



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาวิธีการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยกลุ่มแบคทีเรีย
กรณีศึกษา ลุ่มน้ำท่าจีน”

Development of microbial source tracking methods:
a case study of Tha Chin river basin

โดย

ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน และคณะ

สิงหาคม 2561

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาวิธีการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยกลุ่มแบคทีเรีย
กรณีศึกษา ลุ่มน้ำท่าจีน”

Development of microbial source tracking methods:
a case study of Tha Chin river basin

คณะผู้วิจัย

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| 1. ดร.ขวัญวิ สุริยาญจน | สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ |
| 2. ดร.ปิณดา ลีลพนัง กำแพงทอง | กรมควบคุมมลพิษ |
| 3. นายเอกชัย คงประจักษ์ | สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ |
| 4. นางสาวณัฐชา ไชโรจน์ | สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ |
| 5. นางสาวพรจิรา สมนาค | สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ |

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาวิธีการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยกลุ่มแบคทีเรีย กรณีศึกษา ลุ่มน้ำท่าจีน ฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องด้วยได้รับความอนุเคราะห์จากหลายหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการอนุญาตให้เข้าเก็บตัวอย่างเพื่อการวิจัย ได้แก่ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ โรงพยาบาลจุฬาภรณ์ บริษัท วอเตอร์ อินเด็กซ์ แอนด์ คอนซัลแทนท์ จำกัด สำนักงานเทศบาลตำบลบางปลา สำนักงานเทศบาลเมืองชัยนาท สำนักงานเทศบาลเมืองสุพรรณบุรี สำนักงานเทศบาลนครปฐม สำนักงานการระบายน้ำ กรุงเทพมหานคร สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดชัยนาท สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนครปฐม สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดสุพรรณบุรี สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดปทุมธานี คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา จังหวัด กรุงเทพฯ และ สหกรณ์โคนมนครปฐม จำกัด จังหวัดนครปฐม

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้เข้าร่วมงานเสวนา Thailand 4.0 กับนวัตกรรมการจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources ทุกท่านที่กรุณาใช้เวลาเข้าร่วมงานและให้ความเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการ ได้แก่ ผู้แทนหน่วยงานสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 5 สำนักงานทรัพยากรน้ำแห่งชาติ กรมอนามัย การประปาส่วนภูมิภาค การประปานครหลวง สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ องค์การจัดการน้ำเสีย สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค กรมส่งเสริมการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม และกรมการพัฒนาชุมชน และผู้แทนคณาจารย์จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และมหาวิทยาลัยบูรพา

ขอขอบคุณที่ปรึกษาโครงการ ศาสตราจารย์ ดร. ศกรณ์ มงคลสุข ผู้ให้ความเห็น ข้อเสนอแนะต่องานวิจัย และกำลังใจในการทำงานของคณะผู้วิจัยเสมอมา ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้เชี่ยวชาญ ที่สละเวลาในการตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของการวิจัย ตลอดจนให้ข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์สูงสุดต่องานวิจัย ขอขอบคุณการสนับสนุนเงินวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และขอขอบคุณบุคคลผู้มีส่วนช่วยเหลือเป็นจำนวนมากที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้

อนึ่ง หากงานวิจัยฉบับนี้เกิดประโยชน์ต่อผู้ใดหรือหน่วยงานใด คณะผู้วิจัยขอขอบคุณความดีส่วนนี้ให้แก่ บุพการีผู้เลี้ยงดู และให้การสนับสนุนอย่างดียิ่งเสมอมา และครูอาจารย์ที่เคารพผู้อบรมสั่งสอนให้สามารถนำความรู้มาก่อให้เกิดประโยชน์ต่อไปได้

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2561

Executive Summary

รหัสโครงการ	SRI5930305
ชื่อโครงการ	การพัฒนาวิธีการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยกลุ่มแบคทีเรีย กรณีศึกษา ลุ่มน้ำท่าจีน Development of microbial source tracking methods: a case study of Tha Chin river basin
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน	ดร.ขวัญวี สิริกาญจน สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ดร.ปิณิดา ลีลพานัง กำแพงทอง กรมควบคุมมลพิษ นายเอกชัย คงประจักษ์ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ นางสาวณัฐชา ไขโรจน์ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ นางสาวพรจิรา สมนาค สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์
อีเมล	kwanrawee@cri.or.th , p.leelapanang@gmail.com
ระยะเวลาโครงการ	1 กันยายน 2559 ถึง 31 สิงหาคม 2561

บทสรุปผู้บริหาร

แหล่งน้ำจืดในประเทศไทย ประสบปัญหาความเสื่อมโทรมของคุณภาพน้ำมาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการเติบโตของชุมชนเมือง การขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม และการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยการติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำทั่วประเทศ ปี พ.ศ. 2557 พบว่า ร้อยละ 22 มีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์เสื่อมโทรม โดยพารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่มีปัญหา ได้แก่ ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (BOD) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์มและโคลิฟอร์มทั้งหมด (FCB,TCB) และแอมโมเนียในรูปไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) โดยพารามิเตอร์คุณภาพน้ำเหล่านี้ แสดงถึงภาพรวมของสถานการณ์คุณภาพน้ำจากแหล่งกำเนิดมลพิษที่ทราบจุดแน่นอน (point sources) และแหล่งกำเนิดมลพิษที่ไม่ทราบจุดแน่นอน (non-point sources) แต่ยังไม่สามารถระบุที่มาของแหล่งกำเนิดมลพิษที่แม่นยำรายกิจกรรมได้ การแก้ไขปัญหาแหล่งน้ำที่มีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องระบุกิจกรรมที่ก่อให้เกิดปัญหาหลักได้ตามสัดส่วนการปล่อยมลพิษที่แท้จริง เพื่อนำไปสู่การจัดการมลพิษที่แหล่งกำเนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การนำแบคทีเรียมาใช้จำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษรายกิจกรรม หรือ microbial source tracking (MST) เป็นการศึกษาความจำเพาะของแบคทีเรียที่อาศัยในลำไส้คนและสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น สุกร โค ไก่ แพะ แกะ เป็นต้น กล่าวคือ การตรวจเจอแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวอย่างน้ำจะบ่งชี้ได้ว่าน้ำนั้นมีการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลจากสัตว์ประเภทนี้ แบคทีเรียกลุ่มที่มีการศึกษากันแพร่หลาย ได้แก่กลุ่ม Bacteroidales โดยข้อดีของการตรวจวัด Bacteroidales คือ เนื่องจากเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) จึงไม่พบปัญหาการเพิ่มจำนวนในแหล่งน้ำ (regrowth) การตรวจวัดเชื้อ Bacteroidales นิยมใช้วิธีตรวจวัดทางดีเอ็นเอ ซึ่งได้แก่เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และพีซีอาร์เชิงปริมาณ (quantitative PCR or real-time PCR) เนื่องจากหลีกเลี่ยงความยุ่งยากในการเพาะเชื้อด้วยสภาพไร้อากาศในห้องปฏิบัติการ เทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีทางชีวโมเลกุลที่ใช้ตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) โดยการใช้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการ ด้วยการจับกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น และผลการพบหรือไม่พบดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่าง แสดงผลด้วยแบนด์ ดีเอ็นเอบนเจล ผลที่ได้จึงเป็นเชิงคุณภาพ (พบหรือไม่พบ) ส่วนเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณใช้หลักการคล้ายกัน คือ เพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการจับกับไพรเมอร์จำเพาะ และสามารถแสดงผลเชิงปริมาณได้ เพื่อการเปรียบเทียบผลการปนเปื้อนของแหล่งกำเนิดมากกว่าหนึ่งแหล่งในตัวอย่างน้ำเดียวกันได้

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อให้ได้แนวทางการนำกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมมาสนับสนุนการตรวจวัดกลุ่มพารามิเตอร์แบคทีเรียในมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดิน โครงการวิจัยมีระยะเวลา 2 ปี ผลที่ได้จากโครงการจำแนกตามวัตถุประสงค์ย่อย ได้ดังต่อไปนี้

วัตถุประสงค์ที่ 1 เพื่อจัดทำรายงานสรุปสถานการณ์มลพิษทางน้ำและความจำเป็นของการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษของประเทศ
ไทย

ผลการศึกษา

1. จากการวิเคราะห์ช่องว่างของกฎระเบียบข้อบังคับและมาตรฐานน้ำผิวดินในปัจจุบันของประเทศไทย พบว่าไม่มีพารามิเตอร์ใดในมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินที่เชื่อมโยงไปสู่แหล่งกำเนิดมลพิษเพียงแหล่งเดียว ทำให้มีข้อถกเถียงถึงสัดส่วนการปล่อยมลพิษที่แท้จริง และไม่สามารถระบุผู้ก่อมลพิษที่ชัดเจนได้
2. ความรุนแรงของปัญหาสะท้อนได้จากปัญหามลพิษในประเทศไทยที่เกิดจากสารอินทรีย์โดยมีสิ่งปฏิกูลจากมนุษย์และสัตว์ที่ตรวจวัดการปนเปื้อนได้ในรูปแบบที่เรียและสารประกอบไนโตรเจน
3. การแก้ไขปัญหามลพิษทางน้ำอย่างยั่งยืน ทำได้โดยการตรวจวัดพารามิเตอร์ที่มีความจำเพาะกับกิจกรรม โดยนำมาสนับสนุนดัชนีคุณภาพน้ำที่มีอยู่เดิมในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน เพื่อเสริมเป็นมาตรการเฉพาะพื้นที่เพื่อสืบหาแหล่งกำเนิดตามสัดส่วนการปล่อยมลพิษที่แท้จริง
4. การใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษมาสนับสนุนระดับนโยบายในการจัดการมลพิษแหล่งน้ำนั้น มีกรณีศึกษาที่ประสบความสำเร็จอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ เป็นต้น

วัตถุประสงค์ที่ 2 เพื่อพัฒนาวิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับตรวจวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถจำแนกสิ่งปฏิกูลจากแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรม

ผลการศึกษา

1. จากการศึกษาพบว่าแหล่งกำเนิดมลพิษที่สำคัญในเขตลุ่มน้ำท่าจีนและลุ่มน้ำเจ้าพระยา ได้แก่ ชุมชน สุกรและโค และแหล่งกำเนิดรองลงมา ได้แก่ ฟาร์มปศุสัตว์แพะ แกะ กระบือ ไก่และเป็ด จึงทำการคำนวณจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสมทางสถิติและมีการกระจายตัวที่เหมาะสม ด้วยวิธี stratified random sampling design ด้วยค่าออกแบบ คือ 90% confidence interval และ 0.20 acceptable relative error เพื่อให้ได้ค่าความไวของวิธีทดสอบ ที่ไม่น้อยกว่า 0.80
2. จำนวนตัวอย่างในการทดสอบรวมทั้ง 100 ตัวอย่างจากพื้นที่บริเวณลุ่มน้ำท่าจีน และ 28 ตัวอย่างจากพื้นที่บริเวณลุ่มน้ำเจ้าพระยา โดยแต่ละตัวอย่างเป็นตัวแทนของกลุ่มประชากร กล่าวคือสิ่งปฏิกูลจากมนุษย์เก็บจากน้ำเสียรวมของอาคารที่มีคนอาศัยอยู่มากกว่า 100 คน หรืออาคารโรงพยาบาลที่มีเตียงผู้ป่วยในมากกว่า 80 เตียง และมูลสัตว์ที่ผสมรวมจากมูลของสัตว์ตั้งแต่ 20 ตัวขึ้นไป
3. ไพรเมอร์ที่คัดเลือกมาทำการทดสอบสามารถตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรีย Bacteroidales ได้ โดยแบ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับคน จำนวน 3 คู่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสุกร จำนวน 2 คู่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับโค จำนวน 8 คู่ และไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด (สำหรับยืนยันการปนเปื้อนว่ามาจากสิ่งปฏิกูลจริงโดยไม่ได้เกิดจากการมีอยู่ในธรรมชาติ) จำนวน 3 คู่ รวม 16 คู่

4. จากการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์พบว่า ไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการจำแนกแหล่งปนเปื้อนสิ่งปฏิกลจากแหล่งกำเนิดรวม (ไม่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด) คน สุกร และโค ได้แก่ BacUniEP หรือ GenBac3EP, HF183/BFDrevEP, Pig-2-BacEP, และ Bac3 ตามลำดับ จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพ (performance) ของไพรเมอร์ทั้งสี่คู่นี้เปรียบเทียบระหว่างวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับตัวอย่างในลุ่มน้ำท่าจีน ดังแสดงในตาราง

ชนิด แหล่งกำเนิด	ความไว (%) Sensitivity		ความจำเพาะ (%) Specificity		ความถูกต้อง (%) Accuracy		อัตราการเกิดผลบวก Positive predictive value		อัตราการเกิดผลลบ Negative predictive		LOD (copies/reaction)	
	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR
แหล่งกำเนิดรวม (Universal)	100	96	NA*	NA*	100	96	100	100	NA*	NA*	30	20
น้ำเสียชุมชน	84	100	77	80	78	84	46	54	95	100	300	40
สุกร	100	100	98	96	98	97	91	87	100	100	3000	40
โค	70	70	100	94	94	89	100	74	93	93	300	30

โดยค่าความไว หมายถึง ความสามารถในการตรวจพบในทุกตัวอย่างที่มาจากแหล่งปนเปื้อนนั้นจริงโดยไม่แสดงผลลบลง ความจำเพาะ หมายถึง ความสามารถในการตรวจพบเฉพาะแหล่งกำเนิดที่ต้องการโดยไม่แสดงผลบวกลง อัตราการเกิดผลบวก หมายถึง ค่าความมั่นใจในความถูกต้องหากผลการตรวจเป็นบวกซึ่งนำไปใช้ในการแปลผลการตรวจตัวอย่างน้ำปนเปื้อนได้ อัตราการเกิดผลลบ หมายถึง ค่าความมั่นใจในความถูกต้องหากผลการตรวจเป็นลบซึ่งนำไปใช้ในการแปลผลการตรวจตัวอย่างน้ำปนเปื้อนได้ และ LOD (limit of detection) คือค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ด้วยวิธีดังกล่าว

5. เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณพบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก (ดังแสดงในข้อ 4) แต่เมื่อคำนวณต้นทุนในการตรวจวัดด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณพบว่ามีความแตกต่างกัน โดยการตรวจวัดด้วยวิธีพีซีอาร์ มีต้นทุนประมาณ 1,800 และ 3,400 บาท หากตรวจวัดหนึ่งแหล่งกำเนิดและสี่แหล่งกำเนิด ตามลำดับ หากตรวจวัดด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ มีต้นทุน 3,200 และ 6,000 บาทสำหรับการตรวจวัดหนึ่งแหล่งกำเนิดและสี่แหล่งกำเนิด ตามลำดับ นอกจากนี้ ต้นทุนคงที่สำหรับเครื่องมือวิเคราะห์ของวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ มีมูลค่าประมาณ 710,000 และ 1,335,800 บาท ตามลำดับ ซึ่งวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณต้องมีค่าใช้จ่ายในการเตรียมกราฟมาตรฐานในครั้งแรกเป็นเงินประมาณ 32,000 บาท

วัตถุประสงค์ที่ 3 เพื่อตรวจติดตามคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีนในช่วงเวลา 1 ปี และบ่งชี้แหล่งกำเนิดกิจกรรมปนเปื้อน

ผลการศึกษา

- ทำการตรวจติดตามคุณภาพน้ำจากสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำของส่วนแหล่งน้ำจืด สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ จำนวน 12 สถานี ตั้งแต่ปากแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร ที่ลงสู่อ่าวไทยขึ้นไปถึงสะพานมะขามเฒ่าจังหวัดชัยนาท ต้นกำเนิดแม่น้ำท่าจีนที่แยกออกมาจากแม่น้ำเจ้าพระยา ครอบคลุมคุณภาพแหล่งน้ำประเภทที่ 4 (แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ (1) การอุปโภคและบริโภคโดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำเป็นพิเศษก่อน และ (2) การอุตสาหกรรม) ประเภทที่ 3 (แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ (1) การอุปโภคและบริโภคโดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน และ (2) การเกษตร) และประเภทที่ 2 (แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ (1) การอุปโภคและบริโภคโดยไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อ

- โรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน (2) การอนุรักษ์สัตว์น้ำ (3) การประมง และ (4) การว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ) โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 4 ครั้ง ครอบคลุมฤดูฝน 2 ครั้งและฤดูแล้ง 2 ครั้ง
2. จากการตรวจวัดพบค่าแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดเกินมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 2 ในตัวอย่างฤดูฝนครั้งที่หนึ่งที่สถานี TC25 (ข้างตลาดสามชุก จ.สุพรรณบุรี) และสถานี TC28 (สะพานมะขามเฒ่า จ.ชัยนาท) และค่าแบคทีเรียฟิคอลโคลิฟอร์ม เกินมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 2 ในตัวอย่างฤดูฝนครั้งที่หนึ่งและสอง ที่สถานี TC25 และ TC28 อีกเช่นกัน ในขณะที่สถานี TC01-TC13 ซึ่งจัดอยู่ในแหล่งน้ำประเภทที่ 4 ไม่มีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานแต่ตรวจพบค่าโคลิฟอร์มที่สูงมาก นอกจากนี้ ภาพรวมของค่าออกซิเจนละลาย (DO) ต่ำกว่ามาตรฐานทุกสถานี โดยนับเป็นสัดส่วน 80 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างฤดูฝนรวมสองครั้ง และ 50 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างฤดูแล้งรวมสองครั้ง ภาพรวมค่าความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (BOD) สูงกว่ามาตรฐานทุกสถานี โดยนับเป็นสัดส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างฤดูฝนรวมสองครั้ง และ 80 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างฤดูแล้งรวมสองครั้ง
 3. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจากการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลที่ไม่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด (แหล่งกำเนิดรวม; universal marker) พบการปนเปื้อนในทุกสถานีและทุกรอบการเก็บน้ำ (ฤดูฝนสองครั้ง ฤดูแล้งสองครั้ง) โดยผลตรงกันทั้งวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ ซึ่งแสดงถึงการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลตลอดสายของแม่น้ำท่าจีน เนื่องจากแม่น้ำท่าจีนไม่ได้มีต้นกำเนิดจากพื้นที่ต้นน้ำ แต่เป็นสาขาที่ต่ออย่มาจากแม่น้ำเจ้าพระยาที่ตำบลมะขามเฒ่า จังหวัดชัยนาท ซึ่งเป็นบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาตอนบนที่ได้รับการประเมินให้มีคุณภาพน้ำระดับพอใช้ติดต่อกันมาอย่างต่อเนื่อง
 4. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ ตรวจพบในทั้งฤดูฝนและฤดูแล้งที่สถานีต่อไปนี้ TC07 (ร.ร.บ้านปล่องเหล็ก อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร) TC09 (หน้าวัดเทียนดัด อ.สามพราน จ.นครปฐม) TC10 (วัดบางช้างเหนือ อ.สามพราน จ.นครปฐม) TC13 (หน้าท่าเรือ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม) และ TC25 ในขณะที่ตรวจพบเฉพาะในฤดูฝนที่สถานี TC01 (ปากแม่น้ำท่าจีน จ.สมุทรสาคร) และตรวจพบเฉพาะในฤดูแล้งที่สถานี TC04 (วัดศิริมงคล อ.เมือง จ.สมุทรสาคร) และ TC22 (ท้ายเมืองสุพรรณบุรี อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี) ซึ่งทุกสถานีเป็นบริเวณใกล้ชุมชนทั้งสิ้น
 5. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนด้วยวิธีพีซีอาร์ ตรวจพบที่จำนวนสถานีน้อยกว่าเมื่อใช้วิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ ซึ่งสอดคล้องกับค่าขีดจำกัดการวัดของวิธีพีซีอาร์ที่สูงกว่า ซึ่งหมายความว่าวิธีพีซีอาร์จะไม่สามารถตรวจหาแบคทีเรียที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนได้หากมีระดับการปนเปื้อนที่น้อยเกินไป ในส่วนของค่าที่ตรวจวัดได้ทั้งสองวิธี หากผลเป็นบวกจะมีความมั่นใจได้ 42-54 เปอร์เซ็นต์ว่ามีการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนจริง ในขณะที่หากผลเป็นลบจะมั่นใจได้ 95-100 เปอร์เซ็นต์ว่าผลเป็นลบจริง
 6. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับมูลสุกรด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ ตรวจพบในทั้งฤดูฝนและฤดูแล้งที่สถานี TC07, TC09, TC10, และ TC13 ในขณะที่การตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์พบในฤดูฝนที่สถานี TC07, TC09 และ TC13 และในฤดูแล้งที่สถานี TC07, TC09 และ TC10 โดยจุดปนเปื้อนที่สุดคือ TC07 ซึ่งเป็นขอบของจังหวัดสมุทรสาครที่ติดกับ จ.นครปฐม ซึ่งมีแนวโน้มการได้รับมลพิษที่พัดพามาจากเหนือในเขต จ.นครปฐม ในส่วนของค่าที่ตรวจวัดได้ทั้งสองวิธี หากผลเป็นบวกจะมีความมั่นใจได้ 87-100 เปอร์เซ็นต์ว่ามีการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนจริง ในขณะที่หากผลเป็นลบจะมั่นใจได้ 100 เปอร์เซ็นต์ว่าผลเป็นลบจริง
 7. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับมูลโค ตรวจพบในฤดูฝนเท่านั้น โดยพบที่สถานี TC07 TC09 TC10 TC13 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ และที่สถานี TC07 TC09 TC10 เมื่อทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ ในส่วนของค่าที่

ตรวจวัดได้ทั้งสองวิธี หากผลเป็นบวกจะมีความมั่นใจได้ 74-100 เปอร์เซ็นต์ว่าการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนจริง ในขณะที่ หากผลเป็นลบจะมั่นใจได้ 93-96 เปอร์เซ็นต์ว่าผลเป็นลบจริง

8. สรุปค่าพารามิเตอร์ทางชีวภาพ ซึ่งได้แก่ *E. coli*, Total coliforms, Enterococcus, Fecal coliforms รวมทั้งกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2 ฤดู ($P>0.05$) ยกเว้นกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะต่อสิ่งปฏิกูลจากโคซึ่งพบเฉพาะในฤดูฝน จึงทำให้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฤดูแล้ง ($P<0.05$) ซึ่งบ่งชี้ความเป็นไปได้ว่ามลพิษมูลโคอาจถูกพัดพามากับน้ำท่าในช่วงฤดูฝน
9. สรุปผลรายสถานี พบว่าค่าแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและฟิคอลโคลิฟอร์มที่สูง น่าจะมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนทั้งจากมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนในบริเวณสถานี TC07 TC09 TC10 และ TC13 ในขณะที่สถานี TC01 และ TC04 ไม่พบการปนเปื้อนจากมูลสัตว์ แต่พบการปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชนซึ่งอาจเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ค่า coliforms สูง สำหรับสถานี TC25 ค่า fecal coliforms ที่เกินมาตรฐานได้รับอิทธิพลมาจากการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนบริเวณตลาดสามชุก ในปริมาณที่สูง อย่างไรก็ตามที่สถานี TC22 และ TC28 ไม่พบการปนเปื้อนจากชุมชน โค หรือสุกร อาจเป็นไปได้ว่าค่า fecal coliforms ที่เกินมาตรฐานมีการปนเปื้อนน้ำเสียและสิ่งปฏิกูลจากแหล่งกำเนิดอื่นๆได้
10. แนวทางในการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่บ่งชี้แหล่งกำเนิด สามารถทำได้ด้วยแนวทางเลือกแบบเป็นขั้นตอน (Tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่ โดยทำการกรองตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอเก็บไว้ที่ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียสก่อน จากนั้นรอผลการวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มมาตรฐาน (วิธี MPN ใช้เวลา 4-7 วัน วิธีกรองด้วยเมมเบรนใช้เวลา 1-2 วัน) หากตัวอย่างน้ำพบค่าแบคทีเรียเกินมาตรฐานจึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรวจวิเคราะห์แหล่งกำเนิดได้ โดยใช้ไพรเมอร์แหล่งกำเนิดรวม (Universal) เมื่อต้องการตรวจยืนยันการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลจริงหรือไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดต่างๆ แล้วแต่พื้นที่บริเวณที่ศึกษา นอกจากนี้ หากต้องการตรวจวัดการปนเปื้อนในระดับสูงเท่านั้น ก็สามารถใช่วิธีพีซีอาร์ที่มีต้นทุนและค่าใช้จ่ายถูกกว่าได้ สำหรับตัวอย่างที่ไม่ได้รับการตรวจต่อจะมีค่าใช้จ่ายในการกรองและสกัดดีเอ็นเออยู่ที่ 1,300 บาทต่อตัวอย่าง

วัตถุประสงค์ที่ 4 เพื่อจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำผิวดิน และจัดทำข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย (Policy brief)

ผลการศึกษา

1. คู่มือปฏิบัติการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำผิวดิน ประกอบด้วย
 - a. มาตรฐานการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (Standard Operating Procedures)
 - b. ขั้นตอนทางเลือกในการตรวจวัด (tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้นๆ
 - c. กรณีศึกษาการตรวจติดตามคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีนด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิด
2. ข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย (Policy brief)

โดยสรุปแล้ว โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการที่นำความรู้ในทางวิทยาศาสตร์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมาบูรณาการกับการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อกำหนดแนวทางการผลักดันไปสู่การใช้ประโยชน์เชิงนโยบาย นอกจากนี้ นอกเหนือจากประโยชน์ด้านการจำแนกแหล่งปล่อยมลพิษแล้ว การทราบแหล่งกำเนิดมลพิษสามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบการ

คำนวณความเสี่ยงต่อสุขภาพได้ด้วย เนื่องจากสิ่งปฏิภูลหรือมูลสัตว์ที่ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำมีโอกาสที่จะนำพาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลงสู่แหล่งน้ำนั้นๆด้วย โดยโอกาสการปนเปื้อนชนิดและปริมาณของเชื้อก่อโรคก็แตกต่างกันไปขึ้นกับประเภทแหล่งกำเนิด ดังนั้นจึงเป็นการเน้นย้ำความสำคัญและความจำเป็นอย่างเร่งด่วนของการตรวจติดตามคุณภาพน้ำด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิด เพื่อนำมาแก้ไขปัญหามลพิษของประเทศไทยอย่างมีประสิทธิภาพได้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ SRI5930305

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยกลุ่มแบคทีเรีย กรณีศึกษา ลุ่มน้ำท่าจีน

Development of microbial source tracking methods: a case study of Tha Chin river basin

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน	ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
	ดร.ปิณิดา สีสพรั่ง กำแพงทอง	กรมควบคุมมลพิษ
	นายเอกชัย คงประจักษ์	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
	นางสาวณัฐชา ไขโรจน์	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
	นางสาวพรจิรา สมนาค	สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์

อีเมล kwanrawee@cri.or.th, p.leelapanang@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ 1 กันยายน 2559 ถึง 31 สิงหาคม 2561

บทคัดย่อ

แหล่งน้ำจืดในประเทศไทย ประสบปัญหาความเสื่อมโทรมของคุณภาพน้ำมาอย่างต่อเนื่อง การแก้ไขปัญหามลพิษทางน้ำมีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องระบุกิจกรรมที่ก่อให้เกิดปัญหาหลักได้ตามสัดส่วนการปล่อยมลพิษที่แท้จริง เพื่อนำไปสู่การจัดการมลพิษที่แหล่งกำเนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อให้ได้แนวทางการนำกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมมาสนับสนุนการตรวจวัดกลุ่มพารามิเตอร์แบคทีเรียในมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดิน โครงการวิจัยมีระยะเวลา 2 ปี ประกอบด้วยวัตถุประสงค์ย่อย ได้แก่ 1) การรวบรวมข้อมูลสรุปสถานการณ์มลพิษทางน้ำและความจำเป็นของการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษในบริบทของประเทศไทย 2) การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียแบคทีเรียที่ดีสเพื่อระบุการปนเปื้อนมลพิษสิ่งปฏิกูลจากชุมชน สุกร โค และสิ่งปฏิกูลรวมทุกแหล่งกำเนิด ด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ 3) การตรวจติดตามคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีนในช่วงระยะเวลา 1 ปีและบ่งชี้แหล่งกำเนิดกิจกรรมปนเปื้อน และ 4) การจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำผิวดิน และจัดทำข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย (Policy brief) โดยสรุปแล้วโครงการวิจัยนี้เป็นโครงการที่นำความรู้ในทางวิทยาศาสตร์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมาบูรณาการกับการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อกำหนดแนวทางการผลักดันไปสู่การใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะและเชิงนโยบายต่อไป

คำสำคัญ ดัชนีชี้วัด การตรวจระบุแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยจุลินทรีย์ การตรวจติดตามคุณภาพน้ำ

Abstract

รหัสโครงการ SRI5930305

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยกลุ่มแบคทีเรีย กรณีศึกษา ลุ่มน้ำท่าจีน

Development of microbial source tracking methods: a case study of Tha Chin river basin

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน	ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
	ดร.ปิณิดา สีสพรั่ง กำแพงทอง	กรมควบคุมมลพิษ
	นายเอกชัย คงประจักษ์	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
	นางสาวณัฐชา ไขโรจน์	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
	นางสาวพรจิรา สมนาค	สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์

อีเมล kwanrawee@cri.or.th, p.leelapanang@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ 1 กันยายน 2559 ถึง 31 สิงหาคม 2561

Abstract

Surface water quality in Thailand has been deteriorating. Identification of pollution sources is needed for better water quality management. The ultimate goal of this study was to develop a guideline for microbial source tracking to support bacterial parameters of the Thailand Surface Water Quality Standard. The objectives of this 2-year research project were 1) to collect information regarding polluted water situations in Thailand and the needs for microbial source tracking, 2) to develop microbial source tracking techniques using Bacteroidales for identification of human sewage-, swine-, and cattle-specific and universal fecal pollution using PCR and real-time PCR, 3) to monitor water quality parameters and microbial source trackers in Tha Chin river for 1 year, and 4) to develop a microbial source tracking laboratory guideline and a policy brief. Overall, this project has developed scientific methods and translated to a guideline and a policy brief for future public and policy uses.

Keywords: indicator, microbial source tracking, water quality monitoring

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทสรุปผู้บริหาร	(2)
บทคัดย่อไทย	(8)
Abstract	(9)
สารบัญ	(10)
สารบัญตาราง	(13)
สารบัญรูป	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	9
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	10
2.1 การเก็บตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนในพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน	10
2.2 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์	11
2.3 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ	16
2.4 วิเคราะห์ความเหมาะสมระหว่างเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณในด้านต้นทุน ข้อได้เปรียบ และข้อจำกัดเชิงเทคนิค	21
2.5 ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ควบคู่กับการตรวจสอบคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน	22
บทที่ 3 ผลการวิจัย	27
3.1 การเก็บตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนในพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน	27
3.2 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์	31
3.3 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ	35
3.4 วิเคราะห์ความเหมาะสมระหว่างเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณในด้านต้นทุน ข้อได้เปรียบ และข้อจำกัดเชิงเทคนิค	44
3.5 ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ควบคู่กับการตรวจสอบคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน	47
3.6 บทวิเคราะห์สัดส่วนและแหล่งที่มาหลักของการปนเปื้อนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในแหล่งน้ำท่าจีน	66
3.7 บทวิเคราะห์และทางเลือกในการวิเคราะห์ที่นำเสนอแบบเป็นขั้นตอน (tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้นๆ	69
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	71

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
เอกสารอ้างอิง	76
ภาคผนวก ก. รายงานสรุปสถานการณ์มลพิษทางน้ำและความจำเป็นของการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษของประเทศไทย	81
ภาคผนวก ข. มาตรฐานการปฏิบัติงานวิธีพีซีอาร์สำหรับตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียที่เชื่อมโยงแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมได้	95
ภาคผนวก ข1. การเก็บตัวอย่างมูลสัตว์	96
ภาคผนวก ข2. การเก็บตัวอย่างน้ำ	98
ภาคผนวก ข3. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมูลสัตว์	99
ภาคผนวก ข4. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเสียอาคาร	101
ภาคผนวก ข5. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดแหล่งกำเนิดมลพิษจากสิ่งปฏิกูลทั่วไปคู่ที่ 1 (BacUni 520f/BacUni 690r1)	104
ภาคผนวก ข6. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดแหล่งกำเนิดมลพิษจากสิ่งปฏิกูลทั่วไปคู่ที่ 2 (GenBactF3/GenBactR4)	107
ภาคผนวก ข7. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดแหล่งกำเนิดมลพิษจากสิ่งปฏิกูลทั่วไปคู่ที่ 3 (Bac32F/Bac708R)	110
ภาคผนวก ข8. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดแหล่งกำเนิดมลพิษจากชุมชน (HF183/BFDrev)	113
ภาคผนวก ข9. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดแหล่งกำเนิดมลพิษจากสุกร (Pig-2-Bac41F/Pig-2-Bac163Rm)	116
ภาคผนวก ข10. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดแหล่งกำเนิดมลพิษจากโค (Bac3F/Bac3R)	119
ภาคผนวก ข.11. การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียเป้าหมายในแหล่งกำเนิดต่างๆ ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ	122
ภาคผนวก ข.12. เทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดต่างๆ สำหรับตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสีย	125
ภาคผนวก ข.13. การเก็บตัวอย่างน้ำผิวดิน	127
ภาคผนวก ข.14. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำผิวดิน	128
ภาคผนวก ข.15. เทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดต่างๆ สำหรับตัวอย่างน้ำผิวดิน	131
ภาคผนวก ข.16. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดต่างๆ สำหรับตัวอย่างน้ำผิวดิน	133
ภาคผนวก ข17. ตัวอย่างควบคุมเชิงบวกและควบคุมเชิงลบในวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ	136
ภาคผนวก ค. ตารางรายละเอียดตัวอย่างน้ำเสียอาคารและมูลสัตว์	137

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
ภาคผนวก ง. ข้อมูลการใช้ไพรเมอร์ในงานวิจัยอื่นๆ	142
ภาคผนวก จ. ภาพกิจกรรมแสดงความเชื่อมโยงกับผู้เชี่ยวชาญภายนอก	150
ภาคผนวก ฉ. การสร้างความตระหนักเรื่องความจำเป็นของการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษ ต่อประเทศเพื่อนบ้าน	153
ภาคผนวก ช. บทความวิชาการ Pornjira Somnark, Natcha Chyerochana, Skorn Mongkolsuk, and Kwanrawee Sirikanchana (2018) Performance evaluation of <i>Bacteroidales</i> genetic markers for human and animal microbial source tracking in tropical agricultural watersheds. Environmental Pollution. 236C, 100-110. (impact factor 5.099)	155
ภาคผนวก ซ. บทความวิชาการ Pornjira Somnark, Natcha Chyerochana, Akechai Kongprajug, Skorn Mongkolsuk, and Kwanrawee Sirikanchana (2018) PCR data and comparative performance of <i>Bacteroidales</i> microbial source tracking genetic markers	167
ภาคผนวก ฅ. รายงานสรุปงานเสวนา “Thailand 4.0 กับนวัตกรรมการจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources”	182
ภาคผนวก ฅ1. รายชื่อผู้เข้าร่วมงานเสวนาฯ และอีเมลติดต่อ	215
ภาคผนวก ฅ2. เอกสารนำเสนอที่ 1 “มลพิษ non-point sources: ความท้าทายจากอดีตถึงปัจจุบัน” โดย ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน นักวิจัยชำนาญการ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ หัวหน้าโครงการ	220
ภาคผนวก ฅ3. เอกสารนำเสนอที่ 2 “นวัตกรรมการระบุแหล่งปล่อยมลพิษ ด้วย Microbial Source Tracking (MST)” โดย ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน และ ดร.ปิณดา สิลพนัง กำแพงทอง นักวิชาการสิ่งแวดล้อมชำนาญการ ส่วนแหล่งน้ำจืด กรมควบคุมมลพิษ, คณะผู้วิจัย	229
ภาคผนวก ฅ4. ประมวลภาพบรรยากาศงานเสวนาฯ	243
ภาคผนวก ญ ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์และแผนการดำเนินงานพร้อมทั้งขั้นตอนตลอดแผนการวิจัย	254

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า	
ตารางที่ 1	จำนวนตัวอย่างของแหล่งกำเนิดเป้าหมายและแหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมายจากกลุ่มน้ำท่าจีน	10
ตารางที่ 2	จำนวนตัวอย่างของแหล่งกำเนิดเป้าหมายและแหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมายจากกลุ่มน้ำเจ้าพระยา	10
ตารางที่ 3	รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์	13
ตารางที่ 4	รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ	17
ตารางที่ 5	รายละเอียดตำแหน่งสถานีเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำท่าจีน	22
ตารางที่ 6	แผนความถี่และสถานีในการเก็บตัวอย่างน้ำ	24
ตารางที่ 7	พารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่ทำการวิเคราะห์ วิธีเก็บตัวอย่างน้ำ และวิธีวิเคราะห์	25
ตารางที่ 8	จังหวัดในกลุ่มน้ำท่าจีน (สถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร (องค์การมหาชน) 2555)	27
ตารางที่ 9	ข้อมูลประชากรรายจังหวัดในปี 2558 (สำนักงานสถิติแห่งชาติ 2559)	29
ตารางที่ 10	ข้อมูลปศุสัตว์รายจังหวัดในปี 2558 (กรมปศุสัตว์ 2559)	29
ตารางที่ 11	จำนวนตัวอย่างที่วางแผนเก็บโดยแยกตามจังหวัด	30
ตารางที่ 12	สรุปจำนวนตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนรายจังหวัด	30
ตารางที่ 13	ผลการตรวจวัดตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์ ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดชนิดต่างๆ ด้วยวิธีพีซีอาร์	32
ตารางที่ 14	สรุปคู่ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดสำหรับแหล่งกำเนิดชนิดต่างๆ และค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ประเมินคู่ไพรเมอร์	34
ตารางที่ 15	พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับกราฟมาตรฐานของไพรเมอร์คู่ต่างๆ	36
ตารางที่ 16	ตารางแสดงค่าสถิติเชิงพรรณนาปริมาณ gene copies ในแต่ละไพรเมอร์ที่ตรวจพบในมูลสัตว์แต่ละชนิด และค่า adjusted p-value จากการทดสอบด้วย generalize wilcoxon test (nondetects analysis)	38
ตารางที่ 17	การประเมินประสิทธิภาพไพรเมอร์ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณของตัวอย่างในกลุ่มน้ำท่าจีน	41
ตารางที่ 18	การประเมินประสิทธิภาพไพรเมอร์ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณของตัวอย่างในกลุ่มน้ำเจ้าพระยา	42
ตารางที่ 19	พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการประเมินประสิทธิภาพและความเหมาะสมของเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ ของตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียจากกลุ่มน้ำท่าจีน	45
ตารางที่ 20	ราคาต้นทุนของเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ	46
ตารางที่ 21	ปริมาณน้ำฝนรายชั่วโมงสะสมหนึ่งวันก่อนวันเก็บตัวอย่าง (มิลลิเมตร)	49
ตารางที่ 22	ปริมาณน้ำฝนรายชั่วโมงสะสมห้าวันก่อนวันเก็บตัวอย่าง (มิลลิเมตร)	49
ตารางที่ 23	ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบบที่เรียด้วยวิธีพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิดรวม ชุมชน สุกร และโค จากตัวอย่างน้ำอุจจาระและอุจจาระทั้ง 4 รอบการเก็บตัวอย่าง	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ทางกายภาพ เคมีและชีววิทยาทั้งฤดูฝนและฤดูแล้ง ตัวเลขแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Kendall's Tau correlation coefficient) (*) แสดงค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$	66
ตารางที่ 25 ค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องสำหรับการวิเคราะห์กลุ่มแบบที่เรียกว่าจำเพาะกับแหล่งกำเนิดแบบเป็นขั้นตอน	70
ตารางที่ ก1 ดัชนีคุณภาพน้ำที่กำหนดในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน	83
ตารางที่ ก2 ดัชนีคุณภาพน้ำในมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล	86
ตารางที่ ก3 ดัชนีคุณภาพน้ำด้านจุลชีววิทยาในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค (กระทรวงอุตสาหกรรม 2521)	90
ตารางที่ ก4 ดัชนีคุณภาพน้ำทางบกตรีในมาตรฐานน้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (กระทรวงสาธารณสุข 2524)	91
ตารางที่ ก5 ดัชนีคุณภาพน้ำทางบกตรีในมาตรฐานน้ำบาดาลเพื่อการบริโภค (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม 2552)	91
ตารางที่ ญ1 กิจกรรมที่ดำเนินการในหกเดือนแรกเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย	255
ตารางที่ ญ2 กิจกรรมที่ดำเนินการในรอบหกเดือนที่สองเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย	257
ตารางที่ ญ3 กิจกรรมที่ดำเนินการในรอบหกเดือนที่สามเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย	259
ตารางที่ ญ4 กิจกรรมที่ดำเนินการในรอบหกเดือนสุดท้ายเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย	260
ตารางที่ ญ5 ผลที่ได้จากโครงการในหกเดือนแรก	262
ตารางที่ ญ6 ผลที่ได้จากโครงการในรอบหกเดือนที่สอง	263
ตารางที่ ญ7 ผลที่ได้จากโครงการในรอบหกเดือนที่สาม	263
ตารางที่ ญ8 ผลที่ได้จากโครงการในรอบหกเดือนสุดท้าย	264

สารบัญรูป

เรื่อง		หน้า
รูปที่ 1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ถูกสังเคราะห์เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานและตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดสอบ	17
รูปที่ 2	ตำแหน่งสถานีเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำท่าจีน	23
รูปที่ 3	ความเข้มข้นของโคลิฟอร์มทั้งหมดที่ตรวจวัดได้ จากข้อมูลกรมควบคุมมลพิษ ในฤดูฝน (a) และฤดูแล้ง (b)	23
รูปที่ 4	แผนผังแสดงการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวัดพารามิเตอร์คุณภาพน้ำต่างๆ	25
รูปที่ 5	แผนที่ลุ่มน้ำท่าจีน (สถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร (องค์การมหาชน) 2555)	28
รูปที่ 6	แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์	31
รูปที่ 7	กราฟมาตรฐานของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสุกร (a) น้ำเสียชุมชน (b) โค (c) รวมทุกแหล่งกำเนิด (d) และไก่ (e) ความแตกต่างทางสถิติของเส้นความชันทั้ง 4 เส้น เมื่อทดสอบด้วย analysis of covariance (ANCOVA)	35
รูปที่ 8	ปริมาณ gene copies ของดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสุกร (a) น้ำเสียชุมชน (b) โค (c) และรวมทุกแหล่งกำเนิด (d) ที่สามารถวัดได้ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ กราฟแสดง gene copies ที่วัดได้ในแต่ละตัวอย่างและค่าเฉลี่ย (—) ดอกจัน(*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณ gene copies เมื่อเทียบแหล่งกำเนิด เป้าหมายกับแหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมาย ($P < 0.05$, P-values adjusted by the holm method) ด้วยสถิติ generalize wilcoxon test (nondetects analysis)	37
รูปที่ 9	ความชุกสัมพัทธ์ของดีเอ็นเอเป้าหมายในมูลสุกร (a) น้ำเสียชุมชน (b) มูลโค (c) มูลไก่ (d) รวมทั้งมูลเป็ด กระบือ แกะ และแพะ (e) สีแดงหมายถึงมีความชุกสัมพัทธ์มากที่สุด และสีน้ำเงินหมายถึงมีความชุกสัมพัทธ์เป็นศูนย์	43
รูปที่ 10	แผนที่แสดงสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีน (a) เทียบกับสถานีตรวจวัดปริมาณน้ำฝนในลุ่มน้ำท่าจีน (1, 2, 3, 7, 8) และบริเวณใกล้เคียง (4, 5, 6) (b)	48
รูปที่ 11	พารามิเตอร์คุณภาพน้ำของตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำท่าจีน สำหรับฤดูฝนและฤดูแล้งของค่า pH (a), water temperature (b), salinity (c), conductivity (d), total coliforms (e), fecal coliforms (f), <i>E. coli</i> and enterococcus (g), dissolved oxygen (h), biochemical oxygen demand (i), total suspended solids and total dissolved solids (j), phosphate and total phosphorus (k) เส้นประแสดงค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินของแหล่งน้ำผิวดิน ประเภทที่ 3 (TC15-TC23) และประเภทที่ 2 (TC25-TC28) ตามลำดับ	50
รูปที่ 12	ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบบที่เรียกว่าวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิดรวม (universal) (a) ชุมชน (b) สุกร (c) และโค (d) จากตัวอย่างน้ำฤดูฝนและฤดูแล้งทั้ง 4 รอบการเก็บตัวอย่าง	52

สารบัญรูป (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 13 แผนที่ลำน้ำตามประเภทแหล่งน้ำและการเปลี่ยนแปลงแหล่งกำเนิดมลพิษในสถานีต่างๆ ในตัวอย่างน้ำฤดูฝน (a) และฤดูแล้ง (b)	56
รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์กลุ่มแบคทีเรีย bacteroidetes จากการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูล จากแหล่งกำเนิดรวม (universal) กับ total coliforms และ fecal coliforms ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้เป็นมาตรฐานคุณภาพน้ำ	57
รูปที่ 15 กราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพและเคมีที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างฤดูร้อนและฤดูฝน เมื่อทดสอบด้วย ANOVA สำหรับพารามิเตอร์ที่กระจายตัวแบบปกติ และ Kruskal-Wallis rank sum test สำหรับพารามิเตอร์ที่กระจายตัวไม่ปกติ boxplot แสดงค่ามัธยฐาน และเปอร์เซ็นต์ไทด์ที่ 75 และ 25 พลายเส้นปะแสดงค่าสูงสุดและต่ำสุด จุดสีดำแสดงค่า outlier และจุดสีขาวแสดงค่าเฉลี่ย	58
รูปที่ 16 กราฟแสดงการวิเคราะห์ด้วย Principal component analysis (PCA) ของค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ สำหรับตัวอย่างน้ำฤดูฝนโดยแสดงค่า Scree plot (a), กราฟ PCA แสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มระหว่างพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วย k-means clustering (b), % contribution ของพารามิเตอร์ต่างๆ ใน 5 dimensions แรก (c), และ cluster analysis ของสถานีเก็บตัวอย่างทั้ง 2 รอบในฤดูฝน (d)	59
รูปที่ 17 กราฟแสดงการวิเคราะห์ด้วย Principal component analysis (PCA) ของค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำสำหรับตัวอย่างน้ำฤดูแล้งโดยแสดงค่า Scree plot (a), กราฟ PCA แสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มระหว่างพารามิเตอร์ต่างๆ (b), % contribution ของพารามิเตอร์ต่างๆ ใน 5 dimensions แรก (c), และ cluster analysis ของสถานีเก็บตัวอย่างทั้ง 2 รอบในฤดูแล้ง (d)	61
รูปที่ 18 กราฟแสดงการวิเคราะห์ด้วย model-based clustering ของพารามิเตอร์และตัวอย่างน้ำจากสถานีต่างๆ โดยแสดงโมเดลและจำนวนกลุ่มที่เหมาะสมกับการจัดกลุ่มตัวอย่างน้ำจากสถานีต่างๆ ทั้ง 4 รอบการเก็บน้ำ (a) ผลการจัดกลุ่มตัวอย่างน้ำจากสถานีต่างๆ (b) โมเดลและจำนวนกลุ่มที่เหมาะสมกับการจัดกลุ่มพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ (c) และผลการจัดกลุ่มพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ (d) best model แสดงลักษณะของ model ที่ใช้ EEI คือ the volumes and shape of allclusters are equal, the orientation is the identity ในขณะที่ EII หมายถึง All mixture components are spherical and equal volume. ค่า BIC (Bayesian Information Criterion) มากบ่งชี้ว่าเป็น model ที่เหมาะสม	62
รูปที่ 19 Correlation plot ของพารามิเตอร์ทางชีวภาพทั้งฤดูฝน (a) และฤดูแล้ง (b) ตัวเลขแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Kendall's Tau correlation coefficient) Histogram แสดงการแจกแจงของข้อมูล (*) แสดงค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.5$	64
รูปที่ 20 แผนที่แสดงแหล่งกำเนิดมลพิษเทียบกับสถานีเก็บตัวอย่างน้ำ ในจังหวัดสมุทรสาคร (a), นครปฐม (b), สุพรรณบุรี (c), และชัยนาท (d) (กรมควบคุมมลพิษ 2558)	67
รูปที่ 21 แผนที่แสดงการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์แบคทีเรียตามมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินและกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด	69

สารบัญรูป (ต่อ)

เรื่อง		หน้า
รูปที่ ก1	ความเชื่อมโยงของแหล่งกำเนิดมลพิษที่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำและดัชนีคุณภาพน้ำที่เกี่ยวข้อง	92
รูปที่ จ1	ภาพกิจกรรมสัมมนา เรื่อง Solutions to faecal water pollution: the development and successful application of Microbial Source Tracking in UK and Europe เมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน 2560 ณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์	150
รูปที่ จ2	กิจกรรมนำ Dr. James Ebdon สํารวจพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน, บน - ปากคลองมะขามเฒ่า ต้นกำเนิดแม่น้ำท่าจีน (ซ้าย) ที่แยกออกจากแม่น้ำเจ้าพระยา (ขวา), ล่าง – ลักษณะพื้นที่ใช้สอยริมแม่น้ำท่าจีน ช่วง จ. สุพรรณบุรี ระหว่างตำบลสนามชัย อำเภอมือง จนถึง ตำบลบางปลาหมอ อำเภอบางปลาหมอ	151
รูปที่ ฉ1	ภาพกิจกรรมสัมมนา เรื่อง Solutions to faecal water pollution: the development and successful application of Microbial Source Tracking in UK, Europe, and Thailand โดย Dr. James Ebdon, Dr. Han Tran, และ ดร.ขวัญวิ สิริกาญจน เมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2559 ณ Ho Chi Minh International University สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม	153
รูปที่ ฉ2	กิจกรรมสำรวจพื้นที่ลุ่มน้ำ Thi Tinh River ในเขต Ben Cat เมือง Binh Dong City สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม	154

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

แหล่งน้ำจืดในประเทศไทย ประสบปัญหาความเสื่อมโทรมของคุณภาพน้ำมาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการเติบโตของชุมชนเมือง การขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม และการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยการติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำทั่วประเทศ ปี พ.ศ. 2557 พบว่า ร้อยละ 22 มีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์เสื่อมโทรม โดยพารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่มีปัญหา ได้แก่ ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (BOD) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์มและโคลิฟอร์มทั้งหมด (FCB,TCB) และแอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) (กรมควบคุมมลพิษ 2558) โดยพารามิเตอร์คุณภาพน้ำเหล่านี้ แสดงถึงภาพรวมของสถานการณ์คุณภาพน้ำจากแหล่งกำเนิดมลพิษที่ทราบจุดแน่นอน (point sources) และแหล่งกำเนิดมลพิษที่ไม่ทราบจุดแน่นอน (non-point sources) แต่ยังไม่สามารถระบุที่มาของแหล่งกำเนิดมลพิษที่แม่นยำรายกิจกรรมได้

FCB และ TCB เป็นดัชนีที่ใช้บ่งชี้คุณภาพน้ำทางชีววิทยา โดยบ่งบอกถึงการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูล (fecal indicator) ได้แก่ อุจจาระและของเสียจากมนุษย์และสัตว์ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าน้ำนั้นอาจมีการปนเปื้อนจากเชื้อก่อโรคที่มาจากสิ่งปฏิกูลและส่งผลกระทบต่อสุขภาพสาธารณะ (public health) แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด หรือ TCB (total coliform bacteria) หมายถึงแบคทีเรียแกรมลบ ที่ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ ไม่มีเอนไซม์ออกซิเดส เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศก็ได้ (facultative anaerobe) สามารถหมักแลคโตสโดยใช้เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสให้เป็นกรดและแก๊สภายใน 24-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส TCB เองยังไม่ถือว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่บ่งชี้การปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลได้ดีพอ สำหรับแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่ทนอุณหภูมิสูงได้ (thermotolerant coliforms) หรือเรียกว่า fecal coliforms (FCB) คือกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่สามารถย่อยแลคโตสไปเป็นกรดและแก๊สได้ที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส ภายใน 24±2 ชั่วโมง โดยเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่บ่งชี้ว่าน้ำนั้นมีการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูล (fecal pollution) (Ashbolt et al., 2001) มาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินของประเทศไทย ฉบับปัจจุบัน (พ.ศ. 2537) ได้กำหนดค่า TCB ที่ 5,000 และ 20,000 เอ็มพีเอ็นต่อ 100 มล. และกำหนดค่า FCB ที่ 1,000 และ 4,000 เอ็มพีเอ็นต่อ 100 มล. สำหรับแหล่งน้ำประเภทที่ 2 และ 3 ตามลำดับ (ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8) โดยค่าที่กำหนดนี้เป็นค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 80 จากจำนวนตัวอย่างน้ำทั้งหมดที่เก็บมาตรวจสอบอย่างต่อเนื่อง โดยแหล่งน้ำผิวดินประเภทที่ 2 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ (1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติ และผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน (2) การอนุรักษ์สัตว์น้ำ (3) การประมง และ (4) การว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ ส่วนแหล่งน้ำผิวดินประเภทที่ 3 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ (1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน และ (2) การเกษตร การวิเคราะห์ค่า TCB และ FCB กำหนดให้ใช้วิธี Multiple tube fermentation technique ซึ่งให้อ้างอิงตาม Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (Eaton et al., 2005) หลักการวิเคราะห์โดยย่อ คือ ทดสอบแบคทีเรียที่ย่อยแลคโตสได้ที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส ให้เป็นกรดและแก๊ส และถ่ายเชื้อหรือของเหลวบางส่วนจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดแก๊สลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green lactose bile broth (BGLB) ทำการเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียส และอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium ที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส ซึ่งแก๊สที่เกิดในหลอดของอาหาร BGLB แสดงว่ามาจาก TCB และแก๊สที่เกิดในหลอดของอาหาร EC medium แสดงว่ามาจาก FCB จากนั้นนำจำนวนหลอดที่เกิดแก๊ส เทียบหาค่าเอ็มพีเอ็นได้จากตารางดัชนีเอ็มพีเอ็น ในปัจจุบัน พารามิเตอร์ที่แนะนำสำหรับตรวจวัดคุณภาพน้ำผิวดินของสหรัฐอเมริกาและยุโรป คือ แบคทีเรียอีโคไล และเอ็นเทอโรคอคคัส (European Union, 2006; United States

Environmental Protection Agency, 2012) เนื่องจากเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้บ่งชี้การปนเปื้อนสิ่งปฏิกูล (fecal pollution) จากสัตว์เลื้อยคืบได้และให้ผลแม่นยำกว่า TCB และ FCB แม้ว่า TCB และ FCB ยังคงเป็นพารามิเตอร์คุณภาพน้ำผิวดินในบางพื้นที่ เช่น รัฐมินเนโซตา รัฐฟลอริดา เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ปัญหาการปนเปื้อนแบคทีเรีย FCB และ TCB ยังมีข้อถกเถียงของแหล่งที่มาว่า มาจากน้ำเสียชุมชนที่ไม่ได้รับการบำบัด น้ำเสียของปศุสัตว์ หรือเป็นเพียงแบคทีเรียที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ส่งผลถึงการจัดการคุณภาพน้ำและการแก้ไขปัญหามลพิษทางน้ำไม่สามารถระบุกิจกรรมที่ก่อให้เกิดปัญหาหลักได้ตามสัดส่วนการปล่อยมลพิษที่แท้จริง

การนำแบคทีเรียมาใช้จำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษรายกิจกรรม หรือ microbial source tracking (MST) เป็นการศึกษาความจำเพาะของแบคทีเรียที่อาศัยในลำไส้คนและสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น สุกร โค ไก่ แพะ แกะ เป็นต้น (Field and Samadpour, 2007; Han Tran et al., 2015; Sargent et al., 2011) กล่าวคือ การตรวจเจอแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวอย่างน้ำจะบ่งชี้ได้ว่าน้ำนั้นมีการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลจากสัตว์ประเภทนี้ การศึกษาความจำเพาะของแบคทีเรียต่อคนหรือสัตว์ชนิดต่างๆ อาจทำได้ในระดับ bacterial orders, หรือ species, หรือลงไปถึงระดับ strains โดยแบคทีเรียกลุ่มที่มีการศึกษากันแพร่หลาย ได้แก่กลุ่ม Bacteroidales, Bifidobacterium, Enterococcus เป็นต้น (Harwood et al., 2014) อย่างไรก็ตาม ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งประสบความสำเร็จในการนำเทคนิค MST มากำหนดนโยบายการจัดการมลพิษในแหล่งน้ำ ได้ทำการวิเคราะห์และพบว่าการตรวจวัด Bacteroidales มีความเหมาะสมมากที่สุด (Environment Agency, 2008) โดยข้อดีของการตรวจวัด Bacteroidales คือ เนื่องจากเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) จึงไม่พบปัญหาการเพิ่มจำนวนในแหล่งน้ำ (regrowth) การตรวจวัดเชื้อ Bacteroidales นิยมใช้วิธีตรวจวัดทางดีเอ็นเอ ซึ่งได้แก่เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และพีซีอาร์เชิงปริมาณ (quantitative PCR or real-time PCR) เนื่องจากหลีกเลี่ยงความยุ่งยากในการเพาะเชื้อด้วยสภาพไร้อากาศในห้องปฏิบัติการ

เทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีทางชีวโมเลกุลที่ใช้ตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) โดยใช้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการ ด้วยการจับกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น ไพรเมอร์ คือ ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้นๆ ประมาณ 18-25 เบส ที่สามารถจับกับส่วนปลายของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ด้วยการใช้เบสคู่สมกับดีเอ็นเอส่วนปลายนั้น ดังนั้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จึงต้องใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 เส้น เรียกว่า forward primer และ reverse primer ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน เป็นลักษณะวนต่อเนื่องกันไปหลายรอบ (cycles) โดยใน 1 รอบประกอบด้วย ขั้นตอนที่ 1 คือ denaturation เป็นการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนที่ 2 คือ annealing เป็นการลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์มาจับกับส่วนปลายของดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการ และขั้นตอนที่ 3 คือ primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้ และผลการพบหรือไม่พบดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่าง แสดงผลด้วยแบนด์ ดีเอ็นเอบนเจล ผลที่ได้จึงเป็นเชิงคุณภาพ (พบหรือไม่พบ) ส่วนเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณใช้หลักการคล้ายกัน คือ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการจับกับไพรเมอร์จำเพาะ และสามารถแสดงผลเชิงปริมาณได้ โดยใช้ Taqman probe ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ เพิ่มเติมเพื่อจับกับส่วนกลางของดีเอ็นเอเป้าหมาย และ probe นี้ได้เชื่อมกับสารเรืองแสง ซึ่งเครื่องมือสามารถตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสงเพื่อคำนวณกลับมาเป็นความเข้มข้นดีเอ็นเอเป้าหมายในตัวอย่างได้ด้วยการใช้ standard curves โดยสามารถแสดงผลในหน่วย gene copies per ml ข้อได้เปรียบของเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ คือ สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นดีเอ็นเอในปริมาณน้อยมากได้ แต่จะมีราคาต้นทุนสูงกว่าเทคนิคพีซีอาร์ธรรมดา นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าเทคนิคทั้งสองประเภทนี้ มีไพรเมอร์เป็นส่วนประกอบสำคัญในปฏิกิริยาการออกแบบไพรเมอร์ สามารถทำได้หากทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย และปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ลักษณะทางเทคนิคของไพรเมอร์ที่ดี ประกอบด้วย 1. ขนาดความยาวที่เหมาะสมคือ 18-24 เบส ต่อเส้น 2. ประกอบด้วย G+C ประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ 3. ไม่มีโครงสร้างทุติยภูมิเกิดขึ้นภายในสายของไพรเมอร์ 4. ลำดับเบสบริเวณปลายทั้งคู่ไม่ควรมีเบสคู่สมกัน เพื่อป้องกันการจับกันเอง (primer dimer) และ 5. melting

temperature (T_m) ซึ่งหมายถึง อุณหภูมิที่ทำให้ 50 เปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์แยกเป็นสายเดี่ยว และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ ยังคงเป็นสายคู่ โดย (T_m) ของไพรเมอร์ทั้งสองเส้นมีค่าใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วง 55-65 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ ในส่วนของการนำวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณมาใช้ตรวจหาดีเอ็นเอส่วนที่จำเพาะกับสิ่งปฏิจุลจากสัตว์แต่ละชนิดนั้น การประเมินคู่ไพรเมอร์ที่ดี ใช้พารามิเตอร์ 2 ค่า คือ ความจำเพาะ (specificity) หมายความว่า ไพรเมอร์คู่ที่นำมาใช้นั้น ต้องสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอจากสัตว์ที่เราต้องการได้เพียงชนิดเดียว และ ความไว (sensitivity) หมายถึง ไพรเมอร์คู่ที่ทดสอบนี้ ต้องสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอจากสัตว์ชนิดที่เราต้องการ ได้ในทุกตัวอย่างที่มาจากสัตว์ชนิดนี้

ในงานวิจัยที่ผ่านมา มีการใช้ทั้งเทคนิคพีซีอาร์ธรรมดา และเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ ในการวัดดีเอ็นเอ เป้าหมายของแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidales เพื่อใช้จำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษ นอกจากนี้ การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอสามารถเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานาน และสามารถนำมาตรวจวัดผลได้ใหม่หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติม ตัวอย่างเช่น หากใช้วิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดจากสุกรแล้วพบในปริมาณมากในตัวอย่างน้ำเมื่อเทียบกับแหล่งกำเนิดจากชุมชน หรือโค แสดงว่าแหล่งกำเนิดหลักมาจากฟาร์มสุกรในบริเวณพื้นที่ แต่หากตรวจวัดแล้วพบว่าทั้งกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับทั้งสามแหล่งกำเนิดข้างต้นพบในปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำ ก็สามารถนำวิธีที่มีอยู่แล้วหรือพัฒนาวิธีใหม่ในการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดชนิดอื่นมาตรวจสอบในภายหลังได้ การตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียด้วยดีเอ็นเอ จึงเป็นกระบวนการตรวจวัดแบบเป็นขั้นตอน ซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพในการหาแหล่งกำเนิดได้อย่างแม่นยำเพื่อการจัดการแหล่งน้ำอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

การนำกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษ มากำหนดนโยบายเพื่อใช้เป็นพารามิเตอร์สนับสนุนกลุ่มพารามิเตอร์แบคทีเรียตามมาตรฐานน้ำผิวดิน มีให้เห็นอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการนำมาใช้ในการกำหนดค่าสูงสุดรายวันที่ยินยอมให้มลพิษปล่อยลงแหล่งน้ำนั้นๆ หรือ total maximum daily loads (TMDLs) โดยช่วยในการประเมินแหล่งกำเนิดมลพิษได้อย่างแม่นยำและสามารถบอกแหล่งกำเนิดหลักเทียบกับแหล่งกำเนิดรองอื่นๆได้ และส่งผลให้สามารถลดปริมาณมลพิษลงสู่แหล่งน้ำได้จากแหล่งกำเนิดที่ถูกต้อง ยกตัวอย่างเช่น รัฐเวอร์จิเนีย ได้ใช้ MST เพื่อคำนวณว่าการปนเปื้อน TCB มาจากแหล่งกำเนิดใดในปริมาณเท่าไรเปรียบเทียบกัน และวิเคราะห์ว่าหากลดการปนเปื้อนจากแหล่งกำเนิดเหล่านี้จะสามารถลดความสกปรกของแหล่งน้ำลงได้เท่าไร นอกจากนี้ยังมีการใช้ MST ในการจัดการมลพิษในแหล่งน้ำในรัฐ Idaho, Oregon, New Mexico, New Hampshire, Michigan, และ South Dakota เป็นต้น (United States Environmental Protection Agency, 2011; Benham et al., 2011) นอกจากนี้ หน่วยงานด้านสิ่งแวดล้อมของประเทศอังกฤษและเวลส์ หรือ Environment Agency ได้เป็นแกนนำสำคัญในการพัฒนาและนำงานด้าน MST มาช่วยในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ในประเทศไอร์แลนด์ ฝรั่งเศส โปรตุเกส และสหราชอาณาจักร ดังรายงานในปี 2008 โดยได้รายงานว่าการใช้การตรวจวัดดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย Bacteroidetes ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด และได้พัฒนาการตรวจวัดด้วยวิธีดังกล่าวและกำหนดแนวทางการนำไปใช้เป็นขั้นตอนการตรวจประจำสำหรับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในแหล่งน้ำ เพื่อเรียงลำดับแหล่งกำเนิดมลพิษที่สำคัญอันนำไปสู่การเรียงลำดับการจัดการแหล่งกำเนิดก่อนหลังได้ อย่างไรก็ตาม รายงานได้เน้นย้ำว่าผลการวิเคราะห์แหล่งกำเนิดจะเป็นลักษณะกึ่งเชิงปริมาณ โดยเป็นการเปรียบเทียบกันระหว่างแหล่งกำเนิด แต่จะนำไปสู่การพัฒนาต่อไปสู่เทคนิคที่สามารถคำนวณเชิงปริมาณได้แน่นอนว่าแหล่งกำเนิดใดปลดปล่อยมลพิษออกสู่แหล่งน้ำเป็นปริมาณเท่าใด (Environment Agency, 2008)

นอกเหนือจากประโยชน์ด้านการจำแนกแหล่งปล่อยมลพิษแล้ว การทราบแหล่งกำเนิดมลพิษสามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบการคำนวณความเสี่ยงต่อสุขภาพได้ด้วย เนื่องจากสิ่งปฏิจุลหรือมลพิษที่ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำมีโอกาสที่จะนำพาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลงสู่แหล่งน้ำนั้นๆด้วย โดยโอกาสการปนเปื้อนชนิดและปริมาณของเชื้อก่อโรคก็แตกต่างกันไปขึ้นกับประเภทแหล่งกำเนิด เช่น มีรายงานว่าน้ำเสียชุมชนที่ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำมีความเสี่ยงต่อสุขภาพใกล้เคียงกับการปนเปื้อน

ของมูลโคลงสู่แหล่งน้ำ ในขณะที่การปนเปื้อนจากมูลไก่ สุกร และนกนางนวล (gulls) มีความเสี่ยงต่อสุขภาพในระดับที่ต่ำกว่า เป็นต้น (Soller et al., 2010) ดังนั้น การทราบข้อมูลแหล่งกำเนิดมลพิษ จะช่วยในการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพได้อย่างแม่นยำมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งน้ำประเภทที่ 2 ที่มีการใช้ประโยชน์ด้านการว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ ที่อาจมีการสัมผัสน้ำโดยตรง หรือในแหล่งน้ำประเภทที่ 3 ที่นำน้ำมาใช้ในการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการรดน้ำผักผลไม้ที่เน้นการรับประทานสดเป็นผักสลัด เป็นต้น รวมทั้งการประเมินระดับของเทคโนโลยีของกระบวนการฆ่าเชื้อโรคและกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำก่อนนำไปอุปโภคบริโภค ตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนเชื้อโรค เป็นต้น

แม้ในต่างประเทศจะมีการพัฒนาวิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษมาแล้ว แต่มีการรายงานว่า เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีความหลากหลายและแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ อันอาจเนื่องมาจากสภาพอากาศ ลักษณะอาหารของแต่ละท้องถิ่น (เนื่องจากเป็นแบคทีเรียในลำไส้ อาหารที่ทานจึงมีผลต่อปริมาณและชนิดของแบคทีเรีย) การรับประทานยาปฏิชีวนะ และสภาพเฉพาะท้องถิ่นอื่นๆ (Adami and Cavazzoni, 1999; Looft et al., 2014; Lu et al., 2014; Mah et al., 2008) ดังนั้น การตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิด จึงมีประสิทธิภาพแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ตัวอย่างเช่น Bernhard and Field (2000) ได้พัฒนาวิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรีย Bacteroidales ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ชื่อ HF183 ซึ่งได้รับการทดสอบในสหรัฐอเมริกาว่าใช้จำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษจากคนและจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant) ได้ผลดีมาก (Bernhard and Field, 2000) ต่อมาไพรเมอร์ HF 183 ได้รับการพัฒนาให้ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ เพื่อเพิ่มความแม่นยำและสามารถตรวจในแหล่งน้ำที่มีความสกปรกน้อยๆได้ และไพรเมอร์นี้ได้ถูกนำไปใช้ในประเทศต่างๆ โดยประเทศที่แสดงผลการใช้ว่าได้ผลดี ได้แก่ ออสเตรเลีย (Ahmed et al., 2009) ฝรั่งเศส (Gawler et al., 2007; Gourmelon et al., 2007) ไอร์แลนด์ (Gawler et al., 2007) โปรตุเกส (Gawler et al., 2007) สหราชอาณาจักร (Gawler et al., 2007) และเบลเยียม (Seurinck et al., 2005) ในขณะที่ประเทศที่นำไพรเมอร์ HF183 ไปใช้แต่ให้ผลการจำแนกแหล่งกำเนิดไม่เป็นที่พอใจ ได้แก่ อินเดีย (Odagiri et al., 2015) และเคนยา (Jenkins et al., 2009) เป็นต้น อนึ่งมีข้อสังเกตว่า กลุ่มประเทศที่มีอาณาบริเวณใกล้เคียงกันมีแนวโน้มที่จะสามารถตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มเดียวกันได้ กล่าวคือ สามารถใช้วิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่พัฒนาในประเทศหนึ่งไปใช้ทดสอบน้ำในประเทศข้างเคียงได้ ดังแสดงให้เห็นในประเทศแถบยุโรป เป็นต้น ดังนั้น หากประเทศไทยมีการพัฒนาวิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษได้สำเร็จ ประเทศไทยก็จะเป็นผู้มีส่วนสำคัญในการนำไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมามีโอกาสนำไปใช้ได้ในประเทศในแถบอาเซียนได้ โดยจะต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมในภาคสนามเพื่อยืนยันและคำนวณประสิทธิภาพของวิธีตรวจวัดต่อไป

ในกลุ่มประเทศเขตร้อนเองนั้นได้มีการพัฒนาและทดสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอในสิ่งปฏิกูลจากคนและสัตว์ชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่น Odagiri และคณะ (2015) ได้ทดสอบเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณในประเทศอินเดีย (Odagiri et al., 2015) โดยมีการนำไพรเมอร์หลายๆคู่มาใช้ และได้ผลดีในประเทศอินเดีย ได้แก่ BacUni ที่ใช้สำหรับตรวจหาดีเอ็นเอ 16s rRNA gene ของแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidales ที่จำเพาะกับ fecal pollution โดยไม่เจาะจงชนิดสัตว์ต้นกำเนิดนั้น ซึ่งได้รับการพัฒนาที่รัฐแคลิฟอร์เนีย (Kildare et al., 2007), BacCan ที่ใช้สำหรับตรวจหาดีเอ็นเอ 16s rRNA gene ของแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidales ที่จำเพาะกับสุนัข ซึ่งได้รับการพัฒนาที่รัฐแคลิฟอร์เนีย (Kildare et al., 2007) เป็นต้น ในขณะที่ไพรเมอร์หลายๆคู่ ที่ใช้บ่งชี้ human fecal pollution กลับใช้ได้ผลไม่ดีที่ประเทศอินเดีย เช่น ไพรเมอร์ HF183 ที่ใช้สำหรับตรวจหา 16s rRNA gene ของแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidales ซึ่งได้รับการพัฒนาจากรัฐออเรกอน (Bernhard and Field, 2000), ไพรเมอร์ BacHum-UCD ที่ใช้สำหรับตรวจหา 16s rRNA gene ของแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidales ซึ่งได้รับการพัฒนาจากรัฐแคลิฟอร์เนีย (Kildare et al., 2007), ไพรเมอร์ HumM2 ที่ใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอสำหรับสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโพลีแซคคาไรด์และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของผิวแบคทีเรีย Bacteroidales (Shanks et al., 2009) นอกจากนี้ ยังมีไพรเมอร์ BacCow-UCD ที่พัฒนาจากรัฐแคลิฟอร์เนีย (Kildare et al., 2007) โดยตรวจวัด 16s rRNA gene ของแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidales ที่แสดงความจำเพาะกับสัตว์เคี้ยวเอื้อง ได้แก่ โค กระบือ แพะ และแกะ ได้ดีเมื่อทดสอบในรัฐ

แคลิฟอร์เนีย แต่เมื่อนำมาใช้ที่ประเทศอินเดีย กลับสามารถตรวจวัดแบคทีเรียในมูลสุนัขและไก่ ได้เพิ่มเติมด้วย สำหรับตัวอย่างประเทศในเขตร้อนอีกประเทศได้แก่ ประเทศเคนยา ซึ่ง Jenkins และคณะ (2009) ได้ศึกษาการตรวจวัดแบคทีเรียที่จำเพาะกับสิ่งปฏิกูลด้วยเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณในประเทศเคนยา และพบว่า ไพรเมอร์ BacUni ตรวจวัด fecal pollution และไพรเมอร์ BacCow ที่จำเพาะกับสิ่งปฏิกูลจากโคนั้น ได้ผลดีมากเทียบเท่ากับที่รัฐแคลิฟอร์เนียที่เป็นพื้นที่ที่ได้รับการพัฒนาไพรเมอร์นี้ขึ้นมา ส่วนไพรเมอร์ HF183 มีประสิทธิภาพพอใช้ในประเทศเคนยา ในขณะที่ไพรเมอร์ BacHum ใช้ได้ผลไม่มีประสิทธิภาพอย่างมาก ดังนั้นจะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มว่าไพรเมอร์บางคู่ที่ได้รับการพัฒนาในประเทศเขตร้อนที่ห่างไกลออกไป สามารถนำมาใช้ได้ดีในประเทศเขตร้อน แต่ในขณะที่บางไพรเมอร์ใช้ไม่ได้ผลเลย จึงต้องมีการทดสอบประเมินก่อน

Tran และคณะ (2015) ได้แนะนำว่า การศึกษากลุ่มแบคทีเรียเพื่อใช้จำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษ ควรศึกษาในระดับพื้นที่ที่ประสบปัญหา กล่าวคือ เริ่มจากการเลือกพื้นที่ศึกษา จากนั้นระบุปัญหาที่ต้องการแก้ไข เช่น ต้องการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษจากคนหรือจากสัตว์โดยไม่ระบุชนิดของสัตว์ หรือในบางกรณีอาจต้องมีการระบุชนิดประเภทของสัตว์ เนื่องจากมีกิจกรรมเลี้ยงสัตว์หลากหลายประเภทในพื้นที่ เป็นต้น จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างมูลจากแหล่งกำเนิดประเภทต่างๆ ในพื้นที่ โดยควรกำหนดจำนวนตัวอย่างของแหล่งกำเนิดแต่ละประเภทเป็นสัดส่วนกับแหล่งกำเนิดทั้งหมดในพื้นที่ จากนั้นทำการพัฒนาวิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียและทดสอบกับแหล่งน้ำในพื้นที่นั้น เพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์และชี้แจงแหล่งกำเนิดหลักๆ ตามสัดส่วนต่อไป (Han Tran et al., 2015) แม้ในประเทศสหราชอาณาจักรก็ทำตามขั้นตอนดังกล่าวและประสบความสำเร็จในการกำหนดการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดเป็นการตรวจวัดพื้นฐาน (routine procedures) ในแหล่งน้ำในประเทศ โดยตรวจวัดเชื้อ Bacteroides ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Environment Agency, 2008)

จากผลสำเร็จในการนำวิธีทางห้องปฏิบัติการมาใช้สนับสนุนนโยบายการควบคุมคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินของหลายประเทศในช่วงที่ผ่านมา ทำให้มั่นใจได้ว่ากระบวนการพัฒนาการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดจะประสบความสำเร็จเช่นเดียวกันในประเทศไทย และจะส่งผลประโยชน์อย่างยิ่งต่อการแก้ปัญหามลพิษในแหล่งน้ำได้ จึงถือเป็นความจำเป็นเร่งด่วนที่ประเทศไทยควรจัดทำแนวทางการนำกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมมาเป็นตัวสนับสนุนกลุ่มพารามิเตอร์แบคทีเรียที่กำหนดในมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินในปัจจุบัน โดยโครงการวิจัยนี้จะเป็นการเชื่อมโยงองค์ความรู้ที่ได้จากการพัฒนาวิธีการในห้องปฏิบัติการมาใช้ทดสอบกับพื้นที่ที่ประสบปัญหาจริงในประเทศไทย และนำข้อมูลที่ได้ดังกล่าวมากำหนดเป็นแนวทาง เพื่อการนำไปสู่การผลักดันการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดเพื่อประกอบการตรวจวัดคุณภาพน้ำเป็นประจำต่อไป

แม่น้ำท่าจีน เป็นแหล่งน้ำหนึ่งที่พบปัญหาค่า FCB และ TCB เกินมาตรฐาน โดยเฉพาะในเขตแม่น้ำท่าจีนตอนบนและตอนกลาง ซึ่งมีกิจกรรมการเกษตรการเลี้ยงสัตว์และชุมชนเป็นส่วนใหญ่ จากรายงานสถานการณ์มลพิษของ ประเทศไทย ปี 2557 (กรมควบคุมมลพิษ 2558) พบว่า แม่น้ำท่าจีนตอนบน ซึ่งได้รับการประกาศให้เป็นแหล่งน้ำ ประเภทที่ 2 เพื่อการอนุรักษ์สัตว์น้ำ การประมง การว่ายน้ำ และกีฬาทางน้ำ แต่พบปัญหาค่าพารามิเตอร์ DO, BOD, TCB, FCB เกินมาตรฐานเทียบเท่าแหล่งน้ำประเภทที่ 4 เพื่อการอุตสาหกรรม โดยบริเวณที่พบปัญหา คือ อำเภอเมือง และอำเภอสามชูก จังหวัดสุพรรณบุรี นอกจากนี้ แม่น้ำท่าจีนตอนกลาง ซึ่งได้รับการประกาศให้เป็นแหล่งน้ำประเภทที่ 3 เพื่อการเกษตร แต่พบปัญหาค่าพารามิเตอร์ DO, BOD, TCB เกินมาตรฐานเทียบเท่าแหล่งน้ำประเภทที่ 4 ในเขตอำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม และอำเภอเมืองและอำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี โดยทั้งแม่น้ำท่าจีนตอนบนและตอนกลาง พบว่าแหล่งกำเนิดมลพิษมาจากชุมชนและการเกษตร (รวมการเลี้ยงสัตว์) เป็นส่วนมาก ในขณะที่แม่น้ำท่าจีนตอนล่างซึ่งได้รับการ ประกาศ ให้เป็นแหล่งน้ำประเภทที่ 4 เพื่อการอุตสาหกรรม พบปัญหาค่าพารามิเตอร์ DO, BOD เกินมาตรฐานแหล่งน้ำ ประเภทที่ 4 โดยบริเวณที่พบปัญหา คือ ตั้งแต่บริเวณอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร ถึง อำเภอนครไชยศรี จังหวัดนคร ปฐม โดยแหล่งกำเนิดมลพิษที่สำคัญมาจากชุมชน เกษตร และอุตสาหกรรม ดังนั้น กลุ่มน้ำท่าจีนจึงเหมาะสมอย่างมากในการเป็นพื้นที่ศึกษาการใช้กลุ่ม

แบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดได้ เนื่องจากเหตุผล 2 ประการ คือ 1. พบปัญหาค่า FCB และ TCB เกินมาตรฐานในแม่น้ำท่าจีน 2. กลุ่มน้ำท่าจีนมีกิจกรรมที่หลากหลายที่เป็นแหล่งปล่อยมลพิษค่าโคลิฟอร์ม ซึ่งได้แก่ ชุมชนและการเลี้ยงสัตว์ประเภทต่างๆ

โครงการวิจัยนี้ จะทำการพัฒนาการตรวจวัดมลพิษทางน้ำกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้ microbial source tracking ที่สามารถนำไปสู่การระบุแหล่งที่มาของปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียและสิ่งปฏิจุลินทรีย์ในลำน้ำในแต่ละพื้นที่ได้ว่า มาจากกิจกรรมใดได้อย่างแม่นยำ สนับสนุนการกำหนดนโยบายด้านการจัดการคุณภาพน้ำและลดมลพิษจากแหล่งกำเนิดได้อย่างเป็นรูปธรรม และเป็นการใช้งบประมาณอย่างมีประสิทธิภาพในการกำหนดกิจกรรมเร่งด่วนในการใช้แก้ไขปัญหาในแต่ละพื้นที่ได้

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ (2558) รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย พ.ศ. 2557. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2537) ออกตามความในพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 111 ตอนที่ 16 ง ลงวันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2537
- Adami, a, Cavazzoni, V., 1999. Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. J. Basic Microbiol. 39, 3–9.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Powell, D., Gardner, T., 2009. Evaluation of multiple sewage-associated *Bacteroides* PCR markers for sewage pollution tracking. Water Res. 43, 4872–4877. doi:10.1016/j.watres.2009.08.042
- Ahmed, W., Stewart, J., Powell, D., Gardner, T., 2008. Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution. Lett. Appl. Microbiol. 46, 237–242. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02287.x
- Ashbolt, N., Grabow, W., Snozzi, M., 2001. Chapter 13 Indicators of microbial water quality, in: Fewtrell, L., Bartram, J. (Eds.), Water Quality: Guidelines, Standards and Health. IWA Publishing, London, UK, pp. 289–316.
- Ballesté, E., Bonjoch, X., Belanche, L. a., Blanch, A.R., 2010. Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1789–1795. doi:10.1128/AEM.02350-09
- Benham, B., Krometis, L.-A., Yagow, G., Kline, K., and Dillaha, T. (2011) Chapter 14 Applications of Microbial Source Tracking in the TMDL Process. In Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies. Editors Charles Hagedorn, Anicet R. Blanch, and Valerie J. Harwood. Springer New York.
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4571–4574. doi:10.1128/AEM.66.10.4571-4574.2000

- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., and Greenberg, A.E. (2005) Method 9221. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 21st edition. APHA : American Public Health Association ,AWWA : American Water Works Association and WEF : Water Environment Federation
- Environment Agency, 2008. Using Science to Create a Better Place Microbial Source-Tracking project Science report: SC070003.
- European Union, 2006. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Official Journal of the European Union.
- Field, K.G., Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* 41, 3517–3538. doi:10.1016/j.watres.2007.06.056
- Gawler, A.H., Beecher, J.E., Brandão, J., Carroll, N.M., Falcão, L., Gourmelon, M., Masterson, B., Nunes, B., Porter, J., Rincé, A., Rodrigues, R., Thorp, M., Walters, J.M., Meijer, W.G., 2007. Validation of host-specific Bacteroidales 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Res.* 41, 3780–4. doi:10.1016/j.watres.2007.01.028
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Sgura, R., Le Mennec, C., Lozach, S., Piriou, J.Y., Rince, A., 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4857–4866. doi:10.1128/AEM.03003-06
- Han Tran, N., Yew-Hoong Gin, K., Hao Ngo, H., 2015. Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Sci. Total Environ.* 538, 38–57. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.155
- Harwood, V.J., Staley, C., Badgley, B.D., Borges, K., Korajkic, A., 2014. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1–40. doi:10.1111/1574-6976.12031
- Jenkins, M.W., Tiwari, S., Lorente, M., Gichaba, C.M., Wuertz, S., 2009. Identifying human and livestock sources of fecal contamination in Kenya with host-specific Bacteroidales assays. *Water Res.* 43, 4956–4966. doi:10.1016/j.watres.2009.07.028
- Kildare, B.J., Leutenegger, C.M., McSwain, B.S., Bambic, D.G., Rajal, V.B., Wuertz, S., 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: A Bayesian approach. *Water Res.* 41, 3701–3715. doi:10.1016/j.watres.2007.06.037

- Looft, T., Allen, H.K., Cantarel, B.L., Levine, U.Y., Bayles, D.O., Alt, D.P., Henrissat, B., Stanton, T.B., 2014. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J.* 8, 1566–76. doi:10.1038/ismej.2014.12
- Lu, X.M., Lu, P.Z., Zhang, H., 2014. Bacterial communities in manures of piglets and adult pigs bred with different feeds revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2657–2665. doi:10.1007/s00253-013-5211-4
- Mah, K.W., Sangsupawanich, P., Tunyapanit, W., van Bever, H., Shek, L.P., Chua, K.Y., Lee, B.W., 2008. Gut microbiota of children living in rural south Thailand and urban Singapore. *Allergol. Int.* 57, 65–71. doi:10.2332/allergolint.O-07-501
- Odagiri, M., Schriewer, A., Hanley, K., Wuertz, S., Misra, P.R., Panigrahi, P., Jenkins, M.W., 2015. Validation of Bacteroidales quantitative PCR assays targeting human and animal fecal contamination in the public and domestic domains in India. *Sci. Total Environ.* 502, 462–470. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.09.040
- Sargent, D., Kammin, W.R., Collyard, S., 2011. Review and Critique of Current Microbial Source Tracking (MST) Techniques, No. 11-03-038.
- Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W., Siciliano, S.D., 2005. Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ. Microbiol.* 7, 249–259. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00702.x
- Shanks, O.C., Kelty, C.A., Sivaganesan, M., Varma, M., Haugland, R.A., 2009. Quantitative PCR for genetic markers of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5507–5513. doi:10.1128/AEM.00305-09
- Soller, J. a., Schoen, M.E., Bartrand, T., Ravenscroft, J.E., Ashbolt, N.J., 2010. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. *Water Res.* 44, 4674–4691. doi:10.1016/j.watres.2010.06.049
- United States Environmental Protection Agency, 2012. Recreational Water Quality Criteria. U. S. Environ. Prot. Agency 1–69.
- United States Environmental Protection Agency, 2011. Using Microbial Source Tracking to Support TMDL Development and Implementation.

