ชนิดของโปรโตซัวที่พบในดินที่ปนเปื้อนเชื้อ *Burkhoderia pseudomallei* และสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินบริเวณนั้น

Protozoa in soil contaminated *Burkholderia pseudomallei* and their soil Physico-Chemical Properties

ยุพเรศ ธนะมูล (Yuppared Thanamoon)* พินิจ หวังสมนึก (Pinich Wangsomnuk)**
พิสิฏฐ์ เจริญสุดใจ (Pisit Chareonsudjai)***

บทคัดย่อ

เชื้อ *Burkhoderia pseudomallei* เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิสซึ่งพบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การศึกษาในครั้งนี้เพื่อหาชนิดและความสัมพันธ์ของโปรโตซัวและสมบัติทางกายภาพ-เคมีของดินที่พบร่วมกับเชื้อ *B. pseudomallei* โดยทำการเก็บตัวอย่าง 25 จุด จากบริเวณที่มีรายงานการพบเชื้อ ในเดือนพฤษภาคม 2554 จากการศึกษาในดินที่พบเชื้อพบโปรโตซัว 6 Class 13 ชนิด ในดินที่ไม่พบเชื้อพบโปรโตซัว 10 Class 19 ชนิด โดยมีชนิดที่เด่น คือ *Colpoda cucullus, Chaos illinoisense, Sexingularia parvular* ดินที่พบเชื้อมีค่า pH 5.28-6.94 ดินไม่เค็มมีค่าการนำไฟฟ้า 0.12-0.4 ความชื้นดินสูงมีค่าในช่วง 8.71-28.79 ความจุในการอุ้มน้ำของดินร้อยละ 20.64-44.88 อินทรียวัตถุในดินอยู่ในระดับปานกลางร้อยละ 0.46-2.68 ปริมาณเจดาห์ลไนโตรเจน 81.32-202.65 mg/kg ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนในดิน 0.27-1.55 mg/kg ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน 18.51-69.79 mg/kg ลักษณะเนื้อดินส่วนใหญ่เป็นดินทรายปนร่วน

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei caused of infectious Melioidosis endemic in tropical region, in northeast Thailand. The study soil contaminated *B. pseudomallei* for diversity of protozoa in soil. Twenty-five samples in Nam-Pong, Khon kaen, Thailand in May 2011. The result that diversity index of protozoa is soil with *B. pseudomallei* 6 class 13 species, that soil control 10 class 19 species physic-chemical of soil pH 5.28-6.94 soil salinity electrical conductivity 0.12-0.4 moisture content 8.11-28.79 percent water holding capacity 20.64 percent organic carbon 0.27-1.55 mg/kg total kjedahl nitrogen 81.32-202.65 mg/kg C/N ratio 36.16-80.26 available phosphorus 18.51-69.79 mg/kg soil texture was sandy to sandy loam.

คำสำคัญ: โปรโตซัว เมลิออยโดสิส ปัจจัยทางกายภาพ-เคมีของดิน

Key Words: Protozoa, Soil physico-chemical property, *Burkholderia pseudomallei*

* *นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

** *รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

*** *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

โรคเมลิออยโดสิส (Melioidosis) มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Burkhoderia pseudomallei* ซึ่งพบการระบาดในหลายประเทศที่อยู่ในเขตร้อนใกล้เส้นศูนย์สูตรทั่วโลก ในประเทศไทยมีการพบเชื้อนี้ได้ทั่วประเทศ แต่พบมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ จ. ขอนแก่น จากการศึกษาของ Palasatien (2008) พบว่ามีความถี่ที่สุดในจังหวัดขอนแก่น พบในรายที่ประกอบอาชีพเกษตรกรรมและพบระบาดมากที่สุดในช่วงฤดูฝน โรคนี้มีความรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต

การพบเชื้อนี้มีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆทางสิ่งแวดล้อม ปัจจัยทางกายภาพและเคมีที่ทำให้พบเชื้อ *B. pseudomallei* เช่น ความเป็นกรด-เบสของดิน พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดได้ เช่น ในนาข้าวของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มี pH 4.4-7.7 (Kanai and Kondo, 1994) ความเค็มมีผลต่อการพบเชื้อ *B. pseudomallei* โดยในนาข้าวที่พบเชื้อ *B. pseudomallei* ส่วนใหญ่เป็นดินเค็ม (Wongpokhom *et al.*, 2008) ความชื้นของดินมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อโดยพบการระบาดของโรคเมลิออยโดสิสมากที่สุดในช่วงฤดูฝน (Chaowagul *et al.*, 1989) ลักษณะของเนื้อดินที่พบเชื้อส่วนใหญ่เป็นดินทรายละเอียด (Palasatien *et al.*, 2008) นอกจากนี้แล้วเชื้อ *B. pseudomallei* ยังสามารถใช้ประโยชน์จากธาตุอาหารในดินเพื่อการเจริญเติบโตโดยเฉพาะธาตุเหล็ก(Yang *et al.*, 1991)และไนโตรเจน (Kanai and Kondo, 1994) ซึ่งในนาข้าวจะมีการใส่ปุ๋ยเพื่อเป็นอาหารให้กับพืชซึ่งจากการศึกษาของ Dance (1991b) พบว่านาข้าวเป็นบริเวณที่พบเชื้อ *B. pseudomallei* มากที่สุด

นอกเหนือจากปัจจัยทางกายภาพและเคมีของดินแล้วยังมีรายงานผลของปัจจัยทางชีวภาพด้วยซึ่ง Inglis (2000) รายงานว่าเชื้อ *B. pseudomallei* เข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์ของ อแคนทามีบา (*Acanthamoeba* sp.) เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในการดำรงชีวิต และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะออกจากเซลล์ของอแคนทามีบา (*Acanthamoeba* sp.) และเจริญเติบโตต่อไป (Howard. 2005) การที่เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในโปรโตซัว ทำให้โปรโตซัวกลายเป็นแหล่งเก็บกักเชื้อก่อโรคต่อคนและสัตว์ได้ (Marciano-Cabral and Cabral, 2003) ทั้งนี้เนื่องจากโปรโตซัวมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมทั้งทางกายภาพ-เคมีมากกว่าแบคทีเรีย จึงเป็นที่อาศัยให้กับเชื้อ *B. pseudomallei* ได้เป็นอย่างดี ดังนั้น การวิจัยนี้จึงต้องการหาความสัมพันธ์ของโปรโตซัวและเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุมเชื้อในพื้นที่ดังกล่าว

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่พบในดินที่ปนเปื้อนเชื้อ *B. pseudomallei*
2. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินที่พบโปรโตซัวในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei*

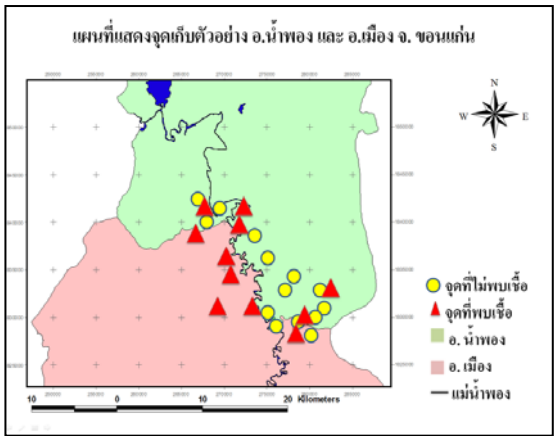
วิธีการวิจัย

1. พื้นที่สำรวจ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการดำเนินการต่อยอดจากการสำรวจเบื้องต้นที่มีการดำเนินการแล้วโดยสุพรรณิภา (2555) ในอำเภอน้ำพอง และอำเภอเมือง ซึ่งเป็นแหล่งที่มีรายงานว่าเชื้อชุกชุมที่สุดในจังหวัดขอนแก่น จำนวนทั้งหมด 25 จุดที่มีการพบเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 11 จุด และดินที่ไม่พบเชื้อจำนวน 14 จุด ดังภาพที่ 1 ในเดือนพฤษภาคม 2554

ทำการเก็บตัวอย่างดินตามตำแหน่งพิกัดซึ่งรายงานโดย Palasatien (2008) บนเครื่อง GPS โดยเก็บที่ความลึก 0-30 เซนติเมตร โดยใช้จอบขุดเป็นรูปตัว V ให้มีความลึกในแนวดิ่งประมาณ 30 เซนติเมตร แล้วนำหน้าดินชั้นแรกทิ้งไป จากนั้นใช้พลั่วมือสแตนเลสแซะเอาเฉพาะดินด้านใดด้านหนึ่งเป็นแผ่นหนาประมาณ 2-3 เซนติเมตร จากปากหลุมถึงก้นหลุม ทำการเก็บดินแต่ละตัวอย่างซ้ำทั้งหมด 4 จุด เก็บเป็นรูปสี่เหลี่ยมแต่ละจุดห่างกัน 1 เมตร จากนั้นนำดินที่ได้มาทำการแบ่งลด

