



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาคณิธีบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

ปริญญา

ปฐพีวิทยา

ปฐพีวิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การแปลงและการกำจัดพิษสารประกอบสารหนูโดยจุลินทรีย์ดิน

Transformation and Detoxification of Arsenic Compounds by Soil Microorganisms

นามผู้วิจัย นางสาวเพชรดา เจริญมิตร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชวลิต ชงประยูร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธัญชัช กองแก้ว, D.Sci.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุเทพ ทองแพ, วท.ค.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสถิตี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแปลงและการกำจัดพิษสารประกอบสารหนูโดยจุลินทรีย์ดิน

Transformation and Detoxification of Arsenic Compounds by Soil Microorganisms

โดย

นางสาวเพชรดา เจริญมิตร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพชรดา เจริญมิตร 2554: การแปลงและการกำจัดพิษสารประกอบสารหนูโดยจุลินทรีย์ดิน ปริญา
ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (ปฐพีวิทยา) สาขาปฐพีวิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, Ph.D. 208 หน้า

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์ในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับความเข้มข้น
ต่ำและสูง ที่อำเภอคำชะอี จังหวัดสุพรรณบุรี โดยอาศัยเทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis
(DGGE) พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอของโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์ไม่มีความแตกต่างระหว่างดินที่ทำการศึกษา
ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียโดยการตัดแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีน 16S rDNA จากแถบดีเอ็นเอตัวแทน 6 ตัวอย่าง สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ คือ *Arthrobacter* sp.
และ *Proteobacteria* sp. สำหรับการคัดแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนู พบแบคทีเรียทั้งหมด 262 ไอโซเลต
จากดินปนเปื้อนสารหนู ซึ่งแบคทีเรียด้านทานสารหนูส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากการวิเคราะห์ข้อมูล
minimum inhibitory concentration (MIC) พบว่าแบคทีเรียสามารถต้านทานสารหนูอาร์เซนิตได้มากกว่า
อาร์เซไนต์ โดยบางไอโซเลตสามารถต้านทานสารหนูทั้งอาร์เซนิตและอาร์เซไนต์ได้มากถึง 1,500 มิลลิกรัม
ต่อลิตร และจากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียทั้งหมดในการต้านทานสารหนู 8 ชนิด สามารถ
จัดกลุ่มได้เป็น 100 กลุ่ม ซึ่งบ่งชี้ถึงความหลากหลายของแบคทีเรียดังกล่าว ทั้งนี้แบคทีเรียแต่ละกลุ่มที่คัดเลือก
จากการต้านทานสารหนู 8 ชนิดนำมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ ERIC primer ซึ่ง
ความสัมพันธ์ของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 100 กลุ่ม แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 100 กลุ่ม
สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ที่ระดับความคล้ายคลึง 5-99% นอกจากนี้จากการตรวจสอบการปรากฏ
ของยีนด้านทานสารหนู (*ars*) ด้วยเทคนิค PCR พบว่า 30% ของแบคทีเรีย 100 ไอโซเลต มีการปรากฏของยีน
ด้านทานสารหนู *arsC* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ arsenate reductase อย่างไรก็ตามแบคทีเรียด้านทานสารหนู
ตัวแทน 100 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากดินปนเปื้อนสารหนูนี้ เมื่อนำมาทดสอบการแปลงสารหนูด้วยเทคนิค
agar plate screening assay ทั้งอาร์เซไนต์และอาร์เซนิต พบว่าแบคทีเรีย 95 ไอโซเลต สามารถรีดิวซ์ อาร์เซนิต
เป็นอาร์เซไนต์ได้ แต่ไม่พบการออกซิไดซ์อาร์เซไนต์เป็นอาร์เซนิต ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง แม้ว่า
แบคทีเรียจะสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของอาร์เซไนต์สูง ทั้งนี้พบแบคทีเรียเพียง 13 ไอโซเลต
ที่มีประสิทธิภาพสูงในการแปลงสารหนูอาร์เซนิต (33-69 ไมโครโมลาร์) เมื่อวัดด้วยวิธี Molybdenum blue
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สามารถจัดอยู่ในพวก *Firmicutes* และ *Proteobacteria*
โดยแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ระบุอยู่ในสกุล *Bacillus* และ 3 ไอโซเลต ระบุอยู่ในสกุล *Enterobacter* และ
Ochrobactrum จากผลการทดลองสรุปได้ว่า แบคทีเรียซึ่งมีความหลากหลายที่คัดแยกได้จากดินปนเปื้อน
สารหนู บริเวณเหมืองแร่ดินบุกเก่ามีความสามารถในการแปลงสารหนูอาร์เซนิตเป็นอาร์เซไนต์ได้

Pechrada Jareonmit 2011: Transformation and Detoxification of Arsenic Compounds by Soil Microorganisms. Doctor of Philosophy (Soil Science), Major Field: Soil Science, Department of Soil Science. Thesis Advisor: Assistant Professor. Kannika Sajjaphan, Ph.D. 208 pages.

The study of the shift in the microbial community structure in heavily arsenic contaminated soils and slightly arsenic contaminated soils located in Amphoe Dan Chang, Suphan Buri Province was determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Band pattern analysis obtained from this study indicated that the microbial community was not significantly different in two kinds of soils. Phylogenetic analysis obtained by excising and sequencing six bands indicated that the soils were dominated by *Arthobacter* sp. and *Proteobacteria* sp. In the isolation of arsenic resistance bacteria, two hundred and sixty-two bacterial isolates were obtained from arsenic contaminated soils. Majority of the arsenic resistant isolates were found to be gram-negative. Minimum inhibitory concentration (MIC) study showed that all of the isolated bacteria were more resistant to arsenate than to arsenite. In the course of this study, some of the bacterial isolates were found resist in medium containing up to 1,500 mg/L of arsenate and arsenite. All strains were also evaluated for resistance to eight antibiotics. Correlations analysis of antibiotic resistance patterns could be categorize the isolates into 100 unique groups indicating high diversity relation among all isolates. Isolates from each antibiotic resistance group were further characterized using the repetitive element-PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting technique with ERIC primers. The genetic relatedness of the 100 bacterial fingerprints showed that these 100 groups of bacteria could be divided into four major clusters with 5-99% similarity. Moreover, the presence of arsenic resistant genes (*ars*) was also identified among the arsenic-resistant isolates using PCR and 30% of one hundred isolates were found to be carrying *arsC* gene encoding arsenic reductase enzyme. One hundred arsenic resistant bacterial isolates were obtained from arsenic contaminated soils. The agar plate screening assay was used to determine if isolates had the ability to transform arsenite and arsenate. The results showed that 95 isolates were capable of arsenate reduction on agar plates. None of bacterial isolates oxidized arsenite to arsenate under the growth conditions tested, but the isolates grew in the presence of high concentrations of arsenite. Only 13 of 100 tested isolates could transform high level of arsenate (33-69 μ M) when tested using molybdenum blue method. Partial sequence analysis of 16S rDNA genes indicated that the isolates belonged to two broad taxonomic group i.e. *Firmicutes* and the *Proteobacteria*. Ten isolates were assigned to four species in the genus *Bacillus*, and three isolates belonged to two species in the genera *Enterobacter* and *Ochrobactrum*. Taken together these results indicated that phylogenetically diverse bacteria isolated from arsenic contaminated soils in an old tin mine area in Thailand have the ability to transform arsenate to arsenite.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. กรรณิการ์ สัจจาพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก สำหรับคำแนะนำและการให้คำปรึกษาในเรื่องการเรียน การวิจัย ตลอดจนการสนับสนุนการ ศึกษาวิจัยและสร้างประสบการณ์ชีวิต ณ University of Minnesota, USA และการเข้าร่วมประชุม วิชาการทั้งในและต่างประเทศ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ชวลิต สงประยูร อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำและการให้คำปรึกษาในเรื่องการเรียน การวิจัย ตลอดจนความ เมตตา อบรมสั่งสอนในเรื่องการดำเนินชีวิต และขอขอบคุณ ผศ.ดร. ธนุชัย กองแก้ว อาจารย์ที่ ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำและการให้คำปรึกษาในการแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ Professor Dr. Michael J. Sadowsky สำหรับคำแนะนำ ความรู้ใหม่ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการ ทำวิทยานิพนธ์ การให้คำปรึกษาในเรื่องการวิจัย ตลอดระยะเวลาการวิจัย ณ University of Minnesota, USA และการให้คำปรึกษาในการตีพิมพ์วารสารนานาชาติ รวมทั้งขอขอบคุณ Eddie Cytrine และ John A. Ferguson สำหรับคำแนะนำและการให้คำปรึกษาด้านเทคนิค DGGE เทคนิค rep-PCR การสร้างและการวิเคราะห์ Dendrogram

ขอขอบคุณ International Environmental Research Center, Gwangju Institute of Science and Technology for Sustainability (UNU & GIST Joint Programme), Korea ในการให้ทุน สนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในการให้ทุนสนับสนุนการวิจัย เพื่อการตีพิมพ์ระดับนานาชาติ และศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้น สูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานคณะกรรมการ อุดมศึกษาในการให้ทุนวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน สำหรับความช่วยเหลือและ การเสนอความคิดในการทำวิทยานิพนธ์ สุดท้ายขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัวเจริญมิตร และชูเกียรติ ปิ่นใจ สำหรับความรักความห่วงใย และกำลังใจในการสนับสนุนและส่งเสริมการเรียน

เพชรดา เจริญมิตร

กรกฎาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	44
อุปกรณ์	44
วิธีการ	45
ผลการทดลองและวิจารณ์	64
ผลการทดลอง	64
วิจารณ์	102
สรุป	113
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	115
ภาคผนวก	141
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	208

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของแร่ที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบ	8
2	แร่ประกอบหินและปริมาณสารหนูที่เป็นองค์ประกอบ	9
3	ปริมาณการปนเปื้อนสารหนูในพืช ผักและอาหารสำเร็จรูป	16
4	ชนิดของสารอันตรายประเภทโลหะหนักและค่ามาตรฐานคุณภาพดิน	18
5	ชนิดของสารประกอบอนินทรีย์และระดับความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งร้ายแรง	20
6	ปริมาตรของสารผสมสำหรับเตรียมเจล	52
7	ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง	56
8	สมบัติดินบางประการ ปริมาณสารหนูรวมและโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดินที่เก็บจากเหมืองแร่เก่า ตำบลองค์พระ อำเภอคำชะอี จังหวัดสุพรรณบุรี	65
9	การระบุชนิดของแบคทีเรียตัวแทนจากตัวอย่างดิน AS1 และ AS5 จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank	71
10	จำนวนแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่แยกได้จากดินปนเปื้อนสารหนู บริเวณเหมืองแร่เก่า 8 จุด บนอาหาร TGE ที่มีการเติมสารหนูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	73
11	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียด้านทานสารหนู	74
12	ความสามารถในการด้านทานสารหนูอาร์เซนิตและอาร์เซไนต์ เมื่อเจือจางแบคทีเรีย 100 และ 10000 เท่า และการปรากฏของยีนด้านทานสารหนู <i>arsC</i>	93
13	ปริมาณของสารหนูอาร์เซไนต์ที่ได้จากการรีดักชันสารหนูอาร์เซนิตเป็นอาร์เซไนต์	99
14	การระบุชนิดของแบคทีเรียจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในข้อมูล GenBank	100

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 การเตรียม stock acrylamide ความเข้มข้น 0% และ 80%	142
2 ส่วนประกอบของอาหาร Tryptone Glucose Yeast Extract (TGE)	143
3 ส่วนประกอบของอาหาร Luria-Bertani (LB)	143
4 ส่วนประกอบของอาหาร Chemically Defined Medium (CDM)	144
5 ส่วนประกอบสารละลาย molybdenum blue solution สำหรับการวัดปริมาณ สารหนูอาร์เซนิต	145
6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณสารหนูอาร์เซนิต	146
7 ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาดิน	147
8 เกณฑ์การประเมินระดับอินทรีย์วัตถุในดิน	148
9 การติดสีแกรมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียด้านทานสารหนู ที่นำมาศึกษา 262 ไอโซเลต	149
10 ความสามารถในการด้านทานสารหนูอาร์เซนิตและอาร์เซไนต์ ที่ระดับ ความเข้มข้นสูงสุดของแบคทีเรีย 262 ไอโซเลต เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 และ 10000 เท่า	155
11 ความสามารถในการด้านทานสารหนูและสารปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น สูงสุดที่สามารถด้านทานได้ของแบคทีเรียตัวแทน 100 ไอโซเลต เมื่อ เจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 และ 10000 เท่า	169
12 ความสามารถในการด้านทานสารหนูอาร์เซไนต์และอาร์เซนิต ที่ระดับความเข้มข้น สูงสุด ของแบคทีเรียตัวแทน 100 ไอโซเลต และการปรากฏของยีนด้านทานสารหนู <i>arsC</i>	177
13 ปริมาณสารหนูอาร์เซไนต์จากการรีดักชันอาร์เซนิตเป็นอาร์เซไนต์โดยแบคทีเรีย วัดด้วยวิธี Molybdenum blue	182
14 การระบุชนิดของแบคทีเรียด้านทานสารหนูจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rDNA เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ใน 5 อันดับแรก	186

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของสารหนูอินทรีย์และอินทรีย์	6
2	ความสัมพันธ์ของค่ารีด็อกโพเทนเชียลและพีเอชต่อรูปของสารหนูในดิน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความดัน 1 บรรยากาศ	12
3	ปฏิกิริยารวมตัวกันทางเคมีของ sulfhydryl ในโปรตีนหรือเอนไซม์กับสารหนู อาร์เซนไนต์	19
4	กลไกการจับพิษของสารหนูและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต	30
5	จุดเก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนสารหนู บริเวณลุ่มน้ำห้วยมะขาม ตำบลองค์พระ อำเภอคำชะอี จังหวัดสุพรรณบุรี	46
6	การประกอบอุปกรณ์เพื่อเตรียมเจลสำหรับเทคนิค DGGE	51
7	การประกอบอุปกรณ์เข้ากับ chamber และแผงควบคุม	51
8	กระดวยกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จุ่มในเซลล์แต่ละไอโซเลต วางบนอาหารแข็ง CDM ที่มีการเติมสารหนู อาร์เซนไนต์หรืออาร์เซนด	60
9	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลที่ได้จากเทคนิค DGGE	68
10	Dendrogram ความสัมพันธ์ของรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากดินปนเปื้อน สารหนูในระดับที่ต่างกัน วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioNumeric version 3.5 โดย UPGMA	69
11	ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 6 แถบ จากดิน AS1 คือ แถบ A B C D และ E และจากดิน AS5 คือ แถบ F	71
12	แบคทีเรียที่สามารถต้านทานสารหนูอาร์เซนไนต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเจือจางแบคทีเรีย 10000 เท่า	77
13	แบคทีเรียที่สามารถต้านทานสารหนูอาร์เซนด ที่ระดับความเข้มข้น 10-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเจือจางแบคทีเรีย 10000 เท่า	77

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้านทานสารหนู โดยอาศัยข้อมูลการต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเจือจางแบคทีเรีย 10000 เท่า	78
15	เปอร์เซ็นต์แบคทีเรียด้านทานสารหนูในการต้านทานสารปฏิชีวนะ 8 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า	80
16	Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้านทานสารหนู อาศัยข้อมูลการต้านทานสารปฏิชีวนะ 8 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า	82
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่ได้จากเทคนิค rep-PCR	84
18	Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้านทานสารหนู โดยอาศัยข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR โดยใช้ ERIC primer	89
19	ผลผลิต PCR ในส่วนของยีนด้านทานสารหนู <i>arsC</i> ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพเมอร์ <i>arsC-1F</i> และ <i>arsC-1R</i>	92
20	การทดสอบการรื้อดักจับสารหนูอาร์เซนดเป็นอาร์เซนไนด์ บนอาหาร CDM ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซนด ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน	96
21	การทดสอบการออกซิเดชันสารหนูอาร์เซนไนด์เป็นอาร์เซนด บนอาหาร CDM ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซนไนด์ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน	97
22	Phylogenetic tree เปรียบเทียบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการการรื้อดักจับอาร์เซนดที่ได้กับแบคทีเรียในฐานข้อมูล RDP	101

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 Dendrogram ความสัมพันธ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันจากเทคนิค DGGE	189
2 เส้นแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์กลุ่มโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนสารหนู	190
3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแถบดีเอ็นเอตัวแทน (AS1 Band A) ที่ได้จากตัวอย่าง AS1 ด้วยเทคนิค DGGE กับ <i>Arthrobacter koreensis</i> N1SF19	191
4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแถบดีเอ็นเอตัวแทน (AS1 Band A) ที่ได้จากตัวอย่าง AS1 ด้วยเทคนิค DGGE กับ <i>β-proteobacterium</i> IMCC1734	192
5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแถบดีเอ็นเอตัวแทน (AS1 Band A) ที่ได้จากตัวอย่าง AS1 ด้วยเทคนิค DGGE กับ Uncultured <i>β-proteobacterium</i> clone TH_a16	193
6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแถบดีเอ็นเอตัวแทน (AS1 Band F) ที่ได้จากตัวอย่าง AS1 ด้วยเทคนิค DGGE กับ Uncultured bacterium clone LNR A2-16	194
7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรีดักชันสารหนู (MC010) กับ <i>Enterobacter cloacae</i> R10-1A	195
8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรีดักชันสารหนู (MC013) กับ <i>Bacillus anthracis</i> HCYL02	196

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
9	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย ตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC120) กับ <i>Bacillus cereus</i> MB-40	197
10	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทน ตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC123) กับ <i>Bacillus cereus</i> IV6	198
11	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทน ที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC169) กับ <i>Bacillus megaterium</i> Z3-4	199
12	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทน ที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC194) กับ <i>Bacillus anthracis</i> HCYL02	200
13	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทน มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC196) กับ <i>Bacillus cereus</i> MB-40	201
14	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทน ที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC197) กับ <i>Ochrobactrum</i> <i>intermedium</i> BCR400	202
15	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทน ที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC202) <i>Bacillus</i> sp. MAN11	203
16	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทน ที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC203) <i>Bacillus anthracis</i> HCYL02	204
17	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทน ที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC204) กับ <i>Enterobacter cloacae</i> R10-1A	205

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
18	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC205) กับ <i>Bacillus cereus</i> IV6	206
19	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC265) กับ <i>Bacillus</i> sp. 093903	207

การแปลงและการจัดพิษของสารประกอบสารหนูโดยจุลินทรีย์ดิน

Transformation and Detoxification of Arsenic Compounds by Soil Microorganisms

คำนำ

ดินเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญทางการเกษตร นอกจากจะมีหน้าที่ในการผลิตปัจจัยที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตแล้ว ยังมีหน้าที่ในการรองรับสารพิษต่างๆ ทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์จากการใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ ด้วย แม้ว่าทรัพยากรดินจะมีความสามารถในการรองรับหรือดูดซับสารพิษต่างๆ แต่ก็อาจมีข้อจำกัดและปัจจัยที่ในการดูดซับสารพิษดังกล่าวของดิน ทั้งนี้จากการพัฒนาและการขยายตัวของเศรษฐกิจตามทิศทางการเปลี่ยนแปลงของเศรษฐกิจโลก ทำให้อุตสาหกรรมการค้าต่างๆ รวมทั้งอุตสาหกรรมทางการเกษตรของประเทศมีการขยายตัวตาม ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนมลพิษจากการทำอุตสาหกรรมและการใช้สารเคมีทางการเกษตร จนก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งหากไม่มีการแก้ปัญหาอาจทำให้เกิดการตกค้างของสารพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมและผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งส่งผลต่อทรัพยากรธรรมชาติเสื่อมโทรมในระยะยาวอีกด้วย ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามหาแนวทางในการจัดการและลดการปนเปื้อนของสารพิษต่างๆ ในดิน โดยมีการนำจุลินทรีย์ดินที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ซึ่งถือเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการลดความเป็นพิษของสารพิษในดินได้

สารหนูจัดเป็นธาตุกึ่งโลหะที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเป็นองค์ประกอบของหินและแร่ต่างๆ และพบมากในสายแร่ทองคำ แร่แมงกานีส ตะกั่ว ดีบุก เงิน และทองคำ อีกทั้งสารหนูยังเป็นธาตุที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตทางอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งเซรามิก โลหะอัลลอยด์ อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ รวมทั้งใช้เป็นส่วนประกอบของสารกำจัดศัตรูพืช อาหารสัตว์และยาฆ่าโรค จึงทำให้สารหนูเป็นธาตุที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและมีผลกระทบในวงกว้างต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นในระบบนิเวศ

การปนเปื้อนสารหนูถือว่าเป็นปัญหาที่พบได้ในหลายประเทศทั่วโลก เช่น จีน เกาหลี บังกลาเทศ อินเดีย สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา กัมพูชา พม่าและ เวียดนาม ซึ่งส่วนใหญ่มีปัญหาการ

ปนเปื้อนสารหนูในแหล่งน้ำและในดินที่มีสาเหตุจากการทำอุตสาหกรรมต่างๆ และการทำเหมืองแร่ และเป็นสาเหตุหลักของการแพร่กระจายและการปนเปื้อนสารหนูลงสู่ดินและแหล่งน้ำในธรรมชาติ สำหรับประเทศไทยเองก็พบการปนเปื้อนของสารหนูในแหล่งน้ำและดินเช่นเดียวกัน โดยพบการปนเปื้อนครั้งแรกที่อำเภอธนบุรี จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งมีสาเหตุมาจากการทำเหมืองแร่ ทั้งนี้การปนเปื้อนดังกล่าวทำให้ประชาชนที่บริโภคน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนสารหนูได้รับอันตรายจากพิษของสารหนูแบบเรื้อรัง

จากการศึกษาผลกระทบของสารหนูต่อสิ่งมีชีวิตพบว่าสารหนูจะมีผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ ซึ่งจากการศึกษาผลของสารหนูต่อจุลินทรีย์ที่ผ่านมาพบว่า สารหนูมีผลต่อการลดจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ รวมทั้งมีผลต่อการลดลงของกิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ด้วย อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์บางชนิดสามารถนำสารหนูมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น การใช้สารประกอบของสารหนูเป็นตัวให้หรือตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถต้านทานสารหนูได้โดยอาศัยกลไกที่สำคัญ คือ การแปลงสารหนูและขับสารหนูออกมานอกเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายยีนที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน และทำงานเป็นระบบ เรียกว่า *ars operon* จึงทำให้จุลินทรีย์มีความสามารถในการต้านทานสารหนู นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังสามารถใช้กลไกอื่นในการลดความเป็นพิษสารหนูได้ เช่น กระบวนการออกซิเดชัน รีดักชัน เป็นต้น

การศึกษาด้านจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับสารหนูที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในต่างประเทศ แต่สำหรับประเทศไทยยังมีการศึกษาด้านจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับสารหนูไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงได้ทำการศึกษาโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารหนูที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ต้านทานสารหนูในดิน รวมทั้งศึกษายีนต้านทานสารหนู *arsC* ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญในการขับสารหนูออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ และศึกษาความสามารถในการแปลงสารหนูทั้งการรีดักชันและออกซิเดชันด้วย ทั้งนี้ก็เพื่อหาแนวทางที่เป็นไปได้ในการลดการปนเปื้อนสารหนู เพื่อใช้ในการควบคุมการแพร่กระจาย และเฝ้าระวังพื้นที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารหนู ซึ่งต้องอาศัยการศึกษาวิจัย และพัฒนาให้ทันสมัยและเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่ด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูและยีนด้านทานสารหนู *arsC* ของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนู
3. เพื่อเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการแปลงสารหนูเพื่อช่วยในการบำบัดและฟื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อนสารหนู

การตรวจเอกสาร

สารหนู

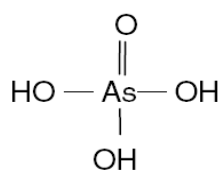
1. ลักษณะและสมบัติทั่วไปของสารหนู

สารหนู (arsenic) เป็นธาตุกึ่งโลหะ (semimetal) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งโลหะและอโลหะ มีลักษณะเป็นผงโลหะสีเทา อาจพบเป็นสีเหลืองหรือแดงเมื่ออยู่เป็นองค์ประกอบของแร่อื่นๆ เช่น orpiment หรือ realgar สารหนูมีน้ำหนักโมเลกุล 74.9216 เลขอะตอมเท่ากับ 33 จัดอยู่ในธาตุหมู่ 5A ซึ่งประกอบด้วยไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) สารหนู (As) แอนติโมนี (Sb) และบิสมัท (Bi) มีความแข็งประมาณ 3.5 สามารถระเหยกกลายเป็นไอที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยการระเหยกจะเกิดได้เร็วที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียสและระเหิดได้ที่อุณหภูมิ 613 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 814 องศาเซลเซียส (ที่ความดันบรรยากาศ 36) โดยสารหนูสีเหลืองจะระเหยเป็นไอได้ง่ายและว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาทางเคมีกว่าสารหนูสีเทา (Othmer, 2004) สารหนูถูกค้นพบครั้งแรกโดย Albertus Magnus ในช่วง 1208-1280 ปีก่อนคริสต์ศักราช โดยคำว่า "arsenic" มาจากภาษาเปอร์เซียว่า "zarnik" แปลว่า หินดกกลีบทอง ซึ่งหมายถึง แร่ชนิดหนึ่งที่มีลักษณะเป็นผลึกมีสีเหลือง ประกอบด้วยธาตุหลัก 2 ธาตุคือ สารหนูและกำมะถัน โดยชาวกรีกนำคำนี้ไปใช้ว่า "arsenikon" ส่วนคำว่า "สารหนู" มาจากการที่สารหนูมีพิษสูง เมื่อกินและหายใจเข้าไปจะเข้าไปทำลายระบบทางเดินอาหารและส่วนอื่นๆ ของร่างกาย และตายในที่สุด จึงนิยมใช้เป็นยาเบื่อหนูและเป็นที่มาของคำว่า “สารหนู” (กฤษณา, 2550) นอกจากการใช้สารหนูเป็นยาพิษแล้วในสมัยพุทธกาล Hippocrates ได้นำสารประกอบของสารหนูมาเป็นองค์ประกอบของยารักษาโรค ชาวกรีกและชาวโรมันใช้สารหนูซัลไฟด์ในการทำสีเมื่อต้องการสีแดงและสีเหลือง นอกจากนี้ Paul Ehrlich นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน ได้มีการนำสารหนูอินทรีย์มาใช้ในการรักษาโรคซิฟิลิสในสมัยที่ยังไม่มียาเพนนิซิลินอีกด้วย ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 1940 จึงมีการนำสารหนูมาใช้กันอย่างแพร่หลายโดยใช้เป็นส่วนผสมของยารักษาโรค (Emsley, 2001)

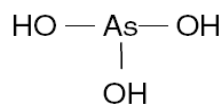
2. รูปของสารหนู

สารหนูสามารถพบได้ 2 รูปคือ สารหนูอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยมีเลขออกซิเดชันหรือวาเลนซ์หลายค่า คือ +5 (As^{+5} ; AsO_4^{-3}) +3 (As^{+3} ; AsO_3^{-3}) 0 (AsH_3) และ -3 (H_3AsO_4) (Leonard, 1991; Jain and Ali, 2000; Oremland *et al.*, 2000) รูปของสารหนูที่พบในดินส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปสารหนูอนินทรีย์ที่มีวาเลนซ์ +5 เรียกว่า อาร์เซนต (As^{+5}) พบได้หลายรูป เช่น AsO_4^{-3} HAsO_4^{-2} และ $\text{H}_2\text{AsO}_4^{-}$ และวาเลนซ์ +3 เรียกว่า อาร์เซไนต์ (As^{+3}) พบได้หลายรูปเช่นเดียวกัน ได้แก่ $\text{As}(\text{OH})_3$ $\text{As}(\text{OH})_4^{-}$ $\text{AsO}_2(\text{OH})^{-2}$ และ AsO_3^{-3} (Cullen and Reimer, 1989; Masscheleyn *et al.*, 1991; Balasoiu *et al.*, 2001) สารหนูอาร์เซนตและอาร์เซไนต์สามารถเกิดการเปลี่ยนรูปได้ขึ้นอยู่กับสภาพรีดอกซ์โพเทนเชียล (redox potential; Eh) และพีเอช (pH) เช่น สารหนูอาร์เซนตจะเสถียรอยู่ในดินเมื่อค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลอยู่ในช่วง -100 ถึง 300 mV ในขณะที่สารหนูอาร์เซไนต์จะเสถียรเมื่อค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลต่ำกว่า -100 mV (McGeehan, 1996)

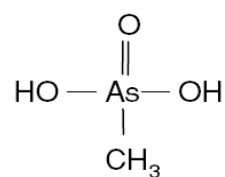
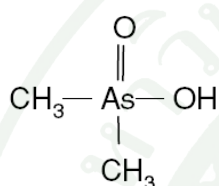
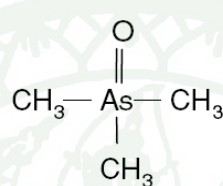
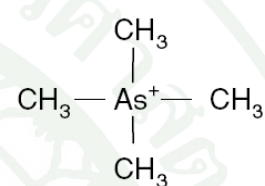
สำหรับสารหนูในรูปอินทรีย์คือ สารหนูที่อยู่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต โดยสารหนูสามารถรวมตัวกับคาร์บอนและไฮโดรเจนในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต กลายเป็นสารหนูอินทรีย์ ซึ่งไม่สามารถแตกตัวเป็นเกลืออนินทรีย์ได้เหมือนกับสารหนูอนินทรีย์ จึงมีพิษน้อยกว่า (นันทฤทธิ์ และไมตรี, 2544) สารหนูอินทรีย์พบได้หลายชนิดทั้งในพืชและสัตว์ โดยเฉพาะในสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง ปู ปลา และสาหร่าย โดยสารหนูอินทรีย์ที่อยู่เป็นองค์ประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิตจะมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตในดินหรือสิ่งแวดล้อม เช่น arsenobetaine arsenocholine monomethylarsonic acid (MMAA) methylarsonate (MA) และ dimethylarsinic acid (DMAA) (Buchet and Lauwerys, 1981; Leonard, 1991) สารหนูในสัตว์น้ำส่วนใหญ่เป็นพวก arsenobetaine arsenocholine และ tetramethylarsonium ion (Meharg and Whitaker, 2002) สำหรับ arsenosugar มักพบเป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อของสาหร่าย (Francesconi and Edmonds, 1998; Meharg and Whitaker, 2002) โครงสร้างทางเคมีของสารหนูดังกล่าวมาข้างต้น ดังภาพที่ 1



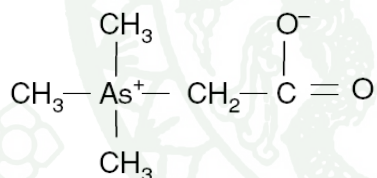
arsenate



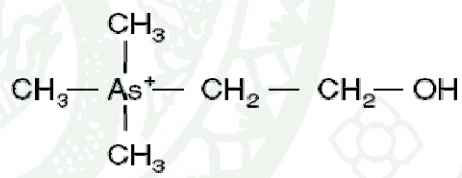
arsenite

monomethylarsonic acid
(MMAA)dimethylarsinic acid
(DMAA)trimethylarsine oxide
(TMAO)

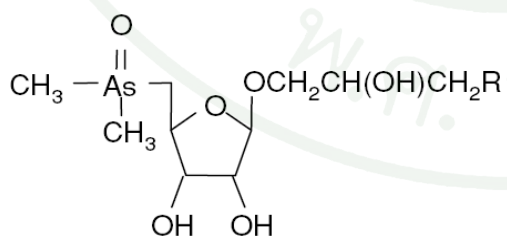
tetramethylarsenium ion



arsenobetaine (AsBet)



arsenocholine (AsCho)



sugar a

R = $\text{OP}_3\text{HCH}_2(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$

sugar b

R = SO_3H

sugar C

R = OSO_3H

sugar D

R = OH

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารหนูอนินทรีย์และอินทรีย์

ที่มา: Meharg and Whitaker (2002)

นอกจากนี้สารประกอบสารหนูอาร์เซเนต (AsO_4^{3-}) สามารถเกิดการรีดักชันเป็นสารหนูอาร์เซไนด์ (AsO_4^{3-}) และเปลี่ยนเป็นแก๊สในชั้นบรรยากาศได้ เรียกแก๊สนี้ว่า แก๊สอาร์ซีน (AsH_3) (Bentley and Chasteen, 2002; Stolz *et al.*, 2006) โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้จะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และมีคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำมาก โดยปกติแก๊สอาร์ซีนเป็นแก๊สที่ไม่มีสี แต่มีกลิ่นฉุนคล้ายกระเทียม และมีระดับความเป็นพิษสูง สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย และสลายตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 225 องศาเซลเซียส (Buchet and Lauwerys, 1981; Leonard, 1991) ความเป็นพิษของแก๊สมักเกิดจากการสัมผัสหรือการสูดดม โดยหากร่างกายได้รับแก๊สนี้มากเกินไป จะทำให้การทำงานของไตล้มเหลว เกิดภาวะโลหิตจางเนื่องจากแก๊สนี้จะเข้าไปทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการเข้าไปจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงและทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงบวมและไม่ทำงาน (Blair *et al.*, 1990) อย่างไรก็ตามเนื่องจากแก๊สอาร์ซีนมีความเสถียรน้อย สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายจึงพบในธรรมชาติได้น้อย ตัวอย่างการเปลี่ยนรูปเป็นแก๊สอาร์ซีน เช่น monomethylarsonic acid (MMAA) เปลี่ยนเป็น monomethylarsine (CH_3AsH_2) หรือ dimethylarsenic acid (DMAA) เปลี่ยนเป็น dimethylarsine ($(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$) และ trimethylarsine oxide (TMAO) เปลี่ยนเป็น trimethylarsine ($(\text{CH}_3)_3\text{As}$) (Cullen and Reimer, 1989)

3. แหล่งที่มาและการใช้ประโยชน์สารหนู

สารหนูเป็นธาตุที่พบมากเป็นอันดับที่ 20 ของธาตุที่พบมากบนโลก โดยสารหนูที่พบในธรรมชาติเกิดจากกระบวนการทางธรณีเคมีและกิจกรรมของมนุษย์ ทั้งนี้สัดส่วนของสารหนูที่พบในดินจากการสลายตัวผุพังตามธรรมชาติเฉลี่ยเท่ากับ 1.5-3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Mandal and Suzuki, 2002) ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบของแร่กว่า 200 ชนิด โดยส่วนใหญ่พบอยู่ในรูปอาร์เซเนตมากถึง 60% ชนิดของแร่ที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบ ดังตารางที่ 1 สารหนูส่วนใหญ่พบเป็นองค์ประกอบของแร่ประกอบซัลไฟด์ของทองแดง (Cu) ตะกั่ว (Pb) สังกะสี (Zn) พลวง (Sb) เงิน (Ag) และทอง (Au) เช่น arsenopyrite (FeAsS) orpiment (As_2S_3) realgar (As_4S_4) lollingite (FeAs_2) และ tennantite ($(\text{Cu,Fe})_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$) (Hossain, 2005) ทั้งนี้ปริมาณสารหนูที่เป็นองค์ประกอบของแร่จะมีปริมาณแตกต่างกันไป เช่น arsenopyrite มีสารหนูเป็นองค์ประกอบประมาณ 0.02 - 0.5% สำหรับหินในธรรมชาติก็พบสารหนูในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแร่และชนิดของหินที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบ เช่น หินตะกอนและหินอัคนีพบสารหนูได้ตั้งแต่ 0.1-2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยหินตะกอนพบสารหนูเฉลี่ย 13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และหินชนวนพบสารหนูเฉลี่ย 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่หินปูนและหินทรายจะพบสารหนูได้น้อยมาก แต่หากเป็นบริเวณที่เป็นแหล่งแร่

แมงกานีสอาจพบสารหนูได้สูงถึง 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Visoottiviseth *et al.*, 2002) โดยทั่วไปหินอัคนีมักพบสารหนูในปริมาณต่ำ เฉลี่ยประมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Onishi and Sandell, 1995) หินแปรมักมีการสลายตัวผุพังและปลดปล่อยสารหนูในปริมาณต่ำ เช่นเดียวกัน ประมาณ 0.4-18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนหินภูเขาไฟสามารถพบสารหนูได้สูงถึง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Mandal and Suzuki, 2002) ชนิดของแร่ประกอบหินและปริมาณสารหนูที่เป็นองค์ประกอบ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ชนิดของแร่ที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบ

ชนิดของแร่	องค์ประกอบ	ชนิดของแร่	องค์ประกอบ
Adamite	$\text{Zn}_2\text{AsO}_4\text{OH}$	Niccolite	NiAs
Alremonite	AsSb	Olivenite	$\text{Cu}_2\text{AsO}_4\text{OH}$
Arsenargentite	Ag_3As	Orpiment	As_2S_3
Arsenolite	As_2O_3	Pearceite	$\text{Ag}_{16}\text{As}_2\text{S}_{11}$
Arsenopyrite	FeAsS	Pharmacosiderite	$\text{Fe}_3(\text{AsO}_4)_2(\text{OH})_3$
Chloanthite	$(\text{Ni},\text{Co})\text{As}_3$	Proustite	Ag_3AsS_3
Cobaltite	CoAsS	Realgar	As_4S_4
Domeykite	Cu_3As	Safflorite	$(\text{Co},\text{Fe})\text{As}_2$
Enargite	Cu_3AsS_4	Scorodite	$(\text{Fe},\text{Al})(\text{AsO}_4)_2\text{S}_2\text{O}$
Gersdorffite	NiAsS	Skuterrudite	$(\text{Co},\text{Ni})\text{As}_3$
Glaucodote	$(\text{Co},\text{Fe})\text{AsS}$	Sperryllite	PtAs_2
Loellingite	FeAs_2	Tennatite	$(\text{Cu},\text{Fe})_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$

ที่มา: ดัดแปลงจาก Smedley and Kinniburgh (2002)

ตารางที่ 2 แร่ประกอบหินและปริมาณสารหนูที่เป็นองค์ประกอบ

ชนิดของแร่	ปริมาณของสารหนู (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	แหล่งอ้างอิง
Sulphide minerals:		
Pyrite	100–77,000	Fleet and Mumin (1997)
Pyrrhotite	5–100	Boyle and Jonasson (1973)
Marcasite	20–126,000	Fleet and Mumin (1997)
Galena	5–10,000	Baur and Onishi (1969)
Sphalerite	5–17,000	Baur and Onishi (1969)
Chalcopyrite	10–5,000	Baur and Onishi (1969)
Oxide minerals:		
Haematite	up to 160	Baur and Onishi (1969)
Magnetite	2.7–41	Baur and Onishi (1969)
Ilmenite	<1	Baur and Onishi (1969)
Fe oxide (undifferentiated)	up to 2,000	Boyle and Jonasson (1973)
Fe(III) oxyhydroxide	up to 76,000	Pichler <i>et al.</i> (1999)
Silicate minerals:		
Quartz	0.4–1.3	Baur and Onishi (1969)
Feldspar	<0.1–2.1	Baur and Onishi (1969)
Biotite	1.4	Baur and Onishi (1969)
Amphibole	1.1–2.3	Baur and Onishi (1969)
Olivine	0.08–0.17	Baur and Onishi (1969)
Pyroxene	0.05–0.8	Baur and Onishi (1969)
Carbonate minerals:		
Calcite	1–8	Boyle and Jonasson (1973)
Dolomite	<3	Boyle and Jonasson (1973)
Siderite	<3	Boyle and Jonasson (1973)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของแร่	ปริมาณของสารหนู (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	แหล่งอ้างอิง
Sulphate minerals:		
Gypsum/anhydrite	<1–6	Boyle and Jonasson (1973)
Barite	<1–12	Boyle and Jonasson (1973)
Jarosite	34–1,000	Boyle and Jonasson (1973)
Other minerals:		
Apatite	<1–1,000	Boyle and Jonasson (1973)
Halite	<3–30	Stewart (1963)
Fluorite	<2	Boyle and Jonasson (1973)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Smedley and Kinniburgh (2002)

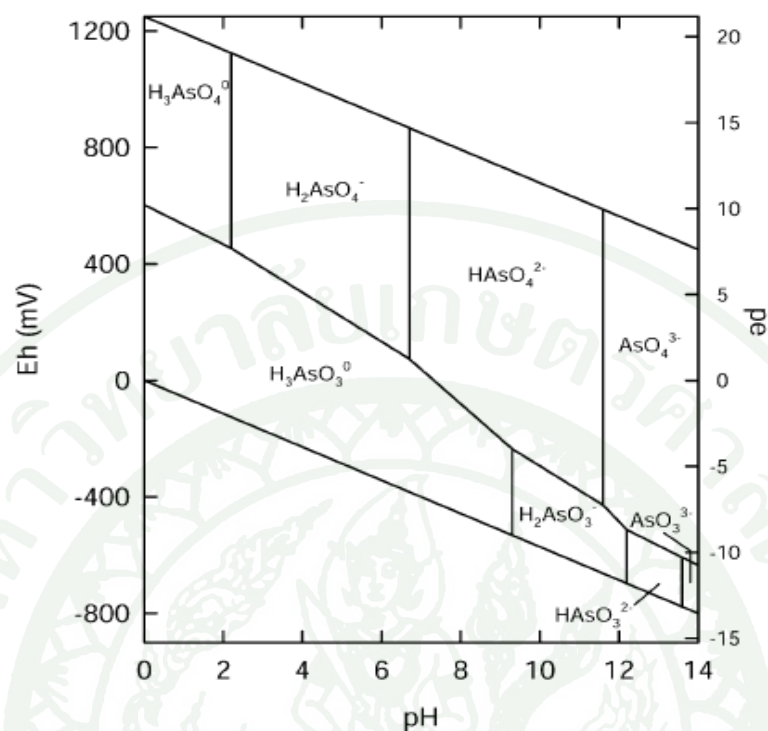
แหล่งที่มาของสารหนูที่เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ ถือเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายและการปนเปื้อนสารหนูสู่สิ่งแวดล้อม ได้แก่ 1) การทำเหมืองแร่-ถลุงแร่ 2) การทำอุตสาหกรรมต่างๆ ที่มีการใช้สารหนูในการกระบวนการผลิต เช่น อุตสาหกรรมแก้วและโลหะอัลลอยด์ 3) อาหารหรือยาที่ใช้ในปศุสัตว์ ซึ่งมีการเติมสารหนูเป็นองค์ประกอบในการเร่งการเจริญเติบโตหรือเพิ่มประสิทธิภาพของยาโดยช่วยในการดูดซึมของยา และ 4) การเกษตร เช่น สารกำจัดศัตรูพืช สารกำจัดรา สารถอนเนื้อไม้ (Mandal and Suzuki, 2002) ปัจจุบันมีการใช้สารหนูเพื่อประโยชน์ในอุตสาหกรรมและการเกษตรมากขึ้น โดยพบว่า 80% ของผลิตภัณฑ์ที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบจะถูกนำไปใช้ในทางการเกษตรเพื่อกำจัดศัตรูพืชในดิน (Nriagu and Pacyna, 1988) โดย calcium arsenate ($\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$) methyl และ dimethylarsonic acid นิยมใช้เป็นสารประกอบในสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดแมลง สารกำจัดรา และสารถอนเนื้อไม้ (Leonard, 1991; Su, 2004) ทั้งนี้สารหนูที่พบได้ทั่วไปในสารกำจัดศัตรูพืชในรูปของสารประกอบ เช่น lead arsenate calcium arsenate copper arsenate copper arsenite และ disodium methyl arsenate ดังนั้นพืชผักผลไม้ที่ปนสารฆ่ากำจัดแมลงที่มีสารหนูเป็นสารประกอบ อาจทำให้มีสารหนูตกค้างอยู่ในผลผลิตได้ นอกจากนี้การตกค้างสารหนูในสัตว์น้ำพวกปลาน้ำจืดและปลาทะเลก็เกิดขึ้นได้เช่นกันจากการใช้ยาฆ่าพยาธิ สำหรับการใส่สารหนูเป็นองค์ประกอบในยาหรือสารเติมในอาหารสัตว์

ตัวอย่างเช่น N-carbamyl-arsanilic acid ใช้ในการกำจัดพยาธิในสัตว์ปีก copper acetoarsenite ใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดจากโปรโตซัว/พยาธิ และยารักษาโรคซิฟิลิส และ arsanilic acid ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา รวมทั้งมีการใช้ 3-nitro-4-hydroxyphenyl arsonic acid (Roxasone) เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ปีกและสุกรด้วย (Mandal and Suzuki, 2002) นอกจากนี้การใช้สารหนูเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ในลักษณะอื่นๆ เช่น การใช้สารประกอบสารหนูเป็นส่วนผสมของโลหะอัลลอยด์ในการผ่าตัด (Su, 2004) รวมทั้งใช้ As_2O_3 และ As_2S_3 ในอุตสาหกรรมการทำแก้ว กระจก และเซรามิก เป็นส่วนผสมของสีย้อมผ้า สบู่ และใช้ผสมกับตะกั่วในแบตเตอรี่ เคลือบสีนาฬิกา ดิจิตอล หรือใช้เป็น light-emitting diode สำหรับเครื่องมือต่างๆ หรือใช้ผลิตตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี เป็นต้น (Nriagu, 2001)

4. ปฏิกิริยาทางเคมีของสารหนู

สารหนูเป็นธาตุที่สามารถทำปฏิกิริยากับธาตุอื่นๆ ในดินได้ เช่น ทองแดง ตะกั่วและทอง ปฏิกิริยาทางเคมีในดินต่างๆ ไปมักอยู่ในสถานะออกซิเดชันโดยมีวาเลนซ์ตั้งแต่ -3 0 +3 และ +5 ภายใต้สภาวะรีดอกซ์โพเทนเชียลที่แตกต่างกัน (Leonard, 1991; Jain and Ali, 2000; Oremland *et al.*, 2000) ทั้งนี้สารหนูอาร์เซนเตจะพบมากในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนมาก ในขณะที่อาร์เซไนต์จะพบมากในสภาพแวดล้อมที่ขาดออกซิเจน (Viraraghavan *et al.*, 1999)

ปฏิกิริยาทางเคมีซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของสารหนู รูปของสารหนู การแพร่กระจายและการเคลื่อนที่ของสารหนู ได้แก่ รีดอกซ์โพเทนเชียลและพีเอช ทั้งนี้ความสัมพันธ์ของรีดอกซ์โพเทนเชียลและพีเอช ดังภาพที่ 2 สภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนและพีเอชต่ำจะพบสารหนูในรูป $H_2AsO_4^-$ แต่หากพีเอชสูงขึ้นจะพบสารหนูในรูป $HAsO_4^{2-}$ ในขณะที่สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและพีเอชต่ำกว่า 9.2 จะพบสารหนูในรูป H_3AsO_3 (Smedley and Kinniburgh, 2002) กล่าวคือสารหนูอาร์เซนเตจะอยู่ในรูป $H_2AsO_4^-$ เมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 2-6 และอยู่ในรูป $HAsO_4^{2-}$ เมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 6.5-12 และพบทั้งสองรูปได้เท่าๆ กันเมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 7-8 สำหรับสารหนูอาร์เซไนต์มักพบในรูป H_3AsO_3 ซึ่งมีประจุรวมเป็นศูนย์ เมื่อพีเอชมีค่าน้อยกว่า 9 (Benavides, 2007; Sadiq, 1997)



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ของค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลและพีเอชต่อรูปของสารหนูในดินที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความดัน 1 บรรยากาศ

ที่มา: Smedley and Kinniburgh (2002)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณารูปของสารหนูที่พบในดินที่มีพีเอชเป็นกลาง ($\text{pH} = 7$) สามารถพบสารหนูอาร์เซเนตและอาร์เซไนต์ในรูปที่แตกต่างกันดังนี้ (ดัดแปลงจาก Sadiq, 1997)

อาร์เซเนต; $\text{HAsO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{AsO}_4^- > \text{AsO}_4^{3-} > \text{H}_3\text{AsO}_4$

อาร์เซไนต์; $\text{H}_3\text{AsO}_3 > \text{H}_2\text{AsO}_3^- > \text{HAsO}_3^{2-} > \text{AsO}_3^{3-}$

สารหนูอาร์เซเนตซึ่งอยู่ในรูป H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} และ AsO_4^{3-} สามารถละลายน้ำ และเคลื่อนที่ได้ในสภาพที่มีพีเอชเป็นกรด แต่ในสภาพที่พีเอชเป็นกลางถึงด่างอ่อนจะเกิดการตกตะกอนร่วมกับธาตุอื่นๆ กลายเป็นแร่ทุติยภูมิ เช่น เหล็ก โคบอลต์ นิกเกิล ตะกั่ว และสังกะสี เป็นต้น

สารหนูเมื่อถูกความร้อนจะเปลี่ยนรูปเป็นแก๊สต่างๆ ได้หลายชนิด เช่น AsCl_3 , As_2O_3 , AsH_3 และ AsS (Bentley and Chasteen, 2002; Stolz *et al.*, 2006) และสามารถเกิดการตกตะกอนเป็นโลหะได้เมื่อเกิดการเย็นตัว ทั้งนี้ไอระเหยของแก๊สดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับธาตุอื่นทำให้เกิดเป็นแร่ประกอบสารหนูได้ เช่น arsenopyrite, nicolite และ cobaltite เป็นต้น จากกระบวนการข้างต้นสรุปได้ว่าสารประกอบสารหนูเมื่อถูกออกซิไดซ์หรือทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจะเกิดเป็นอาร์เซนิตและถูกดูดซับด้วยเหล็กออกไซด์ หรือคอลลอยด์ของธาตุต่างๆ ในดิน และจะเกิดการตกตะกอนได้ในดินกรดหรือละลายไปกับน้ำเมื่ออาร์เซนิตอยู่ในน้ำ แต่กระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ สำหรับในดินด่างสารหนูจะจับกับหินปูนและเกิดการตกตะกอน ในขณะที่ดินเป็นกลางสารหนูจะเกิดปฏิกิริยาดูดซับกับอนุภาคดินเหนียว จากปฏิกิริยาดินทางเคมีที่เกิดขึ้นชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารหนูส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับพีเอช ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงของฟอสฟอรัสในดิน (Meharg and Macnair, 1992; Sharples *et al.*, 2000)

การปนเปื้อนของสารหนูในสิ่งแวดล้อมและอาหาร

การแพร่กระจายและการปนเปื้อนสารหนูสามารถพบได้ทั้งในดิน น้ำ อากาศ รวมทั้งอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากสารหนูเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบของหินและแร่ และสามารถเกิดการสลายตัวผุพังได้ตามธรรมชาติ จึงทำให้พบสารหนูปนเปื้อนได้ในปริมาณต่ำตามธรรมชาติ การปนเปื้อนสารหนูในปริมาณมากส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการทำอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การเผาถ่าน การทำเหมืองแร่ ซึ่งจะปลดปล่อยสารหนูปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้มาก (Adams *et al.*, 1994) ซึ่งพบได้ตั้งแต่ 0.1-40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ATSDR, 2007; Roy and Saha, 2002) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของหินและแร่ รวมทั้งปัจจัยทางดินอื่นๆ เช่น ริด็อกโพเทนเชียล พีเอช ชนิดของดิน ปริมาณของพืชและจุลินทรีย์ในดิน รวมทั้งคอลลอยด์ดิน สำหรับคุณสมบัติทางเคมีซึ่งมีผลต่อความสามารถในการละลายและการดูดซับสารหนูในดิน (Woolson, 1977; Sadiq, 1997) เช่น แร่ดินเหนียว ออกไซด์-ไฮดรอกไซด์ของเหล็กและอะลูมิเนียม แมกนีเซียม-แคลเซียมคาร์บอเนต และอินทรีย์วัตถุในดิน เป็นต้น โดยเฉพาะเหล็กออกไซด์และไฮดรอกไซด์ในดินถือว่าเป็นตัวการหลักในการดูดซับสารหนูทั้งในสภาพที่ดินมีพีเอชเป็นกรดและเป็นด่าง (Polemio *et al.*, 1982) ในขณะที่ซัลไฟด์จะช่วยควบคุมความสามารถในการละลายของสารหนู (Sadiq, 1997)

นอกจากการปนเปื้อนสารหนูในดินแล้วยังพบว่าสารหนูสามารถเคลื่อนที่และสะสมในแหล่งน้ำ รวมทั้งพบการปนเปื้อนอยู่ในอากาศได้ โดยพบสารหนูประมาณ 1-2,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (ATSDR, 2007) ซึ่งเกิดจากการระเบิดของหินภูเขาไฟและการทำอุตสาหกรรม ทั้งนี้ Nriagu and Pacyna (1988) ได้ประเมินปริมาณสารหนูที่ปนเปื้อนในบรรยากาศที่มาจากกิจกรรมของมนุษย์ และพบปริมาณสารหนูปนเปื้อนประมาณ 18,800 ตันต่อเอเคอร์ คิดเป็น 70% ของสารหนูที่มีในชั้นบรรยากาศ สำหรับการปนเปื้อนสารหนูในแหล่งน้ำจะเกิดจากการออกซิเดชันของอาร์เซนิกซัลไฟด์กลายเป็นเกลืออนินทรีย์ของสารหนู (inorganic arsenic salt) มีสมบัติละลายน้ำได้ดีจึงปนเปื้อนในน้ำได้สูง อีกทั้งยังพบสารหนูที่สะสมอยู่ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติพวก methyl arsenic acids และ dimethylarsinic acids อีกด้วย จากการสำรวจของ ATSDR (2007) พบสารหนูที่ในน้ำผิวดินและน้ำใต้ดินส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่ในบริเวณพื้นที่อุตสาหกรรมสามารถพบสารหนูปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้สูงถึง 1,000-3,400 ไมโครกรัมต่อลิตร (ATSDR, 2007)

