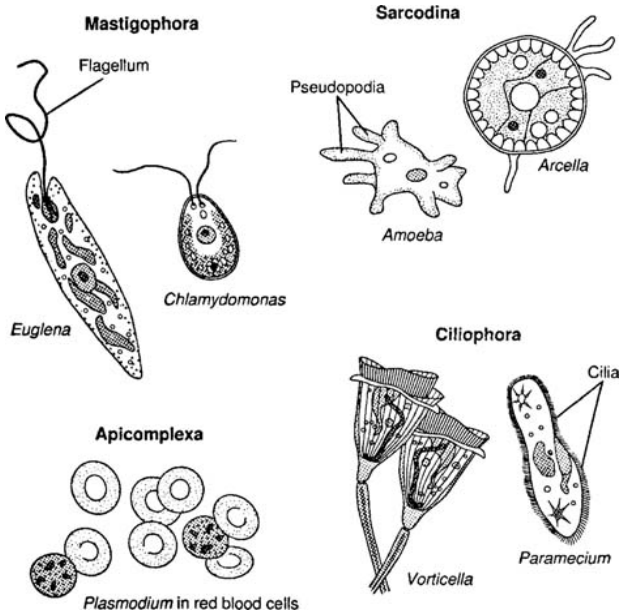
โปรโตซัวในน้ำประปา

โปรโตซัว (Protozoa) หรือสัตว์เซลล์เดียวเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่ในอาณาจักรโพรทิสตา (Protista) ตามการแบ่งของ Kudo (1943)โดยมีลักษณะสำคัญคือ เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส (Eukaryotic cell) และแต่ละเซลล์มีการเคลื่อนที่ที่เป็นอิสระต่อกันหรือถ้ารวมตัวกันก็จะเป็นแบบโคโลนีเท่านั้น นักชีววิทยาได้ทำการจัดหมวดหมู่โปรโตซัวโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างการเคลื่อนที่ ซึ่งแบ่งออกมาได้ 4 คลาสดังต่อไปนี้

- Sarcodina โปรโตซัวในคลาสนี้มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยืดออกได้หรือขาเทียม (pseudopodium) เป็นโครงสร้างหลักในการเคลื่อนที่ อาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม ดิน และโคลน วงชีวิตของโปรโตซัวกลุ่มนี้มี 2 ระยะคือ โทรโฟซอยด์ (trophozoite) และซิสต์ (cyst) โดยระยะแรกจะพบในสภาวะที่เหมาะสม เซลล์มีการเคลื่อนที่ กินอาหาร เติบโต และแบ่งเซลล์ (binary fission) ส่วนระยะหลังจะพบในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เซลล์จะหยุดกิจกรรมเกือบทุกอย่างแล้วสร้างเกราะมาหุ้มตัวเอง ระยะนี้จะไม่มีการแบ่งเซลล์แต่สามารถแบ่งนิวเคลียสได้ นอกจากนี้ซิสต์ยังมีความทนต่อสภาวะต่าง ๆ เช่น ความร้อน ความเย็น กรด-เบส และการขาดออกซิเจน ได้มากกว่าโทรโฟซอยต์ ตัวอย่างโปรโตซัวของคลาสนี้ได้แก่ *Amoeba* spp. และ *Nagleria* spp. เป็นต้น

- Mastigophora (Flagellata) โปรโตซัวในคลาสนี้มีเส้นขนยาวหรือแฟลเจลลัม (flagellum) เป็นโครงสร้างหลักในการเคลื่อนที่ โดยส่วนใหญ่พบอาศัยในน้ำ วงชีวิตมีสองระยะเช่นเดียวกับอะมีบา ตัวอย่างโปรโตซัวของคลาสนี้ได้แก่ *Euglena* spp. และ *Trypanosoma* spp. เป็นต้น



ภาพที่ 1 รูปวาดแสดงสัณฐานวิทยาของโปรโตซัวทั้ง 4 คลาส

- Ciliophora โปรโตซัวในคลาสนี้มีเส้นขนสั้นหรือซิเลีย (cilia) เป็นโครงสร้างหลักในการเคลื่อนที่ โดยส่วนใหญ่พบอาศัยในแหล่งน้ำต่าง ๆ เช่น แม่น้ำ ทะเลสาบ และบึง เป็นต้น แต่ก็มีบางชนิดที่อาศัยอยู่ในดินได้ วง

