์เป็นการศึกษาโดยไม่ต้องเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ โดยขั้นตอนแรกจะทำการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมที่เราต้องการ เช่น ดิน น้ำ สิ่งมีชีวิตต่างๆ เป็นต้น จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปสร้างเป็นฐานข้อมูลเมตาจีโนม (metagenomics library) โดยการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ แล้วนำเวกเตอร์ที่ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host) แล้วคัดเลือกโคลนที่ต้องการไปศึกษาลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเมตาจีโนม

(Scholoss and Handelsman, 2003; Tringe and Rubin, 2005) แต่ปัจจุบันนี้มีการพัฒนาเทคนิคในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ด้วยเทคโนโลยีจีเอ็นเอส (Next generation sequencing technology) (Metzker, 2009) ซึ่งเป็นวิธีที่หาลำดับเบสได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้ข้อมูลลำดับเบสของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดินหรือในสิ่งแวดล้อมที่เราสนใจได้จำนวนมหาศาล และมีต้นทุนค่าใช้จ่ายต่ำ (Zhang *et al.*, 2011) โดยมีหลักการคือ ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ ตะกอนดิน จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพอลิเมอร์เชน (polymerase chain reaction) ในตำแหน่ง V6 hypervariable regions ของยีน 16S rDNA และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป เครื่องมือของเทคโนโลยีจีเอ็นเอสที่ใช้ในการหาลำดับเบสมี 3 รูปแบบหลักที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางได้แก่ 454/Roche, Illumina, และ SOLiD/ABI โดยเครื่องมือต่างๆ เหล่านี้มีหลักการหาลำดับเบสในรูปแบบของข้อมูลลำดับเบสสายสั้น (reads) และจำนวนของข้อมูล reads ที่ได้ออกมาจะแตกต่างกันไป เทคโนโลยีจีเอ็นเอสนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยหลากหลาย เช่น การทำ *de novo* sequencing, target resequencing, RNA sequencing และ metagenomics เมื่อได้ข้อมูลลำดับเบสแล้วสามารถแปลผลข้อมูลต่างๆ ด้วยชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป mothur version 1.27.0 (Huse *et al.*, 2007; Scholoss *et al.*, 2009) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ออกแบบเฉพาะสำหรับวิธีการเมตาจีโนมิกส์เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ และบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์นั้นๆ

ในปัจจุบันการศึกษาทางด้านเมตาจีโนมิกส์เป็นที่สนใจในกลุ่มนักวิจัยอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศโดยมีตัวอย่างงานวิจัยดังนี้

ภควดี และคณะ (2548) ทำการศึกษาการสร้าง metagenomic library และคัดกรองคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อค้นหา โลโปไลติกเอ็นไซม์ จากน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน พบว่ามี 2 โคลน จาก 36,000 โคลน แสดงคุณสมบัติการย่อยไขมัน โดยการผลิตโซนาไทรอบโคลนนั้นๆ เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า หนึ่งโคลนมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึง (31 เปอร์เซ็นต์) กับลำดับกรดอะมิโนของเอสเทอร์สจาก *Rhodobacter sphaeroides* และอีกโคลนมีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึง (39 เปอร์เซ็นต์) กับฟอสโฟไลเปสจาก *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*

Breitbart *et al.* (2002) ทำการศึกษาไวรัสที่ได้จากการกรองน้ำทะเลจำนวน 200 ลิตร พบว่า มีไวรัสต่างๆ มากถึง 5,000 ชนิด และศึกษาไวรัสจากตะกอนใต้ทะเล พบว่ามีไวรัสกว่า 1 ล้านชนิด

Wang *et al.* (2010) ทำการศึกษามีตาจีโนมิกส์ของจุลินทรีย์ของตะกอนในแม่น้ำที่ปนเปื้อนโลหะหนัก และคัดเลือกยีนที่ต้านทานโลหะพบว่า metagenomics library ที่สร้างได้มี 6,000 โคลน และพบยีนที่ต้านทานโลหะหนักแคดเมียมและสังกะสี

Arjun and Harikrishnan (2011) ทำการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์หาความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์ของข้าว พบว่า มีความหลากหลายของกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์ของข้าวโดยแบคทีเรียที่สำคัญมีความคล้ายคลึงกับ *Proteobacteria*

Jia *et al.* (2013) ทำการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ของยีนต้านทานแคดเมียมและคอปเปอร์ในตะกอนที่มีจุลินทรีย์ปนอยู่ (activated sludge) ของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงฟอกหนัง โดยทำการสกัด metagenomic DNA จากตะกอนจุลินทรีย์ที่ปนอยู่และหาลำดับเบสด้วยวิธี Illumina high-throughout sequencing พบว่า มีจำนวน Illumina sequence reads 11,973,394 sequences โดยพบว่า 222 sequence (0.019 เปอร์เซ็นต์) เป็นแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมและ 197 sequence (0.016 เปอร์เซ็นต์) เป็นแบคทีเรียต้านทานคอปเปอร์

5.3 ประโยชน์ของเมตาจีโนมิกส์

5.3.1 ด้านสุขภาพมนุษย์

ในร่างกายมนุษย์นั้นมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ และมีความสัมพันธ์ร่วมกันกับมนุษย์แบบสมชีพ (symbiosis) โดยไม่ทำให้เกิดโรค แต่มีอิทธิพลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของอาหารที่ผ่านเข้ามาเพื่อสลายให้ได้เป็นสารอาหารที่จะดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลำไส้คน นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโน และวิตามินหลายชนิดที่จุลินทรีย์ในลำไส้สร้างให้เป็นประโยชน์กับระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เมตาจีโนมิกส์สามารถช่วยนักวิจัยในการศึกษาเกี่ยวกับโรคทั่วไปได้ ตัวอย่างเช่น โรคมะเร็ง โรคอ้วน เป็นต้น จากการศึกษาของ Turnbaugh *et al.* 2006 ได้ทำการศึกษามิโครไบโอมในลำไส้ของคนด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ โดยต้องการทราบว่า

จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ของคนที่เป็นโรคอ้วน และคนที่มิน้ำหนักในเกณฑ์ปกติเกี่ยวข้อง และเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอ้วนหรือไม่ จากการทดลองพบว่า มีกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ที่มีการแสดงออกโดดเด่น 2 กลุ่ม คือ bacteroidetes และ firmicutes เมื่อมีการควบคุมอาหารปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม firmicutes จะลดลงแต่กลุ่มของ bacteroidetes มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เขาให้ชื่อว่า obese microbiome มีประสิทธิภาพในการทำงานมากขึ้นเพื่อเก็บพลังงานจากอาหาร ในการศึกษาต่อมาเมื่อทดลองนำ obese microbiota ไปใส่ในลำไส้หนูที่ไม่มีจุลินทรีย์จะสามารถเปลี่ยนหนูให้กลายเป็นหนูอ้วน มีการเพิ่มการเก็บสะสมไขมันได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อนำกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็น lean microbiota มาใส่ ประสิทธิภาพในการเก็บพลังงานจากอาหารจะต่ำกว่าและไม่ส่งผลทำให้หนูอ้วน จึงสรุปได้ว่ากลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้สามารถเปลี่ยนแปลงการทำงานในสถานะที่ต่างไป ทำให้มีผลต่อปัจจัยในการได้รับพลังงาน และน่าจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเกิดโรคอ้วนได้ Fish *et al.* (2012) ทำการศึกษาแบคทีเรียในลำไส้ของเด็กอายุ 1 ปี ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ ทำให้เข้าใจถึงแบคทีเรียที่เข้ามาอยู่ในลำไส้ของเด็กอายุ 1 ปี ในระดับเชิงลึก และมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพมนุษย์ เช่น การเกิดโรคภูมิแพ้จากแบคทีเรีย วิธีการเมตาจีโนมิกส์ยังเป็นเครื่องมือในการศึกษาความสัมพันธ์และองค์ประกอบของแบคทีเรียในลำไส้เพื่อหาแนวทางในการป้องกันและรักษาต่อไป

5.3.2 ด้านการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อม

จุลินทรีย์สามารถกำจัดสารพิษจากทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและจากที่มนุษย์สร้างขึ้น โดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลง ตัวอย่างเช่น จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายก๊าซมีเทนที่เป็นสาเหตุสำคัญของภาวะโลกร้อน จุลินทรีย์บางชนิดช่วยย่อยสลายสารพิษในแหล่งน้ำเสีย หรือบ่อกักเก็บน้ำเสียตามโรงงานและแหล่งชุมชนได้ การวิเคราะห์ทางเมตาจีโนมิกส์ สามารถช่วยให้บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ บทบาทหน้าที่และความสามารถในการทำงานที่หลากหลาย ซึ่งสามารถนำข้อดีเหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด Beck *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสถานะที่มีก๊าซมีเทนในตะกอนดินของแหล่งน้ำจืดจากทะเลสาบในเมืองวอชิงตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ พบกลุ่มประชากรหลักของแบคทีเรีย คือ *Methylococcaceae* และ *Methylophilaceae* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสถานะที่มีการปนเปื้อนของก๊าซมีเทน

5.3.3 ด้านการเกษตร

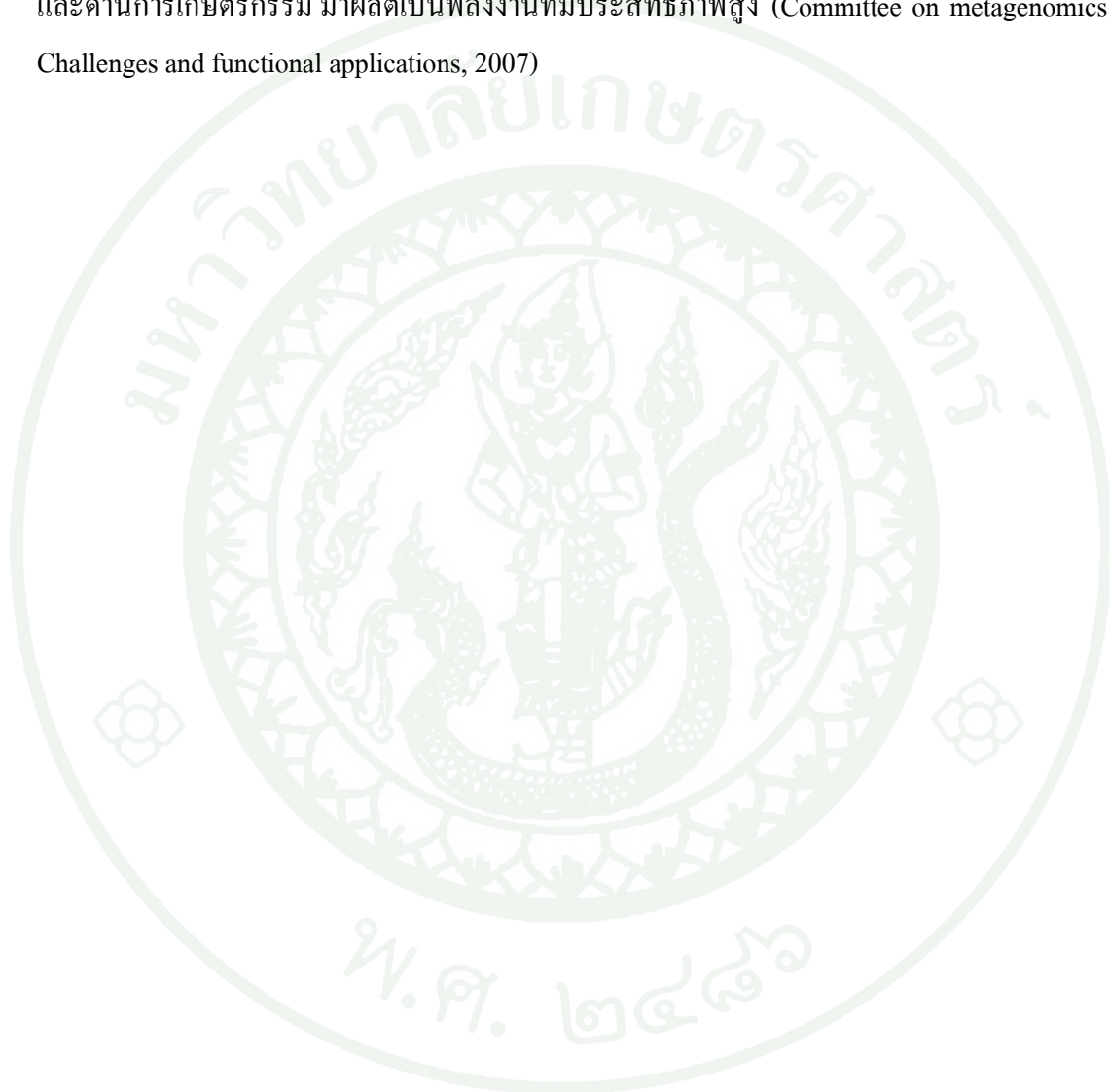
จุลินทรีย์ในดินมีความสำคัญในการย่อยซากพืชซากสัตว์จนกลายเป็นสารอาหารที่พืชต้องการในการเจริญเติบโต แบคทีเรียจะเปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศให้อยู่ในรูปที่พืชและสัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ รวมถึงธาตุอื่นๆ อีกหลายชนิดด้วย เมตาจีโนมิกส์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสังคมจุลินทรีย์กับพืช และหาวิธีที่จะทำให้พืชแข็งแรงมากขึ้น และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือยับยั้งสาเหตุของโรคพืช นอกจากนี้ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์และพืชจะพบมากบริเวณไรโซสเฟียร์ ซึ่งมีกิจกรรมของจุลินทรีย์สูง มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช Arjun and Harikrishnan (2011) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณไรโซสเฟียร์ของข้าวด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ พบว่าประชากรหลักของแบคทีเรียอยู่ในกลุ่ม *Proteobacteria* ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียต่อพืช และแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย

5.3.4 ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาวะโลก

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนโลกมีมากมายหลายชนิด หนึ่งในนั้นมีแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้นี้ส่วนใหญ่แล้วจะพบอาศัยอยู่อย่างอิสระในมหาสมุทรซึ่งครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นผิวโลก แบคทีเรียนี้มีผลต่อสมดุลเคมีของชั้นบรรยากาศโลก เมตาจีโนมิกส์สามารถช่วยนักวิจัยในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพลังงาน และสสารในทะเล ส่วนประกอบของชั้นบรรยากาศ และภูมิอากาศโลก Steffen *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียใน 2 ทวีปคือ ทะเลสาบ Erie ในทวีปอเมริกาเหนือ และ ทะเลสาบ Taihu ในทวีปเอเชีย ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียทำให้เกิดความเป็นพิษและผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ จากการศึกษาพบ *Cyanobacteria* และ *Proteobacteria* ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละตัวอย่าง โดยที่ทะเลสาบ Taihu พบว่า *Proteobacteria* มีลักษณะเด่นในการผลิตไนโตรเจน ส่วนทะเลสาบในทวีปอเมริกาเหนือมีการผลิตไนโตรเจนจาก *Cyanobacteria* ซึ่งไนโตรเจนนี้ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำ ห่วงโซ่อาหาร และระบบนิเวศน์โดยรวม

5.3.5 ด้านพลังงาน

เมตาจีโนมิกส์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านพลังงาน โดยช่วยในการค้นหาความสัมพันธ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนวัตถุดิบที่เหลือจากด้านอุตสาหกรรม และด้านการเกษตรกรรม มาผลิตเป็นพลังงานที่มีประสิทธิภาพสูง (Committee on metagenomics: Challenges and functional applications, 2007)



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างดิน
2. อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และทางเคมีบางประการของดิน และวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสี
3. อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสีที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ (*C. odorata*) ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ (metagenomics)
4. อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสี

วิธีการ

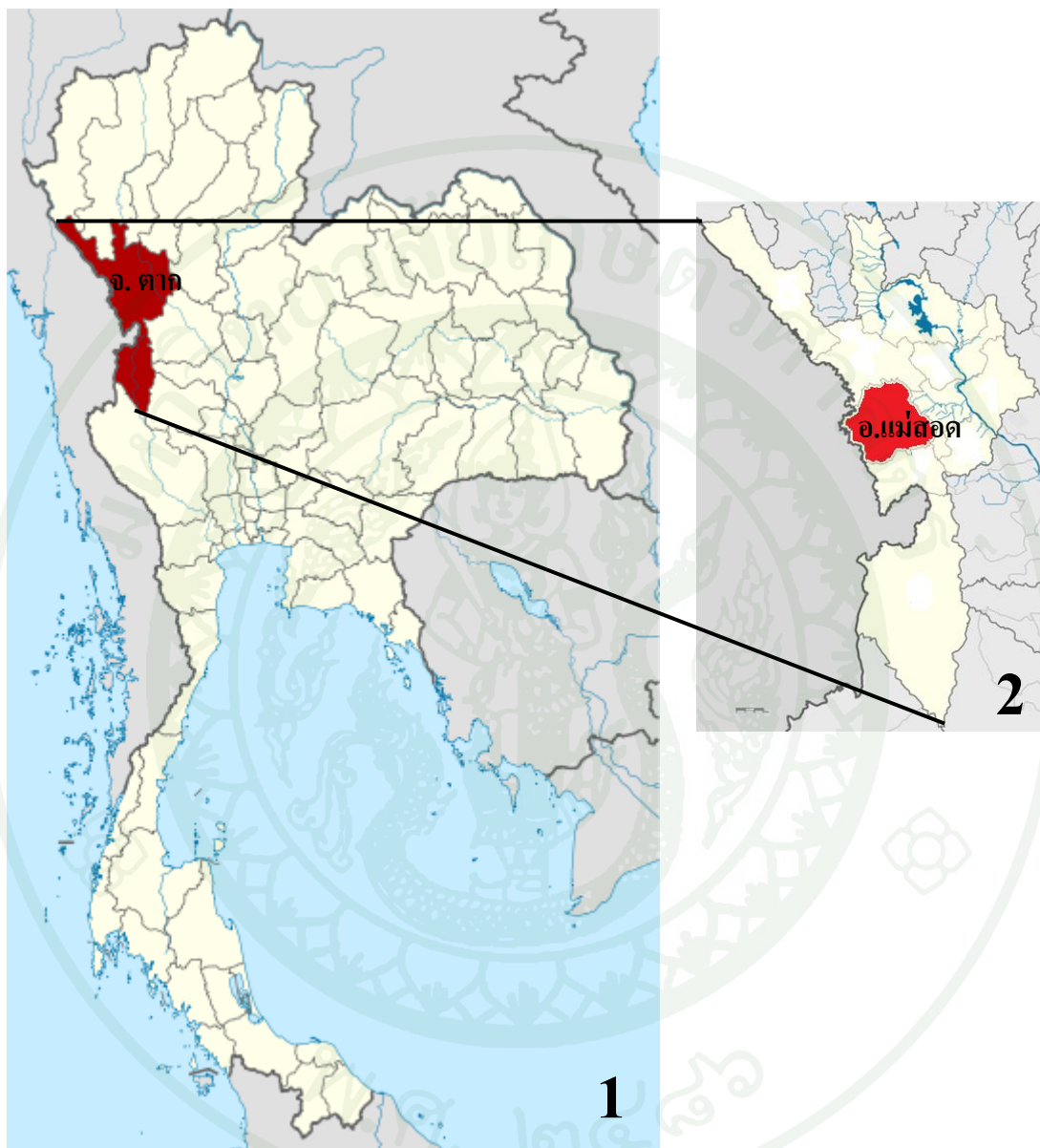
1. ศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสี ที่มีต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ (*C. odorata*) ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ (metagenomics)