1.2 วัตถุประสงค์ของแผนการวิจัย

1.2.1 วัตถุประสงค์หลักของโครงการ คือ เพื่อให้ได้แนวทางในการใช้วิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมในการสนับสนุนการตรวจวัดกลุ่มพารามิเตอร์แบคทีเรียในมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดิน ให้สามารถจัดการปัญหามลพิษทางน้ำจากแหล่งกำเนิดได้อย่างเที่ยงตรงได้

1.2.2 วัตถุประสงค์ย่อยของโครงการ คือ

1. เพื่อจัดทำรายงานการศึกษาวิเคราะห์ความจำเป็นในการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมในบริบทของประเทศไทย การวิเคราะห์ช่องว่างของกฎระเบียบข้อบังคับและมาตรฐานน้ำผิวดินในปัจจุบันของประเทศไทย รวมถึงกรณีศึกษาจากต่างประเทศในการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษมาสนับสนุนระดับนโยบายในการจัดการมลพิษแหล่งน้ำ
2. เพื่อพัฒนาวิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับตรวจวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรีย ที่สามารถจำแนกสิ่งปนเปื้อนจากแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรม ที่สำคัญในพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน ด้วยความจำเพาะ (specificity) ไม่น้อยกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และความไว (sensitivity) ไม่น้อยกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ได้ไพรเมอร์อย่างน้อย 1-2 คู่สำหรับแหล่งกำเนิดมลพิษแต่ละกิจกรรม (ชุมชน ฟาร์มสุกร ฟาร์มโค ฟาร์มไก่และรวมทุกแหล่งกำเนิด) พร้อมวิเคราะห์ความเหมาะสมของทั้งสองเทคนิคเปรียบเทียบกันในด้านต้นทุน ข้อได้เปรียบและข้อจำกัดเชิงเทคนิค
3. เพื่อตรวจติดตามคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีน ในช่วงเวลา 1 ปี ครอบคลุมฤดูฝนและฤดูแล้ง และบ่งชี้แหล่งกำเนิดกิจกรรมที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเกินมาตรฐาน พร้อมวิเคราะห์และนำเสนอทางเลือกแบบเป็นขั้นตอน (tiered approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้นๆ
4. เพื่อจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำผิวดิน และจัดทำข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย (Policy brief)

บทที่ 2 วิธีวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนในพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน

2.1.1 ศึกษาประเภทและที่ตั้งของแหล่งกำเนิดมลพิษที่สำคัญในลุ่มน้ำท่าจีน ซึ่งประกอบด้วย ชุมชน และฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่สำคัญ ได้แก่ สุกร โค และไก่ รวมเรียกว่า แหล่งกำเนิดหลัก

ทำการหาข้อมูลและทบทวนข้อมูลทุติยภูมิ จากแหล่งข้อมูลต่างๆ ได้แก่ สถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร (องค์การมหาชน) กรมควบคุมมลพิษ สำนักงานสถิติแห่งชาติ และกรมปศุสัตว์

2.1.2 กำหนดจำนวนตัวอย่างและสถานที่เก็บตัวอย่าง ตามสัดส่วนการกระจายตัวของแหล่งกำเนิดหลักและแหล่งกำเนิดรอง

ในการเก็บตัวอย่างจากแต่ละแหล่งกำเนิด จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างให้ได้จำนวนอย่างต่ำที่ค่าหนึ่ง เพื่อให้ผลที่ได้สามารถบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญได้ ในงานวิจัยนี้ ทำการคำนวณจำนวนตัวอย่างในแต่ละแหล่งกำเนิด ด้วยวิธี Stratified random sampling โดยใช้การแบ่งตัวอย่างจากแหล่งกำเนิดเป้าหมายเป็นสัดส่วนตามจำนวนที่เลี้ยงในแต่ละจังหวัด โดยคำนวณด้วยเกณฑ์ คือ ค่า 90% confidence interval และ ค่า acceptable relative error of 0.20 และให้มีค่า expected prevalence เท่ากับค่าความไวของวิธีการตรวจวัด (sensitivity) ที่ยอมรับได้ที่ 0.80 (Ahmed *et al.*, 2009; Gawler *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2009; Odagiri *et al.*, 2015) โดยความไวของไพรเมอร์แต่ละคู่ หมายถึงความสามารถของไพรเมอร์ในการตรวจพบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างของสัตว์เป้าหมายที่ต้องการตรวจสอบ ทำการคำนวณจำนวนตัวอย่างขั้นต่ำด้วยโปรแกรม ProMESA version 2.3.0.2 สำหรับตัวอย่างจากแหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมาย คำนวณตามสัดส่วนของสถิติการเลี้ยงรายจังหวัด ซึ่งใช้หลักการเดียวกับวิธี Stratified random sampling ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างของแหล่งกำเนิดเป้าหมายและแหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมายจากลุ่มน้ำท่าจีน

จังหวัด	แหล่งกำเนิดเป้าหมาย			แหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมาย					รวม
	ชุมชน	สุกร	โค	ไก่	แพะ	แกะ	กระบือ	เป็ด	
ชัยนาท	5	2	3	2	2	3	4	1	22
สุพรรณบุรี	4	10	10	8	2	2	1	2	39
นครปฐม	5	8	7	9	3	0	0	2	34
สมุทรสาคร	5	0	0	0	0	0	0	0	5
รวม	19	20	20	19	7	5	5	5	100

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างของแหล่งกำเนิดเป้าหมายและแหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมายจากลุ่มน้ำเจ้าพระยา

จังหวัด	แหล่งกำเนิดเป้าหมาย			แหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมาย					รวม
	ชุมชน	สุกร	โค	ไก่	แพะ	แกะ	กระบือ	เป็ด	
ปทุมธานี	0	3	3	2	3	0	0	0	11
กรุงเทพ	9	0	1	0	0	0	0	0	10
พระนครศรีอยุธยา	0	5	1	0	0	0	1	0	7
Total	9	8	5	2	3	0	1	0	28

2.1.3 เก็บรวบรวมตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนและสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชน

หลักการสำคัญในการเตรียมตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง คือต้องมาจากการผสมกันของมูลสัตว์ตั้งแต่ 20 ตัวขึ้นไป ทั้งนี้เนื่องจากการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลลงสู่แหล่งน้ำ เกิดขึ้นในระดับสูงไม่ไต่ระดับ 1 หรือ 2 ตัว ดังนั้นการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียจากแหล่งกำเนิดแต่ละชนิดจึงต้องใช้ตัวแทนกลุ่มแบคทีเรียรายฝูง และเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีการกระจายตัวที่ดีและเป็นตัวแทนที่ดี จึงทำการเก็บฟาร์มละ 1-3 ตัวอย่างเท่านั้น โดยเก็บแยกคนละคอกเลี้ยง ส่วนตัวอย่างน้ำเสียชุมชนที่รวบรวมเข้าระบบบำบัดน้ำเสียในแต่ละอาคารนั้น ถือว่าเป็นการผสมกันของกลุ่มประชากรอยู่แล้ว ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ข.) โดยสรุปเริ่มจากการเก็บมูลสด ของสัตว์ชนิดเดียวกันจากโรงเรือนเดียวกัน โดยเดินเก็บตามจุดต่างๆ รอบบริเวณโรงเลี้ยงสัตว์หรือพื้นที่เลี้ยงสัตว์ แต่ต้องมั่นใจว่ามูลสัตว์ไม่สัมผัสน้ำยาฆ่าเชื้อโรคที่อาจมีการใช้บนพื้น เก็บตัวอย่างมูลประมาณ 1 กรัมในแต่ละจุด จำนวน 20 จุด ขึ้นไป เพื่อเป็นตัวแทนของสัตว์ 20 ตัวขึ้นไป ใส่ภาชนะที่สะอาดรวมกัน หรืออาจเก็บจากบ่อหรือลานรวบรวมมูลสัตว์แต่ไม่ควรถูกเจือจางด้วยน้ำล้างพื้น และมั่นใจว่าเป็นมูลสดใหม่ โดยเลือกเก็บ 20 จุด ในบ่อ จุดละประมาณ 1 กรัม เก็บใส่ภาชนะที่สะอาดรวมกัน ตัวอย่างนำมาแช่แข็งและนำกลับมาห้องปฏิบัติการภายในวันเดียวกัน การเก็บตัวอย่างน้ำเสีย ทำการเก็บจากจุดรวบรวมน้ำเสียก่อนเข้าระบบบำบัดใต้อาคาร โดยทำการเก็บตัวอย่างปริมาณ 1 ลิตร แช่แข็งและนำกลับมาห้องปฏิบัติการภายในวันเดียวกัน โดยจำนวนตัวอย่างจะเก็บจากพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีนใน 4 จังหวัดหลักเป็นส่วนใหญ่ และจะรวมตัวอย่างที่ได้จากพื้นที่อื่นเข้ามาทดสอบด้วย (ตามความเห็นผู้ประเมิน) เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในการขยายผลการดำเนินการไปยังพื้นที่อื่นต่อไป โดยยังคงเน้นจังหวัดในบริเวณใกล้เคียง

การสกัดดีเอ็นเอมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชน

เก็บตัวอย่างมูลสัตว์และตัวอย่างน้ำเสียไว้ในตู้เย็นที่ 5 องศาเซลเซียส นำมาสกัดดีเอ็นเอดังรายละเอียดในภาคผนวก ข. โดยสรุปคือทำการผสมรวมมูลสัตว์ และนำมูลสัตว์ที่ผสมดีแล้วปริมาณ 150 มิลลิกรัม มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด ZR Fecal DNA MiniPrep Kit (Zymo Research) ได้ดีเอ็นเอปริมาณประมาณ 50-150 ไมโครลิตร ทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific) และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่างน้ำเสีย นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 50-150 มิลลิลิตรมากรองด้วยกระดาษกรอง Mixed cellulose esters membrane ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร (Merck Millipore Ltd) จากนั้นนำกระดาษกรองมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆและสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด ได้ดีเอ็นเอปริมาณ 100 ไมโครลิตร ทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific) และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.2 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์

2.2.1 ทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างจากแหล่งกำเนิดต่างๆ

ทำการทบทวนวรรณกรรมเพื่อรวบรวมไพรเมอร์คู่ที่ได้รับการออกแบบมาให้จำเพาะกับน้ำเสียชุมชน มูลสุกร โค ไก่ และรวมทุกแหล่งกำเนิด จากนั้น ทำการทดสอบวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยมีรายละเอียดของไพรเมอร์ทั้ง 22 คู่ ดังตารางที่ 3 (รายละเอียดเพิ่มเติมดังแสดงในภาคผนวก ง.) วิธีทดลองดังแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข5 ถึง ข10 โดยสรุปคือ ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1. ไพรเมอร์ด้านหน้าและด้านหลัง ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, 2. ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาณ 0.2 ถึง 20 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 3. Thermo

Scientific DreamTaq PCR Master Mix (2X) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ 4. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้น นำปฏิกิริยาพีซีอาร์มารันด้วยเครื่อง Thermo Cycler ด้วยชนิดรอบดังนี้: ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 30 รอบของขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยขั้นตอน annealing ด้วยอุณหภูมิและเวลาดังตารางที่ 3 และขั้นตอน elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที หลังจาก 30 รอบแล้ว ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำ Gel electrophoresis โดยการดูผลการละลายผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ DNA loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยอดลงบนแผ่นเจล agarose ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ในบัฟเฟอร์ TAE โดยมีการใช้ 100-bp DNA ladder (Thermo Scientific, USA) เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นทำการย้อมแผ่นเจลในสารละลาย ethidium bromide และตรวจผลภายใต้เครื่อง UV transilluminator

ตารางที่ 3 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์

ชนิดแหล่งกำเนิด	ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	ลำดับดีเอ็นเอ (5' - 3')	ขนาดไพรเมอร์ (bp)	ขนาดดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ (bp)	อุณหภูมิ annealing (°C)	เวลา annealing (วินาที)	ชื่อจุลินทรีย์ที่ตรวจวัด	ชื่อยีน	เอกสารอ้างอิง
รวมทุกแหล่งกำเนิด (Universal)	1	BacUni-520f	BT5479	CGT-TAT-CCG-GAT-TTA-TTG-GGT-TTA	24	170	60.0	30	Bacteroidales	16s rRNA	Kildare et al., 2007
		BacUni-690r1	BT5480	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG-ATA-TCT-A	25						
	2	GenBac3F	BT5482	GGG-GTT-CTG-AGA-GGA-AGG-T	19	129	60.0	30	Bacteroidetes	16s rRNA	Siefring et al., 2008
		GenBac4R	BT5483	CCG-TCA-TCC-TTC-ACG-CTA-CT	20						
	3	Bac32F	BT5524	AAC-GCT-AGC-TAC-AGG-CTT	18	696 ^a	53.7	60	Bacteroides-Prevotella	16s rRNA	Bernhard and Field, 2000b; Hussein et al., 2014
		Bac708R	BT5492	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18						
ชุมชน	1	BacHum-160f	BT5488	TGA-GTT-CAC-ATG-TCC-GCA-TGA	21	81	60.0	30	Bacteroidales	16s rRNA	Kildare et al., 2007
		BacHum-241r	BT5489	CGT-TAC-CCC-GCC-TAC-TAT-CTA-ATG	24						
	2	HF183	BT5493	ATC-ATG-AGT-TCA-CAT-GTC-CG	20	167 ^a	60.0	30	Bacteroides dorei/total Bacteroidales	16s rRNA	Haugland et al. 2010
		BFDrev	BT5494	CGT-AGG-AGT-TTG-GAC-CGT-GT	20						
	3	HF183F	BT5493	ATC-ATG-AGT-TCA-CAT-GTC-CG	20	541 ^a	55.3	60	Bacteroides-Prevotella	16s rRNA	Bernhard and Field, 2000a; Hussein et al., 2014
		Bac708R	BT5492	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18						
สุกร	1	PF163F	BT5491	GCG-GAT-TAA-TAC-CGT-ATG-A	19	559 ^a	52.4	60	Bacteroides-Prevotella	16s rRNA	Dick et al., 2005; Hussein et al., 2014
		Bac708R	BT5492	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18						
	2	Pig-2-Bac41F	BT5931	GCA-TGA-ATT-TAG-CTT-GCT-AAA-TTT-GAT	27	116	60.0	30	Bacteroides	16s rRNA	Mieszkin et al., 2009
		Pig-2-Bac163Rm	BT5932	ACC-TCA-TAC-GGT-ATT-AAT-CCG-C	22						
โค	1	CowM2F	BT5484	CGG-CCA-AAT-ACT-CCT-GAT-CGT	21	92	60.0	30	Bacteroidales	16s rRNA	Shanks et al., 2008
		CowM2R	BT5485	GCT-TGT-TGC-GTT-CCT-TGA-GAT-AAT	24						
	2	CF128F	BT5486	CCA-ACY-TTC-CCG-WTA-CTC	18	177	60.0	30	Bacteroidales	16s rRNA	Kildare et al., 2007
		BacCow 305r	BT5487	GGA-CCG-TGT-CTC-AGT-TCC-AGT-G	22						
	3	CF193	BT5807	TAT-GAA-AGC-TCC-GGC-C	16	519 ^a	55.0	30	Bacteroides-Prevotella	16s rRNA	Bernhard and Field, 2000a
		Bac708R	BT5492	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18						

ตารางที่ 3 (ต่อ) รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์

ชนิดแหล่งกำเนิด	ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	ลำดับดีเอ็นเอ (5' - 3')	ขนาดไพรเมอร์ (bp)	ขนาดดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ (bp)	อุณหภูมิ annealing (°C)	เวลา annealing (วินาที)	ชื่อจุลินทรีย์ที่ตรวจวัด	ชื่อยีน	เอกสารอ้างอิง
โค	4	CF128F	BT5486	CCA-ACY-TTC-CCG-WTA-CTC	18	596 ^a	62.0	60	Bacteriodales	16s rRNA	Bernhard and Field, 2000a
		Bac708R	BT5492	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18						
	5	Bac2F	BT5868	GCT-TGT-TGC-GTT-CCT-TGAGAT-AAT	24	274	62.0	30	Bacteroidales	Gene encoding an HDIG domain protein involved in energy metabolism and electron transport	Shanks et al., 2006
		Bac2R	BT5869	ACA-AGC-CAG-GTG-ATA-CAG-AAA-G	22						
	6	Bac3F	BT5870	CTA-ATG-GAA-AAT-GGA-TGG-TAT-CT	23	166	60.0	30	Bacteroidales	Gene encoding a sialic acid-specific 9-O- acetyltransferase secretory protein homolog	Shanks et al., 2006
		Bac3R	BT5871	GCC-GCC-CAG-CTC-AAA-TAG	18						
	7	qCS621F	BT5872	AAC-CAC-AGC-CCG-CGA-TT	17	104 ^a	62.0	30	Bacteroides-Prevotella	16s rRNA	Okabe et al 2007
		qBac725R	BT5873	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG-ATA-TCT-A	25						
	8	BoBac367f	BT6078	GAA-GAC-TGA-ACC-AGC-CAA-GTA	21	100	57.0	30	Bacteroides	16s rRNA	Layton et al., 2006
		BoBac467r	BT6079	GCT-TAT-TCA-TAC-GGT-ACA-TAC-AAG	24						
ไก่	1	CP2-9F	BT5808	GTA-AGA-CAG-CAA-CCC-CAT-GTA	21	245	45.0	30	Bacteroides fragilis	16s rRNA	Lu et al., 2007
		CP2-9R	BT5809	ACC-TAT-GGT-TCA-ACA-CGC-TTT-A	22						
	2	qCD362F-HU	BT5810	AAT-ATT-GGT-CAA-TGG-GCG-AGA-G	22	102	60.0	30	Bacteroides-Prevotella	16s rRNA	Kobayashi et al., 2013
		qCD464R-HU	BT5811	CAC-GTA-GTG-TCC-GTT-ATT-CCC-TTA	24						
	3	LA35F	BT5919	ACC-GGA-TAC-GAC-CAT-CTG-C	19	571	58.0	60	Brevibacterium	16s rRNA	Weidhaas et al., 2010
		LA35R	BT5920	TCC-CCA-GTG-TCA-GTC-ACA-GC	20						
	4	Q-PvA-f	BT5925	AGT-CCA-CGA-GAT-TGG-CAA-CA	20	81	60.0	30	Chicken/turkey parvoviruses	Virion protein 1/Virion protein 2	Carratala et al., 2012
		Q-PvA-r	BT5926	GCA-GGT-TAA-AGA-TTT-TCA-CG	20						
	5	Av4143F	BT6080	TGC-AAG-TCG-AAC-GAG-GAT-TTC-T	22	244	60.0	30	Lactobacillus	16s rRNA	Ohad et al., 2016
		Av4143R	BT6081	TCA-CCT-TGG-TAG-GCC-GTT-ACC	21						
	6	Av43F	BT6082	GCA-AGT-TGA-GCG-GAG-ATA-TGG	21	100	60.0	30	Firmicutes	16s rRNA	Ohad et al., 2016
		Av43R	BT6083	ATC-GGC-CTA-TCC-CCC-AAT-ATA	21						
^a DNA product size identified by BLAST											

2.2.2 คำนวณหาความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity)

ความจำเพาะ หมายถึง ความสามารถของโปรแกรมในการตรวจพบดีเอ็นเอเฉพาะตัวอย่างสัตว์ที่ต้องการชนิดเดียว โดยไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของตัวอย่างสัตว์ชนิดอื่นได้เลย เช่น โปรแกรมสำหรับตรวจกลุ่มแบคทีเรียจากชุมชน จะต้องตรวจพบแบคทีเรียดีเอ็นเอในตัวอย่างน้ำเสียชุมชนเท่านั้น โดยจะต้องตรวจไม่พบแบคทีเรียดีเอ็นเอในตัวอย่างมูลสัตว์ชนิดอื่นเลย (ในขอบเขตงานวิจัยนี้ คือ สุกร โค ไก่ เป็ด กระบือ แพะ และ แกะ) ซึ่งค่าที่ดีที่สุด คือ 1.0 ดังนั้น ค่าความจำเพาะเป็นพารามิเตอร์ที่มีความสำคัญมาก ในการประเมินการคัดเลือกโปรแกรม แม้ยังไม่มีการระบุชัดเจนว่าค่าความจำเพาะควรเป็นเท่าไรจึงจะยอมรับได้ แต่จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบว่าค่าความจำเพาะที่เหมาะสมควรมิ่น้อยกว่า 0.90 (Ahmed *et al.*, 2009, 2008; Gawler *et al.*, 2007; Odagiri *et al.*, 2015) การคำนวณค่าความจำเพาะ คำนวณได้จากสมการที่ 1 (Ballesté *et al.*, 2010)

$$s = \frac{TN}{TN + FP} \text{ ----- (1)}$$

เมื่อ s คือค่าความจำเพาะ (specificity), TN (true negative) คือ จำนวนตัวอย่างสัตว์ชนิดอื่นที่ตรวจไม่เจอแบคทีเรียดีเอ็นเอ และ FP (false positive) คือ จำนวนตัวอย่างสัตว์ชนิดอื่นที่ตรวจพบแบคทีเรียดีเอ็นเอ นอกจากนี้ ค่าความไว (sensitivity) ของโปรแกรมแต่ละคู่ หมายถึง ความสามารถของโปรแกรมในการตรวจพบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างของสัตว์ชนิดนั้น โดยค่าที่ดีที่สุด คือ 1.0 แม้ยังไม่มีการระบุชัดเจนว่าค่าความไวควรเป็นเท่าไรจึงจะยอมรับได้ แต่จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบว่าค่าความไวที่เหมาะสมควรมิ่น้อยกว่า 0.65 (Gawler *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2009; Odagiri *et al.*, 2015) คำนวณได้จากสมการที่ 2

$$r = \frac{TP}{TP + FN} \text{ ----- (2)}$$

เมื่อ r คือค่าความไว (sensitivity), TP (true positive) คือ จำนวนตัวอย่างสัตว์ชนิดเป้าหมายที่ตรวจพบแบคทีเรียดีเอ็นเอ และ FN (false negative) คือ จำนวนตัวอย่างสัตว์ชนิดเป้าหมายที่ตรวจไม่พบแบคทีเรียดีเอ็นเอ ผลการทดสอบนำมาประเมินคัดเลือกคู่โปรแกรม เพื่อให้ได้โปรแกรมอย่างน้อย 1-2 คู่สำหรับแหล่งกำเนิดแต่ละชนิด โดยเกณฑ์คัดเลือกคือความจำเพาะของโปรแกรมมีค่ามิ่น้อยกว่า 0.90 และความไวของโปรแกรมมิ่น้อยกว่า 0.65

2.2.3 ประเมินคัดเลือกโปรแกรมคู่ที่เหมาะสมที่สุดของวิธีพีซีอาร์สำหรับแต่ละแหล่งกำเนิด

ทำการคัดเลือกโปรแกรมคู่ที่ดีที่สุดของแต่ละชนิดแหล่งกำเนิด โดยใช้การเปรียบเทียบค่าความไวและความจำเพาะของแต่ละคู่โปรแกรม นอกจากนี้ทำการคำนวณค่าพารามิเตอร์เพิ่มเติมของโปรแกรม คือ อัตราการเกิดผลบวก (positive predictive rate) และอัตราการเกิดผลลบ (negative predictive rate) (Kildare *et al.* 2007) โดยอัตราการเกิดผลบวกคือสัดส่วนของจำนวนตัวอย่างที่ผลเป็นบวกจริงต่อจำนวนตัวอย่างที่เป็นบวกทั้งหมด ใช้สูตรการคำนวณ ดังสมการที่ 3

$$\text{อัตราการเกิดผลบวก} = TP/(TP+FP) \text{ ----- (3)}$$

โดย TP (true positive) คือ จำนวนตัวอย่างสัตว์ชนิดเป้าหมายที่ตรวจพบแบคทีเรียดีเอ็นเอ และ FP (false positive) คือ จำนวนตัวอย่างสัตว์ชนิดอื่นที่ตรวจพบแบคทีเรียดีเอ็นเอ

ส่วนอัตราการเกิดผลลบ คือสัดส่วนของจำนวนตัวอย่างที่ผลเป็นลบจริงต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่เป็นลบ ใช้สูตรการคำนวณ ดังสมการที่ 4

$$\text{อัตราการเกิดผลลบ} = \text{TN}/(\text{TN}+\text{FN}) \text{ ----- (4)}$$

เมื่อ TN (true negative) คือ จำนวนตัวอย่างสัตว์ชนิดอื่นที่ตรวจไม่เจอแบนด์ดีเอ็นเอ และ FN (false negative) คือ จำนวนตัวอย่างสัตว์ชนิดเป้าหมายที่ตรวจไม่พบแบนด์ดีเอ็นเอ

ดังนั้น เมื่อนำวิธีพีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบกับตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนนี้ไปตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจริงที่ไม่ทราบแหล่งปนเปื้อนมลพิษ ให้สมมติว่าค่า อัตราการเกิดผลบวก และอัตราการเกิดผลลบ มีค่าเท่าเดิม เพราะทดสอบในพื้นที่เดิม ทำให้บ่งบอกความเป็นไปได้ที่ผลบวกนั้นจะเป็นผลบวกจริงหรือผลลบนั้นจะเป็นผลลบจริงได้

2.3 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ

2.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียเป้าหมายในแหล่งกำเนิดต่างๆ

การศึกษาด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณนั้นนิยมใช้กราฟมาตรฐานสำหรับบ่งบอกปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งเป็นยีนที่มีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตที่สนใจ ในการศึกษาในครั้งนี้ผู้ศึกษาทำการศึกษายีน 16s rRNA ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteroidales* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความจำเพาะกับแหล่งกำเนิดสูง หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่ามีความจำเพาะในสัตว์ต่างๆ ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ การศึกษาได้ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 5 คู่ ดังตารางที่ 4 ซึ่งมีความจำเพาะต่อสุกร ไก่ โค น้ำเสียชุมชน และ รวมทุกแหล่งกำเนิด (universal) ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียในมูลของสัตว์ชนิดต่างๆ ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดหลัก รวมทั้งมูลสัตว์อื่นๆที่เป็นแหล่งกำเนิดรองที่ทำให้เกิดมลพิษทางน้ำด้วย โดยไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่นี้ได้รับการคัดเลือกมาแล้วด้วยวิธีพีซีอาร์ว่าให้ผลแม่นยำที่สุดกับตัวอย่างมูลของสัตว์ชนิดต่างๆจากบริเวณลุ่มน้ำท่าจีน

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มีปริมาณตัวอย่างเป็นจำนวนมาก วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานที่เหมาะสมกับการป้อนตัวอย่างหลายรอบ คือกราฟมาตรฐานแบบ mixed model (Sivaganesan *et al.*, 2010) โดยทำการสร้างกราฟจากดีเอ็นเอต้นแบบที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นซึ่งมีขนาด 521 คู่เบส และในดีเอ็นเอต้นแบบ 1 สายประกอบด้วยยีน 16s rRNA ของ *Bacteroidales* ที่จำเพาะต่อ สุกร โค น้ำเสียชุมชน และ รวมทุกแหล่งกำเนิด (universal) ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 ในขณะที่ดีเอ็นเอต้นแบบของไพรเมอร์ใกล้เคียงจากการโคลนพีซีอาร์เป้าหมายลงในพลาสมิด หลังจากนั้นทำการเจือจางดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้นต่างๆ รวม 6 ความเข้มข้น ซึ่งประกอบด้วยจำนวนยีน 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , และ 50 gene copy numbers ตามลำดับ ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ทำการทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณกับดีเอ็นเอต้นแบบทั้ง 6 ความเข้มข้น แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง รวมเป็น 18 ปฏิกิริยาต่อคู่ไพรเมอร์ อีกทั้งยังทดสอบกับตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (negative control) ซึ่งเตรียมจากปฏิกิริยาที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทำซ้ำ 3 ครั้งต่อคู่ไพรเมอร์ ในหนึ่งคู่ไพรเมอร์ทำการสร้างกราฟมาตรฐานจำนวน 4 เส้น จากการป้อนตัวอย่างคนละรอบ ทำซ้ำจนครบสำหรับ 4 คู่ไพรเมอร์ ส่วนประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1. ไพรเมอร์ด้านหน้าและด้านหลัง ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.8 ไมโครลิตร, 2. ดีเอ็นเอติดตาม (probe) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร 3. ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 4. iTaq Universal Probes Supermix (2X) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ 4. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาทดสอบด้วยเครื่องพีซีอาร์เชิงปริมาณ (StepOnePlus, Thermo Fisher Scientific) ด้วยชนิดรอบดังนี้: ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 40 รอบของขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ตามด้วยขั้นตอน

annealing และขั้นตอน elongation ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 วินาที (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข 11)

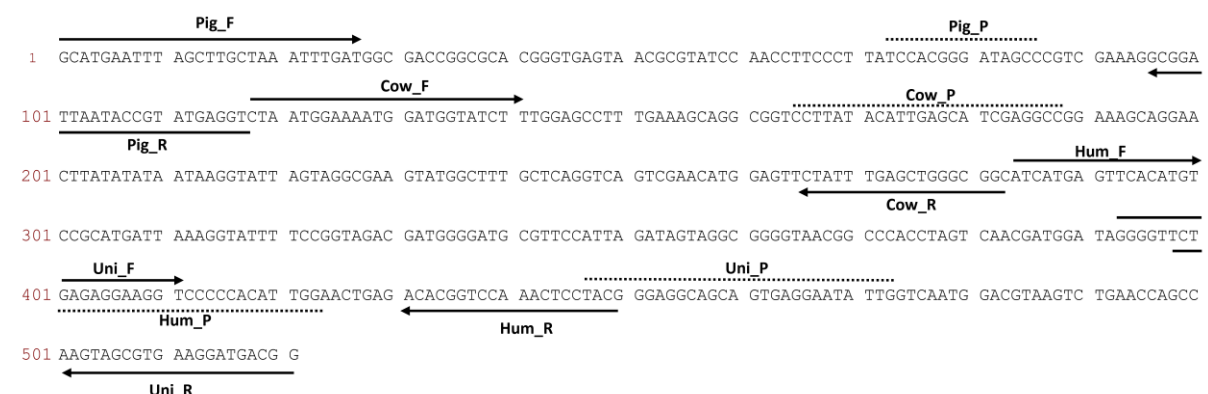
ผลการทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณได้ค่า cycle threshold หรือ Ct โดยค่า Ct ที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้นนำมาหาค่าเฉลี่ย (Ct mean) หลังจากนั้นนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่า Ct mean (แกน Y) และปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ (แกน X) หลังจากนั้น ทำการวิเคราะห์เส้นกราฟมาตรฐานทั้ง 4 เส้นต่อหนึ่งคู่ไพรเมอร์เพื่อหาค่าความแตกต่างทางสถิติและหาค่าความชันเฉลี่ย (pooled slope) โดยใช้ multiple linear regression ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

นอกจากนี้ ทำการคำนวณค่า PCR amplification efficiency (E) ของแต่ละไพรเมอร์จากความชันเฉลี่ยของกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณจากสมการ 5 ซึ่งค่าที่ยอมรับได้จะอยู่ในช่วง 90 – 110 %

$$\text{PCR amplification efficiency (E)} = 10^{-1/\text{slope}} - 1 \quad \dots\dots\dots(5)$$

ตารางที่ 4 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ

ชนิดแหล่งกำเนิด	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	ลำดับดีเอ็นเอ (5' - 3')	ขนาดไพรเมอร์ (bp)	ขนาดดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ (bp)	อุณหภูมิ annealing (°C)	ชื่อจุลินทรีย์ที่ตรวจวัด	ชื่ออื่น	เอกสารอ้างอิง
รวมทุกแหล่งกำเนิด (Universal)	GenBac3F	Uni_F	GGG-GTT-CTG-AGA-GGA-AGG-T	19	129	60.0	<i>Bacteroidetes</i>	16s rRNA	Siefing et al., 2008
	GenBac4R	Uni_R	CCG-TCA-TCC-TTC-ACG-CTA-CT	20					
	–	Uni_P	FAM-CAA-TAT-TCC-TCA-CTG-CTG-CCT-CCC-GTA-TAMRA	27					
ชุมชน	HF183	Hum_F	ATC-ATG-AGT-TCA-CAT-GTC-CG	20	167	60.0	<i>Bacteroides</i> <i>dorei</i> /total <i>Bacteroidales</i>	16s rRNA	Haugland et al. 2010
	BFDrev	Hum_R	CGT-AGG-AGT-TTG-GAC-CGT-GT	20					
	–	Hum_P	FAM-CTG-AGA-GGA-AGG-TCC-ACA-TTG-GA-TAMRA	26					
สุกร	Pig-2-Bac41F	Pig_F	GCA-TGA-ATT-TAG-CTT-GCT-AAA-TTT-GAT	27	116	60.0	<i>Bacteroides</i>	16s rRNA	Mieszkina et al., 2009
	Pig-2-Bac163Rm	Pig_R	ACC-TCA-TAC-GGT-ATT-AAT-CCG-C	22					
	–	Pig_P	FAM-TCC-ACG-GGA-TAG-CC-TAMRA	14					
โค	Bac3F	Cow_F	CTA-ATG-GAA-AAT-GGA-TGG-TAT-CT	23	166	60.0	<i>Bacteroidales</i>	Gene encoding a sialic acid-specific 9-O-acetyltransferase secretory protein homolog	Shanks et al., 2006
	Bac3R	Cow_R	GCC-GCC-CAG-CTC-AAA-TAG	18					
	–	Cow_P	FAM-CCT-TAT-ACA-TTG-AGC-ATC-GAG-GCC-TAMRA	24					
ไก่	qCD362F-HU	PCH_F	AAT-ATT-GGT-CAA-TGG-GCG-AGA-G	22	102	60.0	<i>Bacteroides</i> – <i>Prevotella</i>	16s rRNA	Kobayashi et al., 2013
	qCD464R-HU	PCH_R	ACC-TCA-TAC-GGT-ATT-AAT-CCG-C	22					
	–	PCH_P	FAM-TCC-TTC-ACG-CTA-CTT-GG-TAMRA	17					



รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ถูกสังเคราะห์เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานและตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดสอบ

การหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ)

LOD คือ ปริมาณความเข้มข้นของยีนเป้าหมายที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ และเชื่อมั่นได้ว่าเป็นยีนเป้าหมายที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาจริงที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยอ้างอิงวิธีการศึกษาจาก Francy *et al.*, 2017 ซึ่งวิธีการศึกษาทำโดยนำดีเอ็นเอต้นแบบที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 10 gene copy numbers มาทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณและทำซ้ำ 10 ครั้ง หลังจากนั้นทำการหาค่าเฉลี่ย Ct_{LOD} และต้องมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการคำนวณทั้ง 10 ซ้ำไม่เกิน 0.5 ($SD < 0.5$) รวมทั้งใน 10 ซ้ำต้องสามารถตรวจวัดได้ทั้งหมด (ความเชื่อมั่น 95%) หากความเข้มข้นที่ทดสอบไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ให้ทำการปรับความเข้มข้นขึ้นมาครั้งละ 10 gene copy numbers และทำการทดลองด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น จนกว่าจะได้ค่าเฉลี่ย Ct_{LOD} และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็นไปตามที่กำหนด ความเข้มข้นที่ได้เป็นค่า LOD

LOQ เป็นความเข้มข้นของยีนเป้าหมายที่ต่ำที่สุดที่สามารถคำนวณหาความเข้มข้นได้อย่างถูกต้อง โดย LOQ จะคำนวณได้จากค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Ct_{LOD} ตามสมการที่ 6

$$Ct_{LOQ} = Ct_{LOD} - 2(\sigma_{Ct_{LOD}})$$

เมื่อ $\sigma_{Ct_{LOD}}$ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย Ct_{LOD}

..... (6)

การเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดสอบ เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอชุดเดียวกับที่ใช้ทดสอบวิธีพีซีอาร์ ก่อนทดสอบได้ทำการวัดความเข้มข้นด้วย NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific) อีกครั้งก่อนการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร 10 นาโนกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร และ 5 นาโนกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร สำหรับตัวอย่างที่มาจากแหล่งกำเนิดหลัก (สุกร โค น้ำเสียชุมชน และไก่) และ 20 นาโนกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรสำหรับตัวอย่างที่มาจากแหล่งกำเนิดรอง (เปิด กระบือ แพะ และแกะ) หลังจากนั้น ทำการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่เจือจางที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและละลายหลายรอบ และใช้ในการทดลองภายใน 1 สัปดาห์โดยได้ทำการทดสอบเบื้องต้นพบว่าปริมาณดีเอ็นเอไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงการเก็บตัวอย่าง

2.3.2 การวัดจำนวนยีน (gene copy number) ในตัวอย่างดีเอ็นเอของมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ

ทำการทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วด้วยไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ ดังตารางที่ 4 โดยทดสอบซ้ำ 2 ครั้งในตัวอย่างดีเอ็นเอแต่ละความเข้มข้น ทำการคำนวณหาพื้นที่ของดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะต่อไพรเมอร์นั้นๆ ด้วยค่า Ct เฉลี่ยที่ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อ 1 ปฏิกริยา หากพบว่าตัวอย่างใดเกิดการยับยั้งของปฏิกริยาพีซีอาร์ (PCR inhibition) (รายละเอียดดังหัวข้อ 2.3.3) ให้ใช้ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อ 1 ปฏิกริยาแทน ในการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณทุกครั้งได้ทำการทดสอบควบคู่กับตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (negative control) ซึ่งไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกริยา และตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (positive control) ซึ่งใช้ดีเอ็นเอต้นแบบสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 5×10^6 , 5×10^5 , หรือ 5×10^4 gene copy numbers โดยทำการทดสอบกับตัวอย่างควบคุมเชิงบวกและเชิงลบซ้ำ 3 ครั้ง

จากนั้น ทำการคำนวณค่า Ct เฉลี่ย รวมทั้งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้ต้องไม่เกิน 0.5 ในแต่ละตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างใดมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเกินกว่าที่กำหนด ให้ทำการทดสอบด้วยวิธีซีอาร์เชิงปริมาณซ้ำอีก จนกว่าจะได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่ในระดับที่กำหนด อย่างไรก็ตาม หากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เกินกว่าที่กำหนดนั้นเป็น เหตุมาจากค่า Ct ในแต่ละซ้ำเกิน 35 ขึ้นไป จะไม่ถูกนำมาทำต่อเพราะมีค่า Ct สูงกว่าค่า LOD ดังนั้น เมื่อได้ค่า Ct เฉลี่ยแล้ว นำมาคำนวณจำนวนยีนดังสมการที่ 7 การแทนค่าในสมการนั้นค่า m นำมาจากความชันเฉลี่ยที่ได้จากการสร้างกราฟ มาตรฐาน ส่วนค่า b ซึ่งเป็นจุดตัดแกน Y ได้จากการนำ Ct เฉลี่ยของตัวอย่างควบคุมเชิงบวกไปแทนค่าในสมการที่ 8 ซึ่งเป็น การคำนวณแบบ mixed model ที่ช่วยลดความคลาดเคลื่อนได้มากกว่าการนำค่าจุดตัดแกน Y ที่ได้จากกราฟมาตรฐานมาใช้ ในการคำนวณ (Sivaganesan *et al.*, 2010)

$$\text{Log}_{10} \text{ concentration} = (Ct - b) / m \quad \dots\dots\dots(7)$$

เมื่อ $b =$ จุดตัดแกน Y

$m =$ ความชันเฉลี่ยของกราฟมาตรฐาน

$$b = -((\text{Log}_{10} \text{ concentration} * m) - Ct) \quad \dots\dots\dots(8)$$

เมื่อ $\text{Log}_{10} \text{ concentration} =$ ค่าลอการิทึมความเข้มข้นของตัวอย่างควบคุมเชิงบวก

$m =$ ความชันเฉลี่ยของกราฟมาตรฐาน

หลังจากนั้น ทำการคำนวณทางสถิติเพื่อทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างจำนวนยีน (gene copy numbers) จากตัวอย่างเป้าหมายและตัวอย่างที่ไม่ใช่เป้าหมาย โดยใช้สถิติ one way ANOVA ด้วย Dunnett's Multiple Comparison Test ($P < 0.05$)

การกำหนดค่า Ct cut-off

เนื่องจากการทดสอบด้วยวิธีซีอาร์เชิงปริมาณมีความไวสูง ในบางครั้งอาจพบผลบวกปลอม (false positives) ใน ตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (negative control) ขึ้นได้ ดังนั้น ในการกำหนดเกณฑ์บ่งชี้ว่าผลการทดสอบเป็นผลบวกจริง (true positives) หรือผลบวกปลอม ทำได้โดยนำค่าเฉลี่ย Ct ของตัวอย่างควบคุมเชิงลบที่ทดสอบควบคู่กับตัวอย่างปกติในแต่ละรอบ รวมทั้งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มาคำนวณค่า Ct cut-off ดังสมการที่ 9 (Chandelier *et al.*, 2006)

$$Ct \text{ cut-off} = M - (3 * SD) \quad \dots\dots\dots(9)$$

เมื่อ $M =$ ค่าเฉลี่ย Ct ของตัวอย่างควบคุมเชิงลบ

$SD =$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากนั้น ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Ct ที่ได้จากตัวอย่าง (Ct_{mean}) กับค่า $Ct_{\text{cut-off}}$ โดยมีเกณฑ์การพิจารณาจำแนก ได้ 4 กรณี ดังนี้ คือ

1. กรณีที่ $Ct_{mean} > Ct_{cut-off}$ หรือตัวอย่างไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณ (ซึ่งไม่แสดงค่า Ct หลังจากรันเสร็จสิ้น) ให้พิจารณาผลเป็นลบ คือตรวจไม่พบ หรือผลบวกที่ได้อาจเป็นผลบวกลงอันเนื่องมาจากตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (UN; undetermined)
2. กรณีที่ $Ct_{LOD} < Ct_{mean} < Ct_{cut-off}$ ให้พิจารณาผลเป็นลบ คือตรวจไม่พบเช่นกัน (ND; no detection) ซึ่งหมายความว่าดีเอ็นเอเป้าหมายมีปริมาณน้อยเกินกว่าจะตรวจสอบได้ที่ระดับความมั่นใจ 95%
3. กรณีที่ $Ct_{LOQ} < Ct_{mean} < Ct_{LOD} < Ct_{cut-off}$ ให้พิจารณาผลเป็นบวก คือตรวจพบแม้ว่าจะบอกปริมาณไม่ได้ (NQ; no quantification) ซึ่งหมายความว่าสามารถตรวจพบได้แต่อยู่เกินขอบเขตที่จะบอกปริมาณได้อย่างแม่นยำ
4. กรณีที่ $Ct_{mean} < Ct_{LOQ} < Ct_{LOD} < Ct_{cut-off}$ ให้พิจารณาผลเป็นบวก คือตรวจพบและบอกปริมาณได้

2.3.3 การคำนวณค่าความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) ความถูกต้อง (accuracy) อัตราการเกิดผลบวก (positive predictive rate) และอัตราการเกิดผลลบ (negative predictive rate)

การคำนวณค่าความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) การเกิดผลบวก (positive predictive rate) และอัตราการเกิดผลลบ (negative predictive rate) แสดงไว้ในหัวข้อ 2.2.2 และ 2.2.3 นอกจากนี้ทำการคำนวณค่าความถูกต้อง (accuracy) ของไพรเมอร์แต่ละคู่ หมายถึง ความสามารถของไพรเมอร์ในการตรวจพบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างของมวลสัตว์เป้าหมายและต้องไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของตัวอย่างมวลสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมายได้เลย โดยค่าที่ดีที่สุด คือ 1.0 ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ 10

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + FP + TN + FN} \quad \dots\dots\dots (10)$$

ในการคำนวณค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวนี้ จะเห็นได้ว่าเป็นการนำผลในเชิงคุณภาพ คือผลบวกหรือผลลบเท่านั้น โดยไม่คำนึงถึงปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัดได้ มาใช้ในการคำนวณ ทั้งนี้ เพื่อเป็นการเปรียบเทียบโดยตรงกับวิธีพีซีอาร์ เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถและความเหมาะสมเปรียบเทียบวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ ดังแสดงในหัวข้อ 2.4

การตรวจสอบการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณ (qPCR inhibition)

เนื่องจากในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม มักมีการปนเปื้อนสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้ผลที่ได้มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง จึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบการเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาและคำนวณค่ากลับเพื่อให้ได้ผลที่แม่นยำ วิธีที่ได้รับความนิยมในการใช้ตรวจสอบการเกิดการยับยั้งปฏิกิริยา ได้แก่ วิธีการเจือจางตัวอย่าง ซึ่งให้ผลดีกว่าวิธีการเติมตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (positive controls or internal amplification control) (Bustin *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2012; Staley *et al.*, 2012) โดยทำการเจือจางตัวอย่างจากแหล่งกำเนิดหลัก (โค สุก ร น้ำเสียชุมชน และไก่) ดังรายละเอียดในหัวข้อ 2.3.1 หลังจากนั้น ทำการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง นำ Ct เฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นในแต่ละตัวอย่าง ที่ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า 0.5 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับค่าเฉลี่ย Ct และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) สำหรับตัวอย่างที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต่ำกว่า 0.9 จะพิจารณาว่าตัวอย่างนั้นมีสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณ ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การพบสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์จากสมการที่ 11

$$\text{เปอร์เซ็นต์การพบสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่พบการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่สามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ}} \times 100 \quad (11)$$

ความชุกสัมพัทธ์ของดีเอ็นเอเป้าหมายในแต่ละแหล่งกำเนิด

ความชุกสัมพัทธ์ (relative abundance) คืออัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตรวจวัดได้ด้วยไพรเมอร์เป้าหมาย ต่อปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัดได้จากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับทุกแหล่งกำเนิด (universal) ในตัวอย่างนั้น โดยหาได้จากสมการที่ 12

$$\text{ความชุกสัมพัทธ์} = \frac{\text{จำนวนยีนที่แต่ละไพรเมอร์วัดได้ในตัวอย่างหนึ่ง}}{\text{จำนวนยีนของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับทุกแหล่งกำเนิด (universal) วัดได้ในตัวอย่างนั้น}} \quad (12)$$

2.3.4 ประเมินเพื่อเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในแต่ละแหล่งกำเนิดเป้าหมาย

ประสิทธิภาพของไพรเมอร์แต่ละคู่ในการใช้จำแนกแหล่งกำเนิดด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ จะถูกพิจารณาจากพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้ทำการทดสอบดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น เช่น ค่า PCR amplification efficiency ค่าความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) ความถูกต้อง (accuracy) อัตราการเกิดผลบวก (positive predictive rate) อัตราการเกิดผลลบ (negative predictive rate) รวมทั้งปริมาณยีนของดีเอ็นเอเป้าหมาย

2.4 วิเคราะห์ความเหมาะสมระหว่างเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณในด้านต้นทุน ข้อได้เปรียบ และข้อจำกัดเชิงเทคนิค

เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันเพื่อการตรวจสอบ วินิจฉัย และเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายหรือประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ โดยใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบซึ่งเป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase และใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย 1 คู่ โดยมีขั้นตอนที่สำคัญคือ ขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสายคู่ ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียสในการทำลายพันธะไฮโดรเจน ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-30 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งอุณหภูมิจะแตกต่างกันไปในแต่ละคู่ไพรเมอร์อยู่ในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส ขั้นที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส หลังจากได้ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์แล้วจะถูกนำไปวิเคราะห์โดยการไหลลงใน agarose เจลเพื่อทำการย้อมและดูขนาดดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้

เทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากการทำพีซีอาร์แบบดั้งเดิม โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase และใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย 1 คู่เช่นเดียวกัน แต่มีความแตกต่างคือการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงในดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างดีเอ็นเอได้และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันทีในแต่ละรอบของปฏิกิริยาโดยไม่ต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน การใช้สารเรืองแสงในการตรวจสอบดีเอ็นเอต้นแบบนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สียฟลูออเรสเซนซ์ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ (SYBR Green) หรือการใช้ดีเอ็นเอติดตาม (probe) ที่ติดฉลากด้วยสียฟลูออเรสเซนซ์ซึ่งเป็นวิธีที่ผู้วิจัยใช้ในการศึกษาเนื่องจากมีความจำเพาะสูงกว่าการใช้สียฟลูออเรสเซนซ์แบบ SYBR Green ดีเอ็นเอติดตามเป็นดีเอ็นเอเส้นเดียวที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ ประกอบด้วย reporter dye ที่จับอยู่ปลาย 5' ซึ่งเป็นสี fluorescein เช่น FAM, TET และ HEX เป็นต้น ส่วน quencher dye จะจับที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอติดตาม เช่น TAMRA เป็นต้น เมื่อเกิด

ปฏิกิริยาส่งเคราะห้ดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) เอนไซม์ DNA polymerase ที่มี 5' nuclease activity จะตัด reporter dye ออกจากดีเอ็นเอติดตาม ทำให้ reporter dye หลุดห่างออกจาก quencher dye และสามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนส์จึงสามารถทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ประสิทธิภาพและความเหมาะสมของเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณจะพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ค่า PCR amplification efficiency ค่าความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) ความถูกต้อง (accuracy) อัตราการเกิดผลบวก (positive predictive rate) อัตราการเกิดผลลบ (negative predictive rate) และ limit of detection ในแต่ละไพรเมอร์ที่ได้จากการศึกษา รวมทั้งข้อได้เปรียบข้อเสียเปรียบและต้นทุนที่ใช้ในการศึกษา

2.5 ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ควบคู่กับการตรวจสอบคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน

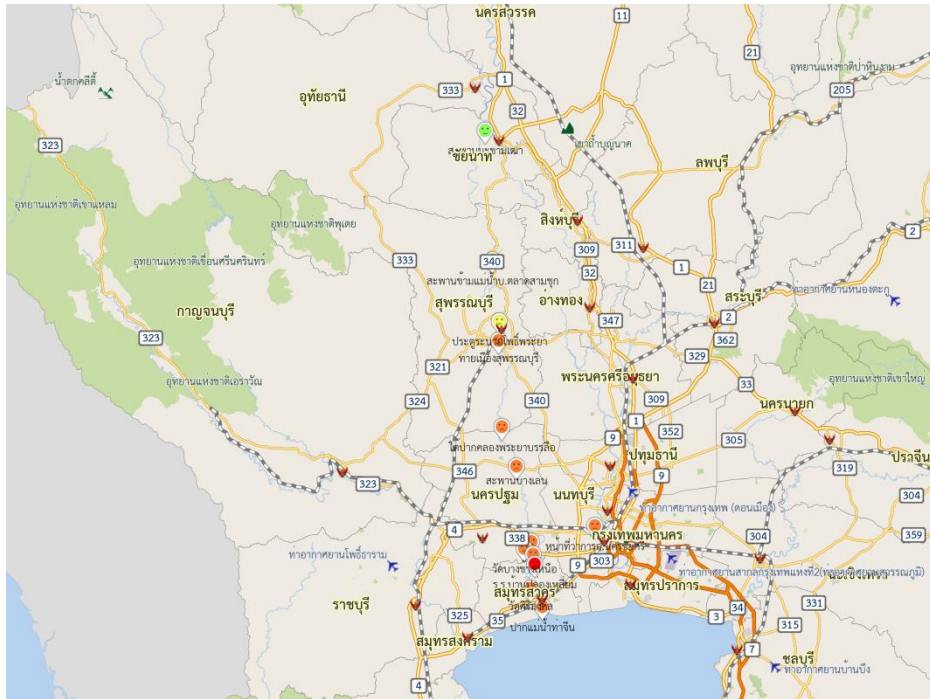
การคัดเลือกสถานีเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำท่าจีน

ในการคัดเลือกสถานีเก็บตัวอย่างน้ำผิวดินในแม่น้ำท่าจีน ใช้สถานีปัจจุบันของส่วนแหล่งน้ำจัด กรมควบคุมมลพิษที่ได้ทำการเก็บวิเคราะห์เป็นประจำทุกปี โดยเลือกตำแหน่งของสถานีเก็บน้ำจำนวน 12 สถานีจากทั้งหมด 14 สถานีที่พบการปนเปื้อนอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 2

จากการรวบรวมข้อมูลที่ผ่านมาของกรมควบคุมมลพิษในช่วงปี 2552 - 2557 พบค่าโคลิฟอร์มทั้งหมด (total coliforms) ในแต่ละสถานี แบ่งตามรอบการเก็บตามช่วงฤดูฝน (2 ครั้งต่อปี) และฤดูแล้ง (2 ครั้งต่อปี) ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยพบว่าค่าโคลิฟอร์มอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง และค่าที่สถานีต่างๆมีความใกล้เคียงกันในรอบการเก็บเดียวกัน ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงทำการเก็บน้ำทั้งหมด 4 รอบ แบ่งเป็นช่วงฤดูฝน 2 รอบและฤดูแล้ง 2 รอบ โดยกำหนดให้ในฤดูเดียวกันทำการเก็บตัวอย่างน้ำในเวลาใกล้เคียงกัน คือห่างกัน 1 เดือน และทำการเก็บตัวอย่างทั้ง 12 สถานี

ตารางที่ 5 รายละเอียดตำแหน่งสถานีเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำท่าจีน

ชื่อแม่น้ำ	ชื่อย่อ	ตำแหน่งจุดเก็บ	แกน X	แกน Y	ประเภทคุณภาพของแหล่งน้ำ ¹
แม่น้ำท่าจีน	TC01	ปากแม่น้ำท่าจีน อ.เมือง จ.สมุทรสาคร	637969N	1493895E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC04	วัดศรีมงคล อ.เมือง จ.สมุทรสาคร	633383N	1501093E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC07	ร.ร.บ้านปล่องเหล็ก อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร	634993N	1510839E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC09	หน้าวัดเทียนดัด บ้านท่าใหม่ อ.สามพราน จ.นครปฐม	634400N	1514600E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC10	วัดบางช้างเหนือ อ.สามพราน จ.นครปฐม	630899N	1517001E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC13	หน้าที่ว่าการ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม	658667N	1525838E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC15	สะพานบางเลน อ.บางเลน จ.นครปฐม	627714N	1549429E	3
แม่น้ำท่าจีน	TC17	ใต้ปากคลองพระยาบรรลือ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	622055N	1564946E	3
แม่น้ำท่าจีน	TC22	ท้ายเมืองสุพรรณบุรี อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี	620685N	1599046E	3
แม่น้ำท่าจีน	TC23	ประตูระบายน้ำโพธิ์พระยา อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี	621057N	1606545E	3
แม่น้ำท่าจีน	TC25	สะพาน อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี	618291N	1630756E	2
แม่น้ำท่าจีน	TC28	สะพานมะขามเฒ่า อ.วัดสิงห์ จ.ชัยนาท	615384N	1681834E	2
หมายเหตุ	¹ ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน แหล่งที่มา: ประกาศกรมควบคุมมลพิษ เรื่องกำหนดประเภท ของแหล่งน้ำในแม่น้ำท่าจีน ตีพิมพ์ใน ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนที่ 62 ง ลงวันที่ 4 สิงหาคม 2537				



รูปที่ 2 ตำแหน่งสถานีเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำท่าจีน



รูปที่ 3 ความเข้มข้นของโคลิฟอร์มทั้งหมดที่ตรวจวัดได้ จากข้อมูลกรมควบคุมมลพิษ ในฤดูฝน (a) และฤดูแล้ง (b)

การเก็บตัวอย่างน้ำและวิเคราะห์พารามิเตอร์คุณภาพน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจาก 12 สถานี แต่เนื่องจากข้อจำกัดของจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ในหนึ่งครั้ง ทำให้ต้องแบ่งการเก็บตัวอย่างในหนึ่งรอบเป็นครั้งละ 6 สถานี ห่างกัน 1 สัปดาห์ โดยเก็บในฤดูฝน 2 รอบ และฤดูแล้ง 2 รอบ ตามแผนการเก็บน้ำ แสดงดังตารางที่ 6 โดยช่วงเวลาที่เก็บให้เป็นช่วงเวลาน้ำล้น คือ ระหว่างช่วงน้ำขึ้นสูงสุดและช่วงน้ำลงสูงสุด โดยตรวจสอบข้อมูลจาก กรมอุทกศาสตร์ กองทัพเรือ นอกจากนี้ เพื่อการควบคุมคุณภาพในงานวิจัย ได้ทำการเก็บตัวอย่างเปล่า (field blank) และตัวอย่างซ้ำ (field duplicate) อย่างละ 1 ชุดต่อหนึ่งรอบการเก็บน้ำ และทำการวิเคราะห์เหมือนกับตัวอย่างน้ำจริง พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์ วิธีการเก็บน้ำ และวิธีวิเคราะห์ แสดงดังตารางที่ 7 และภาคผนวก ข12

สำหรับตัวอย่างน้ำที่เก็บเพื่อวิเคราะห์ทางชีววิทยา นำบรรจุใส่ภาชนะพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแรงดัน (autoclave) ตัวอย่างน้ำที่เก็บเพื่อวิเคราะห์ทางเคมีกายภาพนำบรรจุใส่ภาชนะสะอาดที่ไม่ฆ่าเชื้อ ขวดบรรจุให้นำแช่ในน้ำแข็งระหว่างการขนส่งกลับไปห้องปฏิบัติการและทำการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 4

ตารางที่ 6 แผนความถี่และสถานีในการเก็บตัวอย่างน้ำ

รอบที่	ฤดูกาล*	วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานีเก็บน้ำ	ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ
1	ฤดูฝน	29 ก.ค. 60	TC01, TC04, TC07, TC09, TC10, TC13	ตัวอย่างซ้ำที่ TC13
	ฤดูฝน	5 ส.ค. 60	TC15, TC17, TC22, TC23, TC25, TC28	ตัวอย่างเปล่า เก็บที่ TC28
2	ฤดูฝน	19 ส.ค. 60	TC01, TC04, TC07, TC09, TC10, TC13	ตัวอย่างซ้ำที่ TC13
	ฤดูฝน	26 ส.ค. 60	TC15, TC17, TC22, TC23, TC25, TC28	ตัวอย่างเปล่า เก็บที่ TC28
3	ฤดูแล้ง	3 ก.พ. 61	TC01, TC04, TC07, TC09, TC10, TC13	ตัวอย่างซ้ำที่ TC13
	ฤดูแล้ง	10 ก.พ. 61	TC15, TC17, TC22, TC23, TC25, TC28	ตัวอย่างเปล่า เก็บที่ TC28
4	ฤดูแล้ง	3 มี.ค. 61	TC01, TC04, TC07, TC09, TC10, TC13	ตัวอย่างซ้ำที่ TC13
	ฤดูแล้ง	10 มี.ค. 61	TC15, TC17, TC22, TC23, TC25, TC28	ตัวอย่างเปล่า เก็บที่ TC28

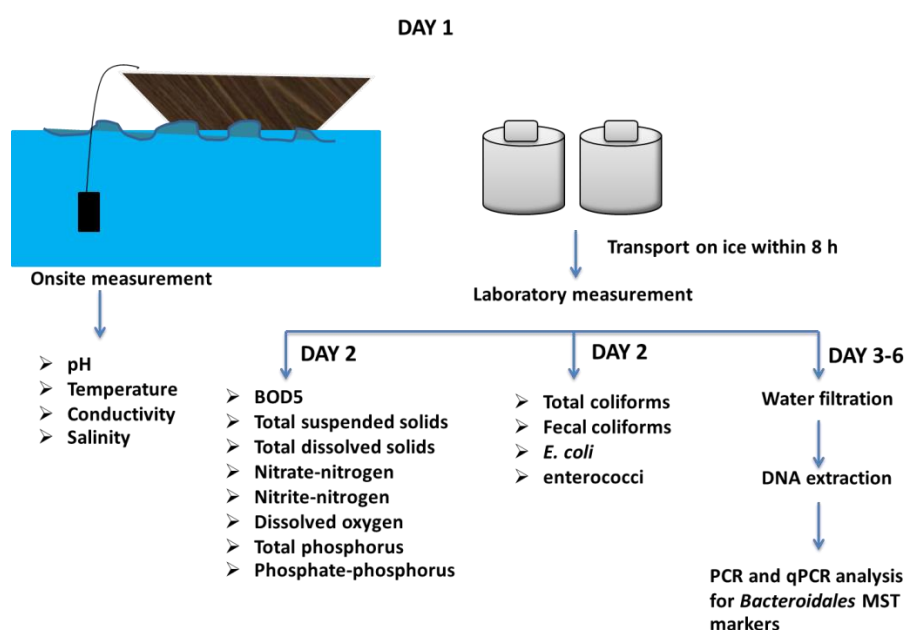
หมายเหตุ ฤดูฝนนับตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม

ฤดูแล้งนับตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน

ตารางที่ 7 พารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่ทำการวิเคราะห์ วิธีเก็บตัวอย่างน้ำ และวิธีวิเคราะห์

พารามิเตอร์	วิธีเก็บตัวอย่าง	วิธีวิเคราะห์*
pH	จุ่มโพรบในน้ำ	electronic probe
temperature	จุ่มโพรบในน้ำ	electronic probe
conductivity	จุ่มโพรบในน้ำ	electronic probe
salinity	จุ่มโพรบในน้ำ	electronic probe
BOD5	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่กึ่งกลางความลึก	azide modification
total suspended solids	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่กึ่งกลางความลึก	dried at 103-105°C
total dissolved solids	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่กึ่งกลางความลึก	dried at 180°C
dissolved oxygen	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่กึ่งกลางความลึก	azide modification
total phosphorus	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่กึ่งกลางความลึก	ascorbic acid
phosphate - phosphorus	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่กึ่งกลางความลึก	ascorbic acid
total coliforms	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่ 30 ซม.ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ	multiple fermentation tube, membrane filtration
fecal coliforms	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่ 30 ซม.ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ	multiple fermentation tube
<i>E. coli</i>	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่ 30 ซม.ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ	membrane filtration
enterococci	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่ 30 ซม.ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ	membrane filtration
DNA	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่ 30 ซม.ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ	PCR, qPCR
SR14 phage	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่ 30 ซม.ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ	double-layer plaque assay
AIM06 phage	จ้วงจากกึ่งกลางลำน้ำ ที่ 30 ซม.ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ	double-layer plaque assay

- หมายเหตุ 1. *วิเคราะห์ตามวิธีของ Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater (American Public Health Association *et al.*, 2017)
2. SR14 และ AIM06 phage เป็น bacteriophage ของ enterococcus ใช้ในการตรวจวัดการปนเปื้อนของน้ำเสียชุมชน (Wangkahad *et al.* 2017, 2015)



รูปที่ 4 แผนผังแสดงการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวัดพารามิเตอร์คุณภาพน้ำต่างๆ

การสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างน้ำธรรมชาติเพื่อเตรียมตรวจวัดด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ

นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 ลิตร มาปรับพีเอชเป็น 3.5 (Harwood *et al.*, 2013) ก่อนนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Mixed cellulose esters membrane ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร (Merck Millipore Ltd) จากนั้นนำกระดาษกรองมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด ZR Fecal DNA MiniPrep Kit (Zymo Research) ได้ดีเอ็นเอปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific) และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตรฐานการปฏิบัติงานการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำผิวดิน ดังแสดงในภาคผนวก ข13

การวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่บ่งชี้แหล่งกำเนิดการปนเปื้อนและความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์อื่นๆ

ทำการตรวจวัดดีเอ็นเอของตัวอย่างด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ สำหรับแหล่งกำเนิดเป้าหมาย 4 ประเภท คือ น้ำเสียชุมชน สุกร โค และแหล่งกำเนิดรวม (universal) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข5 – ข10 และ ข14 – ข15 รายงานผลแบบเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (gene copies per ml) ทำการเปรียบเทียบพารามิเตอร์ต่างๆระหว่างฤดูฝนและฤดูแล้งด้วยสถิติ Analysis of variance (ANOVA) สำหรับพารามิเตอร์ที่มีการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) และ Kruskal–Wallis test สำหรับพารามิเตอร์ที่มีการแจกแจงไม่ปกติ (Non-normal distribution) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำทั้งหมดด้วยวิธีวิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) ด้วยวิธี Principal component analysis (PCA) โดยโปรแกรมอาร์ เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ โดยไม่แบ่งกลุ่มเป็นตัวแปรต้นหรือตัวแปรตาม แต่ทำการสร้างกลุ่มตัวแปรใหม่ ที่ประกอบด้วยความแปรปรวนของตัวแปรเดิม การจัดกลุ่มพารามิเตอร์ใน PCA ใช้วิธี k-means analysis นอกจากนั้นวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบลำดับขั้น (hierarchical clustering) ของตัวอย่างน้ำจากสถานีต่างๆ ในแต่ละรอบการเก็บน้ำในฤดูฝนและฤดูแล้งโดยหา distance matrix ด้วย Euclidean method และใช้ Ward's method ในการสร้างแผนภาพแบบลำดับขั้น หลังจากนั้นทำการจัดกลุ่มพารามิเตอร์และสถานีของการเก็บน้ำทั้ง 4 รอบโดยไม่แยกเป็นฤดูกาล เพื่อหาค่าความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์หลัก (common parameters) และสถานีที่มีความสัมพันธ์กันในทุกฤดู ด้วยการใช้ Model- Based Clustering ซึ่งจะจัดกลุ่มโดยหาความน่าจะเป็นของทุกค่าในแต่ละ cluster และเหมาะสำหรับการจัดกลุ่มพารามิเตอร์ที่ข้อมูลมีการแจกแจงหลายแบบ (normal or Gaussian distribution) โดยใช้ the Expectation-Maximization (EM) algorithm การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (correlation analysis) ระหว่างตัวแปร 2 ตัว เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ด้วย Kendall's correlation coefficient จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลกลุ่มแบคทีเรียที่บ่งชี้แหล่งกำเนิดการปนเปื้อนโดยคำนึงถึงลักษณะการใช้ประโยชน์ที่ดินในบริเวณสถานีเก็บน้ำแต่ละจุด

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 การเก็บตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนในพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน

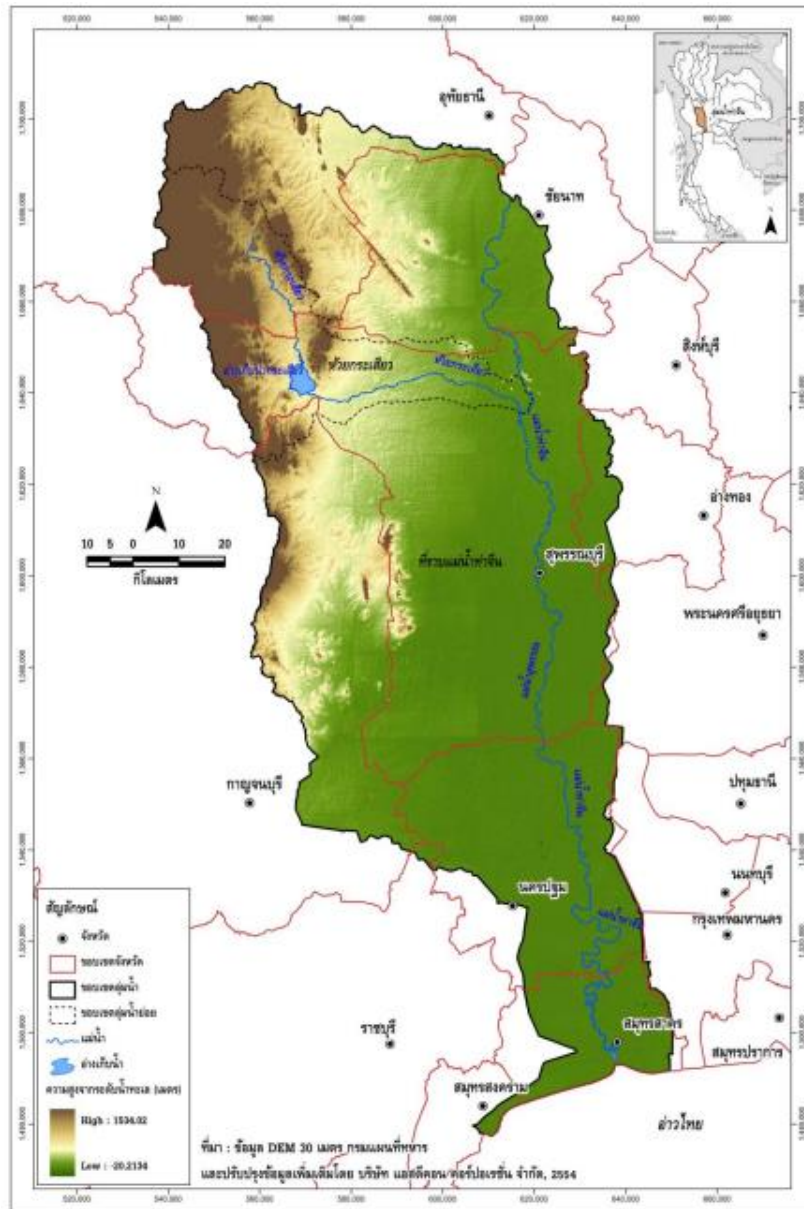
3.1.1 ศึกษาประเภทและที่ตั้งของแหล่งกำเนิดมลพิษที่สำคัญในลุ่มน้ำท่าจีน ซึ่งประกอบด้วย ชุมชน และฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่สำคัญ ได้แก่ สุกร โค และไก่ รวมเรียกว่า แหล่งกำเนิดหลัก

ข้อมูลภูมิศาสตร์และคุณภาพน้ำผิวดิน

ลุ่มน้ำท่าจีนอยู่ในเขตภาคกลาง ครอบคลุมพื้นที่ 13,477.16 ตารางกิโลเมตร พื้นที่ลุ่มน้ำครอบคลุมเขตจังหวัดต่างๆ ดังตารางที่ 8 และรูปที่ 5 ดังนี้

ตารางที่ 8 จังหวัดในลุ่มน้ำท่าจีน (สถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร (องค์การมหาชน) 2555)

จังหวัด	พื้นที่จังหวัด (ตร.กม.)	พื้นที่ในเขตลุ่มน้ำท่าจีน		ร้อยละของ พื้นที่จังหวัด	ร้อยละของพื้นที่ ในลุ่มน้ำท่าจีน
		(ตร.กม.)	(ไร่)		
กรุงเทพมหานคร	1,573.52	11.71	7,318	0.74	0.09
กาญจนบุรี	19,376.39	2,088.57	1,305,358	10.78	15.50
ชัยนาท	2,500.40	1,646.72	1,029,202	65.86	12.22
นครปฐม	2,124.82	1,844.57	1,152,855	86.81	13.69
นนทบุรี	637.06	3.25	2,031	0.51	0.02
พระนครศรีอยุธยา	2,557.82	57.60	36,003	2.25	0.43
ราชบุรี	5,195.27	23.07	14,417	0.44	0.17
สมุทรสงคราม	409.33	32.45	20,280	7.93	0.24
สมุทรสาคร	858.00	663.53	414,704	77.33	4.92
สิงห์บุรี	830.68	9.26	5,788	1.11	0.07
สุพรรณบุรี	5,426.34	4,819.38	3,012,115	88.81	35.76
อ่างทอง	952.70	220.01	137,507	23.09	1.63
อุทัยธานี	6,621.64	2,057.03	1,285,646	31.07	15.26
รวม		13,477.16	8,423,225		100.00



รูปที่ 5 แผนที่ลุ่มน้ำท่าจีน (สถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร (องค์การมหาชน) 2555)

แม่น้ำท่าจีนนั้นแยกออกมาทางฝั่งขวาของแม่น้ำเจ้าพระยาที่ตำบลมะขามเฒ่า อำเภอดำรงวิทยะ จังหวัดชัยนาท และไหลผ่านจังหวัดสุพรรณบุรีนครปฐม และออกสู่อ่าวไทยที่จังหวัดสมุทรสาคร โดยทางกรมควบคุมมลพิษ (2537) ได้กำหนดพื้นที่ของแม่น้ำท่าจีนและกำหนดประเภทแหล่งน้ำผิวดิน ดังนี้คือ

ช่วงที่ 1 แม่น้ำท่าจีนตอนล่าง เริ่มจากปากแม่น้ำ อำเภอมะนัง จังหวัดสมุทรสาคร ถึงที่ว่าการอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม (กิโลเมตรที่ 0 ถึง 82) กำหนด ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน ให้เป็นแหล่งน้ำประเภทที่ 4

ช่วงที่ 2 แม่น้ำท่าจีนตอนกลาง จากที่ว่าการอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ถึงประตูระบายน้ำโพธิ์พระยา อำเภอมะนัง จังหวัดสุพรรณบุรี (กิโลเมตรที่ 82 ถึง 202) กำหนดให้เป็นแหล่งน้ำประเภทที่ 3

ช่วงที่ 3 แม่น้ำท่าจีนตอนบน จากประตูระบายน้ำโพธิ์พระยา จังหวัดสุพรรณบุรี ถึงบ้านปากคลองมะขามเฒ่า อำเภอดำรงวิทยะ จังหวัดชัยนาท (กิโลเมตรที่ 202 ถึง 325) กำหนดให้เป็นแหล่งน้ำประเภทที่ 2

ข้อมูลประชากรและแหล่งกำเนิดมลพิษ

เนื่องจากแม่น้ำท่าจีนไหลผ่าน 4 จังหวัดหลัก ได้แก่ ชัยนาท สุพรรณบุรี นครปฐม และสมุทรสาคร ในโครงการนี้ จึงจะทำการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ 4 จังหวัดดังกล่าวก่อน โดยแหล่งกำเนิดมลพิษที่สำคัญได้แก่ ชุมชน และ การเลี้ยงสัตว์ชนิดต่างๆ ข้อมูลประชากรของแต่ละจังหวัดในปี 2558 แสดงดังตารางที่ 9 และข้อมูลการเลี้ยงสัตว์แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 9 ข้อมูลประชากรรายจังหวัดในปี 2558 (สำนักงานสถิติแห่งชาติ 2559)

จังหวัด	จำนวนประชากร (คน)
ชัยนาท	331,655
สุพรรณบุรี	849,699
นครปฐม	899,342
สมุทรสาคร	545,454

ตารางที่ 10 ข้อมูลปศุสัตว์รายจังหวัดในปี 2558 (กรมปศุสัตว์ 2559)

จังหวัด	จำนวนปศุสัตว์ (ตัว)						
	ไก่	เป็ด	สุกร	โค	กระบือ	แพะ	แกะ
ชัยนาท	2,966,815	516,008	57,105	36,197	7,077	11,755	669
สุพรรณบุรี	13,494,765	2,150,014	315,196	123,765	2,495	15,002	589
นครปฐม	11,210,550	2,158,884	213,510	22,322	480	9,554	1,034
สมุทรสาคร	179,602	11,533	136	46,150	13	1,118	6
รวม	27,851,732	4,836,439	585,947	228,434	10,065	37,429	2,298

จากการศึกษาพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน พบว่า กิจกรรมหลักที่เป็นแหล่งกำเนิดมลพิษทางน้ำได้แก่ กิจกรรมชุมชน และ ฟาร์มปศุสัตว์หลักได้แก่ ฟาร์มเลี้ยงสุกร โคและไก่ ในการศึกษาครั้งนี้ จึงกำหนดให้แหล่งกำเนิดหลัก ได้แก่ สุกร โค ไก่ และชุมชน โดยการพัฒนาวิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดได้ จะมุ่งเน้นแหล่งกำเนิดหลัก ส่วนแหล่งกำเนิดรอง คือ การเลี้ยงสัตว์ประเภทอื่นๆในปริมาณที่รองลงมาในบริเวณลุ่มน้ำท่าจีน ได้แก่ แพะ แกะ กระบือ และเป็ด จะนำมาใช้ในการทดสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจวัดในลำดับต่อไป นอกจากนี้ การตรวจวัดการปนเปื้อนจากแหล่งกำเนิดรวม หมายถึง การบ่งชี้การปนเปื้อนเมื่อมีสิ่งปนเปื้อนจากชุมชน หรือสัตว์ชนิดต่างๆ (ในงานวิจัยนี้ ครอบคลุมการทดสอบกับน้ำเสียชุมชน มูลสุกร โค ไก่ แพะ แกะ กระบือ และเป็ด) ดังนั้น จึงเป็นการยืนยันการปนเปื้อนจริงที่ไม่ระบุแหล่งกำเนิด

ในส่วนของน้ำเสียชุมชน ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียอาคารก่อนการบำบัดที่รวบรวมน้ำเสียห้องน้ำในอาคารที่พักอาศัย อาคารสำนักงาน อาคารโรงพยาบาล (เฉพาะห้องน้ำ โดยไม่รวมห้องผ่าตัดหรือห้องทำการอื่นๆ) และโรงเรียน โดยไม่รวมน้ำเสียจากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนซึ่งอาจมีการปนเปื้อนมูลสุนัขและแมว เป็นต้น สาเหตุที่ทำการเลือกน้ำเสียรวมเพื่อเป็นตัวแทนสิ่งปนเปื้อนจากคน โดยไม่ใช้ตัวอย่างอุจจาระคนนั้น เนื่องจากการจำลองสถานการณ์การปนเปื้อนแหล่งน้ำจริงว่าการปนเปื้อนจากน้ำเสียจากกลุ่มคนหรือชุมชน ให้ผลกระทบมากกว่าการปนเปื้อนสิ่งปนเปื้อนจากอุจจาระรายคน ส่วนการทดสอบมูลสัตว์หรืออุจจาระสัตว์นั้นแทนการใช้น้ำเสียที่ออกจากฟาร์ม เนื่องจากการจัดการฟาร์มมีความหลากหลาย บางฟาร์มใช้น้ำฉีดล้างพื้นคอกเพื่อนำพาส่งสิ่งปนเปื้อนออกไป ในขณะที่บางฟาร์มใช้วิธีกวาดมูลแห้งออกก่อนการขัดล้างพื้น ทำให้ปริมาณการปนเปื้อนมีความแตกต่างกันอย่างสูงมาก การใช้น้ำเสียจากฟาร์มสัตว์จึงไม่เป็นตัวแทนที่ดี การทดสอบมูลสัตว์จะนำมูลสดจากสัตว์รายตัว จำนวน 20 ตัวขึ้นไปมาผสมเป็น 1 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนที่ดีของกลุ่มประชากรรายฝูง

3.1.2 กำหนดจำนวนตัวอย่างและสถานที่เก็บตัวอย่าง ตามสัดส่วนการกระจายตัวของแหล่งกำเนิดหลักและแหล่งกำเนิดรอง

การวางแผนเก็บตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชน ได้ทำการออกแบบอย่างเป็นระบบ กล่าวคือ จำนวนตัวอย่างในแต่ละจังหวัดจะคำนวณจากสัดส่วนจำนวนสัตว์ฟาร์มแต่ละชนิด (ตารางที่ 9 และ 10) กล่าวคือ ในจังหวัดที่มีการเลี้ยงโคจำนวนมาก จะทำการเก็บตัวอย่างมูลโคมากกว่าในจังหวัดที่มีสถิติจำนวนโคน้อยกว่า ทั้งนี้ การเทียบสัดส่วนจะเทียบกับจำนวนสัตว์โดยไม่เทียบกับจำนวนฟาร์ม เนื่องจากการปริมาณสิ่งปฏิกูลแปรผันตามจำนวนสัตว์ และงานวิจัยนี้ไม่คำนึงถึงปัจจัยการจัดการของเสียในแต่ละฟาร์ม ซึ่งมีความหลากหลายมาก ตารางที่ 11 แสดงจำนวนตัวอย่างที่วางแผนเก็บรายจังหวัด

ตารางที่ 11 จำนวนตัวอย่างที่วางแผนเก็บโดยแยกตามจังหวัด

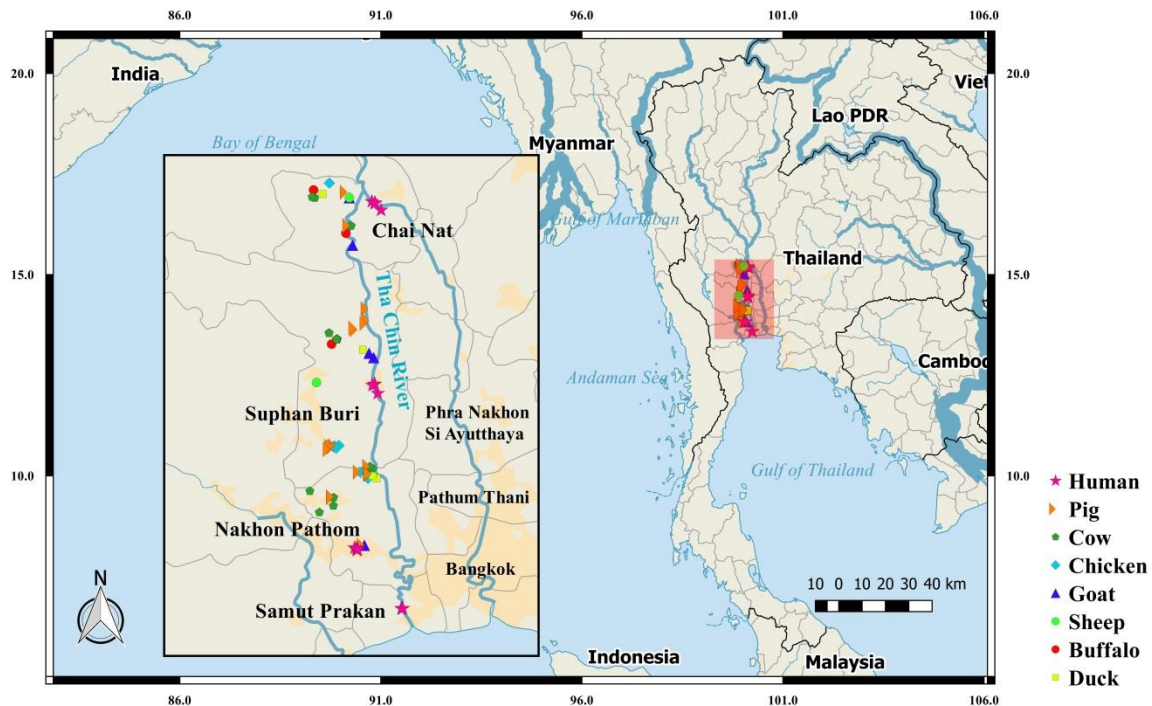
จังหวัด	แหล่งกำเนิดหลัก (ตัวอย่าง)				แหล่งกำเนิดรอง (ตัวอย่าง)			
	ชุมชน	สุกร	โค	ไก่	แพะ	แกะ	กระบือ	เป็ด
ชัยนาท	5	3	4	3	2	2	4	1
สุพรรณบุรี	6	13	14	12	2	1	1	2
นครปฐม	9	9	2	10	1	2	0	2
สมุทรสาคร	5	0	5	0	0	0	0	0
รวม	25	25	25	25	5	5	5	5

3.1.3 เก็บรวบรวมตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนและสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่าง

ข้อมูลสรุปตัวอย่างมูลสัตว์และตัวอย่างน้ำเสียชุมชนที่ทำการเก็บตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 12 (รายละเอียดของตัวอย่าง สถานที่เก็บ และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ แสดงในภาคผนวก ง.) และแผนที่เก็บตัวอย่างดังแสดงในรูปที่ 6 โดยได้เพิ่มการเก็บตัวอย่างในจังหวัดใกล้เคียงในภาคกลางตอนล่าง คือ จังหวัดปทุมธานี กรุงเทพมหานคร และพระนครศรีอยุธยา (ตามความเห็นผู้ประเมิน) ซึ่งทำให้แหล่งกำเนิดบางชนิดมีความแตกต่างระหว่างจำนวนตัวอย่างรายจังหวัดที่วางแผนไว้และที่เก็บจริง เช่น แหล่งกำเนิดจากชุมชน ซึ่งเพิ่มตัวอย่างในกรุงเทพมหานครมากขึ้น เนื่องจากเป็นเมืองหลวงและมีผู้อาศัยอยู่มาก

ตารางที่ 12 สรุปจำนวนตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนรายจังหวัด

จังหวัด	แหล่งกำเนิดเป้าหมาย			แหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมาย					รวม
	ชุมชน	สุกร	โค	ไก่	แพะ	แกะ	กระบือ	เป็ด	
ลุ่มน้ำท่าจีน									
ชัยนาท	5	2	3	2	2	3	4	1	22
สุพรรณบุรี	4	10	10	8	2	2	1	2	39
นครปฐม	5	8	7	9	3	0	0	2	34
สมุทรสาคร	5	0	0	0	0	0	0	0	5
รวม	19	20	20	19	7	5	5	5	100
ลุ่มน้ำเจ้าพระยา									
ปทุมธานี	0	3	3	2	3	0	0	0	11
กรุงเทพฯ	9	0	1	0	0	0	0	0	10
พระนครศรีอยุธยา	0	5	1	0	0	0	1	0	7
รวม	9	8	5	2	3	0	1	0	28



รูปที่ 6 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์

3.2 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์

3.2.1 ทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างจากแหล่งกำเนิดต่างๆ และคำนวณหาความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity)

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์ ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 22 คู่ ด้วยวิธีพีซีอาร์ ดังแสดงในตารางที่ 13 จะเห็นได้ว่า ทำการทดสอบบางไพรเมอร์ด้วยตัวอย่างเพียงบางส่วน (ไม่ครบจำนวน) เนื่องจากเห็นแนวโน้มว่าจะไม่เป็นไพรเมอร์ที่ดี เช่น มีค่าความไว หรือความจำเพาะน้อยมาก จึงไม่ทำการทดสอบไพรเมอร์นั้นๆต่อจนครบทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ ผลการประเมินไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับไก่ พบว่าไม่มีไพรเมอร์คู่ใดให้ผลผ่านเกณฑ์ ทั้งนี้การออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับแหล่งกำเนิดไก่จะใช้เวลามาก ทำให้ไม่สามารถทำได้ในโครงการนี้ อย่างไรก็ตาม ไพรเมอร์ 3 คู่ที่ตรวจวัดแหล่งกำเนิดรวมนั้น สามารถตรวจวัดมูลไก่ได้ ดังนั้นเมื่อใช้ควบคู่กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดอื่น ทำให้ช่วยในการแปลผลแหล่งกำเนิดได้

ตารางที่ 13 ผลการตรวจวัดตัวอย่างน้ำเสียชุมชนและมูลสัตว์ ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดชนิดต่างๆ ด้วยวิธีพีซีอาร์

ชนิด แหล่งกำเนิด	ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	รหัส ไพร เมอร์	จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวก/จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ								ความ ไว (%)	ความจำเพาะ (%)
				คน	สุกร	โค	ไก่	แพะ	แกะ	กระบือ	เปิด		
รวมทุก แหล่งกำเนิด (Universal)	1	BacUni-520f	BT5479	19/19	20/20	20/20	19/19	7/7	5/5	5/5	5/5	100	—
		BacUni-690r1	BT5480										
	2	GenBac3F	BT5482	19/19	20/20	20/20	19/19	7/7	5/5	5/5	5/5	100	—
		GenBac4R	BT5483										
	3	Bac32F	BT5524	15/19	20/20	20/20	19/19	7/7	5/5	5/5	5/5	96	—
		Bac708R	BT5492										
ชุมชน	1	BacHum-160f	BT5488	18/19	17/20	1/20	9/19	5/7	2/5	1/5	2/5	95	54
		BacHum-241r	BT5489										
	2	HF183	BT5493	16/19	4/20	1/20	9/19	2/7	1/5	0/5	2/5	84	77
		BFDrev	BT5494										
	3	HF183F	BT5493	18/19	4/20	4/20	12/19	1/7	1/5	0/5	2/5	95	70
		Bac708R	BT5492										
สุกร	1	PF163F	BT5491	0/0*	20/20	6/20	3/19	0/7	1/5	4/5	0/5	100	77
		Bac708R	BT5492										
	2	Pig-2-Bac41F	BT5931	0/19	20/20	0/20	2/19	0/7	0/5	0/5	0/5	100.0	98
		Pig-2-Bac163Rm	BT5932										
โค	1	CowM2F	BT5484	0/0*	3/3*	6/7*	1/1*	2/2*	0/0*	0/0*	0/0*	86	0
		CowM2R	BT5485										
	2	BactCow CF128f1	BT5486	0/0*	0/3*	0/7*	1/1*	2/2*	0/0*	0/0*	0/0*	100	0
		BactCow CF305r	BT5487										
	3	CF193	BT5807	0/0*	0/3*	0/7*	0/1*	0/2*	0/0*	0/0*	0/0*	0	100
		Bac708R	BT5492										

ตารางที่ 13 (ต่อ) ผลการตรวจวัดตัวอย่างน้ำเสียอาคารและมูลสัตว์ ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดชนิดต่างๆด้วยวิธีพีซีอาร์

ชนิด แหล่งกำเนิด	ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	รหัส ไพร เมอร์	จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวก/ตัวอย่างทั้งหมด								ความ ไว (%)	ความจำเพาะ (%)
				คน	สุกร	โค	ไก่	แพะ	แกะ	กระบือ อ	เป็ด		
โค (ต่อ)	4	CF128F	BT5486	0/0*	3/3*	7/7*	1/1*	2/2*	0/0*	0/0*	0/0*	100	0
		Bac708R	BT5492										
	5	Bac2F	BT5868	0/19	0/20	14/20	0/19	0/7	0/5	0/5	0/5	70	100
		Bac2R	BT5869										
	6	Bac3F	BT5870	0/19	0/20	17/20	0/19	0/7	0/5	0/5	0/5	85	100
		Bac3R	BT5871										
	7	qCS621F	BT5872	0/19	1/20	18/20	18/19	7/7	5/5	5/5	4/5	90	50
		qBac725R	BT5873										
ไก่	1	CP2-9F	BT5808	0/0*	0/3*	0/7*	0/1*	0/2*	0/0*	0/0*	0/0*	0	100
		CP2-9R	BT5809										
	2	qCD362F-HU	BT5810	0/0*	0/0*	0/0*	13/19	0/0*	0/0*	0/0*	2/5	68	60
		qCD464R-HU	BT5811										
	3	LA35F	BT5919	0/0*	0/0*	0/0*	0/19	0/0*	0/0*	0/0*	1/5	0	80
		LA35R	BT5920										
	4	Q-PvA-f	BT5925	0/0*	0/0*	0/0*	0/19	0/0*	0/0*	0/0*	0/5	0	100
		Q-PvA-f	BT5926										
	5	Av4143F	BT6080	0/0*	19/20	19/20	15/19	7/7	4/5	5/5	2/5	79	10
		Av4143R	BT6081										
	6	Av43F	BT6082	0/0*	0/0*	0/0*	8/19	0/0*	0/0*	0/0*	0/0*	42	—
		Av43R	BT6083										

3.2.2 ประเมินคัดเลือกไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสมที่สุดของวิธีพีซีอาร์สำหรับแต่ละแหล่งกำเนิด

ผลของคู่ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดสำหรับแหล่งกำเนิดชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 สรุปคู่ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดสำหรับแหล่งกำเนิดชนิดต่างๆ และค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ประเมินคู่ไพรเมอร์

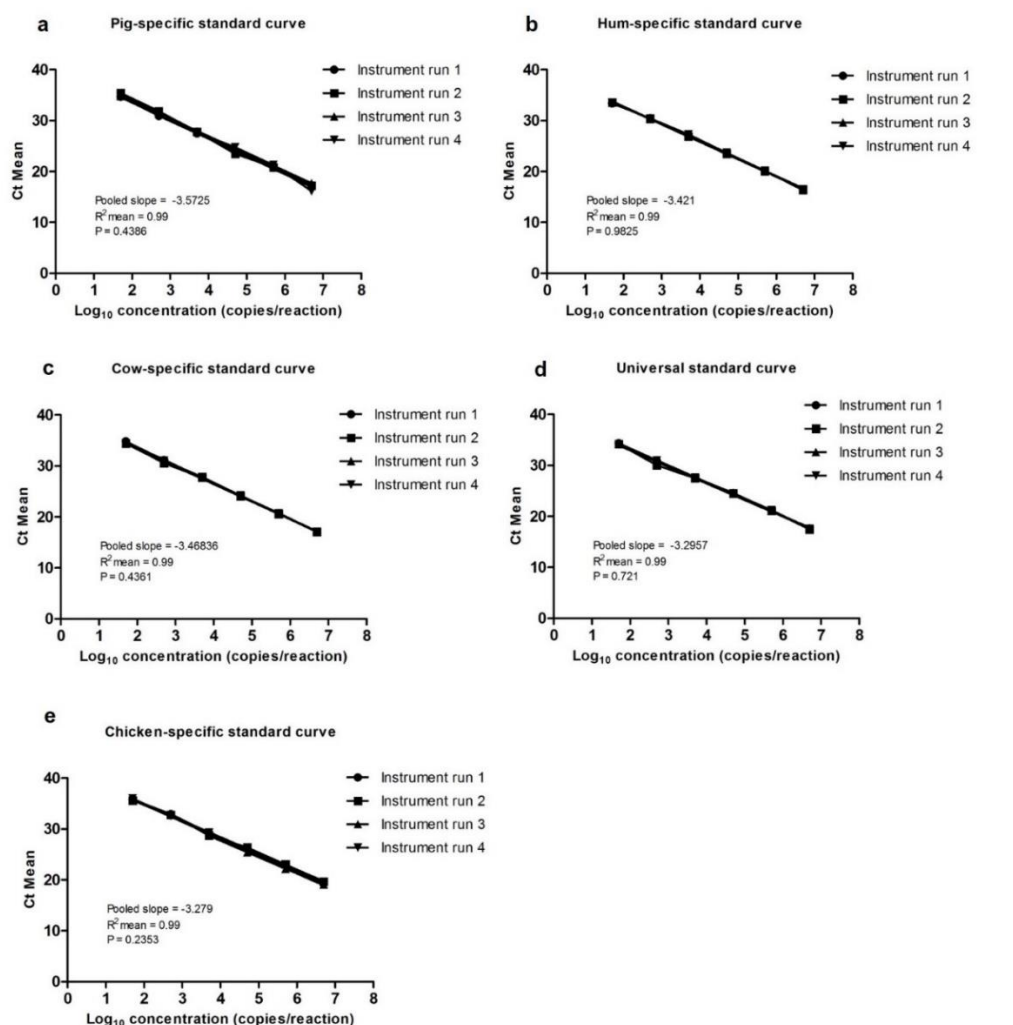
ชนิดแหล่งกำเนิด	ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	ความไว (%)	ความจำเพาะ (%)	อัตราการเกิดผลบวก	อัตราการเกิดผลลบ
รวมทุกแหล่งกำเนิด (Universal)	1	BacUni-520f	BT5479	100	NA	100	NA
		BacUni-690r1	BT5480				
	2	GenBac3F	BT5482	100	NA	100	NA
		GenBac4R	BT5483				
	3	Bac32F	BT5524	96	NA	100	NA
		Bac708R	BT5492				
ชุมชน	2	HF183	BT5493	84	77	46	95
		BFDrev	BT5494				
สุกร	2	Pig-2-Bac41F	BT5931	100	98	91	100
		Pig-2-Bac163Rm	BT5932				
โค	6	Bac3F	BT5870	85	100	100	96
		Bac3R	BT5871				

จากผลการวิจัยพบว่า คู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจยืนยันการปนเปื้อนสิ่งปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำแบบไม่เจาะจงแหล่งกำเนิดสามารถใช้ได้ดีทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ที่ทำการทดสอบ โดยหากทดสอบแล้วได้ผลบวก (หมายถึงขึ้นแบนด์ดีเอ็นเอ) สามารถมั่นใจได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ว่าเป็นการปนเปื้อนสิ่งปนเปื้อนจากคนหรือมูลสัตว์จริง สำหรับวิธีจำแนกมลพิษจากคน ใช้คู่ไพรเมอร์ HF183/BFDrev พบว่าหากทดสอบกับตัวอย่างน้ำได้ผลเป็นบวก จะมีความมั่นใจ 46 เปอร์เซ็นต์ ว่าตัวอย่างนั้นปนเปื้อนสิ่งปนเปื้อนจากคนจริง แต่หากทดสอบได้ผลลบ จะมีความมั่นใจสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ว่าตัวอย่างน้ำนั้นไม่มีการปนเปื้อนสิ่งปนเปื้อนจากคนจริง เนื่องจากมีความไวค่อนข้างสูงมากแต่ความจำเพาะมีค่าต่ำลงมา สำหรับวิธีจำแนกมลพิษจากสุกร ใช้คู่ไพรเมอร์ Pig-2-Bac41F/Pig-2-Bac163Rm พบว่าเมื่อผลเป็นบวก มีความมั่นใจที่จะมีการปนเปื้อนมูลสุกรจริงในตัวอย่างน้ำ 91 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่หากผลเป็นลบ มีความมั่นใจ 100 เปอร์เซ็นต์ ว่าไม่มีการปนเปื้อนจริง ทั้งนี้เนื่องมาจากวิธีนี้มีความไวมากแต่ยังสามารถตรวจเจอในมูลสัตว์อื่นได้อยู่บ้าง ส่วนวิธีจำแนกมลพิษจากโคนั้น ใช้คู่ไพรเมอร์ Bac3F/Bac3R หากได้ผลวิเคราะห์เป็นบวกจะมั่นใจ 100 เปอร์เซ็นต์ ว่าตัวอย่างน้ำมีการปนเปื้อนจากมูลโคจริง และหากเกิดผลเป็นลบก็มั่นใจได้ค่อนข้างสูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ เช่นกันว่าตัวอย่างน้ำไม่มีการปนเปื้อนจากมูลโคจริง จากเกณฑ์ที่กำหนดเบื้องต้นว่าการประเมินคู่ไพรเมอร์ที่ดี ควรมีค่าความไวและความจำเพาะมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ นั้น จะพบว่าไพรเมอร์สำหรับการจำแนกแหล่งกำเนิดจากคนมีค่าความจำเพาะต่ำกว่าเกณฑ์ที่ตั้งไว้ แต่ก็ยังถือว่าใช้ได้เพราะค่าความไวผ่านเกณฑ์