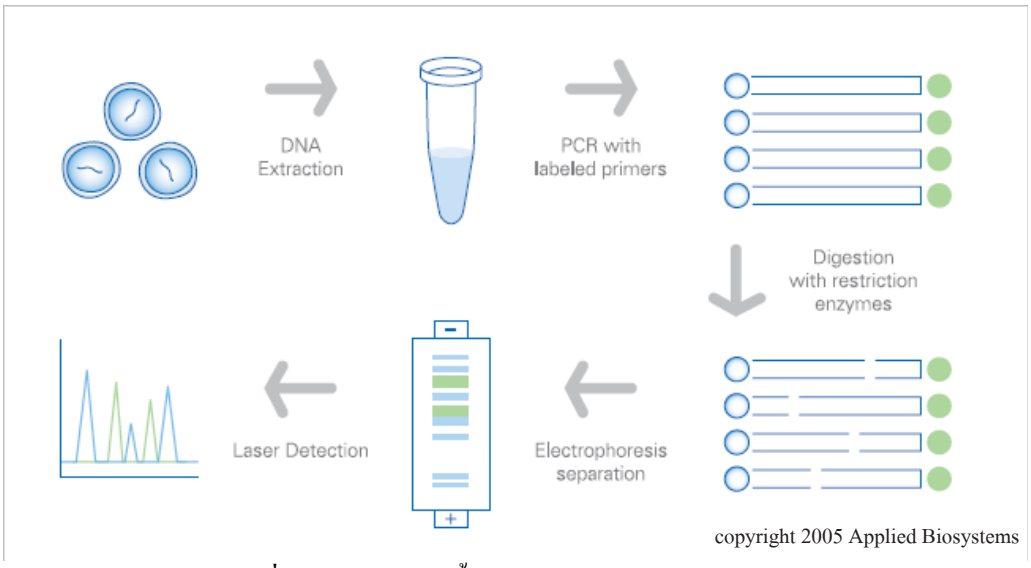
ชีวิตมีสองระยะเช่นเดียวกับอะมีบา ตัวอย่างโปรโตซัวของคลาสนี้ได้แก่ *Paramecium* spp. และ *Balantidium* spp. เป็นต้น

- Apicomplexa โปรโตซัวในคลาสนี้เคลื่อนที่ไม่ได้ยกเว้นระยะเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) และเป็นปรสิตทั้งหมด พวกมันมีอวัยวะพิเศษ (apical complex) เพื่อใช้เจาะเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านได้ วงชีวิตค่อนข้างซับซ้อนตามอวัยวะและชนิดของเจ้าบ้านที่อาศัยอยู่ ตัวอย่างโปรโตซัวของคลาสนี้ได้แก่ *Plasmodium* spp. และ *Cryptosporidium* spp. เป็นต้น

การปนเปื้อนโปรโตซัวในน้ำประปา ส่วนใหญ่มาจากโปรโตซัวที่อาศัยอยู่อย่างอิสระ (free-living protozoa) ในธรรมชาติตามพื้นที่ต่าง ๆ และเนื่องจากมีระยะซิสต์ที่ทนต่อระบบฆ่าเชื้อโรคในน้ำประปา (คลอรีน) ได้ จึงทำให้โปรโตซัวเหล่านี้มีโอกาสที่จะปนเปื้อนเข้าสู่ระบบน้ำประปาและก่อโรคในคนได้ วิธีการจำแนกโปรโตซัวในน้ำประปาทำได้ 2 วิธี ดังนี้

- จำแนกโดยสัณฐานวิทยา
  เป็นการจำแนกรูปร่างที่มองเห็นด้วยตาเปล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้นิยมใช้กันมากเนื่องจากไม่ต้องมีอุปกรณ์ซับซ้อนและใช้เวลาไม่นาน แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดอยู่ที่ผู้วิเคราะห์จะต้องมีความเชี่ยวชาญค่อนข้างมาก

- จำแนกโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล
  เป็นการจำแนกชนิดโดยอาศัยความแตกต่างกันทางพันธุกรรมในจีโนม โดยอาศัยหลักว่าโปรโตซัวแต่ละชนิดจะมีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน วิธีนี้จำแนกได้อย่างเที่ยงตรง ผู้วิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องมีทักษะมาก แต่ก็มีข้อจำกัดคือ เสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์มาก ตัวอย่างเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ได้แก่ วิธี T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) เทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในบริเวณที่จำเพาะในจีโนม โดยในโปรโตซัวจะนิยมวิเคราะห์ยีน 18s rRNA ซึ่งมีขั้นตอนวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ สกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย PCR (polymerase chain reaction) ตัดท่อนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี Gel electrophoresis และวิเคราะห์ข้อมูลตามลำดับ



ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธี T-RFLP

แหล่งอ้างอิง

ขวัญฤดี ไชยมงคล. 2549. โปรโตซัวในสระว่ายน้ำสาธารณะในเขตกรุงเทพมหานครชั้นใน. วิทยานิพนธ์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 77 หน้า.

docs.appliedbiosystems.com/pebiodocs/00115132.pdf

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042272.pdf

http://www.delftcluster.nl/website/files/files_org/Drinkwater_topk/poster_Rinske_Valster-1.pdf

http://www.waterfiltering.com/contamination-types/protozoan-drinking-water-contaminants.html

Detection and identification of free-living protozoa in tap water

Rinske Valster[1,2], Bart Wullings[1], Stefan Voost[1], Geo Bakker[3], Hauke Smidt[2], and Dick van der Kooij[1]

Introduction

Legionella pneumophila **proliferates in the aquatic environment within certain free-living protozoa, e.g.** ***Acanthamoeba*****,** ***Naegleria*****,** ***Saccamoeba*****,** ***Hartmannella*** **and** ***Vexillifera*** **(2, 3, 4). Controlling the multiplication of** ***Legionella*** **in water systems requires detailed knowledge about its behavior, including the presence and behavior of host protozoa. However, information about identity and presence of bacteriovorous free-living protozoa, in particular those serving as host for** ***Legionella*****, is still scarce.**

Objective

The objective of this study was to develop molecular methods to obtain information about the presence and identity of free-living protozoa in surface water, treated water and tap water in the Netherlands.

Free-living protozoa

Free-living protozoa can be defined as phagotrophic protists, that feed on detritus or other protists. Several species are heterotrophic. The major part of protozoa are unicellular organisms and different life-cycle forms can be distinguished, e.g. *Hartmannella vermiformis* (Fig. 2). Free-living fresh water protozoa can be divided in three clusters (Fig. 1). Most protozoa reproduce asexually, but sexual reproduction takes place e.g. in flagellates.

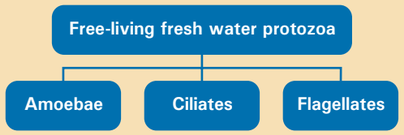


Figure 1: Classification of protozoa (1).

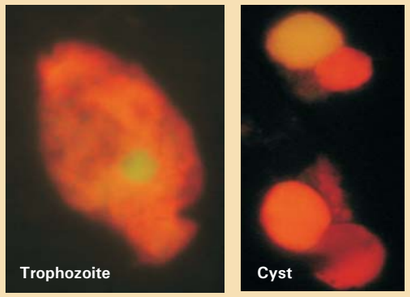


Figure 2: Two life stages of Hartmannella vermiformis.

Water samples and molecular techniques

- **Water samples** were collected in the Netherlands.
- **DNA** was extracted with the Fast DNA spin kit for Soil (Qbiogene, Irvine, CA).
- **T-RFLP** is a molecular technique to generate fingerprints of communities. The method includes a PCR amplification with fluorescent primers and a digestion step after the amplification. Universal eukaryotic 18S rRNA gene-targeted primers and the restriction enzyme *Hha*I were used to study the eukaryotic community.
- **Clone libraries** were constructed from PCR products amplified with universal eukaryotic 18S rRNA gene-targeted primers. Clones were randomly picked, sequenced and compared to sequences in the NCBI-data base by BLAST searches.
- **Quantitative detection** of *H. vermiformis*, *Legionella* spp., *L. pneumophila* and *L. anisa* was performed with a real-time PCR method in combination with a cell-based standard curve and species/genus specific primers targeting the 18S rRNA gene or 16S rRNA gene and *mip* gene respectively.