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก (ภาพที่ 5) โดยเก็บตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์สมบัติทางเคมี และทางฟิสิกส์บางประการของดิน รวมถึงวิเคราะห์แคดเมียมและสังกะสีทั้งหมด และเก็บตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือสำหรับวิเคราะห์ผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสีต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดิน

1.1.1 การเก็บตัวอย่างดินสำหรับวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและทางฟิสิกส์บางประการของดิน และวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีทั้งหมด

เก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตรที่บริเวณต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 นำตัวอย่างดินผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และ 0.5 มิลลิเมตร เพื่อทำการทดลองต่อไป



ภาพที่ 5 (1) แผนที่จังหวัดตาก (2) แผนที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

ที่มา: วิกีพีเดีย สารานุกรมเสรี (2556)

1.1.2 การเก็บตัวอย่างดินสำหรับวิเคราะห์ผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสีต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ (*C. odorata*) ที่บริเวณต่างๆ ในตำบลพระธาตุผาแดง อ.แม่สวด จ.ตาก ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยทำการใช้พลั่วขุดดินรอบต้นสาบเสือ จากนั้นย้ายใส่กระถางขนาด 15 นิ้ว และทำการดูแลรดน้ำไม่ให้ต้นสาบเสือดตายขณะขนส่งเมื่อถึงห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างดินสาบเสื้อมาจากกระถาง และทำการเขย่าดินบริเวณรอบรากให้เหลือแต่ดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ และเก็บตัวอย่างดินดังกล่าวแช่ไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสี ที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ และเพื่อศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายของยีนต้านทานแคดเมียมและสังกะสีในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียมต่อไป

ตารางที่ 1 ตำแหน่งพิกัดของบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างดินใน อ. แม่สวด จ.ตาก

พื้นที่	บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง	ละติจูด	ลองจิจูด
THA1	พื้นที่เหมือง	16° 39' 52.829' N	98° 39' 58.438' E
THA2	พื้นที่การเกษตร	16° 42' 55.636' N	98° 33' 58.136' E
THA3	พื้นที่การเกษตร	16° 40' 30.442' N	98° 37' 41.128' E
THA4	พื้นที่เหมือง	16° 40' 25.213' N	98° 37' 46.911' E
THA5	พื้นที่การเกษตร	16° 40' 11.821' N	98° 37' 1.663' E
THA6	พื้นที่การเกษตร	16° 40' 9.839' N	98° 35' 54.515' E
THA7	พื้นที่การเกษตร	16° 40' 11.723' N	98° 37' 1.764' E
THA8	พื้นที่การเกษตร	16° 39' 23.061' N	98° 40' 4.060' E
THA9	พื้นที่รกร้างว่างเปล่า	16° 39' 41.633' N	98° 39' 58.289' E
THA10	พื้นที่การเกษตร	16° 39' 49.692' N	98° 37' 2.010' E
THA11	พื้นที่การเกษตร	16° 39' 53.113' N	98° 37' 3.860' E
THA12	พื้นที่ฟื้นฟู บริเวณเหมืองเก่า	16° 40' 15.604' N	98° 37' 41.865' E

1.2 วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและทางฟิสิกส์บางประการ

1.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมและสังกะสี ในดินด้วยวิธีการสกัดด้วย HNO_3 - HClO_4 ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Amacher (1996) และ Hesse (1971)

ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร 1 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วสำหรับย่อยสลายดิน (digestion tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acid mixture HNO_3 : HClO_4 อัตราส่วน 1:2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ ประมาณ 12 ชั่วโมง ในเครื่องย่อยสลายตัวอย่างดิน (block digester) เริ่มที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้น 200 องศาเซลเซียส เมื่อการย่อยสลายสมบูรณ์ นำ digestion tube ออกจาก block digester ทิ้งให้เย็น เจือจางสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร และกรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีทั้งหมดด้วยเครื่อง flame atomic absorption spectrophotometer (Varian AA240, Australia)

1.2.2 วิเคราะห์ค่า pH 1:1 (ดิน:น้ำ)

วัดค่า pH ของดินโดยใช้เครื่อง pH meter โดยชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร 20 กรัม ลงใน beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร คนดินให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที คนให้เข้ากันอีกครั้ง และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าด้วยเครื่อง pH meter

1.2.3 ค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity)

ชั่งตัวอย่างดินที่ผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร 20 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนดินให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้ดินตกตะกอน กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสไปวัดค่าสภาพการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง electrical conductivity และนำมาคำนวณตามสมการที่ 1

การคำนวณ

$$ECe \text{ (dS/m)} = EC \text{ (1:5)} \times 6.4 \quad \dots\dots\dots (1)$$

1.2.4 วิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุ (organic matter)

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

การคำนวณ

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

$$\text{Organic matter (เปอร์เซ็นต์)} = \text{Organic carbon (เปอร์เซ็นต์)} \times 1.724 \quad \dots\dots\dots (2)$$

1.2.5 วิเคราะห์หาความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation exchange capacity: CEC)

ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร 10 กรัมใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 1N NH₄OAc (pH 7.0) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี แช่ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นใช้ Isopropyl alcohol ชะ 1N NH₄OAc (pH 7.0) ส่วนที่ดินไม่ได้ดูดซับไว้แล้วใช้ NaCl 10 เปอร์เซ็นต์ ไล่ที่ NH₄ ที่ดินดูดซับไว้ให้ออกมาอีกที แล้วเก็บตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อทำการกลั่นหาแอมโมเนียมไอออน

นำตัวอย่างสารที่มีแคตไอออนที่สกัดได้มาทำการกลั่นหาแอมโมเนียมไอออน โดยเติม boric acid 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงใน erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปใส่เครื่องกลั่น จากนั้นเติม ตัวอย่างสารที่มีแคตไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดกลั่น นำใส่เครื่องกลั่น และเติม NaOH 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ในเครื่องกลั่น จากนั้นทำการกลั่นและเก็บตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร เพื่อนำไปไทเทรต ด้วย 0.001N HCl (Chapman, 1965) บันทึกผล และคำนวณหาความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนตามสูตรด้านล่าง

$$\text{CEC (cmol/kg)} = \frac{(A-B) \times 0.01 \times C \times 100}{\text{Aliquot} \div D} \dots\dots\dots (3)$$

เมื่อ A = ค่าที่ไทเทรตได้จากตัวอย่าง

B = ค่าที่ไทเทรตได้จาก Blank

C = ปริมาตรของน้ำยาสกัด

Aliquot = สารที่ดูตมมากล้น (10 มิลลิลิตร)

1.2.6 วิเคราะห์ลักษณะเนื้อดิน

ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร 10 กรัม นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายใส่ beaker 125 มิลลิลิตร เติมสารละลาย calgon 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แซ่ทิ้งไว้ 1 คืน ถ่ายสารละลายดินลงใน dispersion cup ใช้น้ำกลั่นล้างดินออกให้หมด และปั่นให้ดินแตกออกจากกัน จากนั้นเทใส่ cylinder 1,000 มิลลิลิตร โดยมีตะแกรงกรองขนาด 0.5 มิลลิเมตร วางอยู่บน cylinder เพื่อกรองอนุภาคขนาดทราย (0.5-2 มิลลิเมตร) ออก และนำอนุภาคทรายที่กรองได้ใส่ถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไปอบจนแห้ง ชั่งน้ำหนัก และบันทึกผล จากนั้นปรับปริมาตรของตัวอย่างใน cylinder ให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง จากนั้นดูตัวอย่างที่ความลึก 10 เซนติเมตร (อนุภาคขนาดดินเหนียว) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้วนำไปอบจนแห้ง ชั่งน้ำหนัก และบันทึกผล จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ อนุภาคขนาดทราย ดินเหนียว ทรายแป้ง ตามสมการ

$$\text{อนุภาคขนาดทราย (เปอร์เซ็นต์)} = 100 \times (\text{น้ำหนักอนุภาคขนาดทราย} \div \text{น้ำหนักดิน})$$

$$\text{อนุภาคขนาดเหนียว (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(100 \div \text{น้ำหนักดิน}) \times 1,000 \times \text{น้ำหนักอนุภาคขนาดดินเหนียว}}{25}$$

25

$$\text{อนุภาคขนาดทรายแป้ง (เปอร์เซ็นต์)} = 100 - (\text{อนุภาคขนาดทราย} + \text{อนุภาคขนาดดินเหนียว})$$

1.3 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินในข้อ 1.1.2 ด้วยชุดสกัด PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, California)

1.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 1.3 เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยการนำดีเอ็นเอของตัวอย่างดินที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (Denville, New Jersey) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร โดยใช้ primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 2 ไมโครลิตร ประกอบด้วย forward primer 967F (5'-ID-CAACGCGAAGAACCTTACC) และ reverse primer 1046R (5'-ID-CGACAGCCATGCANCA CCT) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในตำแหน่ง V6 regions ของ 16S rDNA ในการศึกษาด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์เท่านั้น (Sogin *et al.*, 2006) ซึ่ง จะมี ID คือ ลำดับเบส 6 ตัว ที่แตกต่างกันในแต่ละ reverse primers ทำหน้าที่เป็นตัวจำแนกประชากรของแบคทีเรียหรือ sequence reads ในแต่ละตัวอย่างออกจากกัน ในกระบวนการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ที่ทางบริษัท Illumina คิดค้นขึ้น เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างได้ในครั้งเดียว (Yozwiak *et al.*, 2010) (ตารางที่ 2) สำหรับปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มด้วยขั้น initial denaturation และ *Taq* DNA polymerase activation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้น annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที โดยจำนวนรอบที่ใช้คือ 25 รอบ และ ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PTC-200 DNA Engine Cycler (Bio-Red Laboratories, Inc., USA) จากนั้นทำการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ ด้วย gel electrophoresis ในสารละลาย 0.5X TBE buffer โดยใช้ agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ ผสม ethidium bromide 2 ไมโครลิตร และใช้ 1 Kb plus ladder (Invitrogen, California) เป็นเครื่องหมายในการ

ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ป้อนกระแสไฟฟ้าขนาด 120 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พร้อมถ่ายภาพเพื่อวิเคราะห์ข้อมูล

1.5 การสกัดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.4 จากนั้นนำเจลที่ได้จากการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ มาตัดเจลเฉพาะส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างปรากฏภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต นำชิ้นส่วนเจลที่มีดีเอ็นเอมาทำการสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN, District of Columbia) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำมาใส่ในหลอดพีซีอาร์หลอดเดียวกัน ทั้ง 12 ตัวอย่าง จะได้ปริมาตรรวม 150 ไมโครลิตร หรือได้ปริมาณดีเอ็นเอ 3,000 นาโนกรัม จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มจำนวนในตำแหน่ง V6 regions ในแต่ละตัวอย่างนี้ไปวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ด้วยวิธี Illumina sequencing รูปแบบ Illumina Miseq platform โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่ศูนย์ BioMedical Genomics Center มหาวิทยาลัยมินเนโซต้า (BMGC, Saint Paul, MN)

ตารางที่ 2 Reverse primers ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบยีน 16S rDNA ตำแหน่ง V6 region ของตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง

No.	Illumina-ID	Illumina PCR Primer
1	CTGATC	caagcagaagacggcatacagatCTGATCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
2	CGTACT	caagcagaagacggcatacagatCGTACTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
3	GA CTGA	caagcagaagacggcatacagatGA CTGAgtagtactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
4	GCTCAA	caagcagaagacggcatacagatGCTCAAgtagtactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
5	TGAGGA	caagcagaagacggcatacagatTGAGGAgtagtactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
6	ACAACC	caagcagaagacggcatacagatACAACCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNNCGACRRCCATGCANCACCT
7	ACCTCA	caagcagaagacggcatacagatACCTCAgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
8	ACGGTA	caagcagaagacggcatacagatACGGTAgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
9	AGTTGG	caagcagaagacggcatacagatAGTTGGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
10	CTCTCT	caagcagaagacggcatacagatCTCTCTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
11	CAAGTG	caagcagaagacggcatacagatCAAGTGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNNNCGACAGCCATGCANCACCT
12	CCTTGA	caagcagaagacggcatacagatCCTTGAgtagtactggagttcagacgtgtgctcttccgatctNNNNNNNCGACAGCCATGCANCACCT

ที่มา: Sogin *et al.* (2006); Yozwiak *et al.* (2010)

1.6 การวิเคราะห์ผลข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับวิธีการทางเมตาจีโนมิกส์

นำข้อมูลลำดับเบสของประชากรแบคทีเรียทั้ง 12 ตัวอย่างที่ได้จากข้อ 1.5 มาวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมและสังกะสี ด้วยชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป mothur version 1.27.0 (Huse *et al.*, 2007; Scholoss *et al.*, 2009) โดยใช้คำสั่ง (command) ป้อนข้อมูลลงโปรแกรมเพื่อดึงข้อมูลผลการวิเคราะห์ลำดับเบสจากศูนย์ BioMedical Genomics Center, มหาวิทยาลัยมินเนโซต้า (BMGC, Saint Paul, MN) ผ่านซูเปอร์คอมพิวเตอร์ (supercomputer) ของมหาวิทยาลัยมินเนโซต้า เมื่อได้รับข้อมูลเรียบร้อยแล้ว ขั้นตอนแรกจะทำการป้อนคำสั่งการตัดแต่งลำดับเบสที่ไม่สามารถใช้งานได้ ซึ่งมีลำดับเบส 6 ตัว หรือ Illumina-ID ที่เฉพาะเจาะจงต่อตัวอย่างดีเอ็นเอทั้ง 12 ตัวอย่าง ทำหน้าที่ในการจำแนกประชากรแบคทีเรียหรือ sequence reads แต่ละตัวอย่างออกจากกัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ sequence reads ที่มีคุณภาพดี และคัดแยกจำนวนสปีชีส์ (operational taxonomic units: OTUs) โดยมี SILVA taxonomic database ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับลำดับเบสดำแหน่ง V6 region (Huse *et al.*, 2008) เมื่อได้ข้อมูลโครงสร้างประชากรแบคทีเรียแล้ว ทำการเปรียบเทียบประชากรในแต่ละไฟลัมโดยรายงานผล 5 ไฟลัมเด่นที่มีสัดส่วนประชากรมากที่สุด และสร้างกราฟ rarefaction curves แสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปีชีส์และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จากนั้นทำการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรทั้ง 12 ตัวอย่างเชิงสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปนี้ เช่นเดียวกัน โดยจะทำการวิเคราะห์ดัชนีชี้วัดทางเคมีกายภาพ (physicochemical parameters) เช่น Ace, Chao, Jack, Shannon, non-parametric Shannon, and Simpson diversity index และในขั้นสุดท้ายทำการเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดินแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธี Principal Coordinates Analysis (PCoA) เพื่อจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ในรูปแบบ 2 มิติ (2 dimensions) (Truusa *et al.*, 2011) และทำการเปรียบเทียบปัจจัยด้านอื่นได้แก่ ค่า pH, ค่าการนำไฟฟ้า, ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และ ความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนของดิน ด้วยชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป mothur version 1.27.0 เช่นเดียวกัน

2. ศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสีในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม

2.1 การแยกแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสีจากดิน

ซึ่งตัวอย่างดินที่ได้จากบริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ (*C. odorata*) 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง orbital shaker (200 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 30 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที คูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า เป็น 10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} จากนั้นคูดสารแขวนลอยที่เจือจางได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ของแต่ละระดับการเจือจางมา spread plate ในอาหารแข็ง R2A (Altamira *et al.*, 2012) (ตารางผนวกที่ 1) ที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียที่ได้จากความเข้มข้นที่ 10^{-2} ซึ่งเป็นระดับการเจือจางที่มีโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นในช่วง 30-300 โคโลนี จำนวนตัวอย่างละ 96 โคโลนี มาทำให้บริสุทธิ์ โดยนำไป streak บนอาหาร R2A อีกครั้ง นำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว R2A ที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียเจริญถึงขั้น log phase จากนั้นเก็บแบคทีเรียที่ได้ไว้ใน 96 well collection plate (ความเข้มข้นสุดท้าย glycerol 25 เปอร์เซ็นต์) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.2 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการต้านทานแคลเซียมและสังกะสี

นำแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 96 โคโลนี จำนวนรวม 1,152 โคโลนี streak บนอาหารแข็ง R2A ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีของแบคทีเรียใส่ใน 96 well plate ที่บรรจุอาหารเหลว R2A ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ replicator ประทับสารแขวนลอยที่เจือจางได้ลงบนอาหารแข็ง R2A ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ความเข้มข้น 20, 40, 80, 160 และ 320 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2) ความเข้มข้น 200, 400, 800, 1,600 และ 3,200 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกข้อมูลแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) และซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2) ในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยบันทึกข้อมูลเป็นตัวเลข 1 (1=แบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ และซิงค์คลอไรด์) และ 0 (0=แบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ และซิงค์คลอไรด์) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อทำ dendrogram ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

BioNumeric version 3.5 software (Applied Maths, Belgium) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนในกลุ่มประชากรหลัก กล่าวคือ จำนวนประชากรในกลุ่มใหญ่ที่สามารถต้านทานแคดเมียมและสังกะสีได้ คือกลุ่มประชากรหลัก โดยคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนนี้มาจำนวน 2 กลุ่มของแต่ละตัวอย่างในการศึกษาขึ้นต้านทานแคดเมียมและสังกะสีด้วยเทคนิคพีซีอาร์

2.3 การศึกษาขึ้นต้านทานแคดเมียมและสังกะสี

2.3.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมและสังกะสีที่ได้จากข้อ 2.2 ของ 2 กลุ่มประชากรหลัก ตัวอย่างละ 6 โคโลนี มา streak บนอาหารแข็ง R2A ที่มีการเติมแคดเมียมคลอไรด์ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลวดเขี่ยเชื้อพลาสติกที่ปลอดเชื้อและลงบนโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียใส่ในหลอดพีซีอาร์ ที่มี NaOH ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการปั่นลวดเขี่ยเชื้อพลาสติกเพื่อให้เชื้อผสมเข้ากับ NaOH และนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นก็นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ คูดสารละลายใสหรือดีเอ็นเอที่ได้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดพีซีอาร์หลอดใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนต้านทานแคดเมียมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ศึกษาขึ้นต้านทานแคดเมียมและสังกะสีด้วยไพเมอร์ดังตารางที่ 3 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร forward-reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 2 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerase (Denville, New Jersey) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และใช้ universal primers ประกอบด้วย forward primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ reverse primer 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARC C-3') เป็น positive control (Altimira *et al.*, 2012) สำหรับปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มต้นด้วยขั้น initial denaturation และ Taq DNA polymerase activation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3

นาที่ ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยจำนวนรอบที่ใช้ในคือ 35 รอบ และ ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PCT-200 DNA Engine Cycler (Bio-Red Laboratories, Inc., USA) จากนั้นทำการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ในสารละลาย 0.5X TBE buffer โดยเตรียม agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ และผสมด้วย ethidium bromide 2 ไมโครลิตร และใช้ 1 Kb plus ladder (Invitrogen, California) เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ปลั๊กกระแสไฟฟ้าขนาด 120 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พร้อมถ่ายภาพเพื่อวิเคราะห์ข้อมูล

ตารางที่ 3 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการศึกษายีนต้านทานแคดเมียมและสังกะสี

Primers	Sequence	References
czcC	F: 5'TAGCCACGATCATAGTCATG-3' R: 5'ATCCTTGTTTTCTTAGTGACTT-3'	Cavaco <i>et al.</i> , 2010
czcD	F: 5'ATCTTTTACCACCATGGGCGCAGGTCACACGACC-3' R: 3'GAACATCATACCCTAGTTTCTCTGCAGCAAGCGACTTC-5'	Laila <i>et al.</i> , 2011
nccA	F: 5'-ACGCCGGACATCACGAACAAG-3' R: 3'-CCAGCGCACCGAGACTCATCA-5'	Laila <i>et al.</i> , 2011
cadA	F: 5'-ATGTCTGAACAAAAGGTTAACTAATGGAA-3' R: 5'-CTATTTATCCTTCACTCTCATCAGTCGTAA-3'	Abubakr and Crupper, 2010
cadB	F: 5'-TTTGCTAGAGCAAAGACTAGAAAAGAATAT-3' R: 5'-AAATCCTAAAATTGTTTGAATAGTGCAATTTC-3'	Abubakr and Crupper, 2010

ผลและวิจารณ์

1. ศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสี ที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ (*C. odorata*) ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ (metagenomics)

1.1 สมบัติทางเคมีและทางฟิสิกส์บางประการของดินที่นำมาศึกษา และการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสี

เก็บตัวอย่างดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมและสังกะสีบริเวณตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก โดยเก็บตัวอย่างดินจำนวน 12 ตัวอย่าง (THA1 THA2 THA3 THA4 THA5 THA6 THA7 THA8 THA9 THA10 THA11 และ THA12) ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร จากผิวดิน มาวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์บางประการของดิน และวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีในดิน ดังตารางที่ 4 พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้ออกเป็น 3 กลุ่มตามค่าการวิเคราะห์แคดเมียมและสังกะสี โดยกลุ่มแรก เป็นกลุ่มที่มีแคดเมียมในระดับสูง (High Cd level) ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ THA1 ถึง THA6 มีปริมาณแคดเมียมที่ปนเปื้อนอยู่ในดินมีพิสัยอยู่ในช่วง 72.92-898.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณสังกะสีที่ปนเปื้อนอยู่ในดินมีพิสัยอยู่ในช่วง 2,437.30-19,516.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มที่สอง เป็นกลุ่มที่มีแคดเมียมในระดับปานกลาง (Medium Cd level) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ THA7 ถึง THA10 มีปริมาณแคดเมียมที่ปนเปื้อนอยู่ในดินมีพิสัยอยู่ในช่วง 23.85-34.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณสังกะสีที่ปนเปื้อนอยู่ในดินมีพิสัยอยู่ในช่วง 1,024.80-1467.85 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มที่สามเป็นกลุ่มที่มีแคดเมียมในระดับต่ำ (Low Cd level) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ THA11 และ THA12 มีปริมาณแคดเมียมที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน 9.70 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และปริมาณสังกะสีที่ปนเปื้อนอยู่ในดินมีพิสัยอยู่ในช่วง 557.68 และ 586.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งตัวอย่างดินในกลุ่มที่มีแคดเมียมในระดับสูงมีการปนเปื้อนของแคดเมียมเกินค่ามาตรฐานสำหรับดินที่ใช้ทำการเกษตรของประเทศไทย (37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ตามประกาศของคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ปี 2547

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ประการของดิน พบเนื้อดินส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นดินละเอียดดังตารางที่ 4 เมื่อทำการวิเคราะห์ pH ของดิน พบดินมี pH อยู่ในช่วงเป็นกรดเล็กน้อยถึงด่างเล็กน้อย (pH 6.3-8.1) (ตารางภาคผนวกที่ 2) โดยตัวอย่างดิน THA12 มี pH เป็นกรด

(pH 6.3) ตัวอย่างดิน THA2 THA7 THA8 และTHA11 มี pH เป็นกลาง (pH 6.9-7.1) ในขณะที่ตัวอย่างดิน THA1 THA3 THA4 THA5 THA6 THA9 และTHA10 มี pH เป็นด่าง (pH 7.4-8.1)

การวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้าของดินพบว่า ตัวอย่างดินมีค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง 0.3-11.3 เดซิซีเมนต่อเมตร (ตารางผวกที่ 3) ตัวอย่างดินจัดอยู่ในระดับไม่เค็มถึงเค็มมาก โดยตัวอย่างดิน THA8 และ THA11 เป็นดินที่มีความเค็มอยู่ในระดับเค็มมาก คือมีค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 11.3 เดซิซีเมนต่อเมตร และ 10.5 เดซิซีเมนต่อเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือ ตัวอย่างดิน THA7 ซึ่งเป็นดินที่มีค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 4.2 เดซิซีเมนต่อเมตร ซึ่งความเค็มอยู่ในระดับปานกลาง ในขณะที่ตัวอย่างดิน THA1 THA2 THA3 THA4 THA5 THA6 THA9 THA10 และ THA12 เป็นดินที่มีค่าการนำไฟฟ้า 1.0, 1.0, 0.3, 0.3, 1.3, 1.2, 0.4, 0.9 และ 0.9 เดซิซีเมนต่อเมตร ตามลำดับ จัดอยู่ในระดับความเค็มต่ำ

การวิเคราะห์อินทรียวัตถุพบว่า ตัวอย่างดินมีปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในช่วงกว้างคือ ตั้งแต่ระดับต่ำมากถึงสูงมากเท่ากับ 0.5-5.8 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผวกที่ 4) โดยตัวอย่างดิน THA3 THA4 และ THA8 เป็นดินที่มีปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับสูงเท่ากับ 3.9, 5.8 และ 3.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ ตัวอย่างดิน THA2 THA5 THA6 THA7 THA9 THA10 และ THA11 ซึ่งมีระดับอินทรียวัตถุอยู่ในระดับปานกลางคือ 2.9, 2.9, 3.0, 1.8, 2.0, 2.8 และ 2.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างดิน THA1 และ THA12 มีปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับต่ำ 1.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออน พบว่า ตัวอย่างดินที่มีค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนอยู่ในช่วงเท่ากับ 6.0-26.5 เซนติโมลต่อกิโลกรัม (ตารางผวกที่ 5) โดยตัวอย่างดิน THA4 และ THA8 เป็นดินที่มีค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนอยู่ในระดับสูงเท่ากับ 26.5 และ 25.2 เซนติโมลต่อกิโลกรัม ตามลำดับ รองลงมาคือ ตัวอย่างดิน THA2 THA3 THA6 THA10 และ THA11 ซึ่งมีค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนอยู่ในระดับปานกลางคือ 19.4, 21.2, 16.2, 19.6 และ 18.6 เซนติโมลต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างดิน THA1 THA5 THA7 THA9 และ THA12 มีค่าความจุในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนอยู่ในระดับต่ำ 6.0, 14.8, 12.1, 13.1 และ 14.1 เซนติโมลต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

1.2 ศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสี ที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ (*C. odorata*) ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ (metagenomics)

1.2.1 โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดิน

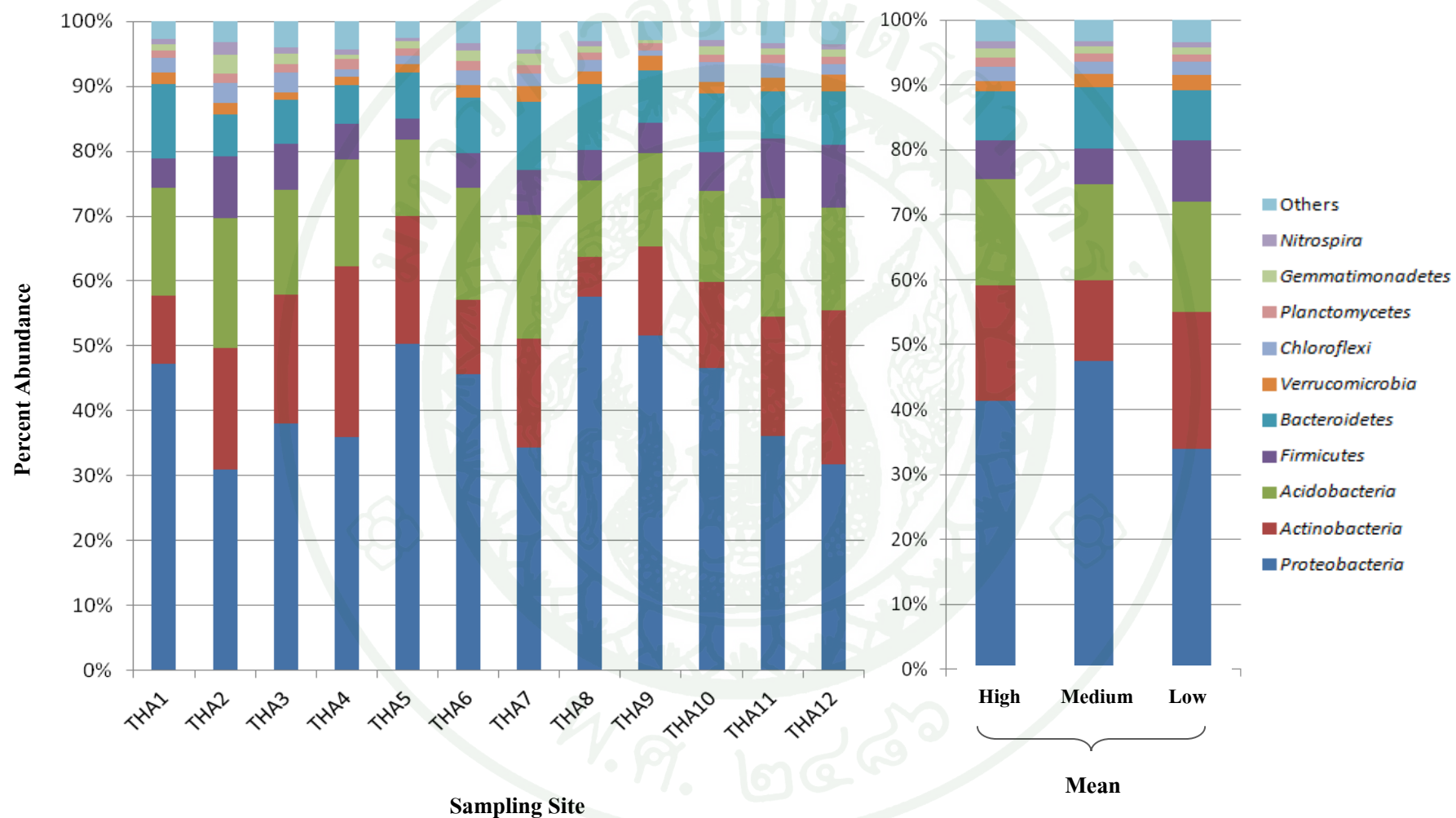
จากการวิเคราะห์โครงสร้างที่ประชากรของจุลินทรีย์ในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมและสังกะสีด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่ศูนย์ BioMedical Genomics Center, มหาวิทยาลัยมินเนโซต้า (BMGC, Saint Paul, MN) พบว่า จำนวน sequence reads ที่ได้ทั้งหมดของตัวอย่างดีเอ็นเอทั้ง 12 ตัวอย่าง มีมากถึง 1.0×10^7 sequences จากนั้นใช้โปรแกรม mothur version 1.27.0 โดยการป้อนคำสั่งลงในโปรแกรมเพื่อนำข้อมูลผลการวิเคราะห์นี้มาจากศูนย์ BioMedical Genomics Center เพื่อนำมาวิเคราะห์ผลในลำดับต่อไปด้วยโปรแกรม mothur version 1.27.0 เช่นเดียวกัน จากผลการวิเคราะห์พบว่า จำนวน sequence reads ที่ได้ทั้งหมด 1.0×10^7 sequences เมื่อทำการคัดกรองลำดับเบสที่ไม่สามารถใช้งานได้ พบว่ามีจำนวน sequence ที่มีคุณภาพดี สามารถนำมาวิเคราะห์ต่อได้มีจำนวน 7.0×10^6 sequences

ผลการวิเคราะห์จำนวน sequence reads หรือการวิเคราะห์หาสปีชีส์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดเทียบกับ SILVA taxonomic database พบจำนวนสปีชีส์ทั้งหมดที่สามารถจำแนกได้ในตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่างเท่ากับ 54,026 สปีชีส์ โดยมีค่าเฉลี่ยในแต่ละตัวอย่าง เท่ากับ $16,528.83 \pm 2,328.39$ สปีชีส์ และพบว่าแบคทีเรีย 99.74 เปอร์เซ็นต์ อาร์เคีย 0.26 เปอร์เซ็นต์ และอีก 0.0001 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถจำแนกได้ แบคทีเรียที่พบในแต่ละตัวอย่างพบว่ามีไฟลัมที่มีลักษณะเด่นหลายไฟลัม แต่ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจนคือ *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Fimicutes* และ *Bacteroidetes* (ภาพที่ 6) ไฟลัมทั้ง 5 ไฟลัมนี้มีจำนวนสปีชีส์ของแบคทีเรียประมาณ 89.17 เปอร์เซ็นต์ ของสปีชีส์ทั้งหมดที่จำแนกได้ในแต่ละตัวอย่าง และมีเพียง 2 OTUs ที่ไม่สามารถจำแนกไฟลัมได้ จากกราฟยังแสดงให้เห็นอีกว่า แบคทีเรียในแต่ละตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมที่ระดับต่างกัน 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับสูง กลุ่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับปานกลาง และ กลุ่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วไม่มีความแตกต่างของประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัม จากนั้นนำ sequence ที่มีคุณภาพดี จำนวน 7.0×10^6 sequences มาทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน sequence และจำนวนสปีชีส์ (operational taxonomic units: OTUs) แต่จากตัวอย่าง THA8 มีจำนวน sequence น้อยที่สุดคือ 5.0×10^5 sequences ดังนั้นการวิเคราะห์นี้จึงใช้ sequence จำนวน 5.0×10^5