3.3 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ

3.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียเป้าหมายในแหล่งกำเนิดต่างๆ

กราฟมาตรฐานที่จำเพาะกับไพรเมอร์แต่ละคู่แสดงดังรูปที่ 7 โดยในแต่ละคู่ไพรเมอร์นั้น ได้แสดงกราฟมาตรฐานทั้ง 4 เส้นที่ได้จากการทดสอบ 4 รอบที่เป็นอิสระต่อกัน ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย analysis of covariance (ANCOVA) ค่าความชันเฉลี่ยของกราฟมาตรฐานสี่เส้นที่จำเพาะต่อสุกร (a) น้ำเสียชุมชน (b) โค (c) ทุกแหล่งกำเนิด (universal) (d) และไก่ (e) มีค่าเท่ากับ -3.57 -3.42 -3.47 -3.3 และ -3.28 ตามลำดับ รวมทั้งมีค่าเฉลี่ยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (correlation coefficients; R^2) = 0.99 สำหรับไพรเมอร์ทุกคู่ ค่า PCR amplification efficiency ที่คำนวณได้อยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ โดยมีค่าตั้งแต่ 90-102 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ค่า LOD ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อทุกแหล่งกำเนิด น้ำเสียชุมชน สุกร โค และไก่อีก ที่ได้จากการทดสอบมีค่า 20 40 40 30 และ 60 gene copy numbers ตามลำดับ ส่วนค่า LOQ ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อทุกแหล่งกำเนิด น้ำเสียชุมชน สุกร โค และไก่อีกนั้นเท่ากับ 40 61 66 52 และ 118 ตามลำดับ ดังตารางที่ 15



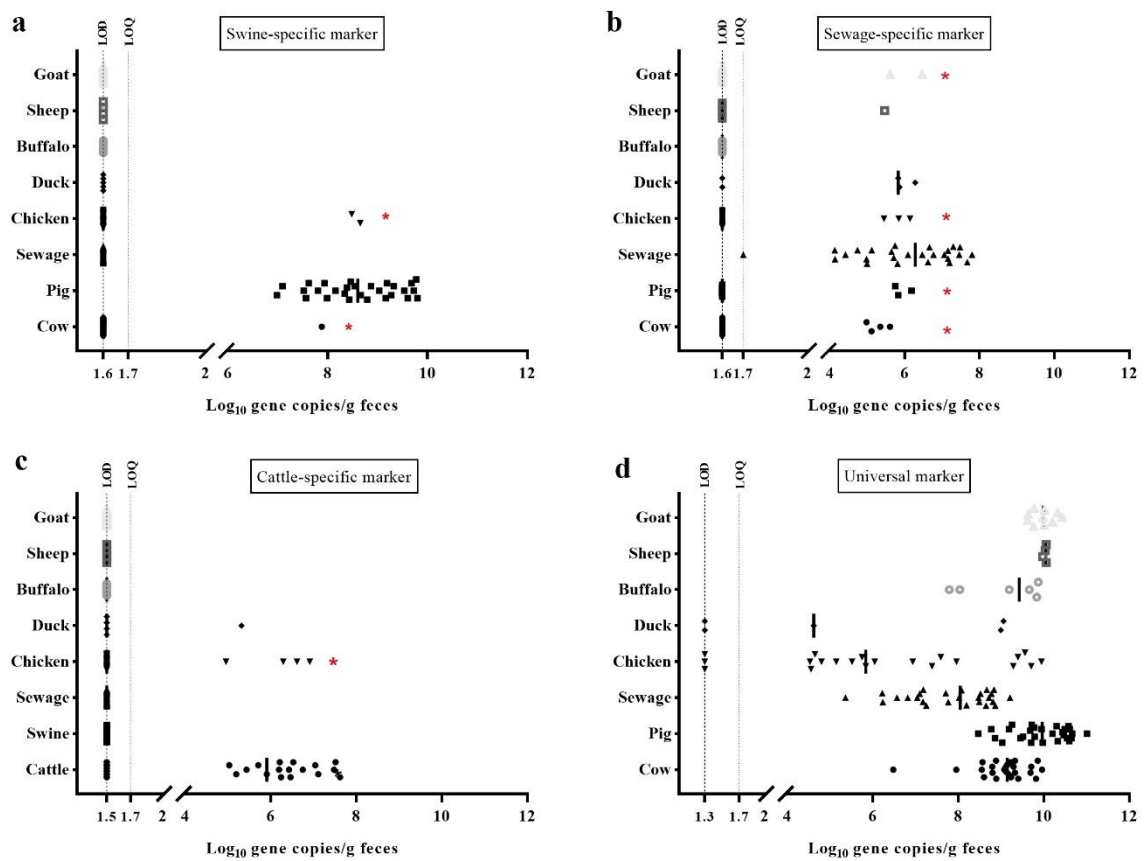
รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสุกร (a) น้ำเสียชุมชน (b) โค (c) รวมทุกแหล่งกำเนิด (d) และไก่ (e) ความแตกต่างทางสถิติของเส้นความชันทั้ง 4 เส้น เมื่อทดสอบด้วย analysis of covariance (ANCOVA)

ตารางที่ 15 พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับกราฟมาตรฐานของไพรเมอร์คู่ต่างๆ

แหล่งกำเนิด เป้าหมาย	ความชันเฉลี่ย (Pooled slope)	PCR amplification efficiency (%)	LOD (copies/reaction)	LOQ (copies/reaction)
รวมทุก แหล่งกำเนิด (Universal)	-3.2957	101	20	40
น้ำเสียชุมชน	-3.4210	96	40	61
สุกร	-3.5725	91	40	66
โค	-3.4684	94	30	52
ไก่	-3.2785	102	60	118

3.3.2 การวัดจำนวนยีน (*gene copy number*) ในตัวอย่างดีเอ็นเอของมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ

จากผลการศึกษา พบว่าไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอในมูลสุกรสามารถใช้วัดจำนวนยีนที่จำเพาะกับมูลสุกรได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 10^8 gene copy numbers ต่อมูลสุกรหนึ่งกรัม และแม้ว่าไพรเมอร์นี้จะตรวจพบดีเอ็นเอในมูลของโคและไก่ได้แต่ในปริมาณเพียงเล็กน้อย และแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้เมื่อเทียบกับมูลสุกร ($P < 0.05$, ตารางที่ 16) ดังนั้น ไพรเมอร์นี้จึงใช้ได้ดีในการตรวจวัดดีเอ็นเอที่จำเพาะกับมูลสุกร (รูปที่ 8a) สำหรับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอจากน้ำเสียชุมชนพบจำนวนยีนเฉลี่ยประมาณ 10^6 gene copy numbers ต่อน้ำเสีย 100 มิลลิลิตร และแม้จะตรวจพบในมูลสัตว์ชนิดอื่นเล็กน้อย ได้แก่ มูลโค มูลสุกร มูลไก่ มูลเป็ด มูลแกะและมูลแพะ แต่มีความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับน้ำเสียชุมชน ($P < 0.05$, ตารางที่ 16) ยกเว้นมูลเป็ดและมูลแกะไม่พบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำเสียชุมชน ($p > 0.05$, ตารางที่ 16) เนื่องจากปริมาณตัวอย่างมีจำนวนน้อยจึงทำให้ไม่สามารถหาค่าความแตกต่างทางสถิติได้ โดยพบดีเอ็นเอ 3 ใน 5 ตัวอย่างของมูลเป็ด และ 1 ใน 4 ตัวอย่างของมูลแพะ (รูปที่ 8b) ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอในมูลโคสามารถตรวจพบดีเอ็นเอเฉลี่ยประมาณ 10^6 gene copy numbers ต่อมูลโคหนึ่งกรัม และสามารถตรวจพบดีเอ็นเอในสัตว์ปีกซึ่งคือมูลไก่จำนวน 4 ใน 21 ตัวอย่าง แต่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับมูลโค ($P < 0.05$, ตารางที่ 16) ในขณะที่มูลเป็ดพบ 1 ใน 5 ตัวอย่างและมีปริมาณ gene copy ที่น้อย (รูปที่ 8c) สุดท้ายไพรเมอร์ที่สามารถตรวจดีเอ็นเอในทุกแหล่งกำเนิด (universal) สามารถวัดจำนวนยีนเป้าหมายได้ในทุกมูลสัตว์ มีค่าเฉลี่ยประมาณ 10^8 - 10^{10} gene copy numbers ยกเว้นในมูลไก่และเป็ดซึ่งมีจำนวนยีนน้อยที่ค่าเฉลี่ยประมาณ 10^3 - 10^6 gene copy numbers (รูปที่ 8d) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Ohad *et al.*, 2016 ที่พบว่าในสัตว์ปีกมีแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteroidales* น้อยเมื่อเทียบกับสัตว์เลื้อยคลานชนิดอื่นที่กล่าวมาในข้างต้น



รูปที่ 8 ปริมาณ gene copies ของดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสุกร (a) น้ำเสียชุมชน (b) โค (c) และรวมทุกแหล่งกำเนิด (d) ที่สามารถวัดได้ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ กราฟแสดง gene copies ที่วัดได้ในแต่ละตัวอย่างและค่าเฉลี่ย (—) ดอกจัน (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณ gene copies เมื่อเทียบแหล่งกำเนิดเป้าหมายกับแหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมาย ($P < 0.05$, P-values adjusted by the holm method) ด้วยสถิติ generalize wilcoxon test (nondetects analysis)

ตารางที่ 16 ตารางแสดงค่าสถิติเชิงพรรณนาปริมาณ gene copies ในแต่ละไพรเมอร์ที่ตรวจพบในมูลสัตว์แต่ละชนิด และค่า adjusted p-value จากการทดสอบด้วย generalize wilcoxon test (nondetects analysis)

Assay	Sample	N ^a	N. Cen ^b	Median	Mean	SD	P-value ^c	Sig ^d
Universal marker	Cattle	25	0	9.1500	9.0420	0.7084	NA	NA
	Swine	28	0	9.9500	9.9321	0.6729	NA	NA
	Sewage	26	0	8.0200	7.8008	1.0144	NA	NA
	Chicken	21	3	5.8400	6.5852	2.0255	NA	NA
	Duck	5	2	4.6200	6.3840	2.6461	NA	NA
	Buffalo	6	0	9.1900	9.0683	0.9298	NA	NA
	Sheep	4	0	NA	10.0350	0.0379	NA	NA
	Goat	10	0	9.9800	9.9780	0.2794	NA	NA
Swine-specific marker	Cattle	25	24	NA	7.8805	NA	<0.0001	*
	Swine	28	0	8.5460	8.6182	0.8378	NA	NA
	Sewage	26	26	NA	0	0	NA	NA
	Chicken	21	19	NA	8.4905	0.0512	<0.0001	*
	Duck	5	5	NA	0	0	NA	NA
	Buffalo	6	6	NA	0	0	NA	NA
	Sheep	4	4	NA	0	0	NA	NA
	Goat	10	10	NA	0	0	NA	NA
Sewage-specific maker	Cattle	25	21	NA	5.0252	0.1632	<0.0001	*
	Swine	28	25	NA	5.7682	0.0987	<0.0001	*
	Sewage	26	1	6.09	6.0946	1.2074	NA	NA
	Chicken	21	18	NA	5.5014	0.2022	<0.0001	*
	Duck	5	2	5.83	5.9260	0.2172	1	NS
	Buffalo	6	6	NA	0	0	NA	NA
	Sheep	4	3	NA	5.4700	NA	0.2075	NS
	Goat	10	8	NA	5.6950	0.3606	0.0046	*
Cattle-specific maker	Cattle	25	8	5.9119	5.9659	0.9284	NA	NA
	Swine	28	28	NA	0	0	NA	NA
	Sewage	26	26	NA	0	0	NA	NA
	Chicken	21	17	NA	5.1911	0.6778	0.0233	*
	Duck	5	4	NA	5.3205	NA	0.2865	NS
	Buffalo	6	6	NA	0	0	NA	NA
	Sheep	4	4	NA	0	0	NA	NA
	Goat	10	10	NA	0	0	NA	NA

^aจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมด

^bจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบดีเอ็นเอน้อยกว่า detection limit

^cadjusted P-values โดย holm method

^dความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ;

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ NS ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และ NA ไม่สามารถหาค่าได้

3.3.3 การคำนวณค่าความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) ความถูกต้อง (accuracy) อัตราการเกิดผลบวก (positive predictive rate) และอัตราการเกิดผลลบ (negative predictive rate)

เนื่องจากได้ทำการประเมินประสิทธิภาพไฟรเมอร์ด้วยวิธีพีซีอาร์ ด้วยตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนจากจังหวัดต่างๆในบริเวณลุ่มน้ำท่าจีน และได้ขยายขอบเขตการประเมินประสิทธิภาพไฟรเมอร์ไปยังตัวอย่างในบริเวณจังหวัดในลุ่มน้ำเจ้าพระยาด้วย ดังนั้น ในงานส่วนต่อมาที่ทำการประเมินประสิทธิภาพไฟรเมอร์ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณนี้ จึงใช้ตัวอย่างชุดเดียวกัน โดยประเมินแยกเป็นกลุ่มตัวอย่างจากลุ่มน้ำท่าจีนและจากลุ่มน้ำเจ้าพระยา จากการประเมินไฟรเมอร์คู่ต่างๆกับกลุ่มตัวอย่างจากลุ่มน้ำท่าจีนพบว่า ไฟรเมอร์ที่จำเพาะกับทุกแหล่งกำเนิด (universal) มีความไว (sensitivity) และความถูกต้อง (accuracy) ประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีอัตราการเกิดผลบวก 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าไฟรเมอร์ที่จำเพาะกับทุกแหล่งกำเนิดมีประสิทธิภาพดีเยี่ยมในการตรวจวัด ดังตารางที่ 17 ในขณะที่ไฟรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับน้ำเสียชุมชน มีความไว 100 เปอร์เซ็นต์ ความจำเพาะและความถูกต้อง ประมาณ 80 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีอัตราการเกิดผลบวกและผลลบเท่ากับ 54 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไฟรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับสุกรมีความไว 100 เปอร์เซ็นต์ ค่าความจำเพาะและความถูกต้อง 96 เปอร์เซ็นต์ และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีอัตราการเกิดผลบวก 87 เปอร์เซ็นต์ และผลลบ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นไฟรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับน้ำเสียชุมชนและสุกรจึงมีประสิทธิภาพในการจำแนกแหล่งกำเนิดในระดับที่ดี ส่วนไฟรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับโค มีความไวประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ค่าความจำเพาะและค่าความถูกต้อง 94 และ 89 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีอัตราการเกิดผลบวกและผลลบ 74 และ 93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าในตัวอย่างที่เป็นมูลโคมีปริมาณยีนของแบคทีเรียที่จำเพาะกับไฟรเมอร์โคน้อย ทำให้ค่าความไวต่ำ ควรทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณจาก 20 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยาเป็น 40-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยาจะทำให้ค่าความไวเพิ่มขึ้น และจากค่าความจำเพาะของไฟรเมอร์โคแสดงให้เห็นว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกแหล่งกำเนิดในระดับที่ดีเช่นกัน

การประเมินไฟรเมอร์คู่ต่างๆกับกลุ่มตัวอย่างจากลุ่มน้ำเจ้าพระยาพบว่าไฟรเมอร์ที่จำเพาะกับทุกแหล่งกำเนิด (universal) มีความไว ความถูกต้อง และอัตราการเกิดผลบวกเท่ากับ 96-100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 18 ในขณะที่ไฟรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับน้ำเสียชุมชน มีความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง รวมทั้งมีอัตราการเกิดผลบวกและผลลบเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกค่า ส่วนไฟรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับสุกรมีความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง รวมทั้งมีอัตราการเกิดผลบวกและผลลบเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน อันดับสุดท้ายไฟรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับโค มีความไวประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ค่าความจำเพาะและค่าความถูกต้อง 100 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีอัตราการเกิดผลบวกและผลลบ 100 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สรุปได้ว่าการประเมินการจำแนกแหล่งกำเนิดของตัวอย่างในลุ่มน้ำเจ้าพระยามีความใกล้เคียงกับตัวอย่างในลุ่มน้ำท่าจีน จึงสามารถนำวิธีการศึกษานี้ไปใช้ในการระบุแหล่งกำเนิดได้ แต่ต้องมีการศึกษาตัวอย่างจากแม่น้ำเจ้าพระยาเพิ่มเติม

สำหรับไฟรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอในมูลไก่ไม่ถูกทำมาวิเคราะห์ผล เนื่องจากมีค่าความไวของวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณที่ต่ำ ประมาณ 57 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาเบื้องต้นด้วยวิธีพีซีอาร์พบว่ามีความไวเท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์ และความจำเพาะ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าความจำเพาะที่ต่ำมากไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด จึงไม่นำมาทดสอบกับมูลสัตว์ชนิดอื่นๆ ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ

การตรวจสอบการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณ (qPCR inhibition)

จากการตรวจสอบการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์พบว่า ในตัวอย่างมูลสุกรและโคพบการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างลุ่มน้ำท่าจีน ในขณะที่ไม่พบการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ในตัวอย่างแม่น้ำเจ้าพระยา ตัวอย่างสิ่งปลูกจากน้ำเสียชุมชนตรวจสอบพบว่ามีสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ 37 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างแม่น้ำท่าจีน และ 57 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างแม่น้ำเจ้าพระยา (ตารางที่ 17 และ 18) สำหรับตัวอย่างที่พบการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำการคำนวณหาปริมาณยีนเป้าหมายโดยการนำตัวอย่างมาเจือจางที่ 10 นาโนกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรและคำนวณหาปริมาณยีนเป้าหมายจากตัวอย่างที่เจือจางนั้น

ตารางที่ 17 การประเมินประสิทธิภาพไพรเมอร์ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณของตัวอย่างในกลุ่มน้ำทำจีน

ชนิด แหล่งกำเนิด	จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวก/จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ								ความไว Sensitivity (%)	ความจำเพาะ Specificity (%)	ความ ถูกต้อง Accuracy (%)	อัตราการ เกิดผลบวก Positive predictive value (%)	อัตราการ เกิดผลลบ Negative predictive value (%)	ตัวอย่างที่มี สารยับยั้ง ปฏิกิริยาพีซี อาร์ (%)
	ชุมชน	สุกร	โค	ไก่	เปิด	แพะ	แกะ	กระป๋อง						
แหล่งกำเนิด รวม (Universal)	19/19	20/20	20/20	17/19	3/5	7/7	4/4	5/5	96	N/A	96	100	0	N/A
น้ำเสียชุมชน	19/19	3/20	4/20	3/19	3/5	2/7	1/4	0/5	100	80	84	54	100	7/19 (36.84)
สุกร	0/19	20/20	1/20	2/19	0/5	0/7	0/4	0/5	100	96	97	87	100	8/20 (40)
โค	0/19	0/20	14/20	4/19	1/5	0/7	0/4	0/5	70	94	89	74	93	2/20 (10)

* Not applicable

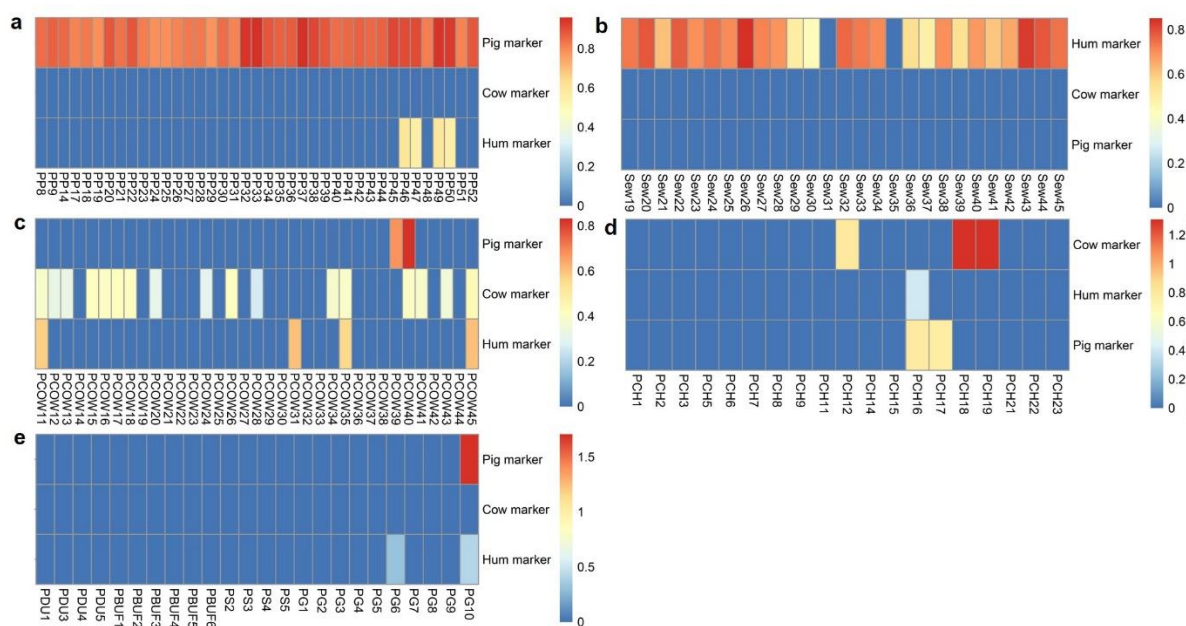
ตารางที่ 18 การประเมินประสิทธิภาพไพโรเมอร์ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณของตัวอย่างในลุ่มน้ำเจ้าพระยา

ชนิด แหล่งกำเนิด	จำนวนตัวอย่างที่เป็นบวก/จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ						ความไว Sensitivity (%)	ความจำเพาะ Specificity (%)	ความถูกต้อง (%) Accuracy	อัตราการ เกิดผลบวก Positive predictive value (%)	อัตราการ เกิดผลลบ Negative predictive value (%)	ตัวอย่างที่มีสาร ยับยั้งปฏิกิริยาพีซี อาร์ (%)
	ชุมชน	สุกร	โค	ไก่	แพะ	กระบือ						
แหล่งกำเนิด รวม (Universal)	7/7	8/8	5/5	1/2	3/3	1/1	96	N/A*	96	100	N/A*	N/A
น้ำเสียชุมชน	7/7	0/8	0/5	0/2	0/3	0/1	100	100	100	100	100	4/7 (57.14)
สุกร	0/7	8/8	0/5	0/2	0/3	0/1	100	100	100	100	100	0/8 (0)
โค	0/7	0/8	3/5	0/2	0/3	0/1	60	100	92	100	91	1/5 (0)

* Not applicable

ความชุกสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเป้าหมายในแต่ละแหล่งกำเนิด

จากผลการศึกษาพบว่าในตัวอย่างมูลสุกร (PP) พบดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะกับสุกรในปริมาณที่มาก ในขณะที่บางตัวอย่างพบดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนเล็กน้อย (รูปที่ 9a) ตัวอย่างของเสียที่มาจากน้ำเสียชุมชน (Sew) พบดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนในปริมาณที่สูงเช่นกัน แต่ไม่พบดีเอ็นเอเป้าหมายของแหล่งกำเนิดอื่นๆเลย (รูปที่ 9b) สำหรับตัวอย่างมูลโค (PCOW) พบดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะกับโคประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และพบว่าสามารถพบดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนและสุกรในปริมาณที่สูงในบางตัวอย่างอีกด้วย (รูปที่ 9c) สำหรับตัวอย่างมูลสัตว์ปีก (PCH และ PDU) พบว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะกับมูลสัตว์อื่นในหลายตัวอย่างและมีความหลากหลายสูง ในขณะที่ตัวอย่างมูลกระป๋อง แกะ แพะ พบประชากรดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะกับโค น้ำเสียชุมชน และสุกร ในปริมาณที่น้อย (รูปที่ 9d และ 9e) นอกจากนั้นในบางตัวอย่าง (PCH13, PCH20 และ PDU2) ไม่สามารถหาค่าความชุกสัมพันธ์ได้ เนื่องจากไม่สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับทุกแหล่งกำเนิด (universal) และในตัวอย่าง PCH18 PCH19 และ PG10 มีค่าความชุกสัมพันธ์เกิน 1 เนื่องจากพบปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับทุกแหล่งกำเนิด (universal) ในปริมาณที่น้อยกว่าปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดต่างๆ ซึ่งอาจเกิดจากคุณภาพของ DNA ของตัวอย่าง ซึ่งพบว่า DNA ที่สกัดได้มีปริมาณและคุณภาพต่ำในสัตว์ปีก ซึ่งพบเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างทั้งหมด



รูปที่ 9 ความชุกสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเป้าหมายในมูลสุกร (a) น้ำเสียชุมชน (b) มูลโค (c) มูลไก่ (d) รวมทั้งมูลเป็ด กระป๋อง แกะ และแพะ (e) สีแดงหมายถึงมีความชุกสัมพันธ์มากที่สุด และสีน้ำเงินหมายถึงมีความชุกสัมพันธ์เป็นศูนย์

3.3.4 ประเมินเพื่อเลือกคูไพรเมอร์ที่เหมาะสมในแต่ละแหล่งกำเนิดเป้าหมาย

ผลจากการวิจัยสรุปได้ว่าไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิด คือ สุก ร น้ำเสียชุมชน โค และรวมทุกแหล่งกำเนิด มีประสิทธิภาพในการจำแนกแหล่งกำเนิดเป้าหมายและสามารถบอกปริมาณจากตัวอย่างลุ่มน้ำทำจิ้นและเจ้าพระยาได้ โดยมีค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) มากกว่า 65 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ยกเว้นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อน้ำเสียชุมชนมีค่าความจำเพาะต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอเป้าหมายในแหล่งกำเนิดหลักอื่นๆ เช่น สุก ร และโค ในการนำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อน้ำเสียชุมชนไปตรวจสอบตัวอย่างจริงจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโค และสุก ร ในการตรวจสอบร่วมด้วย เนื่องจากทั้ง 2 ไพรเมอร์ไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอเป้าหมายในน้ำเสียชุมชน จะทำให้การวิเคราะห์ผลแม่นยำมากขึ้น ในขณะที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับโคมีค่าความไวต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถเพิ่มค่าความไวได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก 20 นาโนกรัมเป็น 40-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

สำหรับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไก่มีค่าความไวเท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์ และความจำเพาะ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณพบว่ามีความไวเพียง 57 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไก่ไม่มีประสิทธิภาพในการจำแนกแหล่งกำเนิด ดังนั้นสรุปได้ว่าการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อมูลไก่ด้วยยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidales Lactobacillus* และ *Firmicutes* รวมทั้งโปรตีนของ Chicken/turkey parvovirus นั้น ไม่มีไพรเมอร์ใดที่เหมาะสมกับการใช้ในลุ่มน้ำทำจิ้น จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า มีการรายงานความยากในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อมูลไก่ เนื่องจากมูลไก่อมีจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายมาก (Ohad *et al.*, 2016; Weidhass *et al.*, 2010) ผลการศึกษาที่ได้นี้จึงเน้นย้ำความสำคัญของการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับมูลไก่ขึ้นใหม่ ด้วยการใช้ตัวอย่างมูลไก่ในแม่น้ำทำจิ้น

3.4 วิเคราะห์ความเหมาะสมระหว่างเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณในด้านต้นทุน ข้อได้เปรียบ และข้อจำกัดเชิงเทคนิค

จากการศึกษาพบว่าเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณมีความไวที่ใกล้เคียงกันโดยเมื่อพิจารณาในแต่ละคูไพรเมอร์พบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดรวม (Universal) และโคมีค่าความไวและความถูกต้องเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์สูงกว่าเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ ในขณะที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนมีค่าความไวและความถูกต้องเมื่อเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณสูงกว่าในเทคนิคพีซีอาร์ สำหรับไพรเมอร์สุก ร นั้นพบว่ามีความไวที่เท่ากันทั้ง 2 เทคนิค แต่มีความถูกต้องในวิธีพีซีอาร์สูงกว่าในวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ ดังตารางที่ 19 เมื่อพิจารณาค่าความจำเพาะพบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะน้ำเสียชุมชนเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณมีค่าสูงกว่าในเทคนิคพีซีอาร์ ในขณะที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสุก ร และโคมีค่าความจำเพาะเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์สูงกว่าเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ เมื่อพิจารณาอัตราการเกิดผลบวกพบว่ามีค่าเท่ากันทั้ง 2 วิธีในไพรเมอร์ที่จำเพาะกับทุกแหล่งกำเนิด ในขณะที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสุก ร และโคมีอัตราการเกิดผลบวกในเทคนิคพีซีอาร์สูงกว่าในเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ สำหรับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนพบว่าอัตราการเกิดผลบวกในเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณสูงกว่าเทคนิคพีซีอาร์ อัตราการเกิดผลบวกพบว่ามีค่าเท่ากันทั้ง 2 วิธีในไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสุก ร สำหรับไพรเมอร์น้ำเสียชุมชนอัตราการเกิดผลบวกในเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณสูงกว่าเทคนิคพีซีอาร์ ในทางกลับกันไพรเมอร์โคมีอัตราการเกิดผลบวกในเทคนิคพีซีอาร์สูงกว่าเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ สุดท้ายเมื่อพิจารณาค่า LOD พบว่าเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณมีค่า LOD ที่ต่ำกว่าในเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งหมายความว่าเทคนิคพีซีอาร์ต้องการดีเอ็นเอเป้าหมายในปฏิกิริยาที่สูงถึงจะสามารถตรวจพบได้

เมื่อพิจารณาข้อดีและข้อจำกัดในเชิงเทคนิคพบว่า เทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณสามารถใช้ทดสอบเพื่อจำแนกแหล่งกำเนิดได้ดีในระดับที่ใกล้เคียงกันในตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดที่มีปริมาณความเข้มข้น

ของดีเอ็นเอเป้าหมายสูง สำหรับในแหล่งน้ำธรรมชาติหรือแม่น้ำปริมาณดีเอ็นเอถูกเจือจางอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการตรวจสอบที่ต่างกันมากขึ้น นอกจากนั้นเทคนิคพีซีอาร์มีข้อดีคือขั้นตอนการแปลผลไม่ซับซ้อน แต่มีข้อจำกัดคือต้องการความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายที่สูงกว่าเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ รวมทั้งสามารถบอกผลได้เพียงพบหรือไม่พบการปนเปื้อน แต่ไม่สามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายหรือระดับการปนเปื้อนได้ ในขณะที่เทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณมีข้อดีคือสามารถตรวจวัดตลอดจนบอกปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายหรือระดับการปนเปื้อนได้ และต้องการปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในปฏิกิริยาที่น้อยกว่าซึ่งหมายถึงสามารถตรวจวัดตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอเป้าหมายเพียงเล็กน้อยได้ดีกว่าเทคนิคพีซีอาร์ และยังสามารถจัดลำดับปริมาณการปนเปื้อนในตัวอย่างที่ได้รับการปนเปื้อนมากกว่า 1 แหล่งกำเนิดได้ ทั้งสองวิธีนี้ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์เริ่มตั้งแต่กรองตัวอย่างน้ำ สกัดดีเอ็นเอ ทดสอบปฏิกิริยาและอ่านผล รวมเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมงใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาที่ต้นทุนพบว่า เทคนิคพีซีอาร์ใช้ต้นทุนต่อการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่างเพื่อตรวจหาทั้ง 4 แหล่งกำเนิดรวมเป็นเงินประมาณ 3,320 บาท ในขณะที่เทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณใช้ต้นทุนต่อการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่างเพื่อตรวจหาทั้ง 4 แหล่งกำเนิดรวมเป็นเงินประมาณ 6,000 บาท โดยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณต้องมีการสร้างกราฟมาตรฐานในครั้งแรก รวมเป็นเงินประมาณ 32,000 บาท และเมื่อพิจารณาจากราคาต้นทุนเครื่องมือสำหรับวิธีพีซีอาร์เปรียบเทียบกับวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณจะเห็นว่าเครื่องมือสำหรับวิธีพีซีอาร์มีราคาต่ำกว่าเกือบ 2 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 19 พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการประเมินประสิทธิภาพและความเหมาะสมของเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ ของตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียจากกลุ่มน้ำท่าจีน

ชนิด แหล่งกำเนิด	ความไว (%) Sensitivity		ความจำเพาะ (%) Specificity		ความถูกต้อง (%) Accuracy		อัตราการเกิดผลบวก Positive predictive value		อัตราการเกิดผลลบ Negative predictive		LOD (copies/reaction)	
	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR
แหล่งกำเนิดรวม (Universal)	100*	96*	NA	NA	100*	96*	100	100	NA	NA	30	20
น้ำเสียชุมชน	84*	100*	77	80	78	84	46	54	95*	100*	300	40
สุกร	100	100	98	96	98	97	91	87	100	100	3000	40
โค	85*	70*	100*	94*	97	89	100*	74*	96	93	300	30

NA, Not applicable

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบด้วย 'N - 1' chi squared test (p<0.05)

ตารางที่ 20 ราคาต้นทุนของเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ

วิธีศึกษา	วัสดุและอุปกรณ์	ราคา* (บาท)	ปริมาณที่ใช้ได้ ต่อหน่วย	ราคา/หน่วย (บาท)	จำนวนหน่วย ต่อปฏิกิริยา	ราคาต่อ ปฏิกิริยา
สกัดดีเอ็นเอ จากตัวอย่าง	เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDrop™ 2000 , Thermo Fisher Scientific)	560,000				
	ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2 ไมโครลิตร (Eppendorf)	15,000				
	ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20 ไมโครลิตร (Eppendorf)	15,000				
	ไมโครปิเปตต์ ขนาด 200 ไมโครลิตร (Eppendorf)	13,000				
	ไมโครปิเปตต์ ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Eppendorf)	13,000				
	ชุดหัวกรองพลาสติกฆ่าเชื้อได้ 10 ชุด	27,000				
	ขวดแก้วขนาด 1 ลิตรต่อกับหัวกรอง 10 ขวด	2,000				
	รวมราคาคงที่	645,000				
	ZR Fecal DNA MiniPrep Kit (Zymo Research)	9,200	50	184.00	5	920.00
	Mixed cellulose esters membrane (Merck Millipore)	5,600	100	56.00	4	224.00
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 10 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	20	14.00
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 20 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	40	28.00
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 200 ไมโครลิตร (Axygen)	600	1,000	0.60	40	24.00
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	20	14.00
	หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen)	500	500	1.00	10	10.00
	รวมราคาสกัดดีเอ็นเอต่อตัวอย่าง (ไม่รวมต้นทุนคงที่)					1,234.00
DNA standards	ค่าตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอ	300	1	300.00	6	1,800.00
	Zymoclean gel DNA recovery kit	4,200	50	84.00	1	84.00
	TAINprep rapid mini plasmid ki	3,700	200	18.50	1	18.50
	PCR reaction	48	1	47.74	1	47.74
	agarose เจล (500 g, Vivantis)	8,000	9,000	0.89	2	1.78
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 10 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	5	3.50
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 20 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	10	7.00
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 200 ไมโครลิตร (Axygen)	600	1,000	0.60	10	6.00
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	10	7.00
	หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen)	500	500	1.00	5	5.00
	ค่า FastDigest enzyme	8,100	2,500	3.24	1	3.24
	รวมพลาสติกสำหรับกราฟมาตรฐาน					1,983.76
พีซีอาร์เชิง ปริมาณ**	synthetic DNA standard (for qPCR สำหรับกราฟมาตรฐาน	5,500	44,000	0.13	18	2.25
	เครื่องพีซีอาร์เชิงปริมาณ (StepOnePlus, Applied Biosystems)	1,300,000				
	ภาคใส่หลอดพีซีอาร์สำหรับลงเครื่อง (Applied Biosystems™)	800				
	ออโรไทป์เปตต์ ขนาด 100 ไมโครลิตร (Mettler-Toledo Rainin)	35,000				
	ค่าเตรียมกราฟมาตรฐาน ****	31,171				
	รวมราคาคงที่	1,335,800				
	iTaq Universal Probes Supermix (2X) (Bio-Rad)	6,500	200	32.50	1	32.50
	ดีเอ็นเอติดตามที่ติดสารเรืองแสง (fluorescent probe , Macrogen)	8,500	6,250	1.36	1	1.36
	ไพรมอร์ 2 เส้น	600	3,125	1.00	2	2.00
	หลอดพชออาร์ (Applied Biosystems)	5,000	1,000	5.00	1	5.00
	ฝาปิดหลอดพีซีอาร์ (Applied Biosystems)	5,300	2,400	2.21	1	2.21
	หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen)	500	500	1.00	5	5.00
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 10 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	3	2.10
	ฟิลเตอร์ที่ป ขนาด 20 ไมโครลิตร (Axygen)	6,000	1,920	3.13	3	9.38
	ฟิลเตอร์ที่ป ขนาด 200 ไมโครลิตร (Axygen)	6,000	1,920	3.13	5	15.63
	ฟิลเตอร์ที่ป ขนาด 100 ไมโครลิตร (Mettler-Toledo Rainin)	2,600	960	2.71	1	2.71
	ไมโครปิเปตต์ที่ป ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	2	1.40
	รวมราคาต่อปฏิกิริยา					79.28
	รวมราคาต่อตัวอย่างหน้า รวมสกัดดีเอ็นเอ (ตารางที่ 4 แหลังกำหนด)					5,990.98
	รวมราคาต่อตัวอย่างหน้า รวมสกัดดีเอ็นเอ (ตาราง 1 แหลังกำหนด)					3,137.02

ตารางที่ 20 (ต่อ) ราคาต้นทุนของเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ

วิธีการศึกษา	วัสดุและอุปกรณ์	ราคา (บาท)	ปริมาณที่ใช้ได้ต่อหน่วย	ราคา/หน่วย (บาท)	จำนวนหน่วยต่อปฏิกิริยา	ราคาต่อปฏิกิริยา
พีซีอาร์***	เครื่องพีซีอาร์ (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad)	200,000				
	เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Doc EZ Imaging system, Bio-rad)	480,000				
	เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid®-exU)	30,000				
	รวมราคาค่าต้นทุนเครื่อง	710,000				
	DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)	5,500	200	27.50	1	27.50
	ไพรเมอร์ 2 เส้น	600	3,125	0.19	2	0.38
	หลอดพีซีอาร์ (Applied Biosystems)	2,700	1,000	2.70	1	2.70
	ฝาปิดหลอดพีซีอาร์ (Applied Biosystems)	700	1,000	0.70	1	0.70
	หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen)	500	500	1.00	5	5.00
	agarose เจล (500 g, Vivantis)	8,000	9,000	0.89	4	3.56
	ไมโครปีเปตต์ที่ป ขนาด 10 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	3	2.10
	ไมโครปีเปตต์ที่ป ขนาด 20 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	3	2.10
	ไมโครปีเปตต์ที่ป ขนาด 200 ไมโครลิตร (Axygen)	600	1,000	0.60	5	3.00
	ไมโครปีเปตต์ที่ป ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Axygen)	700	1,000	0.70	1	0.70
	สารละลายบัฟเฟอร์ และสารเคมีอื่นๆ			10.00	1	10.00
	รวมราคาต่อปฏิกิริยา					57.74
	รวมราคาต่อตัวอย่างน้ำ รวมสกัดดีเอ็นเอ (ตรวจทั้ง 4 แหล่งกำเนิด)					3,312.62
	รวมราคาต่อตัวอย่างน้ำ รวมสกัดดีเอ็นเอ (ตรวจ 1 แหล่งกำเนิด)					1,753.66

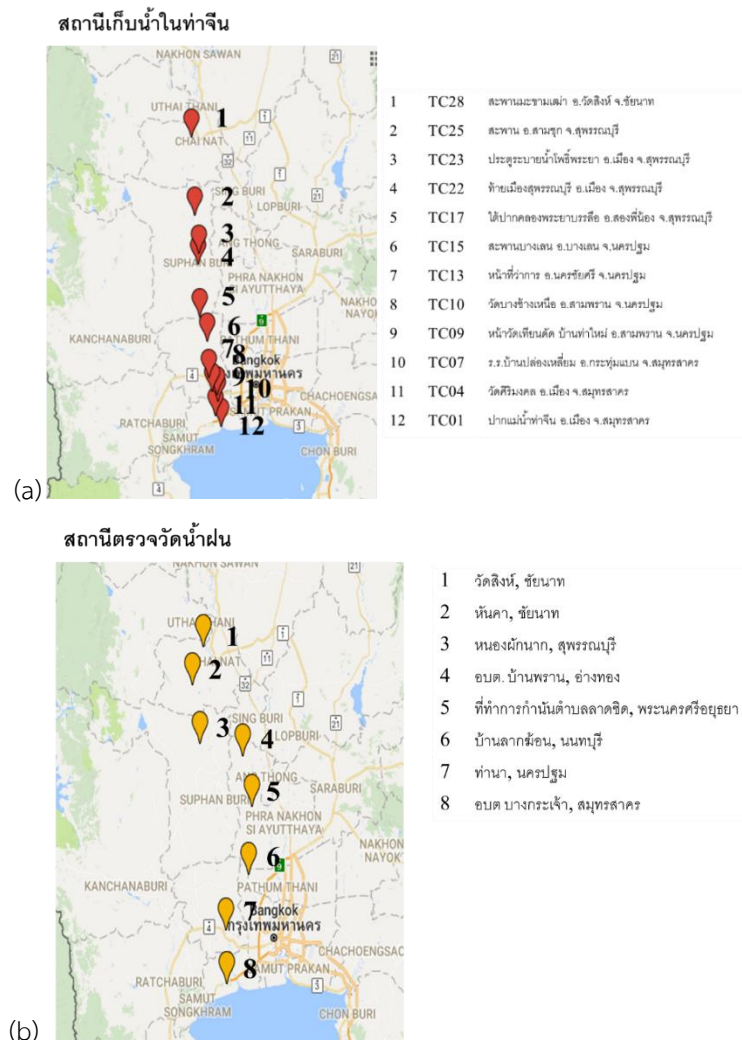
หมายเหตุ	*รายการที่คำนวณนี้สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเพื่อระบุแหล่งปนเปื้อนด้วยวิธีที่ได้รับการพัฒนามาแล้ว ไม่ใช่ราคาสำหรับการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ (ราคานี้ไม่รวมค่าแรงบุคลากร ค่าเครื่องมือพื้นฐาน ค่าบำรุงรักษารายปี และค่าสักรอ เช่น ตู้เย็น, ตู้แช่ตัวอย่าง, เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดัน (autoclave), เครื่องวัดพีเอชน้ำ, อุปกรณ์เลี้ยงเชื้อทางชีววิทยา เป็นต้น) **สำหรับวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ การวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง ใช้ 60 ปฏิกิริยา [4 assays* (3dilutions*2rep + 3 rep positive + 3 rep NTC)] + (acin 2 subsamples*3dilutions*2reps) ***For PCR, 1 ตัวอย่างใช้ 36 ปฏิกิริยา [4 assays * [(3 dilutions * 2 replicates) + 1 positive control + 1 NTC + 1 DNA ladder]] ***การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ ใช้ 288 ปฏิกิริยา [4 assays * 6 concentrations * 3 reps * 4 runs]
----------	---

3.5 ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ควบคู่กับการตรวจสอบคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน

3.5.1 คุณภาพน้ำจากการตรวจสอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียและพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำท่าจีน จำนวน 12 สถานี พร้อมตัวอย่างควบคุมคุณภาพ ได้แก่ ตัวอย่างเปล่า (Field blank) และตัวอย่างซ้ำ (Field duplicate) ในช่วงวันที่ 29 กรกฎาคม ถึง 5 สิงหาคม 2560 เพื่อเป็นตัวแทนตัวอย่างฤดูฝนรอบที่ 1 และช่วงวันที่ 19 ถึง 26 สิงหาคม 2560 เป็นตัวแทนตัวอย่างฤดูฝนรอบที่ 2 ส่วนตัวแทนตัวอย่างฤดูแล้งจะทำการเก็บตัวอย่างรอบที่ 1 ช่วงวันที่ 3 ถึง 10 กุมภาพันธ์ 2561 และรอบที่ 2 ในช่วงวันที่ 3 ถึง 10 มีนาคม 2561 ข้อมูลปริมาณฝน ณ สถานีตรวจวัดปริมาณน้ำฝนบริเวณใกล้เคียงสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีน จากสถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร สังกัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (<http://wea.haii.or.th/telemetry/ais/map.php>) ประกอบด้วยสถานีตรวจวัดปริมาณน้ำฝนในเขตลุ่มน้ำท่าจีน ได้แก่ 1 (วัดสิงห์ จังหวัดชัยนาท), 2 (หันคา จังหวัดชัยนาท), 3 (หนองผักนาก จังหวัดสุพรรณบุรี), 7 (ท่านา จังหวัดนครปฐม) และ 8 (อบต.บางกระเจ้า จังหวัดสมุทรสาคร) และสถานีตรวจวัดปริมาณน้ำฝนที่ตั้งอยู่ในเขตลุ่มน้ำเจ้าพระยา ได้แก่ 4 (อบต.บ้านพราน จังหวัดอ่างทอง), 5 (ที่

ทำการกักน้ำตามลลาดชิด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา), และ 6 (บ้านลากซ้อน จังหวัดนนทบุรี) ซึ่งน้ำท่าของเขตลุ่มน้ำเจ้าพระยาจะไหลลงสู่แม่น้ำเจ้าพระยาเป็นส่วนใหญ่ และลงสู่แม่น้ำท่าจีนค่อนข้างน้อยมาก ดังแสดงในรูปที่ 10 โดยแต่ละสถานีมีปริมาณน้ำฝนรายชั่วโมงสะสมหนึ่งวันและห้าวันก่อนวันเก็บตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 21 และ 22 โดยเกณฑ์การรายงานปริมาณน้ำฝนในประเทศไทยโดยกรมอุตุนิยมวิทยา กำหนดว่า ปริมาณฝนต่อ 24 ชม. กำหนดให้ฝนเล็กน้อย (Light Rain) เมื่อฝนตกมีปริมาณตั้งแต่ 0.1 มิลลิเมตร ถึง 10.0 มิลลิเมตร ฝนปานกลาง (Moderate Rain) เมื่อฝนตกมีปริมาณตั้งแต่ 10.1 มิลลิเมตร ถึง 35.0 มิลลิเมตร ฝนหนัก (Heavy Rain) เมื่อฝนตกมีปริมาณตั้งแต่ 35.1 มิลลิเมตร ถึง 90.0 มิลลิเมตร และฝนหนักมาก (Very Heavy Rain) เมื่อฝนตกมีปริมาณตั้งแต่ 90.1 มิลลิเมตร ขึ้นไป ซึ่งจากผลที่ได้พบว่าในเขตบริเวณลุ่มน้ำท่าจีนมีปริมาณฝนเพียงเล็กน้อยในช่วง 1-5 วันก่อนวันเก็บตัวอย่าง และมีปริมาณฝนตกปานกลางที่สถานีบ้านลากซ้อน จังหวัดนนทบุรี ก่อนวันเก็บตัวอย่างวันที่ 29 กรกฎาคม 2560 ส่วนในฤดูแล้งพบว่ามีฝนตกเล็กน้อย ในช่วง 1-3 วันก่อนเก็บตัวอย่าง ยกเว้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาพบฝนตกในระดับปานกลาง แต่เนื่องจากสถานีวัดน้ำฝนนี้ตั้งอยู่ในเขตลุ่มน้ำเจ้าพระยา น้ำท่าส่วนใหญ่จึงไหลลงแม่น้ำเจ้าพระยาและไม่ลงสู่แม่น้ำท่าจีน โดยสรุปรวมทำให้คาดว่าน้ำท่าไหลลงสู่แม่น้ำท่าจีนในปริมาณน้อย ในน้ำตัวอย่างที่ทำการเก็บทั้งสองรอบในฤดูฝนและฤดูแล้ง



รูปที่ 10 แผนที่แสดงสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีน (a) เทียบกับสถานีตรวจวัดปริมาณน้ำฝนในลุ่มน้ำท่าจีน (1, 2, 3, 7, 8) และบริเวณใกล้เคียง (4, 5, 6) (b)

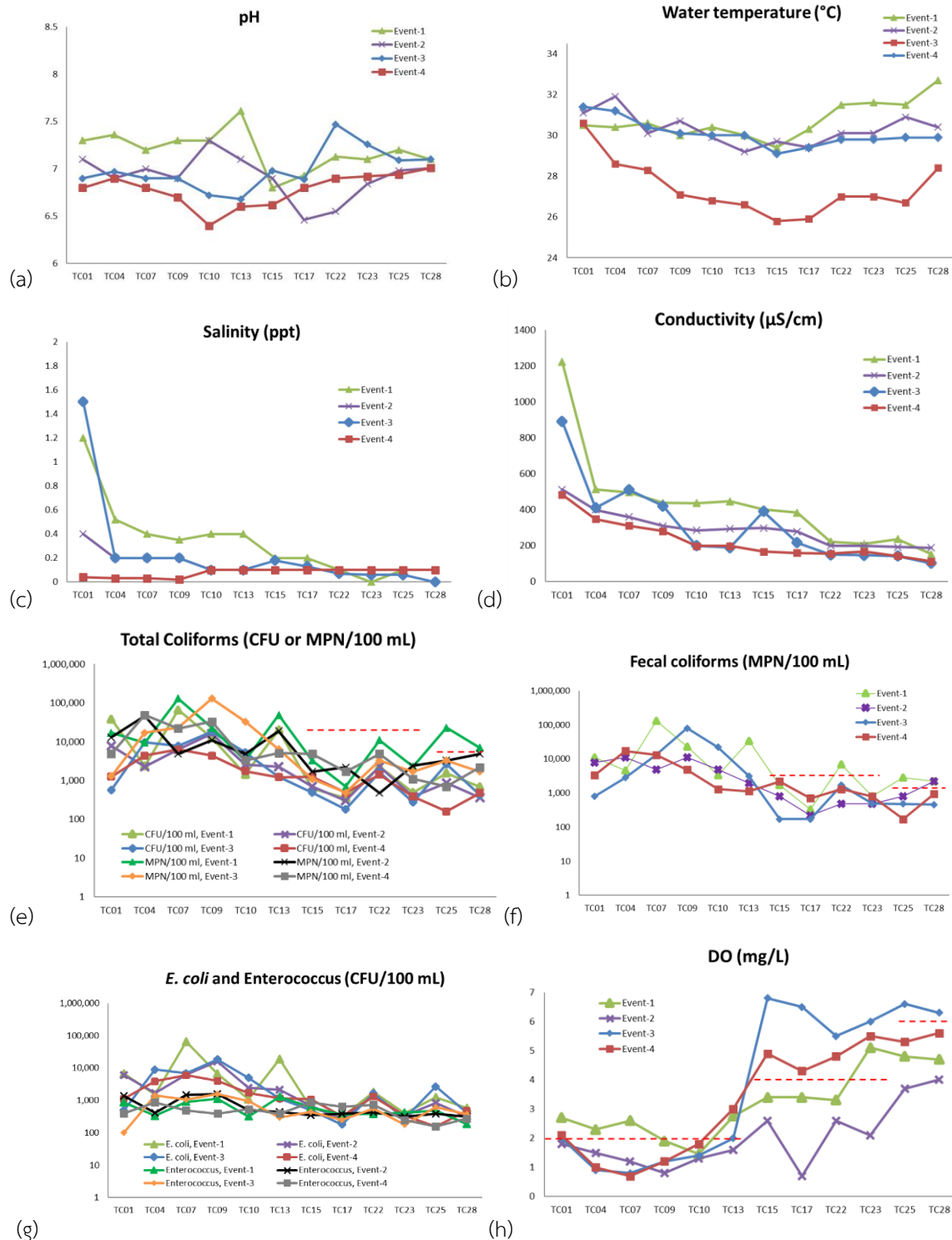
ตารางที่ 21 ปริมาณน้ำฝนรายชั่วโมงสะสมหนึ่งวันก่อนวันเก็บตัวอย่าง (มิลลิเมตร)

วันที่เก็บตัวอย่าง	1. วัดสิงห์ (ชัยนาท)	2. หันคา (ชัยนาท)	3. หนอง ผักนาก (สุพรรณบุรี)	4. อบต. บ้านพราน (อ่างทอง)	5. ที่ทำการกำนันลาดชิด (พระนครศรีอยุธยา)	6. บ้านลากซ้อน (นนทบุรี)	7. ท่านา (นครปฐม)	8. อบต. บางกระเจ้า (สมุทรสาคร)
29-Jul-17					1.8	31.8	0.2	0
5-Aug-17	1.6	0	0	0.4	0			
19-Aug-17					0	0.4	0	0.6
26-Aug-17	0	0	0	0	0			
3-Feb-18					0	0	0	0.4
10-Feb-18	0	0	0	0	0			
3-Mar-18					0	0	0	0
10-Mar-18	0.4	0	0.8	0.2	21.6			
หมายเหตุ	สถานีที่ 4, 5, และ 6 อยู่ในเขตลุ่มน้ำเจ้าพระยา ปริมาณน้ำท่าไหลลงสู่แม่น้ำเจ้าพระยาเป็นส่วนใหญ่							
ที่มา	http://wea.haii.or.th/telemetry/ais/map.php							

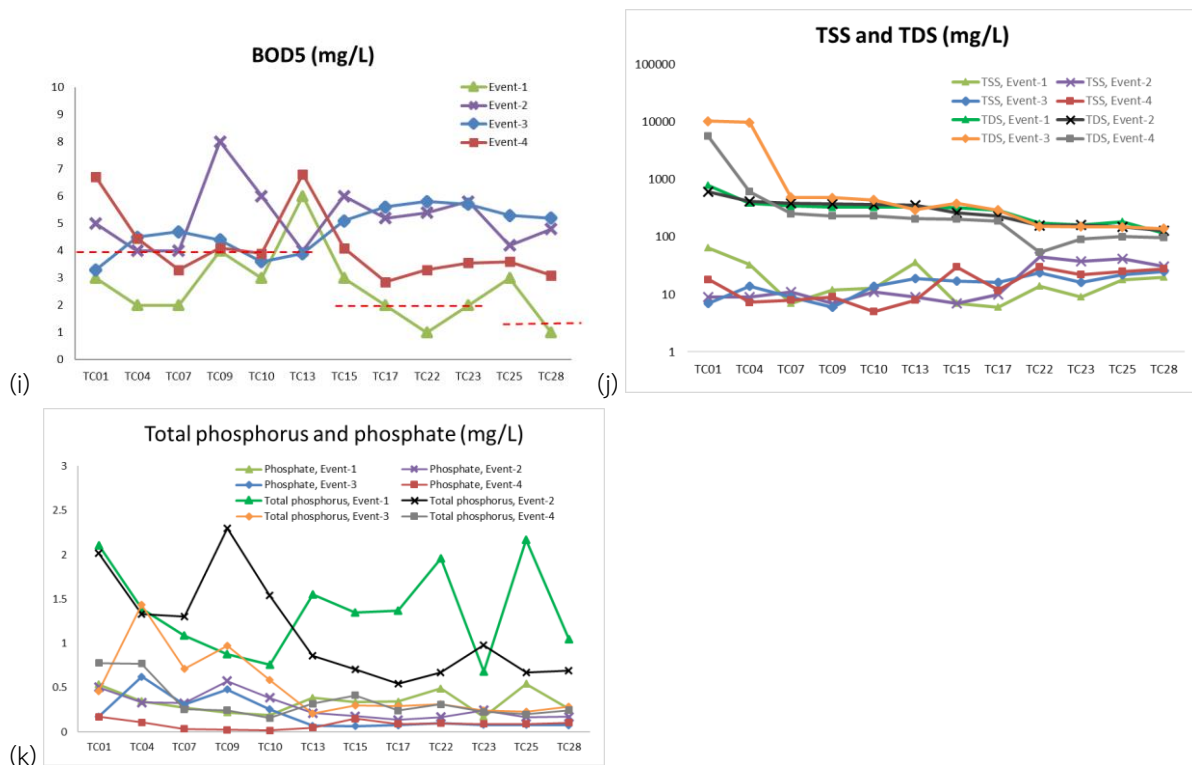
ตารางที่ 22 ปริมาณน้ำฝนรายชั่วโมงสะสมห้าวันก่อนวันเก็บตัวอย่าง (มิลลิเมตร)

วันที่เก็บตัวอย่าง	1. วัดสิงห์ (ชัยนาท)	2. หันคา (ชัยนาท)	3. หนอง ผักนาก (สุพรรณบุรี)	4. อบต. บ้านพราน (อ่างทอง)	5. ที่ทำการกำนันลาดชิด (พระนครศรีอยุธยา)	6. บ้านลากซ้อน (นนทบุรี)	7. ท่านา (นครปฐม)	8. อบต. บางกระเจ้า (สมุทรสาคร)
29-Jul-17					10.8	31.8	0.6	4.8
5-Aug-17	12	0	0	1.8	1.8			
19-Aug-17					41.4	4.2	11.8	14.4
26-Aug-17	10	33	0	0	2.2			
3-Feb-18					0.2	0	0	0.4
10-Feb-18	0	0	0	0	0			
3-Mar-18					8.8	0	0	29
10-Mar-18	0.4	0	0.8	0.2	21.8			
หมายเหตุ	สถานีที่ 4, 5, และ 6 อยู่ในเขตลุ่มน้ำเจ้าพระยา ปริมาณน้ำท่าไหลลงสู่แม่น้ำเจ้าพระยาเป็นส่วนใหญ่							
ที่มา	http://wea.haii.or.th/telemetry/ais/map.php							

จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำต่างๆ ได้ผลวิเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 พารามิเตอร์คุณภาพน้ำของตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำท่าจีน สำหรับฤดูฝนและฤดูแล้งของค่า pH (a), water temperature (b), salinity (c), conductivity (d), total coliforms (e), fecal coliforms (f), *E. coli* and enterococcus (g), dissolved oxygen (h), biochemical oxygen demand (i), total suspended solids and total dissolved solids (j), phosphate and total phosphorus (k) เส้นประแสดงค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินของแหล่งน้ำผิวดินประเภทที่ 3 (TC15-TC23) และประเภทที่ 2 (TC25-TC28) ตามลำดับ

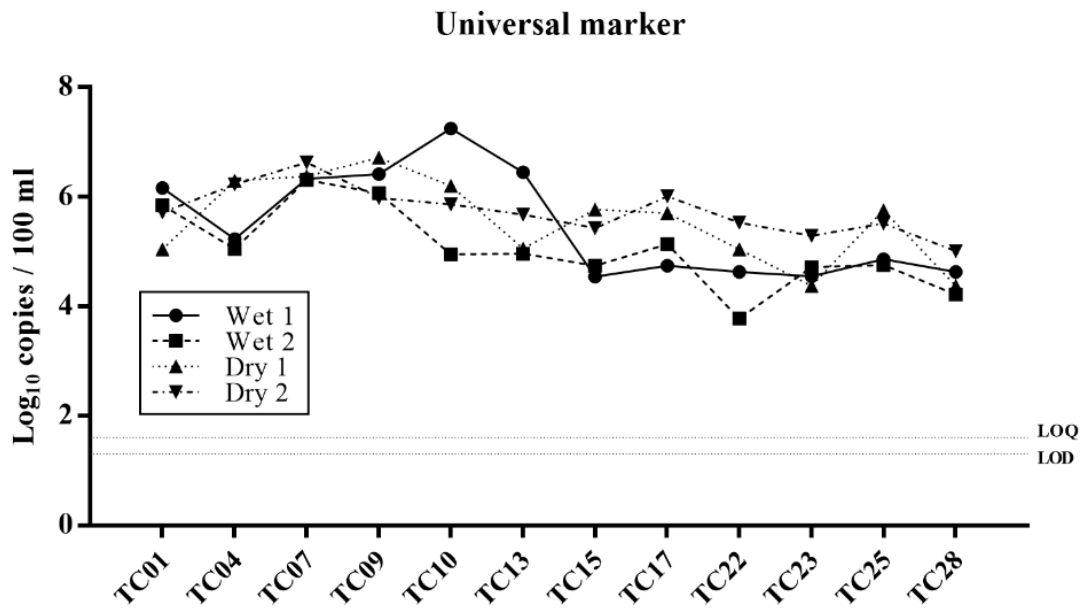


รูปที่ 11 (ต่อ) พารามิเตอร์คุณภาพน้ำของตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำท่าจีน สำหรับฤดูฝนและฤดูแล้งของค่า pH (a), water temperature (b), salinity (c), conductivity (d), total coliforms (e), fecal coliforms (f), *E. coli* and enterococcus (g), dissolved oxygen (h), biochemical oxygen demand (i), total suspend solids and total dissolved solids (j), phosphate and total phosphorus (k) เส้นประแสดงค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินของแหล่งน้ำผิวดินประเภทที่ 3 (TC15-TC23) และประเภทที่ 2 (TC25-TC28) ตามลำดับ

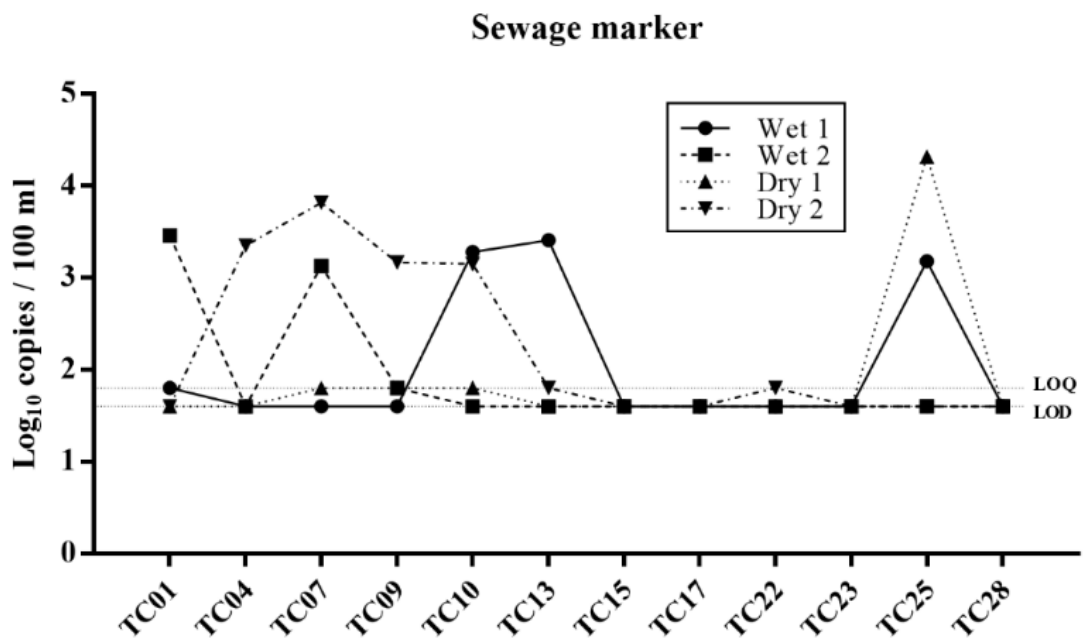
จากผลการวิเคราะห์พารามิเตอร์คุณภาพน้ำในแต่ละสถานีพบว่า มีสถานีที่มีค่าพารามิเตอร์เกินมาตรฐาน ได้แก่ ค่า total coliforms ที่สถานี TC25 และ TC28 ในตัวอย่างน้ำตัวแทนฤดูฝน และ fecal coliforms เกินมาตรฐานที่สถานี TC22 TC25 และ TC28 ในตัวอย่างน้ำตัวแทนฤดูฝนเช่นกัน สำหรับค่า DO พบค่าต่ำกว่ามาตรฐานเกือบทุกสถานีคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด และพบในฤดูฝนเป็นส่วนมากประมาณ 66 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐาน สำหรับค่า BOD5 พบว่ามีสถานีที่สูงกว่ามาตรฐานมากถึง 65 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง นอกจากนี้แนวโน้มที่สถานี TC07, TC09, TC13 พบค่าแบคทีเรียสูง ได้แก่ total coliforms, fecal coliforms, *E. coli* และ enterococcus ซึ่งสอดคล้องกับค่า BOD5 ที่สูงและ DO ที่ต่ำ แสดงถึงคุณภาพน้ำต่ำในตัวอย่างดังกล่าว

3.5.2 คุณภาพน้ำจากการตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ

สำหรับผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่ใช้จำแนกแหล่งกำเนิด ได้แก่ แหล่งกำเนิดรวม แหล่งกำเนิดจากสุกร โค และ ชุมชน ด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ ดังแสดงในรูปที่ 12 และ ตารางที่ 23

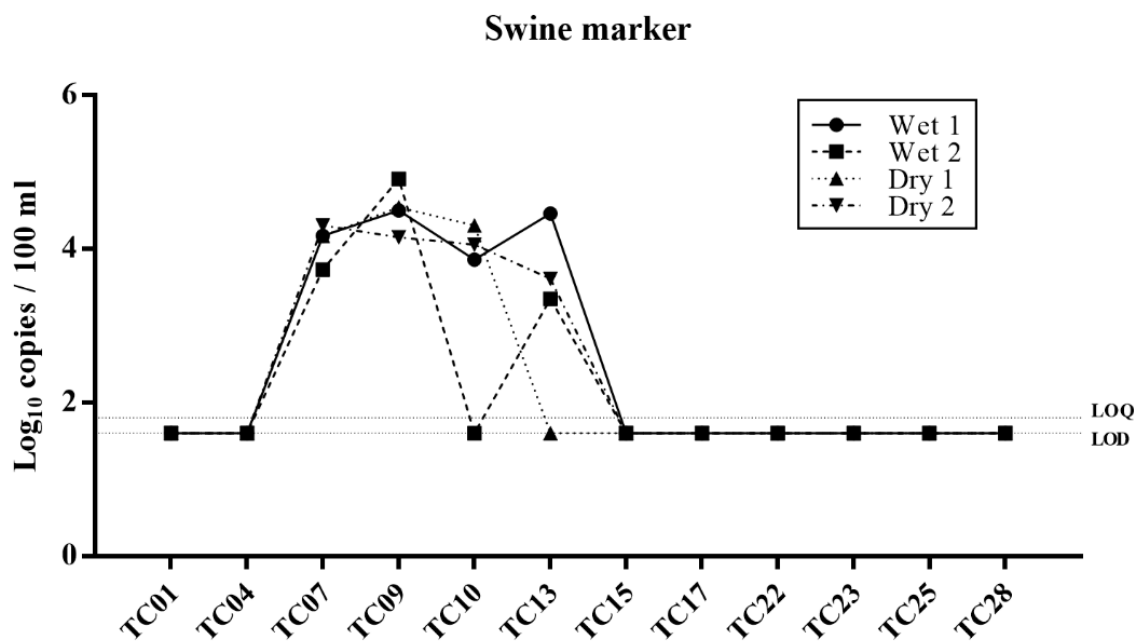


(a)

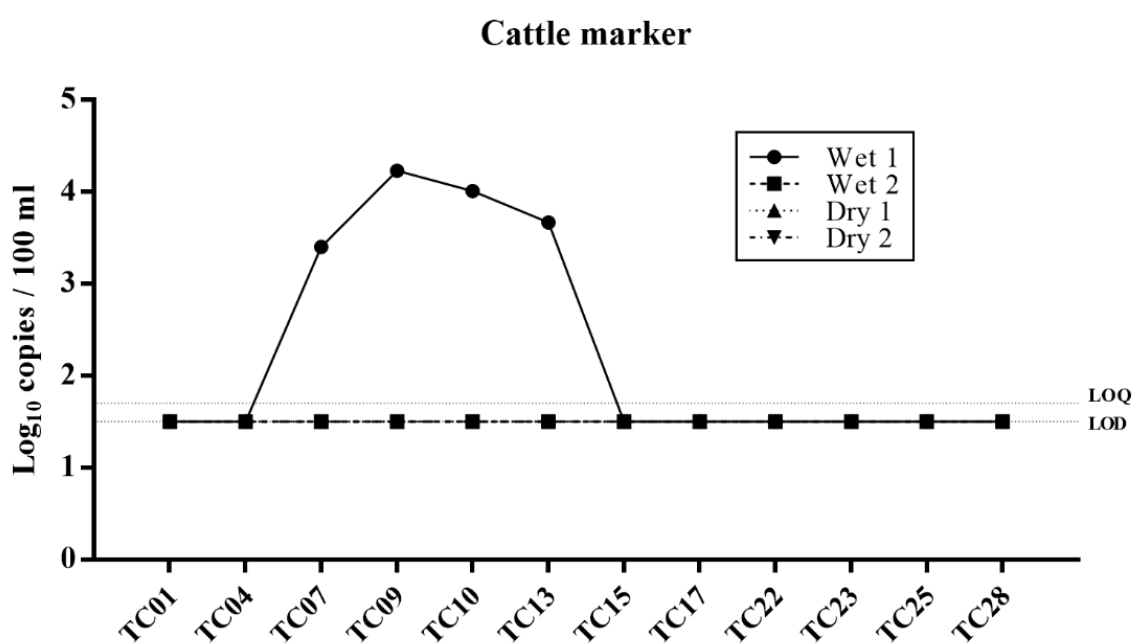


(b)

รูปที่ 12 ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิดรวม (universal) (a) ชุมชน (b) สุกร (c) และโค (d) จากตัวอย่างน้ำฤดูฝนและฤดูแล้งทั้ง 4 รอบการเก็บตัวอย่าง



(c)



(d)

รูปที่ 12 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิดรวม (universal) (a) ชุมชน (b) สุนัข (c) และโค (d) จากตัวอย่างน้ำฤดูฝนและฤดูแล้งทั้ง 4 รอบการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิดรวม ชุมชน สุกร และโค จากตัวอย่างน้ำ
 ฤดูฝนและฤดูแล้งทั้ง 4 รอบการเก็บตัวอย่าง

Marker	ฤดู	สถานที่ที่ตรวจพบ marker
Universal	Wet 1	พบทุกสถานี
	Wet 2	พบทุกสถานี
	Dry 1	พบทุกสถานี
	Dry 2	พบทุกสถานี
Sewage	Wet 1	ไม่พบในทุกสถานี
	Wet 2	TC01 TC07 TC25
	Dry 1	ไม่พบในทุกสถานี
	Dry 2	TC04 TC07 TC09 TC10 TC13
Swine	Wet 1	TC07 TC09 TC13
	Wet 2	TC07 TC09
	Dry 1	ไม่พบในทุกสถานี
	Dry 2	TC07 TC09 TC10
Cattle	Wet 1	TC07 TC09 TC10
	Wet 2	ไม่พบในทุกสถานี
	Dry 1	ไม่พบในทุกสถานี
	Dry 2	ไม่พบในทุกสถานี

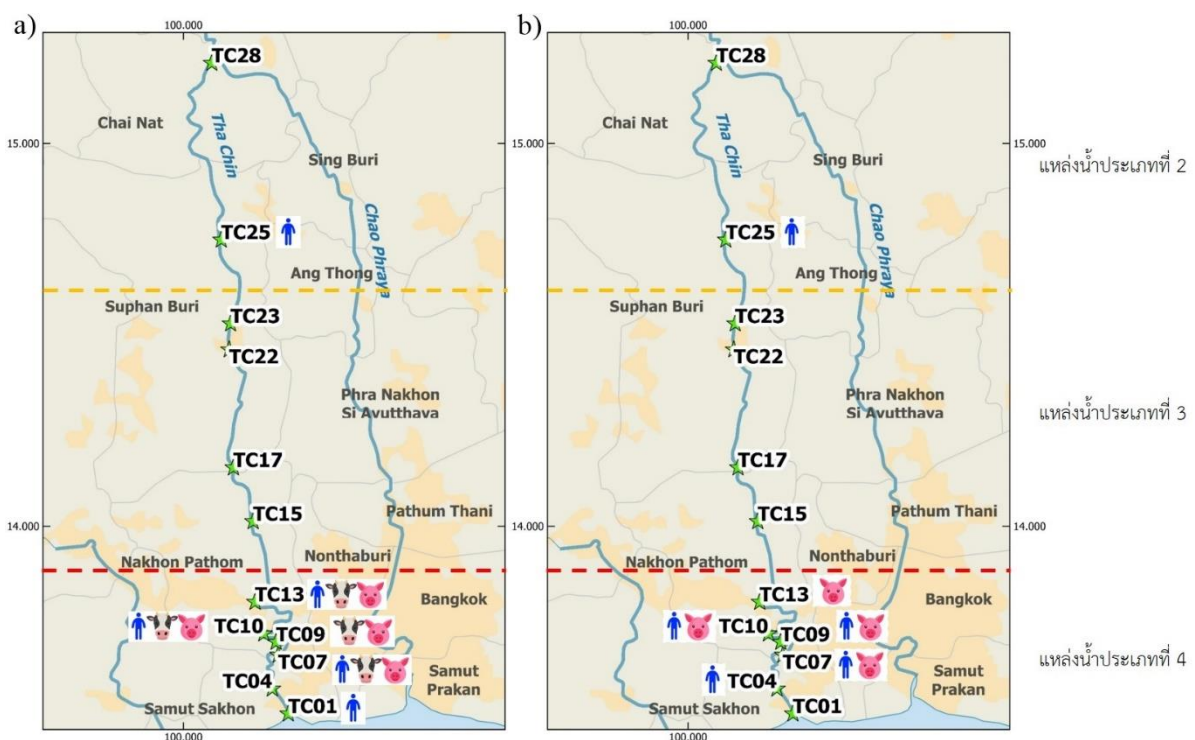
จากการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด พบกลุ่มแบคทีเรียจากการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลจาก
 แหล่งกำเนิดรวมในทุกสถานีเก็บตัวอย่างทั้ง 2 ฤดูทั้งวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ (รูปที่ 12a, ตารางที่ 23) ผลการ
 วิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณพบว่าสามารถตรวจพบได้ที่สถานี TC01 TC07
 TC09 TC10 TC13 TC25 ในฤดูฝน และสถานี TC04 TC07 TC09 TC10 TC13 TC22 TC25 ในฤดูแล้ง ความเข้มข้นของ
 ปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 1.8-4.32 gene copies/100 mL (รูปที่ 12b) ในขณะที่วิธีพีซีอาร์ตรวจพบที่สถานี
 TC01 TC07 TC25 ในฤดูฝนและ TC04 TC07 TC09 TC10 TC13 ในฤดูแล้ง (ตารางที่ 23) โดยสถานที่ที่ตรวจพบทั้ง 2 จะ
 เป็นพื้นที่ชุมชน เช่น TC07 (ร.ร.บ้านปล่องเหล็ก อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร) TC09 (หน้าวัดเทียนดัด บ้านท่าใหม่ อ.สาม
 พรวน จ.นครปฐม) TC10 (วัดบางช้างเหนือ อ.สามพรวน จ.นครปฐม) TC13 (หน้าที่ว่าการ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม) และ
 TC25 (ตลาดสามชุก อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี) ผลการศึกษาสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะ
 กับน้ำเสียชุมชนของวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณที่มีค่าความไวสูงกว่าพีซีอาร์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, ตารางที่ 19) รวมทั้งมี
 ความจำเพาะสูงกว่าพีซีอาร์และมีค่า Limit of detection ที่ต่ำกว่าวิธีพีซีอาร์ (ตารางที่ 19) นอกจากนั้นเมื่อคำนึงถึงค่าอัตรา
 การเกิดผลบวกและผลลบของทั้งวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ (ตารางที่ 19) พบว่า มีความเชื่อมั่นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ว่า
 ทุกสถานีมีการปนเปื้อนจากแหล่งกำเนิดรวมจริง ในสถานที่พบกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชน มีความ
 มั่นใจได้ 54 เปอร์เซ็นต์ ว่าเป็นการปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชนจริง ในขณะที่ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวมีความ
 มั่นใจได้ 100 เปอร์เซ็นต์ว่าไม่มีการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนอยู่จริง โดยที่อัตราการเกิดผลลบของพีซีอาร์เชิงปริมาณ (100%) สูง
 กว่าวิธีพีซีอาร์ (95%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับสุกรด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณพบว่าสามารถตรวจพบที่สถานี TC07 TC09 TC10 TC13 ทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง โดยมีความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 3.35 – 4.9 gene copies/100 mL (รูปที่ 12c) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์พบว่าตรวจพบที่สถานี TC07 TC09 TC13 ในฤดูฝน และ TC07 TC09 TC10 ในฤดูแล้ง (ตารางที่ 23) โดยจุดที่มีการปนเปื้อนมากที่สุดคือ TC09 หน้าวัดเทียนดัด บ้านท่าใหม่ อ.สามพราน จ. นครปฐม เมื่อพิจารณาค่าความไวและความจำเพาะของทั้ง 2 วิธีการตรวจสอบ (ตารางที่ 19) พบว่ามีผลใกล้เคียงกันมาก (96-100 เปอร์เซ็นต์) โดยไม่พบว่ามีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) สำหรับสถานีที่ตรวจพบกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับสุกรสามารถเชื่อมั่นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ว่าการปนเปื้อนจริงเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ และเชื่อมั่นได้ 87 เปอร์เซ็นต์ในวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ ซึ่งเมื่อทดสอบด้วยสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของทั้ง 2 วิธี (ตารางที่ 19) ในขณะที่เมื่อตรวจไม่พบกลุ่มแบคทีเรียสามารถเชื่อมั่นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ว่าไม่มีการปนเปื้อนมูลสุกรทั้ง 2 วิธีการทดสอบ และเมื่อพิจารณาที่ค่า limit of detection พบว่าพีซีอาร์เชิงปริมาณสามารถตรวจพบดีเอ็นเอเป้าหมายในน้ำในปริมาณเล็กน้อย ในขณะที่วิธีพีซีอาร์ต้องใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นมากกว่าถึง 75 เท่า

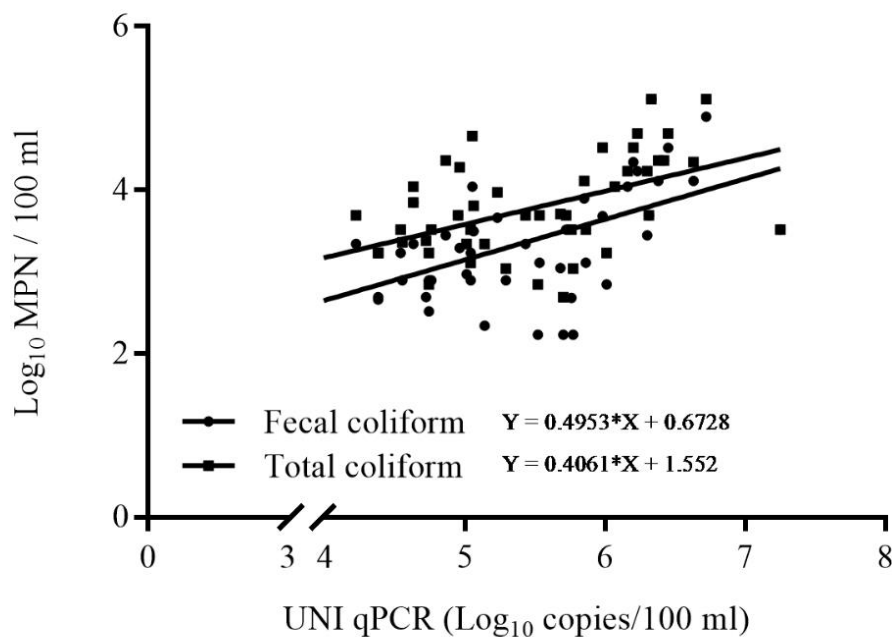
ผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับโคพบว่าสามารถตรวจพบได้ในฤดูฝนเท่านั้น โดยพบที่สถานี TC07 TC09 TC10 TC13 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ (รูปที่ 12d) และที่สถานี TC07 TC09 TC10 เมื่อทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ (ตารางที่ 23) โดยสามารถวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนได้ในช่วง 3.4 - 4.2 gene copies/100 mL เมื่อพิจารณาค่าความไวพบว่าวิธีพีซีอาร์มีค่าความไวที่ 85 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณมีค่า 70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 19) เมื่อพิจารณาที่ค่าความจำเพาะพบว่าทั้ง 2 วิธีมีค่าความจำเพาะใกล้เคียงกันในช่วง 94-100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสถานีที่ตรวจพบกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับโคสามารถเชื่อมั่นได้ 74 และ 100 เปอร์เซ็นต์ในวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณและพีซีอาร์ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อตรวจไม่พบกลุ่มแบคทีเรียสามารถเชื่อมั่นได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนสิ่งปนเปื้อนจากโคที่ความมั่นใจ 96 เปอร์เซ็นต์ในวิธีพีซีอาร์ และ 93 เปอร์เซ็นต์ในวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างวิธีพีซีอาร์และวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณพบว่า วิธีพีซีอาร์มีค่าความไว ความจำเพาะ และอัตราการเกิดผลบวกสูงกว่าวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$, ตารางที่ 19)

จากผลการศึกษาด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณสามารถสรุปผลการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำทั้ง 2 ฤดูได้ดังรูปที่ 13 และเมื่อเทียบผลค่า total coliforms และ fecal coliforms (รูปที่ 11) พบค่า total coliforms เกินมาตรฐานที่สถานี TC25 และ TC28 ตามเกณฑ์คุณภาพน้ำผิวดินประเภท 2 และค่า fecal coliforms เกินมาตรฐานที่สถานี TC 22 TC25 และ TC28 ตามเกณฑ์คุณภาพน้ำผิวดินประเภท 2 และ 3 ในตัวอย่างน้ำฤดูฝนเท่านั้น ส่วนสถานี TC01 TC04 TC07 TC09 TC10 TC13 จัดเป็นน้ำผิวดินประเภท 4 ซึ่งไม่มีเกณฑ์มาตรฐานของ total coliforms และ fecal coliforms แต่จากผลการศึกษาพบว่าสถานีเหล่านี้มีค่าเฉลี่ย total coliforms และ fecal coliforms สูงกว่าค่าเฉลี่ยในสถานีอื่นที่อยู่ในประเภท 2 และ 3 มากถึง 6 และ 14 เท่า ตามลำดับ ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง นอกจากนี้ผลจากกลุ่มแบคทีเรียที่จำแนกแหล่งกำเนิดสามารถช่วยระบุได้ว่าแหล่งกำเนิดน้ำเสียมาจากมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนสำหรับสถานี TC07 TC09 TC10 และ TC13 จึงทำให้มีค่า total coliforms และ fecal coliforms ที่สูง ส่วนสถานี TC01 และ TC04 ไม่พบการปนเปื้อนจากมูลสัตว์ แต่พบการปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชนจึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ค่า coliforms สูง สำหรับสถานี TC25 ค่า fecal coliforms ที่เกินมาตรฐานได้รับอิทธิพลมากจากการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนในปริมาณที่สูง อย่างไรก็ตามที่สถานี TC22 และ TC28 ไม่พบการปนเปื้อนจากชุมชน โค หรือสุกร อาจเป็นไปได้ว่าค่า fecal coliforms ที่เกินมาตรฐานมีการปนเปื้อนน้ำเสียและสิ่งปนเปื้อนจากแหล่งกำเนิดอื่นๆ เช่น ฟาร์มสัตว์ปีก หรือน้ำตามธรรมชาติ เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบค่า $\log_{10}$ copies กลุ่มแบคทีเรีย bacteroidetes จากการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลจากแหล่งกำเนิดรวมกับค่า total coliforms และ fecal coliforms ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้เป็นมาตรฐานคุณภาพน้ำ ที่ตรวจพบในแม่น้ำท่าจีน พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$, Pearson correlation) ดังรูปที่ 14 และเมื่อหาความสัมพันธ์ของค่า LOD ของวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณที่สูงที่สุดของทั้ง 4 ไพรเมอร์ (40 copies/reactions) กับค่า total และ fecal coliforms พบว่าค่า LOD เทียบเท่ากับ 568 และ 138 MPN/100 ml ตามลำดับ ซึ่งค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 2 (ประเภทแหล่งน้ำที่มีคุณภาพน้ำดีที่สุดสำหรับแม่น้ำท่าจีน) กำหนดค่า total และ fecal coliforms อยู่ที่ 5000 และ 1000 MPN/100 ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าค่าที่ตรวจพบต่ำกว่าค่า LOD ในวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณไม่ส่งผลกระทบในการแปลผลคุณภาพของแหล่งน้ำ สำหรับการเปรียบเทียบค่า LOD กับค่าความเสี่ยงทางสุขภาพนั้น ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอในการประเมินผลกระทบทางสุขภาพ เนื่องจากการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนซึ่งกลุ่มแบคทีเรียนี้ไม่ได้เป็นเชื้อก่อโรคอันตราย แต่เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนสิ่งปฏิกูล ซึ่งมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคที่หลากหลายชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันไป



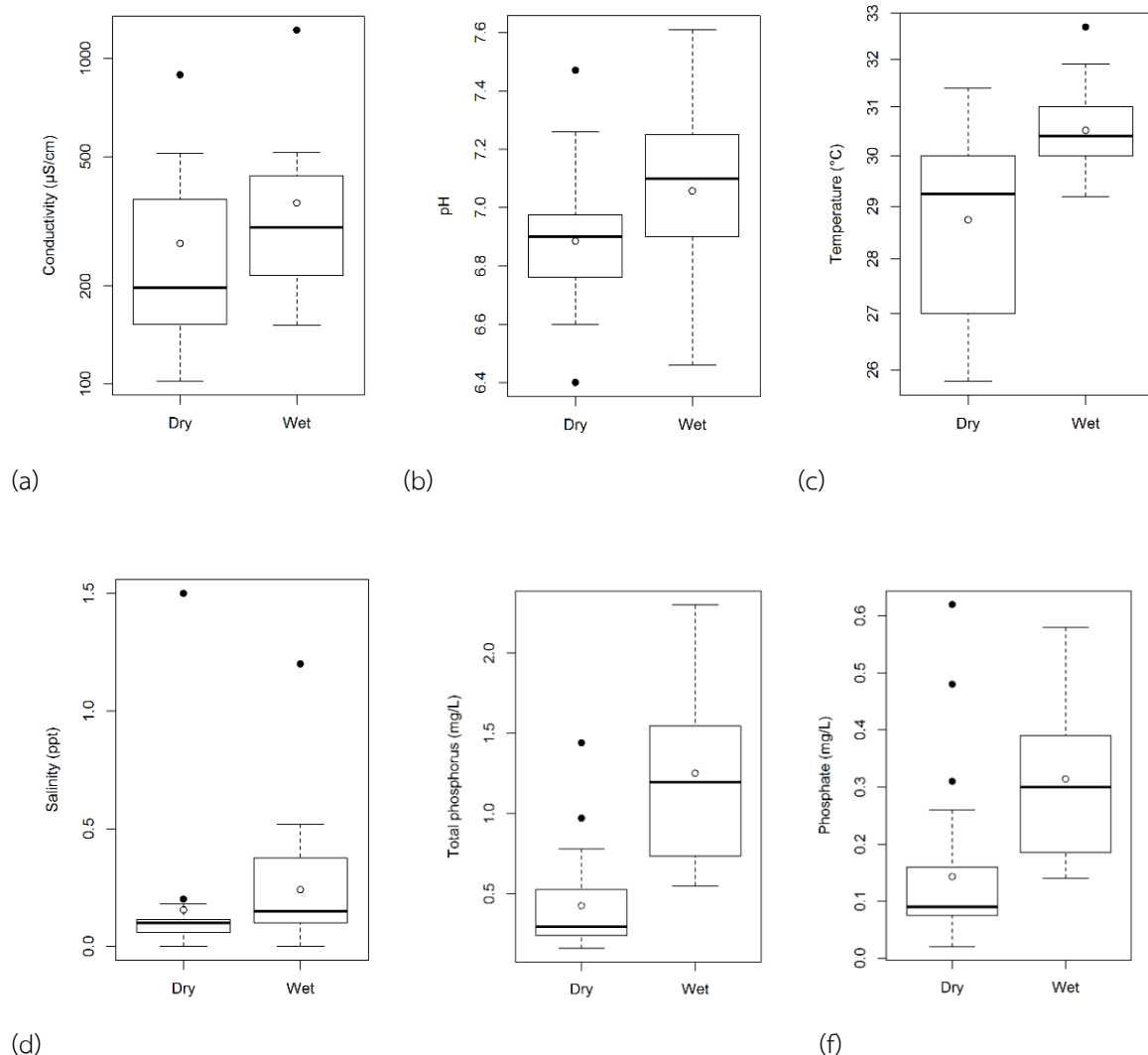
รูปที่ 13 แผนที่ลำน้ำตามประเภทแหล่งน้ำและการปนเปื้อนแหล่งกำเนิดมลพิษในสถานีต่างๆ ในตัวอย่างน้ำฤดูฝน (a) และฤดูแล้ง (b)



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์กลุ่มแบคทีเรีย Bacteroidetes จากการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลจากแหล่งกำเนิดรวม (universal) กับ total coliforms และ fecal coliforms ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้เป็นมาตรฐานคุณภาพน้ำ

3.5.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างของพารามิเตอร์ในตัวอย่างน้ำฤดูฝนและฤดูแล้ง

