

การศึกษาคุณภาพน้ำและความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus*
ในบริเวณถ้ำเขาติ้ว อำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม
และการจัดการทรัพยากร

สิงหาคม 2559

การศึกษาคุณภาพน้ำและความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus*
ในบริเวณถ้ำเขาคีวะ อำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม
และการจัดการทรัพยากร

สิงหาคม 2559

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาคุณภาพน้ำและความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus*
ในบริเวณถ้ำเขาคีวะ อำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม
และการจัดการทรัพยากร

สิงหาคม 2559

ชไมพร ยอดคง. (2559). การศึกษาคุณภาพน้ำและ ความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลของปลาสกุล

Rasbora และ *Esomus* ในบริเวณถ้ำเขาติเว อำเภอลองหาด จังหวัดสระแก้ว. ปริญญา

นิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากร). กรุงเทพฯ: บัณฑิต

วิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ดร.อรินทน์ งามนิยม, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนายท ศรียาภัย, ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ดร.กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (ยีน 16S rDNA และ COI) ของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* ในถ้ำน้ำเขาติเว อำเภอลองหาด จังหวัดสระแก้ว การศึกษาเริ่มจากการสำรวจถ้ำเบื้องต้น พบว่า ถ้ำน้ำเขาติเวเป็นถ้ำที่มีน้ำไหลผ่านตลอดทั้งปี ถ้ำมีความยาวจากปากถ้ำจนถึงจุดสุดท้ายที่ทำการสำรวจประมาณ 300 เมตร ถ้ำนี้ยังไม่สามารถสำรวจจนสุดถ้ำได้ เนื่องจากมีน้ำท่วมบริเวณทางสำรวจทำให้ไม่สามารถเข้าไปสำรวจต่อได้ ระดับความลึกของน้ำประมาณ 10-220 เมตร ตัวอย่างน้ำถูกเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 จุด ใน 3 ช่วงเวลา คือ ช่วงฤดูร้อน ช่วงฤดูฝน และช่วงฤดูหนาว เพื่อนำไปตรวจคุณภาพของน้ำ ผลการศึกษาคุณภาพน้ำบริเวณถ้ำเขาติเวทั้ง 3 ฤดู เปรียบเทียบกับคุณภาพของตัวอย่างน้ำจากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ และเปรียบเทียบกับมาตรฐานคุณภาพน้ำประเทศไทยของกรมควบคุมมลพิษ พบว่า ตัวอย่างน้ำบริเวณถ้ำน้ำเขาติเวมีค่า pH ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ค่าความเค็ม และค่าโลหะหนัก (NH_4^+ , Fe, Zn, Cu) ไกล่เคียงกับตัวอย่างน้ำจากบ่อของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ และมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของกรมควบคุมมลพิษ ส่วนค่าการนำไฟฟ้าและค่าของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดมีค่าสูงกว่าตัวอย่างน้ำจากบ่อของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ แต่ยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของกรมควบคุมมลพิษ ส่วนค่าความกระด้างของน้ำทั้งหมดมีค่าสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำในถ้ำ ตัวอย่างปลาถูกเก็บจากจุดเก็บตัวอย่าง 4 จุดเพื่อทำการศึกษเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของปลา 2 สกุล คือ *Rasbora* และ *Esomus* โดยการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA และ COI จากการศึกษาพบว่า *Rasbora* และ *Esomus* ในถ้ำน้ำเขาติเวแสดงความแตกต่างระหว่างสายสัมพันธ์กับปลาชนิดเดียวกันที่ใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงจากแหล่งน้ำอื่น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region จากตัวอย่างดินโคลนในถ้ำ พบแบคทีเรียที่มีพบมากภายในถ้ำเขาติเว คือแบคทีเรียไฟลัม Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi,

Firmicutes, Bacteroidetes และ Nitrospirae เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบในถ้ำเขาคีวะ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการศึกษาระดับโมเลกุลวิเคราะห์ยีน 18S rDNA พบว่าหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบในถ้ำน้ำเขาคีวะ ยังไม่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับดีเอ็นเอไม่สัมพันธ์กันและไม่ตรงกับสายพันธุ์อื่นที่ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้



WATER QUALITY AND MOLECULAR PHYLOGENY OF *RASBORA* AND *ESOMUS*
IN SHIVA CAVE, SA KAEO PROVINCE, THAILAND.



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Environmental Technology and Resource management
at Srinakharinwirot University

August 2016

Chamaiphon Yodkong. (2016). *Water quality and molecular phylogeny of Rasbora and Esomus in shiva cave, Sa Kaeo province, Thailand*. Master thesis, M.Sc. (Environmental Technology and Resource management). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committees: Assist. Prof. Dr. Arin Ngamniyom, Assist. Prof. Dr. Thayat Sriyapai and Assist. Prof. Dr. Kun Silprasit.

The aims of this study were to examine the water qualities and phylogenetic tree of two fish genera (*Rasbora* and *Esomus*) in Shiva cave, Sa Kaeo Province, Thailand. In this study, the first step was cave exploration and results found that this cave was a water cave, with a running stream throughout the year. The levels of water inside the cave were different, approximately 10-220 centimeters in depth and its distance from the entrance to the end are around 300 meters. However, the end of cave seemed to be the underground exit, but was filled and closed by water flowing out from an unknown place. Water samples were collected from differently six sites in the dry, rainy and winter seasons for the examination of the physical and chemical parameters of water quality. The water quality from the Shiva cave was compared to the water sample from the pool at Srinakharinwirot University and standard water quality in Thailand. The results revealed that the values of pH, dissolved oxygen, salinity, resistivity and heavy metal (NH_4^+ , Fe, Zn, Cu) were comparable to the values of the pool from Srinakharinwirot University were according to the standard. Likewise, conductivity and totally dissolved solids from all of the sampling sites were higher than the values of the pool from Srinakharinwirot University and comparable to the standard. The values of total hardness of the water were higher than the pool from Srinakharinwirot University and the standard. However, *E. coli* was also found in the water samples. The fish specimens of *Rasbora* and *Esomus* were collected from four sites for study of the phylogenetic relationships based on 16S rDNA and COI genes. The phylogenetic tree results showed the common clade of *R. borapetansis*, *R. paviei* and *E. metallicus* within the relationship of other fish. However, each species found in the cave exhibited a little distinction from the monophyletic group with reference to the same species which did not live in any cave area. There were sediment samples collected from three

sites for bacterial diversity analysis. Bacterial diversity were assessed using pyrosequencing analysis of V6-region within 16S rDNA. The results showed that Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Bacteroidetes and Nitrospirae were a predominant group in this cave. Moreover, the flat worm *Macrostomum* was collected from the last site for study regarding morphology and the phylogenetic relationships based on 18S rDNA. The results revealed that morphology and phylogenetic of the *Macrostomum* from the cave without the relationship of other *Macrostomum*.



ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาและคำแนะนำที่ดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรินทน์ งามนิยม อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนายาท ศรียาภย์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วมจนสามารถจัดทำปริญญานิพนธ์ได้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษาสนับสนุนบางส่วนเพื่อการทำปริญญานิพนธ์และทุนอุดหนุนการเข้าร่วมประชุมและนำเสนอผลงานของนิสิตบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรพงษ์ เกริกสกุล, อาจารย์ ดร.พนม สุทธิศักดิ์ โสภณ, อาจารย์ ดร.วิรงรอง ดวงใจ, คุณกฤติญา แสงภักดี และองค์การบริหารส่วนตำบลคลองไก่อ่อน รวมถึงเจ้าหน้าที่ที่ดูแลถ้ำน้ำเขาศิวะ ที่ได้ร่วมเดินทางศึกษาและสำรวจถ้ำ และยังได้มอบความรู้ คำชี้แนะให้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และคณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับสถานที่และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการศึกษาทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร คณบดีคณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้เกียรติเสียสละเวลามาเป็นประธานในการสอบปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุภัณฑิต นิรมรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้เกียรติเสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้

ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่สนับสนุนและให้กำลังใจข้าพเจ้า ขอคุณพี่น้องและเพื่อนทุกคนสำหรับความช่วยเหลือและแสดงน้ำใจให้กันอย่างสม่ำเสมอ และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีได้กล่าวนามในที่นี้ที่ได้ช่วยเหลือจนสำเร็จปริญญานิพนธ์

ชไมพร ยอดคง

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการศึกษาวิจัย.....	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
ถ้ำ (Cave)	6
ความหมายหรือคำจำกัดความของถ้ำ.....	6
ถ้ำที่เกิดจากการละลายของหินปูน.....	7
สิ่งมีชีวิตภายในถ้ำ.....	7
ประโยชน์ของถ้ำ.....	10
ดัชนีวัดคุณภาพน้ำ.....	11
pH.....	11
ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ (Dissolved Oxygen, DO)	12
ความกระด้างทั้งหมด (Total hardness)	12
ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity, EC)	13
ค่าการต้านทานไฟฟ้า (Resistivity)	14
ค่าของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total dissolved Solids)	14
ความเค็ม (Salinity)	14
แอมโมเนียไอออน (NH ₄ ⁺).....	15
โลหะหนัก.....	15
แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด (TCB) – แบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (FCB)...	16
ปลาชิว.....	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2 (ต่อ)	
ปลาซิวหางแดง (<i>Rasbora borapetensis</i>)	17
ปลาซิวควายแถบดำ, ปลาซิวควายน้ำดำ (<i>Rasbora paviana</i>)	18
ปลาซิวหนวดยาว (<i>Esomus metallicus</i>)	19
ปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำ.....	20
หนอนตัวแบนสกุล <i>Macrostromum</i>	20
แบคทีเรีย (Bacteria)	21
ความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในถ้ำ.....	22
สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อแบคทีเรียในถ้ำ.....	23
เครื่องหมายดีเอ็นเอ.....	25
เทคนิค Pyrosequencing)	27
ข้อมูลทั่วไปของจังหวัดสระแก้ว.....	28
ที่ตั้ง ขนาด และอาณาเขต.....	28
ลักษณะภูมิอากาศ.....	28
ทรัพยากรธรรมชาติ.....	29
ถ้ำน้ำเขาศิวะ.....	29
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	30
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	35
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการสำรวจถ้ำ.....	35
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	36
วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
การสำรวจสภาพแวดล้อมลักษณะทั่วไปของถ้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างปลา และตัวอย่างดินในถ้ำ.....	38
การวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มจากน้ำในถ้ำและบ่อน้ำนอกถ้ำ โดยใช้อาหาร สำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Compact Dry)	43

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การจัดจำแนกปลาสกุล <i>Rasbora</i> และ <i>Esomus</i> ด้วยการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (16S rDNA และยีน CO1)	44
การสำรวจความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินโคลนในถ้ำเขาศิ่วโดยการ วิเคราะห์ยีน 16S rDNA บริเวณ V6 region.....	46
การศึกษาหนอนตัวแบนสกุล <i>Macrostomum</i> จากน้ำในถ้ำเขาศิ่ว ด้วยการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (ยีน 18S rDNA)	47
4 ผลการทดลอง.....	51
สภาพแวดล้อมและลักษณะทั่วไปของถ้ำ การเก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างปลาและ ตัวอย่างดินโคลน.....	51
การตรวจสอบคุณภาพน้ำ.....	59
การจัดจำแนกปลาสกุล <i>Rasbora</i> และ <i>Esomus</i> ด้วยการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (16S rDNA และ COI)	69
ความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินโคลนในถ้ำเขาศิ่วโดยการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region.....	75
การศึกษาหนอนตัวแบนสกุล <i>Macrostomum</i> จากน้ำในถ้ำเขาศิ่ว.....	80
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	85
บรรณานุกรม.....	97
ภาคผนวก.....	113
ภาคผนวก ก.....	114
ภาคผนวก ข.....	118
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	121

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตารางแสดงเกณฑ์ความแตกต่างของน้ำ.....	13
2 ตารางแสดงเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของน้ำ.....	15
3 จุดเก็บตัวอย่างบริเวณถ้ำน้ำเขาศิ่ว.....	41
4 ค่าดัชนีตรวจวัดน้ำและเครื่องมือที่ใช้สำหรับการตรวจวัด.....	42
5 ส่วนผสมการทำ PCR สำหรับการสังเคราะห์ 16S rDNA และยีน CO1 ของปลา <i>Rasbora</i> และ <i>Esomus</i>	45
6 ส่วนผสมการทำ PCR ของแบคทีเรียสำหรับการสังเคราะห์ยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region.....	47
7 ส่วนผสมการทำ PCR สำหรับการสังเคราะห์ 18S rDNA ของ หนอนตัวแบนสกุล <i>Macrostomum</i>	49
8 ค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มจากตัวอย่างน้ำในถ้ำและนอกถ้ำ.....	67
9 แสดงความชุกชุม (Abundance) ของแบคทีเรียแต่ละวงศ์ (Family)	78

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 สายใยอาหารในถ้ำ.....	9
2 รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียช่วยในการจำแนกแบคทีเรีย.....	21
3 แผนผังตำแหน่งยีนบริเวณ 18S, 5.8S และยีน 28S.....	26
4 แผนผังตำแหน่งยีนบริเวณ 16S rRNA และยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ.....	27
5 แผนที่ถ้ำเขาติ้ว จังหวัดสระแก้ว.....	38
6 เฟลทอาหารสำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Compact Dry) EC E.coli & Coliform.....	43
7 แผนที่ถ้ำน้ำเขาติ้ว อำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว.....	52
8 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของบ่อน้ำนอกถ้ำ (จุดเก็บตัวอย่างที่ 1)	53
9 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาติ้ว (จุดเก็บตัวอย่างที่ 2)	54
10 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาติ้ว (จุดเก็บตัวอย่างที่ 3)	55
11 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาติ้ว (จุดเก็บตัวอย่างที่ 4)	56
12 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาติ้ว (จุดเก็บตัวอย่างที่ 5)	57
13 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาติ้ว (จุดเก็บตัวอย่างที่ 6)	58
14 กราฟแสดงผลของค่า pH.....	59
15 กราฟแสดงค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen, DO)	60
16 กราฟแสดงค่าความกระด้างของน้ำ (Total hardness)	61
17 กราฟแสดงค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity)	61
18 กราฟแสดงค่าการต้านไฟฟ้า (Electrical Resistivity)	62
19 กราฟแสดงค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (Total dissolved solids, TDS)	63
20 กราฟแสดงค่าความเค็ม (Salinity)	63
21 กราฟแสดงค่าแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+).....	64
22 กราฟแสดงค่าเหล็ก (Fe)	65
23 กราฟแสดงค่าสังกะสี (Zn)	65
24 กราฟแสดงค่าทองแดง (Cu)	66
25 แบคทีเรียโคลิฟอร์มบนเฟลทอาหารสำเร็จรูป (Compact Dry) EC E.coli & Coliform.....	68

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
26 ตัวอย่างปลาที่เก็บได้จากบริเวณถ้ำน้ำเขาศิวะและบ่อน้ำหน้าถ้ำ.....	69
27 ภาพถ่าย agarose gel แสดงผล PCR products บริเวณยีน 16S rDNA ของปลาสกุล <i>Rasbora</i> และ <i>Esomus</i>	70
28 ภาพถ่าย agarose gel แสดงผล PCR products บริเวณยีน COI ของปลาสกุล <i>Rasbora</i> และ <i>Esomus</i>	71
29 ภาพลำดับเบสนิวคลีโอไทด์.....	71
30 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของปลาสกุล <i>R.borapetansis</i> , <i>E.metalicus</i> และ <i>R.paviana</i> เปรียบเทียบกับปลาสายพันธุ์อื่น ในฐานข้อมูล Genbank.....	73
31 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสบริเวณ COI ของปลาสกุล <i>R.borapetansis</i> , <i>E.metalicus</i> และ <i>R.paviana</i> เปรียบเทียบกับปลาสายพันธุ์อื่น ในฐานข้อมูล Genbank.....	74
32 ภาพถ่าย agarose gel แสดงผล PCR products ของยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region ของตัวอย่างดินโคลนในถ้ำน้ำเขาศิวะ.....	77
33 หนอนตัวแบนที่พบในบริเวณถ้ำน้ำเขาศิวะในหลอดเก็บตัวอย่างที่ 1 และ 2 จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	81
34 ภาพหนอนตัวแบนสกุล <i>Macrostomum</i> ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	81
35 ภาพผิวของหนอนตัวแบนสกุล <i>Macrostomum</i> ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (scanning electron microscope)	82
36 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA ของหนอนตัวแบน สกุล <i>Macrostomum</i> เปรียบเทียบกับปลาสายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล Genbank.....	83
37 วิธีการจำแนกหนอนตัวแบนสกุล <i>Macrostomum</i> เบื้องต้น.....	84
38 ห่วงโซ่อาหารในถ้ำเขาศิวะ.....	86

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ถ้ำ (Cave) จัดเป็นหนึ่งในแหล่งท่องเที่ยวเชิงนิเวศประเภทธรณีวิทยาที่ได้รับความนิยมอย่างมากอีกทั้งยังเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ล้ำค่าที่ควรอนุรักษ์ไว้ เนื่องจากถ้ำมีความสำคัญทั้งด้านการท่องเที่ยว หรือเป็นแหล่งค้นคว้าที่สำคัญด้านโบราณคดี ธรณีวิทยาหรือโบราณชีววิทยา นอกจากนี้ยังเป็นที่อยู่อาศัยและที่หลบภัยอันมั่นคงของมนุษย์ก่อนประวัติศาสตร์ (Culver. 2012: 465-468) ถ้ำเป็นสถานที่ที่มีระบบจำกัดทั้งอาหาร แสงสว่าง และอากาศ (Simon. 2012: 99-102) และยังมีลักษณะที่แตกต่างกันไปในแต่ละที่ เช่น ถ้ำมีลักษณะสูงชัน ถ้ำมีลักษณะเป็นเหวลึก ถ้ำที่เกิดในภูเขาไฟแข็ง ถ้ำเกิดจากการระเบิดของภูเขาไฟ หรือถ้ำบางแห่งเป็นถ้ำมีน้ำไหลผ่าน เป็นต้น (สำนักอุทยานแห่งชาติ. 2554: 22) แต่ก็ยังพบสิ่งมีชีวิตที่สามารถอาศัยอยู่ในถ้ำได้ เช่น สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เช่น กบ สัตว์เลื้อยคลานประเภทงูหรือตัวเงินตัวทอง สัตว์เลือดเย็น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประเภทค้างคาว เป็นต้น สำหรับระบบนิเวศของถ้ำที่มีน้ำไหลผ่านสามารถพบสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำพวกหอนอนตัวแบน หอนอนน้ำ หรือแบคทีเรีย ซึ่งในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีผู้ผลิต สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้จะเป็นทำหน้าที่เป็นผู้ผลิตและผู้ย่อยสลายภายในถ้ำ (Wu; et al. 2015: 1-10) หรือบางครั้งก็กลายเป็นอาหารสำหรับสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ที่อาศัยอยู่ในถ้ำ เช่น ปู ปลา เป็นต้น สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในถ้ำเหล่านี้ต่างปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตได้ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปโดยมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรมหรือพันธุกรรม เช่น การหาอาหาร การปรับตัวให้เข้ากับแสงสว่าง การสืบพันธุ์ การตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น เป็นต้น (Gunn. 2006: 4-7) นอกจากนี้พฤติกรรมเหล่านี้จะชักนำให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตจากที่เคยอาศัยอยู่บริเวณภายนอกถ้ำเป็นสามารถมาอาศัยภายในถ้ำได้ (Ma; & Zhao. 2012: 107-125)

ในระบบนิเวศถ้ำสามารถพบกลุ่มสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถพบได้ทั่วไปในโลกทั้งในน้ำ ดิน ถ้ำ อากาศ มนุษย์ พืชและสัตว์ (Pace. 1997: 734-740) สำหรับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในถ้ำนั้นสามารถพบได้ทุกส่วนของถ้ำ เช่น บริเวณแหล่งน้ำ ดินหรือดินโคลน อากาศ ไชดหิน ผงถ้ำ หยดน้ำที่ไหลมาจากหินย้อย เป็นต้น (Gunn. 2006: 758) แบคทีเรียเหล่านี้จะทำหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และมีส่วนทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงต่างภายในถ้ำ (Schulz; et al. 2013: 3983-3996) เช่น ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ แร่ธาตุต่าง ๆ เป็นต้น (Park; et al. 2016: 1100-1107) รวมทั้งยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ใน

ฐานของสายใยอาหารในถ้ำ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเป็นได้ทั้งผู้ผลิต ผู้ย่อยสลายและยังเป็นอาหารให้กับสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในถ้ำ (Poulson. 2012: 323-334) ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมต่างๆ สามารถเป็นตัวบ่งชี้อย่างหนึ่งของลักษณะทางนิเวศวิทยาของสถานที่นั้นๆ ได้ เช่น ความหลากหลายของแบคทีเรียที่พบภายนอกและภายในถ้ำ หินปูนจะสามารถพบความแตกต่างของ ปริมาณกลุ่มแบคทีเรียพวกตรึงไนโตรเจน (Ward; et al. 2007: 2522-2538) นอกจากนี้การศึกษากลุ่มของแบคทีเรียบางกลุ่มยังใช้เป็นตัววัดคุณภาพของแหล่งน้ำในถ้ำได้ เช่น แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นต้น เนื่องจากแบคทีเรียโคลิฟอร์มจัดเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพในแหล่งน้ำ (Al-Bahry; et al. 2009: 1534-1539) สามารถบ่งชี้ได้ว่าน้ำนั้นมีการปนเปื้อนของอุจจาระและเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคหลายชนิด ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์จะถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระ (Campbell; et al. 2011: 75-82)

ปลาน้ำจืดสามารถพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป เช่น แม่น้ำ บ่อน้ำ หรือถ้ำที่มีน้ำไหลผ่าน เป็นต้น จึงจัดได้ว่าปลาน้ำจืดเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญสำหรับมนุษย์และสัตว์ (Ziv; et al. 2012: 5609-5614) นอกจากนี้ยังมีความสำคัญทางด้านการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยานิเวศวิทยา พันธุศาสตร์ การอนุรักษ์ และยังเป็นตัวบ่งชี้ความสมดุลทางธรรมชาติได้อีกด้วย (ชวลิต วิทยานนท์; จรัสชาดา; และ จารุจินต์ นกิตภฏ. 2012: ออนไลน์) การศึกษาความหลากหลายของปลาน้ำจืดทั่วโลกพบประมาณ 21,730 ชนิด (Chaudhri. 2004) ส่วนในประเทศไทยพบประมาณ 700 ชนิด (สาวิกา กัลปพฤกษ์. 2006: 915-923) ในปี 2012 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศไทย พบว่าปลาที่พบจำนวนมากที่สุดคือ วงศ์ปลาตะเพียน ปลาสร้อย และปลาชิว (Cyprinidae) พบอย่างน้อยประมาณ 204 ชนิด และการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่ายังมีปลาที่ไม่เคยมีการรายงานของมาก่อนอย่างน้อย 50 ชนิด (ชวลิต วิทยานนท์; จรัสชาดา; และ จารุจินต์ นกิตภฏ. 2012: ออนไลน์) ซึ่งปลาที่ยังไม่มีรายงานการค้นพบเหล่านี้อาจอาศัยอยู่ในแหล่งที่ยากต่อการเข้าไปสำรวจ หรืออาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น อาศัยอยู่ในสถานที่ที่ไม่มีแสงสว่าง หรืออยู่ในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารเคมี เป็นต้น ปลาเหล่านี้จึงจำเป็นต้องมีการปรับตัวด้านต่าง ๆ เพื่อให้อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ส่งผลให้เกิดวิวัฒนาการทั้งด้านพันธุกรรมและลักษณะภายนอกให้แตกต่างไปจากเดิม (Gunn. 2006: 10-23) เช่น ปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำที่ไม่มีแสงสว่างจะไม่สามารถดำรงชีวิตนอกถ้ำได้ เนื่องจากได้มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายในถ้ำได้อย่างสมบูรณ์ ลักษณะที่เปลี่ยนไปอย่างเห็นได้ชัดเจน คือ ปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำส่วนมากจะมีความสามารถในการมองเห็นลดลงจนถึงขั้นตาบอด (Jeffery; Strickler; &

Yamamoto. 2003: 531-541) และมีสีผิวซีดจางแตกต่างไปจากปลาสกุลเดียวกันที่อาศัยอยู่นอกถ้ำ (Ma; & Zhao. 2012: 107-125) เนื่องจากในถ้ำมีแสงสว่างน้อยหรือไม่มีแสงสว่างส่องเข้ามาถึง ทำให้ดวงตาและเม็ดสีมีการพัฒนาน้อยหรือหยุดพัฒนา แต่จะมีการพัฒนาประสาทส่วนอื่นแทน คือ ปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำจะตอบสนองต่อการสั่นของวัตถุที่มีความถี่ตั้งแต่ 35 Hz ความถี่ของวัตถุที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจจับด้วยปมประสาทที่มีการพัฒนาขึ้นเป็นพิเศษ โดยจะมีเซลล์เป็นลักษณะเส้นขน บริเวณเส้นข้างลำตัวของปลา ซึ่งจะตรวจจับการเคลื่อนไหวและการสั่นของน้ำรอบตัวเพื่อที่จะยืนยันตำแหน่งของเหยื่อ (Yamamoto; Stock; & Jeffery. 2004: 844-847)

ถ้ำน้ำเขาคิระหรือถ้ำเขาคิระ เป็นสถานที่ท่องเที่ยวทางธรรมชาติที่มีชื่อเสียงของจังหวัดสระแก้วและจังหวัดใกล้เคียง เหมาะสำหรับนักท่องเที่ยวที่ชื่นชอบการผจญภัยและรักธรรมชาติ ลักษณะเด่นของถ้ำคือเป็นถ้ำน้ำที่มีน้ำไหลหมุนเวียนออกมาตลอดทั้งปี ภายในถ้ำไม่มีแสงสว่างส่องถึง ถ้ำลึกประมาณ 300-500 เมตร ระดับน้ำสูงตั้งแต่ 10-220 เซนติเมตร ภายในมีหินงอกหินย้อยสวยงาม ภายในถ้ำอากาศถ่ายเทตลอด สิ่งมีชีวิตที่พบภายในถ้ำ เช่น ค้างคาว กบ ปู กุ้ง ปลาชิว ปลาช่อน ปลาตะเพียน เป็นต้น ถ้ำตั้งอยู่ที่บ้านเขาจันทร์แดง ตำบลคลองไก่อีเรือน อำเภอลองหาด จังหวัดสระแก้ว ซึ่งพื้นที่ตั้งของถ้ำน้ำเขาคิระเป็นเขตภูเขาและป่าซึ่งเป็นเขตหวงห้ามมีทหารเข้ามาควบคุมดูแล และได้เปิดเป็นการท่องเที่ยวอย่างเป็นทางการเมื่อ 7 ปีที่ผ่านมา ในปัจจุบันการท่องเที่ยวเชิงนิเวศและผจญภัยได้รับความนิยมมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณถ้ำน้ำเขาคิระมีความสมบูรณ์ของทรัพยากรด้านต่าง ๆ และยังมีกิจกรรมเชิงนิเวศ จึงเป็นที่ดึงดูดความสนใจของนักท่องเที่ยวทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ โดยเฉพาะนักท่องเที่ยวที่ชื่นชอบการท่องเที่ยวเชิงนิเวศและผจญภัย (Eco & Adventure) ซึ่งเป็นการท่องเที่ยวกลุ่มเฉพาะรูปแบบหนึ่งที่ตอบกระแสการท่องเที่ยวอนุรักษ์ธรรมชาติและการตระหนักถึงความสำคัญของสิ่งแวดล้อม แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการสำรวจหรือศึกษาสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาคิระ จึงควรทำการศึกษาข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับถ้ำ เช่น ศึกษาคุณภาพของน้ำที่ไหลผ่านถ้ำ ศึกษาเกี่ยวกับระบบนิเวศสายใยอาหารภายในถ้ำ ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพ ศึกษาข้อมูลของปลาบางชนิดที่สำรวจพบในถ้ำ หรือศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายแบคทีเรียจากในถ้ำ เป็นต้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันแต่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับนักท่องเที่ยว ชุมชนต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่ใกล้กับถ้ำน้ำเขาคิระ หรือหน่วยงานที่รับผิดชอบถ้ำน้ำเขาคิระ เนื่องจากนักท่องเที่ยวที่เดินทางเข้าไปเยี่ยมชมถ้ำมักจะดื่มด่ำน้ำที่ไหลลงมาตามหินย้อย หรือน้ำที่อยู่ในบริเวณหินที่มีรูปร่างลักษณะต่าง ๆ และมักจะนำดินโคลนมาพอกหน้าหรือพอกตามร่างกาย ตามความเชื่อและคำบอกเล่าที่ว่าจะส่งผล

ให้สุขภาพร่างกายแข็งแรงและโชคดี โดยที่ไม่คำนึงถึงคุณภาพของน้ำหรือสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ที่อยู่ในน้ำหรือดินโคลน

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาสภาพแวดล้อมทั่วไปและคุณภาพของน้ำในถ้ำเขาคีวะ
2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* จากถ้ำเขาคีวะระดับโมเลกุล (16S rDNA และ COI) ในถ้ำเขาคีวะ
3. ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินโคลนภายในถ้ำเขาคีวะ (ยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region)

ขอบเขตการศึกษาวิจัย

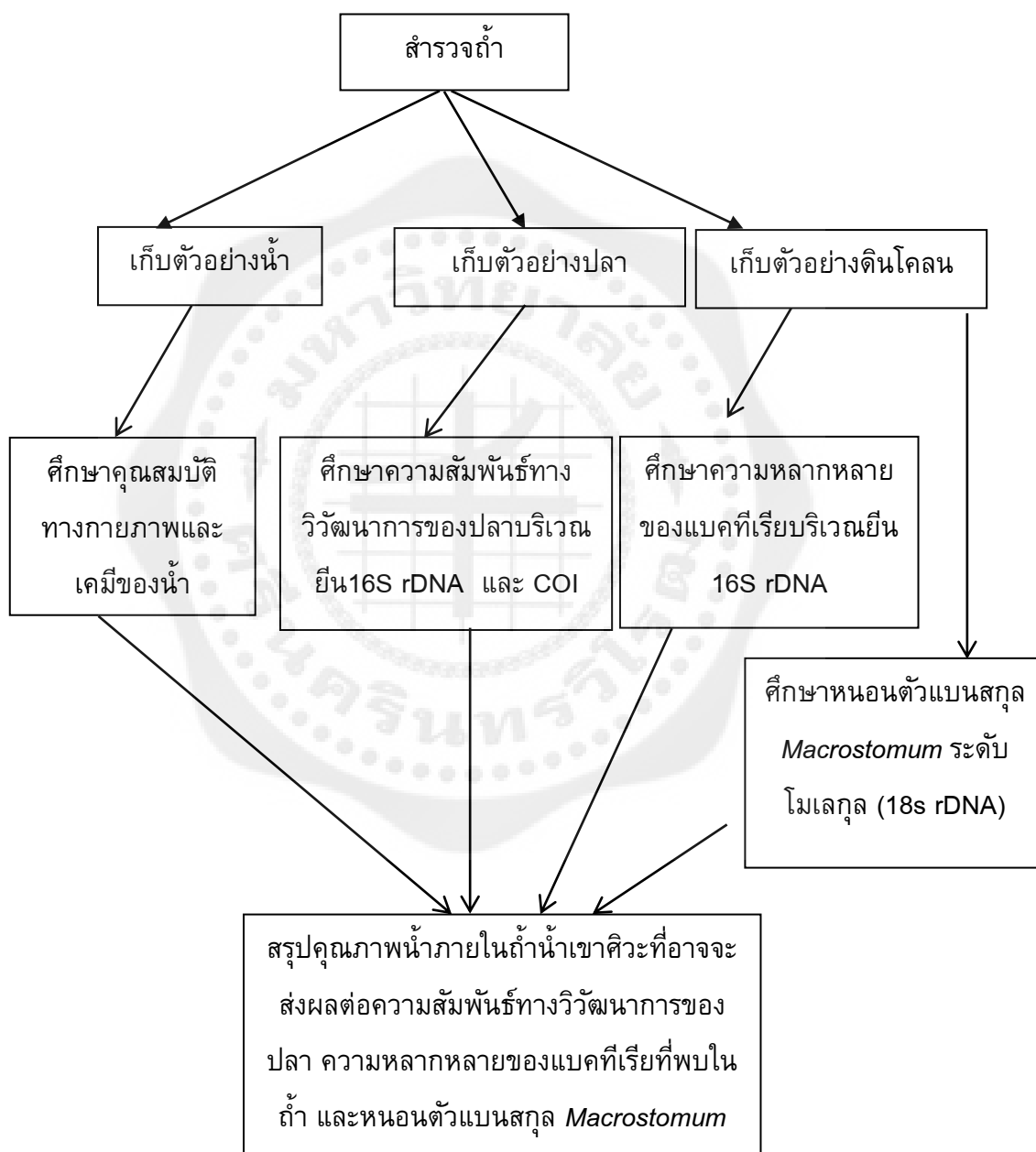
การศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของปลาสกุล *Rasbora*, *Esomus* และความหลากหลายของแบคทีเรีย ในแหล่งท่องเที่ยวทางธรรมชาติ ถ้ำเขาคีวะ เริ่มจากการสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปภายในถ้ำ วัตถุประสงค์มีจุดต่าง ๆ เก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* และตัวอย่างดินโคลนภายในถ้ำ โดยตัวอย่างน้ำที่เก็บได้ จะนำมาตรวจวัด ค่า pH ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำ ค่าการต้านไฟฟ้า ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเค็ม ค่าความขุ่น ค่าความกระด้าง แอมโมเนียม สังกะสี เหล็ก ทองแดง และนำมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยใช้เพลทอาหารสำเร็จรูป จากนั้นนำตัวอย่างปลา 2 สกุล คือ *Rasbora* และ *Esomus* ตัวอย่างดินโคลน มาศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยตัวอย่างปลาจะนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (16S rDNA และ COI) ตัวอย่างดินโคลนจะนำมาศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียระดับโมเลกุล (16S rDNA) นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ระดับโมเลกุล (18S rDNA)

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

การวิจัยนี้ทำให้ทราบเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำภายในถ้ำเขาคีวะ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลาสกุล *Rasbora*, *Esomus* เทียบกับตัวอย่างปลาที่พบบริเวณแหล่งน้ำทั่วไปภายนอกถ้ำ ความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำภายในถ้ำ และความหลากหลายทางชีวภาพภายในถ้ำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อนักชีววิทยาหรือนักวิจัยที่จะเข้าไปหาความรู้ใหม่ ๆ ภายในถ้ำ และยังเป็นประโยชน์ต่อนักท่องเที่ยว ชุมชนละแวกถ้ำเขาคีวะ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการวาง

แผนการจัดการท่องเที่ยว พัฒนา หรือฟื้นฟูทรัพยากรภายในถ้ำ และเพื่อช่วยส่งเสริมการท่องเที่ยว ถ้ำเขาติวะให้เป็นที่รู้จักเพิ่มขึ้น

กรอบแนวคิดในการวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ถ้ำ
2. ดัชนีวัดคุณภาพน้ำ
3. ปลาชิว
4. ปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำ
5. หนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum*
6. แบคทีเรีย
7. เครื่องหมายดีเอ็นเอ
8. เทคนิค Pyrosequencing
9. ข้อมูลทั่วไปของจังหวัดสระแก้ว
10. ถ้ำน้ำเขาคีระ
11. เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

1. ถ้ำ (Cave)

1.1 ความหมายหรือคำจำกัดความของถ้ำ

ถ้ำ (Cave) ความหมายในเชิงวิทยาศาสตร์ หมายถึง ช่องว่างหรือโพรงในหินซึ่งจำทำหน้าที่เป็นช่องทางเดินของน้ำระหว่างทางน้ำเข้าและทางน้ำออก ซึ่งท่อเหล่านี้จะมีขนาดเล็กตั้งแต่ 5-15 มิลลิเมตร จนกระทั่งมีขนาดใหญ่มากจนถึง 30 เมตร (สำนักอุทยานแห่งชาติ. 2554: 14-15) ส่วนความหมายทั่วไปของถ้ำ หมายถึง ช่องว่างที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในหินมีขนาดพอที่คนจะเข้าไปได้ (Gunn. 2006: 417) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอย่างน้อย 30 เซนติเมตร และมีขนาดพอที่จะสามารถเข้าไปสำรวจศึกษาและทำแผนที่ได้

ถ้ำมีหลายประเภทซึ่งแต่ละประเภทเกิดจากสาเหตุที่แตกต่าง เช่น ถ้ำตามชายฝั่งทะเลบางแห่งเกิดจากการถูกคลื่นเอนไซม์กัดเซาะเข้าใส่หน้าผาเป็นเวลานานหรือเกิดจากการกัดเซาะของน้ำทะเลจนเกิดเป็นโพรงถ้ำ (Boop; et al. 2014: 193-203) ถ้ำภูเขาไฟหรือถ้ำลาวาเกิดจากภูเขาไฟระเบิด

(Wood; & Zhang. 2010: 123-130) ถ้ำน้ำแข็งหรือธารน้ำแข็งเกิดจากการละลายของน้ำแข็ง (Gunn. 2006: 419) ส่วนถ้ำที่อยู่ใต้ดินเกิดจากการกัดเซาะของน้ำใต้ดินซึ่งจะไหลเซาะเอาหินอ่อน ๆ เช่น หินปูนออกไป ถ้ำบางชนิดจะมีช่องแสงที่หลังคาถ้ำเกิดจากการรวมตัวของน้ำบนพื้นดินไหลซึมผ่านลงไป บางถ้ำจะมีน้ำไหลคดเคี้ยวผ่านในถ้ำ เมื่อน้ำเหล่านั้นแห้งทำให้คนสามารถเดินเข้าไปได้ บางถ้ำจะมีลักษณะที่เป็นระเบียบลดหลั่นเป็นชั้นลงไปเรื่อย ๆ (Gunn. 2006: 419)

1.2 ถ้ำที่เกิดจากการละลายของหินปูน

ถ้ำหินปูนเป็นปรากฏการณ์ทางธรรมชาติที่เกิดขึ้นเมื่อน้ำฝนตกลงมารวมตัวกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศทำให้น้ำฝนมีสภาพเป็นกรดอ่อน ๆ หรือเรียกว่า กรดคาร์บอนิก มีคุณสมบัติสามารถละลายหินปูน (Limestone) ได้ดี เมื่อน้ำฝนที่มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน ๆ ไหลลงมาใต้ดินจะรวมตัวกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่ใต้ดิน (ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ของจุลินทรีย์ในดิน) ทำให้น้ำฝนมีสภาพเป็นกรดมากขึ้นจึงละลายหินปูนจนเกิดเป็นโพรงถ้ำขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ น้ำภายในถ้ำจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดปี การพัดพาตะกอนขนาดเล็กขุดสีพื้นถ้ำและผนังถ้ำทำให้ระดับพื้นถ้ำต่ำลงเรื่อย ๆ ในขณะที่เดียวกันน้ำที่ซึมตามรอยแยกของหินจากเพดานถ้ำและผนังถ้ำก็มีการสะสมของตะกอนหินปูน (Calcium carbonate) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะระเหยออกมาทำให้แคลเซียมที่อยู่ในสารละลายเริ่มตกตะกอนและจับตัวกันอีกครั้งเกิดรูปทรงที่แปลกตาของตะกอนภายในถ้ำ เช่น หินงอก หินย้อย หรือเสาหิน เป็นต้น เมื่อถ้ำมีการพัฒนาโถงใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ เพดานด้านบนจะเริ่มรับน้ำหนักไม่ไหวก็จะมีอาการถล่มของโถงถ้ำ อาจเกิดเป็นช่องเปิดที่เป็นช่องทางเชื่อมต่อกับภายนอก กลายเป็นปากถ้ำหรือการถล่มบางครั้งจะไม่สามารถสร้างทางเชื่อมต่อได้ แต่จะสามารถทำให้เกิดลักษณะภูมิประเทศเฉพาะตัวได้ (Loftin. 1988: 21-28)

จากการรายงานของ สุธศักดิ์ แก้วอ่อนและอำนาจ น้อยผา (สุธศักดิ์ แก้วอ่อน; และอำนาจ น้อยผา. 2553) พบว่าถ้ำสามารถเกิดขึ้นได้ในเกือบทุกสภาวะบนผิวโลก จากบริเวณเส้นศูนย์สูตรจนถึงบริเวณขั้วโลกเหนือและบริเวณขั้วโลกใต้ จากใต้ทะเลจนถึงบนเขา และจากเขตร้อนขึ้นถึงทะเลทราย เกิดขึ้นในหินเกือบทุกประเภท รวมทั้งหินทราย หินดินดาน ยิปซัม แกรนิต และหินบะซอลต์ แต่ถ้ำที่น่าสนใจและพบมากที่สุดคือถ้ำที่เกิดในหินปูนเนื่องจากมีความสวยงามตระการตา

1.3 สิ่งมีชีวิตภายในถ้ำ

ถ้ำเป็นสถานที่ที่จำกัดทั้งสถานที่ แสงสว่าง อากาศ อาหาร และปัจจัยด้านอื่น ๆ ซึ่งไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด แต่ยังสามารถพบสิ่งมีชีวิตที่สามารถปรับเปลี่ยน

พฤติกรรมในการดำรงชีวิตอาศัยอยู่ในถ้ำได้ (Huppop. 2012: 1-9) สิ่งมีชีวิตภายในถ้ำนั้นสามารถแบ่งได้ ดังนี้

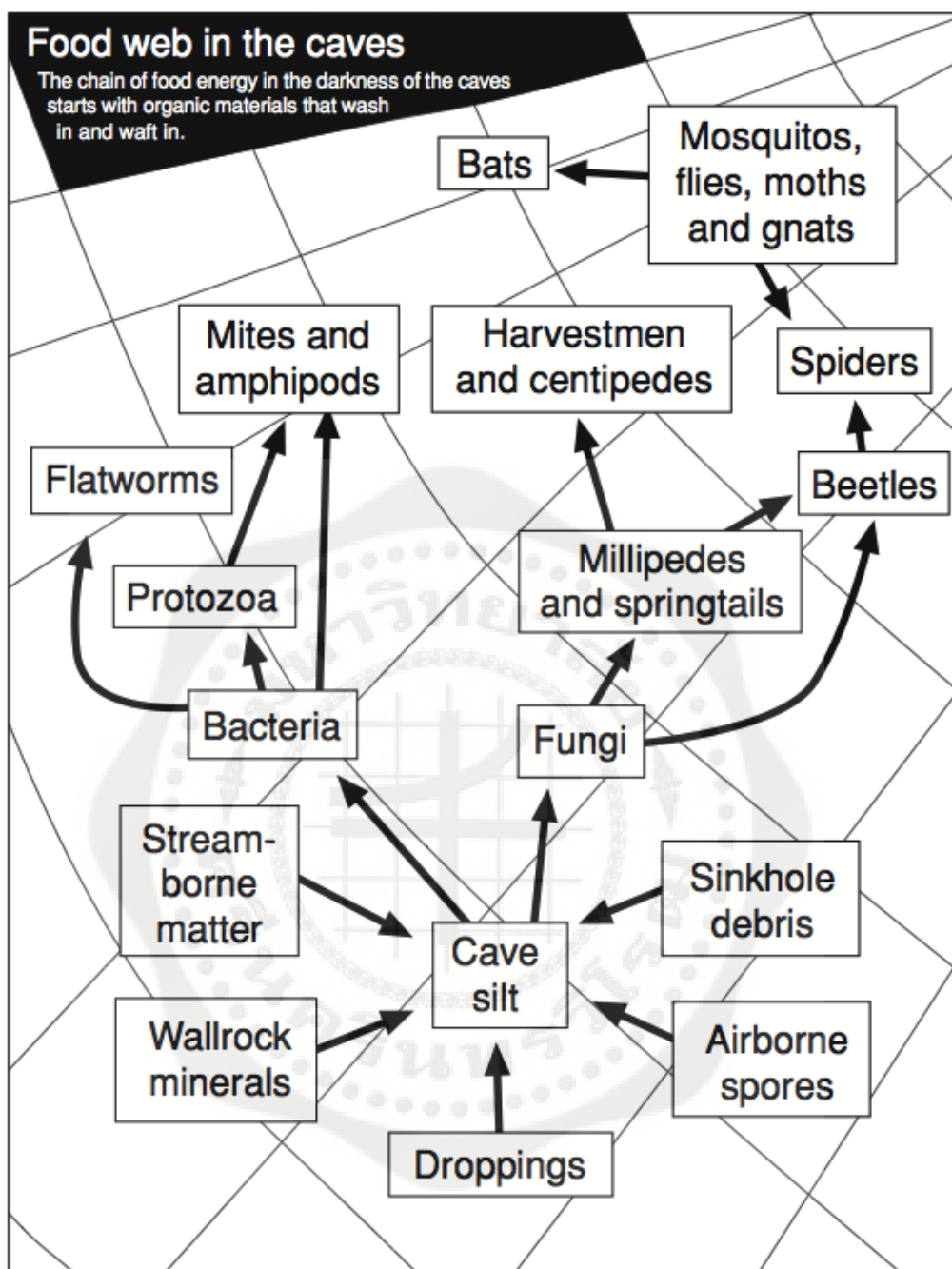
1.3.1 สิ่งมีชีวิตที่เข้ามาอาศัยอยู่ในถ้ำชั่วคราว

เป็นสิ่งมีชีวิตที่เข้ามาอาศัยอยู่ในถ้ำแต่ไม่ปรับตัวหรือมีพัฒนาการให้สามารถอาศัยอยู่ในถ้ำได้ถาวร เรียกสิ่งมีชีวิตจำพวกนี้ว่า ทร็อกโลไฟล์ (troglaphiles) สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในถ้ำและภายนอกถ้ำ โดยปกติสัตว์จะใช้ชีวิตอยู่นอกถ้ำแต่จะเข้ามาในถ้ำเพื่ออาศัยนอนพักผ่อน เช่น ไล่เดือน ค้างคาว แมงมุม แมลงหนอนปลอกน้ำ ผีเสื้อกลางคืน หม่าป่า หู กิ้งกือ หมี นกนางแอ่น งู แมงป่องเทียม จิ้งโกร่ง เป็นต้น (Pricop; & Negrea. 2009: 41-48) ซึ่งถ้าย้อนอดีตไปในยุคหิน มนุษย์ก็จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ออกหากินนอกถ้ำเพราะมนุษย์จะอาศัยถ้ำในการนอนพักผ่อนเช่นกัน (Gunn. 2006: 919-922)

1.3.2 สิ่งมีชีวิตที่อาศัยและหากินในถ้ำตลอดชีวิต

เป็นสัตว์ที่พัฒนาเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อปรับให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายในถ้ำได้อย่างสมบูรณ์ (Pricop; & Negrea. 2009: 41-48) มักอาศัยอยู่ในส่วนลึกของถ้ำ “the deep zone” เรียกสิ่งมีชีวิตจำพวกนี้ว่า ทร็อกโลไบต์ (trogllobites) มีเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ให้แตกต่างไปจากเดิม เช่น ดวงตามีขนาดเล็กลงหรือไม่มีดวงตา เม็ดสีจะลดลงหรือจางหายไป สิ่งมีชีวิตเหล่านี้ไม่สามารถดำรงชีวิตนอกถ้ำได้ (Juan; & Emerson. 2010: 1-5) ยกตัวอย่างเช่น ปลาในถ้ำไม่ใช้ดวงตา เนื่องจากในถ้ำไม่มีแสงสว่างหรือมีน้อย ดวงตาจึงมีการพัฒนาน้อยแต่มีการพัฒนาประสาทส่วนอื่นมาแทน คือ ประสาทด้านรับเสียง รับกลิ่นหรือสัมผัส (Pricop; & Negrea. 2009: 41-48)

ถ้ำที่ไม่ได้รับแสงและไม่อุดมสมบูรณ์ย่อมไม่สามารถเกิดพืชสีเขียวซึ่งเป็นเป็นผู้ผลิตเริ่มต้นในห่วงโซ่อาหาร สิ่งมีชีวิตในถ้ำจึงต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ของสายโซ่อาหารที่ซับซ้อน และสามารถออกหากินได้ภายนอกถ้ำได้ เช่น ค้างคาวที่บินออกจากถ้ำเพื่อไปหาอาหารในเวลากลางคืน และกลับเข้ามานอนในถ้ำเวลากลางวันจะปล่อยของเสียหรือมูลออกมา ซึ่งมูลค้างคาวก็จะกลายเป็นอาหารในปลาหรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในถ้ำได้ ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่อย่างถาวรจึงหาอาหารในปริมาณที่จำกัด หลายพันปีมาแล้วสภาพแวดล้อมที่มีอาหารเพียงเล็กน้อยในถ้ำได้สร้างสายใยของการพึ่งพาอาศัย โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดไม่สามารถทดแทนกันและกันในสายโซ่อาหารได้ (Danielle; et al. 2008: 8-12)



ภาพประกอบ 1 สายใยอาหารในถ้ำ

ที่มา: Schulte, P.; & Bedford, K.C. (2002). *Karst and Caves of Southeast Alaska*. (A Teachers' Resource). Alaska: USA Ketchikan campus and Cultural Heritage Research. p.18.