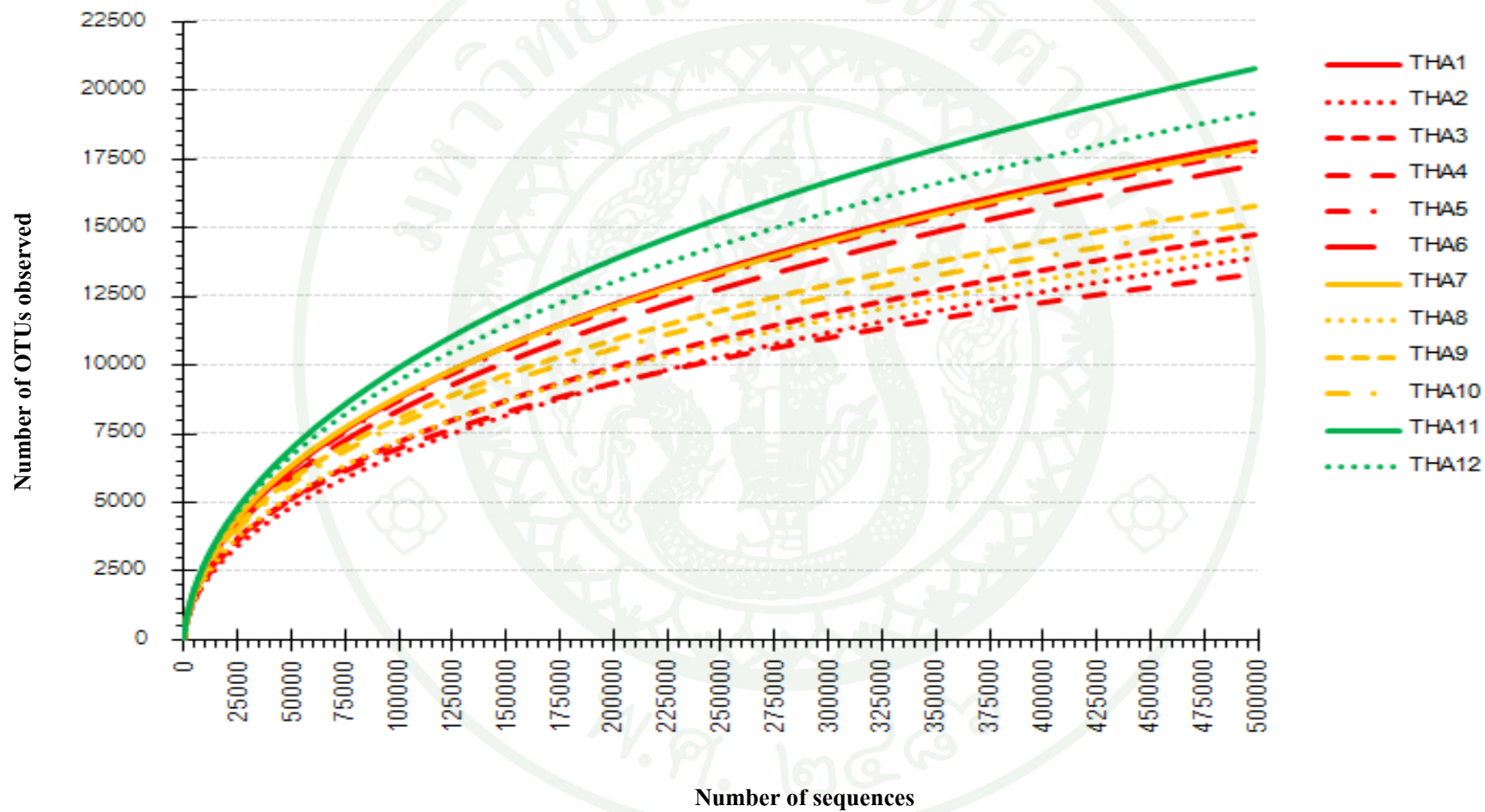
จากแต่ละตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างที่มีความหลากหลายของสปีชีส์มากที่สุดคือ THA11 และ THA12 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมในระดับต่ำ กล่าวคือ ในจำนวน sequence ที่เท่ากับ 5.0×10^5 sequences ของทุกตัวอย่าง ตัวอย่าง THA11 และ THA12 มีจำนวนสปีชีส์ของแบคทีเรียมากที่สุดเท่ากับ 20,801 สปีชีส์ และ 19,196 สปีชีส์ ตามลำดับ และตัวอย่างที่มีความหลากหลายของสปีชีส์น้อยที่สุดคือ THA4 โดยมีจำนวนสปีชีส์ของแบคทีเรียน้อยที่สุดเท่ากับ 13,317 สปีชีส์ (ภาพที่ 7) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่มีปนเปื้อนแคดเมียมอยู่ในระดับต่ำจะมีความหลากหลายของสปีชีส์ของแบคทีเรียมากกว่า ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับปานกลาง และระดับสูงอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 4 สมบัติทางเคมีและทางฟิสิกส์บางประการของดิน ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีในดินจากตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

พื้นที่	บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง	ละติจูด	ลองจิจูด	สมบัติทางฟิสิกส์	สมบัติทางเคมี				ปริมาณแคดเมียมและสังกะสี	
				Texture	pH (1:1)	ECe (dS/m)	OM (%)	CEC (cmol/kg)	Total Cd (mg/kg soil)	Total Zn (mg/kg soil)
THA1	พื้นที่เหมือง	16° 52.8' N	98° 58.4' E	Sandy loam	8.1±0.3	1.0±0.1	1.0±1.1	6.0±0.7	898.2±79.7	19,516.3±3334.9
THA2	พื้นที่เกษตร	16° 55.6' N	98° 58.1' E	Loam	7.1±0.1	1.0±0.0	2.9±0.2	19.4±0.4	103.0±9.8	3,886.0±522.6
THA3	พื้นที่เกษตร	16° 30.4' N	98° 41.1' E	Clay loam	7.8±0.0	0.3±0.0	3.9±1.2	21.2±0.7	97.4±1.6	3,780.1±54.4
THA4	พื้นที่เหมือง	16° 30.4' N	98° 46.9' E	Sandy clay loam	7.7±0.0	0.3±0.0	5.8±0.5	26.5±1.1	76.9±4.5	3,414.4±440.0
THA5	พื้นที่เกษตร	16° 11.8' N	98° 1.7' E	Loam	7.4±1.1	1.3±0.0	2.9±0.0	14.8±0.6	72.9±6.2	2,437.3±152.5
THA6	พื้นที่เกษตร	16° 9.8' N	98° 54.5' E	Loam	7.7±0.0	1.2±0.0	3.0±0.1	16.2±0.7	74.9±8.0	3,130.2±108.1
THA7	พื้นที่เกษตร	16° 11.7' N	98° 1.8' E	Sandy clay	6.9±0.0	4.2±0.2	1.8±0.8	12.1±1.0	34.3±4.5	1,326.0±85.4
THA8	พื้นที่เกษตร	16° 23.1' N	98° 4.1' E	Clay	7.1±0.1	11.3±0.0	3.6±0.2	25.2±2.9	33.9±0.2	1,467.9±72.0
THA9	พื้นที่รกร้างว่างเปล่า	16° 41.6' N	98° 58.3' E	Sandy loam	7.6±0.1	0.4±6.8	2.0±0.0	13.1±0.2	28.2±2.9	1,217.1±134.5
THA10	พื้นที่เกษตร	16° 49.7' N	98° 2.0' E	Loam	7.5±0.1	0.9±0.0	2.8±0.1	19.6±0.8	23.9±0.7	1,024.8±41.6
THA11	พื้นที่เกษตร	16° 53.1' N	98° 3.9' E	Clay	7.0±0.0	10.5±0.2	2.8±0.0	18.6±0.4	9.7±0.8	557.7±26.3
THA12	พื้นที่ฟื้นฟูบริเวณเหมืองเก่า	16° 15.6' N	98° 41.9' E	Sandy clay loam	6.3±0.0	0.9±0.0	0.5±0.3	14.1±0.9	0.1±0.0	586.9±37.6



ภาพที่ 6 อัตราร้อยละของแบคทีเรียไฟลัมที่มีลักษณะเด่น



ภาพที่ 7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน sequences (number of sequences) และจำนวนสปีชีส์ (number of OTUs observed)

1.2.2 ความหลากหลายทางชีวภาพ (biological diversity) และดัชนีชี้วัดทางเคมีกายภาพ (physicochemical parameters)

จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ (biological diversity) พบว่า ค่า Nonparametric Shannon และค่า Shannon ระหว่างกลุ่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับสูง และกลุ่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับต่ำ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Bonferroni's Multiple Comparison Test (ANOVA) พบว่าใน จำนวน sequence ที่เท่ากัน (5.0×10^5 sequence reads) กลุ่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับต่ำ มีความหลากหลายทางชีวภาพ (biological diversity) มากกว่ากลุ่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับสูง อย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.05$) (ตารางที่ 5) สอดคล้องกับค่า Shannon's index เมื่อเทียบกับในทุกกลุ่มความเข้มข้น กลุ่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับต่ำ มีค่าแสดงความหลากหลายของสปีชีส์มากที่สุด นอกจากนี้ความสม่ำเสมอของการกระจายตัวในแต่ละสปีชีส์ในตัวอย่างหนึ่งๆ นั้น กลุ่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในระดับต่ำ มีความสม่ำเสมอมากที่สุด จากผลดังกล่าวจึงอธิบายได้ว่า ปริมาณแคดเมียมที่สูงในดินส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรีย ทำให้ความหลากหลายทางชีววิทยาของแบคทีเรียลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ

วิธีการของ NP Shannon นั้นมีความแตกต่างจาก Shannon คือจะรวมแบคทีเรียที่ไม่สามารถจำแนกชนิด (unclassify OTUs) มาใช้ในการคำนวณด้วย (Chao and Shen, 2003) อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ มีแบคทีเรียเพียง 0.0001 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ดังนั้นผลที่ได้จากทั้งสองวิธีการจึงไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5)

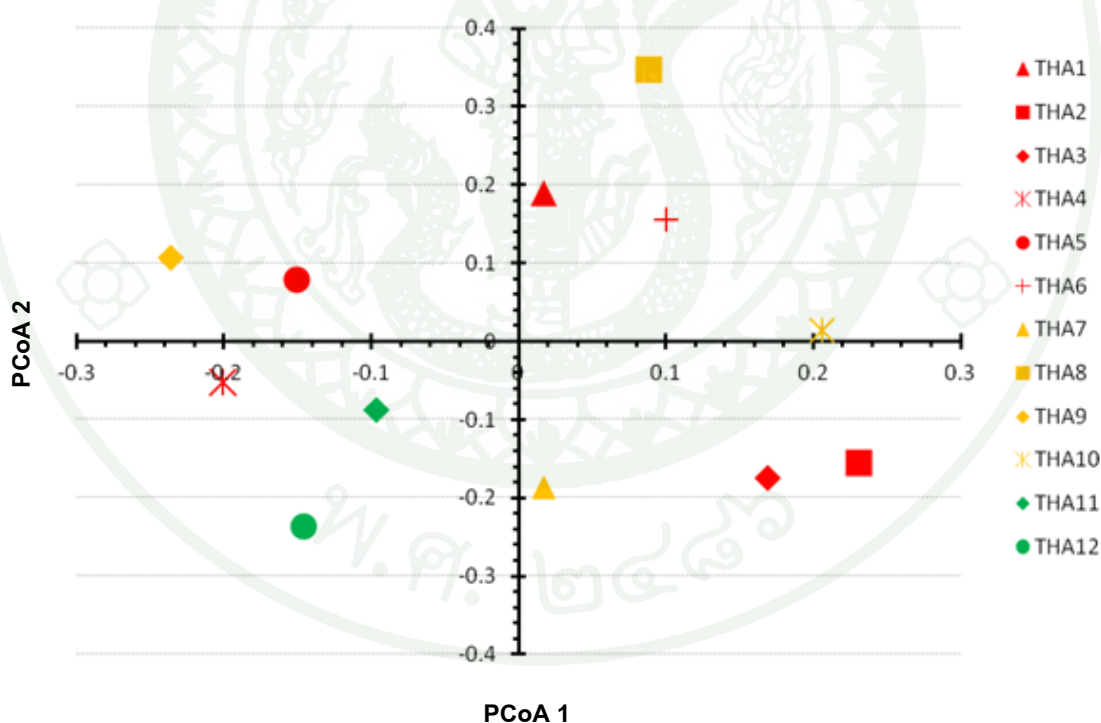
รายงานของ Huber และคณะ (2007) แนะนำให้ใช้โมเดล ACE ในการคำนวณ OTUs richness สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ ในขณะที่ค่า Jackknife มักจะให้ค่าที่มากกว่าความเป็นจริงเสมอ (ตารางที่ 5) โดยตัวแปรสำคัญคือ number of unique และ number of duplicate species ถ้าพบสปีชีส์ที่แตกต่างกันเพิ่มขึ้น จะทำให้ได้ค่าดัชนีเพิ่มมากขึ้น แต่ถ้าหากพบจำนวนสปีชีส์ที่ซ้ำกันมากๆ จะทำให้ได้ค่าความเชื่อมั่นสูงขึ้น (Hill *et al.*, 2003)

ตารางที่ 5 ดัชนีชี้วัดความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในแต่ละตัวอย่าง

Diversity measure	Sampling sites											
	High Cd level (>37 mg/kg.soil)						Medium Cd level (10-37 mg/kg.soil)			Low Cd level (<10 mg/kg.soil)		
	THA1	THA2	THA3	THA4	THA5	THA6	THA7	THA8	THA9	THA10	THA11	THA12
Number of OTUs observed	18,123	13,925	14,731	13,317	17,783	17,295	17,910	14,316	15,801	15,148	20,801	19,196
OTUs richness estimators												
Chao	28,452	21,665	22,750	19,188	27,120	27,459	27,828	21,477	23,544	21,553	32,679	28,535
ACE	34,985	27,528	28,473	22,761	32,966	34,889	34,761	26,129	28,327	25,302	40,711	34,812
Jack	38,576	27,829	30,444	25,338	36,340	35,247	35,372	27,535	30,003	27,329	47,529	37,221
Nonparametric Shannon's index*	7.03	6.86	6.88	6.90	6.89	6.98	7.27	6.50	7.05	7.02	7.40	7.41
Shannon's index (H')*	6.98	6.81	6.83	6.86	6.83	6.93	7.22	6.46	7.00	6.98	7.34	7.36
Shannon evenness index (E)	0.71	0.71	0.71	0.72	0.70	0.71	0.74	0.67	0.72	0.72	0.74	0.75
Simpson's index (D)	0.007	0.004	0.006	0.007	0.015	0.009	0.004	0.016	0.009	0.007	0.003	0.003
Good's coverage	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่มีแคะเมียมระดับสูง มีความหลากหลายทางสปีชีส์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่มีแคะเมียมระดับต่ำ

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในดินแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธี Principal Coordinates Analysis (PCoA) เพื่อจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ในระดับ OTUs ในรูป 2 มิติ (2 dimensions) พบว่า กลุ่มตัวอย่างดินที่มีแคะเมียมในระดับต่ำ จะมีการกระจายตัวอยู่ใน quadrant เดียวกัน ซึ่งกล่าวได้ว่ามีลักษณะทางโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่คล้ายคลึงกันแต่กลุ่มตัวอย่างดินที่มีแคะเมียมในระดับปานกลาง และกลุ่มตัวอย่างดินที่มีแคะเมียมในระดับสูง จะมีลักษณะทางโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่หลากหลาย กระจายอยู่ในเกือบทุก quadrant แต่จะแยกออกมาจากกลุ่มที่มีระดับแคะเมียมต่ำ ดังที่กล่าวมาแล้ว (ยกเว้นตัวอย่าง THA4) แสดงให้เห็นว่า เมื่อดินมีปริมาณแคะเมียมสูงขึ้นถึงในระดับหนึ่ง ลักษณะโครงสร้างทางประชากรแบคทีเรียจะเปลี่ยนไปจากพื้นที่ที่ไม่มีแคะเมียม หรือมีแคะเมียมอยู่ในระดับต่ำ (Ge *et al.*, 2012) (ภาพที่ 8) และจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบปัจจัยด้านอื่น ได้แก่ ค่า pH, ค่าการนำไฟฟ้า, ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนของดิน ไม่พบความสัมพันธ์เกิดขึ้น



R-square = 0.87

ภาพที่ 8 ภาพ PCoA ของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียของดินในแต่ละตัวอย่าง

2. เพื่อศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสีในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม

2.1 การศึกษาความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสี

การทดสอบความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีของแบคทีเรีย ทำโดยศึกษาการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีด้วยวิธีการ Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ซึ่งเป็นวิธีการประเมินความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียมและสังกะสีที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ แต่ในการทดลองนี้ได้นำเทคนิค MICs มาดัดแปลงวิธีการ โดยประเมินความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีของแบคทีเรีย และใช้แคดเมียมคลอไรด์ (CdCl_2) ที่ระดับความเข้มข้น 20-320 มิลลิกรัมต่อลิตร และซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2) ที่ระดับความเข้มข้น 200-3,200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสี โดยจำนวนแบคทีเรียทั้ง 12 ตัวอย่าง สามารถต้านทานแคดเมียมที่ระดับเกินค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรมตามประกาศของคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ปี 2547 กำหนดให้มีแคดเมียมในดินไม่เกิน 37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 96.44 และสามารถต้านทานแคดเมียมได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 26.65 ที่ระดับความเข้มข้น 320 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบแบคทีเรียสามารถต้านทานสังกะสีที่ระดับเกินค่ามาตรฐานคุณภาพดินของกรมพัฒนาที่ดินที่กำหนดให้สังกะสีมีค่าไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 97.31 และสามารถต้านทานสังกะสีได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 2.25 ที่ระดับความเข้มข้น 3,200 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสี ด้วยการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Bionumeric version 3.5 เพื่อสร้าง dendrogram โดยอ้างอิงข้อมูลความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีของแบคทีเรียทั้ง 12 ตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้น 20-320 มิลลิกรัมต่อลิตร และระดับความเข้มข้น 200-3,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 9 และ 10 และสามารถแบ่งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสีออกเป็นกลุ่มประชากรหลัก กล่าวคือ จำนวนประชากรในกลุ่มใหญ่ที่สามารถต้านทานแคดเมียมและสังกะสีได้คือกลุ่มประชากรหลัก ที่ระดับความคล้ายคลึงสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในกลุ่มตัวอย่างดินที่มีแคดเมียมในระดับสูง (THA1 THA2 THA3 THA4 THA5 และ THA6) มีแบคทีเรียในกลุ่มประชากรหลักใน

