ตอนที่ 1 การทำฐานข้อมูลของซิลิเอต

นำซิลิเอตที่คัดแยกได้จากวิธี CDMI มาเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณ 10^5 cell/mL แล้วนำไปทำตามขั้นตอนดังนี้

1. การสกัด DNA โดยใช้ชุด QIAamp DNA Mini Kit QIAamp®

สกัด DNA ของซิลิเอต โดยใช้ชุด QIAamp DNA Mini Kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook จากนั้นนำตัวอย่าง DNA ของซิลิเอตที่สกัดได้มาวัดปริมาณของ DNA โดยวิธี gel electrophoresis 0.8% (wt/vol) บน agarose gel ที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 V ด้วยเครื่อง Gel Electrophoresis System (ยี่ห้อ Advance รุ่น 1ADV – EXU – 1 ประเทศญี่ปุ่น) และนำไปย้อมสีใน ethidium bromide เป็นเวลา 3 นาที ปริมาณของ DNA อยู่ใน agarose gel จากนั้นเก็บตัวอย่าง DNA ของซิลิเอตที่ไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มจำนวน DNA ของซิลิเอตจาก DNA ที่สกัดเก็บเอาไว้ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer CS322F และ EU581RGC ตามตารางที่ 1 โดยในสารผสมปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA Template ของซิลิเอตปริมาตร 3 ไมโครลิตร 1×Reaction Buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 10mMdNTP ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร DMSO (dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 1.25 UTaq Polymerase ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง PCR Machines Cycler (รุ่น Veriti 96-Well Thermal Cycler ยี่ห้อ Applied Biosystems ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตั้งค่าเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 4 องศาเซลเซียส, จำนวน 35 รอบ (Shimano et al., 2012)

ตารางที่ 1 Primer สำหรับเพิ่มจำนวน DNA ของซิลิเอตในการศึกษานี้

Primer	Sequence (5'-3')	Position
CS322F	GATGGTAGTGTATTGGAC	313–330
EU581RGC	GCclamp-ATTACCGCGGCTGCTGGC	557–574

3. การแยก DNA ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

นำPCR product ที่ได้จากขั้นตอน PCR amplification ตัวอย่างละ 150 นาโนกรัม มาโหลดในเจล 8% polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide ratio 37.5:1) ที่ความเข้มข้น 30% - 60% (100% denaturant defined as 7 M urea and 40% deionised formamide) ที่มีความหนา 0.75 mm. (Green et al., 2010) ในสารละลาย 1×TAE buffer ตั้งค่าระบบเครื่อง DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (ยี่ห้อ Cleaver รุ่น VS20 ประเทศอังกฤษ) ซึ่งเป็นแบบ D-code ระยะเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 80V หลังจากนั้นการย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล Gel Documentation (ยี่ห้อ BIO – RAD ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์) และจัดเก็บรูปภาพการเคลื่อนที่ของแถบ DNA เป็นฐานข้อมูลของซิลิเอต

4. การตรวจสอบแถบ DNA จากขั้นตอน DGGE ด้วยการ Sequencing

ตัดแถบ DNA ที่บน polyacrylamide gel ที่ได้จากขั้นตอน DGGE แต่ละชิ้นใส่ลงในหลอด PCR tube เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตรให้ท่วมชิ้นเจลทิ้งไว้เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำส่วนใสมาปริมาตร 2 ไมโครลิตรมาเข้าสู่

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) นำ PCR product ที่ได้มาสกัด DNA โดยใช้ชุด HiYield ™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 9 หลังจากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปส่งไป Sequencing เมื่อได้ข้อมูลมาให้นำมา BLAST เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (Jousset et al.,2010) แล้วจัดเก็บรูปภาพและผลวิเคราะห์จากการ Sequencing เป็นฐานข้อลูมของซิลิเอตแต่ละชนิด

ตอนที่ 2 การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของซิลิเอต

นำตัวอย่างดินทั้งหมด 6 จุด มาเข้าสู่ขั้นตอนการสกัด DNA โดยใช้ชุด QIAamp DNA Mini Kit QIAamp® แล้วเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) แล้วนำไปแยก DNA ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และตวจสอบแถบ DNA จากขั้นตอน DGGE ด้วยการวิเคราะห์ Sequencing แล้วนำข้อมูลมาจำแนกชนิดของซิลิเอตโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่จัดทำไว้จาก ตอนที่ 1 การทำฐานข้อมูลของซิลิเอต รวมถึงการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ผลการวิจัย