1.4 ประโยชน์ของถ้ำ

1.4.1 เป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติต่าง ๆ

เช่น ทรัพยากรแร่ชาติต่าง ๆ หรือเป็นแหล่งของน้ำใต้ดิน เป็นต้น (The geologic column of Missouri. winter. 2008)

1.4.2 เป็นแหล่งท่องเที่ยวและทำกิจกรรมนันทนาการทางธรรมชาติ

ถ้ำแต่ละชนิดจะมีลักษณะที่แตกต่างกันตามลักษณะเฉพาะที่เกิดขึ้น เช่น ความยาว ความลึก ลักษณะรูปร่างต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในถ้ำ หรือถ้ำบางถ้ำอาจจะมีน้ำไหลผ่าน เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้จะส่งผลให้นักท่องเที่ยวเข้ามาเยี่ยมชมถ้ำ การท่องเที่ยวทางธรรมชาติประเภทถ้ำจะตอบสนองแนวความคิดเกี่ยวกับการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ ซึ่งเป็นแนวคิดที่ปรากฏขึ้นเมื่อไม่นานมานี้ เกี่ยวกับการท่องเที่ยวเชิงอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ สิ่งแวดล้อม โดยไม่ก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลง ความเสียหายหรือทำลายระบบนิเวศ เนื่องจากภายในถ้ำมีสิ่งมีชีวิตและลักษณะของรูปร่างต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น หรือมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากภายนอกถ้ำ สิ่งเหล่านี้จะมีความเร็วในการตอบสนองต่อสภาพที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น หินย้อยจะหยุดการเจริญเมื่อมีการสัมผัสบริเวณปลายยอดของหิน เป็นต้น และเหมาะสมกับนักท่องเที่ยวที่ชื่นชอบการผจญภัยหรือนักสำรวจต่าง ๆ (ชูกลิ่น อุณวิจิตร. 2556: 62-72)

1.4.3 เป็นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

สิ่งมีชีวิตทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลัง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และจุลินทรีย์ สิ่งมีชีวิตที่สามารถซึ่งสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในถ้ำจะมีอยู่อย่างโดดเด่นและหลายจำพวก อาทิเช่น สิ่งมีชีวิตที่เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองหรือเป็นสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ เช่น ปลาคอตาบอด ปลาจาดถ้ำ ปลาชะโอนถ้ำ เป็นต้น (กรมประมง. 2546) สิ่งมีชีวิตที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็กที่สุดในโลก คือ ค้างคาวกิตติ (สุรพล ดวงแข. 2550) สิ่งมีชีวิตที่เป็นเอกลักษณ์ของถ้ำหรือสามารถพบได้ภายในถ้ำบางแห่งเท่านั้น เช่น ปลาผีเสื้อถ้ำที่พบเฉพาะถ้ำในภาคเหนือของประเทศไทย เป็นต้น (Romero; & Green. 2005: 3-32)

1.4.4 เป็นหลักฐานทางโบราณคดี

สำหรับศึกษาเกี่ยวกับประวัติศาสตร์ พฤติกรรม สังคม วัฒนธรรมของสิ่งมีชีวิต สัตว์ที่สูญพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงของเปลือกโลก เป็นต้น จากร่องรอยหลักฐานที่ถูกทิ้งไว้ตามผนังถ้ำหรือพื้นถ้ำ โครงสร้างของถ้ำ เครื่องมือที่ใช้ในการดำรงชีวิต โครงกระดูกของสิ่งมีชีวิต ซากดึกดำบรรพ์ หรือซากฟอสซิล (อนุสรณ์ อำพันธ์ศรี. 2555: 65-95)

1.4.5 เป็นแหล่งการเรียนรู้ทางธรรมชาติ

ถ้าสามารถเป็นแหล่งเรียนรู้ทางธรรมชาติซึ่งจะสามารถขยายความเข้าใจของปฏิสัมพันธ์ระหว่างชีววิทยาและธรณีวิทยา เช่น การศึกษาเกี่ยวกับการกำเนิดถ้ำ การกระจายตัวของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทั้งภายในถ้ำและนอกถ้ำ การปรับตัวของสิ่งมีชีวิตภายในถ้ำ ปัจจัยที่ส่งผลต่อสภาพแวดล้อมภายในถ้ำ การเคลื่อนที่ของน้ำ การเกิดหรือการมีอยู่ของแร่ธาตุต่าง ๆ ภายในถ้ำ ห่วงโซ่อาหาร เป็นต้น (สถาพร วรรณชนวิจารย์; และ ธัญญรัตน์ ดำเกาะ. 2557?) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในถ้ำเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านทางการแพทย์ พบว่ามีการใช้ moonmilk ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะสีขาวที่เกิดจากปฏิกิริยาของจุลินทรีย์และแร่ธาตุที่อยู่ภายในถ้ำสำหรับใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อ (Olivier; et al. 2012: 116-126)

1.4.6 ด้านเศรษฐกิจ

นักท่องเที่ยวที่เดินทางเข้ามาเยี่ยมชมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ภายในถ้ำ จะส่งผลให้เศรษฐกิจดีขึ้นและยังเป็นการกระจายรายได้ให้กับคนในชุมชนบริเวณใกล้เคียงกับถ้ำอีกด้วย โดยการขายของที่ระลึก ขายอาหาร การจ้างงาน การทำกิจกรรมหรือการให้บริการต่าง ๆ กับนักท่องเที่ยว นอกจากนี้ถ้ำที่มีทรัพยากรแร่ธาตุอยู่เป็นจำนวนมากก็จะมีส่งผลให้เศรษฐกิจดีขึ้นจากการทำเหมืองแร่ (The geologic column of Missouri. Winter. 2008)

2. ดัชนีวัดคุณภาพน้ำ

น้ำจัดว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ ซึ่งมนุษย์จะใช้น้ำในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การอุปโภคบริโภค การเกษตรกรรม การเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น (วิมลมาศ สตาร์ตัน. ม.ป.ป.) ส่งผลให้คุณภาพน้ำของน้ำมีการปนเปื้อนสารเคมีต่าง ๆ จากกิจกรรมของมนุษย์ ดังนั้นก่อนที่จะนำน้ำไปใช้ประโยชน์จึงควรมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำนั้น ๆ ทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการใช้งาน

2.1 pH

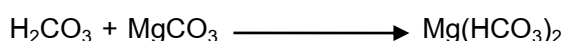
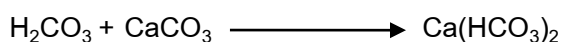
ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ หรือที่เรียกว่าค่า pH มาจากคำว่า Positive potential of the hydrogen ions (กรมชลประทาน. 2555) เป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าน้ำมีคุณสมบัติเป็นกรดหรือเป็นด่าง การวัด pH ของน้ำเป็นการวัดปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H^+) ที่มีอยู่ในน้ำ ณ เวลานั้น ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของน้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 0-14 โดย pH 7 มีค่าเป็นกลาง หาก pH มีค่าต่ำกว่า 7 แสดงว่าน้ำมีคุณสมบัติเป็นกรด แต่ถ้ามียค่า pH สูงกว่า 7 ขึ้นไปแสดงว่าน้ำนั้นมีคุณสมบัติเป็นด่าง (สำนักวิจัยและพัฒนา. 2550)

2.2 ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ Dissolved oxygen (DO)

เป็นค่าที่บอกปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ (สำนักวิจัยและพัฒนา. 2550) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพน้ำและเป็นลักษณะสำคัญที่จะบอกให้ทราบว่าน้ำนั้นมีความเหมาะสมเพียงใดต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ (กรมชลประทาน. 2555) เมื่อไม่มีออกซิเจนละลายในน้ำจะเกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนได้ผลผลิตเป็นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ซึ่งมีกลิ่นเหม็นและก๊าซมีเทน (ศรีสุวรรณ เกษมสวัสดิ์; ศิวพันธุ์ ชูอินทร์; และวรชาดา บัวไพร. 2555) น้ำที่มีค่า DO สูงจะมีคุณภาพดีกว่าน้ำที่มีค่า DO ต่ำ โดยส่วนใหญ่แล้วน้ำในภาวะปกติหรือน้ำธรรมชาติที่มีคุณภาพดีจะมีปริมาณออกซิเจนประมาณ 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมชลประทาน. 2555) สอดคล้องกับรายงานของศรีสุวรรณ เกษมสวัสดิ์, ศิวพันธุ์ ชูอินทร์ และวรชาดา บัวไพรที่กล่าวไว้ว่าน้ำโดยทั่วไปไม่ควรจะมีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ศรีสุวรรณ เกษมสวัสดิ์; ศิวพันธุ์ ชูอินทร์; และวรชาดา บัวไพร. 2555)

2.3 ความกระด้างทั้งหมด (Total hardness)

ความกระด้างของน้ำเกิดจากน้ำฝนที่ตกลงมารวมตัวกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศจึงเกิดเป็นกรดคาร์บอนิก (Carbonic acid) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน ๆ เมื่อน้ำฝนที่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนไหลซึมผ่านชั้นหินหรือชั้นดินที่มีองค์ประกอบเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) แมกนีเซียมคาร์บอเนต ($MgCO_3$) เหล็ก(II)ไอออน (Fe^{2+}) แมงกานีส(II)ไอออน (Mn^{2+}) สตรอนเซียมไอออน (Sr^{2+}) เป็นต้น น้ำฝนที่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนจะสามารถละลายหินปูนและธาตุต่าง ๆ รวมตัวและไหลมากับน้ำ ทำให้น้ำมีปริมาณ Ca^{2+} และ Mg^{2+} หรือธาตุโลหะที่อยู่ในสภาพประจุ +2 มากขึ้น จึงส่งผลให้น้ำมีความกระด้างของน้ำเพิ่มขึ้น (กรมทรัพยากรน้ำบาดาล. 2555) ดังสมการ



ความกระด้างเมื่อแบ่งตามไอออนที่มีอยู่ในน้ำสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.3.1 ความกระด้างชั่วคราว (Carbonat Hardness or Temporary Hardness) เกิดจากเกลือคาร์บอเนตไอออน (CO_3^{2-}) และไบคาร์บอเนตไอออน (HCO_3^-) ความกระด้างแบบนี้สามารถแก้ไขได้ด้วยการต้ม (เมื่อถูกความร้อนจะตกตะกอนกลายเป็นหินปูน)

2.3.2 ความกระด้างถาวร (Non-Carbonat Hardness or Temporary Hardness) เกิดจากเกลือคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ซัลเฟตไอออน (SO_4^{2-}) ความกระด้างประเภทนี้ไม่สามารถแก้ไขได้ด้วย การต้ม แต่สามารถใช้วิธีการทางเคมีได้ เช่น การใช้ปูนขาวและโซดาซักผ้าในการตกตะกอน

ดังนั้น ความกระด้างทั้งหมดเท่ากับผลรวมของความกระด้างชั่วคราวกับความกระด้างถาวร

ตาราง 1 ตารางแสดงเกณฑ์ความกระด้างของน้ำ

เกณฑ์ความกระด้างของน้ำ	ปริมาณความกระด้างของน้ำ (ppm as CaCO_3)
น้ำอ่อน	0 – 75
น้ำค่อนข้างกระด้าง	75 – 150
น้ำกระด้าง	150 – 300
น้ำกระด้างมาก	มากกว่า 30

ที่มา: กรมทรัพยากรน้ำบาดาล. (2555). โครงการศึกษาเพิ่มประสิทธิภาพของระบบปรับปรุงคุณภาพน้ำบาดาล.

2.4 ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity : EC)

ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำเป็นการวัดความสามารถของน้ำที่จะให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่าน ไม่สามารถบอกถึงชนิดของสารในน้ำได้ ซึ่งค่าการนำไฟฟ้านี้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของอิออนของแร่ต่าง ๆ ซึ่งโดยส่วนมากแล้วจะเป็นเกลืออนินทรีย์ที่ละลายอยู่ในน้ำและยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิขณะวัดค่าด้วย ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำเป็นการแสดงถึงการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของอิออนที่ละลายในน้ำ ซึ่งจะมีค่ามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับผลรวมทั้งหมดของแร่ธาตุทุกชนิดทั้งที่เป็นไอออนบวกและไอออนลบที่ละลายอยู่ในน้ำ โดยปกติแล้วการวัดจะเทียบที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นอุณหภูมิมาตรฐาน (สำนักวิจัยและพัฒนา. 2550) ปี 2552 เฉลิม ชัยบุญเรือง ได้ทำการรายงานไว้ว่าค่าการนำไฟฟ้าของน้ำฝนจะอยู่ที่ประมาณ 20-50 $\mu\text{s}/\text{cm}$ และน้ำทั่ว ๆ ไปจะมีค่าอยู่ที่ 1,000 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (เฉลิมชัยบุญเรือง. 2553)

2.5 ความต้านทานไฟฟ้า (Resistivity)

ค่าความต้านทานไฟฟ้าจะมีความหมายตรงกันข้ามกับค่าการนำไฟฟ้า ซึ่งน้ำที่มีค่าความต้านทานไฟฟ้าต่ำหรือเป็นน้ำที่มีความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ละลายอยู่ในน้ำสูงจะยอมให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านได้ง่าย ส่วนน้ำที่มีค่าการต้านทานไฟฟ้าสูงหรือน้ำที่มีความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์หรือแร่ธาตุละลายอยู่ในน้ำต่ำจะยอมทำให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านได้ยาก เห็นได้ชัดจากน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ไม่มีแร่ธาตุจะมีค่าการต้านทานไฟฟ้าอยู่ที่ 18.180 MΩ/cm และมีค่าการนำไฟฟ้าอยู่ที่ 0.05501 μs/cm (IC Controls. 2012: Online)

2.6 ค่าของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total dissolved Solids)

เป็นค่าที่บอกถึงปริมาณแร่ธาตุทั้งหมดที่ละลายอยู่ในน้ำ (เฉลิม ชัยบุญเรือง. 2553) ถ้าปริมาณสารทั้งหมดที่ละลายอยู่มีค่าน้อยแสดงว่ามีเกลือแร่ต่าง ๆ ละลายอยู่น้อย (สำนักอนุรักษ์และฟื้นฟูทรัพยากรน้ำบาดาล. 2558) ซึ่งวิเคราะห์ได้จากปริมาณสารที่เหลืออยู่ในภาชนะหลังจากการระเหยน้ำออกจากตัวอย่างที่ผ่านการกรองของแข็งแขวนลอยทั้งหมดออกแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 103°-105°C (วิมลมาศ สดาร์ตน์. ม.ป.ป.) ตามค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำดื่มที่ภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท กำหนดให้มีปริมาณสารทั้งหมดที่ละลายได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (กองจัดการคุณภาพน้ำ. 2540: 1) ซึ่งตรงกลับเฉลิม ชัยบุญเรืองที่กล่าวไว้ว่าน้ำที่ดีมีค่าของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดต่ำกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (เฉลิม ชัยบุญเรือง. 2553)

2.7 ความเค็ม (Salinity)

ความเค็มของน้ำ (Salinity) เป็นค่าที่บ่งบอกปริมาณเกลือที่ละลายอยู่ในน้ำ ซึ่งเป็นเกลือที่เกิดจากการจับตัวกันของสารประกอบที่มีประจุลบ เช่น คาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) ซัลเฟต (SO_4^{2-}) ไนเตรท (NO_3^-) คลอไรด์ (Cl^-) ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) และฟลูออไรด์ (F^-) กับประจุบวกของแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียม (Ca^{2+}) แมกนีเซียม (Mg^{2+}) โซเดียม (Na^+) และโปแทสเซียม (K^+) ในน้ำ (ธีราภรณ์ เมฆอรุณ. 2555) โดยทั่วไปน้ำจะมีเกลือแร่ละลายอยู่เสมอ ความเค็มของน้ำมีค่าแตกต่างกันตามสภาพของแหล่งน้ำ สำหรับเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของน้ำแสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 ตารางแสดงเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของน้ำ

ชนิดของน้ำ	เกณฑ์ที่ใช้จำแนก
น้ำจืด (fresh water)	มีความเค็มระหว่าง 0 – 0.5 ppt
น้ำกร่อยน้อย (oligohaline brackish water)	มีความเค็มระหว่าง 0.5 – 3 ppt
น้ำกร่อยปานกลาง (mesohaline brackish water)	มีความเค็มระหว่าง 3 - 10 ppt
น้ำกร่อยมาก (polyhaline brackish water)	มีความเค็มระหว่าง 10 – 17 ppt
น้ำเค็มน้อย (oligohaline sea water)	มีความเค็มระหว่าง 17 – 30 ppt
น้ำเค็มปานกลาง (mesohaline sea water)	มีความเค็มระหว่าง 30 – 34 ppt
น้ำเค็มมาก (polyhaline sea water)	มีความเค็มระหว่าง 34 – 38 ppt
น้ำเค็มจัด (brine)	มีความเค็มระหว่าง 38 ppt

ที่มา: วิมลมาศ สตารัตน์. (ม.ป.ป.) ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ.

2.8 แอมโมเนียไอออน (NH_4^+)

เกิดจากของเสียที่ถูกขับถ่ายออกมาจากสัตว์ซึ่งจะมีสารประกอบพวกโปรตีนหรืออินทรีย์อื่น ๆ รวมอยู่ด้วย ไนโตรเจนที่ถูกปล่อยออกมาจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียเป็นแอมโมเนีย (กรมชลประทาน. 2555) ซึ่งแบคทีเรียเป็นส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของไนโตรเจน กระบวนการที่เกิดขึ้นอาจมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น Ammonification หรือ Nitrification เป็นต้น (สำนักวิจัยและพัฒนา. 2550) แอมโมเนียในน้ำอาจอยู่ในรูปของแอมโมเนียอิสระ (NH_3) หรือแอมโมเนียไอออน (NH_4^+) แอมโมเนียอิสระจะเป็นพิษอย่างมากต่อปลาแต่แอมโมเนียไอออนไม่เป็นพิษ สัดส่วนของ NH_3 และ NH_4^+ ในน้ำขึ้นอยู่กับค่า pH อุณหภูมิและปริมาณเกลือแร่ ปริมาณของ NH_3 จะเพิ่มตามระดับ pH และอุณหภูมิที่สูงขึ้น (จรียา ยี่มรัตน์บวร; และ สุรินทร์ บุญอนันตธนสาร. 2556)

2.9 โลหะหนัก

ในด้านคุณภาพน้ำสามารถแบ่งโลหะได้เป็น 2 กลุ่ม

2.9.1 โลหะหนักในกลุ่มที่ไม่มีความเป็นพิษและมีความจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต คือ เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) เป็นกลุ่มโลหะหนักที่มีความจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตและ

ต้องได้รับในปริมาณที่พอเหมาะ หากขาดธาตุเหล่านี้ อาจทำให้การทำงานของเอนไซม์บางชนิดไม่เต็มที่ แต่หากมีมากเกินไปก็อาจทำให้เกิดพิษต่อร่างกายได้ (สำนักวิจัยและพัฒนา. 2550)

2.9.2 โลหะหนักกลุ่มที่เป็นพิษและเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต คือ แคดเมียม (Cd) ตะกั่ว (Pb) ปรอท (Hg) นิกเกิล (Ni) เป็นต้น โลหะกลุ่มนี้ไม่ควรพบในน้ำหรือหากมีควรมีในปริมาณน้อย ๆ (สำนักวิจัยและพัฒนา. 2550) สำหรับค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท มีค่ากำหนดให้เหล็กไม่ควรเกิน 0.5 mg/L สังกะสีไม่ควรเกิน 5.0 mg/L และ ทองแดงไม่ควรเกิน 1.0 mg/L (กองจัดการคุณภาพน้ำ. 2540)

2.10 แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด (TCB) – แบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (FCB)

แบคทีเรียโคลิฟอร์มเป็นดัชนีที่บ่งชี้ถึงความสกปรกที่ปนเปื้อนมาจากอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544: 567) แบคทีเรียโคลิฟอร์มเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่กระจายอยู่ทั่วไป มีทั้งชนิดที่เป็นโทษกับร่างกายและไม่เป็นโทษต่อร่างกายหรือบางชนิดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายของคน ซึ่งช่วยในการสร้างความสมดุลและคอยป้องกันเชื้อโรคที่เป็นอันตรายได้ระดับหนึ่ง แต่ในบางครั้งเมื่อร่างกายเกิดความอ่อนแอ แบคทีเรียโคลิฟอร์มที่เป็นเชื้อประจำถิ่นจะเพิ่มปริมาณมากขึ้น อาจส่งผลทำให้เสียความสมดุลและทำให้เกิดความผิดปกติต่อร่างกายขึ้นได้ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2557)

แบคทีเรียโคลิฟอร์มเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามดิน น้ำ พืชผัก ลำไส้คนและสัตว์เลือดอุ่น เป็นแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae ซึ่งมีคุณสมบัติคือ มีรูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนหรือไม่ออกซิเจน (อุษามาส วังชัยสุนทร. 2547: 51-63) การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรียแสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยของน้ำที่บริโภค เนื่องจากโรคที่เกิดขึ้นเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มักเกิดจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคซึ่งปนเปื้อนอยู่ในอาหารและแหล่งน้ำ การแพร่กระจายของโรคสาเหตุหนึ่งมาจากสิ่งขับถ่ายของคนและสัตว์ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น ท้องร่วง ไทฟอยด์ อหิวาตกโรค ฯลฯ (สุบัณฑิต นิมรัตน์; หทัยทิพย์ บรรเจิดจรัสเลิศ; และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2014: 454-459). การตรวจวัดคุณภาพของแบคทีเรียในน้ำมักใช้แบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้เป็นตัวบ่งชี้ ได้แก่

2.10.1 ฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Fecal coliform) แบคทีเรียมีแหล่งกำเนิดจากอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่น สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสที่อุณหภูมิ 44.5 °C ในเวลา 24 ชั่วโมง ได้แก่ *Escherichia* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544: 568)

2.10.2 นันฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (non-fecal coliform) หมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเป็นแท่ง สามารถหมักยอมน้ำตาลแลคโตสที่อุณหภูมิ 35 °C ในเวลา 24-48 ชั่วโมง ให้ผลเป็นกรดและแก๊ส ส่วนใหญ่พบในพืชและดิน ไม่พบในอุจจาระ เช่น *Enterobacter*, *Serratia* เป็นต้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544: 568)

3. ปลาชิว

ปลาชิวจัดเป็นปลาน้ำจืดที่เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญต่อคนไทยมาเป็นเวลานาน ในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากปลาเพื่อการบริโภคและการเพาะเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม เพื่อเป็นสินค้าส่งออกต่างประเทศ ดังนั้นปลาชิวจึงมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ ระบบนิเวศและการอนุรักษ์ ทั้งยังเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงความสมดุลทางธรรมชาติที่ดี (สิงหา วงศ์โรจน์. 2547)

ปลาชิวจัดอยู่ในอันดับ Cypriniformes วงศ์ Cyprinidae วงศ์ย่อย Danioninae เป็นปลาขนาดเล็ก ไม่สามารถทนอยู่ในสภาวะที่ขาดน้ำได้เป็นเวลานานหรือไม่สามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่น้ำขาดออกซิเจนหรือในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย พบในลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยาไม่น้อยกว่า 100 ชนิด ปลาชิวส่วนใหญ่ลำตัวมีสีเงินและมีลำตัวแบนข้าง บางชนิดมีหนวด บางชนิดไม่มีหนวด ไม่มีฟันที่ริมฝีปาก แต่มีฟันซี่ใหญ่ในลำคอ (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2553: 7) ปลาชิวเป็นปลาที่มีความสำคัญในห่วงโซ่อาหารของแหล่งน้ำ เนื่องจากมีการแพร่กระจายทั้งในแหล่งน้ำนิ่งและแหล่งน้ำไหล เช่น ลำธาร หนอง บึง ทะเลสาบ อ่างเก็บน้ำ เป็นต้น และยังมีขนาดเล็กจึงกลายเป็นแหล่งอาหารของปลาขนาดใหญ่ (สัมพันธ์ จันทร์ดำ; ประณีต งามเสน่ห์; และ อธิยา อรรถอินทรีย์. 2552)

3.1 ปลาชิวหางแดง (*Rasbora borapetensis*)

มีลักษณะรูปร่างยาว ลำตัวแบนข้างเล็กน้อย ปากเล็ก ครีบหางเว้าลึก เกล็ดค่อนข้างใหญ่ หัวและด้านท้องสีเงิน ตัวมีสีเหลืองอ่อน มีแถบสีดำพาดตามแนวยาวตลอดกลางลำตัวและมีแถบสีทองขนานด้านบน ครีบใส ยกเว้นโคนครีบหางมีสีแดงสด ขนาดใหญ่สุดมีความยาวประมาณ 6 ซม. ขนาดเฉลี่ยความยาวประมาณ 3.5 ซม. โดยส่วนมากพบอยู่เป็นฝูงใหญ่ในแหล่งน้ำนิ่งและในที่น้ำหลาก พบตั้งแต่ลุ่มแม่น้ำแม่กลองถึงแม่น้ำโขงและภาคใต้ไปจนถึงมาเลเซียและสิงคโปร์ ปลาชิวหางแดงจะกินลูกน้ำ แพลงก์ตอนสัตว์ หรือตัวอ่อนแมลงน้ำเป็นอาหาร การจัดหมวดหมู่ของปลาชิวหางแดง ดังนี้ (สุจินต์ หนูขวัญ; และ อรุณี รอดลอย. 2552: 62)

Name: Blackline rasbora

Scientific Name: *Rasbora boraetensis* Smith, 1934

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Actinopterygii

Order: Cypriniformes

Family: Cyprinidae

Genus: *Rasbora*

Species: *boraetensis*

3.2 ปลาชีวกวายแถบดำหรือปลาชีวกวายห้าดำ (*Rasbora paviana*)

ลักษณะทั่วไปคือ มีรูปร่างยาวลำตัวแบนข้าง ส่วนของหางยาว มีเกล็ดค่อนข้างใหญ่ บางและหลุดง่าย มีดวงตาโตขอบตาด้านบนมีสีฟ้า ท้องโตและครีบทงมีขนาดใหญ่ มีปลายหางแยกเป็นแฉก มีจุดสีดำที่ปลายครีบทงและมีแถบสีดำที่บริเวณครีบทง ลำตัวสีขาวยเงินและสะท้อนแสงเมื่อโตเต็มวัยจะมีขนาด 4-5 เซนติเมตร สามารถพบได้ในห้วยขนาดเล็กที่น้ำไหลไม่แรงนักในภาคภาคใต้และภาคกลาง และมักจะถูกจับขายเป็นปลาสวยงามเป็นจำนวนมาก การจับหมวดหมู่ของปลาชีวกวายห้าดำ ดังนี้ (ธวัช ดอนสกุล; อัจฉริยา รังษิรุจิ; และวิเชียร มากตุ่น. 2552: 320-327)

Name: Sumatran rasbora

Scientific Name: *Rasbora paviana* Tirant, 1885

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Actinopterygii

Order: Cypriniformes

Family: Cyprinidae

Genus: *Rasbora*

Species: *paviana*

3.3 ปลาชีวหนวดยาว (*Esomus metallicus*)

มีรูปร่างทรงกระบอกแบนข้างเล็กน้อย ปากกว้างเฉียงขึ้นด้านบน มีหนวด 2 คู่ หนวดคู่บนขากรรไกรยาวถึงโคนหาง พื้นลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง มีแถบสีคล้ำพาดกลางลำตัวตั้งแต่หลังช่องเหงือกถึงโคนหาง ครีบใส ครีบอกใหญ่ ครีบหลังค่อนข้างยาว ครีบหางใหญ่และเว้าลึก คอดหางค่อนข้างเรียว ขนาดเฉลี่ยความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร พบตามแม่น้ำ หนอง บึง น้ำตก ลำธารทั่วไป ปลาชีวหนวดยาวจะกินแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดเล็ก ตัวอ่อนแมลง พืชน้ำเป็นอาหาร การจับหมวดหมู่ของปลาชีวหางแดง ดังนี้ (สุจินต์ หนูขวัญ; และ อรุณี รอดลอย. 2552: 62)

Name: Striped flying bard

Scientific Name: *Esomus metallicus* Ahl, 1923

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Actinopterygii

Order: Cypriniformes

Family: Cyprinidae

Genus: *Esomus*

Species: *Metallicus*

4. ปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำ

จากการศึกษาปลาที่เข้าไปอาศัยอยู่ในถ้ำพบว่ามี การปรับเปลี่ยนพฤติกรรม การดำรงชีวิตให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของถ้ำเหมือนสัตว์ชนิดอื่น ๆ จากการศึกษาของยามาโมโตะ ในปี 2004 พบว่ามีปลา 18 สกุล 86 สปีชีส์ที่อาศัยอยู่ในถ้ำ สามารถพบได้ในถ้ำที่มีบ่อน้ำหรือถ้ำที่มีน้ำไหลผ่านทั่วทุกภูมิภาคของโลก (Yamamoto. 2004: R943) เนื่องจากอาหารในถ้ำไม่สมบูรณ์และสภาพแวดล้อมทางกายภาพค่อนข้างคงที่ในด้านความมืด อุณหภูมิและความชื้น ดังนั้นปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำจึงต้องมีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม เช่น อัตราการเผาผลาญอาหารน้อย ออกไข่จำนวนมาก และมีการปรับตัวเข้ากับ ความมืด เช่น ไม่มีตา ไม่มีเมดสี มีหนวดยาวหรือมีอวัยวะรับรู้ความรู้สึกอื่น ๆ ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการว่ายน้ำของปลา (Gunn. 2006: 1272-1276)

ปลาน้ำจืดที่เข้าไปอาศัยอยู่ในถ้ำที่มีระบบนิเวศและสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากภายนอก ถ้ำ มักจะสูญเสียรูปร่างลักษณะบางประการที่ไม่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต หรืออาจจะมีลักษณะบางอย่างที่เพิ่มขึ้นมาเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากที่บรรพบุรุษเคย

อยู่อาศัย เช่น อาจจะมีสูญเสียดวงตา สีหรือรูปร่างลักษณะโครงสร้างของลำตัวจะมีความแตกต่างจากบรรพบุรุษ เป็นต้น แต่กลไกการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการของปลาเหล่านี้ยังไม่เป็นที่รู้จักมากนัก ส่งผลให้ปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำมีความแตกต่างจากปลานอกถ้ำทั้งในระดับโมเลกุลและรูปร่างโครงสร้างต่าง ๆ เช่น ปลาสายพันธุ์เม็กซิกันเทททรา (*Astyanax mexicanus*) สามารถพบได้ทั้งในแหล่งน้ำปกติทั่วไปและในถ้ำ โดยปลากลุ่มที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติจะมีรูปร่างปกติ ส่วนปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำที่มีแสงแดดจะมีสีเผือกและไม่มีลูกตา แต่จะมีการปรับโครงสร้างวิวัฒนาการมาจากปลากลุ่มที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำทั่วไป เช่น สภาพแวดล้อมถ้ำไม่มีแสงจึงทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้ตา ส่งผลให้ตัวอ่อนที่เกิดขึ้นไม่สร้างลูกตา เพื่อเก็บพลังงานไว้ใช้ในกิจกรรมอื่น ๆ โดยปลาเม็กซิกันเทททราที่อาศัยอยู่ในถ้ำจะพัฒนาเส้นข้างลำตัวให้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดันน้ำ (Jeffery. 2012: 36-43) ทำให้รู้ทิศทางที่ต้องการเคลื่อนที่และหาอาหารในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีแสง (ทินพันธุ์ เนตรแพ. 2558: 99-100)

5. หนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum*

เป็นหนอนตัวแบนที่มีสมมาตรแบบด้านข้าง (bilateralsymmetry) บางชนิดสามารถดำรงชีวิตได้แบบอิสระ คือ พลาเนเรีย และบางชนิดสามารถดำรงชีวิตแบบปรสิต คือ พยาธิตัวตืด และพยาธิใบไม้ นอกจากนี้ยังมีลักษณะเด่นคือ มีลำตัวแบนจากทางด้านหลังและท้อง (dorsoventral) มีลักษณะของเนื้อเยื่อเป็น 3 ชั้น โดยที่ไม่มีช่องตัว ไม่มีข้อปล้อง มีช่องทางเดินอาหารที่เป็นช่องเปิดอยู่ทางเดียว (ในพยาธิตัวตืดไม่มีทางเดินอาหาร) กำจัดของเสียโดยใช้เซลล์พิเศษคือ flame cell และเคลื่อนที่โดยใช้ซีเลีย (cilia) หนอนตัวแบนกลุ่มนี้จะมี 2 เพศในตัวเดียวและสามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด น้ำเค็มและพื้นที่ชื้นแฉะทั่วไป บางชนิดไม่ชอบแสงสว่าง ซึ่งหนอนตัวแบนจะกินแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ หรือเศษอินทรีย์วัตถุเป็นอาหาร (อาจอง ประทศสุนทรสาร; และกำธร ธีรคุปติ. ม.ป.ป.)