ปริมาณ Quartering จนได้ดินตัวอย่าง 1 กิโลกรัมแบ่งดินออกเป็นสองส่วนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทาง



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างใน อ.น้ำพอง และ อ.เมือง จ.ขอนแก่น

กายภาพ-เคมี และชีวภาพ การเตรียมดินในการวิเคราะห์ทางกายภาพ-เคมีทำโดยนำดินตัวอย่างที่เก็บมานำมาผึ่งให้แห้งในร่มเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรง 2 มิลลิเมตร ยกเว้นดินที่หาความชื้นและความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน และดินที่ใช้ในการศึกษาทางชีวภาพเก็บใส่ในถุงพลาสติกเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. การแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ในดิน

นำดินตัวอย่างที่ไม่ต้องผึ่งให้แห้งมาแยกเชื้อ *B.pseudomallei* ออกจากดินด้วยวิธีการสกัดด้วยสารละลาย polyethylene glycol (PEG) sodium deoxycholate (DOC)

นำดินตัวอย่างมา 100 กรัม เติมสารละลาย PEG-DOC 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการเจือจาง 5 ระดับ จากนั้นเลี้ยงในอาหาร Ashdown's agar นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นำโคโลนีที่ได้มาตรวจสอบดูว่าเป็นเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยการย้อมสีเซลล์ และการตรวจสอบด้วย Latex ที่ใช้สำหรับตรวจเชื้อ

3. การจำแนกชนิดของโปรโตซัว

ทำการเลี้ยงโปรโตซัวโดยนำดินที่เก็บมาเลี้ยงด้วยอาหาร Neff's Amoeba saline (Rønn et al., 1995) (trypic soy broth 1 g l^{-1}) นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการติดตามทุกวันเป็นเวลา 20 วันและทำการบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง ยี่ห้อ Nikon รุ่น Ci-S ประเทศญี่ปุ่น กำลังขยาย 40-400 เท่า ในการตรวจสอบชนิดใช้ดัชนีชีวภาพของบพิธ และนันทพร (2545) บพิธ (2546)

4. การศึกษาปัจจัยทางกายภาพ-เคมีของดิน

ปัจจัยทางกายภาพ-เคมี ที่สำคัญในการบ่งชี้สภาพแวดล้อมที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณความชื้นในดิน ความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน เนื้อดิน ความเป็นกรด-เบส ความเค็ม ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน ปริมาณเคดาลไนโตรเจน ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน สัดส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

4.1 ปริมาณความชื้นในดิน ชั่งดิน 30 กรัม นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง

4.2 ความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน ตัวอย่างดินหนัก 100 กรัม ใส่ในกรวย Buchner เทน้ำกลั่นลงบนดินแค่พอท่วมจากนั้นปล่อยให้ระบายออก เติมน้ำกลั่นอีกครั้งและขังเอาไว้ 16 ชั่วโมง เสร็จแล้วปล่อยน้ำออก ตรวจวัดโดยการหาปริมาณความชื้นในดิน

4.3 ลักษณะเนื้อดิน ดินแห้งหนัก 50 กรัม ทำการกำจัดสารอินทรีย์ในดิน ด้วยสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้นร้อยละ 50 ตรวจวัดด้วยวิธี Hydrometer (Boyoucos, 1962)

4.4 ความเป็นกรด-เบส ดินแห้ง 20 กรัม และน้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตร คนต่อเนื่อง 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน และทำการวัดด้วยเครื่อง pH meter (Jones, 1930)

4.5 ความเค็ม ดินแห้งหนัก 10 กรัม และน้ำปราศจากไอออน 50 มิลลิลิตร ทำการคนต่อเนื่อง 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน และทำการวัดด้วยเครื่อง EC-meter (Jones, 1930)

4.6 ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน นำดินแห้งหนัก 0.2 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร เติมสาร 1 N K2Cr2O7 5 มิลลิลิตร เติม กรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ 3 หยด นำสารละลายมาไตรเตรทกับ 0.5 $FeSO_4$ จุดยุติให้สารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