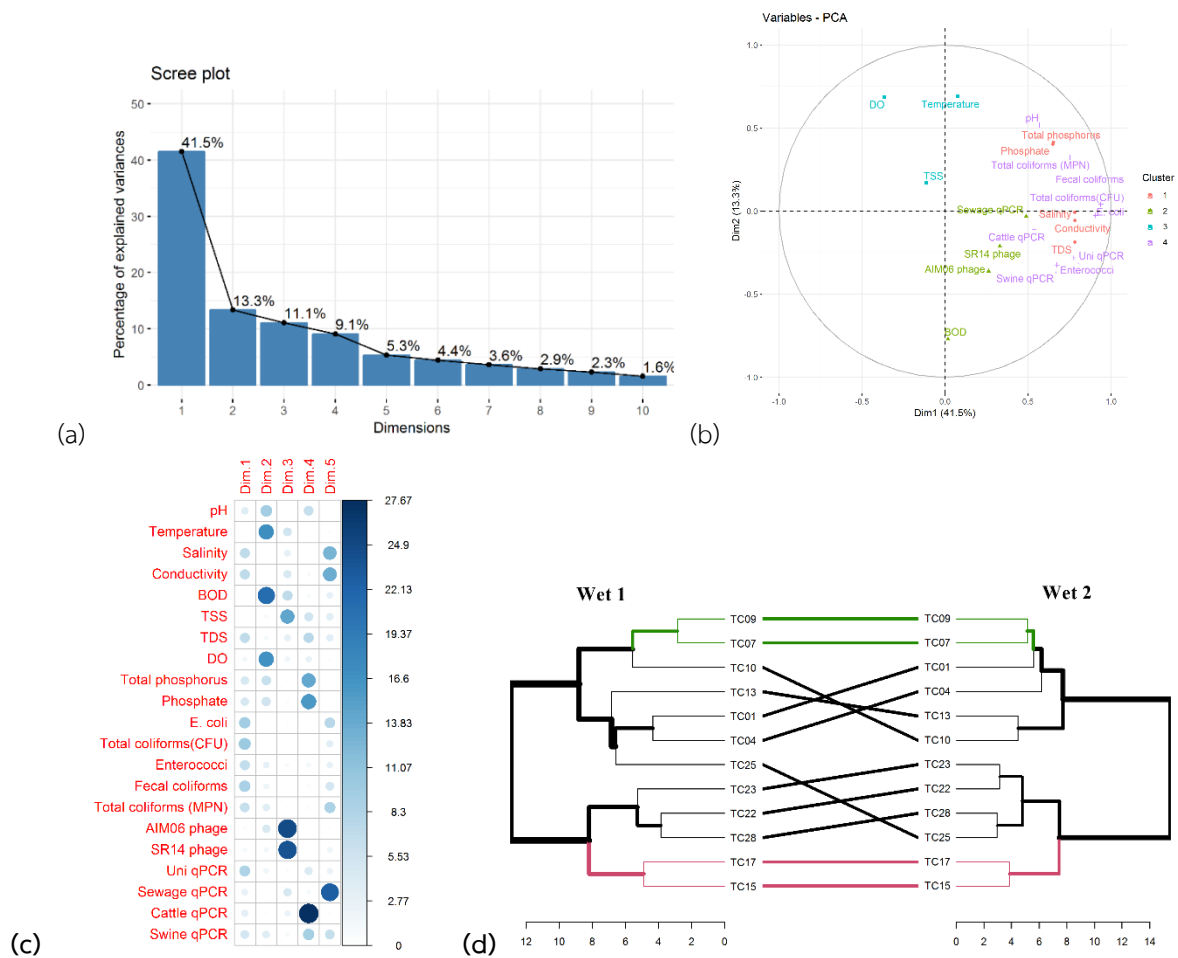
ผลการศึกษาพบว่าพารามิเตอร์ทางกายภาพที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบในฤดูร้อนและฤดูฝน ได้แก่ค่า บีโอดี (BOD) ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (TDS) ของแข็งแขวนลอย (TSS) และ ออกซิเจนละลาย (DO) ในขณะที่ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) pH อุณหภูมิ ความเค็ม ฟอสฟอรัส และฟอสเฟต มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างฤดูฝนและฤดูแล้ง ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 15 ส่วนพารามิเตอร์ทางชีวภาพ ได้แก่ *E.coli*, Total coliforms, Enterococcus, Fecal coliforms, SR14 และ AIM06 phage รวมทั้ง qPCR marker ของกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2 ฤดู ($P > 0.05$) ยกเว้นกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะต่อสิ่งปฏิกูลจากโคซึ่งพบเฉพาะในฤดูฝน จึงทำให้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฤดูแล้ง ($P < 0.05$)



รูปที่ 15 กราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพและเคมีที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างฤดูร้อนและฤดูฝน เมื่อทดสอบด้วย ANOVA สำหรับพารามิเตอร์ที่กระจายตัวแบบปกติ และ Kruskal-Wallis rank sum test สำหรับพารามิเตอร์ที่กระจายตัวไม่ปกติ boxplot แสดงค่ามัธยฐาน และเปอร์เซ็นต์ไทด์ที่ 75 และ 25 ปลายเส้นปะแสดงค่าสูงสุดและต่ำสุด จุดสีดําแสดงค่า outlier และจุดสีขาวแสดงค่าเฉลี่ย

3.5.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ทางกายภาพ เคมีและชีววิทยาด้วยวิธีวิเคราะห์สองตัวแปร (Correlation) และ พหุตัวแปร (multivariate analysis)

เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ต่างๆ มาทำการวิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) ด้วยวิธี Principal component analysis (PCA) เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ โดยไม่แบ่งกลุ่มเป็นตัวแปรต้นหรือตัวแปรตาม แต่ทำการสร้างกลุ่มตัวแปรใหม่ ที่ประกอบด้วยความแปรปรวนของตัวแปรเดิม เรียกว่า Principle component หรือ dimension จากการวิเคราะห์ข้อมูลตัวอย่างน้ำในฤดูฝนพบว่า กลุ่มตัวแปรมีความแปรปรวนอยู่ใน 5 dimensions แรก (ค่าสะสมเกิน 80 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงด้วยกราฟ Scree plot ที่แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของกลุ่มตัวแปรในแต่ละ dimension บางครั้งเรียกความแปรปรวนว่าค่า eigenvalues ดังแสดงในรูปที่ 16(a)



รูปที่ 16 กราฟแสดงการวิเคราะห์ด้วย Principal component analysis (PCA) ของค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ สำหรับตัวอย่างน้ำฤดูฝนโดยแสดงค่า Scree plot (a), กราฟ PCA แสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มระหว่างพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วย k-means clustering (b), % contribution ของพารามิเตอร์ต่างๆ ใน 5 dimensions แรก (c), และ cluster analysis ของสถานีเก็บตัวอย่างทั้ง 2 รอบในฤดูฝน (d)

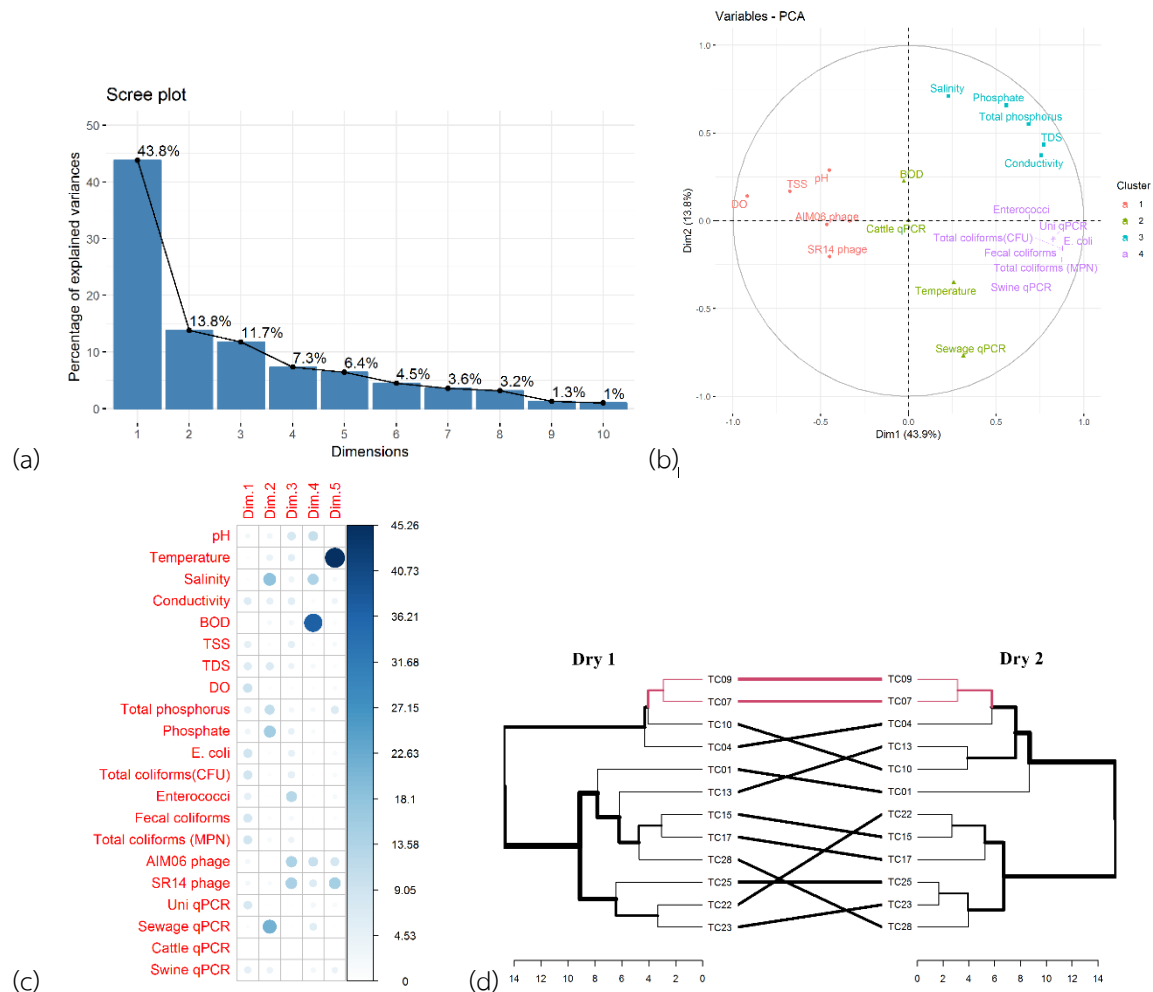
เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์หลักที่ส่งผลต่อกลุ่มตัวแปรใน dimensions 1 และ 2 พบความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 16(b) โดยเวกเตอร์ของพารามิเตอร์ที่อยู่ใกล้กันและห่างจากจุด (0,0) ด้วยระยะใกล้เคียงกัน จะมีความสัมพันธ์กันมากกว่าเวกเตอร์ของพารามิเตอร์ที่อยู่ไกลกัน การวิเคราะห์จัดกลุ่ม (cluster analysis) ซึ่งทำการจัดกลุ่มของพารามิเตอร์ที่มีลักษณะเหมือนหรือคล้ายคลึงกันเข้าด้วยกัน โดยจะเห็นได้ว่าพารามิเตอร์ได้รับการจัดกลุ่มเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ของแข็งแขวนลอย ออกซิเจนละลาย และ อุณหภูมิ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย phosphate total phosphorus ค่าการนำไฟฟ้า ความเค็ม และ ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บีโอดี Sewage qPCR marker SR14 และ AIM06 phage กลุ่มสุดท้ายประกอบด้วย pH total coliforms (CFU method) total coliforms (MPN method), fecal coliforms, *E. coli*, enterococcus, Universal qPCR marker, Cattle qPCR marker และ Swine qPCR marker ดังแสดงในรูปที่ 16(b)

ค่า เปอร์เซ็นต์ contribution แสดงค่าการกระจายตัวของพารามิเตอร์ต่างๆใน dimensions 1 ถึง 5 รูปที่ 16(c) ซึ่งแสดงความสำคัญของพารามิเตอร์ดังกล่าวด้วย โดยแสดงให้เห็นว่าพารามิเตอร์ที่ส่งผลต่อ dimensions 1 ได้แก่ fecal coliforms, ความเค็ม, *E. coli*, ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ, ของแข็งแขวนลอย, ค่าการนำไฟฟ้า, total coliforms (CFU and MPN methods), และ enterococcus ส่วนพารามิเตอร์ที่ส่งผลต่อ dimensions 2 ได้แก่ค่า pH อุณหภูมิ บีโอดี, ออกซิเจนละลาย, total phosphorus และ phosphate ทำให้แสดงค่าเหล่านี้ได้ดีในกราฟ 2 dimentions มีความน่าเชื่อถือในการแปลผลความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ ในขณะที่พารามิเตอร์ที่กระจายตัวใน dimension อื่นจำเป็นต้องใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์อีกครั้ง นอกจากนี้จัดกลุ่มแบบลำดับชั้น (hierarchical clusterings) ของตัวอย่างน้ำรอบ 1 และ 2 รูปที่ 16(d) ซึ่งเป็นตัวแทนน้ำในฤดูฝนพบว่าตัวอย่างน้ำที่สถานี TC07 (ร.ร.บ้านปล่องเหล็ก อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร) และ TC09 (หน้าวัดเทียนดัด บ้านท่าใหม่ อ.สามพราน จ.นครปฐม) มีพารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่ใกล้เคียงกันทั้ง 2 รอบของการเก็บน้ำซึ่งมีคุณภาพน้ำที่ต่ำดังที่กล่าวมาในข้างต้น และพบว่าที่ TC15 (สะพานบางเลน อ.บางเลน จ.นครปฐม) และ TC17 (ใต้ปากคลองพระยาบรรลือ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี) มีพารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่ความใกล้เคียงกันทั้ง 2 รอบ ซึ่งเป็นจุดที่คุณภาพน้ำค่อนข้างดีพบค่า Total และ fecal coliforms ต่ำกว่าเกณฑ์คุณภาพน้ำและยังตรวจไม่พบแบคทีเรียที่จำเพาะกับคน หมู และวัว และยังพบสถานที่ที่พารามิเตอร์ใกล้เคียงกันรองลงมาคือ TC01 และ TC04 ซึ่งอยู่บริเวณปากแม่น้ำ จ.สมุทรสาคร และสถานี TC22, TC23 และ TC28 ซึ่งอยู่บริเวณต้นน้ำ จ.สุพรรณบุรีและชัยนาท

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำในตัวอย่างน้ำฤดูแล้งพบว่ากลุ่มตัวแปรที่มีคุณลักษณะเด่นจะอยู่ใน 5 dimensions แรก (ค่าสะสมเกิน 80 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงด้วยกราฟ Scree plot ในรูปที่ 17(a) เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์หลักที่ส่งผลต่อกลุ่มตัวแปรใน dimensions 1 และ 2 พบความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 17(b) การวิเคราะห์จัดกลุ่ม (cluster analysis) พบว่าพารามิเตอร์ได้รับการจัดกลุ่มเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย pH, ออกซิเจนละลาย, ของแข็งแขวนลอย, SR14 phage และ AIM06 phage กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บีโอดี, อุณหภูมิ, Sewage qPCR marker, Cattle qPCR marker กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย phosphate, total phosphorus, ค่าการนำไฟฟ้า, ความเค็ม และ ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ กลุ่มสุดท้ายประกอบด้วย total coliforms (CFU method), total coliforms (MPN method), fecal coliforms, *E. coli*, enterococcus, Universal qPCR marker และ Swine qPCR marker ดังแสดงในรูปที่ 17(b)

ค่า เปอร์เซ็นต์ contribution แสดงให้เห็นว่าพารามิเตอร์ที่ส่งผลต่อ dimensions 1 และ 2 ได้แก่ ทุกพารามิเตอร์ ยกเว้นค่า pH อุณหภูมิ AIM06 และ SR14 phage ดังแสดงในรูปที่ 17(c) การจัดกลุ่มแบบลำดับชั้น (hierarchical clusterings) ของตัวอย่างน้ำรอบ 1 และ 2 ในฤดูแล้งพบว่า ตัวอย่างน้ำที่สถานี TC07 (ร.ร.บ้านปล่องเหล็ก อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร) และ TC09 (หน้าวัดเทียนดัด บ้านท่าใหม่ อ.สามพราน จ.นครปฐม) มีพารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่ใกล้เคียงกันทั้ง 2 รอบของการเก็บน้ำในฤดูแล้งและมีคุณภาพน้ำที่ต่ำกว่ามาตรฐาน รูปที่ 17(d) ซึ่งทั้ง 2 สถานีมีความใกล้เคียงกันทั้งฤดูร้อนและฤดูฝนแสดงให้เห็นว่าอาจมีการปนเปื้อนสิ่งปนื้อตลอดทั้งปี นอกจากนั้นยังพบสถานที่ที่มีพารามิเตอร์ใกล้เคียงกันรองลงมาคือ TC15 และพบว่าที่ (สะพานบางเลน อ.บางเลน จ.นครปฐม) และ TC17 (ใต้ปากคลองพระยาบรรลือ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี) ซึ่งสอดคล้องกับในฤดูฝนซึ่งอาจเป็นจุดที่มีการปนเปื้อนน้อยทั้ง 2 ฤดู

จากผลที่ได้จากตัวอย่างน้ำทั้งฤดูฝนและฤดูแล้งพบว่ามีความแตกต่างกันบ้าง แต่พารามิเตอร์หลักที่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำของทั้งสองรอบที่เหมือนกัน ได้แก่ total coliforms (CFU and MPN methods), fecal coliforms, *E. coli*, enterococcus ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ทางชีววิทยา

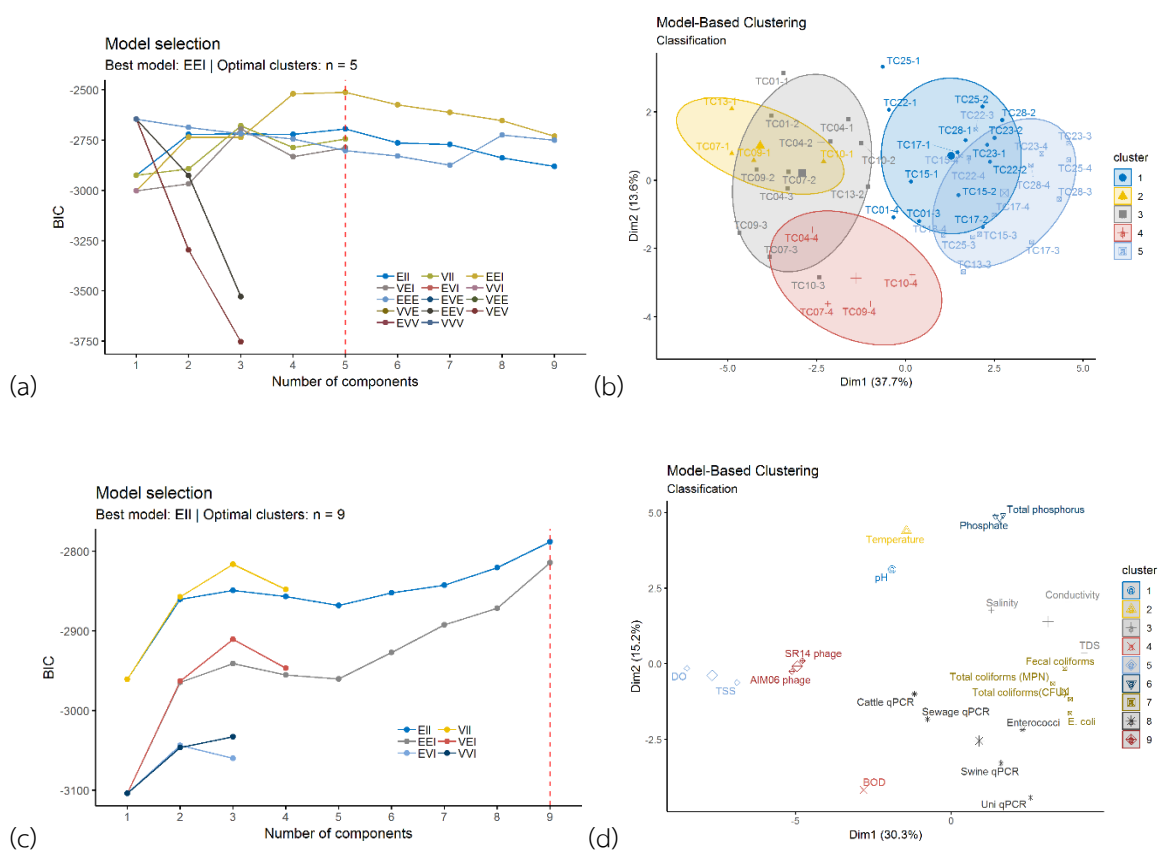


รูปที่ 17 กราฟแสดงการวิเคราะห์ด้วย Principal component analysis (PCA) ของค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำสำหรับตัวอย่างน้ำฤดูแล้งโดยแสดงค่า Scree plot (a), กราฟ PCA แสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มระหว่างพารามิเตอร์ต่างๆ (b), % contribution ของพารามิเตอร์ต่างๆ ใน 5 dimensions แรก (c), และ cluster analysis ของสถานีเก็บตัวอย่างทั้ง 2 รอบในฤดูแล้ง (d)

นอกจากนี้ทำการจัดกลุ่มด้วย model-based clustering ของตัวอย่างน้ำจากสถานีต่างๆ ที่แสดงความคล้ายคลึงกันและจัดกลุ่มพารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่มีความสัมพันธ์กัน โดยการวิเคราะห์ด้วย model-based clustering จะทำการหาโมเดลที่เหมาะสม รูปที่ 18(a, c) ซึ่งเหมาะกับการใช้จัดกลุ่มตัวแปรที่มีการแจกแจงของข้อมูล (distribution) หลายรูปแบบ โดยสามารถแบ่งกลุ่มสถานีได้เป็น 5 กลุ่ม (clusters) ดังแสดงใน รูปที่ 18(b) ในกลุ่มที่ 1 พบว่ามีพารามิเตอร์แบคทีเรียประกอบด้วย total coliforms (CFU และ MPN), fecal coliforms, enterococcus และ *E.coli* ในระดับปานกลาง มีค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพและเคมีในระดับปานกลาง แต่พบค่า qPCR marker ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดต่างๆในระดับต่ำ บ่งชี้คุณภาพน้ำโดยรวมในระดับปานกลาง ซึ่งประกอบด้วยสถานี TC15 TC17 TC22 TC23 TC25 TC28 ซึ่งทั้งหมดอยู่ในฤดูฝน และ TC01 ในฤดูแล้ง กลุ่มที่มีคุณภาพน้ำโดยรวมอยู่ในเกณฑ์ดีพบว่ามีค่าพารามิเตอร์แบคทีเรียในระดับต่ำมีค่าออกซิเจนละลายสูง พบ qPCR marker ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดต่างๆในระดับต่ำ ถึงแม้ว่าจะพบเฟจ SR14 และ AIM06 ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชนสูงในบางสถานี สถานีที่อยู่ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย TC15 TC17 TC22 TC23 TC25 TC28 ซึ่งทั้งหมดอยู่ในฤดูแล้ง ส่วนกลุ่มที่ 2 3 และ 4 พบว่ามีค่าพารามิเตอร์แบคทีเรียและ qPCR marker ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดต่างๆ ในปริมาณที่สูง แต่มีความผันผวนแตกต่างกันเล็กน้อยจากค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพและเคมี

บ่งชี้คุณภาพน้ำโดยรวมในระดับต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งมีสถานีหลักที่พบคือ TC04 TC07 TC09 TC10 TC13 ซึ่งพบทั้งฤดูฝนและฤดูแล้ง จากการวิเคราะห์กลุ่มสถานีพบว่าคุณภาพน้ำโดยรวมที่ตีบย่อในฤดูแล้ง ในขณะที่ฤดูฝนจะพบค่าบ่งชี้คุณภาพน้ำต่ำกว่ามาตรฐานในที่สูง เนื่องจากมีการชะล้างหน้าดินที่ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำในฤดูฝน

สำหรับการจัดกลุ่มพารามิเตอร์คุณภาพน้ำพบว่าสามารถแบ่งพารามิเตอร์ออกเป็น 9 กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กัน ดังรูปที่ 18(d) คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ pH กลุ่มที่ 2 คือ อุณหภูมิ ซึ่งทั้ง 2 พารามิเตอร์ไม่มีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์อื่น กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ความเค็ม ค่าการนำไฟฟ้า และ ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ กลุ่มที่ 4 บีโอดี กลุ่มที่ 5 ออกซิเจนละลาย และ ของแข็งแขวนลอย กลุ่มที่ 6 total phosphorus และ phosphate กลุ่มที่ 7 total coliforms (CFU และ MPN) fecal coliforms และ *E.coli* กลุ่มที่ 8 คือ qPCR marker จำเพาะกับแหล่งกำเนิดต่างๆ และ enterococcus และกลุ่มสุดท้ายคือ SR14 และ AIM06 phage

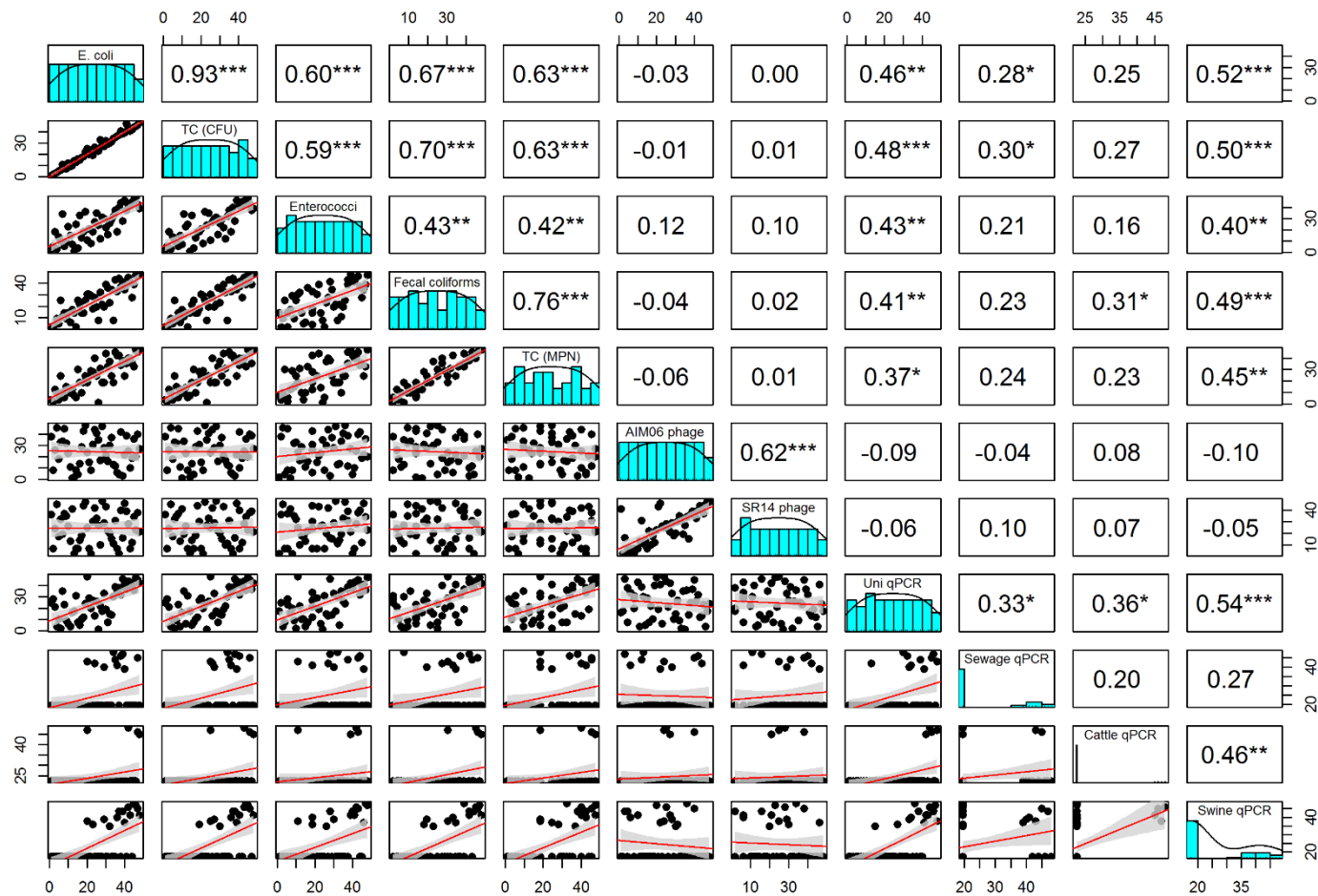


รูปที่ 18 กราฟแสดงการวิเคราะห์ด้วย model-based clustering ของพารามิเตอร์และตัวอย่างน้ำจากสถานีต่างๆ โดยแสดงโมเดลและจำนวนกลุ่มที่เหมาะสมกับการจัดกลุ่มตัวอย่างน้ำจากสถานีต่างๆทั้ง 4 รอบการเก็บน้ำ (a) ผลการจัดกลุ่มตัวอย่างน้ำจากสถานีต่างๆ (b) โมเดลและจำนวนกลุ่มที่เหมาะสมกับการจัดกลุ่มพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ (c) และผลการจัดกลุ่มพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ (d) best model แสดงลักษณะของ model ที่ใช้ EEI คือ the volumes and shape of allclusters are equal, the orientation is the identity ในขณะที่ EII หมายถึง All mixture components are spherical and equal volume. ค่า BIC (Bayesian Information Criterion) มากบ่งชี้ว่าเป็น model ที่เหมาะสม

เนื่องจากการวิเคราะห์แบบ PCA และ clustering เป็นการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์แบบภาพรวม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ในการบอกความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ผลจากการวิเคราะห์พบว่า พารามิเตอร์แบคทีเรีย เช่น total coliforms (CFU และ MPN) fecal coliforms enterococcus และ *E.coli* แสดงค่า correlation อย่างมีนัยสำคัญซึ่งกันและกัน ($p < 0.01$) **ดังรูปที่ 19(a)** qPCR marker ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดรวมและมูลสุกรมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับพารามิเตอร์แบคทีเรียเช่นกัน ($p < 0.05$) ส่วน qPCR marker ที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชน มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ qPCR marker ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดรวม total coliforms (CFU) และ *E.coli* ($p < 0.05$) ในขณะที่ AIM06 และ SR14 phage มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน ($p < 0.001$) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์อื่น

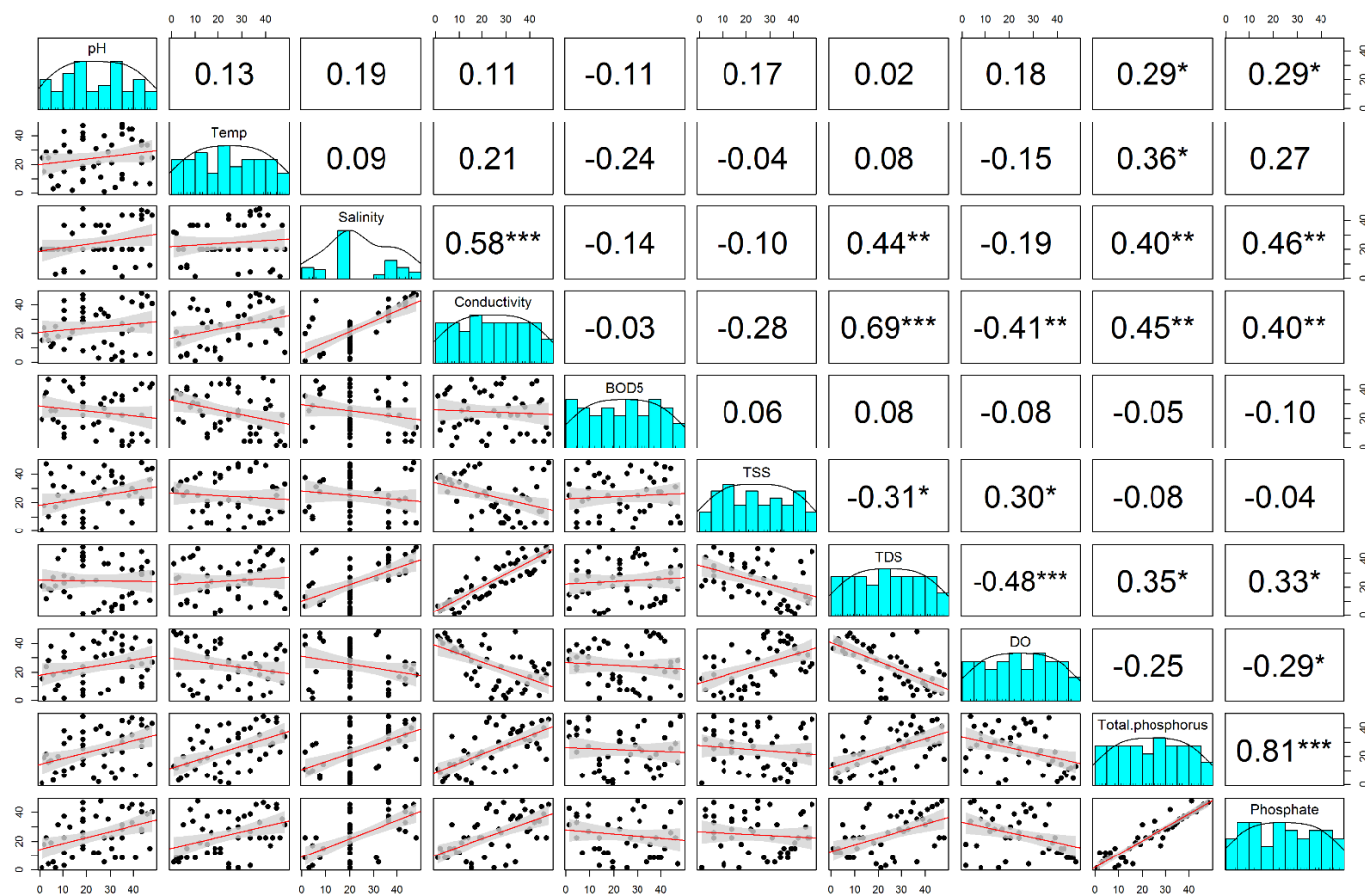
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ทางกายภาพพบว่า ความเค็ม ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ และ ค่าการนำไฟฟ้า มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) **ดังรูปที่ 19(b)** ในขณะที่ ออกซิเจนละลาย มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญกับ ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ และ ค่าการนำไฟฟ้า ($p < 0.01$) ส่วน Total phosphorus มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับค่า pH อุณหภูมิ ความเค็ม ค่าการนำไฟฟ้า ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ และ phosphate ($p < 0.05$) และ phosphate มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับค่า pH ความเค็ม ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ ค่าการนำไฟฟ้า และ Total phosphorus ($p < 0.05$) และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ ออกซิเจนละลาย ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ทางกายภาพ เคมีและแบคทีเรียพบว่า ออกซิเจนละลาย มีความมีความสัมพันธ์เชิงลบกับพารามิเตอร์แบคทีเรีย ได้แก่ *E.coli*, total coliforms (CFU และ MPN), enterococcus, fecal coliform, Uni และ Swine qPCR marker ($p < 0.05$) **ตารางที่ 24** ส่วนพารามิเตอร์ ค่าการนำไฟฟ้า , ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ, phosphorus และ total phosphorus มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับพารามิเตอร์แบคทีเรียที่กล่าวมาในข้างต้น Uni qPCR marker มีความสัมพันธ์กับ ค่าการนำไฟฟ้า และ ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ ($p < 0.05$) ส่วน Cattle qPCR มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ pH และ ความเค็ม และสุดท้าย Swine qPCR marker มีความสัมพันธ์กับ ของแข็งแขวนลอย



(a)

รูปที่ 19 Correlation plot ของพารามิเตอร์ทางชีวภาพทั้งฤดูฝน (a) และฤดูแล้ง (b) ตัวเลขแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Kendall's Tau correlation coefficient) Histogram แสดงการแจกแจงของข้อมูล (*) แสดงค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$



(b)

รูปที่ 19 (ต่อ) Correlation plot ของพารามิเตอร์ทางชีวภาพทั้งฤดูฝน (a) และฤดูแล้ง (b) ตัวเลขแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Kendall's Tau correlation coefficient) Histogram แสดงการแจกแจงของข้อมูล (*) แสดงค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

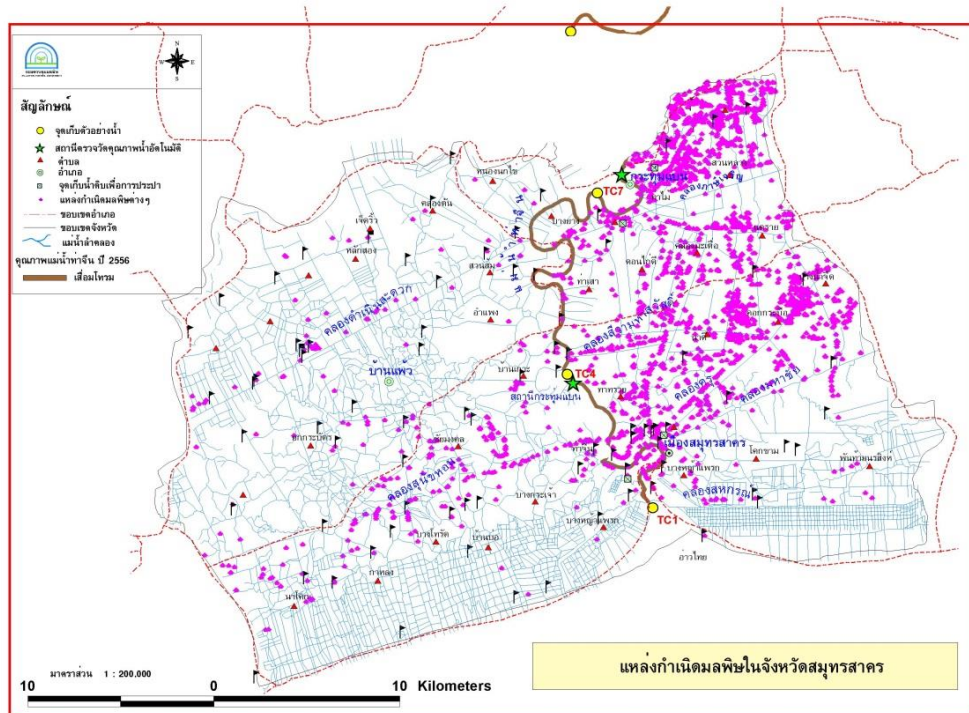
ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ทางกายภาพ เคมีและชีววิทยาทั้งฤดูฝนและฤดูแล้ง ตัวเลขแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Kendall's Tau correlation coefficient) (*) แสดงค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

Parameter	DO	Conductivity	TDS	Phosphorus	Total phosphorus	Salinity	pH	TSS
<i>E.coli</i>	-0.43**	0.37*	0.37*	0.31*	0.32*	<0.29	<0.29	<0.29
Total coliforms (CFU)	-0.42**	0.40**	0.40**	0.33*	0.34*	<0.29	<0.29	<0.29
Enterococcus	-0.29*	0.31*	0.33*	0.30*	0.29*	<0.29	<0.29	<0.29
Total coliforms (MPN)	-0.41**	0.31*	0.32*	0.32*	0.35*	<0.29	<0.29	<0.29
Fecal coliform	-0.46**	0.39*	0.38*	0.39*	0.38*	<0.29	<0.29	<0.29
Uni qPCR	-0.33*	0.32*	0.35*	<0.29	<0.29	<0.29	<0.29	<0.29
Cattle qPCR	<0.29	<0.29	<0.29	<0.29	<0.29	0.35*	0.36*	<0.29
Swine qPCR	-0.43**	<0.29	<0.29	<0.29	<0.29	<0.29	<0.29	-0.33*

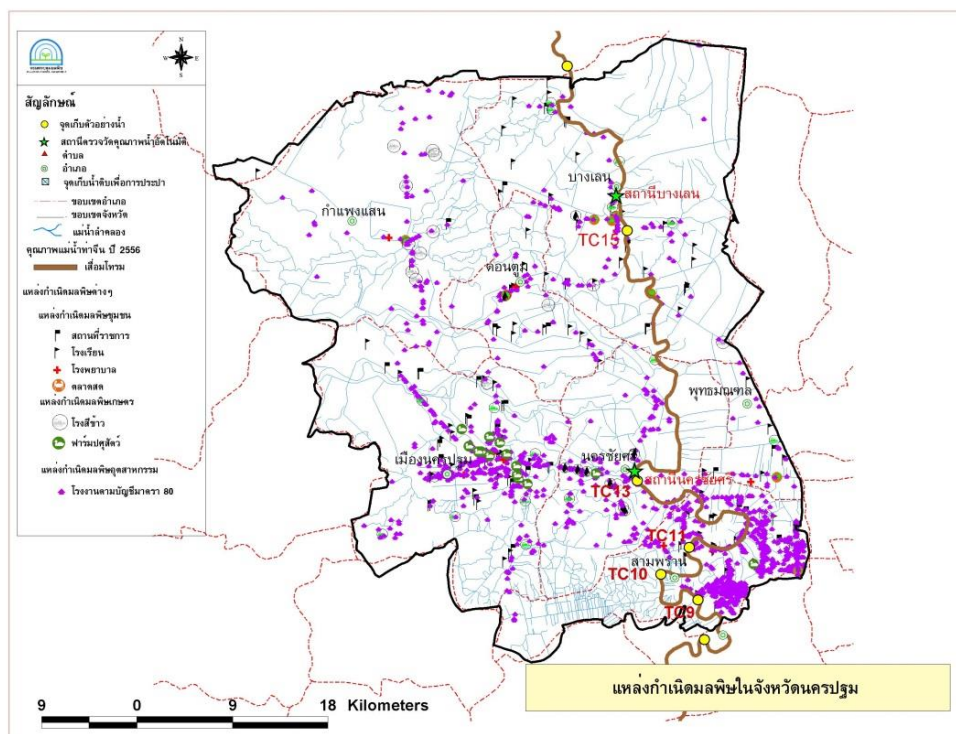
3.6 บทวิเคราะห์สัดส่วนและแหล่งที่มาหลักของการปนเปื้อนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในแหล่งน้ำทำกิน

จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากการเก็บน้ำทั้ง 2 ฤดูพบว่าสถานี TC07 (ร.ร.บ้านปล่องเหล็ก อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร) TC09 (หน้าวัดเทียนดัด บ้านท่าใหม่ อ.สามพราน จ.นครปฐม) TC10 (วัดบางช้างเหนือ อ.สามพราน จ.นครปฐม) และ TC13 (หน้าที่ว่าการ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม) พบว่าตรวจพบกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนและมูลสุกร มากถึง 63 เปอร์เซ็นต์ และ 88% จากการตรวจสอบทั้งหมด 16 ครั้ง ใน 2 ฤดู โดยที่สถานี TC07 TC09 TC10 ตรวจพบ 3 ครั้งใน 4 ครั้งสำหรับน้ำเสียชุมชน และ TC07 TC09 TC10 TC13 ตรวจพบมูลสุกรสถานีละ 3 ครั้งใน 4 ครั้ง นอกจากนั้นยังตรวจพบกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับมูลโคอย่างน้อย 1 ครั้งในทุกสถานีที่กล่าวในข้างต้น

เมื่อพิจารณาประเภทของกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะที่ตรวจพบในสถานีต่างๆ ร่วมกับการตรวจวัดคุณภาพน้ำใน รูปที่ 11 และแผนที่แหล่งกำเนิดมลพิษในแต่ละจังหวัด (รูปที่ 20) สามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า แม่น้ำท่าจีนที่รองรับน้ำจากจังหวัด นครปฐมมีปัญหาการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลจากฟาร์มปศุสัตว์ โดยปริมาณ บีโอดี ที่สูงและ ออกซิเจนละลายต่ำไม่ได้มาตรฐาน มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนมูลสุกรและน้ำเสียชุมชนเป็นหลัก อย่างไรก็ตามแม้การวิเคราะห์แหล่งกำเนิดมลพิษนั้น สามารถพิจารณาจากประเภทและระยะทางระหว่างแหล่งกำเนิดกับสถานีเก็บตัวอย่างน้ำ นอกจากนี้ควรคำนึงถึงทิศทางและอัตราการไหลของน้ำ เพื่อกำหนดการปนเปื้อนมลพิษจากต้นน้ำมาสู่สถานีปลายทาง และควรคำนึงถึงอัตราการย่อยสลาย (decay rate) ของกลุ่มแบคทีเรียที่อาจลดจำนวนลงในแหล่งน้ำก่อนได้รับการตรวจวัดอีกด้วย

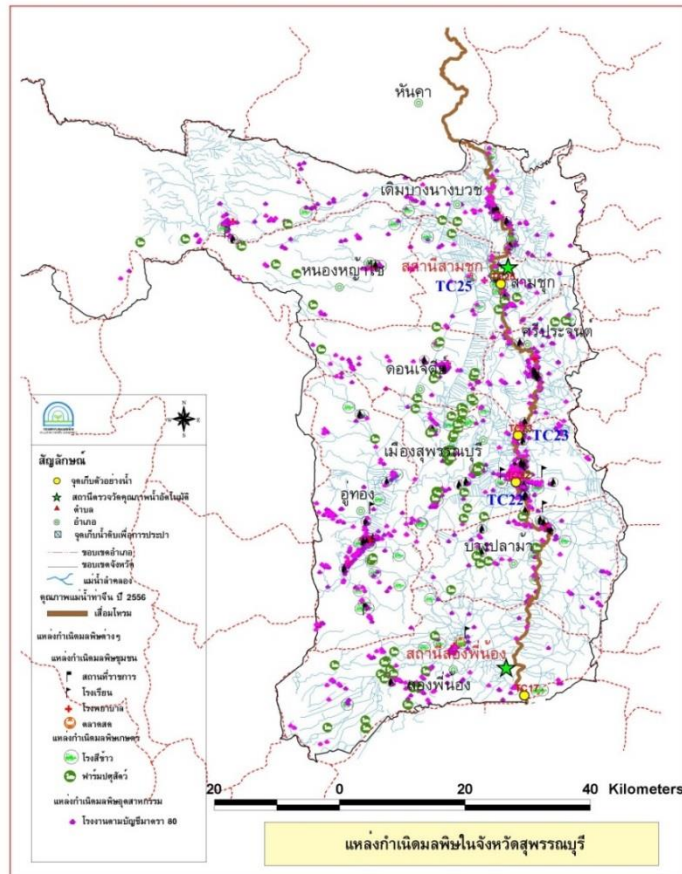


(a)

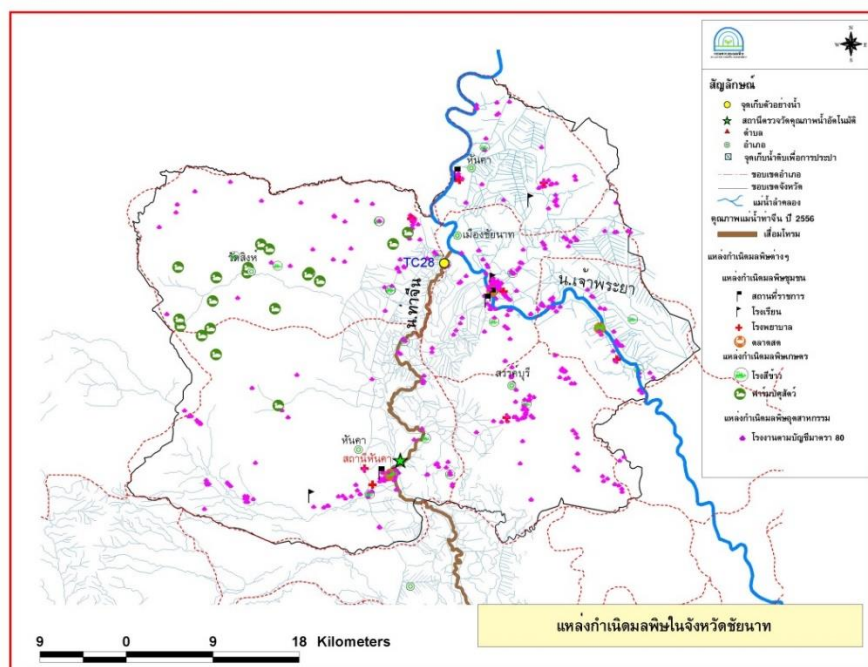


(b)

รูปที่ 20 แผนที่แสดงแหล่งกำเนิดมลพิษเทียบกับสถานีเก็บตัวอย่างน้ำ ในจังหวัดสมุทรสาคร (a), นครปฐม (b), สุพรรณบุรี (c), และชัยนาท (d) (กรมควบคุมมลพิษ 2558)



(C)



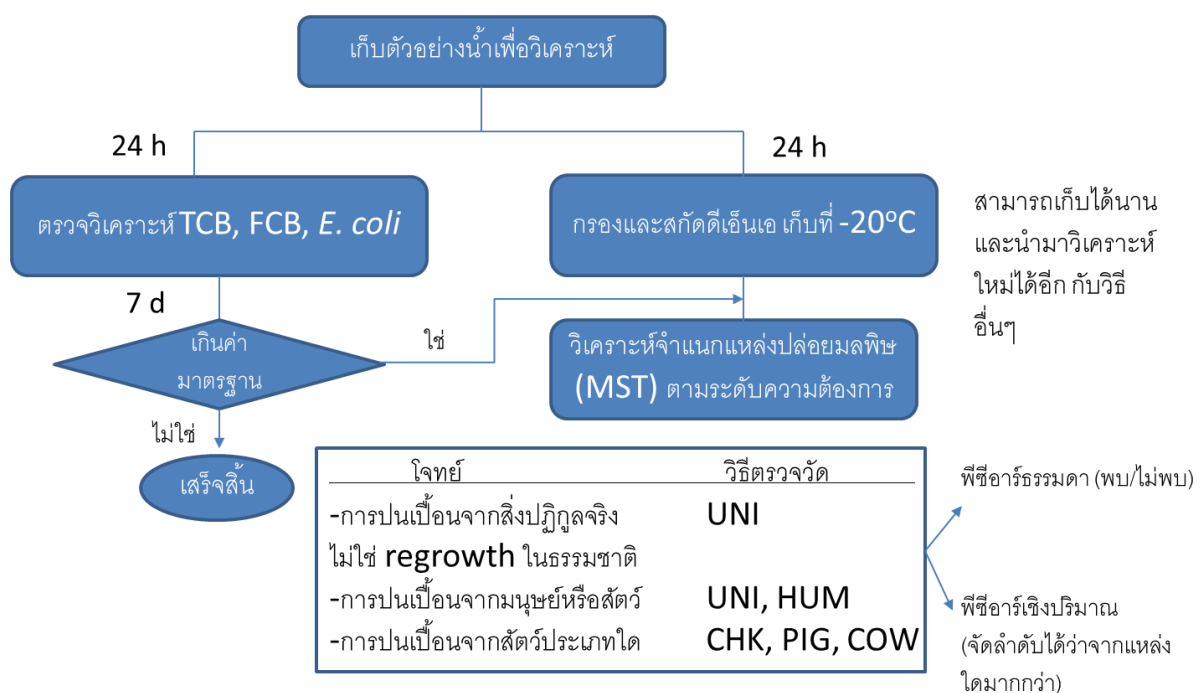
(d)

รูปที่ 20 (ต่อ) แผนที่แสดงแหล่งกำเนิดมลพิษเทียบกับสถานีเก็บตัวอย่างน้ำ ในจังหวัดสมุทรสาคร (a), นครปฐม (b), สุพรรณบุรี (c), และชัยนาท (d) (กรมควบคุมมลพิษ 2558)

3.7 บทวิเคราะห์และทางเลือกในการวิเคราะห์ที่นำเสนอแบบเป็นขั้นตอน (tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้นๆ

การวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่จำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษได้ ในหลายๆประเทศไม่ได้้นำการวิเคราะห์นี้มาแทนที่พารามิเตอร์แบคทีเรียตามมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดิน หากแต่นำมาวิเคราะห์ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำนั้นมีค่าพารามิเตอร์แบคทีเรียเกินค่ามาตรฐาน โดยการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่จำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษนี้ จะสามารถระบุแหล่งปล่อยมลพิษที่เป็นต้นเหตุของค่าแบคทีเรียเกินมาตรฐาน ทำให้ช่วยในการจัดการแหล่งกำเนิดเพื่อลดปริมาณแบคทีเรียปนเปื้อนในบริเวณนั้นๆได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์แบคทีเรียใช้เวลานานถึง 7 วัน จึงเสนอแนะให้ทำการกรองและสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างน้ำและเก็บที่ -20°C ไว้ก่อน หากได้ผลค่าพารามิเตอร์แบคทีเรียแล้วพบว่าเกินค่ามาตรฐาน จึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาทำการวิเคราะห์ต่อไปได้ ดังแสดงในรูปที่ 21 สำหรับการเลือกวิธีตรวจวัดด้วยวิธีพีซีอาร์หรือพีซีอาร์เชิงปริมาณนั้นขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการศึกษาว่าต้องการผลการศึกษาละเอียดในระดับใด งบประมาณที่ใช้ในการศึกษา รวมทั้งข้อได้เปรียบ และข้อจำกัดเชิงเทคนิคของแต่ละวิธีดังแสดงในหัวข้อ 3.4

ตัวอย่าง Tiered Approach และการแปลผล



19

รูปที่ 21 แผนผังแสดงการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์แบคทีเรียตามมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินและกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด

การคำนวณค่าใช้จ่ายสำหรับแต่ละขั้นตอนของการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด ดังแสดงในตารางที่ 23 (รายละเอียดต้นทุนแต่ละขั้นตอนดังแสดงในตารางที่ 20)

ตารางที่ 25 ค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องสำหรับการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดแบบเป็นขั้นตอน

ตัวอย่าง	ขั้นตอน	ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่าง
ตัวอย่างที่ค่าพารามิเตอร์แบคทีเรียไม่เกินค่ามาตรฐาน	สกัดดีเอ็นเอ	1,234 บาท
ตัวอย่างที่ค่าพารามิเตอร์แบคทีเรียเกินค่ามาตรฐาน	พีซีอาร์ รวมสกัดดีเอ็นเอ ตรวจ 4 แหล่งกำเนิด	3,313 บาท
	พีซีอาร์ รวมสกัดดีเอ็นเอ ตรวจ 1 แหล่งกำเนิด	1,754 บาท
	พีซีอาร์เชิงปริมาณ รวมสกัดดีเอ็นเอ ตรวจ 4 แหล่งกำเนิด	5,991 บาท
	พีซีอาร์เชิงปริมาณ รวมสกัดดีเอ็นเอ ตรวจ 1 แหล่งกำเนิด	3,138 บาท

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อให้ได้แนวทางการนำกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมมาสนับสนุนการตรวจวัดกลุ่มพารามิเตอร์แบคทีเรียในมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดิน โครงการวิจัยมีระยะเวลา 2 ปี ผลที่ได้จากโครงการจำแนกตามวัตถุประสงค์ย่อย ได้ดังต่อไปนี้

วัตถุประสงค์ที่ 1 เพื่อจัดทำรายงานสรุปสถานการณ์มลพิษทางน้ำและความจำเป็นของการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษของประเทศไทย

ผลการศึกษา

1. จากการวิเคราะห์ช่องว่างของกฎระเบียบข้อบังคับและมาตรฐานน้ำผิวดินในปัจจุบันของประเทศไทย พบว่าไม่มีพารามิเตอร์ใดในมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินที่เชื่อมโยงไปสู่แหล่งกำเนิดมลพิษเพียงแหล่งเดียว ทำให้มีข้อถกเถียงถึงสัดส่วนการปล่อยมลพิษที่แท้จริง และไม่สามารถระบุผู้ก่อมลพิษที่ชัดเจนได้
2. ความรุนแรงของปัญหาสะท้อนได้จากปัญหามลพิษในประเทศไทยที่เกิดจากสารอินทรีย์โดยมีสิ่งปฏิกลจากมูลมนุษย์และสัตว์ที่ตรวจวัดการปนเปื้อนได้ในรูปแบบที่เรียและสารประกอบไนโตรเจน
3. การแก้ไขปัญหามลพิษทางน้ำอย่างยั่งยืน ทำได้โดยการตรวจวัดพารามิเตอร์ที่มีความจำเพาะกับกิจกรรมโดยนำมาสนับสนุนดัชนีคุณภาพน้ำที่มีอยู่เดิมในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน เพื่อเสริมเป็นมาตรการเฉพาะพื้นที่เพื่อสืบหาแหล่งกำเนิดตามสัดส่วนการปล่อยมลพิษที่แท้จริง
4. การใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษมาสนับสนุนระดับนโยบายในการจัดการมลพิษแหล่งน้ำนั้น มีกรณีศึกษาที่ประสบความสำเร็จอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ เป็นต้น

วัตถุประสงค์ที่ 2 เพื่อพัฒนาวิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับตรวจวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถจำแนกสิ่งปฏิกลจากแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรม

ผลการศึกษา

1. จากการศึกษาพบว่าแหล่งกำเนิดมลพิษที่สำคัญในเขตลุ่มน้ำท่าจีนและลุ่มน้ำเจ้าพระยา ได้แก่ ชุมชน สุกร และโค และแหล่งกำเนิดรองลงมา ได้แก่ ฟาร์มปศุสัตว์แพะ แกะ กระบือ ไก่และเป็ด จึงทำการคำนวณจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสมทางสถิติและมีการกระจายตัวที่เหมาะสม ด้วยวิธี stratified random sampling design ด้วยค่าออกแบบ คือ 90% confidence interval และ 0.20 acceptable relative error เพื่อให้ได้ค่าความไวของวิธีทดสอบ ที่ไม่น้อยกว่า 0.80
2. จำนวนตัวอย่างในการทดสอบรวมทั้ง 100 ตัวอย่างจากพื้นที่บริเวณลุ่มน้ำท่าจีน และ 28 ตัวอย่างจากพื้นที่บริเวณลุ่มน้ำเจ้าพระยา โดยแต่ละตัวอย่างเป็นตัวแทนของกลุ่มประชากร กล่าวคือสิ่งปฏิกลจากมนุษย์เก็บจากน้ำเสียรวมของอาคารที่มีคนอาศัยอยู่มากกว่า 100 คน หรืออาคารโรงพยาบาลที่มีเตียงผู้ป่วยในมากกว่า 80 เตียง และมูลสัตว์ที่ผสมรวมจากมูลของสัตว์ตั้งแต่ 20 ตัวขึ้นไป
3. ไพโรเมอร์ที่คัดเลือกมาทำการทดสอบสามารถตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรีย Bacteroidales ได้ โดยแบ่งเป็นไพโรเมอร์ที่จำเพาะกับคน จำนวน 3 คู่ ไพโรเมอร์ที่จำเพาะกับสุกร จำนวน 2 คู่ ไพโรเมอร์ที่จำเพาะกับโค จำนวน

8 คู่ และไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด (สำหรับยืนยันการปนเปื้อนว่ามาจากสิ่งปนเปื้อนจริงโดยไม่ได้เกิดจากการมีอยู่ในธรรมชาติ) จำนวน 3 คู่ รวม 16 คู่

- จากการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์พบว่า ไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการจำแนกแหล่งปนเปื้อนสิ่งปนเปื้อนจากแหล่งกำเนิดรวม (ไม่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด) คน สุกร และโค ได้แก่ BacUniEP หรือ GenBac3EP, HF183/BFDrevEP, Pig-2-BacEP, และ Bac3 ตามลำดับ จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพ (performance) ของไพรเมอร์ทั้งสี่คู่นี้เปรียบเทียบระหว่างวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับตัวอย่างในลุ่มน้ำท่าจีน ดังแสดงในตาราง

ชนิด แหล่งกำเนิด	ความไว (%) Sensitivity		ความจำเพาะ (%) Specificity		ความถูกต้อง (%) Accuracy		อัตราการเกิดผลบวก Positive predictive value		อัตราการเกิดผลลบ Negative predictive		LOD (copies/reaction)	
	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR
แหล่งกำเนิดรวม (Universal)	100*	96*	NA	NA	100*	96*	100	100	NA	NA	30	20
น้ำเสียชุมชน	84*	100*	77	80	78	84	46	54	95*	100*	300	40
สุกร	100	100	98	96	98	97	91	87	100	100	3000	40
โค	85*	70*	100*	94*	97	89	100*	74*	96	93	300	30

โดยค่าความไว หมายถึง ความสามารถในการตรวจพบในทุกตัวอย่างที่มาจากแหล่งปนเปื้อนนั้นจริงโดยไม่แสดงผลลบลง ความจำเพาะ หมายถึง ความสามารถในการตรวจพบเฉพาะแหล่งกำเนิดที่ต้องการโดยไม่แสดงผลบวกลง อัตราการเกิดผลบวก หมายถึง ค่าความมั่นใจในความถูกต้องหากผลการตรวจเป็นบวกซึ่งนำไปใช้ในการแปลผลการตรวจตัวอย่างน้ำปนเปื้อนได้ อัตราการเกิดผลลบ หมายถึง ค่าความมั่นใจในความถูกต้องหากผลการตรวจเป็นลบซึ่งนำไปใช้ในการแปลผลการตรวจตัวอย่างน้ำปนเปื้อนได้ และ LOD (limit of detection) คือค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ด้วยวิธีดังกล่าว

- เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณพบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก (ดังแสดงในข้อ 4) แต่เมื่อคำนวณต้นทุนในการตรวจวัดด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณพบว่ามีค่าแตกต่างกัน โดยการตรวจวัดด้วยวิธีพีซีอาร์ มีต้นทุนประมาณ 1,800 และ 3,400 บาท หากตรวจวัดหนึ่งแหล่งกำเนิดและสี่แหล่งกำเนิด ตามลำดับ หากตรวจวัดด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ มีต้นทุน 3,200 และ 6,000 บาท สำหรับการตรวจวัดหนึ่งแหล่งกำเนิดและสี่แหล่งกำเนิด ตามลำดับ นอกจากนี้ ต้นทุนคงที่สำหรับเครื่องมือวิเคราะห์ของวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ มีมูลค่าประมาณ 710,000 และ 1,335,800 บาท ตามลำดับ ซึ่งวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณต้องมีค่าใช้จ่ายในการเตรียมกราฟมาตรฐานในครั้งแรกเป็นเงินประมาณ 32,000 บาท

วัตถุประสงค์ที่ 3 เพื่อตรวจติดตามคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีนในช่วงเวลา 1 ปี และบ่งชี้แหล่งกำเนิดกิจกรรมปนเปื้อน

ผลการศึกษา

- ทำการตรวจติดตามคุณภาพน้ำจากสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำของส่วนแหล่งน้ำจืด สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ จำนวน 12 สถานี ตั้งแต่ปากแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร ที่ลงสู่อ่าวไทยขึ้นไปถึงสะพานมะขามเต่าจังหวัดชัยนาท ต้นกำเนิดแม่น้ำท่าจีนที่แยกออกมาจากแม่น้ำเจ้าพระยา ครอบคลุมคุณภาพแหล่งน้ำประเภทที่ 4 (แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ (1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพ

น้ำเป็นพิษก่อน และ (2) การอุตสาหกรรม) ประเภทที่ 3 (แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ (1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน และ (2) การเกษตร) และประเภทที่ 2 (แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ (1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน (2) การอนุรักษ์สัตว์น้ำ (3) การประมง และ (4) การว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ) โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 4 ครั้ง ครอบคลุมฤดูฝน 2 ครั้ง และฤดูแล้ง 2 ครั้ง

2. จากการตรวจวัดพบค่าแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดเกินมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 2 ในตัวอย่างฤดูฝนครั้งที่หนึ่งที่สถานี TC25 (ข้างตลาดสามชุก จ.สุพรรณบุรี) และสถานี TC28 (สะพานมะขามเฒ่า จ. ชัยนาท) และค่าแบคทีเรียฟิคอลโคลิฟอร์ม เกินมาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่ 2 ในตัวอย่างฤดูฝนครั้งที่หนึ่งและสอง ที่สถานี TC25 และ TC28 อีกเช่นกัน ในขณะที่สถานี TC01-TC13 ซึ่งจัดอยู่ในแหล่งน้ำประเภทที่ 4 ไม่มีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานแต่ตรวจพบค่าโคลิฟอร์มที่สูงมาก นอกจากนี้ ภาพรวมของค่าออกซิเจนละลาย (DO) ต่ำกว่ามาตรฐานทุกสถานี โดยนับเป็นสัดส่วน 80 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างฤดูฝนรวมสองครั้ง และ 50 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างฤดูแล้งรวมสองครั้ง ภาพรวมค่าความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (BOD) สูงกว่ามาตรฐานทุกสถานี โดยนับเป็นสัดส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างฤดูฝนรวมสองครั้ง และ 80 เปอร์เซ็นต์ในตัวอย่างฤดูแล้งรวมสองครั้ง
3. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจากการปนเปื้อนสิ่งปฏิจุลที่ไม่จำเพาะกับแหล่งกำเนิด (แหล่งกำเนิดรวม; universal marker) พบการปนเปื้อนในทุกสถานีและทุกรอบการเก็บน้ำ (ฤดูฝนสองครั้ง ฤดูแล้งสองครั้ง) โดยผลตรงกันทั้งวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ ซึ่งแสดงถึงการปนเปื้อนสิ่งปฏิจุลตลอดสายของแม่น้ำท่าจีน เนื่องจากแม่น้ำท่าจีนไม่ได้มีต้นกำเนิดจากพื้นที่ต้นน้ำ แต่เป็นสาขาที่ต่อย่อยมาจากแม่น้ำเจ้าพระยาที่ตำบลมะขามเฒ่า จังหวัดชัยนาท ซึ่งเป็นบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาตอนบนที่ได้รับการประเมินให้มีคุณภาพน้ำระดับพอใช้ติดต่อกันมาอย่างต่อเนื่อง
4. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ ตรวจพบในทั้งฤดูฝนและฤดูแล้งที่สถานีต่อไปนี้ TC07 (ร.ร.บ้านปล่องเหล็ก อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร) TC09 (หน้าวัดเทียนดัด อ.สามพราน จ.นครปฐม) TC10 (วัดบางช้างเหนือ อ.สามพราน จ.นครปฐม) TC13 (หน้าที่ว่าการ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม) และ TC25 ในขณะที่ตรวจพบเฉพาะในฤดูฝนที่สถานี TC01 (ปากแม่น้ำท่าจีน จ.สมุทรสาคร) และตรวจพบเฉพาะในฤดูแล้งที่สถานี TC04 (วัดศิริมงคล อ.เมือง จ.สมุทรสาคร) และ TC22 (ท้ายเมืองสุพรรณบุรี อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี) ซึ่งทุกสถานีเป็นบริเวณใกล้ชุมชนทั้งสิ้น
5. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนด้วยวิธีพีซีอาร์ ตรวจพบที่จำนวนสถานีน้อยกว่าเมื่อใช้วิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ ซึ่งสอดคล้องกับค่าขีดจำกัดการวัดของวิธีพีซีอาร์ที่สูงกว่า ซึ่งหมายความว่าวิธีพีซีอาร์จะไม่สามารถตรวจหากกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับน้ำเสียชุมชนได้หากมีระดับการปนเปื้อนที่น้อยเกินไป ในส่วนของค่าที่ตรวจวัดได้ทั้งสองวิธี หากผลเป็นบวกจะมีความมั่นใจได้ 42-54 เปอร์เซ็นต์ว่ามีการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนจริง ในขณะที่หากผลเป็นลบจะมั่นใจได้ 95-100 เปอร์เซ็นต์ว่าผลเป็นลบจริง
6. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับมูลสุกรด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ ตรวจพบในทั้งฤดูฝนและฤดูแล้งที่สถานี TC07, TC09, TC10, และ TC13 ในขณะที่การตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์พบในฤดูฝนที่สถานี TC07, TC09

และ TC13 และในฤดูแล้งที่สถานี TC07, TC09 และ TC10 โดยจุดปนเปื้อนที่สุดคือ TC07 ซึ่งเป็นขอบของ จังหวัดสมุทรสาครที่ติดกับ จ.นครปฐม ซึ่งมีแนวโน้มการได้รับมลพิษที่พัฒนามาจากเหื่อน้ำในเขต จ. นครปฐม ในส่วนของค่าที่ตรวจวัดได้ทั้งสองวิธี หากผลเป็นบวกจะมีความมั่นใจได้ 87-100 เปอร์เซนต์ว่ามีการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนจริง ในขณะที่หากผลเป็นลบจะมั่นใจได้ 100 เปอร์เซนต์ว่าผลเป็นลบจริง

7. ผลการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะกับมูลโค ตรวจพบในฤดูฝนเท่านั้น โดยพบที่สถานี TC07 TC09 TC10 TC13 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ และที่สถานี TC07 TC09 TC10 เมื่อทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ ในส่วนของค่าที่ตรวจวัดได้ทั้งสองวิธี หากผลเป็นบวกจะมีความมั่นใจได้ 74-100 เปอร์เซนต์ว่ามีการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนจริง ในขณะที่หากผลเป็นลบจะมั่นใจได้ 93-96 เปอร์เซนต์ว่าผลเป็นลบจริง
8. สรุปค่าพารามิเตอร์ทางชีวภาพ ซึ่งได้แก่ *E. coli*, Total coliforms, Enterococcus, Fecal coliforms รวมทั้งกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2 ฤดู ($P>0.05$) ยกเว้นกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะต่อสิ่งปฏิกูลจากโคซึ่งพบเฉพาะในฤดูฝน จึงทำให้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฤดูแล้ง ($P<0.05$) ซึ่งบ่งชี้ความเป็นไปได้ว่ามลพิษมูลโคอาจถูกพัฒมากับน้ำท่าในช่วงฤดูฝน
9. สรุปผลรายสถานี พบว่าค่าแบคทีเรียโคลิฟอร์มทั้งหมดและฟิคอลโคลิฟอร์มที่สูง น่าจะมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนทั้งจากมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนในบริเวณสถานี TC07 TC09 TC10 และ TC13 ในขณะที่สถานี TC01 และ TC04 ไม่พบการปนเปื้อนจากมูลสัตว์ แต่พบการปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชนซึ่งอาจเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ค่า coliforms สูง สำหรับสถานี TC25 ค่า fecal coliforms ที่เกินมาตรฐานได้รับอิทธิพลมากจากการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชนบริเวณตลาดสามชุกในปริมาณที่สูง อย่างไรก็ตามที่สถานี TC22 และ TC28 ไม่พบการปนเปื้อนจากชุมชน โค หรือสุกร อาจเป็นไปได้ว่าค่า fecal coliforms ที่เกินมาตรฐานมีการปนเปื้อนน้ำเสียและสิ่งปฏิกูลจากแหล่งกำเนิดอื่นๆได้
10. แนวทางในการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่บ่งชี้แหล่งกำเนิด สามารถทำได้ด้วยแนวทางเลือกแบบเป็นขั้นตอน (Tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่ โดยทำการกรองตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอเก็บไว้ที่ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียสก่อน จากนั้นรอผลการวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มมาตรฐาน (วิธี MPN ใช้เวลา 4-7 วัน วิธีกรองด้วยเมมเบรนใช้เวลา 1-2 วัน) หากตัวอย่างน้ำพบค่าแบคทีเรียเกินมาตรฐานจึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรวจวิเคราะห์แหล่งกำเนิดได้ โดยใช้ไพรเมอร์แหล่งกำเนิดรวม (Universal) เมื่อต้องการตรวจยืนยันการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลจริง หรือไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแหล่งกำเนิดต่างๆ แล้วแต่พื้นที่บริเวณที่ศึกษา นอกจากนี้ หากต้องการตรวจวัดการปนเปื้อนในระดับสูงเท่านั้น ก็สามารถใช่วิธีพีซีอาร์ที่มีต้นทุนและค่าใช้จ่ายถูกกว่าได้ สำหรับตัวอย่างที่ไม่ได้รับการตรวจต่อจะมีค่าใช้จ่ายในการกรองและสกัดดีเอ็นเออยู่ที่ 1,300 บาทต่อตัวอย่าง

วัตถุประสงค์ที่ 4 เพื่อจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำผิวดิน และจัดทำข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย (Policy brief)

ผลการศึกษา

1. คู่มือปฏิบัติการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำผิวดิน ประกอบด้วย
 - a. มาตรฐานการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (Standard Operating Procedures)
 - b. ขั้นตอนทางเลือกในการตรวจวัด (tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้นๆ
 - c. กรณีศึกษาการตรวจติดตามคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีนด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิด
2. ข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย (Policy brief)

โดยสรุปแล้ว โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการที่นำความรู้ในทางวิทยาศาสตร์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมาบูรณาการกับการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อกำหนดแนวทางการผลักดันไปสู่การใช้ประโยชน์เชิงนโยบาย นอกจากนี้ นอกเหนือจากประโยชน์ด้านการจำแนกแหล่งปล่อยมลพิษแล้ว การทราบแหล่งกำเนิดมลพิษสามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบการคำนวณความเสี่ยงต่อสุขภาพได้ด้วย เนื่องจากสิ่งปฏิภูลหรือมลสัตว์ที่ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำมีโอกาสที่จะนำพาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลงสู่แหล่งน้ำนั้นๆด้วย โดยโอกาสการปนเปื้อนชนิดและปริมาณของเชื้อก่อโรคก็แตกต่างกันไปขึ้นกับประเภทแหล่งกำเนิด ดังนั้น จึงเป็นการเน้นย้ำความสำคัญและความจำเป็นอย่างเร่งด่วนของการตรวจติดตามคุณภาพน้ำด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่จำเพาะต่อแหล่งกำเนิด เพื่อนำมาแก้ไขปัญหามลพิษของประเทศไทยอย่างมีประสิทธิภาพได้

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ, 2537. ประกาศกรมควบคุมมลพิษ เรื่องกำหนดประเภทของแหล่งน้ำในแม่น้ำท่าจีน ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนที่ 62 ง ลงวันที่ 4 สิงหาคม 2537
- กรมควบคุมมลพิษ, 2558. (ร่าง) แผนปฏิบัติการป้องกัน แก้ไขและฟื้นฟูคุณภาพน้ำ พื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน พ.ศ. ๒๕๕๘ – ๒๕๖๔. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- กรมปศุสัตว์, 2559. ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ระดับจังหวัด <http://ict.dld.go.th/th2/index.php/th/report/447-report-thailand-livestock/reportservey2558-1/869-report-survey58> Access date 10 มิถุนายน 2559 ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2552. ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และมาตรการในทางวิชาการสำหรับการป้องกัน ด้านสาธารณสุขและการป้องกันในเรื่องสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ พ.ศ. 2551. ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 85 ง ลงวันที่ 21 พฤษภาคม 2552
- สถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร (องค์การมหาชน), 2555. การดำเนินการด้านการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล โครงการพัฒนาระบบคลังข้อมูล 25 ลุ่มน้ำ และแบบจำลองน้ำท่วมน้ำแล้ง ลุ่มน้ำท่าจีน จัดทำโดย บริษัท แอสดีคอน คอร์ปอเรชั่น จำกัด กุมภาพันธ 2555
- สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2559. ระบบสถิติทางการทะเบียน http://stat.dopa.go.th/stat/statnew/upstat_age.php Access date 15 มิถุนายน 2559
- Ahmed, W., Stewart, J., Powell, D., Gardner, T., 2008. Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution. Lett. Appl. Microbiol. 46, 237–242. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02287.x
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Powell, D., Gardner, T., 2009. Evaluation of multiple sewage-associated *Bacteroides* PCR markers for sewage pollution tracking. Water Res. 43, 4872–4877. doi:10.1016/j.watres.2009.08.042
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2017. Standard methods for the examination of water & wastewater. Online Edition. Access Date 16 January 2017
- Ballesté, E., Bonjoch, X., Belanche, L.A., Blanch, A.R., 2010. Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1789–1795. doi:10.1128/AEM.02350-09
- Bambic, D.G., Kildare-Hann, B.J., Rajal, V.B., Sturm, B.S.M., Minton, C.B., Schriewer, A., Wuertz, S., 2015. Spatial and hydrologic variation of *Bacteroidales*, adenovirus and enterovirus in a semi-arid, wastewater effluent-impacted watershed. Water Res. 75, 83–94. doi:10.1016/j.watres.2015.02.023
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000a. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4571–4574. doi:10.1128/AEM.66.10.4571-4574.2000
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000b. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1587–1594. doi:10.1128/AEM.66.4.1587-1594.2000.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J.F., Kubista, M., Mueller, R.D., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797

- Cao, Y., Griffith, J.F., Dorevitch, S., Weisberg, S.B., 2012. Effectiveness of qPCR permutations, internal controls and dilution as means for minimizing the impact of inhibition while measuring *Enterococcus* in environmental waters. *J. Appl. Microbiol.* 113, 66–75. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05305.x
- Carratalà, A., Rusinol, M., Hundesa, A., Biarnes, M., Rodríguez-Manzano, J., Vantarakis, A., Kern, A., Suñen, E., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2012. A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7496–7499. doi:10.1128/AEM.01283-12
- Carson, C.A., Christiansen, J.M., Benson, V.W., Baffaut, C., Jerri, V., Broz, R.R., Kurtz, W.B., Rogers, W.M., Fales, W.H., Yampara-iquise, H., Davis, J. V., 2005. Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4945–4949. doi:10.1128/AEM.71.8.4945
- Chandelier, A., Ivors, K., Garbelotto, M., Zini, J., Laurent, F., Cavelier, M., 2006. Validation of a real-time PCR method for the detection of *Phytophthora ramorum*. *EPPO Bull.* 36, 409–414. doi:10.1111/j.1365-2338.2006.01020.x
- Chase, E., Hunting, J., Staley, C., Harwood, V.J., 2012. Microbial source tracking to identify human and ruminant sources of faecal pollution in an ephemeral Florida river. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1396–1406. doi:10.1111/jam.12007
- Converse, R. R., Blackwood, A. D., Kirs, M., Griffith, J. F., & Noble, R. T. 2009. Rapid QPCR-based assay for fecal *Bacteroides* spp. as a tool for assessing fecal contamination in recreational waters. *Water Res.* 43(19), 4828–4837. Doi:10.1016/j.watres.2009.06.036
- Dick, L. K., Bernhard, A. E., Brodeur, T. J., Santo Domingo, J. W., Simpson, J. M., Walters, S. P., & Field, K. G. (2005). Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(6), 3184–91. Doi:10.1128/AEM.71.6.3184-3191.2005
- Francy, D.S., Bushon, R.N., Cicale, J.R., Brady, A.M.G., Kephart, C.M., Stelzer, E.A., Ecker, C.D., 2017. Appendix D8. Limits of blank, detection, and quantification for qPCR and qRT-PCR analyses, in: *Quality Assurance/Quality Control Manual: Ohio Water Microbiology Laboratory*.
- Fremaux, B., Gritzfeld, J., Boa, T., Yost, C.K., 2009. Evaluation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed. *Water Res.* 43, 4838–4849. doi:10.1016/j.watres.2009.06.045
- Gawler, A.H., Beecher, J.E., Brandão, J., Carroll, N.M., Falcão, L., Gourmelon, M., Masterson, B., Nunes, B., Porter, J., Rincé, A., Rodrigues, R., Thorp, M., Walters, J.M., Meijer, W.G., 2007. Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Res.* 41, 3780–3784. doi:10.1016/j.watres.2007.01.028
- Gómez-Doñate, M., Casanovas-Massana, A., Muniesa, M., Blanch, A.R., 2015. Development of new host-specific *Bacteroides* qPCRs for the identification of fecal contamination sources in water. *Microbiology Open* 5, 83–94. doi:10.1002/mbo3.313
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Ségura, R., Le Mennec, C., Lozach, S., Piriou, J.Y., Rincé, A., 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4857–4866. doi:10.1128/AEM.03003-06
- Harwood, V.J., Boehm, A.B., Sassoubre, L.M., Vijayavel, K., Stewart, J.R., Fong, T.T., Caprais, M.P., Converse, R.R., Diston, D., Ebdon, J., Fuhrman, J. a., Gourmelon, M., Gentry-Shields, J., Griffith, J.F., Kashian, D.R., Noble, R.T., Taylor, H., Wicki, M., 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source

- determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water Res.* 47, 6929–6943. doi:10.1016/j.watres.2013.04.064
- Haugland, R.A., Varma, M., Sivaganesan, M., Kelty, C., Peed, L., Shanks, O.C., 2010. Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected *Bacteroidales* species and human fecal waste by qPCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 348–357. doi:10.1016/j.syapm.2010.06.001
- Hussein, K.R., Waines, P.L., Nisr, R.B., Glegg, G., Bradley, G., 2014. Development and use of *Bacteroides* 16S rRNA polymerase chain reaction assay for source tracking dog faecal pollution in bathing waters. *Hydrol. Curr. Res.* 5, 1–8. doi:10.4172/2157-7587.1000163
- Jenkins, M.W., Tiwari, S., Lorente, M., Gichaba, C.M., Wuertz, S., 2009. Identifying human and livestock sources of fecal contamination in Kenya with host-specific *Bacteroidales* assays. *Water Res.* 43, 4956–4966. doi:10.1016/j.watres.2009.07.028
- Kildare, B.J., Leutenegger, C.M., McSwain, B.S., Bambic, D.G., Rajal, V.B., Wuertz, S., 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: A Bayesian approach. *Water Res.* 41, 3701–3715. doi:10.1016/j.watres.2007.06.037
- Kobayashi, A., Sano, D., Hatori, J., Ishii, S., Okabe, S., 2013. Chicken- and duck-associated *Bacteroides*–*Prevotella* genetic markers for detecting fecal contamination in environmental water. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, 7427–7437. doi: 10.1007/s00253-012-4469-2.
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R., Sayler, G., 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene taqman-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4214–4224. doi:10.1128/AEM.01036-05
- Layton, B.A., Cao, Y., Ebentier, D.L., Hanley, K., Ballesté, E., Brandão, J., Byappanahalli, M., Converse, R., Farnleitner, A.H., Gentry-Shields, J., Gidley, M.L., Gourmelon, M., Lee, C.S., Lee, J., Lozach, S., Madi, T., Meijer, W.G., Noble, R., Peed, L., Reischer, G.H., Rodrigues, R., Rose, J.B., Schriewer, A., Sinigalliano, C., Srinivasan, S., Stewart, J., Van De Werfhorst, L.C., Wang, D., Whitman, R., Wuertz, S., Jay, J., Holden, P.A., Boehm, A.B., Shanks, O., Griffith, J.F., 2013. Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Res.* 47, 6897–6908. doi:10.1016/j.watres.2013.05.060
- Lee, D.Y., Weir, S.C., Lee, H., Trevors, J.T., 2010. Quantitative identification of fecal water pollution sources by TaqMan real-time PCR assays using *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 1373–1383. doi:10.1007/s00253-010-2880-0
- Lu, J., Santo Domingo, J.W., Lamendella, R., Edge, T., Hill, S., 2008. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3969–3976. doi:10.1128/AEM.00019-08
- Mieszkin, S., Furet, J.P., Corthier, G., Gourmelon, M., 2009. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two Pig-Specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3045–3054. doi:10.1128/AEM.02343-08
- Nshimiyimana, J.P., Ekklesia, E., Shanahan, P., Chua, L.H.C., Thompson, J.R., 2014. Distribution and abundance of human-specific *Bacteroides* and relation to traditional indicators in an urban tropical catchment. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1369–1383. doi:10.1111/jam.12455
- Odagiri, M., Schriewer, A., Hanley, K., Wuertz, S., Misra, P.R., Panigrahi, P., Jenkins, M.W., 2015. Validation of *Bacteroidales* quantitative PCR assays targeting human and animal fecal contamination in the

- public and domestic domains in India. *Sci. Total Environ.* 502, 462–470. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.09.040
- Ohad, S., Ben-Dor, S., Prilusky, J., Kravitz, V., Dassa, B., Chalifa-Caspi, V., Kashi, Y., Rorman, E., 2016. The development of a novel qPCR assay-set for identifying fecal contamination originating from domestic fowls and waterfowl in Israel. *Front. Microbiol.* 7, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2016.00145
- Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O., Ito, T., 2007. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 890–901. doi:10.1007/s00253-006-0714-x
- Pourcher, A.M., Jardé, E., Caprais, M.P., Jaffrezic, A., Marti, R., Mieszkin, S., Solecki, O., Derrien, M., Gourmelon, M., 2010. Identification of livestock faecal contamination in surface waters using chemical and microbiological tools. 14th RAMIRAN International Conference, Sep 2010, Lisbon, Portugal, 4p.
- Raith, M.R., Kelty, C.A., Griffith, J.F., Schriewer, A., Wuertz, S., Mieszkin, S., Gourmelon, M., Reischer, G.H., Farnleitner, A.H., Ervin, J.S., Holden, P.A., Ebentier, D.L., Jay, J.A., Wang, D., Boehm, A.B., Aw, T.G., Rose, J.B., Balleste, E., Meijer, W.G., Sivaganesan, M., Shanks, O.C., 2013. Comparison of PCR and quantitative real-time PCR methods for the characterization of ruminant and cattle fecal pollution sources. *Water Res.* 47, 6921–6928. doi:10.1016/j.watres.2013.03.061
- Reischer, G.H., Kasper, D.C., Steinborn, R., Mach, R.L., Farnleitner, A.H., 2006. Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5610–5614. doi:10.1128/AEM.00364-06
- Sauer, E.P., VandeWalle, J.L., Bootsma, M.J., McLellan, S.L., 2011. Detection of the human specific *Bacteroides* genetic marker provides evidence of widespread sewage contamination of stormwater in the urban environment. *Water Res.* 45, 4081–4091. doi:10.1016/j.watres.2011.04.049
- Schriewer, A., Miller, W.A., Byrne, B.A., Miller, M.A., Oates, S., Conrad, P.A., Hardin, D., Yang, H.H., Chouicha, N., Melli, A., Jessup, D., Dominik, C., Wuertz, S., 2010. Presence of *Bacteroidales* as a predictor of pathogens in surface waters of the central California coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5802–5814. doi:10.1128/AEM.00635-10
- Shanks, O.C., Santo Domingo, J.W., Lamendella, R., Kelty, C.A., Graham, J.E., 2006. Competitive metagenomic DNA hybridization identifies host-specific microbial genetic markers in cow fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4054–4060. doi:10.1128/AEM.00023-06
- Shanks, O.C., Atikovic, E., Blackwood, A.D., Lu, J., Noble, R.T., Domingo, J.S., Seifring, S., Sivaganesan, M., Haugland, R.A., 2008. Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 745–752. doi:10.1128/AEM.01843-07
- Shanks, O.C., White, K., Kelty, C.A., Hayes, S., Sivaganesan, M., Jenkins, M., Varma, M., Haugland, R.A., 2010. Performance assessment PCR-based assays targeting *Bacteroidales* genetic markers of bovine fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1359–1366. doi:10.1128/AEM.02033-09
- Siefring, S., Varma, M., Atikovic, E., Wymer, L., Haugland, R.A., 2008. Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *J. Water Health* 6, 225–237. doi:10.2166/wh.2008.022
- Silkie, S.S., Nelson, K.L., 2009. Concentrations of host-specific and generic fecal markers measured by quantitative PCR in raw sewage and fresh animal feces. *Water Res.* 43, 4860–4871. doi:10.1016/j.watres.2009.08.017
- Sinigalliano, C.D., Ervin, J.S., Van De Werfhorst, L.C., Badgley, B.D., Ballesté, E., Bartkowiak, J., Boehm, A.B., Byappanahalli, M., Goodwin, K.D., Gourmelon, M., Griffith, J., Holden, P.A., Jay, J., Layton, B., Lee, C.,

- Lee, J., Meijer, W.G., Noble, R., Raith, M., Ryu, H., Sadowsky, M.J., Schriewer, A., Wang, D., Wanless, D., Whitman, R., Wuertz, S., Santo Domingo, J.W., 2013. Multi-laboratory evaluations of the performance of *Catellibacterium marimammalium* PCR assays developed to target gull fecal sources. *Water Res.* 47, 6883–6896. doi:10.1016/j.watres.2013.02.059
- Sivaganesan, M., Haugland, R.A., Chern, E.C., Shanks, O.C., 2010. Improved strategies and optimization of calibration models for real-time PCR absolute quantification. *Water Res.* 44, 4726–4735. doi:10.1016/j.watres.2010.07.066
- Staley, C., Gordon, K. V., Schoen, M.E., Harwood, V.J., 2012. Performance of two quantitative PCR methods for microbial source tracking of human sewage and implications for microbial risk assessment in recreational waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7317–7326. DOI: 10.1128/AEM.01430-12
- Toledo-Hernandez, C., Ryu, H., Gonzalez-Nieves, J., Huertas, E., Toranzos, G.A., Santo Domingo, J.W., 2013. Tracking the primary sources of fecal pollution in a tropical watershed in a one-year study. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1689–1696. doi:10.1128/AEM.03070-12
- Wangkahad, B., Bosup, S., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K., 2015. Occurrence of bacteriophages infecting *Aeromonas*, *Enterobacter*, and *Klebsiella* in water and association with contamination sources in Thailand. *J. Water Health* 13, 613–624. doi:10.2166/hydro.2013.124
- Wangkahad, B., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K., 2017. Integrated multivariate analysis with nondetects for the development of human sewage source-tracking tools using bacteriophages of *Enterococcus faecalis*. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2235–2245. doi:10.1021/acs.est.6b04714
- Weidhaas, J.L., Macbeth, T.W., Olsen, R.L., Sadowsky, M.J., Norat, D., Harwood, V.J., 2010. Identification of a *Brevibacterium* marker gene specific to poultry litter and development of a quantitative PCR assay. *J. Appl. Microbiol.* 109, 334–347. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04666.x

ภาคผนวก ก. รายงานสรุปสถานการณ์มลพิษทางน้ำและความจำเป็นของการจำแนก
แหล่งกำเนิดมลพิษของประเทศไทย

วัตถุประสงค์ย่อยที่ 1 เพื่อจัดทำรายงานประเมินสถานการณ์มลพิษปัจจุบันในแหล่งน้ำและศึกษาวิเคราะห์ความจำเป็นในการ
จำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรม

สถานการณ์มลพิษทางน้ำของประเทศไทยในปัจจุบันที่ตรวจสอบโดยกรมควบคุมมลพิษ (2558) พบว่าแม่น้ำที่จัดอยู่ใน
เกณฑ์เสื่อมโทรม เรียงลำดับจากเสื่อมโทรมที่สุด ได้แก่ แม่น้ำท่าจีนตอนล่าง เจ้าพระยาตอนล่าง ระยองตอนล่าง และลำตะคองตอนล่าง
โดยปัญหาคุณภาพน้ำที่สำคัญของประเทศ ได้แก่ ปริมาณสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำในปริมาณที่สูง ส่งผลให้ค่า บีโอดีหรือปริมาณ
ความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ในแหล่งน้ำมีค่าสูงในหลายพื้นที่ รวมถึงมีปริมาณสารประกอบไนโตรเจนและปริมาณแบคทีเรียสูงในบางพื้นที่
ส่งผลให้พบสถานการณ์ที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่ต่ำร่วมด้วย นอกจากนี้ยังพบปัญหาเฉพาะพื้นที่ ได้แก่ การปนเปื้อนของโลหะหนัก
ที่สูงเกินค่าธรรมชาติ และการปนเปื้อนของสารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์จากการทำการเกษตร

เมื่อสืบค้นถึงแนวโน้มของสถานการณ์มลพิษทางน้ำในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา พบว่า แม่น้ำสายหลักของประเทศที่มีคุณภาพน้ำเสื่อมโทรมลง
และจัดอยู่ในเกณฑ์ที่เสื่อมโทรมมาอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ แม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำท่าจีน ซึ่งแม่น้ำท่าจีนได้เคยถูกจัดอันดับเป็นแม่น้ำที่
สกปรกที่สุดของประเทศ ในช่วงปี 2543 – 2545 โดยเฉพาะแม่น้ำท่าจีนตอนล่าง ตั้งแต่กิโลเมตรที่ 82 ปากคลองเจ็ดชัยบูชา อำเภอนครชัยศรี
จังหวัดนครปฐม ซึ่งรองรับน้ำทั้งจากชุมชนและฟาร์มสุกร จนถึงปากแม่น้ำ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร มีความสกปรกสะสมสูงและ
ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และบางจุดต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิจารณ์ สิมานายา 2546)