Kingdom: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Class: Turbellaria

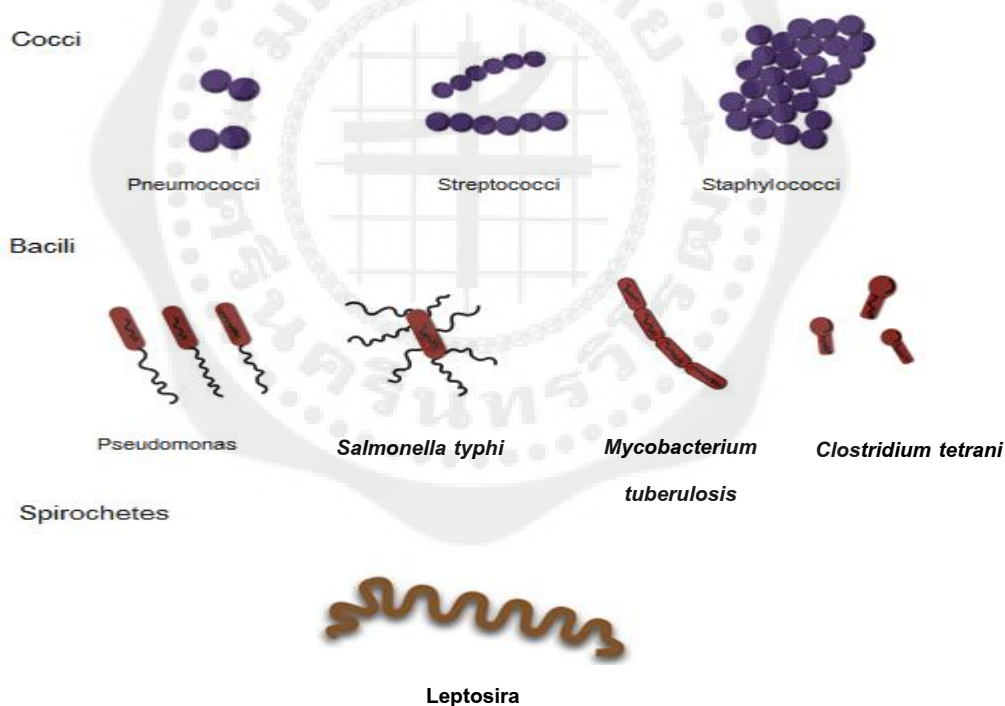
Order: Macrostomida

Family: Macrostomidae

Genus: *macrostomum* (Schmidt, 1848)

6. แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรีย คือ สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว (unicellular) ซึ่งเซลล์ของแบคทีเรียจะประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) แต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและออร์แกเนลล์ต่าง ๆ (organelle) (คมสันต์ วรณไสย. ม.ป.ป.) สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ในดิน น้ำ อากาศ หรือสามารถพบในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต เช่น ภูเขาไฟ น้ำพุร้อน หรือใต้ท้องทะเลลึก (Pace. 1997: 734-740) และยังพบอาศัยอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น พืช สัตว์ และคน เป็นต้น (Pflughoeft; & Versalovic. 2012: 99-122) แบคทีเรียสามารถจำแนกเบื้องต้นได้จากการย้อมสีแกรม (gram stain) โดยแบ่งออกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) เมื่อย้อมสีจะติดสีม่วง และแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) จะติดสีแดง (คมสันต์ วรณไสย. ม.ป.ป.) รูปร่างของแบคทีเรียโดยทั่วไปจะมี 3 แบบคือ รูปกลม (coccus) รูปแท่ง (bacillus) และรูปเกลียว (spiral) (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียช่วยในการจำแนกแบคทีเรีย

ที่มา: ปรับปรุงและแก้ไขมาจาก Bossard, D. C. (2001). *A fit place to live : creation of the biosphere*. Interdisciplinary Biblical Research Institute. Retrieved Desember 15, 2015, from <http://www.ibri.org/RRs/RR051/51Fitplace.html>

คุณสมบัติและความสามารถของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน แบคทีเรียบางชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้ บางชนิดสามารถดำรงชีวิตได้โดยไม่ใช้ออกซิเจน เช่น แบคทีเรียที่สามารถสร้างมีเทนได้ (Methanogenic bacteria) แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่ไม่มีก๊าซออกซิเจน (anaerobic) บางชนิดสามารถสร้างอาหารเองได้ (autotroph) เช่น *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* เป็นต้น (Belyaev; et al. 1983: 691-697) แบคทีเรียที่ชอบความเค็ม (Halophiles) สามารถพบได้ในทะเล หรือโรงงานผลิตเกลือ แบคทีเรียชนิดนี้จะมีความสามารถในการป้องกันการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ได้ โดยการรักษาสภาพความดันออสโมติกภายในเซลล์ให้ทนต่อความเค็มภายนอกได้ (Dassarma; & Arora. 2001: online) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงและกรดจัด (Thermoacidophiles) สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่เป็นกรดจัด ($\text{pH} \leq 4$) และอุณหภูมิที่สูง ($\geq 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$) ได้ เช่น *Acidianus infernus* เป็นต้น (Auernik; Cooper; & Kelly. 2008: 445-453)

6.1 ความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในถ้ำ

ระบบนิเวศถ้ำจัดเป็นระบบนิเวศที่มีความจำกัดทั้งด้านอาหาร แสงสว่าง และอากาศ จึงส่งผลให้ถ้ำแต่ละประเภท เช่น ถ้ำลาวา ถ้ำน้ำ ถ้ำน้ำแข็ง จะพบความหลากหลายและปริมาณของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในถ้ำไม่มาก ยกเว้นสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในถ้ำทุกประเภท เนื่องจากแบคทีเรียสามารถอาศัยได้ในทุกสภาพแวดล้อม ถึงแม้ว่าสภาพแวดล้อมนั้นจะไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ก็ตาม โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในถ้ำคือแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีแสงและได้รับพลังงานจากสารอินทรีย์ (Chemoautotrophic Bacteria) (Wu; et al. 2015) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำหน้าที่สำคัญในระบบนิเวศถ้ำ คือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและหมุนเวียนของสารต่าง ๆ เกิดเป็นห่วงโซ่อาหาร (Pricop; & Negrea. 2009: 41-48) โดยจะทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง กระบวนการนี้เรียกว่า มินอรัลไลเซชัน (mineralization) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้จะกลายเป็นสารอาหารให้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในถ้ำ และเมื่อสิ่งมีชีวิตนั้นตายลงจะถูกแบคทีเรียย่อยสลายอีกครั้ง ทำให้แร่ธาตุเหล่านั้นมีการหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลาเกิดเป็นวัฏจักรต่าง ๆ ขึ้นในระบบนิเวศถ้ำ เช่น วัฏจักรไนโตรเจน (Nitrogen cycle) วัฏจักรกำมะถัน เป็นต้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544: 542-556) นอกจากนี้ถ้ำหินปูนที่มีแร่ธาตุจำพวก เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) ซัลเฟอร์ (S) อยู่จำนวนมากแบคทีเรียในถ้ำจึงสามารถใช้แร่ธาตุเหล่านี้ในปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ (Redox reaction) (Wang. 2012) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในถ้ำจึงจัดเป็นผู้ผลิตในระบบนิเวศถ้ำ (Engel. 2010: 219-238) (Pricop; & Negrea. 2009: 41-48) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณ

สารอาหารและความหลากหลายของแบคทีเรียที่พบในถ้ำ คือ อากาศที่ถ่ายเทเข้าสู่ถ้ำ การซึมผ่านของน้ำหรือแหล่งน้ำที่ไหลเข้าสู่ถ้ำ สัตว์ที่อาศัยอยู่ในถ้ำและกิจกรรมของมนุษย์ เป็นต้น นักท่องเที่ยวจัดเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณสารอาหารและความหลากหลายของแบคทีเรียในถ้ำที่เปิดเป็นแหล่งท่องเที่ยว (Wu; et al. 2015)

6.2 สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อแบคทีเรียในถ้ำ

แบคทีเรียที่พบในถ้ำส่วนมากจะอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำ ดินหรือดินตะกอน ก้อนหินหรือผนังถ้ำ (Wu; et al. 2015) ดังนั้นสภาพแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่จึงแตกต่างกันไปดังนี้

6.2.1 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำจะมีชนิดและของแบคทีเรียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับต้นกำเนิดของแหล่งน้ำแต่ละประเภทที่ไหลผ่านถ้ำ เช่น แหล่งน้ำผิวดิน หรือแหล่งน้ำใต้ดิน เป็นต้น

6.2.1.1 แหล่งน้ำผิวดิน (surface water) น้ำผิวดินเป็นทั่วไปที่พบบริเวณพื้นผิวโลก เช่น แม่น้ำลำคลอง ลำธาร ทะเลสาบ ทะเล และมหาสมุทร เป็นต้น นอกจากนี้แหล่งน้ำผิวดินยังได้รับน้ำจากน้ำฝนที่ชะล้างหน้าดินไหลมารวมกับน้ำที่อยู่บนผิวดิน หรือได้รับน้ำเสียจากการปล่อยทิ้งจากแหล่งต่าง ๆ เช่น บ้านเรือน โรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น ส่งผลให้จำนวนและชนิดของแบคทีเรียแตกต่างกันมาก เพราะแหล่งน้ำเหล่านี้ได้รับแร่ธาตุ สารอาหารมาสะสมกันมากทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544: 557-558)

6.2.1.2 แหล่งน้ำใต้ดิน (ground water) น้ำใต้ดินเป็นน้ำจากการซึมผ่านชั้นหินดิน หรือทราย ทำให้แบคทีเรียจะถูกกรองผ่านชั้นหิน ดิน หรือทรายต่าง ๆ และถ้ำแหล่งน้ำใต้ดินนั้นอยู่ลึกมากก็จะทำให้เกิดการกรองได้มาก ทำให้น้ำนั้นพบปริมาณและชนิดของแบคทีเรียน้อยกว่าแหล่งน้ำผิวดิน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544: 558)

จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแหล่งน้ำแต่ละประเภทที่ไหลผ่านถ้ำจะมีสภาพแวดล้อมทางกายภาพและทางเคมีของน้ำที่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ ดังนี้

1. อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตช้าหรือเร็ว แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน เช่น น้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 5 °C จะเหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มไซโครไฟล์ (psychrophile) หรือน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิ 75-80 °C จะ

พบแบคทีเรียกลุ่มเทอร์โมไฟล์ (thermophile) นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำยังเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาลทำให้ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไปด้วย

2. ความดันของน้ำ (hydrostatic pressure)

น้ำในแม่น้ำลำคลองและน้ำในมหาสมุทรลึก ๆ จะมีความดันที่แตกต่างกัน ความดันของน้ำจะทำให้ pH ของน้ำทะเลลดลงส่งผลให้ความสามารถในการละลายสารอาหารเปลี่ยนแปลงไป น้ำในมหาสมุทรที่มีความดันสูงยังพบแบคทีเรียอาศัยอยู่ คือแบคทีเรียกลุ่มที่ชอบความกดดันของน้ำ (barophilic bacteria)

3. แสงสว่าง (light)

สิ่งมีชีวิตในน้ำส่วนใหญ่ต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ในแหล่งน้ำส่วนใหญ่ผู้ผลิตขั้นต้นคือ สาหร่าย หรือแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic bacteria)

4. ความเค็ม (salinity)

ความเค็มของน้ำส่วนใหญ่จะเป็นเกลือคลอไรด์ (Cl^-) ซัลเฟต (SO_4^{2-}) และคาร์บอเนตของโซเดียม (Na^+) โพแทสเซียม (K^+) แคลเซียม (Ca^{2+}) และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) แบคทีเรียในทะเลส่วนใหญ่จะเป็นพวกชอบความเค็ม (halophilic bacteria) จะเจริญได้ดีที่ความเค็ม 2.5-4 % แต่แบคทีเรียจากแม่น้ำจะมีเจริญที่มีความเค็มมากกว่า 1 %

5. ความขุ่น (turbidity)

สารแขวนลอยที่ทำให้น้ำมีความขุ่น ได้แก่ 1) แร่ธาตุ 2) ซากสารอินทรีย์ 3) จุลินทรีย์ที่แขวนลอย ความขุ่นของน้ำมีผลต่อการแพร่กระจายของแสงลงสู่แหล่งน้ำ ส่งผลต่อการสังเคราะห์แสงด้วย

6. pH

จุลินทรีย์ในแหล่งน้ำเจริญที่ pH ระหว่าง 6.5 – 8.5 แต่ pH ของน้ำทะเลอยู่ระหว่าง 7.5 – 8.5

7. สารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ (inorganic and organic constituents)

แหล่งน้ำใกล้ชายฝั่งจะได้รับของเสียจากบ้านเรือนซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารอาหารมาก ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาจมีโลหะหรือสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ หรือในขณะเดียวกันก็ส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่ต้านทานได้เช่นกัน

6.2.2 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีมากที่สุดในดินทั้งชนิดและจำนวน จากการนับโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และปรีชา สุวรรณ

พินิจ. 2544: 536) และระบบนิเวศถ้าก็สามารถพบแบคทีเรียในดินมากกว่าแหล่งอื่น ๆ (Wu; et al. 2015) ปริมาณของแบคทีเรียในดินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหรือปัจจัยด้านต่าง ๆ ของดิน เช่น ชนิดและปริมาณของสาร ความชื้นในดิน การหมุนเวียนหรือการระบายอากาศ อุณหภูมิ pH หรือสภาวะต่าง ๆ เช่น การเกิดน้ำท่วมทำให้มีการชะหน้าดิน เป็นต้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544: 542)

7. เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดสายสั้น ๆ ซึ่งเป็นช่วงที่ลำดับเบสสามารถจับและเข้าคู่กันได้ในช่วงใดช่วงหนึ่งบนสายดีเอ็นเอ (กำธน สินธวานนท์. 2006) และใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสิ่งมีชีวิต อาจมีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) เช่น ยีน 18S, 5.8S หรือ 28S เป็นต้น บนไมโทคอนเดรียล (mitochondrial DNA) เช่น 12S, 16S หรือ COI เป็นต้น (Gillespie; et al. 2006: 657-686) หรือบนคลอโรพลาสต์ (Chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ (สุรีพร เกตุงาม. 2546: 37-59) ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานด้านต่าง ๆ เช่น งานด้านพันธุศาสตร์หรือด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ ด้านการการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ และได้รับความนิยมมากสำหรับการศึกษาด้านการจำแนกหรือจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอในการศึกษาสามารถใช้ทำการศึกษหรือตรวจสอบได้ทุกระยะการพัฒนามของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังช่วยประหยัดเวลา ประหยัดแรงงาน ลดต้นทุนและพื้นที่ในการศึกษาอีกด้วย (จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555: 299-308)

เครื่องหมายดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียลมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากเครื่องหมายดีเอ็นเอในนิวเคลียส คือ ดีเอ็นเอที่ได้จะได้รับการถ่ายทอดโดยตรงจากมารดาเท่านั้น โดยที่ไม่มีดีเอ็นเอจากฝ่ายพ่อเข้ามาปะปน (จิรารัช กิตนะ. 2555) แต่ดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสจะได้รับการถ่ายทอดมาจากฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่คนละครึ่ง (วรกมล แนนอุตร. 2553) ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียลเกิดอัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate) สูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส และดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียลจะมีลักษณะเป็น natural marker ไม่มีอินทรอน (intron) (ตุจตุติ ปานพรหมมินทร์. 2013: 174-184) นอกจากนี้ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียลยังมีความสามารถในการทนต่อความร้อนได้ดีกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส (วรกมล แนนอุตร. 2553)

ดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสจะมีลักษณะเป็นสายเกี่ยวพันคู่ เส้นยาว (ภาพประกอบ 3) (สุทัศน์ ดวงจิตร. 2554: 53-65) โดยมียีนต่าง ๆ เช่น ยีน 5.8S, 28S หรือ 18S เป็นต้น ซึ่งนักวิจัย

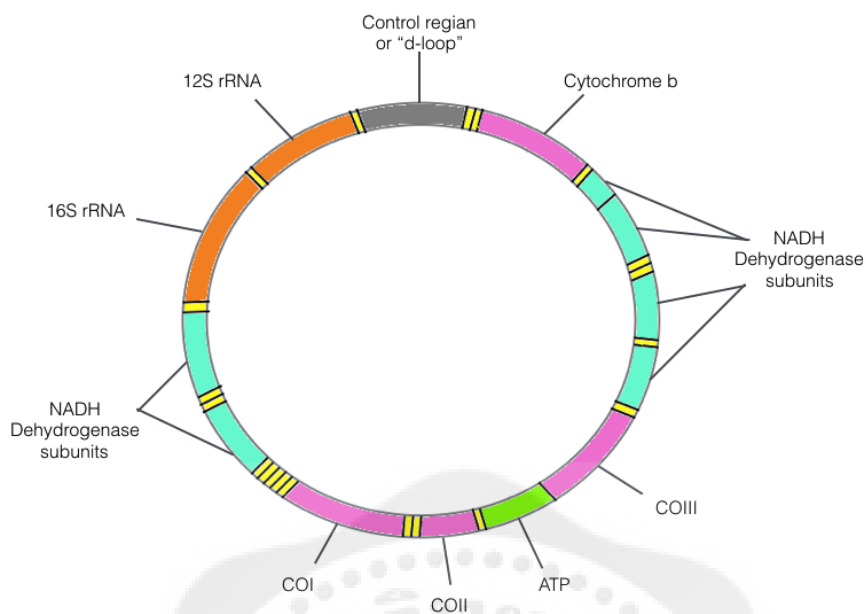
ส่วนใหญ่นิยมใช้ยีน 18S rDNA มาศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในระดับที่สูงกว่าระดับสปีชีส์ (species) เช่น ระดับสกุล (genus) หรือระดับวงศ์ (family) (Fernandez; et al. 1998: 383-391) ส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโทคอนเดรียจะมีลักษณะเป็นวงกลมสายคู่ (ภาพประกอบ 4) โดยมียีนต่างๆ เช่น ยีน COI (Cytochrome C oxidase subunit I) เป็นยีนที่มีความสามารถในการสร้างโปรตีนได้ หรือยีน 16S rRNA ยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์สูง เป็นต้น ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นยีนที่มีประสิทธิภาพสูงและนิยมใช้สำหรับจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิต (ภรณ์อุทโยภาศ. 2555: 269-278) นอกจากนี้ยังมีความสามารถและเหมาะสมกับการนำมาศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากสามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตที่ได้ถึงในระดับสปีชีส์ (species) เดียวกันได้ (Boore; & Brown. 2000: 87-106)

การเลือกใช้ยีนต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการศึกษาต้องพิจารณาความสามารถของยีนด้านต่าง ๆ เช่น ยีน COI มีข้อดีกว่ายีนอื่น ๆ ที่อยู่บนไมโทคอนเดรีย คือ ยีน COI ไม่มีการขาดหรือเกินของคู่เบสทำให้ไม่มีปัญหาในการทำ sequence alignment (ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. 2013: 174-184) แต่ยีน COI ในพืชมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการต่ำ ทำให้มีการแปรผันของลำดับดีเอ็นเอไม่เพียงพอที่จะใช้ศึกษาจำแนกพืชได้ (ณัฐกร เพชรชา; ดวงมล มั่นศิริ; & สุรพล แสนสุข. 2011: 554-563) หรือยีน 18S rDNA มีความสามารถในการจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ถึงระดับสกุลหรือวงศ์ ไม่สามารถจำแนกถึงระดับสปีชีส์ได้ เป็นต้น (อาชว์ดาม์ กันสิทธิ์. 2544).



ภาพประกอบ 3 แสดงแผนผังตำแหน่งยีนบริเวณ 18S, 5.8S และยีน 28S

ที่มา: ปรับปรุงและดัดแปลงจาก อาชว์ดาม์ กันสิทธิ์. (2544). การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ปอด (*Paragonimus heterotremus*) โดยใช้ 18S small subunit และ internal transcribed spacer region ของ nuclear rDNA. ปริญญาณิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.



ภาพประกอบ 4 แสดงแผนผังตำแหน่งยีนบริเวณ 16S rRNA และยีน COI ในไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ

ที่มา: ปรับปรุงและดัดแปลงจาก สุทัศน์ ดวงจิตร. (2554). ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์. *นิติเวชศาสตร์*. 4(1): 53-65.

8. เทคนิค Pyrosequencing

เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี pyrosequencing เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาจากหลักการของ synthesis sequencing และการตรวจจับ inorganic pyrophosphate (ppi) (มณฑล เลิศวรปรีชา. 2554: 111-118) โดยปฏิกิริยาจะอาศัยการทำงานของ primer, DNA template, substrate APS และเอนไซม์ 4 ชนิดคือ เอนไซม์ klenow DNA polymerase ซึ่งทำหน้าที่นำ dNTP ต่อสายดีเอ็นเอและปล่อย ppi ออกมา เอนไซม์ ATP sulfurylase ทำหน้าที่เปลี่ยน ppi ให้เป็น ATP โดยการรวมเข้ากับ APS ซึ่ง ATP จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ Luciferase ทำหน้าที่เปลี่ยน luciferin เป็น oxyluciferin และปล่อยสารให้สามารถเรืองแสงออกมาซึ่งถูกจับได้ด้วยกล้อง CCD แสดงให้เห็นเป็นกราฟ (peak) ซึ่งความสูงของจุดกราฟจะเป็นสัดส่วนกับเบสนิวคลีโอไทด์ที่เอนไซม์ klenow DNA polymerase ต่อเข้าไป และเอนไซม์ Apyrase ทำหน้าที่ย่อย dNTPs และ ATP ที่ไม่ถูกนำไปต่อสาย (Ahmadian; Ehn; & Hober. 2006: 83-94) การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี

pyrosequencing ได้ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชิงพาณิชย์ (Margulies; et. al. 2005: 376-380) เนื่องจากมีข้อดีคือ สามารถหาลำดับเบสได้ในปริมาณมาก ใช้ระยะเวลาสั้น และราคาถูกกว่าอื่น (เทคนิคของ sanger method) แต่เทคนิค pyrosequencing ยังมีข้อเสียคือ ความยาวของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้สั้นมากหากเปรียบเทียบกับวิธีการโคลนนิ่งด้วยวิธีมาตรฐาน จึงทำให้การเปรียบเทียบผลในฐานข้อมูล NCBI ให้ผลที่ลดลง (มณฑล เลิศวรปรีชา. 2554: 111-118)

9. ข้อมูลทั่วไปของจังหวัดสระแก้ว

9.1 ที่ตั้ง ขนาด และอาณาเขต

จังหวัดสระแก้วตั้งอยู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีพรมแดนติดต่อกับประเทศกัมพูชาทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ 165 กิโลเมตร ทิศเหนือเป็นเขตติดต่อกับจังหวัดบุรีรัมย์และนครราชสีมา มีเทือกเขาบรรทัดซึ่งเป็นต้นกำเนิดของแม่น้ำบางปะกงตั้งอยู่มีลักษณะเป็นป่าเขาที่ขรุขระได้แก่ บริเวณอุทยานแห่งชาติปางสีดาซึ่งเป็นแหล่งต้นน้ำลำธาร เป็นต้น ทิศใต้ติดกับจังหวัดฉะเชิงเทราและจันทบุรี มีลักษณะเป็นที่ราบเชิงเขา มีสภาพเป็นป่าโปร่ง ส่วนใหญ่ถูกบุกรุกแผ้วถางป่าเพื่อทำการเกษตรทำให้ป่าเสื่อมโทรม ตอนกลางของพื้นที่มีลักษณะเป็นที่ราบ ได้แก่ ที่ราบอำเภอวังน้ำเย็นกิ่งอำเภอวังสมบูรณ์ เป็นต้น ทิศตะวันออกมีลักษณะเป็นสันปันน้ำและพื้นที่ลาดไปทางอำเภอมืองสระแก้ว และอำเภอรัญประเทศซึ่งเป็นเขตติดต่อกับประเทศกัมพูชา ทิศตะวันตกเป็นเขตติดต่อกับจังหวัดปราจีนบุรี มีลักษณะเป็นที่ราบถึงราบสูงและมีสภาพป่าเป็นป่าโปร่ง (กลุ่มส่งเสริมและพัฒนาเกษตรกร. 2554: 2)

9.2 ลักษณะภูมิอากาศ

ลักษณะภูมิอากาศโดยทั่วไปของจังหวัดสระแก้วเป็นแบบทุ่งหญ้าเมืองร้อน (Tropical Grassland or Savanna Climate) กล่าวคือ ในฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้จะมีอากาศชุ่มชื้นและฝนตกตลอดฤดู แต่ในมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือหรือฤดูหนาวจะมีอากาศแห้ง แล้ง ฤดูการแบ่งออกได้เป็น 3 ฤดู คือ

ฤดูร้อน เริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ – เดือนพฤษภาคม อากาศจะร้อนจัดช่วงกลางเดือน เมษายน วัตได้ 40.3 °C

ฤดูฝน เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม – เดือนตุลาคม ซึ่งเป็นระยะที่ลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้พัดเข้าสู่ประเทศไทย อากาศจะเริ่มชุ่มชื้นและมีฝนตกชุกตั้งแต่เดือนพฤษภาคมเป็นต้นไป ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 1,296 - 1,539 มิลลิเมตร

ฤดูหนาว เริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน - เดือนมกราคม อากาศเย็นและมีหมอกในตอนเช้าอุณหภูมิโดยเฉลี่ย 27.5 - 28.78 °C (กลุ่มส่งเสริมและพัฒนาเกษตรกร. 2554: 3)

9.3 ทรัพยากรธรรมชาติ

9.3.1 ป่าไม้ ปัจจุบันจังหวัดสระแก้วมีเนื้อที่ป่าไม้จำนวน 861,999,518 ไร่ หรือคิดเป็นร้อยละ 19.17 ของพื้นที่จังหวัด มีพื้นที่ป่าตามกฎหมายที่เป็นอุทยานแห่งชาติ 2 แห่ง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า 1 แห่ง และป่าสงวนแห่งชาติ 10 แห่ง โดยปัญหาที่พบเป็นการลักลอบตัดไม้ทำลายป่า และการบุกรุก แผ้วถางป่า สาเหตุส่วนใหญ่มาจากการเพิ่มจำนวนของประชากรและความต้องการที่ดินทำกินของราษฎร (สำนักงานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมจังหวัดสระแก้ว. 2554: ออนไลน์)

9.3.2 แหล่งน้ำ จังหวัดสระแก้วมีแหล่งน้ำธรรมชาติที่สำคัญ 12 แห่ง คือ คลองพระสะทึง คลองตาหลัง คลองไก่อีเรือน คลองวังจิก คลองพระปรัง คลองลำสะโตน ห้วยยาง ห้วยตะเคียน ห้วยนางาม ห้วยพรหมโหด ห้วยไผ่ และคลองน้ำใส มีแม่น้ำ ห้วย ลำธาร คลอง จำนวน 244 สาย ซึ่งในจำนวนนี้มีที่ใช้งานได้ในฤดูแล้ง จำนวน 96 สาย มีหนองบึง 106 แห่ง ที่มีสภาพใช้งานได้ในฤดูแล้ง 53 แห่ง และอื่นๆ 297 แห่ง ที่มีสภาพการใช้งานได้ในฤดูแล้ง 202 แห่งครอบคลุมพื้นที่ทำการเกษตรในฤดูฝน 2,078,205 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 88.80 ของพื้นที่การเกษตร มีปริมาณน้ำท่าเฉลี่ย 2,532.660 ล้านลูกบาศก์เมตร และพื้นที่มีศักยภาพในการกักเก็บน้ำประมาณ 1,154.305 ล้านลูกบาศก์เมตร แต่ในปัจจุบันมีแหล่งกักเก็บน้ำได้เพียง 376.705 ล้านลูกบาศก์เมตร หรือคิดเป็นร้อยละ 15 ของปริมาณน้ำท่าเฉลี่ย และมีพื้นที่ชลประทานเพียง 244.838 ไร่ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 10.4 ของพื้นที่ทำการเกษตร (กลุ่มส่งเสริมและพัฒนาเกษตรกร. 2554: 4-6)

10. ถ้ำน้ำเขาศิวะ

ตั้งอยู่ที่บริเวณบ้านเขาจันทร์แดง อำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว ระหว่างเทือกเขาตาจ็อกและเทือกเขากมะม่วงซึ่งเป็นเทือกเขาใกล้ชายแดนไทย-กัมพูชา อยู่ห่างจากอำเภอคลองหาดประมาณ 16 กิโลเมตร เป็นถ้ำที่มีน้ำไหลออกมาทั้งปี ถ้ำลึกประมาณ 300 เมตร ระดับน้ำสูงตั้งแต่ 10-220 เซนติเมตร ภายในมีหินงอก หินย้อยและมีรูปลักษณะต่างๆ เมื่อแสงไฟกระทบกับเกล็ดทรายของหินงอกหินย้อยสะท้อนกลับมาสีสันแปลกตา บางบริเวณมีลักษณะคล้ายมานและยังมีน้ำไหลเป็นน้ำตกขนาดเล็กภายในถ้ำด้วย น้ำที่อยู่ในถ้ำจะไหลหมุนเวียนตลอดเวลา โดยเฉพาะช่วงฤดูฝนน้ำจะเย็นมากกว่าฤดูหนาว อากาศสดชื่นมีการถ่ายเทตลอด ถ้ำแห่งนี้ถูกค้นพบเมื่อ พ.ศ. 2519

โดยชาวบ้านที่อาศัยอยู่ในละแวกนี้และเปิดให้เป็นแหล่งท่องเที่ยวเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา (กรมทรัพยากรธรณี. 2554)

11. เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ในปี ค.ศ. 2007 โจวและคนอื่น ๆ (Zhou; et al. 2007: 105-112) ได้ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินในถ้ำ Niu ของประเทศจีน โดยใช้วิธี PCR (polymerase Chain Reaction) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16s rRNA พบว่า แบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ ไฟลัม proteobacteria (42.6%) รองลงมาคือ ไฟลัม acidobacteria (18.6%), planctomycetalce (9.0%), nitrospirae (8.0%), chloroflexi (green nonsulfur bacteria 7.5%), actinobacteria (High G+C gram-positive bacteria 6.4%), candidate division (including the OP3,GN08 and SBR 1093, 3.2%), geammatinonetes (2.7%) และ bacteroidetes (2.1%) ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2010 เบอรอนและคนอื่น ๆ (Barron; et al. 2010: 1-10) ได้รายงานเกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินในถ้ำ Blowing Spring Cave เมือง Lauderdale รัฐ Alabama ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้วิธี PCR เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA) บริเวณ 16s rRNA พบว่าความหลากหลายของแบคทีเรียที่พบในถ้ำมีดังนี้ ไฟลัม proteobacteria (43%), planctomycetalce (12%), actinobacteria (9%), geammatinonetes (9%), firmicutes (5%), chloroflexi (5%), acidobacteria (4%) และแบคทีเรียที่ไม่สามารถระบุไฟลัมได้ 13%

คาร์กัน; แพทล; และเวอมา. (Karkun; Patle; & Verma. 2014: 491-499) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในถ้ำแมนดีพคอลล (Mandeepkhol cave) ในจังหวัดราชันจิว (Rajanadgaon) ของอินเดีย เพื่อหาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (อุณหภูมิคงที่ประมาณ 26 -28 °C) ซึ่งอาศัยอยู่ในความมืดภายในถ้ำ โดยทำการเก็บตัวอย่างจากถ้ำในฤดูร้อน ฤดูหนาว และฤดูฝน ซึ่งตัวอย่างที่เก็บคือ ตะกอนจากมูลค้างคาว ตะกอนกิ่งไม้ และตะกอนใบไม้ จากนั้นจึงคัดแยกแบคทีเรียโดยการเจือจางตัวอย่างที่เก็บมาที่ 10^6 และ 10^7 เท่า จากนั้นเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ 28 ± 2 °C ทำการนับโคโลนีที่เกิดขึ้นและตรวจดูรูปร่างและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่มีจำนวนมากโดยการส่งไปตรวจสอบภายในห้องแล็บ พบว่าในฤดูร้อน สามารถจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงสุด 25 ไอโซเลท โดยแยกได้สูงสุดจากตะกอนมูลค้างคาว ตะกอนใบไม้ และตะกอนของกิ่งไม้ ตามลำดับ ในฤดูฝน สามารถจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงสุด 32 ไอโซเลท โดยแยกได้สูงสุดจากตะกอนมูลค้างคาว ตะกอนใบไม้ และตะกอนของกิ่งไม้ ตามลำดับ ในฤดูหนาวสามารถจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงสุด 28 ไอโซเลท โดยแยกได้สูงสุดจาก

ตะกอนมูลค้างคาว ตะกอนใบไม้ และตะกอนของกิ่งไม้ ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียที่พบ 59% เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และ 41% เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สปีชีส์ที่พบมากและบ่อยที่สุดคือ *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Brevundimonas diminuta* โดยแบคทีเรียที่พบจะเป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลางในการดำรงชีวิตในสภาวะภายในถ้ำ

แคมป์เบล และคนอื่น ๆ (Campbell, Joshua W.; et al. 2011: 75-82) ได้ตรวจสอบตัวอย่างน้ำภายในถ้ำ 6 ถ้ำ จากตอนเหนือของอลาบามา (Alabama) และภาคตะวันตกเฉียงเหนือของจอร์เจีย (Georgia) เพื่อศึกษาเกี่ยวกับความอุดมสมบูรณ์ จำนวนสปีชีส์ของเชื้อโคลิฟอร์ม (Coliform) และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ซึ่งแคมป์เบลได้ตั้งข้อสมมุติฐานว่า ถ้ำที่มีมนุษย์และสัตว์เข้าออกเป็นประจำหรือมีน้ำที่ไหลผ่านบริเวณที่ทำการเพาะปลูกหรือไหลผ่านขยะของเสีย จะทำให้มีความอุดมสมบูรณ์และมีจำนวนสปีชีส์ของแบคทีเรียมากขึ้น จากการศึกษา พบว่ามีโคลิฟอร์ม 10 สปีชีส์ และแบคทีเรียทั่วไป 40 สปีชีส์ ภายในถ้ำทั้ง 6 ถ้ำ โดยที่แบคทีเรีย 27 สปีชีส์ เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค ซึ่งแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *E. coli* สามารถพบได้ทุกถ้ำ และยังพบอีกว่าความอุดมสมบูรณ์และจำนวนสปีชีส์ของแบคทีเรียที่มากขึ้น เกิดจากมนุษย์ สัตว์ เช่น ค้างคาว และน้ำที่ไหลผ่านของเสียต่าง ๆ นอกจากนี้แคมป์เบลยังได้ตรวจพบแบคทีเรียที่อยู่ในอุจจาระปนเปื้อนอยู่ในน้ำภายในถ้ำทุกถ้ำ

โซค (Szoke, Emilia. 2005: 135-142) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำภายในถ้ำ ในประเทศฮังการี (Hungary) ตั้งแต่ปี 2000 จนถึงปัจจุบัน โดยเก็บตัวอย่างน้ำภายในถ้ำ น้ำพุ และโคลน ไปตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Atomabsorption spectrophotometer ในห้องแลป พบว่า มีการปนเปื้อนของโลหะหนักอยู่ในเกณฑ์ที่สูงเกินกว่าที่จะยอมรับได้ ซึ่งมีการตรวจพบการปนเปื้อนของ ทองแดง (Cu) โคบอลต์ (Co) แคดเมียม (Cd) นิกเกิล (Ni) ตะกั่ว (Pb) สังกะสี (Zn) แมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe) และโครเมียม (Cr) เป็นต้น จากตัวอย่างทั้งหมดจะพบตะกั่วมีการปนเปื้อนในน้ำสูงเกินกำหนดค่ามาตรฐานน้ำดื่ม จากการตรวจสอบตัวอย่างในปี 2000, 2001 และในเดือนธันวาคม 2002 พบแคดเมียมปนเปื้อนในน้ำในพื้นที่ที่ตรวจสอบและยังคงพบการปนเปื้อนของตะกั่วเช่นกัน

เวสเปอร์ (Vesper, Dorothy J. 2012: 161-166) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำภายในถ้ำ พบว่าโลหะหนักที่ปนเปื้อนในถ้ำและและภูมิประเทศแบบคาสต์ (karst) สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ เช่น การเคลื่อนที่ของผิวโลก พายุ การซึมของน้ำผ่านชั้นหินต่าง ๆ เป็นต้น และเกิดขึ้นจากสิ่งมีชีวิต เช่น เชื้อจุลินทรีย์ หรือมนุษย์ เป็นต้น โดยโลหะหนักที่พบ เช่น สารหนู (As) แบรีเลียม (Be) แคดเมียม (Cd) โครเมียม (Cr) โคบอลต์ (Cr) ทองแดง (Cu)

เหล็ก (Fe)ปรอท (Hg) โมลิบดีนัม (Mo) แมงกานีส (Mn) นิกเกิล (Ni) ตะกั่ว (Pb) แอนทิโมนี (Sb) สแกนเดียม (Sc) ซีลีเนียม (Se) ไทเทเนียม (Ti) แทลเลียม (Tl) วาเนเดียม (V) และสังกะสี (Zn) โลหะหนักที่พบมากที่สุดคือ เหล็ก (Fe) และ แมงกานีส (Mn) และยังสามารถพบได้ในถ้าทั่วไป ความสามารถในการละลายและการเคลื่อนที่ของเหล็กและแมงกานีส คล้ายกับโลหะหนักอื่น ๆ ทั่วไป คือ จะถูกควบคุมด้วยค่า pH และปฏิกิริยารีดอกซ์-ออกซิเดชัน (reduction - oxidation) หรือ ปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) โดยทั่วไปโลหะหนักจะละลายอยู่ในน้ำ บางส่วนมีแนวโน้มจะตกตะกอน ลงรวมกับหินหรือดินที่พื้นถ้า

เฉลิม ชัยบุญเรือง (2553) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการบริหารจัดการคุณภาพน้ำบาดาล จากกรณีศึกษาในพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม เป็นการทำการศึกษาและวิเคราะห์คุณภาพน้ำบาดาล เพื่อสำรวจปริมาณการปนเปื้อนของมลพิษจากฟาร์มหมูในแหล่งน้ำบาดาลและประเมิน สภาพความรุนแรงของการปนเปื้อนของมลพิษในน้ำเสียจากฟาร์มหมูต่อคุณภาพน้ำบาดาล โดย ทำการศึกษาฟาร์มหมูทั้ง 3 ขนาด (ขนาดเล็ก กลาง และใหญ่) พบว่ามีค่าความเป็นกรดและเบสสูง ค่าบีโอดี (BOD) มีค่าอยู่ระหว่าง 1,500 – 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกินมาตรฐานน้ำบาดาลสำหรับการอุปโภคบริโภค และเห็นได้ว่าคุณภาพน้ำบาดาลมีแนวโน้มเสื่อมสภาพลง ซึ่งอาจจะทวีความรุนแรงก่อให้เกิดความเสียหายมากขึ้นเป็นลำดับ

กรมชลประทาน (2555) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ผลข้อมูลตรวจวัดคุณภาพน้ำภาคสนาม ในสระน้ำรอบพระตำหนักสวนปทุม เริ่มตั้งแต่เดือน เมษายน 2553 ถึง มีนาคม 2554 มีจุดตรวจวัด ทั้งหมด 6 จุดสำรวจ สำหรับดัชนีพื้นฐานที่ทำการสำรวจ ได้แก่ ความเป็นกรดและด่าง ออกซิเจนละลาย กาน้ำไฟฟ้าของน้ำ ความเค็ม อุณหภูมิของน้ำ ของแข็งละลายทั้งหมด ฯ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า คุณภาพน้ำโดยรวมยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำใช้ชลประทานเพื่อการเกษตร

ศรีสุวรรร์ เกษมสวัสดิ์ ศิวพันธ์์ ชูอินทร์ และวรชดา บัวไพร (2555) ศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเพื่อการอุปโภคบริโภคอย่างยั่งยืนในเขตพื้นที่อำเภอบางคนที จังหวัดสมุทรสงคราม เพื่อสำรวจตรวจสอบคุณภาพน้ำดิบที่นำมาผลิตเพื่อการอุปโภคบริโภคภายในพื้นที่อำเภอบางคนที จังหวัดสมุทรสงคราม งานวิจัยนี้ทำการศึกษาคูณภาพน้ำในพื้นที่ 13 ตำบลของอำเภอบางคนทีในคลองสายหลักที่มีขนาดใหญ่จำนวน 9 จุด และคลองย่อยที่มีขนาดเล็กจำนวน 41 จุด ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ฤดูกาล คือฤดูร้อนในวันที่ 27 – 28 มีนาคม และ 26 -27 เมษายน 2555 และฤดูฝน ในวันที่ 27 – 28 กรกฎาคม และ 18 – 19 สิงหาคม 2555 พบว่าผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำด้านกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิของน้ำ กรด-ด่าง พบว่าค่าเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 3 ของกรมควบคุมมลพิษ ส่วนความขุ่นของน้ำและปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดมีค่าไม่สูง แต่ไม่

สามารถเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานได้ เนื่องจากการกำหนดค่ามาตรฐาน คุณภาพน้ำด้านเคมี ได้แก่ ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ ค่าบีโอดี และค่าไนโตรเจนในรูปไนเตรทและในรูปแอมโมเนีย พบว่า ค่าเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 3 ของกรมควบคุมมลพิษกำหนด ส่วนค่าไนโตรเจนในรูปไนไตรต์นั้นมีค่าต่ำแต่ไม่สามารถเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานได้เนื่องจากไม่มีค่ากำหนด ปริมาณสารโลหะหนักในน้ำพบว่า สารตะกั่วและสารแคดเมียมมีค่าสูงกว่าที่เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 3 ของกรมควบคุมมลพิษกำหนดมาก ส่วนสังกะสีและสารทองแดง มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน

คอตเทลลัท (Kottelat, Maurice. 1988: 225-231) ได้ศึกษาปลาในถ้ำทางภาคเหนือของประเทศไทย 2 ชนิด คือ ปลาค้อ (*Nemacheilus*) และ ปลาจิ้งจก (*Homaloptera*) โดยใช้วิธีการตรวจวัดลักษณะตามวิธีของ คอตเทลลัท (Kottelat) ส่วนวิธีการตั้งชื่อของสิ่งมีชีวิตจะดูระบบของเส้นข้างลำตัวตามวิธีของอิลลิก (Illick) พบว่าเป็นปลาถ้ำ 2 สปีชีส์ที่พบใหม่ในจังหวัดแม่ฮ่องสอน ทางภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งได้มีการบันทึกการค้นพบปลาถ้ำเป็นครั้งแรกในภูมิภาคนี้ ปลา *Nemacheilus oedipus* เป็นสปีชีส์ที่พบในถ้ำน้ำกลาง (Thum Nam Lang) มีดวงตาเสื่อมคุณภาพ และเป็นการค้นพบครั้งแรกของปลาในจีนัส *Nemacheilus* ที่ยังมีร่องรอยของดวงตาเหลืออยู่ ปลา *Homaloptera thamicola* พบในถ้ำซุซา (Tham Susa) เป็นสปีชีส์ที่ตาบอดโดยสมบูรณ์และอาจจะไม่ได้อยู่ในจีนัส *Homaloptera* อย่างแน่นอน เพราะมีรายละเอียดทางโครงสร้างของปากที่แตกต่างกัน และยังเป็นปลาตาบอดชนิดแรกของจีนัส *Homaloptera* ที่อาศัยอยู่ใต้ดินภายในถ้ำ

เซอร์เจอร์น และคนอื่นๆ (Sargeran, Payam; et al. 2008: 67-74) ได้ศึกษาเกี่ยวกับปลาในถ้ำ สปีชีส์ *Iranocypris typhlops* ของอิหร่าน สองลักษณะที่มีความแตกต่างกันของพื้นที่ใต้ปาก (mental disc) ทำการจับปลาทั้งหมด 44 ตัวจากถ้ำ เก็บรักษาใน 96% เอทานอล ซึ่งมีปลาที่มีพื้นที่ใต้ปากจำนวน 5 ตัว วิเคราะห์โดยการวัดรูปร่างทางสัณฐานวิทยาและลักษณะที่สามารถนับได้ เช่น ครีบ หรือเกล็ด เป็นต้น ตามวิธีของแอบโดลี (Abdoli) เพื่อเปรียบเทียบปลาระหว่างกลุ่มที่มีพื้นที่ใต้ปากและกลุ่มที่ไม่มี โดยทำการวัดรูปร่างทางสัณฐานวิทยา 24 อย่างและลักษณะที่สามารถนับได้ 9 อย่าง จากนั้นวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการจัดจำแนกกลุ่มตามวิธี cluster และ discriminant methods พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างปลา 2 กลุ่ม คือ ปลาที่มีพื้นที่ใต้ปากจะมีครีบอกลดลง ส่วนปลาที่ไม่มีพื้นที่ใต้ปากโดยทั่วไปจะมีถุงลมทั้งสองข้าง และอาจมีความแตกต่างทางด้านการหาอาหารระหว่างปลา 2 กลุ่ม ปลาที่มีพื้นที่ใต้ปากจะสามารถแหบและแทะกินอาหารกับพื้นผิวได้ และความยาวของลำไส้ของปลาที่มีพื้นที่ใต้ปากอาจบ่งบอกถึงลักษณะการกินซากพืชได้

สเตรกเกอร์; เฮาสดอร์ฟ; & วิลเคนส. (Strecker; Hausdorf; & Wilkens. 2012: 62-70) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการปรับตัวของปลา *Astyanax* ในเขตร้อนของทวีปอเมริกาเพื่ออธิบายการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในถ้ำรวมถึงการเกิดวิวัฒนาการย้อนหลัง โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของ microsatellite และ mitochondrial ของปลา *Astyanax* ในถ้ำและนอกถ้ำอย่างละ 7 ตัว ในประเทศเม็กซิโก เพื่ออธิบายวิวัฒนาการของปลาในถ้ำกับทฤษฎีสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันที่มาจากรรพบุรุษเดียวกันแล้วแยกกันไปอยู่คนละสถานที่ที่แตกต่างกันไป แต่มีลักษณะทางสิ่งแวดล้อมคล้าย ๆ กัน ทำให้มีวิวัฒนาการไปในทางเดียวกัน ผลของการศึกษาพบว่าปลา *Astyanax* ได้เข้ามาอยู่ทางตอนเหนือของเม็กซิโกโดยข้าม Trans-Mexican Volcanic Belt มีการปรับตัวเพื่ออาศัยอยู่ในใต้ดิน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปลาภายในถ้ำและนอกถ้ำ

ในปี ค.ศ. 1998 เอง และคอลเลลรัซ (Ng, Heok Hee; & Kottelat, Maurice. 1998: 393-399) ได้ค้นพบปลาชะโอนถ้ำ (*Pterocryptis buccata*) เป็นครั้งแรกในถ้ำจังหวัดกาญจนบุรี เป็นปลาในกลุ่มปลาตุ๊ก ซึ่งมีความแตกต่างจากปลานอกถ้ำในส่วนของกล้ามเนื้อบริเวณขากรรไกรล่าง แก้มปลา ความกว้างของครีบก กระดูก หนวด และฟันปลา

ในปี พ.ศ. 2556 ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์; บุษบง ศรีอ่อนคง; และ นนทรี ปานพรหมมินทร์ ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกชนิดของปลาฉิววงศ์ Rasborinae 12 ชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (Cytochrome C Oxidase I : COI) จากการศึกษาพบว่า ยีน COI สามารถเพิ่มปริมาณได้ในปลาทุกชนิด และยังไม่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาจำนวน 4 ชนิด ในฐานข้อมูล Genbank คือ ปลาฉิวหางดอก ปลาฉิวสามจุด ปลาฉิวอ่าว และปลาฉิวข้าวสาร ในฐานข้อมูล BOLD คือปลาฉิวหางดอก ปลาฉิวสามจุด ปลาฉิวข้าวสาร และปลาฉิวหางกรรไกร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการสำรวจถ้า

1. เครื่องวัดระยะทาง
2. เชือกความยาว 50 เมตร
3. เครื่องวัดอุณหภูมิ
4. ตาชั่งจับปลา
5. หลอดทดลองขนาด 50 ml.
6. ถังพลาสติกและหนังยาง
7. เครื่องวัดแสง
8. ไฟฉาย
9. กล้องถ่ายภาพ
10. Parafilm
11. 4% formaldehyde
12. Absolute alcohol
13. เสื่อชุบน้ำ
14. ไม้บรรทัดวัดขนาด
15. ถังเก็บควบคุมอุณหภูมิ
16. กระดาษแก้วและดินสอ

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เครื่องวัดความกระต้างในน้ำ แบบภาคสนามรุ่น HI 96735 Hardness Meter (HANNA instrument, United Kingdom)
2. เครื่องวัด ค่าpH ค่าความนำไฟฟ้า ค่าการต้านไฟฟ้า ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำ ค่าความเค็ม รุ่น HQd Series Portable Meter (Hach, USA)
3. เพลทอาหารสำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Compact Dry) EC *E. coli* & Coliform (NISSUI, JAPAN)
4. ชุดทดสอบสังกะสี (zinc) Aqua Quant (MERCK, Germany)
5. ชุดทดสอบแอมโมเนียม (Ammonium) Aqua Quant (MERCK, Germany)
6. ชุดทดสอบทองแดง (copper) Aqua Quant (MERCK, Germany)
7. ชุดทดสอบเหล็ก (iron) Aqua Quant (MERCK, Germany)
8. ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Germany)
9. ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)
10. ชุดสกัดดีเอ็นเอ ZR soil microbe DNA kits (ZYMO RESEARCH, USA)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR (BIOER, CHINA)
12. เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) (ADVANCE, Japan)
13. เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) (SCIOLOGEX, USA)
14. เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (spin down) (SCIOLOGEX, USA)
15. เครื่องผสม (vortex) (WISD, KOREA)
16. เครื่องถ่ายภาพเจล (gel doc) (Major science, USA)
17. เครื่องให้กำเนิดแสง UV (uv transilluminator) (Labnet, USA)
18. เครื่องอุ่นสารในหลอดทดลองแบบแห้ง (Digital Dry Bath) (LABNET, USA)
19. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง (OHAUS, USA)
20. เครื่องทำให้แห้งสนิท (Critical Point Drying) (POLARON, UK)
21. กล้องจุลทรรศน์ (LABOMED, USA)
22. บีกเกอร์ ขนาด 200 มิลลิลิตร
23. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
24. เพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) (Hycon Plastics, New Zeland)

25. อาหารปลาสำเร็จรูป (Sakura, Thailand)
26. Isopropanol (BIO BASIC, CANADA)
27. Agarose (Life technologies, USA)
28. Ethanol (MERCK, Germany)
29. Green Master Mix, 2X (PROMEGA, USA)
30. Nuclease-Free water (PROMEGA, USA)
31. 50 bp DNA Ladder r-t-u (biotechrabit, Germany)
32. DNA Loading Dye 6X (biotechrabit, Germany)
33. TEA buffer (MERCK, Germany)
34. 4% formaldehyde (MERCK, Germany)
35. Glutaraldehyde (SIGMA, Germany)
36. Sodium Cacodylate buffer (SIGMA, Germany)
37. Osmium tetroxide (SIGMA, Germany)
38. Uranyl acetate (SIGMA, Germany)

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยสรุปได้ดังนี้

1. การสำรวจสภาพแวดล้อมลักษณะทั่วไปของถ้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างปลาและตัวอย่างดินในถ้ำ
2. นับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มจากน้ำในถ้ำและบ่อน้ำนอกถ้ำ โดยใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Compact Dry)
3. การจัดจำแนกปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* ด้วยการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล(ยีน 16S rDNA และยีน CO1)
4. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินโคลนในถ้ำเขาติวะโดยการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region
5. การศึกษาหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* จากน้ำในถ้ำเขาติวะด้วยการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (ยีน 18S rDNA)

1. การสำรวจสภาพแวดล้อมลักษณะทั่วไปของถ้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างปลาและตัวอย่างดินในถ้ำ



ภาพประกอบ 5 แผนที่ถ้ำเขาติวะ จังหวัดสระแก้ว

ที่มา: ปรับปรุงและตัดแปลงจาก วิกีพีเดีย สารานุกรมเสรี “จังหวัดสระแก้ว”. (2016).