การศึกษาการปนเปื้อนสารหนูและการสะสมสารหนูในร่างกายมนุษย์ใน 70 ประเทศทั่วโลก (137 ล้านคน) พบการสะสมสารหนูมีสาเหตุมาจากการบริโภคน้ำที่ปนเปื้อนสารหนู ซึ่งปัญหาการปนเปื้อนสารหนูในแหล่งน้ำธรรมชาติและน้ำบริโภคพบในหลายประเทศ เช่น อาร์เจนตินา ชิลี เม็กซิโก จีน อินเดีย อังการี บังคลาเทศ เวียดนาม พบสารหนูปนเปื้อนอยู่ในน้ำปริมาณ 1-7,500 มิลลิกรัมต่อลิตร 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 8-620 มิลลิกรัมต่อลิตร 40-750 มิลลิกรัมต่อลิตร 2-176 มิลลิกรัมต่อลิตร 10-3,200 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.5-3,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1-3,050 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Smedley and Kinniburgh, 2002) ทั้งนี้ น้ำดื่มซึ่งรวมถึงน้ำแร่ และน้ำบรรจุขวดต่างๆ บางกรณีอาจตรวจพบปริมาณสารหนูปนเปื้อนและพบสูงกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากแหล่งน้ำใต้ดินมีการปนเปื้อนสารหนู โดยองค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้คุณภาพน้ำสำหรับการบริโภคไม่ควรมีสารหนูปนเปื้อนเกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร (Helmer and Hespahol, 1997; WHO, 2008) ในขณะที่ประเทศไทยโดยกรมควบคุมมลพิษ กำหนดให้คุณภาพน้ำผิวดินที่จะนำมาบริโภคที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคและผ่านกระบวนการเบื้องต้นสำหรับผลิตน้ำดื่มแล้ว มีสารหนูปนเปื้อนไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรเช่นกัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2547ข) สำหรับมาตรฐานคุณภาพน้ำบาดาลเพื่อการบริโภค คุณภาพน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทและมาตรฐานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์น้ำ กำหนดให้มีสารหนูปนเปื้อนได้ถึง 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2547ก)

การปนเปื้อนสารหนูทั้งในดิน น้ำและอากาศดังกล่าว ทำให้มีโอกาสดูดซับสารหนูปนเปื้อนอยู่ในพืชผัก และผลไม้ รวมทั้งในเนื้อสัตว์และอาหารต่างๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่ได้จากสัตว์น้ำ ปลา และกุ้ง ซึ่งเมื่อบริโภคอาหารเหล่านี้เข้าไปสารหนูที่สะสมอยู่ในเนื้อสัตว์และอาหารจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย โดยการดูดซึมจะเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่องปากและกระเพาะอาหาร แต่จะดูดซึมได้มากในลำไส้เล็กและทางผิวหนังหากมีการสัมผัสกับสารหนู ปริมาณการดูดซึมนี้จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายน้ำของสารหนู (WHO, 1981) การสะสมสารหนูในสัตว์และพืชทะเลเกิดขึ้นเนื่องจากสารหนูที่พบในทะเลและมหาสมุทร โดยในทะเลจะมีสารหนูประมาณ 0.5-50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับในแหล่งน้ำจืดพบว่าปริมาณสารหนูในปลาน้ำจืดต่ำกว่าในปลาทะเลมาก คือพบต่ำกว่า 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับพืชบนพื้นดิน ตรวจพบว่า ในพืชไร่มีปริมาณสารหนู 0-20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้ขึ้นกับพื้นที่เพาะปลูก โดยพื้นที่ใกล้แหล่งอุตสาหกรรมหรือในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในปริมาณสูง พืชก็จะมีการดูดซึมสารหนูได้มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในข้าวและยาสูบ พบว่าสามารถตรวจพบสารหนูปนเปื้อนในปริมาณสูงมาก ประมาณ 150-250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (กองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม, 2530)

นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของสารหนูในเห็ดที่บริโภคได้บางชนิด โดยอาจพบสารหนูปนเปื้อนเฉลี่ยประมาณ 20-140 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ATSDR, 2007) ขึ้นกับชนิดของพืชผักและประเภทของอาหาร ดังตารางที่ 3 สำหรับในสัตว์โดยทั่วไปแล้วพบปริมาณสารหนูในระดับใกล้เคียงกับพืชยกเว้นในสัตว์ปีก โดยพบในปริมาณตั้งแต่ 0-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีสาเหตุมาจากอาหารสัตว์ เช่น ปลาปน ทั้งนี้ประเทศไทยโดยกระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2546 กำหนดมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อนประเภทสารหนู สำหรับสัตว์น้ำและอาหารทะเล กำหนดให้สารหนูในรูป อนินทรีย์ (Inorganic arsenic) มีค่าไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับอาหารอื่นๆ กำหนดให้มีสารหนูทั้งหมด (Total arsenic) มีค่าไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ตารางที่ 3 ปริมาณการปนเปื้อนสารหนูในพืช ผักและอาหารสำเร็จรูป

ประเภทอาหาร	ปริมาณการปนเปื้อนสารหนู (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
ผัก	
ผักโขม	1.62
คื่นช่าย	1.53
กระเพรา	1.54
ผักบุ้ง	7.49
ผลไม้	
มะม่วง	1.56
ขนม/อาหารแปรรูป	
ข้าวหอมมะลิอบกรอบรสสาหร่าย	3.30
ข้าวอบกรอบห่อสาหร่าย	7.60
แผ่นสาหร่ายทะเลกรอบ	32.50
สาหร่ายญี่ปุ่นทอด	28.70
สาหร่ายทะเลปรุงรส	66.50
สาหร่ายทะเลไม่ปรุงรส	37.90

ที่มา: กองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม (2530)

การปนเปื้อนสารหนูในประเทศไทย

ประเทศไทยมีรายงานการปนเปื้อนสารหนูในน้ำใต้ดินครั้งแรกในปี พ.ศ. 2530 ที่อำเภอรัตนบุรี จังหวัดนครราชสีมา และอำเภอบ้านนางสาร จังหวัดยะลา โดยพบสารหนูปนเปื้อนในดินตั้งแต่ 21-16,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Visoottiviseth *et al.*, 2002) ในขณะที่บ่อน้ำบาดาลมีปริมาณสารหนูปนเปื้อนสูงถึง 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (William *et al.*, 1996) สารหนูที่ปนเปื้อนในอำเภอรัตนบุรีจะเป็นแร่ arsenopyrite (FeAsS) ที่มากับสายแร่ดินบุก หรือเป็นแร่อื่นที่มีซิลไฟด์เป็นองค์ประกอบ การแพร่กระจายของสารหนูเกิดจากสารหนูใน arsenopyrite ที่ปนอยู่กับสายแร่ถูกขุดออกมาเมื่อเข้าสู่กระบวนการแยกแร่ arsenopyrite จะถูกแยกออกมากับหางแร่และทิ้งไว้ ทำให้เกิด

การออกซิเดชันกับอากาศและน้ำเกิดการแพร่กระจายลงสู่แหล่งน้ำใกล้เคียง โดยส่วนใหญ่บริเวณที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารหนู ได้แก่ เหมืองแร่ถ่านหิน ดิบุก ทองคำ ตะกั่วและเงิน ที่มีการปิดการทำเหมืองและไม่มีการเก็บกากแร่ หรือปล่อยทิ้งไว้ให้สัมผัสกับน้ำและอากาศ ซึ่งเป็นการเร่งให้เกิดการสลายตัวและแพร่กระจายไปตามแหล่งน้ำต่างๆ ต่อไป (วิโรจน์ และ นิตินัย, 2547)

จากข้อมูลการสำรวจดินของกองวัดภูมิพิษ พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่ปนเปื้อนสารหนูในหลายพื้นที่ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สุพรรณบุรี โดยแบ่งระดับการปนเปื้อนสารหนูในดิน เป็น 4 ระดับคือ พื้นที่ที่มีปริมาณสารหนูปนเปื้อน 15-30 30-75 75-100 และ 100-125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยพื้นที่ส่วนใหญ่ที่มีการปนเปื้อนในประเทศไทยมักมีสารหนูประมาณ 15-75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้เมื่อพิจารณาตามมาตรฐานคุณภาพดินสำหรับสารหนูของกรมควบคุมมลพิษซึ่งกำหนดมาตรฐานคุณภาพดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในดินพื้นที่นอกเขตเกษตรกรรมมีค่าไม่เกิน 27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และพื้นที่ในเขตที่อยู่อาศัยและในเขตเกษตรกรรมมีค่าไม่เกิน 3.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (กรมควบคุมมลพิษ, 2547ก) (ตารางที่ 4) นอกจากนี้จากการสำรวจการปนเปื้อนสารหนูของกรมทรัพยากรธรณีพบการปนเปื้อนสารหนูในประเทศไทย 25 จังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี สระบุรี ระยอง สระแก้ว ราชบุรี กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ เลย หนองบัวลำภู หนองคาย ตาก เพชรบูรณ์ น่าน อุตรดิตถ์ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แม่ฮ่องสอน นครศรีธรรมราช ตรัง ยะลา สตูล สงขลา และพัทลุง (กรมทรัพยากรธรณี, 2549) โดยเฉพาะจังหวัดสุพรรณบุรีซึ่งพื้นที่ส่วนใหญ่ทำการเกษตรกรรม (อำเภอด่านช้างและอำเภออู่ทอง) พบการปนเปื้อนสารหนูในน้ำผิวดิน แหล่งน้ำใต้ดิน ซึ่งใช้ในการบริโภคในระดับสูงและสูงเกินค่ามาตรฐานกำหนด (10 ไมโครกรัมต่อลิตร) (กรมควบคุมมลพิษ, 2543ก) ทั้งนี้ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมด้านสิ่งแวดล้อม กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม ได้สำรวจการปนเปื้อนสารหนูในตัวอย่างน้ำและดิน ในอำเภอด่านช้าง ที่ตำบลองค์พระและตำบลวังคัน ปี พ.ศ. 2552 พบว่าตำบลองค์พระมีตัวอย่างน้ำผิวดินซึ่งมีปริมาณสารหนูอยู่ระหว่าง 56-497 ไมโครกรัมต่อลิตร ตัวอย่างดินมีปริมาณสารหนูอยู่ระหว่าง 22-380 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และในตัวอย่างน้ำประปามีปริมาณสารหนูอยู่ระหว่าง 0.34-754.40 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับในตำบลวังคัน พบปริมาณสารหนูในน้ำผิวดินและน้ำประปามีค่าระหว่าง 38.30-81.36 และ 5.57-141.70 ไมโครกรัมต่อลิตร และปนเปื้อนในดิน 5-90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, 2553)

ตารางที่ 4 ชนิดของสารอันตรายประเภทโลหะหนักและค่ามาตรฐานคุณภาพดิน

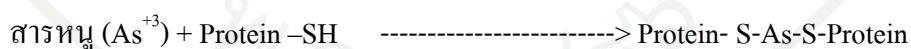
ชนิดของสารอันตรายประเภทโลหะหนัก	มาตรฐานคุณภาพดินประเภทโลหะหนัก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
	เขตที่อยู่อาศัยและเกษตรกรรม	นอกเขตที่อยู่อาศัยและเกษตรกรรม
1. สารหนู (Arsenic)	ต้องไม่เกิน 3.9	ต้องไม่เกิน 27
2. แคดเมียมและสารประกอบแคดเมียม (Cadmium and compounds)	ต้องไม่เกิน 37	ต้องไม่เกิน 810
3. โครเมียมชนิดเฮกซะวาเลนต์ (Hexavalent Chromium)	ต้องไม่เกิน 300	ต้องไม่เกิน 640
4. ตะกั่ว (Lead)	ต้องไม่เกิน 400	ต้องไม่เกิน 750
5. แมงกานีสและสารประกอบแมงกานีส (Manganese and compounds)	ต้องไม่เกิน 1,800	ต้องไม่เกิน 32,000
6. ปรอทและสารประกอบปรอท (Mercury and compounds)	ต้องไม่เกิน 23	ต้องไม่เกิน 610
7. นิกเกิลในรูปของเกลือที่ละลายน้ำได้ (Nickel, soluble salts)	ต้องไม่เกิน 1,600	ต้องไม่เกิน 41,000
8. ซีลีเนียม (Selenium)	ต้องไม่เกิน 390	ต้องไม่เกิน 10,000

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2547ค)

กลไกความเป็นพิษของสารหนู

สารหนูเป็นธาตุพิษที่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ และจัดเป็นธาตุพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ร้ายแรงในกลุ่มที่เป็นอันตรายสูงสุด (Group A) (IRIS, 1998; EPA, 2004) การแบ่งกลุ่มสารประกอบอนินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีอันตรายร้ายแรงต่อการเกิดโรคมะเร็ง ดังตารางที่ 5 ทั้งนี้ระดับความเป็นพิษของสารหนูที่ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น รูปของสารหนูและความสามารถในการละลาย (Pongratz, 1998) โดยทั่วไปพิษของสารหนูอาร์เซไนต์จะมีมากกว่าอาร์เซเนตถึง 100 เท่า (Cervantes *et al.*, 1994) เนื่องจากอาร์เซไนต์ละลายได้ดีกว่าและถูกดูดซึมได้ง่ายกว่าจึงเป็นพิษมากกว่าอาร์เซเนตซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่ละลายหรือละลายได้น้อย (McGeehan, 1996) สำหรับสารหนูอินทรีย์ในกลุ่มเมทิล เช่น MMAA และ DMAA จะมีพิษน้อยกว่าอาร์เซไนต์และอาร์เซเนต (Leonard, 1991) ระดับความเป็นพิษของสารหนูเรียงตามลำดับได้ดังนี้ $\text{arsine} > \text{inorganic As(III)} > \text{organic As(III)} > \text{inorganic As(V)} > \text{organic As(V)} > \text{arsonium compounds}$ และ elemental arsenic (Viraraghavan *et al.*, 1999)

ความเป็นพิษของสารหนูต่อร่างกายเกิดขึ้นเช่นเดียวกับโลหะมีพิษอื่น เช่น ตะกั่ว และปรอท ทั้งนี้สารประกอบของสารหนูอาร์เซไนต์จะรวมตัวกันทางเคมีกับหมู่ $\text{sulfhydryl group (-SH)}$ ใน R-SH ของโปรตีน โพลีเปปไทด์หรือเอนไซม์ รวมทั้ง glutathione และ cysteine ในเซลล์ได้ดี ทำให้การออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction) และกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เซลล์จึงไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติและเกิดอาการผิดปกติหรือเจ็บป่วยขึ้น (Styblo *et al.*, 1999) ปฏิกริยาดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ปฏิกริยาการรวมตัวกันทางเคมีของ sulfhydryl ในโปรตีนหรือเอนไซม์กับสารหนูอาร์เซไนต์ (S-Protein: โปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติ)

ตารางที่ 5 ชนิดของสารประกอบอนินทรีย์และระดับความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งร้ายแรง

สารประกอบอนินทรีย์	มาตรฐานในน้ำดื่ม		ระดับความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็ง (Cancer group ^{/3})
	MCLG ^{/1} (มิลลิกรัมต่อลิตร)	MCL ^{/2} (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
Ammonia	-	-	D
Antimony	0.006	0.006	D
Arsenic	0	0.01	A
Barium	2	2	D
Beryllium	0.004	0.004	-
Boron	-	-	D
Bromate	0	0.01	B2
Cadmium	0.005	0.005	D
Chloramine ^{/4}	4	4	-
Chlorine	4	4	D
Chlorine dioxide	0.8	0.8	D
Chlorite	0.8	1	D
Chromium (total)	0.1	0.1	D
Copper	1.3	< 1.3	D
Cyanide	0.2	0.2	D
Fluoride	4	4	-
Lead	0	< 0.015	B2
Manganese	-	-	D
Mercury	0.002	0.002	D
Molybdenum	-	-	D
Nickel	-	-	-
Nitrate/Nitrite	10	10	-
Selenium	0.05	0.05	D
Silver	-	-	D

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สารประกอบอนินทรีย์	มาตรฐานในน้ำดื่ม		ระดับความเสี่ยงในการ เป็นโรคมะเร็ง (Cancer group ^{1/3})
	MCLG ^{1/} (มิลลิกรัมต่อลิตร)	MCL ^{2/} (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
Strontium	-	-	D
Thallium	0.0005	0.002	-
White phosphorous	-	-	D
Zinc	-	-	D

^{1/} MCLG (maximum contaminant level goal); ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้และไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

^{2/} MCL (maximum contaminant level); ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ในน้ำดื่ม

^{3/} ระดับความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งร้ายแรง (Cancer group): การประเมินเชิงคุณภาพสำหรับการแบ่งกลุ่มของสารเคมีที่เป็นสารก่อมะเร็ง แบ่งเป็น 5 กลุ่ม

Group A	Human carcinogen
Group B	Probable human carcinogen (B1: limited human, B2: evidence in animals and inadequate or no evidence in human)
Group C	Possible human carcinogen
Group D	Not classifiable as to human carcinogen
Group E	Evidence of noncarcinogenicity for humans

ที่มา: ดัดแปลงจาก EPA (2004)

สำหรับอาร์ซีน (Arsine, AsH₃) ซึ่งเป็นแก๊สพิษ สามารถแสดงความเป็นพิษได้เช่นเดียวกับสารหนูอาร์เซไนต์และอาร์เซเนต กล่าวคือ สามารถรวมกับหมู่ -SH ของเอนไซม์สำคัญที่มีหมู่ -SH หลายชนิด ซึ่งจำเป็นต่อกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism) นอกจากนี้สารหนูยังสามารถขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase, succinate hydrogenase, hexokinase ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม

ลักษณะความเป็นพิษอีกอย่างหนึ่งของอาร์ซีนคือ อาร์ซีนสามารถรวมตัวกับฮีโมโกลบินแล้วเกิดการออกซิเดชัน ซึ่งมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) เกิดภาวะโลหิตจางและเกิดการบกพร่องของเอนไซม์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการผิดปกติทางพันธุกรรมได้ (Stybło *et al.*, 1999)

อาการผิดปกติทางพันธุกรรมเนื่องจากสารหนู เกิดขึ้นเนื่องจากสารหนูจะขัดขวางการทำงานของดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) โดยสารหนูจะเข้าไปจับกับหมู่ hydroxyl ($-OH$) ของฟอสเฟตในกรดนิวคลีอิกอย่างแน่นหนา มีผลทำให้เกิดการสลายตัวของพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ระหว่างหมู่ฟอสเฟตกับ hydroxyl ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุล (conformation) ของ t-RNA จนไม่สามารถพากรดอะมิโนไปเกาะที่ไรโบโซม (ribosome) ได้ ส่งผลให้เกิดการผิดปกติทางพันธุกรรมทำให้สารหนูถูกจัดเป็นสารก่อมะเร็งของคน (human carcinogen) ชนิดหนึ่ง

การตรวจสอบสารหนูในร่างกาย สามารถตรวจพบได้ง่ายที่เส้นผม ขน และเล็บโดยผู้ที่ได้รับสารหนูเข้าไปมักจะปรากฏแถบสีขาวบนเล็บมือและเล็บเท้า แสดงถึงการหยุดชะงักของการเจริญเติบโตของเล็บ ส่วนเส้นผมและขนนั้นนิยมใช้ตรวจสอบระยะเวลาการสะสมสารหนูในร่างกาย เนื่องจากเป็นอวัยวะที่จะสะสมสารหนูเมื่อร่างกายไม่สามารถขับออกไปได้หมด ทั้งนี้สารหนูสามารถถูกขับออกจากร่างกายได้ทางปัสสาวะคิดเป็น 25% ภายใน 2-8 ชั่วโมง เมื่อได้รับสารหนูในวันแรก หลังจากนั้นร่างกายจะค่อยๆ ขับสารหนูออกมาทางปัสสาวะและอุจจาระเรื่อยๆ ภายใน 12 วัน จนกระทั่งขับออกจนหมด หากมีการสะสมไว้นานและได้รับในปริมาณมาก อาจใช้ระยะเวลานานถึง 70 วัน สารหนูจึงจะหมดไปจากกระแสเลือด สำหรับสารหนูที่ขับออกไม่หมดจะไปสะสมที่เส้นผมและกระดูก (WHO, 1981) ทั้งนี้ปริมาณสารหนูที่คนกินเข้าไปแล้วมีอันตรายถึงแก่ชีวิตทันทีอยู่ในช่วง 1.5-500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กองระบาดวิทยา, 2537)

ผลกระทบของสารหนูต่อสิ่งมีชีวิต

ผลกระทบของสารหนูต่อสิ่งมีชีวิตทั้งมนุษย์ สัตว์และจุลินทรีย์ มีรายละเอียดดังนี้

1. ผลกระทบของสารหนูต่อมนุษย์

สารหนูมีผลกระทบที่รุนแรงต่อระบบประสาท ระบบทางเดินอาหารและผิวหนัง การได้รับพิษจากสารหนูเป็นเวลานานจะทำให้เกิดอาการแบบเรื้อรัง เรียกว่า arsenicosis ซึ่งเป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ ระบบการย่อย ระบบไหลเวียนเลือด และการขับของเสีย รวมทั้งมีผลต่อการเกิดโรคมะเร็ง (Saha, 2003; Berg *et al.*, 2006) ผลกระทบของสารหนูจะมากหรือน้อยแค่ไหนขึ้นกับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับ ซึ่งโดยปกติแล้วร่างกายสามารถขับสารหนูออกมาได้เองภายใน 2-3 วัน หากได้รับสารหนูปริมาณไม่มากนัก (ธวัชชัย และ รัชฎา, 2543) ทั้งนี้การตรวจปริมาณสารหนูที่ตกค้างในร่างกายสามารถทำได้จากการวัดการตกค้างในเส้นผม ขนและเล็บ เนื่องจากสารหนูสามารถสะสมที่เส้นผม ขนและเล็บ ในอัตราส่วนที่ค่อนข้างคงที่จึงสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการวัดปริมาณการได้รับปริมาณสารหนูที่สะสมได้ดี ส่วนสารหนูในเลือดและน้ำปัสสาวะสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การได้รับสารหนูในระยะแรก เนื่องจากสารหนูจะถูกขับออกจากร่างกายตามปกติทำให้ปริมาณสารหนูในเลือดและปัสสาวะจะค่อยๆ ลดลง

อาการที่พบจากการได้รับสารหนูมี 2 ลักษณะคือ อาการเป็นพิษเฉียบพลันและเรื้อรัง อาการเป็นพิษแบบเฉียบพลันจะเกิดจากการได้รับสารหนูในปริมาณมากเกินไปจากการดื่มกินภายใน 30 นาที โดยมีอาการเริ่มตั้งแต่ระคายเคือง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย ไตถูกทำลาย ไอ เจ็บหน้าอกและหายใจลำบาก ชีพจรเต้นเบา มีความดันเลือดต่ำ แขนขาไม่มีแรง ชัก หมดสติ และอาจถึงตายได้เมื่อได้รับสารหนูอนินทรีย์เพียง 1-3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Shih, 2005; Saha *et al.*, 1999) สำหรับอาการเป็นพิษแบบเรื้อรังเกิดขึ้นจากการได้รับสารหนูเป็นเวลานาน อาการโดยทั่วไปมักเป็นอาการทางผิวหนัง กล้ามเนื้อ ระบบประสาทและระบบไหลเวียนเลือด (WHO, 2000; Saha *et al.*, 1999) โดยมีอาการเริ่มตั้งแต่การระคายเคือง จนกระทั่งผิวหนังด้านหนา เม็ดสีที่ผิวเปลี่ยนเป็นสีดำเข้ม อาจพบเป็นรอยตกกระตามร่างกาย ที่ฝ่ามือจะเป็นจุดขาวๆ กระจายเต็มฝ่ามือ ส่วนฝ่าเท้าจะเกิดเป็นจุดสีดำใหญ่เห็นได้ชัดเจนทั้งสองข้างของฝ่าเท้า เรียกว่าโรค blackfoot หากไม่ได้รับการรักษาอาจกลายเป็นมะเร็งผิวหนังได้ United States Environmental Protection Agency (USEPA) รายงานว่าอาการทางผิวหนังดังกล่าวจะเกิดขึ้นเมื่อได้รับสารหนูในอัตรา 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใน 1 วัน

และมีผลต่อดับและไคเมื่อได้รับสารหนูในอัตรา 1.4 มิลลิกรัมต่อวันติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน (IRIS, 1994) การได้รับพิษจากสารหนูผ่านทางผิวหนังสามารถเกิดขึ้นได้ง่าย และส่วนใหญ่เกิดจากการใช้ยารักษาโรค หรือการสัมผัสยากำจัดศัตรูพืชหรือการใช้เครื่องสำอางค์ที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้สารหนูสามารถซึมผ่านทางรกในสตรีมีครรภ์ได้ ทำให้เกิดการถ่ายทอดปริมาณของสารหนูระหว่างแม่และทารกในครรภ์ (WHO, 1981) สำหรับอาการอื่นๆ มักเป็นอาการเกี่ยวกับไขกระดูก และระบบประสาทส่วนปลาย ได้แก่ อ่อนเพลีย ปวดเมื่อย ระบบทางเดินอาหารผิดปกติและมีไข้ (Lagerkvist and Zetterlund, 1994)

2. ผลกระทบของสารหนูต่อพืช

การตอบสนองต่อสารหนูของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความไวในการตอบสนองของพืชนั้นๆ โดยพืชที่มีกลไกในการต้านทานสารหนูจะตอบสนองสารหนูได้ช้า (Meharg, 1994) หรือต้านทานพิษของสารหนูได้สูง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารหนูเป็นพิษต่อข้าว (*Oryza sativa*) และฝ้าย (*Gossypium* spp.) (Wells and Gilmour, 1977) โดยมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของราก และทำให้พืชตายในที่สุด (Macnair and Cumbes, 1987; Meharg and Macnair, 1992; Paliouris and Hutchinson, 1991; Barrachina *et al.*, 1995) ทั้งนี้สารหนูอาร์เซนดจะมีการสะสมในพืชมากกว่าอาร์เซไนต์ เนื่องจากอาร์เซนดเป็นธาตุที่คล้ายคลึงกับฟอสฟอรัสซึ่งเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช (Meharg and Macnair, 1992; Sharples *et al.*, 2000) และมีผลต่อการแก่งแย่งการดูดใช้ฟอสเฟตของพืชที่ใช้ในการสร้างพลังงาน ทำให้เซลล์พืชไม่สามารถทำงานได้เต็มที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (Meharg, 1994) อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดก็ไม่ตอบสนองต่อสารหนู เช่น *Andropogon scoparius* (Rocovich and West, 1975), *Agrostis castellana*, *Agrostis delicatula* (De Koe and Jacques, 1993), *Agrostis capillaries*, *Descham pspicespitosa*, *Holcus lanatus* (Meharg and Macnair, 1992), *Silene vulgaris* (Paliouris and Hutchinson, 1991), *Plantago lanceolata* (Pollard, 1980) และ *Calluna vulgaris* (Sharples *et al.*, 2000)

3. ผลกระทบของสารหนูต่อจุลินทรีย์

สารหนูที่ปนเปื้อนในดินหรือในสภาพแวดล้อมจะส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในหลายลักษณะ กล่าวคือ สารหนูมีผลต่อการลดกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ เช่น มวลชีวภาพ การหายใจ การตรึงไนโตรเจน และโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์ (Giller *et al.*, 1998;

Vig *et al.*, 2003; Chander *et al.*, 1995; Khan and Scullion, 2002; Aka and Darici, 2004; Kuperman and Carreiro, 1997; Kao *et al.*, 2006)

จากการศึกษาของ Hiroki (1993) ซึ่งศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ในดินปนเปื้อนสารหนูที่เมืองโทโรกู ประเทศญี่ปุ่น 2 บริเวณ คือ บริเวณที่มีสารหนูปนเปื้อนอยู่ในช่วง 32-43 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน และบริเวณที่มีสารหนูปนเปื้อน 391-459 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน พบว่าสารหนูมีผลต่อการลดจำนวนของแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีทและรา โดยเราสามารถอยู่รอดในบริเวณที่มีสารหนูปนเปื้อนได้สูงกว่าแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท เช่นเดียวกับ Olivera and Pumpulha (2006) ที่ศึกษาผลของการปนเปื้อนของโลหะหนักรวมทั้งสารหนูที่มีการปนเปื้อนมากถึง 1,558 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในระยะยาวต่อจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท ราและแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในดินต่างมีจำนวนลดลงในการทดลองทั้ง 2 ปีที่ทำการศึกษา (ค.ศ. 2003-2004) รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ dehydrogenase และปริมาณของ ATP ก็ลดลงด้วย

สารหนูในรูปอาร์เซเนตและอาร์เซไนด์ซึ่งเป็นพิษต่อจุลินทรีย์จะมีกลไกความเป็นพิษที่แตกต่างกัน โดยอาร์เซไนด์จะเข้าไปขัดขวางการจับกันของโปรตีนในกลุ่ม sulfhydryl (Gebel, 2000) ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเอนไซม์หรือขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้อาร์เซไนด์ยังมีผลต่อการทำลายเนื้อเยื่อของเซลล์จุลินทรีย์และทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด ในขณะที่อาร์เซเนตจะไปขัดขวางการดูคใช้ฟอสฟอรัสซึ่งจำเป็นต่อกระบวนการสร้างพลังงาน (ATP synthesis) (Cervantes *et al.*, 1994) ในปฏิกิริยา oxidative phosphorylation ของจุลินทรีย์ (Rathinasabapathi, 2006) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสร้างพลังงานได้ นอกจากรูปของสารหนูที่จะมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในหลายลักษณะแล้ว ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารหนูก็มีผลต่อการตอบสนองต่อสารหนูของจุลินทรีย์ด้วย จากการศึกษากของ Mandel and Suzuki (2002) ซึ่งได้ศึกษาผลกระทบของสารหนูต่อ *Bacillus cereus* และเราพบว่าสารหนูสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ โดย *B. cereus* จะเริ่มมีการเจริญลดลง เมื่อมีอาร์เซไนด์และอาร์เซเนต ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ทั้งนี้ระดับความเป็นพิษของอาร์เซเนตจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีฟอสเฟตในปริมาณต่ำ ในขณะที่ฟอสเฟตไม่มีผลต่อการเพิ่มระดับความเป็นพิษของอาร์เซไนด์ในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* สำหรับความเป็นพิษของสารหนูต่อราพบว่าอาร์เซไนด์และอาร์เซเนตสามารถยับยั้งการเจริญของราได้เช่นเดียวกัน (Da costa, 1972)

การลดการปนเปื้อนและจัดพิษของสารหนูในดิน

จากความเป็นพิษของสารหนูที่กล่าวมาทำให้หลายหน่วยงานได้กำหนดมาตรฐานเพื่อควบคุมระดับของสารหนูและป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่กระจายสารหนูในสิ่งแวดล้อมตั้งแต่ปี ค.ศ. 1986 ทั้งนี้ Environmental Protection Agency (EPA) ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ทำหน้าที่ในการควบคุมปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกา รวมทั้งทำหน้าที่กำหนดมาตรฐานของสารพิษต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมจึงต้องมีการกำหนดมาตรฐานปริมาณสารหนูสูงสุดในน้ำดื่มที่ยอมรับได้ เพื่อเป็นการป้องกันและเฝ้าระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของสารหนูมากขึ้น โดยปี ค.ศ. 1996 ได้กำหนดให้มีค่าไม่เกิน 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ปัจจุบันได้มีการทบทวนข้อกำหนดสำหรับมาตรฐานปริมาณสารหนูสูงสุดในน้ำดื่มที่ยอมรับได้เพื่อเป็นการควบคุมระดับของสารหนูไม่ให้ปนเปื้อนจนเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม โดยในปี ค.ศ. 2002 ได้มีการปรับค่ามาตรฐานจากเดิมมีค่าสูงสุดไม่เกิน 50 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นมีค่าสูงสุดไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อลิตร (EPA, 2002) สำหรับประเทศไทย กรมควบคุมมลพิษ (2547ก) ได้กำหนดมาตรฐานเพื่อควบคุมระดับของสารหนูไว้เช่นเดียวกัน ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

จากปัญหาการปนเปื้อนสารหนูในสิ่งแวดล้อมดังกล่าว ทำให้หลายหน่วยงานมีความพยายามที่จะลดการปนเปื้อนหรือจัดพิษสารหนูให้หมดไปจากดิน ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาอันนานและเลือกวิธีการที่เหมาะสม เนื่องจากดินมีความสามารถในการดูดซับสารหนูได้ทำให้เกิดการตกค้างในดินได้สูง (Peijnenburg *et al.*, 1997; Alexander, 2000) และสารหนูยังสามารถเคลื่อนที่และสะสมอยู่ในดินได้โดยอาศัยกระบวนการต่างๆ เช่น ความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนและการตกตะกอน ในสภาพธรรมชาติทั่วไปสารหนูอาร์เซนิตจะเคลื่อนที่ได้ง่ายกว่าอาร์เซนต แต่เมื่อดินมีฟิออซเป็นกลางอาร์เซนตจะถูกเคลื่อนย้ายได้ง่ายกว่าอาร์เซนิต (Simeonova, 2004; Santini and Vander Hoven, 2004) ดังนั้นการลดการปนเปื้อนและจัดพิษของสารหนูในดินให้มีประสิทธิภาพต้องเลือกวิธีที่เหมาะสม ซึ่งต้องคำนึงถึงรูปของสารหนูของดิน ปริมาณเหล็กซัลเฟต สมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของดิน เช่น การระบายน้ำระบายอากาศ ชนิดของพืชและจุลินทรีย์ อีกทั้งอาจต้องใช้วิธีการหลายวิธีผสมผสานกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารหนูดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

วิธีการจัดพิษของสารหนูในดินที่สำคัญคือ กระบวนการออกซิเดชันสารหนูอาร์เซไนต์ ให้เปลี่ยนเป็นอาร์เซเนตซึ่งเป็นพิษน้อยกว่า กระบวนการนี้สามารถเกิดได้โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี เช่น คลอรีน สารประกอบไฮเปอร์คลอไรด์ โอโซน สารประกอบเปอร์แมงกาเนต ออกซิเจนและไฮเปอร์ออกไซด์ร่วมกับเหล็ก เป็นต้น สารพวกคลอรีนและสารประกอบไฮเปอร์คลอไรด์นิยมใช้กันมากเนื่องจากมีราคาถูก (Guyal *et al.*, 2003) นอกจากการออกซิไดซ์โดยสารเคมีแล้วสารหนูสามารถถูกออกซิไดซ์ได้โดยจุลินทรีย์บางชนิดที่อยู่ในดิน เช่น *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Thiobacillus ferrooxidans* (Stolz *et al.*, 2006) และ *Alcaligenes faecalis* (Anderson *et al.*, 1992; Stolz *et al.*, 2006)

การจัดพิษหรือลดการปนเปื้อนสารหนูในดินอาจทำได้โดยการเคลื่อนย้ายสารหนูออกไปจากบริเวณปนเปื้อนซึ่งต้องอาศัยกระบวนการดูดซับและตกตะกอนสารหนูก่อน สารที่มีอำนาจในการดูดซับโมเลกุลสารหนูได้อาจเป็นสิ่งที่หาได้จากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้น เช่น แร่ดินเหนียว ชนิดต่างๆ แมกนีเซียมออกไซด์ ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ซิลิกาแกมมันต์ (activated silica) เรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange resin) ทั้งนี้อนุภาคดินเหนียวและออกไซด์ของเหล็ก อะลูมิเนียมและแมกนีเซียมที่มีอยู่ในดินเป็นส่วนสำคัญที่มีผลต่อปฏิกิริยาการดูดซับกับสารหนู โดยเหล็กออกไซด์สามารถดูดซับสารหนูได้ดี แต่การเปลี่ยนแปลงของพีเอชจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับสารหนูได้มากกว่าอะลูมิเนียม โดยพบว่าการดูดซับสารหนูจะลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณคาร์บอนเนต และไบคาร์บอนเนตจะไปขัดขวางกระบวนการดูดซับของไฮดรอกไซด์ของเหล็ก (hydrous ferric oxide) กับอาร์เซเนต ทำให้ประสิทธิภาพการดูดซับลดลงจาก 90% เป็น 10% เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นเพียง 2 หน่วย (Vance, 2001) จากการศึกษาของ Grafe *et al.* (2002) พบว่าสารหนูอาร์เซไนต์และอาร์เซเนตที่ถูกดูดซับอยู่บนแร่ goethite ในสภาพธรรมชาตินั้น จะลดความสามารถในการดูดซับเมื่อพีเอชของดินสูงขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้สารดูดซับควรเลือกใช้ให้เหมาะสมกับรูปของสารหนูและคุณสมบัติทางเคมีของดิน เช่น พีเอชและความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน

นอกจากวิธีทางเคมีและกายภาพที่ใช้ในการการลดการปนเปื้อนหรือลดความเป็นพิษของสารหนูแล้ว ยังสามารถใช้พืช (phytoremediation) หรือจุลินทรีย์ (bioremediation) ในการบำบัดได้ เช่น Chinese brake fern และ Indian mustard (Agely *et al.*, 2005) ใช้ได้ดีกับการจัดพิษของสารหนูในน้ำ ซึ่งประสิทธิภาพจะขึ้นอยู่กับกิจกรรมและการเจริญเติบโตของพืชนั่นเอง สำหรับการ

ใช้จุลินทรีย์ในการจัดพิษของสารหนูนั้นมักเกี่ยวข้องกับกระบวนการสำคัญคือ ออกซิเดชัน เมทิลเลชันหรือรีดักชัน (Simeonova, 2004)

การแปลงสารหนูของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ถือว่าเป็นบทบาทสำคัญต่อการแปลงสารหนูและวัฏจักรของสารหนูในธรรมชาติ กระบวนการสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแปลงสารหนูและความเป็นพิษของสารหนูนั้นเกิดจากกระบวนการสำคัญ 2 กระบวนการ คือ กระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการรีดักชัน โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การออกซิเดชันสารหนูอินทรีย์ (อาร์เซนไนต์)

สารหนูอินทรีย์อาร์เซนไนต์สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียและอาร์เคีย โดยใน ปี ค.ศ. 1918 พบว่า *Bacillus arsenoxidans* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์สารหนู (Simeonova, 2004) ปัจจุบันพบแบคทีเรียพวก heterotroph หรือ chemoautotroph ที่สามารถออกซิไดซ์อาร์เซนไนต์ได้หลายชนิดทั้ง β -proteobacteria เช่น *Achromobacter (Alcaligenes) faecalis* (Osborne and Enrlich, 1976), *Cenibacterium arsenoxidans* ULPAs1 (Weeger *et al.*, 1999) และ γ -proteobacteria เช่น *Alkalispirillum mobile* MLHE-1 (Oremland *et al.*, 2002), *Pseudomonas putida* (Abdrashitova *et al.*, 1985) และ *Pseudomonas arsenoxidans* (Ilialetdinov and Abdrashitova, 1981) รวมทั้ง α -proteobacteria เช่น *Agrobacterium albertimagni* AOL15 (Santini *et al.*, 2000) สำหรับพวกอาร์เคียที่สามารถออกซิไดซ์อาร์เซนไนต์ได้แก่ *Thermus thermophilus* HB8, *Thermus aquaticus* YTI (Gihring *et al.*, 2001), *Thermus* sp. HR13 (Gihring and Banfield, 2001), *Sulfolobus acidocaldarius* BC (Sehlin and Lindstrom, 1992), *Pyrobaculum aerophilum*, *Pyrobaculum arsenaticum* (Huber *et al.*, 2000) และ *Thermus* sp. HR13 (Gihring *et al.*, 2001)

การออกซิเดชันสารหนูถือเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญต่อกลไกการจัดพิษของสารหนูในแบคทีเรียอย่างมาก เนื่องจากสามารถแปลงสารหนูจากรูปที่เป็นพิษมากให้เป็นพิษน้อยลงโดยการแปลงสารหนูในรูปอาร์เซนไนต์ให้เป็นอาร์เซนเตต (Santini *et al.*, 2000, Weeger *et al.*, 1999) Muller *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียพวก *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 ซึ่ง

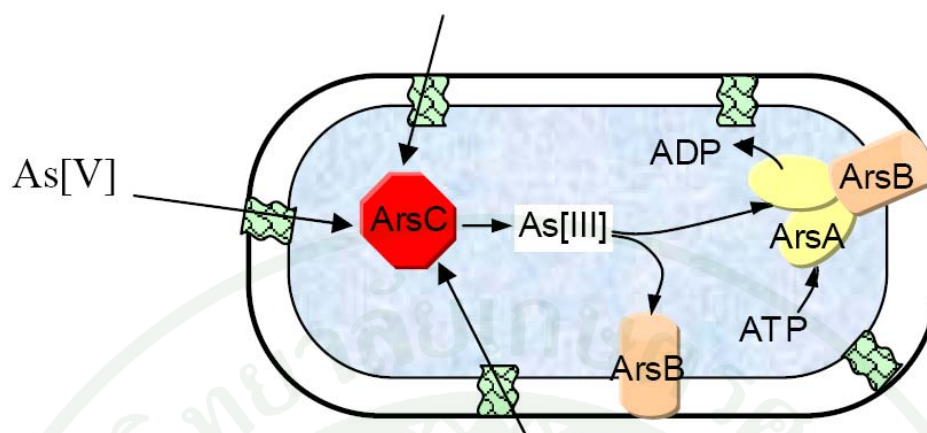
สามารถออกซิไดซ์อาร์เซนไนต์โดยทำให้แบคทีเรียดังกล่าวกลายพันธุ์ด้วยการนำยีนที่เกี่ยวข้องกับการออกซิไดซ์อาร์เซนไนต์ในแบคทีเรียออกไป ทำให้ทราบว่ายีนดังกล่าวทำหน้าที่ควบคุมการแปลงสารหนู ต่อมาได้มีการศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการออกซิเดชันในแบคทีเรียแกรมลบพวก chemoheterotrophic คือ *Alcaligenes faecalis* และพบว่าเอนไซม์ที่ทำหน้าที่นี้คือ เอนไซม์ arsenite oxidase ซึ่งถูกผลิตขึ้น ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (inner membrane) ของ *A. faecalis* โดยเอนไซม์นี้จะประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาดใหญ่ (large subunit) 2 หน่วยย่อยคือ Mo-pterin และ HiPIP protein (high potential iron protein) และหน่วยย่อยที่มีขนาดเล็ก (small subunit) 1 หน่วยย่อยเรียกว่า Rieske ทั้งนี้เอนไซม์ arsenite oxidase จะทำงานเมื่อใช้ azurin หรือ cytochrome c เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) (Anderson *et al.*, 2001)

2. การรีดักชันสารหนู

กลไกการรีดักชันสารหนูสามารถเกิดขึ้นได้ 2 กระบวนการซึ่งพบได้ทั้งในแบคทีเรีย รา และสาหร่าย โดยกระบวนการแรกเป็นกระบวนการการรีดักชันสารหนูเพื่อประโยชน์ในการจัดพิษ ในขณะที่กระบวนการที่สองเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเฉพาะในแบคทีเรียและอาร์เคียบางชนิดซึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้สารหนูเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจของแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตแบบ autotroph หรือ heterotroph (Simeonova, 2004)

2.1 กระบวนการจัดพิษของสารหนูโดย periplasmic As reduction

กลไกการรีดักชันของอาร์เซนเตภายในเซลล์ของโปรคาริโอตจะมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน กลไกการจัดพิษของสารหนูจะขึ้นอยู่กับชนิดของยีนที่มีอยู่ใน *ars operon* ซึ่งต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ arsenate reductase (ArsC) ในไซโตโครม สำหรับระบบการขับสารหนูออกนอกเซลล์อาจจะเกิดขึ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ArsB (ควบคุมโดยยีน *arsB*) เพียงเอนไซม์เดียวหรือเกิดขึ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ArsAB ATPase ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยของเอนไซม์ ArsB (ควบคุมโดยยีน *arsB*) และ ArsA ATPase (ควบคุมโดยยีน *arsA*) (Simeonova, 2004) สำหรับชนิดของเอนไซม์และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการรีดักชันสารหนู ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กลไกการจัดพิษของสารหนูและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต

ที่มา: Simeonova (2004)

เอนไซม์ arsenate reductase (ArsC) ในแบคทีเรียและอาร์เคียบางชนิดเป็นเอนไซม์ที่นักวิทยาศาสตร์รู้จักกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งควบคุมโดยเป็นยีนที่อยู่ใน *ars* operon และทำหน้าที่ในการรีดักชันสารหนูอาร์เซนเตเป็นอาร์เซไนต์ ปัจจุบันพบเอนไซม์ arsenate reductase ที่ผลิตจากยีน *arsC* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 3 กลุ่ม ได้แก่ ArsC-couple Glutaredoxin/Glutathione Thioredoxin-couple ArsC และ ArsC-Acp2 (Mukhopadhyay *et al.*, 2002) ทั้งนี้แบคทีเรียแกรมลบจะมีระบบการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ ArsC กับ glutaredoxin/glutathione (Grx/GSH) ซึ่งเชื่อว่าระบบการทำงานแบบนี้จะมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ arsenite oxidase ของ *Alcaligenes* sp. และเอนไซม์ arsenate reductase ของ *Shewanella* sp. ซึ่งพบทั้งในพลาสมิดและโครโมโซม สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกพบระบบการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ ArsC กับ Thioredoxin (Thioredoxin-couple ArsC; Trx ArsC) เช่น *Staphylococcus* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Ji and Silver, 1992b) สำหรับ พวกยูคาริโอตจะพบการทำงานร่วมกันระหว่าง ArsC-Acp2 เช่น *Saccharomyces cerevisiae* (Mukhopadhyay *et al.*, 2002)

2.2 กระบวนการหายใจโดยใช้อาร์เซนิต

ระบบการหายใจที่มีสารหนูเข้ามาเกี่ยวข้องถือเป็นกลไกการรีดักชันอาร์เซนิตอีกลักษณะหนึ่งที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียและอาร์เคีย กลไกการรีดักชันนี้เกิดจากแบคทีเรียสามารถใช้สารหนูเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจ แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์อาร์เซนิตได้มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus arsenicoselenati*, *Bacillus selenitireducens* (Switzer *et al.*, 1998), *Bacillus* sp. SF-1 (Yamamura *et al.*, 2003), *Chrysiogenes arsenatis* และ *Desulfotobacterium* GBFH (Niggemeyer *et al.*, 2001) รวมทั้งแบคทีเรียพวก γ -proteobacteria และ ϵ -proteobacteria เช่น *Desulfomicrobium* sp. Ben-RB, *Desulfovibrio* sp. Ben-RA (Macy *et al.*, 2000), *Desulfosporosinus auripigmentu*, *Sulfurospirillum arsenophilum*, *Sulfurospirillum deleyianum* (Stolz *et al.*, 1999) และ *Shewanella trabarsenatis* (Saltikov *et al.*, 2003)

กระบวนการรีดักชันอาร์เซนิตซึ่งใช้ในการหายใจของจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่มีฮีมและโปรตีนหรือเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง โปรตีนดังกล่าวได้แก่ anaerobic arsenate reductase (Arr) ซึ่งเป็น periplasmic protein ประกอบด้วยหน่วยใหญ่ของ molybdo-pterin subunit (ArrA) และหน่วยย่อยของ (ArrB) ซึ่งมีโมเลกุลของ Fe-S protein อยู่ที่แกนกลางของโครงสร้างโปรตีน (Krafft and Macy, 1998; Macy and Santini, 2002; Saltikov *et al.*, 2003) Saltikov and Newman (2003) และ Afkar *et al.* (2003) ได้ทำการวิเคราะห์ arsenate reductase ของแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus selenitireducens*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Shewanella trabarsenatis*) พบว่า *S. trabarsenatis* จะมีฮีม *arrAB* ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับฮีม *arsBCD* ใน *ars* operon (กลุ่มฮีมที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานสารหนู) ของ *B. selenitireducens* โดยแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน ArrA คล้ายคลึงกัน 47% (Silver and Phung, 2005)

กลไกการต้านทานสารหนูของแบคทีเรียในดิน

การต้านทานสารหนูของจุลินทรีย์เริ่มมีการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1900 โดยพบว่ากลไกการต้านทานสารหนูมักเกี่ยวข้องกับกระบวนการดังนี้

1. การแปลงสารหนูให้อยู่ในรูปแก๊ส ซึ่งพบมากในแบคทีเรียและอาร์เคีย (archaea) (Tamaki and Frankenberger, 1992)
2. กระบวนการ methylation ของสารหนูในรูปอนินทรีย์เป็นสารหนูในรูปที่เป็นพิษน้อยลง โดยอาศัยแบคทีเรีย สัตว์และพืช (Wu *et al.*, 2002)
3. การจับหรือดูดซับสารหนู เช่น glutathione ช่วยลดการจับสารหนูกับโปรตีนในเซลล์ของยีสต์และพืช (Schmoger *et al.*, 2000) และ
4. การขับสารหนูออกจากเซลล์โดยกระบวนการ arsenic transporter ซึ่งพบในแบคทีเรียยีสต์และพืช (Rosen, 1999)

กลไกการต้านทานสารหนูที่เกิดขึ้นเป็นลักษณะทางพันธุกรรมอย่างหนึ่งของแบคทีเรียที่ควบคุมโดยโครโมโซม (chromosome) หรือพลาสมิด (plasmid) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการถอดรหัสสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานสารหนู ลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมการต้านทานสารหนูโดยโครโมโซมมักเกี่ยวข้องกับการต้านทานอาร์เซนเนต ซึ่งกลไกในการต้านทานเป็นผลมาจากกระบวนการส่งผ่านฟอสเฟต (phosphate transport) ในกระบวนการสร้างพลังงาน (Willsky and Malamy, 1980; Cervantes *et al.*, 1994) จุลินทรีย์บางชนิดสามารถต้านทานสารหนูหรือสามารถนำสารหนูมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ เช่น จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้อาร์เซนเนตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) ในขณะที่จุลินทรีย์พวก chemoautotroph สามารถใช้อาร์เซนไนด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ (Jackson *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถต้านทานต่อความเป็นพิษของสารหนูได้เมื่อได้รับในปริมาณต่ำ เนื่องจากเกิดกระบวนการออกซิเดชันของอาร์เซนไนด์เปลี่ยนเป็นอาร์เซนเนตซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าได้โดยอาศัยเอนไซม์ arsenite oxidase หรือ peroxidase ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ หรืออาจอาศัยกระบวนการขับสารหนูออกนอกเซลล์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ arsenate reductase ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการขจัดพิษ (detoxification) ของจุลินทรีย์วิธีหนึ่ง (Jackson *et al.*, 2003) ดังนั้นกลไกและรูปแบบในการต้านทานสารหนูที่ควบคุมโดยโครโมโซมและพลาสมิดจึงมีผลต่อระดับความสามารถในการต้านทานสารหนูของแบคทีเรีย

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานสารหนู (arsenic resistance gene หรือ *ars* gene)

การศึกษาการต้านทานสารหนูของจุลินทรีย์แม้ว่ามีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง แต่การทำงานของยีนบางตัวก็ยังมีการศึกษาอยู่ในวงจำกัด โดยทั่วไปแล้วการต้านทานสารหนูของจุลินทรีย์จะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานสารหนูหลายยีนและมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป ทั้งการออกซิเดชันซึ่งศึกษาในในกลุ่ม *aox* gene (arsenic oxidation gene) และรีดักชันซึ่งเป็นการศึกษาในในกลุ่ม *ars* gene (arsenic resistance gene) โดยการศึกษา *aox* gene มักเป็นการศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการลดความเป็นพิษของสารหนูซึ่งยีนเหล่านี้จะช่วยให้เปลี่ยนสารหนูอาร์เซนในดินซึ่งมีพิษมากให้เป็นอาร์เซนเนตซึ่งมีพิษน้อยลง ในขณะที่ยีนในกลุ่ม *ars* gene เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดักชันของอาร์เซนเนต ซึ่งเป็นกลไกที่จุลินทรีย์ใช้ในการต้านทานสารหนูและขับสารหนูออกมาภายนอกเซลล์ ปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาการรีดักชันของอาร์เซนเนตมากขึ้น เนื่องจากการรีดักชันของจุลินทรีย์ถือเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมวัฏจักรของสารหนูในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในดิน น้ำใต้ดินและตะกอนดิน