1. ชนิดของซิลิเอตในดินโดยวิธีการคัดแยกและจำแนกจากสัณฐานวิทยา (Culture dependent and morphological identification; CDMI)

จากการศึกษาความหลากชนิดของซิลิเอตที่พบในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei* จากตัวอย่างดิน 6 ตัวอย่างด้วยวิธี CDMI พบซิลิเอตทั้งหมด 3 Class 4 ชนิดได้แก่ 1) Class Colpodea ได้แก่*Colpoda steinii*, *Colpoda inflate* 2) Class Oligohymenophorea ได้แก่ *Tetrahymena* Sp. และ 3) Class Ciliophora ได้แก่ *Leptopharynx costatus*

โดยพบว่า St-28 และ St-39 พบจำนวนชนิดของซิลิเอตมากที่สุด 3 ชนิด ดังนี้ St-28 พบ *Colpoda steinii*, *Colpoda inflate* และ *Leptopharynx costatus* St-39 พบ *Colpoda steinii*, *Colpoda inflate* และ *Tetrahymena* Sp. ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า St-28 และ St-39 ตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* มากที่สุด 2 อันดับแรกตามลำดับ ในขณะที่บริเวณอื่นๆพบซิลิเอต 2 ชนิด ตามรายละเอียดในตารางที่ 2 ซิลิเอตชนิดที่พบบ่อยที่สุดคือ *Colpoda steinii* ซึ่งสอดคล้องกับ Keller (2014) มีการรายงานว่าซิลิเอตชนิดนี้เป็นส่วนหนึ่งของสายวิวัฒนาการของเชื้อ *B. pseudomallei* นอกจากนี้ซิลิเอตยังส่งผลต่อเซลแบคทีเรียยังเซลล์โดยซิลิเอตจะไปยับยั้งกิจกรรมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในระบบนิเวศทำให้พบ *Colpoda steinii* ในจุดที่พบเชื้อ *B. Pseudomallei* ทุกจุด

ตารางที่ 2 ชนิดซิลิเอตที่พบตามสถานีเก็บตัวอย่างดิน

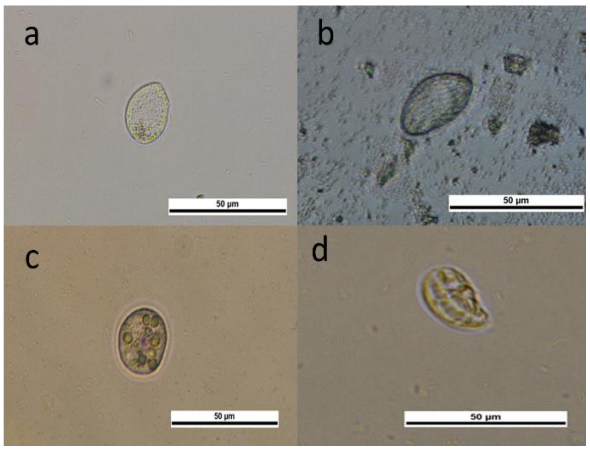
Ciliates	สถานีเก็บตัวอย่าง					
	St-09	St-28	St-36	St-39	St-46	St-47
Colpoda steinii		+	+	+	+	+
	+					
Colpoda inflate	+	+	+	+		
Tetrahymena sp.				+	+	+
Leptopharynx costatus		+				

+ คือ พบซิลิเอต (ว่าง) = ไม่พบ

จากการศึกษาพบ *Leptopharynx costatus* เพียงจุดเดียวจากพื้นที่ที่ศึกษาทั้งหมดคือ St-28 เนื่องจากเป็นบริเวณนาข้าว ติดคลองชลประทานซึ่งแตกต่างจากจุดเก็บตัวอย่างอื่นๆ (ตารางที่ 3) จึงทำพบซิลิเอตชนิดจุดเดียว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Omar (2012) ที่มีการรายงานว่าพบ *Leptopharynx costatus* ในบริเวณที่เป็นผิวน้ำ เขตกลางน้ำ หรือบริเวณที่เป็นน้ำไหล รวมถึงบริเวณบนบกใกล้แหล่งน้ำและบริเวณที่มีการปลูกข้าวสาลี

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพและเคมีตามสถานีเก็บตัวอย่างดิน