From <https://th.wikipedia.org/wiki/จังหวัดสระแก้ว>

การสำรวจถ้ำเขาติวะ อำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว (ละติจูด 13 องศา 49 ลิปดา 12 ฟลิปดาเหนือ, 102 องศา 4 ลิปดา 12 ฟลิปดาตะวันออก) การสำรวจและเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่ 14 พฤษภาคม 2557 เป็นช่วงที่ปริมาณน้ำไหลผ่านถ้ำน้อย (เนื่องจากสภาพอากาศอยู่ในช่วงฤดูร้อนตามกรมอุตุนิยมวิทยาของจังหวัดสระแก้ว) การสำรวจและเก็บตัวอย่างครั้งที่สองในวันที่ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ปริมาณน้ำที่ไหลผ่านถ้ำมีระดับสูงมาก (ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่สามารถเข้าไปสำรวจถ้ำได้เนื่องจากน้ำท่วมถ้ำ สภาพอากาศอยู่ในฤดูฝนตามกรมอุตุนิยมวิทยาของจังหวัดสระแก้ว) และการสำรวจและเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้ายในวันที่ 24 มกราคม 2559 (ปริมาณน้ำเริ่มลดลงเนื่องจากกำลังจะเข้าสู่ช่วงแล้ง สภาพอากาศอยู่ในช่วงฤดูหนาวตามกรมอุตุนิยมวิทยาของจังหวัดสระแก้ว) การสำรวจถ้ำเริ่มจากการศึกษาหาข้อมูลเบื้องต้นของถ้ำจากแหล่งข้อมูลของจังหวัดสระแก้ว พบว่า

ถ้ามีระยะทางประมาณ 300 เมตร จึงได้กำหนดจุดเก็บตัวอย่าง 5 จุดภายในถ้ำ ซึ่งมีระยะห่างกันประมาณ 50-60 และเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำภายนอกถ้ำ 1 จุด

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างภายในถ้ำ

1.1.1 เตรียมความพร้อมวัสดุอุปกรณ์การสำรวจถ้ำ ได้แก่ ไฟฉาย เสื้อชูชีพ หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำ ตาข่ายจับปลา ถูพลาสติกและหนังยางเพื่อเก็บตัวอย่างปลาและตัวอย่างดินโคลน กล้องถ่ายรูป เครื่องวัดระยะทาง เชือกที่มีความยาว 50 เมตร

1.1.2 เข้าสำรวจถ้ำเพื่อศึกษาสภาพแวดล้อมต่างๆ ถ่ายภาพสิ่งมีชีวิตและเก็บตัวอย่างภายในถ้ำ ตามจุดเก็บตัวอย่างที่กำหนดไว้ ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างแต่ละจุดจะใช้เชือกที่มีความยาว 50 เมตร วัดระยะความห่างแต่ละจุดรวมกับการใช้เครื่องวัดระยะทาง เมื่อกำหนดจุดเก็บตัวอย่างแล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างปลา และตัวอย่างดินโคลน ซึ่งตัวอย่างน้ำในแต่ละจุดจะแบ่งเก็บเป็น 3 ช่วง คือ เก็บที่บริเวณผิวน้ำ กลางน้ำ และใต้น้ำ ช่วงละ 3 หลอด ซึ่งแต่ละช่วงจะมีระยะห่างกันประมาณ 30 ซม. วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำจะจุ่มหลอดทดลองลงไปทั้งหลอดแล้วค่อยเปิดฝาหลอดเมื่อถึงบริเวณที่จะเก็บ จากนั้นเมื่อเก็บเสร็จแล้วทำการปิดฝาหลอดก่อนแล้วค่อยยกขึ้นมาจากน้ำ วิธีการเก็บตัวอย่างดินโคลนแต่ละจุดจะเก็บที่ความลึกประมาณ 10 ซม. ส่วนตัวอย่างปลาทำการเก็บโดยใช้ตาข่ายจับปลา

1.2 การศึกษาคุณภาพน้ำและจำแนกสิ่งมีชีวิตเบื้องต้น

1.2.1 หลังจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างภายในถ้ำเสร็จ จึงได้สรุปตัวอย่างที่เก็บจากถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งตัวอย่างน้ำจะถูกนำมาทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำหลังจากเก็บตัวอย่างเสร็จทันที โดยการวัดค่า pH ค่าความนำไฟฟ้า ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ค่าของแข็งที่ละลายในน้ำทั้งหมด ค่าความเค็มของน้ำ โดยใช้เครื่องวัดรุ่น HQd Series Portable Meter (Hach, USA) ส่วนค่าความกระด้างในน้ำ วัดโดยใช้เครื่องวัดความกระด้างในน้ำ แบบภาคสนาม รุ่น HI 96735 Hardness Meter (HANNA instrument, United Kingdom) และตรวจวัดสารเคมีประเภทโลหะหนักที่ละลายอยู่ในน้ำ ได้แก่ สังกะสี แอมโมเนียม เหล็กและทองแดง โดยใช้ชุดทดสอบทางเคมีสำหรับสารเคมีแต่ละชนิด Aqua Quant (MERCK, Germany) (ตาราง 4) จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำกลับมาวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อได้ผลจากการวัดค่าต่าง ๆ ก็นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics

1.2.2 ตัวอย่างปลาที่จับได้จะนำมาจำแนกเบื้องต้นตามหนังสือปลาไทยลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2553) และหนังสือคู่มือปลาน้ำจืด (ชวลิต วิทยา

นนท์. 2447) จากนั้นทำการแช่ตัวอย่างปลาใน 4 % ฟอรัมาลดีไฮด์ (formaldehyde) (MERCK, GERMANY) และทำการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำกลับมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

1.2.3 ตัวอย่างดินโคลนทำการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำกลับมาวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

1.2.4 คุณภาพของน้ำในบริเวณถ้ำเขาติ้วจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับคุณภาพของแหล่งน้ำบริเวณอื่นที่อยู่ภายนอกถ้ำ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างน้ำจากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ 3 จุดมาเป็นตัวเปรียบเทียบ ดังนี้ จุดที่ 1 คือตัวอย่างน้ำบริเวณคลองหน้ามหาวิทยาลัย (ประตู 1) จุดที่ 2 คือตัวอย่างน้ำในบ่อบริเวณคณะวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ และจุดที่ 3 คือตัวอย่างน้ำบริเวณทุ่งนาข้างโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์

1.2.5 จัดจำแนกสิ่งมีชีวิตที่พบในถ้ำเบื้องต้นตามหนังสือคู่มือการจำแนกสิ่งมีชีวิตแต่ละประเภท เช่น จำแนกค้างคาวเบื้องต้นตามหนังสือ A Naturalist's Guide to the MAMMALS OF THAILAND and Southeast Asia (Shepherd, C.R.; & Shepherd, L. A. 2012) จำแนกสิ่งมีชีวิตจำพวกปูและกบตามหนังสือคู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย (ธัญญา จันอาจ. 2546) จำแนกกุ้งตามหนังสือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (ศิริเพ็ญ สุภัทธาวิวัฒน์. 2007) จำแนกตัวเงินตัวทองโดยหนังสือวิทยาศาสตร์λεύคลานและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (วีรยุทธ์ เลาะห์จินดา. 2552) และจำแนกจิ้งหรีดตามหนังสือCave Crickets at Naracoorte: A Report on the Cave (Camel) Cricket *Novotettix Naracoortensis* (Richards) (Orthoptera : Rhaphidophoridae) in the Naracoorte Karst Area (Simms. 1996)

1.2.6 จำแนกพืชน้ำที่พบในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 เบื้องต้นโดยใช้หนังสือร้อยพรรณพฤษชา พรรณไม้หน้า (เศรษฐมนันตร์ กาญจนกุล. 2008) หนังสือพรรณไม้ประดับตู้ปลา (สุภาพร สุพิน. 2017) และหนังสือสวนในตู้ปลา Aquatic Garden (ทวีลักษณ์ บุนนาค. 2010)

ตาราง 3 จุดเก็บตัวอย่างบริเวณถ้ำน้ำเขาศิ่ว

จุดเก็บตัวอย่าง	ตัวอย่างน้ำ	ตัวอย่างปลา	ตัวอย่างดิน
จุดที่ 1	✓	✓	✓ (ก้อนหิน, ดินโคลน, ปูน)
จุดที่ 2	✓	✓	✓ (กรวดหยาบ)
จุดที่ 3	✓	✓	✓ (หิน, กรวด, ดินโคลน)
จุดที่ 4	✓	-	✓ (ดินโคลน)
จุดที่ 5	✓	✓	✓ (แผ่นหิน)
จุดที่ 6	✓	-	✓ (กรวดละเอียด)

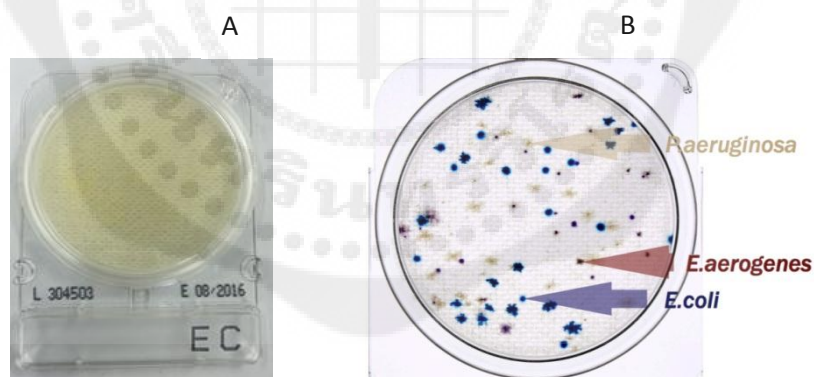
ตาราง 4 ค่าดัชนีตรวจวัดน้ำและเครื่องมือที่ใช้สำหรับการตรวจวัด

เครื่องวัด	ค่าดัชนีที่ตรวจวัด
1. เครื่องวัดรุ่น HQd Series Portable Meter (Hach, USA)	ค่า pH ค่าออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ (Dissolved oxygen)(DO)(mg/L) ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) ($\mu\text{s}/\text{cm}$) ค่าของแข็งที่ละลายในน้ำ (Total dissolved solids) (g/L) ค่าความเค็ม (Salinity) (ppt) ค่าการต้านไฟฟ้า (Resistivity) (Ωcm)
2. เครื่องวัดแบบภาคสนามรุ่น HI 96735 Hardness Meter (HANNA instrument, United Kingdom)	ค่าความกระด้าง (Total hardness) (mg/L)
3. ชุดทดสอบทางเคมีสำหรับสารเคมีแต่ละชนิด Aqua Quant (MERCK, Germany)	แอมโมเนียม (NH_4^+) (mg/L) เหล็ก (Fe) (mg/L) สังกะสี (Zn) (mg/L) ทองแดง (Cu) (mg/L)
4. เพลทอาหารสำเร็จรูป (Compact Dry) สำหรับ <i>E.coli</i> & Coliform (NISSUI, JAPAN)	แบคทีเรียโคลิฟอร์ม

2. การวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มจากน้ำในถ้ำและบ่อน้ำนอกถ้ำ โดยใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Compact Dry)

การวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มจากน้ำในถ้ำและบ่อน้ำภายนอกถ้ำโดยใช้เพลทอาหารสำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Compact Dry) EC *E. coli* & Coliform (NISSUI, JAPAN) ซึ่งมีลักษณะเป็นเพลทอาหารสำเร็จรูปแบบแห้งจัดเป็น Chromogenic media ที่มี Chromogenic enzyme substrates คือ Magenta-GAL และ X-GLUC ผสมอยู่ซึ่งจะจำเพาะกับ เอนไซม์ของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม 3 ชนิด คือ *Escherichia coli* ส่งผลให้โคโลนีที่เกิดเป็นสีสีน้ำเงินหรือฟ้า *Enterobacter aerogenes* เกิดโคโลนีสีชมพูหรือแดง และ *Pseudomonas aeruginosa* เกิดโคโลนีสีเหลือง (ภาพประกอบ 6)

วิธีการวิเคราะห์เริ่มจากการนำตัวอย่างน้ำทุกจุดที่เก็บมาจากถ้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยดลงในเพลทอาหารสำเร็จรูป จากนั้นนำเพลทอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีของเชื้อจะขึ้นบนเพลทอาหารเป็นสีต่าง ๆ ทำให้เลือกโคโลนีได้ง่ายและจำเพาะมากขึ้น จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏขึ้นบนเพลทอาหารแล้วรายงานผลเป็นโคโลนี ซึ่งการวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มนี้จะทำการวัดซ้ำจุดละ 3 ซ้ำ



ภาพประกอบ 6 เพลทอาหารสำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Compact Dry) EC *E. coli* & Coliform (A) เพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ (B) ลักษณะของเชื้อที่ขึ้นหลังจากบ่มไว้ 24 ชั่วโมงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ที่มา: Compact Dry “Nissui” EC for Coliform & *E. coli*. (2015). From http://www.nissui-pharm.co.jp/english/industry/pdf/CompactDry_EC_E.pdf

3. การจัดจำแนกปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* ด้วยการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (16S rDNA และ ยีน CO1)

3.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ปลาที่จับได้จะนำมาจำแนกเบื้องต้นตามหนังสือปลาไทยลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2553) และหนังสือคู่มือปลาน้ำจืด (ชวลิต วิทยานนท์. 2447) พบว่าตัวอย่างปลาที่พบในถ้ำคือปลาสกุล *Rasbora* และ *esomus* จากนั้นทำการแช่ตัวอย่างปลาใน 4 % ฟอर्मัลดีไฮด์เพื่อนำกลับมาวิเคราะห์ระดับโมเลกุลในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

3.2 การวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (16S rDNA และ ยีน CO1) ในห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลของปลาสกุล *Rasbora* และ *esomus* ที่พบในถ้ำในครั้งนี้ได้เปรียบเทียบกับปลาสกุลเดียวกันที่อยู่ภายนอกถ้ำ โดยใช้ตัวอย่างปลาที่จับได้จากบริเวณทุ่งนาข้างโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ (จุดที่ 3 ของการเก็บตัวอย่างน้ำ)

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของปลา

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของปลาแต่ละสกุล (family) ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNeasy Tissue Kit) (Qiagen, Germany) โดยใช้ส่วนของตับปลาในการสกัด (เนื่องจากตับของปลาเป็นส่วนของที่สามารถบดเพื่อทำการสกัด DNA ได้ง่ายกว่าส่วนของกล้ามเนื้อและครีบปลา) วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่แยกตามขนาดภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV light) และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อบริเวณบางส่วนของยีน 16S rDNA และยีน CO1 ของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* โดยการนำข้อมูลลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA และยีน CO1 ของปลาสกุล *Rasbora* 3 สปีชีส์ และ *Esomus* 3 สปีชีส์ จากฐานข้อมูลของ GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) จัดเรียงเพื่อดูบริเวณที่เหมือนกัน (Conservation) ในโปรแกรม ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) จากนั้นเลือกบริเวณที่มีเบส C และ G มากกว่าเบสตัวอื่น ๆ มาคำนวณค่า Tm (Melting temperature)

(<http://insilico.ehu.es/tm.php>) จากสูตรพื้นฐาน $Tm = [4x(C+G)]+[2x(A+T)]$ โดยที่ C, G, A และ T คือจำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีอยู่ในลำดับเบส ซึ่งทำให้ได้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส ดังนี้

ไพรเมอร์ของยีน 16S rDNA

Forward primer : 5'-GATCTRYCCGTGCAGAAGCGG-3'

Reverse primer : 5'-CAACATCGAGGTCGTAAACCC-3'

โดยที่ R = A/G, Y = C/T และขนาดของ PCR Product เท่ากับ 350 bp

ไพรเมอร์ของยีน CO1

Forward primer : 5'-GAACTCAGCCAGCCAGGATCAC -3'

Reverse primer : 5'-GGTCTCCTCCGCCGGCTG-3'

โดยที่ขนาดของ PCR Product เท่ากับ 560 bp

ตาราง 5 ส่วนผสมการทำ PCR สำหรับการสังเคราะห์ 16S rDNA และยีน CO1 ของปลา *Rasbora* และ *Esomus*

ส่วนผสม PCR Reaction	Volume	Final concentration
GoTaq [®] Green master mix (2X)	11.5 µl	1X
H ₂ O	11.5 µl	-
Primer (10 µM)	0.5 µl	0.2 µM
Primer (10 µM)	0.5 µl	0.2 µM
DNA Template	1 µl	-
ปริมาณสุทธิ	25 µl	

กำหนดสภาวะของอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำ PCR ดังนี้

ขั้นที่ 1	initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นที่ 2	denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 3	annealing	อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 4	extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นที่ 5	final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที

นำผลจากการทำ PCR มาวิเคราะห์ขนาดของ DNA ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นตัด แอบตีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจลเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) และส่งดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาลำดับ เบส (Macrogen DNA Sequencing Service, Korea) วิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit และนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ของแต่ละสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.10) โดยกำหนดการวิเคราะห์แบบ neighbour-joining และ 1000 bootstrap

4. การสำรวจความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินโคลนในถ้ำเขาคีวะโดยการ วิเคราะห์ยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากดิน

การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ ZR soil microbe DNA kits (ZYMO RESEARCH, USA) จากนั้นทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่แยกตามขนาดภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV light) และ เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับขั้นตอนต่อไป

4.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ (Neave; et al. 2012: 639-650) ที่ถูก ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region ขนาดของ PCR Product เท่ากับ 100 bp ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้

A-967F forward primer : 5'-CAACGCGAAGAACCTTACC-3'

B-1046R reverse primer : 5'-CGACAGCCATGCANCACCT-3'

ตาราง 6 ส่วนผสมการทำ PCR ของแบคทีเรียสำหรับการสังเคราะห์ยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region

ส่วนผสม PCR Reaction	Volume	Final concentration
GoTaq [®] Green master mix (2X)	11.5 μ l	1X
H ₂ O	11.5 μ l	-
Primer Bac V6-F1 (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M
primer Bac V6-R1 (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M
DNA Template	1 μ l	-
ปริมาณสุทธิ	25 μ l	

กำหนดสภาวะของอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำ PCR ดังนี้

ขั้นที่ 1	initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
ขั้นที่ 2	denaturation	อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 วินาที
ขั้นที่ 3	annealing	อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นที่ 4	extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นที่ 5	final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที

นำผลจากการทำ PCR มาวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจลเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ทำการสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์จนได้ปริมาณประมาณ 250 ไมโครลิตร จึงนำไปตรวจวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีนาโนทรอปก่อนส่งไปวิเคราะห์ด้วยวิธี pyrosequencing (Beijing Genomics Institute, China)

5. การศึกษาหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* จากน้ำในถ้ำเขาคีวะ ด้วยการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (ยีน 18S rDNA)

การศึกษาเกี่ยวกับหนอนตัวแบนในถ้ำน้ำเขาคีวะเป็นการศึกษาเพิ่มเติมขึ้นมาเพื่อให้เข้าใจสายใยอาหารภายในถ้ำได้อย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น เนื่องจากถ้ำแห่งนี้เป็นถ้ำที่ไม่มีแสงสว่างส่อง

เข้าไปในถ้ำส่งผลให้ไม่มีผู้ผลิตประเภทพืช หรือสาหร่ายต่าง ๆ เจริญเติบโตภายในถ้ำได้ ดังนั้นอาหารของสิ่งมีชีวิตจำพวกปลาที่พบในถ้ำก็จะเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำพวกหนอนตัวแบน หนอนน้ำ หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำพวกอื่น ๆ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำพวกหนอนตัวแบนภายในถ้ำน้ำเขาคิระ

5.1 การจำแนกเบื้องต้นด้วยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เริ่มจากการนำสิ่งมีชีวิตที่พบในตัวอย่างดินโคลนจากจุดที่ 1, 2 และ 6 มาเพาะเลี้ยงในเพลทเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) (Hycon Plastics, New Zealand) เป็นเวลา 3 วัน โดยเลี้ยงด้วยอาหารปลาสำเร็จรูป (Sakura, Thailand) 1 เม็ดต่อจำนวนประชากรร่วมกับสาหร่ายน้ำจืด จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น เช่น ลักษณะรูปร่างภายนอก ผิว อวัยวะต่าง ๆ เป็นต้น เพื่อทำการจัดจำแนกเบื้องต้นจากงานวิจัยของฟาเบล (Faubel, A. 2010: Online) และวิธีของเชลล่าและคนอื่น ๆ (Scharer; et al. 2011: 1490-1495) (ภาคผนวก ข) ซึ่งสามารถจำแนกหนอนตัวแบนเบื้องต้นออกได้ 3 ชนิด จากนั้นทำการแยกหนอนตัวแบนแต่ละชนิดเลี้ยงในเพลทเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) (Hycon Plastics, New Zealand) โดยเลี้ยงด้วยอาหารปลาสำเร็จรูป (Sakura, Thailand) 1 เม็ดต่อจำนวนประชากรร่วมกับสาหร่ายน้ำจืด ให้มีปริมาณมากขึ้นเพื่อทำการศึกษาระดับโมเลกุลต่อไป

5.2 การศึกษาระดับโมเลกุล (ยีน 18S rDNA) ของหนอนตัวแบนสกุล

Macrostomum

5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำหนอนตัวแบนที่เลี้ยงไว้ให้เพิ่มปริมาณมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNeasy Tissue Kit) (Qiagen, Germany) วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่แยกตามขนาดภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

5.2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน 18S rDNA ซึ่งมีลำดับเบส (Noren; & Jondelius. 1999: 103-112) ดังนี้

Primer Tim A : 5'-AMCTGGTTGATCCTGCCAG-3'

Primer Tim B : 5'-TGATCCATCTGCAGGTTACCT-3'

โดยที่ M = A/C และขนาดของ PCR Product เท่ากับ 1,700 bp

ตาราง 7 ส่วนผสมการทำ PCR สำหรับการสังเคราะห์ 18S rDNA ของหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum*

ส่วนผสม PCR Reaction	Volume	Final concentration
GoTaq [®] Green master mix (2X)	11.5 µl	1X
H ₂ O	11.5 µl	-
Primer (10 µM)	0.5 µl	0.2 µM
Primer (10 µM)	0.5 µl	0.2 µM
DNA Template	1 µl	-
ปริมาณสุทธิ	25 µl	

กำหนดสภาวะของอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำ PCR ดังนี้

ขั้นที่ 1	initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นที่ 2	denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 3	annealing	อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1.30 นาที
ขั้นที่ 4	extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1.30 นาที
ขั้นที่ 5	final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที

นำผลจากการทำ PCR มาวิเคราะห์ขนาดของ DNA ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจลเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) และส่งดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบส (Macrogen DNA Sequencing Service, Korea) วิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit และนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ของแต่ละสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.10) โดยกำหนดการวิเคราะห์แบบ neighbour-joining และ 1000 bootstrap

5.3 การศึกษารูปลักษณะพื้นผิวภายนอกของหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum*

การศึกษารูปลักษณะพื้นผิวภายนอกของหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* เริ่มจากการเตรียมตัวอย่างโดยการนำหนอนตัวแบนที่เลี้ยงไว้ในการทดลองที่ 5.1 แช่ลงใน 2.5% Glutaraldehyde (SIGMA, Germany) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย Sodium Cacodylate buffer (SIGMA, Germany) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน 1% Osmium tetroxide (SIGMA, Germany) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปแช่ใน 1% Uranyl acetate (SIGMA, Germany) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำตัวอย่างมา Dehydration โดยผ่าน 50%, 70%, 90% และ 100% Ethanol ตามลำดับ ครั้งละประมาณ 10 นาที แล้วจึงทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำให้แห้งสนิท (Critical Point Drying) (POLARON, UK) จากนั้นนำตัวอย่างหนอนตัวแบนที่เตรียมไว้ติดบนแท่น stub เพื่อเคลือบพื้นผิวด้วยละอองของธาตุทอง (Gold coating) และทำการถ่ายรูปพื้นผิวและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ที่ศูนย์เครื่องมือกลางของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

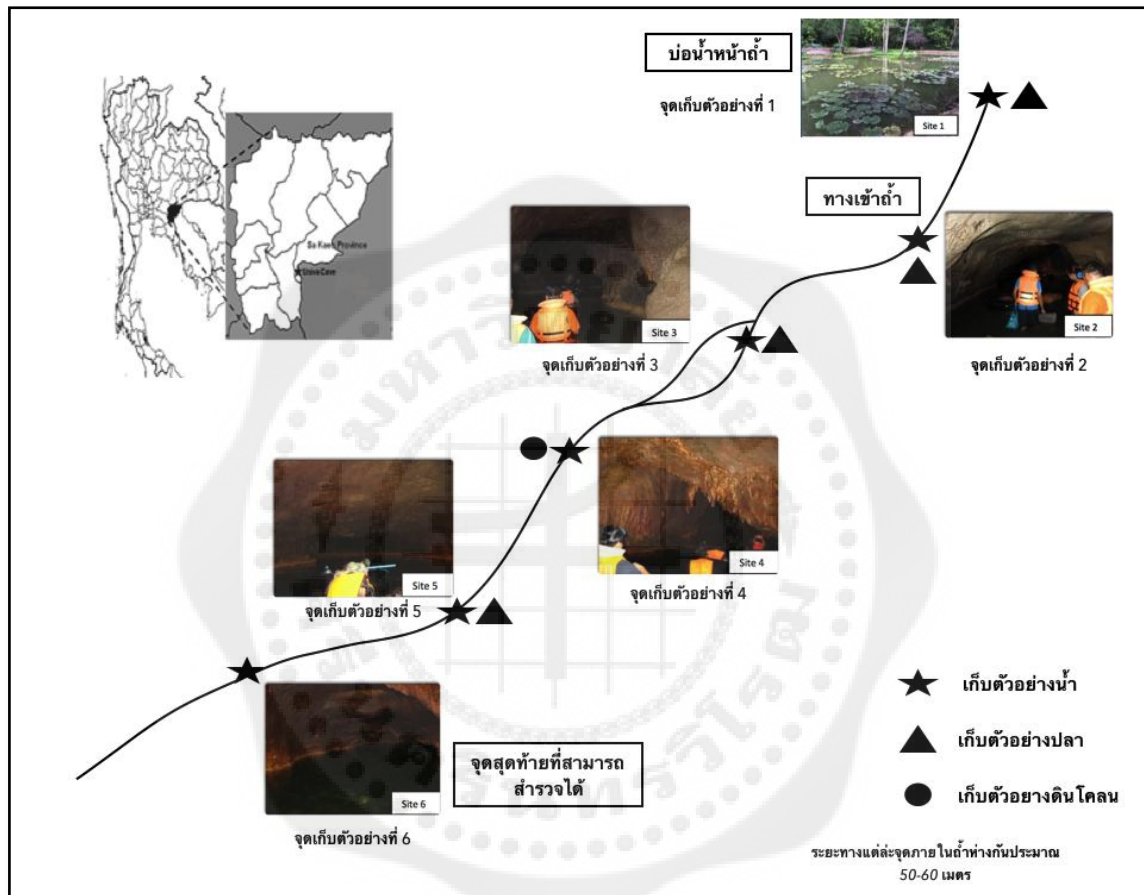
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. สภาพแวดล้อมและลักษณะทั่วไปของถ้ำ และการเก็บตัวอย่างน้ำตัวอย่างปลาและตัวอย่างดินโคลน

การสำรวจสภาพแวดล้อมเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างปลาภายในถ้ำน้ำเขาศิ่วได้ดำเนินการเป็น 3 ช่วงเวลา คือ การสำรวจและเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่ 14 พฤษภาคม 2557 เป็นช่วงที่ปริมาณน้ำไหลผ่านถ้ำน้อย (เนื่องจากสภาพอากาศอยู่ในช่วงฤดูร้อน ตามกรมอุตุนิยมวิทยาของจังหวัดสระแก้ว) ซึ่งอุณหภูมิภายนอกถ้ำอยู่ที่ 34-35 °C ส่วนการสำรวจและเก็บตัวอย่างครั้งที่สองในวันที่ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ปริมาณน้ำที่ไหลผ่านถ้ำมีระดับสูงมาก (ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่สามารถเข้าไปสำรวจถ้ำได้เนื่องจากน้ำท่วมถ้ำ สภาพอากาศอยู่ในฤดูฝนตามกรมอุตุนิยมวิทยาของจังหวัดสระแก้ว) อุณหภูมิภายนอกถ้ำอยู่ที่ 31-34 °C และการสำรวจและเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้ายในวันที่ 24 มกราคม 2559 (ปริมาณน้ำเริ่มลดลงเนื่องจากกำลังจะเข้าสู่ช่วงแล้ง สภาพอากาศอยู่ในช่วงฤดูหนาวตามกรมอุตุนิยมวิทยาของจังหวัดสระแก้ว) อุณหภูมิภายนอกถ้ำอยู่ที่ 21-34 °C สิ่งมีชีวิตที่สำรวจพบภายในถ้ำได้แก่ ค้างคาว (*Eonycteris* spp.) จำแนกตามหนังสือ A Naturalist's Guide to the MAMMALS OF THAILAND and Southeast Asia (Shepherd, C.R.; & Shepherd, L. A. 2012) แมงมุมเส้ (Order: Amblypygid) จำแนกตามหนังสือ Insects spiders and other terrestrial arthropods-Smithsonian Handbooks (McGavin. 2009) กบ (*Ranidae* spp.) และ ปู (*Somanniathelphusa* spp.) จำแนกตามหนังสือคู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย (รัชญา จันอาจ. 2546) ส่วนปลาฉิวหลังดำ (*Esomus metallicus*) ปลาฉิวหางแดง (*Rasbora borapetansis*) ปลาฉิวหนวดยาว (*R. paviana*) ปลาตะเพียน (*Barbonymus* spp.) และปลาช่อน (*Channa* spp.) จำแนกตามหนังสือปลาไทยลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2553) และหนังสือคู่มือปลาน้ำจืด (ชวลิต วิทยานนท์. 2447) กุ้งฝอย (*Caridina* spp.) จำแนกตามหนังสือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (ศิริเพ็ญ สุภัทราวิวัฒน์. 2007) จิ้งหรีดถ้ำ (Family: Rhaphidophoridae) จำแนกตามหนังสือ Cave Crickets at Naracoorte: A Report on the Cave (Camel) Cricket *Novotettix Naracoortensis* (Richards) (Orthoptera : Rhaphidophoridae) in the Naracoorte Karst Area (Simms. 1996) และตัวเงินตัวทอง (*Varanus* spp.) จำแนกโดยหนังสือวิทยาศาสตร์เลือกถ้ำและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (วีรยุทธ์ เลาะห์จินดา. 2552) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีหินงอกหินย้อยที่มีลักษณะรูปร่างต่าง ๆ สวยงามเป็นจำนวนมาก ซึ่งลักษณะทั่วไปของถ้ำน้ำเขาคีจะมีระยะทางตั้งแต่ปากถ้ำจนถึงสุดทางถ้ำที่จะสามารถเดินสำรวจได้ประมาณ 300 เมตร (ยังไม่สามารถสำรวจจนสุดถ้ำได้เนื่องจากน้ำท่วมบริเวณปากทางเข้า) จึงได้กำหนดจุดสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างปลาและตัวอย่างดินโคลน 5 จุดในทุก ๆ 50-80 เมตรภายในถ้ำ



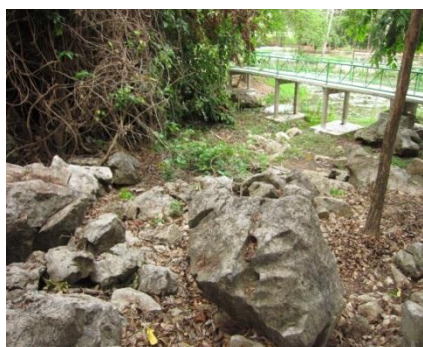
ภาพประกอบ 7 แผนที่ถ้ำน้ำเขาคี อำเภอลองหาด จังหวัดสระแก้ว

ที่มา: ปรับปรุงและดัดแปลงจาก วิกีพีเดีย สารานุกรมเสรี “จังหวัดสระแก้ว”. (2016).