จากการศึกษาการทำงานของยีนใน *ars* operon ของจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมียีนต้านทานสารหนูแตกต่างกัน ทำให้มีกลไกการทำงานของยีนใน *ars* operon ต่างกัน ทั้งนี้ยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านทานสารหนูที่เรียกว่า arsenic resistance gene (*ars* gene) ประกอบไปด้วยยีนสำคัญ 6 ยีน คือ *arsA* *arsB* *arsC* *arsD* *arsR* และ *arsH* ทั้งนี้ยีนดังกล่าวจะทำงานร่วมกันเป็นระบบเรียกว่า *ars* operon (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Rosen, 1999) ดังนั้นหากแบ่งจุลินทรีย์ตามการทำงานของยีนใน *ars* operon สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์ที่มียีนต้านทานสารหนู 5 ยีน ได้แก่ *arsA* *arsB* *arsC* *arsD* และ *arsR* ตัวอย่างเช่น *Escherichia coli* R773 *Escherichia coli* R46 และ *Acidiphilum multivolum* PKW301 (Silver and Phung, 1996) และจุลินทรีย์ที่มียีนต้านทานสารหนู 3 ยีน ได้แก่ *arsB* *arsC* และ *arsR* ตัวอย่างของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น *Staphylococcus xylosus* (pSX267), *Staphylococcus aureus* (pI258) (Ji and Silver, 1992a,b) *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas fluorescens* (Su, 2004) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดอาจมียีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานสารหนู 4 ยีนคือ *arsB* *arsC* *arsR* และ *arsH* ได้แก่ *Halobacterium* sp. NRC-1 (Su, 2004) ทั้งนี้จุลินทรีย์อาจมียีนต้านทานสารหนูที่อยู่ในจีโนมเพียงชุดเดียวหรือมากกว่าสองชุด ซึ่งอาจจะมีครบทุกยีนหรือมีเพียงบางยีนก็ได้ โดยแต่ละยีนจะมีบทบาทและหน้าที่ที่แตกต่างกัน กลไกการทำงานของ arsenic resistance gene บน *ars* operon มีดังนี้

1. ยีน *arsR* หรือ ArsR-trans-acting repressor protein เป็นยีนที่ควบคุมการถอดรหัส mRNA โดยการสังเคราะห์โปรตีน ArsR-transcriptional repressor protein โดยยีนนี้สามารถตอบสนองต่อสารหนูได้ดีในระดับต่ำ (basal level) (Chen and Rosen, 1997) ในสภาวะที่ไม่มีสารปนเปื้อนสารหนูหรือตัวเหนี่ยวนำอื่นๆ เช่น พลวง (Sb) จะเป็นตัวเหนี่ยวนำ ArsR protein ให้ไปจับกับ promoter ทำให้ไม่เกิดการ transcription แต่เมื่อมีตัวเหนี่ยวนำจะทำให้ ArsR protein ไปจับกับตัวเหนี่ยวนำเหล่านั้นทำให้เกิดการ transcription และมีการแสดงออกของยีนบน *ars* operon

2. ยีน *arsD* หรือ ArsD secondary regulator protein เป็นยีนที่มีหน้าที่คล้ายกับยีน *arsR* โดยทำหน้าที่ในการสร้าง ArsD protein ซึ่งเป็น regulator protein เหมือนกันแต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน (Wu and Rosen, 1993) จากการศึกษา ArsD protein พบว่า ArsD protein เป็นโปรตีนที่สามารถทำงานได้โดยการเหนี่ยวนำของอาร์เซนไนต์ที่ระดับความเข้มข้นสูงถึง 100 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ ArsR protein สามารถทำงานได้เมื่อมีอาร์เซนไนต์ความเข้มข้นเพียง 10 ไมโครโมลาร์ นั้นแสดงว่าการทำงานของ ArsD protein จะเกิดที่ตำแหน่งเดียวกันกับ ArsR protein แต่มีกลไกการทำงานที่ตอบสนองต่อระดับของสารหนูที่ต่ำกว่าหรือตอบสนองเมื่อมีสารหนูระดับสูงเท่านั้น (Chen and Rosen, 1997)

3. ยีน *arsB* หรือ ArsB-intergal membrane protein เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยยีนนี้มีการทำงาน 2 ลักษณะคือ 1) ยีน *arsB* ทำหน้าที่ขับสารหนูออกเพียงลำพังแบบ ATPase-independent transporter ซึ่งจะเคลื่อนย้ายอาร์เซนไนต์โดยกลไก chemiosmotic อาศัยความแตกต่างกันระหว่างความเข้มข้นของไอออนภายในเซลล์และนอกเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ไม่ต้องการพลังงาน 2) ยีน *arsB* ทำหน้าที่ร่วมกับยีน *arsA* แบบ ATPase-dependent transporter กล่าวคือ ArsB-intergal membrane protein จะทำหน้าที่จับกับสารหนูอาร์เซนไนต์ในบริเวณ binding site ทำให้ยีน *arsA* ผลิต ATPase เพื่อผลิตพลังงานในการขับสารหนูออกไป การทำงานในลักษณะนี้เป็นการทำงานที่มีประสิทธิภาพในการขับสารหนูได้สูงและเป็นกระบวนการที่ต้องการพลังงาน

4. ยีน *arsA* หรือ ArsA-oxyanion stimulate ATPase เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ ATPase protein ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำหน้าที่ในการสะสมและเป็นแหล่งพลังงานในการขับสารหนูออกนอกเซลล์ โดย ArsA protein จะประกอบไปด้วย ATP binding sites 2 หน่วย ซึ่งจำเป็นต่อการต้านทานสารหนูและกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ทั้งนี้สารหนูอาร์เซนไนต์และพลวงเป็นตัว

เหนียวนำและกระตุ้นยีน *arsA* ทำงานและทำให้ ArsA protein ไปจับกับ ArsB protein ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ก่อนที่จะขับสารหนุออกนอกเซลล์ (Su, 2004)

5. ยีน *arsC* หรือ ArsC-arsenate reductase เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ arsenate reductase ซึ่งจะเปลี่ยนสารหนุอาร์เซเนตให้เป็นอาร์เซไนต์ภายในเซลล์ก่อนที่จะขับออกนอกเซลล์ โดยแบคทีเรียแกรมลบ เอนไซม์ ArsC จะจับกับ glutathione หรือ glutaredoxine ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนก่อนที่อาร์เซเนตจะเปลี่ยนเป็นอาร์เซไนต์โดยเอนไซม์ arsenate reductase (Oden *et al.*, 1994) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวก ArsC protein จะจับกับตัวให้อิเล็กตรอนพวก thioredoxin แทน (Ji and Silver, 1992b) จากการศึกษาพบว่ายีน *arsC* จะมีความแปรปรวนสูง ซึ่งมีระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในแต่ละวงศ์ (family) ตั้งแต่ 61-91% (silver *et al.*, 2002; Jackson and Dugas 2003)

6. ยีน *arsH* เป็นยีนที่ยังไม่รู้หน้าที่ที่แน่นอน แต่พบอยู่บนพลาสมิดของ *Yersinia enterocolitica*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* และ *Serratia marcescens* PR478 (Ryan and Colleran, 2003) อย่างไรก็ตามเชื่อว่ายีนนี้มีความสำคัญต่อการต้านทานสารหนุ เนื่องจากเมื่อทำการดัดยีน *arsH* ออกจะทำให้จุลินทรีย์สูญเสียความสามารถในการต้านทานสารหนุ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่ายีน *arsH* น่าจะมีหน้าที่ในการเป็น secondary regulator คล้ายกันกับยีน *arsD* โดยอาจจะทำหน้าที่ควบคุมยีนเพียงบางส่วน เช่น ควบคุมยีน *arsB* หรือควบคุมการจับของโปรตีนที่ตำแหน่ง binding site ของ regulatory protein ในระบบการทำงานบน *ars* operon (Ryan and Colleran, 2002)

กลไกการต้านทานสารหนุในจุลินทรีย์ เริ่มจากจุลินทรีย์ได้รับสารหนุอาร์เซเนต ซึ่งอาร์เซเนตที่อยู่ในเซลล์จะเป็นตัวเหนียวนำและกระตุ้นการทำงานของยีน *arsR* (สร้าง ArsR-trans-acting repressor protein) หรือ ยีน *arsD* (สร้าง ArsD secondary regulator protein) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารหนุที่ได้รับ หลังจากนั้นจะเกิดการส่งสัญญาณไปยังยีน *arsC* และกระตุ้นให้เกิดการผลิตเอนไซม์ arsenate reductase เพื่อทำหน้าที่ในการรีดิวซ์อาร์เซเนตเป็นอาร์เซไนต์ ทั้งนี้อาร์เซไนต์จะถูกขับออกนอกเซลล์โดยอาศัย ArsB protein (integral membrane protein) ซึ่งควบคุมการทำงานโดยยีน *arsB* หรือโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของ ATPase complex (soluble ATPase unit) และ ArsB protein (Chen *et al.*, 1986) ซึ่งควบคุมการทำงานโดยยีน *arsA* และ *arsB* ตามลำดับ

การควบคุมการทำงานของยีนดังกล่าวข้างต้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณอาร์เซนิตในสิ่งแวดล้อมหรือในเซลล์ กล่าวคือ ArsR repressor protein จะควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับพื้นฐาน (basal level) เมื่อมีอาร์เซนิตในระดับต่ำยีนสามารถแสดงออกและตอบสนองได้ทันที ในขณะที่ ArsD regulator protein จะควบคุมการแสดงออกในระดับสูง (upper level) โดยจะมีการแสดงออกของยีนก็ต่อเมื่อมีอาร์เซนิตในปริมาณสูง (Butcher and Rawlings, 2002) สำหรับจุลินทรีย์บางชนิดอาจมีกลไกแตกต่างกัน เช่น *Bacillus subtilis* SKIN จะสร้าง YqcL protein ซึ่งจะทำหน้าที่คล้ายกับ ArsB protein ในการขับสารหนูกนอกเซลล์ (Sato and Kobayashi, 1998) สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* มีกลไกหลักในการต้านทานสารหนู 2 วิธีคือ 1) เปลี่ยนอาร์เซนิตเป็นอาร์เซไนต์โดย Arr2p protein (คล้ายกับ ArsC product จากยีน *arsC*) หลังจากนั้นขับสารหนูกออกด้วย Arr3p protein ซึ่งเป็น membrane efflux protein เหมือน ArsB protein 2) อาร์เซไนต์ถูกเคลื่อนย้ายไปและถูกขับจากบริเวณ cytoplasm ไปยังบริเวณ vacuole membrane โดย Ycf1p protein บริเวณ binding site ใน vacuole membrane (Mukhopadhyay *et al.*, 2002) จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์จะไม่ได้รับอันตรายจากอาร์เซไนต์ที่เกิดจากการรื้อถอนภายในเซลล์ เนื่องจากการทำงานของยีนที่เป็นลำดับขั้นตอน จุลินทรีย์บางชนิดซึ่งมียีนบางส่วนขาดหายไปจะมีความสามารถหรือประสิทธิภาพในการต้านทานหรือกลไกการต้านทานสารหนูน้อยและแตกต่างกันตามระบบของยีนที่ควบคุมที่แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลต่อระดับความสามารถในการต้านทานสารหนูที่แตกต่างกันไปด้วย

การใช้เทคนิค DGGE สำหรับการศึกษากลุ่มโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม

จุลินทรีย์ดินมีบทบาทสำคัญหลายประการในการรักษาคุณภาพและสมดุลของดินตามธรรมชาติ เนื่องจากจุลินทรีย์ดินมีบทบาทเกี่ยวข้องตั้งแต่กระบวนการเกิดดิน การย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุ วัฏจักรของธาตุอาหารพืช และการเปลี่ยนแปลงของสารพิษในดิน จึงอาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์ดินถือเป็นดัชนีชี้วัดความสมดุลและการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศในดินได้ สำหรับการศึกษาจุลินทรีย์ดินแบบดั้งเดิมมักเป็นการศึกษาเกี่ยวกับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Alexander, 2000; Murray *et al.*, 2000) และการวัดกิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ (Tabatabai, 1977; Bååth *et al.*, 1992; Insam *et al.*, 1996) แต่การศึกษาดังกล่าวมีข้อจำกัดของวิธีการ ทำให้มีจุลินทรีย์ดินเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Torsvik *et al.*, 1998) ดังนั้นจึงไม่สามารถทำการศึกษาดูจุลินทรีย์ดินได้ครอบคลุมทั้งหมด การเลือกใช้เทคนิคใหม่ๆ หรือการดัดแปลงเทคนิคต่างๆ ในการศึกษาดูจุลินทรีย์ดินจึงถูกนำมาใช้เพื่อให้สามารถประเมินได้อย่างถูกต้องมากขึ้น

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล มาช่วยในการศึกษาจุลินทรีย์กันมาก โดยสามารถใช้ในการศึกษาชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สนใจในตัวอย่างต่างๆ ทั้งดิน น้ำ หรือ เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังนำมาศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศอีกด้วย ซึ่งถือว่าเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีข้อได้เปรียบกว่าหลายประการ อีกทั้งยังรวดเร็วในการตรวจสอบแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ นอกจากนี้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้านด้วยกันนอกจากการศึกษาทางด้านจุลินทรีย์ เช่น ด้านการแพทย์ใช้ประโยชน์ในแง่การตรวจรักษาโรคและพัฒนายาใหม่ ด้านการเกษตรใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงและอนุรักษ์พันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ ด้านกฎหมายใช้ในการตรวจสอบบุคคล ตรวจพิสูจน์หลักฐานในคดีความ เป็นต้น (Amann *et al.*, 1995)

เทคนิคทางชีวระดับโมเลกุลเทคนิคหนึ่งที่ว่า Denaturing gradient gel electrophoresis หรือ DGGE เป็นเทคนิคที่มีการนำมาใช้ศึกษาโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์และความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ดี โดยเทคนิคนี้สามารถบอกความแตกต่างของโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้ ทั้งนี้อาศัยหลักการของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน จะมีความสามารถหรือความแข็งแรงในการแยกของสายดีเอ็นเอต่างกัน และเมื่อทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏออกมา จะพบแถบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างกันแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ที่มีความแตกต่างกัน (Muyzer *et al.*, 1993) การแยกตัวของดีเอ็นเอดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของดีเอ็นเอนั้นเอง ทั้งนี้โครงสร้างของดีเอ็นเอจะประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์ที่มาเรียงต่อกันเป็นสายยาวและมีเบสเรียงซ้ำๆ กัน จะมีลักษณะพันเป็นเกลียวคู่ ที่เกิดจากโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายเรียงตัวขนานและกลับทิศทางกัน มีน้ำตาลฟอสเฟตและหมู่ฟอสเฟตพันอยู่รอบนอกโมเลกุลเบสที่เรียงซ้ำๆ กัน ซึ่งประกอบไปด้วย adenine (A) guanine (G) cytosine (C) และ Thymine (T) จะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยเบส A และ T จะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ ในขณะที่เบส G และ C จะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ และต่อกับน้ำตาล deoxyribose ซึ่งมีตัวเชื่อมเป็นหมู่ฟอสเฟตระหว่างตำแหน่งที่ 5' ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับตำแหน่งที่ 3' ของน้ำตาลอีกโมเลกุลหนึ่ง เกิดเป็นโครงสร้างของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2539) การจับกันด้วยพันธะที่แตกต่างกันนี้จะมีผลต่อความสามารถหรือความแข็งแรงในการแยกของสายดีเอ็นเอจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวได้แตกต่างกัน

เทคนิค DGGE เป็นเทคนิคที่ต้องอาศัยการการเสียสภาพของดีเอ็นเอ (denature) ทำให้ดีเอ็นเอแยกตัวเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งการทำให้ดีเอ็นเอเกิดการแยกตัวนี้ต้องอาศัยสารประกอบ urea และ formamide ที่เป็นตัวกลางใน polyacrylamide gel ทั้งนี้ดีเอ็นเอที่มีเบสที่แตกต่างกันจะเกิดการแยกตัวต่างกันตามความเข้มข้นของ urea และ formamide ซึ่งมีลักษณะเป็น gradient และเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลจากขั้วลบไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้า จะเกิดการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเฉพาะขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ (Myers *et al.*, 1987; Fischer and Lerman, 1983) โดยดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะเกิดการแยกตัวที่ระยะทางต่างกันบนเจล กล่าวคือจุลินทรีย์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีจำนวนเบส GC น้อยจะเกิดการแยกตัวก่อนหรือแยกตัวได้ง่ายบนเจลที่มีความเข้มข้นของ urea และ formamide ต่ำนั่นเอง จากลักษณะการแยกตัวของดีเอ็นเอข้างต้นทำให้สามารถแยกจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค DGGE จากสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ง่ายและแม่นยำ อย่างไรก็ตามการแยกตัวของดีเอ็นเอสามารถเกิดขึ้นได้โดยใช้อุณหภูมิเป็นตัวกลางในการทำให้เกิดการแยกตัว ซึ่งจะเรียกเทคนิคนี้ว่า Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้หลักการเดียวกันกับเทคนิค DGGE จะแตกต่างกันเพียงการใช้อุณหภูมิในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวนั่นเอง

ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งของเทคนิค DGGE คือ ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษาและความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แยกตัวได้มีผลต่อการวิเคราะห์ความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจล ดังนั้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษาจะต้องนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ก่อน โดยความยาวของผลผลิตดีเอ็นเอที่เหมาะสมควรยาวประมาณ 500 bp (Myers *et al.*, 1985) และต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา ซึ่งไพรเมอร์ที่นำมาใช้ควรทำให้เกิดการแยกตัวของดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวอย่างน้อย 50% ของความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ การเพิ่มความสามารถในการแยกตัวของดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ที่สุดหรือใกล้เคียง 100% สามารถทำได้โดยการเติมเบส G และ C จำนวนมากที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของไพรเมอร์ เรียกว่า GC clamp โดย GC clamp จะทำหน้าที่เป็น high melting domain เพื่อป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวกลับมาจับกันเป็นสายคู่ ทั้งนี้ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GC clamp ควรอยู่ที่ประมาณ 30-50 นิวคลีโอไทด์ (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989) การเข้าใจลักษณะการแยกตัวของดีเอ็นเอจะทำให้สามารถเลือกใช้ความเข้มข้นของ urea และ formamide หรือค่าคเคเน gradient ที่ใช้ได้อย่างเหมาะสมกับแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ซึ่งจะทำให้แถบดีเอ็นเอที่แยกบนเจลนั้นมีความชัดเจน คมชัด ไม่ซ้อนทับกัน (smear) อีกทั้งยังทำให้นักวิจัยสามารถเลือกใช้ระยะเวลาในการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าได้อย่างเหมาะสมมากขึ้น (Myers and Smalla, 1998)

ปัจจุบันการใช้เทคนิค DGGE ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน 16S rDNA เริ่มมีการศึกษารั้งแรกในกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกาะที่ผิว (microbial biofilm) (Muyzer *et al.*, 1993) ซึ่งพบว่าผลผลิต PCR ในตัวอย่างที่ศึกษาจะเกิดการแยกตัวเป็นแถบดีเอ็นเอบนเจลต่างกัน ซึ่งผลผลิต PCR ในตัวอย่างหนึ่งๆ จะประกอบด้วย จุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ดังนั้นแถบของดีเอ็นเอแต่ละแถบอาจแสดงถึงจุลินทรีย์แต่ละชนิด ทั้งนี้สามารถตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ได้ง่ายจากการตัดแถบดีเอ็นอบนเจลและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยตรง (Muyzer *et al.*, 1993) ทั้งนี้ Muyzer *et al.* (1995) ได้ใช้เทคนิค DGGE ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในปล่องน้ำพุร้อน (hydrothermal vents) 2 บริเวณ ซึ่งผลการศึกษพบแบคทีเรียจำนวนน้อยมาก และสามารถระบุชนิดของแบคทีเรียหลักได้เพียง 1 ชนิด จากพื้นที่ศึกษาบริเวณที่ 1 และ ระบุชนิดของแบคทีเรียได้ 3 ชนิด จากพื้นที่ศึกษาบริเวณที่ 1 ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเป็นแบคทีเรียพวก sulfur reducing bacteria สกุล *Thiomicrospira* ในขณะที่ Moyer *et al.* (1995) ก็ได้ทำการศึกษาในลักษณะเดียวกันและพบแบคทีเรีย sulfur reducing bacteria เช่นเดียวกัน แต่ระบุได้เป็น *Desulfovibrio salexigens*

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค DGGE มาศึกษาชนิดของแบคทีเรียพวก sulfate reducing bacteria และการทำงานของเอนไซม์ในชั้นแท่งมวลน้ำ (water column) ของประเทศเดนมาร์ก (Teske *et al.*, 1996) รวมทั้งศึกษาโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์ในดินด้วยเทคนิค TGGE (Felske *et al.*, 1996b) และใช้เทคนิค DGGE ในการศึกษาโครงสร้างสังคมจุลินทรีย์ของพวก cyanobacteria ในน้ำพุร้อน (Felske *et al.*, 1996a) ซึ่งพบว่าแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บมาจากน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิใกล้เคียงกันจะมีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน ซึ่งแตกต่างจากชนิดของ cyanobacteria ที่พบจากบริเวณน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิที่สูงกว่า รวมทั้งยังมีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการศึกษา phytoplankton (Muyzer *et al.*, 1996) และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในตัวอย่างจากวัสดุต่างๆ และในมหาสมุทร (Nubel *et al.*, 1997) หรือศึกษา ammonia oxidizing bacteria ในดินทรายที่มีระดับ pH ต่างกัน (Kowalchuk *et al.*, 1997) ศึกษาเอนไซม์ hydrogenase จากแบคทีเรียในสกุล *Desulfovibrio* (Wawer and Muyzer, 1995) และใช้ศึกษาจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของ sulfate reducing bacteria (Santegoies *et al.*, 1997) ในบริเวณที่ไม่มีอากาศ

Zwart *et al.* (1997) ยังได้ศึกษาความแตกต่างของแบคทีเรียพวก *Verrucomicrobiales* ในทะเลสาบน้ำจืด ของประเทศเนเธอร์แลนด์ ด้วยเทคนิค DGGE และ nested PCR จากการเปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำจะพบแบคทีเรียที่เป็นชนิดเดียวกันในทะเลสาบน้ำจืดที่มาจาก

ตัวอย่างเดียวกันตลอดทั้งปี และ Heuer *et al.* (1997) ก็ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแอสคิโนมัยซีทในดินที่ต่างกัน และศึกษาการเปลี่ยนแปลงในบริเวณรอบรากพืชของมะเขือเทศ โดยการทำ PCR โดยตรงเปรียบเทียบกับ nested PCR ซึ่งพบว่าการใช้ DGGE ร่วมกับ nested PCR สามารถใช้ประเมินจำนวนของแอสคิโนมัยซีทในดินได้ดี ในขณะที่การใช้ DGGE ร่วมกับการทำ PCR โดยตรงจะประเมินจำนวนแอสคิโนมัยซีทได้น้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากรายละเอียดทางเทคนิคที่นำมาใช้ เช่น ไพเมอร์ การทำปฏิกิริยา PCR รวมทั้งตัวอย่างที่นำมาศึกษา (Myers and Smalla, 1998) โดยเฉพาะตัวอย่างจากดินซึ่งเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์มีความซับซ้อนในธรรมชาติ จุลินทรีย์ที่อยู่ในดินอาจมีความแตกต่างกันแม้จะมีระยะห่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งปริมาณของจุลินทรีย์และความผันแปรที่เกิดขึ้นภายในดินจะเป็นปัญหาต่อการศึกษาคอนสตรัคต์ของจุลินทรีย์ได้ (Van and Overbeek, 1993) ข้อจำกัดประการหนึ่งของเทคนิคนี้คือ สารอินทรีย์หรือสารปนเปื้อนที่มีอยู่ในดินอาจมีผลในการขัดขวางการสกัดดีเอ็นเอจากดินโดยตรง หรือการทำ PCR ดังนั้นการเลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากดินจึงต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของดิน และจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษารวมทั้งการเลือกไพเมอร์ต้องมีความเหมาะสมด้วย

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยเทคนิค rep-PCR

หลักการสำคัญในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยปกติแล้วควรเลือกศึกษาจุลินทรีย์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์สูงๆ (highly conserved region) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน (repetitive nucleotide sequences) เพื่อที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความจำเพาะในจีโนมของจุลินทรีย์ได้ (Martin *et al.*, 1992; Sadowsky and Hur, 1998; Versalovic *et al.*, 1994; Versalovic *et al.*, 1991) ซึ่งเทคนิค rep-PCR หรือ repetitive based sequence-PCR เป็นเทคนิคหนึ่งที่อาศัยหลักการของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนหรือนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าว เทคนิค rep-PCR ได้รับการพัฒนามาจาก Lupski จากวิทยาลัยทางการแพทย์รัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งนำมาใช้กับการศึกษาในหลายด้านด้วยกัน ทั้งด้านการแพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม และความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (Versalovic *et al.*, 1994)

การศึกษาโดยเทคนิค rep-PCR นั้นสามารถใช้ในการศึกษาแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกบางกลุ่ม (Lupski and Weinestock, 1992) จากการอาศัยหลักการของความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีชุดซ้ำกันมากกว่า 1 ชุดในโครโมโซม (Gilson *et al.*, 1984; Hulton *et al.*, 1991; Sharples and Lloyd, 1990; Stern *et al.*, 1984) จึงแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์

บริเวณที่มีชุดซ้ำกันนี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียงซ้ำๆ กันยาว 35-40 bp เรียกว่า repetitive extragenic palindromic (REP) sequence 2) ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียงซ้ำๆ กันยาว 124-127 bp เรียกว่า enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence และ 3) ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 154 bp เรียกว่า BOX element (Versalovic *et al.*, 1994) ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในตำแหน่งต่างๆ เหล่านี้จะกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนมของแบคทีเรียนั่นเอง ลักษณะเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำๆ กันนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการระบุชนิดของแบคทีเรียโดยตรงหรือใช้เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาบริเวณ REP, ERIC หรือ BOX ด้วยเทคนิค PCR ได้ (Versalovic *et al.*, 1994) ซึ่งทำให้ได้ไพรเมอร์ที่เรียกแตกต่างกันออกไปด้วย ซึ่งเมื่อนำมาใช้ร่วมกับเทคนิค PCR ก็จะได้ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับวิธีการที่ใช้ในเทคนิค rep-PCR จึงมีชื่อเรียกแตกต่างกันคือ REP-PCR genomic fingerprinting, ERIC-PCR genomic fingerprinting และ BOX-PCR genomic fingerprinting (Versalovic *et al.*, 1991, 1994) ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันนี้สามารถนำมาแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) และแสดงผลออกมาเป็นแถบดีเอ็นเอหลายๆ แถบ เรียกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint patterns) ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียแต่ละชนิด จึงทำให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการศึกษาจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง และสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกและติดตามจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และศึกษาจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (DeBruijn, 1992; Versalovic *et al.*, 1991; Judd *et al.*, 1993) ซึ่งสะดวก รวดเร็วและค่าใช้จ่ายไม่สูงมากเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆ รวมทั้งยังเป็นวิธีที่ใช้ในการติดตามศึกษาจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่มีความแตกต่างกันได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย (Johnson *et al.*, 2004) เช่น *Rhizobium*, *Agrobacterium* และ *Pseudomonads* เป็นต้น ทั้งนี้การศึกษาความหลากหลายโดยใช้เทคนิค rep-PCR ถือว่ามีประโยชน์อย่างมากในการระบุชนิดและจัดจำแนกจุลินทรีย์ รวมทั้งใช้ในการศึกษาศาสตร์ทางการแพทย์แขนงที่เกี่ยวข้องกับโรคในมนุษย์และเชื้อสาเหตุโรคพืช (Versalovic *et al.*, 1997) รวมทั้งใช้ในการศึกษาจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridium difficile*, *E. coli* และ Fecal coliform เป็นต้น (Spigaglia and Mastrantonio, 2003; Johnson *et al.*, 2004)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ หรือที่เรียกว่า DNA sequencing มีความสำคัญต่อ การศึกษาสิ่งมีชีวิตในเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุลมาก เนื่องจากสามารถนำมาใช้ในการระบุชนิด ของจุลินทรีย์ หรือระบุชนิดของยีนที่ต้องการศึกษา รวมทั้งใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของดีเอ็นเอสายนั้นๆ ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันได้ ทั้งนี้เทคนิคในการหาลำดับนิว คลีโอไทด์นั้นมีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 1970 โดยมี 2 วิธี คือ วิธีทางเคมีและวิธีใช้เอนไซม์ ซึ่งทั้งสอง วิธีอาศัยหลักการแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในสารตัวกลาง ที่มียูเรียผสมอยู่ด้วย เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเกิดการเคลื่อนที่ไปได้ในระยะทางที่เป็น สัดส่วนกับขนาดของโมเลกุล โดยไม่ขึ้นกับชนิดของเบสในสายดีเอ็นเอนั้น โดยสามารถบอกความ แตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้น แม้จะมีขนาดต่างกันเพียงที่ต่างกันเพียงแค่ 1 เบส (สุรินทร์, 2539)

1. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีทางเคมี (chemical sequencing)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์วิธีนี้พัฒนาขึ้นโดย Maxam และ Gilbert ซึ่งอาศัยสารเคมีและ ปฏิกริยาทางเคมีในการตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะที่ต่างกัน เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Maxam-Gilbert sequencing โดยมีขั้นตอนคือ นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาแยกให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาติด ฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (P^{32}) โดยแต่ละสายของดีเอ็นเอสายคู่จะถูกติดฉลากที่ปลาย 5' หรือ 3' จากนั้นนำสายดีเอ็นเอที่ติดฉลากไว้มาแยกให้เป็นสายเดี่ยว โดยในแต่ละสายจะถูกติดฉลากที่ ปลายข้างหนึ่งข้างใดเท่านั้น หลังจากนั้นนำสายดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลากแบ่งออกเป็น 4 ส่วน และนำแต่ละ ส่วนมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งจำเพาะที่เบสใดเบสหนึ่ง หลังจากนั้นนำแต่ละส่วน มาทำปฏิกิริยาเคมีที่ต่างกัน แล้วจึงนำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทางเคมีโดยใช้ วิธี polyacrylamide gel electrophoresis เสร็จแล้วจึงนำเจลที่ได้ไปวางบนกระดาษกรอง ตรวจสอบ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละแถวโดยวิธีออโตเรดิโอกราฟ จะปรากฏเป็นแถบสีดำขึ้นในแต่ละแถว ซึ่งแปลผลเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างๆ เรียงจากปลายที่ติดฉลากไว้

2. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีใช้เอนไซม์ (enzyme sequencing)

วิธีการนี้พัฒนาขึ้นมาโดย Sanger และคณะ ในปี 1977 ซึ่งอาศัยการสร้างดีเอ็นเอสายคู่สมด้วยเอนไซม์ DNA polymerase I โดยใช้ไพเมอร์สายสั้นๆ ในการเริ่มต้นสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่ปลาย 3' ของไพเมอร์ ได้เป็นดีเอ็นเอสายคู่สมขึ้นมา การต่อสายดีเอ็นเอนี้จะหยุดลงที่เบสจำเพาะแต่ละเบส (4 เบส คือ A T C และ G) โดยการเติมสาร 2',3' dideoxynucleotide ในหลอดทำปฏิกิริยาในแต่ละหลอด ทั้งนี้ผลที่ได้จากปฏิกิริยาทั้ง 4 หลอดจะนำมาแปลผลเช่นเดียวกับวิธีทางเคมี แต่การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอคู่สมจาก 5' ด้านล่างสู่ 3' ด้านบน ดังนั้นถ้าต้องการอ่านสายดีเอ็นเอต้นแบบจะต้องคิดกลับอีกครั้งหนึ่ง ทั้งนี้วิธีการนี้มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า dideoxy chain terminating method หรือ Sanger sequencing ปัจจุบันวิธี dideoxy เป็นวิธีที่นิยมใช้มากและมีการพัฒนามาจนถึงปัจจุบันนี้ ซึ่งก็สามารถทำได้ง่ายและไม่ซับซ้อนยุ่งยาก อีกทั้งยังนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาอื่นต่างๆ ทั้งในคน สัตว์ และพืช ตัวอย่างเช่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของคนที่เรียกว่า human genome project เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมและการรักษาโรคต่างๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

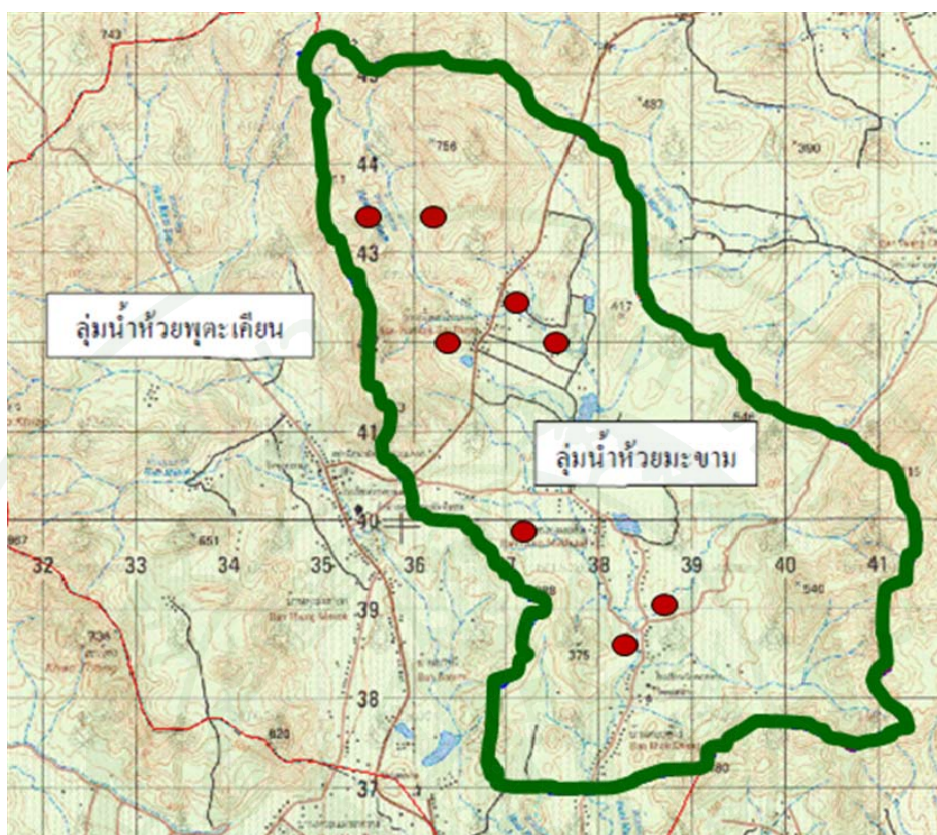
1. เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี เช่น แท่งแก้ว ปีกเกอร์ ขวดแก้ว กระบอกตวง
2. เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาทางดิน เช่น หลอดทดลอง จานอาหารเลี้ยงเชื้อ สไลด์ ไปเปิด จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบหลุม
3. ถังจลทรรศน์
4. pH meter
5. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
7. เครื่องผสมสาร (vortex)
8. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
9. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
10. เครื่องเขย่า (incubator shaker)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ DNA Thermal cycle
12. Atomic absorption spectrophotometer
13. Denaturing gradient gel electrophoresis apparatus
14. Horizontal electrophoresis apparatus ขนาด 20x25 เซนติเมตร
15. Spectrophotometer

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารหนูในบริเวณลุ่มน้ำห้วยมะขาม ตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 8 จุด (8 ตัวอย่าง) ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของสารหนูที่ต่างกัน ตำแหน่งในการเก็บตัวอย่าง ดังภาพที่ 5 โดยเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตร ด้วยกระบอกเก็บตัวอย่างดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile soil core) นำดินไปเก็บไว้ในถังน้ำแข็งระหว่างการขนส่ง และเมื่อถึงห้องปฏิบัติการนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยาทางดิน และเก็บตัวอย่างดินอีกส่วนด้วยพลั่วบรรจุในถุงพลาสติกเพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

เตรียมตัวอย่างดินสำหรับวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี โดยนำตัวอย่างดินที่เก็บด้วยพลั่วไปตากในที่ร่มจนกระทั่งแห้ง เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นทำการคัดแยกเศษหินและเศษพืชออก นำตัวอย่างดินที่แห้งมาบดให้มีขนาดเล็ก และนำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 และ 2 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมีต่อไป สำหรับตัวอย่างดินที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลชีววิทยาทางดิน นำตัวอย่างดินที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนู และศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE



ภาพที่ 5 จุดเก็บตัวอย่างดินปนเปื้อนสารหนู บริเวณลุ่มน้ำห้วยมะขาม ตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี

2. การวิเคราะห์สมบัติดิน

2.1 วิเคราะห์เนื้อดิน

การวิเคราะห์เนื้อดิน (การกระจายของอนุภาคดิน) โดยวิธีไปเปต (Kilmer and Alexander, 1949; Day, 1965) ทำโดยชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม เติม KMnO_4 ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ดินมีอินทรียวัตถุสูงต้องเติมสารละลาย KMnO_4 ความเข้มข้น 5% เพื่อกำจัดอินทรียวัตถุก่อน) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วย high speed stirrer เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายดินใส่ในกระบอกตวงขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยการกรองผ่านตะแกรงกรองที่มีขนาด 300 mesh (อนุภาคทรายแป้งและอนุภาคดินเหนียวจะผ่านลงไป ในกระบอกตวง) ทำการล้างตะกอนของสารละลายดินผ่านตะแกรงกรองจนกระทั่งอนุภาคทรายแป้งและอนุภาคดินเหนียวออกจากอนุภาค

ทรายจนหมด ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำอนุภาคทรายที่แยกได้บนตะแกรงใส่ในภาชนะที่อบแห้ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างดินไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (จนน้ำหนักคงที่) และชั่งน้ำหนักจะได้น้ำหนักของอนุภาคทราย

สำหรับสารละลายดินที่อยู่ในกระบอกตวงจะมีเพียงอนุภาคทรายแป้งและดินเหนียว ทำการแยกอนุภาคดินเหนียวโดยใช้ automatic pipette ทำโดยกวนสารละลายดินด้วยแท่งกวน (plunger) ตั้งทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดตัวอย่างสารละลายดินที่อยู่ในสภาพแขวนลอยที่ระดับความลึก 10 เซนติเมตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วย automatic pipette เก็บตัวอย่างสารละลายดินใส่ภาชนะอบแห้ง หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักจะได้น้ำหนักของอนุภาคดินเหนียว คำนวณเปอร์เซ็นต์อนุภาคดินแต่ละชนิด สำหรับเปอร์เซ็นต์อนุภาคทรายแป้ง คำนวณจากผลต่างของเปอร์เซ็นต์อนุภาคดินทั้งหมด (100%) กับผลรวมของเปอร์เซ็นต์อนุภาคดินเหนียวและดินทราย ผลที่ได้จากการวิเคราะห์นำมาแจกแจงประเภทของเนื้อดิน (soil textural class) โดยการเปรียบเทียบกับชั้นเนื้อดินตามเกณฑ์ของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (USDA textural class) (Soil Survey Staff, 2010)

2.2 การวัดค่าพีเอช (pH) ของดิน

ชั่งตัวอย่างดินแห้งที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร จำนวน 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วนดิน: น้ำ เท่ากับ 1:1) ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ 10 นาที นำตัวอย่างดินไปวัดด้วย pH meter

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนอินทรีย์เพื่อหาอินทรีย์วัตถุ

วิเคราะห์โดยใช้วิธีการออกซิเดชันและไทเทรตตามวิธีการของ Walkley และ Black (Nelson and Sommers, 1982) จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณอินทรีย์วัตถุตามสูตร

$$\text{Organic matter (\%)} = \% \text{ Organic carbon} \times 1.724$$

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูทั้งหมด

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงไปใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม acid mixture H_2SO_4 - HNO_3 อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำ flask ตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม HCl ความเข้มข้น 12 นอร์มัล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการย่อยสารละลายดินต่อไปจนกระทั่งสารละลายตัวอย่างใส ตั้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปเติม KMnO_4 ความเข้มข้น 6% จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง หลังจากนั้นเติม $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปั่นไว้ข้ามคืน (Stewart and Bettany, 1982) หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารหนูทั้งหมดด้วย hydride atomic absorption spectrophotometer (Varian AA240, Austraria)

2.5 การวิเคราะห์โลหะอื่น ๆ (Cu Cr Zn Mn Al Fe Pb และ Cd)

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงไปในหลอด (digestion tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acid mixture HNO_3 : HClO_4 อัตราส่วน 5:2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการย่อยสลายจนกระทั่งสารละลายตัวอย่างใส ตั้งไว้ให้เย็น แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 นำสารละลายที่กรองได้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตรใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Amacher, 1996) หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักด้วย flame atomic absorption spectrophotometer (Varian AA240, Austraria)

3. ศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในดินปนเปื้อนสารหนูด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ชั่งตัวอย่างดิน 0.25 กรัม และนำมาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากดินด้วยชุดสกัด PowerSoil DNA kit (MOBio laboratory, Inc., USA) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260})

ด้วย spectrophotometer และตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการทำ electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5X TAE buffer

3.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.40 ไมโครลิตร 5X buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร BSA ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร universal primer (PRBA338F 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' และ PRUN518R 5'-ATTACCGCGGCTGC TGG-3') (Cindy *et al.*, 2000) ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 0.75 ไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร (Promega, USA) ทั้งนี้ PRBA338F ซึ่งเป็น forward primer จะมีการเติมเบส G และ C เข้าที่ปลายด้าน 3 ไพรม์ ซึ่งเรียกว่า GC clamp จำนวน 20 bp เพื่อช่วยในการวิเคราะห์การแยกตัวเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยเทคนิค DGGE สำหรับปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มที่ initial denaturation 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ดัดแปลงจาก Becker *et al.*, 2006) โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Robo cycler (Stratagene, USA) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR นำมาวิเคราะห์บน agarose gel ความเข้มข้น 2% ใน 0.5X TAE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที โดยใช้ 1 kb plus ladder (Invitrogen, USA) เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ ร่วมกับ multiple bacteria marker (*Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* ADP1, *E. coli* DH5 α , *Comamonas testosteroni* และแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม BW7) และนำเจลที่ได้มาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และถ่ายภาพ

3.2 การทำ Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

การเตรียมอุปกรณ์ในการทำ DGGE เริ่มจากนำแผ่นกระจก 2 แผ่นขนาด 16x16 เซนติเมตร และขนาด 16x14 เซนติเมตร ทำความสะอาดกระจกด้วย 70% alcohol และน้ำกลั่น เช็ดด้วยกระดาษซับ Kimwipe ระวางอย่าให้มีฝุ่นหรือกระดาษซับติด นำกระจกแผ่นใหญ่

(16x16 เซนติเมตร) วางบนโต๊ะ และนำ spacer วางที่ขอบกระจก แล้วทา spacer ด้วยสารหล่อลื่น เพื่อให้เกิดการยึดระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองดีขึ้น หลังจากนั้นนำกระจกแผ่นเล็ก (16x14 เซนติเมตร) มาประกบกันพร้อมกับจัดกระจกทั้งสองให้เสมอกันทั้งด้านข้างและด้านล่าง (ภาพที่ 6A) หลังจากนั้นนำกระจกไปประกอบเข้ากับแกนยึด (plate clamps) และประกอบเข้ากับตัวฐาน (pouring stand) เทเจลที่เตรียมไว้ลงในแผ่นกระจก นำหวี (well comb) ไปเสียบระหว่างช่องว่างของกระจก (ภาพที่ 6B) เมื่อเจลแข็งตัวแล้วนำแผ่นกระจกออกจาก pouring stand แล้วนำไปประกอบเข้ากับ core (ภาพที่ 7A) และนำไปใส่ไว้ใน chamber หลังจากนั้นนำแผงควบคุม (controller) ของเครื่อง DGGE apparatus (Bio-Rad Universal Mutation Detection System) สวมเข้าที่ด้านบนของ chamber เมื่อประกอบอุปกรณ์เรียบร้อยแล้ว นำ power supply มาต่อเข้ากับแผงควบคุมเพื่อรอใช้ในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 7B)

การเตรียมเจลในขั้นตอนแรกทำการเตรียม stock acrylamide ความเข้มข้น 0 และ 80% (ตารางผนวกที่ 1) หลังจากนั้นนำความเข้มข้นทั้งสองมาผสมให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการเพื่อให้เป็น gradient และทำให้ดีเอ็นเอเกิดการแยกตัวออกจากกัน ในขั้นตอนการเตรียมเจลความเข้มข้น 13% และใช้ gradient 40%-70% ทำโดยผสมสารดังตารางที่ 6 หลังจากนั้นเติม ammonium persulphate (APS) ความเข้มข้น 10% และ TEMED ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการเกิดโพลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) หลังจากเติม APS และ TEMED ควรเทเจลทันที เพื่อไม่ให้เจลแข็งตัวก่อนเทเจลเสร็จ



A



B

ภาพที่ 6 การประกอบอุปกรณ์เพื่อเตรียมเจลสำหรับเทคนิค DGGE

A คือ การประกอบกระจกเข้ากับแกนยึด (plate clamp)

B คือ การประกอบอุปกรณ์เข้ากับฐานตั้ง (pouring stand) และหัวทำช่องเจล (well comb)



A



B

ภาพที่ 7 การประกอบอุปกรณ์เข้ากับ chamber และแผงควบคุม

A การประกอบอุปกรณ์กระจกทั้งหมดเข้ากับ pouring stand เพื่อนำไปวางใน chamber

B การประกอบอุปกรณ์ทั้งหมดเข้ากับแผงควบคุม ก่อนจะต่อเข้ากับ electrophoresis

ที่มา: Laboratory for microbial ecology (2004)

ตารางที่ 6 ปริมาตรของสารผสมสำหรับเตรียมเจล

สารละลาย	0% acrylamide (มิลลิลิตร)	80% acrylamide (มิลลิลิตร)	10% APS ^{1/} (ไมโครลิตร)	TEMED ^{2/} (ไมโครลิตร)
70% denaturant	1.375	9.625	45	8
40% denaturant	5.5	5.5	45	8

หมายเหตุ ^{1/} APS = ammonium persulphate

^{2/} TEMED = N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

สำหรับการเทเจลในแผ่นกระจกให้นำ stock acrylamide ความเข้มข้น 80% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เติม APS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 35 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 8 ไมโครลิตร) โดยใช้ pipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ใสลงไปบนแผ่นกระจกที่ประกอบเข้ากับตัวฐาน (pouring stand) แล้วและระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการไหลซึมหรือรั่วของเจลทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นใส่สารผสมความเข้มข้น 40 และ 70% ลงไปในกระบอกร gradient marker ชั้นนอกและชั้นใน ตามลำดับ เปิดเครื่องปั๊มเพื่อให้สารผสมความเข้มข้น 70% ไหลเข้าสู่แผ่นกระจกก่อน (ประมาณ 10 วินาที) หลังจากนั้นเปิดวาล์วของกระบอกร gradient marker ชั้นนอกเพื่อให้สารผสมความเข้มข้น 40% และ 70% ค่อยๆ ผสมกันโดยใช้ magnetic stirrer และไหลผ่านสายยางเข้าสู่แผ่นกระจกในเวลาเดียวกัน (สารผสมมีลักษณะเป็น gradient) เมื่อสารผสมไหลลงในแผ่นกระจกจนเกือบเต็มแผ่นกระจก ทำการปิดวาล์วและเครื่องปั๊ม และนำ stock acrylamide ความเข้มข้น 0% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (เติม APS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 4 ไมโครลิตร) ใสลงในช่องว่างตรงกลางของแผ่นกระจกโดยใช้ pipette ขนาด 1000 ไมโครลิตร ปล่อยให้สารผสมไหลลงไปช้าๆ จากนั้นนำหวี (well comb) เสียบเข้าไปในแผ่นกระจกทิ้งไว้ประมาณ 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลที่เตรียมเรียบร้อยแล้วใส่ลงใน chamber เติม 0.5X TAE buffer ปริมาตร 7 ลิตร นำแผงควบคุมและ power supply มาต่อเข้ากับ chamber เปิดแผงควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งอุณหภูมิของ buffer อยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ลงในช่องเจลปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ multiple bacteria marker (*Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* ADP1, *E. coli* DH5 α , *Comamonas testosteroni* และแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม BW7) และ 1 kb plus ladder (Invitrogen, USA) ที่ช่องเจลด้านข้างทั้งสองและตรงกลาง

เพื่อใช้เป็นจุดอ้างอิงในการวิเคราะห์ผล หลังจากนั้นทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าที่มีศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเจลไปย้อมสีด้วย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ใน 1X TAE buffer ทั้งนี้ นำเจลที่แช่ใน ethidium bromide มาเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที ทั้งนี้ในระหว่างการเขย่าให้ปิดภาชนะด้วยกระดาษฟอยด์ เพื่อป้องกันแสงเข้าทำลายดีเอ็นเอและให้การย้อมสีเกิดทั่วทั้งแผ่นเจล จากนั้นนำเจลไปแช่น้ำกลั่น พร้อมทั้งเขย่า เป็นเวลา 30 นาที เพื่อล้างสีย้อมส่วนเกินออก นำเจลที่ได้มาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และถ่ายภาพ

3.3 การวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์และการระบุชนิดของแบคทีเรีย

เพื่อศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน นำภาพถ่ายที่ได้จากเทคนิค DGGE ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป BioNumeric version 3.5 software (Applied Maths, Belgium) โดยวิเคราะห์จำนวนและตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ (band-base analysis) ที่ปรากฏบนเจลของแต่ละตัวอย่างเพื่อบอกความหลากหลายของจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับแต่ละตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนสารหนูแตกต่างกัน และประมวลผลเป็น dendrogram สำหรับการศึกษาดัชนีโครงสร้างสังคมแบคทีเรีย ทำโดยตัดแถบ ดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา (แถบที่มีความชัดเจนและมีความแตกต่างกับแถบดีเอ็นเออื่น) โดยใช้มีดที่ปลอดเชื้อตัดแถบดีเอ็นเอบนเจล นำไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่บรรจุ RNase/DNase-free water ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มใน heat block ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายใสด้านบน (ดีเอ็นเอ) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ไว้ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 ไมโครลิตร และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

การนำดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค DGGE ซึ่งตัดแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น ต้องทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอก่อนว่าไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของแถบดีเอ็นเอใกล้เคียง ซึ่งทำโดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลก่อนหน้านี้มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ PRBA338F และ PRUN518R จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิค DGGE ดังวิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้น เมื่อตรวจสอบว่าเป็นแถบดีเอ็นเอเดี่ยว (single band) แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้ง และนำดีเอ็นเอความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ผสมกับ reverse primer (ใช้ไพรเมอร์ที่ไม่ติด GC clamp) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรของตัวอย่างที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 12 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Biomedical genomics sequencing center and analysis facility, University of Minnesota, St. Paul, USA หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5 ไพรม์ ไป 3 ไพรม์ (5'-3') โดยใช้โปรแกรม reverse complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html และ <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn

4. การแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนูจากดินปนเปื้อนสารหนู

4.1 การแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนูจากดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัมใส่ในขวดแก้วขนาด 200 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าด้วย agitator เป็นเวลา 30 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที คูดสารละลายใส 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า เป็น 10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} และ 10^{-8} จากนั้นคูดสารละลายเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตรของแต่ละระดับการเจือจาง มา spread plate ในอาหาร Tryptone glucose yeast extract (TGE) (ตารางผนวกที่ 2) ซึ่งมีการเติมอาร์เซนไนต์ที่ความเข้มข้น 10 50 100 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละความเข้มข้นของอาร์เซนไนต์จะทำ 3 ซ้ำแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้จากทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมาคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยนำไป streak บนอาหารแข็ง TGE อีกครั้งจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว TGE โดยนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญถึงช่วง log phase จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้ไว้ใน 96 well collection plate (ความเข้มข้นสุดท้าย 25% glycerol) และเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียส

4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและการย้อมสีแบบแกรม (Gram staining)

นำเชื้อบริสุทธิ์มา streak บนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) (ตารางผนวกที่ 3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อมาสมิแยลงบนสไลด์ นำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้จุลินทรีย์ติดแน่นบนแผ่นสไลด์ แล้วหยด crystal violet ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลาย iodine ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างออกด้วย alcohol และล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นย้อมทับด้วย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างสีของ safranin O ออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Loynachan, 2002)

4.3 การศึกษาความสามารถในด้านทานสารหนูและสารปฏิชีวนะ

นำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร LB โดยนำแบคทีเรียที่เก็บไว้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate ที่บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาเจือจางตั้งแต่ให้ได้ 10^2 10^4 10^6 และ 10^8 เท่า ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ replicator ประทับสารละลายเชื้อแต่ละระดับการเจือจางลงบนอาหารแข็ง LB ที่เติมโซเดียมอาร์เซไนต์ (NaAsO_2) ความเข้มข้น 10 50 100 250 500 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือโซเดียมอาร์เซเนต (NaHAsO_2) ความเข้มข้น 10 40 100 200 500 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ทำเช่นเดียวกับการทดสอบการต้านทานสารหนูอาร์เซไนต์และอาร์เซเนต โดยเติมสารปฏิชีวนะในอาหารแข็ง LB ตามความเข้มข้น ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง

สารปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)
Chloramphenicol	1, 5, 10
Streptomycin	5, 10
Tetracycline	0.5, 1, 2
Kanamycin	1, 5
Naladixic acid	1, 2.5, 5
Rifamycin	1, 12, 15
Ampicilin	1, 5, 10
Spectinomycin	1, 5, 10

บันทึกข้อมูลแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีการเติมอาร์เซนไนต์ อาร์เซนเนตและสารปฏิชีวนะความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละระดับการเจือจาง โดยบันทึกข้อมูลเป็นตัวเลข 1 (1 = แบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีการเติมอาร์เซนไนต์ อาร์เซนเนตหรือสารปฏิชีวนะ) และ 0 (0 = แบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีการเติมอาร์เซนไนต์ อาร์เซนเนตหรือสารปฏิชีวนะ) หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อทำ dendrogram ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป BioNumeric version 3.5 software (Applied Maths, Belgium) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูด้วยเทคนิค rep-PCR

5. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูด้วยเทคนิค rep-PCR

5.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียด้านทานสารหนูมา streak บนอาหารแข็ง LB ที่ไม่มีการเติมอาร์เซนไนต์หรืออาร์เซนเนต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลวดเขี่ยเชื้อพลาสติกที่ปลอดเชื้อและลงบนโคโลนีเดี่ยว ใส่ใน 96 well plate (สำหรับทำ PCR) ที่มี NaOH ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการปั่นลวดเขี่ยเชื้อพลาสติกเพื่อให้เชื้อผสมเข้ากับ NaOH นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 640 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอน

เซลล์ ดูดสารละลายไฮดรอกซีดีเอ็นเอที่สกัดปริมาณ 30 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well PCR plate อันใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร 10X buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ไพเมอร์ ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' และ ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' (Morases *et al.*, 2000) ความเข้มข้น 0.08 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มจากการ initial incubating ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ก่อน หลังจากนั้นเริ่มทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วินาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที (Johnson *et al.*, 2004) โดยใช้เครื่อง Thermal DNA cycler (MJ. Research, USA)

นำผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมด้วย 6X loading dye ปริมาตร 6.6 ไมโครลิตร ดูดผลผลิต PCR ผสมดังกล่าว 13 ไมโครลิตร มาตรวจสอบบน agarose gel ความเข้มข้น 1.5% ใน 0.5X TAE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 70 โวลต์ เป็นเวลา 17 ชั่วโมง โดยใช้ 1 kb ladder (Invitrogen, USA) เป็น marker หลังจากนั้นต่อป้อนเข้ากับ chamber เพื่อให้ buffer ไหลเวียนใน chamber บ่มทิ้งไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส นำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตพร้อมถ่ายภาพ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยนำภาพถ่ายเจลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioNumeric version 3.5 software (Applied Maths, Belgium) เพื่อทำการจัดกลุ่มแบคทีเรีย และทำ dendrogram

6. การศึกษายีนด้านทานสารหนู *arsC*

6.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียที่แช่แข็งไว้มา streak บนอาหารแข็ง LB ที่มีการเติมอาร์เซนไนต์ 10 มิลลิกรัม ต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ pipett tip ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและลงบนโคโลนีเดียว นำมาใส่ใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แยกสารละลายใสหรือดีเอ็นเอที่สกัดได้ใส่ในหลอดใหม่เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *arsC* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

ศึกษายีนด้านทานสารหนู *arsC* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการรื้อถอนของสารหนูโดยการแปลงสารหนูอาร์เซเนตเป็นอาร์เซนไนต์โดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ *arsC*-1F 5'-GTAATACGCTGGAGATGATCCG-3' และ *arsC*-1R 5'-TTTCCTGCTTCATCAACGAC-3' (Saltikov and Olson, 2002) การทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร forward-reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle TC512 (Techne, UK) โดยใช้ปฏิกิริยา PCR เริ่มที่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 นาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที (Chang *et al.*, 2008) นำผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบบน agarose gel ความเข้มข้น 1% ใน 1X TAE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที โดยใช้ 1 kb ladder (Life Technology, USA) เป็น marker และนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตพร้อมถ่ายภาพ

7. การศึกษาการแปลงสารหนูของแบคทีเรียด้านทานสารหนู

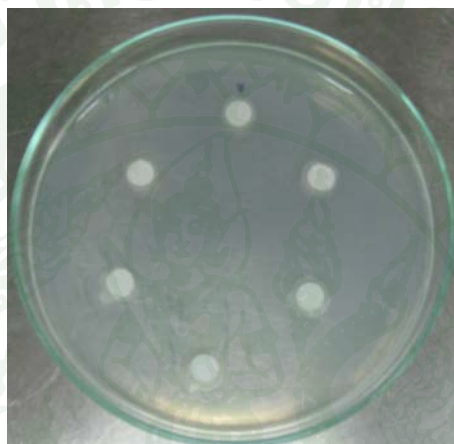
7.1 การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียด้านทานสารหนูบนอาหาร CDM (Chemically Defined Medium)

นำแบคทีเรียแช่แข็งมา streak บนอาหารแข็ง LB ที่มีการเติมอาร์เซไนต์ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว Chemically Defined Medium (CDM) (Weeger *et al.*, 1999) (ตารางผนวกที่ 4) ใน 96 well collection plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ replicator ประทับสารละลายเชื้อลงบนอาหารแข็ง CDM ที่เติมอาร์เซไนต์หรืออาร์เซนิต ความเข้มข้น 2 5 10 20 และ 25 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร CDM ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซไนต์หรืออาร์เซไนต์ เพื่อนำไปใช้ในการเลือกความเข้มข้นของอาร์เซนิตและอาร์เซไนต์ที่เหมาะสมในการทดสอบการแปลงสารหนูบนอาหารแข็งด้วยเทคนิค agar plate screening assay

7.2 การทดสอบการแปลงสารหนูด้วยเทคนิค agar plate screening assay

การทดสอบความสามารถในการแปลงสารหนูบนอาหารแข็ง CDM ด้วยเทคนิค agar plate screening assay ทำโดยนำแบคทีเรียแช่แข็งมา streak บนอาหารแข็ง LB ที่มีการเติมอาร์เซไนต์ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซไนต์ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,560 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาวัดค่า optical density และปรับให้มีค่าเท่ากับ 0.6 ($OD_{600} = 0.6$) หลังจากนั้นดูดสารละลายเซลล์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well collection plate ที่บรรจุอาหารเหลว CDM (ไม่เติมสารหนูอาร์เซไนต์หรืออาร์เซนิต) ปริมาตร 130 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มาจุ่มในสารละลายเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต แล้วนำไปวางบนอาหารแข็ง CDM ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซไนต์หรืออาร์เซนิต (ภาพที่ 8) ความเข้มข้น 2 และ 20 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ในที่มีด หลังจากนั้นนำมาทดสอบการแปลงสารหนูโดยการทำปฏิกิริยากับ AgNO_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ดัดแปลงจาก Krumova *et al.*, 2008) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น ทั้งนี้การออกซิเดชันอาร์เซนไนต์เป็นอาร์เซนเตจะเกิดการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลแดง ในขณะที่การรีดักชันอาร์เซนเตเป็นอาร์เซนไนต์จะเกิดการเปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงเป็นสีเหลือง



ภาพที่ 8 กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จุ่มในเซลล์แต่ละไอโซเลต วางบนอาหารแข็ง CDM ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซนไนต์หรืออาร์เซนเต

7.3 การทดสอบการแปลงสารหนูด้วยวิธี microplate screening assay

microplate screening assay เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ตรวจสอบการแปลงสารหนู เช่นเดียวกันกับ agar plate screening assay แต่ต่างกันที่ microplate screening assay จะเป็นการทดสอบการแปลงสารหนูในรูปของเหลว ซึ่งวิธีนี้นอกจากจะคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการแปลงสารหนูได้แล้ว ยังสามารถบอกสัดส่วนของสารหนูที่เกิดการออกซิเดชันหรือรีดักชันได้ด้วย โดยต้องอาศัยแผ่นเทียบสี (colour scale) ในการบอกสัดส่วนดังกล่าว สำหรับการทดลองนี้จะเป็นการทดสอบการออกซิเดชันหรือรีดักชันเท่านั้น ทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB ที่ไม่มีการเติมสารหนู จากนั้นนำไปล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาวัดค่า optimal density และปรับปริมาตรให้มีค่าเท่ากับ 0.6 ($\text{OD}_{600} = 0.6$) ด้วย Tris-HCl (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ หลังจากนั้นดูดเซลล์แต่ละไอโซเลตปริมาณ 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96 well

collection plate ที่มี Tris-HCl (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ซึ่งเติมอาร์เซไนต์หรืออาร์เซเนตความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ 2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำมาทดสอบการรีดักชันและออกซิเดชันสารหนูด้วยการทำปฏิกิริยาการเกิดสีกับ AgNO_3 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (Simonova *et al.*, 2004) สังเกตการตกตะกอนของสีที่เกิดขึ้นทันทีที่มีการเติม AgNO_3 โดยการออกซิเดชันจะเกิดตะกอนสีเหลืองจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง AgNO_3 กับสารหนูอาร์เซเนต ในขณะที่การรีดักชันจะเกิดการตะกอนสีน้ำตาลแดงจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง AgNO_3 กับสารหนูอาร์เซไนต์

8. การวัดประสิทธิภาพการแปลงสารหนูด้วยวิธี Molybdenum blue method

การทดสอบการแปลงสารหนูด้วยเทคนิค molybdenum blue method (Johnson and Pilson, 1972) ทำโดยนำแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการแปลงสารหนูอาร์เซไนต์หรืออาร์เซเนตที่ได้จากการทดสอบด้วย AgNO_3 ด้วยเทคนิค agar plate screening assay มา streak บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เช่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแบคทีเรียไปล้างตะกอนเซลล์ด้วย PIPES buffer (pH 7.0) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาวัดค่า optimal density และปรับปริมาตรให้มีค่าเท่ากับ 0.6 ($\text{OD}_{600} = 0.6$) ด้วย PIPES buffer (pH 7.0) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ย้ายไปเลี้ยงใน PIPES buffer (pH 7.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซเนตความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาแบ่งใส่ microtube 4 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายใสเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารหนูต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูอาร์เซไนต์ทำได้โดยการเตรียม oxidized sample และ unoxidized sample สำหรับการเตรียม oxidized sample ทำโดยนำตัวอย่าง (สารละลายใส) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (เจือจาง 8 เท่า ด้วย PIPES buffer) เติมสารละลาย KIO_3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม molybdenum blue solution (ตารางผนวกที่ 5) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิทันที ที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 865 นาโนเมตร ทั้งนี้ควรวัดตัวอย่างภายใน 15 นาที

การเตรียม unoxidized sample ทำได้โดยดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 300 ไมโครลิตร (สารละลายตัวอย่างเจือจาง 8 เท่า ด้วย PIPES buffer) เติม HCl ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม molybdenum blue solution ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิทันทีที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 865 นาโนเมตร การคำนวณปริมาณสารหนูอาร์เซนในตัวอย่างได้จากค่าความแตกต่างระหว่าง unoxidized sample และ oxidized sample นั่นคือปริมาณสารหนูอาร์เซนในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ สำหรับการคำนวณปริมาณสารหนูอาร์เซนที่ได้จากการออกซิเดชันคำนวณจากการวัดค่าที่อ่านได้จาก unoxidized sample โดยตรง ซึ่งในหลอดบ่มตัวอย่างมีการเติมอาร์ซีนิดเป็นสารตั้งต้น

เตรียมสารละลายมาตรฐานสารหนูอาร์เซนความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ จาก stock ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ปรับปริมาตรโดยใช้ PIPES buffer) เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน (ตารางผนวกที่ 6) นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาเติม molybdenum blue solution ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิทันทีที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 865 นาโนเมตร และเขียนกราฟมาตรฐาน

9. การระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการแปลงสารหนูโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA

ศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA โดยนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการแปลงสารหนูมาเลี้ยงในอาหารแข็ง LB ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซนิด ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB ที่ไม่มีการเติมสารหนู บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใส

ส่วนบนออก หลังจากนั้นเติม NaCl ความเข้มข้น 3% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง จากนั้นเติม NaOH ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และวางบนน้ำแข็งทันทีนาน 3 นาที หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คัดสารละลายใส ส่วนบนปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่เตรียมได้ดังกล่าวมาข้างต้น มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบคือ ดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 100 มิลลิ โมลาร์ ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร 10X buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร universal primer ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (341F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' และ 928R 5'-CCCCGCAATTCCTTTGAGTT-3') ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำที่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (Sajjaphan *et al.*, 2010) โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle TC512 (Techne, UK) นำผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรวจสอบบน agarose gel ความเข้มข้น 0.8 % ใน 1X TAE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที นำผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Macrogen (Seoul, Korea) หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์สมบัติดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารหนูในเขตลุ่มน้ำห้วยมะขาม ตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่เหมืองแร่เก่าและมีประวัติการทำเหมืองแร่ดีบุกมานานกว่า 40 ปี โดยมีลุ่มน้ำห้วยมะขามเป็นแม่น้ำสายหลักไหลผ่านเหมือง เก็บตัวอย่างดินจำนวน 8 จุด (AS1 AS2 AS3 AS4 AS5 AS6 AS7 และ AS8) ที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตร จากผิวดิน โดยตัวอย่างดิน AS1-AS6 เป็นตัวอย่างดินที่ตั้งอยู่บริเวณขุมเหมือง สำหรับตัวอย่างดิน AS7 และ AS8 เป็นตัวอย่างดินที่ตั้งอยู่บริเวณท้ายเหมือง และตัวรับควบคุม (Control) คือตัวอย่างดินที่เก็บจากพื้นที่นอกเหมือง นำตัวอย่างดินไปวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารหนูและวิเคราะห์สมบัติดินต่างๆ ดังตารางที่ 8

การวิเคราะห์สมบัติดินทางกายภาพ พบเนื้อดินส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นดินร่วนเหนียว หรือเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย ดังตารางที่ 8 และเมื่อทำการจัดจำแนกดินตามแผนที่แสดงชุดดินในระดับจังหวัด มาตรฐาน 1:5000 ระบุว่าดินทุกตัวอย่างจัดจำแนกอยู่ในชุดดินท่ายาง สำหรับการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน พบดินมี pH อยู่ในช่วงเป็นกรดปานกลางถึงด่างจัด (pH 5.8-8.5) (ตารางภาคผนวกที่ 7) โดยตัวอย่างดิน AS2 AS3 และ AS4 มี pH เป็นกรด (pH 5.8-6.5) ในขณะที่ตัวอย่างดิน AS1 AS5 AS6 AS7 และ AS8 มี pH เป็นด่าง (pH 7.4-8.5) ส่วนอินทรียวัตถุพบว่าตัวอย่างดินมีปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในช่วงกว้าง คือตั้งแต่ระดับต่ำถึงระดับสูงปานกลาง เท่ากับ 2.3-29 กรัมต่อกิโลกรัม (ตารางผนวกที่ 8) โดยตัวอย่างดิน AS3 และ AS8 เป็นดินที่มีปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับสูงเท่ากับ 26.3 และ 29 กรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาคือตัวอย่างดิน AS2 AS4 และ AS5 ซึ่งมีระดับอินทรียวัตถุอยู่ในระดับปานกลาง คือ 25 21.4 และ 22.2 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างดิน AS1 และ AS6 มีปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับต่ำ (8.1 และ 2.3 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ)

ตารางที่ 8 สมบัติดินบางประการ ปริมาณสารหนุรวมและโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน ที่เก็บจากเหมืองแร่เก่า ตำบลองค์พระ อำเภอคำชะอี จังหวัดสุพรรณบุรี

ตัวอย่างดิน	เนื้อดิน	สมบัติทางเคมี		ปริมาณของโลหะหนักในดิน								
		pH	OM	As	Cu	Cr	Mn	Pb	Zn	Cd	Fe	Al
		--กรัม/กิโลกรัม--	----- มิลลิกรัม/กิโลกรัม-----								--กรัม/กิโลกรัม--	
AS1	ร่วน	7.8	8.1	389	26	26	138	9	29	0.61	13.2	16.3
AS2	ร่วนเหนียวปนทราย แป้ง	6.5	25	711	54	111	302	17	97	1.44	54.6	63.4
AS3	ร่วนเหนียว	6	26.3	124	12	32	279	9	50	0.88	15.9	31.8
AS4	ร่วนเหนียวปนทราย	5.8	21.4	160	12	34	167	2	28	0.61	14.9	24.3
AS5	ร่วนเหนียว	7.4	22.2	315	15	38	142	8	31	1.02	18.6	30.5
AS6	ร่วนเหนียว	8.5	2.3	467	38	71	467	58	101	1.58	41.2	65.5
AS7	ร่วนทราย	7.4	14.8	356	13	34	220	43	33	0.78	15.5	20.3
AS8	ร่วนเหนียว	7.9	29	381	16	29	112	66	68	0.95	16.1	19.5

การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูรวมในดิน พบว่าตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณเหมืองแร่เก่ามีปริมาณสารหนูรวมเกินกว่ามาตรฐานที่กรมควบคุมมลพิษกำหนด ยกเว้นตำรับควบคุมมีปริมาณสารหนูรวมเพียง 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน (กรมควบคุมมลพิษ, 2547ค) สำหรับในการทดลองแบ่งพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารหนูออกเป็น 2 พื้นที่ คือ พื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารหนูระดับสูงคือ สารหนูปนเปื้อนมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน และพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารหนูระดับต่ำคือ สารหนูปนเปื้อนน้อยกว่า 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน จากการวิเคราะห์ตัวอย่างดินพบตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูระดับสูง จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างดิน AS2 เป็นดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูสูงสุดเท่ากับ 711 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาคือตัวอย่างดิน AS6 AS1 AS8 AS7 และ AS5 มีการปนเปื้อนสารหนูเท่ากับ 467 389 381 356 และ 315 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูระดับต่ำ จำนวน 2 ตัวอย่าง คือตัวอย่างดิน AS3 และ AS4 เป็นดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูเท่ากับ 124 และ 160 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก พบปริมาณสังกะสีและแมงกานีสในปริมาณสูง ส่วนโลหะหนักอื่นๆ พบปนเปื้อนเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามตัวอย่างดินที่มีปริมาณสารหนูระดับสูงจะมีแนวโน้มพบธาตุโลหะอื่นๆ ในปริมาณสูงกว่าตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูระดับต่ำ

2. การศึกษาโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนสารหนู

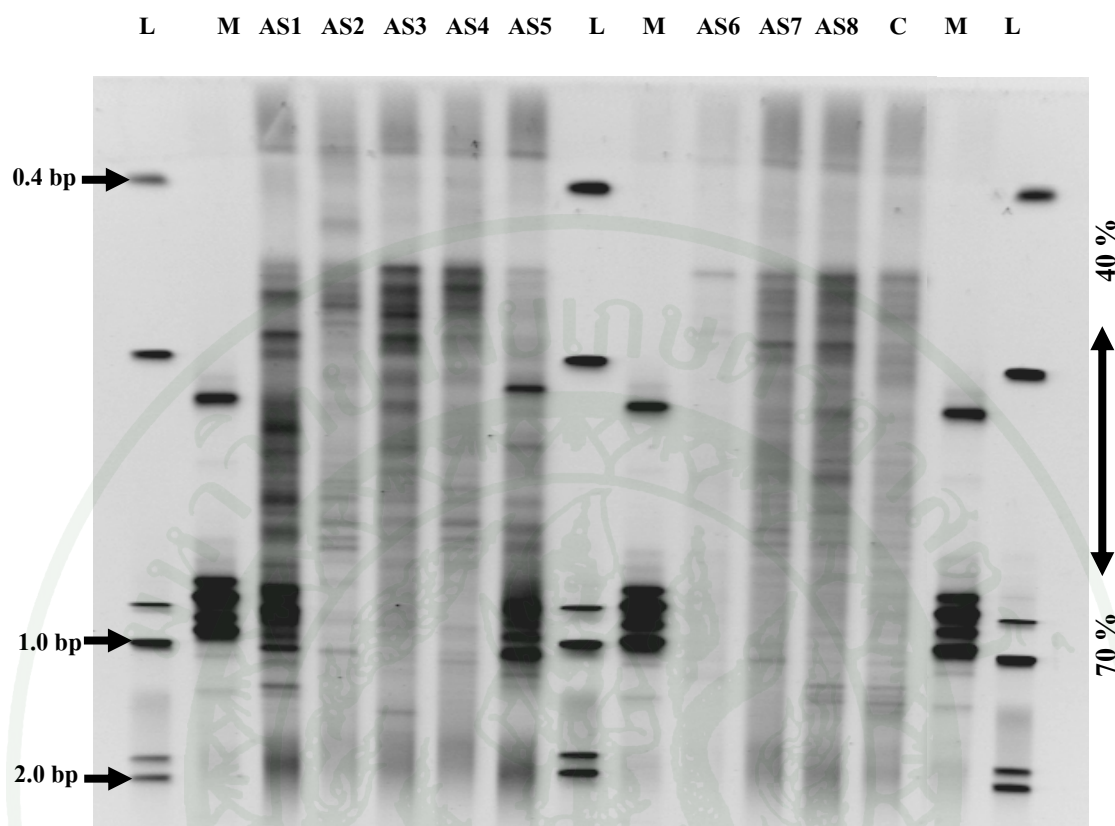
2.1 โครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนสารหนูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินปนเปื้อนสารหนูที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ด้วยเทคนิค DGGE โดยปกติสามารถวิเคราะห์ได้ 3 แบบ คือ วิเคราะห์จำนวนแถบดีเอ็นเอ ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ และความเข้มของแถบดีเอ็นเอ สำหรับในการทดลองนี้ทำการวิเคราะห์โดยอาศัยข้อมูลจำนวนแถบดีเอ็นเอและตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์โครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยอาศัยการวิเคราะห์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล ด้วยโปรแกรม BioNumeric version 3.5 ดังภาพที่ 9 (ภาพผนวกที่ 2) พบว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างดินในแต่ละตัวอย่างจากเทคนิค DGGE มีแถบดีเอ็นเอปรากฏอยู่บนเจลประมาณ 26-52 แถบ ซึ่งพบทั้งแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกันและแตกต่างกัน ทั้งนี้ตัวอย่างดิน AS7 ซึ่งมีปริมาณสารหนูระดับสูงเท่ากับ 357 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน จะพบแถบดีเอ็นเอหรือมีจำนวนมากที่สุดถึง 52 แถบ ประเมินได้ว่ามีชนิดของแบคทีเรียมากที่สุดคือ 52 ชนิด รองลงมาได้แก่ ตัวอย่างดิน AS3 ซึ่งมีปริมาณสารหนูระดับต่ำ

คือ 124 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน แต่มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 47 แถบ ในทางตรงกันข้ามตัวอย่างดิน AS6 ซึ่งมีปริมาณสารหนูปนเปื้อน 467 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน พบแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 26 แถบ เช่นเดียวกับตัวอย่างดิน AS2 มีปริมาณสารหนูมากที่สุดคือ 711 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน พบจำนวน แถบดีเอ็นเอ 42 แถบ ซึ่งมีจำนวนแถบ ดีเอ็นเอใกล้เคียงกับตัวอย่างดินในตำรับควบคุม (C) ที่มี จำนวนแถบดีเอ็นเอ 41 แถบ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารหนูที่ปนเปื้อนในระดับสูงหรือต่ำไม่มีผล ต่อจำนวนของแบคทีเรีย แต่มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของแบคทีเรียในดิน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสมบัติ ของดินเบื้องต้น เช่น พีเอช เนื้อดิน อินทรีย์วัตถุในดิน กล่าวคือแบคทีเรียแต่ละชนิดจะดำรงชีวิตอยู่ใน สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน แบคทีเรียบางชนิดชอบความเป็นกรด บางชนิดชอบความเป็นด่าง ซึ่ง ส่วนใหญ่ดินที่มีพีเอชเป็นกลางจะพบแบคทีเรียจำนวนมาก โดยเฉพาะในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ หรืออินทรีย์วัตถุสูง เนื่องจากสภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของแบคทีเรีย รวมทั้งมีสารอาหารจากอินทรีย์วัตถุเพียงพอต่อการเจริญเติบโตด้วย ดังเช่นในตัวอย่างดิน AS6 ซึ่งมี ปริมาณสารหนู 467 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินและปริมาณอินทรีย์วัตถุต่ำมากเท่ากับ 2.3 กรัมต่อ กิโลกรัม จะพบแถบดีเอ็นเอเพียง 26 แถบ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสังคม แบคทีเรียในดิน ไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณการปนเปื้อนสารหนูเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับสมบัติดิน ด้วย อีกทั้งระดับความเป็นพิษของสารหนูหรือความสามารถในการต้านทานสารหนูในดินน่าจะมีผล ต่อแบคทีเรียแตกต่างกัน ซึ่งแม้ว่าดินจะมีปริมาณสารหนูในปริมาณสูงแต่หากอยู่ในรูปที่มีระดับความ เป็นพิษต่ำก็ทำให้แบคทีเรียในดินสามารถต้านทานหรือดำรงชีวิตอยู่ได้

สำหรับการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล สามารถใช้ประเมินโครงสร้างสังคมแบคทีเรียว่ามีความคล้ายคลึงกันมากน้อยเพียงใด โดยแบคทีเรียที่ อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน มีความเป็นไปได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันได้ ทั้งนี้ในการศึกษาได้ใช้ โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ BioNumeric version 3.5 software มาช่วยในการประมวลผลเพื่อจัดกลุ่ม ความสัมพันธ์ของรูปแบบหรือตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ได้ ดังภาพที่ 10



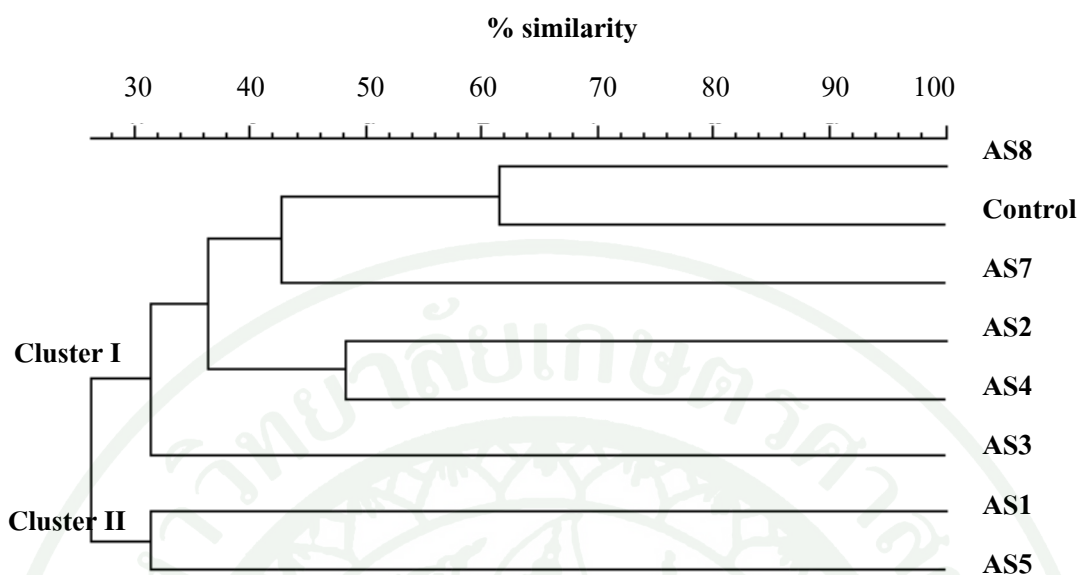
ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลที่ได้จากเทคนิค DGGE

หมายเหตุ ช่องเจล M (bacteria marker) คือ ผลผลิต PCR รวมของแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่

Pseudomonas putida, *Acinetobacter ADP1*, *E. coli DH5α*, *Comamonas testosteroni* และแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม BW7)

ช่องเจล L คือ ladder plus DNA

ช่องเจล AS1-AS8 คือ ผลผลิต PCR จากตัวอย่างดินแต่ละจุดที่มีการปนเปื้อนสารหนู



ภาพที่ 10 Dendrogram ความสัมพันธ์ของรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากดินปนเปื้อนสารหนูในระดับที่ต่างกัน วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioNumeric Version 3.5 โดย UPGMA

จากการประมวลผลด้วย UPGMA โดยใช้ simple matching binary coefficient เพื่อสร้าง dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบแถบดีเอ็นเอหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูที่แตกต่างกัน พบว่าดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูที่แตกต่างกันมีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากและมีระดับความคล้ายคลึง (% similarity) อยู่ในช่วง 25- 60% แบ่งเป็น 2 clusters ที่ระดับความคล้ายคลึง 30% โดย cluster I มี 6 ตัวอย่างดินคือ AS2 AS3 AS4 AS7 AS8 และดำรับควบคุม ในขณะที่ cluster II มี 2 ตัวอย่าง คือ AS1 และ S5 โดยทั้งสองตัวอย่างมีระดับความการปนเปื้อนสารหนูที่ระดับใกล้เคียงกัน สำหรับตัวอย่างดิน AS6 ไม่ได้นำมาวิเคราะห์ใน dendrogram ด้วย เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลจางมาก จึงไม่สามารถนำมาประมวลผลเพื่อแสดงความสัมพันธ์ได้

จากการจัดกลุ่มจะเห็นว่าแบคทีเรียในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารหนูมีความหลากหลายมากทั้งในดินที่มีการปนเปื้อนในระดับสูงและต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบกับดำรับควบคุมจะเห็นว่าตัวอย่างดิน AS7 และ AS8 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับดำรับควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นดินที่มีสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 6) จึงทำให้มีชนิดของแบคทีเรียคล้ายคลึงกันมากกว่าในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในบริเวณอื่น ในขณะที่ตัวอย่างดิน AS2 และ AS4 เก็บ

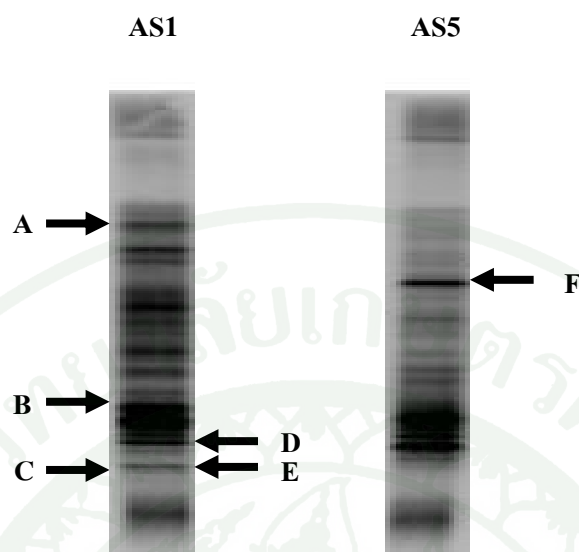
มาจากบริเวณชุมเหืองแม้จะมีปริมาณสารหนูและสมบัติทางเคมีต่างกัน แต่ดินก็มีเนื้อดินใกล้เคียงกัน จึงทำให้พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันมากที่สุดที่ 60%

สำหรับตัวอย่างดินใน cluster II ซึ่งมี AS1 และ AS5 อยู่ในกลุ่มเดียวกันนั้น เมื่อพิจารณาคุณสมบัติดินพบว่าดินทั้งสองจุดมีคุณสมบัติดินทั้งทางกายภาพและทางเคมีใกล้เคียงกันมาก รวมทั้งปริมาณการปนเปื้อนสารหนู (381 และ 315 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน ตามลำดับ) ยกเว้นเพียงปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินที่แตกต่างกัน (8.1 และ 22.2 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูทั้งสองกลับมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีระดับความคล้ายคลึงกันเพียง 30% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างดินแม้จะมีสมบัติดินที่คล้ายกัน (ตารางที่ 8) แต่ก็อาจมีจำนวนและชนิดของแบคทีเรียแตกต่างกันได้ ถ้ามีปริมาณอินทรีย์วัตถุที่แตกต่างกัน (8.1 และ 22.2 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) โดยจะเห็นได้จาก dendrogram รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะมีระดับความคล้ายคลึงกันเพียง 30% ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียที่พบในดินทั้งสองน่าจะมีหลากหลายมากกว่าแบคทีเรียในตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูอื่นๆ

2.2 การวิเคราะห์และระบุชนิดของแบคทีเรียในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนู

จากการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนู (ภาพที่ 9 และ 11) พบตัวอย่างดิน AS1 และ AS5 มีความหลากหลายของโครงสร้างสังคมแบคทีเรียจึงทำการเลือกแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน AS1 และ AS5 เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างจากแบคทีเรียที่พบในดินปนเปื้อนสารหนูอื่นๆ ทั้งนี้แถบดีเอ็นเอที่สนใจนำมาระบุชนิดของแบคทีเรียมีทั้งหมด 6 แถบ ซึ่งเป็นตัวแทนจากตัวอย่างดิน AS1 จำนวน 5 แถบ (แถบ A B C D และ E) และตัวอย่างดิน AS5 จำนวน 1 แถบ (แถบ F) ตำแหน่งและสัญลักษณ์ของแถบดีเอ็นเอที่เลือกมาศึกษา ดังภาพที่ 11

แถบดีเอ็นเอที่นำมาศึกษาต้องทำการตรวจสอบการปนเปื้อนหรือตรวจสอบแถบดีเอ็นเอว่ามีเพียงแถบเดียวหรือแบคทีเรียชนิดเดียวอีกครั้งด้วยเทคนิค DGGE ก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Biomedical genomics sequencing center and analysis facility, University of Minnesota, St. Paul, USA ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ GenBank



ภาพที่ 11 ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 6 แถบ จากดิน

AS1 คือ แถบ A B C D และ E และจากดิน AS5 คือ แถบ F

ตารางที่ 9 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่เรืยตัวแทนจากตัวอย่างดิน AS1 และ AS5 จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

ตัวอย่างดิน	ตำแหน่ง แถบดีเอ็นเอ	ชนิด	ระดับความคล้ายคลึง (% similarity)	เลขทะเบียน (Accession no.)
AS1	A	<i>Arthrobacter</i> <i>koreensis</i> N1SF19	97	AM183961.1
	B	β -proteobacteria IMCC1734	99	D0664220.1
	C	unknown bacterial clones TH a16	98	EU373144.1
AS5	F	unknown bacterial clones LNR A2-16	100	DO988269.1

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ ดีเอ็นเอตัวแทน มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ GenBank โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ ดีเอ็นเอตัวแทน A และ B สามารถระบุกลุ่มหรือชนิดของแบคทีเรีย ได้เป็น *Arthrobacter koreensis* N1SF19 และ β -proteobacteria IMCC1734 ที่ระดับความคล้ายคลึง 97% และ 99% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ GenBank ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ C และ F มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ Unknow bacteria clones FLSED16 ที่ระดับความคล้ายคลึง 98% และ Unknow bacteria clones LNR A2-16 ที่ระดับความคล้ายคลึง 100% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ GenBank (ภาพผนวกที่ 3-6) สำหรับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของแถบ ดีเอ็นเอตัวแทน D และ E ไม่สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ (ตารางที่ 9)

3. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนู

3.1 การแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนู

การแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนูจากตัวอย่างดิน 8 จุด ซึ่งตั้งอยู่ในบริเวณเหมืองแร่ดีบุกเก่า ตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ในขั้นแรกได้ทำการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างสังคมแบคทีเรียโดยเทคนิค DGGE พบว่าการวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียในบริเวณที่มีปริมาณสารหนู แม้จะมีความแตกต่างกันมาก แต่ก็ไม่มี ความแตกต่างจากตัวอย่างดินในดำรับควบคุม นั้นแสดงว่าแบคทีเรียในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารหนุน่าจะมีความสามารถในการด้านทานสารหนูหรือมีกลไกบางอย่างเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับสูงได้ แต่เนื่องจากเทคนิค DGGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย โดยการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในดินปนเปื้อนสารหนู ดังนั้นในการทดลองจึงไม่สามารถทำการทดสอบความสามารถในการด้านทานสารหนูของแบคทีเรียได้ เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่สามารถด้านทานสารหนู จึงทำการแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนูจากดินที่มีการปนเปื้อนโดยใช้เทคนิค dilution และ plating

การแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนูจากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับที่แตกต่างกัน จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยการเจือจางบนอาหารแข็ง TGE ซึ่งเติมสารหนูอาร์เซนิตที่ระดับความเข้มข้น 10 50 100 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่สามารถเจริญบนอาหาร

แข็ง TGE ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 911 ไอโซเลต และเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว TGE และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ได้แบคทีเรียด้านทานสารหนูที่จะนำไปศึกษาจำนวน 262 ไอโซเลต ดังตารางที่ 10

จากการนำแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่แยกได้จากดินปนเปื้อนสารหนูในแต่ละระดับความเข้มข้นมาศึกษา พบว่าตัวอย่างดิน AS2 มีจำนวนแบคทีเรียด้านทานสารหนูมากที่สุด คือ 92 ไอโซเลต และเป็นตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในดินมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ตัวอย่างดิน AS4 AS3 AS1 AS5 AS6 AS8 และ AS7 โดยพบจำนวนแบคทีเรียด้านทานสารหนู จำนวน 48 33 30 20 18 12 และ 9 ไอโซเลต ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ด้านทานสารหนูที่แยกได้ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารหนูที่ปนเปื้อนในดิน เช่น ตัวอย่างดิน AS3 และ AS4 ซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนสารหนูในดินเท่ากับ 124 และ 160 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แต่พบแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่แยกได้เพียง 33 และ 48 ไอโซเลต รองจากตัวอย่างดิน AS2 ซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนสารหนูในดินมากที่สุดเท่ากับ 711 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 10 จำนวนแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่แยกได้จากดินปนเปื้อนสารหนู บริเวณเหมืองแร่เก่า 8 จุด บนอาหาร TGE ที่มีการเติมสารหนูที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่างดิน	ปริมาณสารหนูในดินที่วิเคราะห์ได้ (total As; มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน)	จำนวนแบคทีเรียด้านทาน สารหนู (ไอโซเลต)
AS1	389	30
AS2	711	92
AS3	124	33
AS4	160	48
AS5	315	20
AS6	467	18
AS7	356	9
AS8	381	12
รวม		262

3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการย้อมสีแบบแกรมของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่นำมาศึกษา พบว่าแบคทีเรียด้านทานสารหนูมีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งลักษณะรูปร่างของเซลล์มีทั้งลักษณะกลม (cocci) และแท่ง (rod) และแบคทีเรียประมาณ 49% จะมีลักษณะเป็นแท่ง ซึ่งมีทั้งที่ต่อกันเป็นสายยาวและเป็นแท่งเดี่ยว ดังตารางที่ 11 สำหรับรายละเอียดของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแต่ละไอโซเลต ดังตารางภาคผนวกที่ 9

ตารางที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียด้านทานสารหนู

ตัวอย่าง ดิน	จำนวนแบคทีเรียด้านทาน สารหนูนำมาศึกษา	จำนวนแบคทีเรียแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา			
		แกรมบวก	แกรมลบ	รูปร่างกลม	รูปร่างแท่ง
AS1	30	-	30	18	12
AS2	92	15	77	58	34
AS3	33	3	30	-	33
AS4	48	11	37	48	-
AS5	20	1	19	-	20
AS6	18	-	18	9	9
AS7	9	-	9	1	8
AS8	12	2	10	-	12
รวม	262	32	230	134	128

3.3 การศึกษาความสามารถในการต้านทานสารหนู

การทดสอบความสามารถในการต้านทานสารหนูของแบคทีเรียด้านทานสารหนู ทำโดยศึกษาการต้านทานสารหนูในรูปที่มีความเป็นพิษตามธรรมชาติ 2 รูป คือ สารหนูอาร์เซไนต์และสารหนูอาร์เซเนต ด้วยเทคนิค minimum inhibitory concentration (MIC) ซึ่งเป็นวิธีการประเมินความเข้มข้นต่ำสุดของสารหนูอาร์เซไนต์หรืออาร์เซเนตที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ แต่ในการทดลองนี้ได้นำเทคนิค MIC มาปรับวิธีการโดยประเมินความสามารถในการต้านทานสารหนูของแบคทีเรียที่มีการเจือจางเซลล์และใช้สารหนูอาร์เซไนต์และอาร์เซเนต ที่ระดับความ

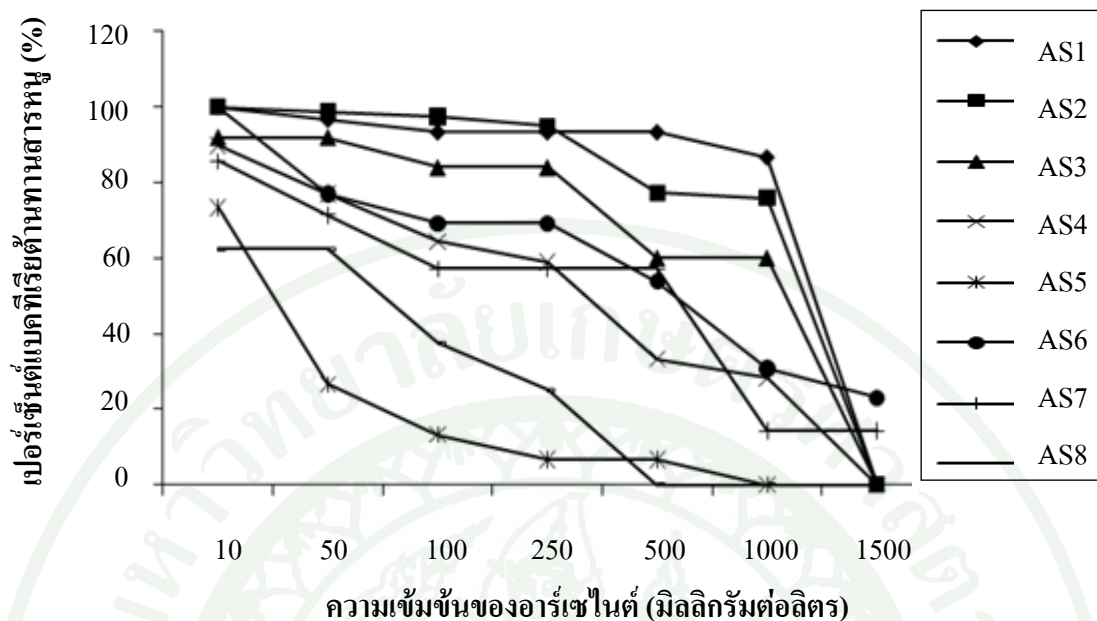
เข้มข้นตั้งแต่ 10-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากทดลองพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานสารหนูทั้งอาร์เซนไนด์และอาร์เซเนต โดยแบคทีเรียจะต้านทานสารหนูอาร์เซเนตได้มากกว่าอาร์เซนไนด์ และมีความสามารถในการต้านทานได้ลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของสารหนูเพิ่มขึ้น และพบว่า การเจือจางเซลล์แบคทีเรียที่ 10^6 ถึง 10^8 ทำให้ความสามารถในการต้านทานสารหนูทั้งอาร์เซเนตและอาร์เซนไนด์ลดลงมาก และมีแบคทีเรียเพียงไม่กี่ไอโซเลตที่สามารถต้านทานสารหนูได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้ผลการทดลองความสามารถต้านทานสารหนู ที่ระดับการเจือจางของแบคทีเรียที่ 10000 เท่า (10^4) ดังภาพที่ 12 และ 13

จากภาพที่ 12 แสดงการต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์เมื่อมีการเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จากตัวอย่างดิน AS1 AS2 และ AS3 มากกว่า 60% มีความสามารถต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์ได้สูงถึงที่ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่แบคทีเรียจากตัวอย่างดิน AS6 และ AS7 ประมาณ 50% สามารถต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์ที่ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่มีเพียงแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน AS6 และ AS7 เท่านั้นที่สามารถต้านทานสารหนูได้สูงสุดที่ระดับ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน AS4 พบแบคทีเรียประมาณ 60% ที่สามารถต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์ที่ระดับความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน AS5 และ AS8 จะสามารถต้านทานสารหนูอาร์เซนไนด์ได้ในระดับต่ำคืออยู่ในช่วง 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นแบคทีเรียมากกว่า 60%

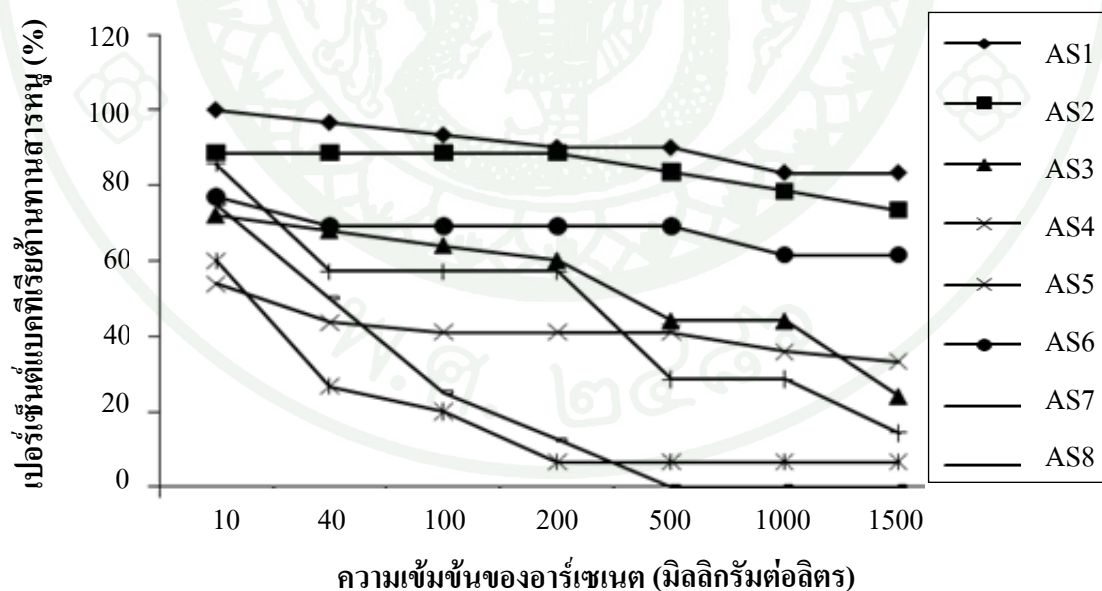
สำหรับการต้านทานสารหนูอาร์เซเนตเมื่อมีการเจือจางแบคทีเรียที่ 10000 เท่า ดังภาพที่ 13 จะได้ผลในลักษณะเดียวกัน โดยพบว่าแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน AS1 AS2 AS3 และ AS6 คิดเป็นแบคทีเรียมากกว่า 60% สามารถต้านทานสารหนูได้สูงสุดตั้งแต่ระดับ 10-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังพบแบคทีเรียมากกว่า 60% ที่สามารถต้านทานสารหนูอาร์เซเนตได้ ยกเว้นตัวอย่างดิน AS3 ที่มีจำนวนแบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานสารหนูลดลง คิดเป็น 45% ที่สามารถต้านทานได้ที่ 500-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูจะลดลงเหลือเพียง 20% เมื่อความเข้มข้นสูงสุดถึง 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน AS4 และ AS7 ประมาณ 40% สามารถต้านทานสารหนูอาร์เซเนตได้ที่ระดับ 200 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน AS7 จะมีแบคทีเรียต้านทานสารหนูลดลงต่ำกว่า 40% ที่ระดับ 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่แบคทีเรียจากตัวอย่างดิน AS5 และ AS8 จะไม่สามารถต้านทานสารหนูได้หรือต้านทานได้น้อยเมื่อความเข้มข้นสูงมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับรายละเอียดของการต้านทานสารหนู

อาร์เซไนต์และอาร์เซนดของแต่ละไอโซเลตที่ระดับการเจือจางของเซลล์แบคทีเรีย 100 และ 10000 เท่า ดังตารางภาคผนวกที่ 10

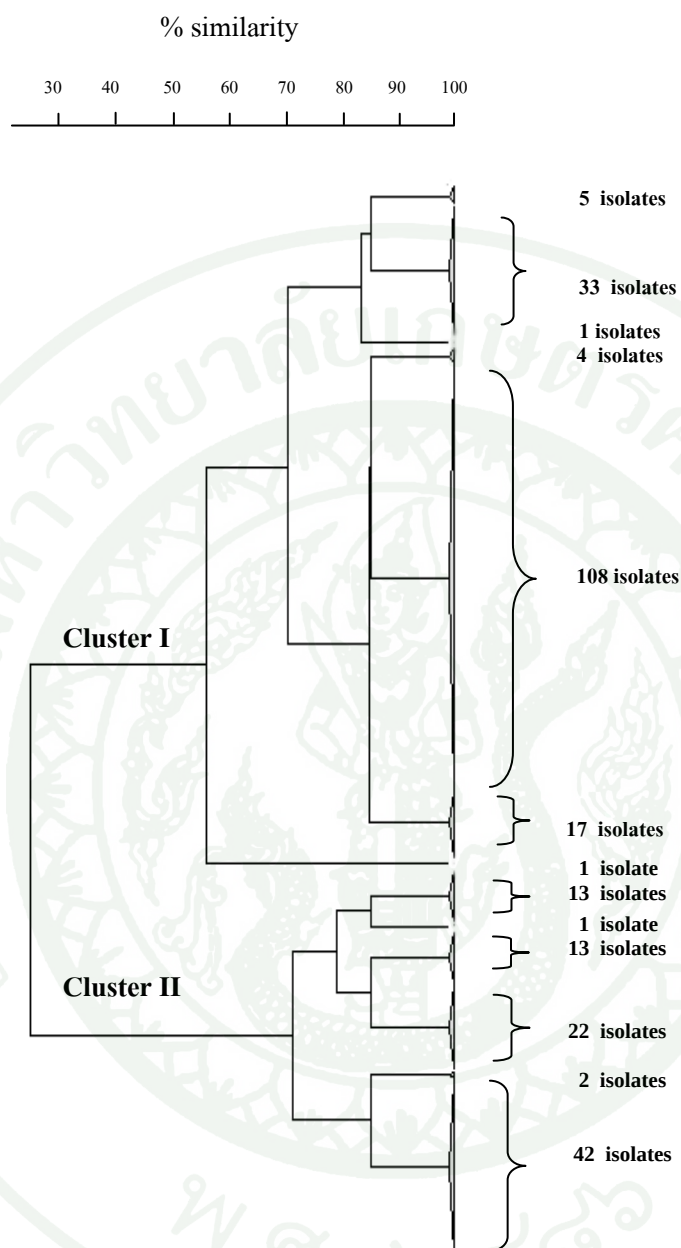
การวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานของสารหนู ด้วยการวิเคราะห์ UPGMA โดยใช้ simple matching binary coefficient เพื่อสร้าง dendrogram โดยอาศัยข้อมูลความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์เซไนต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า ดังภาพที่ 14 สามารถแบ่งแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่แยกได้ทั้งหมดเป็น 2 clusters และ 13 กลุ่มย่อย ที่ระดับความคล้ายคลึงสูงสุด 100% โดย cluster I ประกอบด้วยแบคทีเรียด้านทานสารหนู 169 ไอโซเลต และ cluster II ประกอบด้วยแบคทีเรียด้านทานสารหนู 93 ไอโซเลต ทั้งนี้ในแต่ละ cluster ประกอบด้วยแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่แยกได้จากดิน 8 ตัวอย่าง และเพื่อให้การจัดกลุ่มแบคทีเรียมีความละเอียดและชัดเจนมากขึ้น จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการศึกษาความสามารถในการต้านทานสารปฏิวินะเพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรียต่อไป



ภาพที่ 12 แบคทีเรียที่สามารถต้านทานสารหนูอาร์เซไนต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเจือจางแบคทีเรีย 10000 เท่า