แต่ละตัวอย่างสามารถต้านทานแคดเมียมและสังกะสีอยู่ที่ระดับ 320/1600 (35.42 เปอร์เซ็นต์), 320/800 (43.75 เปอร์เซ็นต์), 80/200 (44.79 เปอร์เซ็นต์), 320/800 (15.63 เปอร์เซ็นต์), 320/800 (26.04 เปอร์เซ็นต์) และ 320/3200 (34.38 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ในกลุ่มตัวอย่างดินที่มีแคดเมียมในระดับปานกลาง (THA7 THA8 THA9 และTHA10) มีแบคทีเรียในกลุ่มประชากรหลักในแต่ละตัวอย่างสามารถต้านทานแคดเมียมและสังกะสีอยู่ประมาณ 40/200 (15.63 เปอร์เซ็นต์), 80/400 (30.25 เปอร์เซ็นต์), 160/1600 (47.92 เปอร์เซ็นต์) และ 160/400 (40.63 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ในกลุ่มตัวอย่างดินที่มีแคดเมียมในระดับต่ำ (THA11 และTHA12) มีแบคทีเรียในกลุ่มประชากรหลักในแต่ละตัวอย่างสามารถต้านทานแคดเมียมและสังกะสีอยู่ประมาณ 160/200 (15.63 เปอร์เซ็นต์) และ 80/200 (35.42 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

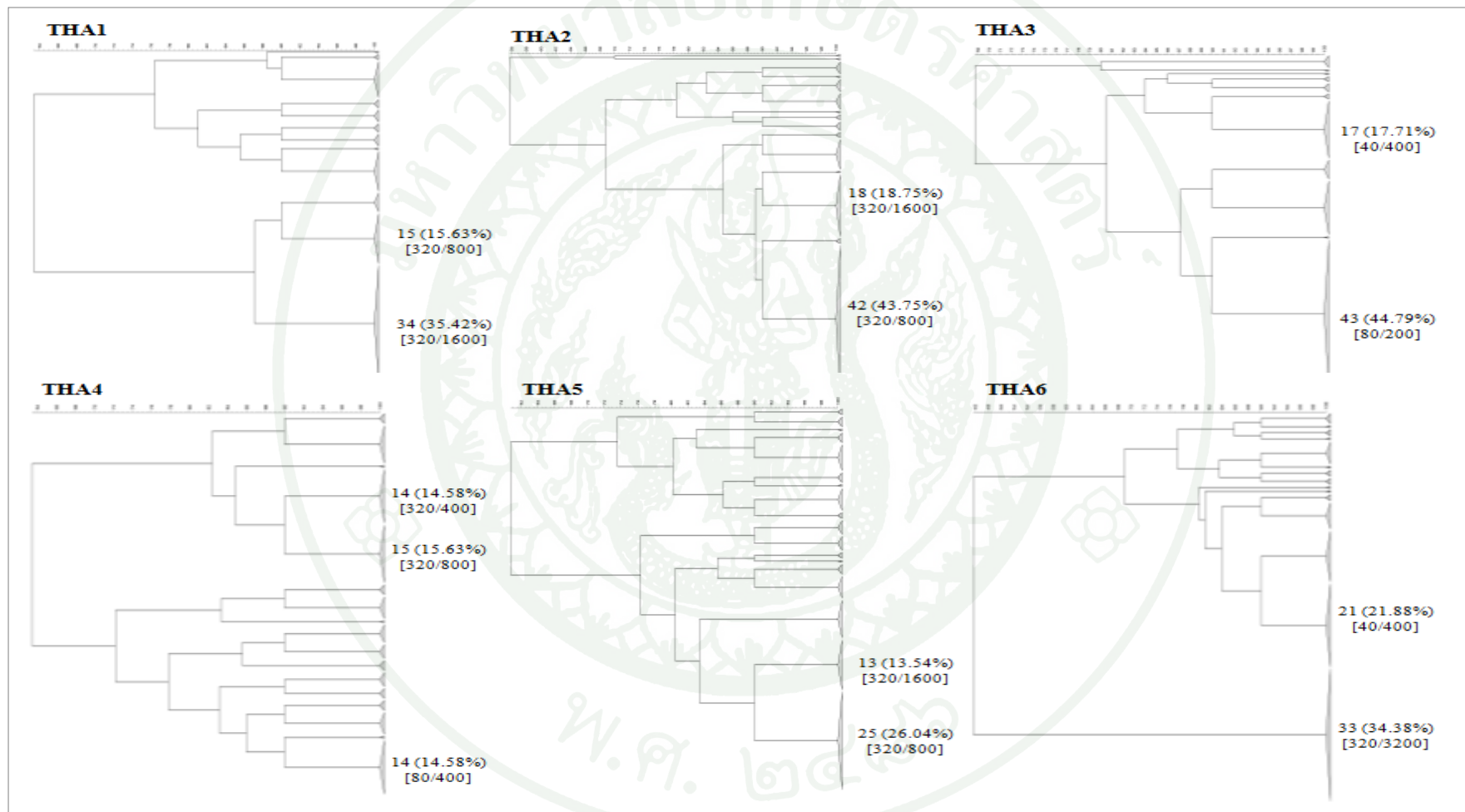
จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมและสังกะสีด้วยวิธีการ MIC จากตัวอย่างดินทั้ง 12 ตัวอย่างมีความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีลดลง เมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมและสังกะสีเพิ่มขึ้น และพบว่าในแบคทีเรียของกลุ่มประชากรหลักในแต่ละตัวอย่างมีการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีในระดับที่เท่ากัน อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและสังกะสีที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันอาจมีกลุ่มของยีนชนิดเดียวกัน ดังนั้นจากการวิเคราะห์ dendrogram จะได้กลุ่มประชากรหลักของแต่ละตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาต้านทานแคดเมียมและสังกะสี

2.2 การศึกษายีนต้านทานแคดเมียมและสังกะสี

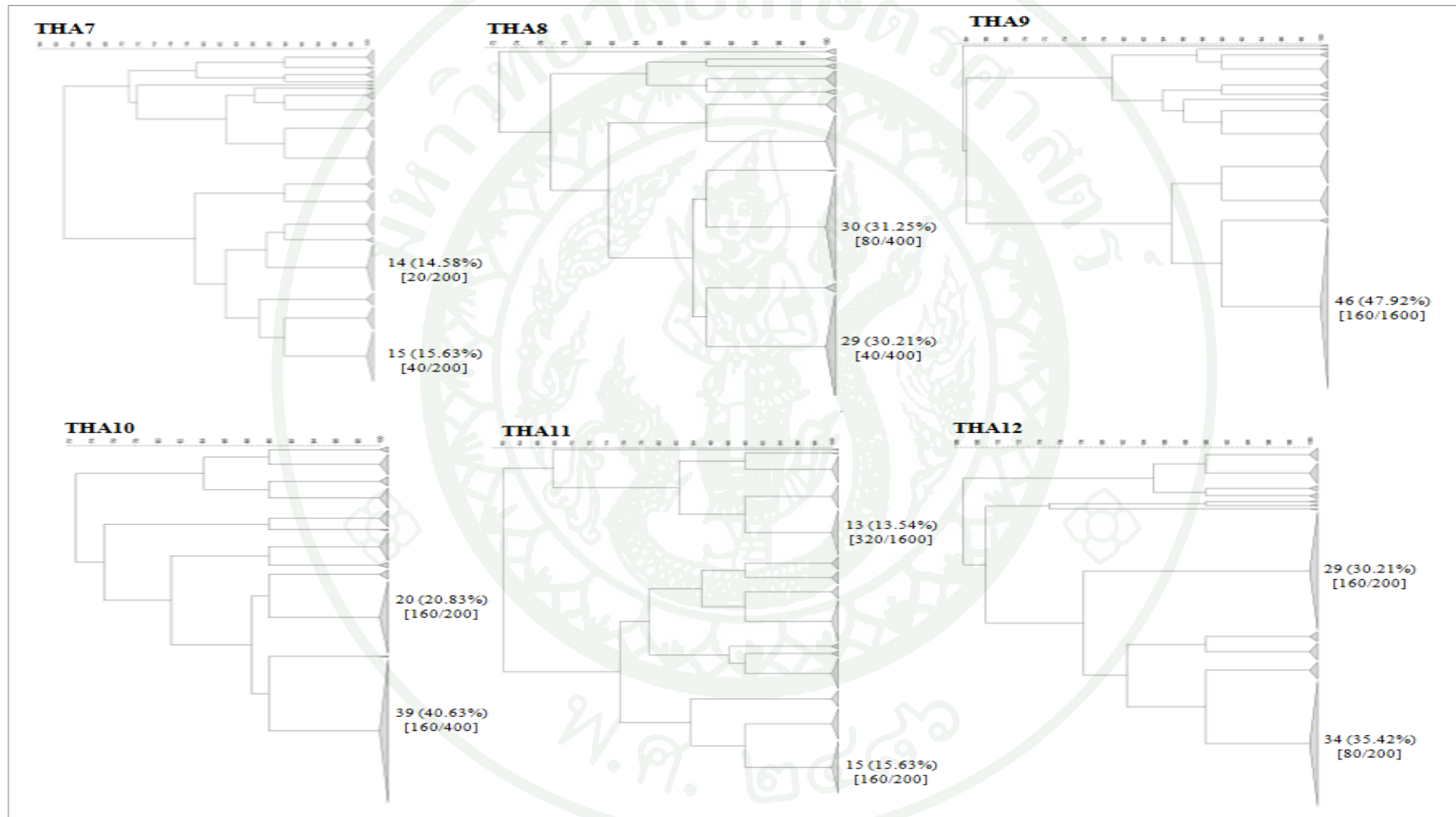
จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมและสังกะสีด้วยวิธีการ MICs สามารถคัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียจากกลุ่มประชากรหลักในแต่ละตัวอย่างมาทำการศึกษาโดยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อป่งชี้แบคทีเรียที่ต้านทานแคดเมียมและสังกะสี โดยใช้ไพรเมอร์ *czrC* (Cavaco *et al.*, 2010), *czcD*, *nccA* (Laila *et al.*, 2011), *cadA* และ *cadB* (Abubakr and Crupper, 2010) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ไม่สามารถตรวจสอบยีนที่ต้านทาน

แคดเมียมและสังกะสีได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ผลการทดลองในครั้งนี้แบคทีเรียที่คัดแยกได้อาจเป็น
ยีนชนิดใหม่ที่ต้านทานแคดเมียมและสังกะสี





ภาพที่ 9 Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสีของตัวอย่างดิน THA1-THA6



ภาพที่ 10 Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสีของตัวอย่างดิน THA7-THA12

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสีต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตรจากตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สวด จังหวัดตาก มาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีบางประการของดิน พบว่า เนื้อดินส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นดินร่วน มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.3-8.1 ดินมีค่าความเค็มอยู่ในระดับไม่เค็มถึงเค็มมาก มีปริมาณอินทรีย์วัตถุต่ำมากถึงสูงมาก ค่าการแลกเปลี่ยนแคตไอออนมีค่าต่ำถึงสูง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมและสังกะสีที่ปนเปื้อนในดินพบ การปนเปื้อนแคดเมียมปริมาณ 0.1-898.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และการปนเปื้อนสังกะสีในดินปริมาณ 577.7-19,516.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่มีแคดเมียมปนเปื้อนอยู่ในระดับสูง (THA1 THA2 THA3 THA4 THA5 และ THA6) กลุ่มที่มีแคดเมียมปนเปื้อนอยู่ในระดับปานกลาง (THA7 THA8 THA9 และ THA10) และกลุ่มที่มีแคดเมียมปนเปื้อนอยู่ในระดับต่ำ (THA11 และ THA12)

การวิเคราะห์ผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสีในดินด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์ โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ (*C. odorata*) จากตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สวด จังหวัดตาก พบว่ามี แบคทีเรีย 99.74 เปอร์เซ็นต์ อาร์เคีย 0.26 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 0.0001 เปอร์เซ็นต์ พบแบคทีเรียไฟลัมที่มีลักษณะเด่น 5 ไฟลัม ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดคือ *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Fimicutes* และ *Bacteroidetes* ใน 5 ไฟลัมนี้มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 89.17 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนที่พบทั้งหมด จากนั้นทำการวิเคราะห์ดัชนีความหลากหลายทางชีวภาพพบว่า ค่า NP Shannon และ Shannon ของกลุ่มที่มีแคดเมียมปนเปื้อนอยู่ในระดับต่ำ มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่ากลุ่มที่มีแคดเมียมปนเปื้อนอยู่ในระดับสูง

จากนั้นทำการวิเคราะห์ PCoA ของโครงสร้างประชากรของทุกตัวอย่างพบว่า กลุ่มที่มีแคดเมียมปนเปื้อนอยู่ในระดับต่ำ มีการกระจายตัวอยู่ใน quadrant เดียวกัน มีลักษณะประชากรคล้ายคลึงกัน แต่กลุ่มที่มีแคดเมียมปนเปื้อนอยู่ในระดับปานกลาง และ กลุ่มที่มีแคดเมียมปนเปื้อนอยู่ในระดับสูง มีการกระจายตัวอยู่ทุกๆ quadrant

การวิเคราะห์การแพร่กระจายและความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสี โดยการทดสอบ MIC พบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถด้านทานแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 20-320 มิลลิกรัมต่อลิตร และสังกะสีที่ระดับความเข้มข้น 200-3,200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถแบ่งแบคทีเรียด้านทานแคดเมียมและสังกะสีออกเป็นกลุ่มประชากรหลักตัวอย่างละ 2 กลุ่ม จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนจากกลุ่มประชากรหลักที่ระดับความคล้ายคลึงสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ มาทำการศึกษาในด้านทานแคดเมียมและสังกะสีด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อบ่งชี้แบคทีเรียที่มียีนด้านทานแคดเมียม พบว่า ไพรมเมอร์ที่ใช้ไม่สามารถตรวจสอบยีนที่ด้านทานแคดเมียมและสังกะสีได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ในครั้งนี้แบคทีเรียที่คัดแยกได้อาจเป็นยีนชนิดใหม่ที่ด้านทานแคดเมียมและสังกะสี

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถด้านทานแคดเมียมและสังกะสีนี้ ในแปลงทดลองเพื่อศึกษาลักษณะของแบคทีเรียต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งจะเป็แนวทางในการบำบัดแคดเมียมและสังกะสีที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อไป
2. ควรศึกษาหาชนิดใหม่ทางด้านทานแคดเมียมและสังกะสีที่อาจพบเกิดขึ้นได้ ซึ่งจะเป็องค์ความรู้ใหม่ทางด้านงานวิจัยในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

พิชิต พงษ์สกุล, สุรสิทธิ์ อรรถจารุ และสุรทิน แก้วโรจน์. 2543. การดูดซับแคดเมียมในดิน.

วารสารดินและปุ๋ย 22: 163-173.

ภควดี ตีรวงศาโรจน์, รัชดาภรณ์ ศรีปรารักษ์, ปิยนันท์ หาญพิชาญชัย, วีรวัฒน์ แซ่มปรีดา, สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์, กุศล ภูชนกกิจ และลิลี่ เอื้อวิไลจิตร. 2548. การสร้างเมตาจีโนมิกไลบรารีและการคัดกรองคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อค้นหาไลโปไลติกเอนไซม์จากป้อน้ำพุร้อนแอ่งซ้อน. ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, นครปฐม.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2013. จังหวัดตาก. แหล่งที่มา: <http://th.wikipedia.org/wiki/จังหวัดตาก>, 30 มกราคม 2556.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2541. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศุภมาส พนิชศักดิ์พัฒนา. 2545. ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการป้องกันและจัดการภัยพิบัติ. 2012. พิษจากโลหะหนักที่ชื่อว่าแคดเมียม. แหล่งที่มา: <http://dpm.nida.ac.th/main/index.php/articles/chemical-hazards/itemlist/tag/>, 1 สิงหาคม 2555.

Abubakr, S. and S.S. Crupper. 2010. Prevalence of cadmium resistance in *Staphylococcus sciuri* isolated from the Gray Treefrog, *Hyla chrysoscelis* (Anura: Hylidae). **Phyllomedusa: Journal of Herpetology** 9(2): 141-146.

Amacher, M.C. 1996. Methods of soil analysis: nickel, cadmium and lead, pp. 739-745. In D. L. Sparks, ed. **Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods**. SSSA, Inc., USA.

- Amann, R.L., W. Ludwig and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 59: 143-169.
- Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR). 1995. **Toxicological Profile for Zinc**. Public Health Service, Department of Health and Human Services, USA.
- Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR). 2008. **ToxGuide™ for Ethylbenzene**. Public Health Service, Department of Health and Human Services, USA.
- Abou-Shanab, R.A.I., P. van Berkum and J.S. Angle. 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. **Chemosphere** 68: 360-367.
- Altimira, F., C. Yanez, G. Bravo, M. Gonzalez, L. A. Rojas and M. Seeger. 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. **BMC Microbiology** 12: 193.
- Anton, A., C. Grosse, C. Reissmann, T. Pribyl and D.H. Nies. 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia sp.* strain CH34. **Journal of Bacteriology** 181: 6876-6881.
- Arjan, J.K. and K. Harikrishnan. 2011. Metagenomic analysis of bacterial diversity in the rice rhizosphere soil microbiome. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering** 3: 361-367.
- Baath, E. 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations. **Water, Air and Soil Pollution** 47: 335 – 379.