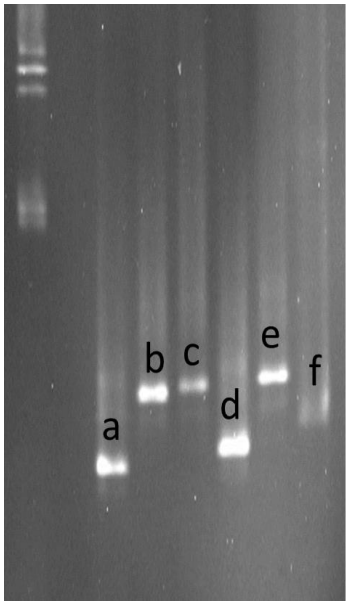
สถานีเก็บตัวอย่าง	การใช้ประโยชน์ที่ดิน	pH	WHC (%)
St-09	พื้นที่ว่างเปล่าติดถนน มีต้นไม้ปกคลุม	5.72	22.03
St-28	นาข้าว ติดคลองชลประทาน	5.03	53.18
St-36	สวนยางพารา	6.05	17.75
St-39	สวนมะม่วง	5.48	22.49
St-46	พื้นที่ว่างเปล่า	7.36	29.56
St-47	พื้นที่ว่างเปล่า	5.58	27.44



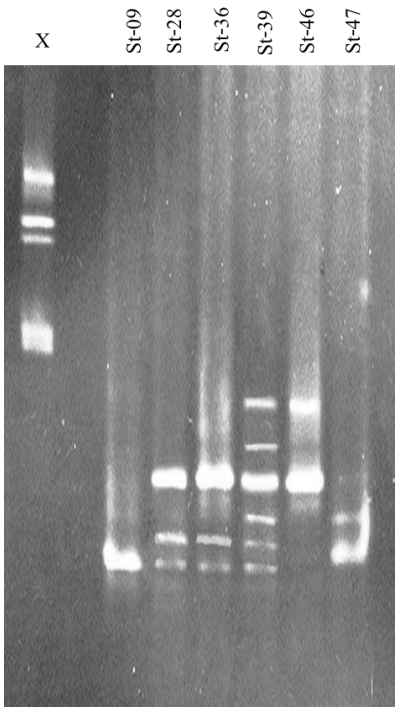
ภาพที่ 2 ชนิดของซิลิเอตที่พบในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei* a=*Colpoda steinii* b= *Colpoda inflate* c=*Tetrahymena* sp., d=*Leptopharynx costatus*

2. ชนิดของซิลิเอตในดินโดยการใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

จากการศึกษาความหลากชนิดของซิลิเอตในตำแหน่งเดียวกันโดยการใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) พบซิลิเอตเพิ่มจากเดิม 2 ชนิดคือ *Colpoda Lucida*, *Oxitrichidae* Sp. โดยพบ *Colpoda Lucid* จากจุดเก็บตัวอย่างดิน St-28, St-36, St-39 และ *Oxitrichidae* Sp. ภาพที่ (3) จากจุดเก็บตัวอย่างดิน St- 39 เพียงจุดเดียว จึงเป็นไปได้ว่าซิลิเอตสองชนิดนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ จึงไม่สามารถหาชนิดของซิลิเอตทั้งสองชนิดด้วยวิธี CDMI ได้ เนื่องจากอาจมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่จะทำให้ซิลิเอตทั้ง 2 ชนิดเจริญเติบโตได้ตามปกติ นอกจากนี้ยังได้นำแถบ DNA ทั้งหมดไปวิเคราะห์ Sequencing จึงทำให้ได้ข้อมูลชนิดของซิลิเอตที่มีความเชื่อมั่นมากกว่า 95 % จากการศึกษาจึงได้จัดเก็บฐานของมูลของซิลิเอตทั้งหมด 6 ชนิดนี้ไว้ในรูปแบบของภาพแสดงแถบของ DNAของซิลิเอตแต่ละชนิดที่มีลักษณะการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้เปรียบเทียบชนิดของซิลิเอตในการตรวจติดตามต่อไป (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แผ่นเจล polyacrylamide gels แสดงแถบ DNA ของซิลิเอตแต่ละชนิดที่มีเคลื่อนที่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DGGE บน 8%polyacrylamide gels ได้แก่ a. *Colpoda steinii*, b. *Colpoda inflate*, c. *Colpoda lucida*, d. *Leptopharynx costatus*, e. *Tetrahymena* Sp., f. *Oxitrichidae* Sp.