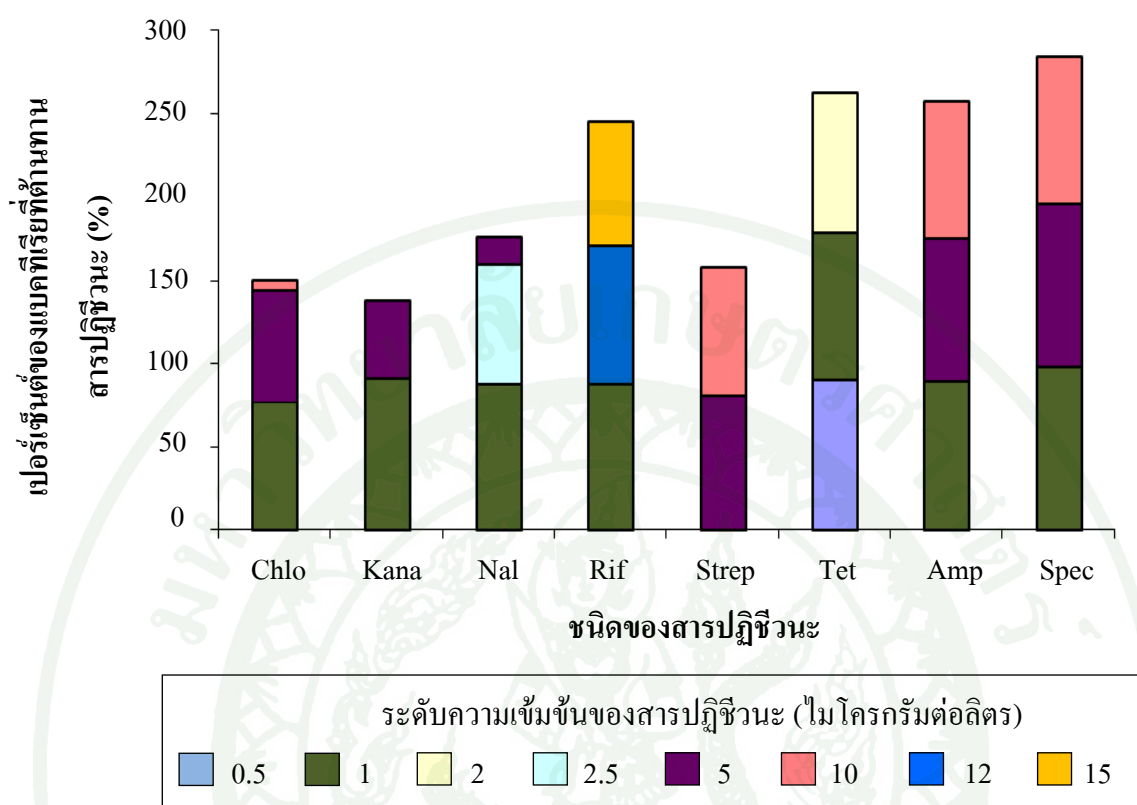
ภาพที่ 13 แบคทีเรียที่สามารถต้านทานสารหนูอาร์เซเนต ที่ระดับความเข้มข้น 10-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเจือจางแบคทีเรีย 10000 เท่า



ภาพที่ 14 Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้านทานสารหนู โดยอาศัยข้อมูลการ
 ด้านทานสารหนูอาร์เซนไนต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร
 เมื่อเจือจางแบคทีเรีย 10000 เท่า

3.4 การศึกษาความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะ

การศึกษาความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะด้วยเทคนิค MIC ซึ่งใช้สารปฏิชีวนะ 8 ชนิด ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ ampicillin kanamycin spectinomycin chloramphenicol streptomycin rifamycin tetracycline และ naladixic acid โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถในการต้านทานสารหนู พบว่าแบคทีเรียต้านทานสารหนูทั้งหมด 262 ไอโซเลต สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ทั้ง 8 ชนิด แต่จะต้านทานสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ซึ่งเมื่อทำการเจือจางแบคทีเรียที่ 10^2 - 10^8 เท่า พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะเมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรียมากถึง 10^4 ถึง 10^8 หรือต้านทานได้น้อยมากในบางไอโซเลต จึงทำให้ไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกตัวแทนเพื่อศึกษาความหลากหลายได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ค่า MIC เมื่อมีการเจือจางเซลล์แบคทีเรียที่ระดับการเจือจาง 100 เท่า มาใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนเพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียต้านทานสารหนู ดังภาพที่ 15 จากภาพจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะพวก rifamycin streptomycin tetracycline ampicillin และ spectinomycin จะมีจำนวนแบคทีเรียที่ต้านทานสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดไม่แตกต่างกันในแต่ละระดับความเข้มข้นที่ทดสอบต้านทาน ตัวอย่างเช่น สารปฏิชีวนะ tetracycline จะมีจำนวนแบคทีเรียที่ต้านทานได้คิดเป็น 90% 88% และ 85% เมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 1 2 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่ทำการทดสอบ พบว่าแบคทีเรียต้านทานสารหนูจะต้านทานสารปฏิชีวนะ spectinomycin rifamycin ampicillin และ streptomycin ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบคือ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร คิดเป็น 88% 84% 83% และ 77% ตามลำดับ ยกเว้นการต้านทานสารปฏิชีวนะ rifamycin ของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ 15 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่แบคทีเรียพบแบคทีเรียต้านทานได้มากถึง 74% สำหรับการต้านทานสารปฏิชีวนะ chloramphenicol kanamycin และ nalalidic acid พบแบคทีเรียประมาณ 70-80% สามารถต้านทานที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ผลการทดลองโดยละเอียดของการต้านทานสารปฏิชีวนะทั้ง 8 ชนิดในแต่ละระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรียที่ 100 เท่าและ 10000 เท่า ดังตารางผนวกที่ 11



ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์แบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูในการต้านทานสารปฏิชีวนะ 8 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูแต่ละไอโซเลต โดยอาศัยข้อมูลจากการต้านทานสารปฏิชีวนะ เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูได้ 100 กลุ่ม ที่ระดับความคล้ายคลึงสูงสุด 100% ดังภาพที่ 16 จากผลของการแบ่งกลุ่มสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูตัวแทนได้ 100 ไอโซเลต จากแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูที่แยกทั้งหมด 262 ไอโซเลต จากผลการวิเคราะห์พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียได้เป็น 4 clusters ที่ระดับความคล้ายคลึงสูงสุด 66% โดย cluster I ประกอบด้วยแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนู 13 ไอโซเลต cluster II ประกอบด้วยแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนู 33 ไอโซเลต cluster III ประกอบด้วยแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนู 45 ไอโซเลต และ cluster IV ประกอบด้วยแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนู 10 ไอโซเลต แบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูตัวแทน 100 ไอโซเลตซึ่งแต่ละไอโซเลตแบ่งตาม cluster ได้ดังนี้

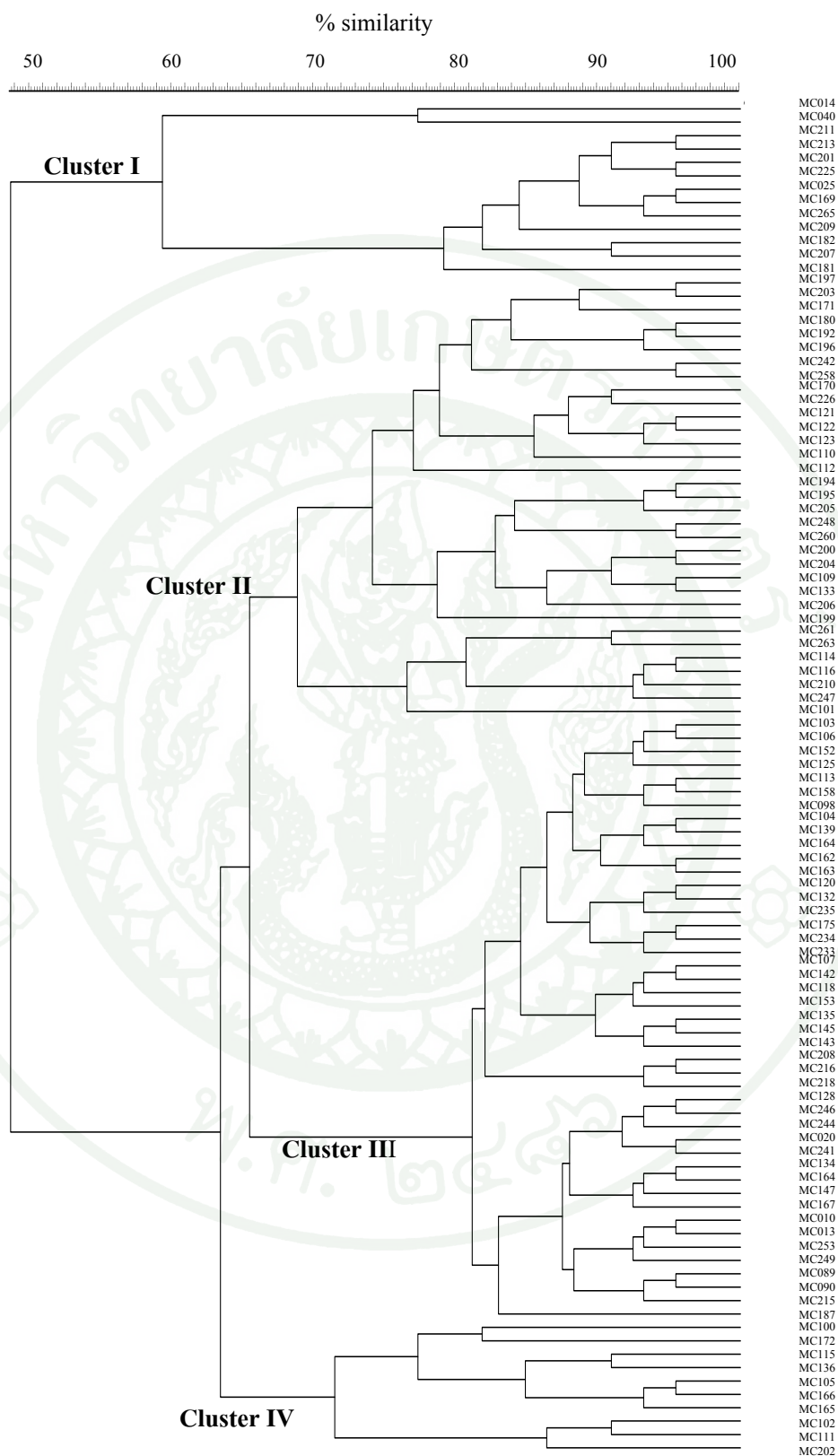
cluster I มีแบคทีเรียด้านทานสารหนู 13 ไอโซเลต ได้แก่ MC14 MC25 MC40 MC169 MC181 MC182 MC201 MC207 MC209 MC211 MC213 MC225 และ MC265

cluster II มีแบคทีเรียด้านทานสารหนู 33 ไอโซเลต ได้แก่ MC101 MC109 MC110 MC112 MC114 MC121 MC122 MC123 MC133 MC161 MC170 MC171 MC180 MC192 MC194 MC195 MC196 MC197 MC199 MC200 MC203 MC204 MC205 MC206 MC210 MC226 MC242 MC247 MC248 MC258 MC260 MC261 และ MC263

cluster III มีแบคทีเรียด้านทานสารหนู 45 ไอโซเลต ได้แก่ MC10 MC13 MC20 MC89 MC90 MC98 MC103 MC104 MC106 MC107 MC113 MC118 MC120 MC125 MC128 MC132 MC134 MC135 MC139 MC142 MC143 MC145 MC147 MC152 MC153 MC158 MC162 MC163 MC164 MC167 MC175 MC187 MC208 MC215 MC216 MC218 MC233 MC234 MC235 MC241 MC244 MC246 MC249 MC253 และ MC264

cluster IV มีแบคทีเรียด้านทานสารหนู 10 ไอโซเลต ได้แก่ MC100 MC102 MC105 MC111 MC115 MC136 MC165 MC166 MC172 และ MC202

ทั้งนี้แบคทีเรียด้านทานสารหนูตัวแทนทั้ง 100 ไอโซเลต จะนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูโดยใช้เทคนิค rep-PCR ต่อไป

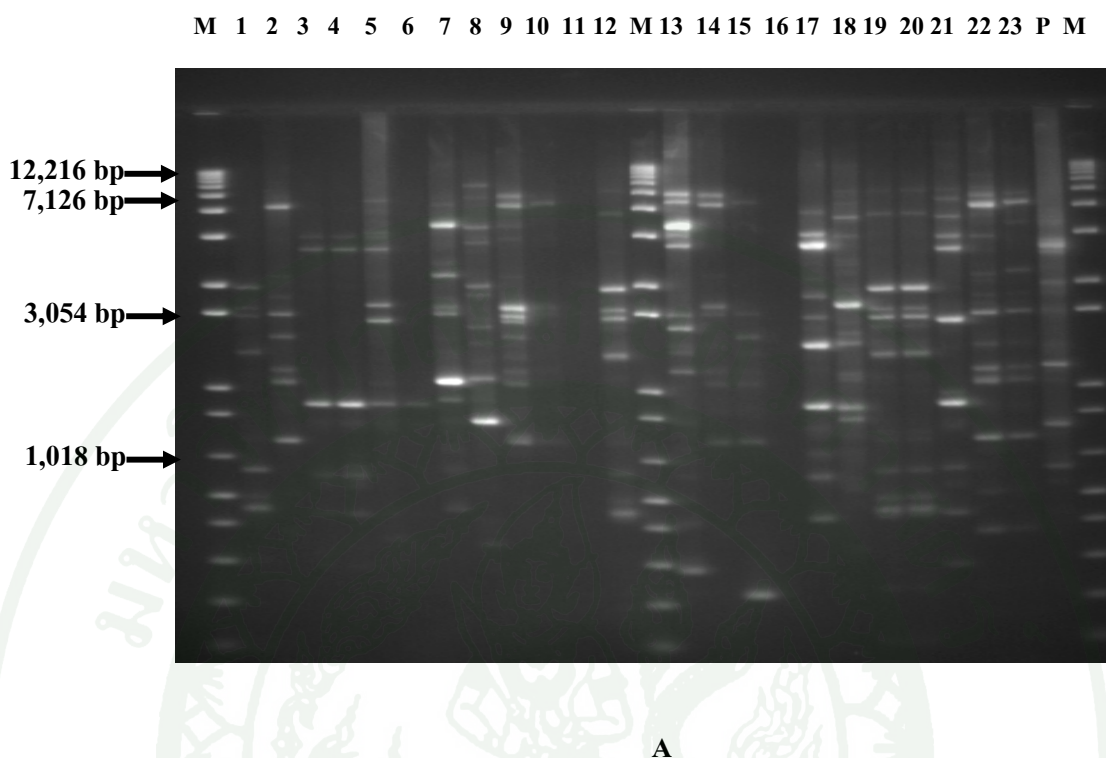


ภาพที่ 16 Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้านทานสารหนู อาศัยข้อมูลการด้านทานสารปฏิกิริยา 8 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า

3.5 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูโดยเทคนิค rep-PCR (repetitive extragenic palindromic-PCR)

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูตัวแทน 100 ไอโซเลต จากความสามารถในการด้านทานสารหนูจำนวน 8 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น โดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ที่เรียกว่า rep-PCR พบแบคทีเรียด้านทานสารหนูจำนวน 92 ไอโซเลต จาก 100 ไอโซเลต ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอบนเจลซึ่งมีขนาดและตำแหน่งที่แตกต่างกัน ขึ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้านทานสารหนูแต่ละไอโซเลตจะมีขนาดอยู่ในช่วง 100-12,000 bp ซึ่งมีจำนวนแถบดีเอ็นเอในแต่ละไอโซเลตที่ปรากฏประมาณ 10-20 แถบ ดังภาพที่ 17

ในส่วนของการวิเคราะห์ตำแหน่งและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลนั้น พบว่าแบคทีเรียด้านทานสารหนู 100 ไอโซเลตมีความแตกต่างกันของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีระดับความคล้ายคลึงในช่วงที่กว้างตั้งแต่ 5-99% และเมื่อแบ่งกลุ่มสามารถแบ่งได้เป็น 4 cluster คือ cluster I ประกอบด้วยแบคทีเรียด้านทานสารหนู 9 ไอโซเลต cluster II ประกอบด้วยแบคทีเรียด้านทานสารหนูมากที่สุดจำนวน 63 ไอโซเลต และ cluster III ประกอบด้วยแบคทีเรียด้านทานสารหนู 26 ไอโซเลต ส่วน cluster IV ประกอบด้วยแบคทีเรียด้านทานสารหนูเพียง 2 ไอโซเลต ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 17A ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่ได้จากเทคนิค rep-PCR

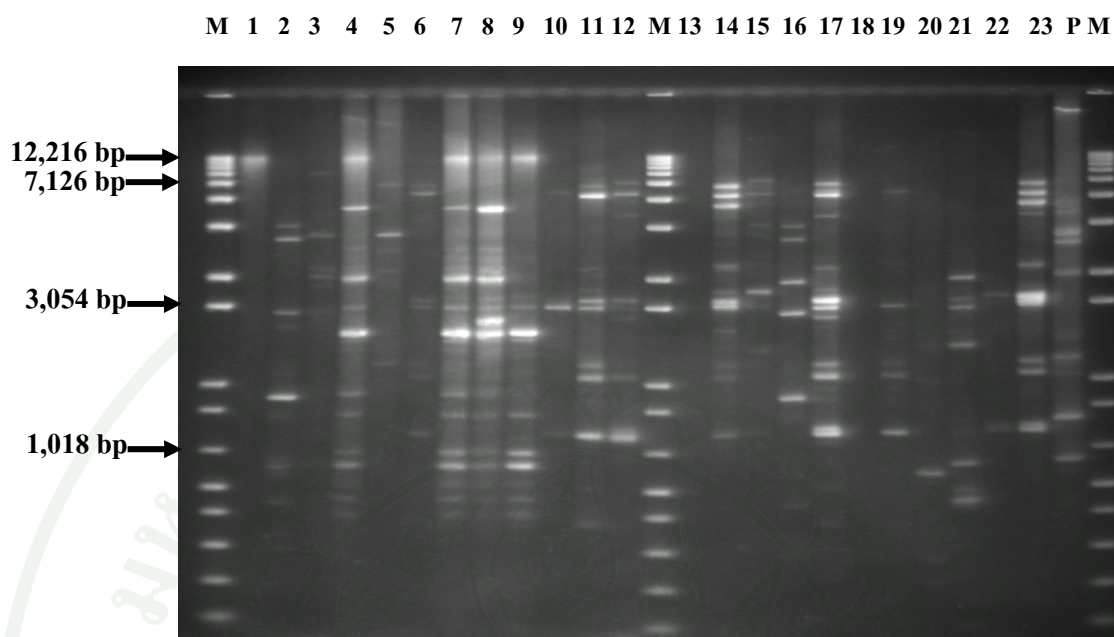
หมายเหตุ ช่องเจล M คือ 1 kb ladder

ช่องเจล P คือ positive control (*E. coli* 294)

ช่องเจล 1-23 คือ แบคทีเรียด้านทานสารหนู MC10 MC13 MC14 MC20 MC25 MC40

MC89 MC90 MC98 MC100 MC101 MC102 MC103 MC104 MC105 MC106 MC107

MC109 MC110 MC111 MC112 MC213 และ MC114 ตามลำดับ



B

ภาพที่ 17B ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่ได้จากเทคนิค rep-PCR

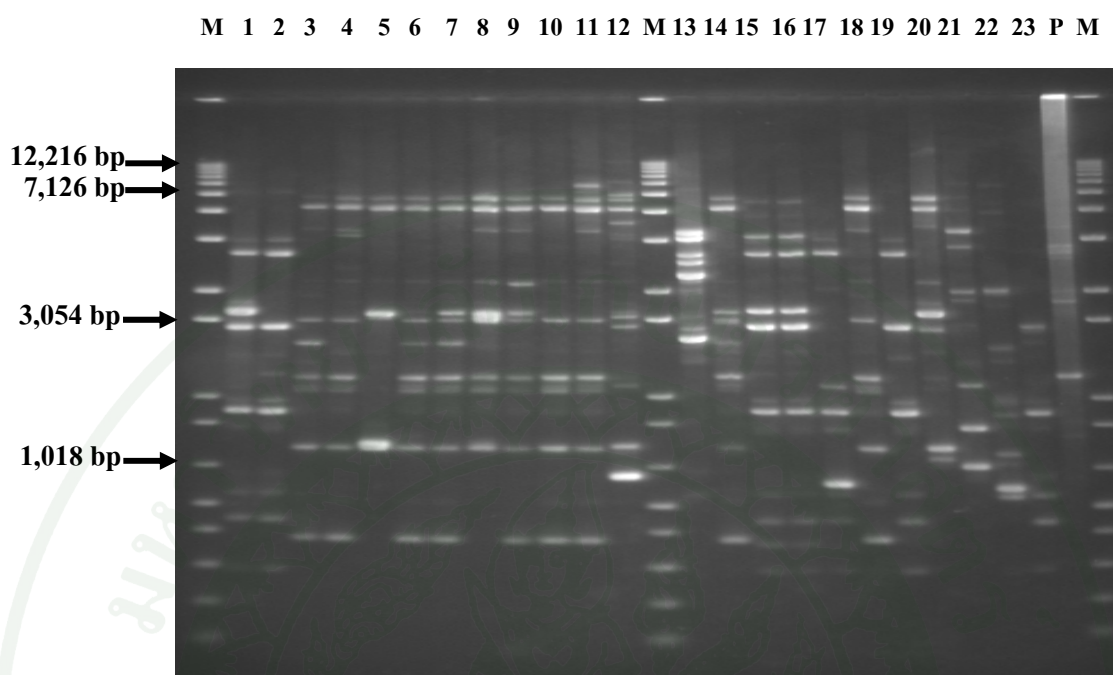
หมายเหตุ ช่องเจล M คือ 1 kb ladder

ช่องเจล P คือ positive control (*E. coli* 294)

ช่องเจล 1-23 คือ แบคทีเรียด้านทานสารหนู MC115 MC118 MC120 MC121 MC122

MC123 MC125 MC128 MC132 MC133 MC134 MC135 MC136 MC139 MC142

MC143 MC145 MC147 MC152 MC153 MC158 MC161 และ MC162 ตามลำดับ



ภาพที่ 17C ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่ได้จากเทคนิค rep-PCR

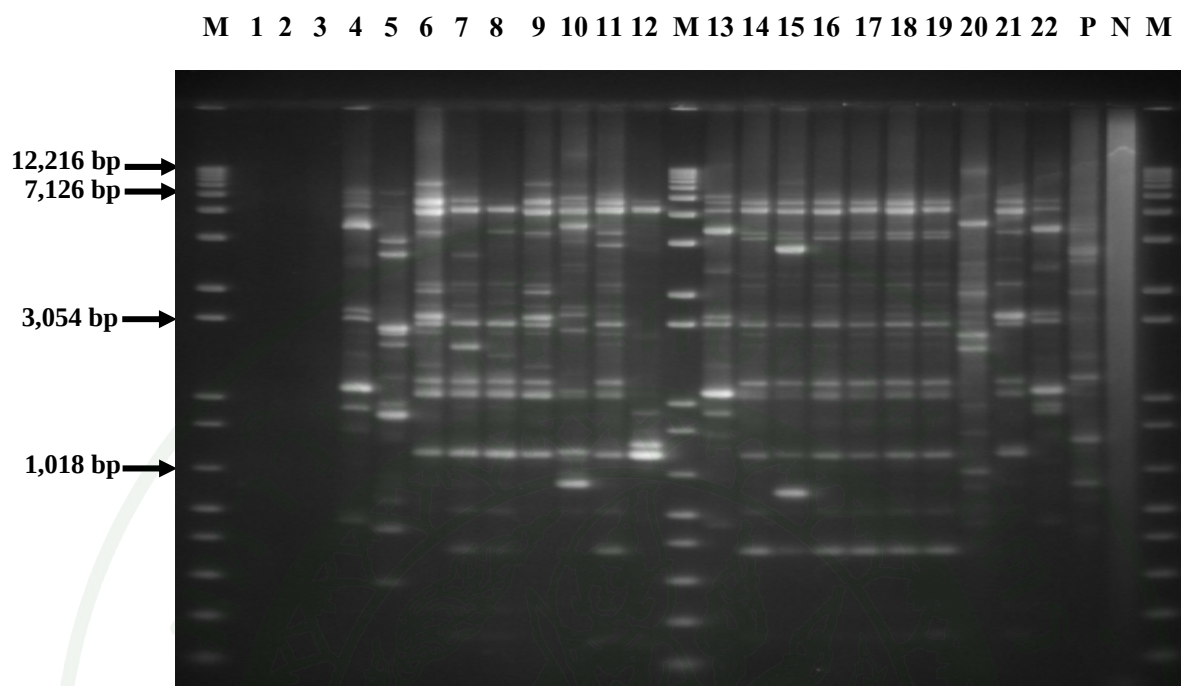
หมายเหตุ ช่องเจล M คือ 1 kb ladder

ช่องเจล P คือ positive control (*E. coli* 294)

ช่องเจล 1-23 คือ แบคทีเรียด้านทานสารหนู MC163 MC165 MC166 MC167 MC169

MC170 MC171 MC172 M175 MC180 MC181 MC182 MC187 MC192 MC194 MC195

MC196 MC197 MC199 MC200 MC201 MC202 และ MC203 ตามลำดับ



D

ภาพที่ 17D ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่ได้จากเทคนิค rep-PCR

หมายเหตุ ช่องเจล M คือ 1 kb ladder

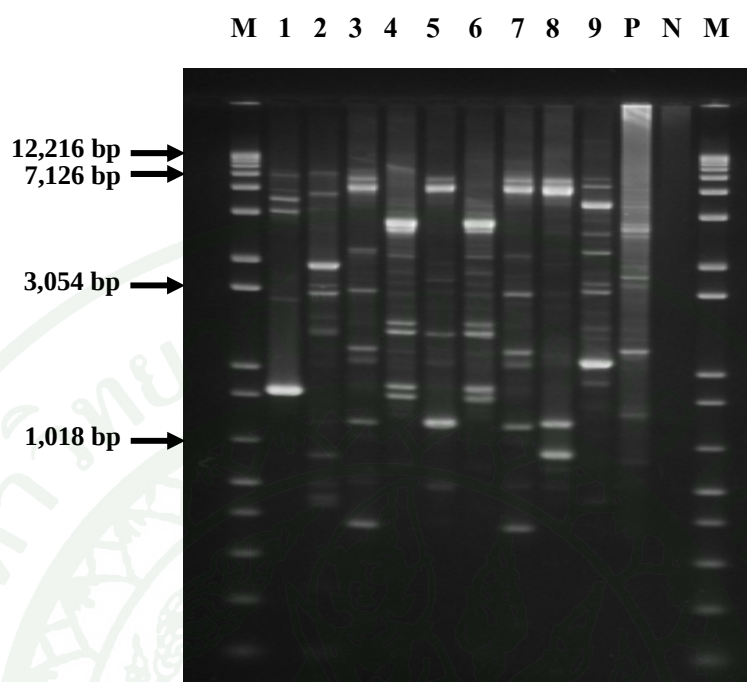
ช่องเจล P คือ positive control (*E. coli* 294)

ช่องเจล N คือ negative control (น้ำกลั่น)

ช่องเจล 1-22 คือ แบคทีเรียด้านทานสารหนู MC204 MC205 MC206 MC207 MC208

MC209 MC210 MC211 MC213 MC215 MC216 MC218 MC225 MC226 MC233

MC234 MC235 MC241 MC242 MC244 MC246 และ MC247 ตามลำดับ



E

ภาพที่ 17E ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่ได้จากเทคนิค rep-PCR

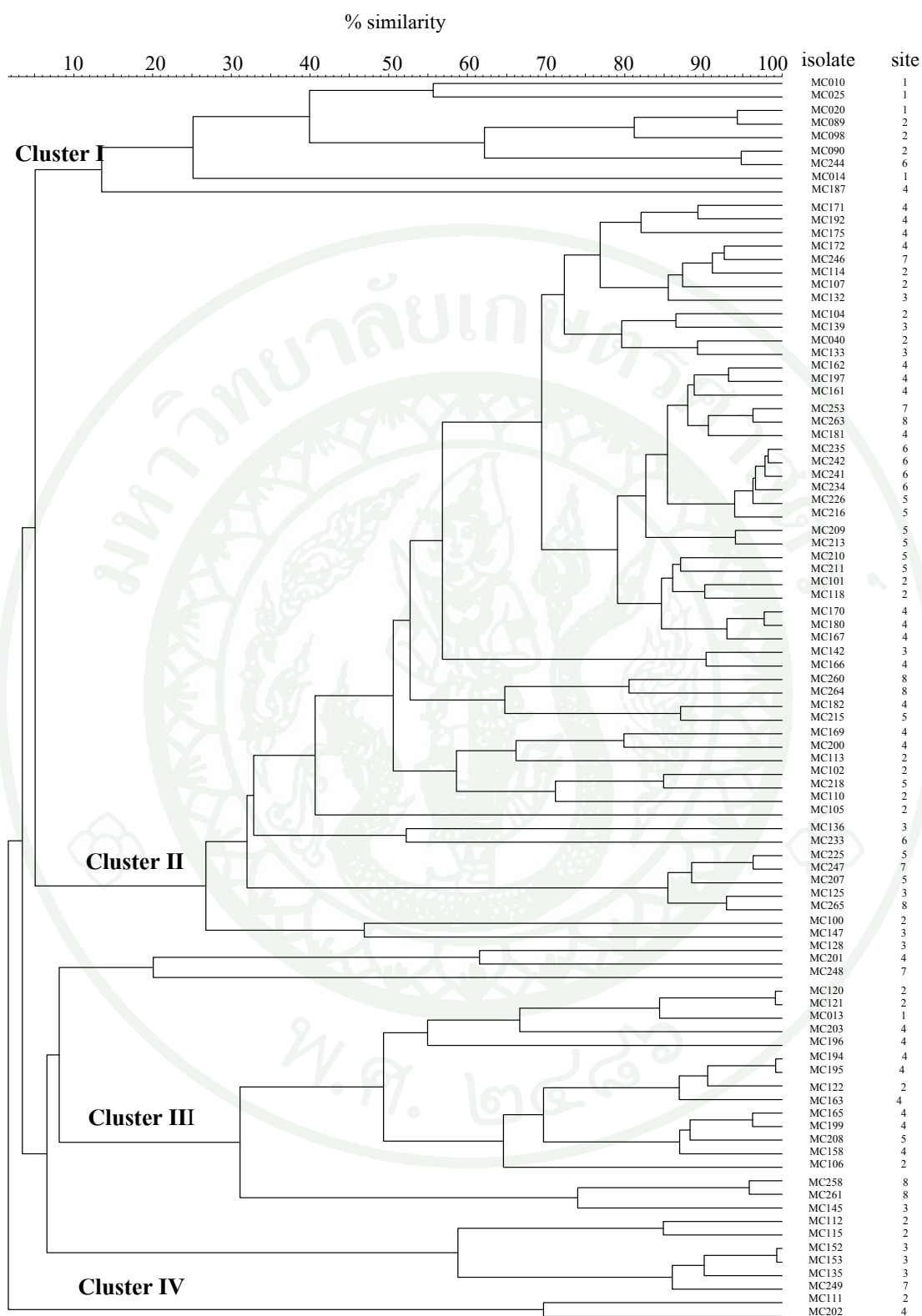
หมายเหตุ ช่องเจล M คือ 1 kb ladder

ช่องเจล P คือ positive control (*E. coli* 294)

ช่องเจล N คือ negative control (น้ำกลั่น)

ช่องเจล 1-9 คือ แบคทีเรียด้านทานสารหนู MC248 MC249 MC253 MC258 MC260

MC261 MC263 MC264 และ MC265 ตามลำดับ



ภาพที่ 18 Dendrogram ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้านทานสารหนู โดยอาศัยข้อมูลลายพิมพ์ ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR โดยใช้ ERIC primer

เมื่อพิจารณารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อบอกความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูตัวแทนทั้ง 100 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนู (ตารางที่ 9) พบว่าแบคทีเรียตัวแทนแต่ละไอโซเลตมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเฉพาะ โดยแต่ละไอโซเลตแบ่งตาม cluster และตัวอย่างดินที่ทำการคัดแยกได้ดังนี้

cluster I มีแบคทีเรียด้านทานสารหนู 9 ไอโซเลต คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนู 4 ตัวอย่างคือ

ตัวอย่างดิน AS1 ได้แก่ MC10, MC14, MC20 และ MC25

ตัวอย่างดิน AS2 ได้แก่ MC89, MC90 และ MC98

ตัวอย่างดิน AS4 ได้แก่ MC187

ตัวอย่างดิน AS6 ได้แก่ MC244

cluster II มีแบคทีเรียด้านทานสารหนู 67 ไอโซเลต คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนู 7 ตัวอย่างคือ

ตัวอย่างดิน AS2 ได้แก่ MC40 MC101 MC102 MC104 MC105 MC106 MC107 MC100 MC110 MC113 MC114 และ MC118

ตัวอย่างดิน AS3 ได้แก่ MC125 MC128 MC132 MC133 MC136 MC139 MC142 และ MC147

ตัวอย่างดิน AS4 ได้แก่ MC161 MC162 MC166 MC167 MC169 MC170 MC171 MC172 M175 MC180 MC181 MC182 MC192 MC197 MC200 และ MC201

ตัวอย่างดิน AS5 ได้แก่ MC207 MC209 MC210 MC211 MC213 MC215 MC216 MC218 MC225 และ MC226

ตัวอย่างดิน AS6 ได้แก่ MC233 MC234 MC235 MC241 และ MC242

ตัวอย่างดิน AS7 ได้แก่ MC246 MC147 MC248 และ MC253

ตัวอย่างดิน AS8 ได้แก่ MC260 MC263 MC264 และ MC265

cluster III มีแบคทีเรียด้านทานสารหนู 26 ไอโซเลต คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนู 7 ตัวอย่างคือ

ตัวอย่างดิน AS1 และ AS5 ได้แก่ MC13 และ MC208 ตามลำดับ

ตัวอย่างดิน AS2 ได้แก่ MC106 MC112 MC115 MC120 MC121 MC122 MC135 และ MC192

ตัวอย่างดิน AS3 ได้แก่ MC128 MC145 MC152 MC153

ตัวอย่างดิน AS4 ได้แก่ MC158 MC163 MC165 MC194 MC195 MC196 MC199 MC201 และ MC203

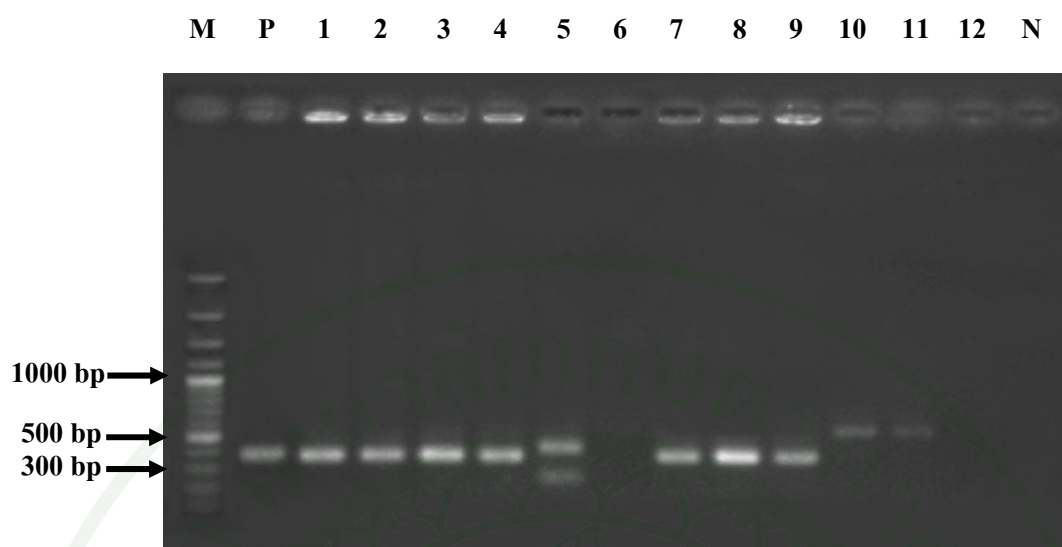
ตัวอย่างดิน AS7 ได้แก่ MC248 และ MC249

ตัวอย่างดิน AS8 ได้แก่ MC258 และ MC261

cluster IV มีแบคทีเรียด้านทานสารหนู 2 ไอโซเลต ได้แก่ MC114 และ MC202 จากตัวอย่างดิน AS2 และ AS4 ตามลำดับ

4. การศึกษายีนด้านทานสารหนู arsenate reductase gene (*arsC*)

ยีนด้านทานสารหนู *arsC* เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการรีดักชันสารหนูอาร์เซนเตเป็นอาร์เซไนต์โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ arsenate reductase ก่อนที่จะถูกขับออกนอกเซลล์ ในการศึกษา ยีนด้านทานสารหนู *arsC* นั้น ทำการศึกษากับแบคทีเรียด้านทานสารหนูตัวแทน 100 ไอโซเลต ซึ่งคัดเลือกจากความสามารถในการด้านทานสารหนูที่ 8 ชนิด พบว่าแบคทีเรียด้านทานสารหนูตัวแทน 30 ไอโซเลตมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่เป็นชิ้นส่วนของยีน *arsC* ที่มีขนาด 350 bp ดังภาพที่ 19 คิดเป็นแบคทีเรียด้านทานสารหนู 30% ของแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมดที่ทำการศึกษา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการ PCR ไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียตัวแทนที่ทำการศึกษาจึงไม่สามารถตรวจสอบการปรากฏของยีนด้านทานสารหนู *arsC* ได้ทั้งหมด หรือแบคทีเรียไม่มียีนด้านทานสารหนู *arsC* เนื่องจากแบคทีเรียใช้วิธีอื่นในการด้านทานสารหนู อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ปรากฏยีนด้านทานสารหนู *arsC* จำนวน 30 ไอโซเลต ดังตารางที่ 12 สำหรับรายละเอียดของแบคทีเรียด้านทานสารหนูทั้ง 100 ไอโซเลต ดังตารางภาคผนวกที่ 12



ภาพที่ 19 ผลผลิต PCR ในส่วนของยีนต้านทานสารหนู *arsC* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *arsC-1F* และ *arsC1-R*

หมายเหตุ ช่องเจล M คือ 100-bp ladder

ช่องเจล P คือ positive control (*E. coli* W3110)

ช่องเจล N คือ negative control (น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ)

ช่องเจล 1A-12A คือ แบคทีเรียต้านทานสารหนู MC10 MC13 MC14 MC20 MC25 MC40 MC89 MC90 MC98 MC100 MC101 และ MC102 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์เซนิตและอาร์เซไนต์ เมื่อเจือจางแบคทีเรีย 100 และ 10000 เท่า และการปรากฏของยีนต้านทานสารหนู *arsC*

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความสามารถในการต้านทานสารหนู				การปรากฏของ ยีน <i>arsC</i>
			เจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เจือจางเซลล์แบคทีเรีย		
			100 เท่า		10000 เท่า		
			อาร์เซไนต์	อาร์เซเนต	อาร์เซไนต์	อาร์เซเนต	
1	AS1	MC10	1000	1500	1000	1500	+
2	AS1	MC13	1000	1000	1000	500	+
3	AS1	MC14	50	200	50	10	+
4	AS1	MC20	1000	1500	1000	1500	+
5	AS2	MC89	1000	1500	1000	1500	+
6	AS2	MC90	1000	1500	1000	1500	+
7	AS2	MC98	1000	1500	100	1500	+
8	AS2	MC104	250	1000	0	0	+
9	AS2	MC105	250	1000	10	200	+
10	AS2	MC110	250	1500	0	0	+
11	AS2	MC111	100	200	0	0	+
12	AS2	MC112	1000	1500	250	0	+
13	AS2	MC118	100	200	50	0	+
14	AS3	MC132	100	1500	10	0	+
15	AS3	MC134	100	10	0	0	+
16	AS4	MC158	1000	1500	250	10	+
17	AS4	MC161	250	100	0	0	+
18	AS4	MC169	100	200	50	0	+
19	AS4	MC172	250	100	0	0	+
20	AS4	MC175	250	1000	250	0	+
21	AS4	MC180	1000	1500	250	0	+
22	AS4	MC181	250	200	50	0	+
23	AS4	MC182	250	100	50	0	+

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความสามารถในการต้านทานสารหนู				การปรากฏของ ยีน <i>arsC</i>
			เจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เจือจางเซลล์แบคทีเรีย		
			100 เท่า		10000 เท่า		
			อาร์เซไนต์	อาร์เซนิต	อาร์เซไนต์	อาร์เซนิต	
24	AS4	MC201	250	1500	500	1500	+
25	AS4	MC202	100	1000	50	0	+
26	AS6	MC235	250	1500	0	0	+
27	AS7	MC241	250	1000	10	0	+
28	AS7	MC246	50	500	0	0	+
29	AS8	MC263	250	1500	100	40	+
30	AS8	MC265	250	1500	10	0	+

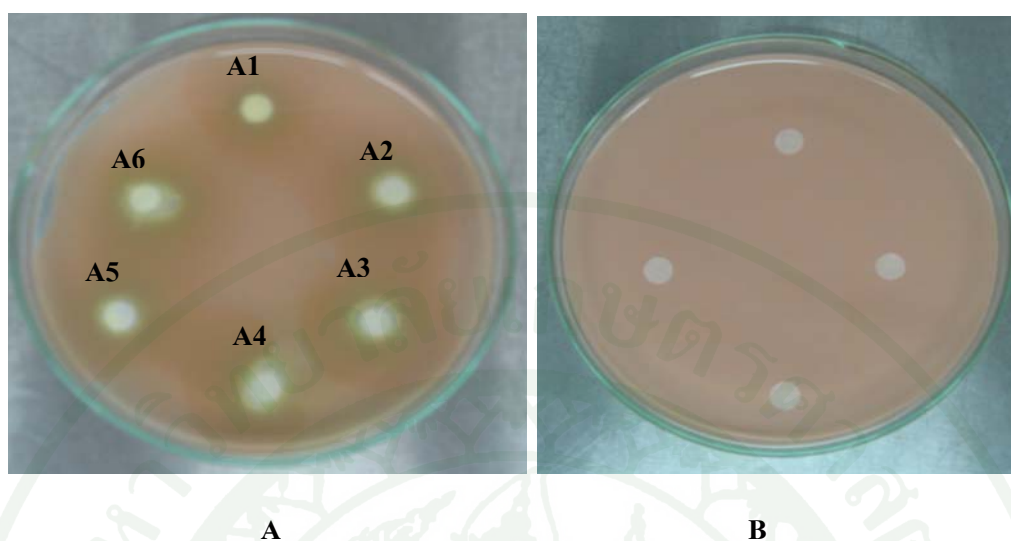
5. การศึกษาการแปลงสารหนูด้วยเทคนิค agar plate screening assay และ microplate screening assay

จากข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียต้านทานสารหนู ด้วยการทดสอบการต้านทานสารปรอทชีวณะ จึงนำแบคทีเรียทั้ง 100 ไอโซเลต มาศึกษาการแปลงสารหนู อาร์เซไนต์และอาร์เซนิตด้วยเทคนิค agar plate screening assay (Krumova *et al.*, 2008) ซึ่งเป็นการทดสอบการแปลงสารหนูบนอาหารแข็งโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างสารหนูกับ AgNO_3 ทั้งนี้ อาหารที่ใช้ในการทดสอบจะต้องไม่เกิดปฏิกิริยากับ AgNO_3 หรือถูกรบกวนโดยสารเคมีในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงเลือกอาหารแข็ง CDM มาทำการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียตัวแทน และพบว่าแบคทีเรียตัวแทนสามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง CDM ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซไนต์หรืออาร์เซนิตได้สูงสุด ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 20 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบการแปลงสารหนูของแบคทีเรียตัวแทน 100 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียตัวแทน 95 ไอโซเลต สามารถรีดิวซ์สารหนูอาร์เซนิตเป็นอาร์เซไนต์ได้ ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีจากสีน้ำตาลแดงเป็นสีเหลือง ดังภาพที่ 20 สำหรับการออกซิเดชันสารหนูอาร์เซไนต์

เป็นอาร์เซนเด้นั้น พบว่าแบคทีเรียตัวแทนทั้ง 100 ไอโซเลต ไม่สามารถออกซิเดชันสารหนูอาร์เซไนต์เป็นอาร์เซนเด้นได้ (ไม่เกิดการเปลี่ยนสีจากสีน้ำตาลแดงเป็นสีเหลือง) ดังภาพที่ 21

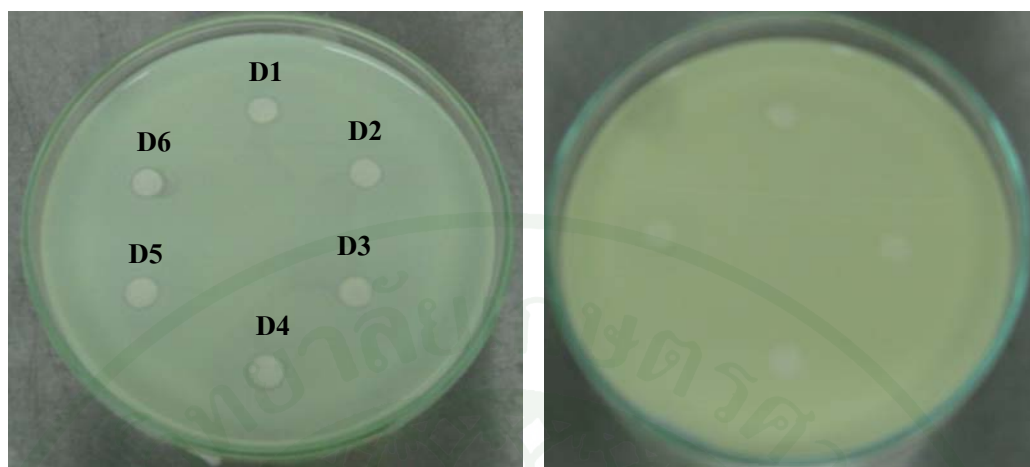
จากผลการทดสอบการแปลงสารหนูดังกล่าวข้างต้น จึงนำแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่สามารถรีดิวซ์อาร์เซนเด้นเป็นอาร์เซไนต์จำนวน 95 ไอโซเลตมาทดสอบการรีดักชันสารหนูอีกครั้งด้วยวิธี microplate screening assay และเมื่อนำตัวอย่างไปทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างสารหนูกับ AgNO_3 และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีเช่นเดียวกับวิธี agar plate screening assay พบว่าแบคทีเรียทั้ง 95 ไอโซเลต ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลแดง กล่าวคือไม่เกิดการออกซิเดชันเปลี่ยนสารหนูอาร์เซไนต์เป็นอาร์เซนเด้นเมื่อทดสอบด้วยวิธี microplate screening assay ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของสารหนูที่ใช้ในการทดลองมีระดับสูง จึงทำให้ปริมาณของสารหนู อาร์เซไนต์ที่เหลือในการทำปฏิกิริยากับ AgNO_3 ที่มากจึงปรากฏให้เห็นแต่สีเหลือง ในขณะที่การรีดักชันพบการเปลี่ยนแปลงของสีน้ำตาลแดงเป็นสีเหลืองเพียงเล็กน้อย ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารหนูกับ AgNO_3 จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วก่อนที่จะจางหายไปในเวลาเพียง 1-2 วินาที จนทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นสีเหลืองที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน อีกทั้งการรีดักชันสารหนูอาร์เซนเด้นเป็นอาร์เซไนต์ที่เกิดขึ้นอาจเกิดไม่สมบูรณ์จึงทำให้สีที่เกิดขึ้นเกิดเป็นการการผสมกันระหว่างสีเหลืองจากการรีดักชันและสีน้ำตาลแดงจากอาร์เซนเด้น จากผลการทดลองดังกล่าวจึงนำแบคทีเรียทั้ง 95 ไอโซเลต ไปวัดการรีดักชันด้วยวิธี molybdenum blue เพื่อบอกถึงปริมาณของการรีดักชันที่เกิดขึ้น



ภาพที่ 20 การทดสอบการเกิดรีดักชันสารหนูอาร์เซนิตเป็นอาร์เซไนด์ บนอาหาร CDM ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซนิต ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน

หมายเหตุ A คือ แบคทีเรียตัวแทนที่สามารถรีดักชันสารหนูอาร์เซนิตเป็นอาร์เซไนด์จะปรากฏสีเหลือง (A1-A6 คือ แบคทีเรียด้านทานสารหนู MC10 MC13 MC14 MC20 MC25 และ MC40)

B คือ ดำรับควบคุม (control) ปรากฏสีน้ำตาลแดง



A

B

ภาพที่ 21 การทดสอบการเกิดออกซิเดชันสารหนูอาร์เซนไนต์เป็นอาร์เซนเต บนอาหาร CDM ที่มีการเติมสารหนูอาร์เซนไนต์ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 2 วัน

หมายเหตุ A คือ แบคทีเรียตัวแทนที่สามารถแปลงสารหนูอาร์เซนไนต์เป็นอาร์เซนเตจะปรากฏสีน้ำตาลแดง (D1-D6 คือ แบคทีเรียด้านทานสารหนู MC139 MC142 MC143 MC145 MC147 และ MC152)

B คือ ดำรับควบคุม (control) ปรากฏสีเหลือง

6. การวัดประสิทธิภาพการแปลงสารหนูและระบุชนิดของแบคทีเรีย

จากการทดสอบการแปลงสารหนูเบื้องต้น ซึ่งพบแบคทีเรียด้านทานสารหนู 95 ไอโซเลต มีความสามารถในการรีดิวซ์อาร์เซนเนตเป็นอาร์เซไนต์ และน่าจะมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้เป็นพวก *arsenate reducing bacteria* โดยการปรากฏสีเหลืองขึ้นบนอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบ ด้วยเทคนิค agar plate screening assay ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาทำการวัดประสิทธิภาพการแปลงสารหนู ด้วยวิธี Molybdenum blue method (Johnson and Pilson, 1972) จากการทดลองพบว่าสามารถวัดปริมาณอาร์เซไนต์จากการรีดิวซ์อาร์เซนเนตเป็นอาร์เซไนต์ด้วยวิธี Molybdenum blue method ได้ โดยแบคทีเรีย 71 ไอโซเลต สามารถรีดักชันสารหนูอาร์เซนเนต ในช่วง 0.12-69.59 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดักชันตั้งแต่ 30 ไมโครโมลาร์ จำนวน 13 ไอโซเลต (ตารางที่ 13) และมีเพียง 4 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงในการรีดักชันมากกว่า 50 ไมโครโมลาร์ คือ ไอโซเลต MC204 MC197 MC120 และ MC196 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการรีดักชันสารหนูได้สูงที่สุด เท่ากับ 69.59 56.94 55.44 และ 66.22 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นประสิทธิภาพในการรีดักชันเพียง 3-7% ของปริมาณสารหนูตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง (1,000 ไมโครโมลาร์) สำหรับปริมาณการรีดักชันสารหนูอาร์เซนเนตเป็นอาร์เซไนต์ของแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมด ดังตารางผนวกที่ 13

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการรีดักชันสารหนู ซึ่งพบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการแปลงสารหนู 13 ไอโซเลต จึงนำแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลต มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 3 สกุล ดังตารางที่ 14 (ภาพผนวกที่ 7-19) โดยมีแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* ระบุเป็น *Bacillus* sp. และ 2 ไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุลอื่นคือ MC010 และ MC197 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* ระบุเป็น *Enterobacter* sp. ที่ระดับความคล้ายคลึง 100% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank และ MC204 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Ochrobactrum* ซึ่งระบุเป็น *Ochrobactrum* sp. ที่ระดับความคล้ายคลึง 99% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank รายละเอียดของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ทำการศึกษากับแบคทีเรียในฐานข้อมูล Genbank ดังตารางผนวกที่ 14 และภาพผนวกที่ 7-19

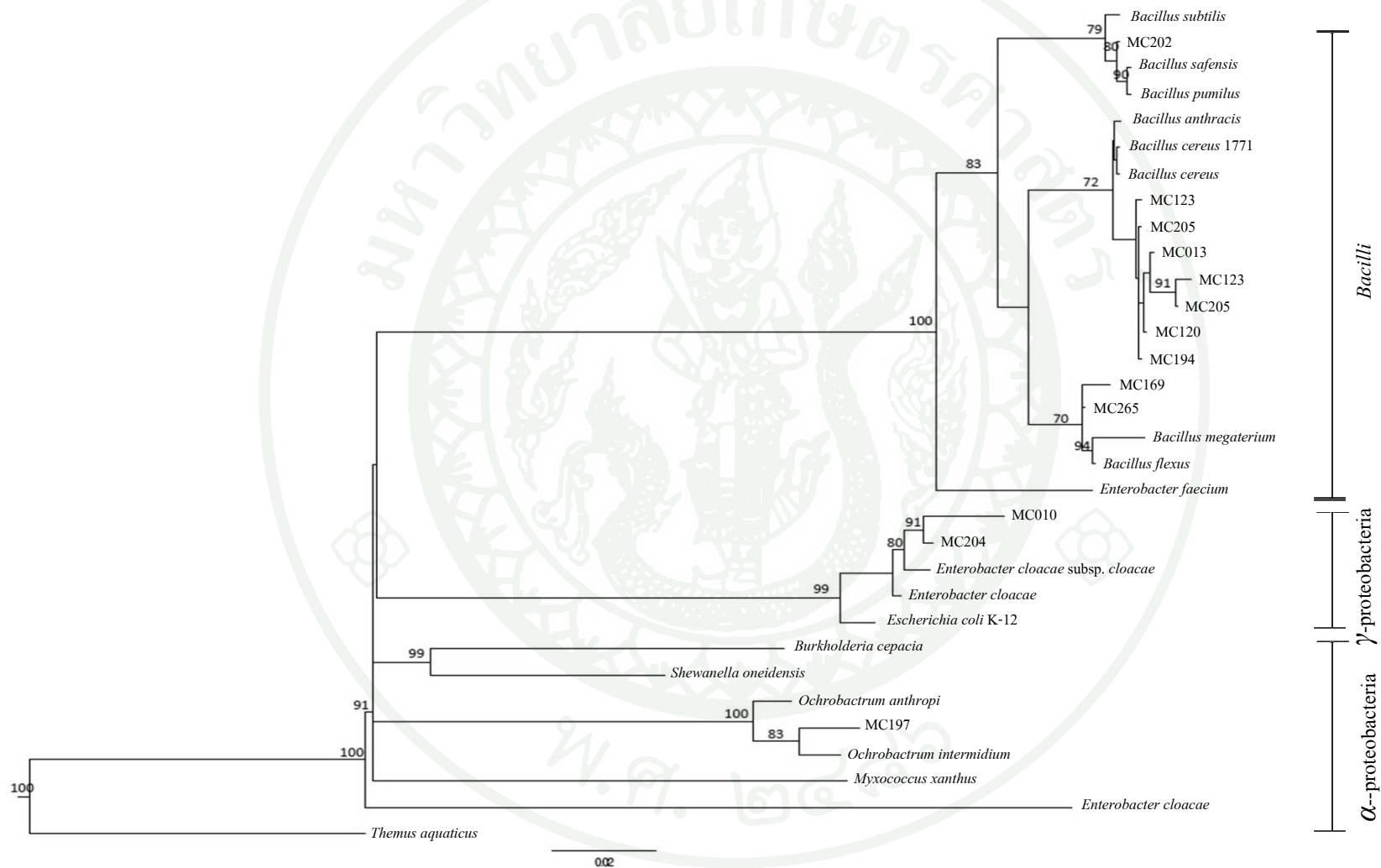
สำหรับการทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม RDPII โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่นำมาศึกษาทั้ง 13 ไอโซเลต มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล RDP นั้น ได้ผลการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank โดยแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่มีความสามารถในการรีดิวซ์อาร์เซนตเป็นอาร์เซนไนต์จะมีลักษณะของแผนภูมิวิวัฒนาการที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียใน 3 class คือ *Bacilli*, γ -proteobacteria และ α -proteobacteria ดังภาพที่ 22