From <https://th.wikipedia.org/wiki/จังหวัดสระแก้ว>

1.1 จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 1 (บ่อน้ำบริเวณหน้าถ้ำ)

บ่อน้ำบริเวณหน้าถ้ำมีลักษณะเป็นบ่อปูนเพื่อรองรับน้ำที่ไหลออกมาจากถ้ำก่อนจะปล่อยสู่ลำคลอง ระยะห่างระหว่างถ้ำกับบ่อน้ำประมาณ 2-3 เมตร อุณหภูมิช่วงที่เก็บตัวอย่างในฤดูร้อนวัดเฉลี่ยประมาณ 26.3 °C ระหว่างทางน้ำไหลเต็มไปด้วยโขดหิน ไม่เลี้ยวและไม่ย่นตันปกคลุมบริเวณรอบ ๆ บ่อน้ำพบต้นตะขบและต้นมะพร้าวหลายต้น ส่วนในบ่อพบพืชน้ำจืดพวกบัว (*Nymphaea* spp.) สาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla* spp.) ผักบุ้ง (*Ipomoea* spp.) จอก (*Pistia* spp.) สันตะวาใบพาย (*Ottelia* spp.) ดีปลีน้ำ (*Potamogeton* spp.) ริคเซีย (*Riccia* spp.) ผักแว่น (*Marsilea* spp.) สาหร่ายข้าวเหนียว (*Utricularia* spp.) จำแนกตามหนังสือร้อยพรรณพฤกษา พรรณไม้หน้า (เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล. 2008) หนังสือพรรณไม้ประดับตู้ปลา (สุภาพร สุพิน. 2017) และหนังสือสวนในตู้ปลา Aquatic Garden (ทวีลักษณ์ บุนนาค. 2010) สิ่งมีชีวิตที่พบในบ่อน้ำ เช่น ปลาชีวาหางแดง (*Rasbora borapetensis*) กุ้ง (*Caridina* spp.) ปลาช่อน (*Channa* spp.) ปลาตะเพียน (*Barbonymus* spp.) เป็นต้น ในฤดูร้อนทางน้ำระหว่างถ้ำและบ่อน้ำจะแห้งไม่มีน้ำไหลผ่านมีใบไม้ร่วงปกคลุม ส่วนในฤดูฝนน้ำจะไหลล้นออกมาจากปากถ้ำผ่านทางน้ำ ชะล้างใบไม้แห้งและเศษหินลงสู่บ่อน้ำหน้าถ้ำ หากน้ำมีปริมาณมากจนล้นบ่อก็จะไหลลงสู่ลำคลองที่เชื่อมต่อกับบ่อน้ำ



ภาพประกอบ 8 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของบ่อน้ำนอกถ้ำ (จุดเก็บตัวอย่างที่ 1)

1.2 จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 2 (บริเวณปากถ้ำ)

บริเวณปากทางเข้าถ้ำมีความกว้างประมาณ 5 เมตร สูงประมาณ 2 เมตร พบทางน้ำเล็ก ๆ ไหลออกจากปากถ้ำไปยังบ่อน้ำด้านนอก ระดับน้ำบริเวณปากถ้ำประมาณ 30-110 เซนติเมตร และจะลึกลงเรื่อย ๆ อุณหภูมิตรวจวัดในฤดูร้อนเฉลี่ยได้ 26.3 °C พื้นถ้ำใต้น้ำมีหินแหลมคมต้องใช้ความระมัดระวังในการเดินสำรวจ แสงสว่างสามารถส่องจากบริเวณปากถ้ำลึกเข้าไปในถ้ำประมาณ 50 เมตร บริเวณนี้พบสิ่งมีชีวิตจำพวกกุ้ง (*Caridina* spp.) ปลาชิวหลังดำ (*Esomus metallicus*) และคั้งคว (Eonycteris spp.) จำนวนมากเกาะอยู่บนเพดานถ้ำ บริเวณเพดานถ้ำตลอดจนถึงกำแพงด้านข้างของถ้ำพบคราบของเสียจากคั้งควไหลลงมาทำให้เกิดลวดลายต่าง ๆ ตามกำแพงถ้ำ



ภาพประกอบ 9 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาศิวะ (จุดเก็บตัวอย่างที่ 2)

1.3 จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 3

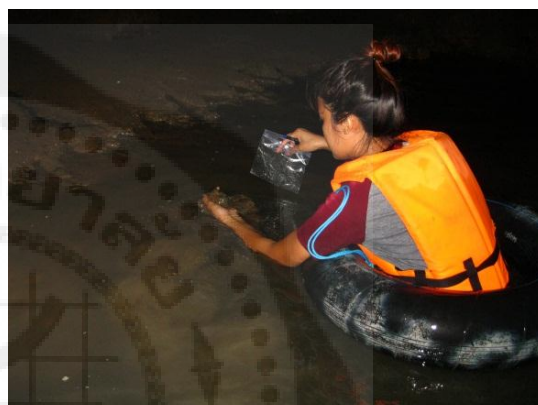
ระดับน้ำลึกประมาณ 1-1.5 เมตร ในฤดูฝนบางช่วงน้ำจะสูงจนถึงเพดานถ้ำ ทำให้ต้องปิดทำการถ้ำเนื่องจากไม่สามารถเข้าชมถ้ำได้ จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 นี้พบว่าแสงสว่างไม่สามารถส่องเข้ามาถึง อุณหภูมิจากการตรวจวัดในฤดูร้อนอยู่ที่เฉลี่ยประมาณ 26.3 °C บริเวณนี้ยังคงพบสิ่งมีชีวิตเช่น ค้างคาว (*Eonycteris* spp.) กบ (*Ranidae* spp.) กุ้ง (*Caridina* spp.) และปลาซีวหลังดำ (*E. metallicus*) เป็นต้น พื้นถ้ำใต้น้ำส่วนมากเป็นหิน เริ่มพบหินงอกหินย้อยลวดลายต่าง ๆ



ภาพประกอบ 10 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาคีวะ (จุดเก็บตัวอย่างที่ 3)

1.4 จุดเก็บตัวอย่างที่ 4

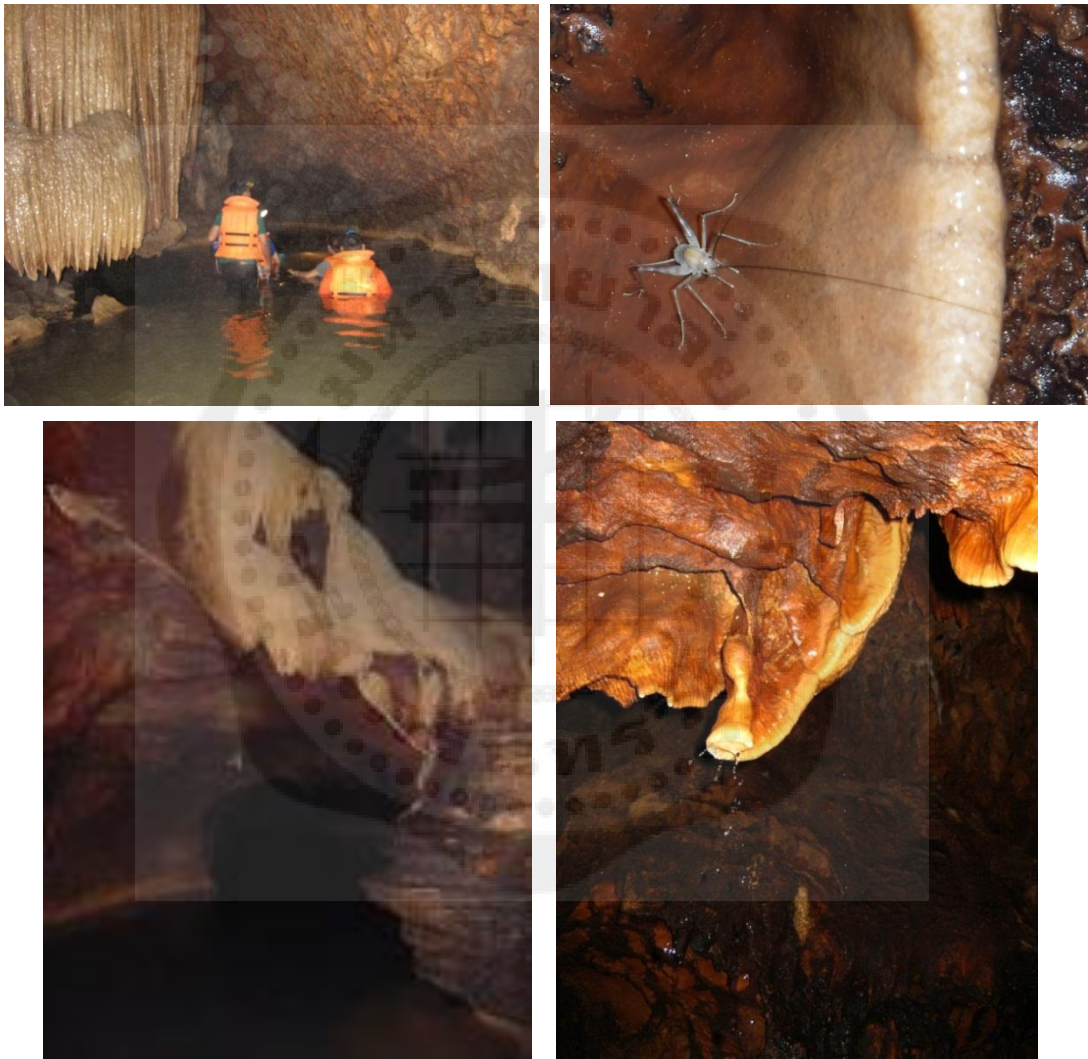
ระดับน้ำลึกตั้งแต่ 0.5-1.5 เมตร แสงสว่างไม่สามารถส่องถึง อุณหภูมิที่ตรวจวัดใน ถูร้อนวัดได้เฉลี่ยประมาณ 26.3 °C บางช่วงพบบริเวณที่เป็นดินโคลน หินย้อยที่มีขนาดใหญ่ (คน ในพื้นที่เรียก สะตือถ้ำ หรือเสาถ้ำ และหินย้อยที่มีรูปร่างคล้ายใบหนามนุษย์ชาวบ้านในละแวกนี้เชื่อ ว่าคล้ายใบหน้าของพระศิวะจึงตั้งชื่อถ้ำว่า “ถ้ำน้ำเขาศิวะ” ตามใบหน้าที่เห็นในถ้ำ) สิ่งมีชีวิตที่พบใน บริเวณนี้ เช่น แมงมุมเส้า (Order: Amblypygid) ปู (Somanniathelphusa spp.) กุ้ง (Caridina spp.) และตัวเงินตัวทอง (*Varanus* spp.) เป็นต้น



ภาพประกอบ 11 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาศิวะ (จุดเก็บตัวอย่างที่ 4)

1.5 จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 5

พบสิ่งมีชีวิต เช่น ปลาชิวหนวดยาว (*R. paviana*) ปลาตะเพียน (*Barbonymus spp.*) จิ้งหรีดถ้ำ (Family: Rhabdophoridae) เป็นต้น ระดับน้ำประมาณ 0.5-1.0 เมตร บริเวณนี้พบน้ำไหลลงมาตามหินย้อย (เก็บตัวอย่างน้ำที่ไหลจากหินย้อยไปวัดพบว่ามีค่าความกระด้างอยู่ที่ 305 mg/L) อุณหภูมิที่ตรวจวัดในถ้ำอุณหภูมิต่ำได้เฉลี่ยประมาณ 26.3 °C



ภาพประกอบ 12 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาคีวะ (จุดเก็บตัวอย่างที่ 5)

1.6 จุดเก็บตัวอย่างจุดที่ 6 (จุดสุดท้าย)

จุดสิ้นสุดสำหรับการสำรวจมีลักษณะคล้ายห้องโถงขนาดใหญ่ (เนื่องจากน้ำเอ่อล้นท่วมทางสำรวจทำให้ไม่สามารถเดินสำรวจจนถึงจุดสิ้นสุดของถ้ำและแหล่งที่มาของน้ำได้) ระหว่างทำสำรวจพบน้ำตกขนาดเล็ก ระดับความลึกของน้ำจุดสุดท้ายที่ทำการสำรวจประมาณ 1.7 เมตร อุณหภูมิที่ตรวจวัดได้เฉลี่ยประมาณ 26.3 °C สิ่งมีชีวิตที่พบ เช่น ปลาช่อน (*Channa spp.*) กุ้ง (*Caridina spp.*) เป็นต้น



ภาพประกอบ 13 การสำรวจสภาพแวดล้อมทั่วไปของถ้ำน้ำเขาศิวะ (จุดเก็บตัวอย่างที่ 6)

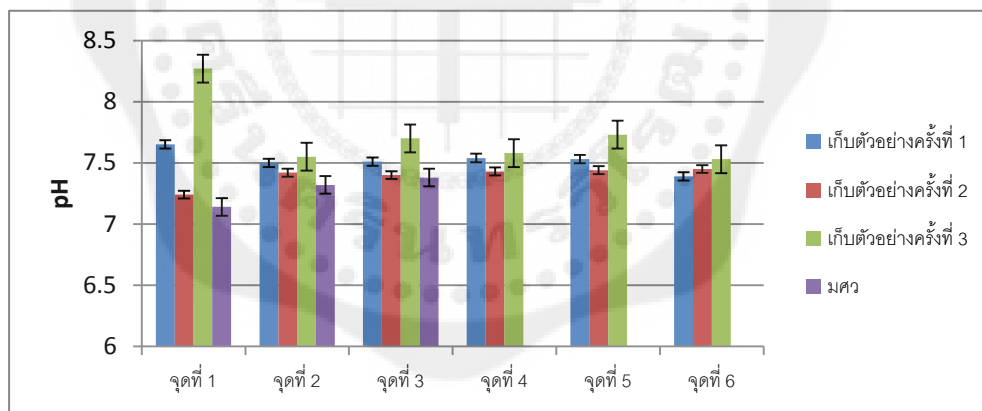
ตัวอย่างน้ำจะทำการตรวจวัดทันทีที่เก็บตัวอย่างเสร็จ ตัวอย่างปลาจะถูกเก็บรักษาสภาพใน 4 % formaldehyde ส่วนตัวอย่างดินจะถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิประมาณ 4 °C เพื่อนำมาวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลในห้องปฏิบัติการ

2. การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ตัวอย่างน้ำจะถูกเก็บจากจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 จุดที่กำหนดไว้ วิธีการเก็บน้ำตัวอย่างจะแบ่งออกเป็นเก็บที่บริเวณผิวน้ำ กลางน้ำ และใต้น้ำ ตัวอย่างน้ำจะทำการเก็บซ้ำจุดละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำมาวัดค่าดัชนีต่าง ๆ และนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics จากนั้นนำค่าที่ตรวจวัดได้ไปเปรียบเทียบกับค่าของตัวอย่างน้ำที่เก็บมาทั้งหมด 3 จุด จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์

2.1 ค่า pH

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าคุณภาพน้ำตัวอย่างภายในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำทั้ง 6 จุด ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 มีค่า pH อยู่ในช่วง 7.39-7.65 เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 7.52 การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 มีค่า pH อยู่ในช่วง 7.24-7.45 เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 7.40 และการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 จะมีค่า pH อยู่ในช่วง 7.53-8.27 เมื่อเฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 7.73 เมื่อนำค่า pH ของตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาศิระทั้งหมดที่ตรวจวัดได้มาเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 7.28 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

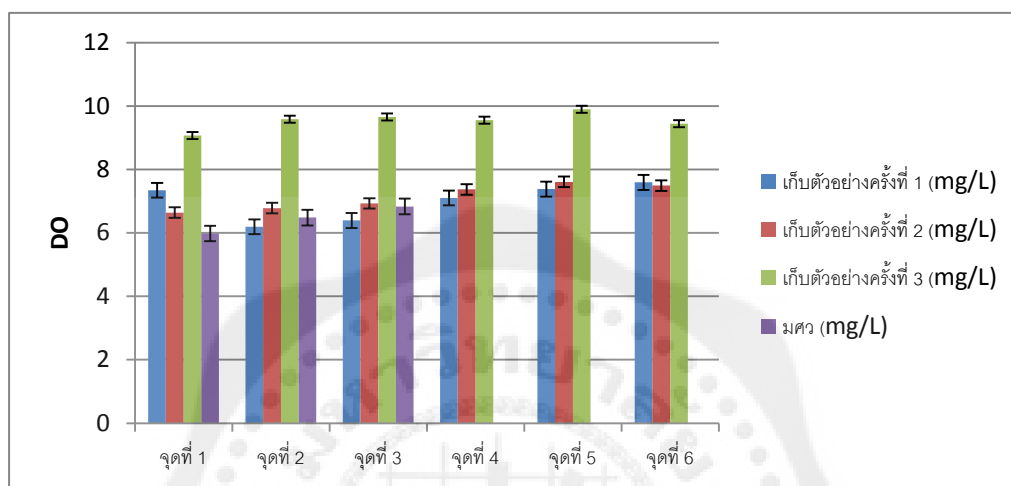


ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงผลของค่า pH

2.2 ออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen, DO)

การตรวจวัดค่า DO ในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาศิระพบว่า ค่า DO ที่ตรวจวัดได้จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาวมีค่าสูงกว่าค่า DO ที่ตรวจวัดได้ในทุกฤดูที่ทำการเก็บตัวอย่าง ซึ่งค่า DO อยู่ในช่วง 9.07-9.90 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 9.532 mg/L ส่วนการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ตรวจวัดค่า DO ได้ 6.19-7.59 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 6.99 mg/L การเก็บ

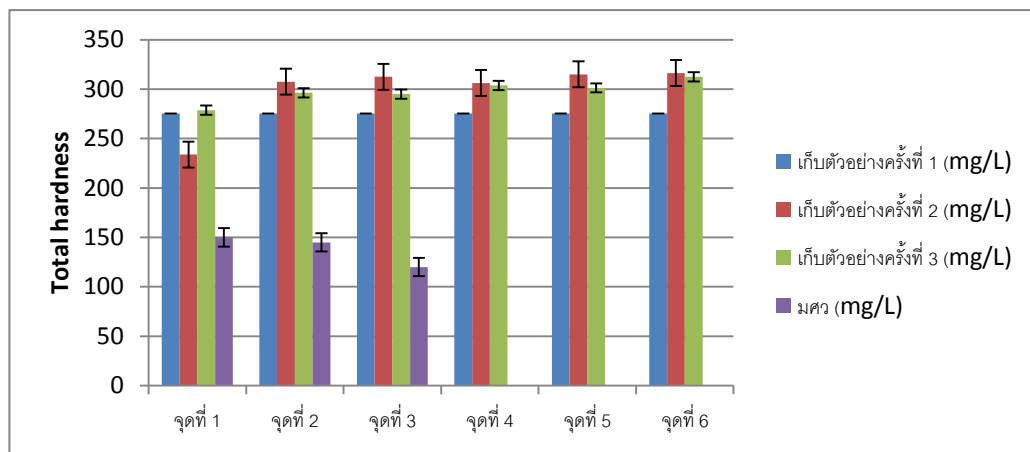
ตัวอย่างครั้งที่ 2 ตรวจวัดค่า DO ได้ 6.64-7.61 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 7.14 mg/L ผลการตรวจค่า DO ของการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และ 2 ของตัวอย่างน้ำบริเวณถ้าเขาติวะพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับผลการตรวจวัดค่า DO ของน้ำในบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ ที่ตรวจวัดเฉลี่ยได้ 6.43 mg/L



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen, DO)

2.3 ค่าความกระด้าง (Total hardness)

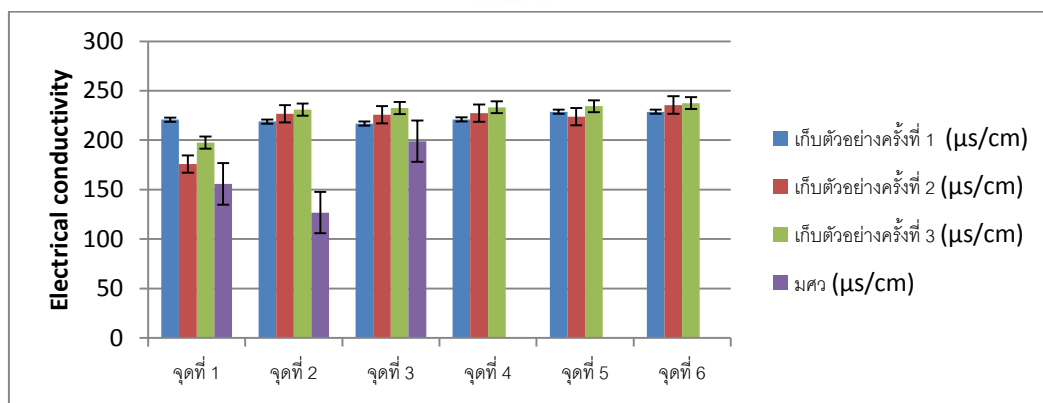
การตรวจวัดค่าความกระด้างทั้งหมดของน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะพบว่า น้ำในถ้ำและบ่อน้ำนอกถ้ำมีค่าความกระด้างค่อนข้างสูงทั้ง 3 ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง เฉลี่ยอยู่ที่ 277.58, 289.54 และ 297.917 mg/L ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าความกระด้างของน้ำระหว่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะกับบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ ที่เฉลี่ยอยู่ที่ 138.33 mg/L พบว่าน้ำในถ้ำและบ่อน้ำนอกถ้ำเขาติวะทั้ง 3 ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างมีค่าความกระด้างสูงมาก โดยค่าความกระด้างของน้ำในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 จะมีค่าความกระด้างของน้ำในถ้ำสูงกว่าในค่าความกระด้างของน้ำในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และ 3 ซึ่งบางจุดมีค่าสูงถึง 306.25 – 316.25 mg/L



ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงค่าความกระด้างของน้ำ (Total hardness)

2.4 ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity)

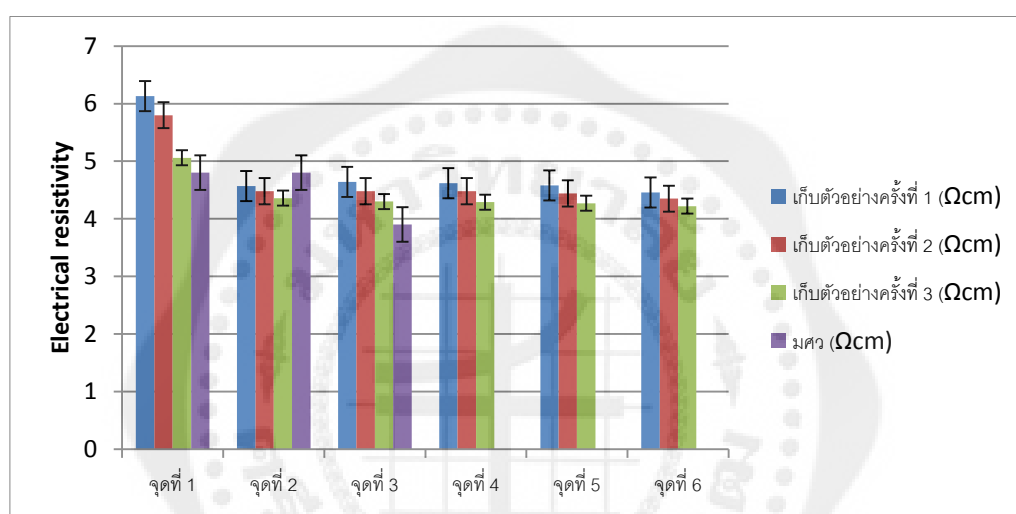
สำหรับค่าการนำไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้ในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำน้ำเขาศิระ พบว่าทั้ง 3 ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างมีค่าการนำไฟฟ้าใกล้เคียงกัน การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ตรวจวัดค่าได้ 216.75-228.75 $\mu\text{s}/\text{cm}$ เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 222.45 $\mu\text{s}/\text{cm}$ การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ตรวจวัดได้ 175.83-235.50 $\mu\text{s}/\text{cm}$ เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 219.14 $\mu\text{s}/\text{cm}$ และการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ตรวจวัดค่าได้ 197.55-237.5 $\mu\text{s}/\text{cm}$ เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 227.658 $\mu\text{s}/\text{cm}$ เมื่อเปรียบเทียบค่าการนำไฟฟ้าของน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาศิระกับน้ำในบ่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ ที่มีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยอยู่ที่ 160.51 $\mu\text{s}/\text{cm}$ พบว่าค่าการนำไฟฟ้าของน้ำในถ้ำและนอกถ้ำเขาศิระทั้ง 3 ช่วงเวลามีค่าสูงกว่าน้ำในบ่อของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity)

2.5 ค่าการต้านไฟฟ้า (Electrical Resistivity)

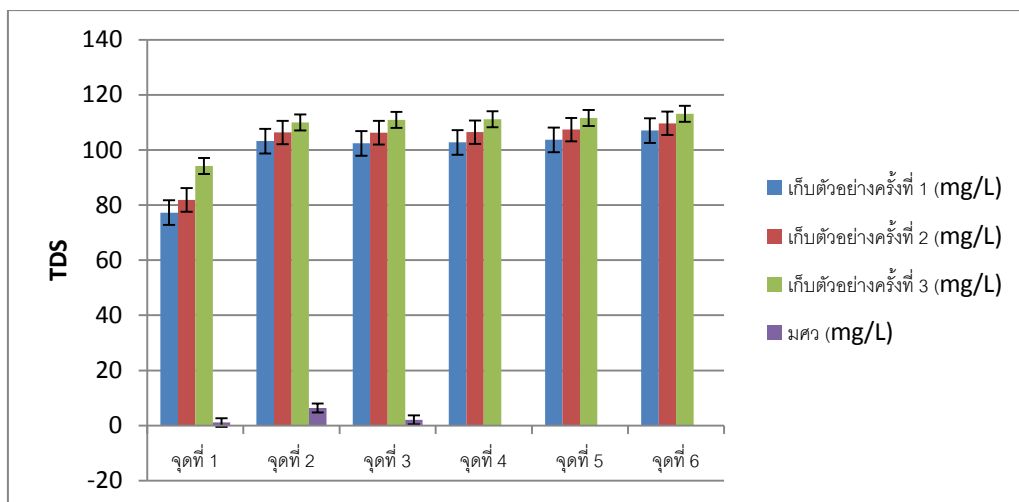
สำหรับการตรวจวัดค่าการต้านไฟฟ้าของน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาสิวะพบว่า ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 สามารถตรวจวัดค่าการต้านไฟฟ้าได้ 4.46-6.13 Ωcm เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 4.83 Ωcm การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 วัดค่าการต้านไฟฟ้าได้ 4.35-5.80 Ωcm เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 4.67 Ωcm และการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ตรวจวัดได้ 4.22-5.06 Ωcm เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 4.417 Ωcm ส่วนในบ่อน้ำของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 4.5 Ωcm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำในถ้ำและบ่อน้ำนอกถ้ำเขาสิวะ



ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงค่าการต้านไฟฟ้า (Electrical Resistivity)

2.6 ของแข็งทั้งหมดที่ละลาย (Total dissolved solids, TDS)

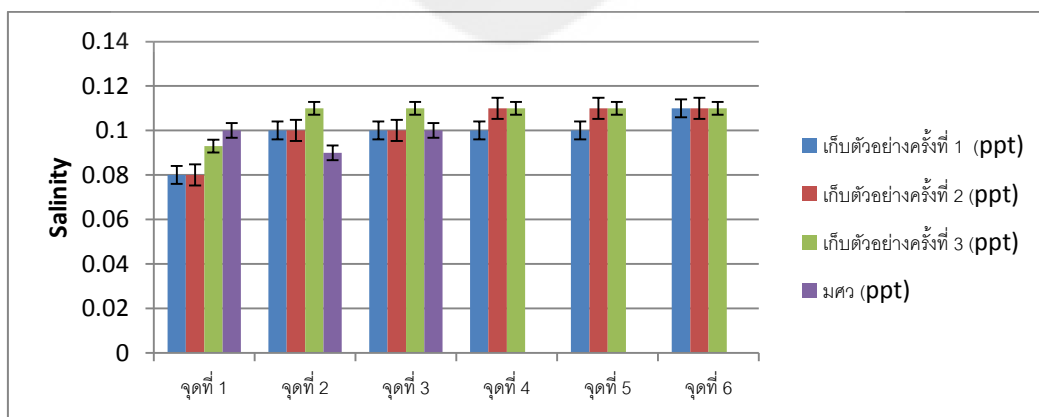
การตรวจวัดค่าของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดพบว่า ตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาสิวะมีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 ช่วงเวลา ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ตรวจวัดค่าของแข็งที่ละลายในน้ำ 77.25 - 107.03 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 99.38 mg/L การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 สามารถตรวจวัดได้ 81.80 - 109.68 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 103.00 mg/L และการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ตรวจวัดได้ 94.13-113.13 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้ 108.487 mg/L ผลการตรวจวัดน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาสิวะทั้ง 3 ช่วงเวลา มีค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำสูงกว่าน้ำในบ่อของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ ที่เฉลี่ยอยู่ที่ 3.16 mg/L.



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (Total dissolved solids, TDS)

2.7 ความเค็ม (Salinity)

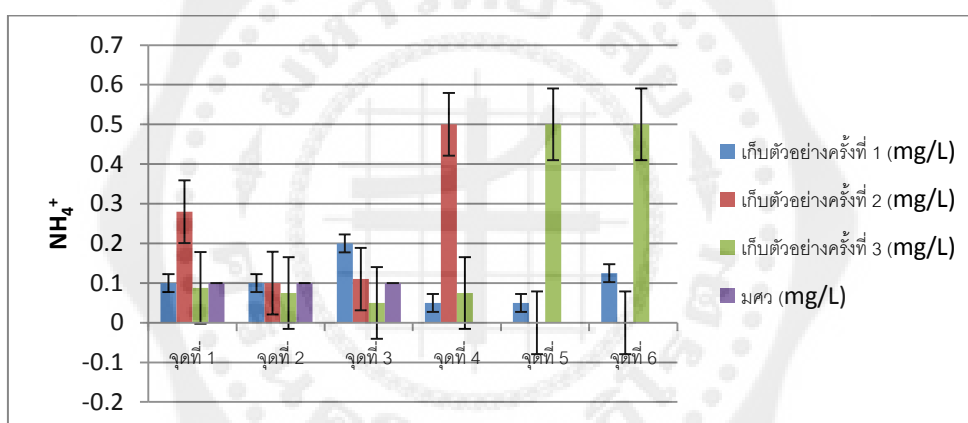
การตรวจวัดค่าความเค็มของน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาศิระพบว่า มีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 ช่วงเวลา โดยการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ตรวจวัดค่าความเค็มได้ 0.80-0.10 ppt เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 0.098 ppt การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ตรวจวัดค่าความเค็ม 0.80-0.11 ppt เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 0.10 ppt. และการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ตรวจวัดได้ 0.093-0.11 เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้ 0.107 ppt. เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำจากบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ ที่วัดค่าความเค็มเฉลี่ยได้ 0.097 ppt พบว่าน้ำในถ้ำและนอกถ้ำเขาศิระมีค่าความเค็มใกล้เคียงกันกับตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์



ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงค่าความเค็ม (Salinity)

2.8 แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+)

ผลการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาคีวะ ในการเก็บตัวอย่างครั้งแรกตรวจวัดแอมโมเนียม 0.05-0.20 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 0.10 mg/L สำหรับการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ตรวจวัดได้ 0.10-0.50 mg/L โดยจุดที่ 4 มีค่าสูงสุด และสองจุดสุดท้ายของการเก็บตัวอย่างตรวจไม่พบแอมโมเนียมไอออน เมื่อเฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 0.17 mg/L และการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ตรวจวัดได้ 0.075-0.5 เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 0.054 mg/L โดยที่สองจุดสุดท้ายมีค่าสูงสุด สำหรับผลการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนในบ่อน้ำของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.1 mg/L เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวัดแอมโมเนียมไอออนระหว่างตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำ กับตัวอย่างน้ำจากบ่อของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงเดียวกันในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3

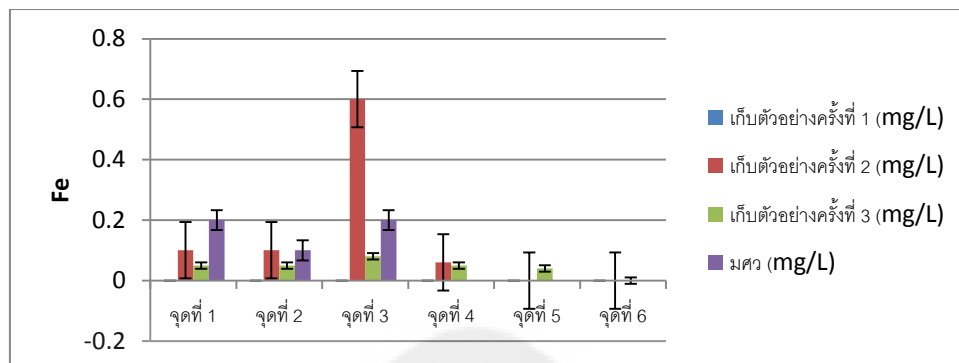


ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงค่าแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+)

2.9 เหล็ก (Fe)

การตรวจวัดเหล็กจากตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาคีวะ พบว่าการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ในจุดเก็บตัวอย่างที่ 3 ตรวจวัดค่าเหล็กได้สูงสุด 0.60 mg/L สำหรับการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ตรวจไม่พบค่าเหล็กทุกจุดเก็บตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ตรวจวัดเหล็กได้ 0.04-0.08 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 0.054 mg/L จากกราฟแสดงให้เห็นว่าจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 ของทั้ง 3 ช่วงเวลาตรวจพบเหล็กในปริมาณที่ต่ำและไม่สามารถตรวจไม่พบเหล็กในจุดเก็บตัวอย่างที่ 6 สำหรับการตรวจวัดเหล็กในบ่อน้ำของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาคีวะ พบว่า ผลการตรวจวัดมีน้ำของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิ

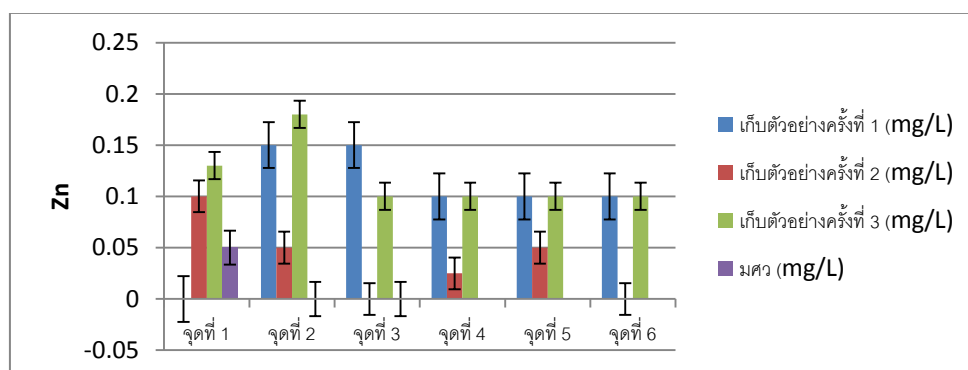
โรคม องครักษ์มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 มากกว่าการเก็บตัวอย่างครั้งอื่น



ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงค่าเหล็ก (Fe)

2.10 สังกะสี (Zn)

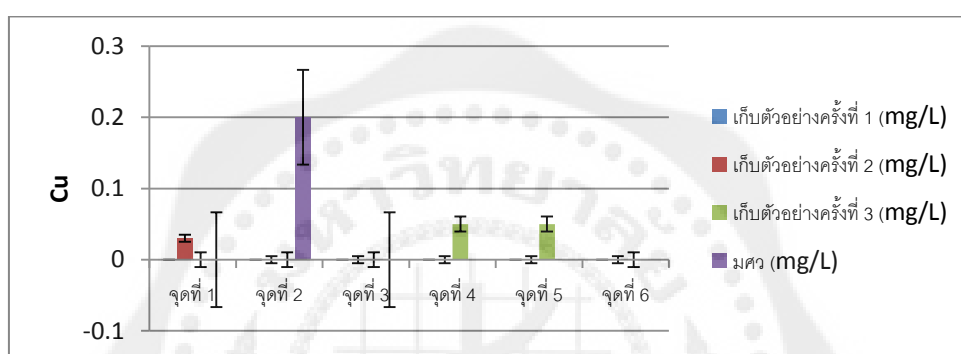
ผลการตรวจวัดสังกะสีจากตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะ พบว่าในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 จะมีค่าเฉลี่ยของสังกะสีสูงกว่าทุกครั้ง โดยตรวจวัดสังกะสีได้ 0.1-0.18 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 0.118 mg/L ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ตรวจวัดสังกะสีมีค่าอยู่ระหว่าง 0.10-0.15 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 0.12 mg/L ส่วนการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ตรวจวัดสังกะสีอยู่ในช่วง 0.03-0.28 mg/L เฉลี่ยทั้ง 6 จุดได้เท่ากับ 0.07 mg/L สำหรับการตรวจวัดสังกะสีจากตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.05 mg/L ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างน้ำบริเวณถ้ำเขาติวะในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2



ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงค่าสังกะสี (Zn)

2.11 ทองแดง (Cu)

ผลการตรวจวัดทองแดงในจากตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะ พบว่า การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ตรวจไม่พบทองแดงทุกจุดเก็บตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ตรวจพบทองแดงในบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะ 0.03 mg/L ส่วนการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ตรวจพบทองแดงจากจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 และ 5 เฉลี่ยค่าที่ตรวจพบได้ 0.05 mg/L สำหรับการตรวจวัดทองแดงของตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.2 mg/L ซึ่งมีค่าทองแดงสูงกว่าจุดเก็บตัวอย่างอื่น ๆ ทุกฤดู



ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงค่าทองแดง (Cu)

2.12 การตรวจวัดแบคทีเรียโคลิฟอร์มจากน้ำภายในถ้ำและบ่อน้ำนอกถ้ำ

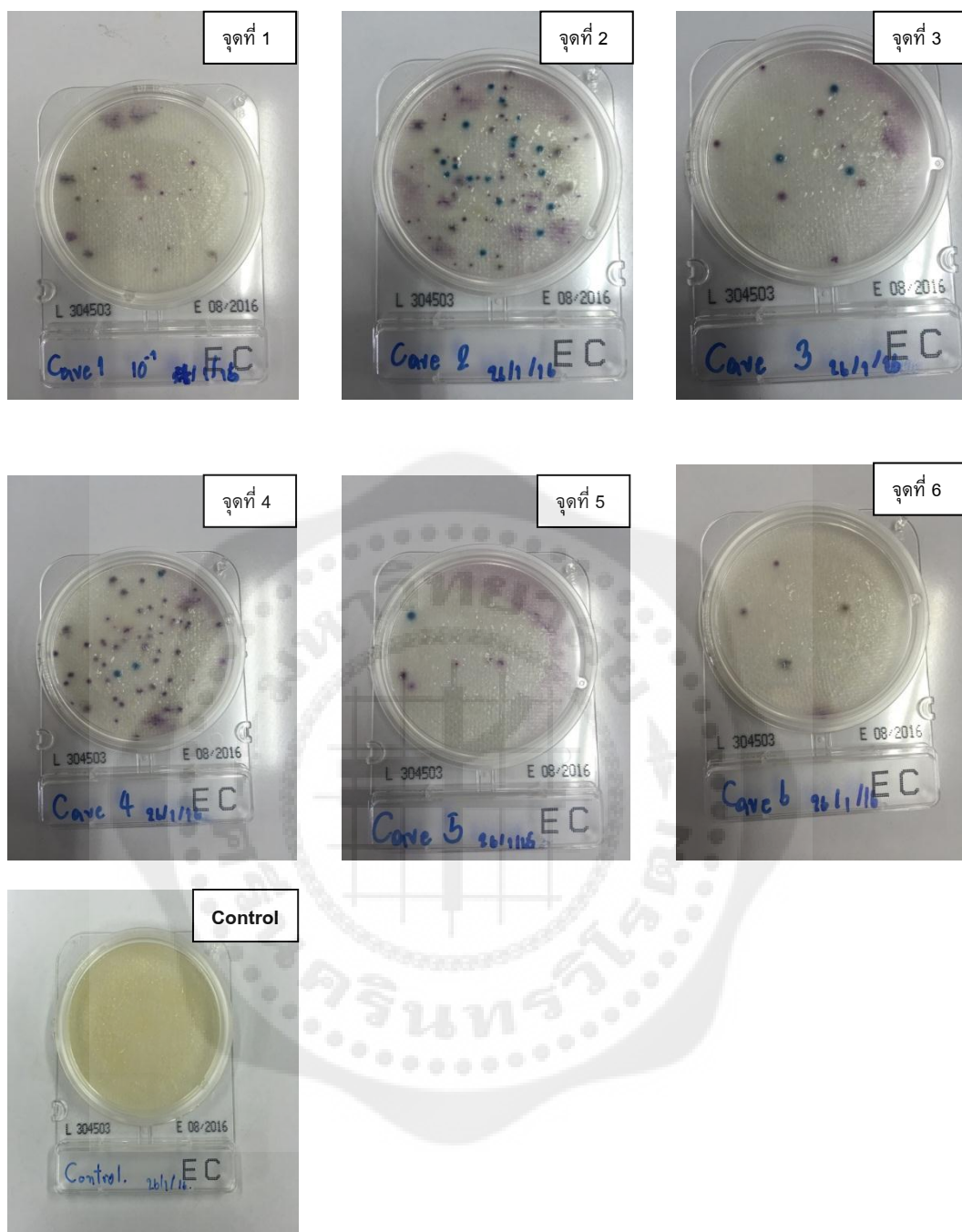
การศึกษาในครั้งนี้ได้นำตัวอย่างน้ำที่ถูกเก็บจากจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมดที่กำหนดไว้มาตรวจวัดแบคทีเรียโคลิฟอร์ม โดยใช้เพลทอาหารสำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Compact Dry) EC *E. coli* & Coliform (NISSUI, JAPAN) เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มตามวิธีมาตรฐาน (Conventional method) ต้องใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน ถึงจะทราบจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่แน่ชัด (สุจิตรา มณีรัตน์; และคนอื่น ๆ. 2543: 238-338) นอกจากนี้ยังต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือจำนวนมาก ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงได้เลือกใช้เพลทอาหารสำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Compact Dry) EC *E. coli* & Coliform (NISSUI, JAPAN) เนื่องจากมีประสิทธิภาพที่ดีและได้รับการยอมรับว่าเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน (Compact Dry “Nissui” EC for Coliform & *E.coli*. online)

จากผลการตรวจวัดน้ำภายในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะ พบว่าน้ำมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 และ 6 ตรวจไม่พบ *E. coli* ส่วนจุดเก็บ

ตัวอย่างที่ 2, 3, 4 และ 5 สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* โดยจุดเก็บตัวอย่างที่ 2 สามารถตรวจพบ *E. coli* มากถึง 17 CFU/ml ซึ่งมีจำนวนโคโลนีมากกว่าทุกจุดที่ทำการตรวจวัด ส่วน *E. aerogenes* และ *P. aeruginosa* สามารถตรวจพบทุกจุดเก็บตัวอย่าง โดยจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 ตรวจพบ *E. aerogenes* มากที่สุดถึง 215 CFU/ml รองลงมาคือจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 ตรวจพบ 42 CFU/ml และ *P. aeruginosa* สามารถตรวจพบมากที่สุดในการเก็บตัวอย่างที่ 1 คือ 55 CFU/ml รองลงมาคือจุดเก็บตัวอย่างที่ 2 คือ 12 CFU/ml ผลการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าตัวอย่างน้ำจากถ้ำเขาติ้วะจุดที่ 5 และ 6 มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในปริมาณที่ต่ำกว่าทุกจุดที่ทำการสำรวจ (ตาราง 8)

ตาราง 8 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มจากตัวอย่างน้ำในถ้ำและนอกถ้ำ

แบคทีเรียโคลิฟอร์ม	<i>E. coli</i> (CFU/ml)	<i>E. aerogenes</i> (CFU/ml)	<i>P. aeruginosa</i> (CFU/ml)
จุดที่ 1	0	215	55
จุดที่ 2	17	35	12
จุดที่ 3	5	9	3
จุดที่ 4	3	42	10
จุดที่ 5	1	6	3
จุดที่ 6	0	2	1



ภาพประกอบ 25 แบคทีเรียโคลิฟอร์มบนเพลทอาหารสำเร็จรูป (Compact Dry) EC E.coli & Coliform

3. การจัดจำแนกปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* ด้วยการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (16S rDNA และ COI)

3.1 การจัดจำแนกเบื้องต้น

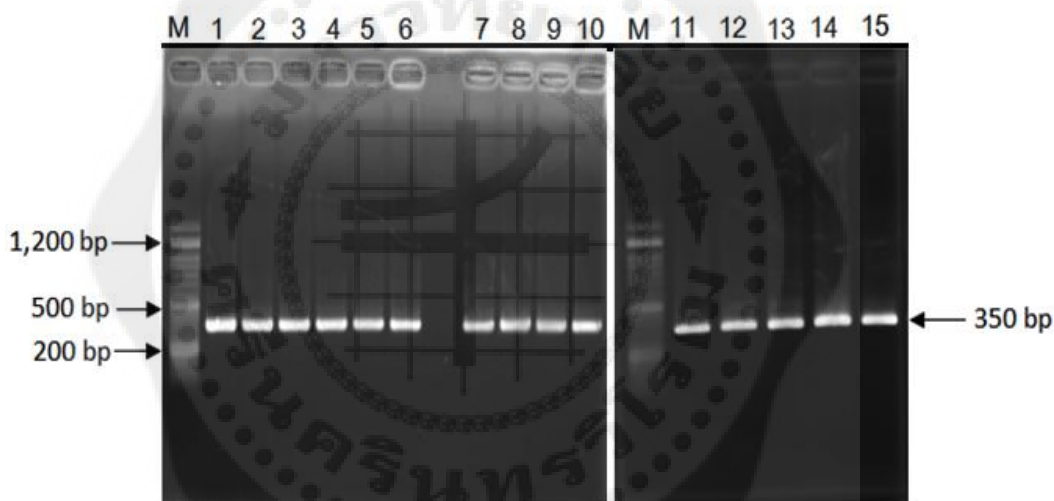
ตัวอย่างปลาที่เก็บได้จากจุดที่ 1, 2, 3 และ 5 จะทำการจำแนกสายพันธุ์เบื้องต้นตามหนังสือปลาไทยลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2553) และหนังสือคู่มือปลาน้ำจืด (ชวลิต วิทยานนท์. 2447) พบว่า ตัวอย่างปลาจากจุดที่ 1 คือ *Rasbora borapetansis* ตัวอย่างปลาจากจุดที่ 2 และ 3 คือ *Esomus metallicus* และตัวอย่างปลาจากจุดที่ 3 คือ *Rasbora paviana*



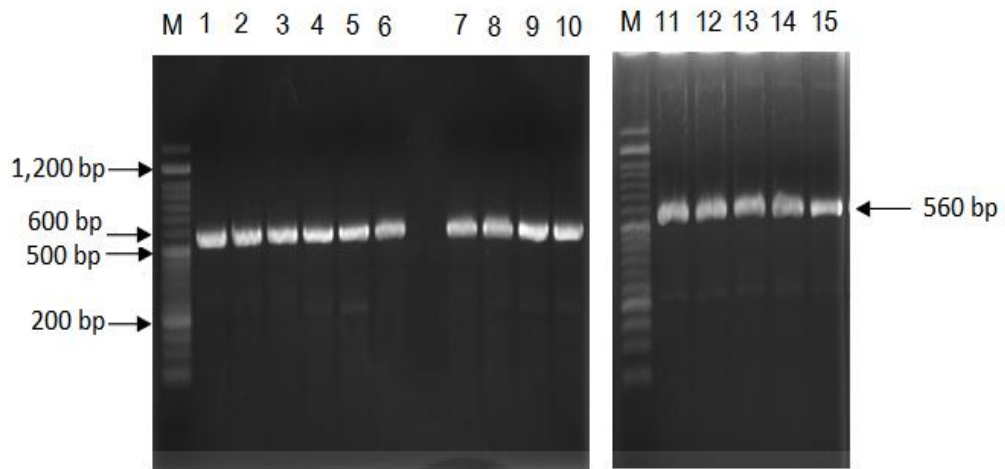
ภาพประกอบ 26 ตัวอย่างปลาที่เก็บได้จากบริเวณถ้ำน้ำเขาคีระและบ่อน้ำหน้าถ้ำและจำแนกเบื้องต้นโดยหนังสือปลาไทยลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา (A) *Rasbora borapetansis*, (B) *Esomus metallicus*, (C) *Rasbora paviana*

3.2 การศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA และยีน CO1 ของปลา *Rasbora borapetansis*, *Esomus metallicus* และ *R. paviana*