- Baker, A.J.M., S. P. McGrath, R.D. Reeves and J.A.C. Smish. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils, pp. 85-107. *In* N. Terry and G. Banuelos., eds. **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Lewis Publishers, Florida.
- Bais, H.P., T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy and J.M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **The Annual Review of Plant Biology** 57:233–266.
- Beck, D.A.C., M.G. Kalyuzhnaya, S. Malfatti, S.G. Tringe, T.G.D. Rio, N. Ivanova, M.E. Lidstrom and L. Chistoserdova. 2013. A metagenomic insight into freshwater methane-utilizing communities and evidence for cooperation between the Methylococcaceae and the Methylophilaceae **Peer Journal** 1-23.
- Breitbart, M., P. Salamon, B. Andresen, J.M. Mahaffy, A.M. Segall, D. Mead, F. Azam and F. Rohwer. 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. **Proceeding of the National Academy of Sciences of America** 99: 14250–14255.
- Breitbart, M., A. Hoare, A. Nitti, J. Siefert, M. Haynes, E. Dinsdale, R. Edwards, V. Souza, F. Rohwer and D. Hollander. 2009. Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. **Environmental Microbiology** 11: 16-34.
- Canovas, D., I. Cases and V. Lorenzo. 2003. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. **Environmental Microbiology** 5: 1242-1256.

Cavaco, L.M., H. Hasman, M. Stegger, P.S. Andersen, R. Skov, A.C. Fluit T. Ito and F.M.

Aarestrup. 2010. Cloning and Occurrence of *czrC*, a Gene Conferring Cadmium and zinc resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 9: 3605-3608.

Chao, A. and T.J. Shen. 2003. Nonparametric Estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. **Environmental and Ecological Statistics** 10: 429-443.

Chapman, H.D. 1965. Cation exchange capacity, pp. 891-901. In C.A. Black, ed. **Method of soil analysis, part II: chemical and microbiological properties**. Agron. Inc., Wisconsin.

Chi, Q.Q., G.W. Zhu and A. Langdon. 2007. Bioaccumulation of heavy metals in fishes from Taihu Lake, China. **Journal of Environment Science** 19: 1500-1504.

Chudamani, J., D.L. Jan, V.A. Jelte, K.S. Andrew, D.L. Hari, C.V.D. Iris and N. Nawang. 2006. Indirect remote sensing of a cryptic forest understorey invasive species. **Forest Ecology and Management** 225: 245-256.

Chugh, L.K. and S.K. Sawhney. 1996. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. **Environmental Pollution** 92: 1-5.

Committee on metagenomics: Challenges and functional applications. 2007. **The new Science of Metagenomics : Revealing the Secrets of our Microbial Planet**. The national Academies press, Washington D.C.

Coombs, J.M. and T. Barkay. 2004. Molecular evidence for the evolution of metal homeostasis genes by lateral gene transfer in bacteria from the deep terrestrial subsurface. **Applied and Environmental Microbiology** 70: 1698-1707.

- Damek, P.M. and K.K. Sawicka. 2003. Damage of the liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworkers and zinc smelters in Poland. **Toxicology** 186: 1-10.
- Darrah, P.R. 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. **Plant and Soil** 155-156: 1-20.
- Domino, J.L. 1994. Metal-induced developmental toxicity in mammal. **Toxicology Environment Health** 42: 123-141.
- Franke, S., G. Grass, C. Rensing and D.H. Nies. 2003. Molecular analysis of the copper transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** 185: 3804-3812.
- Fischer, A., K. Whiteson, V. Lazarevic, J. Hibbs, P. Francois and J. Schrenzel. 2012. Infant gut microbial colonization and health: recent findings from metagenomics studies. **Journal of Integrated Omics** 2:1-16.
- Ge, Y., J.P. Schimel and P.A. Holden. 2012. Identification of Soil Bacteria Susceptible to TiO₂ and ZnO Nanoparticles. **Applied and Environmental Microbiology** 78: 6749-6758.
- Grass, G., B. Fan, B.P. Rosen, S. Franke, D.H. Nies and C. Rensing. 2001. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** 183: 4664-4667.
- Hassan, M.T., D. van der Lelie, D. Springael, U. Romling, N. Ahmed and M. Mergeay. 1999. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Gene** 238: 417-425.

Hesse, P.R. 1971. Textbook of Soil Chemical Analysis, pp. 371-378. **William Clowes and Sons Limited**, London.

Hill, T.C.J., K.A. Walsh, J.A. Harris and B.F. Moffett. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology** 43: 1-11.

Huber, J.A., D.B. Mark Welch, H.G. Morrison, S.M. Huse, P.R. Neal, D.A. Butterfield and M.L. Sogin. 2007. Microbial Population Structures in the Deep Marine Biosphere. **Science** 318: 97-100.

Hugenholtz, P., B.M. Goebel and N.R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology** 180: 4765-4774.

Huse, S.M., J.A. Huber, H.G. Morrison, M.L. Sogin and W.D. Mark. 2007. **Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing**. Marine Biological Laboratory at Woods Hole, USA.

Huse, S.M., L. Dethlefsen, J.A. Huber, W.D. Mark, D.A. Relman and M.L. Sogin. 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. **PLoS Genetic** 4:e1000255.

Hynninen, A. 2010. **Zinc cadmium and resistance mechanism in bacteria and their contribution to biosensing**. Department of Food and Environmental Sciences Faculty of Agriculture and Forestry University of Helsinki, Finland.

Jerome Nriago. 2011. **Zinc toxicity in humans**. School of Public Health, University of Michigan, USA.

- Jia, S., Z. Wang, X.X. Zhang, B. Liu, W. Li and S. Cheng. 2013. Metagenomic analysis of cadmium and copper resistance genes in activated sludge of a tannery wastewater treatment plant. **Journal of Environment Biology** 34: 375-380.
- Kamizono, A., M. Nishizawa, Y. Teranishi, K. Murata and A. Kimura. 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & General Genetic** 219: 161-167.
- Kanazawa, S. and K. Mori. 1996. Isolation of cadmium-resistant bacteria and their resistance mechanisms. **Soil Science and Plant Nutrition** 42: 725-730.
- Kermanshahi, R.K., A. Ghazifard and A. Tavakoli. 2007. Identification of bacteria resistant to heavy metals in the soils of Isfahan province. **Iranian Journal of Science & Technology** 31: 7-16.
- Kennedy, J., B. Flemer, S.A. Jackson, D.P.H. Lejon, J.P. Morrissey, F. O’Gara and A.D.W. Dobson. 2010. Marine Metagenomics: New Tools for the Study and Exploitation of Marine Microbial Metabolism. **Marine Drugs** 8: 608-628.
- Kobayashi, E., Y. Okubo, Y. Suwazono, T. Kido, M. Nishijo, K. Nakagawa and K. Nogawa. 2002. Association between total cadmium intake calculated from the cadmium concentration in household rice and mortality among inhabitants of the cadmium-polluted Jinzu River basin of Japan. **Toxicology Letter** 129: 85-91.
- Kowalchuk, G.A., D.S. Buma, W. de Boer, P.G.L. Klinkhamer and J.A. van Veen. 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. **Antonie van Leeuwenhoek** 81: 509–520.

- Laila, M.A., K.B. Wagdy, H.A. Thanaa and F.M. Karima. 2011. Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Egyptian soils. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation** 6: 201-211.
- Liles, M.R., B.F. Manske, S.B. Bintrim, J. Handelsman and R.M. Goodman. 2003. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 2684-2691.
- Lloyd, J. and J.A. Taylor. 1994. On the temperature dependence of soil respiration. **Functional Ecology** 8: 315-323.
- Metzker M.L. 2009. Sequencing technologies the next generation. **Nature reviews** 11: 31-46
- Michael P.W. 2003. Review Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research** 533: 107-120.
- Nicoletta, R. and N.I. Flavia. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?. **Plant Science** 180: 169-181.
- Nies, D.H. and S. Silver. 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology** 171: 896-900.
- Nies, D.H. 1999. Microbial heavy metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 51: 730-750.
- Nordberg, G. 2003. Cadmium and human health: a perspective based on recent studies in China. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine** 16: 307-319.

- Nucifora, G., L. Chu, T.K. Misra and S. Silver. 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium efflux ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 86: 3544-8.
- Nwuche, C.O. and E.O. Ugoji. 2008. Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity. **Journal of Environment Science Technmology** 5: 409-414.
- Oger, C., J. Mahillon and F. Petit. 2003. Distribution and diversity of a cadmium resistance (*cadA*) determinant and occurrence of IS257 insertion sequences in *Staphylococcal* bacteria isolated from a contaminated estuary (Seine, France). **FEMS Microbiology Ecology** 43: 173-183.
- Olivier, J. 2008. **Long-term fate of zinc in contaminated soils: zinc speciation by synchrotron spectroscopy and chemical extractions**. Ph.D. Thesis, University of Neuchatel.
- Phaenark, C., P. Pokethitiyook, M. Kruatrachue and C. Ngernsansaruay. 2009. Cd and Zn accumulation in plants from the padaeng zinc mine area. **International Journal of Phytoremediation** 11: 479-495.
- Pius, J. 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology** 238: 272-279.
- Qing, H., D. Minna, Q. Hongyan, X. Xiangming, Z. Guoqiang and Y. Min. 2007. Detection, isolation, and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE. **Journal of Environmental Sciences** 19: 1114-1119.
- Rathnayake, I.V.N., M. Megharaj, N. Bolan and R. Naidu. 2010. Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. **International Journal of Civil and Environmental Engineering** 4: 191-195.

- Rensing, C., B. Mitra and B.P. Rosen. 1997. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn (II)-translocating P-type ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 94: 14326-14331.
- Riesenfeld, C.S., P.D. Schloss and J. Handelsman. 2004. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. **Annual Review of Genetics** 38: 525-552.
- Rondon, M.R., P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K.A. Loiacono, B.A. Lynch, I.A. MacNeil, C. Minor, C.L. Tiong, M. Gilman, M.S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman and R.M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 2541-2547.
- Roane, T.M. and S.T. Kellogg. 1996. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. **Canadian Journal of Microbiology** 42: 593-603.
- Ruamkuson, D. and M. Ketudat-Cairns. 2009. Optimum conditions for DGGE of 16S rDNA from *Sulfolobus* intestinal tract micro flora. **Science and Technology** 16(4): 311-317.
- Scherer, J. and D.H. Nies. 2009. CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. **Molecular Microbiology** 73: 601-621.
- Schmidt, T. and H.G. Schlegel. 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. **Journal of Bacteriology** 176: 7045-7054.
- Schloss, P.D. and J. Handelsman 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology** 14: 303-310.

- Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R. A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Horn and C.F. Weber. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology** 75: 7537-7541.
- Shah, K. and J.M. Nongkynrih. 2007. Metal hyperaccumulation and bioremediation. **Biologia Plantarum** 4: 618-634.
- Sheoran, V., A.S. Sheoran and P. Poonia. 2011. Role of Hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. **Environmental Science and Technology** 41: 168-214.
- Steffen, M.M., Z. Li, T.C. Effler, L.J. Hauser, G.L. Boyer and S.W. Wilhelm. 2012. Comparative Metagenomics of Toxic Freshwater Cyanobacteria Bloom Communities on Two Continents. **PLOS ONE** 7: 1-9.
- Silver, S. and G. Ji. 1994. Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. **Environmental Health Perspectives** 102: 107-113.
- Simmons, R.W., P. Pongsakul, R.L. Chaney, D. Saiyasitpanich, S. Klinphoklap and W. Nobuntou. 2003. The relative exclusion of zinc and iron from rice grain in relation to rice grain cadmium as compared to soybean: Implications for human health. **Plant Soil** 257: 163-170.
- Simmons, R.W., P. Pongsakul, D. Saiyasitpanich and S. Klinphoklap. 2005. Elevated levels of cadmium and zinc in paddy soils and elevated levels of cadmium in rice grain downstream of a zinc mineralized area in Thailand: Implications for public health. **Environment Geochemistry and Health** 27: 501-511.

- Sogin, M.L., H.G. Morrison, J.A. Huber, W. D. Mark, S.M. Huse, P.R. Neal, J.M. Arrieta and G.J. Herndl. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103: 12115-12120.
- Trajanovska, S., L.B. Margaret and M. Bhawe. 1997. Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. **Biodegradation** 8: 113-124.
- Tringe, S.G. and E.M. Rubin. 2005. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics** 6: 805-814.
- Truusa, M., E. Rasmann, M. Metsis, T. Kango, I. Tamm L. Lilje and M. Ameerikas. 2011. Impact of monoculture practices and fertilization regimes on the diversity of the bacterial communities in soil, **Proceedings of the 6th IOBC Working Group Meeting on Multitrophic Interactions in soil**. 4-7 April 2011, Tallinn University of Technology. Cordoba, Spain
- Turnbaugh, P.J., R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini., E.R. Mardis and J.I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature** 444:1027-1031.
- Vassilev, A., J. Vangronsveld and I. Yordanov. 2002. Cadmium phytoextraction: present state, biological backgrounds and research needs. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**. 28: 68-95.
- Walkley, A. and C.A. Black. 1934. An examination of Degtiareff Method for determining soil organic matter: a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science** 37: 29-35.

- Wang, X. and D. Zabowski. 1998. Nutrient composition of Douglas-fir rhizosphere and bulk soil solutions. **Plant and Soil** 200: 13-20.
- Wang, L. and P.S. Qi. 2010. **The construction of metagenome of metal contaminated river sediments and screening heavy metal resistant gene.** State Key Laboratory of Urban Water Resources and Environment, Harbin, China.
- Wang, A., F.Z. Wu, W.Q. Yang, L.Q. Zhou, X.X. Wang and Y. Han. 2011. Effects of cadmium stress on the microbial biodiversity in purple soil and alluvial soil potted with a poplar (*Populus deltoides* x *Populus nigra*). **Environmental Sciences and Tehnology** 32 : 2133-2143.
- Wuertz, S. and M. Mergeay. 1997. The impact of heavy metals on soilmicrobial communities and their activities, pp. 1-20. *In* J. D. Elsas, E.M.H. Wellington, J.T. Trevors, Eds. **Modern Soil Microbiology.** Marcel Decker, New York.
- Xiong, A. and R.K. Jayaswal. 1998. Molecular characterization of a chromosomal determinant conferring resistance to zinc and cobalt ions in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology** 180: 4024-4029.
- Yozwiak, N.L., C.P. Skewes, A. Gordon, S. Saborio, G. Kuan, A. Balmaseda, D. Ganem, E. Harris and J.L. Derisi. 2010. Human Enterovirus 109: a novel interspecies recombinant enterovirus isolated from a case of acute pediatric respiratory illness in Nicaragua. **Journal of Virology** 84: 9047-9058.
- Zhang, Y., H. Zhang and X. Li. 2008. The cadA gene in cadmium-resistant bacteria from cadmium-polluted soil in the zhangshi area of northeast China. **Current Microbiology** 56: 236-239.

Zhang, W., C. Jiajia, Y. Yang, T. Yifei, S. Jing and S. Bairong. 2011. A practical comparison of *De Novo* genome assembly software tools for next-generation sequencing technologies. **PLOS ONE** 6: e17915.



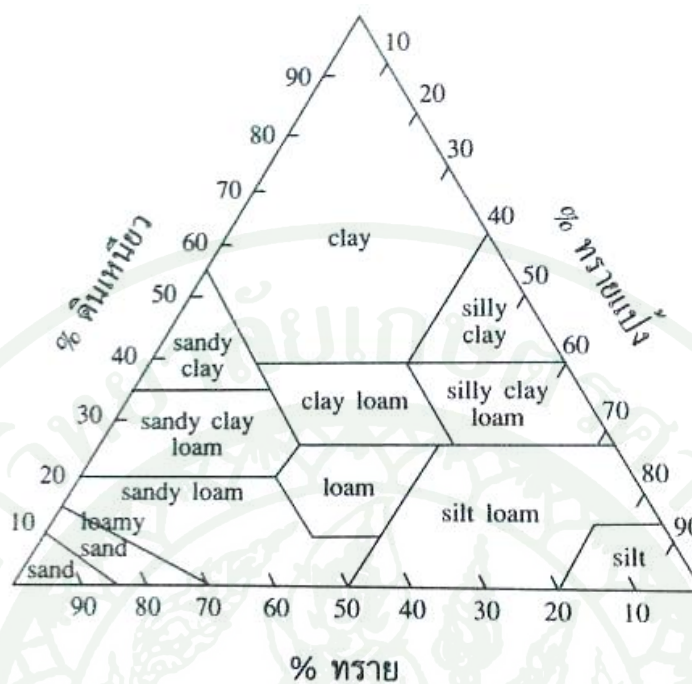


ตารางผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารแข็ง R2A

สารเคมี	ปริมาณ
Yeast Extract	0.5 กรัม
Proteose Peptone No. 3	0.5 กรัม
Casamino Acids	0.5 กรัม
Dextrose	0.5 กรัม
Soluble Starch	0.5 กรัม
Sodium Pyruvate	0.3 กรัม
Dipotassium Phosphate	0.3 กรัม
Magnesium Sulfate	0.05 กรัม
Agar	15.0 กรัม

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Altimira *et. al.* (2012)

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7 ด้วย 1 N NaOH แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที



ภาพผนวกที่ 1 ไคอะแกรมสามเหลี่ยมแบ่งประเภทของเนื้อดิน (soil texture triangle) ตามสัดส่วนโดยมวลของอนุภาคขนาดทราย (sand) อนุภาคขนาดทรายแป้ง (silt) และอนุภาคขนาดดินเหนียว (clay)

ที่มา: คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2541)

ตารางผนวกที่ 2 ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาเดิน

ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาเดิน	พีเอช
กรดรุนแรงมากที่สุด	<3.5
กรดรุนแรงมาก	3.5-4.5
กรดจัดมาก	4.5-5.0
กรดจัด	5.1-5.5
กรดปานกลาง	5.6-6.0
กรดเล็กน้อย	6.1-6.5
กลาง	6.6-7.3
ด่างเล็กน้อย	7.9-8.4
ด่างปานกลาง	7.9-8.4
ด่างจัด	8.5-9.0
ด่างจัดมาก	>9.5

ที่มา: คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2541)

ตารางผนวกที่ 3 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน

ระดับความเค็ม	การนำไฟฟ้า (เดซิซีเมนต์ต่อเมตร)
ไม่เค็ม	0-2
ไม่เค็ม	2- <4
เค็ม	4 หรือสูงกว่า 4
เค็มปานกลาง	4-8
เค็มมาก	>8-16
เค็มมากที่สุด	>16