เมื่อประเมินปริมาณความสกปรกในรูปบีโอดี (BOD Loading) ที่ระบายออกสู่สิ่งแวดล้อมในลุ่มน้ำท่าจีน จาก 4 จังหวัดหลักที่อยู่
ในพื้นที่ลุ่มน้ำ ได้แก่ ชัยนาท สุพรรณบุรี นครปฐม และสมุทรสาคร พบว่า มีการระบายปริมาณความสกปรกรวมประมาณ 89 ตันบีโอดีต่อ
วัน โดยมีแหล่งกำเนิดน้ำเสียสำคัญที่ทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมมากที่สุด ได้แก่ อุตสาหกรรม ร้อยละ 58 ชุมชน ร้อยละ 26 และ
เกษตรกรรม (การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ฟาร์มสุกร และนาข้าว) ร้อยละ 16 และจัดหวั่นนครปฐมและสมุทรสาครมีปริมาณความสกปรกในรูปบีโอดี
ที่ระบายออกสู่สิ่งแวดล้อมมากที่สุดใกล้เคียงกัน ประมาณ 34 ตันบีโอดีต่อวัน (ร้อยละ 40) และ 33 ตันบีโอดีต่อวัน (ร้อยละ 38)
ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับศักยภาพการรองรับมลพิษที่ประเมินจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์นั้น แม่น้ำท่าจีนมีความสามารถในการ
รองรับความสกปรกประมาณ 60 ตันบีโอดีต่อวัน แม่น้ำท่าจีนจึงอยู่ในสภาวะที่รองรับของเสียที่เกินศักยภาพการฟอกตัวโดยธรรมชาติมา
ตลอด และส่งผลให้คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมลง (สำนักจัดการคุณภาพน้ำ 2558)

มาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินออกตามความในพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535
มาตรา 32 บัญญัติให้คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติกำหนดมาตรฐานคุณภาพสิ่งแวดล้อมเพื่อเป็นเป้าหมายในการรักษา
คุณภาพสิ่งแวดล้อมให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม ในฉบับที่ได้ประกาศใช้ครั้งแรกใช้ชื่อว่า "มาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินซึ่งมีใช้
ทะเล" ต่อมาในฉบับปัจจุบันปี พ.ศ. 2537 เปลี่ยนเป็น "มาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน" ตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อม
แห่งชาติ ฉบับที่ 8 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 111 ตอนที่ 16ง ลง วันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2537

มาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน ได้กำหนดแหล่งน้ำผิวดินตามลักษณะการใช้ประโยชน์ ออกเป็น 5 ประเภท ดังนี้

แหล่งน้ำประเภทที่ 1 ได้แก่ แหล่งน้ำที่คุณภาพน้ำมีสภาพตามธรรมชาติ โดยปราศจากน้ำทิ้งจากกิจกรรมทุกประเภทและสามารถ
เป็นประโยชน์เพื่อ

(ก) การอุปโภคและบริโภคโดยตรงผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติก่อน

(ข) การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตระดับพื้นฐาน

(ค) การอนุรักษ์ระบบนิเวศน์ของแหล่งน้ำ

แหล่งน้ำประเภทที่ 2 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

(ก) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน

(ข) การอนุรักษ์สัตว์น้ำ

(ค) การประมง

(ง) การว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ

แหล่งน้ำประเภทที่ 3 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

(ก) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติก่อนและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน

(ข) การเกษตร

แหล่งน้ำประเภทที่ 4 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

(ก) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำเป็นพิเศษก่อน

(ข) การอุตสาหกรรม

แหล่งน้ำประเภทที่ 5 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทั้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อการคมนาคมและได้กำหนดดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำไว้รวมทั้งสิ้น 28 ดัชนี ตามประเภทแหล่งน้ำ ดังตารางที่ ก1

ตารางที่ ก1 ดัชนีคุณภาพน้ำที่กำหนดในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน

ดัชนีคุณภาพน้ำ ^{1/}	หน่วย	ค่าทางสถิติ	เกณฑ์กำหนดสูงสุด ^{2/} ตามการแบ่งประเภทคุณภาพน้ำตามการใช้ประโยชน์				
			ประเภท 1	ประเภท 2	ประเภท 3	ประเภท 4	ประเภท 5
1.สี กลิ่นและรส (Colour, Odour and Taste)	-	-	ธ	ธ'	ธ'	ธ'	-
2.อุณหภูมิ (Temperature)	องศาเซลเซียส	-	ธ	ธ'	ธ'	ธ'	-
3.ความเป็นกรดและด่าง (pH)	-	-	ธ	5-9	5-9	5-9	-
4.ออกซิเจนละลาย (DO) ^{2/}	มก./ล.	P20	ธ	6.0	4.0	2.0	-
5.บีโอดี (BOD)	มก./ล.	P80	ธ	1.5	2.0	4.0	-

ตารางที่ ก1 ดัชนีคุณภาพน้ำที่กำหนดในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน (ต่อ)

ดัชนีคุณภาพน้ำ ^{1/}	หน่วย	ค่าทางสถิติ	เกณฑ์กำหนดสูงสุด ^{2/} ตามการแบ่งประเภทคุณภาพน้ำตามการใช้ประโยชน์				
			ประเภท1	ประเภท2	ประเภท3	ประเภท4	ประเภท5
6.แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total Coliform Bacteria)	เอ็มพีเอ็น/ 100 มล.	P80	๐	5,000	20,000	-	-
7.แบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria)	เอ็มพีเอ็น/ 100 มล.	P80	๐	1,000	4,000	-	-
8.ไนเตรต (NO ₃) ในหน่วยไนโตรเจน	มก./ล.	-	๐	5.0			-
9.แอมโมเนีย (NH ₃) ในหน่วยไนโตรเจน	มก./ล.	-	๐	0.5			-
10.ฟีนอล (Phenols)	มก./ล.	-	๐	0.005			-
11.ทองแดง (Cu)	มก./ล.	-	๐	0.1			-
12.นิกเกิล (Ni)	มก./ล.	-	๐	0.1			-
13.แมงกานีส (Mn)	มก./ล.	-	๐	1.0			-
14.สังกะสี (Zn)	มก./ล.	-	๐	1.0			-
15.แคดเมียม (Cd)	มก./ล.	-	๐	0.005* 0.05**			-
16.โครเมียมชนิดเฮกซะวาเลนต์ (Cr Hexavalent)	มก./ล.	-	๐	0.05			-

ตารางที่ ก1 ดัชนีคุณภาพน้ำที่กำหนดในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน (ต่อ)

ดัชนีคุณภาพน้ำ ^{1/}	หน่วย	ค่าทาง	เกณฑ์กำหนดสูงสุด ^{2/} ตามการแบ่งประเภทคุณภาพน้ำตามการใช้ประโยชน์
------------------------------	-------	--------	---

		สถิติ	ประเภท 1	ประเภท 2	ประเภท 3	ประเภท4	ประเภท5
17.ตะกั่ว (Pb)	มก./ล.	-	ธ	0.05	17.ตะกั่ว (Pb)	มก./ล.	-
23.ดีดีที (DDT)	ไมโครกรัม/ ล.	-	ธ	1.0			-
24.บีเอชซีชนิดแอลฟา (Alpha-BHC)	ไมโครกรัม/ ล.	-	ธ	0.02			-
25.ดิลดริน (Dieldrin)	ไมโครกรัม/ ล.	-	ธ	0.1			-
26.อัลดริน (Aldrin)	ไมโครกรัม/ ล.	-	ธ	0.1			-
27.เฮปตาคลอร์และเฮปตาคลออีพอกไซด์ (Heptachor&Heptachlorepoide)	ไมโครกรัม/ ล.	-	ธ	0.2			-
28.เอนดริน (Andrin)	ไมโครกรัม/ ล.	-	ธ	ไม่สามารถตรวจพบได้ตาม วิธีการตรวจสอบที่กำหนด			-

หมายเหตุ : ^{1/}กำหนดค่ามาตรฐานเฉพาะในแหล่งน้ำประเภทที่ 2-4 สำหรับแหล่งน้ำประเภทที่ 1 ให้เป็นไปตามธรรมชาติ และแหล่งน้ำประเภทที่ 5 ไม่กำหนดค่า

^{2/} ค่า DO เป็นเกณฑ์มาตรฐานต่ำสุด

ธ เป็นไปตามธรรมชาติ

ธ'อุณหภูมิของน้ำจะต้องไม่สูงกว่าอุณหภูมิตามธรรมชาติเกิน 3 องศาเซลเซียส

* น้ำที่มีความกระด้างในรูปของ CaCO₃ ไม่เกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

** น้ำที่มีความกระด้างในรูปของ CaCO₃ เกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาตามการบ่งชี้สภาวะคุณภาพน้ำ สามารถแบ่งดัชนีออกเป็นกลุ่มได้ ดังนี้

1. กลุ่มบ่งชี้สภาวะทั่วไป ทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ โดยใช้ในการระบุระดับคุณภาพน้ำว่าดี พอใช้ หรืออยู่ในระดับที่เน่าเสีย
สังเกตได้จากค่ามาตรฐานที่แตกต่างไปในแต่ละระดับคุณภาพน้ำตามประเภทแหล่งน้ำ ได้แก่ สี กลิ่น รส อุณหภูมิ ความเป็นกรด
ต่าง (pH) ออกซิเจนละลาย (DO) บีโอดี (BOD) แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด (TCB) แบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (FCB) โดย
BOD บ่งชี้การปนเปื้อนจากสารอินทรีย์ที่มาจากทุกกิจกรรม TCB และ FCB บ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของมูลสัตว์เลื้อยคลานซึ่งหมาย
รวมถึงมนุษย์และปศุสัตว์ และเป็นแบคทีเรียที่พบในธรรมชาติได้เช่นกัน

2. กลุ่มบ่งชี้สภาพเป็นพิษ ดัชนีกลุ่มนี้จะรวมมลสารที่เป็นพิษต่อทั้งระบบนิเวศและต่อมนุษย์ โดยค่ามาตรฐานมักจะกำหนดค่าเดียวจากจากค่าความเป็นพิษ ซึ่งมีหลายชนิด ได้แก่ โลหะหนักที่เป็นสารที่พบได้ทั้งตามธรรมชาติโดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีสินแร่และการปนเปื้อนอาจมาจากกิจกรรมเหมืองแร่และสารเคมีที่ใช้ในครัวเรือนและอุตสาหกรรม สารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์เพื่อใช้ในการเกษตร สารเคมีอื่นๆ เช่น โซดาไฟ ฟีนอล และสารกัมมันตรังสี รวมถึงสารประกอบไนโตรเจนที่บ่งชี้การปนเปื้อนที่มาจากทั้งมูลมนุษย์ ปุ๋ยสัตว์และปุ๋ยที่ใช้ในพื้นที่การเกษตร ซึ่งในปริมาณที่เหมาะสมนั้นเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่เมื่อมีปริมาณมากในน้ำจะส่งผลเกิดความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ดัชนีดังกล่าวคือ ไนเตรทในหน่วยไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) และแอมโมเนียในหน่วยไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$)

สำหรับมาตรการและนโยบายที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันและควบคุมการปนเปื้อนในรูปของแบคทีเรีย พบว่ามีระบุไว้ในมาตรฐานคุณภาพน้ำสำหรับน้ำธรรมชาติ ได้แก่ น้ำผิวดิน (ตารางที่ ก1) และน้ำทะเล (ตารางที่ ก2) โดยระบุในรูปดัชนีแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด (TCB) แบคทีเรียกลุ่มฟิโคไลฟอร์ม (FCB) โดยในน้ำทะเลมีดัชนีแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรคอคไค (Enterococci Bacteria)

ตารางที่ ก2 ดัชนีคุณภาพน้ำในมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล

ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	ประเภทการใช้ประโยชน์					
		ประเภท 1	ประเภท 2	ประเภท 3	ประเภท 4	ประเภท 5	ประเภท 6
1. วัตถุที่ลอยน้ำ (Floatable Solids)	-	ไม่เป็นที่น่ารังเกียจ					
2. สี	-	ไม่เป็นที่น่ารังเกียจ					
3. กลิ่น (Odour)	-	ไม่เป็นที่น่ารังเกียจ					
4. อุณหภูมิ (Temperature)	องศา เซลเซียส	เปลี่ยนแปลง เพิ่มขึ้นไม่เกิน 1	ไม่เปลี่ยนแปลง	เปลี่ยนแปลง เพิ่มขึ้นไม่ เกิน 1	เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นไม่เกิน 2		

ตารางที่ ก2 ดัชนีคุณภาพน้ำในมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล (ต่อ)

ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	ประเภทการใช้ประโยชน์					
		ประเภท 1	ประเภท 2	ประเภท 3	ประเภท 4	ประเภท5	ประเภท 6
5.ความเป็นกรดและด่าง (pH)	-	7.0 - 8.5					
6.ความโปร่งใส (Transparency)	-	ลดลงจากสภาพธรรมชาติไม่เกินกว่า 10% จากค่าต่ำสุด					
7.สารแขวนลอย	-	ดูหมายเหตุ 1					
8.ความเค็ม (Salinity)		เปลี่ยนแปลงได้ไม่เกินกว่า 10% ของค่าต่ำสุด					
9.น้ำมันหรือไขมันบนผิวน้ำ (Floatable Oil & Grease)	-	มองไม่เห็น					
10.ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน	ug/l	ไม่เกิน 0.5			ไม่เกิน 1	ไม่เกิน 5	
11.ออกซิเจนละลาย (DO)	mg/l	ไม่น้อยกว่า 4	ไม่น้อยกว่า 6	ไม่น้อยกว่า 4			
12.แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total Coliform Bacteria)	เอ็มพี.. /เอน100 มล.	ไม่เกิน 1000					
13.แบคทีเรียกลุ่มฟิคอลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria)	CFU/100 ml	ไม่เกิน 70					

ตารางที่ ก2 ดัชนีคุณภาพน้ำในมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล (ต่อ)

ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	ประเภทการใช้ประโยชน์					
		ประเภท 1	ประเภท 2	ประเภท 3	ประเภท4	ประเภท5	ประเภท 6
14.แบคทีเรียกลุ่มเอ็นเทอโรคอกไค (Enterococci Bacteria)	CFU/100 ml	-					
15.ไนเตรท (ไนโตรเจน NO ₃ -N)	ug - N/l	ไม่เกิน 20					
16.ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส (PO ₄ -P)	ug - P/l	ไม่เกิน 15					
17.แอมโมเนียไนโตรเจน (NH ₃ -N)	ug - N/l	ไม่เกิน 70					
18.ปรอททั้งหมด (Total Hg)	ug/l	ไม่เกิน 0.1					
19.แคดเมียม (Cd)	ug/l	ไม่เกิน 5					
20.โครเมียมรวม (Cr)	ug/l	ไม่เกิน 100					
21.โครเมียมชนิดเฮกซะวาเลนต์ เส้นทึบ (Cr-Hexavalent)	ug/l	ไม่เกิน 50					
22.ตะกั่ว (Pb)	ug/l	ไม่เกิน 8.5					
23.ทองแดง (Cu)	ug/l	ไม่เกิน 8					
24.แมงกานีส (Mn)	ug/l	ไม่เกิน 100					
25.สังกะสี (Zn)	ug/l	ไม่เกิน 50					
26.เหล็ก (Fe)	ug/l	ไม่เกิน 300					

ตารางที่ ก2 ดัชนีคุณภาพน้ำในมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล (ต่อ)

ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	ประเภทการใช้ประโยชน์					
		ประเภท 1	ประเภท 2	ประเภท 3	ประเภท4	ประเภท5	ประเภท 6
27.ฟลูออไรด์ (F)	ug/l	ไม่เกิน 1					
28.คลอรีนคงเหลือ (Residual Chlorine)	ug/l	-	-	-	-	ไม่เกิน 0.01	
29.ฟีนอล (Phenols)	ug/l	ไม่เกิน 0.03					
30.ซัลไฟด์ (Sulfide)	ug/l	ไม่เกิน 10					
31.ไซยาไนด์ (Cyanide)	ug/l	ไม่เกิน 7					
32.พีซีบี (PCB)	ug/l	ตรวจไม่พบ					
33.สารเคมีที่ใช้ในการ ป้องกันกำจัดศัตรูพืชและ สัตว์ (Total Organochlorine Pesticides)	-	ดูหมายเหตุ 2					
34.สารหนู (Arsenic)	ug/l	ไม่เกิน 10					
35.กัมมันตภาพรังสี เบค) (เคอเรลต่อลิตร - ค่ากัมมันตภาพรังสีรวม แอลฟา - ค่ากัมมันตภาพรังสีรวมเบ ตา (ไม่รวมค่าโปตัสเซียม-40)	ug/l	ไม่เกิน 0.1 ไม่เกิน 1.0					
36.สารประกอบดีบุก อินทรีย์ชนิดไตรบิวทิล	ng/l	ไม่เกิน 10					

และมีมาตรการป้องกันการปนเปื้อนไปสู่ผู้บริโภคน้ำโดยมีดัชนีแบคทีเรียกำหนดในมาตรฐานน้ำดื่มต่างๆ ได้แก่ มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภคออกโดยกระทรวงอุตสาหกรรม (ตารางที่ ก3) มาตรฐานคุณภาพน้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทออกโดยกระทรวงสาธารณสุข (ตารางที่ ก4) และมาตรฐานน้ำบาดาลเพื่อการบริโภคออกโดยกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (ตารางที่ ก5)

ตารางที่ ก3 ดัชนีคุณภาพน้ำด้านจุลชีววิทยาในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค (กระทรวงอุตสาหกรรม 2521)

คุณลักษณะ	ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	มาตรฐาน	
			เกณฑ์กำหนดสูงสุด (Maximum Acceptable Concentration)	เกณฑ์อนุโลมสูงสุด ^a (Maximum Allowable Concentration)
ทางจุลชีววิทยา	28.แสดงดาร์คเพลตเคานต์ (Standard Plate Count)	โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (Colonies/cm ³)	500	-
	29.เอ็มพีเอ็น (MPN)	โคลิฟอร์มออร์แกนีสซึมต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร (Coliform Organism/100 cm ³)	น้อยกว่า 2.2	-
	30.อีโคไล (<i>E.coli</i>)		ไม่มี	-

หมายเหตุ: a เกณฑ์ที่อนุโลมให้สูงสุดเป็นเกณฑ์ที่อนุญาตให้สำหรับน้ำประปาหรือน้ำบาดาลที่มีความจำเป็นต้องใช้บริโภคเป็นการชั่วคราวและน้ำที่มีคุณลักษณะอยู่ในระหว่างเกณฑ์กำหนดสูงสุด กับเกณฑ์อนุโลมสูงสุดนั้นไม่ใช่หน้าที่ให้เครื่องหมายมาตรฐานได้

ตารางที่ ก4 ดัชนีคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียในมาตรฐานน้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (กระทรวงสาธารณสุข 2524)

คุณลักษณะ	ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	ค่ามาตรฐาน(เกณฑ์อนุโลมสูงสุด)
ทางแบคทีเรีย	27.โคลิฟอร์ม (Coliform)	เอ็ม/พี.เอ็น.100 มล.	2.2
	28.อีโคไล (<i>E.coli</i>)	เอ็ม/พี.เอ็น.100 มล.	ตรวจไม่พบ
	29.จุลินทรีย์ทำให้เกิดโรค (Disease-causing bacteria)	เอ็ม/พี.เอ็น.100 มล.	ตรวจไม่พบ

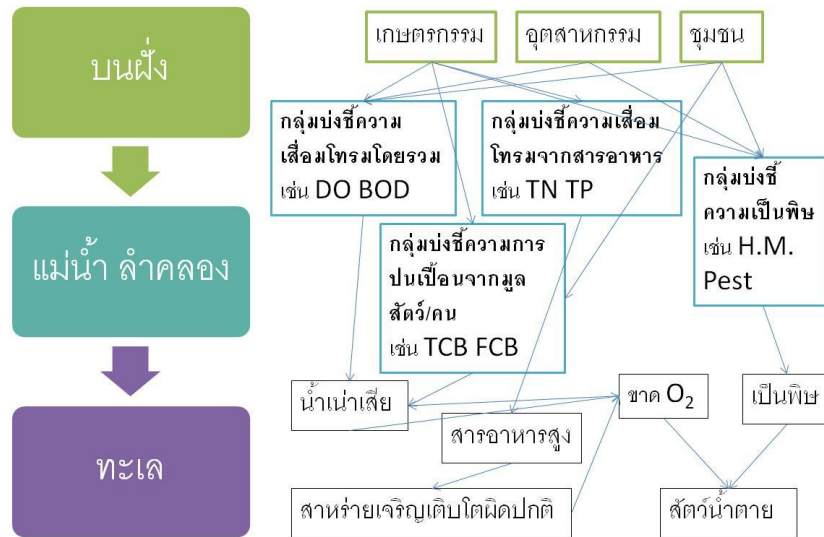
ตารางที่ ก5 ดัชนีคุณภาพน้ำทางแบคทีเรียในมาตรฐานน้ำบาดาลเพื่อการบริโภค (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม 2552)

คุณลักษณะ	ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	ค่ามาตรฐาน	
			เกณฑ์กำหนดที่เหมาะสม	เกณฑ์อนุโลมสูงสุด
ทางแบคทีเรีย	21.แบคทีเรียที่ตรวจพบโดยวิธี Standard plate count	โคโลนีต่อ ลบ.ซม.	ไม่เกินกว่า 500	-
	22.แบคทีเรียที่ตรวจพบโดยวิธี Most Probable Number (MPN)	เอ็มพี.เอ็น. ต่อ 100 ลบ.ซม.	น้อยกว่า 2.2	-
	23.อีโคไล (<i>E.coli</i>)	-	ต้องไม่มีเลย	-

ในส่วนของแหล่งกำเนิดมลพิษหรือกิจกรรมที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนในรูปแบบที่เรื้อรัง ซึ่งได้แก่ น้ำเสียจากครัวเรือน น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร และน้ำเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ ยังคงไม่มีนโยบายหรือมาตรการใดสำหรับควบคุมการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลในรูปแบบที่เรื้อรังในน้ำทิ้งเลย มาตรฐานน้ำทิ้งที่เกี่ยวข้องที่มีอยู่ในปัจจุบันและควรมีการกำหนดดัชนีเพิ่มเติม ได้แก่ มาตรฐานน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน มาตรฐานน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมประเภทอาหารและการแปรรูปเนื้อสัตว์มาตรฐานน้ำทิ้งจากฟาร์มสุกร และมาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยง

เมื่อวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของดัชนีกับแหล่งกำเนิดมลพิษจะพบว่า ทุกดัชนีสามารถเชื่อมโยงไปสู่แหล่งกำเนิดมลพิษได้มากกว่า 1 แหล่ง (รูปที่ ก1) ดัชนีที่บ่งชี้ความเสื่อมโทรมของคุณภาพน้ำโดยรวมที่นิยมใช้ในการจัดลำดับคุณภาพน้ำและแบ่งประเภทแหล่ง ได้แก่ ออกซิเจนละลาย (DO) และบีโอดี (BOD) เป็นผลรวมของผลกระทบจากการปล่อยสารอินทรีย์จากแหล่งกำเนิดทุกประเภท ทั้งจากเกษตรกรรม อุตสาหกรรมและชุมชน ดัชนีที่บ่งชี้ภาวะสารอาหารสูง ได้แก่ ไนโตรเจน (TN) และฟอสฟอรัส (TN) มาจาก

ภาคการเกษตรเป็นหลัก และอาจมาจากน้ำเสียชุมชนที่ไม่ได้รับการบำบัดและน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารและการเกษตร ดัชนีที่บ่งชี้การปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูล ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (TCB FCB) อาจมาจากการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลจากมนุษย์ ทั้งจากมูลของสัตว์จากน้ำทิ้งปศุสัตว์และจากกระชังปลาในแม่น้ำ นอกจากนี้ยังรวมถึงแบคทีเรียที่อยู่ในธรรมชาติด้วย และแม้ในกรณีดัชนีที่บ่งชี้ความเป็นพิษซึ่ง ได้แก่ โลหะหนัก ก็อาจมาจากน้ำเสียจากอุตสาหกรรมหรือสารเคมีที่ใช้ในครัวเรือน สรุปได้ว่า ยังไม่มีดัชนีใดในมาตรฐานที่สามารถบ่งชี้แหล่งกำเนิดมลพิษได้เพียงแหล่งเดียว ดังนั้น ในการแก้ไขปัญหามลพิษจากแหล่งกำเนิดจึงมีข้อถกเถียงถึงสัดส่วนการปล่อยมลพิษที่แท้จริง และไม่สามารถระบุผู้ก่อมลพิษที่ชัดเจนได้ โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาปัญหาคุณภาพน้ำที่ผ่านมา ซึ่งสรุปได้ว่า ปัญหามลพิษที่ประเทศไทยประสบอย่างต่อเนื่องและทวีความรุนแรงขึ้นล้วนมาจากสารอินทรีย์โดยมีสิ่งปฏิกูลจากมูลมนุษย์และสัตว์ที่ตรวจวัดการปนเปื้อนได้ในรูปแบบที่เรียและสารประกอบไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ในการแก้ไขปัญหาอย่างยั่งยืนจึงมีความจำเป็นที่ควรปรับปรุงการตรวจวัดและพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการตรวจวัดดัชนีคุณภาพน้ำหรือพารามิเตอร์ที่มีความจำเพาะกับกิจกรรม โดยสามารถนำมาใช้เป็นพารามิเตอร์สนับสนุนดัชนีคุณภาพน้ำที่มีอยู่เดิมในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน เสริมเป็นมาตรการเฉพาะพื้นที่เพื่อสืบหาแหล่งกำเนิดตามสัดส่วนการปล่อยมลพิษที่แท้จริง



รูปที่ ก1 ความเชื่อมโยงของแหล่งกำเนิดมลพิษที่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำและดัชนีคุณภาพน้ำที่เกี่ยวข้อง

การนำกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษ มากำหนดนโยบายเพื่อใช้เป็นพารามิเตอร์สนับสนุนกลุ่มพารามิเตอร์แบคทีเรียตามมาตรฐานน้ำผิวดิน มีให้เห็นอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการนำมาใช้ในการกำหนดค่าสูงสุดรายวันที่ยินยอมให้มลพิษปล่อยลงแหล่งน้ำนั้นๆ หรือ total maximum daily loads (TMDLs) โดยช่วยในการประเมินแหล่งกำเนิดมลพิษได้อย่างแม่นยำและสามารถบอกแหล่งกำเนิดหลักเทียบกับแหล่งกำเนิดรองอื่นๆ ได้ และส่งผลให้สามารถลดปริมาณมลพิษลงสู่แหล่งน้ำได้จากแหล่งกำเนิดที่ถูกต้อง ยกตัวอย่างเช่น รัฐเวอร์จิเนีย ได้ใช้ MST เพื่อคำนวณว่าการปนเปื้อนTCBมาจากแหล่งกำเนิดใดในปริมาณเท่าไรเปรียบเทียบกัน และวิเคราะห์ว่าหากลดการปนเปื้อนจากแหล่งกำเนิดเหล่านี้จะสามารถลดความสกปรกของแหล่งน้ำลงได้เท่าไร นอกจากนี้ยังมีการใช้ MST ในการจัดการมลพิษในแหล่งน้ำในรัฐต่างๆ เช่น Idaho, Oregon, New Mexico, New Hampshire, Michigan, และ South Dakota เป็นต้น (United States Environmental Protection

Agency, 2011; Benham et al., 2011) ซึ่งสามารถระบุแหล่งกำเนิดทั้งแบบที่ทราบจุดแน่นอน (point source) และแหล่งกำเนิดที่ไม่ทราบจุดแน่นอน (non-point source) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การจัดการแหล่งกำเนิดที่ไม่ทราบจุดแน่นอน ซึ่งทำได้ยากกว่าแหล่งกำเนิดที่ทราบจุดแน่นอนนั้น ทาง US EPA ได้รวบรวมกรณีตัวอย่างที่ประสบความสำเร็จไว้ในเว็บไซต์ <https://www.epa.gov/nps/success-stories-about-restoring-water-bodies-impaired-nonpoint-source-pollution> นอกจากนี้ หน่วยงานด้านสิ่งแวดล้อมของประเทศอังกฤษและเวลส์ หรือ Environment Agency ได้เป็นแกนนำสำคัญในการพัฒนาและนำงานด้าน MST มาช่วยในการแก้ปัญหามลพิษปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ในประเทศไอร์แลนด์ ฝรั่งเศส โปรตุเกส และสหราชอาณาจักร ดังรายงานในปี 2008 โดยได้รายงานว่าการใช้การตรวจวัดดีเอ็นเอของกลุ่มแบคทีเรีย Bacteroidetes ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด และได้พัฒนาการตรวจวัดด้วยวิธีดังกล่าวและกำหนดแนวทางการนำไปใช้เป็นขั้นตอนการตรวจประจำสำหรับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในแหล่งน้ำ เพื่อเรียงลำดับแหล่งกำเนิดมลพิษที่สำคัญอันนำไปสู่การเรียงลำดับการจัดการแหล่งกำเนิดก่อนหลังได้ อย่างไรก็ตาม รายงานได้เน้นย้ำว่าผลการวิเคราะห์แหล่งกำเนิดจะเป็นลักษณะกึ่งเชิงปริมาณ โดยเป็นการเปรียบเทียบกับระหว่างแหล่งกำเนิด แต่จะนำไปสู่การพัฒนาต่อไปสู่เทคนิคที่สามารถคำนวณเชิงปริมาณได้แน่นอนว่าแหล่งกำเนิดใดปลดปล่อยมลพิษออกสู่แหล่งน้ำเป็นปริมาณเท่าใด (Environment Agency, 2008)

นอกเหนือจากประโยชน์ด้านการจำแนกแหล่งปล่อยมลพิษแล้ว การทราบแหล่งกำเนิดมลพิษสามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบการคำนวณความเสี่ยงต่อสุขภาพได้ด้วย เนื่องจากสิ่งปนเปื้อนหรือมลพิษที่ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำมีโอกาสที่จะนำพาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลงสู่แหล่งน้ำนั้นๆ ด้วย โดยโอกาสการปนเปื้อนชนิดและปริมาณของเชื้อก่อโรคก็แตกต่างกันไปขึ้นกับประเภทแหล่งกำเนิด เช่น มีรายงานว่าน้ำเสียชุมชนที่ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำมีความเสี่ยงต่อสุขภาพใกล้เคียงกับการปนเปื้อนของมูลโคลงสู่แหล่งน้ำ ในขณะที่การปนเปื้อนจากมูลไก่ สุนัข และนกนางนวล (gulls) มีความเสี่ยงต่อสุขภาพในระดับที่ต่ำกว่า เป็นต้น (Soller et al., 2010) ดังนั้น การทราบข้อมูลแหล่งกำเนิดมลพิษ จะช่วยในการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพได้อย่างแม่นยำมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งน้ำประเภทที่ 2 ที่มีการใช้ประโยชน์ด้านการว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ ที่อาจมีการสัมผัสน้ำโดยตรง หรือในแหล่งน้ำประเภทที่ 3 ที่นำน้ำมาใช้ในการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการรดน้ำผักผลไม้ที่เน้นการรับประทานสดเป็นผักสลัด เป็นต้น รวมทั้งการประเมินระดับของเทคโนโลยีของกระบวนการฆ่าเชื้อโรคและกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำก่อนนำไปอุปโภคบริโภค ตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนเชื้อโรค เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2558. รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย ปี 2558. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- กระทรวงอุตสาหกรรม. 2521. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 332 เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค. ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 95 ตอนที่ 68 ลงวันที่ 4 กรกฎาคม 2521.
- กระทรวงสาธารณสุข. 2524. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะที่ปิดสนิท. ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 98 ตอนที่ 157 (ฉบับพิเศษ) ลงวันที่ 24 กันยายน 2524 ซึ่งได้แก้ไขเพิ่มเติมโดย ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2534) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2534 ตีพิมพ์ในหนังสือราชกิจจานุเบกษา เล่ม 108 ตอนที่ 61 ลงวันที่ 2 เมษายน 2534.
- กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2552. ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และมาตรการในทางวิชาการสำหรับการป้องกัน ด้านสาธารณสุขและการป้องกันในเรื่องสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ พ.ศ. 2551. ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนที่พิเศษ 85 ง ลงวันที่ 21 พฤษภาคม 2552

- วิจารณ์ สิมานายา. 2546. ทศวรรษคุณภาพแม่น้ำสายหลัก แนวโน้มและการเปลี่ยนแปลง. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ.
- สำนักจัดการคุณภาพน้ำ. 2558. (ร่าง)แผนปฏิบัติการป้องกันแก้ไขและฟื้นฟูคุณภาพน้ำ พื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน พ.ศ. 2558 – 2564. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- Environment Agency, 2008. Using Science to Create a Better Place Microbial Source-Tracking project Science report: SC070003.
- Soller, J. a., Schoen, M.E., Bartrand, T., Ravenscroft, J.E., Ashbolt, N.J., 2010. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. Water Res. 44, 4674–4691. doi:10.1016/j.watres.2010.06.049
- United States Environmental Protection Agency, 2011. Using Microbial Source Tracking to Support TMDL Development and Implementation.

ภาคผนวก ข. มาตรฐานการปฏิบัติงานวิธีพีซีอาร์สำหรับตรวจวิเคราะห์
แบคทีเรียที่เชื่อมโยงแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมได้

ภาคผนวก ข1. การเก็บตัวอย่างมูลสัตว์

อุปกรณ์และวัสดุ

1. กระดาษทิชชู
2. ตู้แช่แข็งที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง -20 องศาเซลเซียส (Mitsubishi Electric ชื่อรุ่น MF-U14J-W)
3. ถังใส่น้ำแข็ง
4. ถุงพลาสติกใส
5. ถุงมือลาเท็กซ์แบบใช้แล้วทิ้ง
6. เทปกาวหนังไก่
7. น้ำแข็ง
8. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
9. ผ้าปิดจมูกแบบใช้แล้วทิ้ง
10. ยางรัด
11. รองเท้าบูท
12. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
13. หลอดพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Axygen™ Presterilized Conical Centrifuge Tubes)

วิธีวิจัย

1. สวมรองเท้าบูทตลอดเวลาที่อยู่ในพื้นที่เก็บตัวอย่าง
2. สวมถุงมือและผ้าปิดจมูกทุกครั้ง ในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่าง
3. ทำการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ โดยเลือกเก็บมูลสดของสัตว์ชนิดเดียวกันจากโรงเรือนเดียวกัน โดยเดินเก็บตามจุดต่างๆ เลือกบริเวณที่มั่นใจว่ามูลสัตว์ไม่สัมผัสน้ำยาฆ่าเชื้อโรคซึ่งอาจมีการใช้บนพื้น ทำการเก็บประมาณ 1 กรัมในแต่ละจุด จำนวน 20 จุดขึ้นไป เพื่อเป็นตัวแทนของสัตว์ 20 ตัวขึ้นไป
4. อาจทำการเก็บตัวอย่างมูลจากบ่อหรือลานรวบรวมมูลสัตว์แต่ไม่ควรถูกเงาจากตัวน้ำล้างพื้น และมั่นใจว่าเป็นมูลสดใหม่ โดยเลือกเก็บ 20 จุดในบ่อ จุดละประมาณ 1 กรัม
5. นำตัวอย่างที่ได้ ใส่รวมกันในหลอดพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างมูล 1 ตัวอย่าง โดยไม่ควรใส่จนเต็มหลอด เนื่องจากจะทำให้ตัวอย่างล้นออกมาได้เมื่อนำไปแช่แข็ง หากใกล้เต็มหลอด ให้แบ่งตัวอย่างใส่อีกหลอดหนึ่ง
6. ใช้ปากกาเขียนชื่อตัวอย่าง วันที่เก็บตัวอย่าง จำนวนจุดของมูลที่ทำกรเก็บ ตรงบริเวณข้างหลอดพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร
7. ใช้กระดาษทิชชูเช็ดบริเวณขอบฝา ก่อนที่จะทำการปิดฝาหลอดพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร และนำใส่ถุงพลาสติกใสมัดปากถุงให้เรียบร้อย รวบรวมกระดาษทิชชูใช้แล้ว ใส่ถุงพลาสติกอีกใบเพื่อรวบรวมนำทิ้ง
8. หากต้องการเก็บตัวอย่างชุดใหม่ในบริเวณสถานที่เลี้ยงสัตว์เดียวกัน ให้ทำการเก็บตามวิธีในข้อ 3 ถึง 7 โดยเปลี่ยนถุงมือใหม่ทุกครั้งเมื่อเริ่มการเก็บตัวอย่างชุดใหม่ นำถุงมือใช้แล้วใส่ลงในถุงพลาสติกเพื่อรวบรวมนำทิ้ง
9. ใช้เทปกาวหนังไก่แปะบริเวณข้างถุงรวบรวมหลอดเก็บตัวอย่าง แล้วทำการเขียนสถานที่เก็บตัวอย่างและวันที่เก็บตัวอย่าง
10. นำถุงพลาสติกที่มีตัวอย่างมูลใส่ในถังที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่
11. ถอดผ้าปิดจมูกที่ใช้แล้วใส่ถุงพลาสติกมัดปากถุงให้เรียบร้อยเพื่อรวบรวมนำทิ้ง

12. ถอดรองเท้าบูทเมื่อออกจากพื้นที่เลี้ยงสัตว์ หากเปื้อนเศษดินปริมาณมาก ให้ล้างด้วยน้ำประปา ตามด้วยการเช็ดด้วยเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ด้วยกระดาษทิชชู หากเปื้อนเพียงเล็กน้อยให้เช็ดด้วยเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
13. หากมีการเก็บตัวอย่างที่สถานที่เลี้ยงสัตว์แห่งอื่นต่อไป ให้ดำเนินการตามข้อ 1 ถึง 12
14. ถังน้ำแข็งที่บรรจุตัวอย่างมูล จะถูกขนส่งมาที่ห้องปฏิบัติการ ภายในเวลาไม่เกิน 8 ชั่วโมงหลังจากการเก็บตัวอย่าง
15. เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการ ทำการย้ายถุงพลาสติกบรรจุหลอดเก็บตัวอย่างไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอภายใน 4 วัน
16. ถุงมือใช้แล้วและทิชชูใช้แล้วที่รวบรวมมาจะถูกกำจัดอย่างถูกวิธีตามสถานที่นั้นกำหนด
17. รองเท้าบูทที่ใช้แล้วควรล้างให้สะอาด และทำการตากให้แห้ง

ภาคผนวก ข2. การเก็บตัวอย่างน้ำเสีย

อุปกรณ์และวัสดุ

1. กระดาษทิชชู
2. กระบอกฉีดยาบรรจุสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
3. ขวดพลาสติกโพลีโพรพิลีนที่ผ่านการฆ่าเชื้อสำหรับบรรจุน้ำเสีย ขนาด 1 ลิตร
4. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส
5. ถังใส่น้ำแข็ง
6. ถุงมือลาเท็กซ์แบบใช้แล้วทิ้ง
7. เทปกาวหนักรูป
8. น้ำแข็ง
9. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
10. ผ้าปิดจมูกแบบใช้แล้วทิ้ง
11. ยางรัด
12. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำ

วิธีวิจัย

1. สวมถุงมือทุกครั้ง ในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย
2. ใช้เทปกาวหนักรูปแปะบริเวณข้างขวดเก็บตัวอย่าง แล้วทำการเขียนสถานที่เก็บตัวอย่างและวันที่เก็บตัวอย่าง
3. ใช้อุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำเสียหย่อนลงไปใต้ น้ำ ทำการล้างอุปกรณ์เก็บด้วยการแกว่งในน้ำเสียประมาณ 15 วินาที
4. จากนั้นหย่อนอุปกรณ์เก็บตัวอย่างลงได้น้ำประมาณ 30 เซนติเมตร ดึงขึ้นมาและเทน้ำเสียใส่ลงในขวดบรรจุน้ำเสีย ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว
5. นำขวดตัวอย่างน้ำที่เก็บได้แช่ลงในถังน้ำแข็งบรรจุน้ำแข็งที่ทำการเตรียมไว้
6. ทำการล้างอุปกรณ์เก็บตัวอย่างด้วยน้ำประปา ตามด้วยการเช็ดด้วยเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ด้วยกระดาษทิชชู
7. ควรเปลี่ยนถุงมือทุกครั้ง เมื่อจะเก็บตัวอย่างถัดไป โดยนำถุงมือใช้แล้วใส่ลงในถุงพลาสติกเพื่อรวบรวมน้ำทิ้ง มัดปากถุงให้เรียบร้อย จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างถัดไป โดยดำเนินการตามข้อ 1 ถึง 6
8. ถังน้ำแข็งที่บรรจุตัวอย่างน้ำ จะถูกขนส่งมาที่ห้องปฏิบัติการ ภายในเวลาไม่เกิน 8 ชั่วโมงหลังจากการเก็บตัวอย่าง
9. เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการ ทำการย้ายขวดบรรจุตัวอย่างไปเก็บในตู้เย็นแช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส เพื่อทำการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอภายใน 9 วัน
10. ถุงมือใช้แล้วและทิชชูใช้แล้วที่รวบรวมมาจะถูกกำจัดอย่างถูกวิธีตามสถานที่นั้นกำหนด

ภาคผนวก ข3. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมูลสัตว์

อุปกรณ์และวัสดุ

1. กระจกยี่ห้อชู
2. กล้องรวบรวมหลอดบรรจุดีเอ็นเอ
3. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
4. เครื่องชั่งสองตำแหน่ง (Mettler Toledo ชื่อรุ่น ML802/01)
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ อุนิอุมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Tomy รุ่น ES-315)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuges; Eppendorf รุ่น minispin plus)
7. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific)
8. ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ (ZR Fecal DNA MiniPrep™, Zymo Research)
9. ตะเกียบไม้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
10. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
11. ตู้แช่แข็งที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง -80 องศาเซลเซียส (Thermo Scientific รุ่น Forma 900)
12. ถังพลาสติก
13. ถุงมือลาเทกซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
14. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
15. ผ้าปิดจมูกแบบใช้แล้วทิ้ง
16. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson)
17. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Corning incorporated)
18. ยางรัด
19. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
20. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
21. เสื้อกาวน์
22. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. นำตัวอย่างมูลสัตว์ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส ออกมาวางบนโต๊ะประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ตัวอย่างละลายตัว
4. นำไม้ตะเกียบมากวนผสมตัวอย่างอุจจาระที่อยู่ในหลอดพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นเวลาประมาณ 15 นาที
5. นำไม้ตะเกียบที่ใช้แล้วรวมไปถึงถุงมือ ใส่ลงในถังพลาสติกที่เตรียมไว้เพื่อรวบรวมน้ำทิ้ง ควรเปลี่ยนตะเกียบไม้และถุงมือทุกครั้งเมื่อเริ่มทำตัวอย่างใหม่
6. ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ ZR Fecal DNA MiniPrep™ เริ่มจากการใช้ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาดใดก็ได้ใช้ในการเขี่ยตัวอย่างอุจจาระและใช้เครื่องชั่งเพื่อชั่งตัวอย่างปริมาณ 150 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด ZR BashingBead™ Lysis

7. ใช้กระดาศทิชชู เช็ดบริเวณขอบหลอดบรรจุตัวอย่างขนาด 50 มิลลิลิตรให้เรียบร้อย นำหลอดบรรจุตัวอย่างเก็บใส่ถุงพลาสติกมัดปากถุงให้เรียบร้อยและนำไปแช่ในตู้แช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส
8. เติมสารละลาย Lysis Solution ลงในหลอด ZR BashingBead™ Lysis ที่ปริมาตร 750 ไมโครลิตร
9. หลังจากนั้นนำหลอด ZR BashingBead™ Lysis ไปผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องเขยาสารเป็นเวลา 20 นาที
10. นำหลอด ZR BashingBead™ Lysis ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
11. ทำการดูดสารละลายส่วนใส เป็นปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IV Spin Filter (Orange Top) ที่สวมด้วยหลอด Collection Tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
12. เติมสารละลาย Fecal DNA Binding Buffer ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตรลงในสารละลายที่ตกลงมาในหลอด Collection Tube
13. ทำการดูดสารละลายในหลอด Collection Tube เป็นปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Zymo-Spin™ IIC ที่สวมด้วยหลอด Collection Tube
14. นำหลอด Zymo-Spin™ IIC ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
15. เทสารละลายที่ตกลงมาในหลอด Collection Tube ทั้ง แล้วนำหลอด Collection Tube สวมได้หลอด Zymo-Spin™ IIC อย่างเดิม
16. ทำซ้ำข้อ 13-15
17. เติม DNA Pre-Wash Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IIC ที่สวมด้วยหลอด Collection Tube หลอดใหม่
18. นำหลอด Zymo-Spin™ IIC ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
19. เติม Fecal DNA Wash Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IIC
20. นำหลอด Zymo-Spin™ IIC ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
21. หลังจากนั้น ย้ายหลอด Zymo-Spin™ IIC ออกจาก Collection Tube เดิม และนำไปสวมกับหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
22. หลังจากนั้น ใส่ DNA Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IIC ทำการปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอตกลงมาที่หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจทางด้านล่าง
23. อาจทำซ้ำข้อ 22 เพื่อให้ได้ปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น
24. จากนั้น ทำการเตรียม Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter (Green Top) โดยเปิดฐานด้านล่างออกและสวมด้วยหลอด Collection Tube ทำการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 3 นาที
25. นำสารละลายดีเอ็นเอในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจมาใส่ใน Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter (Green Top) ที่เตรียมแล้ว ทำการสวมหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจหลอดใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอสุดท้ายตกลงมาในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจสำหรับการทดลองต่อไป
26. ทำการวัดดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
27. ใช้ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง เขียนจดบันทึก ชื่อตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดข้างหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร
28. เก็บหลอดบรรจุดีเอ็นเอที่สกัดเรียบร้อยแล้วลงในกล่องบรรจุดีเอ็นเอ และเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
29. ถูมือ กระดาศทิชชู และวัสดุต่างๆที่สัมผัสตัวอย่างมูลสัตว์นำใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้เรียบร้อยและจะถูกกำจัดอย่างถูกวิธีตามสถานที่นั้นๆกำหนด

ภาคผนวก ข4. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเสีย

อุปกรณ์และวัสดุ

1. กรรไกร
2. กระดาษกรอง Mixed cellulose esters membrane, 0.22 μ m GSWP (Merck Millipore Ltd)
3. กระดาษทิชชู
4. กล้องใสในการบรรจุดีเอ็นเอ
5. ขวดแก้ว Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร
6. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Tomy รุ่น ES-315)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
9. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDrop™ 2000 Thermo Fisher Scientific)
10. จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีฝาปิดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
11. ชุดกรองสุญญากาศ (Nalgene® DS0320-5045 Reusable Bottle Top Filter Holder, Polysulfone with 45 mm Neck Vacuum Adapter, 500mL; Thermo Scientific)
12. ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ (ZR Fecal DNA MiniPrep™, Zymo Research)
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์
14. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
15. ตู้แช่แข็งที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง -80 องศาเซลเซียส (Thermo Scientific รุ่น Forma 900)
16. ถังพลาสติก
17. ถุงมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
18. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
19. บีมสุญญากาศ (Vacuubrand รุ่น ME1)
20. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
21. ปากคืบ
22. ฝาปิดจุ่มกแบบใช้แล้วทิ้ง
23. ไฟแช็ค
24. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson)
25. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson)
26. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
27. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
28. สารละลายเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์)
29. เสื้อกาวน์
30. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. นำตัวอย่างน้ำที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส ออกมาวางบนโต๊ะประมาณ 30 นาทีเพื่อให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง
4. ทำการประกอบชุดกรองสุญญากาศ เพื่อเตรียมวางกระดาษกรอง
5. นำไฟแช็คมาจุดตะเกียงแอลกอฮอล์ และใช้ปากคีบจุ่มสารละลายเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์) ทำการลนไฟ ทิ้งปากคีบไว้สักพักให้เย็นตัว
6. หลังจากนั้นใช้ปากคีบคีบกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางบนที่วางกระดาษกรองในชุดกรอง ประกอบชุดกรองกับขวดแก้ว Duran และปั๊มสุญญากาศ
7. นำตัวอย่างน้ำเสียมาเขย่าอย่างแรงจำนวน 20 ครั้งเพื่อให้เข้ากัน และเทน้ำเสียปริมาตร 50-150 มิลลิลิตรลงในถ้วยรับน้ำของชุดกรอง เปิดปั๊มสุญญากาศ รอจนน้ำถูกกรองจนหมด ปิดปั๊มสุญญากาศ
8. เทน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในถ้วยรับน้ำของชุดกรอง โดยเทรอบๆ ผิวด้านในของถ้วยรับน้ำเพื่อชะล้างตัวอย่างน้ำเสียที่อาจติดค้าง เปิดปั๊มสุญญากาศ รอจนน้ำถูกกรองจนหมด ปิดปั๊มสุญญากาศ
9. ใช้ปากคีบจุ่มสารละลายเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์) ทำการลนไฟ ทิ้งปากคีบไว้สักพักให้เย็นตัว
10. ถอดส่วนประกอบของชุดกรอง ใช้เครื่องมือคีบ คีบกระดาษกรองบนชุดกรอง ออกมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีฝาปิด
11. นำกรรไกรจุ่มสารละลายเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์) ทำการลนไฟ ทิ้งกรรไกรไว้สักพักให้เย็นตัว
12. นำกรรไกรมาตัดกระดาษกรองที่วางไว้ให้มีขนาดเล็กขึ้นละประมาณ 5×5 มิลลิเมตร นำชิ้นกระดาษกรองที่ถูกตัดมาใส่ลงในชุดสกัดสารดีเอ็นเอ ในหลอด ZR BashingBead™ Lysis
13. นำถุงมือ ใส่ลงในถุงพลาสติกที่เตรียมไว้เพื่อรวบรวมน้ำทิ้ง ควรเปลี่ยนถุงมือทุกครั้งที่เราเริ่มทำตัวอย่างใหม่
14. เติมสารละลาย Lysis Solution ลงในหลอด ZR BashingBead™ Lysis ที่ปริมาตร 750 ไมโครลิตร
15. หลังจากนั้นนำหลอด ZR BashingBead™ Lysis ไปผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องเขยาสารเป็นเวลา 20 นาที
16. นำหลอด ZR BashingBead™ Lysis ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว $10,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที
17. ทำการดูดสารละลายส่วนใส เป็นปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IV Spin Filter (Orange Top) ที่สวมด้วยหลอด Collection Tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ $7,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที
18. เติมสารละลาย Fecal DNA Binding Buffer ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตรลงในสารละลายที่ตกลงมาในหลอด Collection Tube
19. ทำการดูดสารละลายในหลอด Collection Tube เป็นปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Zymo-Spin™ IIC ที่สวมด้วยหลอด Collection Tube
20. นำหลอด Zymo-Spin™ IIC ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว $10,000 \times g$ เป็นเวลา 1 นาที
21. เทสารละลายที่ตกลงมาในหลอด Collection Tube ทิ้ง แล้วนำหลอด Collection Tube สวมได้หลอด Zymo-Spin™ IIC อย่างเดิม
22. ทำซ้ำข้อ 19-21
23. เติม DNA Pre-Wash Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IIC ที่สวมด้วยหลอด Collection Tube หลอดใหม่

24. นำหลอด Zymo-Spin™ IIC ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
25. เติม Fecal DNA Wash Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IIC
26. นำหลอด Zymo-Spin™ IIC ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
27. หลังจากนั้น ย้ายหลอด Zymo-Spin™ IIC ออกจาก Collection Tube เดิม และนำไปสวมกับหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
28. หลังจากนั้น ใส่ DNA Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IIC ทำการปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอตกลงมาที่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ทางด้านล่าง
29. อาจทำซ้ำข้อ 28 เพื่อให้ได้ปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น
30. จากนั้น ทำการเตรียม Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter (Green Top) โดยเปิดฐานด้านล่างออกและสวมด้วยหลอด Collection Tube ทำการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 3 นาที
31. นำสารละลายดีเอ็นเอในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์มาใส่ใน Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter (Green Top) ที่เตรียมแล้ว ทำการสวมหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอสุดท้ายตกลงมาในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์สำหรับการทดลองต่อไป
32. ทำการวัดดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
33. ใช้ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง เขียนจดบันทึก ชื่อตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดข้างหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
34. เก็บหลอดบรรจุดีเอ็นเอที่สกัดเรียบร้อยแล้วลงในกล่องบรรจุดีเอ็นเอ และเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
35. ถังมือ และวัสดุต่างๆที่สัมผัสตัวอย่างมูลสัตว์จะถูกกำจัดอย่างถูกวิธีตามสถานที่นั้นๆกำหนด

ภาคผนวก ข5. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดสิ่งปฏิกูลทั่วไปคู่ที่ 1
(BacUni 520f/BacUni 690r1)

อุปกรณ์และวัสดุ

1. 1X TAE บัฟเฟอร์ (50X TAE buffer: 242 กรัม tris base, 57 กรัม glacial acetic acid, 100 ไมโครลิตร 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร)
2. DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)
3. Forward primer (BacUni 520f): 5'-CGT-TAT-CCG-GAT-TTA-TTG-GGT-TTA-3' (10 ไมโครโมลาร์)
4. Reverse primer (BacUni 690r1): 5'-CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG-ATA-TCT-A-3' (10 ไมโครโมลาร์)
5. กระดาษทิชชู
6. กล้องใส่น้ำแข็ง
7. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
8. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Doc XR System)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
11. เครื่องพีซีอาร์ (Thermo cycler; Eppendorf)
12. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid®-exU)
13. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส
15. ถังพลาสติก
16. ถุงมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
17. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
18. น้ำแข็ง
19. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
20. แผ่นพาราฟิล์ม
21. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20 และ 200 ไมโครลิตร (Gilson)
22. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร (Gilson)
23. ยางรัด
24. สารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอ (Ethidium bromide)
25. สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอ (100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific™)
26. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
27. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
28. สี (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific™)
29. เลือกวาน์
30. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
31. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวซ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
32. อะกาโรสเจล (3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล: 3 กรัม อะกาโรส ผสมลงใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. เตรียม Master Mix โดยใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรวางในตะแกรงวางหลอดที่แช่บนถังน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อคงความเย็น ทำการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังนี้ โดยใช้ ไมโครปิเปตต์ทึบ ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร จำนวนปฏิกิริยาให้คำนวณจากจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1ปฏิกิริยาเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปฏิกิริยา	ตัวอย่างการเตรียมสำหรับ 20 ปฏิกิริยา
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	5 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำที่ทำการผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3 ไมโครลิตร	60 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	9 ไมโครลิตร	180 ไมโครลิตร

4. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
5. หลังจากนั้นเตรียมหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลอง วางบนถังที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่
6. ดูดสารจากหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างเรียบร้อยแล้วในปริมาตร 9 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้
7. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนใกล้ละลาย แล้วนำแช่ในน้ำแข็งเพื่อคงอุณหภูมิให้เย็น
8. ทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็น 0.2, 2, และ 20 นาโนกรัม ด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการคำนวณจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหลอดตัวอย่างดีเอ็นเอ
9. หลังจากนั้น ดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 ไมโครลิตรที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ ทำการผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร
10. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก
11. หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปใส่ในเครื่องมือพีซีอาร์โดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	30
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1
4 องศาเซลเซียส	α	1

12. หลังจากนั้นเตรียม 3 เปอร์เซนต์ อะกาโรสเจล สำหรับในการแยกดีเอ็นเอขนาด 170 เบส ด้วยกระแสไฟฟ้า
13. เจลที่เตรียมไว้จะถูกวางลงใน 1 X TAE บัฟเฟอร์ ในเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
14. นำสารผสมที่ได้จากการทำพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 2 ไมโครลิตรบนแผ่นพาราฟิล์ม
15. ใส่สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรในช่องแรกของเจลที่เราเตรียมไว้
16. ใส่สารละลายที่ผสมกันเรียบร้อยแล้วในข้อ 14 ลงในช่องเจลถัดมา
17. ตั้งค่าเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที
18. หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ในสารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอเป็นเวลา 10 นาที
19. นำเจลออกจากการย้อมดีเอ็นเอ และวางบนเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล
20. เจลที่ทำการถ่ายภาพและวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จะถูกนำไปกำจัดอย่างถูกวิธีโดยสถาบันนั้นๆ
21. ถ้าผลที่ได้ไม่ขึ้นแบนที่ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.2 นาโนกรัม ให้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบเป็น 2 และ 20 นาโนกรัม ตามลำดับ

**ภาคผนวก ข6. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดสิ่งปฏิกูลทั่วไปคู่ที่ 2
(GenBactF3/GenBactR4)**

อุปกรณ์และวัสดุ

1. 1X TAE บัฟเฟอร์ (50X TAE buffer: 242 กรัม tris base, 57 กรัม glacial acetic acid, 100 ไมโครลิตร 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร)
2. DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)
3. Forward primer (GenBactF3): 5'-GGG-GTT-CTG-AGA-GGA-AGG-T-3' (10 ไมโครโมลาร์)
4. Reverse primer (GenBact4R): 5'-CCG-TCA-TCC-TTC-ACG-CTA-CT-3' (10 ไมโครโมลาร์)
5. กระดาษทิชชู
6. ถังใส่น้ำแข็ง
7. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
8. เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Doc XR System)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
11. เครื่องพีซีอาร์ (Thermo cycler; Eppendorf)
12. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid®-exU)
13. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส
15. ถังพลาสติก
16. ถุงมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
17. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
18. น้ำแข็ง
19. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
20. แผ่นพาราฟิล์ม
21. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20 และ 200 ไมโครลิตร (Gilson)
22. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร (Gilson)
23. ยางรัด
24. สารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอ (Ethidium bromide)
25. สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอ (100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific™)
26. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
27. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
28. สี (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific™)
29. เสือกาว
30. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
31. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
32. อะกาโรสเจล (3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล: 3 กรัม อะกาโรส ผสมลงใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. เตรียม Master Mix โดยใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรวางในตะแกรงวางหลอดที่แช่บนถังน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อคงความเย็น ทำการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังนี้ โดยใช้ ไมโครปิเปตต์ทิบ ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร จำนวนปริมาตรให้คำนวณจากจำนวนปริมาตรที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1 ปริมาตรเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปริมาตร	ตัวอย่างการเตรียมสำหรับ 20 ปริมาตร
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	5 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำที่ทำการผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3 ไมโครลิตร	60 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	9 ไมโครลิตร	180 ไมโครลิตร

4. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
5. หลังจากนั้นเตรียมหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปริมาตรที่จะทดลอง วางบนถังที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่
6. ดูดสารจากหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างเรียบร้อยแล้วในปริมาตร 9 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้
7. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนใกล้ละลาย แล้วนำแช่ในน้ำแข็งเพื่อคงอุณหภูมิให้เย็น
8. ทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็น 0.2, 2, และ 20 นาโนกรัม ด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการคำนวณจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหลอดตัวอย่างดีเอ็นเอ
9. หลังจากนั้น ดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 ไมโครลิตรที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ ทำการผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร
10. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก
11. หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปใส่ในเครื่องมือพีซีอาร์โดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	30
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1
4 องศาเซลเซียส	α	1

12. หลังจากนั้นเตรียม 3 เปอร์เซนต์ อะกาโรสเจล สำหรับในการแยกดีเอ็นเอขนาด 129 เบส ด้วยกระแสไฟฟ้า
13. เจลที่เตรียมไว้จะถูกวางลงใน 1 X TAE บัฟเฟอร์ ในเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
14. นำสารผสมที่ได้จากการทำพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 2 ไมโครลิตรบนแผ่นพาราฟิล์ม
15. ใส่สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรในช่องแรกของเจลที่เราเตรียมไว้
16. ใส่สารละลายที่ผสมกันเรียบร้อยแล้วในข้อ 14 ลงในช่องเจลถัดมา
17. ตั้งค่าเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที
18. หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ในสารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอเป็นเวลา 10 นาที
19. นำเจลออกจากการย้อมดีเอ็นเอ และวางบนเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล
20. เจลที่ทำการถ่ายภาพและวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จะถูกนำไปกำจัดอย่างถูกวิธีโดยสถาบันนั้นๆ
21. ถ้าผลที่ได้ไม่ขึ้นแบนที่ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.2 นาโนกรัม ให้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบเป็น 2 และ 20 นาโนกรัม ตามลำดับ

ภาคผนวก ข7. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดสิ่งปฏิกูลทั่วไปคู่ที่ 3
(Bac32F/Bac708R)

อุปกรณ์และวัสดุ

1. EDTA (pH 8.0) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร)
2. DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)
3. Forward primer (Bac32F): 5'-AAC-GCT-AGC-TAC-AGG-CTT-3' (10 ไมโครโมลาร์)
4. Reverse primer (Bac708R): 5'-CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG-3' (10 ไมโครโมลาร์)
5. กระดาษทิชชู
6. กล่องใส่น้ำแข็ง
7. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
8. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Doc XR System)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
11. เครื่องพีซีอาร์ (Thermo cycler; Eppendorf)
12. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid®-exU)
13. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส
15. ถังพลาสติก
16. ถังมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
17. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
18. น้ำแข็ง
19. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
20. แผ่นพาราฟิล์ม
21. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20 และ 200 ไมโครลิตร (Gilson)
22. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร (Gilson)
23. ยางรัด
24. สารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอ (Ethidium bromide)
25. สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอ (100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific™)
26. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
27. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
28. สี (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific™)
29. เลื่อแก้ว
30. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
31. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
32. อะกาโรสเจล (3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล: 3 กรัม อะกาโรส ผสมลงใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. เตรียม Master Mix โดยใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรวางในตะแกรงวางหลอดที่แช่บนถังน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อคงความเย็น ทำการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังนี้ โดยใช้ ไมโครปิเปตต์ทิบ ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร จำนวนปริมาตรให้คำนวณจากจำนวนปริมาตรที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1 ปริมาตรเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปริมาตร	ตัวอย่างการเตรียมสำหรับ 20 ปริมาตร
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	5 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำที่ทำการผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3 ไมโครลิตร	60 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	9 ไมโครลิตร	180 ไมโครลิตร

4. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
5. หลังจากนั้นเตรียมหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปริมาตรที่จะทดลอง วางบนถังที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่
6. ดูดสารจากหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างเรียบร้อยแล้วในปริมาตร 9 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้
7. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนใกล้ละลาย แล้วนำแช่ในน้ำแข็งเพื่อคงอุณหภูมิให้เย็น
8. ทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็น 0.2, 2, และ 20 นาโนกรัม ด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการคำนวณจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหลอดตัวอย่างดีเอ็นเอ
9. หลังจากนั้น ดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 ไมโครลิตรที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ ทำการผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร
10. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก
11. หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปใส่ในเครื่องมือพีซีอาร์โดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	30
53.7 องศาเซลเซียส	60 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1
4 องศาเซลเซียส	α	1

12. หลังจากนั้นเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล สำหรับในการแยกดีเอ็นเอขนาด 670 เบส ด้วยกระแสไฟฟ้า
13. เจลที่เตรียมไว้จะถูกวางลงใน 1 X TAE บัฟเฟอร์ ในเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
14. นำสารผสมที่ได้จากการทำพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 2 ไมโครลิตรบนแผ่นพาราฟิล์ม
15. ใส่สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรในช่องแรกของเจลที่เราเตรียมไว้
16. ใส่สารละลายที่ผสมกันเรียบร้อยแล้วในข้อ 14 ลงในช่องเจลถัดมา
17. ตั้งค่าเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที
18. หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ในสารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอเป็นเวลา 10 นาที
19. นำเจลออกจากการย้อมดีเอ็นเอ และวางบนเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล
20. เจลที่ทำการถ่ายภาพและวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จะถูกนำไปกำจัดอย่างถูกวิธีโดยสถาบันนั้นๆ
21. ถ้าผลที่ได้ไม่ขึ้นแบนที่ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.2 นาโนกรัม ให้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบเป็น 2 และ 20 นาโนกรัม ตามลำดับ

ภาคผนวก ข8. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดน้ำเสียชุมชน
(HF183/BFDrev)

อุปกรณ์และวัสดุ

1. EDTA (pH 8.0) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร)
2. DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)
3. Forward primer (HF183): 5'- ATC-ATG-AGT-TCA-CAT-GTC-CG -3' (10 ไมโครโมลาร์)
4. Reverse primer (BFDrev): 5'- CGT-AGG-AGT-TTG-GAC-CGT-GT -3' (10 ไมโครโมลาร์)
5. กระดาษทิชชู
6. ถังล้างน้ำแข็ง
7. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
8. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Doc XR System)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
11. เครื่องพีซีอาร์ (Thermo cycler; Eppendorf)
12. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid®-exU)
13. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส
15. ถังพลาสติก
16. ถังมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
17. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
18. น้ำแข็ง
19. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
20. แผ่นพาราฟิล์ม
21. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20 และ 200 ไมโครลิตร (Gilson)
22. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร (Gilson)
23. ยางรัด
24. สารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอ (Ethidium bromide)
25. สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอ (100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific™)
26. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
27. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
28. สี (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific™)
29. เสือกาว
30. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
31. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
32. อะกาโรสเจล (3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล: 3 กรัม อะกาโรส ผสมลงใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. เตรียม Master Mix โดยใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรวางในตะแกรงวางหลอดที่แช่บนถังน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อคงความเย็น ทำการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังนี้ โดยใช้ ไมโครปิเปตต์ที่บิ ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร จำนวนปริมาตรให้คำนวณจากจำนวนปริมาตรที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1 ปริมาตรเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปริมาตร	ตัวอย่างการเตรียมสำหรับ 20 ปริมาตร
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	5 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำที่ทำการผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3 ไมโครลิตร	60 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	9 ไมโครลิตร	180 ไมโครลิตร

4. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
5. หลังจากนั้นเตรียมหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปริมาตรที่จะทดลอง วางบนถังที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่
6. ดูดสารจากหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างเรียบร้อยแล้วในปริมาตร 9 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้
7. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนใกล้ละลาย แล้วนำแช่ในน้ำแข็งเพื่อคงอุณหภูมิให้เย็น
8. ทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็น 0.2, 2, และ 20 นาโนกรัม ด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการคำนวณจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหลอดตัวอย่างดีเอ็นเอ
9. หลังจากนั้น ดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 ไมโครลิตรที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ ทำการผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร
10. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก
11. หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปใส่ในเครื่องมือพีซีอาร์โดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	30
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1
4 องศาเซลเซียส	α	1

12. หลังจากนั้นเตรียม 3 เปอร์เซนต์ อะกาโรสเจล สำหรับในการแยกดีเอ็นเอขนาด 167 เบส ด้วยกระแสไฟฟ้า
13. เจลที่เตรียมไว้จะถูกวางลงใน 1 X TAE บัฟเฟอร์ ในเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
14. นำสารผสมที่ได้จากการทำพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 2 ไมโครลิตรบนแผ่นพาราฟิล์ม
15. ใส่สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรในช่องแรกของเจลที่เราเตรียมไว้
16. ใส่สารละลายที่ผสมกันเรียบร้อยแล้วในข้อ 14 ลงในช่องเจลถัดมา
17. ตั้งค่าเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที
18. หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ในสารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอเป็นเวลา 10 นาที
19. นำเจลออกจากการย้อมดีเอ็นเอ และวางบนเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล
20. เจลที่ทำการถ่ายภาพและวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จะถูกนำไปกำจัดอย่างถูกวิธีโดยสถาบันนั้นๆ
21. ถ้าผลที่ได้ไม่ขึ้นแบนที่ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.2 นาโนกรัม ให้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบเป็น 2 และ 20 นาโนกรัม ตามลำดับ

**ภาคผนวก ข9. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดจากสุกร
(Pig-2-Bac41F/Pig-2-Bac163Rm)**

อุปกรณ์และวัสดุ

1. EDTA (pH 8.0) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร)
2. DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)
3. Forward primer (Pig-2-Bac41F): 5'-GCA-TGA-ATT-TAG-CTT-GCT-AAA-TTT-GAT-3' (10 ไมโครโมลาร์)
4. Reverse primer (Pig-2-Bac163Rm): 5'-ACC-TCA-TAC-GGT-ATT-AAT-CCG-C-3' (10 ไมโครโมลาร์)
5. กระดาษทิชชู
6. ถังล้างน้ำแข็ง
7. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
8. เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Doc XR System)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
11. เครื่องพีซีอาร์ (Thermo cycler; Eppendorf)
12. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid®-exU)
13. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส
15. ถังพลาสติก
16. ถังมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
17. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
18. น้ำแข็ง
19. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
20. แผ่นพาราฟิล์ม
21. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20 และ 200 ไมโครลิตร (Gilson)
22. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร (Gilson)
23. ยางรัด
24. สารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอ (Ethidium bromide)
25. สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอ (100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific™)
26. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
27. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
28. สี (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific™)
29. เสือกาว
30. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
31. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
32. อะกาโรสเจล (3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล: 3 กรัม อะกาโรส ผสมลงใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. เตรียม Master Mix โดยใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรวางในตะแกรงวางหลอดที่แช่บนถังน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อคงความเย็น ทำการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังนี้ โดยใช้ ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร จำนวนปริมาตรให้คำนวณจากจำนวนปริมาตรที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1 ปริมาตรเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปริมาตร	ตัวอย่างการเตรียมสำหรับ 20 ปริมาตร
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	5 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำที่ทำการผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3 ไมโครลิตร	60 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	9 ไมโครลิตร	180 ไมโครลิตร

4. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
5. หลังจากนั้นเตรียมหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปริมาตรที่จะทดลอง วางบนถังที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่
6. ดูดสารจากหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างเรียบร้อยแล้วในปริมาตร 9 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้
7. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนใกล้ละลาย แล้วนำแช่ในน้ำแข็งเพื่อคงอุณหภูมิให้เย็น
8. ทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็น 0.2, 2, และ 20 นาโนกรัม ด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการคำนวณจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหลอดตัวอย่างดีเอ็นเอ
9. หลังจากนั้น ดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 ไมโครลิตรที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ ทำการผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร
10. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก
11. หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปใส่ในเครื่องมือพีซีอาร์โดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	30
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1
4 องศาเซลเซียส	α	1

12. หลังจากนั้นเตรียม 3 เปอร์เซนต์ อะกาโรสเจล สำหรับในการแยกดีเอ็นเอขนาด 116 เบส ด้วยกระแสไฟฟ้า
13. เจลที่เตรียมไว้จะถูกวางลงใน 1 X TAE บัฟเฟอร์ ในเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
14. นำสารผสมที่ได้จากการทำพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 2 ไมโครลิตรบนแผ่นพาราฟิล์ม
15. ใส่สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรในช่องแรกของเจลที่เราเตรียมไว้
16. ใส่สารละลายที่ผสมกันเรียบร้อยแล้วในข้อ 14 ลงในช่องเจลถัดมา
17. ตั้งค่าเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที
18. หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ในสารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอเป็นเวลา 10 นาที
19. นำเจลออกจากการย้อมดีเอ็นเอ และวางบนเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล
20. เจลที่ทำการถ่ายภาพและวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จะถูกนำไปกำจัดอย่างถูกวิธีโดยสถาบันนั้นๆ
21. ถ้าผลที่ได้ไม่ขึ้นแบนที่ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.2 นาโนกรัม ให้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบเป็น 2 และ 20 นาโนกรัม ตามลำดับ

**ภาคผนวก ข10. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดจากโค
(Bac3F/Bac3R)**

อุปกรณ์และวัสดุ

1. EDTA (pH 8.0) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร)
2. DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)
3. Forward primer (Bac3F): 5'- CTA-ATG-GAA-AAT-GGA-TGG-TAT-CT-3' (10 ไมโครโมลาร์)
4. Reverse primer (Bac3R): 5'- GCC-GCC-CAG-CTC-AAA-TAG-3' (10 ไมโครโมลาร์)
5. กระดาษทิชชู
6. ถังใส่น้ำแข็ง
7. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
8. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Doc XR System)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
11. เครื่องพีซีอาร์ (Thermo cycler; Eppendorf)
12. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid®-exU)
13. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส
15. ถังพลาสติก
16. ถังมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
17. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
18. น้ำแข็ง
19. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
20. แผ่นพาราฟิล์ม
21. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20 และ 200 ไมโครลิตร (Gilson)
22. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร (Gilson)
23. ยางรัด
24. สารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอ (Ethidium bromide)
25. สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอ (100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific™)
26. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
27. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
28. สี (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific™)
29. เสื่อกาว
30. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
31. หลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
32. อะกาโรสเจล (3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล: 3 กรัม อะกาโรส ผสมลงใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. เตรียม Master Mix โดยใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรวางในตะแกรงวางหลอดที่แช่บนถังน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อคงความเย็น ทำการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังนี้ โดยใช้ ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร จำนวนปริมาตรให้คำนวณจากจำนวนปริมาตรที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1 ปริมาตรเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปริมาตร	ตัวอย่างการเตรียมสำหรับ 20 ปริมาตร
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	5 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำที่ทำการผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3 ไมโครลิตร	60 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	9 ไมโครลิตร	180 ไมโครลิตร

4. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
5. หลังจากนั้นเตรียมหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปริมาตรที่จะทดลอง วางบนถังที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่
6. ดูดสารจากหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างเรียบร้อยแล้วในปริมาตร 9 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้
7. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนใกล้ละลาย แล้วนำแช่ในน้ำแข็งเพื่อคงอุณหภูมิให้เย็น
8. ทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็น 0.2, 2, และ 20 นาโนกรัม ด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการคำนวณจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหลอดตัวอย่างดีเอ็นเอ
9. หลังจากนั้น ดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 ไมโครลิตรที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ ทำการผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร
10. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก
11. หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปใส่ในเครื่องมือพีซีอาร์โดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	30
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1
4 องศาเซลเซียส	α	1

12. หลังจากนั้นเตรียม 3 เปอร์เซนต์ อะกาโรสเจล สำหรับในการแยกดีเอ็นเอขนาด 166 เบส ด้วยกระแสไฟฟ้า
13. เจลที่เตรียมไว้จะถูกวางลงใน 1 X TAE บัฟเฟอร์ ในเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
14. นำสารผสมที่ได้จากการทำพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 2 ไมโครลิตรบนแผ่นพาราฟิล์ม
15. ใส่สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรในช่องแรกของเจลที่เราเตรียมไว้
16. ใส่สารละลายที่ผสมกันเรียบร้อยแล้วในข้อ 14 ลงในช่องเจลถัดมา
17. ตั้งค่าเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที
18. หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ในสารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอเป็นเวลา 10 นาที
19. นำเจลออกจากการย้อมดีเอ็นเอ และวางบนเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล
20. เจลที่ทำการถ่ายภาพและวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จะถูกนำไปกำจัดอย่างถูกวิธีโดยสถาบันนั้นๆ
21. ถ้าผลที่ได้ไม่ขึ้นแบนที่ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.2 นาโนกรัม ให้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบเป็น 2 และ 20 นาโนกรัม ตามลำดับ

ภาคผนวก ข11. การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียเป้าหมายในแหล่งกำเนิดต่างๆ ด้วยวิธี
พีซีอาร์เชิงปริมาณ

อุปกรณ์และวัสดุ

1. iTaq Universal Probes Supermix (2X) (Bio-Rad)
2. กระดาษทิชชู
3. ถังล้างน้ำแข็ง
4. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
7. เครื่องพีซีอาร์เชิงปริมาณ (StepOnePlus™ Real-Time PCR; Applied Biosystems™)
8. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
9. ตู้ปลอดเชื้อ Biological Safety Cabinet Class II
10. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส
11. ภาชนะรักษาความเย็นสำหรับหลอดพีซีอาร์ อุณหภูมิ -20 °C
12. ภาชนะใส่หลอดพีซีอาร์สำหรับลงเครื่อง (Applied Biosystems™)
13. ถังพลาสติก
14. ถังมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
15. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 รอบ
16. น้ำแข็ง
17. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
18. ฝาพีซีอาร์ (MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips; Applied Biosystems™)
19. ฟิลเตอร์ทิป ขนาด 100 ไมโครลิตร (Mettler-Toledo Rainin)
20. ฟิลเตอร์ทิป ขนาด 20 และ 200 ไมโครลิตร (Axygen)
21. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Eppendorf)
22. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Axygen)
23. ยางรัด
24. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
25. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
26. เสื้อกาวน์
27. หลอดพีซีอาร์ (MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL; Applied Biosystems™)
28. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
29. ออร์โตปิเปตต์ ขนาด 100 ไมโครลิตร (Mettler-Toledo Rainin)

วิธีวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบที่ขนาด 521 คู่เบส ซึ่งในดีเอ็นเอต้นแบบ 1 สายประกอบด้วยยีน 16s rRNA ของ Bacteroidales ที่จำเพาะต่อ สุกอร์ โค น้ำเสียชุมชน และ รวมทุกแหล่งกำเนิด (universal) รายละเอียดดังรูปที่ 1 ในบทที่ 2 วิธีวิจัย หัวข้อที่ 2.3 ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ทำการสังเคราะห์ผ่าน GeneArt Gene Synthesis บริษัท Invitrogen สหรัฐอเมริกา ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน
2. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
3. ทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อ Biological Safety Cabinet โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
4. ทำการเจือจางดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วย PCR grade water ในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ความเข้มข้นต่างๆ รวม 6 ความเข้มข้น ซึ่งประกอบด้วยจำนวนยีน 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , และ 10 gene copy numbers ต่อไมโครลิตร ตามลำดับ โดยคำนวณจากมวลโมเลกุลของเส้นดีเอ็นเอต้นแบบ ด้วยสูตร $N \times 1.096E-21 \text{ g/bp}$, เมื่อ $N=521$ คู่เบส จะได้มวลโมเลกุลของดีเอ็นเอ 1 copy และทำการคูณด้วยปริมาณ copies ของดีเอ็นเอที่ต้องการ (6 ความเข้มข้น) ดังที่กล่าวในข้างต้น
5. การสร้างกราฟมาตรฐานในแต่ละคูไพรเมอร์จะทำการทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณกับดีเอ็นเอต้นแบบทั้ง 6 ความเข้มข้น แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง รวมเป็น 18 ปฏิกิริยาต่อคูไพรเมอร์ อีกทั้งยังทดสอบกับตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (negative control) ซึ่งเตรียมจากปฏิกิริยาที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทำซ้ำ 3 ครั้งต่อคูไพรเมอร์ รวมเป็น 21 ปฏิกิริยาต่อคูไพรเมอร์
6. เตรียม Master Mix โดยใช้หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางด้านล่าง โดยใช้ไมโครปิเปตต์ที่ขนาดต่างๆ ให้เหมาะสมกับปริมาตรจำนวนปฏิกิริยาให้คำนวณจากจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1 ปฏิกิริยาเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปฏิกิริยา
iTaq Universal Probes Supermix (2X)	10 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.8 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.8 ไมโครลิตร
Fluorescent probe (10 ไมโครโมลาร์)	0.4 ไมโครลิตร
น้ำที่ทำการผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	15 ไมโครลิตร

7. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
8. หลังจากนั้นเตรียมหลอดพีซีอาร์ (8-Tube Strip) ขนาด 0.1 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลอง วางบนภาชนะรักษาความเย็นที่มีอุณหภูมิไม่มากกว่า 4 °C ตลอดการทดลอง และดูดสารจากหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างๆเรียบร้อยแล้วในปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดหลอดพีซีอาร์ที่เตรียมไว้

9. นำตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบในแต่ละความเข้มข้น (ทั้ง 6 ความเข้มข้น) เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร หลังจากนั้นดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.1 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ เมื่อใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอครบแล้วทำการปิดฝาและผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร โดยใช้แรงเขย่าต่ำ
10. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก หลังจากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ไปใส่ในเครื่องมือพีซีอาร์เชิงปริมาณโดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	15 วินาที	40
60 องศาเซลเซียส	60 วินาที	

11. ในหนึ่งคูไพรเมอร์จะทำการสร้างกราฟมาตรฐานจำนวน 4 เส้น จากการป้อนตัวอย่างเข้าเครื่องพีซีอาร์เชิงปริมาณ 4 รอบๆละ 21 ปฏิบัติดังรายละเอียดในข้อ 3.
12. ผลการทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณได้ค่า cycle threshold หรือ Ct โดยค่า Ct ที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้นนำมาหาค่าเฉลี่ย (Ct mean) หลังจากนั้นนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่า Ct mean (แกน Y) และปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ (แกน X) ทำการวิเคราะห์เส้นกราฟมาตรฐานทั้ง 4 เส้น ต่อหนึ่งคูไพรเมอร์เพื่อหาค่าความแตกต่างทางสถิติและหาค่าความชันเฉลี่ย (pooled slope) โดยใช้ multiple linear regression
13. ทำการคำนวณค่า PCR amplification efficiency (E) ของแต่ละไพรเมอร์จากความชันเฉลี่ยของกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณจากสมการ $PCR\ amplification\ efficiency\ (E) = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$ ซึ่งค่าที่ยอมรับได้จะอยู่ในช่วง 90 – 110 %

ภาคผนวก ข12. เทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดต่างๆ สำหรับตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสีย

อุปกรณ์และวัสดุ

- 61 iTaq Universal Probes Supermix (2X) (Bio-Rad)
- 62 กระดาษทิชชู
- 63 กล้องใส่น้ำแข็ง
- 64 เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
- 65 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
- 66 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
- 67 เครื่องพีซีอาร์เชิงปริมาณ (StepOnePlus™ Real-Time PCR; Applied Biosystems™)
- 68 ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 69 ตู้ปลอดเชื้อ Biological Safety Cabinet Class II
- 70 ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส
- 71 ถาดรักษาความเย็นสำหรับหลอดพีซีอาร์ อุณหภูมิ -20 °C
- 72 ถาดใส่หลอดพีซีอาร์สำหรับลงเครื่อง (Applied Biosystems™)
- 73 ถังพลาสติก
- 74 ถังมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
- 75 น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 รอบ
- 76 น้ำแข็ง
- 77 ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
- 78 ฝาพีซีอาร์ (MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips; Applied Biosystems™)
- 79 ฟิลเตอร์ทิบ ขนาด 100 ไมโครลิตร (Mettler-Toledo Rainin)
- 80 ฟิลเตอร์ทิบ ขนาด 20 และ 200 ไมโครลิตร (Axygen)
- 81 ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Eppendorf)
- 82 ไมโครปิเปตต์ทิบ ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Axygen)
- 83 ยางรัด
- 84 สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
- 85 สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
- 86 เสื่อกาว
- 87 หลอดพีซีอาร์ (MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL; Applied Biosystems™)
- 88 หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
- 89 ออร์โตปิเปตต์ ขนาด 100 ไมโครลิตร (Mettler-Toledo Rainin)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อ Biological Safety Cabinet โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. เตรียม Master Mix ก่อนนำตัวอย่างเข้ามาเปิดในตู้ โดยใช้หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางด้านล่าง โดยใช้ไมโครปิเปตต์ที่ขนาดต่างๆ ให้เหมาะสมกับปริมาณจำนวนปฏิกิริยาให้คำนวณจากจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1 ปฏิกิริยาเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปฏิกิริยา
iTaq Universal Probes Supermix (2X)	10 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.8 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.8 ไมโครลิตร
Fluorescent probe (10 ไมโครโมลาร์)	0.4 ไมโครลิตร
น้ำที่ทำการผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	15 ไมโครลิตร

4. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
5. หลังจากนั้นเตรียมหลอดพีซีอาร์ (8-Tube Strip) ขนาด 0.1 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลอง วางบนภาชนะรักษาความเย็นที่มีอุณหภูมิไม่มากกว่า 4 °C ตลอดการทดลอง
6. ดูดสารจากหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างๆเรียบร้อยแล้วในปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดหลอดพีซีอาร์ที่เตรียมไว้
7. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
8. หลังจากนั้น ดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.1 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ เมื่อใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอครบแล้วทำการปิดฝาและผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร โดยใช้แรงเขย่าต่ำ
9. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก
10. หลังจากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ไปใส่ในเครื่องมือพีซีอาร์เชิงปริมาณโดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	15 วินาที	40
60 องศาเซลเซียส	60 วินาที	

11. เมื่อได้ค่าเฉลี่ย Ct แล้วจะคำนวณปริมาณยีนจากสมการ $\log_{10} \text{concentration} = (Ct - b) / m$ เมื่อ b เป็นค่าตัดแกน Y ที่คำนวณจากค่า Ct ของตัวอย่างควบคุมเชิงบวก และ m คือ ค่าความชันเฉลี่ยที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ข13. การเก็บตัวอย่างน้ำผิวดิน

อุปกรณ์และวัสดุ

1. กระดาษทิชชู
2. กระบอกฉีดยาบรรจุสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
3. ขวดพลาสติกโพลีโพรพิลีนที่ผ่านการฆ่าเชื้อสำหรับบรรจุน้ำเสีย ขนาด 1 ลิตร
4. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส
5. ถังใส่น้ำแข็ง
6. ถุงมือลาเท็กซ์แบบใช้แล้วทิ้ง
7. เทปกาวหนังไก่
8. น้ำแข็ง
9. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
10. ผ้าปิดจมูกแบบใช้แล้วทิ้ง
11. ยางรัด
12. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำ

วิธีวิจัย

1. สวมถุงมือทุกครั้ง ในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำผิวดิน
2. ใช้เทปกาวหนังไก่แปะบริเวณข้างขวดเก็บตัวอย่าง แล้วทำการเขียนสถานที่เก็บตัวอย่างและวันที่เก็บตัวอย่าง
3. ใช้อุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำผิวดินหย่อนลงไปใต้ น้ำ ทำการล้างอุปกรณ์เก็บตัวอย่างด้วยการแกว่งในน้ำประมาณ 15 วินาที
4. จากนั้นหย่อนอุปกรณ์เก็บตัวอย่างลงใต้น้ำประมาณ 30 เซนติเมตรสำหรับการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรีย และที่ระดับกึ่งกลางความลึกของแม่น้ำสำหรับการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางเคมีฟิสิกส์อื่นๆ ดึงขึ้นมาและเทน้ำใส่ลงในขวดบรรจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว
5. สำหรับขวดตัวอย่างที่ใช้สำหรับวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen; DO) ต้องทำการเติมสารละลายละลายแมงกานีสซัลเฟต (manganous sulfate) และน้ำยาอัลคาไลโอไดด์อะไซด์ (alkali-iodide-azide reagent) อย่างละประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในขวดน้ำตัวอย่างผิวดิน จากนั้นทำการเขย่าขวดผสมสารให้เข้ากันกับตัวอย่างน้ำผิวดิน
6. ขวดตัวอย่างที่ใช้วัดค่าทางเคมีตัวอย่างจะต้องทำการรักษาคุณภาพน้ำโดยการเติมกรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) ลงในตัวอย่างน้ำผิวดินโดยให้ค่า pH ต่ำกว่า 2
7. นำขวดตัวอย่างน้ำที่เก็บได้แช่ลงในถังน้ำแข็งบรรจุน้ำแข็งที่ทำการเตรียมไว้
8. ทำการล้างอุปกรณ์เก็บตัวอย่างด้วยน้ำประปา ตามด้วยการเช็ดด้วยเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ด้วยกระดาษทิชชู
9. ควรเปลี่ยนถุงมือทุกครั้ง เมื่อจะเก็บตัวอย่างถัดไป โดยนำถุงมือใช้แล้วใส่ลงในถุงพลาสติกเพื่อรวบรวมนำทิ้ง มัดปากถุงให้เรียบร้อย จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างถัดไป โดยดำเนินการตามข้อ 1 ถึง 6
10. ถังน้ำแข็งที่บรรจุตัวอย่างน้ำ จะถูกขนส่งไปที่ห้องปฏิบัติการ ภายในเวลาไม่เกิน 8 ชั่วโมงหลังจากการเก็บตัวอย่าง
11. เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการ ทำการย้ายขวดบรรจุตัวอย่างไปเก็บในตู้เย็นแช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ทางเคมีและสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอภายใน 6 วัน
12. ถุงมือใช้แล้วและทิชชูใช้แล้วที่รวบรวมมาจะถูกกำจัดอย่างถูกวิธีตามสถานที่นั้นกำหนด

ภาคผนวก ข14. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำผิวดิน

อุปกรณ์และวัสดุ

1. 2N กรดไฮโดรคลอริก (HCL)
2. 2N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
3. กรรไกร
4. กระดาษกรอง MFTM Memberane Filters, 0.45 µm HA (Merck Millipore Ltd)
5. กระดาษทิชชู
6. กล้องใสในการบรรจุดีเอ็นเอ
7. ขวดแก้ว Duran ขนาด 1000 มิลลิลิตร
8. ขวดแก้ว Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร
9. เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Isotemp Digital Hot Plate/Stirrer, Thermo Fisher Scientific)
10. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
11. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Tomy รุ่น ES-315)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
13. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (YSI Model 60 Operations, USA)
14. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (NanoDropTM 2000 Thermo Fisher Scientific)
15. จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีฝาปิดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
16. ชุดกรองสุญญากาศ (Nalgene® DS0320-5045 Reusable Bottle Top Filter Holder, Polysulfone with 45 mm Neck Vacuum Adapter, 500mL; Thermo Scientific)
17. ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ (Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe Miniprep, Zymo Research)
18. ตะเกียงแอลกอฮอล์
19. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
20. ตู้แช่แข็งที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง -80 องศาเซลเซียส (Thermo Scientific รุ่น Forma 900)
21. ถังพลาสติก
22. ถังมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
23. แท่งแม่เหล็กกวนสาร
24. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
25. น้ำยา pH4 บัฟเฟอร์
26. น้ำยา pH7 บัฟเฟอร์
27. ปีมสุญญากาศ (Vacuubrand รุ่น ME1)
28. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
29. ปากคืบ
30. ฝาปิดจุ่มแบบใช้แล้วทิ้ง
31. ไฟแช็ค
32. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson)
33. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson)
34. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
35. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)

36. สารละลายเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์)
37. เสื่อกาวน
38. หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื่อกาวน ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
 2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการปรับ pH กับตัวอย่างน้ำผิวดิน โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
 3. นำตัวอย่างน้ำผิวดินที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส ออกมาวางบนโต๊ะประมาณ 30 นาทีเพื่อให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง
 4. นำตัวอย่างน้ำผิวดินมาทำการเขย่าให้เข้ากัน เป็นจำนวน 20 ครั้ง
 5. เทตัวอย่างน้ำผิวดินที่ทำการเขย่าให้เข้ากัน 1 ลิตร ลงใน ขวดแก้ว Duran ขนาด 1000 มิลลิลิตร
 6. ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสารลงใน ขวดแก้ว Duran ขนาด 1000 มิลลิลิตรที่มีน้ำผิวดินและนำวางลงบนเครื่องกวนสารให้ความร้อน (Isotemp Digital Hot Plate/Stirrer, Thermo Fisher Scientific) หลังจากนั้นหมุนปุ่มกวนสาร
 7. จุ่มเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (YSI Model 60 Operations, USA) ลงใน น้ำยา pH4 บัฟเฟอร์ และ น้ำยา pH7 บัฟเฟอร์ เพื่อทำการ calibrate เครื่องก่อนนำไปจุ่มในตัวอย่างน้ำผิวดิน
 8. จุ่มเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (YSI Model 60 Operations, USA) ลงในน้ำผิวดิน และทำการปรับ pH ของน้ำผิวดินให้เป็น pH 3.5 ถ้าจุ่มเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่างลงในน้ำผิวดินแล้วได้ค่า pH เป็น 7 ให้ใส่ 2N กรดไฮโดรคลอริก (HCL) 1 หยดจนกระทั่ง pH เป็น 3.5 แต่ถ้าจุ่มเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่างลงในน้ำผิวดินแล้วได้ค่า pH เป็น 4 ให้ใส่ 2N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 หยดจนกระทั่ง pH เป็น 3.5
- เมื่อทำการ ปรับ pH ของตัวอย่างได้เป็น 3.5 เรียบร้อยแล้ว ให้นำ probe ในการวัด pH จุ่มลงใน สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจุ่มลงในน้ำยา pH4 บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที
9. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
 10. ทำการประกอบชุดกรองสุญญากาศ เพื่อเตรียมวางกระดาษกรอง
 11. นำไฟแช็คมาจุดตะเกียงแอลกอฮอล์ และใช้ปากคีบจุ่มสารละลายเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์) ทำการลนไฟ ทิ้งปากคีบไว้สักพักให้เย็นตัว
 12. หลังจากนั้นใช้ปากคีบ คีบกระดาษกรอง MFTM Memberane Filters, 0.45 μ m HA (Merck Millipore Ltd) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางบนที่วางกระดาษกรองในชุดกรอง ประกอบชุดกรองกับขวดแก้ว Duran และปั๊มสุญญากาศ
 13. นำตัวอย่างน้ำผิวดินที่ทำการปรับ pH เป็นที่เรียบร้อยแล้ว มาเขย่าอย่างแรงจำนวน 20 ครั้งเพื่อให้เข้ากัน และเทน้ำผิวดินปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงในถ้วยรับน้ำของชุดกรอง เปิดปั๊มสุญญากาศ รอจนน้ำถูกกรองจนหมด ปิดปั๊มสุญญากาศ
 14. ใช้ปากคีบจุ่มสารละลายเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์) ทำการลนไฟ ทิ้งปากคีบไว้สักพักให้เย็นตัว

15. ถอดส่วนประกอบของชุดกรอง ใช้เครื่องมือคีบ คีบกระดาษกรองบนชุดกรอง ออกมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีฝาปิดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
16. นำกรรไกรจุ่มสารละลายเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์) ทำการลนไฟ ทิ้งกรรไกรไว้สักพักให้เย็นตัว
17. หลังจากนั้นทำการกรองตัวอย่างผิวดินครึ่งละ 250 มิลลิลิตรลงบนกระดาษกรอง จนกระทั่งน้ำผิวดินหมด 1 ลิตร
18. นำกรรไกรมาตัดกระดาษกรองที่วางไว้ให้มีขนาดเล็กชิ้นละประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร นำชิ้นกระดาษกรองที่ถูกตัดมาใส่ลงในชุดสกัดสารดีเอ็นเอ ในหลอด ZR BashingBead™ Lysis
19. นำถุงมือ ใส่ลงในถุงพลาสติกที่เตรียมไว้เพื่อรวบรวมน้ำทิ้ง ควรเปลี่ยนถุงมือทุกครั้งเมื่อเริ่มทำตัวอย่างใหม่
20. เติมสารละลาย BashingBead™ buffer ลงในหลอด ZR BashingBead™ Lysis ที่ปริมาตร 750 ไมโครลิตร
21. หลังจากนั้นนำหลอด ZR BashingBead™ Lysis ไปผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 20 นาที
22. นำหลอด ZR BashingBead™ Lysis ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
23. ทำการดูดสารละลายส่วนใส เป็นปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ III-F Filter ที่สวมด้วยหลอด Collection Tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
24. เติมสารละลาย Genomic lysis buffer ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตรลงในสารละลายที่ตกลงมาในหลอด Collection Tube
25. ทำการดูดสารละลายในหลอด Collection Tube เป็นปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Zymo-Spin™ IIC ที่สวมด้วยหลอด Collection Tube
26. นำหลอด Zymo-Spin™ IIC ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
27. เทสารละลายที่ตกลงมาในหลอด Collection Tube ที่ทิ้ง แล้วนำหลอด Collection Tube สวมได้หลอด Zymo-Spin™ IIC อย่างเดิม
28. ทำซ้ำข้อ 25-27
29. เติม DNA Pre-Wash Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IIC ที่สวมด้วยหลอด Collection Tube หลอดใหม่
30. นำหลอด Zymo-Spin™ IIC ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
31. เติม g-DNA Wash Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IIC
32. นำหลอด Zymo-Spin™ IIC ใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
33. หลังจากนั้น ย้ายหลอด Zymo-Spin™ IIC ออกจาก Collection Tube เดิม และนำไปสวมกับหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
34. หลังจากนั้น ใส่ DNA Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลอด Zymo-Spin™ IIC ทำการปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอตกลงมาที่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ทางด้านล่าง
35. ทำซ้ำข้อ 28 เพื่อให้ได้ปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น
36. นำสารละลายดีเอ็นเอในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์มาใส่ใน Zymo-Spin™ III-HRC Spin Filter ที่เตรียมแล้ว ทำการสวมหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 3 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอสุดท้ายตกลงมาในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์สำหรับการทดลองต่อไป
37. ทำการวัดดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
38. ใช้ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง เขียนจดบันทึก ชื่อตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดข้างหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
39. เก็บหลอดบรรจุดีเอ็นเอที่สกัดเรียบร้อยแล้วลงในกล่องบรรจุดีเอ็นเอ และเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
40. ถุงมือ และวัสดุต่างๆที่สัมผัสตัวอย่างมูลสัตว์จะถูกกำจัดอย่างถูกวิธีตามสถานที่นั้นๆกำหนด

ภาคผนวก ข15. เทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดต่างๆ
สำหรับตัวอย่างน้ำผิวดิน

อุปกรณ์และวัสดุ

1. iTaq Universal Probes Supermix (2X) (Bio-Rad)
2. กระดาษทิชชู
3. ถังใส่น้ำแข็ง
4. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
7. เครื่องพีซีอาร์เชิงปริมาณ (StepOnePlus™ Real-Time PCR; Applied Biosystems™)
8. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
9. ตู้ปลอดเชื้อ Biological Safety Cabinet Class II
10. ตู้เย็นแช่ตัวอย่าง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส
11. ถาดรักษาความเย็นสำหรับหลอดพีซีอาร์ อุณหภูมิ -20 °C
12. ถาดใส่หลอดพีซีอาร์สำหรับลงเครื่อง (Applied Biosystems™)
13. ถังพลาสติก
14. ถุงมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
15. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 รอบ
16. น้ำแข็ง
17. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
18. ฝาพีซีอาร์ (MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips; Applied Biosystems™)
19. ฟิลเตอร์ทิว ขนาด 100 ไมโครลิตร (Mettler-Toledo Rainin)
20. ฟิลเตอร์ทิว ขนาด 20 และ 200 ไมโครลิตร (Axygen)
21. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Eppendorf)
22. ไมโครปิเปตต์ทิว ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Axygen)
23. ยางรัด
24. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
25. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
26. เสื้อกาวน์
27. หลอดพีซีอาร์ (MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL; Applied Biosystems™)
28. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
29. ออร์โตปิเปตต์ ขนาด 100 ไมโครลิตร (Mettler-Toledo Rainin)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อ Biological Safety Cabinet โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. เตรียม Master Mix ก่อนนำตัวอย่างเข้ามาเปิดในตู้ โดยใช้หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางด้านล่าง โดยใช้ไมโครปิเปตต์ที่ขนาดต่างๆ ให้เหมาะสมกับปริมาตรจำนวนปฏิกิริยาให้คำนวณจากจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1 ปฏิกิริยาเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปฏิกิริยา
iTaq Universal Probes Supermix (2X)	10 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.8 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.8 ไมโครลิตร
Fluorescent probe (10 ไมโครโมลาร์)	0.4 ไมโครลิตร
Bovine serum albumin (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	4 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	16 ไมโครลิตร

4. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
5. หลังจากนั้นเตรียมหลอดฟิชัวร์ (8-Tube Strip) ขนาด 0.1 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลอง วางบนถาดรักษาความเย็นที่มีอุณหภูมิไม่มากกว่า 4 °C ตลอดจนการทดลอง
6. ดูดสารจากหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างๆเรียบร้อยในปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดหลอดฟิชัวร์ที่เตรียมไว้
7. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
8. หลังจากนั้น ดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 4 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดฟิชัวร์ขนาด 0.1 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ เมื่อใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอครบแล้วทำการปิดฝาและผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร โดยใช้แรงเขย่าต่ำ
9. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก
10. หลังจากนั้นนำหลอดฟิชัวร์ไปใส่ในเครื่องมือฟิชัวร์เชิงปริมาณโดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	15 วินาที	40
60 องศาเซลเซียส	60 วินาที	

11. เมื่อได้ค่าเฉลี่ย Ct แล้วจะคำนวณปริมาณยีนจากสมการ $\log_{10} \text{concentration} = (Ct - b) / m$ เมื่อ b เป็นค่าตัดแกน Y ที่คำนวณจากค่า Ct ของตัวอย่างควบคุมเชิงบวก และ m คือ ค่าความชันเฉลี่ย (pooled slope) ที่ได้จากการพหุคูณ

ภาคผนวก ข16. เทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจวัดกลุ่มแบคทีเรียจำแนกแหล่งกำเนิดต่างๆ สำหรับตัวอย่างน้ำผิวดิน

อุปกรณ์และวัสดุ

1. 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร)
2. 1X TAE บัฟเฟอร์ (50X TAE buffer: 242 กรัม tris base, 57 กรัม glacial acetic acid, 100 ไมโครลิตร
3. DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)
4. Forward primer (ตามแหล่งกำเนิดที่ต้องการตรวจวัด)
5. Reverse primer (ตามแหล่งกำเนิดที่ต้องการตรวจวัด)
6. กระดาษทิชชู
7. กล้องใส่น้ำแข็ง
8. เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie 2; Scientific Industries)
9. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Doc XR System)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge; Eppendorf รุ่น minispin plus)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (TT-6000 Mini-Centrifuge)
12. เครื่องพีซีอาร์ (Thermo cycler; Eppendorf)
13. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid®-exU)
14. ตะแกรงพลาสติกใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
15. ถังพลาสติก
16. ถังมือลาเท็กซ์ชนิดใช้แล้วทิ้ง
17. น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
18. น้ำแข็ง
19. ปากกาที่ใช้ในการระบุตัวอย่าง
20. แผ่นพาราฟิล์ม
21. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 20 และ 200 ไมโครลิตร (Gilson)
22. ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร (Gilson)
23. ยางรัด
24. สารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอ (Ethidium bromide)
25. สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอ (100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific™)
26. สารละลาย RNase AWAY® Surface Decontaminant (Molecular BioProducts)
27. สารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์)
28. สี (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific™)
29. เสื้อกาวน์
30. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
31. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Corning incorporated)
32. อะกาโรสเจล (3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล: 3 กรัม อะกาโรส ผสมลงใน 1X TAE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)

วิธีวิจัย

1. ทำการสวมเสื้อกาวน์ ใส่ผ้าปิดจมูกและใส่ถุงมือในขณะที่ทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา
2. ทำความสะอาดพื้นผิวโต๊ะที่จะทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยฉีดด้วยสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง ตามด้วยสารละลาย RNase Away ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีแล้วใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้แห้ง
3. เตรียม Master Mix โดยใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรวางในตะแกรงวางหลอดที่แช่น้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อคงความเย็น ทำการผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังนี้ โดยใช้ ไมโครปิเปตต์ทิป ขนาด 2 และ 20 ไมโครลิตร จำนวนปฏิกิริยาให้คำนวณจากจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลองจริงและบวกเพิ่มอีก 1 ปฏิกิริยาเพื่อชดเชยปริมาตรที่อาจหายไปจากการปิเปต

สารที่ใช้ในการผสม	1 ปฏิกิริยา	ตัวอย่างการเตรียมสำหรับ 20 ปฏิกิริยา
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	5 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
น้ำที่ทำการผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	2 ไมโครลิตร	40 ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	8 ไมโครลิตร	160 ไมโครลิตร

4. ทำการผสมสารในหลอด Master Mix ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร
5. หลังจากนั้นเตรียมหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร จำนวนหลอดเท่าจำนวนปฏิกิริยาที่จะทดลอง วางบนถังที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่
6. ดูดสารจากหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทำการผสมสารต่างเรียบร้อยแล้วในปริมาตร 8 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้
7. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนใกล้ละลาย แล้วนำแช่น้ำแข็งเพื่อคงอุณหภูมิให้เย็น
8. ทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็น 10 นาโนกรัม ด้วยน้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยการคำนวณจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหลอดตัวอย่างดีเอ็นเอ
9. หลังจากนั้น ดูดแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 0.5 ไมโครลิตรที่มีสารละลาย Master Mix ผสมอยู่ ทำการผสมสารในหลอดด้วยเครื่องเขย่าสาร
10. นำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก
11. หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปใส่ในเครื่องมือพีซีอาร์โดยกำหนดการทำงานตามตารางดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	30
ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่เอามาตรวจสอบ	30-60 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1
4 องศาเซลเซียส	α	1

12. หลังจากนั้นเตรียม 3 เปอร์เซนต์ อะกาโรสเจล สำหรับในการแยกดีเอ็นเอขนาด 166 เบส ด้วยกระแสไฟฟ้า
13. เจลที่เตรียมไว้จะถูกวางลงใน 1 X TAE บัฟเฟอร์ ในเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
14. นำสารผสมที่ได้จากการทำพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 2 ไมโครลิตรบนแผ่นพาราฟิล์ม
15. ใส่สารเทียบขนาดของดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรในช่องแรกของเจลที่เราเตรียมไว้
16. ใส่สารละลายที่ผสมกันเรียบร้อยแล้วในข้อ 14 ลงในช่องเจลถัดมา
17. ตั้งค่าเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที
18. หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ในสารที่ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอเป็นเวลา 10 นาที
19. นำเจลออกจากการย้อมดีเอ็นเอ และวางบนเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล
20. เจลที่ทำการถ่ายภาพและวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว จะถูกนำไปกำจัดอย่างถูกวิธีโดยสถาบันนั้นๆ

ภาคผนวก ข17. ตัวอย่างควบคุมเชิงบวกและควบคุมเชิงลบในวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ

● วิธีพีซีอาร์

วิธีวิจัย

1. ตัวอย่างควบคุมเชิงบวกเตรียมจากการ clone ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับมัลติเมอร์ต่างๆ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากมัลติเมอร์ชนิดนั้นๆ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์
2. ทำการยืนยันลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบด้วยการ sequencing และทำการ blast ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อดูว่าเป็นดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่เราต้องการหรือไม่
3. ในการทำพีซีอาร์แต่ละครั้งจะทดสอบตัวอย่างควบคุมเชิงบวกด้วยดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการเตรียมในข้างต้นอย่างน้อย 1 ปฏิกิริยา เพื่อยืนยันว่าการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์มีความถูกต้อง
4. ตัวอย่างควบคุมเชิงลบคือปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะใส่น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทนที่ปริมาตรของดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อยืนยันว่าไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา โดยจะทำตัวอย่างควบคุมเชิงลบอย่างน้อย 1 ปฏิกิริยาต่อการทำพีซีอาร์

● วิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ

วิธีวิจัย

1. ตัวอย่างควบคุมเชิงบวกจะใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สังเคราะห์ขึ้นใน ภาคผนวก ข11. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงปริมาณ
2. การทำพีซีอาร์เชิงปริมาณแต่ละครั้งจะทดสอบตัวอย่างควบคุมเชิงบวกด้วยดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการสังเคราะห์อย่างน้อย 3 ปฏิกิริยา เพื่อยืนยันว่าการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์มีความถูกต้อง
3. ตัวอย่างควบคุมเชิงลบคือปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะใส่น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทนที่ปริมาตรของดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อยืนยันว่าไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา โดยจะทำตัวอย่างควบคุมเชิงลบอย่างน้อย 3 ปฏิกิริยาต่อการทำพีซีอาร์เชิงปริมาณ

ภาคผนวก ค. รายละเอียดตัวอย่างน้ำเสียอาคารและมูลสัตว์

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ชื่อฟาร์ม	ปริมาตรน้ำที่สกัด (มล.) หรือน้ำหนักสกัด (กรัม)	ปริมาตรน้ำยา ชะดีเอ็นเอ ออกจากชุด สกัด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ(นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)*
น้ำเสียอาคาร						
1	Sewage 1	จ. กรุงเทพฯ	อาคาร CRI	100 มล.	50+50	36.1, 23.6
2	Sewage 2	จ. กรุงเทพฯ	โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์	100 มล.	50+50	30.1, 28.2
3	Sewage 19	จ. กรุงเทพฯ	น้ำเข้าโรงพยาบาลใต้-เก่า 106-1	100 มล.	50+50	175.3, 75.8
4	Sewage 20	จ. กรุงเทพฯ	น้ำเข้าโรงพยาบาลนครธน 106-2	100 มล.	50+50	93.6, 49.5
5	Sewage 21	จ. กรุงเทพฯ	น้ำเข้าโรงพยาบาลบางแคใหม่ 106-3	100 มล.	50+50	50.6, 38.8
6	Sewage 22	จ. กรุงเทพฯ	น้ำเข้าโรงพยาบาลบางแค 14 ชั้น 106-4	100 มล.	50+50	282,135.70
7	Sewage 23	จ. ชัยนาท	น้ำโรงเรียนเทศบาลท่าพระ	50 มล.	50+50	222.9, 109.3
8	Sewage 24	จ. ชัยนาท	น้ำโรงเรียนเทศบาลบ้านกล้วย	50 มล.	50+50	157. 1,81.3
9	Sewage 25	จ. ชัยนาท	ศูนย์การศึกษาพิเศษ	150 มล.	50+50	64.3, 49.3
10	Sewage 26	จ. ชัยนาท	โรงเรียนเทศบาลวัดห้วยยาง	50 มล.	50+50	176.4, 79.9
11	Sewage 27	จ. ชัยนาท	สำนักงานเทศบาล อำเภอเมือง	50 มล.	50+50	173.9, 98.6
12	Sewage 28	จ. สมุทรสาคร	สำนักงานเทศบาล ตำบลบางปลา	50 มล.	50+50	84.7, 30
13	Sewage 29	จ. สมุทรสาคร	โรงเรียนอนุบาลเทศบาลตำบลบางปลา	50 มล.	50+50	40.3
14	Sewage 30	จ. สมุทรสาคร	ศูนย์พัฒนาเด็กเล็ก	50 มล.	50+50	52.7
15	Sewage 31	จ. สมุทรสาคร	อพาร์ทเมนต์เพิ่มบุญ	50 มล.	50+50	150. 1,48.5
16	Sewage 32	จ. สมุทรสาคร	โรงเรียนมัธยมสมุทรสาครวุฒิชัย	50 มล.	50+50	41.7, 33.9
17	Sewage 33	จ. สุพรรณบุรี	กิตติธอร์ อพาร์ทเมนต์	50 มล.	50+50	51.3, 37.1
18	Sewage 34	จ. สุพรรณบุรี	บ้านป่าแปด	50 มล.	50+50	96, 34.7
19	Sewage 35	จ. สุพรรณบุรี	ศิริมงคลเพชร อพาร์ทเมนต์	50 มล.	50+50	35.8, 34.4
20	Sewage 36	จ. สุพรรณบุรี	พิศารุทธิ์ อพาร์ทเมนต์	50 มล.	50+50	32.3, 30.0
21	Sewage 37	จ. สุพรรณบุรี	สำนักงานเทศบาล อำเภอเมือง	50 มล.	50+50	28.4, 27
22	Sewage 38	จ. นครปฐม	โรงเรียนเทศบาล 2	50 มล.	50+50	161, 93
23	Sewage 39	จ. นครปฐม	โรงเรียนเทศบาล 1	50 มล.	50+50	36, 25.1
24	Sewage 40	จ. นครปฐม	กสน.	50 มล.	50+50	95, 39.1
25	Sewage 41	จ. นครปฐม	โรงเรียนเทศบาล 3	50 มล.	50+50	33.8, 26.2
26	Sewage 42	จ. นครปฐม	ศูนย์เด็กเล็ก	50 มล.	50+50	60.2, 32.1
27	Sewage 43	จ. กรุงเทพฯ	โรงพยาบาลวิภาวดี	100 มล.	50+50	151.9, 67.3
28	Sewage 44	จ. กรุงเทพฯ	โรงพยาบาลเปาโล	100 มล.	50+50	343.4, 128.5
29	Sewage 45	จ. กรุงเทพฯ	โรงพยาบาลพระชาชีวะ	100 มล.	50+50	310.4, 156.3

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ชื่อฟาร์ม	ปริมาณน้ำที่สกัด (มล.) หรือน้ำหนักสกัด (กรัม)	ปริมาณน้ำยา อะซีโตนเอ ออกจากชุด สกัด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น เอีโนเอ(นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร)*
สุกร						
1	P9	จ.นครปฐม	ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน	0.19	50+50	28.7, 15.7
2	P14	จ.นครปฐม	ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาฯ	0.14	50+50	27.0, 20.1
3	P17	จ.นครปฐม	ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาฯ	0.18	50+50	47.0, 32.5
4	PP19	จ.นครปฐม	ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน	0.15	50+50	38.2, 21.7
5	PP18	จ.นครปฐม	ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน	0.19	50+50	63.0, 36.8
6	PP21	จ. อุดรธานี	บุญส่งฟาร์ม	0.15	50+50+50	51.6
7	PP22	จ. อุดรธานี	บุญส่งฟาร์ม	0.15	50+50+50	49.3
8	PP23	จ. อุดรธานี	บุญส่งฟาร์ม	0.15	50+50+50	48.7
9	PP24	จ. อุดรธานี	จรัสฟาร์ม	0.15	50+50+50	76.8
10	PP27	จ. อุดรธานี	พรทิพย์ฟาร์ม	0.15	50+50+50	27.8
11	PP30	จ. ปทุมธานี	พรชัยฟาร์ม	0.15	50+50+50	78.4
12	PP31	จ. ปทุมธานี	พรชัยฟาร์ม	0.15	50+50+50	61
13	PP32	จ. ปทุมธานี	พรชัยฟาร์ม	0.15	50+50+50	33
14	PP33	จ.ชัยนาท	บำรุงฟาร์ม	0.15	50+50	283.1, 102.3
15	PP34	จ. สุพรรณบุรี	สวิกฟาร์ม	0.15	50+50	133.4, 60.1
16	PP35	จ. สุพรรณบุรี	พอฟาร์ม	0.15	50+50	170.9, 82.1
17	PP36	จ. สุพรรณบุรี	พอฟาร์ม	0.15	50+50	139.4, 60.1
18	PP37	จ. สุพรรณบุรี	พอฟาร์ม	0.15	50+50	153.7, 65.1
19	PP38	จ. สุพรรณบุรี	พอฟาร์ม	0.15	50+50	155.3, 81.1
20	PP39	จ. สุพรรณบุรี	ประวิทย์ฟาร์ม	0.15	50+50	172.5, 55.2
21	PP40	จ.ชัยนาท	พัฒนาฟาร์ม	0.15	50+50	241.9, 162.9
22	PP41	จ. สุพรรณบุรี	พรเทพฟาร์ม	0.15	50+50	501.1, 273.3
23	PP42	จ. สุพรรณบุรี	ประยงค์ฟาร์ม	0.15	50+50	444.5, 232.9
24	PP43	จ. สุพรรณบุรี	สุรัตน์ฟาร์ม	0.15	50+50	341.2, 162.0
25	PP44	จ. สุพรรณบุรี	สุชาติฟาร์ม	0.15	50+50	224.6, 107.8
26	PP45	จ. สุพรรณบุรี	มัลลิกาฟาร์ม	0.15	50+50	323.1, 120.5
27	PP46	จ. นครปฐม	รัตน์ฟาร์ม	0.15	50+50	144.5, 83.4
28	PP47	จ. นครปฐม	อมรฟาร์ม	0.15	50+50	348.2, 121.7
29	PP48	จ. นครปฐม	สายรุ้งฟาร์ม	0.15	50+50	241.6, 90.0
30	PP49	จ. นครปฐม	เนียนฟาร์ม	0.15	50+50	161.3, 70.8
31	PP50	จ. นครปฐม	คำรณฟาร์ม	0.15	50+50	303.4, 154.3
32	PP51	จ. นครปฐม	สุดยอดฟาร์ม	0.15	50+50	186.0, 93.5
33	PP52	จ. นครปฐม	สมใจฟาร์ม	0.15	50+50	271.4, 109.6

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ชื่อฟาร์ม	ปริมาณน้ำ ที่สกัด (มล.) หรือน้ำหนัก สกัด (กรัม)	ปริมาณน้ำยา อะซีเอโนเอ ออกจากชุด สกัด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น เอโนเอ(นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร)*
โค						
1	PCOW11	จ. นครปฐม	ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาฯ	0.16	50+50	32.0, 15.9
2	PCOW12	จ. นครปฐม	ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน	0.17	50	40.4, 20.9
3	PCOW13	จ. นครปฐม	ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน	0.15	50	38.8, 20.7
4	PCOW14	จ. ปทุมธานี	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี	0.15	50+50+50	67.2
5	PCOW15	จ. กรุงเทพฯ	โรจนาโคมนวนจิตลดา	0.15	30+30	37.7
6	PCOW16	จ. นครปฐม	บ้านเจ็ดฟาร์ม	0.15	50+50+50	57.4
7	PCOW17	จ. นครปฐม	สมบัติฟาร์ม	0.15	50+50+50	55.9
8	PCOW19	จ. นครปฐม	ธนชัยฟาร์ม	0.15	50+50+50	58.1
9	PCOW20	จ. นครปฐม	นิคมฟาร์ม	0.15	50+50+50	67.1
10	PCOW21	จ. อุดรธานี	รุ่งโรจน์ฟาร์ม	0.15	50+50+50	126.6
11	PCOW22	จ. ปทุมธานี	สุรพลฟาร์ม	0.15	50+50+50	50.4
12	PCOW23	จ. ปทุมธานี	อิสซอสฟาร์ม	0.15	50+50+50	39.4
13	PCOW24	จ. ชัยนาท	อันชันฟาร์ม	0.15	50+50	160.5, 79.1
14	PCOW25	จ. ชัยนาท	ลากฟาร์ม	0.15	50+50	103, 43.3
15	PCOW26	จ. สุพรรณบุรี	สำเร็จฟาร์ม	0.15	50+50	148.4, 73.2
16	PCOW27	จ. สุพรรณบุรี	สวาดฟาร์ม	0.15	50+50	184.7, 89.3
17	PCOW28	จ. สุพรรณบุรี	เขียวฟาร์ม	0.15	50+50	154.3, 63.6
18	PCOW29	จ. สุพรรณบุรี	ธเนศฟาร์ม	0.15	50+50	133.5, 83.4
19	PCOW30	จ. สุพรรณบุรี	ปัญญาฟาร์ม	0.15	50+50	125.1, 52.1
20	PCOW31	จ. สุพรรณบุรี	สำเนียงฟาร์ม	0.15	50+50	120.9, 96.4
21	PCOW32	จ. สุพรรณบุรี	กลิ้งฟาร์ม	0.15	50+50	305.2, 141.9
22	PCOW33	จ. สุพรรณบุรี	กลิ้งฟาร์ม	0.15	50+50	67.9, 31.6
23	PCOW34	จ. สุพรรณบุรี	สมใจฟาร์ม	0.15	50+50	262.3, 110.3
24	PCOW35	จ. สุพรรณบุรี	สง่าฟาร์ม	0.15	50+50	217.2, 77.4
25	PCOW36	จ. สุพรรณบุรี	เต็มชัยฟาร์ม	0.15	50+50	234.1, 129.2
26	PCOW37	จ. สุพรรณบุรี	วิชัยฟาร์ม	0.15	50+50	202.4, 123.4
27	PCOW38	จ. สุพรรณบุรี	เพลินฟาร์ม	0.15	50+50	78.7, 39.4
28	PCOW39	จ. สุพรรณบุรี	พินิจฟาร์ม	0.15	50+50	265.0, 128.5
29	PCOW40	จ. สุพรรณบุรี	เฉลิมฟาร์ม	0.15	50+50	223.1, 121.2
30	PCOW41	จ. ชัยนาท	เฉลาฟาร์ม	0.15	50+50	126.8, 55.4
31	PCOW42	จ. ชัยนาท	ประนัยฟาร์ม	0.15	50+50	124.2, 55.8
	(ผสมสองฟาร์ม)	จ. ชัยนาท	สมเกียรติฟาร์ม			
32	PCOW43	จ. ชัยนาท	มณเฑียรฟาร์ม	0.15	50+50	151.0, 78.8
33	PCOW44	จ. นครปฐม	สน่ห์ฟาร์ม	0.15	50+50	175.0, 71.5
34	PCOW45	จ. นครปฐม	รัตนฟาร์ม	0.15	50+50	171.1, 55.1

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ชื่อฟาร์ม	ปริมาณน้ำที่สกัด (มล.) หรือน้ำหนักสกัด (กรัม)	ปริมาณน้ำยาอะดีเอ็นเอออกจากชุดสกัด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ(นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)*
ไก่						
1	PCH1	จ. นครปฐม	ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาฯ	0.17	50	30.1, 15.8
2	PCH2	จ. ปทุมธานี	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี	0.15	50+50+50	77.2
3	PCH3	จ. ปทุมธานี	แสงประไพฟาร์ม	0.15	50+50+50	24.5
4	PCH4	จ. สุพรรณบุรี	ประเสริฐฟาร์ม	0.15	50+50	30.6, 24.9
5	PCH5	จ. สุพรรณบุรี	สุรินทร์ฟาร์ม	0.15	50+50	151.1, 64.7
6	PCH6	จ. สุพรรณบุรี	ทมฟาร์ม	0.15	50+50	31.6, 28.7
7	PCH7	จ. สุพรรณบุรี	วินด์ฟาร์ม	0.15	50+50	136.6, 72.0
8	PCH8	จ. สุพรรณบุรี	ลัดดาฟาร์ม	0.15	50+50	32.6, 20.9
9	PCH9	จ. สุพรรณบุรี	ไธ่ฟาร์ม	0.15	50+50	65.7, 39.4
10	PCH10	จ. สุพรรณบุรี	ทัดดาวฟาร์ม	0.15	50+50	55.0, 34.4
11	PCH11	จ. สุพรรณบุรี	ประไพฟาร์ม	0.15	50+50	11.5, 3.7
12	PCH12	จ. สุพรรณบุรี	อานันต์ฟาร์ม	0.15	50+50	5.9, 0
13	PCH13	จ. สุพรรณบุรี	เจริญฟาร์ม	0.15	50+50	4.6, -0.8
14	PCH14	จ. ชัยนาท	ชุ่มหนองจิก	0.15	50+50	140.0, 82.9
15	PCH15	จ. ชัยนาท	พัฒนาฟาร์ม	0.15	50+50	30.6, 21.3
16	PCH16	จ. นครปฐม	สายรุ้งฟาร์ม	0.15	50+50	130.2, 65.9
17	PCH17	จ. นครปฐม	เนี่ยนฟาร์ม	0.15	50+50	173.5, 77.3
18	PCH18	จ. นครปฐม	สุดยอดฟาร์ม	0.15	50+50	27.0, 22.6
19	PCH19	จ. นครปฐม	สุดยอดฟาร์ม	0.15	50+50	31.1, 28.1
20	PCH20	จ. นครปฐม	สมใจฟาร์ม	0.15	50+50	26.5, 21.5
21	PCH21	จ. นครปฐม	ประเสริฐฟาร์ม	0.15	50+50	97.6, 49.4
22	PCH22	จ. นครปฐม	วิไลวรรณฟาร์ม	0.15	50+50	29.4, 19.6
23	PCH23	จ. นครปฐม	นิตฟาร์ม	0.15	50+50	148.8, 73.5
แพะ						
1	PG1	จ. นครปฐม	ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาฯ	0.17	50	68.9, 22.1
2	PG2	จ. นครปฐม	ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาฯ	0.15	50	22.1, 18.1
3	PG3	จ. ปทุมธานี	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี	0.15	50+50+50	99.5
4	PG4	จ. ปทุมธานี	สุรพลฟาร์ม	0.15	50+50+50	68.6
5	PG5	จ. ปทุมธานี	ชากริฟาร์ม	0.15	50+50+50	92
6	PG6	จ. สุพรรณบุรี	ทรัพย์สมบูรณ์ฟาร์ม	0.15	50+50	175.6, 76.1
7	PG7	จ. สุพรรณบุรี	M&D ฟาร์ม	0.15	50+50	179.2, 66.4
8	PG8	จ. ชัยนาท	ฟาร์ม	0.15	50+50	54.4, 24.4
9	PG9	จ. ชัยนาท	วีรเทพฟาร์ม	0.15	50+50	133.4, 81.0
10	PG10	จ. นครปฐม	จงฟาร์ม	0.15	50+50	264.0, 134.4

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ชื่อฟาร์ม	ปริมาณน้ำที่สกัด (มล.) หรือน้ำหนักสกัด (กรัม)	ปริมาณน้ำยาอะดีเอ็นเอออกจากชุดสกัด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ(นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)*
แกะ						
1	PS1	จ. สุพรรณบุรี	ทรัพย์สมบูรณ์ฟาร์ม	0.15	50+50	209.3, 92.2
2	PS2	จ. ชัยนาท	ฟาร์ม	0.15	50+50	124.7, 61.1
3	PS3	จ. สุพรรณบุรี	ประกอบกิจฟาร์ม	0.15	50+50	98.4, 50
4	PS4	จ. ชัยนาท	มณฑะยารฟาร์ม	0.15	50+50	172.9, 83.9
5	PS5	จ. ชัยนาท	จิระฟาร์ม	0.15	50+50	115.8, 50.8
กระบือ						
1	PBUF1	จ. อุดรธานี	รุ่งโรจน์ฟาร์ม	0.15	50+50+50	86.1
2	PBUF2	จ. ชัยนาท	ปัญญาฟาร์ม	0.15	50+50	153.4, 69.2
3	PBUF3	จ. ชัยนาท	อุมารณฟาร์ม	0.15	50+50	115, 49.1
4	PBUF4	จ. ชัยนาท	อุเทนฟาร์ม	0.15	50+50	88.3, 35.6
5	PBUF5	จ. สุพรรณบุรี	เกษมฟาร์ม	0.15	50+50	93.9, 30.9
6	PBUF6	จ. ชัยนาท	สุรศักดิ์ฟาร์ม	0.15	50+50	158.0, 68.4
เป็ด						
1	PDU1	จ. สุพรรณบุรี	ประสิทธิ์ฟาร์ม	0.15	50+50	25.2, 24.6
2	PDU2	จ. สุพรรณบุรี	ทำนองฟาร์ม	0.15	50+50	17.8, 15.2
3	PDU3	จ. ชัยนาท	จอมฟาร์ม	0.15	50+50	31.9, 27.7
4	PDU4	จ. นครปฐม	รอนฟาร์ม	0.15	50+50	70.9, 37.6
5	PDU5	จ. นครปฐม	วิเชียรฟาร์ม	0.15	50+50	88.4, 44.5

หมายเหตุ *ความเข้มข้นดีเอ็นเอในดีเอ็นเอสกัดหลอดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ภาคผนวก ง. ข้อมูลการใช้ไพรเมอร์ในงานวิจัยอื่นๆ

ชนิด แหล่งกำเนิด	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	เอกสารอ้างอิง	พื้นที่ที่ทดสอบ	ประเภทการ ทดสอบ	ความไว (จำนวน ตัวอย่างที่ทดสอบ)	ความจำเพาะ (จำนวนตัวอย่างที่ ทดสอบ)	ประเภทแหล่งกำเนิดที่ทดสอบ	เทคนิค วิเคราะห์
รวมทุก แหล่งกำเนิด (Universal)	BacUni-520f/BacUni-690r1	BT5479/BT5480	Kildare et al., 2007	California , USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 73)	ไม่มี	Human, Cow, Horse, Dog, Cat, Seagull, Wastewater	PCR
			Ahmed et al., 2009	Southeast Queensland, Australia	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 50)	ไม่มี	Human feces , Cattle, Pigs, Sheep, Goat, Horses, Chickens, Dogs, Ducks, Pelicans, Kangaroos	PCR
	GenBactF3/GenBactR4	BT5482/BT5483	Siefring et al., 2008	Mexico	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	ไม่มี	ไม่มี	Surface water	qPCR
			Lee et al., 2010	Southern Ontario, Canada	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 70)	ไม่มี	Human, Cow, Pig, Dear, Horse, Dog, Cat, Gull, Raccoon, Goose	PCR
	Bac32F/Bac708R	BT5524/BT5492	Bernhard and Field, 2000b	Oregon, USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 35)	ไม่มี	Human, Sewage, Cow	PCR
			Carson et al., 2005	Columbia, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	89% (ตัวอย่างมูล; 286)	ไม่มี	Human, Sewage, Dog, Beef cattle, Dairy cattle, Chicken, Turkey, Horse, Swine, Goose	PCR
			Toledo-Hernandez et al., 2013	Puerto Rico, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	96% (น้ำระบบบำบัดน้ำเสีย; 16)	ไม่มี	Wastewater treatment plant	PCR
	ชุมชน	BacHum-160f/BacHum-241r	BT5488/BT5489	Kildare et al., 2007	California , USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	67% (ตัวอย่างมูล; 18); 100% (ตัวอย่างน้ำเสีย; 14)	97% (ตัวอย่างมูล; 41)	Sewage, Human feces, Cow, Horse, Dog, Cat, Gull
Jenkins et al., 2009				Kenya	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	25% (ตัวอย่างมูล; 12); 0% (ตัวอย่างน้ำเสีย; 5)	100% (ตัวอย่างมูล; 25)	Sewage, Human feces, Cow, Donkey	qPCR
Lee et al., 2010				Southern Ontario, Canada	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 16)	81.5% (ตัวอย่างมูล; 54)	Human, Cow, Pig, Dear, Horse, Dog, Cat, Gull, Raccoon, Goose	PCR

ชนิด แหล่งกำเนิด	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	เอกสารอ้างอิง	พื้นที่ที่ทดสอบ	ประเภทการ ทดสอบ	ความไว (จำนวน ตัวอย่างที่ทดสอบ)	ความจำเพาะ (จำนวนตัวอย่างที่ ทดสอบ)	ประเภทแหล่งกำเนิดที่ทดสอบ	เทคนิค วิเคราะห์
ชุมชน (ต่อ)	BacHum-160f/BacHum-241r (ต่อ)	BT5488/BT5489	Silkie and Nelson, 2009	California , USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 12)	70% (ตัวอย่างมูล; 41)	Sewage, Dog, Cow, Horse, Canada geese	qPCR
			Jenkins et al., 2009	Kenya	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	11% (ตัวอย่างน้ำเสีย; 18)	ไม่มี	River water	qPCR
			Sauer et al., 2011	Wisconsin, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	57% (ตัวอย่างน้ำเสีย; 828)	ไม่มี	Storm water	qPCR
			Bambic et al., 2015	California , USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	88% (ตัวอย่างน้ำเสีย; 73)	ไม่มี	Surface water and storm water	qPCR
	HF183/BFDrev	BT5493/BT5494	Haugland et al. 2010	—	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	ไม่มี	ไม่มี	Cow,pig, chicken, dog and cat	qPCR
	HF183F/Bac708R	BT5492/BT5493	Bernhard and Field, 2000a	Oregon, USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	87.5% (ตัวอย่างมูล; 16)	100% (ตัวอย่างมูล; 27)	Cat, Deer, Dog, Duck, Elk, Goat, Llama, Pig, Seagull, Sheep, Human feces	PCR
			Ahmed et al., 2008	Southeast Queensland, Australia	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 52)	100% (ตัวอย่างมูล; 207)	Sewage, Ducks, Kangaroos, Cattle, Horses, Dogs, Chickens, Pigs, Pelican, Goat, Deer, Wild birds, Sheep	PCR
			Ahmed et al., 2009	Southeast Queensland, Australia	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 50)	99% (ตัวอย่างมูล; 136)	Human Feces , Cattle, Pigs, Sheep, Goat, Horses, Chickens, Dogs, Ducks, Pelicans, Kangaroos	qPCR
			Ahmed et al., 2009	Southeast Queensland, Australia	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	97% (น้ำระบบบำบัดน้ำ เสีย; 32)	99.9% (น้ำระบบ บำบัดน้ำเสีย; 50)	Human sewage, Cattle, Pigs, Sheep, Dogs, Ducks	qPCR

ชนิด แหล่งกำเนิด	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	เอกสารอ้างอิง	พื้นที่ทดสอบ	ประเภทการ ทดสอบ	ความไว (จำนวน ตัวอย่างที่ทดสอบ)	ความจำเพาะ (จำนวนตัวอย่างที่ ทดสอบ)	ประเภทแหล่งกำเนิดที่ทดสอบ	เทคนิค วิเคราะห์
ชุมชน	HF183F/Bac708R	BT5492/BT5493	Layton et al., 2013	California , USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	75% (ตัวอย่างมูล; 84)	96% (ตัวอย่างมูล; 182)	Chicken, Cow, Dog, Deer, Goose, Gull, Horse, Human, Pig	qPCR
			Ballesté et al., 2010	France; United Kingdom; Cyprus; Sweden	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	50% (ตัวอย่างมูล; 40)	71% (ตัวอย่างมูล; 73)	Human, Cow, Poultry, Swine	PCR
			Gómez-Doñate et al., 2016	Catalonia , Spain	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 11)	20% (ตัวอย่างมูล; 33)	Human fecal, Poultry, Pig, Cattle	qPCR
			Nshimimana et al., 2014	Singapore	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	93% (น้ำระบบบำบัดน้ำเสีย; 54)	ไม่มี	Reservoir and Catchment water	qPCR
			Chase et al., 2012	Pasco, Washington, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	34% (น้ำระบบบำบัดน้ำเสีย; 35)	ไม่มี	River water	qPCR
			Gourmelon et al., 2007	France	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	98% (น้ำระบบบำบัดน้ำเสีย; 44)	94% (น้ำระบบบำบัดน้ำเสีย; 86)	Cow, Sheep, Pig, Duck, Seabird, Human	PCR
			Gourmelon et al., 2007	France	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (น้ำระบบบำบัดน้ำเสีย; 11)	100% (น้ำระบบบำบัดน้ำเสีย; 10)	Waste effluents	PCR
หมู	Pig-2-Bac41F/Pig-2-Bac163Rm	BT5931/BT5932	Mieszkin et al., 2009	Brittany, France	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 25)	100% (ตัวอย่างมูล; 54)	Human, Bovine, Horse, Sheep, Pig	qPCR
			Pourcher et al., 2010	Brittany, France	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 2); 100% (น้ำระบบบำบัดน้ำเสีย; 6)	100% (ตัวอย่างมูล; 2); 100% (น้ำระบบบำบัดน้ำเสีย; 6)	Pig, Bovine, Wastewater	qPCR
			Gómez-Doñate et al., 2016	Spain	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 12)	50% (ตัวอย่างมูล; 32)	Human fecal, Poultry, Pig, Cattle	qPCR
	PF163F/Bac708R	BT5491/BT5492	Dick et al., 2005	Cincinnati, Ohio	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	95% (ตัวอย่างมูล; 20)	ไม่มี	Horse, Cow, Elk, Sheep, Deer, Dog, Cat, Human, Gull, Chicken, Pig	PCR
			Fremaux et al., 2009	Canada	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 50)	100% (ตัวอย่างมูล; 161)	Cow, Pig, Chicken, Goat, Moose, Deer, Caribou, Bison, Goat,	PCR
			Hussein et al., 2014	United Kingdom	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (น้ำเสีย; 2)	100% (น้ำเสีย; 2)	Beach water	PCR

ชนิด แหล่งกำเนิด	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	วรรณกรรมอ้างอิง	พื้นที่ที่ทดสอบ	ประเภทการ ทดสอบ	ความไว (จำนวน ตัวอย่างที่ทดสอบ)	ความจำเพาะ (จำนวนตัวอย่างที่ ทดสอบ)	ประเภทแหล่งกำเนิดที่ทดสอบ	เทคนิค วิเคราะห์
โค	Bac2F/Bac2R	BT5868/BT5869	Shanks et al., 2006	Kentucky, USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	ไม่มี	100% (ตัวอย่างมูล; 279)	Birds, Human, Domestic, Wildlife, Pets	PCR
			Shanks et al., 2010	Ohio, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 247)	100% (ตัวอย่างมูล; 431)	Alpaca, Pronghorn, Elk, Gazelle, Giraffe, Goat, Mule deer, Okapi, Sheep, Takin, Tufted deer, Moose, White-tailed deer, Canadian goose, Cat, Chicken, Dog, Duck, Horse, Human, Pelican, Pig, Raccoons, Sea gull, Turkey	PCR
	Bac3F/Bac3R	BT5870/BT5871	Shanks et al., 2006	Kentucky, USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	ไม่มี	99% (ตัวอย่างมูล; 279)	Birds, Human, Domestic, Wildlife, Pets	PCR
			Shanks et al., 2010	Ohio, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	91% (ตัวอย่างมูล; 247)	98.9% (ตัวอย่างมูล; 431)	Alpaca, Pronghorn, Elk, Gazelle, Giraffe, Goat, Mule deer, Okapi, Sheep, Takin, Tufted deer, Moose, White-tailed deer, Canadian goose, Cat, Chicken, Dog, Duck, Horse, Human, Pelican, Pig, Raccoon, Sea gull, Turkey	PCR
	CF128F/BacCow 305r	BT5486/BT5487	Bernhard and Field, 2000a	Oregon, USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 19)	89% (ตัวอย่างมูล; 40)	Cat, Deer, Dog, Duck, Elk, Goat, Llama, Pig, Seagull, Sheep, Human feces, Cow	PCR
			Kildare et al., 2007	Ventura, California, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 8)	95% (ตัวอย่างมูล; 65)	Human fecal, Horse, Dog, Cat, Seagull, Wastewater treatment plant	PCR
			Raith et al., 2013	Northern, Central and Southern California	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (8)	62% (51)	Horse, Dog, Cat, Gull, Wastewater, Human, Cow	qPCR

ชนิด แหล่งกำเนิด	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	วรรณกรรมอ้างอิง	พื้นที่ที่ทดสอบ	ประเภทการ ทดสอบ	ความไว (จำนวน ตัวอย่างที่ทดสอบ)	ความจำเพาะ (จำนวนตัวอย่างที่ ทดสอบ)	ประเภทแหล่งกำเนิดที่ทดสอบ	เทคนิค วิเคราะห์
โค	CF128F /Bac708R	BT5486/BT5492	Bernhard and Field, 2000a	Ohio, USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	ไม่มี	ไม่มี	Cow, Deer, Elk, Cat, Dog, Duck, Pig, Gull	PCR
			Shanks et al., 2010	Ohio, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 247)	76% (ตัวอย่างมูล; 431)	Alpaca, Pronghorn, Elk, Gazelle, Giraffe, Goat, Mule deer, Okapi, Sheep, Takin, Tufted deer, Moose, White- tailed deer, Canadian goose, Cat, Chicken, Dog, Duck, Horse, Human, Pelican, Pig, Raccoon, Sea gull, Turkey	PCR
			Toledo-Hernandez et al., 2013	Puerto Rico, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	64% (ตัวอย่างมูล; 66)	ไม่มี	Cow, Goat, Horse, Swine, Monkey, Fish, Pigeon, Chicken, Duck, Turkey, Swan, Guinea fowl	PCR
	CF193/Bac708R	BT5807/BT5492	Bernhard and Field, 2000a	Ohio, USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	ไม่มี	100% (ตัวอย่างมูล)	Cow, Deer, Elk, Cat, Dog, Duck, Pig, Gull	PCR
			Shanks et al., 2010	Ohio, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 247)	99.9% (ตัวอย่างมูล; 431)	Alpaca, Pronghorn, Elk, Gazelle, Giraffe, Goat, Mule deer, Okapi, Sheep, Takin, Tufted deer, Moose, White- tailed deer, Canadian goose, Cat, Chicken, Dog, Duck, Horse, Human, Pelican, Pig, Raccoon, Sea gull, Turkey	PCR

ชนิด แหล่งกำเนิด	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	วรรณกรรมอ้างอิง	พื้นที่ที่ทดสอบ	ประเภทการ ทดสอบ	ความไว (จำนวน ตัวอย่างที่ทดสอบ)	ความจำเพาะ (จำนวนตัวอย่างที่ ทดสอบ)	ประเภทแหล่งกำเนิดที่ทดสอบ	เทคนิค วิเคราะห์
โค	CowM2F /CowM2R	BT5484/BT5485	Shanks et al., 2008	West Virginia; Georgia; Wyoming; Delaware; Florida; Ohio	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	ไม่มี	99.9% (144)	Alpaca, Canadian Goose, Cat, Chicken, Bovine, Deer, Dog, Duck, Goat, Horse, Human, Pelican, Pig, Seagull, Sheep, Turkey, Wastewater	qPCR
			Shanks et al., 2010	Ohio, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	ไม่มี	99.9% (ตัวอย่างมูล; 431)	Alpaca, Pronghorn, Elk, Gazelle, Giraffe, Goat, Mule deer, Okapi, Sheep, Takin, Tufted deer, Moose, White- tailed deer, Canadian goose, Cat, Chicken, Dog, Duck, Horse, Human, Pelican, Pig, Raccoon, Sea gull, Turkey	PCR
			Raith et al., 2013	California, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	ไม่มี	100%	Alpaca, Canada Goose, Cat, Chicken, Deer, Dog, Duck, Goat, Horse, Human, Pelican, Pig, Gull, Sheep, Turkey, Wastewater, Cow	qPCR
	BoBac367f/BoBac467r	BT6078/BT6079	Layton et al., 2006	Tennessee, Pennsylvania, Texas (USA)	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 4)	100% (ตัวอย่างมูล; 30)	Human, Bovine, Swine, Canine, and Equine fecal	qPCR
			Shanks et al., 2010	Ohio, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	ไม่มี	47.4% (ตัวอย่างมูล; 431)	Alpaca, Pronghorn, Elk, Gazelle, Giraffe, Goat, Mule deer, Okapi, Sheep, Takin, Tufted deer, Moose, White- tailed deer, Canadian goose, Cat, Chicken, Dog, Duck, Horse, Human, Pelican, Pig, Raccoon, Sea gull, Turkey	PCR

ชนิด แหล่งกำเนิด	ชื่อไพรเมอร์	รหัสไพรเมอร์	วรรณกรรมอ้างอิง	พื้นที่ทดสอบ	ประเภทการ ทดสอบ	ความไว (จำนวน ตัวอย่างที่ทดสอบ)	ความจำเพาะ (จำนวนตัวอย่างที่ ทดสอบ)	ประเภทแหล่งกำเนิดที่ทดสอบ	เทคนิค วิเคราะห์
โค	BoBac367f/BoBac467r	BT6078/BT6079	Kildare et al., 2007	Ventura, California, USA	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 8)	97% (ตัวอย่างมูล; 65)	Human fecal, Horse, Dog, Cat, Seagull	PCR
			Lee et al., 2010	Southern Ontario, Canada	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	100% (ตัวอย่างมูล; 18)	90.4% (ตัวอย่างมูล; 52)	Cat, Deer, Dog, Goose, Gull, Horse, Raccoon, Pig, Human, Cow	PCR
	qCS621F/qBac725R	BT5872/BT5873	Okabe et al., 2007	Japan	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	ไม่มี	ไม่มี	River water	qPCR
ไก่	qCD362F-HU/qCD464R-HU	BT5810/BT5811	Kobayashi et al., 2013	Japan	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	80% (ตัวอย่างมูล; 49)	100% (ตัวอย่างมูล; 78)	Duck, Chicken, Cow, Pig, Human, Swan, White-fronted goose	qPCR
			Lu et al., 2007	Florida, New Jersey, West Virginia, Delaware, Ohio, Texas, Nebraska, and Georgia (USA)	นำมาใช้ในพื้นที่นี้	40% (ตัวอย่างมูล; 70)	100% (ตัวอย่างมูล; 36)	Cow, pig, human, Canada goose, Chicken	PCR
			Hernandez et al., 2013	Puerto Rico, USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	14-37% (ตัวอย่างมูล; 97)	ไม่มี	Cow, Goat, Horse, Swine, Monkey, Fish, Pigeon, Chicken, Duck, Turkey, Swan, Guinea fowl	PCR
	LA35F/ LA35R	BT5919/BT5920	Weidhaas et al., 2010	Oklahoma, USA	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	76.1% (ตัวอย่างมูล; 57)	93% (ตัวอย่างมูล; 116)	Cow, pig, ducks, goose, human, Chicken	PCR
	Av4143F/Av4143R	BT6080/BT6081	Ohad et al., 2016	Israel	พัฒนาวิธีที่พื้นที่นี้	95% (ตัวอย่างมูล; 97)	97% (ตัวอย่างมูล; 104)	Battery hen, Poultry, Turkey, Waterfowl, Human wastewater Effluent, Bovine, Swine, Horse, Gazelle	qPCR

ชนิด แหล่งกำเนิด	ชื่อไฟรเมอร์	รหัสไฟรเมอร์	วรรณกรรมอ้างอิง	พื้นที่ที่ทดสอบ	ประเภทการ ทดสอบ	ความไว (จำนวน ตัวอย่างที่ทดสอบ)	ความจำเพาะ (จำนวนตัวอย่างที่ ทดสอบ)	ประเภทแหล่งกำเนิดที่ทดสอบ	เทคนิค วิเคราะห์
ไก่	Av43F/Av43R	BT6082/BT6083	Ohad et al., 2016	Israel	พัฒนาวิธีที่พื้นที่	91% (ตัวอย่างมูล; 97)	99% (ตัวอย่างมูล; 104)	Battery hen, Poultry, Turkey, Waterfowl, Human wastewater Effluent, Bovine, Swine, Horse, Gazelle	qPCR
	Q-PvA-f/Q-PvA-r	BT5925/BT5926	Carratalà et al., 2012	Catalonia (coastal Northeast Spain), the Basque Country (Northern Spain), Patras (Greece), and Budapest (Hungary)	พัฒนาวิธีที่พื้นที่	ไม่มี	ไม่มี	Chicken, Turkey, Partridge, Hen	qPCR

ภาคผนวก จ. ภาพกิจกรรมแสดงความเชื่อมโยงกับผู้เชี่ยวชาญภายนอก
(Dr. James Ebdon, University of Brighton, UK)



รูปที่ จ1 ภาพกิจกรรมสัมมนา เรื่อง Solutions to faecal water pollution: the development and successful application of Microbial Source Tracking in UK and Europe เมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน 2560 ณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์



รูปที่ จ2 กิจกรรมนำ Dr. James Ebdon สำรวจพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน, บน - ปากคลองมะขามเฒ่า ต้นกำเนิดแม่น้ำท่าจีน (ซ้าย) ที่แยกออกจากแม่น้ำเจ้าพระยา (ขวา), ล่าง - ลักษณะพื้นที่ใช้สอยริมแม่น้ำท่าจีน ช่วง จ. สุพรรณบุรี ระหว่างตำบลสนามชัย อำเภอมืองจนถึง ตำบลบางปลาหมอ อำเภอบางปลาหม้อ



รูปที่ จ2 (ต่อ) กิจกรรมนำ Dr. James Ebdon สํารวจพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน, บนและล่าง – ลักษณะพื้นที่ใช้สอยริมแม่น้ำท่าจีน ช่วง จ. สุพรรณบุรี ระหว่างตำบลสนามชัย อำเภอมือง จนถึง ตำบลบางปลาหม้า อำเภอบางปลาหม้า

ภาคผนวก ฉ. การสร้างความตระหนักเรื่องความจำเป็นของการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษ

ต่อประเทศเพื่อนบ้าน



รูปที่ ฉ.1 ภาพกิจกรรมสัมมนา เรื่อง Solutions to faecal water pollution: the development and successful application of Microbial Source Tracking in UK, Europe, and Thailand โดย Dr. James Ebdon, Dr. Han Tran, และ ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน เมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2559 ณ Ho Chi Minh International University สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม



รูปที่ ๑2 กิจกรรมสำรวจพื้นที่ลุ่มน้ำ Thi Tinh River ในเขต Ben Cat เมือง Binh Doung City สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม

ภาคผนวก ข. บทความวิชาการ

Pornjira Somnark, Natcha Chyerochana, Skorn Mongkolsuk, and Kwanrawee Sirikanchana
(2018) Performance evaluation of *Bacteroidales* genetic markers for human and animal
microbial source tracking in tropical agricultural watersheds. Environmental Pollution.

236C, 100-110.

(impact factor 5.099)



Performance evaluation of *Bacteroidales* genetic markers for human and animal microbial source tracking in tropical agricultural watersheds[☆]

Pornjira Somnark^a, Natcha Chyerochana^b, Skorn Mongkolsuk^{b, c, d}, Kwanrawee Sirikanchana^{b, d, *}

^a Applied Biological Sciences, Chulabhorn Graduate Institute, Chulabhorn Royal Academy, Lak Si, Bangkok, Thailand

^b Research Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Lak Si, Bangkok, Thailand

^c Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^d Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology (EHT), Ministry of Education, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2017

Received in revised form

21 December 2017

Accepted 17 January 2018

Keywords:

Microbial source tracking

PCR

Bacteroidales

Tropical watersheds

Southeast Asia

ABSTRACT

Microbial source tracking (MST) DNA-based assays have been used to successfully solve fecal pollution problems in many countries, particularly in developed nations. However, their application in developing countries has been limited but continues to increase. In this study, sixteen endpoint and quantitative PCR (qPCR) assays targeting universal and human-, swine-, and cattle-specific *Bacteroidales* gene markers were modified for endpoint PCR, evaluated for their performance with sewage and fecal samples from the Tha Chin watershed and subsequently validated with samples from the Chao Phraya watershed, Thailand. Sample sizes of 81 composite samples (from over 1620 individual samples) of farm animals of each type as well as 19 human sewage samples from the Tha Chin watershed were calculated using a stratified random sampling design to achieve a 90% confidence interval and an expected prevalence (i.e., desired assay's sensitivity) of 0.80. The best universal and human-, swine-, and cattle-specific fecal markers were BacUni EP, HF183/BFDrev EP, Pig-2-Bac EP, and Bac3 assays, respectively. The detection limits for these assays ranged from 30 to 3000 plasmid copies per PCR. The positive predictive values were high in universal and swine- and cattle-specific markers (85–100%), while the positive predictive value of the human-specific assay was 52.2%. The negative predictive values in all assays were relatively high (90.8–100%). A suite of PCR assays in Thailand was established for potential MST use in environmental waters, which supports the worldwide applicability of *Bacteroidales* gene markers. This study also emphasizes the importance of using a proper sample size in assessing the performance of MST markers in a new geographic region.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Microbial source tracking (MST) is an approach used to identify source markers that indicate fecal hosts by taking advantage of genotypic and phenotypic traits of microorganisms in animal gastrointestinal tracts that are specific to their particular host species, for example, pigs, cows, chicken, goat, and sheep (Field and

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Dr. Harmon Sarah Michele.

* Corresponding author. Research Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Lak Si, Bangkok, Thailand.

E-mail address: kwanrawee@cri.or.th (K. Sirikanchana).

Samadpour, 2007; Sargent et al., 2011; Tran et al., 2015). The presence and distribution of these source markers in water re-sources can indicate contamination from particular hosts or groups. Fecal marker microorganisms belong to bacterial orders or higher (Bernhard and Field, 2000a; Kildare et al., 2007; Ohad et al., 2016; Shanks et al., 2008; Siefring et al., 2008), bacterial genera and species (Bernhard and Field, 2000a, 2000b; Haugland et al., 2010; Ohad et al., 2016; Weidhaas et al., 2010), or bacterial strains (Jofre et al., 2014; Leknoi et al., 2017; Sirikanchana et al., 2014; Wangkahad et al., 2017). The bacterial class Bacteroidetes and, in particular, the bacterial order *Bacteroidales* have been most frequently applied in MST (Ahmed et al., 2016; Harwood et al., 2014; Tran et al., 2015). Molecular techniques, specifically

endpoint and quantitative PCR (qPCR) methods, have been designed to detect the order *Bacteroidales* to indicate the specific origins of fecal sources, such as human (Bernhard and Field, 2000a; Kildare et al., 2007; Siefring et al., 2008), swine (Dick et al., 2005; Mieszkina et al., 2009), cattle (Bernhard and Field, 2000a; Layton et al., 2006; Shanks et al., 2006b), chicken (Kobayashi et al., 2013; Lu et al., 2007), and universal (general) (Bernhard and Field, 2000b; Kildare et al., 2007; Siefring et al., 2008). An advantage of using molecular methods is that the samples are stable for long periods with proper storage and thus can be reanalyzed with assays that are developed or improved after the samples are stored.

qPCR can quantitatively measure fluorescently labeled amplification products using a hydrolysis probe or non-specific intercalating dye, which in principle can provide more sensitive detection than endpoint PCR (Botes et al., 2013; Smith and Osborn, 2009). qPCR can also deliver more accurate measurement because it avoids amplification bias that may occur in later cycles by measuring fluorescent signal in real-time during an exponential amplification phase (Smith and Osborn, 2009). Although a number of studies have demonstrated good performance of general and source-specific qPCR assays for MST application (Kildare et al., 2007; Layton et al., 2006; Mieszkina et al., 2009; Shanks et al., 2008), challenge of implementing qPCR methods in developing countries remains an obstacle. Endpoint PCR, in contrast, involves lower instrumental and yearly maintenance costs, lower costs for each PCR (i.e., consumables, reagents, etc.), and less technical skill (Riedel et al., 2014), all of which suit the application for use in developing countries. In fact, promotion of PCR laboratories in developing countries has also been increasingly emphasized (Ragheb and Jimenez, 2014; World Health Organization, 2016). Consequently, there is a pressing need to investigate endpoint PCR assays for both general and source-specific fecal markers for use in developing countries. Nonetheless, for some fecal sources, no suitable endpoint PCR assays have been established (Ballesté et al., 2010; Bernhard and Field, 2000a; Gourmelon et al., 2007; Shanks et al., 2010; Toledo-Hernandez et al., 2013). Therefore, it is intriguing to adapt the widely used qPCR assays to endpoint platforms and evaluate the performance of the modified endpoint PCR counterparts. Apart from challenges in adapting the assay from qPCR to PCR platforms, including probable loss of detection sensitivity and accuracy (Botes et al., 2013; Smith and Osborn, 2009), variability in PCR performance could further be impacted by laboratory protocols and reagents used and therefore could vary from laboratory to laboratory (Al-soud and Radstrom, 1998; Riedel et al., 2014; Rissanen et al., 2010; Saeidi et al., 2017; Silva and Domingues, 2015). In practice, improved qPCR performance over PCR counterparts with similar primers and target amplicons appeared to be assay-specific, as no improved sensitivity was shown in one study, while 10 times improvement was shown in another study (Dagher et al., 2004; Riedel et al., 2014).

Moreover, although fecal markers have been identified and developed for source tracking applications in many countries, the microorganism communities in gastrointestinal tracts can be dissimilar for each host species in different geographical areas, which may be due to climate, food, antibiotics, and other region-specific factors (Adami and Cavazzoni, 1999; Looft et al., 2014; Lu et al., 2013; Mah et al., 2008; Shanks et al., 2011). This potential variation can lead to variability in the performance of fecal markers among regions. Sets of performance criteria facilitate the selection of the best assay when method evaluation is critical. Sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value, and negative predictive value have been used as criteria in the evaluation of MST assays and are determined by measuring the intrinsic properties of MST markers in regions of interest (Ballesté et al., 2010; Cao et al., 2015; Fremaux et al., 2009; Gómez-Doñate et al., 2015; Green et al.,

2012; Harwood et al., 2013; Li et al., 2015, 2016; Odagiri et al., 2015; Schriewer et al., 2013; Wangkahad et al., 2017). Although no strict guidelines are available, suitable values of sensitivity and specificity have been recommended to be 0.80 and 0.90, respectively (Ahmed et al., 2016; Boehm et al., 2013; U.S. Environmental Protection Agency, 2005). It is also clear that these performance characteristics depend on the number of samples collected for testing markers; however, a lack of sample size guidelines has been acknowledged (Ahmed et al., 2016; Harwood et al., 2014; Santo Domingo et al., 2007). In epidemiology, a minimum sample size can be computed to ensure that samples represent the prevalence of markers or diseases in a population within a specified confidence level and acceptable error (Thompson, 2012). When evaluating MST assay performance, such a minimum sample size can be calculated based on the expected marker prevalence, as defined by the assay's sensitivity. Calculations of sample size vary with the method of sampling. Three common statistical sampling designs used in animal populations are simple random sampling, cluster or two-stage sampling, and stratified random sampling (Leon et al., 2011). Simple random sampling, or random sampling without replacement, is the simplest sampling design and involves randomly selecting samples with equal probabilities of selection from a population (Thompson, 2012). Cluster or two-stage sampling is a type of sampling method in which a whole population is divided into clusters, and certain clusters are randomly selected for individual sampling. In contrast, stratified random sampling classifies a population into strata of similar traits; samples are then collected from each stratum by simple random sampling. The stratified random selection method is generally used when strata are classified by geographical region or other factors. Because one goal of this study was to establish a set of MST markers that could be used throughout the Tha Chin watershed, stratified random sampling was most appropriate for calculating the sample size of target hosts to achieve the expected sensitivity.

The ultimate goal of this study was to establish a set of endpoint PCR assays for tracking universal and human-, swine-, and cattle-specific fecal markers in agricultural watersheds in Thailand. The specific objectives were to 1) perform method modification of the widely used endpoint and qPCR primers to endpoint PCR assays for universal (general) and human-, swine-, and cattle-specific fecal origins; 2) evaluate performance of the modified endpoint PCR assays on sewage and fecal samples of known origins from Tha Chin watershed and validate in Chao Phraya watershed; and 3) select the best modified endpoint PCR assays and define their corresponding detection limits.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The Tha Chin watershed is located in the central part of Thailand (Fig. 1). It covers 13,477.16 km² comprising 13 provinces. The Tha Chin River is 325 km long, receives water from the Chao Phraya River in Chai Nat Province and is connected to the Gulf of Thailand in Samut Sakhon Province. The four main provinces (Chai Nat, Suphan Buri, Nakhon Pathom, and Samut Sakhon) through which the Tha Chin River passes were selected as sample collection regions in this study (Hydro and Agro Informatics Institute, 2012a). For a decade, the Tha Chin River had one of the poorest water qualities among the 65 monitored freshwater sources in Thailand (Pollution Control Department (PCD), 2015). The parameters that pose water quality problems for the Tha Chin River include dissolved oxygen (DO), biochemical oxygen demand (BOD), total coliform bacteria (TCB), fecal coliform bacteria (FCB), and ammonia-nitrogen (NH₃-N) (Pollution Control Department (PCD),

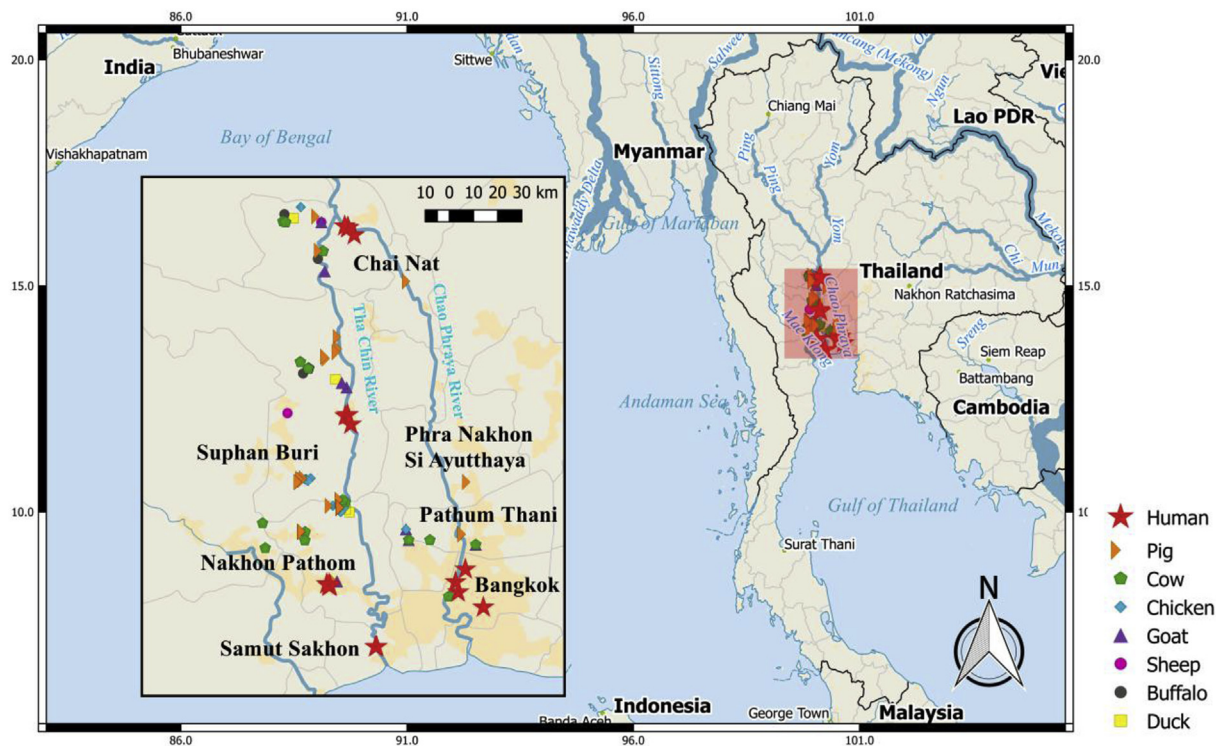


Fig. 1. Sampling map in the Tha Chin and Chao Phraya watersheds.

2015). The upper and central regions of the Tha Chin River have been suspected of both community and agricultural contamination, while the lower Tha Chin River region is likely to be affected by industry in addition to community and agriculture activities (Pollution Control Department (PCD), 2015). Two main animal husbandry practices in the Tha Chin watershed include the tending of swine and that of cattle; these animals, as well as human sources, were used as target hosts for MST assays. Samples from animals raised in lower numbers in the Tha Chin watershed, including chickens, goats, sheep, buffalo, and ducks, served as non-target hosts and were collected to determine the assay's specificity. Additional target and non-target samples were collected from the adjacent Chao Phraya watershed, including Phra Nakhon Si Ayutthaya, Pathum Thani, and Bangkok Provinces, to further validate the PCR assays developed for the Tha Chin watershed. The Chao Phraya river is the main river in Thailand, flowing through Bangkok and into the Gulf of Thailand. Its water quality is poor, ranking second to the lower Tha Chin River (Pollution Control Department (PCD), 2015). The Chao Phraya watershed covers 20,523.42 km² in 16 provinces locating community, agricultural and industrial activities (Hydro and Agro Informatics Institute, 2012b).

2.2. Sample size calculation

The number of each target sample to be collected in the Tha Chin watershed was calculated using a stratified random sampling design (Table 1). Target populations were stratified based on province, and their corresponding population sizes were gathered from population census and farm animal records (Information and Communication Technology Center, 2015; National Statistical Office Thailand, 2016). Sample size was calculated with a 90% confidence interval and an acceptable relative error of 0.20. The expected prevalence of the marker in the population was assumed to equal the threshold PCR assay's sensitivity of 0.80 (Ahmed et al., 2016;

Boehm et al., 2013; U.S. Environmental Protection Agency, 2005). A minimum sample size was then calculated via Eq. (1) using ProMESA version 2.3.0.2 (Leon et al., 2011). Sample sizes for non-target hosts in each province of the Tha Chin watershed were weighted based on population size, similarly to the stratified sampling method (Table 1).

$$n = \frac{\sum_{i=1}^e \left[\frac{n_i^2 \times p_i \times (1-p_i)}{w_i} \right]}{N^2 \times \frac{AE^2}{z^2} + \sum_{i=1}^e [n_i \times p_i (1-p_i)]} \quad (1)$$

where e is the number of strata, n_i is the number of individuals in strata i , p_i represents the expected prevalence in strata i , N is the total number of individuals in the population, AE is the acceptable absolute error, z corresponds to the value obtained from the standard normal distribution, and w_i denotes a weighting factor for each stratum, which is calculated as follows:

$$w_i = \frac{n_i \times \sqrt{p_i \times (1-p_i)}}{\sum_{i=1}^e [n_i \times \sqrt{p_i \times (1-p_i)}]} \quad (2)$$

2.3. Sample collection

For samples of human fecal origin, 100 mL of raw human sewage was collected by grab sampling from influent sumps of residential buildings and office buildings with no fewer than 100 residents and of hospitals with no fewer than 80 inpatient beds. The samples were stored in decontaminated plastic bottles with 3.33 mL of 0.3% sodium thiosulfate. Non-human fecal samples were manually collected from freshly excreted feces (within 2 h after excretion) on

Table 1
Number of composite samples^a for each animal host in the Tha Chin and Chao Phraya watersheds.

Location	Target host			Non-target host					Total
	Human	Swine	Cattle	Chicken	Goat	Sheep	Buffalo	Duck	
Tha Chin watershed									
Chai Nat	5	2	3	2	2	3	4	1	22
Suphan Buri	4	10	10	8	2	2	1	2	39
Nakhon Pathom	5	8	7	9	3	0	0	2	34
Samut Sakhon	5	0	0	0	0	0	0	0	5
Total	19	20	20	19	7	5	5	5	100
Chao Phraya watershed									
Pathum Thani	0	3	3	2	3	0	0	0	11
Bangkok	9	0	1	0	0	0	0	0	10
Phra Nakhon Si Ayutthaya	0	5	1	0	0	0	1	0	7
Total	9	8	5	2	3	0	1	0	28

^a One composite sample was prepared from equal amount of at least 20 individual feces samples.

the ground of agricultural farms. One composite sample was prepared by onsite manual agitation of approximately one gram of fresh feces from at least 20 different individuals. Feces of the following animals were collected: pigs (*Sus domesticus*), cows (*Bos taurus* and *Bos indicus*), chickens (*Gallus gallus*), ducks (*Anas platyrhynchos*), goats (*Capra aegagrus hircus*), sheep (*Ovis aries*), and water buffalo (*Bubalus bubalis*). Mixed fecal samples were stored in 50-mL sterile polypropylene centrifuge tubes. Notably, fresh feces samples, instead of a mixed slurry from a farm waste lagoon, were collected to reduce variations in farm management, such as the use of disinfectants or water to clean floors in contrast to sweeping away dry feces, which could affect the number of expected microorganisms. Both water and feces samples were transported on ice to the laboratory within 8 h. A total of 100 composite animal fecal and human sewage samples from the Tha Chin watershed were collected from January to September 2016, and a total of 28 composite fecal and human sewage samples were collected from the Chao Phraya watershed from May 2016 to March 2017 (Table 1).

2.4. DNA extraction

Water samples were stored at 5 °C, while composite fecal samples were stored at –20 °C; neither was stored for more than 3 d before they were further processed by DNA extraction. Water samples with volumes of 50–100 mL were filtered through a 0.22-μm-pore-size mixed cellulose ester membrane (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). The membrane filter was subsequently cut into small pieces using straight iris stainless steel scissors. The scissors were decontaminated between samples by wiping with RNase AWAY decontaminating agent (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) to remove DNA contamination on the surface, followed by ethanol-dipping and burning. The cut membrane pieces were subjected to DNA extraction using a ZR Fecal DNA MiniPrep™ kit, following the manufacturer's instruction (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Approximately 150–200 mg of composite fecal samples was processed for DNA extraction also using the ZR Fecal DNA MiniPrep™ kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Approximately 50–150 μL of DNA extract was eluted and stored at –80 °C until use within six months. DNA extracts were diluted in sterile distilled water to 0.2, 2.0, and 20 ng μL^{–1} total DNA and stored at –20 °C before used in PCR experiments within 10 days. Moreover, a total of five extraction blanks were performed periodically by filtering 100 mL of sterile distilled water and following similar protocols as for sample DNA extraction.

2.5. Primers and PCR method modification

PCR primers targeting universal and human-, swine-, and cattle-

specific fecal markers were selected from both endpoint and qPCR platforms; all markers were originally reported to have high specificity (Table 2). Primer maps show annealing regions with partial 16S rRNA genes of human-, swine-, and cattle-associated *Bacteroidales* (see Figs. 1 and 2 in Somnark et al., 2018). A 10-μL PCR involved 0.5 μL each of 10 μM forward primers and 10 μM reverse primers, 1 μL of DNA template (corresponding to 0.2, 2.0 or 20 ng total DNA), 5 μL of DreamTaq PCR Master Mix (2×; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and sterile water. The reaction was processed in a Mastercycler Pro thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Regardless of the original cycling conditions, the PCR program in this study was modified with the following steps: initial denaturation at 95 °C for 3 min; 30 cycles of a denaturation step at 95 °C for 30 s, an annealing step at the temperature and time stated (Table 2), and an elongation step at 72 °C for 30 s; and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were analyzed by gel agarose electrophoresis run at 100 V for 30 min; the gels were stained with ethidium bromide, and the DNA bands were visualized with a Gel Doc XR system (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

2.6. Plasmid DNA constructs

Plasmid DNA standards were constructed with DNA inserts that were PCR-amplified from specified fecal hosts. First, a DNA template from an animal or sewage sample was amplified with PCR primers, and the PCR product was separated using gel electrophoresis and purified with a QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Next, the purified gene amplicon was cloned using competent *E. coli* DH5α cells and a pGEM-T Easy cloning kit (Promega, Madison, WI, USA). Transformants were grown by incubating them at 37 °C overnight on Luria-Bertani (LB) agar plates supplemented with 100 μg mL^{–1} ampicillin, 80 μg mL^{–1} X-gal, and 200 μM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Transformants were confirmed by colony PCR to have DNA inserts and were subsequently propagated in LB broth containing 100 μg mL^{–1} ampicillin shaken overnight at 37 °C. Plasmid DNA standards from overnight cultures were extracted using a QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) as recommended by the manufacturer. The DNA inserts of purified plasmids were sequenced using M13 primers at Macrogen, Inc. (Seoul, Republic of Korea). For the universal marker, cloned plasmids were prepared with individual DNA inserts from human, swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, and duck DNA samples. Sequences that were homologous to the sequencing results were sought in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990). Plasmid stocks were stored at –20 °C until use.

Table 2
Nucleotide sequences and experimental conditions of primers used in this study.

Host	Assay name	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Primer size (bp)	DNA product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Annealing time (s)	Target microorganism	Target gene	Original platform	Reference
Universal	BacUni-EP	BacUni-520f	CGT-TAT-CCG-GAT-TTA-TTG-GGT-TTA	24	170	60.0	30	<i>Bacteroidales</i>	16s rRNA	qPCR	(Kildare et al., 2007)
		BacUni-690r1	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG-ATA-TCT-A	25							
	GenBac-EP	GenBac3F	GGG-GTT-CTG-AGA-GGA-AGG-T	19	129	60.0	30	<i>Bacteroidetes</i>	16s rRNA	qPCR	(Sieftring et al., 2008)
		GenBac3R	CCG-TCA-TCC-TTC-ACG-CTA-CT	20							
	Bac32F/Bac708R	Bac32F	AAC-GCT-AGC-TAC-AGG-CTT	18	696 ^a	53.7	60	<i>Bacteroides-Prevotella</i>	16s rRNA	PCR	(Bernhard and Field, 2000b; Hussein et al., 2014)
		Bac708R	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18							
Human sewage	BacHum-EP	BacHum-160f	TGA-GTT-CAC-ATG-TCC-GCA-TGA	21	81	60.0	30	<i>Bacteroidales</i>	16s rRNA	qPCR	(Kildare et al., 2007)
		BacHum-241r	CGT-TAC-CCC-GCC-TAC-TAT-CTA-ATG	24							
	HF183/BFDrev-EP	HF183	ATC-ATG-AGT-TCA-CAT-GTC-CG	20	167 ^a	60.0	30	<i>Bacteroides dorei/total Bacteroidales</i>	16s rRNA	qPCR	(Haugland et al., 2010)
		BFDrev	CGT-AGG-AGT-TTG-GAC-CGT-GT	20							
	Modified HF183F/Bac708R	HF183F	ATC-ATG-AGT-TCA-CAT-GTC-CG	20	541 ^a	55.3	60	<i>Bacteroides-Prevotella</i>	16s rRNA	PCR	(Bernhard and Field, 2000a; Hussein et al., 2014)
		Bac708R	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18							
Swine	PF163F/Bac708R	PF163F	GCG-GAT-TAA-TAC-CGT-ATG-A	19	559 ^a	52.4	60	<i>Bacteroides-Prevotella</i>	16s rRNA	PCR	(Dick et al., 2005; Hussein et al., 2014)
		Bac708R	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18							
	Pig-2-Bac-EP	Pig-2-Bac41F	GCA-TGA-ATT-TAG-CTT-GCT-AAA-TTT-GAT	27	116	60.0	30	<i>Bacteroidales</i>	16s rRNA	qPCR	(Mieszkina et al., 2009)
		Pig-2-Bac163Rm	ACC-TCA-TAC-GGT-ATT-AAT-CCG-C	22							
Cattle	CowM2-EP	CowM2F	CGG-CCA-AAT-ACT-CCT-GAT-CGT	21	92	60.0	30	<i>Bacteroidales</i>	16s rRNA	qPCR	(Shanks et al., 2008)
		CowM2R	GCT-TGT-TGC-GTT-CCT-TGA-GAT-AAT	24							
	BacCow-EP	CF128F	CCA-ACY-TTC-CCG-WTA-CTC	18	177	60.0	30	<i>Bacteroidales</i>	16s rRNA	qPCR	(Kildare et al., 2007)
		BacCow305r	GGA-CCG-TGT-CTC-AGT-TCC-AGT-G	22							
	CF193F/Bac708R	CF193	TAT-GAA-AGC-TCC-GGC-C	16	519 ^a	55.0	30	<i>Bacteroides-Prevotella</i>	16s rRNA	PCR	(Bernhard and Field, 2000a)
		Bac708R	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18							
	Modified CF128F/Bac708R	CF128F	CCA-ACY-TTC-CCG-WTA-CTC	18	596 ^a	62.0	60	<i>Bacteroidales</i>	16s rRNA	PCR	(Bernhard and Field, 2000a; Hussein et al., 2014)
		Bac708R	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18							

Table 2 (continued)

Host	Assay name	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Primer size (bp)	DNA product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Annealing time (s)	Target microorganism	Target gene	Original platform	Reference
		Bac708R	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	18							Lamendella et al., 2007)
	Bac2	Bac2F	GCT-TGT-TGC-GTT-CCT-TGAGAT-AAT	24	274	62.0	30	<i>Bacteroidales</i>	Gene encoding an HDIG domain protein involved in energy metabolism and electron transport	PCR	(Shanks et al., 2006b)
		Bac2R	ACA-AGC-CAG-GTG-ATA-CAG-AAA-G	22							
	Bac3	Bac3F	CTA-ATG-GAA-AAT-GGA-TGG-TAT-CT	23	166	60.0	30	<i>Bacteroidales</i>	Gene encoding a sialic acid-specific 9-O- acetyltransferase secretory protein homolog	PCR	(Shanks et al., 2006b)
		Bac3R	GCC-GCC-CAG-CTC-AAA-TAG	18							
	Cow-Bac2 EP	qCS621F	AAC-CAC-AGC-CCG-CGA-TT	17	104 ^a	62.0	30	<i>Bacteroides-Prevotella</i>	16s rRNA	SYBR qPCR	(Okabe et al., 2007)
		qBac725R	CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG-ATA-TCT-A	25							
	BoBac EP	BoBac367f	GAA-GAC-TGA-ACC-AGC-CAA-GTA	21	100	57.0	30	<i>Bacteroides</i>	16s rRNA	qPCR	(Layton et al., 2006)
		BoBac467r	GCT-TAT-TCA-TAC-GGT-ACA-TAC-AAG	24							

^a DNA product size identified by BLAST (Somnark et al., 2018).

2.7. PCR quality controls

PCRs for each DNA sample were replicated by two different lab personnel on different days to demonstrate reproducibility (inter-assay consistency). The replicates for 1.5% (n = 1568) of all samples did not agree; thus, these PCRs were repeated one additional time, and regardless of the result, positive or negative, the majority was recorded. Negative PCR results were reported when negative results were obtained at all three DNA template concentrations (0.2, 2.0, and 20 ng), which corresponded to 18.5–2.51 × 10³-fold dilutions from undiluted samples. Each no-template control (NTC) and plasmid standard for each primer pair were included in every PCR run. When performing PCR, target samples with 0.2–20 ng of total DNA, corresponding to 0.01 ng–10 mg of feces, were tested for the presence of DNA markers. To prevent bias, the amounts of the non-target samples that were tested were similar to the amounts of the target host that yielded positive results.

2.8. Confirmation of absence of PCR inhibition

Absence of PCR inhibition was confirmed by adding 200 ng μL⁻¹ (final concentration) bovine serum albumin (BSA) (Gawler et al., 2007; Schriewer et al., 2011) to a PCR that had the universal primer pair GenBac3F/GenBac3R and contained 0.2–20 ng of DNA extract of two duck composite fecal samples and two sewage samples. Subsequent tests were performed with the same primer pair with a qPCR platform. The qPCR contained 20 ng of DNA extract, 1× KAPA PROBE FAST qPCR Kit Master Mix (Kapa

Biosystems, Wilmington, MA, USA), 400 nM each primer, 100 nM probe (FAM-5'CAA-TAT-TCC-TCA-CTG-CTG-CCT-CCC-GTA3'-TAMRA (Dick and Field, 2004)), 1× ROX high, 50 and 200 ng μL⁻¹ final concentrations of BSA, and enough PCR-grade water to reach 20 μL in final volume. The qPCR was performed using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the following program: 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. No significant differences in C_q values were observed at 0, 50 and 200 ng μL⁻¹ final concentrations of BSA in all samples tested (p > .05, repeated measures one-way ANOVA). In summary, addition of BSA showed no effect in either endpoint PCR or qPCR assays, which further suggested that negative PCR results were not due to an inhibition effect. Thus, BSA was not used in the PCR, and PCR inhibition was not further suspected.

2.9. Performance evaluation measures

The best PCR markers for universal and host-specific fecal origins were selected based on their sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value, and negative predictive value, as calculated by Eqs. (3)–(7). Sensitivity is a measure of DNA marker distribution in a target host population. Specificity, on the other hand, reflects whether the markers are distributed only in target hosts or also in non-target hosts. Sensitivity can be calculated as the fraction of known positive samples that yield positive results (i.e., visualized PCR product band) with the PCR assay of interest, while specificity refers to the fraction of known negative samples that yield negative results with the PCR assay of interest. Accuracy is calculated as the

fraction of samples correctly detected as negative or positive. The positive predictive value refers to the probability that a positive result would be derived from a truly positive sample, and the negative predictive value is the probability that a negative result would be derived from a truly negative sample. Significant differences between performance measures in different datasets were investigated with a two-proportion z test using the Yates correction in SigmaPlot 11.0.

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP + FN} \quad (3)$$

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN + FP} \quad (4)$$

$$\text{Accuracy} = \frac{TP + TN}{TP + FP + TN + FN} \quad (5)$$

$$\text{Positive predictive value} = \frac{TP}{TP + FP} \quad (6)$$

$$\text{Negative predictive value} = \frac{TN}{TN + FN} \quad (7)$$

where TP (true positive) represents the number of target samples that showed positive results, FN (false negative) denotes the number of target samples that showed negative results, TN (true negative) represents the number of non-target samples that showed negative results, and FP (false positive) is the number of non-target samples that showed positive results.

2.10. PCR assay detection limits

Plasmid DNA constructs were linearized by *Pst*I or *Sal*I FastDigest® enzyme (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), and the products were purified with the Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). The linearized plasmid copies were calculated using plasmid molecular weights, and concentrations were measured using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). For each human-, swine-, and cattle-specific PCR primer pair, two plasmid clones from the same cloning reaction were chosen to determine the detection limits, while for the universal PCR assay, two plasmid clones from each host source (i.e., human, swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, and duck), constituting 16 clones in total, were used. The PCR detection limits were determined by varying the number of plasmid copies used as templates in PCRs. The lowest plasmid copy number that provided positive PCR results when performed in ten replicates was considered the detection limit for each plasmid clone. The PCR detection limit for each PCR primer was reported as a range if different clones exhibited different detection limits.

3. Results

3.1. PCR method modification and quality control

DNA sequences of the product amplicons from the modified endpoint PCR assays were identified, and homology to the database was shown (Table 3). All ten assays demonstrated high homology with amplicons from originally designed endpoint PCR and qPCR assays. The results revealed the successful endpoint PCR modification that could detect the desired genetic markers originally reported. In a total of 253 instrumental runs, 96.8% of NTCs ($n = 253$) were free of contaminated DNA. Only samples co-run with negative

NTCs were included for further analysis. All five extraction blanks were negative when amplified with universal primer BacUni EP.

3.2. Evaluation of MST marker performance from the Tha Chin watershed

Of all 16 MST markers, ten were assayed in all fecal and sewage samples of known origin from the Tha Chin watershed, and the performance evaluation measures were determined (Table 4 and Table 1 in Somnark et al. (2018)). There were MST markers that were tested with only a subset of samples because of their obviously poor performance (their sensitivity and specificity were explicitly lower than 0.70 and 0.80, respectively; see Table 2 in Somnark et al. (2018)). Consequently, these primer pairs were later excluded from the performance assessment. Two universal markers, BacUni EP and GenBac3 EP, demonstrated ideal performance, while the Bac32F/Bac708R marker failed to detect only one human sewage sample. HF183/BFDrev EP demonstrated the highest specificity, accuracy, and positive predictive value, even though its sensitivity to human sewage was slightly lower than that of the other two human-specific assays. The swine-specific Pig-2-Bac EP marker presented perfect sensitivity and high specificity by cross-reacting with only two chicken composite samples. For cattle-specific markers, both Bac2 and Bac3 markers delivered perfect specificity and positive predictive values, but the latter primer pair showed higher sensitivity and accuracy and a negative predictive value. When these characteristics were determined, the best host-specific MST markers for human, swine, and cattle were selected to be HF183/BFDrev EP, Pig-2-Bac EP, and Bac3, respectively. Although both universal markers BacUni EP and GenBac3 EP performed equally well, the BacUni EP marker was chosen for further characterization.

3.3. Validation with the Chao Phraya watershed

A set of ten PCR markers that had been assessed with fecal and sewage samples from the Tha Chin watershed was also used to examine samples from the Chao Phraya watershed (see Table 1 in Somnark et al. (2018)). The performance evaluation criteria were calculated (Table 4). No significant difference in the performance measures between samples from the two watersheds was observed for most MST markers ($p > .05$, two-proportion z test). Exceptions were observed in the human-specific marker HF183/BFDrev EP and the cow-specific marker Cow-Bac2 EP, whose performance criteria were significantly improved in the Chao Phraya watershed ($p < .05$, two-proportion z test). However, the results must be interpreted with care because these markers were tested with a slightly smaller variety of non-target animals. In summary, the same set of best universal and host-specific MST markers from the Tha Chin watershed, including BacUni EP, HF183/BFDrev EP, Pig-2-Bac EP, and Bac3 markers, could be used and performed equally well in the Chao Phraya watershed.

3.4. PCR detection limits

The PCR detection limits, as identified by plasmid clone standards, ranged from 300 to 3000 copies per 10-μL PCR for host-specific markers (Table 5). For the universal BacUni EP marker, the detection limits for a total of 18 cloned plasmids from fecal DNA of human, swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, and duck samples were separately determined to range from 30 to 3000 copies per reaction.

Table 3
Amplified products from modified endpoint PCR assays.