ภาพที่ 2 แผ่นเจลแสดงแถบ DNA ของซิลิเอตที่ตำแหน่งต่างกัน ตามชนิดของซิลิเอตในจุดเก็บตัวอย่างดินทั้ง 6 จุด เมื่อเทียบฐานข้อมูลแถบ DNA ของซิลิเอตแต่ละชนิด ดังนี้ St-09 พบ 1 ชนิดคือ *Colpoda steinii* St-28 พบ 3 ชนิดคือ *Colpoda steinii*, *Colpoda lucida* และ *Leptopharynx costatus* St-36 พบ 4 ชนิดคือ *Colpoda steinii*, *Colpoda inflate*, *Colpoda Lucida* และ *Leptopharynx costatus* St-39 พบทุกชนิดทั้งหมด 6 ชนิด St-46 พบ 2 ชนิดคือ *Colpoda inflate* และ *Oxitrichidae* Sp. และ St-47 พบ 2 ชนิดคือ *Colpoda steinii* และ *Leptopharynx costatus* X=marker

นอกจากนี้จากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 6 จุด พบว่า St-39 เป็นจุดที่พบชนิดของซิลิเอตเพิ่มขึ้นจากเดิม 3 ชนิด รวมทั้งหมดเป็น 6 ชนิด ซึ่งเป็นบริเวณที่พบมากที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณอื่น จากการตรวจสอบเชื้อ *B. pseudomallei* บริเวณนี้เป็นจุดที่พบเชื้อมากที่สุดจึงมีผลทำให้พบชนิดของซิลิเอตมากกว่าบริเวณอื่นๆ บริเวณที่พบชนิดซิลิเอตน้อยที่สุดคือ St-09 ที่พบ *Colpoda steinii* เพียงชนิดเดียวโดยจากการตรวจสอบเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่าตรวจพบเชื้อน้อยที่สุดจาก 6 จุดจากการศึกษาของ Purves (2005) เมื่อแบคทีเรียมีจำนวนมากโพรโทซัวจะค่อยๆเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ และมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น มีการกินที่มากขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรียมีจำนวนลดลง เมื่อมีอาหารน้อยลงโพรโทซัวจะเริ่มตายและลดจำนวนลง ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถที่จะเพิ่มจำนวนขึ้น และเมื่อมีอาหารเพิ่มมากขึ้นโพรโทซัวก็จะเพิ่มจำนวนขึ้นตามไปด้วย (Purves, 2005) จึงมีความเป็นไปได้ที่บริเวณนี้จะพบชนิดของซิลิเอตน้อยเนื่องจากแบคทีเรียมีจำนวนไม่มากพอที่จะเป็นอาหารของซิลิเอต

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเปรียบเทียบชนิดของซิลิเอตในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) กับวิธีการคัดแยกและจำแนกด้วยสัณฐานวิทยา (Culture dependent and morphological identification; CDMI) จากจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 6 จุด พบว่า วิธี CDMI พบซิลิเอตทั้งหมด 4 ชนิดได้แก่ *Colpoda steinii*, *Colpoda inflate*, *Tetrahymena* Sp., *Leptopharynx costatus* ในขณะที่เทคนิค DGGE นอกจากพบทั้ง 4 ชนิดเดิมแล้วยังพบซิลิเอตเพิ่มขึ้น 2 ชนิดได้แก่ *Colpoda lucida* และ *Oxitrichidae* Sp. ซึ่งสรุปได้ว่าเทคนิค DGGE สามารถทราบชนิดของซิลิเอตได้มากกว่า วิธี CDMI ซึ่งใช้อยู่เดิม และรวดเร็วกว่าโดย DGGE สามารถทราบชนิดของซิลิเอตภายใน 2 วัน ขณะที่ CDMI ใช้เวลา 1 เดือน นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าใช้จ่ายในการดำเนินการทดลองได้ (Anupama et al., 2015) รวมถึงยังสามารถแก้ปัญหาที่พบ เช่น การไม่สามารถเพาะเลี้ยงและคัดแยก จึงเหมาะที่จะใช้ติดตามการเปลี่ยนแปลงในสิ่งแวดล้อมหรือใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อไป (Altenburger et al., 2010)

ซิลิเอตที่พบในดินที่มีเชื้อ *B. pseudomallei* ส่วนใหญ่คือ Class Colpodea แสดงว่าลักษณะทางกายภาพเคมีของดินที่มี pH อยู่ในช่วงประมาณ 5-7, WHC ประมาณ 20%-55% รวมถึงพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่เกษตรกรรมเพาะปลูกและนาข้าวจึงเหมาะแก่การที่เชื้อ *B. pseudomallei* และซิลิเอต Class Colpodea จะเจริญเติบโตได้ด้วยกัน นอกจากนี้การพบซิลิเอต *Colpoda lucida* ร่วมกับเชื้อ *B. pseudomallei* แทบทุกจุดเก็บตัวอย่างทำให้มีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของเชื้อ *B. pseudomallei* และสามารถนำตรวจติดตามชนิดของซิลิเอต ในแหล่งที่อยู่อาศัยอื่นได้ (Jousset et al., 2010)

เอกสารอ้างอิง

บพิธ จารุพันธุ์. โพรโทซัววิทยา. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2546.