ที่มา: คณะกรรมาธิการวิชาการ (2541)

ตารางผนวกที่ 4 มาตรฐานอินทรีย์วัตถุในดิน

ระดับ	อินทรีย์วัตถุ (เปอร์เซ็นต์)
ต่ำมาก	< 0.5
ต่ำ	0.5-1.0
ต่ำปานกลาง	>1.0-1.5
ปานกลาง	>1.5-2.5
สูงปานกลาง	>2.5-3.5
สูง	>3.5-4.5
สูงมาก	>4.5

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 5 ระดับความสามารถในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนของดิน

ระดับ	การแลกเปลี่ยนแคตไอออนของดิน (เซนติโมลต่อกิโลกรัม)
ต่ำมาก	<5
ต่ำ	5-15
ปานกลาง	15-25
สูง	25-40
สูงมาก	>40

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์ ในการศึกษาผลกระทบของแคดเมียมและสังกะสี ที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณไรโซสเฟียร์ของสาบเสือ *C. odorata* (L.) ด้วยวิธีการเมตาจีโนมิกส์

สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP)	10	1
10X PCR buffer	25	5
Primer F	100	2
Primer R	100	2
Taq DNA Polymerase	5 (unit)	0.5
DNA	-	2
H ₂ O	-	37.5

ตารางผนวกที่ 7 อุณหภูมิ ระยะเวลา และจำนวนรอบในการตั้งค่าเครื่องพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบของปฏิกิริยา
Initiation	95	3 min	} 25 cycle
Denaturing	95	30 sec	
Annealing	55	30 sec	
Extention	72	30 sec	
Final extention	72	3 min	

ตารางผนวกที่ 8 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์ ในการศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายของยีนต้านทานแคดเมียมและสังกะสีในพื้นที่ปนเปื้อนแคดเมียม

สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP)	10	1
10X PCR buffer	25	5
Primer F	100	2
Primer R	100	2
Taq DNA Polymerase	5 (unit)	0.5
DNA	-	2
H ₂ O	-	37.5

ตารางผนวกที่ 9 อุณหภูมิ ระยะเวลา และจำนวนรอบในการตั้งค่าเครื่องพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบของปฏิกิริยา
Initiation	95	3 min	} 35 cycle
Denaturing	95	1 min	
Annealing	50	1 min	
Extention	72	1 1/2 min	
Final extention	72	7 min	

ตารางผนวกที่ 10 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA1

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR10001	320	1,600	1	TR10025	160	400	9
TR10002	160	800	2	TR10026	320	800	3
TR10003	320	800	3	TR10027	320	800	3
TR10004	320	800	3	TR10028	320	1,600	1
TR10005	320	1,600	1	TR10029	160	400	9
TR10006	40	400	4	TR10030	160	400	9
TR10007	80	200	5	TR10031	80	800	10
TR10008	320	800	3	TR10032	320	800	3
TR10009	320	800	3	TR10033	80	200	5
TR10010	320	800	3	TR10034	320	1,600	1
TR10011	40	400	4	TR10035	40	800	8
TR10012	320	800	3	TR10036	160	400	9
TR10013	320	1,600	1	TR10037	160	400	9
TR10014	320	1,600	1	TR10038	320	1,600	1
TR10015	40	400	4	TR10039	160	800	2
TR10016	160	200	6	TR10040	320	1,600	1
TR10017	320	1,600	1	TR10041	320	1,600	1
TR10018	320	1,600	1	TR10042	80	400	11
TR10019	40	200	7	TR10043	160	200	6
TR10020	320	1,600	1	TR10044	40	400	4
TR10021	320	800	3	TR10045	40	800	8
TR10022	40	800	8	TR10046	320	1,600	1
TR10023	320	800	3	TR10047	320	1,600	1
TR10024	40	400	4	TR10048	320	1,600	1

ตารางผนวกที่ 11 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR10049	320	1,600	1	TR10073	80	200	5
TR10050	320	1,600	1	TR10074	320	1,600	1
TR10051	160	800	2	TR10075	320	1,600	1
TR10052	160	800	2	TR10076	320	800	3
TR10053	80	800	10	TR10077	160	800	2
TR10054	320	1,600	1	TR10078	80	200	5
TR10055	40	400	4	TR10079	320	1,600	1
TR10056	320	1,600	1	TR10080	320	400	12
TR10057	320	1,600	1	TR10081	40	400	4
TR10058	40	800	8	TR10082	320	1,600	1
TR10059	320	1,600	1	TR10083	40	200	7
TR10060	320	1,600	1	TR10084	40	400	4
TR10061	320	1,600	1	TR10085	160	400	9
TR10062	320	800	3	TR10086	160	400	9
TR10063	160	400	9	TR10087	160	400	9
TR10064	320	1,600	1	TR10088	160	400	9
TR10065	40	200	7	TR10089	320	1,600	1
TR10066	320	1,600	1	TR10090	320	1,600	1
TR10067	160	400	9	TR10091	40	400	4
TR10068	320	1,600	1	TR10092	320	800	3
TR10069	40	400	4	TR10093	40	400	4
TR10070	80	800	10	TR10094	160	800	2
TR10071	320	1,600	1	TR10095	320	800	3
TR10072	320	1,600	1	TR10096	40	400	4

ตารางผนวกที่ 12 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA2

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR20001	320	200	1	TR20025	320	800	4
TR20002	40	400	2	TR20026	320	400	6
TR20003	80	800	3	TR20027	320	800	4
TR20004	320	800	4	TR20028	320	400	6
TR20005	320	800	4	TR20029	320	1600	5
TR20006	320	800	4	TR20030	320	800	4
TR20007	320	800	4	TR20031	320	800	4
TR20008	320	800	4	TR20032	320	800	4
TR20009	40	400	2	TR20033	40	400	2
TR20010	320	1600	5	TR20034	320	1600	5
TR20011	320	800	4	TR20035	320	800	4
TR20012	320	400	6	TR20036	160	800	9
TR20013	40	400	2	TR20037	320	1600	5
TR20014	320	800	4	TR20038	320	800	4
TR20015	160	1600	7	TR20039	160	400	10
TR20016	320	800	4	TR20040	320	800	4
TR20017	320	800	4	TR20041	40	800	11
TR20018	320	400	6	TR20042	320	800	4
TR20019	320	800	4	TR20043	40	800	11
TR20020	320	800	4	TR20044	320	800	4
TR20021	160	200	21	TR20045	40	800	11
TR20022	320	400	6	TR20046	320	800	4
TR20023	320	800	4	TR20047	320	0	12
TR20024	320	400	6	TR20048	160	400	10

ตารางผนวกที่ 13 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR20049	320	1600	5	TR20073	80	400	14
TR20050	80	800	3	TR20074	320	1600	5
TR20051	320	800	4	TR20075	80	800	3
TR20052	160	400	10	TR20076	320	800	4
TR20053	320	800	4	TR20077	320	800	4
TR20054	40	800	11	TR20078	320	1600	5
TR20055	320	1600	5	TR20079	320	800	4
TR20056	40	0	13	TR20080	320	400	6
TR20057	320	1600	5	TR20081	320	1600	5
TR20058	320	800	4	TR20082	320	800	4
TR20059	320	800	4	TR20083	320	400	6
TR20060	320	800	4	TR20084	320	1600	5
TR20061	320	1600	5	TR20085	320	800	4
TR20062	80	400	14	TR20086	320	800	4
TR20063	80	800	3	TR20087	160	800	9
TR20064	320	800	4	TR20088	320	800	4
TR20065	320	800	4	TR20089	80	800	3
TR20066	320	1600	5	TR20090	320	200	1
TR20067	320	800	4	TR20091	320	1600	5
TR20068	320	1600	5	TR20092	320	400	6
TR20069	320	800	4	TR20093	40	20	15
TR20070	320	1600	5	TR20094	320	800	4
TR20071	320	1600	5	TR20095	320	800	4
TR20072	320	800	4	TR20096	320	1600	5

ตารางผนวกที่ 14 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่
สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA3

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR30001	80	200	1	TR30025	40	400	7
TR30002	320	400	2	TR30026	160	400	4
TR30003	80	400	3	TR30027	40	400	7
TR30004	80	200	1	TR30028	80	200	1
TR30005	80	400	3	TR30029	80	200	1
TR30006	80	400	3	TR30030	40	1600	9
TR30007	80	200	1	TR30031	40	400	7
TR30008	160	400	4	TR30032	40	400	7
TR30009	40	800	5	TR30033	40	800	5
TR30010	80	200	1	TR30034	40	400	7
TR30011	80	200	1	TR30035	80	200	1
TR30012	80	200	1	TR30036	80	200	1
TR30013	320	400	2	TR30037	80	200	1
TR30014	320	1600	6	TR30038	80	400	8
TR30015	320	400	2	TR30039	40	400	7
TR30016	40	400	7	TR30040	40	400	7
TR30017	80	200	1	TR30041	160	400	4
TR30018	80	200	1	TR30042	80	200	1
TR30019	80	200	1	TR30043	40	800	5
TR30020	80	200	1	TR30044	80	200	1
TR30021	320	400	2	TR30045	80	400	3
TR30022	80	200	1	TR30046	80	400	3
TR30023	80	200	1	TR30047	80	200	1
TR30024	80	400	8	TR30048	160	400	4

ตารางผนวกที่ 15 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA3 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR30049	40	400	7	TR30073	40	400	7
TR30050	80	400	3	TR30074	80	400	8
TR30051	160	400	4	TR30075	80	200	1
TR30052	40	400	7	TR30076	80	200	1
TR30053	40	400	7	TR30077	80	200	1
TR30054	80	200	1	TR30078	80	200	1
TR30055	40	400	7	TR30079	80	200	1
TR30056	40	400	7	TR30080	80	400	8
TR30057	40	200	10	TR30081	80	200	1
TR30058	40	200	10	TR30082	80	200	1
TR30059	80	400	8	TR30083	80	800	11
TR30060	80	200	1	TR30084	80	200	1
TR30061	40	400	7	TR30085	80	200	1
TR30062	160	400	4	TR30086	160	200	12
TR30063	40	400	7	TR30087	80	200	1
TR30064	40	400	7	TR30088	80	200	1
TR30065	80	800	11	TR30089	80	200	1
TR30066	80	400	8	TR30090	80	400	8
TR30067	80	200	1	TR30091	80	200	1
TR30068	80	400	8	TR30092	80	200	1
TR30069	80	200	1	TR30093	80	200	1
TR30070	80	200	1	TR30094	80	400	8
TR30071	80	200	1	TR30095	80	400	8
TR30072	80	200	1	TR30096	80	200	1

ตารางผนวกที่ 16 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA4

รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR40001	320	800	1	TR40025	40	400	13
TR40002	160	800	2	TR40026	40	200	10
TR40003	320	800	1	TR40027	320	1600	3
TR40004	320	1600	3	TR40028	80	400	5
TR40005	80	800	4	TR40029	80	400	5
TR40006	80	400	5	TR40030	160	200	13
TR40007	80	800	4	TR40031	320	800	1
TR40008	320	400	6	TR40032	320	800	1
TR40009	320	200	7	TR40033	320	400	6
TR40010	20	200	8	TR40034	160	400	15
TR40011	20	200	8	TR40035	80	400	5
TR40012	20	200	8	TR40036	40	800	11
TR40013	320	3200	9	TR40037	320	1600	3
TR40014	320	800	1	TR40038	320	800	1
TR40015	320	800	1	TR40039	320	800	1
TR40016	40	200	10	TR40040	40	800	11
TR40017	40	800	11	TR40041	80	400	5
TR40018	40	200	10	TR40042	160	400	15
TR40019	40	0	2	TR40043	320	400	6
TR40020	320	400	6	TR40044	80	400	5
TR40021	320	1600	3	TR40045	320	800	1
TR40022	320	400	6	TR40046	160	800	2
TR40023	20	200	8	TR40047	80	400	5
TR40024	320	800	1	TR40048	320	400	6

ตารางผนวกที่ 17 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR40049	80	400	5	TR40073	160	200	13
TR40050	320	400	6	TR40074	320	400	6
TR40051	40	400	13	TR40075	320	800	1
TR40052	320	400	6	TR40076	20	400	16
TR40053	320	3200	9	TR40077	40	800	11
TR40054	320	1600	3	TR40078	160	400	15
TR40055	320	3200	9	TR40079	160	400	15
TR40056	320	800	1	TR40080	320	400	6
TR40057	320	800	1	TR40081	20	200	8
TR40058	80	400	5	TR40082	320	400	6
TR40059	320	400	6	TR40083	160	400	15
TR40060	320	1600	3	TR40084	80	400	5
TR40061	160	200	13	TR40085	320	1600	3
TR40062	320	400	6	TR40086	40	400	13
TR40063	80	400	5	TR40087	80	400	5
TR40064	320	1600	3	TR40088	320	800	1
TR40065	320	1600	3	TR40089	20	400	16
TR40066	80	800	4	TR40090	80	400	5
TR40067	80	400	5	TR40091	40	400	13
TR40068	20	400	16	TR40092	20	200	8
TR40069	40	400	13	TR40093	160	200	13
TR40070	320	800	1	TR40094	320	400	6
TR40071	40	400	13	TR40095	160	800	2
TR40072	80	200	17	TR40096	320	1600	3

ตารางผนวกที่ 18 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA5

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR50001	80	800	1	TR50025	320	3200	2
TR50002	320	3200	2	TR50026	320	800	5
TR50003	80	200	3	TR50027	320	800	5
TR50004	320	3200	2	TR50028	320	800	5
TR50005	320	1600	4	TR50029	320	3200	2
TR50006	320	800	5	TR50030	40	400	11
TR50007	320	1600	4	TR50031	20	400	13
TR50008	320	1600	4	TR50032	320	200	14
TR50009	320	800	5	TR50033	160	1600	7
TR50010	160	800	6	TR50034	20	400	13
TR50011	160	1600	7	TR50035	320	800	5
TR50012	320	1600	4	TR50036	320	800	5
TR50013	80	200	8	TR50037	320	800	5
TR50014	80	1600		TR50038	320	800	5
TR50015	80	200	3	TR50039	320	3200	2
TR50016	320	800	5	TR50040	320	800	5
TR50017	320	3200	2	TR50041	320	800	5
TR50018	160	800	6	TR50042	320	800	5
TR50019	320	400	10	TR50043	320	400	10
TR50020	40	400	11	TR50044	160	400	15
TR50021	40	400	11	TR50045	20	400	13
TR50022	40	400	11	TR50046	320	400	10
TR50023	40	1600	12	TR50047	160	400	15
TR50024	320	1600	4	TR50048	80	400	16

ตารางผนวกที่ 19 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR50049	320	1600	4	TR50073	160	1600	7
TR50050	320	800	5	TR50074	320	1600	4
TR50051	320	800	5	TR50075	320	1600	4
TR50052	320	3200	2	TR50076	40	800	17
TR50053	320	800	5	TR50077	160	200	18
TR50054	320	800	5	TR50078	320	3200	2
TR50055	80	400	16	TR50079	40	1600	12
TR50056	80	400	16	TR50080	40	400	11
TR50057	80	400	16	TR50081	320	1600	4
TR50058	160	800	6	TR50082	320	200	14
TR50059	160	800	6	TR50083	40	1600	12
TR50060	160	800	6	TR50084	320	800	5
TR50061	80	400	16	TR50085	320	3200	2
TR50062	320	800	5	TR50086	320	800	5
TR50063	40	400	11	TR50087	320	200	14
TR50064	320	400	10	TR50088	320	800	5
TR50065	320	800	5	TR50089	320	3200	2
TR50066	80	800	1	TR50090	40	800	17
TR50067	40	400	11	TR50091	320	800	5
TR50068	160	800	6	TR50092	320	1600	4
TR50069	80	400	16	TR50093	320	1600	4
TR50070	320	200	14	TR50094	20	200	19
TR50071	320	1600	4	TR50095	320	1600	4
TR50072	320	800	5	TR50096	320	800	5

ตารางผนวกที่ 20 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA6

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR60001	20	200	1	TR50025	320	3200	3
TR60002	40	400	2	TR50026	40	200	5
TR60003	320	3200	3	TR50027	40	200	5
TR60004	320	3200	3	TR50028	40	400	2
TR60005	320	3200	3	TR50029	320	3200	3
TR60006	320	3200	3	TR50030	40	400	2
TR60007	320	3200	3	TR50031	40	400	2
TR60008	40	400	2	TR50032	40	400	2
TR60009	160	400	4	TR50033	40	400	2
TR60010	40	400	2	TR50034	320	800	7
TR60011	40	400	2	TR50035	320	3200	3
TR60012	160	400	4	TR50036	320	800	7
TR60013	40	200	5	TR50037	40	200	5
TR60014	40	400	2	TR50038	80	800	8
TR60015	40	200	5	TR50039	320	3200	3
TR60016	40	200	5	TR50040	320	3200	3
TR60017	40	800	6	TR50041	320	3200	3
TR60018	40	400	2	TR50042	40	200	5
TR60019	320	800	7	TR50043	40	400	2
TR60020	40	400	2	TR50044	160	800	10
TR60021	80	800	8	TR50045	320	800	7
TR60022	40	400	2	TR50046	40	800	6
TR60023	80	400	9	TR50047	320	3200	3
TR60024	40	400	2	TR50048	40	800	6