Table 1: Water samples collected in the Netherlands.

Water type	Code	T (°C)
Treated aerobic groundwater	TW1	10
Treated anaerobic groundwater	TW2	11
Treated aerobic groundwater	TW3	11
Treated surface water	TW4	15
Treated anaerobic groundwater	TW5	14
Tap water after 15 min. flushing	Tap1	16
Stagnant tap water	Tap2	21
Stagnant tap water	Tap3	20
Surface water (river)	SW1	13
Surface water (river)	SW2	13

Results

Quantification of *H.vermiformis* and *Legionella* spp.

Legionella spp. were detected in all samples. *L. pneumophila* and *L. anisa* were only observed in tap water. *H. vermiformis* was also detected in these samples and in TW4 (Fig. 3). Most likely, *H. vermiformis*, *L. pneumophila* and *L. anisa* multiplied in the tap water systems at elevated temperatures.

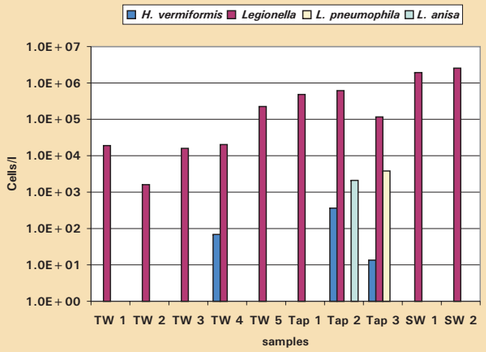


Figure 3: Quantification of H. Vermiformis and Legionella spp.

Eukaryotic diversity

The T-RFLP analysis showed a high eukaryotic diversity in all water samples (Fig. 4). Free-living protozoa represented a major cluster of the total eukaryotic community (Fig. 5). TW 3 is used as example for the pilot studies with T-RFLP analysis in combination with sequence analysis of clones. Clones with the highest similarity for different genera cannot always be distinguished from each other with the used primers and restriction enzyme (Fig. 6).

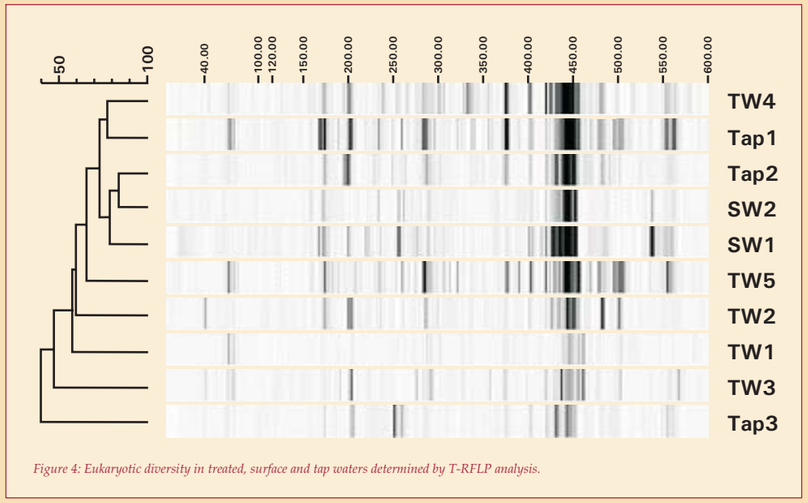


Figure 4: Eukaryotic diversity in treated, surface and tap waters determined by T-RFLP analysis.