ตารางที่ 13 ปริมาณของสารหนูอาร์เซนไนต์ที่ได้จากการรีดักชันสารหนูอาร์เซนตเป็นอาร์เซนไนต์

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ประสิทธิภาพการรีดักชันสารหนู (ไมโครโมลาร์)
1	AS1	MC10	38.32
2	AS1	MC13	39.09
3	AS1	MC120	56.94
4	AS2	MC123	36.64
5	AS2	MC169	37.12
6	AS4	MC194	33.16
7	AS4	MC196	54.44
8	AS4	MC197	66.22
9	AS4	MC202	36.30
10	AS4	MC203	39.67
11	AS4	MC204	69.59
12	AS4	MC205	35.30
13	AS4	MC265	38.92

ตารางที่ 14 การระบุชนิดของแบคทีเรียจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA
เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ชนิดของแบคทีเรีย	% Similarlity
1	AS1	MC10	<i>Enterobacter</i> sp.	100
2	AS1	MC13	<i>Bacillus</i> sp.	100
3	AS1	MC120	<i>Bacillus</i> sp.	100
4	AS2	MC123	<i>Bacillus</i> sp.	99
5	AS2	MC169	<i>Bacillus</i> sp.	98
6	AS4	MC194	<i>Bacillus</i> sp.	100
7	AS4	MC196	<i>Bacillus</i> sp.	100
8	AS4	MC197	<i>Ochrobactrum</i> sp.	99
9	AS4	MC202	<i>Bacillus</i> sp.	99
10	AS4	MC203	<i>Bacillus</i> sp.	100
11	AS4	MC204	<i>Enterobacter</i> sp.	100
12	AS4	MC205	<i>Bacillus</i> sp.	97
13	AS4	MC265	<i>Bacillus</i> sp.	98



ภาพที่ 22 Phylogenetic tree เปรียบเทียบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการการรื้อถอนอาร์เซนดที่ให้กับแบคทีเรียในฐานข้อมูล RDP

วิจารณ์

1. การศึกษาโครงสร้างสังคมแบคทีเรียด้วยเทคนิค DGGE

การศึกษาโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูจากตัวอย่างดินที่มีระดับความเข้มข้นของสารหนูที่แตกต่างกัน 8 จุด (AS1 AS2 AS3 AS4 AS5 AS6 AS7 และ AS8) จากบริเวณเหมืองแร่เก่า ซึ่งตั้งอยู่ในลุ่มน้ำห้วยมะขาม อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี โดยพื้นที่ดังกล่าวมีการทำเหมืองแร่ดีบุกมานานกว่า 40 ปี และปัจจุบันได้มีการเปลี่ยนเป็นพื้นที่เกษตรกรรมไปบางส่วน ทั้งนี้บางพื้นที่ที่มีการทิ้งร้างไว้ เมื่อนำตัวอย่างดินมาวิเคราะห์สมบัติดิน และปริมาณการปนเปื้อนสารหนู พบการปนเปื้อนสารหนูทั้งในระดับต่ำและสูงไม่ขึ้นกับสมบัติของดิน และเมื่อศึกษาโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค DGGE โดยการวิเคราะห์อาศัยจำนวนแถบดีเอ็นเอและตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ จะเห็นว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูต่างกันได้จากเทคนิค DGGE จะมีแถบดีเอ็นเอปรากฏอยู่ในช่วง 26-52 แถบ ทั้งนี้โครงสร้างสังคมแบคทีเรียในแต่ละตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูต่างกันไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารหนูที่ปนเปื้อนในระดับสูงหรือต่ำ กล่าวคือปริมาณความเข้มข้นสารหนูในดินไม่มีผลต่อโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินที่ปนเปื้อนสารหนู

จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในดินที่ผ่านมาจะพบว่าโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินอาจมีจำนวนมากกว่า 100 ชนิด (Gans *et al.*, 2005; Torvik *et al.*, 1996) ดังนั้นเมื่อพิจารณาทางด้านเทคนิคที่ใช้ในการศึกษา DGGE ในบางกรณีอาจพบการซ้อนทับของแถบดีเอ็นเอ หรือดีเอ็นเอบางแถบไม่ชัดเจนได้ ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอเพื่อบอกจำนวนของแบคทีเรีย ทั้งนี้เป็นผลมาจากความหลากหลายของแบคทีเรียในตัวอย่างที่ต้องการศึกษามีมาก อีกทั้งจำนวนของแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจมีจำนวนมาก จึงทำให้แถบดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์มีลักษณะทั้งเข้มและหนาเกินไป จนอาจเกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ ดังนั้นการประเมินความหลากหลายหรือชนิดของแบคทีเรียบางครั้งจึงอาจต้องใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการประมวลผลทั้งจำนวนและความเข้มของแถบดีเอ็นเอ เพื่อกำจัดแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจนออกไป ซึ่งเป็นการลดความผิดพลาดและเพิ่มความแม่นยำในการแปลผลนั่นเอง ทั้งนี้แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ควรไม่เกิน 40 แถบ ซึ่งถือเป็นจำนวนที่เหมาะสมในการประเมินชนิดของแบคทีเรียที่ถูกต้อง (Nakatsu, 2007) นอกจากนี้การใช้เทคนิค PCR และ primer จะต้องเหมาะสมต่อวัตถุประสงค์ในการศึกษา (Klappenbach *et al.*, 2001) เนื่องจาก primer บางตัวเหมาะสำหรับใช้ศึกษาแบคทีเรียได้

หลายกลุ่ม ในขณะที่ primer บางตัวเหมาะสำหรับการศึกษาแบคทีเรียได้กลุ่มเดียว (Baker and Cowan, 2004)

สำหรับการประเมินโครงสร้างสังคมแบคทีเรียโดยอาศัยการศึกษาสมบัติของดินเบื้องต้น เช่น เนื้อดิน และอินทรีย์วัตถุในดิน และพีเอช นอกเหนือจากการปนเปื้อนสารหนูในดิน ก็น่ามีผลต่อโครงสร้างสังคมแบคทีเรียและความหลากหลายของแบคทีเรียด้วย กล่าวคือแบคทีเรียแต่ละชนิดจะดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน แบคทีเรียบางชนิดชอบความเป็นกรด บางชนิดชอบความเป็นด่าง โดยส่วนใหญ่พีเอชดินที่เป็นกลางจะพบแบคทีเรียที่เจริญและดำรงชีวิตอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์หรืออินทรีย์วัตถุสูง เนื่องจากสภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อแบคทีเรีย และมีสารอาหารจากอินทรีย์วัตถุเพียงพอต่อการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าความหลากหลายของโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณการปนเปื้อนสารหนูเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับสมบัติของดินด้วย อีกทั้งระดับความเป็นพิษของสารหนูหรือความสามารถในการต้านทานสารหนูในดินน่าจะมีผลต่อแบคทีเรียแตกต่างกัน ซึ่งแม้ว่าดินจะมีปริมาณสารหนูในปริมาณสูงแต่หากอยู่ในรูปที่มีระดับความเป็นพิษต่ำก็ทำให้แบคทีเรียในดินสามารถต้านทานหรือดำรงชีวิตอยู่ได้

จากการระบุชนิดของแบคทีเรียโดยพิจารณาจากความแตกต่างของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ และใช้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนู ในการทดลองเลือกแถบดีเอ็นเอที่สนใจจำนวน 6 แถบ (จากตัวอย่างดิน AS1 และ AS5) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนสารหนูอื่นๆ และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบเพียงแบคทีเรีย 2 ชนิด จากตัวอย่างดิน AS1 ที่สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ ในขณะที่แบคทีเรียจากแถบดีเอ็นเอที่เลือกมาศึกษาอื่นๆ ไม่สามารถระบุชนิดได้ เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ทำการศึกษาใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลโดยตรง มีโอกาสในการเกิดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอของแถบดีเอ็นเอใกล้เคียง ซึ่งเกิดการซ้อนทับกับแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันมาก หรือมีปริมาณมากจึงทำให้ไม่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอเดี่ยวได้ หรือดีเอ็นเอเกิดการปนเปื้อนดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ 2 ชนิดได้ ดังนั้นหากแบคทีเรียที่ต้องศึกษามีความคล้ายคลึงกันมากหรือมีลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันเพียง 2-3 นิวคลีโอไทด์ เพื่อป้องกันการแยกตัวในตำแหน่งใกล้เคียงกัน จึงอาจต้องใช้ gradient ในช่วงที่แคบลง เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกตัวได้ดีขึ้นและสามารถวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ง่ายขึ้นด้วย (Muyzer *et al.*, 1993) สำหรับการระบุชนิดของแบคทีเรียที่สนใจจากเทคนิค DGGE

ควรใช้การโคลน ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าการใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลโดยตรง (Muyzer *et al.*, 1993) เนื่องจากจะทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์และง่ายต่อการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล นอกจากนี้การใช้ดีเอ็นเอซึ่งผ่านการย่อยสัและส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตแล้วมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์จะทำให้ดีเอ็นเอบางส่วนเกิดการเสียสภาพจนไม่สามารถนำไปศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามหากจำเป็นต้องใช้แถบดีเอ็นเอจากเจลในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่สนใจศึกษา ควรเลือกใช้ primer ในการทำเทคนิค DGGE ที่ไม่สั้นหรือยาวเกินไป ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมต่อการระบุชนิดของแบคทีเรียควรอยู่ที่ประมาณ 500 bp (Muyer *et al.*, 1993)

2. การคัดแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนู

การแยกแบคทีเรียด้านทานสารหนูเบื้องต้นจากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับที่แตกต่างกัน 8 ตัวอย่าง โดยการเจือจางบนอาหารแข็ง TGE ซึ่งเติมสารหนูอาร์เซนไนต์ที่ระดับความเข้มข้น 10-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และคัดแยกให้บริสุทธิ์ในอาหาร LB สามารถคัดแยกและเลือกแบคทีเรียด้านทานสารหนูมาศึกษาได้ 262 ไอโซเลต และเมื่อพิจารณาการคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าดินที่มีระดับการปนเปื้อนสารหนูในระดับสูงหรือต่ำ ไม่ได้มีต่อจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ กล่าวคือจำนวนแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่แยกได้ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารหนูที่ปนเปื้อนในดินโดยตรง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากแบคทีเรียในดินที่ปนเปื้อนสารหนูมีความสามารถในการด้านทานสารหนูได้สูง หรือใช้กลไกบางอย่างในการด้านทานสารหนู จึงทำให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้เป็นจำนวนมาก แม้จะแยกมาจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำก็ตาม อีกทั้งลักษณะและสมบัติต่างๆ ของดินย่อมมีผลต่อการคัดแยกเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง pH ในดินซึ่งแบคทีเรียและเชื้อราส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในช่วง pH ที่กว้าง และยังสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลง pH ได้ดีอีกด้วย (Hiroki, 1992; Jordan and Lechevalier, 1975) ตัวอย่างเช่นการศึกษาจำนวนแบคทีเรียในดินปนเปื้อนสังกะสี ความเข้มข้น 10-50 มิลลิโมลาร์ พบจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ในดินที่มีสังกะสีและสารหนูปนเปื้อนมีจำนวนมากกว่าค่ารับควบคุมถึง 8.5×10^8 CFU (Ashraf and Ali, 2007)

3. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนู

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูจากดินปนเปื้อนสารหนูนี้ ได้นำแบคทีเรียที่คัดแยกทั้งหมดมาคัดเลือกโดยใช้ความสามารถในการด้านทานสารหนู และความสามารถในการด้านทานสารปฏิชีวนะ ที่ระดับความเข้มข้นของสารต่างๆ มาช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรียจำนวนมาก เพื่อเลือกแบคทีเรียตัวแทนที่มีความหลากหลายก่อนที่จะนำไปใช้ศึกษาด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลต่อไป ดังนี้

3.1 ความสามารถในการด้านทานสารหนูและสารปฏิชีวนะ

จากการศึกษาความสามารถในการด้านทานสารหนู ทั้งอาร์เซนิตและอาร์เซไนต์ ที่ความเข้มข้น 10-1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นว่าแบคทีเรียมีความสามารถด้านทานของสารหนูทั้งอาร์เซไนต์และอาร์เซนิตได้สูง อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสามารถด้านทานอาร์เซนิตได้มากกว่าอาร์เซไนต์ ทั้งนี้เป็นผลมาจากสารหนูอาร์เซไนต์จะมีความเป็นพิษมากกว่าอาร์เซนิต อีกทั้งอาร์เซไนต์ยังสามารถละลายน้ำได้มากกว่า และถูกดูดซึมได้ดีกว่าจึงทำให้เป็นพิษมากกว่าอาร์เซนิต ซึ่งไม่ละลายหรือละลายได้น้อย (McGeehan, 1996) และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียหรือระดับการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียจะมีความสามารถในการด้านทานสารหนูได้ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารหนูเพิ่มมากขึ้นหรือเซลล์มีการเจริญมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการด้านทานสารหนูที่ลดลงด้วย กล่าวคือการเจริญของเซลล์แบคทีเรียให้มีความเข้มข้นของเซลล์ต่ำมากเท่าไร ก็จะเป็นการลดความสามารถในการด้านทานสารหนูที่มากขึ้น เช่นเดียวกับการด้านทานสารปฏิชีวนะจะพบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถด้านทานสารปฏิชีวนะในกลุ่ม streptomycin rifammycin ampicillin tetracycline และ spectinomycin ได้ดี แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ จะเห็นว่าแบคทีเรียสามารถด้านทานสารปฏิชีวนะต่อ streptomycin rifammycin ampicillin และ spectinomycin ได้ดีที่ความเข้มข้นสูง

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการด้านทานสารปฏิชีวนะแต่ละไอโซเลต จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต มักแสดงความสามารถในการด้านทานสารปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดจะมีการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น ampicillin จะมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกทำให้โครงสร้างผนังเซลล์ผิดปกติไปหรือไปขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ ในขณะที่ rifammycin และ tetracycline มีผลต่อการ

สังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ของเซลล์แบคทีเรีย (มาลีนิ, 2541) ดังเช่นในการศึกษาแบคทีเรียด้านทานโลหะหนักที่คัดแยกจากน้ำเสีย พบแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถต้านทานโลหะหนักและสารปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิดของ และ 90% ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดจะต้านทานสารปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด และสามารถระบุชนิดของแบคทีเรียเป็นพวก *Staphylococcus* sp., *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus* sp., *Citrobacter* sp., *Acinobacter* sp. และ *Flavobacterium* sp. (Rajbanshi, 2008) เช่นเดียวกับ Filali *et al.* (1999) ซึ่งศึกษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียพบว่า *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* และ *Staphylococcus* sp. ก็สามารถต้านทานต่อโลหะหนักและสารปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด กล่าวคือ *Staphylococcus* sp. ต้านทานต่อทั้งสารหนู นิกเกิล โครเมียมและโคบอลต์ในปริมาณสูง และต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ penicillin erythromycin และ tetracycline ส่วน *E. coli* ซึ่งต้านทานต่อสารหนูและโครเมียม จะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ampicillin cotrimoxazole ciprofloxacin และ tetracycline ได้ดี ในขณะที่ *Acinobacter* sp. และ *Flavobacterium* sp. ซึ่งต้านทานต่อแคดเมียม จะต้านทานสารปฏิชีวนะในกลุ่ม tetracycline และ ampicillin (Rajbanshi, 2008) อย่างไรก็ตามการต้านทานสารต่างๆ โดยปกติจุลินทรีย์มักมีกลไกที่ช่วยในการต้านทานสารต่างๆ ในกรณีของโลหะหนักแบคทีเรียสามารถต้านทานโดยอาจจะอาศัยกระบวนการจับของโลหะที่ผนังเซลล์ การรีดักชัน หรือกลไกการขับโลหะออกนอกเซลล์ เป็นต้น (Silver and Phung, 1996) จากลักษณะการต้านทานทั้งสารหนูและสารปฏิชีวนะดังกล่าวทำให้สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความหลากหลายได้ในเบื้องต้น โดยสามารถใช้โปรแกรมทางคณิตศาสตร์เข้ามาคำนวณเพื่อช่วยในการแบ่งกลุ่มได้ง่ายขึ้น

3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายโดยใช้อาศัยเทคนิค rep-PCR

จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูเบื้องต้น และคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนจากลักษณะการต้านทานสารปฏิชีวนะ ซึ่งได้แบคทีเรียตัวแทนมาใช้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้านทานสารหนูจำนวน 100 ไอโซเลต โดยใช้เทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล rep-PCR อาศัยการแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบนเจลของผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีชุดซ้ำๆ กัน ซึ่งจากผลการทดลองชี้ชัดว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้สามารถแยกชิ้นได้อย่างชัดเจน เมื่อพิจารณาตำแหน่งของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแต่ละแถบแล้วสามารถประเมินได้ว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้และนำมาศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค rep-PCR นี้ มีความหลากหลายค่อนข้างสูงมาก โดยเมื่อใช้โปรแกรมทางคณิตศาสตร์ในการวิเคราะห์ก็จะเห็นว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีระดับความคล้ายคลึงกันน้อยมาก โดยแบ่งออกเป็น 4

clusters ซึ่งในแต่ละ cluster มักประกอบด้วยแบคทีเรียตัวแทนที่แยกได้จากดินในบริเวณชุมชนเมือง คือ ตัวอย่างดิน AS1-AS6 โดยมีเพียงแค่ 10 ไอโซเลต ที่เป็นแบคทีเรียตัวแทนจากจากตัวอย่างดิน AS7 และ AS8 เท่านั้นที่ถูกจัดอยู่ใน dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้านทานสารหนู

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค rep-PCR เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ในการใช้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียได้ดีและค่อนข้างแม่นยำ ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคนี้ใช้ primer ที่มีความจำเพาะสูงในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณอนุรักษ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ กัน กระจายอยู่ทั้งจีโนม ซึ่งโดยปกติแล้วเทคนิคนี้มักนิยมใช้ในการระบุแหล่งที่มาของแบคทีเรียในสัตว์ เช่น การศึกษาแหล่งที่มาของเชื้อ *E. coli* ที่คัดแยกจากสัตว์ 7 ชนิด (หมู แพะ เป็ด และ ไก่ วัว และ ห่าน) และในมนุษย์ พบ *E. coli* ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 208 ไอโซเลต และเมื่อนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างกันระหว่าง *E. coli* ที่ได้จากมนุษย์และสัตว์ ด้วยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ BOX primer พบว่าเทคนิค rep-PCR สามารถระบุแหล่งที่มาของ *E. coli* ได้อย่างถูกต้อง (Dombek *et al.*, 2000) ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาแหล่งที่มาของ *E. coli* เพิ่มเติมในสัตว์ 12 ชนิด คือ หมู เป็ด ไก่ วัว และ แพะ สุนัข แมว ม้า ไก่ ห่าน และม้า (Bryan *et al.*, 2004) จะเห็นได้ว่าเทคนิค rep-PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการบอกความแตกต่างของ *E. coli* จากแหล่งที่มาที่แตกต่างกันเป็นอย่างดี ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการศึกษาแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนอื่นๆ ด้วย

ตัวอย่างเช่นการศึกษาแบคทีเรียในจากดินที่มีการปนเปื้อนสังกะสี ในชายฝั่งของรัฐ Colorado ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยเทคนิค rep-PCR โดยใช้ primer 3 ชนิด คือ BOX primer ERIC primer และ REP primer พบว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลด้วย BOX primer และ REP primer นั้นจะมีลักษณะเหมือนกัน ซึ่งแตกต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก ERIC primer ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก ERIC primer มีความจำเพาะสูงต่อแบคทีเรียพวก anaerobic thermophilic Fe(III)-reducing bacteria ซึ่งคัดแยกได้จากดินปนเปื้อนสังกะสี (Roh *et al.*, 2002) ดังนั้นการเลือกใช้ primer ในเทคนิค rep-PCR จึงถือว่าเป็นสิ่งจำเป็นต่อการศึกษาแบคทีเรีย ทั้งนี้ REP primer และ ERIC primer นิยมใช้ศึกษาจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Rhizobium* *Agrobacterium* และ *Pseudomonas* เป็นต้น (Spigaglia and Mastrantonio, 2003; Johnson *et al.*, 2004)

4. การศึกษาในด้านทฤษฎีของแบคทีเรียด้านทฤษฎี

การด้านทฤษฎีของแบคทีเรียเป็นกระบวนการที่พบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งอาศัยกระบวนการจับสารหนูอาร์เซนิตหรืออาร์เซไนต์ออกจากเซลล์โดยใช้พลังงานและถูกควบคุมด้วยยีนบน *ars operon* (Cervantes *et al.* 1994; Ji and Silver 1992a,b) ปัจจุบันมีการศึกษาและตรวจสอบยีนด้านทฤษฎี (*ars gene*) โดยใช้ตัวอย่างจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมเพื่อหาความสัมพันธ์ของการด้านทฤษฎีหรือความสามารถในการแปลงสารหนูของแบคทีเรีย (Anderson and Cook 2004; Jackson *et al.* 2003; Saltikov and Olson 2002) หรือการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการด้านทฤษฎีเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพในการบอกถึงการปนเปื้อนสารหนู (Sun *et al.* 2004) การศึกษาในด้านทฤษฎีของแบคทีเรียตัวแทนที่คัดแยกได้จากดินปนเปื้อนสารหนู สามารถทำได้โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ตรวจสอบการปรากฏของยีนด้านทฤษฎีและสามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายของยีนด้านทฤษฎี *arsC* บนโครโมโซมได้ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย (Cervantes *et al.*, 1994; Diorio *et al.*, 1995; Oremland *et al.* 2002) ทั้งนี้จากการศึกษาการปรากฏของยีนด้านทฤษฎี *arsC* ในการทดลองนี้ พบแบคทีเรียด้านทฤษฎีตัวแทนเพียง 30 ไอโซเลตที่ตรวจพบยีนด้านทฤษฎี *arsC* ที่มีขนาด 350 bp จากแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมด 100 ไอโซเลตที่ทำการศึกษา ซึ่งเมื่อพิจารณาความสามารถในการด้านทฤษฎีเทียบกับการปรากฏของยีนด้านทฤษฎี *arsC* ที่ตรวจสอบแล้ว จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่มีการตรวจสอบพบยีนด้านทฤษฎี *arsC* จะมีความสามารถในการด้านทฤษฎีได้เท่ากับแบคทีเรียที่ไม่มียีนด้านทฤษฎี ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในการทดลองไม่สามารถตรวจพบการปรากฏของยีน *arsC* ได้ด้วยไฟเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ กล่าวคือ ยีนด้านทฤษฎี *arsC* ที่พบในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามยีนด้านทฤษฎี *arsC* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน แต่จะทำหน้าที่เหมือนกันนั้นแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ *arsC*-couple Glutaredoxin/Glutathione, *arsC* couple -Thioredoxin และ *arsC*- couple Acp2 (Ji and Silver, 1992b; Mukhopadhyay *et al.*, 2002) ตัวอย่างเช่น *arsC* couple-Thioredoxin พบในแบคทีเรียพวก *Staphylococcus* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* (Ji and Silver, 1992b) สำหรับ *arsC*-Acp2 มักพบในพวกยูคาริโอต เช่น *Saccharomyces cerevisiae* (Mukhopadhyay *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยีนด้านทฤษฎี *arsC* อาจพบได้ 1 ชุด หรือมากกว่า 1 ชุดในโครโมโซมหรือพลาสมิดของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น พบยีนด้านทฤษฎี *arsC* จำนวน 3 ชุดบน *ars operon* ของ *Corynebacterium efficiens* YS-314 และบนพลาสมิดของ *Rhodococcus erythropolis* เป็นต้น (Ordernae *et al.*, 2005)

จากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนด้านทานสารหนู *arsC* ของแบคทีเรียทำให้การศึกษายีนดังกล่าวต้องใช้ความเฉพาะเจาะจงมากขึ้น ซึ่งจะต้องพิจารณาปัจจัยต่างๆ ที่ต้องใช้ทางเทคนิคในการทำ PCR เช่น การสกัดดีเอ็นเอ ชนิดของไพเมอร์ สารเคมีและการกำหนดอุณหภูมิเวลาและรอบในการปฏิกิริยา PCR รวมทั้งการระบุกลุ่มหรือชนิดของแบคทีเรียก่อนการศึกษายีนด้านทานสารหนูด้วยเทคนิค PCR น่าจะช่วยให้การตรวจสอบยีนนี้เป็นไปได้ง่ายและแม่นยำขึ้นเนื่องจากจะทำให้การเลือกใช้ไพเมอร์หรือการออกแบบไพเมอร์สำหรับการศึกษาทำได้สะดวกและแม่นยำในการตรวจสอบมากขึ้นนั่นเอง

5. การแปลงสารหนูและการวัดประสิทธิภาพการรีดักชันสารหนู

การศึกษาการแปลงรูปสารหนูด้วยเทคนิค agar plate screening assay ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่าง AgNO_3 กับสารหนู เป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็วเหมาะสำหรับการทดสอบการแปลงรูปสารหนูที่มีแบคทีเรียจำนวนมาก แม้ว่าวิธีนี้จะไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณของการแปลงรูปสารหนูได้ แต่ก็ยังเป็นวิธีพื้นฐานที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าวในจำนวนมาก สำหรับการตรวจสอบการแปลงรูปสารหนูด้วยเทคนิค microplate screening assay ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่าง AgNO_3 กับสารหนู เช่นเดียวกันแต่ทำในอาหารเหลว มีข้อเสียคือปฏิกิริยาการเกิดสีทันทีที่เกิดขึ้นระหว่าง AgNO_3 กับสารหนูเมื่อทำการเติม AgNO_3 ลงไป ทำให้ตรวจสอบการตกตะกอนของสีน้ำตาลแดงจากการออกซิไดซ์และสีเหลืองจากการรีดักชันได้ยาก หากแบคทีเรียเกิดการออกซิเดชันหรือรีดักชันในปริมาณต่ำ เนื่องจากจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีเพียง 1-2 วินาทีก่อนที่จะจางหายไป ดังนั้นการศึกษาศามารถในการแปลงรูปสารหนูด้วยเทคนิค agar plate screening assay จึงน่าจะเป็นวิธีคัดเลือกแบคทีเรียแปลงสารหนูได้ดีและง่ายกว่า โดยเฉพาะเมื่อทดสอบบนอาหาร CDM ดังเช่นการศึกษาของ Simonova *et al.* (2004) ที่ทำการศึกษาแบคทีเรียด้านทานสารหนู ซึ่งพบแบคทีเรียทั้งพวก arsenite oxidising bacteria และ arsenate reducing bacteria ซึ่งระบุได้เป็น Proteobacteria และพบทั้งพวก β -proteobacteria γ -proteobacteria และ α -proteobacteria ที่สามารถออกซิไดซ์สารหนูอาร์เซไนต์เป็นอาร์เซนดซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าได้ (Osborne and Enrlich, 1976; Weeger *et al.*, 1999; Oremland *et al.*, 2002; Abdrashitova *et al.*, 1985; Ilialetdinov *et al.*, 1981; Santini *et al.*, 2000)

จากการทดลองพบเพียงแบคทีเรียพวก arsenate reducing bacteria ที่สามารถรีดิวซ์อาร์เซนดเป็นอาร์เซไนต์ได้ ซึ่งจะวัดประสิทธิภาพการแปลงสารหนูด้วยวิธี molybdenum blue (Johnson and

Pilson, 1972) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณสารหนูโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารหนูอาร์เซนเตกับ molybdenum blue mix solution เกิดเป็นสารประกอบ arsenomolybdate ซึ่งทำให้สามารถวัดการดูดกลืนได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ข้อควรระวังในการใช้วิธีการนี้คือต้องระวังการปนเปื้อนของฟอสเฟตซึ่งเป็นธาตุที่คล้ายคลึงกับอาร์เซนเต และสามารถเกิดปฏิกิริยากับ molybdenum blue mix solution ได้ ซึ่งในการทดลองนี้ทำการกำจัดความผิดพลาดนี้โดยการใช้หลอดพลาสติกใหม่ ซึ่งไม่มีการปนเปื้อนฟอสฟอรัส และสำหรับเครื่องแก้วต้องผ่านการล้างด้วยกรดและน้ำกลั่น พร้อมอบแห้งก่อนใช้เสมอ

การวัดปริมาณสารหนูด้วยวิธี Molybdenum blue เป็นการวัดปริมาณสารหนูโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารหนูอาร์เซนเตกับ Molybdenum blue mix solution และต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้เป็น oxidized sample และ unoxidized sample ก่อน ซึ่งทำให้การคำนวณหาปริมาณอาร์เซไนต์จากกระบวนการรีดักชันไม่สามารถทำได้โดยตรง แต่ต้องคำนวณจากผลต่างระหว่าง oxidized sample และ unoxidized sample โดย unoxidized sample จะเป็นการวัดปริมาณสารหนู อาร์เซนเตที่คงเหลืออยู่ในตัวอย่างทั้งหมด ในขณะที่ oxidized sample จะเป็นการวัดปริมาณสารหนูรวมทั้งหมดซึ่งหมายถึงอาร์เซนเตที่คงเหลืออยู่ในตัวอย่างทั้งหมด รวมกับอาร์เซไนต์ที่ถูกออกซิไดซ์เป็นอาร์เซนเต ดังนั้นในการทดลองหากตัวอย่างถูกออกซิไดซ์ไม่หมด อาจทำให้ค่าที่ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ซึ่งส่งผลต่อปริมาณอาร์เซไนต์ที่คำนวณได้ด้วย นอกจากนี้สารหนูยังสามารถเกิดการระเหยกลายเป็นไอได้ในธรรมชาติจึงอาจทำให้มีการสูญเสียสารหนูตั้งต้นไปในระหว่างการทดลองหรือระหว่างการบ่มตัวอย่าง เป็นผลทำให้ปริมาณสารหนูรวมที่คำนวณได้ต่ำกว่าปริมาณสารหนูตั้งต้นที่ใส่ไปได้

นอกจากการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ที่ต้องระมัดระวังแล้ว การวัดประสิทธิภาพการแปลงสารหนูทั้งการออกซิเดชันและรีดักชัน ควรจะทำการเตรียมตัวอย่างและทดสอบในสภาวะที่เหมาะสมกับแบคทีเรียแต่ละชนิด เพื่อให้สามารถแปลงสารหนูได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาพแวดล้อมนั้นๆ และจะได้นำแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมต่อการบำบัดสารหนูต่อไป ดังเช่นการทดลองของ Srivastava *et al.* (2009) พบว่า *Pseudomonas* sp. DRBS1 มีประสิทธิภาพในการรีดักชันสารหนูคิดเป็น 97% ของสารหนูตั้งต้น เมื่อบ่มตัวอย่างใน Tris-HCl (pH 7.0) ที่มีสารหนูอาร์เซนเตตั้งต้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ *Pseudomonas* sp. DRBS1 จะมีประสิทธิภาพในการรีดักชันสารหนู มากขึ้นเมื่อบ่มในสภาวะที่มี selenate เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งในการทดลองได้มีการทดสอบสภาพแวดล้อมและอาหารที่เฉพาะเจาะจงในการทดลอง จึงทำให้ง่ายต่อการทดสอบการรีดักชัน แต่สำหรับการทดลองการรีดักชันสารหนูที่มีแบคทีเรียจำนวนมากถึง 95

ไอโซเลต ซึ่งไม่ได้ระบุชนิดของจุลินทรีย์มาก่อนนั้น ได้ทดลองโดยใช้สภาพแวดล้อมและอาหารที่แบคทีเรียทั้งหมดสามารถเจริญได้ดีที่สุดก่อนที่จะนำมาทดสอบการรีดักชัน และพบแบคทีเรีย 71 ไอโซเลต ที่สามารถวัดปริมาณสารหนูจากการรีดักชันได้ด้วยวิธีการนี้

นอกจากสภาพแวดล้อมและอาหารที่ใช้ในการทดลองแล้ว การเข้าใจกระบวนการของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการรีดักชันก็น่าจะช่วยให้การทดลองมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์โดยมากมักจะถูกกระตุ้นในสภาวะใดสภาวะหนึ่ง หรือกระตุ้นด้วยสารอาหารบางอย่าง สภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้ตรวจสอบไม่พบกิจกรรมที่ต้องการศึกษาได้ ตัวอย่างเช่น *Aeromonas* sp. และ *Exiguobacterium* sp. จะสามารถแปลงสารหนูอาร์เซเนตได้ เมื่อใช้อาร์เซเนตเป็นสารตั้งต้น 50 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งบ่มในอาหารที่เซลล์ต้องเจริญอยู่ในช่วงระยะ exponential (Anderson *et al.*, 2004) ทั้งนี้เอนไซม์ arsenate reductase จะถูกกระตุ้นให้ทำงานมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH 5.2 โดยเฉพาะเมื่อแบคทีเรียมีสารพวก citrate glucose galactose และมีโลหะบางชนิดอยู่ด้วย เช่น Cd^{2+} Cu^{2+} Ca^{2+} และ Fe^{2+} ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ (Srivastava *et al.*, 2009)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรีดักชันสารหนูส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* มีเพียงบางไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุลอื่น คือ *Enterobacter* และ *Ochrobactrum* จากการศึกษาของ Anderson and Cook (2004) พบแบคทีเรียด้านทานสารหนูพวก heterotroph ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Exiguobacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* และ *Acinetobacter* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียพวก γ -proteobacteria ในสกุล *Actinobacteria* และ *Flavobacteria* ส่วนใหญ่แล้วเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการด้านทานสารหนูซึ่งเกี่ยวข้องกับการแปลงสารหนูโดยกระบวนการรีดักชันอาร์เซเนต (arsenate reduction) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วมักเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้อาร์เซไนต์หรืออาร์เซเนตในกระบวนการหายใจ (Anderson and Cook, 2004; Matlakowska *et al.*, 2008; Salam *et al.*, 2009)

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะคัดแยกแบคทีเรียจากดินปนเปื้อนสารหนูในประเทศไทย เพื่อใช้ในการรีดักชันสารหนูและลดการปนเปื้อนของสารหนูจากบริเวณปนเปื้อน ซึ่งแม้ว่ากระบวนการนี้จะเป็นการเพิ่มความเป็นพิษของสารหนู แต่การรีดักชันสารหนูอาร์เซเนตเป็นอาร์เซไนต์นั้นสามารถเกิดการตกตะกอนกับโลหะอื่น ๆ ได้ง่ายกว่าทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและด่าง ซึ่ง

กระบวนการตกตะกอนถือเป็นการบำบัดสารพิษในน้ำได้วิธีหนึ่งและใช้ได้ดีกับโลหะหนักหลายชนิด เช่น *Klebsiella* เป็นแบคทีเรียที่ต้านทานแคดเมียมได้สูง โดยอาศัยกลไกการตกตะกอนแคดเมียมในรูปของแคดเมียมซัลไฟด์ (CdS) นั่นเอง (Sharma *et al.*, 2000) สำหรับสารหนูอาร์เซไนต์ที่เกิดจากกระบวนการรีดักชันโดยจุลินทรีย์นั้น สามารถเกิดการตกตะกอนได้กับซัลไฟด์ ซึ่งมักพบการตกตะกอนในรูป arsenic trisulfide (As_2S_3) ทั้งนี้แบคทีเรียในกลุ่ม dissimilatory arsenic-respiring bacteria เช่น *Desulfotomaculum auripigmentum* สามารถตกตะกอนสารหนูในรูป As_2S_3 ในสภาวะที่มีการรีดิวซ์ซัลเฟต (Newman *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *Shewanella* sp. HN-41 สามารถรีดิวซ์สารหนู และสร้างโครงสร้างพิเศษของ arsenic-sulfide (As-S) มีลักษณะเป็นท่อที่มีขนาดอนุภาคระดับนาโน โดยกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นเมื่อป้อนในอาหารที่มีอาร์เซเนต และ S_2O_3 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ (Lee *et al.*, 2007)

สรุป

การศึกษาโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยเก็บตัวอย่างดินจากเหมืองแร่เก่า ซึ่งตั้งอยู่บริเวณลุ่มน้ำห้วยมะขาม ในตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งจากการวิเคราะห์สมบัติของดินเบื้องต้นพบว่า ดินบริเวณนี้มีเนื้อดินเป็นดินร่วนถึงร่วนปนเหนียว และมี pH อยู่ในช่วง 5.5-8.5 ดินมีปริมาณอินทรีย์วัตถุต่ำถึงต่ำมาก สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารหนูพบสารหนูปริมาณตั้งแต่ 124-722 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนปริมาณธาตุโลหะอื่นๆ พบการปนเปื้อนของแคดเมียมและสังกะสีในปริมาณต่ำ โครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูถูกนำมาศึกษาโดยเทคนิค DGGE และพบว่าระดับความเข้มข้นของสารหนูที่สูงและต่ำไม่มีผลต่อความหลากหลายของโครงสร้างสังคมแบคทีเรียในดินโดยตรง แต่น่าจะขึ้นอยู่กับสมบัติอื่นๆ ด้วย อย่างไรก็ตามจากการศึกษาตัวแทนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่สนใจ พบเพียง *Arthrobacter* และ β -proteobacteria เป็นแบคทีเรียที่โดดเด่น

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินปนเปื้อนสารหนูและนำมาศึกษาจำนวน 262 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้ค่อนข้างมีความหลากหลายสูงมาก จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความหลากหลายโดยการศึกษาความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์เซนิตและอาร์เซไนต์ และสารปฏิชีวนะ 8 ชนิด ซึ่งพบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานสารหนูทั้ง 2 รูปได้ตั้งแต่ 10-1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดิน โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ต้านทานต่อสารหนูอาร์เซนิตได้มากกว่าสารหนูอาร์เซไนต์ ทั้งนี้เนื่องจากสารหนูอาร์เซนิตมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารหนูอาร์เซไนต์ เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการต้านทานสารหนูรวมกับการต้านทานสารปฏิชีวนะสามารถคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนที่ระดับความคล้ายคลึงสูงสุด 100% ได้ 100 ไอโซเลต และนำมาตรวจสอบการแยกตัวของแถบดีเอ็นเอบนเจลด้วยเทคนิค rep-PCR พบแบคทีเรียทั้งหมดมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมาก แสดงถึงความหลากหลายของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต เมื่อศึกษาอินที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานสารหนู *arsC* ด้วยเทคนิค PCR พบแบคทีเรียเพียง 30 ไอโซเลตจาก 100 ไอโซเลต ที่มีอินต้านทานสารหนู *arsC* ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความหลากหลายของอินต้านทานสารหนู *arsC* และไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาไม่สามารถใช้ได้กับแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมด และจากผลการทดลองด้วยเทคนิค rep-PCR ซึ่งชี้ถึงความหลากหลายของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต สำหรับการศึกษาการแปลงสารหนูของแบคทีเรียตัวแทน พบแบคทีเรีย 95 ไอโซเลต มีความสามารถแปลงสารหนูโดยการรีดักชันอาร์เซนิตเป็นอาร์เซไนต์ได้ แต่ไม่พบการออกซิไดซ์อาร์เซไนต์เป็นอาร์เซนิต ทั้งนี้เมื่อวัดปริมาณการรีดักชันอาร์เซนิต พบว่าแบคทีเรียเพียง 13 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์

อาร์เซนิตเป็นอาร์เซไนต์ (33-69 ไมโครโมลาร์) โดยเมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลต สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียอยู่ใน 3 สกุลคือ แบคทีเรีย 10 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ส่วนแบคทีเรียอีก 3 ไอโซเลต จัดอยู่ในสกุล *Enterobacter* และ *Ochrobactrum* ตามลำดับ



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษฎา ชูติมา. 2550. สารหนู, น. 17605-17609. ใน สารานุกรมไทยฉบับราชบัณฑิตยสถาน. เล่มที่ 27. กรุงเทพฯ.

กรมควบคุมมลพิษ. 2543. ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำใต้ดิน. แหล่งที่มา: http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water03.html, 15 กันยายน 2551.

_____. 2547ก. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท. แหล่งที่มา: http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water05.html#s2, 8 มิถุนายน 2553.

_____. 2547ข. ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดิน. แหล่งที่มา : http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water05.html#s3, 8 มิถุนายน 2553.

_____. 2547ค. ประกาศราชกิจจานุเบกษาตามคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน. แหล่งที่มา: http://infofile.pcd.go.th/law/9_1_soil.Pdf, 17 พฤศจิกายน 2551.

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 2539. ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม. แหล่งที่มา: http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water04.html#s1, 15 กันยายน 2551.

กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสุพรรณบุรี. 2553. รายงานฉบับ
สมบูรณ์โครงการประเมินความเสี่ยงและค่าความปลอดภัยของสารหนูในพื้นที่ อ.ด่านช้าง
จ.สุพรรณบุรี. แหล่งที่มา: [http://www.ertc.deqp.go.th/ertc/index.php?option=com_content
&Task=view&id=1096&Itemid=37](http://www.ertc.deqp.go.th/ertc/index.php?option=com_content&Task=view&id=1096&Itemid=37), 31 มีนาคม 2554.

กระทรวงสาธารณสุข. 2546. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 273 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มี
สารปนเปื้อน. แหล่งที่มา: http://www.shawpat.or.th/laws/health/460710_health039.pdf, 28
มกราคม 2554.

กรมทรัพยากรธรณี. 2549. สุพรรณบุรีพบสารหนูปนเปื้อน. แหล่งที่มา: [http://dmr.go.th/ewt
_news.php?nid=4619&filename=index](http://dmr.go.th/ewt_news.php?nid=4619&filename=index), 7 เมษายน 2550.

กองระบาดวิทยา. 2537. การศึกษาอัตราโรคพิษสารหนู ต. ร่อนพิบูลย์ จ. นครศรีธรรมราช. ใน
รายงานเบื้องต้นสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข และโรงพยาบาลหาดใหญ่ จ. สงขลา.
กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.

กองมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อม. 2530. รายงานการสำรวจสารหนูเป็นพิษ ที่ ต. ร่อนพิบูลย์ อ. ร่อน
พิบูลย์ จ. นครศรีธรรมราช. สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และการพลังงาน, กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2545. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัชชัย บุญทอง และ รัชฎา รุจิพัฒน์พงศ์. 2543. การศึกษาสถานการณ์การแพร่กระจายของสารหนู
อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช. สำนักงานธรณีเขต ฝ่ายสิ่งแวดล้อมทรัพยากร
ธรณี, สงขลา.

นันทฤทธิ์ โชคถาวร และ ไมตรี สุทธจิตต์. 2544. อันตรายและความเป็นพิษของสารหนู. ใน **ความรู้เกี่ยวกับสารพิษและวัตถุอันตราย**. ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แหล่งที่มา. http://webdb.dmssc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_2_001c.asp?info_id=121, 9 พฤศจิกายน 2553.

มาลินี ลิ้มโกคา. 2541. **ยาต้านจุลชีพ**. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

วิโรจน์ บุญอำนวยวิทยา และ นิติชัย ขำมาลัย. 2004. สารหนูกับสิ่งแวดล้อม. ใน **ปราชญ์ พัฒนพิพิธ** ไพศาล, ผู้รวบรวม. **การปนเปื้อนสารหนูในน้ำใต้ดินเขตลุ่มแม่น้ำโขงตอนล่าง**. แหล่งที่มา: <http://www.lib.ubu.ac.th/jdb/jubon/pdfjubon/jubon-2008-10-02.27-39.pdf>, 10 กุมภาพันธ์ 2551.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2539. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Abdrashitova, S.A., G.G. Abdullina and A.N. Ilialetdinov. 1985. Glucose consumption and hydrogenase activity of the cells of the arsenite-oxidizing bacterium *Pseudomonas putida*. **Mikrobiol.** 54: 679-81.

Afkar, E., J. Lisak, C. Saltikov, P. Basu, R.S. Oremland and J.F. Stolz. 2003. The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. **FEMS Microbiol. Lett.** 226: 107-112.

Agely A.A., D.M. Sylvia and Q.M. Lena. 2005. Mycorrhiza increase arsenic uptake by the Hyperaccumulator Chinese Brake Fern (*Pteris vittata*). **Environ. J.** 34: 2181-2186.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. **Toxicological profile for arsenic (update)**. Available source: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-2.pdf>, November 02, 2010.

- Aka, H. and C. Darici. 2004. Carbon and nitrogen mineralization of lead treated soils in eastern Mediterranean region. **Soil Sediment Contam.** 13: 255-265.
- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. **Environ. Sci. Technol.** 34: 4259-4265.
- Amacher, M.C. 1996. Nickel, cadmium and lead, pp. 739-768. In D.L. Spark, ed. **Method of Soil Analysis. Part 3.** Madison, Wisconsin.
- Anderson, C.R. and G.M. Cook. 2004. Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites of New Zealand. **Curr. Microbiol.** 48:341-347.
- Anderson, G.L., J. Williams and R. Hille. 1992. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. **J. Biol. Chem.** 267: 23674-23682.
- _____, P.J. Ellis, P. Kuhn and R. Hille. 2001. Oxidation of arsenite by *Alcaligenes faecalis*. pp. 343-362. In M. Dekker, ed. **Environmental Chemistry of Arsenic.** New York, USA.
- Amann, R., W. Ludwig and K. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.** 59: 143-169.
- Ashraf, R. and T.A. Ali. 2007. Effect of heavy metals on soil microbial community and Mung beans seed germination. **Pak. J. Bot.** 39: 629-636.
- Bååth, E., A. Frostegård and H. Fritze. 1992. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 4026-4031.

- Baker, G.C. and D.A. Cowan. 2004. 16S rDNA primers and the unbiased assessment of thermophile diversity. **Biochem. Soc. Trans.** 32:218-221.
- Balasoieu, C., G. Zagury and L. Deshenes. 2001. Partitioning and speciation of chromium, copper and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. **Sci. Total Environ.** 280: 239-255.
- Barrachina, A.C., F.B. Carbonell and J.M. Beneyto. 1995. Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants-effect of arsenite on plant growth and yield. **J. Plant Nutri.** 18: 1237-1250.
- Baur, W.H. and Onishi B.M.H. 1969. Arsenic, pp. 33. In K.H. Wedepohl, ed. **Handbook of Geochemistry**. Springer-Verlag, Berlin.
- Becker, J.M., T. Parkin, H.N. Cindy, D.W. Jayson and A. Konopka. 2006. Bacterial activity, community structure and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil. **Microb. Ecol.** 51: 220-231.
- Benavides, A.M. 2007. **The Effect of Arsenic Speciation on Arsenic Uptake and Fate in the Presence of the Hyper-accumulating Species *Pteris cretica***. M.S. Thesis, University of Pittsburgh, USA.
- Bentley, R. and T.G. Chasteen. 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 66: 250-271.
- Berg, M., W. Giger, T.H. Con, P.H. Viet, P.T.K. Trang and R. Schertenleib. 2006. **Extent and Severity of Arsenic Pollution in Vietnam and Cambodia in Managing Arsenic in the Environment: from Soil to Human Health**. CSIRO, Melbourne.

- Blair, P.C., M.B. Thompson, M. Bechtold, R.E. Wilson and F.B.A. Moorman. 1990. Evidence for oxidative damage to red blood cells in mice induced by arsine gas. **Toxicol.** 63: 25-34.
- Boyle, R.W. and I.R. Jonasson. 1973. The geochemistry of As and its use as an indicator element in geochemical prospecting. **J. Geochem. Explor.** 2: 251-296.
- Bryan, A., N. Shapir and M.J. Sadowsky. 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 2503-2507.
- Buchet, J.P. and R. Lauwerys. 1981. Evaluation of exposure to inorganic arsenic in man, pp. 75-89. In S. Facchetti, ed. **Analytical Techniques for Heavy Metals in Biological Fluids**. Elsevier, Amsterdam.
- Butcher, B.G. and D.E. Rawlings. 2002. The divergent chromosomal *ars* operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. **Microbiol.** 148: 3983-3992.
- Cervantes, C., G. Ji, J.L. Ramirez and S. Silver. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. **Microbiol. Rev.** 15: 355-367.
- Chander, K., P.C. Brookes and S.A. Hardin. 1995. Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched biosolids to a sandy loam. **Soil Biol. Biochem.** 27: 1409-1421.
- Chang, J. S., Y.H. Kim, and K.W. Kim. 2008. The *ars* genotype characterization of arsenic-resistant bacteria from arsenic-contaminated gold-silver mines in the Republic of Korea. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 80: 155-165.

- Chen, C., T. Misra, S. Silver and B. Rosen. 1986. Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump; The plasmid-encoded arsenical resistance operon. **J. Biol. Chem.** 261: 15030-15038.
- Chen, Y. and B.P. Rosen. 1997. Metalloregulatory properties of the ArsD repressor. **J. Biol. Chem.** 272: 14257-14262.
- Cindy, H.N., V. Torsvik and L. Øvreås. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. **Soil Sci. Soc. Amer. J.** 64: 1382-1388.
- Cullen, W.R. and K.J Reimer. 1989. Arsenic speciation in the environment. **Chem. Rev.** 89: 713-764.
- Da Costa, E.W.B. 1972. Variation in the toxicity of arsenic compounds to microorganisms and the suppression of the inhibitory effects of phosphate. **Appl. Environ. Microbiol.** 23: 46-53.
- Day, P.R. 1965. Particle fractionation and particle size analysis, pp. 545-567. In C.A. Black, ed. **Methods of Soil Analysis Part I.** Agronomy, No. 9. Soc. of Agron. Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- De Bruijn, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 2180-2187.
- De Koe, T. and N.M.M. Jacques. 1993. Arsenate tolerance in *Agrostis castellana* and *Agrostis delicatula*. **Plant and Soil** 151: 185-191.

- Diorio, C., J. Cai, J. Marmor, R. Shinder and M.S. DuBow. 1995. An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in Gram-negative bacteria. **J. Bacteriol.** 177: 2050-2056.
- Dombek, P.E., L.K. Johnson, S.T. Zimmerley and M.J. Sadowsky. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2572-2577.
- Emsley, J. 2001. **Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements.** Oxford University Press, UK.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2004. **Arsenic treatment technologies for soil, waste and water**, Available Source: [http://www. Epa.gov/tioclu-in.org/arsenic](http://www.Epa.gov/tioclu-in.org/arsenic), February 08, 2008.
- Felske, A., B. Engelen, U. Nubel and H. Backhaus. 1996. Direct ribosomal isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 4162-4167.
- Filali, B.K., J. Taoufik, Y. Zeroual, F.A.Z. Dzairi, M. Talbi and M. Blaghen 1999. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. **Curr. Microbiol.** 41: 151-156.
- Fleet, M.E. and A.H. Mumin. 1997. Gold-bearing arsenian pyrite and marcasite and arsenopyrite from Carlin Trend gold deposits and laboratory synthesis. **Am. Mineral.** 82: 182-193.
- Francesconi, K.A. and J.S. Edmonds. 1998. Arsenic species in marine samples. **Croatica Chemica. Acta.** 71: 343-359.
- Gans, J., M. Wolinsky and J. Dunbar. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Sci.** 309:1387-1390.