บพิธ จารุพันธุ์, นันทพร จารุพันธุ์. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโพรโทซัว ถึง ทาร์ดิกราดา. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2545.

Altenburger A, Ekelund F, Jacobsen CS.Protozoa and their bacterial prey colonize sterile soil fast. Soil Biology and Biochemistry 2010; 42 (9), 1636-1639.

Green SJ, Leigh MB, Neufeld JD. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for Microbial Community Analysis. In K. Timmis (Ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology 2010; 4137-4158.

Inglis J, Rigby P, Robertson TA, Dutton NS, Henderson M, Chang BJ. Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba species* results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape. Infection and Immunity 2000; 68(3): 1681-1686.

Inglis J, Sagripanti JL. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. Applied and Environmental Microbiology 2006; 72(11): 6865-6875.

Jousset A, Lara E, Nikolausz M, Harms H, Chatzinotas A. Application of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique as an efficient diagnostic tool for ciliate communities in soil. Science of The Total Environment 2010; 408(5): 1221-1225.

Keller T, Jousset A, Overbeek L, Elsas JD, Costa R. The Freshwater Sponge *Ephydatia fluviatilis* Harbours Diverse *Pseudomonas* Species (*Gammaproteobacteria, Pseudomonadales*) with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity. PLOS ONE 2014; 9(2).

Omar A, Foissner W. Description of *Leptopharynx brasiliensis* nov. spec. *and Leptopharynx costatus gonohymen* nov. subspec. (Ciliophora, Microthoracida). European Journal of Protistology 201; 48(1): 30-47.

Palasatien S, Lertsirivorakul R, Royros P., Wongratanacheewin S, Sermswan RW. (Soil physicochemical properties related to the presence of *Burkholderia pseudomallei*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Supplement 2008; 1(0): S5-S9.

Peacock SJ, Chieng G, Cheng AC, Dance AB, Amornchai P, Wongsuvan G, Wuthiekanun V. Comparison of Ashdown's Medium, *Burkholderia cepacia* Medium, and *Burkholderia pseudomallei* Selective Agar for Clinical Isolation of *Burkholderia pseudomallei.* Journal of Clinical Microbiology 2005; 43(10): 5359-5361.

Purves WK, Orians GH, Heller HC (2005). Life: The Science of Biology. Avialable from http://www.globalchange.umich.edu/globalhange1/current/lectures/predation/predation.html

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

Shimano S, Sambe M, Kasahara Y. Application of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) for the analysis of ciliate communities in soils Microbes Environ 2012; 27: 136-141.

Suebrasri T, Wang-Ngarm S, Chareonsudjai P, Sermswan RW, Chareonsudjai S. Seasonal variation of soil environmental characteristics affect the presence of *burkholderia pseudomallei* in khon kaen, Thailand. African J Microbiol Res 2013; 7: 1940-1945.

Trung TT, Hetzer A, Topfstedt E, Gohler A, Limmathurotsakul D, Wuthiekanun V. Improved culture-based detection and quantification of *Burkholderia pseudomallei* from soil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2011; 105(6): 346-351.

Vaerewijck MJ, Sabbe K, Bar J, Houf K. Microscopic and Molecular Studies of the Diversity of Free-Living Protozoa in Meat-Cutting Plants. Applied and Environmental Microbiology 2008; 74: 5741-5749.

Wadowsky RM, Wilson TM, Kapp NJ, West AJ, Kuchta JM, States SJ, Yee RB. Multiplication of Legionella spp. in tap water containing Hartmannella vermiformis. Applied and environmental microbiology 1991; 57(7): 1950-1955.

Wuthiekanun V, Dance DA, Wattanagoon Y, Supputtamongkol Y, Chaowagul W, White NJ. The use of selective media for the isolation of *Pseudomonas pseudomallei* In clinical practice. J Med Microbiology 1990; 33(2): 121-126.