4.7 ปริมาณอินทรียคาร์บอนในดิน คิดจากปริมาณอินทรียวัตถุในดินที่คาร์บอนร้อยละ 58 มีค่าคงที่เท่ากับ 1.724 (Nelson and Sommers, 1996)

4.8 ปริมาณเคดาลไนโตรเจน ย่อยดินแห้งหนัก 2 กรัม ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มากลั่นและไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.005 N H_2SO_4 ที่จุดยุติเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง (Jackson, 1958)

4.9 ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน ตรวจวัดโดยวิธี สกัดด้วยสารละลาย Bray II (Bray and Kurtz, 1945) ชั่งดินแห้งหนัก 5กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร เติมนำยาสกัด Bray II 25 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเป็นเวลา 5 นาที ทำการกรองทันทีด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 และทำให้เกิดสีด้วยวิธี Molydenum blue ของ Muphy and Riley (1962) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

4.10 สัดส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน คิดจากปริมาณอินทรีย์คาร์บอนหารด้วยปริมาณเคดาลไนโตรเจน

ผลการวิจัย

1. ชนิดของโปรโตซัวที่พบในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei*

จากการศึกษาชนิดของโปรโตซัวในดินที่ปนเปื้อนเชื้อ *B. pseudomallei* จากตัวอย่างดิน 25 ตัวอย่าง พบ11 จุดที่มีรายงานการพบเชื้อ และ 14 จุดควบคุมซึ่งเป็นจุดที่ไม่มีการพบเชื้อ (สุพรรณิภา หวังงาม, 2555) ที่เก็บในเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2554 ระดับความลึก 0-30 เซนติเมตร ผลการศึกษาพบในดินที่พบเชื้อ *B. pseudomallei* พบโปรโตซัว ทั้งสิ้น 6 Class 13 ชนิด ได้แก่ 1) ชั้นคอลโปดี (Class Colpodea) ได้แก่ คอลโปดา คูคัลลัส (*Colpoda cucullus*) 2) ชั้นสพิโรทริเซีย (Class Spirotrichea) ได้แก่ เฮลทีเรีย เกรนดินีลลา (*Halteria grandinella*), *โอซิทริกา ฟอลเลก (Oxytrica fallax)* 3) ชั้นโลโบซี Class Lobosea *ได้แก่ เชาว์ อิลลินอยเซ็น (Chaos illinoisense), ไดอะมีบา แอกควิม (Dinamoeba acuum), อะแคนทามีบา เคสแทลลานี (Acanthamoeba castellanii), ซีซานกูลาเรีย พาวูลา (Sexangularia parvula), อาร์เซลลา วูลากริส (Arcella vulagris)* 4) ชั้นไฟโทมาสทิโกฟอเรีย (Class Phytomastigophorea) ได้แก่ ไมโครกลีนา โอวุม (*Microglena ovum), คริสแอพสิส ซายีน (Chrysapsis sagene)* 5) ชั้นนาสโซฟอเรีย (Class Nassophorea) ได้แก่ พารามีเซียม ทริเซียม (*Paramecium trichium), พารามีเซียม ออราเลีย (Paramecium Aurelia)* 6) ชั้นโปรโทมาเทีย (Class Protomatea) ได้แก่ *แอคติโนโบลิน่า เรเดียนส์ (Actinobolina radians)*

จากการศึกษาชนิดของโปรโตซัวในดินพบว่าชนิดของโปรโตซัวที่พบเฉพาะในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei* มี 2 ชนิด โปรโตซัวที่พบในดินไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* มี 7 ชนิด และโปรโตซัวที่พบร่วมกันในดินทั้งสองมี 12 ชนิด

จากการศึกษาพบโปรโตซัวจำพวกซิเลีย [ชั้น คอลโปดี (Class Colpodea), ชั้น สพิโรทริเซีย (Spirotrichea), (Nassophorea)] จะพบมากที่สุดร้อยละ 42 รองลงมาเป็นอะมีบา [ชั้นโลโบซี (Class Lobosea)] ร้อยละ 35 และแฟลเจลลา [ชั้นไฟโทมาสทิโกฟอเรีย (Class Phytomastigophorea)] ร้อยละ 14