- Gebel, T. 2000. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. **Toxicol.** 144: 155-162.
- Gihring, T.M. and J.F. Banfield. 2001. Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. **FEMS Microbiol. Lett.** 202: 335-340.
- Gihring, T.M., G.K. Druschel, R.B. McCleskey, R.J. Hammers and J.F. Banfield. 2001. Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: Field and laboratory investigations. **Environ. Sci. Tech.** 35: 3857-3862.
- Giller, K.E., E. Witter and S.P. McGrath. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biol. Biochem.** 30: 1389-1414.
- Gilson, R., J. M. Clement, D. Brutlag and M. Hofnung. 1984. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **EMBO J.** 3: 1417-1421.
- Grafe M., M.J. Eick, P.R. Grossl and A.M. Saunders. 2002. Adsorption of arsenate and arsenite on ferrihydrite in the presence and absence of dissolved organic carbon. **J. Environ. Qual.** 31: 1115-1123.
- Guyol, N., S.C. Jain and U.C. Banerjee. 2003. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. **Adv. Environ. Res.** 7: 311-319.
- Helmer, R. and I. Hespanhol. 1997. **Water pollution control: A guide to the use of water quality management principles.** Available source: http://www.who.int/water_sanitation_health/, January 10, 2010.

- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla and E.M.H. Wellington. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoretic separation in denaturing gradients. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3233-3241.
- Hiroki, M. 1992. Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. **Soil Sci. Plant Nutri.** 38: 141-147.
- _____. 1993. Effect of arsenic pollution on soil microbial population. **Soil Sci. Plant Nutri.** 39: 227-235.
- Hossain, F., A.C. Bagtzoglou, N. Nahar and M.D. Hossain. 2005. Statistical characterization of arsenic contamination in shallow tube wells of western Bangladesh. **Hydrol. Proc.** 20: 1497-1510.
- Huber, R., M. Sacher, A. Vollmann, H. Huber and D. Rose. 2000. Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea. **Syst. Appl. Microbiol.** 23: 305-314.
- Hulton, C.S.J., C.F. Higgins and P.M. Sharp. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Mol. Microbiol.** 5: 825-834.
- Ilialetdinov, A.N. and S.A. Abdrashitova. 1981. Autotropic oxidation of arsenic by *Pseudomonas arsenitoxidans*. **Mikrobiol.** 50: 197-204.
- Insam, H., T.C. Hutchinson and H.H. Reber. 1996. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. **Soil Biol. Biochem.** 28: 691-694.

Integrated Risk Information System (IRIS). 1994. **Carcinogenicity assessment for lifetime exposure to cinnamati**. Available source: <http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/subst/0278.htm#I.B.>, January 01, 2008.

Jackson, C.R. and S.L. Dugas. 2003. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient. **BMC Evol. Biol.** 3: 18.

_____, E.F. Jackson, S.L. Dugas, K. Gamble and S.E. Williams. 2003. Microbial transformation of arsenite and arsenate in natural environment. **Recent Res. Developments in Microbiol.** 7: 103-118.

Jain, C.K. and I. Ali. 2000. Arsenic: Occurrence, Toxicity and Speciation Techniques. Cited by M.B. Jenkins, P.G. Hartel, T.J. Olexa and J.A. Stuedemann. Putative temporal variability of *Escherichia coli* ribotypes from yearling steers. **J. Environ. Qual.** 32: 305-309.

Ji, G. and S. Silver. 1992a. Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid p1258. **J. Bacteriol.** 174: 3684-3694.

_____ and _____. 1992b. Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid p1258. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89: 7974-7978.

Johnson, D.L. 1971. Simultaneous determination of arsenate and phosphate in natural waters. **Environ. Sci. Technol.** 5:411-414.

Johnson, D. and M. Pilson, M. 1972. Spectrophotometer determination of arsenite, arsenate and phosphate in natural waters. **Anal. Chim. Acta.** 58: 289-299.

- Johnson, L.K., M.B. Brown, E.A Carruthers, J.A. Ferguson, P.E. Dombek and M.J. Sadowsky. 2004. Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence Accuracy of determining sources of fecal pollution. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 4478-4485.
- Jordan, M.J. and M.P. LeChavelier. 1975. Effects of zinc-smelter emissions on forest soil microflora. **Can. J. Microbiol.** 21: 1855-1865.
- Judd, A.K., M. Schneider, M.J. Sadowsky and F.J. De Bruijn. 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1702-1708.
- Kao, P.H., C.C. Huang and Z.Y. Hseu. 2006. Response of microbial activities to heavy metals in a neutral loamy soil treated with biosolid. **Chemosphere.** 64: 63-70.
- Khan, M. and J. Scullion. 2002. Effect of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. **Appl. Soil Ecol.** 20: 145-155.
- Kilmer, V.J. and L.T. Alexander. 1949. Method of making mechanical analysis of soils. **Soil Sci.** 68: 15-24.
- Klappenbach, J.A., P.R. Saxman, J.R. Cole and T.M. Schmidt. 2001. The ribosomal RNA operon copy number database. **Nucleic Acids Res.** 29:181-184.
- Kowalchuk, G.A., J.R. Stephen, W. De Boer, J.I. Prosser, T.M. Embley and J.W. Woldendorp. 1997. Analysis of ammoniaoxidizing bacteria of the subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR amplified 16S ribosomal DNA fragments. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1489-1497.

- Krafft, T. and J.M. Macy. 1998. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. **European J. Biochem.** 255: 647-653.
- Krumova, K., M. Nikolovska, V. Groudeva. 2008. Isolation and identification of arsenic-transforming bacteria from arsenic contaminated sites in Bulgaria. **Bio. Biotech.** 721-728.
- Kuperman, R.G. and M.M. Carreiro. 1997. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. **Soil Biol. Biochem.** 29: 179-190.
- Laboratory for Microbial Ecology. 2004 . **Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)**. Department of Earth, Ecological and Environmental Sciences, University of Toledo.
- Lagerkvist, B.J. and B. Zetterlund. 1994. Assessment of exposure to arsenic among smelter workers: A five-year follow-up. **Amer. J. Indus. Medic.** 25: 477-488.
- Lee, J.H., Y. Roh, K.W. Kim and H.G. Hur. 2007. Organic Acid-Dependent Iron Mineral formation by a newly isolated iron-reducing bacterium, *Shewanella* sp. HN-41. **Geomicrobiol. J.** 24: 31-41.
- Leonard, A. 1991. Arsenic, pp. 751-772. In E. Merian, ed. **Metals and Their Compounds in the Environment**. VCH, Weinheim.
- Macnair, M.R. and Q. Cumbes. 1987. Evidence that arsenic tolerance in *Holcus lanatus* L. is caused by an altered phosphate uptake system. **New Phytologist.** 107: 387-394.
- Macy, J.M. and J.M. Santini. 2002. Unique modes of arsenate respiration by *Chrysiogenes arsenatis* and *Desulfotomaculum* sp. Str. BEN-RB, pp. 297-312. In .T. Frankenberger, ed. **Environmental Chemistry of Arsenic**. Marcel Dekker, New York.

- Macy, J.M. and J.M. Santini. B.V. Pauling, A.H. O'Neill and L.I. Sly. 2000. Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. **Archive. Microbiol.** 173: 49-57.
- Mandal, B.K. and K.T. Suzuki. 2002. Arsenic round the world: a review. **Talanta.** 58: 201-235.
- Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, R. Hakenbeck, D.A. Morrison, G.J. Boulnois and J.P. Claverys. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.** 20: 3479-3483.
- Masscheleyn, P.H., R.D. Delaune and W.H. Patrick. 1991. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. **Environ. Sci. Technol.** 25: 1414-1419.
- McGeehan, S.L. 1996. Arsenic sorption and redox reactions: relevance to transport and remediation. **Environ. Sci. Heal.** 31: 2319-2336.
- Meharg, A.A. 1994. Integrated tolerance mechanisms - constitutive and adaptive plant- responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant Cell Environ.** 17: 989-993.
- _____ and J.H. Whitaker. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist.** 154: 29-43.
- _____ and M.R. Macnair. 1992. Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcuslanatus* L. **J. Experiment Botany.** 43: 519-524.

- Morases, S.R., R.B. Goncalves, C. Mouton, L. Seldin, M.C.S. Ferreira and R.M.C.P. Domingues. 2000. Use of rep-PCR to define genetic relatedness among *Bacteroides fragilis* strains. **J. Med. Microbiol.** 49: 279-284.
- Moyer, C.L., F.C. Dobbs and D.M. Karl. 1995. Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1555-1562.
- Muller, D., D. Lievremon, D.D. Simeonova, J.C. Hubert and M.C. Lett. 2003. Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant α -proteobacterium. **J. Bacteriol.** 185: 135-141.
- Mukhopadhyay, R., B.P. Rosen, L. Phung and S. Silver. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. **FEMS Microbiol. Rev.** 26: 311-325.
- Murray, P., Y. Ge and W.H. Hendershot. 2000. Evaluating three trace metal contaminated sites: a field and laboratory investigation. **Environ. Pollut.** 107: 127-135.
- Muyzer, G., A. Teske, C.O. Wirsen and H.W. Jannasch. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deepsea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Arch. Microbiol.** 164: 165-171.
- _____, E.C. De Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 695-700.
- _____ and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology. **Antonie Leeuwenhoek.** 73:127-141.

- Muyzer, G., S. Hottentrager, A. Teske and C. Wawer. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA -A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities, pp. 1-23. In A.D.L. Akkermans, J.D. Van Elsas and F.J. De Bruijn, eds. **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer
- Myers, R.M., S.G. Fischer, L.S. Lerman and T. Maniatis. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Res.** 13: 3131-3145.
- _____, T. Maniatis and L.S. Lerman. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods Enzymol.** 155: 501-527.
- Nakatsu, C.H. 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel Electrophoresis. **SSSAJ.** 71: 562-571.
- Nelson, D.W. and L.E. Sommers. 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter, pp. 539-577. In A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, eds. **Methods of Soil Analysis, Part 2**. Madison, Wisconsin.
- Newman, D.K., T.J. Beveridge and F.M.M. Morel. 1997. Precipitation of As₂S₃ by a novel As(V)-reducing bacterium, strain OREX-4. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 2022-2028.
- Niggemyer, A., S. Spring, E. Stackebrandt and R.F. Rosenzweig. 2001. Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and genus *Desulfitobacterium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 5568-5580.
- Nriagu, J.O. 2001. Arsenic poisoning through the ages, pp. 1-26. In W.T. Frankenberger, ed. **Environmental Chemistry of Arsenic**. Marcel Dekker, New York.

- Nriagu, J.O. and J.M. Pacyna. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. **Nature** 333: 134-139.
- Nubel, U., P.F. Garcia and G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3327-3332.
- Oden, K.L., T.B. Gladysheva and B. P. Rosen. 1994. Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione. **Mol. Microbiol.** 12: 301-306.
- Oliveira, A. and M.E. Pumpulha. 2006. Effect of long term heavy metal contamination on soil microbial characteristic. **Biosci. Bioeng.** 102:157-161.
- Onishi, H. and E.B. Sandell. 1995. Geochemistry of arsenic. **Geochim. Cosmochim. Acta.** 7: 1-33.
- Oremland, R.S., P.R. Dowdle, S. Hoefft, J.O. Sharp, J.K. Schaefer, L.G Miller., J.S. Blum, R.L. Smith, N.S. Bloom and D. Wallschlaeger. 2000. Bacterial dissimilatory reduction of arsenate and sulfate in meromictic Mono Lake, California. **Geochim. Cosmochim. Acta.** 64: 3073-3084.
- Oremland, S.E. Hoefft, J.M. Santini, N. Bano, R.A. Hollibaugh and J.T. Hollibaugh. 2002. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by facultative arsenite-oxidizing chemoautotroph strain MLHE-1. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 4795-4802.
- Osborne, F.H. and H.L. Enrich. 1976. Oxidation of arsenite by a soil isolate of *Alcaligenes*. **J. Appl. Bacteriol.** 41: 295-305.

- Othmer, K. 2004. **Antibiotics (Phenazines) To Bleaching Agents**. In Encyclopedia of Chemical Technology. 3rd Vol. 3, John Wiley & Sons. Available source: <http://www.eng.fsu.edu/departments/civil/research/arsenicremedia/ARSENIC%20CHEMISTRY.DOC>, November 5, 2004.
- Paliouris, G. and T.C. Hutchinson. 1991. Arsenic, cobalt and nickel tolerances in two populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke from Ontario, Canada. **New Phytologist** 117: 449-459.
- Peijnenburg, W.J.G.M., L. Posthuma, H.J.P. Eijsackers and H.E. Allen. 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. **Ecotoxicol. Environ. Safety**. 37: 163-172.
- Pichler, T., J. Veizer, G.E.M. Hall. 1999. Natural input of arsenic into a coral reef ecosystem by hydrothermal fluids and its removal by Fe (III) oxyhydroxides. **Environ. Sci. Technol.** 33: 1373-1378.
- Polemio, M., N. Senesi and S.A. Bufo. 1982. Soil contamination by metals: A survey in industrial and rural areas of Southern Italy. **Sci. Tot. Environ.** 25: 71-79.
- Pollard, A. 1980. Diversity of metal tolerances in *Plantago lanceolata* L. from the southeastern United States. **New Phytologist**. 86: 109-117.
- Pongratz, R. 1998. Arsenic speciation in environmental samples of contaminated soil. **Sci. Tot. Environ.** 224: 133-141.
- Rajbanshi, A. 2008. Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment plant. **Nature**. 6: 52-57.

- Rathinasabapathi, B., L. Ma and M. Srivastava. 2006. Arsenic hyperaccumulating ferns and their application to phytoremediation of arsenic contaminated sites, pp. 304-311. In A. Jaime and T. Silva, eds. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. Global science book, UK.
- Rocovich, S. and D. West. 1975. Arsenic tolerance in a population of the grass *Andropogon scoparius* Michx. **Sci.** 188: 263-264.
- Roh, Y., S.V. Liu, G. Li, H. Huang, T.J. Phelps and J. Zhou. 2002. Isolation and Characterization of Metal-Reducing *Thermoanaerobacter* Strains from Deep Subsurface Environments of the Piceance Basin, Colorado. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 6013-6020.
- Rosen, B.P. 1999. Families of arsenic transporters. **Trends Microbiol.** 7: 207-212.
- Roy, P. and A. Saha. 2002. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. **Curr. Sci.** 82: 38-45.
- Ryan, D. and E. Colleran. 2002. Arsenical resistance in the IncHI2 plasmids. **Plasmid.** 47: 234-240.
- Sadiq, M. 1997. Arsenic chemistry in soils: An overview of thermodynamic predictions and field observations. **Water, Air and Soil Pollut.** 93: 117-136.
- Sadowsky, M.J. and H.G. Hur. 1998. Use of endogenous repeated sequences to fingerprint bacterial genomic DNA, pp. 399-413. In J.R. Lupski, G. Weinstock and F.J. De Bruijn, eds. **Bacterial Genomes: Structure and Analysis**. Chapman and Hall, New York.
- Saha, J.C., A.K. Dikshit, M. Bandyopadhyay and K.C. Saha. 1999. A review of arsenic poisoning and its effects on human health. **Cri. Rev. Environ. Sci. Technol.** 29: 281-313.

- Saha, J.C. and K.C. 2003. Diagnosis of arsenicosis: Part A. Toxic/hazardous substances and environmental engineering. **J. Environ. Sci. Heal.** 38: 255-272.
- Sajjaphan, K., P. Heepngoen and M.J. Sadowsky. 2010. *Arthrobacter sp.* strain KU 001 isolated from a Thai soil degrades atrazine in the presence of inorganic nitrogen sources. **J. Microbiol. Biotechnol.** 20:602-608.
- Salam, M.A., M.S. Hossain, M.E Ali, M.A. Asad and M.H. Ali. 2009. Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from different environment in South-West region of Bangladesh. **Res. J. Environ. Sci.** 3:110-115.
- Saltikov, C.W., A. Cifuentes, K. Venkateswaran and D.K. Newman. 2003. The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 2800-2809.
- _____ and B.H. Olson. 2002. Homology of *Escherichia coli* R773 *arsA*, *arsB*, and *arsC* genes in arsenic-resistant bacteria isolated from raw sewage and arsenic-enriched creek waters. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 280-288.
- _____ and D.K. Newman. 2003. Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 100: 10983-10988.
- Santegoeds C.M., G. Muyzer and D. De Beer. 1997. Successional processes in a bacterial biofilm determined with microsensors and molecular techniques, pp. 77. **In Proceedings International Symposium Environmental Biotechnology.**

- Santini, J.M., L.I. Sly, R.D. Schangl and J.M. Macy. 2000. A new hemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: Phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 92-97.
- _____ and R.N. Vanden Hoven. 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. **J. Bacteriol.** 186: 1614-1619.
- Sato, T. and Y. Kobayashi. 1998. The *ars* operon in the *skin* element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. **J. Bacteriol.** 180: 1655-1661.
- Schmoger, M.E.V., M. Oven and E. Grill. 2000. Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants. **Plant Physiol.** 122: 793-801.
- Sehlin, H.M. and B.E. Lindstrom. 1992. Oxidation and reduction of arsenic by *Sulfolobus acidocaldarius* strain BC. **FEMS Microbiol. Lett.** 93: 87-92
- Sharples, J.M., A.A. Meharg, S.M. Chambers and J.W.G. Cairney. 2000. Mechanism of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. **Plant Physiol.** 124: 1327-1334.
- Sharples, G.J. and R.G. Lloyd. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Res.** 18: 6503-6508.
- Sharma, K.P., A. Frenkel and L.D. Balkwill 2000. A new *Klebsiella planticola* strain (cd-1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulphide. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3083-3087.
- Sheffield, V.C., D.R. Cox and R.M. Myers. 1989. Attachment of a 40bp G+C rich sequence (GCclamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single base changes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 232-236.

Shih, M.C. 2005. An overview of arsenic removal by pressure-driven membrane processes.

Desalinat. 172: 85-97.

Silver, S. and L.T. Phung. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annu. Rev.**

Microbiol. 50: 753-789.

_____ and _____. 2005. Minireview: Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 599-608.

_____, _____ and B. Rosen. 2002. Arsenic metabolism: resistance, reduction and oxidation. pp. 247-272. *In* W.T. Frankenberger, ed. **Environmental Chemistry of Arsenic.** Marcel Dekker, New York.

Simeonova, D.D. 2004. **Arsenic Oxidation of *Cenibacterium arsenoxidans*: Potential Application in Bioremediation of Arsenic Contaminated Water.** M.S. thesis, University of Louis Pasteur, France.

Smedley, P.L. and D.G. Kinniburgh. 2002. A review of source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. **Appli. Geochem.** 17: 517-568.

Soil Survey Staff. 2010. **Keys to Soil Taxonomy.** 11th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service. Washington, DC.

Spigaglia, P. and P. Mastrantonio. 2003. Evaluation of repetitive extragenic palindromic-PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. **J. Clinical Microbiol.** 41: 2454-2457.

Srivastava, D., D. Madamwar and R.B. Subramanian. 2009. Pentavalent arsenate reductase activity in cytosolic fractions of *Pseudomonas* sp., isolated from arsenic-contaminated sites of Tezpur, Assam. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162: 776-779.

- Stern, M.J., G. F.L. Ames, N.H. Smith, E.C. Robinson and C.F. Higgins. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**. 37: 1015-1026.
- Stewart, J.W.B. and J.R. Bettany. 1982. Mercury. pp. 367-384. In A.L. Page, ed. **Methods of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological Properties**, 2nd ed. Soil Science Society of America Inc., Wisconsin, WI.
- Stewart, F.H. 1963. **Data of Geochemistry**. University of California, Sandiage, USA.
- Stolz, J.F., P. Basu, J.M. Santiniand and R.S. Oremland. 2006. Arsenic and Serenium in Microbial Metabolism. **Annu. Rev. Microbiol.** 60: 107-130.
- Styblo M., L.M. Del Razo, E.L. LeCluyse, G.A. Hamilton, C. Wang and W.R. Cullen. 1999. Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes. **Chem. Res. Toxicol.** 12:560-565.
- Su, C. 2004. **Regulation of a Novel *ars* Gene Cluster in *Sinorhizobium* sp.** M.S. Thesis, University of Wollongong.
- Sun, H.Y., S.P. Deng, and W.R. Raun. 2004. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. **Appl. Environ. Microbiol.** 70:5868-5874.
- Switzer B.J., A.B. Bindi, J. Buzzeli, J.F. Stolz and R.S Oremland. 1998. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono-Lake California that respire oxyanions of selenium and arsenic. **Arch. Microbiol.** 171: 19-30.
- Tamaki, S. and W. Frankenberger. 1992. Environmental biochemistry of arsenic. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** 124: 79-110.

- Tabatabai, M.A. 1977. Effects of trace elements on urease activity in soils. **Soil Biol. Biochem.** 9: 9-13.
- Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer and N.B. Ramsing. 1996. Distribution of sulfatereducing bacteria in a stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most probable number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified ribosomal DNA fragments. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1405-1415.
- Torsvik, V., F. Daae, R.A. Sandaa, L. Ovreås. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **J. Biotech.** 64: 53-62.
- _____, R. Sorheim and J. Goksoyr. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities: A review. **J. Ind. Microbiol.** 17:170-178.
- Van Elsas, J.D. and L.S. Van Overbeek. 1993. Bacterial responses to soil stimuli, pp. 55-79. *In* S. Kjelleberg, ed. **Starvation in Bacteria**. Plenum Press, New York.
- Vance, D.W. 2001. **Arsenic-chemical behavior and treatment**. Available Source : <http://2the4.net/arsenicart.html>, October 10, 2008.
- Versalovic, J., T. Koeuth and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.** 19: 6823-6831.
- _____, M. Schneider, F.J. De Brulin and J.R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell. Biol.** 5: 25-40.
- Vig, M., M. Megharaj, N. Sethunathan and R. Naidu. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. **Adv. Environ. Res.** 8: 121-135.

- Viraraghavan, T., K.S. Subramanian and K.S. Aruldoss. 1999. Arsenic in drinking water problems and solutions. **Water Sci. Technol.** 40: 69-76.
- Visoottiviseth, P., K. Francesconi and W. Sridokchan. 2002. **Environ. Pollut.** 118: 453-461.
- Wawer, C. and G. Muyzer. 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 2203-2210.
- Wells, B. and J. Gilmour. 1977. Sterility in rice cultivars as influenced by MSMA rate and water management. **Agro. J.** 69: 451-454.
- Weeger W., D. Lievremont, M.L. Perret, J.C. Fagarde, M. Hubert and M.C. Lett. 1999. Oxidation of arsenite to arsenate by bacteria isolation from an aquatic environment. **Bio. Metals.** 12: 141-149.
- Williams, M. 1997. **Mining-related Arsenic Hazards: Thailand Case-study.** Summary Report. Brit. Geol. Surv. Tech. Rep., WC/97/49.
- Williams, M., F. Fordyce, A. Pajitprapapon and P. Charoenchaisri. 1996. Arsenic contamination in surface drainage and groundwater in part of the southeast Asian tin belt, Nakhon Si Thammarat Province, southern Thailand. **Environ. Geol.** 27: 16-33.
- Willsky, G.R. and M.H. Malamy. 1980. Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 144: 366-374.
- World Health Organization (WHO). 1981. **Arsenic Environment health criteria.** Available source: <http://www.who.int/peh-emf/standards/en/>, December 19, 2010.
- _____. 2000. Arsenic, pp. 1-14. In **WHO Regional Office for Europe: Air Quality Guidelines.** 2nd ed. Copenhagen, Denmark.

- World Health Organization (WHO). 2008. Guideline for drinking water quality. **Available source:** http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf, November 19, 2008.
- Woolson, E.A. 1977. Fate of arsenicals in different environmental substrates. **Environ. Heal. Persp.** 19: 73-81.
- Wu, J. and B.P. Rosen. 1993. Metalloregulated expression of the *ars* operon. **J. Biol. Chem.** 268: 52-58.
- _____, R. Zhang and R. Lilley. 2002. Methylation of arsenic in vitro by cell (*Agrostis tenuis*): effect of acute exposure of plants to arsenate. **Functional Plant Biology** 29: 73-80.
- Yamamura, S., M. Ike and M. Fujita. 2003. Dissimilatory arsenate reduction by a facultative anaerobe, *Bacillus* sp. strain SF-1. **J. Biosci. Bioengineer.** 96: 454-460.
- Zwart, G., R. Huismans, M. Van Agterveld, Y. Van de Peer, P. De Rijk, H. Eenhoorn, G. Muyzer, E. Van Hanne, H. Gons and R. Laanbroek. 1997. Divergent members of the bacterial division *Verrucomicrobiales* in a temperate freshwater lake. **FEMS Microbiol. Eco.** 25: 159-169.



ตารางผนวกที่ 1 การเตรียม stock acrylamide ความเข้มข้น 0% และ 80%

ความเข้มข้น	สารเคมี	ปริมาณ	
0% (100 มิลลิลิตร)	AA/Bis solution (37.3:1)	13.00	มิลลิลิตร
	50X TAE solution	1.73	มิลลิลิตร
	H ₂ O	70.19	มิลลิลิตร
80% (150 มิลลิลิตร)	Urea	29.10	กรัม
	Formamide	27.73	มิลลิลิตร
	AA/Bis solution (37.3:1)	13.00	มิลลิลิตร
	50X TAE solution	1.73	มิลลิลิตร
	H ₂ O	70.19	มิลลิลิตร

หมายเหตุ นำสารละลายที่เตรียมแล้วใส่ในขวดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปห่อด้วยกระดาษฟอยล์ และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 2 ส่วนประกอบของอาหาร Tryptone Glucose Yeast Extract (TGE) (ต่อลิตร)

สารเคมี	ปริมาณ	
Meat extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
D (+) glucose	1	กรัม
agar	15	กรัม

หมายเหตุ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติมสารหนูอาร์เซนดหรืออาร์เซไนต์ เมื่ออาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 3 ส่วนประกอบของอาหาร Luria-Bertani (LB) (ต่อลิตร)

สารเคมี	ปริมาณ	
Tryptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
agar	15	กรัม

หมายเหตุ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1 N NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารหนูอาร์เซนด อาร์เซไนต์ หรือสารปฏิชีวนะ หลังจากอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 4 ส่วนประกอบของอาหาร Chemically Defined Medium (CDM) (ต่อลิตร)
(Weeger *et al.* 1999, Simeonova, 2004)

ประเภท	สารเคมี	ปริมาณ
Solution A ^{/1}	MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 กรัม
	NH ₄ Cl	10 กรัม
	K ₂ HPO ₄	0.13 กรัม
	Na ₂ SO ₄	9.9 กรัม
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.66 กรัม
	Sodium lactate	0.446 มิลลิโมลาร์
Solution B ^{/2}	Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	4.8 มิลลิโมลาร์
Solution C ^{/3}	NaHCO ₃	0.95 มิลลิโมลาร์

หมายเหตุ ^{/1} Solution A นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (เติม Solution A ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร)

^{/2} Solution B ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (เติม Solution B ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร)

^{/3} Solution C ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (เติม Solution C ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร)

นำสารละลายที่เตรียมไว้ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

ตารางผนวกที่ 5 ส่วนประกอบสารละลาย molybdenum blue solution สำหรับการวัดปริมาณ
สารหนูอาร์เซนด

ประเภท	สารเคมี	ปริมาณ	
Molybdenum blue solution (Johnson, 1971)	Ammonium molybdate	6	กรัม
	Ascorbic acid	10.8	กรัม
	Potassium antimonyl tartrate	0.136	กรัม
	H ₂ SO ₄ (conc.)	67.3	มิลลิลิตร

หมายเหตุ การเตรียมสารละลาย KIO₃ ทำโดยละลาย KIO₃ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ใน HCl
ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (Niggemyer *et al.* 2001)

ตารางผนวกที่ 6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณสารหนูอาร์เซนิต

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน (ไมโครโมลาร์)	Arsenate stock solution (ไมโครโมลาร์) ^{1/}	Molybdenum blue mix reagent (ไมโครโมลาร์)	PIPES Buffer (ไมโครโมลาร์)
0	400	600	0
20	380	600	20
40	360	600	40
60	340	600	60
80	320	600	80
100	300	600	100

หมายเหตุ ^{1/} เตรียมจาก arsenate stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ตารางผนวกที่ 7 ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาเดิน

พีเอช	ความรุนแรงของปฏิกิริยาเดิน
< 3.5	กรดรุนแรงมากที่สุด
3.5 - 4.5	กรดรุนแรงมาก
4.5 - 5.0	กรดจัดมาก
5.1 - 5.5	กรดจัด
5.6 - 6.0	กรดปานกลาง
6.1 - 6.5	กรดเล็กน้อย
6.6 - 7.3	กลาง
7.4 - 7.8	ด่างเล็กน้อย
7.9 - 8.4	ด่างปานกลาง
8.5 - 9.0	ด่างจัด
>9.5	ด่างจัดมาก

ที่มา: คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2545)

ตารางผนวกที่ 8 เกณฑ์การประเมินระดับอินทรีวัตถุในดิน

ปริมาณอินทรีวัตถุ (กรัมต่อกิโลกรัม)	ระดับที่บ่งบอก
ต่ำกว่า 5	ต่ำมาก
5-10	ต่ำ
11-15	ค่อนข้างต่ำ
16-25	ปานกลาง
26-35	สูงปานกลาง
36-45	สูง
มากกว่า 45	สูงมาก

ที่มา: คณะกรรมาธิการวิสามัญ (2545)

ตารางผนวกที่ 9 การติดสีแกรมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียด้านทานสารหนูที่นำมาศึกษา 262 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ		ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ	
		แกรม	รูปร่าง			แกรม	รูปร่าง
MC002	AS1	negative	rod	MC027	AS1	negative	cocci
MC003	AS1	negative	cocci	MC028	AS1	negative	rod
MC004	AS1	negative	cocci	MC029	AS1	negative	cocci
MC005	AS1	negative	rod	MC030	AS1	negative	rod
MC006	AS1	negative	cocci	MC031	AS1	negative	rod
MC007	AS1	negative	rod	MC032	AS1	negative	cocci
MC008	AS1	negative	cocci	MC033	AS2	negative	cocci
MC009	AS1	negative	cocci	MC034	AS2	negative	cocci
MC010	AS1	negative	cocci	MC035	AS2	negative	cocci
MC011	AS1	negative	rod	MC036	AS2	negative	cocci
MC012	AS1	negative	rod	MC037	AS2	positive	cocci
MC013	AS1	negative	rod	MC038	AS2	positive	cocci
MC014	AS1	negative	cocci	MC039	AS2	negative	cocci
MC015	AS1	negative	cocci	MC040	AS2	negative	cocci
MC016	AS1	negative	cocci	MC041	AS2	negative	cocci
MC017	AS1	negative	cocci	MC042	AS2	negative	cocci
MC018	AS1	negative	cocci	MC043	AS2	negative	cocci
MC019	AS1	negative	cocci	MC044	AS2	negative	cocci
MC020	AS1	negative	cocci	MC045	AS2	negative	cocci
MC021	AS1	negative	rod	MC046	AS2	negative	cocci
MC022	AS1	negative	cocci	MC047	AS2	negative	rod
MC023	AS1	negative	cocci	MC048	AS2	negative	cocci
MC024	AS1	negative	cocci	MC049	AS2	negative	rod
MC025	AS1	negative	rod	MC050	AS2	negative	cocci
MC026	AS1	negative	rod	MC051	AS2	negative	cocci

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ		ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ	
		แกรม	รูปร่าง			แกรม	รูปร่าง
MC052	AS2	negative	rod	MC077	AS2	negative	cocci
MC053	AS2	negative	cocci	MC078	AS2	negative	cocci
MC054	AS2	negative	cocci	MC079	AS2	negative	cocci
MC055	AS2	negative	cocci	MC080	AS2	negative	cocci
MC056	AS2	negative	cocci	MC081	AS2	negative	cocci
MC057	AS2	negative	cocci	MC082	AS2	negative	cocci
MC058	AS2	negative	cocci	MC083	AS2	negative	cocci
MC059	AS2	negative	cocci	MC084	AS2	negative	cocci
MC060	AS2	positive	cocci	MC085	AS2	negative	rod
MC061	AS2	negative	cocci	MC086	AS2	negative	cocci
MC062	AS2	negative	cocci	MC087	AS2	positive	cocci
MC063	AS2	positive	cocci	MC088	AS2	negative	cocci
MC064	AS2	negative	cocci	MC089	AS2	negative	rod
MC065	AS2	negative	cocci	MC090	AS2	negative	cocci
MC066	AS2	negative	cocci	MC091	AS2	negative	cocci
MC067	AS2	negative	cocci	MC092	AS2	negative	cocci
MC068	AS2	negative	rod	MC093	AS2	negative	cocci
MC069	AS2	negative	cocci	MC094	AS2	negative	rod
MC070	AS2	negative	cocci	MC095	AS2	negative	cocci
MC071	AS2	negative	cocci	MC096	AS2	positive	cocci
MC072	AS2	negative	cocci	MC098	AS2	positive	rod
MC073	AS2	positive	cocci	MC099	AS2	positive	rod
MC074	AS2	negative	cocci	MC100	AS2	negative	rod
MC075	AS2	negative	cocci	MC101	AS2	negative	rod
MC076	AS2	negative	cocci	MC102	AS2	negative	rod

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

ไอโซเลต	ตัวอย่าง ดิน	ลักษณะ		ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ	
		แกรม	รูปร่าง			แกรม	รูปร่าง
MC103	AS2	negative	rod	MC128	AS3	negative	rod
MC104	AS2	negative	rod	MC129	AS3	negative	rod
MC105	AS2	negative	rod	MC130	AS3	negative	rod
MC106	AS2	positive	rod	MC131	AS3	negative	rod
MC107	AS2	negative	rod	MC132	AS3	negative	rod
MC108	AS2	positive	rod	MC133	AS3	positive	rod
MC109	AS2	negative	rod	MC134	AS3	negative	rod
MC110	AS2	negative	rod	MC135	AS3	negative	rod
MC111	AS2	negative	rod	MC136	AS3	negative	rod
MC112	AS2	negative	rod	MC137	AS3	positive	rod
MC113	AS2	negative	rod	MC138	AS3	negative	rod
MC114	AS2	negative	rod	MC139	AS3	negative	rod
MC115	AS2	negative	rod	MC140	AS3	negative	rod
MC116	AS2	negative	rod	MC141	AS3	negative	rod
MC117	AS2	negative	rod	MC142	AS3	negative	rod
MC118	AS2	negative	rod	MC143	AS3	negative	rod
MC119	AS2	positive	rod	MC144	AS3	negative	rod
MC120	AS2	positive	rod	MC145	AS3	positive	rod
MC121	AS2	negative	rod	MC146	AS3	negative	rod
MC122	AS2	positive	rod	MC147	AS3	negative	rod
MC123	AS2	negative	rod	MC148	AS3	negative	rod
MC124	AS2	positive	rod	MC149	AS3	negative	rod
MC125	AS2	negative	rod	MC150	AS3	negative	rod
MC126	AS3	negative	rod	MC151	AS3	negative	rod
MC127	AS3	negative	rod	MC152	AS3	negative	rod

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ		ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ	
		แกรม	รูปร่าง			แกรม	รูปร่าง
MC153	AS3	negative	rod	MC178	AS4	negative	rod
MC154	AS3	negative	rod	MC179	AS4	negative	rod
MC155	AS3	negative	rod	MC180	AS4	negative	rod
MC156	AS3	negative	rod	MC181	AS4	negative	rod
MC157	AS3	negative	rod	MC182	AS4	negative	rod
MC158	AS3	positive	rod	MC183	AS4	negative	rod
MC159	AS4	negative	rod	MC184	AS4	negative	rod
MC160	AS4	negative	rod	MC185	AS4	negative	rod
MC161	AS4	negative	rod	MC186	AS4	negative	rod
MC162	AS4	negative	rod	MC187	AS4	negative	rod
MC163	AS4	positive	rod	MC188	AS4	negative	rod
MC164	AS4	negative	rod	MC189	AS4	negative	rod
MC165	AS4	negative	rod	MC190	AS4	negative	rod
MC166	AS4	negative	rod	MC191	AS4	negative	rod
MC167	AS4	negative	rod	MC192	AS4	negative	rod
MC168	AS4	negative	rod	MC194	AS4	positive	rod
MC169	AS4	negative	rod	MC195	AS4	negative	rod
MC170	AS4	negative	rod	MC196	AS4	positive	rod
MC171	AS4	negative	rod	MC197	AS4	negative	rod
MC172	AS4	negative	rod	MC198	AS4	negative	rod
MC173	AS4	negative	rod	MC199	AS4	negative	rod
MC174	AS4	negative	rod	MC200	AS4	negative	rod
MC175	AS4	negative	rod	MC201	AS4	negative	rod
MC176	AS4	negative	rod	MC202	AS4	positive	rod
MC177	AS4	negative	rod	MC203	AS4	positive	rod

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ		ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ	
		แกรม	รูปร่าง			แกรม	รูปร่าง
MC204	AS4	positive	rod	MC229	AS6	negative	cocci
MC205	AS4	positive	rod	MC230	AS6	negative	cocci
MC206	AS4	positive	rod	MC231	AS6	negative	cocci
MC207	AS4	negative	rod	MC232	AS6	negative	cocci
MC208	AS5	positive	rod	MC233	AS6	negative	rod
MC209	AS5	negative	rod	MC234	AS6	negative	rod
MC210	AS5	negative	rod	MC235	AS6	negative	rod
MC211	AS5	negative	rod	MC236	AS6	negative	rod
MC212	AS5	negative	rod	MC237	AS6	negative	rod
MC213	AS5	negative	rod	MC238	AS6	negative	rod
MC214	AS5	negative	rod	MC239	AS6	negative	rod
MC215	AS5	negative	rod	MC240	AS6	negative	cocci
MC216	AS5	negative	rod	MC241	AS6	negative	rod
MC217	AS5	negative	rod	MC242	AS6	negative	rod
MC218	AS5	negative	rod	MC243	AS6	negative	cocci
MC219	AS5	negative	rod	MC244	AS6	negative	cocci
MC220	AS5	negative	rod	MC245	AS6	negative	cocci
MC221	AS5	negative	rod	MC246	AS7	negative	rod
MC222	AS5	negative	rod	MC247	AS7	negative	rod
MC223	AS5	negative	rod	MC248	AS7	negative	rod
MC224	AS5	negative	rod	MC249	AS7	negative	rod
MC225	AS5	negative	rod	MC250	AS7	negative	rod
MC226	AS5	negative	rod	MC251	AS7	negative	rod
MC227	AS5	negative	cocci	MC252	AS7	negative	rod
MC228	AS6	negative	cocci	MC253	AS7	negative	rod

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ		ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ลักษณะ	
		แกรม	รูปร่าง			แกรม	รูปร่าง
MC254	AS8	negative	rod	MC260	AS8	negative	rod
MC255	AS8	positive	rod	MC261	AS8	negative	rod
MC256	AS8	positive	rod	MC262	AS8	negative	rod
MC257	AS8	negative	rod	MC263	AS8	negative	rod
MC258	AS8	negative	rod	MC264	AS8	negative	rod
MC259	AS8	negative	rod	MC265	AS8	negative	rod

ตารางผนวกที่ 10 ความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์เซนิตและอาร์เซไนต์ของแบคทีเรีย
262 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 และ
10000 เท่า

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นของอาร์เซไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนิต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
1	AS1	MC002	1000	1000	1500	1500
2	AS1	MC003	1000	1000	1500	1500
3	AS1	MC004	1000	1000	1500	1500
4	AS1	MC005	1000	1000	1500	1500
5	AS1	MC006	1000	1000	1500	1500
6	AS1	MC007	1000	1000	1500	1500
7	AS1	MC008	1000	1000	1500	1500
8	AS1	MC009	1000	1000	1500	1500
9	AS1	MC010	1000	1000	1500	1500
10	AS1	MC011	1000	1000	1500	1500
11	AS1	MC012	1000	500	1500	1500
12	AS1	MC013	1000	1000	1000	0
13	AS1	MC014	50	50	200	0
14	AS1	MC015	1000	1000	1500	1500
15	AS1	MC016	1000	1000	1500	1500
16	AS1	MC017	1000	1000	1500	1500
17	AS1	MC018	1000	1000	1500	1500
18	AS1	MC019	1000	1000	1500	1500
19	AS1	MC020	1000	1000	1500	1500
20	AS1	MC021	1000	1000	1500	1500
21	AS1	MC022	1000	1000	1500	1500
22	AS1	MC023	1000	1000	1500	1500

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเตต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
23	AS2	MC024	1000	500	1500	1500
24	AS2	MC025	50	10	40	40
25	AS2	MC026	1000	1000	500	500
26	AS2	MC027	1000	1000	1500	1500
27	AS2	MC028	1000	1000	1500	1500
28	AS2	MC029	1000	1000	1500	1500
29	AS2	MC030	1000	1000	1500	1500
30	AS2	MC031	1000	1000	1500	100
31	AS2	MC032	1000	1000	1500	1500
32	AS2	MC033	1000	1000	1500	1500
33	AS2	MC034	1000	1000	1500	1500
34	AS2	MC035	1000	1000	1500	1500
35	AS2	MC036	1000	1000	1500	1500
36	AS2	MC037	500	0	1500	0
37	AS2	MC038	1000	100	40	0
38	AS2	MC039	1000	1000	500	500
39	AS2	MC040	1000	0	50	0
40	AS2	MC041	1000	1000	1500	1500
41	AS2	MC042	1000	1000	1500	1500
42	AS2	MC043	1000	1000	1500	1500
43	AS2	MC044	1000	1000	1500	1500
44	AS2	MC045	1000	1000	1500	1500
45	AS2	MC046	1000	1000	1500	1500
46	AS2	MC047	1000	1000	1500	1500

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเตต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
47	AS2	MC048	1000	1000	1500	1500
48	AS2	MC049	1000	50	250	200
49	AS2	MC050	1000	1000	1500	1500
50	AS2	MC051	1000	1000	1500	1500
51	AS2	MC052	1000	1000	1500	1500
52	AS2	MC053	1000	1000	1500	1500
53	AS2	MC054	1000	1000	1500	1500
54	AS2	MC055	1000	1000	1500	1000
55	AS2	MC056	1000	1000	1500	1500
56	AS2	MC057	1000	1000	1500	1500
57	AS2	MC058	1000	1000	1500	1500
58	AS2	MC059	1000	1000	1500	1500
59	AS2	MC060	1000	1000	1500	1000
60	AS2	MC061	1000	1000	1500	1500
61	AS2	MC062	1000	1000	1500	1500
62	AS2	MC063	1000	1000	1500	1500
63	AS2	MC064	1000	1000	1500	1500
64	AS2	MC065	1000	1000	1500	1500
65	AS2	MC066	1000	1000	1500	1500
66	AS2	MC067	1000	1000	1500	1500
67	AS2	MC068	1000	1000	1500	1500
68	AS2	MC069	1000	1000	1500	1500
69	AS2	MC070	1000	1000	1500	1500
70	AS2	MC071	1000	1000	1500	1500

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นของอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
71	AS2	MC072	1000	1000	1500	1500
72	AS2	MC073	1000	1000	1500	1500
73	AS2	MC074	1000	1000	1500	1500
74	AS2	MC075	1000	1000	1500	1500
75	AS2	MC076	1000	1000	1500	1500
76	AS2	MC077	1000	1000	1500	1500
77	AS2	MC078	1000	1000	1500	1500
78	AS2	MC079	1000	1000	1500	1500
79	AS2	MC080	1000	1000	1500	1500
80	AS2	MC081	1000	1000	1500	1000
81	AS2	MC082	1000	1000	1500	1500
82	AS2	MC083	1000	1000	1500	1500
83	AS2	MC084	1000	1000	1500	1500
84	AS2	MC085	250	500	1500	500
85	AS2	MC086	1000	1000	1500	1500
86	AS2	MC087	1000	1000	1500	1000
87	AS2	MC088	1000	1000	1500	1500
88	AS2	MC089	1000	1000	1500	1500
89	AS2	MC090	1000	1000	1500	1500
90	AS2	MC091	1000	1000	1500	1500
91	AS2	MC092	1000	1000	1500	1500
92	AS2	MC093	1000	1000	1500	1500
93	AS2	MC094	1000	1000	1500	1500
94	AS2	MC095	1000	500	1500	1500

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเนต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
95	AS2	MC096	1000	1000	1500	1500
96	AS2	MC098	1000	100	1500	1500
97	AS2	MC099	1000	250	1500	1500
98	AS2	MC100	100	0	200	0
99	AS2	MC101	500	0	1500	0
100	AS2	MC102	250	0	40	0
101	AS2	MC103	1000	250	1500	200
102	AS2	MC104	500	0	1000	0
103	AS2	MC105	500	10	1000	200
104	AS2	MC106	1000	500	1500	500
105	AS2	MC107	100	0	40	0
106	AS2	MC108	500	250	1500	1500
107	AS2	MC109	250	0	200	0
108	AS2	MC110	250	0	1500	0
109	AS2	MC111	100	0	200	0
110	AS2	MC112	1000	250	1500	0
111	AS2	MC113	250	10	1500	0
112	AS2	MC114	250	10	1500	0
113	AS2	MC115	1000	250	1500	0
114	AS2	MC116	1000	250	1500	0
115	AS2	MC117	1000	250	1500	0
116	AS2	MC118	100	50	200	0
117	AS2	MC119	250	250	1500	0
118	AS2	MC120	1000	250	1500	500

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนตสูงสุด	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		ที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
119	AS2	MC121	1000	250	1500	200
120	AS2	MC122	1000	250	1500	0
121	AS2	MC123	1000	250	1500	0
122	AS2	MC124	500	250	1500	0
123	AS3	MC125	250	0	1500	0
124	AS3	MC126	250	0	1500	200
125	AS3	MC127	250	0	1500	0
126	AS3	MC128	250	0	1500	0
127	AS3	MC129	250	0	1500	0
128	AS3	MC130	1000	0	1500	0
129	AS3	MC131	1000	10	1500	0
130	AS3	MC132	100	10	1500	0
119	AS3	MC121	1000	250	1500	200
120	AS3	MC122	1000	250	1500	0
121	AS3	MC123	1000	250	1500	0
122	AS3	MC124	500	250	1500	0
123	AS3	MC125	250	0	1500	0
124	AS3	MC126	250	0	1500	200
125	AS3	MC127	250	0	1500	0
126	AS3	MC128	250	0	1500	0
127	AS3	MC129	250	0	1500	0
128	AS3	MC130	1000	0	1500	0
129	AS3	MC131	1000	10	1500	0
130	AS3	MC132	100	10	1500	0

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
131	AS3	MC133	250	250	1500	10
132	AS3	MC134	100	0	0	0
133	AS3	MC135	1000	500	1500	200
134	AS3	MC136	250	50	1500	0
135	AS3	MC137	100	50	1500	0
136	AS3	MC138	1000	1000	1500	1500
137	AS3	MC139	1000	1000	1000	1000
138	AS3	MC140	1000	1000	200	200
139	AS3	MC141	1000	1000	1000	1000
140	AS3	MC142	1000	1000	1000	1000
141	AS3	MC143	1000	1000	1500	1500
142	AS3	MC144	1000	1000	1500	1500
143	AS3	MC145	1000	1000	1500	200
144	AS3	MC146	250	0	0	0
145	AS3	MC147	1000	1000	1500	1000
146	AS3	MC148	1000	1000	1500	1500
147	AS3	MC149	1000	1000	1500	1500
148	AS3	MC150	1000	1000	1500	0
149	AS3	MC151	1000	250	1500	0
150	AS3	MC152	1000	250	1500	0
151	AS3	MC153	1000	250	1500	0
152	AS3	MC154	1000	1000	1500	200
153	AS3	MC155	1000	250	1500	50
154	AS3	MC156	1000	1000	1500	1000

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเตต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
155	AS3	MC157	1000	1000	1500	155
156	AS4	MC158	1000	250	1500	156
157	AS4	MC159	1000	1000	1500	1500
158	AS4	MC160	100	0	200	10
159	AS4	MC161	250	0	200	500
160	AS4	MC162	250	0	200	0
161	AS4	MC163	250	250	1500	0
162	AS4	MC164	250	250	1000	0
163	AS4	MC165	250	250	1500	1500
164	AS4	MC166	100	0	500	0
165	AS4	MC167	250	0	1500	0
166	AS4	MC168	1000	1000	1500	0
167	AS4	MC169	100	50	200	0
168	AS4	MC170	100	250	1500	1500
169	AS4	MC171	250	0	200	0
170	AS4	MC172	250	0	100	10
171	AS4	MC173	250	0	50	0
172	AS4	MC174	250	0	100	0
173	AS4	MC175	250	250	1000	0
174	AS4	MC176	1000	1000	1500	0
175	AS4	MC177	1000	1000	1500	0
176	AS4	MC178	100	10	200	1500
177	AS4	MC179	250	10	1500	1500
178	AS4	MC180	1000	250	1500	0

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเตต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
179	AS4	MC181	250	50	200	0
180	AS4	MC182	250	50	100	0
181	AS4	MC183	1000	1000	1500	1500
182	AS4	MC184	1000	1000	1500	1500
183	AS4	MC185	1000	100	1500	0
184	AS4	MC186	1000	1000	1500	0
185	AS4	MC187	1000	10	1500	10
186	AS4	MC188	100	0	1000	0
187	AS4	MC189	1000	250	1500	0
188	AS4	MC190	500	0	1500	0
189	AS4	MC191	500	0	1500	0
190	AS4	MC192	1000	0	1500	0
191	AS4	MC194	1000	500	1500	1500
192	AS4	MC195	500	250	1500	1000
193	AS4	MC196	1000	500	1500	1500
194	AS4	MC197	500	500	1500	1500
195	AS4	MC198	50	10	500	0
196	AS4	MC199	250	100	1500	0
197	AS4	MC200	250	0	1500	0
198	AS4	MC201	250	50	1500	1500
199	AS4	MC202	100	50	1000	0
200	AS4	MC203	500	500	1500	1000
201	AS4	MC204	500	250	1500	1500
202	AS4	MC205	1000	500	1500	1500

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเนต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
203	AS4	MC206	1000	500	1500	1500
204	AS5	MC207	50	0	200	0
205	AS5	MC208	1000	500	1500	1500
206	AS5	MC209	50	0	1000	10
207	AS5	MC210	250	0	1500	0
208	AS5	MC211	50	50	1000	10
209	AS5	MC212	500	10	1000	10
210	AS5	MC213	50	10	1000	10
211	AS5	MC214	250	0	1500	0
212	AS5	MC215	100	0	1000	40
213	AS5	MC216	500	100	1000	100
214	AS5	MC217	250	0	1500	0
215	AS5	MC218	250	0	1000	0
203	AS5	MC206	1000	500	1500	1500
204	AS5	MC207	50	0	200	0
205	AS5	MC208	1000	500	1500	1500
206	AS5	MC209	50	0	1000	10
207	AS5	MC210	250	0	1500	0
208	AS5	MC211	50	50	1000	10
209	AS5	MC212	500	10	1000	10
210	AS5	MC213	50	10	1000	10
211	AS5	MC214	250	0	1500	0
212	AS5	MC215	100	0	1000	40
213	AS5	MC216	500	100	1000	100

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเนต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
214	AS5	MC217	250	0	1500	0
215	AS5	MC218	250	0	1000	0
216	AS5	MC219	250	0	1000	0
217	AS5	MC220	250	0	1000	0
218	AS5	MC221	250	10	1000	0
219	AS5	MC222	100	10	500	0
220	AS5	MC223	500	10	1500	0
221	AS5	MC224	250	10	1500	0
222	AS5	MC225	250	50	1500	10
223	AS5	MC226	250	10	1500	0
224	AS6	MC227	1500	1500	1500	1500
225	AS6	MC228	1500	1500	1500	1500
226	AS6	MC229	1500	500	1500	1500
227	AS6	MC230	500	500	1500	1500
228	AS6	MC231	1500	500	1500	1500
229	AS6	MC232	1500	250	1500	1500
230	AS6	MC233	100	0	500	0
231	AS6	MC234	100	0	500	0
232	AS6	MC235	250	0	1500	0
233	AS6	MC236	500	250	1500	500
234	AS6	MC237	250	10	1500	0
235	AS6	MC238	250	10	1500	0
236	AS6	MC239	50	50	200	0
237	AS6	MC240	1500	1000	1500	1500

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเนต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
238	AS6	MC241	250	10	1000	0
239	AS6	MC242	250	10	1000	0
240	AS6	MC243	50	0	200	0
241	AS6	MC244	1500	1500	1500	1500
242	AS7	MC245	1500	1500	1500	1500
243	AS7	MC246	50	0	500	0
244	AS7	MC247	250	0	1500	0
245	AS7	MC248	1000	500	1500	200
246	AS7	MC249	1000	500	1500	200
247	AS7	MC250	500	500	1500	1000
248	AS7	MC251	100	10	1500	10
249	AS7	MC252	100	0	1000	0
250	AS7	MC253	100	50	1000	10
251	AS7	MC254	250	50	1500	10
252	AS7	MC255	250	0	1500	0
253	AS7	MC256	250	0	1500	0
238	AS7	MC241	250	10	1000	0
239	AS7	MC242	250	10	1000	0
240	AS7	MC243	50	0	200	0
241	AS7	MC244	1500	1500	1500	1500
242	AS7	MC245	1500	1500	1500	1500
243	AS7	MC246	50	0	500	0
244	AS7	MC247	250	0	1500	0
245	AS7	MC248	1000	500	1500	200