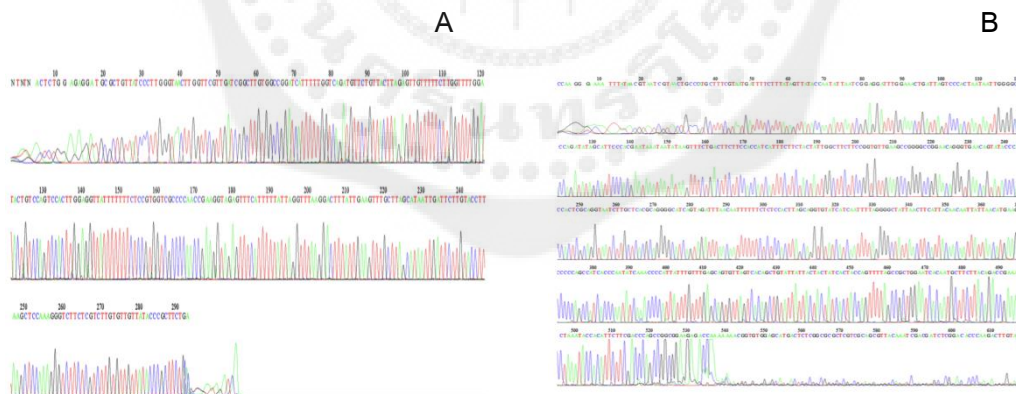
การตรวจวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลของปลาเพื่อจำแนกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และยีน CO1 โดยเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอแล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนนั้นๆ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) นำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ซึ่งผลผลิต PCR ของยีน 16S rDNA คือ ประมาณ 350 คู่เบส และยีน CO1 คือประมาณ 560 คู่เบส จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากแผ่นเจล แล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำมาจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์เปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกันกับปลาสายพันธุ์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล Genbank



ภาพประกอบ 27 ภาพถ่าย agarose gel แสดงผล PCR products ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนบริเวณยีน 16S rDNA ของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* (M) หมายถึง Ladder marker, (1,2,3,) หมายถึง *R. borapetansis* จากถ้ำ (4) หมายถึง *R. borapetansis* จากทุ่งนา (5,6,7,8) หมายถึง *E. metallicus* จากถ้ำ (9,10,11) หมายถึง *E. metallicus* จากทุ่งนา (12,13,14) หมายถึง *R. paviana* จากถ้ำ (15) หมายถึง *R. paviana* จากทุ่งนา



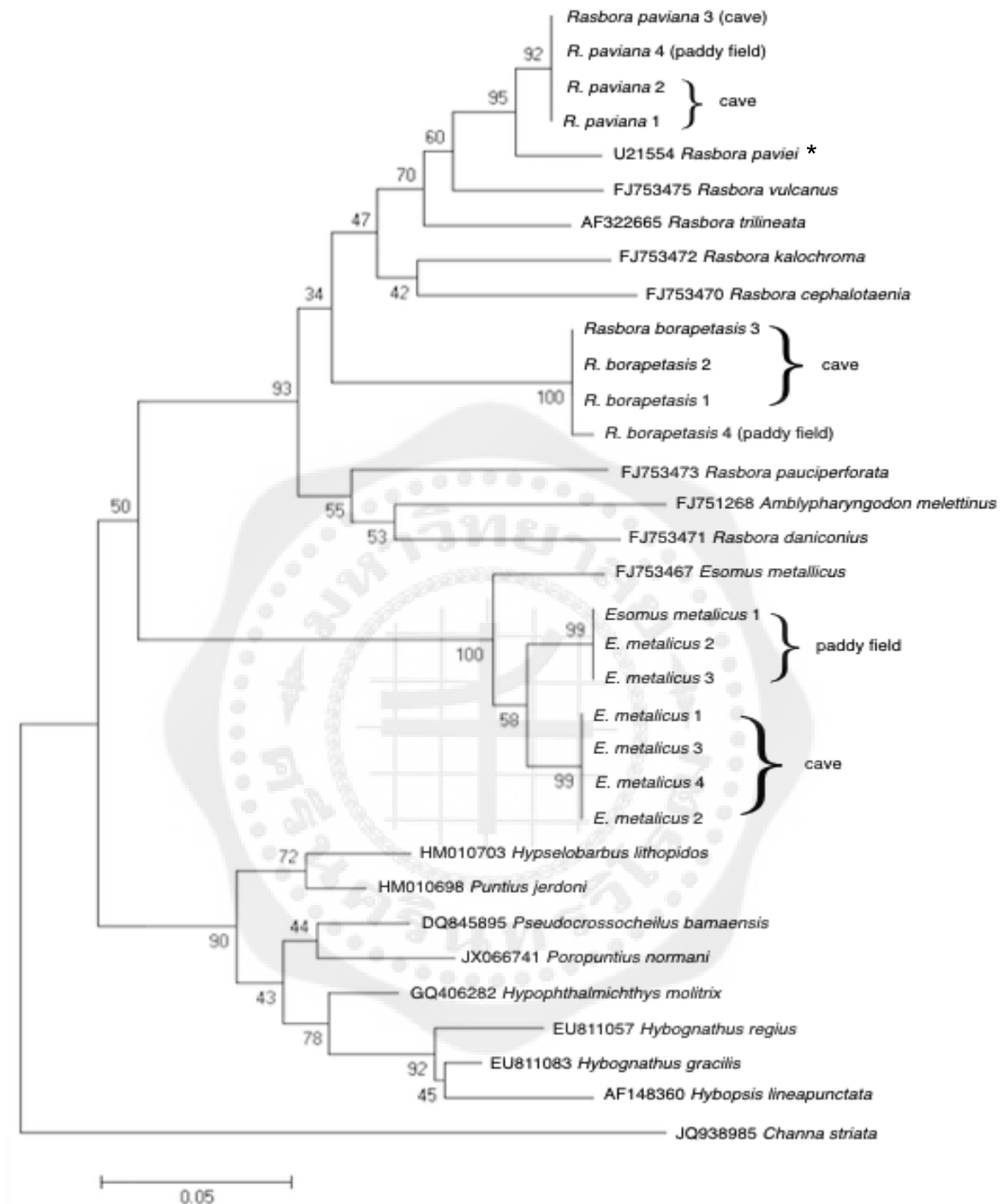
ภาพประกอบ 28 ภาพถ่าย agarose gel แสดงผล PCR products ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน COI ของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* (M) Ladder marker (1,2,3,) คือ *R. borapetansis* จากถ้ำ (4) คือ *R. borapetansis* จากทุ่งนา (5,6,7,8) คือ *E. metallicus* จากถ้ำ (9,10,) คือ *E. metallicus* จากทุ่งนา (11,12,13,14) คือ *R. paviana* จากถ้ำ (15) คือ *R. paviana* จากทุ่งนา



ภาพประกอบ 29 ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ (A) คือยีน 16S rDNA (B) คือยีน COI

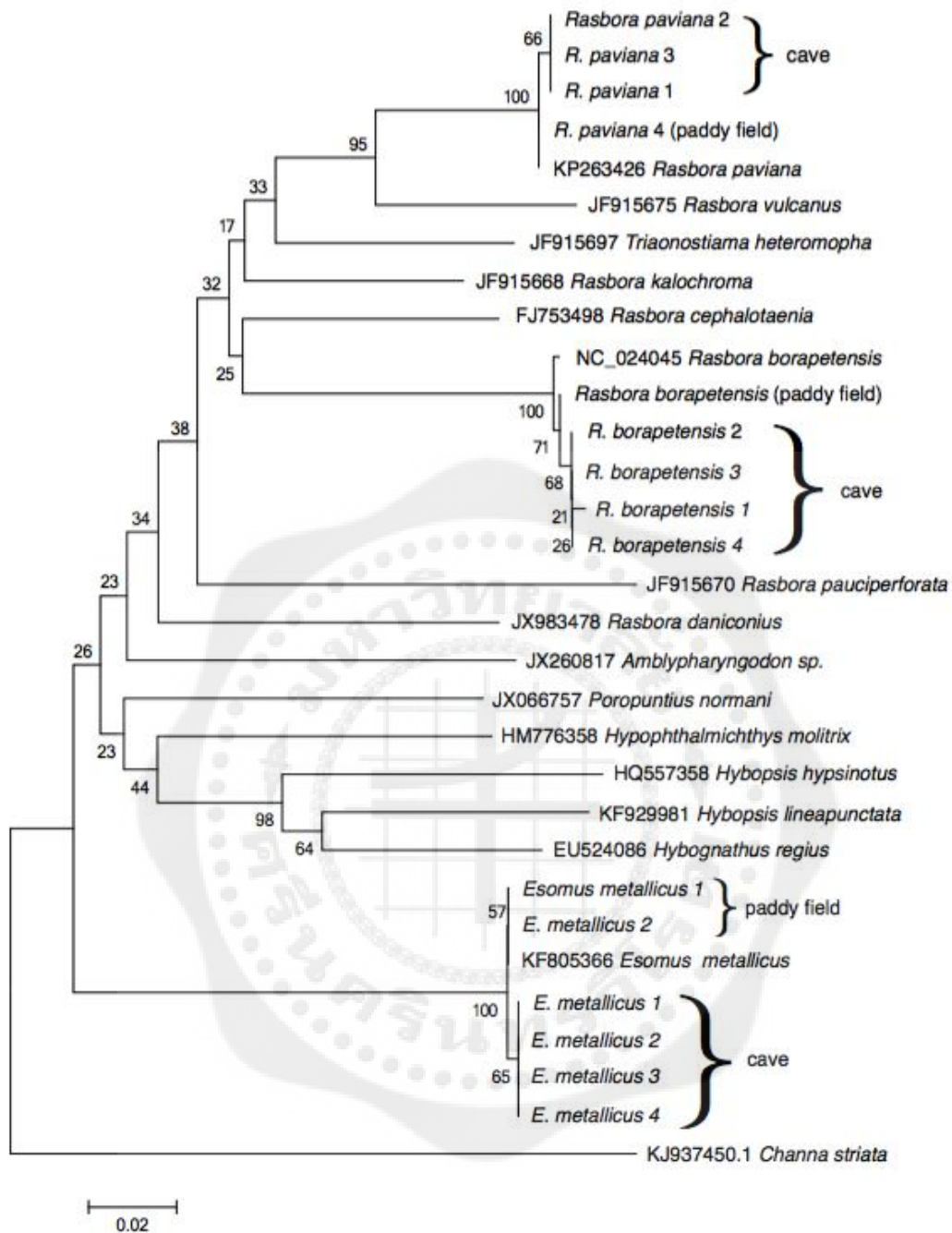
จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA และยีน CO1 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank และสร้างแผนภูมิทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่า ยีน 16S rDNA ของปลาสกุล *R. paviana* และ *E. metalicus* ที่พบในถ้ำมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เบสเล็กน้อยกับปลาสกุล *R. paviana* และ *E. metalicus* ที่พบในทุ่งนาและมีความแตกต่างกับปลาสกุล *R. paviana* (U21554) และ *E. metalicus* (fJ753467) ตามลำดับ (ภาพประกอบ 29) สำหรับยีน CO1 พบว่าปลาสกุล *R. paviana*, *R. borapetansi* และ *E. metalicus* ที่พบในถ้ำมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เบสเล็กน้อยกับปลาสกุล *R. paviana*, *R. borapetansis* และ *E. metalicus* ที่พบในทุ่งนาและมีความแตกต่างกับปลาสกุล *R. paviana* (KP263426) ปลาสกุล *R. borapetansis* (NC_024045) และ *E. metalicus* (KF805366) ตามลำดับ (ภาพประกอบ 30)





ภาพประกอบ 30 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของปลาสกุล *R.borapetansis*, *E.metalicus* และ *R.paviana* เปรียบเทียบกับปลาสายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล Genbank

* *Rasbora paviei* คือชื่อเดิม แต่ปัจจุบันได้ใช้ชื่อที่เป็นที่ยอมรับใหม่คือ *Rasbora paviana*



ภาพประกอบ 31 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสบริเวณ CO1 ของปลาสกุล *Rasbora borapetensis*, *Esomus metallicus* และ *R.paviana* เปรียบเทียบกับปลาสายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล Genbank

4. ความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินโคลนในถ้ำเขาคีระโดยการวิเคราะห์ยีน

16S rDNA บริเวณ V6-region

การศึกษาเริ่มจากนำตัวอย่างดินโคลนมาศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินในถ้ำเขาคีระ โดยการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากดินโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ แล้วทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) นำผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ซึ่งผลผลิต PCR ของยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region ประมาณ 100 คู่เบส จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากแผ่นเจล ทำการสกัดดีเอ็นเอจากดินซ้ำจนได้ปริมาณของดีเอ็นเอบริสุทธิ์ประมาณ 250 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่องวัดนาโนทรอปก่อนจะส่งไปวิเคราะห์ด้วยวิธี pyrosequencing

ผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างดินจากถ้ำเขาคีระจุดที่ 1, 2, 3, 5 และ 6 สกัดดีเอ็นเอได้เพียงเล็กน้อย ส่วนจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 สามารถสกัดดีเอ็นเอได้มากที่สุด เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บจากจุดที่ 1, 2, 3, 5 และ 6 เป็นหินและกรวดทำให้สกัดได้ยาก ส่วนตัวอย่างที่เก็บจากจุดที่ 4 เป็นดินโคลนจึงทำการสกัดได้ง่ายกว่า จากนั้นนำดีเอ็นเอจากจุดเก็บตัวอย่างเหล่านี้ไปทำ PCR และวัดคุณภาพด้วยวิธีนาโนทรอป พบว่าดีเอ็นเอจากจุดเก็บตัวอย่างที่ 2, 5 และ 6 มีคุณภาพต่ำ ส่วนดีเอ็นเอจากจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 3 และ 4 มีคุณภาพที่ดีจึงส่งไปวิเคราะห์ด้วยวิธี pyrosequencing พบว่า แบคทีเรียที่ตรวจพบทั้ง 3 จุด มีความหลากหลายของไฟล์้มใกล้เคียงกัน โดยที่จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 และ 3 ตรวจพบแบคทีเรีย 14 ไฟล์้ม 132 สกุลเท่ากัน ซึ่งไฟล์้มของแบคทีเรียที่พบมีดังนี้ Acidobacteria, Actinobacteria, Armitimonadetes, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria_Chloroplast, Firmicutes, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria, Thermotoyae, Verrucomicrobia และ WS3 แบคทีเรียที่พบในจุดที่ 1 และจุดที่ 3 มากที่สุดคือแบคทีเรียไฟล์้ม Actinobacteria โดยพบทั้งหมด 49 สกุลเท่ากัน ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 มีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ (relative abundance) ของแบคทีเรียไฟล์้ม Actinobacteria เท่ากับ 0.5465 มีสกุลที่พบมากที่สุดคือ *Micromonospora*, *Rubrobacter* และ *Kribbella* ตามลำดับ ส่วนจุดเก็บตัวอย่างที่ 3 มีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ของแบคทีเรียไฟล์้ม Actinobacteria เท่ากับ 0.3336 ซึ่งสกุลที่พบมากที่สุดคือ *Micromonospora*, *Streptomyces* และ *Solirubrobacter* ตามลำดับ

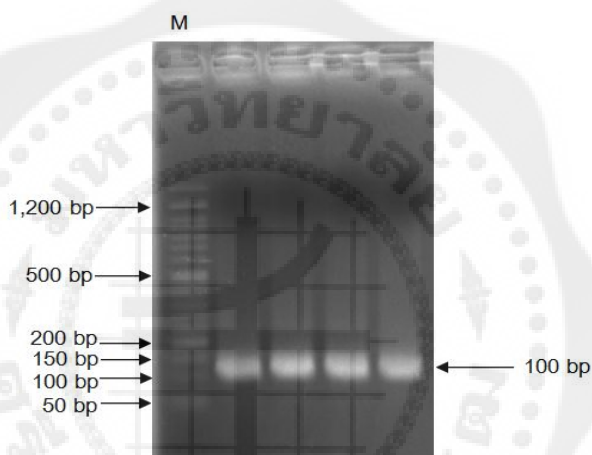
นอกจากนี้จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 พบว่าไฟล์้มของแบคทีเรียที่มีความชุกชุมสัมพัทธ์รองลงมาจากไฟล์้ม Actinobacteria คือ ไฟล์้ม Acidobacteria โดยพบทั้งหมด 10 สกุล แต่มีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์มากถึง 0.1656 โดยกลุ่มที่พบมากที่สุดคือ Acidobacteria subgroup 6 (Gp6), Gp4 และ

Gp5 ตามลำดับ รองลงมาคือไฟลัม Proteobacteria พบมากถึง 43 สกุล แต่มีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์เท่ากับ 0.1427 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าไฟลัม Acidobacteria โดยสกุลที่พบมากที่สุดคือ *Aminobacter*, *Desulfuromonas* และ *Simiduia* ตามลำดับ ไฟลัมที่พบว่ามีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์รองลงมาคือ ไฟลัม Verrucumicrobia ที่พบทั้งหมด 4 สกุล และมีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์อยู่ที่ 0.0367 ส่วนแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes ถึงแม้จะพบเพียง 1 สกุล แต่กลับมีความชุกชุมสัมพัทธ์มากกว่าแบคทีเรียไฟลัม Bacteroidetes, Nitrospira, Chloroflexi และ Armitimonadetes ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียไฟลัม WS3 (Wurtsmith aquifer Sequences-3) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้พบครั้งแรกในตะกอนของระบบการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anoxic sediments) และมีลักษณะของ monophyletic อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียไฟลัม Fibrobacteres – Chlorobi - Bacteroidetes (FCB) (Youssef; et. al. 2015: 1-21) ส่วนแบคทีเรียไฟลัม Thermotoyae, Cyanobacteria_Chloroplast พบว่ามีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์น้อยลงตามลำดับ โดยแบคทีเรียไฟลัม Chlorobi และ Planctomycetes ในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 พบน้อยที่สุดซึ่งมีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์อยู่ที่ 0.00001 (ตารางที่ 8)

ส่วนจุดเก็บตัวอย่างที่ 3 พบไฟลัมของแบคทีเรียที่มีความชุกชุมสัมพัทธ์มากรองลงมาจากไฟลัม Actinobacteria คือ ไฟลัม Proteobacteria ที่พบมากถึง 43 สกุลและยังมีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์มากถึง 0.2674 โดยสกุลที่พบมากที่สุดคือ *Methylomicrobium*, *Pesulfuromonas* และ *Pedomicrobium* ตามลำดับ ไฟลัมที่พบรองลงมาคือ Acidobacteria ที่พบ 10 สกุล และไฟลัม Verrucumicrobia ที่พบ 4 สกุล มีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์อยู่ที่ 0.1722 และ 0.0688 ตามลำดับแบคทีเรียไฟลัม Chloroflexi ที่พบเพียง 4 สกุล แต่มีค่าความสัมพัทธ์มากกว่าแบคทีเรียไฟลัม Bacteroidetes และ Firmicutes ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียที่พบน้อยลงมากคือไฟลัม Nitrospira, WS3, Thermotoyae, Armtimonadetes, Planctomycetes และ Chlorobi ตามลำดับ โดยพบแบคทีเรียไฟลัม Cyanobacteria_Chloroplast น้อยที่สุดในจุดเก็บตัวอย่างที่ 3 (ตารางที่ 8)

สำหรับจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 ตรวจพบแบคทีเรีย 14 ไฟลัม 116 สกุล ไฟลัมของแบคทีเรียที่พบมีดังนี้ Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Caldithrix, Chlamydia, Chlorobi, Chloroflexi, Firmicutes, Nitrospirae, NC10, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes และ Verrucomicrobia แบคทีเรียที่พบในจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 มากที่สุดได้แก่ แบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria พบ 41 สกุล โดยสกุลที่พบมากที่สุดคือ *Halomonas*, *Thiorhodospira* และ *Methylomicrobium* ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ของแบคทีเรียมากที่สุดคือ 0.2612 แบคทีเรียที่พบรองลงมาคือ ไฟลัม Chloroflexi พบ 4 สกุล เช่น *Anaerolinea*, *Caldilinea*, และ *Dehalogenimonas* เป็นต้น แต่มีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์มากถึง 0.1855 และไฟลัม Actinobacteria

พบ 39 สกุล สกุลที่พบมากที่สุดคือ *Mycobacterium*, *Sterptomyces* และ *Microlunatus* มีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์ของแบคทีเรียเท่ากับ 0.1435 ตามลำดับ ไฟลัม Planctomycetes และ ไฟลัม NC10 (กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์มีเทนในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobically oxidize methane (AOM)) (He; et al. 2016: 5099-5108) พบเพียง 1 สกุล แต่มีค่าความชุกชุมสัมพัทธ์มากถึง 0.0683 และ 0.0436 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความชุกชุมมากกว่าไฟลัม Firmicutes ที่พบ 11 สกุล แต่มีค่าความชุกชุมเพียง 0.0330 และ ไฟลัม Verrucomicrobia ที่พบ 5 สกุล มีค่าความชุกชุมอยู่ที่ 0.0365 ส่วนไฟลัม Chloroflexi, Nitrospirae และ Acidobacteria พบจำนวนสกุล 4, 4 และ 3 สกุล ตามลำดับ และยังมีค่าความชุกชุมมากกว่าไฟลัม Firmicutes และ Verrucomicrobia (ตาราง 8)



ภาพประกอบ 32 ภาพถ่าย agarose gel แสดงผล PCR products ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region ของตัวอย่างดินโคลนจุดที่ 4 ในถ้ำน้ำเขาคีวะ

ตาราง 9 แสดงค่าความชุกชุม (Operational taxonomic unit, OTU) ของแบคทีเรียแต่ละ phylum

phylum	จำนวน genus ที่พบ				ความชุกชุม (Operational taxonomic unit, OTU)				ความชุกชุมสัมพัทธ์ (Relative Abundance)			
	จุดที่ 1	จุดที่ 3	จุดที่ 4	จุดที่ 4	จุดที่ 1	จุดที่ 3	จุดที่ 4	จุดที่ 4	จุดที่ 1	จุดที่ 3	จุดที่ 4	จุดที่ 4
Acidobacteria	10	10	3	3	287,536	223,591	20,968	20,968	0.1656	0.1722	0.0823	0.0823
Actinobacteria	49	49	39	39	948,836	433,240	36,603	36,603	0.5465	0.3336	0.1435	0.1435
Armimonadetes	3	3	-	-	5,751	1,547	-	-	0.0033	0.0012	-	-
Bacteroidetes	7	7	3	3	49,361	53,246	1,846	1,846	0.0284	0.0410	0.0072	0.0072
Caldithrix	-	-	1	1	-	-	430	430	-	-	0.0017	0.0017
Chlamydiae	-	-	1	1	-	-	152	152	-	-	0.0006	0.0006
Chlorobi	1	1	1	1	44	565	4,994	4,994	0.00001	0.0004	0.0196	0.0196
Chloroflexi	4	4	4	4	29,571	75,330	47,256	47,256	0.0170	0.0580	0.1855	0.1855
Cyanobacteria_Chloroplast	1	1	-	-	378	30	-	-	0.0002	0.00001	-	-
Firmicutes	6	6	11	11	53,160	37,924	8,418	8,418	0.0306	0.0292	0.0330	0.0330
NC10	-	-	1	1	-	-	11,118	11,118	-	-	0.0436	0.0436
Nitrospirae	1	1	4	4	45,068	25,514	29,434	29,434	0.0260	0.0196	0.1155	0.1155
Planctomycetes	1	1	1	1	7	641	17,408	17,408	0.00001	0.0005	0.0683	0.0683

ตาราง 9 แสดงค่าความชุกชุม (Operational taxonomic unit, OTU) ของแบคทีเรียแต่ละ phylum (ต่อ)

phylum	จำนวน genus ที่พบ				ความชุกชุม (Operational taxonomic unit, OTU)				ความชุกชุมสัมพัทธ์ (Relative Abundance)			
	จุดที่ 1	จุดที่ 3	จุดที่ 4	จุดที่ 1	จุดที่ 3	จุดที่ 4	จุดที่ 1	จุดที่ 3	จุดที่ 4	จุดที่ 1	จุดที่ 3	จุดที่ 4
Proteobacteria	43	43	41	247,713	347,292	66,566	0.1427	0.2674	0.2612			
Spirochaetes	-	-	1	-	-	297	-	-	0.0012			
Thermutoyae	1	1	-	1,729	3,347	-	0.0010	0.0026	-			
Verrucomicrobia	4	4	5	63,724	89,418	9324	0.0367	0.0688	0.0365			
WS3	1	1	-	3,332	7,063	-	0.0019	0.0054	-			
รวม	132	132	116	1,736,210	1,298,748	254,814	0.99992	0.99991	0.9997			

5. การศึกษาหอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* จากน้ำในถ้ำเขาคิเว

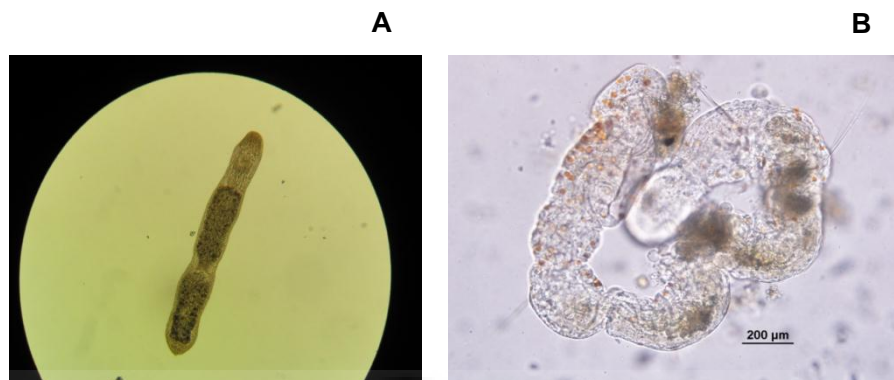
5.1 การจำแนกเบื้องต้นด้วยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากถ้ำน้ำเขาคิเวเป็นถ้ำที่ไม่มีแสงสว่างจึงทำให้ไม่มีสิ่งมีชีวิตจำพวกพืชหรือสาหร่ายสีเขียวซึ่งเป็นผู้ผลิตในระบบนิเวศเจริญเติบโตได้ ดังนั้นสิ่งมีชีวิตจำพวกปลาที่อาศัยอยู่ในถ้ำน้ำเขาคิเวแห่งนี้จึงต้องกินสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำพวกหอนน้ำหรือหอนตัวแบนเป็นอาหาร จึงจะทำให้เกิดห่วงโซ่อาหารภายในถ้ำได้อย่างสมบูรณ์ จึงได้ทำการศึกษาสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเคลื่อนที่อยู่บริเวณตัวอย่างดินโคลนของจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2 และ 6 จึงได้นำสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในเพลทเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เลี้ยงด้วยอาหารปลาสำเร็จรูป (Sakura, Thailand) จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยจำแนกเบื้องต้นตามหนังสือพรโทซัวในแหล่งน้ำจืด (บพิช จารุพันธ์; และ นันทพร จารุพันธ์. 2549) หนังสือพรโทซัววิทยา (บพิช จารุพันธ์. 2546) และงานวิจัยของแอนโน ฟาเบล (Faubel, A. 2010: Online) พบว่าสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในหลอดทดลองเก็บตัวอย่างน้ำจืดที่ 1 และ 2 คือ *Stenostomum grande* และ *Pristina longiseta* ส่วนจุดเก็บตัวอย่างที่ 6 คือ หอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* (ภาพประกอบ 33)

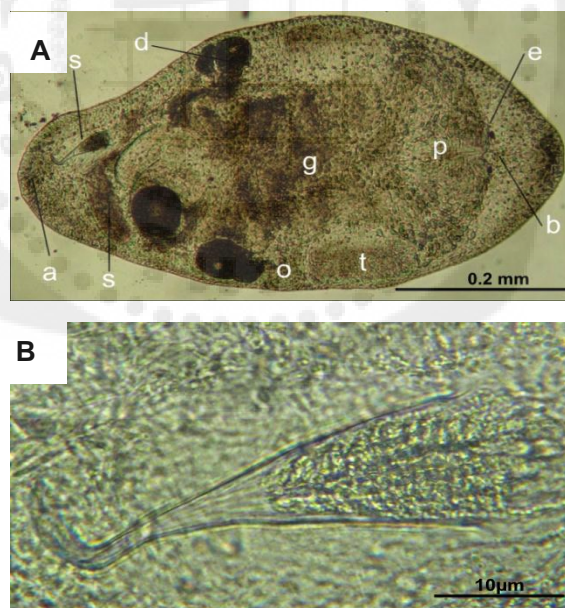
5.2 การวิเคราะห์หอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ระดับโมเลกุล (ยีน 18S rDNA)

การตรวจวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลของหอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* เพื่อจำแนกชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA โดยเริ่มจากการเลี้ยงหอนตัวแบนด้วยอาหารเลี้ยงปลาสำเร็จรูป (Sakura, Thailand) ให้เพิ่มจำนวน จากนั้นสกัดดีเอ็นเอแล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) นำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ซึ่งผลผลิต PCR ของยีน 18S rDNA คือ ประมาณ 1,700 คู่เบส จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากแผ่นเจล แล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำมาจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับปลาสายพันธุ์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล Genbank และนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ของแต่ละสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.10) จากการศึกษาพบว่าหอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบในถ้ำน้ำเขาคิเว มีลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับหอนตัวแบนสายพันธุ์ *Macrostomum quiritum* (FJ715299) และ *Macrostomum tuba* (U70080) (ภาพประกอบ 36) ซึ่งผลการศึกษาหอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบในถ้ำน้ำเขาคิเวในระดับโมเลกุลนี้ พบว่ามีผลการศึกษาไม่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา จึงได้นำหอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบในถ้ำน้ำเขาคิเวมาถ่ายรูปพื้นผิวและลักษณะทาง

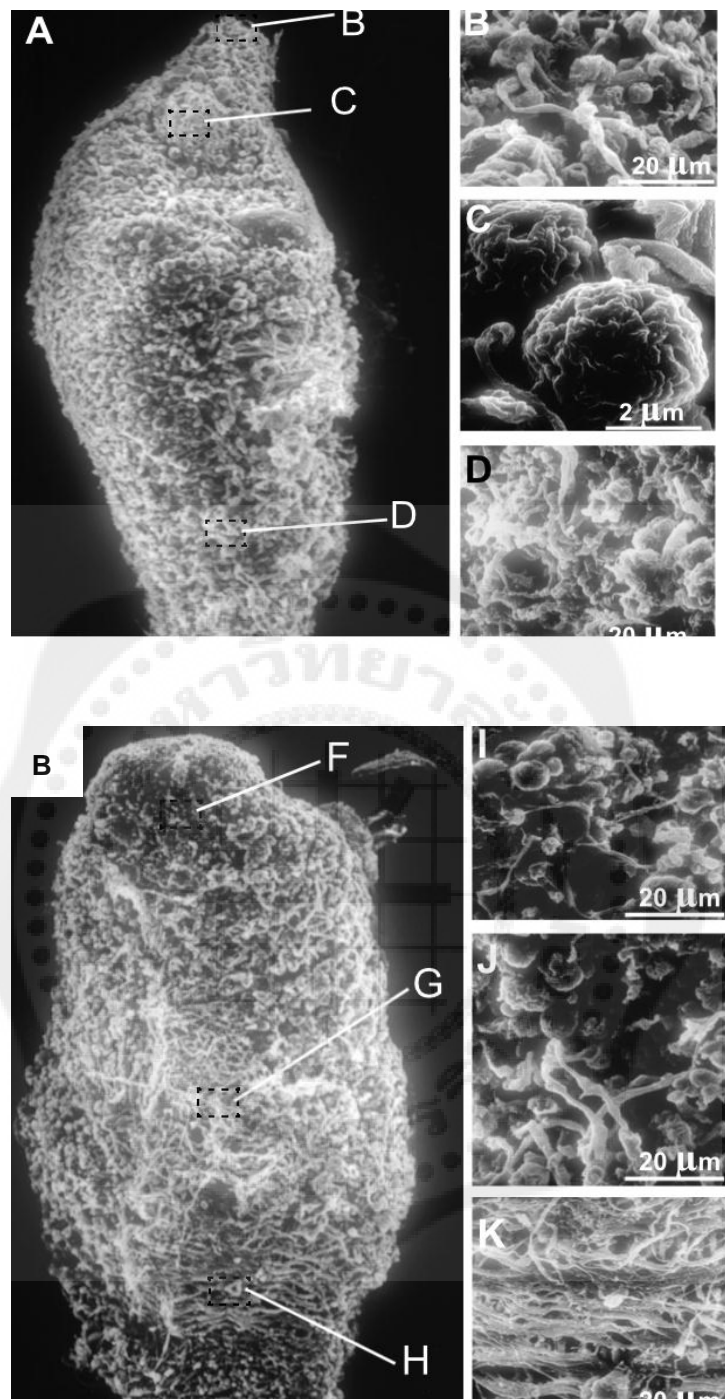
สัณฐานวิทยาภายนอกโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการจัดจำแนกในอนาคต



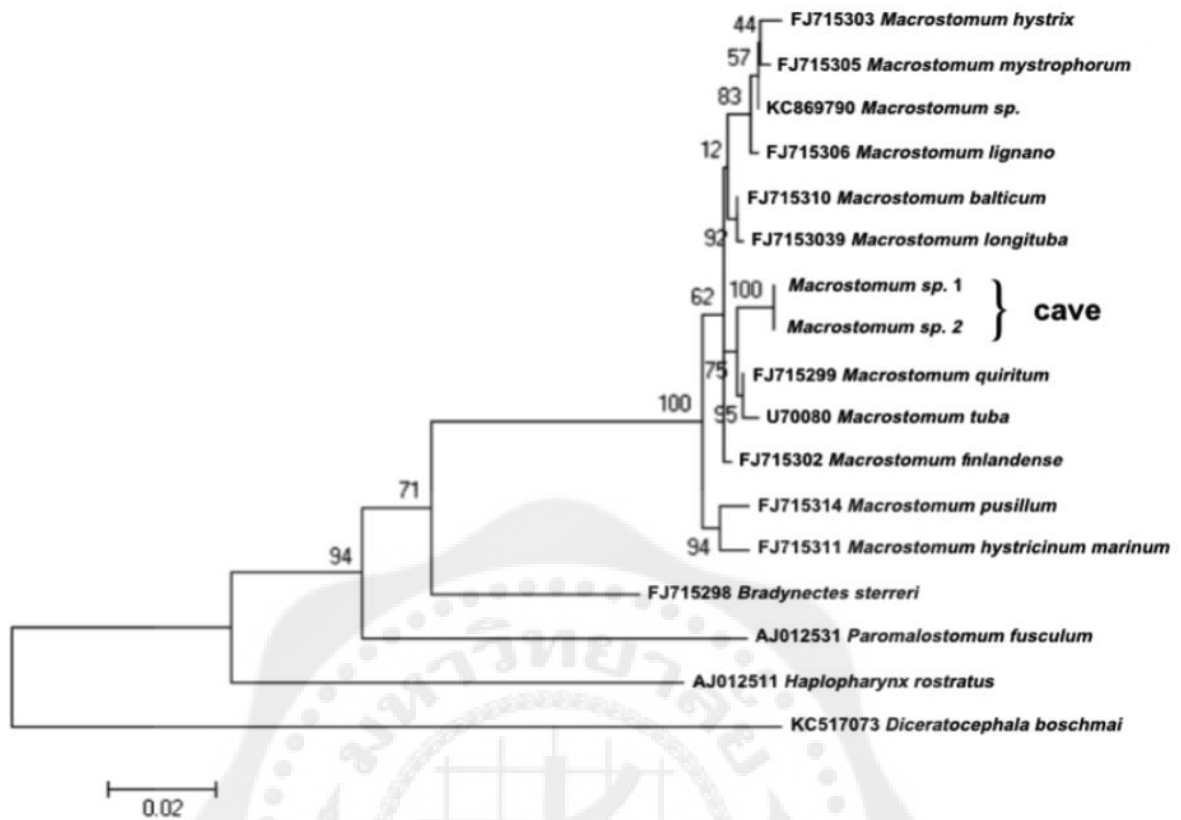
ภาพประกอบ 33 หนอนตัวแบนที่พบในบริเวณถ้ำน้ำเขาศิ่วในหลอดเก็บตัวอย่างที่ 1 และ 2 จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (A) คือ *Stenostomum grande* (B) คือ *Pristina longiseta*



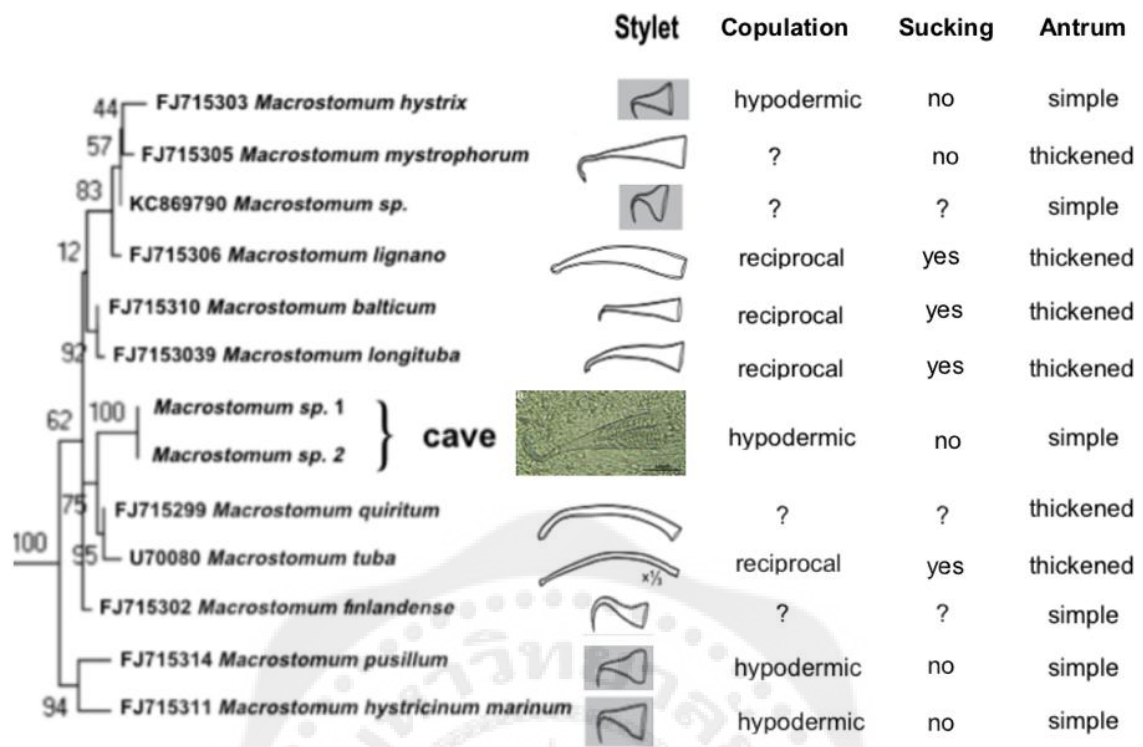
ภาพประกอบ 34 ภาพหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (A) คือ รูปร่างลักษณะภายนอก โดยที่ a: ก้าน, b: สมอง d: ไข่ e: ตา g: กระเพาะ o: รังไข่ p: ปาก s: อวัยวะสืบพันธุ์ se: ท่อพักอสุจิ และ t: อัณฑะ (B) คือ อวัยวะสืบพันธุ์ของหนอนตัว



ภาพประกอบ 35 ภาพผิวของหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) (A) คือ รูปร่างผิวหนึ่งบริเวณช่วงท้อง (B) คือ ผิวหนึ่งบริเวณด้านหลัง



ภาพประกอบ 36 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสบริเวณ 18s rDNA ของหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* เปรียบเทียบกับหนอนตัวแบนสายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล Genbank



ภาพประกอบ 37 ข้อมูลระดับโมเลกุลและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนตัวแบนสกุล

Macrostomum ที่พบในถ้ำน้ำเขาคีจะเปรียบเทียบกับหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ตัวอื่นๆ โดยที่ (Stylet) หมายถึง ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์แบบต่าง ๆ (Copulation) คือ ลักษณะของการสืบพันธุ์โดยที่ hypodermic หมายถึง อวัยวะสืบพันธุ์ของหนอนตัวแบนเพศผู้จะเจาะเข้าไปในผิวหนังแล้วฉีดอสุจิเข้าไปในตัวของหนอนเพศเมีย ส่วน reciprocal หมายถึง การสืบพันธุ์แบบปกติของหนอนตัวแบนเพศผู้และเพศเมีย (Sucking) หมายถึง ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่เป็นแบบดูด (yes) หรือไม่ดูด (no) (Antrum) หมายถึง ลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียที่เป็นแบบผนังหนา (thickened) หรือผนังบาง (simple)

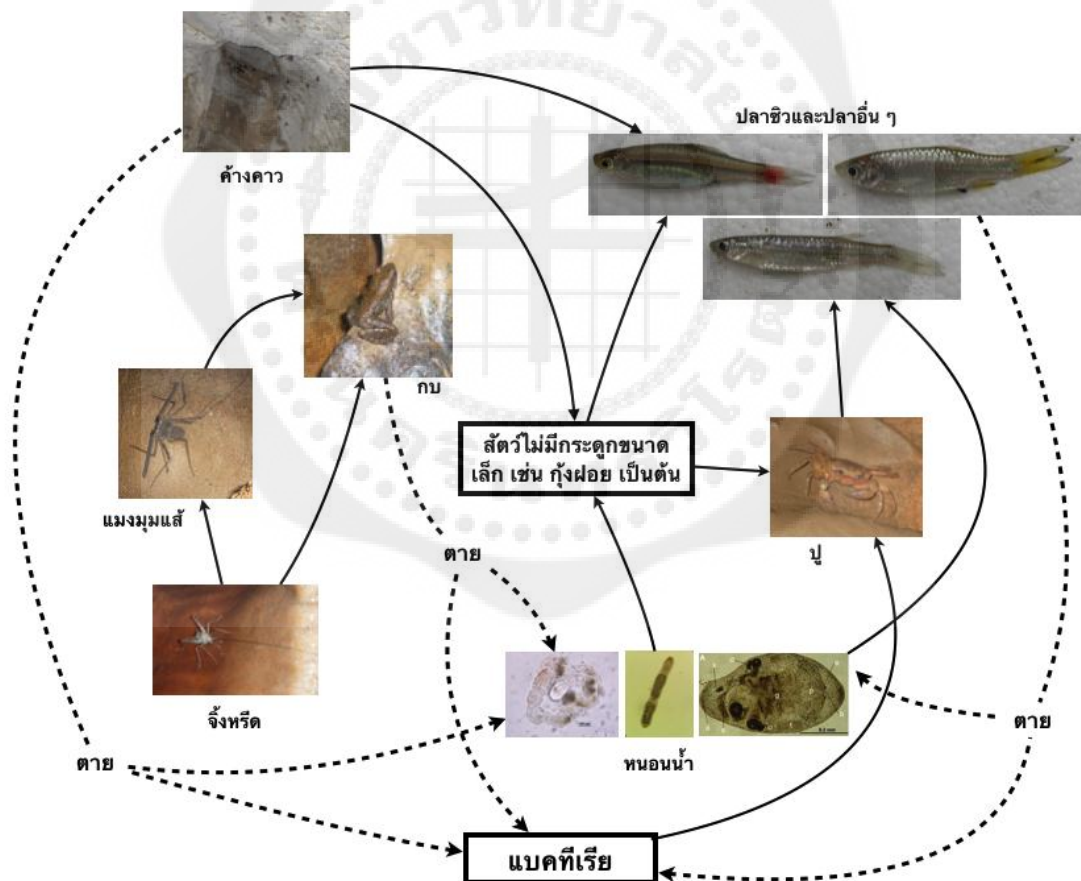
ที่มา: ปรับปรุงและดัดแปลงมาจาก Scharer; et al. (2011). Mating behavior and the evolution of sperm design. *PNAS*. 108(4): 1490-1495