จากการศึกษาของตัวอย่างควบคุม 15 ตัวอย่างพบชนิดของโปรโตซัว 10 class 19 ชนิด ได้แก่ 1) ชั้น โอลิโกไฮมีนอฟอรา (Class Oligohymenophora) ได้แก่ *ไซลิเดียม กลอคอมา (Cyelidium glaucoma), เตตระไฮมีนา ไพริฟรอมิส (Tetrahymena pyriformis)* 2) ชั้นคอลโปดี (Class Colpodae) ได้แก่ คอลโปดา คูคัลลัส (*Colpoda cucullus*) 3) ชั้นโลโบซี Class Lobosea ได้แก่ *อะแคน*

ตารางที่ 2 ชนิดของโปรโตซัวที่พบในตัวอย่างดิน

	ดินที่พบเชื้อ *B. pseudomallei*	ดินที่ไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei*
Acanthamoeba castellanii	++	++
○ ***Acineria incurvata***	+	
Actinobolina radians	+	+
□ ***Actinophrys sol***		+
Arcella vulagris	+	+
□ *Bodo caudatus*		+
Chaos illinoisense	++	++
Chrysapsis sagene	+	+
Colpoda cucullus	+++	+++
□ *Cyelidium glaucoma*		+
Dinamoeba acuum	++	+
○ *Halteria grandinella*	+	
□ *Holophrya simplex*		+
□ *Loxodes magnus*		+
□ *Oikomonas termo*		+
Oxytrica fallax	++	++
Microglena ovum	++	+++
Paramecium aurelia	++	++
Paramecium trichium	+	+
Sexingularia parvula	+++	+++
□ *Tetrahymena pyriformis*		++
รวม	13	19

+ คือ พบโปรโตซัวชนิดนั้น

\+ = พบโปรโตซัวชนิดนั้นจำนวนน้อย

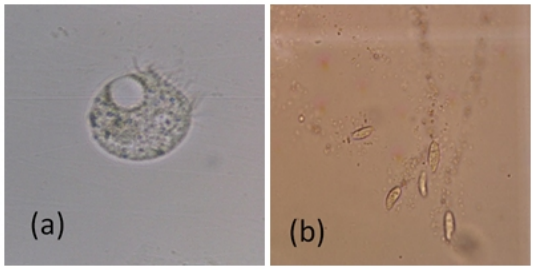
++ = พบโปรโตซัวชนิดนั้นจำนวนปานกลาง

+++ = พบโปรโตซัวชนิดนั้นจำนวนมาก

○ = พบเฉพาะในดินที่ไม่มีเชื้อ *B. pseudomallei*

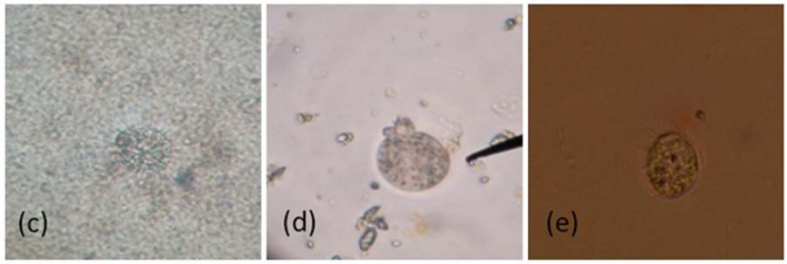
□ = พบเฉพาะในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei*

ว่าง = พบทั้งหมด



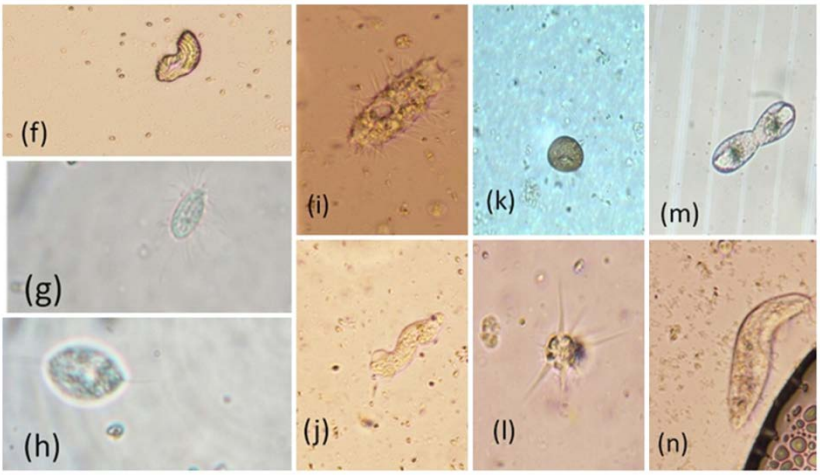
ภาพที่ 2 โปรโตซัวในดินที่พบ *B. pseudomallei*