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเนต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
246	AS7	MC249	1000	500	1500	200
247	AS7	MC250	500	500	1500	1000
248	AS7	MC251	100	10	1500	10
249	AS7	MC252	100	0	1000	0
250	AS7	MC253	100	50	1000	10
251	AS8	MC254	250	50	1500	10
252	AS8	MC255	250	0	1500	0
253	AS8	MC256	250	0	1500	0
254	AS8	MC257	100	0	500	0
255	AS8	MC258	500	250	1500	40
256	AS8	MC259	250	50	1500	10
257	AS8	MC260	50	0	500	0
258	AS8	MC261	500	250	1500	200
259	AS8	MC262	250	0	1500	100
260	AS8	MC263	250	100	1500	40
261	AS8	MC264	250	10	1500	0
262	AS8	MC265	250	0	1500	0
246	AS8	MC249	1000	500	1500	200
247	AS8	MC250	500	500	1500	1000
248	AS8	MC251	100	10	1500	10
249	AS8	MC252	100	0	1000	0
250	AS8	MC253	100	50	1000	10
251	AS8	MC254	250	50	1500	10
252	AS8	MC255	250	0	1500	0

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	ความเข้มข้นอาร์เซนไนต์		ความเข้มข้นอาร์เซนเนต	
			สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน		สูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน	
			เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย	
			100 เท่า	10000 เท่า	100 เท่า	10000 เท่า
253	AS8	MC256	250	0	1500	0
254	AS8	MC257	100	0	500	0
255	AS8	MC258	500	250	1500	40
256	AS8	MC259	250	50	1500	10
257	AS8	MC260	50	0	500	0
258	AS8	MC261	500	250	1500	200
259	AS8	MC262	250	0	1500	100
260	AS8	MC263	250	100	1500	40
261	AS8	MC264	250	10	1500	0
262	AS8	MC265	250	0	1500	0

ตารางผนวกที่ 11 ความสามารถในการต้านทานสารสารหนูอาร์ซีไนต์ อาร์เซนิตและสารปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถต้านทานได้ของ
แบคทีเรียตัวแทน 100 ไอโซเลต เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 และ 10000 เท่า

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	การต้านทาน				ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน								ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน							
			อาร์ซีไนต์		อาร์เซนิต		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า								เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า							
			10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec
1	AS1	MC010	1000	1000	1500	1500	5	5	2.5	15	10	2	10	10	1	5	2.5	15	10	2	10	10
2	AS1	MC013	1000	1000	1000	0	5	5	5	15	10	2	10	10	1	5	1	15	10	2	10	10
3	AS1	MC014	50	50	200	0	1	1	0	0	0	0.5	10	0	1	0	1	0	0	0	0	0
4	AS1	MC020	1000	1000	1500	1500	5	1	5	15	10	2	10	10	1	1	2.5	12	10	2	10	10
5	AS1	MC025	50	10	40	40	0	0	0	0	0	0	0	10	1	0	0	0	0	0	0	10
6	AS2	MC040	1000	0	50	0	1	1	1	0	10	0.5	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
7	AS2	MC089	1000	1000	1500	1500	1	5	2.5	15	10	2	10	10	1	5	2.5	15	10	2	10	10
8	AS2	MC090	1000	1000	1500	1500	1	5	1	15	10	2	10	10	1	5	1	15	10	2	5	5
9	AS2	MC098	1000	100	1500	1500	0	1	2.5	15	10	1	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
10	AS2	MC100	100	0	200	0	0	1	2.5	15	0	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	AS2	MC101	500	0	1500	0	0	1	0	15	0	1	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0
12	AS2	MC102	250	0	40	0	0	1	0	12	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	การต้านทาน		การต้านทาน		ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน								ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน							
			อาร์เซนไนต์		อาร์เซนิต		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า								เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า							
			10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec
13	AS2	MC103	1000	250	1500	200	1	1	2.5	15	5	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
14	AS2	MC104	500	0	1000	0	1	1	1	12	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	AS2	MC105	500	10	1000	200	1	1	1	15	10	2	0	10	0	0	0	0	0	0	0	1
16	AS2	MC106	1000	500	1500	500	1	1	2.5	15	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	1	0
17	AS2	MC107	100	0	40	0	1	1	2.5	15	5	2	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
18	AS2	MC109	250	0	200	0	0	0	1	0	0	1	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
19	AS2	MC110	250	0	1500	0	0	1	2.5	12	0	2	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
20	AS2	MC111	100	0	200	0	0	1	2.5	12	0	2	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
21	AS2	MC112	1000	250	1500	0	0	1	5	15	5	2	10	5	0	0	0	0	5	0.5	0	1
111	AS2	MC113	250	10	1500	0	0	1	2.5	12	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
22	AS2	MC114	250	10	1500	0	0	1	1	12	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
23	AS2	MC115	1000	250	1500	0	1	1	5	12	10	2	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
24	AS2	MC118	100	50	200	0	1	1	2.5	15	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	การต้านทาน อาร์เซนไนต์		การต้านทาน อาร์เซนด		ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า								ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า							
			10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec
25	AS2	MC120	1000	250	1500	500	0	1	2.5	15	10	2	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0
26	AS2	MC121	1000	250	1500	200	0	5	2.5	12	0	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
27	AS2	MC122	1000	250	1500	0	0	1	2.5	12	0	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
28	AS2	MC123	1000	250	1500	0	0	1	2.5	15	0	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
30	AS3	MC125	250	0	1500	0	1	1	2.5	15	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	1
31	AS3	MC128	250	0	1500	0	5	1	2.5	15	10	2	10	10	0	0	0	12	0	0	0	0
32	AS3	MC132	100	10	1500	0	1	1	2.5	15	10	2	10	5	0	0	0	1	10	2	0	1
33	AS3	MC133	250	250	1500	10	0	0	2.5	0	0	1	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
34	AS3	MC134	100	0	0	0	10	5	2.5	15	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
35	AS3	MC135	1000	500	1500	200	1	1	5	15	10	2	5	10	0	0	0	0	0	1	0	0
36	AS3	MC136	250	50	1500	0	0	1	5	15	10	2	0	10	0	0	0	0	0	0.5	0	0
37	AS3	MC139	1000	1000	1000	1000	1	1	2.5	12	10	2	10	10	0	0	1	1	10	2	10	10
38	AS3	MC142	1000	1000	1000	1000	1	1	2.5	15	10	2	1	10	0	0	2.5	15	10	2	5	10

ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	ไอโซ	การต้านทาน		การต้านทาน		ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน								ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน							
			อาร์เซนไนต์		อาร์เซนิต		เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า								เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า							
บ	ดิน	เลต	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec
39	AS3	MC143	1000	1000	1500	1500	5	1	2.5	15	10	2	5	10	0	0	2.5	15	10	2	5	10
40	AS3	MC145	1000	1000	1500	200	1	1	2.5	15	10	2	5	10	0	0	1	0	0	0	0	0
41	AS3	MC147	1000	1000	1500	1000	10	5	5	15	10	2	10	10	0	5	2.5	15	10	1	10	10
42	AS3	MC152	1000	250	1500	0	1	1	5	15	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
43	AS3	MC153	1000	250	1500	0	1	1	5	15	10	2	1	10	0	0	0	0	0	0	1	0
44	AS4	MC158	1000	250	1500	10	0	1	2.5	15	10	2	10	10	0	0	0	0	10	0	0	5
45	AS4	MC161	250	0	200	0	0	1	2.5	12	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	1
46	AS4	MC162	250	0	200	0	0	1	1	15	10	2	10	10	0	0	0	1	0	0	0	0
47	AS4	MC163	250	250	1500	1500	1	1	1	15	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
48	AS4	MC165	250	250	1500	0	1	1	1	12	10	1	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
49	AS4	MC166	100	0	500	0	1	1	1	12	10	2	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
50	AS4	MC167	250	0	1500	0	10	5	2.5	12	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
51	AS4	MC169	100	50	200	0	0	0	1	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	การต้านทาน		การต้านทาน		ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน								ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน							
			อาร์เซนไนต์	อาร์เซนิต	อาร์เซนไนต์	อาร์เซนิต	เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า								เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า							
			10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec
52	AS4	MC170	100	250	1500	10	0	1	1	1	0	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
53	AS4	MC171	250	0	200	0	0	1	5	0	5	2	10	10	0	0	1	0	0	2	5	0
54	AS4	MC172	250	0	100	0	0	1	5	1	0	2	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
55	AS4	MC175	250	250	1000	0	1	1	1	15	10	2	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
56	AS4	MC180	1000	250	1500	0	1	1	2.5	1	10	2	10	10	0	0	1	1	0	0	0	1
57	AS4	MC181	250	50	200	0	0	0	2.5	1	0	0	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0
58	AS4	MC182	250	50	100	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
59	AS4	MC187	1000	10	1500	10	10	5		15	5	2	10	5	0	1	1	0	5	0.5	10	0
60	AS4	MC192	1000	0	1500	0	1	1	2.5	1	5	2	10	10	0	0	1	0	0	0.5	10	5
61	AS4	MC194	1000	500	1500	1500	1	1	0	0	0	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
62	AS4	MC195	500	250	1500	1000	1	1	1	0	0	2	10	10	0	0	0	0	0	2	10	10
63	AS4	MC196	1000	500	1500	1500	1	1	1	1	5	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
64	AS4	MC197	500	500	1500	1500	0	1	1	0	5	2	10	10	0	0	0	0	0	0.5	0	0

ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	การต้านทาน อาร์เซนไนต์		การต้านทาน อาร์เซนเนต		ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า								ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า							
			10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec
65	AS4	MC199	250	100	1500	0	0	1	0	0	0	2	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
66	AS4	MC200	250	0	1500	0	0	1	0	0	0	1	10	10	0	0	0	0	0	0.5	0	0
67	AS4	MC201	250	50	1500	1500	1	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
68	AS4	MC202	100	50	1000	0	0	1	0	12	5	0.5	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
69	AS4	MC203	500	500	1500	1000	0	1	1	0	5	1	10	10	0	0	0	0	5	0	0	5
70	AS4	MC204	500	250	1500	1500	0	0	0	0	0	1	10	10	0	0	0	0	0	0	0	10
71	AS4	MC205	1000	500	1500	1500	1	0	1	0	0	2	10	10	0	0	0	0	0	0.5	1	1
72	AS4	MC206	1000	500	1500	1500	0	0	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
73	AS5	MC207	50	0	200	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
74	AS5	MC208	1000	500	1500	1500	1	1	0	12	10	2	10	10	0	0	0	0	5	0	0	1
75	AS5	MC209	50	0	1000	10	0	1	0	12	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
76	AS5	MC210	250	0	1500	0	0	1	0	12	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
77	AS5	MC211	50	50	1000	10	0	1	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างดิน	ไอโซเลต	การต้านทาน		การต้านทาน		ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน								ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน							
			อาร์เซนไนต์	อาร์เซนิต	อาร์เซนไนต์	อาร์เซนิต	เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า								เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า							
			10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec
78	AS5	MC213	50	10	1000	10	1	1	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
79	AS5	MC215	100	0	1000	40	5	5	1	15	10	2	10	10	0	5	0	1	10	1	5	10
80	AS5	MC216	500	100	1000	100	5	1	0	15	10	2	10	10	0	0	0	1	5	1	5	10
81	AS5	MC218	250	0	1000	0	1	1	0	15	10	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
82	AS5	MC225	250	50	1500	10	1	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
83	AS5	MC226	250	10	1500	0	0	1	0	12	0	2	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
84	AS6	MC233	100	0	500	0	5	1	1	15	10	2	10	5	0	0	1	0	0	0	0	1
85	AS6	MC234	100	0	500	0	1	1	1	15	10	2	10	5	0	0	1	0	0	0	0	0
86	AS6	MC235	250	0	1500	0	1	1	2.5	12	10	2	10	5	0	0	1	0	0	1	0	1
87	AS6	MC241	250	10	1000	0	10	1	5	15	10	2	10	10	0	1	1	15	10	2	10	10
88	AS6	MC242	250	10	1000	0	0	1	1	1	10	2	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0
89	AS6	MC244	1500	1500	1500	1500	10	1	2.5	15	10	2	10	10	0	1	1	15	10	2	10	10
90	AS7	MC246	50	0	500	0	5	1	1	15	10	2	10	10	0	1	1	0	10	2	10	10

ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซ	ตัวอย่างดิน เลต	การต้านทาน		การต้านทาน		ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน								ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะสูงสุดที่แบคทีเรียต้านทาน							
			อาร์เซนไนต์	อาร์เซนเนต	อาร์เซนไนต์	อาร์เซนเนต	เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 100 เท่า								เมื่อเจือจางเซลล์แบคทีเรีย 10000 เท่า							
บ			10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec	chlo	Kan	Nal	Rif	Strep	Tet	Amp	Spec
91	As7	MC247	250	0	1500	0	0	1	1	15	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
92	AS7	MC248	1000	500	1500	200	0	0	1	0	0	2	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0
93	AS7	MC249	1000	500	1500	200	5	5	5	15	10	2	10	5	0	1	1	0	0	0	0	0
94	AS7	MC253	100	50	1000	10	5	5	5	15	10	2	5	10	0	1	1	15	10	0.5	10	10
95	AS8	MC258	500	250	1500	40	0	1	1	12	10	2	10	5	0	0	0	0	5	0	0	0
96	AS8	MC260	50	0	500	0	0	0	1	0	0	2	10	5	0	0	1	0	0	0	0	0
97	AS8	MC261	500	250	1500	200	0	1	1	15	10	0	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0
98	AS8	MC263	250	100	1500	40	0	1	1	15	10	0.5	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
99	AS8	MC264	250	10	1500	0	10	5	1	15	10	2	10	10	5	1	1	0	5	2	10	10
100	AS8	MC265	250	0	1500	0	0	0	1	1	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ 12 ความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์เซไนต์และอาร์เซนิตของแบคทีเรีย
ตัวแทน 100 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด และการปรากฏของยีน
ต้านทานสารหนู *arsC*

ลำดับ	ไอโซเลต	ตัวอย่าง ดิน	ความสามารถต้านทานสาร หนู เมื่อเจือจางเซลล์		ความสามารถต้านทาน สารหนู เมื่อเจือจางเซลล์		การปรากฏ ของยีน <i>arsC</i>
			แบคทีเรีย 100 เท่า		แบคทีเรีย 10,000 เท่า		
			อาร์เซไนต์	อาร์เซนิต	อาร์เซไนต์	อาร์เซนิต	
1	MC10	AS1	1000	1500	1000	1500	+
2	MC13	AS1	1000	1000	1000	500	+
3	MC14	AS1	50	200	50	10	+
4	MC20	AS1	1000	1500	1000	1500	+
5	MC25	AS1	50	40	10	40	-
6	MC40	AS2	1000	40	0	0	-
7	MC89	AS2	1000	1500	1000	1500	+
8	MC90	AS2	1000	1500	1000	1500	+
9	MC98	AS2	1000	1500	100	1500	+
10	MC100	AS2	100	200	0	0	-
11	MC101	AS2	500	1500	0	0	-
12	MC102	AS2	250	40	0	0	-
13	MC103	AS2	1000	1500	250		
						0	+
15	MC105	AS2	250	1000	10	200	+
16	MC106	AS2	1000	1500	500	500	-
17	MC107	AS2	100	40	0	0	-
18	MC109	AS2	250	250	0	0	-
19	MC110	AS2	250	1500	0	0	+
20	MC111	AS2	100	200	0	0	+
21	MC112	AS2	1000	1500	250	0	+
22	MC113	AS2	250	1500	0	0	-

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	ตัวอย่าง ดิน	ความสามารถด้านทานสาร หนู เมื่อเจือจางเซลล์ แบคทีเรีย 100 เท่า		ความสามารถด้านทาน สารหนู เมื่อเจือจางเซลล์ แบคทีเรีย 10000 เท่า		การปรากฏ ของยีน <i>arsC</i>
			อาร์เซนไนต์	อาร์เซนต	อาร์เซนไนต์	อาร์เซนต	
23	MC114	AS2	250	1500	0	0	-
24	MC115	AS2	1000	250	1500	0	-
25	MC118	AS2	100	200	50	0	+
26	MC120	AS2	1000	1500	250	1500	-
27	MC121	AS2	1000	1500	250	200	-
28	MC122	AS2	1000	1500	250	0	-
29	MC123	AS2	1000	1500	250	0	-
30	MC125	AS3	250	1500	0	0	-
31	MC128	AS3	250	1500	0	0	-
32	MC132	AS3	100	1500	10	0	+
33	MC133	AS3	250	1500	0	10	-
34	MC134	AS3	100	10	0	0	+
35	MC135	AS3	1000	1500	250	100	-
36	MC136	AS3	250	1500	50	0	-
37	MC139	AS3	1000	1000	1000	1000	-
38	MC142	AS3	1000	1000	1000	1000	-
39	MC143	AS3	1000	1500	1000	1500	-
40	MC145	AS3	1000	1500	1000	200	-
41	MC147	AS3	1000	1500	1000	1000	-
42	MC152	AS3	1000	1500	250	0	-
43	MC153	AS3	1000	1500	250	0	-
44	MC158	AS4	1000	1500	250	10	+
45	MC161	AS4	250	100	0	0	+
46	MC162	AS4	250	200	0	0	-

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	ตัวอย่าง ดิน	ความสามารถต้านทานสาร หนู เมื่อเจือจางเซลล์ แบคทีเรีย 100 เท่า		ความสามารถต้านทาน สารหนู เมื่อเจือจางเซลล์ แบคทีเรีย 10000 เท่า		การปรากฏ ของยีน <i>arsC</i>
			อาร์เซไนต์	อาร์เซนิต	อาร์เซไนต์	อาร์เซนิต	
47	MC163	AS4	250	1500	250	250	-
48	MC165	AS4	250	1500	250	0	-
49	MC166	AS4	100	500	0	0	-
50	MC167	AS4	1000	1500	0	0	-
51	MC169	AS4	100	200	50	0	+
52	MC170	AS4	1000	1500	250	10	-
53	MC171	AS4	250	200	0	0	-
54	MC172	AS4	250	100	0	0	+
55	MC175	AS4	250	1000	250	0	+
56	MC180	AS4	1000	1500	250	0	+
57	MC181	AS4	250	200	50	0	+
58	MC182	AS4	250	100	50	0	+
59	MC187	AS4	1000	1500	10	10	-
60	MC192	AS4	1000	1500	10	10	-
61	MC194	AS4	1000	1500	500	1500	-
62	MC195	AS4	500	1500	250	10	-
63	MC196	AS4	1000	1500	500	1500	-
64	MC197	AS4	500	1500	500	1500	-
65	MC199	AS4	250	1500	100	40	-
66	MC200	AS4	250	1500	0	10	-
67	MC201	AS4	250	1500	500	1500	+
68	MC202	AS4	100	1000	50	0	+
69	MC203	AS4	500	1500	500	1500	-
70	MC204	AS4	500	1500	250	1500	-

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	ตัวอย่าง ดิน	ความสามารถด้านทานสาร หนู เมื่อเจือจางเซลล์ แบคทีเรีย 100 เท่า		ความสามารถด้านทาน สารหนู เมื่อเจือจางเซลล์ แบคทีเรีย 10000 เท่า		การปรากฏ ของยีน <i>arsC</i>
			อาร์เซไนต์	อาร์เซเนต	อาร์เซไนต์	อาร์เซเนต	
71	MC205	AS4	1000	1500	500	1500	-
72	MC206	AS4	1000	1500	1000	1500	-
73	MC207	AS5	50	200	0	0	-
74	MC208	AS5	1000	1500	500	500	-
75	MC209	AS5	50	1000	0	0	-
76	MC210	AS5	250	1500	0	0	-
77	MC211	AS5	50	1000	50	0	-
78	MC213	AS5	50	1000	10	100	-
79	MC215	AS5	100	1000	0	40	-
80	MC216	AS5	500	1000	100	100	-
81	MC218	AS5	250	1000	0	0	-
82	MC225	AS5	250	1500	50	10	-
83	MC226	AS5	250	1500	0	0	-
84	MC233	AS6	100	500	10	0	-
85	MC234	AS6	100	500	10	0	-
86	MC235	AS6	250	1500	0	0	+
87	MC241	AS7	250	1000	10	0	+
88	MC242	AS7	250	1000	10	0	-
89	MC244	AS7	1500	500	1500	10	-
90	MC246	AS7	50	0	10	0	+
91	MC247	AS7	250	0	10	0	-
92	MC248	AS7	1000	1500	500	200	-
93	MC249	AS7	1000	1500	500	200	-
94	MC253	AS7	250	1000	50	10	-

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	ตัวอย่าง ดิน	ความสามารถต้านทานสาร หนู เมื่อเจือจางเซลล์ แบคทีเรีย 100 เท่า		ความสามารถต้านทาน สารหนู เมื่อเจือจางเซลล์ แบคทีเรีย 10000 เท่า		การปรากฏ ของยีน <i>arsC</i>
			อาร์เซไนต์	อาร์เซเนต	อาร์เซไนต์	อาร์เซเนต	
95	MC258	AS8	1500	1500	250	40	-
96	MC260	AS8	50	500	0	0	-
97	MC261	AS8	50	1500	0	0	-
98	MC263	AS8	250	1500	100	40	+
99	MC264	AS8	250	1500	10	0	-
100	MC265	AS8	250	1500	10	0	+

ตารางผนวกที่ 13 ปริมาณสารหนูอาร์เซนไนต์จากการรีดักชันอาร์เซนเตเป็นอาร์เซนไนต์โดยแบคทีเรีย
วัดด้วยวิธี Molybdenum blue

ลำดับที่	รหัส	ตัวอย่างดิน	ปริมาณสารหนูอาร์เซนไนต์ (ไมโครโมลาร์)
1	MC10	AS1	38.32 ± 0.95
2	MC13	AS1	39.09 ± 5.18
3	MC20	AS1	19.85 ± 0.43
4	MC25	AS1	3.70 ± 1.43
5	MC40	AS2	16.71 ± 0.23
6	MC89	AS2	19.84 ± 3.33
7	MC90	AS2	7.33 ± 0.00
8	MC100	AS2	10.42 ± 0.48
9	MC103	AS2	5.81 ± 0.43
10	MC104	AS2	29.31 ± 1.73
11	MC105	AS2	8.74 ± 0.95
12	MC106	AS2	23.87 ± 2.38
13	MC107	AS2	25.88 ± 5.23
14	MC109	AS2	24.18 ± 0.92
15	MC110	AS2	12.44 ± 0.48
16	MC111	AS2	18.83 ± 5.71
17	MC112	AS2	13.11 ± 0.48
18	MC113	AS2	4.04 ± 0.95
19	MC114	AS2	22.52 ± 0.48
20	MC120	AS2	56.94 ± 6.11
21	MC121	AS2	15.49 ± 3.56
22	MC122	AS2	9.21 ± 0.81
23	MC123	AS2	36.64 ± 0.47
24	MC125	AS3	20.72 ± 3.25
25	MC128	AS3	6.33 ± 3.25
26	MC132	AS3	21.01 ± 0.41

ตารางผนวกที่ 13 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	ตัวอย่างดิน	ปริมาณสารหนูอาร์เซนไนต์ (ไมโครโมลาร์)
27	MC134	AS3	5.47 ± 0.40
28	MC135	AS3	7.20 ± 2.85
29	MC136	AS3	10.54 ± 0.25
30	MC139	AS3	11.23 ± 1.22
31	MC142	AS3	2.59 ± 2.04
32	MC145	AS3	16.14 ± 0.94
33	MC147	AS3	19.28 ± 0.41
34	MC152	AS3	19.84 ± 0.47
35	MC153	AS3	25.21 ± 0.48
36	MC158	AS4	17.84 ± 2.44
37	MC161	AS4	20.72 ± 0.00
38	MC162	AS4	11.80 ± 0.41
39	MC165	AS4	9.32 ± 0.49
40	MC166	AS4	27.39 ± 2.04
41	MC169	AS4	37.12 ± 2.55
42	MC180	AS4	0.12 ± 0.03
43	MC181	AS4	26.65 ± 2.60
44	MC182	AS4	8.60 ± 2.99
45	MC187	AS4	20.18 ± 5.10
46	MC192	AS4	27.39 ± 9.17
47	MC194	AS4	33.16 ± 4.08
48	MC195	AS4	25.21 ± 3.32
49	MC196	AS4	52.44 ± 2.85
50	MC197	AS4	66.22 ± 0.48
51	MC199	AS4	12.80 ± 1.13
52	MC201	AS4	21.26 ± 5.60
53	MC202	AS4	36.30 ± 0.00

ตารางผนวกที่ 13 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	ตัวอย่างดิน	ปริมาณสารหนูอาร์เซนไนด์ (ไมโครโมลาร์)
54	MC203	AS4	39.67 ± 0.01
55	MC204	AS4	69.59 ± 2.40
56	MC205	AS4	35.30 ± 1.44
57	MC206	AS4	7.60 ± 0.57
58	MC207	AS5	2.59 ± 2.02
59	MC208	AS5	24.75 ± 1.63
60	MC218	AS5	15.58 ± 3.02
61	MC225	AS5	15.87 ± 0.01
62	MC226	AS5	20.46 ± 0.00
63	MC233	AS6	23.51 ± 3.03
64	MC235	AS6	8.74 ± 0.00
65	MC248	AS7	4.58 ± 0.44
66	MC253	AS7	15.88 ± 0.00
67	MC260	AS8	6.42 ± 0.43
68	MC261	AS8	4.69 ± 3.57
69	MC262	AS8	5.05 ± 4.08
70	MC263	AS8	8.81 ± 0.23
71	MC265	AS8	38.92 ± 5.09

ตารางผนวกที่ 14 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่เรืย่้านทานสารหนูจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rDNA เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ใน 5 อันดับแรก

ลำดับ	ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ชนิดของแบคทีเรีย	% Similarlity	Accession no.
1	MC10	AS1	<i>Enterobacter cloacae</i> R10-1A	100	HQ154578.1
			<i>Enterobacter cloacae</i> R2-5A	100	HQ154552.1
			<i>Enterobacter</i> sp. AJAR-A3	100	HM103366.1
			<i>Enterobacter</i> sp. AJAR-A2	100	HM103365.1
			<i>Enterobacter</i> sp. EB44	100	FJ194525.1
2	MC13	AS1	<i>Bacillus anthracis</i> HCYL02	100	GQ392044.1
			<i>Bacillus cereus</i> MB-40	100	HM055982.1
			<i>Bacillus</i> sp. T5-12	100	GU294129.1
			<i>Bacillus cereus</i> S1	100	GQ226038.1
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	FJ655837.1
3	MC120	AS1	<i>Bacillus cereus</i> MB-40	100	HM055982.1
			<i>Bacillus</i> sp. T5-12	100	GU294129.1
			<i>Bacillus anthracis</i> HCYL02	100	GQ392044.1
			<i>Bacillus</i> sp. DQ62	98	GU377065.1
			<i>Bacillus thuringiensis</i> JS1	98	EU939700.1
4	MC123	AS2	<i>Bacillus cereus</i> IV6	99	EU366376.1
			<i>Bacillus cereus</i> THt1-S	100	HQ333013.1

ตารางผนวกที่ 14 (ต่อ)

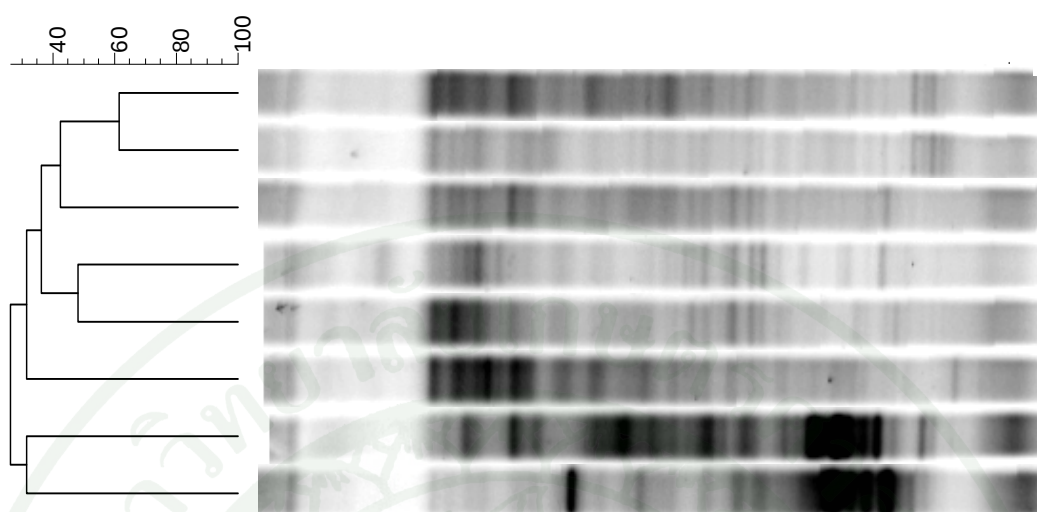
ลำดับ	ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ชนิดของแบคทีเรีย	% Similarlity	Accession no.
5	MC169	AS2	<i>Bacillus cereus</i> MB-40	100	HM055982.1
			<i>Bacillus</i> sp. T5-12	100	GU294129.1
			<i>Bacillus cereus</i> S1	100	GQ226038.1
			<i>Bacillus megaterium</i> Z3-4	98	HQ268535.1
			<i>Bacillus</i> sp. NIOC27	98	JF893458.1
			<i>Bacillus megaterium</i> 1027	98	FJ944650.1
			<i>Bacillus megaterium</i> 132XG35Y	98	FJ174651.1
			<i>Bacillus megaterium</i> 108X	98	FJ174609.1
6	AS4	MC194	<i>Bacillus anthracis</i> HCYL02	100	GQ3920444.1
			<i>Bacillus</i> sp. DQ62	99	GU377065.1
			<i>Bacillus cereus</i> MB-40	99	HM055982.1
			<i>Bacillus</i> sp. T5-12	99	GU294129.1
			<i>Bacillus thuringiensis</i> JS1	99	EU939700.1
7	MC196	AS4	<i>Bacillus cereus</i> MB-40	100	HM055982.1
			<i>Bacillus</i> sp. T5-12	100	GU294129.1
			<i>Bacillus cereus</i> S1	100	GQ226038.1
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	FJ655837.1

ตารางผนวกที่ 14 (ต่อ)

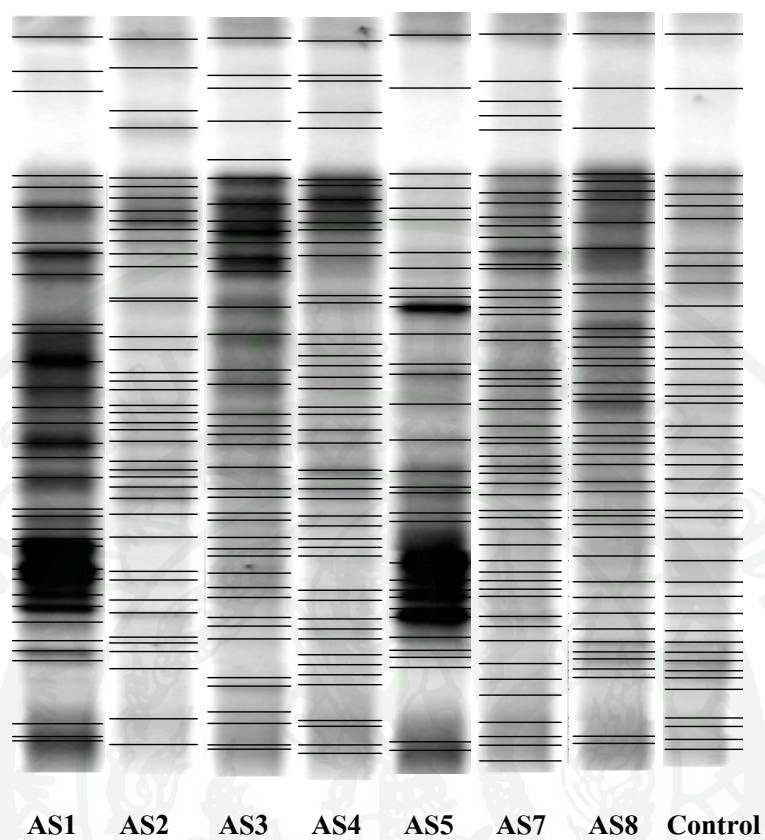
ลำดับ	ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ชนิดของแบคทีเรีย	% Similarlity	Accession no.
			<i>Bacillus</i> sp. YAC4-9	100	DQ649444.1
8	MC197	AS4	<i>Ochrobactrum intermedium</i> BCR 400	99	JN033212.1
			<i>Ochrobactrum</i> sp. PG-3-8	99	JF820105.1
			<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99	GU596495.1
			<i>Ochrobactrum</i> sp. N1	99	HQ231209.1
			<i>Ochrobactrum</i> sp. p48	99	HQ652579.1
9	MC202	AS4	<i>Bacillus</i> sp. MAN11	99	HM755813.1
			<i>Bacillus</i> sp. YACS13	99	DQ658919.1
			<i>Bacillus</i> sp. BWDY-34	99	DQ314544.1
			<i>Bacillus</i> sp. MAN9	99	HM755811.1
			<i>Bacillus</i> sp. N53	99	HQ188632.1
10	MC203	AS4	<i>Bacillus anthracis</i> HCYL02	100	GQ392044.1
			<i>Bacillus cereus</i> MB-40	100	HM055982.1
			<i>Bacillus</i> sp. T5-12	100	GU294129.1
			<i>Bacillus cereus</i> S1	100	GQ226038.1
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	FJ655837.1
11	AS4	MC204	<i>Enterobacter cloacae</i> R10-1A	100	HQ154578.1
			<i>Enterobacter cloacae</i> R2-5A	100	HQ154552.1

ตารางผนวกที่ 14 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	ตัวอย่างดิน	ชนิดของแบคทีเรีย	% Similarlity	Accession no.
			<i>Enterobacter</i> sp. AJAR-A3	100	HM103366.1
			<i>Enterobacter</i> sp. AJAR-A2	100	HM103365.1
			<i>Enterobacter</i> sp. EB44	100	FJ194525.1
12	MC205	AS4	<i>Bacillus cereus</i> IV6	97	EU366376.1
			<i>Bacillus thuringiensis</i> Ts-5	97	GU062823.1
			<i>Bacillus thuringiensis</i> EI-12	97	FJ613540.1
			<i>Bacillus</i> sp. Hg23	97	FJ228153.1
			<i>Bacillus cereus</i> ANetcr1	97	HQ286640.1
13	MC265	AS4	<i>Bacillus</i> sp. 093903	98	EF522790.1
			<i>Bacillus flexus</i> AK39763	99	HQ234345.1
			<i>Bacillus megaterium</i> p10	99	HQ166114.1
			<i>Bacillus flexus</i> j6	99	HQ166108.1
			<i>Bacillus</i> sp. IHB B 4016	99	HM233990.1



ภาพผนวกที่ 1 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารหนูในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จากเทคนิค DGGE



ภาพผนวกที่ 2 เส้นแสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์กลุ่มโครงสร้างสังคมแบคทีเรีย
ของดินปนเปื้อนสารหนู

Arthrobacter koreensis N1SF19, 16S ribosomal RNA gene, partial

Length = 870

Score = 291 bits (322), Expect = 2e-75

Identities = 172/179 (97%), Gaps = 0/179 (0%)

Strand = Plus/Plus

AS1-Band A	2	TATTACCGCGTATGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTT	61
<i>A. koreensis</i>	362	TATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTT	421
AS1-Band A	62	CGCTTCTTATCTGCTGAAAGAAGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGCC	121
<i>A. koreensis</i>	422	CGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAAGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTC	481
AS1-Band A	122	GCTGCATCAGGCTTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCCTACGAGTC	180
<i>A. koreensis</i>	482	GCTGCATCAGGCTTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCCTACGAGTC	540

ภาพผนวกที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแถบดีเอ็นเอ

ตัวแทน (AS1 Band A) ที่ได้จากตัวอย่าง AS1 ด้วยเทคนิค DGGE กับ *Arthrobacter koreensis* N1SF19

β-proteobacterium IMCC1734

Length = 791

Score = 282 bits (312), Expect = 2e-72

Identities = 165/168 (99%), Gaps = 2/168 (1%)

Strand = Plus/Plus

AS5 Band B	616	GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGACGCAAGTCTGATCCAGCC	675
IMCC1734	266	GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGACGCAAGTCTGATCCAGCC	325
AS5 Band B	676	ATGCCGCGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTGTGAGGGAAGAAACGC	735
IMCC1734	326	ATGCCGCGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTGTGAGGGAAGAAACGC	385
AS5 Band B	736	TCTGGGTTAATACCCTGGGGTAATGACGGTACC-GAAGAA-AAGAACC	781
IMCC1734	386	TCTGGGTTAATACCCTGGGGTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACC	433

ภาพผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย

ตัวแทน (AS1 Band B) ที่ได้จากตัวอย่าง AS1 ด้วยเทคนิค DGGE

กับ *β-proteobacterium* IMCC1734

Uncultured beta proteobacterium clone TH_a16

Length = 700

Score = 280 bits (310), Expect = 4e-72

Identities = 160/163 (99%), Gaps = 0/163 (0%)

Strand = Plus/Plus

AS1 Band C	254	ggACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGC	313
Th_a16	273	GGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGC	332
AS1 Band C	314	AATGCCGCGTGCAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAACTGCTTTTGTACGGAACGAAACG	373
Th_a16	333	AATGCCGCGTGCAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAACTGCTTTTGTACGGAACGAAACG	392
AS1 Band C	374	GTTCTGGTTAATACCTGGGGCTAATGACGGTACCGTAAGAATA	416
Th_a16	393	GTCCTGGTTAATACCTGGGGCTAATGACGGTACCGTAAGAATA	435

ภาพผนวกที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทน (AS1 Band C) ที่ได้จากตัวอย่าง AS1 ด้วยเทคนิค DGGE กับ Uncultured *β*-proteobacterium clone TH_a16

Uncultured bacterium clone LNR A2-16

Length = 1302

Score = 260 bits (288), Expect = 3e-66

Identities = 157/162 (97%), Gaps = 5/162 (3%)

Strand = Plus/Plus

AS5 Band F	253	GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCAAGCCTGAACCAGCC	312
LNR A2-16	237	GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCAAGCCTGAACCAGCC	296
AS5 Band F	313	ATCCCGCGTGCAGGAAGACGGCGCTATGCGTTGTAACTGCTTTTCCAGGGGGAGAACT	372
LNR A2-16	297	ATCCCGCGTGCAGGAAGACGGCGCTATGCGTTGTAACTGCTTTTCCAGGGGGAGAACT	356
AS5 Band F	373	TGCGCACGTGTTGCGCAA-TGAC-GTACCCTG---ATAAGCA	409
LNR A2-16	357	TGCGCACGTGTTGCGCAATTGACGGTACCCTGGGAATAAGCA	398

ภาพผนวกที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียแอ
ตัวแทน (AS1 Band F) ที่ได้จากตัวอย่าง AS1 ด้วยเทคนิค DGGE กับ Uncultured
bacterium clone LNR A2-16

Enterobacter cloacae R10-1A

Length = 1491

Score = 961 bits (520), Expect = 0.0

Identities = 520/520 (100%), Gaps = 0/520 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC010	11	CCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGG	70
<i>E. cloacae</i>	377	CCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGG	436
MC010	71	TGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC	130
<i>E. cloacae</i>	437	TGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC	496
MC010	131	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA	190
<i>E. cloacae</i>	497	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA	556
MC010	191	GCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC	250
<i>E. cloacae</i>	557	GCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC	616
MC010	251	ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGA	310
<i>E. cloacae</i>	617	ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGA	676
MC010	311	AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGAC	370
<i>E. cloacae</i>	677	AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGAC	736
MC010	371	GCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA	430
<i>E. cloacae</i>	737	GCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA	796
MC010	431	AACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGCGTTCCGGAGCTAACGCGTTAA	490
<i>E. cloacae</i>	797	AACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGCGTTCCGGAGCTAACGCGTTAA	856
MC010	491	TCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAA	530
<i>E. cloacae</i>	857	TCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAA	896

ภาพผนวกที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มี
ความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC013) กับ *Enterobacter cloacae* R10-1A

Bacillus anthracis HCYL02

Length = 562

Score = 983 bits (532), Expect = 0.0

Identities = 532/532 (100%), Gaps = 0/532 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC013	1	TCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAG	60
<i>B. anthracis</i>	19	TCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAG	78
MC197	61	GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC	120
<i>B. anthracis</i>	79	GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC	138
MC013	121	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	180
<i>B. anthracis</i>	139	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	198
MC013	181	TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	240
<i>B. anthracis</i>	199	TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	258
MC013	241	GTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGT	300
<i>B. anthracis</i>	259	GTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGT	318
MC013	301	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC	360
<i>B. anthracis</i>	319	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC	378
MC013	361	TGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	420
<i>B. anthracis</i>	379	TGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	438
MC013	421	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTT	480
<i>B. anthracis</i>	439	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTT	498
MC013	481	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAG	532
<i>B. anthracis</i>	499	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAG	550

ภาพผนวกที่ 8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC013) กับ *Bacillus anthracis* HCYL02

Bacillus cereus MB-40

Length = 990

Score = 979 bits (530), Expect = 0.0

Identities = 530/530 (100%), Gaps = 0/530 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC120	1	TCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAG	60
<i>B. cereus</i> MB40	23	TCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAG	82
MC120	61	GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC	120
<i>B. cereus</i> MB40	83	GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC	142
MC120	121	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	180
<i>B. cereus</i> MB40	143	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	202
MC120	181	TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	240
<i>B. cereus</i> MB40	203	TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	262
MC120	241	GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGT	300
<i>B. cereus</i> MB40	263	GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGT	322
MC120	301	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC	360
<i>B. cereus</i> MB40	323	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC	382
MC120	361	TGTAAGTGAAGTGAAGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGT	420
<i>B. cereus</i> MB40	383	TGTAAGTGAAGTGAAGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGT	442
MC120	421	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTT	480
<i>B. cereus</i> MB40	443	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTT	502
MC120	481	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCA	530
<i>B. cereus</i> MB40	503	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCA	552

ภาพผนวกที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC120) กับ *Bacillus cereus* MB-40

Bacillus megaterium Z3-4

Length = 1126

Score = 985 bits (533), Expect = 0.0

Identities = 544/550 (99%), Gaps = 2/550 (0%)

Strand=Plus/Plus

MC169	1	TCTGACGGANCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTA	59
<i>B. megaterium</i>	285	TCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTA	344
MC169	60	GGGAAGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTGCTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCAC	119
<i>B. megaterium</i>	345	GGGAAGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTGCTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCAC	404
MC169	120	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	179
<i>B. megaterium</i>	405	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	464
MC169	180	TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	239
<i>B. megaterium</i>	465	TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	524
MC169	240	GTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAGAGAAAAGCGGAATTCACAGT	299
<i>B. megaterium</i>	525	GTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAGAGAAAAGCGGAATTCACAGT	584
MC169	300	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTTGGTC	359
<i>B. megaterium</i>	585	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTTGGTC	644
MC169	360	TGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	419
<i>B. megaterium</i>	645	TGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	704
MC169	420	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCT	479
<i>B. megaterium</i>	705	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCT	764
MC169	480	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCANGGTTTTGA	539
<i>B. megaterium</i>	765	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCANGGTTTTGA	823
MC169	540	CGGGGG 545	
<i>B. megaterium</i>	824	CGGGGG 682	

ภาพผนวกที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มี
ความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC169) กับ *Bacillus megaterium* Z3-4

Bacillus anthracis HCYL02

Length = 562

Score = 983 bits (532), Expect = 0.0

Identities = 532/532 (100%), Gaps = 0/532 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC196	1	TCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAG	60
<i>B. anthracis</i>	19	TCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAG	78
MC196	61	GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC	120
<i>B. anthracis</i>	79	GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC	138
MC196	121	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	180
<i>B. anthracis</i>	139	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT	198
MC196	181	TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	240
<i>B. anthracis</i>	199	TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACC	258
MC196	241	GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGT	300
<i>B. anthracis</i>	259	GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGT	318
MC196	301	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC	360
<i>B. anthracis</i>	319	GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC	378
MC196	361	TGTAAGTGAAGTGAAGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGT	420
<i>B. anthracis</i>	379	TGTAAGTGAAGTGAAGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGT	438
MC196	421	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTT	480
<i>B. anthracis</i>	439	CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTT	498
MC196	481	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAG	532
<i>B. anthracis</i>	499	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAG	550

ภาพผนวกที่ 12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อคั่นสารหนู (MC194) กับ *Bacillus anthracis* HCYL02

Bacillus cereus MB-40

Length = 990

Score = 979 bits (530), Expect = 0.0

Identities = 530/530 (100%), Gaps = 0/530 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC196	1	TGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG	60
<i>B. cereus</i> MB40	25	TGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG	84
MC196	61	AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG	120
<i>B. cereus</i> MB40	85	AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG	144
MC196	121	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG	180
<i>B. cereus</i> MB40	145	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG	204
MC196	181	GGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGT	240
<i>B. cereus</i> MB40	205	GGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGT	264
MC196	241	GGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGT	300
<i>B. cereus</i> MB40	265	GGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGT	324
MC196	301	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTG	360
<i>B. cereus</i> MB40	325	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTG	384
MC196	361	TAAGTGAAGTGAAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	420
<i>B. cereus</i> MB40	385	TAAGTGAAGTGAAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	444
MC196	421	ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAA	480
<i>B. cereus</i> MB40	445	ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAA	504
MC196	481	CGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA	530
<i>B. cereus</i> MB40	505	CGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA	554

ภาพผนวกที่ 13 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC196) กับ *Bacillus cereus* MB-40

Ochrobactrum intermedium BCR400

Length = 1384

Score = 894 bits (484), Expect = 0.0

Identities = 489/491 (99%), Gaps = 2/491 (0%)

Strand=Plus/Plus

MC197	40	CCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCCTTTTCACCGGTGAAGATAATGA	99
<i>O. intermedium</i>	333	CCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCT-C-TTTCACCGGTGAAGATAATGA	390
MC197	100	CGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGAAGGG	159
<i>O. intermedium</i>	391	CGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGAAGGG	450
MC197	160	GGCTAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGGCTAATAAGTCAGG	219
<i>O. intermedium</i>	451	GGCTAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGGCTAATAAGTCAGG	510
MC197	220	GGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACGCTTTGATACTGTTAGTCTTGAGTATGGT	279
<i>O. intermedium</i>	511	GGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACGCTTTGATACTGTTAGTCTTGAGTATGGT	570
MC197	280	AGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAG	339
<i>O. intermedium</i>	571	AGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAG	630
MC197	340	TGGCGAAGGCGGCTCACTGGACCTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA	399
<i>O. intermedium</i>	631	TGGCGAAGGCGGCTCACTGGACCTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA	690
MC197	400	CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTTGGGGAGTT	459
<i>O. intermedium</i>	691	CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTTGGGGAGTT	750
MC197	460	TACTCTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA	519
<i>O. intermedium</i>	751	TACTCTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA	810
MC197	520	TTAAAACTCAA	530
<i>O. intermedium</i>	811	TTAAAACTCAA	821

ภาพผนวกที่ 14 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC197) กับ *Ochrobactrum intermedium* BCR400

Bacillus sp. MAN11

Length = 837

Score = 1007 bits (545), Expect = 0.0

Identities = 546/547 (99%), Gaps = 0/547 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC202	1	AAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT	60
<i>Bacillus</i> sp.	6	AAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT	65
MC202	61	TAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC	120
<i>Bacillus</i> sp.	66	TAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC	125
MC202	121	ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT	180
<i>Bacillus</i> sp.	126	ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT	185
MC202	181	ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA	240
<i>Bacillus</i> sp.	186	ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAA	245
MC202	241	CCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGNGGAATTCCAC	300
<i>Bacillus</i> sp.	246	CCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCAC	305
MC202	301	GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGG	360
<i>Bacillus</i> sp.	306	GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGG	365
MC202	361	TCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA	420
<i>Bacillus</i> sp.	366	TCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA	425
MC202	421	GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG	480
<i>Bacillus</i> sp.	426	GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG	485
MC202	481	CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT	540
<i>Bacillus</i> sp.	486	CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT	545
MC202	541	GACGGGG 547	
<i>Bacillus</i> sp.	546	GACGGGG 552	

ภาพผนวกที่ 15 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อดักชั้นสารหนู (MC202) *Bacillus* sp. MAN11

Bacillus anthracis HCYL02

Length = 562

Score = 957 bits (1060), Expect = 0.0

Identities = 530/530 (100%), Gaps = 0/530 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC203	1	TGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG	60
<i>B. anthracis</i>	21	TGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG	80
MC203	61	AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG	120
<i>B. anthracis</i>	81	AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG	140
MC203	121	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG	180
<i>B. anthracis</i>	141	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG	200
MC203	181	GGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT	240
<i>B. anthracis</i>	201	GGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT	260
MC203	241	GGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT	300
<i>B. anthracis</i>	261	GGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGT	320
MC203	301	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTG	360
<i>B. anthracis</i>	321	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTG	380
MC203	361	TAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC	420
<i>B. anthracis</i>	381	TAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC	440
MC203	421	ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAA	480
<i>B. anthracis</i>	441	ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAA	500
MC203	481	CGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAG	530
<i>B. anthracis</i>	501	CGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAG	550

ภาพผนวกที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC203) *Bacillus anthracis* HCYL02

Enterobacter cloacae R10-1A

Length = 1491

Score = 957 bits (1060), Expect = 0.0

Identities = 530/530 (100%), Gaps = 0/530 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC204	2	CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGG	61
<i>E. cloacae</i>	368	CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGG	427
MC204	62	GGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCG	121
<i>E. cloacae</i>	428	GGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCG	487
MC204	122	GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT	181
<i>E. cloacae</i>	488	GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT	547
MC204	182	GGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCT	241
<i>E. cloacae</i>	548	GGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCT	607
MC204	242	GGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTG	301
<i>E. cloacae</i>	608	GGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTG	667
MC204	302	TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACA	361
<i>E. cloacae</i>	668	TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACA	727
MC204	362	AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	421
<i>E. cloacae</i>	728	AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	787
MC204	422	CACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA	481
<i>E. cloacae</i>	788	CACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA	847
MC204	482	CGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAA	531
<i>E. cloacae</i>	848	CGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAA	897

ภาพผนวกที่ 17 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อดักจับสารหนู (MC204) กับ *Enterobacter cloacae* R10-1A

Bacillus cereus IV6

Length = 1450

Score = 940 bits (1042), Expect = 0.0

Identities = 533/544 (98%), Gaps = 0/544 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC205	1	GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG	60
<i>B. cereus</i> IV6	368	GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG	427
MC205	61	AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG	120
<i>B. cereus</i> IV6	428	AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG	487
MC205	121	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG	180
<i>B. cereus</i> IV6	488	CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG	547
MC205	181	GGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTNTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT	240
<i>B. cereus</i> IV6	548	GGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT	607
MC205	241	GGAGGGTCNNTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCANAANAGGAAANTGGAATTCATGTGT	300
<i>B. cereus</i> IV6	608	GGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGT	667
MC205	301	NGCGGTGAAATGCGTANAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTG	360
<i>B. cereus</i> IV6	668	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTG	727
MC205	361	TAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC	420
<i>B. cereus</i> IV6	728	TAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC	787
MC205	421	ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAA	480
<i>B. cereus</i> IV6	788	ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAA	847
MC205	481	CGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGTTTTNNCN	540
<i>B. cereus</i> IV6	848	CGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGTTTGACG	907
MC205	541	GGGG	544
<i>B. cereus</i> IV6	908	GGGG	911

ภาพผนวกที่ 18 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มี
ความสามารถในการรื้อถอนสารหนู (MC205) กับ *Bacillus cereus* IV6

Bacillus sp. 093903

Length = 1432

Score = 953 bits (1056), Expect = 0.0

Identities = 541/549 (99%), Gaps = 2/549 (0%)

Strand = Plus/Plus

MC265	1	AAGTCTGACGGAGCA - CGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAAC TCTGTTG	59
<i>Bacillus</i> sp.093903	344	AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAAC TCTGTTG	403
MC265	60	TTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAAC T GCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC	119
<i>Bacillus</i> sp.093903	404	TTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAAC T GCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC	463
MC265	120	CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT	179
<i>Bacillus</i> sp.093903	464	CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT	523
MC265	180	TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACG GCTCA	239
<i>Bacillus</i> sp.093903	524	TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACG GCTCA	583
MC265	240	ACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC TTGAGNGCAGAAGAAAAGNGGAATTCCA	299
<i>Bacillus</i> sp.093903	584	ACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCA	643
MC265	300	CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTTTTTG	359
<i>Bacillus</i> sp.093903	644	CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTTTTTG	703
MC265	360	GTCTGTAAC T GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGT	419
<i>Bacillus</i> sp.093903	704	GTCTGTAAC T GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGT	763
MC265	420	AGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTTANAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCA	479
<i>Bacillus</i> sp.093903	764	AGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCA	823
MC265	480	GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG- TT	538
<i>Bacillus</i> sp.093903	824	GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGATT	883
MC265	539	NNACNGGGG	547
<i>Bacillus</i> sp.093903	884	TGACGGGGG	892

ภาพผนวกที่ 19 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวแทนที่มีความสามารถในการรื้อक्षणสารหนู (MC265) กับ *Bacillus* sp. 093903

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเพชรดา เจริญมิตร
เกิดวันที่	11 มกราคม 2520
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปี 2542 วท.ม. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2545
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์ประจำภาควิชาปฐพีวิทยา
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ทุน International Environmental Research Center, Gwangju Institute of Science and Technology for Sustainability (UNU & GIST Joint Programme), Korea - ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อการตีพิมพ์ผลงานใน วารสารวิชาการระดับนานาชาติ ประจำปีงบประมาณ 2552 - ทุนสนับสนุนการวิจัย ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานคณะกรรมการ อุดมศึกษาประจำปีงบประมาณ 2552