ตารางผนวกที่ 21 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR60049	80	200	11	TR50073	320	3200	3
TR60050	40	400	2	TR50074	320	800	7
TR60051	40	400	2	TR50075	320	800	7
TR60052	320	3200	3	TR50076	320	3200	3
TR60053	320	3200	3	TR50077	40	800	6
TR60054	320	3200	3	TR50078	320	3200	3
TR60055	40	800	6	TR50079	160	200	13
TR60056	320	3200	3	TR50080	40	200	5
TR60057	40	200	5	TR50081	320	3200	3
TR60058	40	800	6	TR50082	160	800	10
TR60059	320	3200	3	TR50083	20	800	14
TR60060	40	400	2	TR50084	40	0	15
TR60061	320	3200	3	TR50085	320	3200	3
TR60062	320	3200	3	TR50086	40	200	5
TR60063	320	3200	3	TR50087	40	200	5
TR60064	320	3200	3	TR50088	40	400	2
TR60065	40	400	2	TR50089	320	3200	3
TR60066	320	3200	3	TR50090	40	400	2
TR60067	320	3200	3	TR50091	40	200	5
TR60068	80	400	9	TR50092	40	800	6
TR60069	320	400	12	TR50093	320	3200	3
TR60070	320	3200	3	TR50094	40	200	5
TR60071	160	400	4	TR50095	20	800	14
TR60072	320	3200	3	TR50096	320	3200	3

ตารางผนวกที่ 22 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA7

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR70001	40	200	1	TR70025	80	1600	11
TR70002	80	400	2	TR70026	80	400	2
TR70003	80	800	3	TR70027	320	400	10
TR70004	40	200	1	TR70028	80	800	3
TR70005	80	200	4	TR70029	80	1600	11
TR70006	80	400	2	TR70030	40	200	1
TR70007	320	200	5	TR70031	20	200	6
TR70008	20	200	6	TR70032	20	400	12
TR70009	20	200	6	TR70033	40	200	1
TR70010	40	200	1	TR70034	40	200	1
TR70011	40	0	7	TR70035	20	200	6
TR70012	320	1600	8	TR70036	40	200	1
TR70013	320	1600	8	TR70037	40	200	1
TR70014	40	400	9	TR70038	80	400	2
TR70015	40	400	9	TR70039	80	200	4
TR70016	80	200	4	TR70040	160	800	13
TR70017	40	400	9	TR70041	20	400	12
TR70018	320	1600	8	TR70042	20	400	12
TR70019	320	400	10	TR70043	20	400	12
TR70020	80	400	2	TR70044	20	400	12
TR70021	80	800	3	TR70045	80	800	3
TR70022	40	200	1	TR70046	40	1600	14
TR70023	20	200	6	TR70047	80	1600	11
TR70024	80	400	2	TR70048	40	400	9

ตารางผนวกที่ 23 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA7 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR80049	80	800	3	TR80073	20	800	17
TR80050	40	200	1	TR80074	80	400	2
TR80051	40	200	1	TR80075	20	200	6
TR80052	40	200	1	TR80076	20	0	18
TR80053	40	200	1	TR80077	20	200	6
TR80054	20	200	6	TR80078	20	800	17
TR80055	40	400	9	TR80079	80	200	4
TR80056	40	400	9	TR80080	20	0	18
TR80057	320	800	15	TR80081	20	0	18
TR80058	40	0	7	TR80082	320	400	10
TR80059	80	400	2	TR80083	320	1600	8
TR80060	40	200	1	TR80084	80	400	2
TR80061	160	400	16	TR80085	20	0	18
TR80062	160	400	16	TR80086	80	400	2
TR80063	40	200	1	TR80087	20	0	18
TR80064	160	400	16	TR80088	20	200	6
TR80065	160	400	16	TR80089	80	400	2
TR80066	160	400	16	TR80090	20	800	17
TR80067	20	200	6	TR80091	20	200	6
TR80068	160	400	16	TR80092	20	0	18
TR80069	20	800	17	TR80093	20	200	6
TR80070	40	400	9	TR80094	20	200	6
TR80071	320	1600	8	TR80095	20	400	12
TR80072	20	0	18	TR80096	20	200	6

ตารางผนวกที่ 24 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA8

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR80001	160	200	1	TR80025	80	200	3
TR80002	40	200	2	TR80026	80	400	8
TR80003	160	200	1	TR80027	160	800	10
TR80004	160	200	1	TR80028	80	200	3
TR80005	160	200	1	TR80029	80	400	8
TR80006	80	200	3	TR80030	40	400	5
TR80007	80	200	3	TR80031	320	800	11
TR80008	320	400	4	TR80032	40	400	5
TR80009	40	400	5	TR80033	160	400	6
TR80010	160	400	6	TR80034	40	400	5
TR80011	80	800	7	TR80035	320	400	4
TR80012	40	400	5	TR80036	40	400	5
TR80013	40	200	2	TR80037	80	400	8
TR80014	80	200	3	TR80038	80	400	8
TR80015	80	400	8	TR80039	40	400	5
TR80016	40	400	5	TR80040	80	200	3
TR80017	80	400	8	TR80041	80	400	8
TR80018	80	400	8	TR80042	40	400	5
TR80019	40	400	5	TR80043	80	400	8
TR80020	80	200	3	TR80044	40	400	5
TR80021	40	400	5	TR80045	80	200	3
TR80022	80	400	8	TR80046	80	200	3
TR80023	40	800	9	TR80047	80	200	3
TR80024	80	400	8	TR80048	80	200	3

ตารางผนวกที่ 25 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA8 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR80049	80	200	3	TR80073	80	400	8
TR80050	80	200	3	TR80074	80	400	8
TR80051	40	400	5	TR80075	40	400	5
TR80052	160	400	6	TR80076	80	400	8
TR80053	40	400	5	TR80077	80	400	8
TR80054	40	400	5	TR80078	80	400	8
TR80055	160	800	10	TR80079	40	400	5
TR80056	80	400	8	TR80080	40	800	9
TR80057	80	200	3	TR80081	40	800	9
TR80058	40	400	5	TR80082	40	400	5
TR80059	320	800	11	TR80083	80	200	3
TR80060	80	400	8	TR80084	80	400	8
TR80061	40	400	5	TR80085	80	400	8
TR80062	80	400	8	TR80086	40	400	5
TR80063	40	400	5	TR80087	80	400	8
TR80064	40	400	5	TR80088	80	400	8
TR80065	80	400	8	TR80089	80	400	8
TR80066	80	400	8	TR80090	80	400	8
TR80067	40	400	5	TR80091	40	400	5
TR80068	80	400	8	TR80092	80	400	8
TR80069	40	400	5	TR80093	160	200	1
TR80070	80	400	8	TR80094	40	400	5
TR80071	40	400	5	TR80095	40	400	5
TR80072	160	400	6	TR80096	160	400	6

ตารางผนวกที่ 26 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA9

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR90001	160	200	1	TR90025	80	800	6
TR90002	160	1600	2	TR90026	160	1600	2
TR90003	160	400	3	TR90027	160	800	4
TR90004	160	800	4	TR90028	160	1600	2
TR90005	160	1600	2	TR90029	160	1600	2
TR90006	20	800	5	TR90030	40	200	8
TR90007	160	1600	2	TR90031	40	200	8
TR90008	160	1600	2	TR90032	160	1600	2
TR90009	80	800	6	TR90033	160	200	1
TR90010	160	1600	2	TR90034	40	200	8
TR90011	160	1600	2	TR90035	160	1600	2
TR90012	80	200	7	TR90036	160	1600	2
TR90013	160	1600	2	TR90037	160	800	4
TR90014	40	200	8	TR90038	160	1600	2
TR90015	320	1600	9	TR90039	160	1600	2
TR90016	40	400	10	TR90040	160	1600	2
TR90017	160	800	4	TR90041	160	800	4
TR90018	160	1600	2	TR90042	160	800	4
TR90019	160	1600	2	TR90043	160	800	4
TR90020	160	1600	2	TR90044	160	1600	2
TR90021	80	800	6	TR90045	160	1600	2
TR90022	80	200	7	TR90046	160	800	4
TR90023	160	1600	2	TR90047	80	800	6
TR90024	160	1600	2	TR90048	160	1600	2

ตารางผนวกที่ 27 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR90049	160	1600	2	TR90073	80	200	7
TR90050	80	800	6	TR90074	160	1600	2
TR90051	160	1600	2	TR90075	80	800	6
TR90052	160	1600	2	TR90076	160	1600	2
TR90053	160	1600	2	TR90077	160	1600	2
TR90054	160	800	4	TR90078	80	800	6
TR90055	80	400	11	TR90079	40	200	8
TR90056	40	200	8	TR90080	160	1600	2
TR90057	160	1600	2	TR90081	160	1600	2
TR90058	160	1600	2	TR90082	40	200	8
TR90059	80	400	11	TR90083	40	200	8
TR90060	320	200	12	TR90084	160	1600	2
TR90061	160	1600	2	TR90085	160	200	1
TR90062	80	800	6	TR90086	80	200	7
TR90063	160	1600	2	TR90087	80	200	7
TR90064	80	800	6	TR90088	160	200	1
TR90065	160	1600	2	TR90089	160	1600	2
TR90066	160	800	4	TR90090	160	1600	2
TR90067	20	200	13	TR90091	160	200	1
TR90068	160	1600	2	TR90092	160	200	1
TR90069	40	400	10	TR90093	160	1600	2
TR90070	160	1600	2	TR90094	80	400	11
TR90071	320	1600	9	TR90095	160	400	3
TR90072	160	1600	2	TR90096	160	1600	2

ตารางผนวกที่ 28 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA10

รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR100001	160	200	1	TR100025	160	400	2
TR100002	160	400	2	TR100026	160	400	2
TR100003	160	200	1	TR100027	160	400	2
TR100004	80	200	3	TR100028	320	200	7
TR100005	160	200	1	TR100029	160	400	2
TR100006	160	200	1	TR100030	160	400	2
TR100007	160	200	1	TR100031	160	400	2
TR100008	160	200	1	TR100032	40	400	8
TR100009	160	200	1	TR100033	160	400	2
TR100010	160	200	1	TR100034	160	200	1
TR100011	80	0	4	TR100035	160	400	2
TR100012	160	200	1	TR100036	160	0	6
TR100013	160	800	5	TR100037	40	200	9
TR100014	160	400	2	TR100038	160	400	2
TR100015	160	400	2	TR100039	160	0	6
TR100016	160	0	6	TR100040	80	400	10
TR100017	160	400	2	TR100041	160	400	2
TR100018	160	400	2	TR100042	40	200	9
TR100019	320	200	7	TR100043	160	400	2
TR100020	160	400	2	TR100044	160	400	2
TR100021	160	200	1	TR100045	160	400	2
TR100022	160	200	1	TR100046	160	400	2
TR100023	160	200	1	TR100047	160	200	1
TR100024	160	400	2	TR100048	80	400	10

ตารางผนวกที่ 29 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA10 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR100049	160	400	2	TR100073	40	400	8
TR100050	160	0	6	TR100074	80	200	3
TR100051	80	0	4	TR100075	160	400	2
TR100052	160	0	6	TR100076	40	0	11
TR100053	160	400	2	TR100077	40	0	11
TR100054	40	200	9	TR100078	80	200	3
TR100055	160	400	2	TR100079	160	400	2
TR100056	160	400	2	TR100080	160	400	2
TR100057	160	200	1	TR100081	320	400	12
TR100058	40	200	9	TR100082	40	400	8
TR100059	160	400	2	TR100083	160	400	2
TR100060	40	400	8	TR100084	40	200	9
TR100061	160	400	2	TR100085	160	0	6
TR100062	160	400	2	TR100086	160	200	1
TR100063	160	400	2	TR100087	160	200	1
TR100064	320	200	7	TR100088	160	400	2
TR100065	160	400	2	TR100089	160	400	2
TR100066	40	400	8	TR100090	40	0	11
TR100067	320	200	7	TR100091	160	200	1
TR100068	40	200	9	TR100092	160	400	2
TR100069	160	200	1	TR100093	160	0	6
TR100070	160	400	2	TR100094	160	0	6
TR100071	40	400	8	TR100095	160	200	1
TR100072	160	400	2	TR100096	320	200	7

ตารางผนวกที่ 30 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA11

รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR110001	80	0	1	TR110025	160	400	5
TR110002	160	200	2	TR110026	80	800	12
TR110003	40	200	3	TR110027	320	1600	11
TR110004	160	800	4	TR110028	160	800	4
TR110005	160	400	5	TR110029	160	400	5
TR110006	320	400	6	TR110030	320	800	13
TR110007	80	200	7	TR110031	40	200	3
TR110008	80	200	7	TR110032	160	800	4
TR110009	80	200	7	TR110033	320	1600	11
TR110010	160	200	2	TR110034	320	1600	11
TR110011	40	200	3	TR110035	40	200	3
TR110012	80	400	8	TR110036	160	800	4
TR110013	160	0	9	TR110037	80	0	1
TR110014	160	400	5	TR110038	320	400	6
TR110015	40	200	3	TR110039	40	200	3
TR110016	80	400	8	TR110040	80	400	8
TR110017	160	400	5	TR110041	160	200	2
TR110018	80	400	8	TR110042	160	200	2
TR110019	40	0	10	TR110043	160	200	2
TR110020	320	400	6	TR110044	320	1600	11
TR110021	160	200	2	TR110045	40	200	3
TR110022	160	400	5	TR110046	320	1600	11
TR110023	160	200	2	TR110047	320	800	13
TR110024	320	1600	11	TR110048	320	800	13

ตารางผนวกที่ 31 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA11 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความ เข้มข้นของ CdCl_2 ใน การยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความ เข้มข้นของ ZnCl_2 ในการ ยับยั้ง แบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR110049	160	200	2	TR110073	160	0	9
TR110050	320	1600	11	TR110074	160	400	5
TR110051	320	1600	11	TR110075	80	0	1
TR110052	320	1600	11	TR110076	320	400	6
TR110053	320	1600	11	TR110077	320	400	6
TR110054	40	0	10	TR110078	80	0	1
TR110055	160	400	5	TR110079	40	400	15
TR110056	160	400	5	TR110080	40	400	15
TR110057	320	800	13	TR110081	40	200	3
TR110058	40	1600	14	TR110082	320	1600	11
TR110059	40	400	15	TR110083	40	200	3
TR110060	40	400	15	TR110084	160	200	2
TR110061	80	0	1	TR110085	80	0	1
TR110062	80	0	1	TR110086	160	200	2
TR110063	80	0	1	TR110087	80	0	1
TR110064	80	200	7	TR110088	160	800	4
TR110065	160	800	4	TR110089	160	800	4
TR110066	320	800	13	TR110090	320	800	13
TR110067	320	1600	11	TR110091	320	800	13
TR110068	160	800	4	TR110092	160	200	2
TR110069	320	1600	11	TR110093	160	200	2
TR110070	160	200	2	TR110094	160	200	2
TR110071	160	200	2	TR110095	40	200	3
TR110072	40	200	3	TR110096	40	200	3

ตารางผนวกที่ 32 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA12

รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR120001	40	200	1	TR120025	320	800	6
TR120002	320	200	2	TR120026	160	200	4
TR120003	40	200	1	TR120027	160	200	4
TR120004	80	200	3	TR120028	80	200	3
TR120005	40	200	1	TR120029	160	200	4
TR120006	80	200	3	TR120030	160	200	4
TR120007	80	200	3	TR120031	160	200	4
TR120008	160	200	4	TR120032	80	200	3
TR120009	80	200	3	TR120033	80	200	3
TR120010	80	200	3	TR120034	160	800	8
TR120011	160	400	5	TR120035	80	200	3
TR120012	160	200	4	TR120036	320	1600	9
TR120013	320	800	6	TR120037	40	400	10
TR120014	80	200	3	TR120038	80	200	3
TR120015	40	800	7	TR120039	160	200	4
TR120016	80	200	3	TR120040	160	200	4
TR120017	160	200	4	TR120041	80	200	3
TR120018	320	800	6	TR120042	160	200	4
TR120019	160	200	4	TR120043	160	200	4
TR120020	160	200	4	TR120044	80	200	3
TR120021	160	400	5	TR120045	80	200	3
TR120022	80	200	3	TR120046	80	200	3
TR120023	80	200	3	TR120047	160	200	5
TR120024	160	800	8	TR120048	80	400	11

ตารางผนวกที่ 33 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียม (CdCl_2) และสังกะสี (ZnCl_2) ที่สามารถ
ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตัวอย่างที่ THA12 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ค่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	ค่าความเข้มข้นของ ZnCl_2 ในการยับยั้งแบคทีเรีย (mg/L)	กลุ่ม
TR120049	80	200	3	TR120073	320	800	6
TR120050	80	200	3	TR120074	160	400	5
TR120051	40	200	1	TR120075	80	200	3
TR120052	160	800	8	TR120076	80	200	3
TR120053	160	800	8	TR120077	160	200	4
TR120054	80	200	3	TR120078	320	1600	9
TR120055	80	200	3	TR120079	160	200	4
TR120056	80	200	3	TR120080	160	200	4
TR120057	80	200	3	TR120081	160	200	4
TR120058	160	200	4	TR120082	160	200	4
TR120059	160	1600	12	TR120083	160	200	4
TR120060	160	200	4	TR120084	80	400	11
TR120061	320	800	6	TR120085	320	200	2
TR120062	80	200	3	TR120086	320	200	2
TR120063	40	200	1	TR120087	80	200	3
TR120064	80	200	3	TR120088	80	200	3
TR120065	160	1600	12	TR120089	80	200	3
TR120066	80	200	3	TR120090	160	200	4
TR120067	160	200	4	TR120091	160	200	4
TR120068	80	200	3	TR120092	320	800	6
TR120069	160	200	4	TR120093	160	400	5
TR120070	160	400	5	TR120094	80	200	3
TR120071	160	200	4	TR120095	160	200	4
TR120072	20	200	13	TR120096	80	400	11

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวรัชชาภรณ์ เรืองเดช
 เกิดวันที่ 18 เมษายน 2530
 สถานที่เกิด อำเภอ แก่งหางแมว จังหวัด จันทบุรี
 ประวัติการศึกษา วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี ปี 2552
 ตำแหน่งปัจจุบัน -
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
 ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -
 ทุนการศึกษาที่ได้รับ ได้รับทุนโครงการ “เสริมสร้างศักยภาพนิสิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ผู้
 สากล ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555” จากกองวิเทศสัมพันธ์
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์