Host	Assay name	PCR product (bp)	% Identity	% Query cover	Matched nearest reference sequence (s)
Universal	BacUni EP	176–177	100	100	<i>Bacteroides</i> spp.
	GenBac3 EP	129	100	100	<i>Bacteroides</i> spp.
	Bac32F/Bac708R	687–695	99	100	<i>Bacteroides</i> spp.
Human	BacHum EP	82	100	100	<i>Bacteroides</i> spp.
	HF183F/BFDrev EP	167	100	100	AB242142
	Modified HF183F/Bac708R	541	99	100	<i>Bacteroides</i> spp.
	Pig-2-Bac EP	117	91–100	100	AB237869 (100%); AB237867 (91%); AY695691 (98%); AB695696 (93%)
Cattle	Bac2	232	38	93	An HDIG domain protein involved in energy metabolism and electron transport (with 32% identity from Shanks et al. (2006b))
	Bac3	166	74	97	A sialic acid-specific 9-O-acetyltransferase secretory protein homolog (with 75% identity from Shanks et al. (2006b))
	Cow-Bac2 EP	104	89	100	AF233407

4. Discussion

A total of 16 endpoint PCR assays targeting *Bacteroidales* genes were successfully modified from 7 endpoint and 9 qPCR platforms as demonstrated by correct DNA amplicons similar to those of the original assays. To compare the performance of *Bacteroidales* fecal markers across PCR platforms (endpoint or quantitative) and geographic regions, the sensitivity and specificity of published assays, both originally designed studies and publications that adopted the original assay for use in another geographic region, were compiled (see Table 3 in Somnark et al., 2018). Of all 9 original qPCR assays, only one qPCR assay (BacHum qPCR) had been previously adapted to an endpoint PCR platform (Ahmed et al., 2009). The human-specific BacHum EP marker demonstrated reduced specificity to 0.53–0.54 in Thailand, while great specificity of 0.96 was reported in Australia in an endpoint PCR platform, similar to the 0.98 specificity for the BacHum qPCR assay in California, USA (Ahmed et al., 2009; Kildare et al., 2007; this study). Reduced specificity of the BacHum EP in this study was due to its strong reaction with goat and swine samples (66–88%) and moderate reaction with buffalo, sheep, duck, and chicken feces (20–47%) (see Table 1 in Somnark et al. (2018)). However, excellent performance of the modified endpoint PCR (0.84–1.00 sensitivity and 0.77–1.00 specificity) similar to the original qPCR platforms was observed in the BacUni, GenBac, HF183/BFDrev, and Pig-2-Bac genetic markers (Haugland et al., 2010; Kildare et al., 2007; Mieszkina et al., 2009; Siefring et al., 2008). Although reduction in specificity from 1.00 to 0.50–0.78 of Cow-Bac2 EP, compared to the original Cow-Bac2

qPCR assay (Okabe et al., 2007), was noticed, this was because the endpoint PCR counterpart strongly cross-reacted with fecal samples from chicken, goat, sheep, buffalo, and duck (80–100% for each species). Moreover, a set of fecal markers (CowM2 EP, BacCow EP, and BoBac EP) was tested with only a subset of fecal samples but with no human-derived samples due to notice of potential reduced specificity (see Tables 2 and 3 in Somnark et al. (2018)). Nonetheless, the specificity and sensitivity of the modified endpoint PCR assays could have been improved if the methods had been further optimized for reaction components and cycling conditions. CowM2 EP and BacCow EP could amplify every DNA sample (6 of 6) from swine, chicken, and goat, while BoBac EP could detect DNA markers from 18 out of 19 swine fecal samples only (no cross-reaction with chicken, goat, sheep, buffalo, and duck samples). Consequently, probable loss of specificity of the assay due to lack of qPCR probes could remain a challenge when adapting the assay from qPCR to PCR platforms in certain assays (Botes et al., 2013; Smith and Osborn, 2009). Moreover, endpoint PCR has a higher chance of false negatives due to undetectable partial inhibition and partial

Table 5
Detection limit of the best endpoint PCR assays.

Host	Assay name	PCR detection limit (copy no. per reaction)
Universal	BacUni EP	30–3,000
Human	HF183F/BFDrev EP	300
Swine	Pig-2-Bac EP	3000
Cattle	Bac3	300

Table 4
Performance evaluation measures of PCR assays in the Tha Chin and Chao Phraya watersheds.

Host	Assay name	Tha Chin watershed					Chao Phraya watershed				
		Sensitivity	Specificity	Accuracy	Positive predictive value	Negative predictive value	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Positive predictive value	Negative predictive value
Universal	BacUni EP	1.00	NA ^a	1.00	1.00	NA	0.96	NA	0.96	1.00	NA
	GenBac3 EP	1.00	NA	1.00	1.00	NA	1.00	NA	1.00	1.00	NA
	Bac32F/Bac708R	0.96	NA	0.96	1.00	NA	1.00	NA	1.00	1.00	NA
Human	BacHum EP	0.95	0.54	0.62	0.33	0.98	1.00	0.53	0.68	0.50	1.00
	HF183F/BFDrev EP	0.84	0.77^b	0.78^b	0.46^b	0.95	1.00	1.00^b	1.00^b	1.00^b	1.00
	Modified HF183F/Bac708R	0.95	0.70	0.75	0.43	0.98	1.00	0.68	0.79	0.60	1.00
	Pig-2-Bac EP	1.00	0.98	0.98	0.91	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cattle	Bac2	0.70	1.00	0.94	1.00	0.93	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Bac3	0.85	1.00	0.97	1.00	0.96	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Cow-Bac2 EP	0.90	0.50^b	0.58^b	0.31	0.95	1.00	0.78^b	0.82^b	0.50	1.00

^a Not applicable.^b Significant difference was observed between Tha Chin and Chao Phraya watersheds as calculated by the two-proportion z test at p-values of 0.05 or less.

interference to the DNA isolation steps, which could affect the calculated sensitivity and specificity (Shanks et al., 2006a; Riedel et al., 2014; Rossen et al., 1992).

The following seven endpoint PCR fecal markers, including Bac32F/Bac708R, human-specific HF183F/Bac708R, swine-specific PF163F/Bac708R, and cow-specific Bac2, Bac3, CF193F/Bac708R, and CF128F/Bac708R markers were subsequently tested in other regions with an endpoint PCR platform (see Table 3 in Somnark et al. (2018)). The Bac32F/Bac708R primers performed well, with a sensitivity ranging from 0.78 to 1.00 in both tropical and temperate areas, consistent with our results (Ahmed et al., 2009; Bernhard and Field, 2000b; Bower et al., 2005; Carson et al., 2005; Fremaux et al., 2009; Gourmelon et al., 2007; Lamendella et al., 2009; Toledo-Hernandez et al., 2013). The human-specific primers HF183F/Bac708R demonstrated great sensitivity in Thailand (0.95), in agreement with results obtained for regions in USA, France, Canada, and Australia, while the sensitivity of this marker in Spain is unexpectedly low (0.50) (Ahmed et al., 2008, 2012; Ballesté et al., 2010; Bernhard and Field, 2000a; Bower et al., 2005; Fremaux et al., 2009; Gourmelon et al., 2007; Toledo-Hernandez et al., 2013). The swine-specific primers PF163F/Bac708R exhibited great sensitivity in this study in Thailand and other countries (Dick et al., 2005; Fremaux et al., 2009; Gourmelon et al., 2007; Lamendella et al., 2009; Toledo-Hernandez et al., 2013), but its cross-reaction with a limited number of cattle, chicken, sheep, and buffalo (14 out of 49) prevented us from characterizing the marker with a full set of fecal samples that would include human sewage. The simultaneously developed cattle-specific Bac2 and Bac3 markers showed perfect specificity in both this study and in the original region, although the sensitivity of their assays was consistently compromised. The cattle- or ruminant-specific CF193F/Bac708R primers were not fully tested with samples in Thailand because of its low sensitivity, in agreement with results obtained in Spain and Canada. The cattle- or ruminant-specific CF128F/Bac708R primers performed well with cattle feces but also with swine, chicken, and goat samples; the low specificity has been observed in other regions. It should be noted that, although there could be challenges in modifying from qPCR to endpoint PCR platform, this study showed that three out of four best assays (BacUni EP, HF183F/BFDrev EP, and Pig-2-Bac EP) were modified from qPCR platforms that outperformed their endpoint PCR contestants. Moreover, the distribution and levels of DNA markers could be affected by many factors; for example, the presence of CF128 and CF193 markers in cattle hosts was observed to be associated with the age and diet of calves (Shanks et al., 2014). Furthermore, some studies have used individual samples, while others have tested the markers with mixed or composite samples. The use of composite samples as opposed to individual fecal samples could compromise the true measurement of marker distributions in target and non-target hosts. However, in this study, composite fecal samples were intentionally created from the same animal facilities; moreover, human sewage samples were collected from populated buildings as representatives of human fecal pollution. Supported by the stratified random sampling method, each composite sample offered marker prevalence information in facility levels. The purpose of this approach was to mimic a situation in which massive fecal contamination from a farm level or community level is introduced into water bodies from runoff or direct disposal.

Expanding the application of these PCR assays to other regions would require additional validation tests with known fecal samples because of the potentially dissimilar distribution and prevalence of each genetic marker in human and animal populations. Additionally, calculation of sample sizes for proper sampling design is necessary to prevent oversized samples, which require more time

and money to process. Proper design is also necessary to avoid undersized samples, which would be inaccurate representations of the population of interest (Thompson, 2012). The use of the PCR assays examined in this study, which provided qualitative indications of pollution sources, could serve as a screening step that would lead to a thorough investigation of fecal source apportionment via other techniques, such as qPCR. Moreover, this study had evaluated the performance of PCR assays in detecting genetic targets, which were the intrinsic properties of sensitivity and specificity (Harwood and Stoeckel, 2011). For future MST application in environmental water samples, it is important to consider other factors that could influence the performance of the PCR assays, including inhibition effect from interfering substances present in environmental matrices, loss in recovery during sample processing, and the method's detection limits (Odagiri et al., 2016; Rajal et al., 2007; U.S. Environmental Protection Agency, 2004).

In conclusion, this work evaluated the performance of modified endpoint PCR assays in detecting *Bacteroidales* genetic targets in tropical agricultural watersheds. The BacUni EP, HF183/BFDrev EP, Pig-2-Bac EP, and Bac3 assays demonstrated potential for MST of general (non-host specific) and human-, swine-, and cattle-derived fecal pollution in the two most significant watersheds in central Thailand. This research demonstrates the multiregional applicability of the *Bacteroidales* genes in MST and emphasizes the need to use significant sample sizes to validate the MST markers in a new geographic area.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Thailand Research Fund under contract no. SRI5930305. KS also received the Kurita Water and Environmental Foundation (KWEF) – Asian Institute of Technology research grant. Ms. Rattiya Padungpol and Mr. Sinpana Uraruen are thankfully acknowledged for their help in establishing molecular experiments. We thank Mr. Akechai Kongprajug for his assistance in graphics preparation.

References

- Adami, A., Cavazzoni, V., 1999. Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *J. Basic Microbiol.* 39, 3–9.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Powell, D., Gardner, T., 2009. Evaluation of multiple sewage-associated *Bacteroides* PCR markers for sewage pollution tracking. *Water Res.* 43, 4872–4877. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.042>.
- Ahmed, W., Hughes, B., Harwood, V.J., 2016. Current status of marker genes of *Bacteroides* and related taxa for identifying sewage pollution in environmental waters. *Water* 8, 1–27. <https://doi.org/10.3390/w8060231>.
- Ahmed, W., Masters, N., Toze, S., 2012. Consistency in the host specificity and host sensitivity of the *Bacteroides* HF183 marker for sewage pollution tracking. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 283–289.
- Ahmed, W., Stewart, J., Powell, D., Gardner, T., 2008. Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 237–242.
- Al-soud, W.A.B.U., Radstrom, P., 1998. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3748–3753.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Ballesté, E., Bonjoch, X., Belanche, L.A., Blanch, A.R., 2010. Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1789–1795. <https://doi.org/10.1128/AEM.02350-09>.
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000a. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4571–4574. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4571-4574.2000>.
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000b. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1587–1594. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1587-1594.2000>. Updated.
- Boehm, A.B., Van De Werfhorst, L.C., Griffith, J.F., Holden, P.A., Jay, J.A., Shanks, O.C., Wang, D., Weisberg, S.B., 2013. Performance of forty-one microbial source tracking methods: a twenty-seven lab evaluation study. *Water Res.* 47,

- 6812–6828. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.046>.
- Botes, M., De Kwaadsteniet, M., Cloete, T.E., 2013. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 91–108.
- Bower, P. a, Scopel, C.O., Jensen, E.T., Depas, M.M., Mclellan, S.L., 2005. Detection of genetic markers of fecal indicator bacteria in Lake Michigan and determination of their relationship to *Escherichia coli* densities using standard microbiological methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8305–8313. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8305>.
- Cao, Y., Raith, M.R., Griffith, J.F., 2015. Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment. *Water Res.* 70, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.008>.
- Carson, C.A., Christiansen, J.M., Benson, V.W., Baffaut, C., Jerri, V., Broz, R.R., Kurtz, W.B., Rogers, W.M., Fales, W.H., Yampara-iquise, H., Davis, J.V., 2005. Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4945–4949.
- Dagher, H., Donniger, H., Hutchinson, P., Ghildyal, R., Bardin, P., 2004. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J. Virol. Methods* 117, 113–121.
- Dick, L., Field, K., 2004. Rapid estimation of numbers of fecal *Bacteroidetes* by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5695–5697. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5695>.
- Dick, L.K., Bernhard, A.E., Brodeur, T.J., Santo Domingo, J.W., Simpson, J.M., Walters, S.P., Field, K.G., 2005. Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3184–3191. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3184-3191.2005>.
- Field, K.G., Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* 41, 3517–3538. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.056>.
- Fremaux, B., Gritzfeld, J., Boa, T., Yost, C.K., 2009. Evaluation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed. *Water Res.* 43, 4838–4849. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.045>.
- Gawler, A.H., Beecher, J.E., Brandão, J., Carroll, N.M., Falcão, L., Gourmelon, M., Masterson, B., Nunes, B., Porter, J., Rincé, A., Rodrigues, R., Thorp, M., Walters, J.M., Meijer, W.G., 2007. Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Res.* 41, 3780–3784. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.028>.
- Gómez-Donate, M., Casanovas-Massana, A., Muniesa, M., Blanch, A.R., 2015. Development of new host-specific *Bacteroides* qPCRs for the identification of fecal contamination sources in water. *Microbiol. Open* 5, 83–94. <https://doi.org/10.1002/mbo3.313>.
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Segura, R., Le Mennec, C., Lozach, S., Piriou, J.Y., Rince, A., 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4857–4866. <https://doi.org/10.1128/AEM.03003-06>.
- Green, H.C., Dick, L.K., Gilpin, B., Samadpour, M., Field, K.G., 2012. Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 503–510. <https://doi.org/10.1128/AEM.05734-11>.
- Harwood, V.J., Boehm, A.B., Sassoubre, L.M., Vijayavel, K., Stewart, J.R., Fong, T.T., Caprais, M.P., Converse, R.R., Diston, D., Ebdon, J., Fuhrman, J. a., Gourmelon, M., Gentry-Shields, J., Griffith, J.F., Kashian, D.R., Noble, R.T., Taylor, H., Wicki, M., 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water Res.* 47, 6929–6943. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.064>.
- Harwood, V.J., Staley, C., Badgley, B.D., Borges, K., Korajkic, A., 2014. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1–40. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12031>.
- Harwood, V.J., Stoeckel, D.M., 2011. Chapter 2 Performance Criteria. In: Hagedorn, C., Blanch, A.R., Harwood, V.J. (Eds.), *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*. Springer New York, New York, NY, pp. 7–30.
- Haugland, R.A., Varma, M., Sivaganesan, M., Kelty, C., Peed, L., Shanks, O.C., 2010. Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected *Bacteroidales* species and human fecal waste by qPCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.06.001>.
- Hussein, K.R., Waines, P.L., Nisr, R.B., Glegg, G., Bradley, G., 2014. Development and use of *Bacteroides* 16S rRNA polymerase chain reaction assay for source tracking dog faecal pollution in bathing waters. *Hydrol. Curr. Res.* 5, 1–8.
- Hydro and Agro Informatics Institute, 2012a. Data Collection and Data Analysis for the Development of Databases of 25 River Basins and Flood and Drought Modelling: Tha Chin River Basin (Bangkok, Thailand).
- Hydro and Agro Informatics Institute, 2012b. Data Collection and Data Analysis for the Development of Databases of 25 River Basins and Flood and Drought Modelling: Chao Phraya River Basin (Bangkok, Thailand).
- Information and Communication Technology Center, 2015. 2015 Farm animals and farmers per province. <http://ict.dld.go.th/th2/index.php/th/report/447-report-thailand-livestock/reportserve2558-1/869-report-survey58>. (Accessed 10 June 2016) (Thai).
- Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., Muniesa, M., 2014. Bacteriophages infecting *Bacteroides* as a marker for microbial source tracking. *Water Res.* 55, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.006>.
- Kildare, B.J., Leutenegger, C.M., McSwain, B.S., Bambi, D.G., Rajal, V.B., Wuertz, S., 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: a Bayesian approach. *Water Res.* 41, 3701–3715. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.037>.
- Kobayashi, A., Sano, D., Hatori, J., Ishii, S., Okabe, S., 2013. Chicken- and duck-associated *Bacteroides-Prevotella* genetic markers for detecting fecal contamination in environmental water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7427–7437. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4469-2>.
- Lamendella, R., Domingo, J.W.S., Oerther, D.B., Vogel, J.R., Stoeckel, D.M., 2007. Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of *Bacteroidetes* 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 651–660. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00211.x>.
- Lamendella, R., Santo Domingo, J.W., Yannarell, A.C., Ghosh, S., Di Giovanni, G., Mackie, R.L., Oerther, D.B., 2009. Evaluation of swine-specific PCR assays used for fecal source tracking and analysis of molecular diversity of swine-specific “*Bacteroidales*” populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5787–5796.
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R., Sayler, G., 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene taqman-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4214–4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-05>.
- Leknoi, Y., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K., 2017. Assessment of swine-specific bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in swine farms with different antibiotic practices. *J. Water Health.* <https://doi.org/10.2166/wh.2016.069>.
- Leon, E., Duffy, S., O’Leary, B., Stevenson, M., 2011. ProMESA Version 2.3.0.2.
- Li, X., Harwood, V.J., Nayak, B., Staley, C., Sadowsky, M.J., Weidhaas, J., 2015. A novel microbial source tracking microarray for pathogen detection and fecal source identification in environmental systems. *Environ. Sci. Technol.* 49, 7319–7329. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00980>.
- Li, X., Harwood, V.J., Nayak, B., Weidhaas, L., 2016. Ultrafiltration and microarray for detection of microbial source tracking marker and pathogen genes in riverine and marine systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1625–1635. <https://doi.org/10.1128/AEM.02583-15>.
- Looft, T., Allen, H.K., Cantarel, B.L., Levine, U.Y., Bayles, D.O., Alt, D.P., Henrissat, B., Stanton, T.B., 2014. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J.* 8, 1566–1576. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.12>.
- Lu, J., Santo Domingo, J., Shanks, O.C., 2007. Identification of chicken-specific fecal microbial sequences using a metagenomic approach. *Water Res.* 41, 3561–3574. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.033>.
- Lu, X.M., Lu, P.Z., Zhang, H., 2013. Bacterial communities in manures of piglets and adult pigs bred with different feeds revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2657–2665. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5211-4>.
- Mah, K.W., Sangsupawanich, P., Tunyapanit, W., van Bever, H., Shek, L.P., Chua, K.Y., Lee, B.W., 2008. Gut microbiota of children living in rural south Thailand and urban Singapore. *Allergol. Int.* 57, 65–71. <https://doi.org/10.2332/allergolint.0-07-501>.
- Mieszkin, S., Furet, J.-P., Corthier, G., Gourmelon, M., 2009. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3045–3054. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-08>.
- National Statistical Office Thailand, 2016. Official Statistics Registration Systems. http://stat.dopa.go.th/stat/statnew/upstat_age.php. (Accessed 15 June 2016).
- Odagiri, M., Schriever, A., Hanley, K., Wuertz, S., Misra, P.R., Panigrahi, P., Jenkins, M.W., 2015. Validation of *Bacteroidales* quantitative PCR assays targeting human and animal fecal contamination in the public and domestic domains in India. *Sci. Total Environ.* 502, 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.040>.
- Odagiri, M., Schriever, A., Daniels, M.E.M.E., Wuertz, S., Smith, W.A., Clasen, T., Schmidt, W.-P.W., Jin, Y., Torondel, B., Misra, P.R., Panigrahi, P., Jenkins, M.W.M.W., 2016. Human fecal and pathogen exposure pathways in rural Indian villages and the effect of increased latrine coverage. *Water Res.* 100, 232–244.
- Ohad, S., Ben-Dor, S., Prilusky, J., Kravitz, V., Dassa, B., Chalifa-Caspi, V., Kashi, Y., Rorman, E., 2016. The development of a novel qPCR assay-set for identifying fecal contamination originating from domestic fowls and waterfowl in Israel. *Front. Microbiol.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00145>.
- Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O., Ito, T., 2007. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 890–901. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0714-x>.
- Pollution Control Department (PCD), 2015. Thailand State of Pollution Report 2015. PCD No. 06–062. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Ragheb, S.M., Jimenez, L., 2014. Polymerase chain reaction/rapid methods are gaining a foothold in developing countries. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 68, 239–255.
- Rajal, V.B., McSwain, B.S., Thompson, D.E., Leutenegger, C.M., Kildare, B.J., Wuertz, S., 2007. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res.* 41, 1411–1422.
- Riedel, T.E., Zimmer-Faust, A.G., Thulsiraj, V., Madi, T., Hanley, K.T., Ebentier, D.L., Byappanahalli, M., Layton, B., Raith, M., Boehm, A.B., Griffith, J.F., Holden, P.A., Shanks, O.C., Weisberg, S.B., Jay, J.A., 2014. Detection limits and cost

- comparisons of human- and gull-associated endpoint and quantitative PCR assays in artificial and environmental waters. *J. Environ. Manag.* 136, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.01.029>.
- Rissanen, A.J., Kurhela, E., Aho, T., Oittinen, T., Tirola, M., 2010. Storage of environmental samples for guaranteeing nucleic acid yields for molecular microbiological studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 977–984. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2838-2>.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O.F., 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 37–45.
- Saeidi, N., Gu, X., Goh, S.G., Xin, C.L.Y., Gin, K.Y.H., 2017. Evaluating the efficacy of commercial kits for viral DNA/RNA extraction. *Water Pract. Technol.* 12, 80–86. <https://doi.org/10.2166/wpt.2017.015>.
- Santo Domingo, J.W., Bambic, D.G., Edge, T. a., Wuertz, S., 2007. Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. *Water Res.* 41, 3539–3552. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.001>.
- Sargent, D., Kammin, W.R., Collyard, S., 2011. *Review and Critique of Current Microbial Source Tracking (MST) Techniques*. No. 11-03-038. Olympia, Washington, USA.
- Schriewer, A., Goodwin, K.D., Sinigalliano, C.D., Cox, A.M., Wanless, D., Bartkowiak, J., Ebentier, D.L., Hanley, K.T., Ervin, J., Deering, L.A., Shanks, O.C., Peed, L.A., Meijer, W.G., Griffith, J.F., SantoDomingo, J., Jay, J.A., Holden, P.A., Wuertz, S., 2013. Performance evaluation of canine-associated *Bacteroidales* assays in a multi-laboratory comparison study. *Water Res.* 47, 6909–6920. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.062>.
- Schriewer, A., Wehlmann, A., Wuertz, S., 2011. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *J. Microbiol. Meth.* 85, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.12.027>.
- Shanks, O.C., Atikovic, E., Blackwood, A.D., Lu, J., Noble, R.T., Domingo, J.S., Seifring, S., Sivaganesan, M., Haugland, R.A., 2008. Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 745–752. <https://doi.org/10.1128/AEM.01843-07>.
- Shanks, O.C., Kelty, C.A., Archibeque, S., Jenkins, M., Newton, R.J., McLellan, S.L., Huse, S.M., Sogin, M.L., 2011. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2992–3001. <https://doi.org/10.1128/AEM.02988-10>.
- Shanks, O.C., Kelty, C.A., Peed, L., Sivaganesan, M., Mooney, T., Jenkins, M., 2014. Age-related shifts in the density and distribution of genetic marker water quality indicators in cow and calf feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1588–1594. <https://doi.org/10.1128/AEM.03581-13>.
- Shanks, O.C., Nietch, C., Simonich, M., Younger, M., Reynolds, D., Field, K.G., 2006a. Basin-wide analysis of the dynamics of fecal contamination and fecal source identification in Tillamook Bay, Oregon. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5537–5546.
- Shanks, O.C., Santo Domingo, J.W., Lamendella, R., Kelty, C.A., Graham, J.E., 2006b. Competitive metagenomic DNA hybridization identifies host-specific microbial genetic markers in cow fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4054–4060. <https://doi.org/10.1128/AEM.00023-06>.
- Shanks, O.C., White, K., Kelty, C.A., Hayes, S., Sivaganesan, M., Jenkins, M., Varma, M., Haugland, R.A., 2010. Performance assessment PCR-based assays targeting *Bacteroidales* genetic markers of bovine fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1359–1366. <https://doi.org/10.1128/AEM.02033-09>.
- Siefring, S., Varma, M., Atikovic, E., Wymer, L., Haugland, R.A., 2008. Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *J. Water Health.* 6, 225–237. <https://doi.org/10.2166/wh.2008.022>.
- Silva, D.M., Domingues, L., 2015. On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: a review on PCR-based methods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 400–411.
- Sirikanchana, K., Wangkahad, B., Mongkolsuk, S., 2014. The capability of non-native strains of *Bacteroides* bacteria to detect bacteriophages as faecal indicators in a tropical area. *J. Appl. Microbiol.* 117, 1820–1829. <https://doi.org/10.1111/jam.12646>.
- Smith, C.J., Osborn, A.M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 6–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>.
- Somnark, P., Chyerochana, N., Kongprajug, A., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K., 2018. PCR data and comparative performance of *Bacteroidales* microbial source tracking genetic markers. Data in Brief.
- Thompson, S.K., 2012. Sampling. In: Hoboken, third. ed. Wiley, New Jersey, United States.
- Toledo-Hernandez, C., Ryu, H., Gonzalez-Nieves, J., Huertas, E., Toranzo, G.A., Santo Domingo, J.W., 2013. Tracking the primary sources of fecal pollution in a tropical watershed in a one-year study. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1689–1696. <https://doi.org/10.1128/AEM.03070-12>.
- Tran, N.H., Gin, K.Y.-H., Ngo, H.H., 2015. Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Sci. Total Environ.* 538, 38–57. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.155>.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2004. Quality Assurance/quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples. EPA 815-B-04–001. Office of Water, Washington, D.C., United States.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2005. Microbial Source Tracking Guide Document. EPA/600-R-05–064. Office of Research and Development, Cincinnati, OH, United States.
- Wangkahad, B., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K., 2017. Integrated multivariate analysis with nondetects for the development of human sewage source-tracking tools using bacteriophages of *Enterococcus faecalis*. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2235–2245. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04714>.
- Weidhaas, J.L., Macbeth, T.W., Olsen, R.L., Sadowsky, M.J., Norat, D., Harwood, V.J., 2010. Identification of a *Brevibacterium* marker gene specific to poultry litter and development of a quantitative PCR assay. *J. Appl. Microbiol.* 109, 334–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04666.x>.
- World Health Organization, 2016. Establishment of PCR Laboratory in Developing Countries, second ed. Regional Office for South-East Asia, India.

ภาคผนวก ซ. บทความวิชาการ

Pornjira Somnark, Natcha Chyerochana, Akechai Kongprajug, Skorn Mongkolsuk, and
Kwanrawee Sirikanchana (2018) PCR data and comparative performance of *Bacteroidales*
microbial source tracking genetic markers



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib

Data Article

PCR data and comparative performance of *Bacteroidales* microbial source tracking genetic markers

Pornjira Somnark^a, Natcha Chyerochana^b,
Akechai Kongprajug^b, Skorn Mongkolsuk^{b,c,d},
Kwanrawee Sirikanchana^{b,d,*}

^a Applied Biological Sciences, Chulabhorn Graduate Institute, Chulabhorn Royal Academy, Lak Si, Bangkok 10210 Thailand

^b Research Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Lak Si, Bangkok 10210 Thailand

^c Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400 Thailand

^d Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology (EHT), Ministry of Education, Bangkok 10210 Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2018

Received in revised form

20 April 2018

Accepted 30 April 2018

Available online 5 May 2018

Keywords:

Endpoint PCR

Fecal pollution

Microbial source tracking

Bacteroidales

Sensitivity

Specificity

Water quality

ABSTRACT

We reported modified endpoint PCR results analyzed by universal and human-, swine-, and cattle-specific *Bacteroidales* gene markers with human sewage and animal fecal samples (i.e., swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, and duck) from Tha Chin and Chao Phraya watersheds. Annealing locations of PCR primers were illustrated by maps of 16S rRNA *Bacteroidales* genes. We also summarized previously published work on the performance of the PCR assays. For further discussion of the data presented here, please refer to Somnark et al., Performance evaluation of *Bacteroidales* genetic markers for human and animal microbial source tracking in tropical agricultural watersheds, Environ. Pollut. 236 (2018) 100–110.

© 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI of original article: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.052>

* Corresponding author at: Research Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Lak Si, Bangkok, Thailand.

E-mail address: kwanrawee@cri.or.th (K. Sirikanchana).

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.04.129>

2352-3409/© 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Specifications Table

Subject area	Biology
More specific subject area	Applied microbiology
Type of data	Tables and figures
How data were acquired	PCR instrument (Mastercycler Pro thermocycler, Eppendorf), and literature review
Data format	Analyzed
Experimental factors	Composite fecal and sewage samples were collected, and DNA extraction was performed
Experimental features	PCR primers originally designed as endpoint and quantitative PCR were used in the modified endpoint PCR assays.
Data source location	Samples were collected from Tha Chin (Chai Nat, Suphan Buri, Nakhon Pathom, and Samut Sakhon provinces) and Chao Phraya (Phra Nakhon Si Ayutthaya, Pathum Thani, and Bangkok provinces) watersheds, located in the central part of Thailand.
Data accessibility	Data are with this article

Value of the data

- PCR results of *Bacteroidales*-modified endpoint PCR markers could be compared with microbial source tracking (MST) studies in other geographic areas for further development of region-specific MST methods.
- *Bacteroidales* PCR primer maps could offer an insight into annealing regions of primers for further design of new primers or evaluating currently available primers with their performance.
- A summary of PCR assays that are originally designed and adopted to other regions could serve as a database for comparing the MST method performance in different geographical areas.

1. Data

We performed endpoint PCR assays modified from published methods originally in PCR and qPCR platforms. PCR results of ten good-performing modified endpoint PCR assays against human sewage and animal fecal samples from Tha Chin and Chao Phraya watersheds are shown (Table 1). There were six modified endpoint PCR assays that demonstrated potentially low sensitivity or specificity during the process of testing against a limited number of samples and therefore were not further tested with total samples (Table 2). We also compiled sensitivity and specificity data of previously published *Bacteroidales* genetic markers from both studies that originally designed the assays and studies that adopted the designed assays to be used in another geographic location (Table 3). To provide further insight into PCR performance, we mapped PCR primers to 16S rRNA gene of human-, swine-, and cattle-associated *Bacteroidales* (Figs. 1 and 2). Amplified PCR products with universal and human-, swine-, and cattle-specific *Bacteroidales* PCR assays were presented (Fig. 3).

2. Experimental design, materials and methods

2.1. Sample collection and DNA extraction

Raw human sewage and non-human fecal samples were collected from Tha Chin and Chao Phraya watersheds. One composite fecal sample was prepared by mixing fresh feces of at least 20 individuals. Samples were transported on ice to the laboratory. DNA extraction of composite fecal samples and 0.22-µm-pore-size mixed cellulose ester membrane (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) after 50–

Table 1

Positive PCR results of modified endpoint PCR markers showing good performance with samples from Tha Chin and Chao Phraya watersheds.

Host	Assay name	Tha Chin watershed								Chao Phraya watershed					
		Human (19)	Swine (20)	Cattle (20)	Chicken (19)	Goat (7)	Sheep (5)	Buffalo (5)	Duck (5)	Human (9)	Swine (8)	Cattle (5)	Chicken (2)	Goat (3)	Buffalo (1)
Universal	BacUni EP	19	20	20	20	7	5	5	5	9	8	5	1	3	1
	GenBac3 EP	19	20	20	20	7	5	5	5	9	8	5	2	3	1
	Bac32F/Bac708R	15	20	20	20	7	5	5	5	9	8	5	2	3	1
Human	BacHum EP	18	17	1	9	5	2	1	2	9	7	0	0	2	0
	HF183F/BFDrev EP	16	4	1	9	2	1	0	2	9	0	0	0	0	0
	Modified HF183F/ Bac708R	18	4	4	12	1	1	0	2	9	5	0	0	1	0
Swine	Pig-2-Bac EP	0	20	0	2	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
Cattle	Bac2	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
	Bac3	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
	Cow-Bac2 EP	0	1	18	18	7	5	5	4	0	0	5	1	3	1

Table 2

Positive PCR results of modified endpoint PCR markers showing relatively poor performance with limited numbers of samples from the Tha Chin watershed.

Fecal origin	Assay name	No. of positive samples/no. of samples tested ^a								Sensitivity	Specificity	Accuracy
		Human	Swine	Cattle	Chicken	Goat	Sheep	Buffalo	Duck			
Swine	PF163F/Bac708R	0/0	20/20	6/20	3/19	0/7	1/5	4/5	0/5	1.00	0.77	0.83
Cattle	CowM2 EP	0/0	3/3	6/7	1/1	2/2	0/0	0/0	0/0	0.86	0.00	0.47
	BacCow EP	0/0	3/3	7/7	1/1	2/2	0/0	0/0	0/0	1.00	0.00	0.54
	CF193F/Bac708R	0/0	0/3	0/7	0/1	0/2	0/0	0/0	0/0	0.00	1.00	0.46
	CF128F/Bac708R	0/0	3/3	7/7	1/1	2/2	0/0	0/0	0/0	1.00	0.00	0.54
	BoBac EP	0/0	18/19	20/20	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1.00	0.05	0.54

^a Limited number of animal samples tested for certain assays due to potentially low sensitivity or specificity.

100 mL human sewage filtration was performed with a ZR Fecal DNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). DNA concentrations were measured using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

2.2. PCR method modification and performance criteria

PCR primers targeting universal and human-, swine-, and cattle-specific fecal markers were selected from both endpoint and quantitative PCR platforms (Table 4). A 10-μL PCR is composed of 0.5 μL each of 10 μM forward primers and 10 μM reverse primers, 1-μL of DNA template (corresponding to 0.2, 2.0 or 20 ng total DNA), 5 μL of DreamTaq PCR Master Mix (2×; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and sterile water. The reaction was processed in a Mastercycler Pro thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). PCR cycling conditions were modified as follows: initial denaturation at 95 °C for 3 min; 30 cycles of a denaturation step at 95 °C for 30 s, an annealing step at varying temperature and time (Table 4), and an elongation step at 72 °C for 30 s; and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were visualized with a Gel Doc XR system (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). PCRs were run in duplicate. No-template controls and extraction blanks were included for quality control. Performance criteria including sensitivity, specificity, and accuracy were calculated as $TP/(TP+FN)$, $TN/(TN+FP)$, and $(TP+TN)/(TP+FP+TN+FN)$, respectively, where TP, FN, TN, and FP, are true positive, false negative, true negative, and false positive, respectively.

Table 3Sensitivity and specificity of *Bacteroidales* markers in studied in which the assays were originally designed and adopted to other geographic regions.

Host source	Assay name	Platform	Geographical region	Original/ Adopted	Sensitivity (n) ^a	Specificity (n)	Non-target hosts	Reference
Universal	BacUni	qPCR	California, USA	Original	1.00 (n=73)	NA ^b	Human ^c , cow, horse, dog, cat, seagull, WWTP ^d (primary influent)	[1]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=100, composite)	NA	Swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, duck, sewage ^e	[2]
		PCR	Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted	0.96 (n=28, composite)	NA	Swine, cattle, chicken, goat, buffalo, sewage	[2]
Universal	GenBac3	qPCR	Louisiana, Michigan, Mississippi, USA	Original	NA	NA	Surface water sample	[3]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=100, composite)	NA	Swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, duck, sewage	[2]
			Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=28, composite)	NA	Swine, cattle, chicken, goat, buffalo, sewage	[2]
Universal	Bac32F/ Bac708R	PCR	Oregon, USA	Original	1.00 (n=30)	NA	Human, cow	[4]
		PCR	Southeast Queensland, Australia	Adopted	1.00 (n=186)	NA	Cattle, pig, sheep, goat, horse, chicken, dog, duck, pelican, kangaroo, WWTP	[5] (one base pair mismatch for Bac32F primer)
		PCR	Wisconsin, USA	Adopted	1.00 (n=89)	NA	Cow, WWTP	[6]
		PCR	Missouri, USA	Adopted	0.89 (n=286)	NA	Human, sewage, dog, beef cattle, dairy cattle, chicken, turkey, horse, swine, goose	[7]
		PCR	Britanny and Normandy, France	Adopted	0.96 (n=136)	NA	Pig, cow, sheep, chicken, wild bird	[8]
		PCR	Saskatchewan, Canada	Adopted	1.00 (n=273)	NA	Human, WWTP, cow, pig, chicken, goose, moose, deer, caribou, bison, goat	[9]
		PCR	Illinois, Nebraska, Ohio, Texas, Delaware, and West Virginia, USA	Adopted	0.78 (n=222)	NA	Cattle, human, chicken, raccoon, horse, pig, pig manure pit, pig waste lagoon	[10]
		PCR	Puerto Rico, USA	Adopted	0.89 (n=356)	NA	Cow, goat, horse, swine, monkey, fish, pigeon, chicken, guinea fowl, duck, turkey, swan, WWTP	[11]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	0.96 (n=100, composite)	NA	Swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, duck, sewage	[2]
			Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=28, composite)	NA	Swine, cattle, chicken, goat, buffalo, sewage	[2]

Human	BacHum	qPCR	California, USA	Original	0.67 (n=18); 1.00 (n=14, sewage)	0.98 (n=41)	Cow, horse, dog, cat, seagull	[1]
		PCR	Southeast Queensland, Australia	Adopted	1.00 (n=50, WWTP)	0.96 (n=136)	Cattle, pig, sheep, goat, horse, chicken, dog, duck, pelican, kangaroo	[5]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	0.95 (n=19, sewage)	0.54 (n=81, composite)	Swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, duck	[2]
Human	HF183/ BFDrev	qPCR	Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=9, sewage)	0.53 (n=19, composite)	Swine, cattle, chicken, goat, buffalo	[2]
			Michigan, Minnesota, Colorado, South Dakota, Wyoming, Hawaii, Virginia, Ohio, Florida, North Carolina, and New York, USA	Original	1.00 (n=14, WWTP)	0.60 (n=5, composite)	Cow, pig, chicken, dog, cat	[12]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	0.84 (n=19, sewage)	0.77 (n=81, composite)	Swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, duck	[2]
Human	HF183/ Bac708R	PCR	Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=9, sewage)	1.00 (n=19, composite)	Swine, cattle, chicken, goat, buffalo	[2]
			Oregon, USA	original	0.85 (n=13); 1.00 (n=3, WWTP)	1.00 (n=46)	Cow, deer, elk, cat, dog, duck, pig, gull, goat, llama, sheep	[13]
		PCR	Southeast Queensland, Australia	Adopted	1.00 (n=52, WWTP)	1.00 (n=155)	Duck, kangaroos, cattle, horse, dog, chicken, pig, pelican, goat, deer, wild birds, sheep	[14]
		PCR	Spain	Adopted	0.50 (n=40, WWTP)	0.71 (n=73)	Poultry, pig, cow	[15]
		PCR	Southeast Queensland, Australia	Adopted	1.00 (n=59, WWTP); 0.80 (n=20)	0.95 (n=214)	Bird, camel, cattle, chicken, dog, duck, horse, kangaroo, pig, possum	[16]
		PCR	Britanny and Normandy, France	Adopted	0.98 (n=44)	0.99 (n=86)	Pig, cow, sheep, chicken, wild bird	[8]
		PCR	Puerto Rico, USA	Adopted	0.75 (n=16, sewage WWTP)	1.00 (n=340)	Cow, goat, horse, swine, monkey, fish, pigeon, chicken, guinea fowl, duck, turkey, swan	[11]
		PCR	Wisconsin, USA	Adopted	1.00 (n=14, WWTP)	1.00 (n=75)	Cow	[6]
		PCR	Saskatchewan, Canada	Adopted	1.00 (n=8, WWTP); 0.94 (n=54)	1.00 (n=211)	Cow, pig, chicken, goose, moose, deer, caribou, bison, goat	[9]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	0.95 (n=19, sewage)	0.70 (n=81, composite)	Swine, cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, duck	[2]

Table 3 (continued)

Host source	Assay name	Platform	Geographical region	Original/ Adopted	Sensitivity (n) ^a	Specificity (n)	Non-target hosts	Reference
Swine	PF163F/ Bac708R	PCR	Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=9, sewage)	0.68 (n=19, composite)	Swine, cattle, chicken, goat, buffalo	[2]
		PCR	Cincinnati, Ohio	Original	1.00 (n=19)	NA	NA	[17]
		PCR	Saskatchewan, Canada	Adopted	1.00 (n=50)	1.00 (n=223)	Human, WWTP, cow, chicken, goose, moose, deer, caribou, bison, goat	[9]
		PCR	Illinois, Nebraska, Ohio, Texas, Delaware, and West Virginia, USA	Adopted	0.87 (n=97); 1.00 (n=6, slurry)	0.77 (n=119)	Cattle, cattle lagoon, human, chicken, raccoon, horse	[10]
		PCR	Puerto Rico, USA	Adopted	1.00 (n=30)	0.75 (n=261)	Cow, goat, horse, monkey, fish, pigeon, chicken, guinea fowl, duck, turkey, swan, WWTP	[11]
		PCR	Britanny and Normandy, France	Adopted	1.00 (n=25)	0.98 (n=105)	Human, cow, sheep, chicken, wild bird	[8]
Swine	Pig-2-Bac	PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=20, composite)	0.77 (n=61, composite)	Cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, duck	[2]
		qPCR	Brittany, France	Original	1.00 (n=25); 1.00 (n=23, slurry)	1.00 (n=54)	Human, bovine, horse, sheep	[18]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=20, composite)	0.98 (n=80, composite)	Cattle, chicken, goat, sheep, buffalo, duck, sewage	[2]
Cattle	CowM2	qPCR	Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=8, composite)	1.00 (n=20, composite)	Cattle, chicken, goat, buffalo, sewage	[2]
		qPCR	West Virginia, Georgia, Wyoming, Delaware, Florida, and Ohio, USA	Original	1.00 (n=60)	1.00 (n=139); 1.00 (n=5, WWTP (primary effluent))	Alpaca, goat, mule deer, sheep, Canadian goose, cat, chicken, dog, duck, horse, human, pelican, pig, sea gull, turkey	[19]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	0.86 (n=7, composite)	0.00 (n=6, composite)	Swine, chicken, goat	[2]
Cattle	BacCow	qPCR	California, USA	Original	1.00 (n=8)	0.95 (n=65)	Human, horse, dog, cat, seagull, WWTP (primary effluent)	[1]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=7, composite)	0.00 (n=6, composite)	Swine, chicken, goat	[2]
Cattle	CF193/ Bac708R	PCR	Oregon, USA	Original	1.00 (n=19)	0.72 (n=43)	Human, WWTP, deer, elk, cat, dog, duck, pig, gull, goat, llama, sheep	[13]
		PCR	Wisconsin, USA	Adopted	0.85 (n=75)	NA	NA	[6]
		PCR	Saskatchewan, Canada	Adopted	0.16 (n=32)	NA	NA	[9]

Cattle	CF128F/ Bac708R	PCR	Spain, UK, Cyprus, France, and Sweden	Adopted	0.00 (n=19, ruminant)	0.99 (n=94)	WWTP, poultry, pig	[15]
		PCR	USA	Adopted	0.68 (n=247)	1.00 (n=175)	Alpaca, pronghorn, elk, gazelle, giraffe, goat, mule deer, okapi, sheep, takin, tufted deer, moose, white-tailed deer, Canadian goose, cat, chicken, dog, duck, horse, human, pelican, pig, raccoons, sea gull, turkey	[20]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	0.00 (n=7, composite)	1.00 (n=6, composite)	Swine, chicken, goat	[2]
		PCR	Oregon, USA	Original	1.00 (n=19)	0.77 (n=43)	Human, WWTP, deer, elk, cat, dog, duck, pig, gull, goat, llama, sheep	[13]
		PCR	Wisconsin, USA	Adopted	1.00 (n=75)	0.93 (n=14)	WWTP	[6]
		PCR	Britanny and Normandy, France	Adopted	1.00 (n=32)	0.60 (n=98)	Human, pig, chicken, sheep, wild bird	[8]
		PCR	Saskatchewan, Canada	Adopted	0.96 (n=51, cow);	0.62 (n=222, cow);	Human, WWTP, pig, chicken, goose	[9]
					0.98 (n=121, ruminant=cow, deer, caribou, bison, moose, goat)	0.93 (n=152, ruminant=cow, deer, caribou, bison, moose, goat)		
		PCR	Spain	Adopted	0.26 (n=19, ruminant)	1.00 (n=95)	WWTP, poultry, pig	[15]
		PCR	USA	Adopted	0.85 (n=247)	0.76 (n=175)	Alpaca, pronghorn, elk, gazelle, giraffe, goat, mule deer, okapi, sheep, takin, tufted deer, moose, white-tailed deer, Canadian goose, cat, chicken, dog, duck, horse, human, pelican, pig, raccoons, sea gull, turkey	[20]
		PCR	Puerto Rico, USA	Adopted	0.64 (n=66)	0.90 (n=290)	Goat, horse, swine, monkey, fish, pigeon, chicken, guinea fowl, duck, turkey, swan, WWTP	[11]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=7, composite)	0.00 (n=6, composite)	Swine, chicken, goat	[2]
		PCR	USA	Adopted	0.54 (n=148)	1.00 (n=279)	Bird, human, domestic, wildlife, pets, water by cattle	[21]
		PCR	USA	Adopted	0.54 (n=247)	1.00 (n=175)	Alpaca, pronghorn, elk, gazelle, giraffe, goat, mule deer, okapi, sheep, takin, tufted deer, moose, white-tailed deer, Canadian goose, cat, chicken, dog, duck, horse, human, pelican, pig, raccoons, sea gull, turkey	[20]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	0.70 (n=20, composite)	1.00 (n=80, composite)	Swine chicken, goat, sheep, buffalo, duck, sewage	[2]
Cattle	Bac2		Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted			Swine chicken, goat, buffalo, sewage	[2]

Table 3 (continued)

Host source	Assay name	Platform	Geographical region	Original/ Adopted	Sensitivity (n) ^a	Specificity (n)	Non-target hosts	Reference
Cattle	Bac3	PCR	USA	Original	1.00 (n=5, composite) 0.91 (n=148)	1.00 (n=23, composite) 0.99 (n=245)	Human, sewage, bovine, chicken, black vulture, Canadian goose, peacock, pigeon, dog, cat, guinea pig, domestic goat, pig, sheep, horse, alpaca, llama, armadillo, bobcat, coyote, gray squirrel, rabbit, opossum, raccoon, whitetail deer, wild turkey, hedgehog, prairie dog	[21]
		PCR	USA	Adopted	0.69 (n=247, ind)	0.99 (n=175, ind)	Alpaca, pronghorn, elk, gazelle, giraffe, goat, mule deer, okapi, sheep, takin, tufted deer, moose, white-tailed deer, canadian goose, cat, chicken, dog, duck, horse, human, pelican, pig, raccoons, sea gull, turkey	[20]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	0.85 (n=20, composite)	1.00 (n=80, composite)	Swine chicken, goat, sheep, buffalo, duck, sewage	[2]
		Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=5, composite)	1.00 (n=23, composite)	Swine chicken, goat, buffalo, sewage	[2]	
Cattle	Cow-Bac2	qPCR	Sapporo and Ebetsu Cities, Japan	Original	1.00 (n=7)	1.00 (n=9)	Human, pig	[22]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	0.90 (n=20, composite)	0.50 (n=80, composite)	Swine chicken, goat, sheep, buffalo, duck, sewage	[2]
Cattle	BoBac	qPCR	Chao Phraya watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=5, composite)	0.78 (n=23, composite)	Swine chicken, goat, buffalo, sewage	[2]
		qPCR	Tennessee, Pennsylvania, and Texas, USA	Adopted	1.00 (n=11)	0.87 (n=15)	Human, swine, canine, equine	[23]
		PCR	Tha Chin watershed, Thailand	Adopted	1.00 (n=20, composite)	0.05 (n=19, composite)	Swine	[2]

^a Total number of samples being tested.^b Not applicable.^c Human individual fecal sample.^d Influent of municipal wastewater treatment plant, unless stated otherwise.^e Influent of wastewater treatment system in buildings or septic tanks.

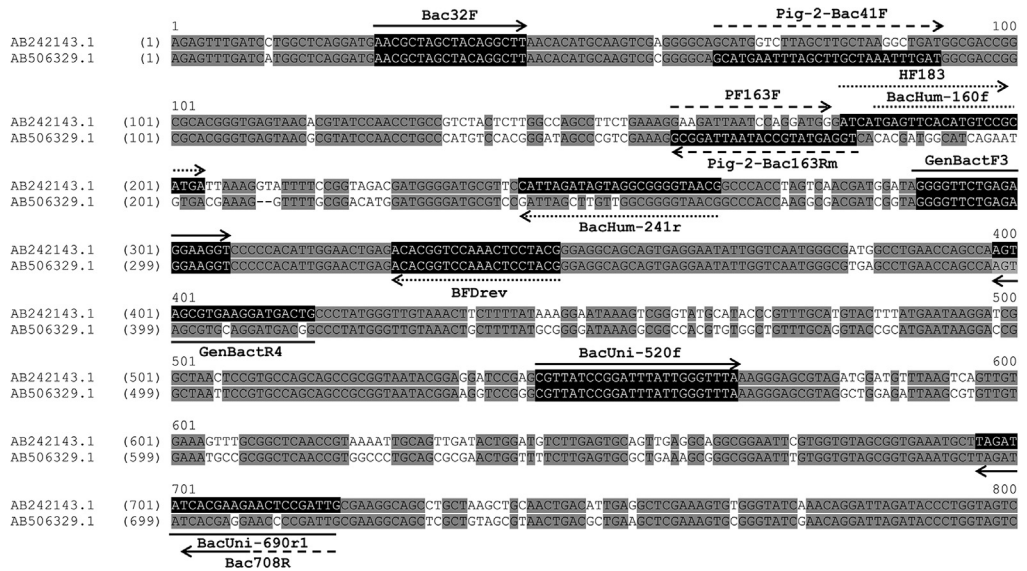


Fig. 1. Primer map targeting the 16S rRNA gene of human- and swine-associated *Bacteroidales*. All primers were BLASTed against the NCBI database. The representative sequences from human feces (Accession no. AB242143.1 [24]) and swine feces (AB506329.1 [25]) were selected to align with specific primers. Human-specific, swine-specific and universal *Bacteroidales* primers are indicated in dotted, dashed and solid arrows, respectively.

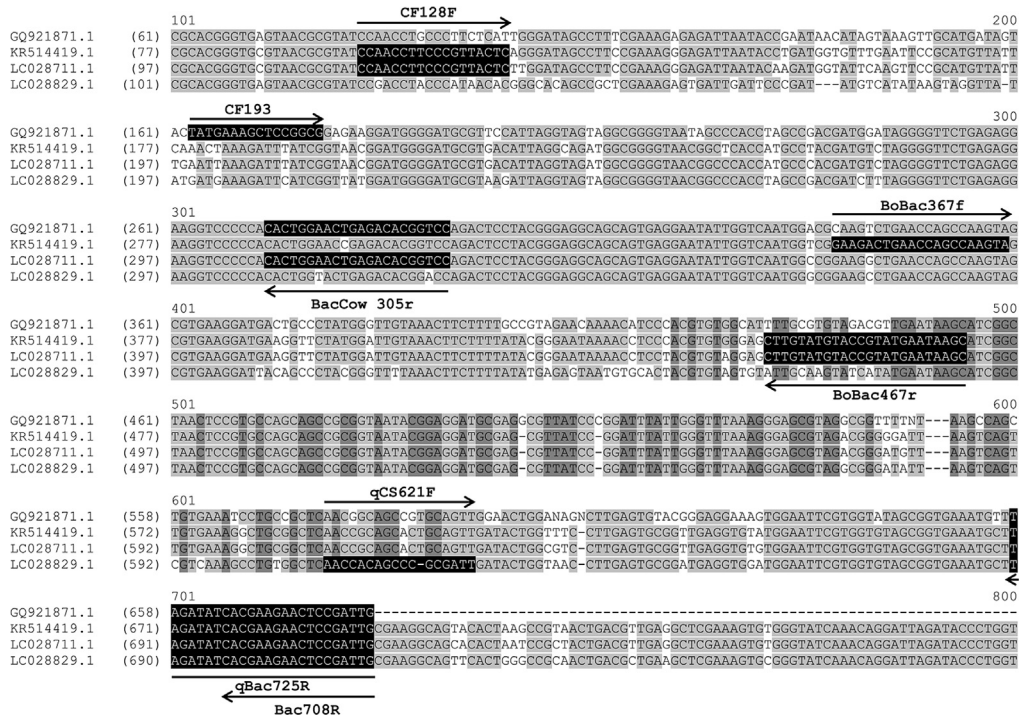


Fig. 2. Primer map targeting the 16S rRNA gene of cattle-associated *Bacteroidales*. All primers were BLASTed against the NCBI database. The representative sequences (Accession nos. GQ921871.1 [26], KR514419.1, LC028711.1, and LC028829.1) were selected to align with specific primers.

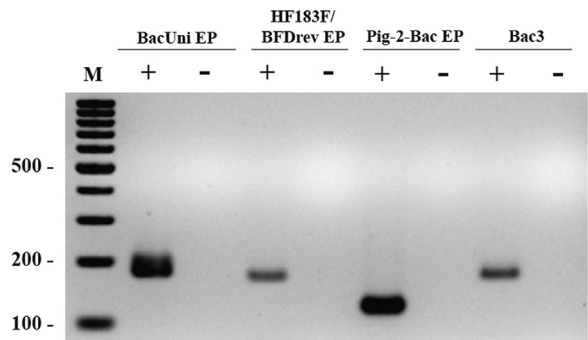


Fig. 3. PCR results showing amplification products for universal and human-, swine-, and cattle-specific *Bacteroidales* markers (see [2] for related information).

Table 4

Primer sequences and PCR cycling conditions.

Host	Assay name	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Annealing temperature (°C)	Annealing time (s)	Original platform	Reference
Universal	BacUni EP	BacUni-520f BacUni-690r1	CGT-TAT-CCG-GAT-TTA-TTG-GGT-TTA CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG-ATA-TCT-A	60.0	30	qPCR	[1]
	GenBac3 EP	GenBac3F GenBac3R	GGG-GTT-CTG-AGA-GGA-AGG-T CCG-TCA-TCC-TTC-ACG-CTA-CT	60.0	30	qPCR	[3]
	Bac32F/Bac708R	Bac32F Bac708R	AAC-GCT-AGC-TAC-AGG-CTT CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	53.7	60	PCR	[4,27]
Human sewage	BacHum EP	BacHum-160f BacHum-241r	TGA-GTT-CAC-ATG-TCC-GCA-TGA CGT-TAC-CCC-GCC-TAC-TAT-CTA-ATG	60.0	30	qPCR	[1]
	HF183/BFDrev EP	HF183 BFDrev	ATC-ATG-AGT-TCA-CAT-GTC-CG CGT-AGG-AGT-TTG-GAC-CGT-GT	60.0	30	qPCR	[12]
	Modified HF183F/Bac708R	HF183F Bac708R	ATC-ATG-AGT-TCA-CAT-GTC-CG CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	55.3	60	PCR	[13,27]
Swine	PF163F/Bac708R	PF163F Bac708R	GCG-GAT-TAA-TAC-CGT-ATG-A CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	52.4	60	PCR	[17,27]
	Pig-2-Bac EP	Pig-2-Bac41F Pig-2-Bac163Rm	GCA-TGA-ATT-TAG-CTT-GCT-AAA-TTT-GAT ACC-TCA-TAC-GGT-ATT-AAT-CCG-C	60.0	30	qPCR	[18]
Cattle	CowM2 EP	CowM2F CowM2R	CGG-CCA-AAT-ACT-CCT-GAT-CGT GCT-TGT-TGC-GTT-CCT-TGA-GAT-AAT	60.0	30	qPCR	[19]
	BacCow EP	CF128F BacCow 305r	CCA-ACY-TTC-CCG-WTA-CTC GGA-CCG-TGT-CTC-AGT-TCC-AGT-G	60.0	30	qPCR	[1]
	CF193F/Bac708R	CF193 Bac708R	TAT-GAA-AGC-TCC-GGC-C CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	55.0	30	PCR	[13]
	Modified CF128F/Bac708R	CF128F Bac708R	CCA-ACY-TTC-CCG-WTA-CTC CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG	62.0	60	PCR	[13,28]
	Bac2	Bac2F Bac2R	GCT-TGT-TGC-GTT-CCT-TGAGAT-AAT ACA-AGC-CAG-GTG-ATA-CAG-AAA-G	62.0	30	PCR	[21]
	Bac3	Bac3F Bac3R	CTA-ATG-GAA-AAT-GGA-TGG-TAT-CT GCC-GCC-CAG-CTC-AAA-TAG	60.0	30	PCR	[21]
	Cow-Bac2 EP	qCS621F qBac725R	AAC-CAC-AGC-CCG-CGA-TT CAA-TCG-GAG-TTC-TTC-GTG-ATA-TCT-A	62.0	30	SYBR qPCR	[22]
	BoBac EP	BoBac367f BoBac467r	GAA-GAC-TGA-ACC-AGC-CAA-GTA GCT-TAT-TCA-TAC-GGT-ACA-TAC-AAG	57.0	30	qPCR	[23]

Acknowledgements

This research was financially supported by the Thailand Research Fund (Contract no. SRI5930305) and the Kurita Water and Environmental Foundation (KWEF) – Asian Institute of Technology (AIT) research grant.

Author's statement

The authors declare that they have no competing interests.

Transparency document. Supporting information

Transparency data associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.04.129>.

References

- [1] B.J. Kildare, C.M. Leutenegger, B.S. McSwain, D.G. Bambic, V.B. Rajal, S. Wuertz, 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: a Bayesian approach, *Water Res.* 41 (2007) 3701–3715.
- [2] P. Somnark, N. Chyerochana, S. Mongkolsuk, K. Sirikanchana, Performance evaluation of *Bacteroidales* genetic markers for human and animal microbial source tracking in tropical agricultural watersheds, *Environ. Pollut.* 236 (2018) 100–110.
- [3] S. Sieftring, M. Varma, E. Atikovic, L. Wymer, R.A. Haugland, Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems, *J. Water Health.* 6 (2008) 225–237.
- [4] A.E. Bernhard, K.G. Field, Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 1587–1594.
- [5] W. Ahmed, A. Goonetilleke, D. Powell, T. Gardner, Evaluation of multiple sewage-associated *Bacteroides* PCR markers for sewage pollution tracking, *Water Res.* 43 (2009) 4872–4877.
- [6] P. Bower, C.O. Scopel, E.T. Jensen, M.M. Depas, S.L. Mclellan, Detection of genetic markers of fecal indicator bacteria in Lake Michigan and determination of their relationship to *Escherichia coli* densities using standard microbiological methods, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 8305–8313.
- [7] C.A. Carson, J.M. Christiansen, V.W. Benson, C. Baffaut, V. Jerri, R.R. Broz, W.B. Kurtz, W.M. Rogers, W.H. Fales, H. Yamparaquise, J.V. Davis, Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 4945–4949.
- [8] M. Gourmelon, M.P. Caprais, R. Segura, C. Le Mennec, S. Lozach, J.Y. Piriou, A. Rince, Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 4857–4866.
- [9] B. Fremaux, J. Gritzfeld, T. Boa, C.K. Yost, Evaluation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed, *Water Res.* 43 (2009) 4838–4849.
- [10] R. Lamendella, J.W. Santo Domingo, A.C. Yannarell, S. Ghosh, G. Di Giovanni, R.I. Mackie, D.B. Oerther, Evaluation of swine-specific PCR assays used for fecal source tracking and analysis of molecular diversity of swine-specific “*Bacteroidales*” populations, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 5787–5796.
- [11] C. Toledo-Hernandez, H. Ryu, J. Gonzalez-Nieves, E. Huertas, G. Toranzos, J.W. Santo Domingo, Tracking the primary sources of fecal pollution in a tropical watershed in a one-year study, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 1689–1696.
- [12] R.A. Haugland, M. Varma, M. Sivaganesan, C. Kelty, L. Peed, O.C. Shanks, Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected *Bacteroidales* species and human fecal waste by qPCR, *Syst. Appl. Microbiol.* 33 (2010) 348–357.
- [13] A.E. Bernhard, K.G. Field, A. PCR, assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 4571–4574.
- [14] W. Ahmed, J. Stewart, D. Powell, T. Gardner, Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution, *Lett. Appl. Microbiol.* 46 (2008) 237–242.
- [15] E. Ballesté, X. Bonjoch, L.A. Belanche, A.R. Blanch, Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 1789–1795.
- [16] W. Ahmed, N. Masters, S. Toze, Consistency in the host specificity and host sensitivity of the *Bacteroides* HF183 marker for sewage pollution tracking, *Lett. Appl. Microbiol.* 55 (2012) 283–289.
- [17] L.K. Dick, A.E. Bernhard, T.J. Brodeur, J.W. Santo Domingo, J.M. Simpson, S.P. Walters, K.G. Field, Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 3184–3191.
- [18] S. Mieszkina, J.P. Furet, G. Corthier, M. Gourmelon, Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 3045–3054.

- [19] O.C. Shanks, E. Atikovic, A.D. Blackwood, J. Lu, R.T. Noble, J.S. Domingo, S. Seifring, M. Sivaganesan, R.A. Haugland, Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 745–752.
- [20] O.C. Shanks, K. White, C.A. Kelty, S. Hayes, M. Sivaganesan, M. Jenkins, M. Varma, R.A. Haugland, Performance assessment PCR-based assays targeting *Bacteroidales* genetic markers of bovine fecal pollution, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 1359–1366.
- [21] O.C. Shanks, J.W. Santo Domingo, R. Lamendella, C.A. Kelty, J.E. Graham, Competitive metagenomic DNA hybridization identifies host-specific microbial genetic markers in cow fecal samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 4054–4060.
- [22] S. Okabe, N. Okayama, O. Savichtcheva, T. Ito, Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (2007) 890–901.
- [23] A. Layton, L. McKay, D. Williams, V. Garrett, R. Gentry, G. Saylor, Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene taqman-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 4214–4224.
- [24] M.A. Bakir, M. Sakamoto, M. Kitahara, M. Matsumoto, Y. Benno, *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 (2006) 1639–1643.
- [25] Y. Kobayashi, A. Itoh, K. Miyawaki, S. Koike, O. Iwabuchi, Y. Iimura, Y. Kobashi, T. Kawashima, J. Wakamatsu, A. Hattori, H. Murakami, F. Morimatsu, T. Nakaebisu, T. Hishinuma, Effect of liquid whey feeding on fecal microbiota of mature and growing pigs, *Anim. Sci. J.* 82 (2011) 607–615.
- [26] J.Y. Jeong, H.D. Park, K.H. Lee, J.H. Hwang, J.O. Ka, Quantitative analysis of human- and cow-specific 16S rRNA gene markers for assessment of fecal pollution in river waters by real-time PCR, *J. Microbiol. Biotechnol.* 20 (2010) 245–253.
- [27] K.R. Hussein, P.L. Waines, R.B. Nisr, G. Glegg, G. Bradley, Development and use of *Bacteroides* 16S rRNA polymerase chain reaction assay for source tracking dog faecal pollution in bathing waters, *Hydrol.: Curr. Res.* 5 (2014) 1–8.
- [28] R. Lamendella, J.W.S. Domingo, D.B. Oerther, J.R. Vogel, D.M. Stoeckel, Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of *Bacteroidetes* 16S rRNA gene, *FEMS Microbiol. Ecol.* 59 (2007) 651–660.

ภาคผนวก ณ. รายงานสรุปงานเสวนา
“Thailand 4.0 กับนวัตกรรมจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources”



วันพุธที่ 25 กรกฎาคม 2561 เวลา 9:00 – 15:30 น.
ณ ห้องคริสตัล 1-2 โรงแรมเซ็นจูรี พาร์ค กรุงเทพมหานคร

1. หลักการและเหตุผล

แหล่งน้ำจืดในประเทศไทย ประสบปัญหาความเสื่อมโทรมของคุณภาพน้ำมาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการเติบโตของชุมชนเมือง การขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม และการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร จากการติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินทั่วประเทศในปี 2559 พบว่า ร้อยละ 20 มีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์เสื่อมโทรม โดยพารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่มีปัญหา ได้แก่ ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (BOD) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์มและโคลิฟอร์มทั้งหมด (FCB, TCB) และแอมโมเนียในรูปไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) (กรมควบคุมมลพิษ 2560) อย่างไรก็ตาม พารามิเตอร์คุณภาพน้ำเหล่านี้สามารถบ่งชี้ได้เพียงภาพรวมของคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำที่รองรับน้ำเสียจากแหล่งกำเนิดมลพิษทั้งที่มีจุดกำเนิดแน่นอน (point sources) และไม่แน่นอน (non-point sources) แล้ว แต่ปัจจุบันยังไม่มีมาตรการวัดพารามิเตอร์อื่นใดที่สามารถระบุที่มาของน้ำเสียจากแหล่งกำเนิดมลพิษเพียงแหล่งเดียวได้ ในขณะที่แหล่งกำเนิดมลพิษที่มีจุดกำเนิดไม่แน่นอน (non-point sources) ในต่างประเทศได้มีการพัฒนาเทคนิค Microbial Source Tracking (MST) อาทิ ในประเทศสหรัฐอเมริกา สหราชอาณาจักร และ กลุ่มประเทศยุโรป ซึ่งใช้ MST เป็นเครื่องมือตรวจคุณภาพน้ำเพื่อระบุแหล่งกำเนิดมลพิษได้อย่างแม่นยำ นำไปสู่การลดการปล่อยมลพิษจากแหล่งกำเนิด และฟื้นฟูแหล่งน้ำให้มีคุณภาพน้ำผ่านเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินได้อย่างประสบผลสำเร็จ

ภายใต้โครงการ “การพัฒนาวิธีการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยกลุ่มแบคทีเรีย กรณิศึกษา ลุ่มน้ำท่าจีน” ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก สกว. คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค MST โดยมีพื้นที่ศึกษาในลุ่มน้ำท่าจีน โดยสามารถจำแนกที่มาของการปนเปื้อนของ FCB ในแม่น้ำท่าจีนจากน้ำเสียชุมชนและสิ่งปฏิกูลจากสุกรและโคได้ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาต่อยอดงานวิจัย เพื่อสืบหาที่มาของน้ำเสียและกำหนดนโยบายการควบคุมการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลลงสู่แหล่งน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้จัดงานเสวนา Thailand 4.0 กับนวัตกรรมการจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources ขึ้น เพื่อรับฟังความคิดเห็นและข้อเสนอแนะจากทั้งหน่วยงานภาคการศึกษา หน่วยงานภาครัฐและรัฐวิสาหกิจที่เกี่ยวข้อง เพื่อได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการกำหนดแนวทางการพัฒนาต่อยอดงานวิจัย และการกำหนดนโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำของประเทศไทยต่อไป

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์การจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources ในปัจจุบันระหว่างภาครัฐ ภาคเอกชน และภาคการศึกษา
- 2.2 เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยการใช้ MST เพื่อสนับสนุนการกำหนดนโยบายจัดการคุณภาพน้ำของประเทศไทย
- 2.3 เพื่อรับฟังความคิดเห็นและข้อเสนอแนะการนำ MST ไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยจากนักวิจัยและภาคการศึกษาที่เกี่ยวข้อง และการนำไปประกอบการกำหนดนโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำ

3. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แนวทางการนำเทคโนโลยี MST ไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยและใช้ประโยชน์ในการจัดการมลพิษทางน้ำในบริบทของประเทศไทย

4. กำหนดการ

เวลา	รายการ
8:30 – 9:00 น.	ลงทะเบียน
9:00 – 9:30 น.	กล่าวเปิดงานโดย ▪ รศ.ดร.ชนาธิป พาริโน ผู้อำนวยการสกว. ฝ่ายสวัสดิภาพสาธารณะ ▪ ศ.ดร.ศกรณ์ มงคลสุข ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
9:30 – 10:00 น.	บรรยาย หัวข้อ “มลพิษ non-point sources: ความท้าทายจากอดีตถึงปัจจุบัน” โดย ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน นักวิจัยชำนาญการ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ หัวหน้าโครงการวิจัย (เพื่อสร้างความตระหนักถึงความรุนแรงของปัญหาและความท้าทายในบริบทประเทศไทยและต่างประเทศ)
10:00 – 10:15 น.	พักรับประทานอาหารว่าง
10:15 – 11:30 น.	เสวนา หัวข้อ “ความสำเร็จและโอกาสในการจัดการมลพิษยุค Thailand 4.0” ▪ รศ.ดร.พิสุทธิ์ เพ็ชรมนกุล ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ คณะกรรมการจัดทำยุทธศาสตร์ชาติ (2560 วาระ 5 ปี): ความก้าวหน้าในการจัดทำยุทธศาสตร์ด้านมลพิษและที่เกี่ยวข้อง ▪ ดร.พรศรี สุทธนารักษ์ ผู้อำนวยการสำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ: นโยบาย กฎหมาย และการจัดการมลพิษ ▪ นายแพทย์ดนัย ธีวันดา รองอธิบดีกรมอนามัย: นโยบาย กฎหมาย และปัญหาด้านสาธารณสุข ▪ ดร.สมสิทธิ์ มูลสถาน กรรมการสถาบันน้ำและสิ่งแวดล้อมเพื่อความยั่งยืน สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย: เทคโนโลยี มาตรการและการป้องกันของผู้ประกอบการ ▪ ศ.ดร.จรงค์ ผลประโยชน์ ภาควิชาวิศวกรรมโยธา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์: ประเด็นความก้าวหน้าด้านงานวิจัยและเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้อง ดำเนินรายการโดย: นายกุลพล คุปรัตน์ นักวิชาการอิสระ (เพื่อแลกเปลี่ยนมุมมองในหลากหลายมิติระหว่างภาครัฐ ภาคเอกชน และภาคการศึกษา)
11:30 – 12:00 น.	ถาม-ตอบ/ความคิดเห็นจากผู้เข้าร่วมการประชุม
12:00 – 13:00 น.	พักรับประทานอาหารกลางวัน
13:00 – 13:30 น.	บรรยาย หัวข้อ “นวัตกรรมการระบุแหล่งปล่อยมลพิษ ด้วย Microbial Source Tracking (MST)” โดย ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน และ ดร.ปิณิดา สิลพนัง กำแพงทอง นักวิชาการสิ่งแวดล้อมชำนาญการ ส่วนแหล่งน้ำจืด กรมควบคุมมลพิษ, คณะผู้วิจัย (เพื่อเผยแพร่เทคโนโลยีและผลการศึกษาในแม่น้ำท่าจีน)
13:30 – 15:00 น.	อภิปรายและระดมสมอง หัวข้อ “ก้าวต่อไป...เพื่อต่อยอดงานวิจัยและนำไปสู่นโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำ” - การพัฒนางานวิจัย MST ในการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมและการสร้างเครือข่ายนักวิจัยในไทย (ภาคการศึกษาและวิจัย) ดำเนินรายการโดย ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน - การนำผลการวิจัยไปสู่นโยบายและ/หรือมาตรการที่เกี่ยวข้อง (หน่วยงานภาครัฐและรัฐวิสาหกิจ) ดำเนินรายการโดย ดร.ปิณิดา สิลพนัง กำแพงทอง (เพื่อระดมความเห็นจากหลายภาคส่วนให้ได้แนวทางการผลักดันงานวิจัยไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม)

เวลา	รายการ
15.00 – 15:15 น.	รับประทานอาหารว่าง
15.15 – 15.45	สรุปผลและปิดการประชุม

5. ผู้เข้าร่วมงานเสวนาฯ (รวมทั้งสิ้น 56 ท่าน)

รายละเอียดไปรษณีย์และอีเมลติดต่อดังแสดงในภาคผนวก ณ1.

5.1 วิทยากรผู้ทรงคุณวุฒิ

1. ศ.ดร.จรงค์ ทรัพย์ประเสริฐ ภาควิชาวิศวกรรมโยธา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
2. นพ.ดนัย ธีวันดา กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข
3. รศ.ดร.พิสุทธิ เพียรมนกุล ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. ดร.พรศรี สุทธนารักษ์ สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ
5. ดร.สมสิทธิ์ มูลสถาน สถาบันน้ำและสิ่งแวดล้อมเพื่อความยั่งยืน สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย

5.2 ผู้เข้าร่วมงาน ภาคการศึกษา

1. ผศ.ดร.กำพล นันทพงษ์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
2. ดร.ดวงสิทธิ์ เด่นเพชรกุล ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมและการจัดการภัยพิบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี
3. รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. ดร.ปิยธิดา เรืองศรี ภาควิชาวิศวกรรมแหล่งน้ำ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. รศ.ดร.พงศ์ศักดิ์ หนูพันธ์ ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
6. อ.ดร.พรพรรณ สอนเชื้อ สถาบันวิทยาศาสตร์ฟิสิกส์ สาขาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
7. ผศ.ดร.รุจิภาญจน์ นาสนิท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยี อุตสาหกรรมมหาวิทยาลัยศิลปากร
8. ดร.วิลาสินี อยู่ชัชวาล ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
9. ดร.สุภัทรา วิเศษศรี ภาควิชาวิศวกรรมแหล่งน้ำ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10. ดร.สุรพงษ์ รัตนกุล ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
11. รศ.ดร.สุวรรณา บุญตานนท์ ภาควิชาวิศวกรรมโยธาและสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
12. ผศ.สุวรรณี จุฑามณีพงษ์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
13. ดร.อดิศักดิ์ ร่มแสง ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
14. ผศ.ดร.อัญญา อัครจุลชัย คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

15. รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
16. รศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 ผู้เข้าร่วมงาน ภาครัฐและรัฐวิสาหกิจ

1. คุณกาญจน์ แสงสุคติ สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 5
2. คุณจรัส เทพอวยพร สำนักงานทรัพยากรน้ำแห่งชาติ
3. คุณจารุวรรณ โลไธสง กรมอนามัย
4. คุณชัชพันธ์ นีวาสงษ์ การประปาส่วนภูมิภาค
5. คุณเชิดศักดิ์ โกศลวัฒน์ กรมอนามัย
6. น.สพ.ไชยา ส่งาประโคน สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์
7. คุณธงชัย มหัจฉริยวงศ์ องค์การจัดการน้ำเสีย
8. คุณนรี ทรัพย์เจริญ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์
9. คุณบุปผา อุ่นแสงจันทร์ สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ
10. คุณบุสดี เอี่ยมสวัสดิ์ สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 5
11. นางสาวปัทมรา คุณเลิศ กรมวิชาการเกษตร
12. ดร.ประกิจ จันทรดีบ กรมวิชาการเกษตร
13. คุณปริยัตย์ ใหม่เจริญศรี สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย
14. พญ.รชนีกร วีระเจริญ สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค
15. คุณรัตนารณ ถาวรยุติธรรม การประปาส่วนภูมิภาค
16. คุณสุชัย เจนพจนารถ องค์การจัดการน้ำเสีย
17. คุณสุดา อธิสุภรณ์รัตน์ กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม
18. คุณสุนันท์ นาคกร สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค
19. คุณพพร พลายพิชิต กรมการพัฒนาชุมชน
20. คุณสุวรรณ สัตววรรณ กรมการพัฒนาชุมชน
21. คุณอังกูร บุญญะ หัวหน้าส่วนแหล่งน้ำตะวันออก ฝ่ายคุณภาพน้ำ การประปานครหลวง
22. นายเอกราช บุญล้อมรักษ์ กรมส่งเสริมการเกษตร
23. นายสังสรรค์ ทิพย์โบล การประปานครหลวง

5.4 ทีมงานผู้จัดงาน

1. ศ.ดร.ศกรณ์ มงคลสุข ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
2. รศ.ดร.ชนาธิป ผาริโน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายสวัสดิภาพสาธารณะ
3. ดร.ขวัญวิ สิริกาญจน ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
4. ดร.ปิณิดา ลีลพนัง กำแพงทอง ส่วนแหล่งน้ำจืด สำนักงานจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ
5. คุณกุลพล คุปรัตน์ นักวิชาการอิสระ
6. คุณกฤษกร สานอินจักร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล
7. คุณกฤตยพงษ์ จันทรเดช ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
8. คุณณัฐชา ไขโรจน์ ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
9. คุณณิชาภัท พฤทธิภูมิ ภาควิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

10. คุณพรจิรา สมนาค ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพประยุกต์ สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์
11. คุณเอกชัย คงประจักษ์ ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาลงกรณ์
12. คุณอานนท์ จริยนิเรศเรษฐ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

6. เนื้อหางานเสวนา (แบ่งตามช่วงต่างๆ)

6.1 การบรรยายหัวข้อ “มลพิษ non-point sources: ความท้าทายจากอดีตถึงปัจจุบัน”

โดย ดร.ขวัญวิริ สิริกาญจน นักวิจัยชำนาญการ สถาบันวิจัยจุฬาลงกรณ์ หัวหน้าโครงการวิจัย
วัตถุประสงค์ เพื่อสร้างความตระหนักถึงความรุนแรงของปัญหาและความท้าทายในบริบทประเทศไทย
และต่างประเทศ

เนื้อหา (เอกสารนำเสนอ ดังแสดงในภาคผนวก ณ2.)