(a) *Halteria grandinella* (b) *Acineria incurvata*



ภาพที่ 3 โปรโตซัวในดินที่ไม่พบ *B. pseudomallei*

(c) *Actinophrys sol* (d) *Holophrya simplex* (e) *Tetrahymena pyriformis*



ภาพที่ 4 โปรโตซัวที่พบทั่วไปในดินที่พบและไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei*

(f) *Colpoda cucullus* (g) *Actinobolina radians* (h) *Microglena ovum* (i) *Acanthamoeba castellanii* (j) *Chaos illinoisense* (k) *Arcella vulagris* (l) *Dinamoeba acuum* (m) *Sexingularia parvula* (n) *Oxytrica fallax*

ทามีบา เคสแทลลานี (Acanthamoeba castellanii), เชาว์ อิลลินอยเซ็น (Chaos illinoisense), อาร์เซลลา วูลการิส (Arcella vulgaris), ไดอะมีบา แอกควิม (Dinamoeba acuum), ซีซานกูลาเรีย พาวูลา (Sexangularia parvula) 4) ชั้นฮิวเอียสโซอี (Class Heliozoea) ได้แก่ แอคติโนพลิส ซอล *(Actinophrys sol)* 5) ชั้นสไปโรทริกา (Class Spirotricha) ได้แก่ *โอซิทริกา ฟอลเลก (Oxytricha fallax)* 6) ชั้น โปรโทเมเทีย (Class Protomatea) ได้แก่ แอคติโนโบลินา *เรเดียนส์* (*Actinobolina radians), โฮโลไฟรยา ซิมเพล็กซ์ (Holophrya simplex* 7) ชั้นคารีรีโอลิกเทีย (Class KaryreolicteaX ได้แก่ โลโซเดส แม็กนัส (*Loxodes magnus)* 8) ชั้นนาสโซฟอเรีย (Class Nassophorea) ได้แก่ พารามีเซียม ออรีเรีย *(Paramecium Aurelia), พารามีเซียม ทริคเซียม (Paramecium trichium*) 9) ชั้นซูมาสติโกฟอเรีย (Class Zoomastigophorea) ได้แก่ โบโด ควอดาทัส*(Bodo caudatus)* 10) ชั้นไฟโทมาสทิโกฟอเรีย Class Phytomastigophorea ได้แก่ ไมโครกลีนา โอวุม(*Microglena ovum), โออิโคโมเนส เทอร์โม Oikomonas termo, คริสแอพสิส ซายีน (Chrysapsis sagene)* โดยการศึกษาพบว่ามีโพรโทซัวจำพวกซิเลียมากที่สุดร้อยละ 47 [ชั้นโอลิโกไฮมีโนฟอรา (Class Oligohymenophora), คอลโปดี (Colpodae), นาสโซฟอเรีย (Nassophorea), สไปโรทริชา (Spirotricha), โปรโทมาเทีย (Protomatea), คารีรีโอลิคเทีย(Karyreolictea)] รองลงมาเป็นอะมีบา [ชั้นโลโบซี (Class Lobosea), ฮิวเอียสโซอี (Heliozoea)] ร้อยละ29 และแฟลเจลลา [ชั้นไฟโทมาสทิโกฟอเรีย (Class Phytomastigophorea), ซูมาสทิโกฟอเรีย (Zoomastigophorea)] ร้อยละ 24

2) ปัจจัยทางกายภาพของดินที่พบเชื้อ *B. pseudomallei* ปัจจัยทางกายภาพของดินที่พบจากการศึกษาปัจจัยทางกายภาพ-เคมีในดินที่พบเชื้อลักษณะของเนื้อดินส่วนใหญ่เป็นทรายปนดินร่วน ดินเป็นกรดเล็กน้อยมีค่า pH 6.15±0.83 ความชื้นดินมีค่าร้อยละ 19.01±10.04 ดินไม่เค็มมีค่าการนำไฟฟ้า 0.13±0.26 dS/m อินทรียวัตถุในดินอยู่ในระดับปานกลางมีค่าร้อยละ 1.5±1.11 ความสามารถในการอุ้มน้ำของดินมีค่าร้อยละ 24.76±12.12 ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนในดินมีค่าร้อยละ 0.1±0.54 ปริมาณเคดาลไนโตรเจน 139.97±60 mg/kg สัดส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน 50.21±20.05 ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน 26.64±34.15 mg/kg การพบโปรโตซัวในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างมีความเกี่ยวเนื่องกับปัจจัยทางกายภาพและเคมีของดิน