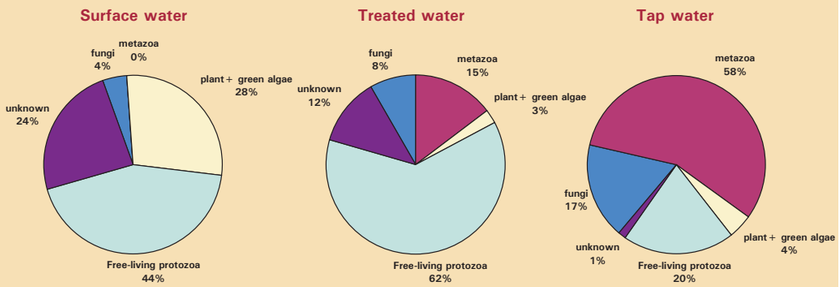


Figure 5. Classification of eukaryotic clone libraries made from surface, treated and tap water obtained in the Netherlands.

The eukaryotic community in treated water

Table 2: Used clones from TW 3 to identify T-RFs observed in community samples.

Clone	Highest similarity with the genus
1	Uncultured cercozoan clone (89%)
2	*Bodo* (95%)
3	*Pyrrhospora* (88%)
4	*Vexillifera* (94%)
5	*Vexillifera* (94%)
6	Cercomonas (92%)
7	Uncultured nematode (98%)
8	*Bodo* (95%)
9	*Acanthamoeba* (99%)
10	*H.vermiformis* (99%)

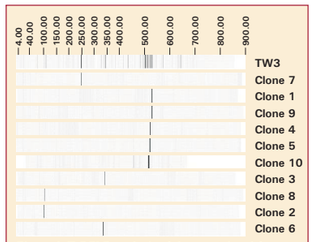


Figure 6: T-RFLP analysis of clones retrieved from sample TW3.

Diversity and identity of free-living protozoa in treated water

A total of 308 clones from five types of treated water were analyzed and 62% were most closely related to free-living protozoa, representing 41 different genera (Fig. 5). Blast analysis of the clones revealed the presence of a highly diverse group of free-living protozoa in all three water types. *H. vermiformis* was detected in the clone library of Tap 2. In TW3 a total of thirteen genera of free-living protozoa was distinguished (Table 3). *Acanthamoeba* and *Vexillifera* are potential hosts for *L. Pneumophila*.

Table 3. Identified free-living protozoa from TW 3.

Highest similarity with the genus	Similarity (%)	Part of the total protozoa population (%)
Acanthamoeba	>95	7.9
Alexandrium	91	1.6
Bodo	>91	12.7
Cercomonas	>92	14.3
Diaphanoeca	92	3.2
Entorhipidium tenue	94	3.2
Frontonia	96	1.6
Neobodo	92	7.9
Paravahikampfia	89	3.2
Rhynchomonas	98	7.9
Uncultured cercozoan clone	>89	25.4
Uncultured petrich clone	87	3.2
Vexillifera	94	7.9

Conclusions

- T-RFLP analysis with the right primers and enzymes in combination with clone libraries is an efficient method to determine the eukaryotic diversity and to estimate the diversity of free-living protozoa in fresh water;
- Free-living protozoa are ubiquitous in treated water but genetically poorly defined;
- Protozoa which may serve as host for *L. pneumophila* are present in treated water;
- *H. vermiformis* is not a dominant species in the protozoa community.

This study was conducted within the framework of the joint research program of the Dutch Watercompanies and co-financed by Delft Cluster.

References
1. **Fenchel T.** 1987. Ecology of Protozoa. Berlin; Heidelberg etc.: Springer-Verlag. 197 p
2. **Fields, B.S., R.F. Benson, and R.E. Besser.** 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. 25: 506-526.
3. **Kuiper, M.W., B.A. Wullings, A.D.L.Akkermans, R.R.Beumer, and D.van der Kooij.** 2004. Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticizes PVC. Appl. Environ. Microbiol: 70: 6826-6833.
4. **Steinert M., U. Hentschel and J. Hacker.** 2001. *Legionella pneumphila*: an aquantic microbe goes astray. FEMS Microbiology Reviews 26: 149-162.

1 Kiwa Water Research, P.O. Box 1072, 3430 BB Nieuwegein, The Netherlands
Contact: rinske.valster@kiwa.nl
2 Wageningen University, P.O. BOX 8080, 6700 DD Wageningen, NL
3 Vitens Water Supply Company , P.O. BOX 10005, 8000 GA Zwolle, NL