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาคุณภาพน้ำ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของปลาสกุล *Rasbora*, *Esomus* นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียและหนอนตัวแบนที่พบในบริเวณถ้ำเขาคีวะ อำเภอลองหาด จังหวัดสระแก้ว โดยเริ่มจากการสำรวจสภาพแวดล้อมของถ้ำน้ำเขาคีวะเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างปลา และตัวอย่างดินโคลนภายในถ้ำน้ำเขาคีวะและบ่อน้ำหน้าถ้ำ การสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำจะทำการศึกษาโดยเข้าไปสำรวจและเก็บตัวอย่างบริเวณถ้ำ 3 ช่วงเวลา คือ การสำรวจและเก็บตัวอย่างครั้งแรกในวันที่ 14 พฤษภาคม 2557 ซึ่งสภาพอากาศอยู่ในช่วงฤดูร้อน (ตามการรายงานของกรมอุตุนิยมวิทยาจังหวัดสระแก้ว) และมีปริมาณน้ำไหลผ่านถ้ำน้อย ส่วนการสำรวจและเก็บตัวอย่างครั้งที่สองในวันที่ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2558 มีสภาพอากาศอยู่ในช่วงของปลายฤดูฝน (ตามกรมอุตุนิยมวิทยาของจังหวัดสระแก้ว) น้ำที่ไหลผ่านถ้ำจะมีปริมาณที่สูงมาก บางช่วงน้ำจะท่วมจนถึงเพดานถ้ำทำให้ไม่สามารถเข้าสำรวจถ้ำได้ แต่จะสามารถเข้าไปสำรวจได้ในช่วงปลายฤดูฝนเนื่องจากระดับน้ำได้มีปริมาณลดลงจนสามารถเข้าไปสำรวจได้ การสำรวจและเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้ายใน วันที่ 24 มกราคม 2559 ซึ่งสภาพอากาศอยู่ในช่วงฤดูหนาว (ตามกรมอุตุนิยมวิทยาของจังหวัดสระแก้ว) ปริมาณน้ำที่ไหลผ่านถ้ำเริ่มลดลงเนื่องจากกำลังจะเข้าสู่ช่วงฤดูแล้ง จากการสำรวจถ้ำเบื้องต้น พบว่าถ้ำน้ำเขาคีวะมีระยะทางตั้งแต่น้ำตกถ้ำจนถึงสุดทางถ้ำที่สามารถเดินสำรวจได้ประมาณ 300 เมตร (ยังไม่สามารถสำรวจจนสุดถ้ำได้เนื่องจากน้ำท่วมบริเวณทางที่จะเข้าไปสำรวจ) อุณหภูมิภายในถ้ำค่อนข้างคงที่ โดยวัดได้เฉลี่ยประมาณ 26.3 °C แสงสว่างสามารถส่องเข้ามาภายในถ้ำได้ประมาณ 30 เมตรจากบริเวณปากถ้ำ ภายในถ้ำไม่พบพืชน้ำที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ สิ่งมีชีวิตที่สำรวจพบภายในถ้ำ ได้แก่ ค้างคาวเล็บกุด (*Eonycteris* spp.) ซึ่งเป็นค้างคาวที่กินผลไม้หรือน้ำหวานจากเกสรดอกไม้เป็นอาหาร (Shepherd, C.R.; & Shepherd, L. A. 2012) ค้างคาวเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศถ้ำ เนื่องจากอาหารที่เข้ามาภายในถ้ำส่วนใหญ่จะถูกนำเข้ามาโดยค้างคาว (Missouri State Parks. Online) เพราะค้างคาวสามารถบินออกไปหาอาหารนอกถ้ำได้เมื่อกลับเข้ามาในถ้ำก็จะปล่อยของเสียออกมาเป็นอาหารให้กับกุ้ง หรือปลาชนิดต่าง ๆ เช่น ปลาฉิวหลังดำ (*Esomus metallicus*) ปลาฉิวหางแดง (*Rasbora borapetensis*) ปลาฉิวหนวดยาว (*R. paviana*) ปลาตะเพียน (*Barbonymus* spp.) หรือปลาช่อน (*Channa* spp.) ปลาเหล่านี้นอกจากจะได้อาหาร

จากคั้งควแล้วยังสามารถกิน กุ้งฝอย (*Caridina* spp.) ลูกปู (*Somanniathelphusa* spp.) หรือ หนอนตัวแบน (*Macrostomum* spp.) เป็นอาหารได้ ส่วนสิ่งมีชีวิตจำพวกกบ (*Ranidae* spp.) ก็จะมีกินแมงมุมเส้ (Order: Amblypygid) และจิ้งหรีดดำ (Family: Rhaphidophoridae) เป็นอาหาร เมื่อสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ตายก็จะกลายเป็นอาหารให้กับพวกสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือพวกแบคทีเรียที่อยู่ในถ้ำ จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในถ้ำเขาติวะเบื้องต้นสามารถสรุปห่วงโซ่อาหารเบื้องต้นที่เกิดขึ้นในถ้ำได้ ดังที่แสดงในภาพประกอบ 37 จากนั้นจึงได้กำหนดจุดเก็บตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างปลา และตัวอย่างดินโคลน ดังนี้ กำหนดจุดเก็บตัวอย่างภายในถ้ำ 5 จุด ระยะห่างจุดละประมาณ 50-60 เมตร และบริเวณบ่อน้ำภายนอกถ้ำ 1 จุด รวมจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 จุด โดยที่ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินโคลนจะถูกเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 จุด ส่วนตัวอย่างปลาเก็บในจุดที่ 1, 2, 3 และ 5



ภาพประกอบ 38 ห่วงโซ่อาหารในถ้ำเขาติวะ

หลังจากการสำรวจและเก็บตัวอย่าง ได้ทำการจัดประเภทของแหล่งน้ำที่ไหลผ่านถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะ ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินของกรมควบคุมมลพิษ พบว่าแหล่งน้ำนี้จัดอยู่ในประเภทที่ 1 คือ เป็นแหล่งน้ำที่คุณภาพน้ำมีสภาพตามธรรมชาติโดยปราศจากน้ำทิ้งจากกิจกรรมทุกประเภทและสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ (1.) การอุปโภคและบริโภคโดยตรงผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติก่อน (2.) การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตระดับพื้นฐาน (3.) การอนุรักษ์ระบบนิเวศน์ของแหล่งน้ำ (กองจัดการคุณภาพน้ำ. 2540: หน้า 22) (ภาคผนวก ก)

จากนั้นทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำที่ไหลผ่านถ้ำและน้ำจากบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะทั้ง 3 ช่วงเวลา โดยการวัดค่า pH ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ค่าความกระด้าง ค่าการนำไฟฟ้า ค่าการต้านไฟฟ้า ค่าของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด ค่าความเค็ม ค่าโลหะหนัก (NH_4^+ , Fe, Zn และ Cu) และแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม เปรียบเทียบกับแหล่งน้ำทั่วไป (คุณภาพน้ำจากบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์) และยังสามารถนำมาเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินของกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (ภาคผนวก ก) พบว่าค่า pH ของตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะอยู่ในช่วง pH ที่เป็นกลางและมีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างน้ำจากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ค่า pH ที่ตรวจวัดจากตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำจัดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินที่กำหนดไว้ให้มีค่า pH ที่กำหนดไว้ให้มีค่าเป็นไปตามธรรมชาติ

สำหรับค่า DO ที่ทำการตรวจวัดทุกจุดบริเวณถ้ำน้ำเขาติวะมีค่า > 6.0 ซึ่งจัดเป็นน้ำที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำดี ค่า DO ของตัวอย่างน้ำบริเวณถ้ำเขาติวะในฤดูหนาวจะมีค่าสูงกว่าค่า DO ของฤดูร้อน ฤดูฝน และสูงกว่าตัวอย่างน้ำจากบ่อของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เนื่องจากค่าการละลายของออกซิเจนจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ค่าความเค็ม (salinity) และความดันบรรยากาศ โดยที่ปริมาณของค่า DO จะสูงขึ้นหากค่าความเค็มลดลง เนื่องจากออกซิเจนจะละลายได้ดีในน้ำจืดมากกว่าน้ำเค็ม และเมื่ออุณหภูมิ 0°C ภายใต้ความดัน 1 บรรยากาศ ออกซิเจนสามารถละลายน้ำได้ 14.6 mg/L แต่เมื่ออุณหภูมิ 35°C ออกซิเจนจะสามารถละลายน้ำได้ 7 mg/L (กรมชลประทาน. 2558) จึงทำให้ฤดูหนาวมีค่า DO สูงและค่า DO จะต่ำลงในฤดูร้อน (Dowling; & Wiley. 1986: p. 1) นอกจากนี้ในฤดูหนาวสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น ปลา ที่อาศัยอยู่ในถ้ำก็อาจจะอยู่ในสภาวะจำศีล (Hibernation) ส่งผลให้กระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายลดลง จึงทำให้การใช้ออกซิเจนลดลงอีกด้วย (Hamish; et al. 2008: 1-9) ก๊าซออกซิเจนเป็นก๊าซที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เพื่อใช้ในกระบวนการหายใจทั้งสิ่งมีชีวิตที่อยู่บนบกและในน้ำ (Jack; Abdsalam; & Khalifa. 2009: 135-156) โดยส่วนใหญ่แล้วปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำเกิดจากขบวนการ

สังเคราะห์แสงของพืชน้ำ แพลนตอนพืชหรือสาหร่ายแล้วปล่อยออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำ (ศิริลักษณ์ อารีรัชกุล. 2554: หน้า 1) ซึ่งค่าออกซิเจนในแหล่งน้ำสามารถลดลงได้จากการนำไปใช้ในการหายใจหรือการออกซิไดส์ของสัตว์น้ำ พืชน้ำ หรือแบคทีเรีย เป็นต้น (Kunlasak; et al. 2013: 46-53) สำหรับถ้ำน้ำเขาคิจะเป็นสถานที่ที่จำกัดคือ ไม่มีสิ่งมีชีวิตจำพวกพืช หรือสาหร่าย และไม่มีแสงแดดส่องเข้าไปถึงจนสุดถ้ำทำให้ไม่เกิดขบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง แต่จากผลการตรวจวัดปริมาณ DO ในถ้ำและนอกถ้ำพบว่าน้ำในถ้ำและนอกถ้ำมีค่า DO ที่สูง โดยจุดที่มีค่าสูงที่สุดคือ จุดที่ 5 อาจเนื่องมาจากเส้นทางการไหลของน้ำที่ผ่านจุดที่ 5 ซึ่งมีลักษณะเป็นชั้นน้ำตก หรือชั้นหินต่าง ๆ นอกจากนี้ถ้ำน้ำยังเป็นถ้ำที่มีอากาศถ่ายเทได้สะดวกและน้ำภายในถ้ำมีการไหลเวียนอยู่ตลอดเวลา จึงทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนออกซิเจนกับบรรยากาศอยู่เสมอ และจากการที่แสงสว่างไม่สามารถส่องเข้ามาถึงภายในถ้ำทำให้อุณหภูมิภายในถ้ำต่ำตลอดเวลาจึงส่งผลให้การละลายของออกซิเจนเพิ่มขึ้น

สำหรับการตรวจวัดค่าความกระด้างทั้งหมดของน้ำในถ้ำและนอกถ้ำเขาคิพบว่า น้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำมีค่าความกระด้างค่อนข้างสูงทั้ง 3 ช่วงเวลาและมีค่าสูงกว่าตัวอย่างน้ำจากบ่อในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ ในฤดูฝนน้ำที่ไหลผ่านถ้ำพบว่าค่าความกระด้างมากกว่า 300 mg/L ทุกจุดสำรวจ เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานของกรมควบคุมมลพิษ พบว่าน้ำบริเวณถ้ำในฤดูฝนจัดอยู่ในเกณฑ์ “น้ำกระด้างมาก” ในฤดูหนาวมีบางจุดสำรวจที่มีความกระด้างสูงเกิน 300 mg/L และในฤดูร้อนน้ำจะมีความกระด้างลดลง จัดอยู่ในเกณฑ์ที่เรียกว่า “น้ำกระด้าง” (กองจัดการคุณภาพน้ำ. 2540: หน้า 1) โดยจุดที่มีค่าความกระด้างสูงคือ จุดเก็บตัวอย่างที่ 4, 5 และ 6 นอกจากนี้ยังพบอีกว่าจุดที่ 5 เป็นจุดที่มีน้ำไหลลงมาตามหินย่อยและนักท่องเที่ยวที่เข้ามาเยี่ยมชมถ้ำนิยมนำมาดื่มกินโดยไม่คำนึงถึงคุณภาพของน้ำ สาเหตุที่ทำให้น้ำในถ้ำเขาคิมีค่าความกระด้างสูง เนื่องมาจากความกระด้างของน้ำเกิดจากน้ำฝนที่ตกลงมาได้ไหลผ่านภูเขาที่ตั้งของถ้ำน้ำเขาคิซึ่งเป็นภูเขาที่มีหินปูน (CaCO_3) หรือหินโดโลไมต์ ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) เป็นส่วนประกอบ หินเหล่านี้เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำฝนที่มีฤทธิ์เป็นกรดที่สามารถกัดกร่อนหินทำให้แร่ธาตุ (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ที่อยู่ในหินละลายมากับน้ำ ส่งผลทำให้ปริมาณของแร่ธาตุในน้ำเพิ่มมากขึ้น น้ำที่ไหลผ่านถ้ำจึงมีความกระด้างมากขึ้นด้วย (Pentamwa; Thiphawa; & Nuangon. 2011: 479-483)

สำหรับค่าการนำไฟฟ้าของตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาคิทั้ง 3 จุด พบว่าตัวอย่างน้ำในถ้ำทุกจุดจะมีค่าการนำไฟฟ้าสูงกว่าตัวอย่างน้ำจากบ่อของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ ทุกจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง สาเหตุอาจเนื่องมาจากน้ำในถ้ำและนอกถ้ำเขาคิเป็นน้ำบาดาลที่ไหลผ่านชั้นหินต่าง ๆ ทำให้เกิดชะล้างเอาสารประกอบอนินทรีย์หรือแร่ธาตุต่าง ๆ

จำนวนมากไหลมากับน้ำ ส่งผลให้ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำสูงขึ้น ค่าการนำไฟฟ้าที่ตรวจวัดจากตัวอย่างน้ำทั้งหมด มีค่าอยู่ระหว่าง 150-300 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ซึ่งอยู่ในช่วงค่าการนำไฟฟ้าปกติของแหล่งน้ำจืด (กรมควบคุมมลพิษ. 2547: หน้า 45) ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำจะมีความสัมพันธ์กับค่าการต้านทานไฟฟ้าเสมอ กล่าวคือจะมีความแปรผกผันกัน (IC Controls. 2012: Online) ดังเช่นผลของการตรวจวัดน้ำบริเวณถ้ำเขาติ้วซึ่งตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าได้ค่าที่สูงแต่ตรวจวัดค่าการต้านไฟฟ้าได้ต่ำ เนื่องจากตัวอย่างน้ำในถ้ำมีปริมาณของแร่ธาตุและสารประกอบอนินทรีย์จำนวนมาก ทำให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านได้ดี จึงส่งผลให้มีค่าการต้านทานไฟฟ้าที่ต่ำ นอกจากนี้ค่าการนำไฟฟ้ายังมีความสัมพันธ์กับค่าของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด เนื่องจากสภาพการนำไฟฟ้าของน้ำขึ้นอยู่กับความเข้มข้นทั้งหมดของสารที่มีประจุที่ละลายอยู่ในน้ำ ชนิดของสารที่มีประจุ จำนวนของประจุ หรือความเข้มข้นของของสารที่มีประจุแต่ละชนิด เป็นต้น ดังนั้น สภาพการนำไฟฟ้าของน้ำจึงมีความสัมพันธ์กับปริมาณของแข็งที่ละลายอยู่ในน้ำทั้งหมด ดังสมการนี้ (ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข. 2555)

$$K = \text{TDS}/\text{COND}$$

หรือ

$$\text{TDS} = K(\text{COND})$$

เมื่อ

K = ค่าคงที่ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง COND และ TDS

COND = สภาพการนำไฟฟ้า มีหน่วยเป็น $\mu\text{s}/\text{cm}$

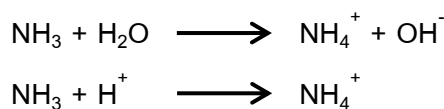
TDS = ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total dissolved solid) มีหน่วยเป็น mg/L

ดังนั้นหากค่าการนำไฟฟ้าสูงก็จะส่งผลให้ค่าของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดก็จะสูงตามไปด้วย จากตัวอย่างน้ำบริเวณถ้ำเขาติ้ว ในฤดูฝนจะมีของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดสูงกว่าฤดูร้อน ซึ่งอาจเนื่องมาจากฤดูฝนมีการชะล้างสิ่งต่าง ๆ ที่อยู่บนผิวดิน ชั้นหินหรือชั้นดินต่าง ๆ เช่น เกลืออนินทรีย์ สารอินทรีย์ หรือโลหะต่าง ๆ เป็นต้น ไหลมารวมกันในแหล่งน้ำทำให้มีแร่ธาตุ โลหะ หรือของแข็งต่าง ๆ ละลายอยู่ในน้ำส่งผลตัวอย่างน้ำในฤดูฝนมีค่าของแข็งที่ละลายน้ำสูงกว่าฤดูอื่น ๆ น้ำที่มีค่าของแข็งที่ละลายอยู่ในน้ำทั้งหมดสูงบางครั้งอาจส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ ซึ่งของแข็งที่ละลายอยู่ในน้ำอาจเป็นแร่ธาตุ เกลือ สารเคมีกลุ่มโลหะหนัก หรือกลุ่มของสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน (Persistent organic pollutant: POPs) ที่อาจส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น ความเข้มข้นของไอออนบางชนิดที่สูงมากอาจส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตบางชนิด ส่งผลต่อกระบวนการหายใจทำให้การเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ บางครั้งอาจส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันหรือระบบสืบพันธุ์ โดยการยับยั้งการฟักไข่ การเจริญเติบโตของตัวอ่อนหยุดชะงักหรือลดลง หรืออาจส่งผลต่อประสิทธิภาพ

การทำงานของอสุจิของปลา (Phyllis; Scannell; & Lawrence. 2007: 1-6) ซึ่งทำให้ความหลากหลายของสัตว์น้ำน้อยลง (Derry; Prepas; & Hebert. 2003: 199-215)

การตรวจวัดค่าความเค็มของตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาติวะกับตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ พบว่า มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งค่าที่ตรวจวัดได้ทั้งหมดเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเกณฑ์ที่ใช้จำแนกประเภทน้ำตามระดับความเค็ม จัดตัวอย่างน้ำที่มีความเค็มอยู่ระหว่าง 0-0.5 ppt. เรียกว่าเป็น น้ำจืด (Fresh Water) (กรมชลประทาน. 2555: หน้า 14) ความเค็มของน้ำจืดเกิดจากเกลือสินเธาว์ (Rock salt) โดยที่น้ำใต้ดินหรือน้ำบาดาลละลายและชะล้างเอาโซเดียม (Na^+) และคลอไรด์ (Cl^-) ออกจากหินแล้วไหลมารวมกับแหล่งน้ำ (Nielsen; et al. 2003: 655-665) ทำให้แหล่งน้ำจืดมีค่าความเค็มเพิ่มขึ้น

การตรวจวัดค่าแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างน้ำในบ่อน้ำของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ ปริมาณของแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ในถ้ำน้ำเขาติวะเกิดจากสิ่งมีชีวิตที่เข้าไปอาศัยในถ้ำ เช่น ค้างคาว ปลา ตัวเงินตัวทอง หรือมนุษย์ เป็นต้น แล้วปล่อยแอมโมเนียมออกมากับของเสียปะปนในแหล่งน้ำ สำหรับฤดูฝนจะตรวจไม่พบแอมโมเนียมในจุดเก็บตัวอย่างที่ 5 และ 6 อาจเนื่องมาจากน้ำที่ไหลผ่านถ้ำได้ท่วมจุดเก็บตัวอย่างที่ 3 ทำให้สิ่งมีชีวิตจำพวกค้างคาวหรือมนุษย์ไม่สามารถเข้ามาถึงจุดที่ 5 และจุดที่ 6 ได้ หรือที่ไหลออกจากจุดสุดท้ายที่ 6 ก็อาจจะชะล้างแอมโมเนียมออกมาจนหมด ทำให้ตรวจไม่พบแอมโมเนียมในบริเวณนี้ นอกจากนี้ยังพบว่า แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ไม่มีความเป็นพิษต่อปลา เนื่องจากมีการเปลี่ยนรูปของแอมโมเนียอิสระ (NH_3) ให้เป็นแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) โดยที่แอมโมเนียอิสระจะมีปริมาณลดลงถ้าแหล่งน้ำนั้นมีปริมาณเกลือแร่มาก ดังสมการ (จรียา ยัมรัต นบวร; และ สุรินทร์ บุญอนันตสนสาร. 2556: หน้า 20)



ผลการตรวจวัดโลหะหนัก เหล็ก(Fe), สังกะสี(Zn) และทองแดง(Cu) พบว่าตัวอย่างน้ำในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำในฤดูฝนตรวจวัดค่าเฉลี่ยของเหล็กและสังกะสีได้ใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของตัวอย่างน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ ยกเว้นการตรวจพบค่าทองแดงจากบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์ ที่มีค่าสูงกว่าตัวอย่างน้ำจากบริเวณถ้ำน้ำเขาติวะ อาจเนื่องมาจากบริเวณบ่อน้ำมีทองแดงอยู่มากกว่าโลหะหนักชนิดอื่น เพราะแร่ธาตุบางชนิดเป็น

องค์ประกอบของหินหรือชั้นดินต่าง ๆ และสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น เหล็ก สังกะสี ทองแดง นิเกิล แมงกานีส แคลเซียม เป็นต้น (วิมลนันท์ กันเกตุ. 2549) ซึ่งปริมาณของการปนเปื้อนของโลหะหนักจำพวกเหล็ก (Fe), สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) ในธรรมชาติมักขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Lee; & Saunders. 2003: 177-185) โดยค่า pH ต่ำจะส่งผลให้โลหะหนักมีการละลายจากแหล่งธรรมชาติลงสู่แหล่งน้ำมากขึ้น (Church; Guerard; & Finger. n.d.: 501-533) นอกจากนี้ค่าความกระด้างยังส่งผลต่อการละลายของโลหะหนักอีกด้วย (Rathore; & Khangarot. 2003: 341-356) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาค่าความกระด้างของน้ำบริเวณถ้ำเขาคิระที่มีค่าความกระด้างสูงมากแต่พบค่าโลหะหนักต่ำ อย่างไรก็ตามค่าโลหะหนักที่ตรวจพบทุกช่วงฤดูในบริเวณถ้ำเขาคิระมีค่าเป็นไปตามธรรมชาติของมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน และมีค่าไม่เกินมาตรฐานคุณภาพน้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (กองจัดการคุณภาพน้ำ. 2540: หน้า 1) แร่ธาตุเหล็ก (Fe), สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) จัดอยู่ในกลุ่มของโลหะหนักที่ไม่เป็นพิษสามารถพบได้ปริมาณเล็กน้อยในสิ่งมีชีวิตและเป็นโลหะหนักที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต เช่น ช่วยในการทำงานของเอนไซม์บางชนิดทำงานได้เต็มที่ เป็นต้น แต่ถ้ำร่างกายได้รับโลหะกลุ่มนี้มากเกินไปความจำเป็นก็อาจก่อให้เกิดพิษได้ จึงได้เรียกโลหะกลุ่มนี้ว่า Essential elements (สำนักวิจัยและพัฒนา. 2550: หน้า 98)

สำหรับการตรวจพบวัดแบคทีเรียโคลิฟอร์มในแหล่งน้ำเพื่อประเมินคุณภาพความสะอาดของน้ำ เนื่องจากแบคทีเรียโคลิฟอร์มนิยมใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำและอาหาร โดยเฉพาะในแหล่งน้ำหากมีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มแสดงให้เห็นว่าน้ำนั้นมีการปนเปื้อนอุจจาระ และมีแนวโน้มที่จะปนเปื้อนแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหาร เช่น *Salmonella* และ *Shigella* เป็นต้น ดังนั้นจึงใช้เชื้อโคลิฟอร์มประเมินคุณภาพความสะอาดของน้ำ ผลการตรวจวัดน้ำตัวอย่างภายในถ้ำและบ่อน้ำหน้าถ้ำพบว่าตัวอย่างน้ำมีการตรวจพบเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ที่พบในจุดเก็บตัวอย่างที่ 2 มากที่สุด เนื่องจากจุดเก็บตัวอย่างที่ 2 เป็นบริเวณปากถ้ำที่ยังคงมีแสงสว่างส่องถึงและมีสิ่งมีชีวิตเข้าไปอาศัยมากกว่าทุกจุดในถ้ำ สิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะปล่อยของเสียออกมาทำให้มีการปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์ม จุดที่ตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์มมากที่สุดคือ จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 ซึ่งเป็นบ่อน้ำหน้าถ้ำทำหน้าที่รองรับน้ำที่ไหลออกมาจากถ้ำ ดังนั้นจึงทำให้เชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำไหลมารวมกันอยู่ภายในบ่อน้ำแห่งนี้ อีกทั้งสภาพแวดล้อมภายนอกถ้ำที่มีทั้งแสงแดดและพืชน้ำเจริญเติบโตอยู่ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (อุณหภูมิจึง อาหาร อากาศ ความชื้น ค่า pH) ของเชื้อโคลิฟอร์มมากกว่าในถ้ำ (ดารณี แก้วจุมพล. 2551) ส่งผลให้พบเชื้อโคลิฟอร์มมากกว่าทุกจุดที่ทำการตรวจวัด และจุดที่พบเชื้อโคลิ-

ฟอร์มน้อยที่สุดคือ จุดเก็บตัวอย่างที่ 6 และ 5 ตามลำดับ เนื่องมาจากเป็นบริเวณที่พบสิ่งมีชีวิตน้อยกว่าบริเวณอื่นและเชื้อโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำยังถูกน้ำพัดออกมา จึงทำให้พบเชื้อบริเวณนี้น้อยกว่าจุดอื่น ๆ ถ้าน้ำเขาติจะเป็นถ้ำที่มีน้ำไหลผ่าน โดยที่น้ำจะพัดเอาสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำออกมาจากถ้ำ แต่จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 พบว่ามีการตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์มในแหล่งน้ำมากกว่าจุดที่ 3 และยังมีการตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์มมากกว่าจุด 5 และ 6 ถึงสองเท่า เนื่องจากบริเวณจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 มีโซนที่เป็นดินโคลนอยู่เป็นบริเวณกว้างและแบคทีเรียโคลิฟอร์มสามารถอาศัยอยู่ได้ในดิน (ภัทรนัน บุญยังแก้ว, 2558) ทำให้น้ำที่ไหลผ่านจุดที่ 4 มีการชะแบคทีเรียที่อยู่ในดินโคลน ส่งผลให้พบแบคทีเรียโคลิฟอร์มบริเวณจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 มากกว่าจุดเก็บตัวอย่างที่ 3 ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำในถ้ำและบ่อน้ำถ้ำไม่เหมาะสมสำหรับการอุปโภคบริโภค เนื่องจากมีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มในแหล่งน้ำ ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนอุจจาระของคนหรือสัตว์เลื้อยคุดด้วย เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียโคลิฟอร์มในครั้งนี้ทำการศึกษาโดยใช้เพลทอาหารสำเร็จรูปสำหรับนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ซึ่งเป็นชุดทดสอบเบื้องต้นที่ง่าย และสะดวกต่อการใช้งาน แต่อาจแสดงผลที่ไม่แน่นอน ดังนั้นในอนาคตควรทำการศึกษาแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำที่ไหลผ่านถ้ำเขาติวะโดยใช้วิธีมาตรฐาน เช่น วิธี Most Probable number (MPN) เป็นต้น ควบคู่ไปด้วย

การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* ที่พบภายในถ้ำ โดยการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA และ ยีน COI พบว่า จากการวิเคราะห์เบื้องต้นของปลาทั้ง 2 สกุลที่พบในถ้ำมีรูปร่างหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะคล้ายกับปลาชนิดเดียวกันที่ดำรงชีวิตอยู่ภายนอกถ้ำ แต่เมื่อวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอโดยใช้ยีน 16S rDNA และ ยีน COI เปรียบเทียบระหว่างปลาทั้ง 2 สกุลที่พบในถ้ำกับปลาที่อยู่ภายนอกถ้ำ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ปลาชนิดเดียวกันที่จับได้จากบริเวณทุ่งนาข้างโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ (จุดที่ 3 ของการเก็บตัวอย่างน้ำ) และไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อบริเวณบางส่วนของยีน 16S rDNA และยีน COI ของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* จากฐานข้อมูลของ GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยยีน 16S rDNA จะมีขนาดของ PCR Product เท่ากับ 350 bp และยีน COI มีขนาดของ PCR Product เท่ากับ 560 bp เนื่องจากยีน 16S rDNA และ COI บนไมโทคอนเดรียของปลาสกุล *Rasbora* และ *Esomus* มีลำดับเบสทั้งหมดประมาณ 450-600 bp และ 600-650 bp ตามลำดับ (www.ncbi.nlm.nih.gov) จากนั้นทำการคัดเลือกบริเวณที่เป็น Conservation และบริเวณที่มีเบส C และ G มากกว่าช่วงอื่น ๆ ทำให้ขนาด

ของ PCR Product ที่ได้มีขนาดสั้นลง ผลของการศึกษาพบว่า ปลาทั้ง 2 สกุลที่พบในถ้ำมีลำดับดีเอ็นเอแตกต่างกับปลาชนิดเดียวกันที่ใช้เป็นตัวอ้างอิง โดยที่แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสยีน COI สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของปลาในถ้ำและปลาชนิดเดียวกันที่จับได้จากบริเวณทุ่งนา ข้างโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ (จุดที่ 3 ของการเก็บตัวอย่างน้ำ) ได้ชัดเจนมากกว่าแผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสยีน 16S rDNA สอดคล้องกับงานวิจัยของนิโคลัสและคนอื่น ๆ (Nicolas; et al. 2012: 1-11) ได้รายงานว่ายีน COI มีประสิทธิภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิตหรือค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการและความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่ายีน 16S และสอดคล้องกับงานวิจัยของดุจฤดี ปานพรหมมินทร์; บุษบง ศรีอ่อนคง; และ นนทรี ปานพรหมมินทร์ (2556) ที่ได้รายงานไว้ว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (COI) สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดของปลาในสกุล Rasborinae ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยสามารถแยกปลาชนิดต่างชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ปลาที่พบในถ้ำเขาควีจะมีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากปลาชนิดเดียวกันที่จับได้จากบริเวณทุ่งนา ข้างโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ (จุดที่ 3 ของการเก็บตัวอย่างน้ำ) ซึ่งอาศัยอยู่ภายนอกถ้ำนั้น อาจเป็นผลมาจากสิ่งแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ส่งผลให้ปลาปรับเปลี่ยนสภาพดีเอ็นเอ รูปร่าง หรือลักษณะต่าง ๆ ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่มีแสงสว่าง มีความอุดมสมบูรณ์ของอาหารน้อย และยังมีค่าความกระด้างสูงมาก (Anjos,J.; et al. 2013: 1-66) เพื่อที่จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ในถ้ำที่ไม่มีแสงสว่างและมีปริมาณอาหารที่จำกัดได้ ซึ่งได้มีการรายงานว่าปลาที่เข้ามาอาศัยอยู่ในถ้ำจะมีวิวัฒนาการด้านต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการอยู่รอด (Jeffery. 2001: 1-12) เช่น มีดวงตาที่เล็กลง เนื่องจากไม่ได้ใช้งาน มีสีขาวยืด มีครีบหรือหนวดที่ยาว เป็นต้น (Mahjoorazad; & Coad. 2009: 30-33)

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากดินตะกอนภายในถ้ำเขาควีโดยใช้ยีน 16S rDNA บริเวณ V6-region พบว่าตัวอย่างดินที่เก็บมาสามารถสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นก้อนกรวด โดยมีเพียงจุดที่ 4 ที่มีลักษณะเป็นดินโคลน เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอและส่งไปวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรีย พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้เพียง 3 จุดคือ จุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 3 และ 4 ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 และ 3 พบแบคทีเรียไฟลัม Acidobacteria มีความชุกชุมสัมพันธ์มากที่สุด เนื่องจากมีการรายงานว่าแบคทีเรียไฟลัม Acidobacteria เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในทุกสภาพแวดล้อมและยังพบอยู่ในดินมากที่สุดในโลก (Navarrett; et al. 2015: 1-10) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในไฟลัม Acidobacteria มีบทบาทสำคัญที่ก่อให้เกิดวัฏจักรต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อม เช่น ทำหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในดินกลายเป็นวัฏจักร

ต่าง ๆ หมุนเวียนอยู่ในดิน ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (Catao; et al. 2014: 1-12) ส่วนจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 พบแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria มีความชุกชุมสัมพัทธ์มากที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria เป็นแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในดินทุกสภาพแวดล้อม (Spain; Krumholz; & Elshahed. 2009: 992-1000) เช่น ดินตะกอนในถ้ำ ดินตะกอนในป่าชายเลน เป็นต้น (Sanka; et al. 2016: 68-74) นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (nitrogen-fixation) (Ghen; et al. 2003: 7266-7272) และยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีแสงและได้รับพลังงานจากสารอินทรีย์ (Chemoautotrophic Bacteria) (Ghosh; & Dam. 2009: 999-1043) เนื่องจากถ้าเขาติวะเป็นถ้ำที่ไม่มีแสงสว่างและมีค้ำคาวเข้าไปอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก มูลค้ำคาวในถ้ำจึงเป็นแหล่งอาหารให้กับสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ภายในถ้ำรวมทั้งแบคทีเรียอีกด้วย (Mandal; et al. 2015: 99-101) ค้ำคาวเหล่านี้จะปล่อยของเสียที่มีเป็นสารแอมโมเนียออกมา (จรัพร ศรีอักษร. 2558) ทำให้พบแบคทีเรียหลายไฟลัมที่มีความสามารถที่จะตรึงไนโตรเจน (nitrogen-fixation) ได้ เช่น Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Chlorobi, Firmicutes และ Nitrospirae (Desai; Assig; & Dattagupta. 2013: 2411-2423), (Kadnikov; et al. 2013: 1-11) นอกจากนี้ภายในถ้ำเขาติวะยังพบแบคทีเรียที่ไฟลัม Chloroflexi ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถสร้างอาหารได้จากการออกซิไดซ์ไนโตรเจน (chemolithoautotrophic nitrite oxidizer) (Sorokin; et al. 2012: 2245-2256) แบคทีเรียไฟลัม NC10 ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์มีเทนในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobically oxidize methane (AOM)) (He; et al. 2016: 5099-5108) แบคทีเรียไฟลัม WS3 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบครั้งแรกในตะกอนของระบบการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anoxic sediments) และมีลักษณะของ monophyletic อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียไฟลัม Fibrobacteres–Chlorobi-Bacteroidetes (FCB) (Youssef; et al. 2015: 1-21) แบคทีเรียไฟลัม Spirochaetes ซึ่งบางสปีชีส์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคฉี่หนู (Leptospirosis) ในคนและสัตว์ (Marinho; & Cardoso. 2014: 1-2) แบคทีเรียที่พบจากดินตะกอนในถ้ำเขาติวะส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในดินทั่วไป เนื่องจากผลของการศึกษาในครั้งนี้ได้สอดคล้องกับผลของงานวิจัยหลายชิ้น เช่น งานวิจัยของอาโรโจและคนอื่น ๆ (Araujo; et al. 2012: 760-770), งานวิจัยของเจนบิวและคนอื่น ๆ (Jeanbille; et al. 2016: 482-493), งานวิจัยของเซงและคนอื่น ๆ (Zhang; et al. 2015: 739-746), การศึกษาของเชนและคนอื่น ๆ (Shen; et al. 2016: 1552-1560) และงานวิจัยของบาเทียและคนอื่น ๆ (Bhatia; et al. 2015: 195-200)

การศึกษาหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบในถ้ำจากตัวอย่างดินโคลนในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2 และ 6 ของถ้ำน้ำเขาศิวะ เริ่มจากการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการจำแนกชนิดจากลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ (Scharer; et al. 2011: 1490-1495) พบว่าหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบในถ้ำมีอวัยวะสืบพันธุ์ใกล้เคียงกับหนอนตัวแบน *Macrostomum puslilum* และ *Macrostomum hystricinum marinum* คือมีลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่เรียกว่า hypodemic แบบไม่ดูด และมีอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียแบบผนังบาง แต่เมื่อวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (ยีน 18S rDNA) พบว่าลำดับเบสดีเอ็นเอของหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบในถ้ำจัดอยู่ใกล้เคียงกับกลุ่มหนอนตัวแบน *Macrostomum longtuba* และ *Macrostomum quiritum* ที่มีลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้แบบ reciprocal แบบดูด และมีอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียแบบผนังหนา ซึ่งจากจำแนกหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบในถ้ำจากลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์และลำดับเบสดีเอ็นเอของหนอนตัวแบนสกุล พบว่ามีผลไม่สอดคล้องกัน และนอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการค้นพบในลักษณะนี้มาก่อน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* ที่พบบริเวณจุดสุดท้ายของถ้ำน้ำเขาศิวะเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีการค้นพบ จึงต้องทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้านต่าง ๆ ของหนอนตัวแบนต่อไป

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นทำให้สรุปได้ว่าน้ำในถ้ำน้ำเขาศิวะและบ่อน้ำหน้าถ้ำเขาศิวะไม่เหมาะสมที่จะนำมาบริโภค เพราะน้ำที่ไหลผ่านถ้ำมีความกระด้างสูงมากโดยมีการรายงานก่อนหน้านี้ไว้ว่าการดื่มน้ำกระด้างจะส่งผลให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ (Emmanuel; Simon; & Joseph. 2013: 35-43) นอกจากนี้ยังได้ตรวจพบกลุ่มของแบคทีเรียโคลิฟอร์มและแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ที่มีความสามารถในการก่อโรคจากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินโคลนในถ้ำเขาศิวะ เช่น แบคทีเรียที่ก่อโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร (*Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonadaceae*) หรือไฟลัมของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคฉี่หนู (*Leptospirales*) เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จัดได้ว่าเป็นตัวชี้วัดว่าคุณภาพของน้ำที่ไหลผ่านถ้ำเขาศิวะมีการปนเปื้อนเชื้อก่อโรค และสภาพแวดล้อมในถ้ำยังส่งผลให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่เข้าไปอาศัยอยู่ในถ้ำ ซึ่งการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมส่งผลให้สิ่งมีชีวิตที่พบในถ้ำที่มีความแตกต่างจากบรรพบุรุษที่อาศัยอยู่นอกถ้ำ เช่น การพบจิ้งหรีดที่มีสีขา ผลการศึกษาเกี่ยวกับปลาชิวในถ้ำที่มีลำดับดีเอ็นเอแตกต่างจากปลาที่อาศัยอยู่นอกถ้ำ หรือผลจากการศึกษาเกี่ยวกับหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* เป็นต้น ข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์และเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับผู้ดูแลและผู้รับผิดชอบถ้ำเขาศิวะ เพื่อให้คำแนะนำแก่นักท่องเที่ยวไม่ให้ดื่มน้ำจากถ้ำโดยตรงเนื่องจากส่งผลต่อสุขภาพได้ และทำให้ทราบว่าถ้ำน้ำเขาศิวะ

คิดจะยังคงเป็นสถานที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพและมีสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ได้มีการศึกษาซึ่งเหมาะสำหรับนักชีววิทยาเข้าไปศึกษาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตหรือสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในถ้ำ



บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- กรมควบคุมมลพิษ. (2547). คู่มือการตรวจสอบคุณภาพสิ่งแวดล้อมอย่างง่าย. กรุงเทพฯ: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- (2559). มาตรฐานคุณภาพน้ำบาดาลที่ใช้บริโภค. สืบค้นเมื่อ 29 เมษายน 2559, จาก http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water01.html#s3
- กรมชลประทาน. (2555). รายงานผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำ พระตำหนัก สวนปทุม จังหวัดปทุมธานี ประจำปี 2553-2554. กรุงเทพฯ: กลุ่มงานตะกอนและคุณภาพน้ำ ส่วนอุทกวิทยา สำนักบริหารจัดการน้ำ และอุทกวิทยา กรมชลประทาน กระทรวงฯ.
- (2558). รายงานคุณภาพน้ำชลประทาน ตามมาตรา 8 ประจำปีงบประมาณ 2558. โครงการส่งน้ำและบำรุงรักษาแม่วัง. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมทรัพยากรธรณี. (2554). การจำแนกเขตเพื่อการจัดการด้านธรณีวิทยาและทรัพยากรธรณี จังหวัดสระแก้ว. กรุงเทพฯ: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- กรมทรัพยากรน้ำบาดาล. (2555). โครงการศึกษาเพิ่มประสิทธิภาพของระบบปรับปรุงคุณภาพน้ำบาดาล. กรุงเทพฯ: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- กรมประมง. (2546, 12 พฤศจิกายน). ประกาศกรมประมง เรื่อง การรับแจ้งการครอบครองสัตว์ป่าคุ้มครอง ตามมาตรา 61 แห่งพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535.
- กองจัดการคุณภาพน้ำ. (2540). เกณฑ์ระดับคุณภาพน้ำและมาตรฐานคุณภาพน้ำประเทศไทย. กรุงเทพฯ: กองจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงฯ.
- กลุ่มส่งเสริมและพัฒนาเกษตรกร. (2554). รายงานข้อมูลวิสาหกิจชุมชนจังหวัดสระแก้ว. สระแก้ว: สำนักงานเกษตรฯ.
- กำธน สินธวานนท์. (2006). เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. ใน สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่ม 28. กรุงเทพฯ: โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว
- คมสันต์ วรรณไสย. (ม.ป.ป). พยาธิวิทยาของโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อย. (เอกสารประกอบคำสอน). เชียงใหม่: ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

- จรียา ยัมรัตน์บวร; และ สุรินทร์ บุญอนันตสนสาร. (2556). ศักยภาพการหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ของระบบพื้นที่ชุ่มน้ำประดิษฐ์สำหรับการเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสม. (รายงานวิจัย).
- นครราชสีมา: สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. ถ่ายเอกสาร.
- จิรารัช กิตนะ. (2555). ออร์แกนัลที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปพลังงาน. (คู่มือประกอบการสอนวิชาชีววิทยา). กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน และ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- จุฑาพร แสงประจักษ์. (2555). การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. ใน *แก่นเกษตรปีที่ 40*. หน้า. 299-308.
- จรีพร ศรีอักษร. (2558). การประเมินความหลากหลายของแบคทีเรียย่อยสลายแอมโมเนียบริเวณเขาวังเขมรและการโคลนและการแสดงออกของยีนไฮดรอกซีลามีนออกซิโดรีดักเทส. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมศาสตร์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.
- เฉลิม ชัยบุญเรือง. (2553). การบริหารจัดการคุณภาพน้ำบาดาล กรณีศึกษา อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม. วิทยานิพนธ์ วศ.ม. (การจัดการทางวิศวกรรม). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ชวลิต วิทยานนท์. (2447). *คู่มือปลาน้ำจืด*. กรุงเทพฯ: สารคดี.
- ชวลิต วิทยานนท์; จรัสชาติ; และ จารุจินต์ นภิตะภักดิ์. (2012). ความหลากหลายชนิดของปลาน้ำจืดในประเทศไทย. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์ชายฝั่ง สงขลา. สืบค้นเมื่อ 17 ธันวาคม 2558, จาก http://www.nicaonline.com/index.php?option=com_content&id=452:2012-02-21-06-54-35&Itemid=122
- ชุกลิน อุ่นวิจิตร. (2556). การวิจัยขีดความสามารถในการรองรับการท่องเที่ยวโดยชุมชนบ้านถ้ำปลาจังหวัดเชียงรายระยะที่ 1. ใน *วารสารวิจัยเพื่อการพัฒนาเชิงพื้นที่*. 6(2): หน้า 62-72. กรุงเทพฯ: สกว.
- ณัฐกร เพชรชา; ดวงกมล แม้นศิริ; และ สุรพล แสนสุข. (2011). การประเมินดีเอ็นเอในพลาสติกบริเวณ *rpoC1* และ *rpoB* ในการใช้เป็น DNA barcode และกรณีศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae). ใน *The 12th National Graduate Research Conference at Khon Kaen*. 554-563.