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่พบในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei* มีโปรโตซัว 13 ชนิด ได้แก่ *อะแคนทามีบา เคสแทลลานี (Acanthamoeba castellanii),คอลโปดา คูคัลลัส (Colpoda cucullus)*, เฮลทีเรีย เกรนดินีลลา *(Halteria grandinella), โอซิทริกา ฟอลเลก (Oxytrica fallax), เชาว์ อิลลินอยเซ็น(Chaos illinoisense), ไดอะมีบา แอกควิม (Dinamoeba acuum), อะแคนทามีบา เคสแทลลานี (Acanthamoeba castellanii), ซีซานกูลาเรีย พาวูลา (Sexangularia parvula), อาร์เซลลา วูลการิส (Arcella vulagris)*, ไมโครกลีนา โอวุม *(Microglena ovum), คริสแอพสิส ซายีน(Chrysapsis sagene), พารามีเซียม ทริคเซียม (Paramecium trichium),* พารามีเซียม ออรีเรีย *Paramecium aurelia* และ*แอคติโนโบลิน่า เรเดียนส์ Actinobolina radians* ชนิดของโปรโตซัวที่มีความชุมมากที่สุด คือ *Colpoda cucullus* โดยโปรโตซัวชนิดนี้เป็นพวกซิลิเอท โปรโตซัวดินที่พบได้ทั่วไป กินแบคทีเรียเป็นอาหารสามารถอยู่ในดินที่มีความแห้งแล้งได้และสามารถอยู่ได้ในดินทุกประเภท ชนิดที่มีความชุมรองลงมา คือ อะมีบา Class Lobosea ซึ่งโปรโตซัวชนิดนี้มักอาศัยอยู่ในดินที่เป็นทราย (บพิธ, 2546) จึงทำให้พบได้ในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งการศึกษาพบว่าดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei* มีลักษณะเป็นดินทรายมีความชื้นน้อยสอดคล้องกับ Palasatien (2008) และสุพรรณิภา (2555) ที่พบว่าบริเวณที่เชื้อ *B. pseudomallei* อาศัยอยู่มีลักษณะส่วนใหญ่เป็นดินทราย

โปรโตซัวในดินมักอาศัยอยู่ในดินที่มีความชื้น จากการศึกษาพบว่าความชื้นของดินมีผลต่อความหลากหลายและความชุกชุมของโปรโตซัว (Bamforth, 2007) ดินที่พบเชื้อ *B. pseudomallei* ส่วนใหญ่เป็นดินทรายปนร่วนทำให้พบโปรโตซัวส่วนใหญ่เป็นพวกอะมีบาส่วนซิลิเอตและแฟลกเจเลตที่ชอบอาศัยอยู่ในที่ชื้นจะพบน้อยกว่า (บพิธ, 2546) ค่า pH ในดินที่พบเชื้อ *B. pseudomallei* มีความเป็นกรดเล็กน้อย (Palasatien, 2008) ซึ่งโปรโตซัวมักอาศัยอยู่ในดินที่มีค่า pH 6-7 จึงทำให้พบโปรโตซัวได้ จากการศึกษาของ Inglis and Sagripanti (2006) พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถมีชีวิตอยู่รอดในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 2.5 จากผลการศึกษาพบว่าดินที่มีเชื้อเป็นดินไม่เค็มมีค่า 0.13 จึงทำให้พบเชื้อนี้ได้ ความสามารถในการอุ้มน้ำของดินมีน้อยเพราะเป็นดินร่วนปนทรายซึ่งเป็นดินที่เชื้อ *B. pseudomallei* อาศัยอยู่อย่างชุกชุม (Palasatien, 2008) ปัจจัยทางเคมีและฤดูกาลยังมีผลต่อความหลากชนิดของโปรโตซัวในฤดูฝนมีปัจจัยที่ทำให้เกิดความชุกชุมของโปรโตซัวเช่น ปริมาณฟอสฟอรัสจะมีค่าสูงมากกว่าในฤดูแล้ง จากการศึกษาของ สุพรรณิภา (2555) พบว่า ในฤดูฝนจะมีปริมาณเคดาลไนโตรเจนมากกว่าฟดูแล้ง เช่นเดียวกับค่าปริมาณไนโตรเจนซึ่งเป็นปัจจัยสนับสนุนความอุดมสมบูรณ์ของดินทำให้มีความหลากชนิดและความชุกชุมของโปรโตซัวในฤดูฝนมีการชะอินทรียวัตถุสูงจึงเป็นการส่งเสริมให้โปรโตซัวกลุ่มที่กินซากอินทรียวัตถุและแบคทีเรียเป็นอาหารสามารถเจริญเติบโตได้ดี (ยุวรัตน์, 2553)