- दारुณี แก้วจุมพล. (2551). *ปัจจัยที่มีผลต่อการปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียของอาหารกุ้งที่จำหน่ายในตลาดประเภทที่ 1: กรณีศึกษาพื้นที่จังหวัดหนองคาย*. (รายงานวิจัย).
 ขอนแก่น : กลุ่มพัฒนาการส่งเสริมสุขภาพและพัฒนาอนามัยสิ่งแวดล้อม กระทรวงสาธารณสุข. (ถ่ายเอกสาร).
- ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. (2013). ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลาและการประยุกต์ใช้. ใน *วารสารนเรศวรพะเยา*. 6(3): 174-184.
- ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์; บุษบง ศรีอ่อนคง; และ นนทรี ปานพรหมมินทร์. (2556). การจำแนกชนิดปลาฉวีวงศ์ย่อย Rasborinae 12 ชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด. ใน *แก่นเกษตรปีที่ 41 ฉบับพิเศษ 1*. หน้า 459-465.
- ทินพันธุ์ เนตรแพร. (2558). *ชลชีววิทยา*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธวัช ดอนสกุล; อัจฉริยา รังษิรุจิ; และ วิเชียร มากตุน. (2552). คาร์โบไฮเดรตของปลาฉวีวงศ์ ฉวีหลังจุด ฉวีหลังแดง ฉวีเพชรน้อยและปลาฉวีหนุที่พบในประเทศไทย. ใน *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาประมง*. หน้า 320-327.
 กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธวิลักษณ์ บุนนาค. (2010). *สวนในตู้ปลา Aquatic Garden*. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.
- ธัญญา จันอาจ. (2546). *คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย*. กรุงเทพฯ: เกรียงไกร สุวรรณภักดี.
- ธีรภรณ์ เมฆอรุณ. (2555). *คุณภาพทางเคมีของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาสัตว์ในประเทศไทย*. ปริญญาโท นพนธ์ วท.ม. (ระบอดวิทยาทางสัตวแพทย์) สาขาระบอดวิทยาทางสัตวแพทย์. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2544). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. พิมพ์ครั้งที่ 3.
 กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บพิธ จารุพันธุ์. (2546). *โพรโทซัววิทยา*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บพิธ จารุพันธุ์; และ นันทพร จารุพันธุ์. (2549). *โพรโทซัวในแหล่งน้ำจืด*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปลาฉวีคืน...เคลื่อนธารา*. (2555). สืบค้นเมื่อ 18 ธันวาคม 2558, จาก http://bangkrod.blogspot.com/2012/02/blog-post_1219.html
- ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข. (2555). *การวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: กรมโรงงานอุตสาหกรรม.

- ภรณ์ อุทโยภาศ. (2555). การจำแนกหนอนแดงโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล. ใน วารสาร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปีที่ 20. หน้า 269-278. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- ภัทรนัน บุญยังแก้ว. (2558). คุณภาพทางจุลชีววิทยาของฟองน้ำล้างจานจากโรงอาหารภายใน มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก. วิทยานิพนธ์ วท.บ. (ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม). พิษณุโลก : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร. ถ่ายเอกสาร.
- มณฑล เลิศวรปรีชา. (2554). Pyrosequencing: วิธีการใหม่สำหรับการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์และการประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางชีววิทยา. ใน วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 4(1): 111-118.
- วรกมล แนนอุดร. (2553). ความแปรผันของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอตำแหน่ง 8271-8873 ในการถ่ายทอดพันธุกรรมฝ่ายแม่. ปรินูฎานิพนธ์ วท.ม. (นิติวิทยาศาสตร์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร. ถ่ายเอกสาร.
- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี "จังหวัดสระแก้ว". (2016). สืบค้นเมื่อ 17 ธันวาคม 2558, From <https://th.wikipedia.org/wiki/จังหวัดสระแก้ว>
- วิมลนันท์ กันเกตุ. (2549). สมบัติของอนุภาคขนาดดินเหนียวของดินในอันดับแอลฟีซอลส์และอัททิซอลส์ในประเทศไทย. ปรินูฎาจุษฎิบัณฑิต (ปฐพีวิทยา) สาขาเอกปฐพีวิทยา. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- วิมลมาศ สดาร์ตัน. (ม.ป.ป.) ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ. (เอกสารประกอบคำบรรยาย) โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการหลักสูตร การจัดการดิน น้ำ วัชพืชและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ: กลุ่มงานเคมี ส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ สำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน. ถ่ายเอกสาร.
- วีรยุทธ์ เลาะห์จินดา. (2552). วิทยาศาสตร์เลี้ยงโคลานและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศรีสุวรรณ เกษมสวัสดิ์; ศิวพันธ์ ชูอินทร์; และวรชาดา บัวไพร. (2555). คุณภาพน้ำเพื่อการอุปโภคบริโภคอย่างยั่งยืนในเขตพื้นที่อำเภอบางคนที่ จังหวัดสมุทรสงคราม. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.
- ศิริเพ็ญ สุภัทราวิวัฒน์. (2007). สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

- ศิริลักษณ์ อารีรัชชกุล. (2554). การสร้างแบบจำลองโครงข่ายใยประสาทประดิษฐ์เพื่อทำนายค่าออกซิเจนในน้ำผิวดิน กรณีศึกษาคุณภาพน้ำคลองในเขตอุตสาหกรรม. (รายงานวิจัย). กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา. ถ่ายเอกสาร.
- เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล. (2008). ร้อยพรรณพฤกษา พรรณไม้น้ำ. กรุงเทพฯ: เศรษฐศิลป์.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. (2557). *Escherichia coli*. (fact sheet). กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงฯ.
- สถาพร วรรณชนวิจารณ์; และ ธัญญรัตน์ ดำเกาะ. (2557?) *นิเวศวิทยา ECOLOGY*. (เอกสารประกอบการเรียน). นครปฐม: โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์. ถ่ายเอกสาร.
- สัมพันธ์ จันทร์ดำ; ประณีต งามเสน่ห์; และ อชยา อรรถอินทรีย์. (2552). การศึกษาชีววิทยาบางประการของปลาซีข้างขาว (*Trigonostigma espei*) ในจังหวัดจันทบุรี. ใน *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 3*. หน้า 1-7. เชียงใหม่: คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- สาวิกา กัลปพฤกษ์. (2006). ความหลากหลายของชนิดพันธุ์สัตว์น้ำเศรษฐกิจและรูปแบบการทำประมงในพื้นที่แม่น้ำน้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา. ใน *Veridian E-Journal*. V6. pp. 915-923. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- สิงหา วงศ์โรจน์. (2547). การศึกษาอนุกรมวิธานของปลาน้ำจืดในพื้นที่กรุงเทพมหานครฝั่งตะวันออก. ปรินญาณีพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- สุจินต์ หนูขวัญ; และ อรุณี รอดลอย. (2552). 100 ชนิดปลาสวยงามของไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ดอกเบญจ. สุจิตรา มณีรัตน์; และคนอื่น ๆ. (2543). ประสิทธิภาพของการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนโคลิฟอร์ม/อีโคไล อย่างรวดเร็วด้วยชุดทดสอบกระดาษ. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38*. หน้า 238-338.
- สุรีพร เกตุงาม. (2546). เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. ใน *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 5(2): 37-59.
- สุทัศน์ ดวงจิตร. (2554). ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอและการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์. *นิติเวชศาสตร์*. 4(1): 53-65.

- สุบัญญัติ นิมรัตน์; หทัยทิพย์ บรรเจิดจรัสเลิศ; และ วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย. (2014). การประเมินคุณภาพของน้ำดื่มบรรจุขวดที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสารคาม*. 33(5): 454-459.
- สุภาพร สุพิน. (2017). *พรรณไม้ประดับตู้ปลา*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- สุรพล ดวงแข. (2550). คำกล่าวกิตติ. ใน *BRT Newsletter*. (21): หน้า 70. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. สืบค้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2558, จาก <http://www.nstda.or.th/index.php/home/1465>
- สุรศักดิ์ แก้วอ่อน; และ อำนวย น้อยผา. (2553). สภาวะของถ้ำในจังหวัดนครศรีธรรมราช. (รายงานวิจัย). นครศรีธรรมราช: สำนักคณะกรรมการอุดมศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช. ถ่ายเอกสาร.
- สำนักงานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมจังหวัดสระแก้ว. (2554). รายงานประจำปี 2554. สืบค้นเมื่อ 12 ธันวาคม 2558. จาก http://sakaeo.mnre.go.th/sk1/images/pdf/ReportYear2554/ReportYear2554_3.pdf
- สำนักวิจัยและพัฒนา. (2550). *คู่มือปฏิบัติงาน การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ*. กรุงเทพฯ: กลุ่มงานเคมีส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ กรมฯ.
- สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. (2553). *ปลาไทยลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา*. กรุงเทพฯ: กรมประมง.
- สำนักอนุรักษ์และฟื้นฟูทรัพยากรน้ำบาดาล. (2558). *รายงานสถานการณ์น้ำบาดาลประเทศไทย พ.ศ. 2558 รายงานไตรมาสที่ 1*. กรุงเทพฯ: กรมทรัพยากรน้ำบาดาล กระทรวงฯ.
- สำนักอุทยานแห่งชาติ. (2554). *คู่มืออุทยานแห่งชาติ ลำดับที่ 14 การจัดการถ้ำเพื่อการท่องเที่ยวในอุทยานแห่งชาติ*. กรุงเทพฯ: กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.
- อนุสรณ์ อำพันธ์ศรี. (2555, มกราคม-มิถุนายน). การจัดการพื้นที่อยู่อาศัยสมัยก่อนประวัติศาสตร์ : การศึกษาหลักฐานทางโบราณคดีประเภทกระดูกสัตว์. ใน *ดำรงวิชาการ*. 11(1): 65-95.
- อาจอง ประทัดสุนทรสาร; และ กำธร ธีรคุปต์. (ม.ป.ป). *คู่มือการสอนวิชา...ชีววิทยา*. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อาซวีดาม์ กันสิทธิ์. (2544). *การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ปอด (Paragonimus heterotremus) โดยใช้ 18S small subunit และ internal transcribed spacer region ของ nuclear rDNA*. ปรินญาณิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

- อุษามาต วังชัยสุนทร. (2547). คุณภาพอาหารทางจุลชีวะวิทยาคืออะไร. *วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*. 24(2): 51-63.
- Ahmadian, A.; Ehn, M.; & Hober, S. (2006). Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *ELSEVIER*. 83-94.
- Al-Bahry, S. N., et al. (2009). Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. *Chemosphere*. 77(11): 1534-1539.
- Anjos, J.; et al. (2013). *Assessing the impact of environmental changes in endemic freshwater fish populations through the temporal analysis of genetic diversity patterns*. Retrieved December 15, 2015, from http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/7949/1/ulfc102781_tm_joana_anjos.pdf
- Araujo, J.F; et al. (2012). Characterization of Soil Bacterial Assemblies in Brazilian Savanna-Like Vegetation Reveals Acidobacteria Dominance. *Microbial Ecology*. 64(3):760-770.
- Auernik, K. S.; Cooper, C. R.; & Kelly, R. M. (2008). Life in hot acid: pathway analyses in extremely thermoacidophilic archaea. *Current Opinion in Biotechnology*. 19(5): 445–453.
- Barron, S. K.; et al. (2010). Analysis of bacterial diversity in soils from Blowing Spring Cave (Lauderdale County, AL). *Journal of the Alabama Academy of Science*. 81(1): 1-10.
- Belyaev, S. S.; et al. (1983). Methanogenic Bacteria From the Bondyuzhskoe Oil Field: General Characterization And Analysis Of Stable-Carbon Isotopic Fractionation. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(2): 691-697.
- Bhatia, S.: et al. (2015). Metagenomic analysis of bacterial and archaeal assemblages in the soil-mousse surrounding a geothermal spring . *Genomics Data*. 30:195-200.
- Boop, L.M.; et al. (2014). Groundwater geochemistry observations in littoral caves of Mallorca (western Mediterranean): implications for deposition of phreatic overgrowths on speleothems. *International Journal of Speleology*. 43(2). 193-203.

- Boore, J.L.; & Brown, W.M. (2000). Mitochondrial Genomes of *Galathealinum*, *Helobdella*, and *Platynereis*: Sequence and Gene Arrangement Comparisons Indicate that Pogonophora Is Not a Phylum and Annelida and Arthropoda Are Not Sister Taxa. *Mol Biol Evol.* 17(1). 87-106.
- Bossard, D. C. (2001). *A fit place to live : creation of the biosphere*. Interdisciplinary Biblical Research Institute. Retrieved December 15, 2015, from <http://www.ibri.org/RRs/RR051/51Fitplace.html>
- Campbell, J. W.; et al. (2011). Escherichia coli, other coliform, and environmental chemoheterotrophic bacteria in isolated water pools from six caves in northern Alabama and northwestern Georgia. *Journal of Cave and Karst Studies.* 73(2): 75-82.
- Catao, E. C. P.; et al. (2014). Soil Acidobacterial 16S rRNA Gene Sequences Reveal Subgroup Level Differences between Savanna-Like Cerrado and Atlantic Forest Brazilian Biomes. *Microbiology.* 1-12.
- Chaudhuri, S. K. (2004). Freshwater Fish Diversity Information System as a Basis for Sustainable Fishery. (Conference paper) *In IASLIC XXI National Seminar, Kolkata (India)*. 31 December 2004 -3 January 2005.
- Church, S.E.; Guerard, P.V.; & Finger, S.F. (n.d.). Integrated Investigations of Environmental Effects of Historical Mining in the Animas River Watershed, San Juan County, Colorado. *In Distribution of pH Values and Dissolved Trace-Metal Concentrations in Streams.* 501-533.
- Compact Dry "Nissui" EC for Coliform & *E.coli*. (2015). Retrieved December 17, 2015. From http://www.nissui-pharm.co.jp/english/industry/pdf/CompactDry_EC_E.pdf
- Culver, D. C. (2012). Life History Evolution. *In Encyclopedia of Caves.* pp. 465-468. Amsterdam: Elsevier Inc.
- Danielle, C.; et.al. (2008). A progress report of a study of the reproductive Cycle of the Cave-dwelling Crickets, *Hadenocetus cumberlandicus* and *Ceuthophilus stygius* (Orthoptera, Rhaphidophoridae), in Northeastern Kentucky. *In PHOLEOS.* 26(1,2): 8-12.

- Derry, A.M.; Prepas, E.E.; & Hebert, P.D.N. (2003). A comparison of zooplankton communities in saline lakewater with variable anion composition. *Hydrobiologia*. 505(1): 199-215.
- Desai, M.S.; Assig, K.; & Dattagupta, S. (2013). Nitrogen fixation in distinct microbial niches within a chemoautotrophy-driven cave ecosystem. *International Society for Microbial Ecology*. 7(21): 2411-2423.
- Dassarma, S.; & Arora, P. (2001). Halophiles. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Retrieved Desember 20, 2015, from <http://openwetware.org/images/2/2d/Halophiles.pdf>
- Dowling, D.C.; & Wiley, M. J. (1986). *The effects of Dissolved oxygen, Temperature, and Low stream flow on fish*. (A literature review). Illinois: Aquatic biology section technical report.
- Emmanuel, E.; Simon, Y.; & Joseph, O. (2013). Characterization of hardness in the groundwater of port-au-prince. an overview on the health significance of magnesium in the drinking water. *Aqua-LAC*. 5:35-43.
- Engel, A. S. (2010). Microbial Diversity of Cave Ecosystems. In *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. pp.219-238. Netherlands : Springer.
- Faubel, A. (2010). *Monograph of Macrostomida and Haplopharyngida (Plathelminthes: Rhabditophora)*. Retrieved August 25, 2015, from <http://macrostomorpha.info/node/3782>
- Fernandez, M.; et al. (1998). Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on 18S rRNA sequences. *Parasitology*. 383-391.
- Ghen, W.; et al. (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology*. 185(24): 7266-7272.
- Ghosh, W.; & Dam, B. (2009). Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *Federation of European Microbiological Societies*. 33: 999-1043.
- Gillespie, J.J.; et al. (2006). Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements. *Insect Molecular Biology*. 15(5): 657-686.

- Gunn, J. (2006). *Encyclopedia of Caves and Karst Science*. New York: Fitzroy Dearborn.
- He, Z.; et al. (2016). Improved PCR primers to amplify 16S rRNA genes from NC10 bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1000(11): 5099-5108.
- Huppopp, K. (2012). Adaptation to low food. *In Encyclopedia of Caves.* pp.1-9. Amsterdam: Elsevier Inc.
- IC controls. (2012). *Conductivity measurement in high purity water samples below 10 μ siemens/cm.* IC Controls application notes issue 4.2. Retrieved January 15, 2015, from <http://www.iccontrols.com/files/4-2.pdf>
- Ivanova, V.; et al. (2013). High phylogenetic diversity of bacteria in the area of prehistoric paintings in Magura cave, Bulgaria. *Journal of Cave and Karst Studies.* 75(3): 218-228.
- Jack, J.P.; Abdsalam, A.T.; & Khalifa, N.S. (2009). Assesment of dissolved oxygen in coastal waters of Benghazi, Libya. *Mediterranean Environment.* 15:135-156.
- Jeanbille, M.: et al. (2016). Soil parameters drive the structure, diversity and metabolic potentials of the bacterial communities across temperate beech forest soil sequences. *Microbial Ecology.* 71(2): 482-493.
- Jeffery, W.R. (2001). Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Developmental Biology.* 231(1): 1-12.
- Jeffery, W.R. (2012). *Astyanax mexicanus* : A model organism for evolution and adaptation. *In Encyclopedia of caves.* V.2. pp.36-43. Amsterdam: Elsevier Inc.
- Jeffery, W. R.; Strickler, A. G.; & Yamamoto, Y. (2003). To see or not to see: evolution of eye degeneration in mexican blind cavefish. *Integrative and Comparative Biology.* 43(4): 531-541.
- Juan, C.; & Emerson, B.C. (2010). Evolution underground: shedding light on the diversification of subterranean insects. *Journal of Biology.* 9(17): 1-5.
- Kadnikov, V.V.; et al. (2013). Genomic Analysis of *Melioribacter roseus*, Facultatively Anaerobic Organotrophic Bacterium Representing a Novel Deep Lineage within Bacterioidetes/Chlorobi Group. *Plos One.* 8(1): 1-11.

- Karkun, A.; Patle, K.; & Verma, S. (2014). Bacterial diversity of Mandeepkhol cave, Rajnandgaon district of C.G., India. *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*. 1(4): 491-499.
- Kottelat, M. (1988). Two Species of Cavefishes from Northern Thailand in the Genera *Nemacheilus* and *Homaioptera* (Osteichthyes: Homalopteridae). *Records of the Australian Museum*. 40(4): 225-231.
- Kunlasak, K.; et al. (2013). Relationships of Dissolved Oxygen with Chlorophyll-a and Phytoplankton Composition in Tilapia Ponds. *Geosciences*. 4: 46-53.
- Lee, M.L.; & Saunders, J.A. (2003). Effects of pH on Metals Precipitation and Sorption: Field Bioremediation and Geochemical Modeling Approaches. *Vadose Zone Journal*. 2: 177-185.
- Loftin, R.W. (1988). Caves and Evolution. *Creation Evolution Journal*. 8(23): 21-28.
- Ma, L., & Zhao, Y.h. (2012). Cavefish of China. *In Encyclopedia of Caves*. pp.107-125. Amsterdam: Elsevier Inc.
- Mahjoorazad, A.; & Coad, B.W. (2009). A new cave fish locality for Iran. *Ichthyology*. 2:30-33.
- Margulies, M.; et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *NATURE*. 437: 376-380.
- Mandal, S.D.; et al. (2015). First report of bacterial community from a Bat Guano using Illumina next-generation sequencing. *Genomics Data*. 4: 99-101.
- Marinho, M.; & Cardoso, T.C. (2014). Pathogenesis of Leptospirosis: Important Issues. *Medical Microbiology & Diagnosis*. 4(1):1-2.
- McGavin, G.C. (2009). *Insects spiders and other terrestrial arthropods-Smithsonian Handbooks*. USA: Dk Pub.
- Missouri State Parks. (n.d.). *Food chains and pyramids at Onondaga cave state park*. Retrieved June 10, 2015, from <https://mostateparks.com/page/55121/food-chains-and-pyramids>

- Navarrett, A. A.; et al. (2015). Differential Response of Acidobacteria Subgroups to Forest-to-Pasture Conversion and Their Biogeographic Patterns in the Western Brazilian Amazon. *Microbiology*. 6: 1-10.
- Neave, M.J.; et al. (2012). The bacterial community associated with the marine Polychaete *Ophelina* sp.1 (Annelida: Opheliidae) Is altered by copper and zinc contamination in sediments. *Microbial ecology*. 63(3): 639-650.
- Ng, H. H.; & Kottelat, M. (1998). *Pterocnjptis buccata*, a new species of catfish from western Thailand (Teleostei: Siluridae) with epigeal and hypogean populations. *Ichthyological Research*. 45(4): 393–399.
- Nicolas, V.; et al. (2012). Assessment of Three Mitochondrial Genes (16S, Cytb, CO1) for Identifying Species in the Praomyini Tribe (Rodentia: Muridae). *Plos One*. 7(5):1-11.
- Nielsen, D.L.; et al. (2003). Effects of increasing salinity on freshwater ecosystems in Australia. *Botany*. 51: 655–665.
- Noren, M.; & Jondelius, U. (1999). Phylogeny of the Prolecithophora (Platyhelminthes) Inferred from 18S rDNA Sequences. *Cladistics*. 15(2): 103-112.
- Olivier, B.; et al. (2012). Microbiological activities in MOONMILK monitored using isothermal microcalorimetry (cave of vers chez le brandt, neuchatel, Switzerland). *Cave and Karst Studies*. 1(74): p.116–126.
- Pace, N.R. (1997). A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. In *Science AAAS*. V.276. pp. 734-740.
- Park, G. S.; (2016). An improved effective microorganism (EM) soil ball-making method for water quality restoration. *Environmental Science and Pollution Research*. 23(2): 1100-1107.
- Pentamwa, P.; Thipthawa, W.; & Nuangon, S. (2011). Removal of Hardness from Groundwater by Synthetic Resin from Waste Plastics. *Environmental Science and Development*. 2(6): 479-483.
- Pflughoeft, K.J.; & Versalovic, J. (2012). Human microbiome in health and disease. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*. 7: 99-122.

- Phyllis, K.; Scannell, W. & Lawrence K.D. (2007). Effects of Total Dissolved Solids on Aquatic Organisms : A Review of Literature and Recommendation for Salmonid Species. *American Journal of Environmental Sciences*. 3(1): 1-6.
- Poulson, T.L. (2012). Food sources. *In Encyclopedia of Caves*. pp. 323-334. Amsterdam: Elsevier Inc.
- Pricop, E.; & Negrea, B.M. (2009). On the adaptations to cave life of some different animal groups (first note). *ELBA Bioflux*. 1(2):41-48.
- Rathore, R.S.; & Khangarot, B.S. (2003). Effects of Water Hardness and Metal Concentration on a Freshwater *Tubifex Tubifex* Muller. *Water, Air, and Soil Pollution*. 142(1): 341-356.
- Romero, A.; & Green, S.M. (2005). The end of regressive evolution: examining and interpreting the evidence from cave fishes. *Fish Biology*. 67(1): 3-32.
- Sanka, L.D.; et al. (2016). Pyrosequencing-Based Seasonal Observation of Prokaryotic Diversity in Pneumatophore-Associated Soil of *Avicennia marina*. *Current Microbiology*. 72(1): 68-74.
- Sargeran, P.; et al. (2008). The endemic Iranian Cave-fish, *Iranocypris typhlops*: two taxa or two forms based on the mental disc?. *Zoology in the Middle East*. 44: 67-74.
- Scharer; et al. (2011). Mating behavior and the evolution of sperm design. *PNAS*. 108(4): 1490-1495.
- Schulz, S.; et al. (2013). The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. *Biogeosciences*. 10(6): 3983-3996.
- Schulte, P.; & Bedford, K.C. (2002). *Karst and Caves of Southeast Alaska*. (A Teachers' Resource). Alaska: UAS Ketchikan campus and Cultural Heritage Research.
- Shen, L. D.; et al. (2016). Presence of diverse *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*-like bacteria of NC10 phylum in agricultural soils. *Journal of Applied Microbiology*. 120(6): 1552-1560.
- Shepherd, C.R.; & Shepherd, L. A. (2012). *A Naturalist's Guide to the Mammals of Southeast Asia: Brunei, Cambodia, Indonesia, Laos, Malaysia, Myanmar, the*

- Philippines, Singapore, Thailand and Vietnam*. 7 th ed. Spain: John Beaufoy Publishing Ltd.
- Simon; K.S. (2012). Cave ecosystems. *In Encyclopedia of Caves*. pp. 99-102. Amsterdam: Elsevier Inc.
- Simms; R. (1996). *Cave Crickets at Naracoorte: A Report on the Cave (Camel) Cricket *Novotettix Naracoortensis* (Richards) (Orthoptera : Rhabdophoridae) in the Naracoorte Karst Area*. Australian: South Australian Speleological Council.
- Sorokin, D. P.; et al. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum *Chloroflexi*. *International Society for Microbial Ecology*. 6(12): 2245-2256.
- Spain, A. M.; Krumholz, L. R.; & Elshahed, M. S. (2009). Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *International Society for Microbial Ecology*. 3(8): 992-1000.
- Strecker, U.; Hausdorf, B.; & Wilkens, H. (2012). Parallel speciation in *Astyanax* cave fish (Teleostei) in Northern Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62(1): 62-70.
- Szoke, E. (2005). Research on the heavy metal pollution of some cave waters of the karsts of Aggtelek from 2000 until now. *Acta Climatologica et Chorologica*. 135-142.
- The geologic column of Missouri. (winter, 2008). 2(2). Missouri: Geological Survey Program.
- Vesper, D. J. (2012). Contamination of Cave Waters by Heavy Metals. *In Encyclopedia of Caves*. (Second Edition). (pp. 161-166). Amsterdam: Academic Press.
- Wang, D. (2012). Redox chemistry of molybdenum in natural waters and its involvement in biological evolution. *Frontiers in Microbiology*. 3.
- Ward, B. B.; et al. (2007). Ammonia-oxidizing bacterial community composition in estuarine and oceanic environments assessed using a functional gene microarray. *Environment Microbiology*. 9(10): 2522-2538.
- Williams, K. p.; et al. (2010). Phylogeny of Gammaproteobacteria. *Journal of Bacteriology*. 192(2): 2305-2314.

- Wood, C.; & Zhang, H. (2010). Volcanic Centres and Lava Caves in China. *In Proceedings of the 14th International Symposium on Vulcanospeleology.* pp.123-130. Australia: International Symposium on Vulcanospeleology.
- Wu, Y.; et al. (2015). Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. *Frontiers in Microbiology.* 6: 1-10.
- Yamamoto, Y. (2004). Cavefish. *Current Biology.* 14(22): p.R943.
- Yamamoto, Y., Stock, D. W., & Jeffery, W. R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature International Weekly Journal of Science.* 431(7010): 844-847.
- Youssef, N. H.; et. al. (2015). In Silico Analysis of the Metabolic Potential and Niche Specialization of Candidate Phylum "Latescibacteria" (WS3). *Plos One.* 10(6): 1-21.
- Zhang, Y.; et al. (2015). Soil bacterial diversity patterns and drivers along an elevational gradient on Shennongjia Mountain, China. *Microb Biotechnology.* 8(4): 739-746.
- Zhou, J.; et al. (2007). Phylogenetic Diversity of Bacteria in an Earth-Cave in Guizhou Province, Southwest of China. *The Journal of Microbiology.* 45(2): 105-112.
- Ziv, G.; et al. (2012). Trading-off fish biodiversity, food security, and hydropower in the Mekong River Basin. *PNAS.* 190(15): pp. 5609-5614.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
มาตรฐานคุณภาพหน้า

มาตรฐานคุณภาพน้ำ

มาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน

ลำดับ	คุณภาพน้ำ	ค่าทางสถิติ	หน่วย	เกณฑ์กำหนดสูงสุด ^{3/} ตามการแบ่งประเภทคุณภาพน้ำตามการใช้ประโยชน์ ^{1/}				
				ประเภท 1	ประเภท 2	ประเภท 3	ประเภท 4	ประเภท 5
1.	สี กลิ่นและรส (Colour, Odour and Taste)		-	๓	๓'	๓'	๓'	-
2.	อุณหภูมิ (Temperature)		°ซ	๓	๓'	๓'	๓'	-
3.	ความเป็นกรดและด่าง (pH)		-	๓	5.0-9.0	5.0-9.0	5.0-9.0	-
4.	ออกซิเจนละลาย (DO) ^{3/}	P20	mg/L	๓	6.0	4.0	2.0	-
5.	บีโอดี (BOD)	P80	"	๓	1.5	2.0	4.0	-
6.	แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total Coliform Bacteria)	P80	MPN/ 100 ml	๓	5,000	20,000		-
7.	แบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria)	P80	"	๓	1,000	4,000		-
8.	ไนเตรต (NO ₃) ในหน่วยไนโตรเจน		mg/L	๓	5.0	5.0	5.0	-
9.	แอมโมเนีย (NH ₃) ในหน่วยไนโตรเจน		"	๓	0.5	0.5	0.5	-
10.	ฟีนอล (Phenols)		"	๓	0.005	0.005	0.005	-
11.	ทองแดง (Cu)		"	๓	0.1	0.1	0.1	-
12.	นิกเกิล (Ni)		"	๓	0.1	0.1	0.1	-
13.	แมงกานีส (Mn)		"	๓	1.0	1.0	1.0	-
14.	สังกะสี (Zn)		"	๓	1.0	1.0	1.0	-
15.	แคดเมียม (Cd)		"	๓	0.005*	0.005*	0.005*	-
					0.05**	0.05**	0.05**	
16.	โครเมียมชนิดเฮกซะวาเลนต์ (Cr Hexavalent)		"	๓	0.05	0.05	0.05	-
17.	ตะกั่ว (Pb)		"	๓	0.05	0.05	0.05	-
18.	ปรอททั้งหมด (Total Hg)		"	๓	0.002	0.002	0.002	-
19.	สารหนู (As)		"	๓	0.01	0.01	0.01	-
20.	ไซยาไนด์ (Cyanide)		"	๓	0.005	0.005	0.005	-
21.	กัมมันตภาพรังสี (Radioactivity)		เบอ					
	- รังสีแอลฟา (Alpha)		เคอ	๓	0.1	0.1	0.1	-
	- รังสีเบตา (Beta)		เรล/ล.	๓	1.0	1.0	1.0	-

(ต่อ)

ลำดับ	คุณภาพน้ำ	ค่าทางสถิติ	หน่วย	เกณฑ์กำหนดสูงสุด ^{3/} ตามการแบ่งประเภทคุณภาพน้ำตามการใช้ประโยชน์ ^{1/}				
				ประเภท 1	ประเภท 2	ประเภท 3	ประเภท 4	ประเภท 5
22.	สารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ชนิดที่มีคลอรีนทั้งหมด (Total Organochlorine Pesticides)		mg/L	๐	0.05	0.05	0.05	-
23.	ดีดีที (DDT)		ไมโครกรัม/ล.	๐	1.0	1.0	1.0	-
24.	บีเอชซีชนิดอัลฟา (Alpha-BHC)		"	๐	0.02	0.02	0.02	-
25.	ดิลดริน (Dieldrin)		"	๐	0.1	0.1	0.1	-
26.	อัลดริน (Aldrin)		"	๐	0.1	0.1	0.1	-
27.	เฮปตาคลอร์และเฮปตาคลออีพอกไซด์ (Heptachlor & Heptachlor epoxide)		"	๐	0.2	0.2	0.2	-
28.	เอนดริน (Endrin)		"	๐	ไม่สามารถตรวจพบได้ตามวิธีการตรวจสอบที่กำหนด			-

แหล่งที่มาของข้อมูล : ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2537) ออกตามความในพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน ดีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนที่ 16 ลงวันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2537

หมายเหตุ

1/ การแบ่งประเภทแหล่งน้ำผิวดิน

- ประเภทที่ 1 ได้แก่ แหล่งน้ำที่คุณภาพน้ำมีสภาพตามธรรมชาติโดยปราศจากน้ำทิ้งจากกิจกรรมทุกประเภทและสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ
- (1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติก่อน
 - (2) การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตระดับพื้นฐาน
 - (3) การอนุรักษ์ระบบนิเวศน์ของแหล่งน้ำ

ประเภทที่ 2 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทิ้งจากกิจกรรมบางประเภทและสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

- (1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน
- (2) การอนุรักษ์สัตว์น้ำ
- (3) การประมง
- (4) การว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ

ประเภทที่ 3 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภทและสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

- (1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน
- (2) การเกษตร

ประเภทที่ 4 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภทและสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

- (1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำเป็นพิเศษก่อน
- (2) การอุตสาหกรรม

ประเภทที่ 5 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภทและสามารถเป็นประโยชน์เพื่อการคมนาคม

2/ กำหนดค่ามาตรฐานเฉพาะในแหล่งน้ำประเภทที่ 2-4 สำหรับแหล่งน้ำประเภทที่ 1 ให้เป็นไปตามธรรมชาติและแหล่งน้ำประเภทที่ 5 ไม่กำหนดค่า

3/ ค่า DO เป็นเกณฑ์มาตรฐานต่ำสุด

๓ เป็นไปตามธรรมชาติ

๓' อุณหภูมิของน้ำจะต้องไม่สูงกว่าอุณหภูมิตามธรรมชาติเกิน 3 องศาเซลเซียส

-* น้ำที่มีความกระด้างในรูปของ CaCO_3 ไม่เกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

-** น้ำที่มีความกระด้างในรูปของ CaCO_3 เกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

°ซ องศาเซลเซียส

P20 ค่าเปอร์เซ็นต์ไทลที่ 20 จากจำนวนตัวอย่างน้ำทั้งหมดที่เก็บมาตรวจสอบอย่างต่อเนื่อง

P80 ค่าเปอร์เซ็นต์ไทลที่ 80 จากจำนวนตัวอย่างน้ำทั้งหมดที่เก็บมาตรวจสอบอย่างต่อเนื่อง

mg/L หรือ มก./ล. มิลลิกรัมต่อลิตร

MPN เอ็ม.พี.เอ็น. หรือ Most Probable Number

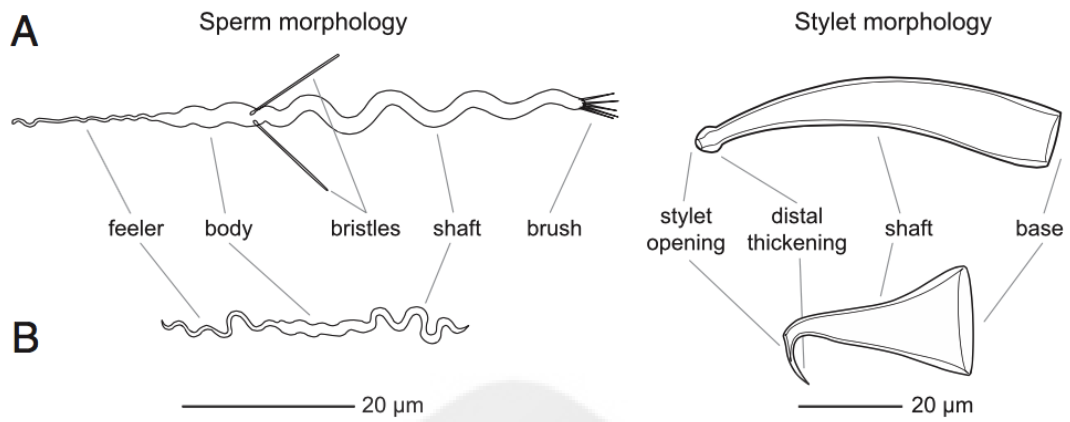


ภาคผนวก ข

อวัยวะสืบพันธุ์ของหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum*

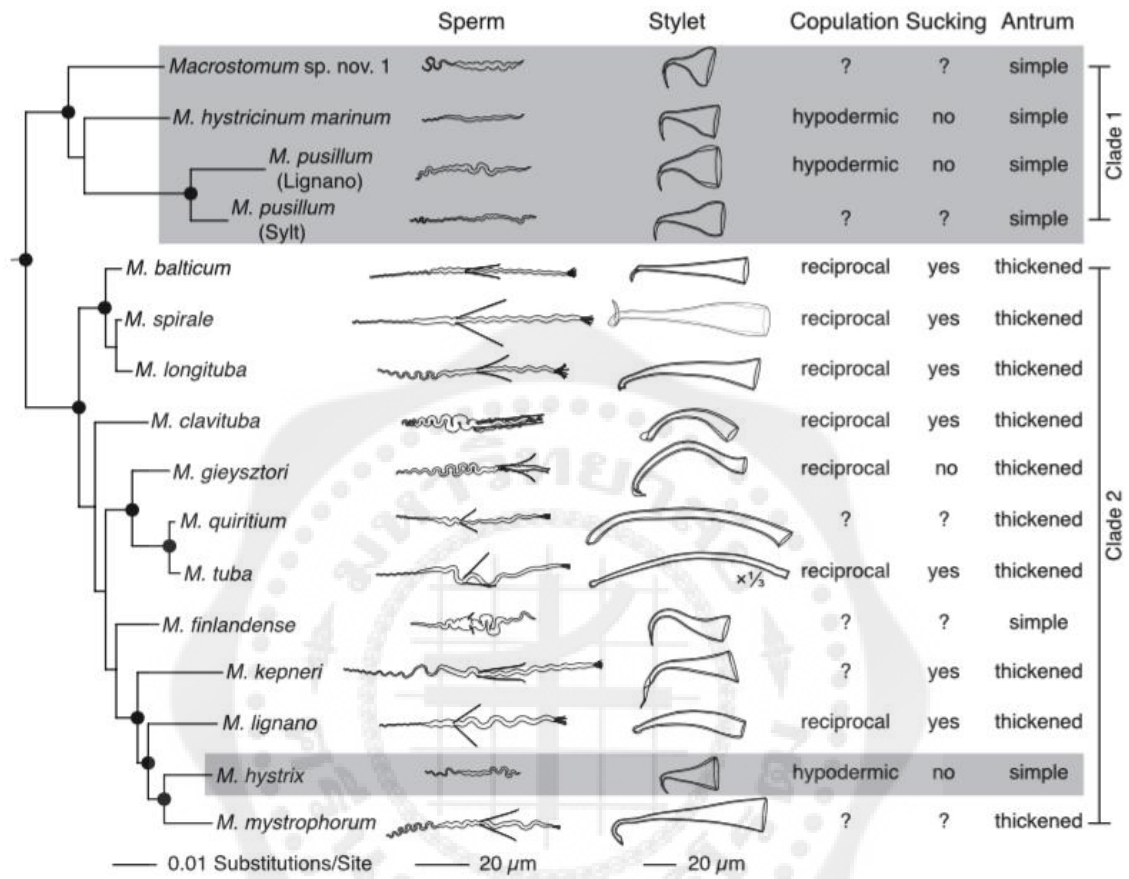
(Scharer; et al. 2011: 1490-1495)

ลักษณะของสเปิร์ม (sperm) และอวัยวะสืบพันธุ์ของหนอนตัวแบน *Macrostomum*



A คือ *M. lignano* มีลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เป็นแบบหนา (thickened) B คือ *M. hystrix* ลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เป็นแบบเข็ม หรือแบบปกติ (Simple)

แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic) ของหนอนตัวแบนสกุล *Macrostomum* และลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์



ประวัติย่อผู้วิจัย



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ- ชื่อสกุล นางสาวชไมพร ยอดคง
 วันเดือนปีเกิด วันอังคารที่ 17 เมษายน พ.ศ. 2533
 สถานที่เกิด อำเภอวิเชียรบุรี จังหวัดเพชรบูรณ์
 สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 11 หมู่ 5 ตำบลโคกปรัง อำเภอวิเชียรบุรี จังหวัดเพชรบูรณ์
 67130

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2551 จบการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย
 จากโรงเรียนเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ ลพบุรี
- พ.ศ. 2555 จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
 จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
- พ.ศ. 2559 จบการศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและ
 การจัดการทรัพยากร คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ
 จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

ผลงาน

เข้าร่วมการประชุมงานวิชาการระดับชาติ “มศว วิจัย” ครั้งที่ 8 จัดแสดงผล
 งานวิจัยเรื่อง สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของปลาสกุล
Rasbora และ *Esomus* และสภาพแวดล้อมในน้ำของแหล่งท่องเที่ยวทาง
 ธรรมชาติ ถ้ำเขาควัว อำเภอคลองหาด จังหวัดสระแก้ว (Molecular
 phylogeny of *Rasbora* and *Esomus* and environmental condition in
 water of nature attraction, Shiva Cave, Khlong Hat District, Sa Kaeo
 Province) ณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

เข้าร่วมการประชุมงานวิชาการระดับนานาชาติ “ 11th International
 Conference on Environmental Science and Development (ICESD)”
 ผลงานนำเสนอเรื่อง WATER QUALITY AND MOLECULAR
 PHYLOGENY OF RASBORA, ESOMUS AND BACTERIA DIVERSITY
 IN SHIVA CAVE, SA KAEO PROVINCE, THAILAND. ณ Bayview Hotel
 ประเทศ สิงคโปร์