เอกสารอ้างอิง

บพิธ จารุพันธุ์. 2546. โพรโทซัววิทยา. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บพิธ จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์. 2545. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังI:โพรโทซัวถึงทาร์ดิกราดา. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มงคล ตั๊ะอุ่น. 2548. เทคนิคและการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการดิน พืช น้ำ และปุ๋ย. ขอนแก่น. สหมิตรการพิมพ์

ยุวรัตน์ ปรมีศนาภรณ์. 2010. การศึกษาคุณภาพและความหลากหลายชนิดของโปรโตซัวในแม่น้ำเจ้าพระยา จังหวัดนนทบุรี. SDU Res(1): Jan-Dec

สุพรรณิภา หวังงาม. 2555. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในดินที่มีอิทธิพลต่อการกระจายของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในจังหวัดขอนแก่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ ประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Bamforth, SS. 2007. "Protozoa from aboveground and ground soils of a tropical rain forest in Puerto Rico." Pedobiologia **50**(6): 515-525.

Bray II, RH. and LT. Kurtz. 1945 Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. Soil Sci. 59: 39-45.

Bouyoucos, GJ, 1962. Hydrometer method improved for making partile size analysis of soils. Agron J, 54:464-465

Chaowagul, WNJ. White, et al. 1989. "Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand." J Infect Dis 159(5): 890-9.1/95. Bartels und Wernitz Druck, München, Germany

Dance, DA. 1991b. *Pseudomonas pseudomallei*: danger in the paddy fields. Trans R Soc Trop Med Hyg,85(1, 1-3).

Howard, K. and Inglis, TJJ. 2005. "Disinfection of *Burkholderia pseudomallei* in potable water." Water Research 39(6): 1085-1092.

Inglis,. TJ., and Sagripanti, JL. 2006. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkhoderia pseudomallei*. Appl Environ Micro biol, 72(11), 6865-6875

Inglis, TJJ, P. Rigby, et al. 2000. Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* Species Results in Coiling Phagocytosis, Endamebic Bacterial Survival, and Escape." Infection and Immunity. 68(3): 1681- 1686.

Jones, J. 1930. Laboratory guide forconducting soil test plant analysis. Boca Raton: CRC Press. 363p.

Kanai K, Kondo E. 1994. Rencent advances in biomedical sciences of *Burkholderia pseudomallei* (basonym: *Pseudomonas pseudomallei)*. Jpn J Med Sci Biol. 47:1-45.

Marciano-Cabral, F. and G. Cabral. 2003. "Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans." Clin Microbiol Rev 16(2): 273-307.

Murphy, J., and, JR., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal Chem Acta. 27: 31-36

Nelson, DW., and Sommers, LE. 1996. Methods of soil analysis. Wisconsin: Madison

Palasatien, S., R. Lertsirivorakul, et al. 2008. "Soil physicochemical properties related to the presence of *Burkholderia pseudomallei*." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 102(Supplement 1): S5-S9.

Rønn, R., Ekalund, F., Christensen, S. 1995. Optimizing soil extract and broth medis for MPN enumeration of naked amoebea and heterotrophic flagellates in soil. Pedobiologia 39:10-19

Yabuuchi, E. and M. Arakawa. 1993. "*Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: be aware in temperate area." Microbiol Immunol. 37(11): 823-36.

Yang HM, Chaowagul W, Sokol PA. Siderophore production by *Pseudumonas pseudomallei.* Infect Immun. [Research Sopport, Non-U.S. Gov't. 1991 Mar. 59(3):776-80

Walkley, A., and Black, LA. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil Oeganic matter On a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science. 37, 29-38.

Wongpokhom, N., Kheoruenromne, I., Suddhiprakarn, A. and Gilkes, R. J. 2008. Micromorphological properties of salt affected soils in Northeast Thailand. Geoderma. 144(1-2), 158-170.