การบรรยายเริ่มด้วยการนำเสนอตัวอย่างกรณีขายหาดทองเที่ยวของสหรัฐอเมริกา ณ ขายหาด Avalon เกาะ Catalina มลรัฐแคลิฟอร์เนีย ที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อก่อโรคในน้ำ ทำให้นักท่องเที่ยวที่มาเล่นน้ำเกิดอาการเจ็บป่วย เป็นกรณีตัวอย่างที่น้ำขายหาดที่ดูเหมือนสะอาดปลอดภัย แต่ปนเปื้อนเชื้อโรคได้ ขายหาดแห่งนี้พบปัญหาค่าแบคทีเรียสูงเกินมาตรฐานบ่อยครั้ง โดยในปี 2010 เป็นขายหาดที่มีจำนวนวันที่สกปรกที่สุดในมลรัฐแคลิฟอร์เนียที่ต้องตั้งป้ายเตือนนักท่องเที่ยวว่าค่าแบคทีเรียมาตรฐานตามข้อกำหนดของมลรัฐ ต่อมาทีมงานวิจัยหลายชิ้นที่พยายามตรวจสอบหาสาเหตุการปนเปื้อนแบคทีเรียโดยมีการตรวจพบจุลินทรีย์จำเพาะที่บ่งชี้การปนเปื้อนมูลนกทะเลในตัวอย่างน้ำขายหาดมากกว่าการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชน นอกจากนี้มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าอัตราการเจ็บป่วยของผู้เล่นน้ำที่ไคลีนน้ำเข้าไปมีอัตราเพิ่มขึ้นเมื่อมีปรากฏการณ์ submarine groundwater discharge หรือน้ำใต้ดินดันทรายบริเวณขายหาดขึ้นมา แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่อาจมาจากน้ำใต้ดิน นอกจากนี้ การสำรวจพื้นที่พบว่าท่อรวบรวมน้ำเสียมีสภาพชำรุดผุกร่อนเนื่องจากเกาะแคทาลินาแห่งนี้ใช้น้ำทะเลในระบบสุขภัณฑ์แทนน้ำจืดที่มีจำกัด ดังนั้นการปนเปื้อนเชื้อโรคของน้ำทะเลขายหาดแห่งนี้จึงเป็นตัวอย่างของการปนเปื้อนทั้งจาก point sources (PS) และ non-point sources (NPS) ซึ่งแสดงความซับซ้อนของปัญหาและเน้นความจำเป็นที่จะต้องมีการร่วมมือหรือนวัตกรรมในการตรวจจำแนกแหล่งปล่อยมลพิษได้

จากนั้นนำเสนอกรณีตัวอย่างที่สอง ซึ่งเป็นกรณีศึกษาที่โด่งดังเนื่องจากเป็นการระบาดของเชื้อโรคทางน้ำที่ใหญ่ที่สุดในประวัติศาสตร์สหรัฐอเมริกา เกิดขึ้น ณ เมือง Milwaukee มลรัฐวิสคอนซิน ซึ่งเกิดเหตุการณ์น้ำประปาปนเปื้อนเชื้อโรคในปี 1993 ทำให้มีผู้เสียชีวิต 103 รายและเจ็บป่วย 403,000 ราย ซึ่งในช่วงที่เกิดเหตุมีรายงานว่าน้ำประปามีลักษณะขุ่น หลังจากเหตุการณ์ดังกล่าวมีการตรวจสอบเพิ่มเติมพบว่า การปนเปื้อนเกิดจากเชื้อ *Cryptosporidium parvum* ซึ่งเป็นโปรโตซัวชนิดหนึ่งที่สร้าง oocysts ที่ทนต่อสภาพแวดล้อม และที่สำคัญคือทนต่อคลอรีนในขั้นตอนการฆ่าเชื้อโรคในโรงประปา ทำให้เกิดการปนเปื้อนไปสู่บ้านเรือนได้ โดยเชื่อนี้เกิดจากการปนเปื้อนของมูลโคที่เลี้ยงในพื้นที่เปิดบริเวณริมทะเลสาบมิชิแกนที่ถูกชะล้างด้วยน้ำฝนลงสู่แหล่งน้ำซึ่งเป็นแหล่งน้ำดิบเพื่อผลิตน้ำประปาของโรงประปาแห่งนี้ ดังนั้นกรณีตัวอย่างนี้เป็นตัวอย่างสำคัญที่แสดงถึงปัญหามลพิษ NPS ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของประชาชนเป็นอย่างมาก

ต่อมาได้นำเสนอนิยามและตัวอย่างแหล่งกำเนิดที่แยกเป็น point sources และ non-point sources เพื่อความเข้าใจตรงกันของแหล่งกำเนิดทั้งสองประเภท จากนั้นนำเสนอตัวอย่างการจัดการมลพิษ NPS ของสหรัฐอเมริกา คือ National Nonpoint Source Program ที่เริ่มขึ้นตั้งแต่ปี 2005 และทาง United States Environmental Protection Agency (USEPA) ได้ทำรายงานสรุปเมื่อปี 2016 แสดงถึงความสำเร็จในการจัดการมลพิษ NPS โดยได้มีเว็บไซต์ที่รวบรวมตัวอย่างกรณีศึกษาในพื้นที่ต่างๆในทุกรัฐที่ประสบความสำเร็จในการจัดการมลพิษ NPS ได้ โดยในแต่ละกรณีศึกษา ได้ทำการสรุปปัญหา วิธีแก้ไข และผลลัพธ์ที่ได้เป็นอย่างดี

ต่อมาทำการนำเสนอห้องปฏิบัติการตรวจวัดทางสิ่งแวดล้อมของหน่วยงาน Environment Agency ของประเทศ อังกฤษ ซึ่งได้นำเทคโนโลยีการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยจุลินทรีย์มาใช้ในการระบุแหล่งปล่อยน้ำเสียสู่แหล่งน้ำ ซึ่ง เรียกว่า Microbial Source Tracking (MST) ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลสำคัญที่ช่วยในการแก้ปัญหาการจัดการมลพิษและฟื้นฟู คุณภาพแหล่งน้ำให้ดีขึ้นได้อย่างประสบความสำเร็จมากกว่า 10 ปี โดยห้องปฏิบัติการ National Laboratory Service ที่ตั้งอยู่ ที่เมือง Starchcross นี้เป็นห้องปฏิบัติการแห่งเดียวที่ตรวจวัดคุณภาพน้ำทางชีววิทยาจากชายหาดทั่วประเทศ และได้ใช้เทคนิค การเพาะเชื้อร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจวัดดีเอ็นเอจำเพาะ และวิเคราะห์ดีเอ็นเอแบบ metagenomes (การ ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่รวมดีเอ็นเอของทุกสิ่งมีชีวิตในตัวอย่าง) เพื่อช่วยในการระบุแหล่งกำเนิดที่มา จากน้ำเสียชุมชน หรือสัตว์ประเภทต่างๆ เช่น นกทะเล โค สุนัข ม้า เป็นต้น

จากนั้น ทำการนำเสนอรูปแบบการตรวจติดตามและรายงานผลคุณภาพน้ำของประเทศอังกฤษ ซึ่งแสดงอยู่ในเว็บ ไซต์ที่มีรายละเอียดของชายหาดแต่ละแห่ง โดยมีการแสดงระดับคุณภาพน้ำ (ดีมาก ดี เลื่อนโทรม) ย้อนหลัง 4 ปี เนื่องจากถูก กำหนดด้วยข้อบังคับว่าแหล่งน้ำต้องมีระดับคุณภาพน้ำไม่เลวลงในช่วงย้อนหลัง 4 ปี ซึ่งกำหนดโดยมาตรฐานคุณภาพน้ำ สหภาพยุโรป นอกจากนี้ ประเทศอังกฤษยังมี application บนมือถือที่ใช้บอกคุณภาพน้ำสำหรับนักท่องเที่ยวหรือผู้เล่นเซิร์ฟ เพื่อการลดผลกระทบของคุณภาพน้ำต่อสุขภาพประชาชนได้ ในส่วนของประเทศไทยนั้น ก็มีการรายงานคุณภาพน้ำผิวดิน (น้ำ จืด) และน้ำทะเลชายฝั่ง ในเว็บไซต์ของกรมควบคุมมลพิษ โดยแสดงทั้งคุณภาพน้ำที่ตรวจวัดรายฤดูกาล (น้ำผิวดิน 4 ครั้งต่อปี และน้ำทะเลชายฝั่ง 2 ครั้งต่อปี) และคุณภาพน้ำจากสถานีตรวจวัดอัตโนมัติที่แสดงผลใหม่รายชั่วโมง นอกจากนี้ ยังมี application บนมือถือที่แสดงค่าคุณภาพน้ำดังกล่าวด้วย กล่าวคือ การตรวจติดตามคุณภาพน้ำของประเทศไทยได้เข้าสู่ยุค Thailand 4.0 อย่างแท้จริง การบรรยายในช่วงเช้านี้ จบด้วยการนำเสนอคุณภาพน้ำของประเทศไทยในปีล่าสุดที่ทำการ เผยแพร่ คือปี 2559 ซึ่งมีแหล่งน้ำผิวดินและน้ำทะเลชายฝั่งที่คุณภาพอยู่ในเกณฑ์พอใช้ เลื่อนโทรม และเลื่อนโทรมมาก เป็น จำนวนมากถึง 66% และ 39% ตามลำดับ และที่สำคัญคือแหล่งน้ำที่คุณภาพน้ำไม่ดีมีแนวโน้มคงอยู่ในสภาพเดิมมาอย่าง ต่อเนื่องตลอดช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมาโดยไม่ได้รับการแก้ไขฟื้นฟูให้ดีขึ้นได้ ดังนั้นจึงเป็นความท้าทายของประเทศไทยในการ ฟื้นฟูคุณภาพน้ำต่อไป

6.2 การเสวนา หัวข้อ “ความสำเร็จและโอกาสในการจัดการมลพิษยุค Thailand 4.0”

ดำเนินรายการโดย: นายกุลพล คุปรัตน์ นักวิชาการอิสระ

วัตถุประสงค์ เพื่อแลกเปลี่ยนมุมมองในหลากหลายมิติระหว่างภาครัฐ ภาคเอกชน และภาคการศึกษา

1. รศ.ดร.พิสุทธิ เพ็ชรมนกุล ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ คณะกรรมการจัดทำ ยุทธศาสตร์ชาติ (2560 วาระ 5 ปี) หัวข้อ ความก้าวหน้าในการจัดทำยุทธศาสตร์ด้านมลพิษและที่เกี่ยวข้อง

แผนต่างๆมีการแบ่งประเภทออกเป็นสามระดับ (tiers) แผนยุทธศาสตร์ชาติอยู่ในระดับบนสุด จะเปลี่ยนได้ก็ต้อง เปลี่ยนรัฐธรรมนูญเท่านั้น ซึ่งแผนระดับที่หนึ่งมีการผูกมัดและให้ประเทศเดินตามแนวทาง แผนระดับที่สองเป็นแผนปฏิรูป ประเทศ 11 ด้าน และแผนแม่บทภายใต้ยุทธศาสตร์ชาติ แผนระดับที่สามเป็นแผนของหน่วยงาน กรม กระทรวง กองต่างๆ สำนักงานต่างๆ ถ้าจะเริ่มทำวิจัยเกี่ยวกับ non-point source แนะนำให้ศึกษายุทธศาสตร์ชาติที่ผ่านเรียบร้อยแล้ว

ยุทธศาสตร์ชาติด้านที่ห้า เรื่อง การสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งประกอบด้วยคำ สำคัญ 3 คำ ได้แก่ สิ่งแวดล้อม คุณภาพชีวิต และการเติบโต ถ้าพูดถึงสิ่งแวดล้อมเราต้องมีการเติบโตอยู่เสมอ ซึ่งไม่ยากใน คนในยุคนี้มองเป็นเรื่องของ NGO การเติบโตและยั่งยืนควรให้สมดุลกัน เราจะไม่มองว่ายุทธศาสตร์ด้านนี้เป็นยุทธศาสตร์ด้าน สิ่งแวดล้อมเพียงด้านเดียว ส่วนต่อมา vision อีกยี่สิบปีข้างหน้าเราอยากให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่พัฒนาแล้วที่มีคุณภาพ ชีวิตที่ดีที่สุดในอาเซียน ท่านคณะกรรมการหลายๆท่านบอกว่าเราต้องมีเป้าหมายที่ท้าทาย ประเทศเรามีพื้นที่สีเขียวเยอะ เลย เป็นที่มาของ vision คำนี้ ประเทศเราเป็นประเทศที่น่าท่องเที่ยวติดอันดับของโลก แต่เราไม่เคยติดอันดับประเทศที่น่าอยู่เลย

เป้าหมายของยุทธศาสตร์แบ่งออกเป็นสี่ข้อ แผนทุกอย่างที่ทำมาทั้งหมดจะต้องมาเข้ากับสี่เป้าหมายนี้โดยเอา natural resources เป็นตัววัด ประกอบด้วย (1) ทำไปแล้ว nature resources ดีขึ้น เช่น ปลุกป่าเพิ่ม สร้างทัศนคติ โดยทำให้นature resources ดีขึ้น (2) neutral คือการคงสภาพไว้ โดยมีการอนุรักษ์และรักษา (3) natural resources ลดลงมา ต้องมีการชดเชยกับการพัฒนา การเติบโต สมดุลยั่งยืน การที่ nature resources ลดลง อีกฝั่งหนึ่งก็ตอบให้ได้ว่าการสมดุลกัน เช่น ได้ GDP หรือการพัฒนาประเทศที่ดีขึ้น และ (4) คือการปรับระดับยกกระบวนทัศน์ประเทศ หรือ paradigm shift การจะทำให้ไปถึงเป้าหมาย 4 ข้อเหล่านี้ ทำได้โดยแบ่งการทำงานเป็น 6 ประเด็นย่อย เปรียบเสมือนบ้าน ฐานด้านล่างที่รองรับเสาสี่เสา คือ food-water-energy nexus ต้องมั่นคงมีเสถียรภาพ จากนั้น เสาที่หนึ่งเป็นการสร้างพัฒนานบนฐานเศรษฐกิจสีเขียว เสาที่สอง คือ blue economy (แนวคิดที่มุ่งขับเคลื่อนการพัฒนาทางทะเลและชายฝั่งสู่การพัฒนาที่ยั่งยืน) เสาที่สามเกี่ยวกับ climate change เสาที่สี่คือเรื่องของการพัฒนาเชิงพื้นที่การเกษตร อุตสาหกรรม และในด้านของผังเมือง เป็นต้น จาก 6 ประเด็นย่อยดังกล่าว นำมาแบ่งเป็นคณะทำงานย่อย 16 ชุด รวมจำนวนคนสามร้อยกว่าคน เพื่อการจัดทำแผนแม่บทภายใต้ยุทธศาสตร์ชาติ 16 หัวข้อ

ในคณะทำงานย่อย 16 คณะนี้ ได้สรุปคณะทำงานที่มีประเด็นที่เกี่ยวข้องกับ non-point source ในเรื่องของน้ำเป็น 6 คณะทำงาน ได้แก่ (1) คณะทำงานชุดที่ 3 การอนุรักษ์และฟื้นฟูแม่น้ำลำคลองและแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งมีการตั้งเป้าหมายไว้ว่าประมาณ 70-80% ของแม่น้ำลำคลองทั่วประเทศจะต้องสะอาดมากขึ้น (2) คณะทำงานชุดที่ 6 การฟื้นฟูชายหาดท่องเที่ยวและการกักเซาะชายฝั่ง เช่น เร็วๆนี้จะมีการถมทรายที่หาดพัทยาบริเวณพญาเหินใกล้โรงแรมดุสิตธานี จะส่งผลให้มีพื้นที่หาดท่องเที่ยวเพิ่มมากขึ้น (3) คณะทำงานชุดที่ 12 การพัฒนาความมั่นคงน้ำและเพิ่มผลิตภาพของน้ำทั้งระบบ การคำนวณผลิตภาพ หรือ productivity ในอนาคตของประเทศถ้าเราใช้น้ำในการปลูกข้าว และนำข้าวส่งออกต่างประเทศ หรือใช้น้ำในการอื่นๆที่สูงมาก ผลสุดท้ายอาจจะส่งผลกระทบต่อ การปนเปื้อนสารเคมีของประเทศได้ (4) คณะทำงานชุดที่ 11 การจัดการมลพิษทุกประเภทและสารเคมีกับภาคเกษตรทั้งระบบ และ (5) คณะทำงานชุดที่ 1 เศรษฐกิจฐานชีวภาพและพัฒนาความมั่นคงด้านเกษตรอาหารและยา ในส่วนของตัวชีวิตแบ่งออกเป็นสามช่วง ช่วงแรกคือห้าปีแรก ช่วงสองห้าถึงสิบปี ช่วงสามสิบถึงยี่สิบปี โดยที่ให้ความสำคัญในช่วงแรกค่อนข้างมาก หากต้องการโจทย์ในการทำวิจัย ควรดูที่ตัวชีวิตในช่วงห้าปีแรก

ช่วงคำถามคำตอบจากผู้เข้าร่วมงาน

1. ถาม: แหล่งน้ำที่เราจะรองรับมลพิษสามารถรองรับได้เท่าไร เพราะทั้งประเทศไม่รู้เลยว่าแต่ละส่วนสามารถปล่อยออกมาได้เท่าไร ถ้าเป็นในต่างประเทศจะมีการกำหนดแบบแผนออกมาเลยว่าแหล่งโรงงานอุตสาหกรรมทั้งหมดปล่อยมลพิษออกมาได้เท่าไร เกษตรกรรมปล่อยออกมาได้เท่าไร แต่เกษตรกรรมในทางบ้านเรา เราคงไปบีบบังคับอะไรเขามากไม่ได้ เพราะเนื่องจากการมีรายได้ที่ค่อนข้างต่ำ แล้วมันจะเป็นหน้าที่ของใครที่จะต้องควบคุมการปล่อยมลพิษออกมาได้เท่าไร มาตรฐานเราจะควบคุมที่เท่าไร

ตอบ: รศ.ดร.พิสุทธิ์ เพียรมนกุลไม่ได้ตอบ ดร.พรศรี สุทธนารักษ์ ตอบแทนว่า ในแผนเราพูดถึง polluted system, caring capacity ต้องโหลดลงสู่ผิวน้ำเท่าไรที่จะยกระดับคุณภาพน้ำ เพราะฉะนั้นสองตัวนี้เป็นเครื่องมือ

2. ข้อเสนอแนะ: ในบ้านของเราน้ำทิ้งชุมชนยังไม่มีมาตรฐานที่ชัดเจน รวมไปถึงมาตรฐานในการปล่อยที่ไม่มีมาตรฐานชัดเจน ดังนั้นเราควรมีมาตรฐานที่ชัดเจนก่อนเป็นอันดับแรก

2. ดร.พรศรี สุทธนารักษ์ ผู้อำนวยการสำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ หัวข้อ นโยบาย กฎหมาย และการจัดการมลพิษ

ในส่วนของการจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ ที่ดูแลในเรื่องของคุณภาพน้ำทะเลทั่วประเทศ เราจะมีการทำงานในระดับที่สาม ซึ่งขณะนี้ร่างและผ่านเข้าคณะกรรมการควบคุมมลพิษเพื่อให้มีการแสดงความคิดเห็น และจะผลักดันให้เข้าสู่คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติภายในเดือนหน้า แต่เนื่องจากว่าเราต้องมีข้อมูลค่อนข้างมาก ซึ่งข้อมูลของตัวเองนั้นเราต้องทำชัดเจน และแน่น เพื่อนำไปอ้างอิงได้ต่อไป ประเด็นที่ทางกรมมีการทำ เราจะมีงานแบ่งงาน point sources and non-point sources แบ่งยุทธศาสตร์ออกเป็นสามส่วน ส่วนแรกคือการป้องกันมลพิษ สองคือการควบคุมมลพิษ สามคือการบริหารจัดการ เราค้นพบว่าการบริหารจัดการในประเทศไทยเป็นปัญหาค่อนข้างใหญ่ เพราะว่าเรามีภาคส่วนต่างๆหลายภาคส่วน หน้าที่ในการจัดการสิ่งแวดล้อมและมลพิษไม่ใช่เฉพาะรัฐบาลตรงกลางอย่างเดียว ในส่วนของภาคพื้นที่จะมีภาคท้องถิ่นเข้ามามีส่วนร่วม ในการขับเคลื่อนและช่วยในการผลักดัน ภาคท้องถิ่นจะเป็นส่วนที่สำคัญที่เราจะมีการส่งนโยบายลงไปในการขับเคลื่อนเพื่อลงไปสู่คุณภาพน้ำที่ดี เป้าหมายของเราใน 20 ปี คุณภาพน้ำจะเป็นไปตามมาตรฐาน 100% ในสิบปีแรกที่เราจะยกระดับคุณภาพน้ำ เราดูประเด็นปัญหาหลักๆของเราในเรื่องของ point sources and non-point sources ถ้าในเรื่องของ point sources มันจะเป็นในส่วนของภาคชุมชน ภาคอุตสาหกรรม และในส่วนของภาคเกษตรกรรมที่เป็น point sources บางส่วนของภาคเกษตรกรรมก็จะเป็น non-point sources

การป้องกันก่อนที่จะเกิดปัญหามลพิษ ในภาคของอุตสาหกรรมจะมีการทำเยอะ เช่น อุตสาหกรรมสีเขียว ซึ่งมีนโยบายในการขับเคลื่อนอยู่แล้ว แต่ในส่วนของภาคชุมชนยังค่อนข้างขาด ภาคชุมชนมีประเด็นที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ เราต้องมีการจัดการระบบบำบัดน้ำเสีย เราต้องยอมรับว่าเรามีการปล่อยน้ำเสียโดยไม่ได้รับการบำบัดซึ่งตรงนี้เป็นปัญหาค่อนข้างใหญ่ซึ่งจะนำไปสู่ในเรื่องของการปนเปื้อนของ coliform bacteria ที่จะปล่อยลงน้ำ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชาชน ในเรื่องของการจัดการน้ำเสียจะเกี่ยวข้องในเรื่องของการลงทุน องค์การบริหารจัดการ ถ้าเป็นในส่วนที่บ้านเรือนกระจายอยู่ตามแหล่งน้ำเราต้องใช้การบริหารอีกบริบทหนึ่งที่จะต้องเดินไปควบคู่กันของ non-point sources ในภาคของเกษตรกรรมเรื่องของการความสกปรก ฟาร์มหมู การเลี้ยงปลาในกระชัง ซึ่งเป็นชีวิตของประชาชน เราจะทำอย่างไรเพราะสิ่งเหล่านี้ไม่ใช่แค่เชิงเศรษฐกิจแต่รวมถึงทางด้านสังคม เช่นลุ่มแม่น้ำท่าจีนตอนล่างเป็นเชิงเศรษฐกิจเราควมอย่างไรให้เขาจัดการมลพิษก่อนที่จะปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมหรือลงสู่แหล่งน้ำ เราจะทำออกมาเป็นตัวมาตรการและแผนแม่บทในการจัดการคุณภาพของประเทศไทย ในอีก 20 ปีข้างหน้า

ในส่วนของการ non-point sources ค่อนข้างยากสำหรับการบริหารจัดการเพราะประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชาชนเราการใช้สารเคมี และปุ๋ย เรายังไม่ค่อยมีองค์ความรู้ตรงนั้น เราจะมีจัดการตรงปลายทางเรื่องการส่งเสริมทางเกษตรกรรมที่เป็นภาคของการส่งออกพวก GMP แต่ในส่วนของเกษตรกรรมที่เราเอามาใช้ในการรับประทานยังค่อนข้างน้อยจากการที่ได้ข้อมูล ซึ่งเราจะผลักดันอย่างไร ซึ่งเราต้องคุยกับหลายๆภาคส่วน ซึ่งเราต้องควบคุมคุณภาพน้ำให้เป็นไปตามค่ามาตรฐานในเรื่องของการใช้ประโยชน์ บางทีคุณภาพน้ำของเราอยู่ในระดับที่ดีมาเป็นระยะเวลา 20 ปี แล้วเราจะมียกระดับคุณภาพได้อย่างไร ซึ่งยุทธศาสตร์จะเป็นเครื่องมือตัวหนึ่งในการวางแผน และสามารถที่จะตั้งงบประมาณในการขับเคลื่อนได้ให้ได้มากที่สุด ในภาคพื้นที่บริบทของสิ่งแวดล้อมมีทีมงานค่อนข้างมาก ไม่ว่าจะเป็นอาจารย์ของมหาวิทยาลัยหรือสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคต่างๆที่อยู่ในแต่ละพื้นที่ ในเรื่องของภาคประชาชนเป็นสิ่งที่สำคัญที่จะเป็นตัวเฝ้าระวังให้กับพวกเรา ไม่ใช่แค่ในส่วนด้านทางวิทยาศาสตร์เท่านั้นเรายังมีภาคประชาสังคมก็ถือว่าเป็นที่จะส่วนเราได้ ในส่วนด้านของงานวิจัยก็มีส่วนสำคัญที่กำลังมองว่า เราเห็นปัญหาคุณภาพน้ำเสื่อมโทรม เรามองแค่มาจากน้ำทิ้งชุมชนหรือไม่ ในบางพื้นที่คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมไม่ได้ผ่านพื้นที่ชุมชน เช่นแม่น้ำตรัง จังหวัดตรัง สมัยก่อนคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ดี สามสี่ปีต่อมาคุณภาพน้ำเสื่อมโทรมลงเมื่อมีการตรวจวัด เราจึงสงสัยว่ามีการเสื่อมโทรมลงได้อย่างไร เราจึงมีการติดตามการวัด พบว่ามีการเปิดหน้าดิน มีการเลี้ยงสัตว์ มีการทำกิจกรรมต่างๆเกิดขึ้น ซึ่งมันเป็นการเปลี่ยนการใช้พื้นที่ ซึ่งมันจะก่อให้เกิดคุณภาพน้ำ

เปลี่ยนแปลง ในการวิจัยเชิงภาพใหญ่ก็สามารถที่จะตอบได้ งานวิจัยในระดับเล็กในด้าน bio and molecular เรายังไม่มี ในกรรมควบคุมมลพิษเรายังไม่มีถึงในระดับนั้นแต่มันก็เป็นทิศทางที่น่าสนใจ เรากำลังที่จะตรวจสอบในแต่พื้นที่ที่มีปัญหาในทางด้านค่า coliform bacteria ว่าพื้นที่ที่ปล่อยลงสู่แม่น้ำนั้นมาจากแหล่งไหนบ้าง ซึ่งกำลังจะเริ่มทำในปีนี้อย่างเข้มข้น ซึ่งเป็นงานวิจัยในเชิงภาคใหญ่ ซึ่งงานวิจัยเชิงภาคเล็กก็สามารถช่วยเราได้

ช่วงคำถามคำตอบจากผู้เข้าร่วมงาน

1. ถาม: ถ้าเรามองในด้านของ อุตสาหกรรม ชุมชน ภาคการเกษตร อุตสาหกรรมเราสามารถจัดการเองได้และเราจะไปควบคุมที่ point source ได้เลย และจะมีกรมโรงงานอุตสาหกรรมด้วยที่ดูแล ฉะนั้นที่เป็นปัญหาก็คือ จากชุมชน และภาคเกษตรกรรม ถ้าอยากจะทำวิจัยเราควรจะดูในสองหัวข้อนี้เป็นหลักสำหรับนักวิจัยที่ต้องการจะศึกษา ในส่วนของชุมชนค่อนข้างจะชัดเจนคือมีหน่วยงานที่ต้องดูแลอยู่แล้ว แต่ ณ ปัจจุบันหน่วยงานที่รับผิดชอบมีโครงสร้างที่ไม่ครบ ที่จะดูเรื่องนี้ เนื่องด้วยคุณภาพที่ลำบาก รวมไปถึงการดำเนินงาน ซึ่งทางเทศบาลจะมีระบบและขอบข่าย พื้นที่ที่เขาดูแลด้วย และเทศบาลมีประมาณกี่ % ที่มีระบบบำบัดน้ำเสียโดยไม่พูดถึงดีหรือไม่ดี และทางภาคเกษตรถ้าเราอยากจะทำ ศึกษา ควรจะตรงไหนเป็นส่วนแรกที่เราควรไปจัดการ เรื่องสารเคมีรีเปลา หรือดูทางด้านชีวภาพ เพื่อนักวิจัยคนไหนสนใจที่จะทำก็ควรมุ่งเน้นไปในเรื่องที่มีความสำคัญอันดับต้นๆก่อน

ตอบ: ในส่วนของภาคอุตสาหกรรมจริงๆก็มาตรฐานของเขายู่แล้ว เพราะฉะนั้นโรงงานอุตสาหกรรมมีการควบคุมมลพิษอยู่แล้ว แต่ก็ยังมีในเรื่องของการร้องเรียน เราพบสถิติการร้องเรียนค่อนข้างเยอะทั้งเรื่องของน้ำเสียที่ปล่อยออก เรื่องกลิ่น โลหะ ซึ่งมีมาจากทุกภาคส่วน เรื่องของระบบบำบัดน้ำเสียเรามี 101 แห่ง ซึ่งสร้างมาสิบกว่าปีแล้ว ซึ่งการสร้างระบบบำบัดน้ำเสียเป็นหน้าที่ของท้องถิ่น ที่จะจัดให้มีระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชน เราก็ต้องยอมรับเรื่องการจัดการน้ำเสียไม่ค่อยมีคนอยากจะทำ หนึ่งต้องหางบประมาณในการสร้างระบบบำบัดน้ำเสีย สองการจัดการระบบบำบัดน้ำเสีย ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง กลไกที่เราจะผลักดันให้มีการเก็บค่าน้ำเสียเหมือนการเก็บค่าขยะ กลไกนี้พยายามขับเคลื่อนในด้านเศรษฐศาสตร์ โดยการที่ท้องถิ่นของงบประมาณต้องผ่านสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เราจะต้องคิดว่าต้องเรียกค่าเก็บบำบัดน้ำเสีย ซึ่งก็ยังไม่ขับเคลื่อนอยู่แต่ประสิทธิภาพในการเก็บค่าบำบัดน้ำเสียถ้าเปรียบเทียบกับค่าขยะยังไม่สามารถที่จะทำได้อย่างเต็มที่ มันเลยกลายเป็นปัญหาอยู่ เรายังคิดต่อมาว่าจะทำอย่างไรให้ท้องถิ่นมีการสร้างระบบบำบัดน้ำเสียด้วยการใช้งบประมาณของตนเอง หรือจะใช้กลไกทางเศรษฐศาสตร์อย่างไรเพื่อมีแหล่งเงินทุน ปัญหาที่เสียถือว่ามีปัญหาในในพื้นที่สำคัญที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยในฝั่งอันดามันโดยรายได้เป็นหลักรองจากกรุงเทพ ที่พบน้ำเสียลงสู่ทะเล โดยมีค่าโคลิฟอร์มแบคทีเรียเพิ่มสูงมาก

2. ถาม: พื้นที่นาร่อง เราต้องมีการคิดก่อนไหมว่าต้องทำพื้นที่ตรงนี้ก่อนเพื่อที่จะพัฒนาไปส่วนอื่นๆในประเทศ เพื่อที่นักวิจัยจะได้ไม่ไปทำงานที่ผิดพื้นที่ หรือมีการช่วยชี้เป้าเช่นคนในชุมชนจะร่วมด้วยเพื่อที่นักวิจัยจะได้ทำงานร่วมกันกับชุมชนไปด้วยเลย

ตอบ: ในเรื่องของระบบบำบัดน้ำเสียเรามีการจัดอันดับความสำคัญอยู่แล้ว ซึ่งการจัดอันดับความสำคัญนั้นจะจัดในเชิงของวิทยาศาสตร์ เป็นแหล่งชุมชนเมื่อสร้างระบบบำบัดน้ำเสียแล้วจะทำให้คุณภาพน้ำดีขึ้น ทั้งในเรื่องของเศรษฐกิจ เรื่องของเป็นพื้นที่คุ้มครองสิ่งแวดล้อม เรื่องของพื้นที่เป็นมลพิษใหม่ ดูเรื่องของ carrying capacity ถ้าศักยภาพของพื้นที่ในการรองรับมลพิษน้อยลงแล้วเพราะฉะนั้นจำเป็นที่เราจะต้องกระชับพื้นที่ โดยการปล่อยมลพิษของสิ่งแวดล้อมต้องลด

น้อยลง ซึ่งแผนหลักของเราจะมีเรื่องของ model เข้ามาจับในภาคพื้นที่หรือสัดส่วนที่จะปล่อยลงสู่ผิวน้ำ ไม่ว่าจะเป็นภาคอุตสาหกรรม ซึ่งงานต่อไปเรากำหนดไว้ในแผนของเราเพื่อที่จะต้องดำเนินการต่อ

3. ถาม: งานเสวนาเราเป็นวิธีที่บอกได้ว่าสิ่งที่ปนเปื้อนลงมานั้น มาจากแหล่งไหน ทางกรมควบคุมมลพิษใช้ตรวจวัดได้อย่างไร

ตอบ: ตอนที่เรารู้ว่า เราต้องดูว่าเป็นพื้นที่วิกฤตไหม ในที่นี้คือเป็นพื้นที่ร้องเรียนซ้ำซาก หรือวิกฤตในระดับประเทศหรือเป็นพื้นที่ที่ประกาศเป็นเขตคุ้มครองสิ่งแวดล้อมใหม่ เขตควบคุมมลพิษใหม่ เราจะมีการจัดความสำคัญและมีเรื่องการติดต่อตรวจสอบให้ดำเนินไปในการกฎหมาย มีทั้งลงไปตรวจสอบใช้มาตรการทางกฎหมาย ถ้าเป็นโรงงานอุตสาหกรรม ตอนนี้มี 130,000 โรงงาน เราไม่สามารถที่จะไปได้ทุกโรงงานเราก็เลือกที่มีการร้องเรียนบ่อยๆ หรือแม่น้ำท่าจีนที่มีการตรวจสอบในฟาร์มสุกร เครื่องมือที่มีการตรวจนั้น ไม่ใช่เพียงแค่เรื่องของตรวจจับตามมาตรฐานที่ปล่อยออกมา แต่จะมีการส่งเสริมให้ปฏิบัติตามกฎหมายในเชิงบวกเพราะว่าบางที่เจ้าของแหล่งกำเนิดมลพิษเองไม่รู้จกกฎหมาย เราจึงมีความคิดว่าเขาต้องรู้กฎหมายทุกกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการปล่อยลงมาของมลพิษ แต่จริงๆ แล้วไม่ใช่เช่นนั้นจากการลงพื้นที่ 40-50 เปอร์เซ็นต์ที่จะรู้กฎหมาย เพราะฉะนั้นเราต้องส่งเสริมให้เขารู้กฎหมายรวมถึงการจัดการน้ำเสียบางที่เขาจัดการน้ำเสียในรูปแบบของเขาโดยไม่เข้าใจว่าแต่ละขั้นตอนทำไปเพื่ออะไร

3. ศ.ดร.จรงค์ ผลประเสริฐ ภาควิชาวิศวกรรมโยธา คณะวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ หัวข้อ ประเด็นความก้าวหน้าด้านงานวิจัยและเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้อง

ขอเสนอประเด็นวิจัย 2 ประเด็นที่เป็นภัยเงียบอันตรายที่ไม่มีการตระหนักมากแต่มีการส่งผลกระทบต่อสุขภาพมาก หนึ่งคือปัญหาเชื้อโรคดื้อยา เป็นปัญหาที่ทุกคนไม่ตระหนัก เช่นเกิดป่วย ท้องเสียรุนแรง เป็นไข้หวัดใหญ่ หรือติดเชื้อในกระแสเลือด ยาปฏิชีวนะในอดีตที่เคยใช้ได้ผล ในปัจจุบันอาจจะใช้ไม่ได้ผลแล้วเพราะว่าเชื้อโรคในตัวเรามันดื้อต่อตัวยาที่เราใช้ ปัจจุบันนี้คนไทยเสียชีวิตจากปัญหาการดื้อยา 38,000 คน หรือวันละ 100 คนซึ่งมากกว่าโรคอื่นเยอะ ความเสียหายทางเศรษฐกิจมีความเสียหายถึงสี่หมื่นสองพันล้านบาท เป็นข้อมูลมาจากกระทรวงสาธารณสุข ไม่ใช่แค่เฉพาะประเทศไทย ทั่วโลกก็ประสบกับปัญหานี้เช่นเดียวกัน ทั่วโลกในหนึ่งปีคนตาย 700,000 คนหรือวันละหนึ่งคน ในอนาคตอาจจะมีการตายเพิ่มมากขึ้น ส่วนใหญ่อยู่ในเอเชีย ปัญหาหลักมาจากคนไทยที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะมากและสามารถเข้าถึงยาได้ง่าย เวลาเราเจ็บป่วยสามารถไปร้านขายยาได้ ถ้าในต่างประเทศถ้าจะมีการซื้อยาต้องมีการไปหาหมอก่อน ทางด้านปศุสัตว์ก็มีการใช้ยาปฏิชีวนะมาก ฟาร์มหมู ไก่ การประมง จากการตรวจสอบพบว่าการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในแหล่งน้ำมาก ทำให้มีเชื้อโรคดื้อยาเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก เรามีแผนยุทธศาสตร์ห้าปีที่จะมีการจัดการปัญหาโรคดื้อยา ลดการเจ็บป่วย ลดการใช้ยาน้อยลง สิ่งเหล่านี้จะเกิดขึ้นได้นั้นประชาชนต้องมีการตระหนัก ทางด้านสาธารณสุข โภค ชาวบ้านและประชาชนจำนวนมากยังแยกความแตกต่างไม่ได้ระหว่างยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าเชื้อและยาแก้ปวด งานวิจัยเราก็มีการพยายามศึกษา โรงพยาบาลส่วนมากที่มีการปล่อยน้ำเสียออกมาก็มียาปฏิชีวนะตกค้างปนเปื้อนออกมาด้วย เราศึกษาวิจัยโดยใช้ระบบ wet land ขึ้นสูงและปลูกพืชได้แก่ กก และธูปฤาษี พบว่า ไฮดรอกซิลเรดิเคิลสามารถย่อยสลายยาตกค้างได้ เมื่อใช้ดินที่มีเหล็ก 30% เป็นปฏิกิริยาเฟ้นตันเพื่อปลูกต้นไม้ก็สามารถที่จะย่อยสลายยาได้ มีโรงพยาบาลบางแห่ง เช่น โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศรซึ่งอยู่ติดแม่น้ำบางปะกงก็มีการลงมือทำและประสบความสำเร็จ นอกจากนี้ ยาตกค้างจากการเลี้ยงปลากระชังก็มีความเหมือนกัน ซึ่งเป็นปัญหาเพราะความเข้มข้นน้อยมาก ดังนั้นการตรวจวัดจะต้องมีการใช้ค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างแพง

ส่วนอีกปัญหานึงคือไดออกซินเป็นสารพิษตกค้าง คงทน อันตราย และอยู่ในธรรมชาติได้นาน มีการกระจายไปทั่วในแหล่งน้ำ และมีการสะสมในไขมันของคนและสัตว์ ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้เนื่องจากขยะเยอะขึ้น การวัดไดออกซินก็มีการใช้

ค่าใช้จ่ายสูงและเราก็ไม่มีการตรวจวัดที่ได้มาตรฐาน ซึ่งสารไดออกซินเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ในต่างประเทศโดยเฉพาะเยอรมัน พบไดออกซินในไขมันในน้ำมัน ก็มีการพยายามลดในน้ำมันคุณแม่ ของประเทศไทยเราก็ควรมีการตรวจวัดไดออกซินในนมแม่ซึ่งมีผลกระทบต่อสมองและการเจริญเติบโต รวมไปถึงให้มีการทำวิจัยต่อไป

4. ดร.สมสิทธิ์ มูลสถาน กรรมการสถาบันน้ำและสิ่งแวดล้อมเพื่อความยั่งยืน สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย หัวข้อ เทคโนโลยี มาตรการและการป้องกันของผู้ประกอบการ

จุดกำเนิดของ Thailand 4.0 มาจากสภาอุตสาหกรรม ซึ่งเริ่มจากการกล่าวถึง industry 4.0 โดยเป็นการใช้นวัตกรรมมาสร้างรายได้ ใช้แรงน้อยแต่ได้เงินมาก แต่อุตสาหกรรมในประเทศไทยยังเป็นระดับ industry 2.0 ภาพรวมของประเทศไทยปัจจุบันก็ยังเป็นระดับ Thailand 3.0 ซึ่งหากเป็นเรื่องน้ำเสีย ถ้ารัฐบาลมีการให้เงินไป มีการรับประกันสองปี และให้ผู้ประกอบการมีการจ้างการดำเนินงานอีกสองปีจะได้ผลดีมาก เนื่องจากส่วนใหญ่เมื่อการก่อสร้างแล้วเสร็จก็จะมี training บางครั้งมีการลงทุนสี่สิบถึงห้าสิบล้านหรือร้อยล้านบาท หลังจากนั้นนำผู้ที่ไม่ชำนาญมา operate และมีการเปลี่ยนนโยบายบ่อยมากซึ่งจะต้องมีการทำให้ดีขึ้นเรื่อยๆโดยมีการ training ไปเรื่อยๆ ดังนั้นรัฐบาลควรมีการ operate ไปเลยอย่างน้อย 2 ปี โดยไม่ควรเปลี่ยนบ่อย

เรื่องไดออกซินนั้น ปัจจุบันมาตรฐานอยู่ที่ 0.5 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร แต่มีความพยายามปรับมาตรฐานลงเป็น 0.1 เพื่อให้เท่ากับประเทศในแถบยุโรป อย่างไรก็ตาม เนื่องจากประเทศไทยมีข้อจำกัดด้านการตรวจวัดที่แพงมาก จึงไม่ควรจะใช้มาตรฐานความเข้มข้นของไดออกซินที่เท่ากับในต่างประเทศมากำหนดเป็นมาตรฐานของประเทศไทย นอกจากนี้ ในการควบคุมโรงงานอุตสาหกรรม ทำได้โดยกรมโรงงานซึ่งสั่งปิดโรงงานได้ ในขณะที่กรมควบคุมมลพิษไม่มีอำนาจสั่งปิด ความผิดของโรงงาน ได้แก่ การลักลอบปล่อยน้ำทิ้งบ้าง เพราะเนื่องจากว่ามีต้นทุนสูงในการบำบัด แม้ผู้ประกอบการรู้วิธีในการกำจัดก็ตาม นอกจากนี้ สิ่งที่เราควรพิจารณาเพิ่มเติมคือแหล่งกำเนิดอื่นๆที่นอกเหนือจากโรงงานด้วย เช่น ชุมชน หรือ non-point sources ด้วย ซึ่งเป็นที่น่าเสียดายที่ทางกรมมลพิษไม่มีอำนาจ นอกจากนี้ สิ่งที่ยากเห็นคือ โรงงานไฟฟ้าจากพลังงานขยะที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืน การบำบัดน้ำเสียที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืน

ช่วงคำถามคำตอบจากผู้เข้าร่วมงาน

1.ถาม: ในสภาอุตสาหกรรมมีการตระหนักอย่างไรบ้างในเรื่องของ non point sources จากแหล่งกำเนิดอุตสาหกรรม

ตอบ: ทุกวันนี้หลายโรงงานในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับ non point sources มีการโดนปิด เนื่องจากมีการลักลอบการปล่อยน้ำทิ้ง เพราะต้นทุนในการบำบัดมีค่าใช้จ่ายสูง

2.ถาม: ในด้านอุตสาหกรรม ถ้าพูดในเชิงของ ข้อมูลวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และผลผลิต ทางผู้ประกอบการโรงงานอุตสาหกรรมทราบไหมว่า กระบวนการของตัวเองเป็นอย่างไร ถ้ามีมลพิษเกิดขึ้น เขาได้คิดไหมว่าจะต้องลดต้นทุน

ตอบ: ทางผู้ประกอบการรู้อยู่แล้วว่ากระบวนการของตัวเองเป็นอย่างไร รวมไปถึงรู้วิธีในการจัดการกับมลพิษที่เกี่ยวข้องกับ non point sources แต่เป็นที่ทราบอยู่แล้วว่า ต้องใช้ต้นทุนสูงในการจัดการ

4. นายแพทย์คณัย ธีวันดา รองอธิบดีกรมอนามัย หัวข้อ นโยบาย กฎหมาย และปัญหาด้านสาธารณสุข

ปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่งในปัจจุบันนี้ คือ การแก้ปัญหาต่างๆโดยไม่ศึกษาบริบทที่แท้จริง เช่น ความเชื่อมโยงในหลายๆเรื่องตั้งแต่เรื่องของข้อกฎหมายรวมไปถึงกระบวนการในการพัฒนาในหลายๆส่วน บางครั้งมีการทำแบบ segment แต่ละตัวก็มีการทำที่ต่างกัน บริบทตัวเองหรือแม้กระทั่งกลไกของทางสาธารณสุขก่อนหน้านี้ก็เป็นลักษณะแบบนี้ สิ่งที่เราเห็นภาพได้ชัดก็คือว่า ปัญหาเกิดจากการที่เราไม่ทราบวิถีชีวิตจริงของคนไทยเป็นแบบไหน รูปแบบการดำรงชีวิตของตัวเอง เปลี่ยนไปค่อนข้างมาก ตั้งแต่เรื่องของการใช้หลักความคิด ตั้งแต่การใช้นโยบายแบบภาคเกษตรมาเป็นการใช้งานภาคอุตสาหกรรม ก็ยังมีการใช้รูปแบบเดิมๆ และสิ่งจำเป็นที่เราควรควบคุมและต้องเข้มงวดกลับละเลย ตัวชี้วัดหลายๆตัวตัวที่มีการปนเปื้อนออกมาเป็นการส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมมารบริโภค และพฤติกรรมทางการบริการของบุคลากรทางด้านการแพทย์ รวมทั้งกลไกของการควบคุมซึ่งอาจจะไม่ได้ตอบโจทย์กับสิ่งที่เราต้องการว่าให้มีสุขภาพที่ดี

ในหลายครั้งมีการพยายามให้ประชาชนพึ่งพาตัวเองได้ แต่นโยบายหลายอย่างกลับส่งเสริมให้ประชาชนพึ่งพาการทำงานของภาครัฐ ในเรื่องของกระจายอำนาจ ในอดีตเรามีการมองถึงการบริหารจัดการประเทศ ซึ่งพยายามที่จะให้มีองค์กรส่วนท้องถิ่นครอบคลุมทั่วประเทศเพื่อที่จะให้เกิดการดำเนินการ แต่ปัญหาอยู่ที่ตรงที่ว่าองค์กรส่วนท้องถิ่นมีการใช้อำนาจรัฐที่จะไปบริหารจัดการในกลุ่มย่อยนั้นเกิดขึ้นไม่ได้จริง เพราะการลงทุนในหลายๆส่วนแค่ในเรื่องของการจัดการมันมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมหาศาล แทนที่เราจะมีส่วนท้องถิ่นแค่หลักร้อยแต่กลับมีถึงหลักพัน ในแต่ละหน่วยต้องใช้กันอย่างมหาศาล แต่ในตัวของกฎหมาย ดูเหมือนมองอำนาจให้ส่วนท้องถิ่นแต่สุดท้ายมีการมอบอำนาจให้ราชการส่วนกลาง และอำนาจของการบริหารส่วนภูมิภาคมาเป็นตัวกุญแจ ที่ไม่สามารถตอบโจทย์ต่อวิธีการต่อการแก้ไขปัญหาคือ

ดังนั้น เมื่อกล่าวถึง non-point sources แท้ที่จริงแล้วในทุกพื้นที่ของประเทศ เราใช้ชีวิตสร้างพวกสารพิษหรือปล่อยสารพิษต่างๆออกมาโดยไม่รู้ตัว กลไกที่จะช่วยควบคุมได้ก็ควบคุมในระดับหนึ่ง แต่ข้อควรระวังคือการใช้ model ของที่หนึ่งไปขยายผลอีกทีหนึ่ง โดยลืมไปว่าเงื่อนไข วิธีปฏิบัติโดยพฤติกรรมของคนแต่ละภูมิภาคในแต่ละที่หรือว่าในแต่ละกลุ่มไม่เหมือนกัน ดังนั้น การวิจัยต่างๆในประเทศไทยที่จะเกิดขึ้น ต้องมีการวิจัยบนพื้นฐานของความคิดแบบคนไทย และเงื่อนไขต่างๆที่เราจะดำเนินการ เราจะมอง model จุดใดจุดหนึ่งแล้วเอาไปขยายผลต่อในประเทศนั้นเป็นไปได้อย่างมาก ดังจะเห็นได้จากการลงทุนที่ผ่านมาจนกลายเป็นไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ เช่น เตาเผาขยะติดเชื้อ รัฐบาลมีการลงทุนและมีการจัดสรรงบประมาณไปให้ทั่วประเทศในรอบหลายปีที่ผ่านมา แต่ตอนนี้มีเตาเผาขยะติดเชื้อที่ยังดำเนินการอยู่แค่สิบแห่ง ในสิบแห่งมีการจัดการของภาครัฐ 8-9 แห่ง ภาคเอกชนหนึ่งแห่ง ปัญหาในการดำเนินการคือปริมาณขยะที่ไม่เพียงพอต่อการเผา หากจะทำวิจัยจริงๆตัวเชื่อมระหว่างการทำวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์และทางด้านสังคม จะเป็นตัวหนึ่งที่จะช่วยทำให้เงื่อนไขในการทำงานสามารถตอบโจทย์ได้ ซึ่งไม่อยากจะให้ทำวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ หรือ ทางด้านสังคม เพียงอย่างเดียว แต่อยากจะให้ทำวิจัยที่เชื่อมโยงกัน รวมทั้งอีกส่วนหนึ่งคือการวิจัยที่เชื่อมต่อไปถึงส่วนสุดท้ายคือการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของประชาชนเองภายใต้บริบทในปัจจุบัน

ช่วงคำถามคำตอบจากผู้เข้าร่วมงาน

1.ถาม: โดย ผศ.สุวรรณี จุฑามณีพงษ์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในมุมมองของกรมอนามัย แหล่งกำเนิดมลพิษ มีอะไรอยากจะให้ช่วยกัน Focus ใหม่ ทางกรมอนามัยมีการจัดลำดับความสำคัญอย่างไรบ้างเกี่ยวกับด้านมลพิษ

ตอบ: โดยภาพรวมด้วยปัญหาเกิดขึ้นทุกๆจุด ไม่ใช่เกิดแค่จุดใดจุดหนึ่ง เราควรมุ่งไปที่พฤติกรรมของคน วิธีการในการตรวจสอบต่างๆที่เกี่ยวข้อง รวมไปถึงข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ภายใต้ของกลไกกฎหมายหลายๆฉบับสามารถที่จะทำได้ ในมุมมองของคนที่จะปฏิบัติ หรือคนที่ใช้ในชีวิตประจำวันเรายังมองข้ามความปลอดภัยในจุดนี้อยู่ สิ่งที่เราอยากจะให้เกิดขึ้นได้จริงๆ จะทำยังไง

ให้คนไทยของเราเปลี่ยนวิถีชีวิตให้มองในเรื่องของความปลอดภัย คำนึงการรับผิดชอบต่อตัวเองมากที่สุดโดยปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง วิธีในการปฏิบัตินั้น เราคิดในส่วนที่ว่าข้อความที่ถูกปล่อยโดยทางราชการ หรือหน่วยงานอื่นๆ เป็นการปล่อยข้อความที่ไม่ได้แบ่งกลุ่มว่ากลุ่มนี้ต้องปล่อยข้อความออกมาแบบไหน ดังนั้นการที่จะปล่อยออกมาสู่ประชาชนจริงๆต้องเป็นลักษณะที่ง่ายมากที่สุด อย่างน้อยพวกเขาสสามารถทำอะไรได้บ้าง ส่วนถัดมาคือในแง่ของชุมชนเอง เราจะทำอย่างไรให้ชุมชนสามารถดูแลกันเองได้ภายใต้กลไกของเขาเอง ในส่วนของสถานประกอบการต่างๆไม่ว่าจะเป็นภาครัฐหรือภาคเอกชน ถ้าหากว่าเราจะให้กลไกเหล่านั้นควบคุมกันเองในระดับหนึ่งภายใต้กฎหมายหรือข้อบังคับต่างๆ ไม่ควรที่จะบีบรัดจนเกินไป ในขณะเดียวกันก็เพื่อให้อิสระในการที่เขาจะสามารถบูรณาการได้ ซึ่งตรงนี้เป็นส่วนหนึ่งที่จะช่วยได้ สุดท้ายอยากจะเน้นมุ่งเน้นไปที่พฤติกรรมของคนไทยเป็นหลัก

2. ข้อเสนอแนะ: โดย ผศ.ดร.กำพล นันทพงษ์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ต่อเนื่องมาจากอาจารย์ที่ทำงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเรื่องส้วม และการนำส้วมมาใช้ในพื้นที่จริงอาจารย์ธรรมรัตน์ คุณตะเทพ ได้มีการดูค่า DALY ซึ่งเป็นค่าดัชนีชี้วัดสุขภาพ ซึ่งปัญหาก็คือการนำสิ่งแวดล้อมมาเชื่อมโยงกับสุขภาพและการวิเคราะห์ต้นทุนซึ่งมีการคำนวณที่ยากเมื่อนำมาเกี่ยวข้องกับเรื่องสุขภาพ แต่ปัญหาเกี่ยวกับระบบรายงานไม่มีการสนับสนุนกับทางด้านสิ่งแวดล้อมในการหาค่า DALY จากเหตุผลที่กล่าวมานี้จึงไม่สามารถที่จะคำนวณย้อนกลับได้ว่าการสูญเสียไปเท่าไร ปัญหาหลักคือ เรื่องระบบรายงานมีความซับซ้อน ไม่ว่าจะเป็นทางด้านสาธารณสุข หรือองค์กรส่วนท้องถิ่น เช่น ในเรื่องการสร้างระบบบำบัดน้ำเสียของทางเทศบาล ในเรื่องของระบบบำบัดน้ำเสียจะต้องมีหลายหน่วยงานเข้ามาดูแลเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นควรจะฝากใครที่ช่วยเข้ามาดูแลในส่วนนี้
3. ข้อเสนอแนะ: โดย ผศ.ดร.กำพล นันทพงษ์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประเด็นที่หนึ่งการแก้ไขปัญหามลพิษกับการควบคุมคุณภาพในแหล่งน้ำ จากแผน 20 ปีของ รศ.ดร.พิสุทธิ เพียรมนกุล ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจจะเป็นแผน 40 ปี หรือ 50 ปีขึ้นไป สิ่งที่น่าเป็นห่วงคือระบบบำบัดน้ำเสียส่วนรวม โดยตอนนี้เกิดเป็นโครงการของอาจารย์ธรรมรักษ์ เราควรจะย้อนกลับไปดูที่แหล่งกำเนิดของเสียที่ปล่อยออกมาจากบ้านเรือนเราควรจะทำให้สำเร็จเสร็จสิ้นอยู่ในบ้าน ดังนั้นงานวิจัยควรจะย้อนกลับไปแหล่งกำเนิดมลพิษ แล้วมีการจัดการทำให้การปล่อยของเสียออกมาน้อยที่สุด ประเด็นที่สองเราควรยกเลิกระบบที่ท้องถิ่นจะต้องมารองรับขยะตามบ้าน เช่นบ้านไหนจะทิ้งขยะก็ให้ไปจดทะเบียน แต่ถ้าบ้านไหนที่สามารถจัดการได้ แยกได้ภายในบ้านก็ไม่ต้องจ่าย ซึ่งเป็นประเด็นที่เราลองจะศึกษา
4. ข้อเสนอแนะ: โดย รศ.ดร.สุวรรณา บุญตานนท์ ภาควิชาวิศวกรรมโยธาและสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เนื่องจากว่าหัวข้อนี้เป็นความสำเร็จและโอกาสที่สำคัญ ประเด็นที่เกี่ยวกับเรื่องน้ำเสีย และยาปฏิชีวนะ เราจะเห็นได้ว่างานด้านการจัดการมลพิษถือเป็นโอกาส ไม่ใช่เพียงแค่บอกค่าความสกปรกเท่านั้น แต่มันเป็นเรื่องโอกาสในการจัดการปัญหาสุขภาพในการเติมเต็มข้อมูลทางด้านสุขภาพอีกด้วย เช่นประเด็นยาปฏิชีวนะ เรื่องการดื้อยา งานทางด้านสิ่งแวดล้อมหรืองานทางด้านสุขภาพสามารถที่จะช่วยเติมเต็มข้อมูลทางการแพทย์ได้ แต่ว่าข้อมูลทางด้านสิ่งแวดล้อมงานน้ำเสียสามารถบอกอะไรได้มากมาย เช่นการเอาน้ำเสียมาบ่งบอกข้อมูลทางด้านสุขภาพหรือเรื่องของการจัดการคุณภาพ ซึ่งอาจจะเป็นโอกาสในการใช้เทคโนโลยีของทางหัวหน้าโครงการที่พัฒนาขึ้น ซึ่งงานเสวนาค่อนข้างเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีเพราะว่ารวมหลายภาคส่วนและรวมไปถึงทางสังคม เพราะฉะนั้นการที่หลายๆภาคส่วนมีส่วนร่วมโดยเฉพาะการสื่อสาร ต้องมีการสื่อสารเข้ามามีส่วนร่วมมากๆ ไม่อย่างนั้นจะส่งผลให้ไม่สามารถที่จะสื่อสารให้กับชุมชนได้

5. รศ.ดร.พิสุทธิ เพียรมนกุล ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตอบ จากประเด็นที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ จะมีการนำไปถ่ายทอดต่อ โดยส่วนตัวผมก็ให้ความเห็นกับในทีม พยายามที่จะไปข้างบนถึงท่านนายกรัฐมนตรี เขาบอกว่าถ้าเราจะทำยุทธศาสตร์ชาติสี่ปีแล้วประชาชนไม่รู้ เรียนตามตรงว่าด้วยยุทธศาสตร์ที่ทำมันทำช่วงปลายของ คสช. จริงๆเกือบจะเลือกตั้งแล้ว กลายเป็นว่าการสร้างการรับรู้ กับการ engagement มันมีข้อจำกัดค่อนข้างน้อย อย่างหลายๆท่านเห็นภาพออกมาแล้วหายไปเลย นั่นคือ engagement ที่สร้างขึ้นมาเพื่อบอกว่าเรามีแผนปฏิรูปประเทศ โดยส่วนตัวนั้นไม่ใช่เลย ก็มีพยายามที่จะส่งต่อในเรื่องของ engagement เพราะว่าถ้าเรา engage ให้คนรับรู้ไม่ได้ว่าเรามีอันนี้สี่ปีเราจะไปคาดหวังอย่างไรว่าเขาจะใช้ต่อ คนที่จะเป็นคนสร้างว่าคุณห้ามเปลี่ยนผมพูดจริงๆว่าโดยส่วนตัว ผมว่ารัฐธรรมนูญควบคุมไม่ได้ ประชาชนต่างหากที่จะบอกว่าฉันจะเอาแบบนี้ แต่ถ้าปัจจุบันถ้ายังทำกันอยู่แค่นั้นมันก็ไม่ครบ โดยที่ผมว่าเรื่อง environment education ผมมองอีกโจทย์หนึ่งที่น่าทำ คือเราเรียนในเชิงพื้นฐานอาชีพค่อนข้างเยอะ แต่เราจะ disrupt รูปแบบการสอนในเชิง environmental อีกแบบดีไหม ที่มีความเติบโต สมดุล และยั่งยืนให้คนเรียนตั้งแต่เด็กเห็นภาพทั้งสองแบบว่า คุณดูอย่างสิงคโปร์ ญี่ปุ่น จริงๆแล้วเขาพัฒนาอุตสาหกรรม สิ่งแวดล้อมเขาก็ดีด้วย ก็ต้องยอมเสียทั้งสองฝั่ง เด็กถึงจะโตด้วยกัน สุดท้ายผม ถ้าผมมองการวิจัยเกี่ยวกับเรื่อง non point sources ที่ผมอยากทำ มีโอกาสเสนอในแผนด้วย ผมก็ต้องมองทั้งสองด้านคือจากบ่อกุ้งทะเล ทะเลสู่บก ผมว่าจากบ่อกุ้งทะเลคือเกษตรชัดเจน เรื่องขยะชัดเจน นั่นคือ non point sources อย่างจริงจัง บ่อกุ้งทะเลอีกอันคือเรื่อง saving ผมว่าถ้าเราไม่ saving ก็แก้ไม่จบ ถ้าเรายังใช้ 70% เป็นน้ำจากการเกษตร เราไม่รู้ตรงนี้เลย ผมว่าจากบ่อกุ้งทะเลยังแก้ไม่ได้ ต้องเริ่มที่พฤติกรรมต้อง saving ตัวนี้ให้ได้ก่อน ในขณะที่จากทะเลสู่บกผมว่าก็มีคนพูดเยอะ ยกตัวอย่างเช่น oil spill แล้วในอนาคตเราจะไม่สามารถปฏิเสธได้ การที่ประเทศไทยจะมีความเป็นธรรมของภูมิภาคมันเป็นแนวๆอยู่แล้ว ดังนั้น pollution ที่เป็น non point sources pollution จากทะเลสู่บกทั้งในเชิงของคุณภาพอากาศด้วย จริงๆมี professor ที่เกาหลีหลายท่านในต่างประเทศที่ทำ เรื่อง violent air pollution มันมีเพียง 2.5 จากทะเลเข้ามาสู่บกเท่าไร ดังนั้นเป็นอีกโจทย์หนึ่งที่เราสามารถทำในเชิง non point source research ต่อได้

6.3 การบรรยายหัวข้อ “นวัตกรรมการระบุแหล่งปล่อยมลพิษ ด้วย Microbial Source Tracking (MST)”

โดย ดร.ขวัญวิ สิริกาญจน นักวิจัยชำนาญการ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ หัวหน้าโครงการวิจัย และ ดร.ปิณดา ลีลพจน์ กำแพงทอง นักวิชาการสิ่งแวดล้อมชำนาญการ ส่วนแหล่งน้ำจัดการควบคุมมลพิษ ผู้ร่วมวิจัย

วัตถุประสงค์ เพื่อเผยแพร่เทคโนโลยีและผลการศึกษาในแม่น้ำท่าจีน

เนื้อหา (เอกสารนำเสนอ ดังแสดงในภาคผนวก ณ3.)

ผู้บรรยายนำเสนอปัญหาปัจจุบันที่มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินและน้ำทะเลชายฝั่งยังไม่มีพารามิเตอร์ใดที่สามารถระบุไปถึงแหล่งกำเนิดมลพิษเพียงแหล่งเดียวได้ โดยที่พบคือเป็นการระบุแหล่งกำเนิดรวมกันหรือคาบเกี่ยวกันระหว่างกิจกรรมหลักๆ 3 กิจกรรม ได้แก่ เกษตรกรรม อุตสาหกรรม และชุมชน ในส่วนของพารามิเตอร์บ่งชี้คุณภาพน้ำทางชีววิทยาที่มีการใช้แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม ฟีคอลลีฟอร์ม และเอ็นเทอโรคอกไค ซึ่งก็สามารถปนเปื้อนมาจากแหล่งกำเนิดหลายชนิด ได้แก่ น้ำเสียชุมชน มูลสัตว์ต่างๆ ทั้งปศุสัตว์ (เช่น โค สุกร สัตว์ปีก) สัตว์เลี้ยง (เช่น สุนัข แมว) หรือแม้แต่สัตว์ตามธรรมชาติ (เช่น นกน้ำ สัตว์ป่า ปลาธรรมชาติ เป็นต้น) ปัจจุบันมีสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำผิวดินประมาณ 20 เปรอร์เซ็นต์ และสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งประมาณ 15-50 เปรอร์เซ็นต์ที่พบค่าแบคทีเรียเกินมาตรฐาน ดังนั้น ปัญหาการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำจึงนับเป็นปัญหาสำคัญที่หากสามารถดำเนินการแก้ไขได้ จะทำให้คุณภาพน้ำในแหล่งน้ำดีขึ้นได้ ในต่างประเทศ ทั้งสหรัฐอเมริกาและประเทศสหภาพยุโรป มีการกำหนดมาตรฐานแบคทีเรียสำหรับแหล่งน้ำเพื่อการนันทนาการ โดยใช้แบคทีเรียอีโคไลและเอ็นเทอโรคอกไคสำหรับทั้งน้ำจืดและน้ำทะเล หากน้ำมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียดังกล่าวเกินค่ามาตรฐาน จะมีมาตรการคือติดป้ายเตือนบริเวณชายหาดเพื่อให้นักท่องเที่ยวรับทราบความเสี่ยงของการเจ็บป่วยหากลงเล่นน้ำ

แนวทางที่สำคัญในการแก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำเสื่อมโทรมและฟื้นฟูคุณภาพน้ำให้กลับมาดีขึ้นอย่างประสบผลสำเร็จ ในต่างประเทศ คือการใช้เทคนิคการตรวจระบุแหล่งกำเนิดน้ำเสียด้วยจุลินทรีย์ หรือ Microbial Source Tracking (MST) โดยการตรวจจำแนกจุลินทรีย์ในลำไส้ที่จำเพาะกับคนหรือสัตว์ประเภทต่างๆ เช่น สุกร โค ม้า แพะ แกะ ไก่ เป็ด นก เป็นต้น เทคนิค MST นั้นนอกจากจะเป็นวิธีการระบุแหล่งปล่อยมลพิษน้ำเสียลงสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจมีหลายแหล่งที่ปล่อยน้ำเสียและสิ่ง ปฏิกูลปนเปื้อน ยังสามารถช่วยในการประเมินความเสี่ยงผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ได้อีกด้วย เนื่องจากสิ่งปฏิกูลจากคนมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้ออันตรายที่ก่อโรคในคนได้สูง ในขณะที่สิ่งปฏิกูลจากสัตว์อาจมีเชื้อที่ติดต่อกันได้แต่ด้วยชนิด และปริมาณที่น้อยกว่า เทคนิค MST นี้อันที่จริงแล้วเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิจัยด้าน Fecal Source Tracking ซึ่งคือการ ตรวจระบุแหล่งปล่อยสิ่งปฏิกูล โดยมีการศึกษาอีกด้านคือ chemical source tracking (CST) ซึ่งหมายถึงการตรวจวิเคราะห์ สารเคมี เช่น การตรวจวิเคราะห์สารคาเฟอีนและน้ำหอมสามารถระบุการปนเปื้อนกิจกรรมจากคนได้ หรือ การตรวจสาร sterols บางชนิดใช้ระบุการปนเปื้อนจากสัตว์ป่าหรือพื้นที่การเกษตรได้ เป็นต้น แต่ไม่เป็นที่แพร่หลายเท่ากับการใช้จุลินทรีย์ เนื่องจากมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเชื้อก่อโรคมกกว่า เช่น อัตราการสลายตัวเมื่อถูกปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม เป็นต้น เทคนิค MST ได้รับการพัฒนาจากงานวิจัยที่ได้รับการศึกษาค้นคว้าอย่างจริงจังตั้งแต่ปี 2000 และความก้าวหน้าของเทคนิคนี้ในต่างประเทศ จะเห็นได้จากการมีเอกสารคู่มือการตรวจวัดเพื่อการใช้งานจริงจากหน่วยงานภาครัฐของสหรัฐอเมริกาและอังกฤษ ตั้งแต่ปี 2008 นอกจากนี้ยังมีการจัดทำข้อสรุปด้านนโยบาย (policy brief) ในสหรัฐอเมริกา และมีห้องปฏิบัติการเอกชนที่รับตรวจ วิเคราะห์ด้าน MST โดยเฉพาะอีกด้วย

ในส่วนของประเทศไทยนั้น มีการศึกษาวิจัยด้าน MST มาตั้งแต่ปี 2009 โดยคณะผู้วิจัยจากห้องปฏิบัติการวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ปัจจุบัน คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิควิธีการที่ได้รับการทดสอบและพร้อมใช้งานใน ประเทศไทย ทั้งหมด 3 วิธี คือ (1) การตรวจระบุการปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชนด้วยไวรัสแบคทีริโอเฟจ ซึ่งใช้เทคนิคการ เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสของแบคทีเรียเอนเทอโรคอกคัส เป็นเทคนิคที่ง่าย ต้นทุนไม่สูง และผู้วิเคราะห์มีความรู้ด้านการเพาะเลี้ยง เชื้อเท่านั้น (2) การตรวจระบุการปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชน โค สุกร และการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลโดยรวม (ไม่ระบุแหล่งกำเนิด เฉพาะ) ด้วยดีเอ็นเอโดยการใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเทคนิคมีความซับซ้อนมากขึ้น ผลที่ได้รายงานเป็นบวกหรือลบ มีต้นทุนและ ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ที่สูงขึ้น และผู้วิเคราะห์ต้องมีความรู้ความเข้าใจด้านเทคนิคทางชีวโมเลกุล และ (3) การตรวจระบุ การปนเปื้อนจากน้ำเสียชุมชน โค สุกร และการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลโดยรวม (ไม่ระบุแหล่งกำเนิดเฉพาะ) ด้วยดีเอ็นเอโดยการใช้ เทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ ผลที่ได้สามารถระบุแหล่งกำเนิดได้หลายแหล่งและเปรียบเทียบระดับการปนเปื้อนจากแต่ละแหล่ง ได้ ซึ่งเทคนิคมีความซับซ้อนมากขึ้น มีค่าใช้จ่ายสูงขึ้น ต้องการผู้วิเคราะห์ที่มีความรู้ความเข้าใจด้านเทคนิคชีวโมเลกุลมากขึ้น แต่ข้อมูลที่ได้นี้มีความครอบคลุมมากกว่าสองวิธีแรก ซึ่งตารางแสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพข้อดีและข้อจำกัดของทั้ง 3 วิธี ดังแสดงในภาคผนวก ก3.

จากนั้น นำเสนอผลการศึกษาโครงการ การจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยกลุ่มแบคทีเรีย กรณีสึกษา ลุ่มน้ำท่าจีน ซึ่งโครงการนี้ ได้พัฒนาวิธีตรวจวัด MST ด้วยวิธีดีเอ็นเอแบบพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณ (วิธีที่ 2 และ 3) และทำการตรวจ ติดตามคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีน โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำ ณ สถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำของกรมควบคุมมลพิษ จำนวน 12 สถานี ตั้งแต่ต้นแม่น้ำท่าจีนที่แยกจากแม่น้ำเจ้าพระยาที่อำเภอชะอำมา จังหวัดชัยนาท ผ่านจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม จนถึงปากแม่น้ำท่าจีนที่ลงสู่อ่าวไทยที่จังหวัดสมุทรสาคร โดยทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 4 รอบ แบ่งเป็นฤดูฝน 2 รอบ และ ฤดูแล้ง 2 รอบ ผลเบื้องต้นพบการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากมูลสุกร โค และน้ำเสียชุมชนในหลายๆบริเวณ นอกจากนี้ ทำการ วิเคราะห์แบบหลายตัวแปรเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มพารามิเตอร์คุณภาพน้ำต่างๆ ด้วย (รายละเอียดดังแสดงใน ภาคผนวก ค.) โดยผลที่ได้จากโครงการนี้ เป็นตัวอย่างในการใช้เทคนิค MST เพื่อการวิจัยเชิงพื้นที่ ในการระบุแหล่งกำเนิด มลพิษได้อย่างประสบผลสำเร็จ

6.4 การอภิปรายและระดมสมอง หัวข้อ “ก้าวต่อไป...เพื่อต่อยอดงานวิจัยและนำไปสู่นโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำ”

วัตถุประสงค์ เพื่อระดมความเห็นจากหลายภาคส่วนให้ได้แนวทางการผลักดันงานวิจัยไปสู่การใช้ประโยชน์
อย่างเป็นรูปธรรม

เนื้อหาส่วนที่ 1: การพัฒนางานวิจัย MST ในการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมและการสร้างเครือข่ายนักวิจัยในไทย
(ภาคการศึกษาและวิจัย) ดำเนินรายการโดย ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน

กิจกรรมที่ 1 – การเชื่อมโยงเครือข่ายนักวิจัย เพื่อสร้างเครือข่ายความรู้ความชำนาญของนักวิจัยและอาจารย์แต่ละท่าน

ชนิดตัวอย่างที่วิเคราะห์	สิ่งที่ตรวจวัด	เทคนิคชีวโมเลกุล	เทคนิคเลี้ยงเชื้อ	อื่นๆ
1. ดิน: - รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี - รศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย 2. น้ำ/น้ำเสีย: - ผศ.ดร.กำพล นันทพงษ์ - ดร.ดวงสิทธิ์ เเด่นเพชรกุล - รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี - ผศ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสินิ - ดร.วิลาสินี อยู่ชัชวาล - ดร.สุรพงษ์ รัตนกุลสุตา - รศ.ดร.สุวรรณา บุญตานนท์ - ดร.สุภัทรา วิเศษศรี - ดร.อดิศักดิ์ ร่มแสง 3. พืช: - รศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย 4. หอยนางรม: - รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส 5. อาหาร: - อ.ดร.พรพรรณ สอนเชื้อ	1. จุลินทรีย์: - ผศ.ดร.กำพล นันทพงษ์ - รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี - ผศ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสินิ - ดร.วิลาสินี อยู่ชัชวาล - คุณสุดา อธิสุภรณ์รัตน์ - ดร.สุรพงษ์ รัตนกุลสุตา - รศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย - ดร.อดิศักดิ์ ร่มแสง 2. ไวรัส: - ดร.ดวงสิทธิ์ เเด่นเพชรกุล - รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส 3. จุลินทรีย์ก่อโรค: - อ.ดร.พรพรรณ สอนเชื้อ - ผศ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสินิ - ดร.สุรพงษ์ รัตนกุลสุตา - ดร.อดิศักดิ์ ร่มแสง 4. สารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน, การปนเปื้อนของสารสารกลุ่มผลิตภัณฑ์ยาและผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพและยาปฏิชีวนะ (POPs, PPCPs, and Antibiotic) : - รศ.ดร.สุวรรณา บุญตา	1. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): - รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี - ดร.วิลาสินี อยู่ชัชวาล - รศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย 2. Morphology: - ดร.อดิศักดิ์ ร่มแสง 3. Polymerase Chain Reaction (PCR): - ดร.ดวงสิทธิ์ เเด่นเพชรกุล - อ.ดร.พรพรรณ สอนเชื้อ - รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี - คุณสุดา อธิสุภรณ์รัตน์ - ดร.สุรพงษ์ รัตนกุลสุตา - ผศ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสินิ - ดร.วิลาสินี อยู่ชัชวาล - รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส 3. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR): - ดร.ดวงสิทธิ์ เเด่นเพชรกุล - อ.ดร.พรพรรณ สอนเชื้อ - ดร.สุรพงษ์ รัตนกุลสุตา	1. แบคทีเรีย: - รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี - อ.ดร.พรพรรณ สอนเชื้อ - ผศ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสินิ - คุณสุดา อธิสุภรณ์รัตน์ - ดร.สุรพงษ์ รัตนกุลสุตา - ดร.อดิศักดิ์ ร่มแสง 2. ยีสต์: - ผศ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสินิ 3. Cell line: - รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส 4. วิธีการตรวจนับเชื้อ (Plate count): - ผศ.ดร.กำพล นันทพงษ์ - รศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย 5. ไวรัส (Virus): - ดร.สุรพงษ์ รัตนกุลสุตา - รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส	1. ทดสอบเชื้อดื้อยา: - คุณสุดา อธิสุภรณ์รัตน์ 2. การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ (Bioremediation): - รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี - รศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย 3. การประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณ (QMRA): - ดร.ดวงสิทธิ์ เเด่นเพชรกุล 4. Surfactant technology, Environmental Biotechnology: - รศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย 5. การจัดการของเสีย: - ผศ.ดร.กำพล นันทพงษ์

ชนิดตัวอย่างที่วิเคราะห์	สิ่งที่ตรวจวัด	เทคนิคชีวโมเลกุล	เทคนิคเลี้ยงเชื้อ	อื่นๆ
	นนท์	- รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส 4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): - คุณสุดา อธิธิสุภรณ์รัตน์ - ผศ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสนิต 5. Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE): - ดร.สุรพงษ์ รัตนกุลสุตา 6. Sequencing: - อ.ดร.พรพรรณ สอนเชื้อ - ผศ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสนิต - รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส 7. Southern blot: - รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส		

กิจกรรมที่ 2: – สิ่งที่ยากให้เกิดขึ้นในอนาคตในแต่ละช่วงเวลา เพื่อที่จะต่อยอดงานวิจัยและนำไปสู่นโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำ

ช่วงเวลา	หัวข้อ	ความเห็น
1-3 ปี	การบำบัด	1.การจัดการน้ำเสียรอบศูนย์ราชการแจ้งวัฒนะ ซึ่งเป็นน้ำนิ่ง มีการกำจัดจากเครื่องบำบัดยังไม่เพียงพอจะมีการจัดการแบบอื่น 2. ควรมีเทคโนโลยีการบำบัดน้ำเสียที่เป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบติดกับที่) ที่มีประสิทธิภาพ
	งานวิจัย	1. กลุ่มวิจัยที่เข้มแข็งจากหน่วยงานต่างๆ เช่น นักวิจัยจากมหาวิทยาลัยและสถาบันวิจัย เพื่อตอบสนองนโยบายการจัดการทางด้านสิ่งแวดล้อม 2. งานวิจัยที่สามารถใช้ประโยชน์ได้จริง 3. เพิ่มความสนใจในเรื่องโรคที่เกิดจากเชื้อ เช่น ไวรัสอีโบล่า 4. การศึกษาไวรัสและแบคทีเรียในเชิง Fate and transport
	การศึกษา	1. มีการศึกษาทางด้านสังคมและเศรษฐศาสตร์ 2. ความพร้อมของบุคลากรทางภาครัฐที่จะรับรู้สิ่งใหม่ๆ เช่นความพร้อมทางด้านการศึกษา, ความตั้งใจที่อยากจะทำงาน และจริยธรรม 3. การถ่ายทอดความรู้จากหน่วยงานและมหาวิทยาลัยอย่างต่อเนื่อง
	การบูรณาการ	1. การร่วมมือทำงานวิจัยแบบบูรณาการ ที่สามารถนำไปแก้ไขปัญหาได้จริง 2. บูรณาการความรู้หลายๆ ศาสตร์เพื่อสามารถนำไปใช้ได้จริง
	ชุมชน	1. ให้ความรู้ถึงผลเสียจากการกระทำในชีวิตที่ก่อให้เกิดมลพิษ (การปล่อยน้ำเสีย) และรวมไปถึงการสร้างจิตสำนึก 2. การให้ความรู้ชุมชนเกี่ยวกับผลกระทบของมลพิษ รวมทั้งแนวทางการจัดการทางด้านมลพิษ 3. การมีส่วนร่วมของภาครัฐและประชาชนในการวางแผนเฝ้าระวังแหล่งมลพิษ
	นโยบาย	1. นโยบายข้อบังคับเกี่ยวกับการปล่อยมลพิษที่ชัดเจน 2. มีการเชื่อมโยงนโยบาย ปฏิบัติในการควบคุมมลพิษอย่างมีประสิทธิภาพ “บูรณาการทำงาน” 3. การเชื่อมโยงกันระหว่างนักวิจัยกับผู้กำหนดนโยบายกับผู้นำผลวิจัยไปใช้ บ่อยครั้งที่ผลวิจัยไม่สามารถไปต่อได้ เนื่องจากปัญหาระดับนโยบายของหน่วยงานรัฐที่ยังยึดติดกับเทคโนโลยีเดิมๆ ทั้งไม่ยอมเพิ่มภาระหน้าที่ เช่นถ้าเราเริ่มเปลี่ยนอะไรใหม่ๆ ระบบราชการจะเริ่มสงสัยว่าใช้ได้จริงหรือไม่ แม้ว่าจะมีการวิจัยรับรอง 4. การเอาใจจริงเอาใจกับผู้ที่ปล่อยมลพิษลงสู่สิ่งแวดล้อม 5. ความร่วมมือระหว่างหน่วยงานที่ชัดเจนขึ้น
3-5 ปี		1. อยากรู้งานวิจัยที่มีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงจริงๆ 2. มาตรฐานน้ำทิ้งที่มีสารปนเปื้อนใหม่ๆ บรรจุอยู่ด้วย 3. วิธีบำบัดน้ำเสียที่ง่ายถูกและมีประสิทธิภาพมากขึ้น 4. มาตรฐานคุณภาพน้ำ (parameter) ที่ทันสมัยและน่าเชื่อถือ มากขึ้น 5. ลดเลิกการใช้สารเคมี (ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพคนและสิ่งแวดล้อม) เช่น สารเคมีภาคการเกษตร
5-10 ปี		1. การร่วมมือจากหลายภาคส่วนในการจัดการปัญหามลพิษภายในประเทศ ตั้งแต่ ภาคส่วนงานวิจัยไปจนถึงนโยบายระดับประเทศ (PS) 2. มีมาตรฐานเฉพาะสำหรับ indicator virus 3. กฎหมายสิ่งแวดล้อมที่เป็นที่พึ่งของประชาชนได้อย่างเป็นรูปธรรม 4. การเข้าถึงเครื่องมือวิเคราะห์โดยสะดวก มีมาตรฐาน 5. ค้นพบวิธีตรวจสอบที่ track source ของการปนเปื้อนได้อย่างแม่นยำ 6. ค้นพบวิธีที่รวดเร็ว ง่าย ที่คนธรรมดา (ไม่ใช่ในห้อง lab) สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ detection kit and rapid
มากกว่า 10 ปี		1. อยากรู้ให้คล่องใสมองเห็นตัวปลา

กิจกรรมที่ 3: – ต้นไม้ปัญหา เพื่อให้ทุกคนแสดงความคิดเห็นถึงปัญหา สาเหตุของปัญหา ผลกระทบของปัญหา และแนวทางในการแก้ไข

ต้นไม้ปัญหาที่ 1

สิ่งที่อยากให้เกิดขึ้น	ปัญหาหรือข้อจำกัดในปัจจุบัน	ผลกระทบหากไม่เกิด	แนวทางการแก้ไข
หลัก: พัฒนาพารามิเตอร์น้ำที่มีประสิทธิภาพ เสริม: 1. พัฒนาตัวชี้วัดที่ตรวจวัดง่ายและตอบโจทย์ของปัญหาแหล่งมลพิษทั้งทางชีวภาพและสารเคมี 2. มีระบบการตรวจวัดพารามิเตอร์ ที่บ่งชี้แหล่งมลพิษ 3. เชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างมลพิษและแหล่งปล่อยมลพิษได้อย่างแม่นยำ	1. พารามิเตอร์ในการตรวจวัดเพื่อเฝ้าระวัง ควรพัฒนาให้มีประสิทธิภาพและสามารถทำงานได้เอง 2. ไม่สามารถสืบหาแหล่งที่มาของมลพิษได้ 3. ไม่มีมาตรฐานน้ำทิ้งที่กำหนดสำหรับ non-point sources 4. พารามิเตอร์ที่ตรวจวัดในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุแหล่งหรือตรวจวัดยากเลย ไม่รู้ว่ามีมาจากแหล่งกำเนิดไหน 5. พารามิเตอร์ที่ใช้ในปัจจุบัน ยังไม่อัปเดตไปกับสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป 6. ในปัจจุบันมาตรฐานทางจุลชีววิทยาขึ้นอยู่กับ fecal coliform/ <i>E. coli</i> เท่านั้น แต่พฤติกรรมอาจไม่ตรงกับสปีชีส์อื่นๆ 7. ขาดแคลนบุคลากรและเครื่องมือ 8. พารามิเตอร์น้ำ/มลพิษมีการวิเคราะห์ยากและแพง 9. การนำไปใช้ให้เกิดภาพได้ชัดเจนอาจต้องเชื่อมโยงกับองค์ความรู้อื่นๆ เช่น นอกจากจะศึกษากับแหล่งที่มาของน้ำเสียแล้ว อาจนำไปเชื่อมโยงกับการศึกษาถึงการดื้อยาของเชื้อก่อโรค	1. ไม่ทราบแหล่งของมลพิษที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำ 2. เกิดการระบาดของโรคทางน้ำที่มาจากสปีชีส์อื่นๆ 3. ปัญหาจะยิ่งสะสมมากขึ้นและกระจายในวงกว้าง เมื่อขาดแหล่งน้ำที่สะอาด อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพ และ เศรษฐกรรรม 4. ไม่สามารถจัดการมลพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่ทราบแหล่งที่มาของมลพิษ 5. คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมลง เพราะขาดการตรวจวัด	1. แนวทางการเชื่อมโยงระหว่างมลพิษและแหล่งที่มาเพื่อจะได้จัดการได้ถูกจุด (โดยการวิจัย) 2. เพิ่มงานวิจัยศึกษาเปรียบเทียบกับ <i>E.coli</i> และจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สนใจ 3. เพิ่มบุคลากร/เครื่องมือ 4. เครือข่ายงานวิจัย

ต้นไม้ปัญหาที่ 2

สิ่งที่อยากให้เกิดขึ้น	ปัญหาหรือข้อจำกัดในปัจจุบัน	ผลกระทบหากไม่เกิด	แนวทางการแก้ไข
หลัก: พัฒนาระบบบำบัดน้ำที่มีประสิทธิภาพ เสริม: 1. อยากให้มีการกำจัดกลิ่นหรือสีของน้ำให้ดีขึ้น/ ระบบบำบัดดีแล้ว 2. มีระบบบำบัดที่ดีในชุมชน, ปศุสัตว์	1. ไม่มีงบประมาณในการก่อสร้างระบบบำบัดน้ำเสีย 2. มีแต่ระบบเก่าๆ ที่ไม่มีประสิทธิภาพ เชื้อไม่โต, pump พัง และน้ำไม่เข้าระบบ 3. ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ขนาดเล็ก ไม่มีระบบบำบัดน้ำเสียถูกต้อง 4. ปัญหาน้ำเสียที่อยู่ในสระรอบศูนย์ราชการแจ้งวัฒนะที่ยังไม่ดีพอ ยังส่งกลิ่นเหม็นเมื่อหน้าฝนหรือมีฝนตก/ ข้อจำกัดปัจจุบัน มีระบบบำบัดแต่ยังมีกลิ่นเหม็น 5. แหล่งชุมชน และปศุสัตว์ไม่ตระหนักในการบำบัดมลพิษ	1. น้ำเสีย ก่อโรค และมีผลต่อสุขภาพ 2. เกิดมลภาวะไม่ดี คนสูดกลิ่นเหม็นของน้ำ 3. ยังคงมีการปล่อยมลพิษสู่สิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตและชุมชน	1. ออกกฎหมายกระตุ้นให้เกิดระบบบำบัดน้ำเสียแบบติดกับที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น 2. เพิ่มการตรวจวัด ระบบบำบัด (เพิ่มงบประมาณ) 3. จัดทำมาตรฐานน้ำทิ้งและบทลงโทษที่ชัดเจนอย่างเป็นรูปธรรม 4. ใช้วิธีธรรมชาติ เช่น ปลูกตบขวช่วยดูดกลิ่น/ใช้ก้อนจุลินทรีย์ เพื่อพัฒนาน้ำให้ใส 5. เพิ่มงบ 6. การตรวจวัดแบบ Real-Time Monitoring 7. มีแผนการทำงานอย่างเป็นรูปธรรม

เนื้อหาส่วนที่ 2: การนำผลการวิจัยไปสู่นโยบายและ/หรือมาตรการที่เกี่ยวข้อง (หน่วยงานภาครัฐและรัฐวิสาหกิจ) ดำเนินรายการโดย ดร.ปิณิดา ลีลพนัง กำแพงทอง

กิจกรรมที่ 1 – การเชื่อมโยงเครือข่ายความรู้ความชำนาญของตัวแทนหน่วยงานแต่ละท่าน

นโยบายและแผน	ฝ่ายปฏิบัติงาน
1. อนามัยสิ่งแวดล้อม: - คุณเชิดศักดิ์ โกศลวัฒน์ 2. สร้างหลักสูตรฝึกอบรม: - คุณสุวรรณ สัศวรรณ	1. ควบคุมคุณภาพน้ำประปา: - คุณรัตนารักษ์ ธารวายุธรรม - คุณชัชพันธ์ นีวาสงษ์ 2. ควบคุมคุณภาพน้ำผิวดิน: - ดร.ประกิจ จันทร์ดี - คุณสังสรรค์ ทิพย์พ - คุณอังกูร บุญญะ 3. ควบคุมคุณภาพน้ำการเกษตร: - คุณคุณบุปผา อุ่นแสงจันทร์ 4. ควบคุมสารเคมี/สารตกค้างในสิ่งแวดล้อม: - ดร.ประกิจ จันทร์ดี - คุณปัทมา คุณเลิศ 5. พัฒนาชุมชน - คุณพชร พลายพิชิต 6. ส่งเสริมการเกษตร - คุณเอกราช บุญพร้อมรักษ์

กิจกรรมที่ 2: – ต้นไม้ปัญหา ในหัวข้อ “ทำไมปัจจุบันยังไม่มียุทธศาสตร์เกี่ยวกับ non-point source”

ต้นไม้ปัญหาที่ 1

ทำไมปัจจุบันยังไม่มียุทธศาสตร์เกี่ยวกับ non-point source	ปัญหาหรือข้อจำกัดในปัจจุบัน	ผลกระทบหากไม่เกิด	แนวทางการแก้ไข
1. เกษตรกรรู้และทราบผลกระทบแต่หลีกเลี่ยงไม่ได้ 2. ยังไม่มีหน่วยงานที่รับผิดชอบโดยตรง และยังไม่มียุทธศาสตร์ที่เป็นรูปธรรม 3. ภาคเกษตรและประชาชนปล่อยมลพิษมาก แต่มีส่วนร่วมในการบำบัดน้ำน้อย 4. ประชาชนยังขาดความสำนึกรับผิดชอบเรื่องของเสีย 5. คิดว่าควบคุมแหล่งกำเนิดไม่ได้ 6. ประชาชนระดับล่างขาดความรู้ ความเข้าใจและสำคัญวิธีในการบำบัดน้ำเสีย 7. เพราะไม่รู้ว่าจะไปควบคุมใครอย่างไร ทำให้ยังไม่ได้มีการทำนโยบายในการจัดการควบคุม 8. non-point source ภาคการเกษตรการกระจายไม่ได้เป็นระบบทำให้ไม่สามารถป้องกันและเฝ้าระวังได้ 9. เนื่องจากแหล่งที่มาของมลพิษไม่แน่นอน ทำให้การกำหนดหน่วยงานหรือไม่มีคนรับผิดชอบหลัก, ไม่ชัดเจนและยังเป็นเรื่องใหม่ของหลายคน 10. ผู้นำไม่มีวิสัยทัศน์มองว่าการจัดการมลพิษมีหลายหน่วยงานที่รับผิดชอบอยู่แล้ว 11. ปัจจุบันยังไม่มียุทธศาสตร์ เพราะไม่เห็น	1. หน่วยงานภาครัฐไม่ทำงานประสานกัน 2. ไม่สามารถบังคับจุดที่ทำให้เกิดปัญหาได้แน่นอน ดังนั้นจึงต้องใช้คนและงบประมาณสูงและอาจแก้ไขได้ไม่ตรงจุด 3. non point sources of pollution เป็นแหล่งที่สำคัญ แต่ยังไม่สามารถหา source ได้ 4. หน่วยงานที่รับผิดชอบในการจัดการยังไม่สามารถจัดหาระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชน (อปท.) ได้ครบ 5. ยังไม่ใช่ปัญหา ยังมองไม่เห็นชัดเจน 6. ประชาชนระดับล่าง ขาดทุนและความรู้ในการบำบัด 7. ความรู้ ความเข้าใจของหน่วยงานหลักที่จะกระจายความรู้แก่ประชาชน 8. ขาดงบประมาณในการสนับสนุนในการทำวิจัย 9. คนส่วนใหญ่ไม่ได้ให้ความสำคัญกับ non-point sources มากนัก คิดว่า low concentration และ dilute ง่าย 10. หา polluter ที่จะไปเจาะจงให้เคำจัดการมลพิษได้ยาก 11. ทำให้แหล่งน้ำเสื่อมโทรมและไหลลงทะเล 12. ภาคเกษตรและชุมชน ส่วนใหญ่ขาดการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยสู่ธรรมชาติ	1. สารพิษ-เชื้อโรคอยู่ในเลือดอยู่ในระดับที่ทำให้ป่วย 2. เชื้อโรคอยู่ในสัตว์น้ำที่คนกิน 3. เกิดผลกระทบต่อสุขภาพประชาชนในระยะยาว 4. ถ้าไม่มียุทธศาสตร์ non-point sources อาจไม่มีความรู้หรือความไม่เข้าใจของประชาชน และจะยังคงพบเจอมลพิษแบบ non-point sources คงอยู่เรื่อยๆ เมื่อไม่ได้รับการแก้ไข 5. ส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคและทำให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม 6. เล่นน้ำในคลองแม่น้ำคัน 7. น้ำประปาดื่มไม่ได้	1. ต้องมีตัวกลางในการประสานกับส่วนต่างๆ เพื่อออกนโยบาย 2. เพิ่มประสิทธิภาพในการประชาสัมพันธ์กับภาครัฐ 3. บังคับใช้กฎหมายอย่างเคร่งครัด 4. บูรณาการภาครัฐและภาคเอกชน 5. ส่งเสริมการบำบัด ณ แหล่งกำเนิด 6. ให้ความรู้และส่งเสริมการลด pollution prevention จาก sources ต่างๆ เช่น เกษตรและปศุสัตว์ 7. ส่งเสริมให้ประชาชนและหน่วยงานภาครัฐ รวมถึงภาคเอกชนให้เห็นและตระหนักถึงความสำคัญของการบำบัด non-point sources 8. ส่งเสริมในการเพิ่ม เนื้อหาวิชา (ถ้าเป็นไปได้) ให้มีการเรียนรู้ ทราบถึงปัญหาหรือความสำคัญ นำไปสู่การตระหนักและนำไปสู่การเกิด action ให้มีการกำหนดนโยบาย 9. การบวกค่าจัดการน้ำเสียกับบิลน้ำประปา 10. อปท. เข้มแข็ง 11. ควรเก็บค่าบำบัดน้ำเสียในน้ำประปาและถ้าเรามีระบบบำบัด

ทำไมปัจจุบันยังไม่มียุทธศาสตร์เกี่ยวกับ non-point source	ปัญหาหรือข้อจำกัดในปัจจุบัน	ผลกระทบหากไม่เกิด	แนวทางการแก้ไข
ประโยชน์ที่แท้จริง เช่น สุขภาพประชาชนดีขึ้น หรือลดค่าใช้จ่ายในการจัดการ 12. อปท. ไม่ให้ความสำคัญ 13. ยังไม่มีข้อกำหนด กำหนดมาบังคับ/ขาดการประชาสัมพันธ์ถึงผลกระทบที่จะเกิดในอนาคตกับมนุษย์ 14. นโยบายของแต่ละกระทรวงไม่สอดคล้องกันทำให้ยากต่อการกำหนด 15. กำหนดให้มีแต่ขาดการบังคับใช้จริงจัง 16. ผู้ที่ก่อให้เกิดมลพิษ (ทั้งภาคเกษตรและชุมชน) ไม่ต้องรับผิดชอบกับปัญหาที่เกิดขึ้น 17. การบังคับใช้กฎหมาย 18. ขาดมาตรฐานในการตรวจวัด 19. ขาดการบังคับใช้กฎหมาย	13. ปัจจุบันคุณภาพน้ำที่ต่ำลงส่งเสริมการเกิดปัญหาสาหร่าย เริ่มพบการ bloom ของสาหร่ายพิษ 14. ภาครัฐยังไม่เห็นความสำคัญและยังไม่เห็นประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรมเท่าที่ควร รวมถึงงบประมาณในการลงทุน 15. เกษตรกรเขาต้องการผลผลิต เราจะแก้ไขอย่างไร		

กิจกรรมที่ 3: – นโยบายและกฎหมายในอนาคตที่อยากให้เกิดขึ้นในอนาคต

นโยบาย	ต้นทาง	กลางทาง	ปลายทาง
1. Problem based policy ปัญหาเป็นตัวตั้งต้น 2. อาจมีการควบคุมการปล่อยของเสียทางการเกษตร ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติให้ครอบคลุมทั่วประเทศ 3. โครงสร้างงบประมาณการวิจัย, เครื่องมือ และประชาสัมพันธ์	1. การศึกษาให้ความรู้ตระหนัก 2. สนับสนุนรวมกลุ่มเกษตรกร 3. เข้มงวดกับมาตรการดีๆ ที่มีอยู่แล้ว 4. GMP สำหรับเกษตรกรกรม (การเปลี่ยนแปลงที่ดี) 5. มีการผลักดันให้เป็นเกษตรอินทรีย์ 6. พยายามหาแหล่งน้ำที่มั่นคงทางด้านปริมาณและคุณภาพ ถ้ายังไม่เจอก็พยายามต่อไป	1. เฝ้าระวังและติดตามปริมาณน้ำและคุณภาพน้ำเพื่อการวางแผนการผลิตน้ำ 2. งานวิจัยที่สามารถระบุ leaching rate และประเมินได้ว่า non-point loading ทั้งประเทศมีเท่าไร 3. งานวิจัย ROI ที่เข้าใจ SROI (social return on investment)	1. กปน. ต้องการน้ำดิบ (แหล่งน้ำธรรมชาติ) ที่มีคุณภาพดี เพื่อให้ได้น้ำประปาที่มีคุณภาพ ต้นทุนต่ำ 2. ช่องทางร้องเรียน (ประชาสังคมตื่นรู้) 3. ผลิตน้ำให้ได้จากแหล่งน้ำทุกประเภท 4. หน่วยงานท้องถิ่นพาชาวบ้านไปดูคนป่วยจากสารเคมีเพื่อสร้างความตระหนัก 5. เพิ่มเครือข่าย/ส่งเสริมรับผลผลิตจากฟาร์ม GAP

กิจกรรมที่ 4: – นโยบายและโครงสร้าง ความรับผิดชอบของหน่วยงานต่างๆ ต่อแหล่งกำเนิดมลพิษ non point sources ที่นำเสนอ

นโยบายที่เกี่ยวข้องในการจัดการมลพิษ Non-Point Source

ระดับนานาชาติ



เป้าหมายการพัฒนาที่ยั่งยืน เป้าหมายที่ 6 การจัดการน้ำและสุขาภิบาล
ภายในปี 2573 การทำให้มีน้ำดื่มที่ปลอดภัยและราคาเหมาะสม จำเป็นต้องมีการลงทุน
โครงสร้างพื้นฐานที่เหมาะสม โดยจัดให้มีสิ่งอำนวยความสะดวกด้านสุขอนามัยและส่งเสริม
สุขอนามัยในทุกระดับ ปกป้องและฟื้นฟูระบบนิเวศที่เกี่ยวข้องกับน้ำ เช่น ป่าไม้ ภูเขาและ
แม่น้ำ

ระดับประเทศ



ยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปี (2559 - 2579)

ยุทธศาสตร์ด้านการสร้างการเติบโตบน
คุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม :
- การจัดระบบอนุรักษ์ฟื้นฟูและป้องกัน
การทำลายทรัพยากรธรรมชาติ
- วางระบบบริหารจัดการน้ำ ให้มี
ประสิทธิภาพทั้ง ๒๕ ลุ่มน้ำ

แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคม

แห่งชาติ ฉบับที่ 12

ยุทธศาสตร์ที่ 4 การเติบโตที่เป็นมิตรกับ
สิ่งแวดล้อมเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน
- เร่งแก้ไขปัญหาน้ำเสียจากชุมชนและ
อุตสาหกรรม
- สนับสนุนการปรับเปลี่ยนกระบวนการ
ผลิตทางการเกษตรที่เป็นมิตรกับ
สิ่งแวดล้อม

ด้านสิ่งแวดล้อมและสุขอนามัย



ยุทธศาสตร์การจัดการมลพิษ 20 ปี
(2559 - 2579)

ยุทธศาสตร์ที่ 1 การป้องกันและลดการเกิดมลพิษ
ที่ต้นทาง
ยุทธศาสตร์ที่ 2 เพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัด
กำจัดของเสียและควบคุมมลพิษจากแหล่งกำเนิด

ยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปี
(2559 - 2579)

ด้านสาธารณสุข

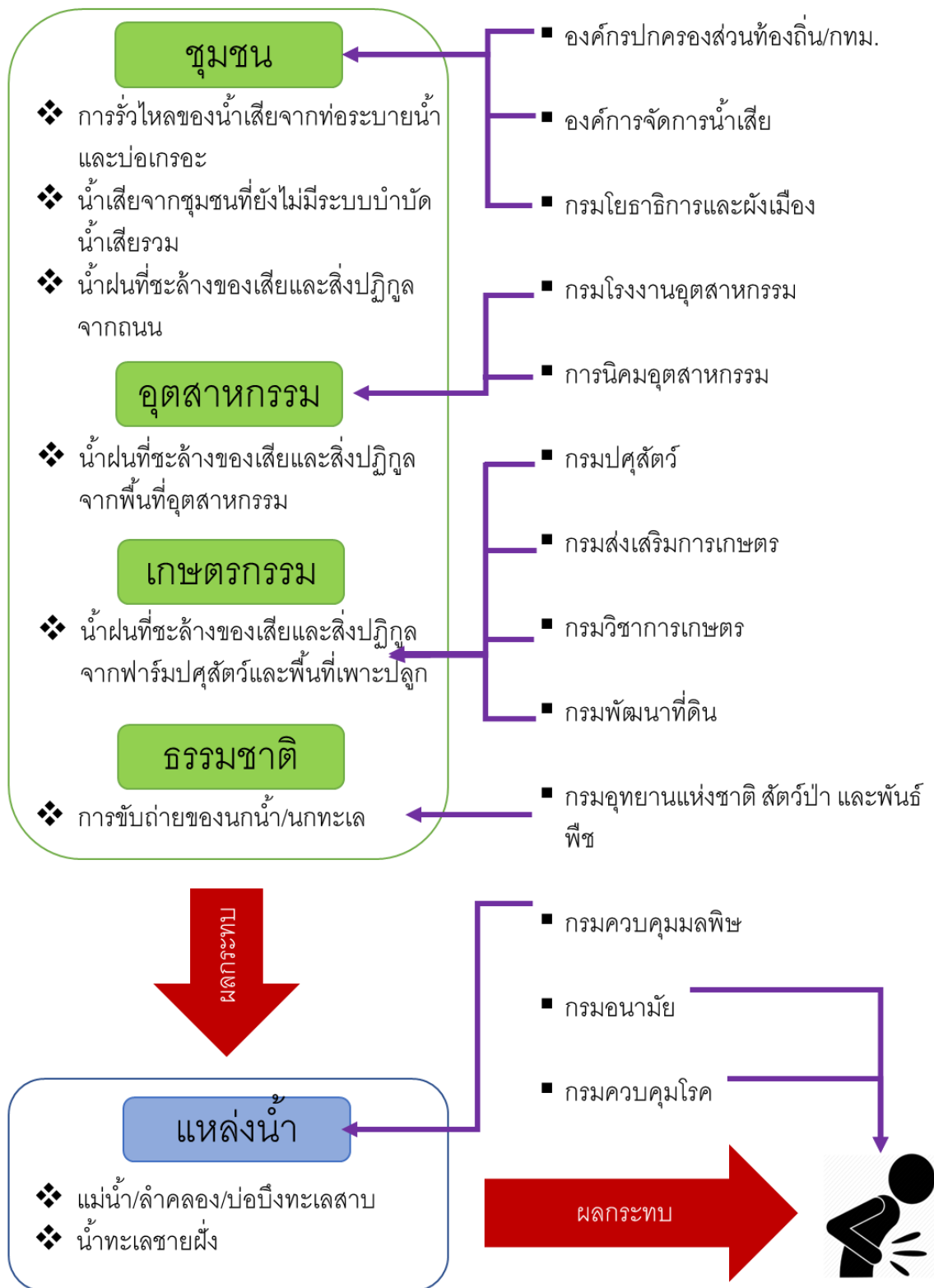
- ความปลอดภัยด้านอาหารและลด
ปัจจัยเสี่ยงต่อโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง
- การบริหารจัดการสิ่งแวดล้อม



แผนจัดการมลพิษ (2560 - 2565)

ยุทธศาสตร์ที่ 2 การจัดการคุณภาพสิ่งแวดล้อมที่ดีได้รับการป้องกัน บำบัด และ
ฟื้นฟู
- ติดตามและเฝ้าระวังสถานการณ์มลพิษในพื้นที่วิกฤต และฟื้นฟูอย่างเป็นรูปธรรม

แหล่งกำเนิดมลพิษ Non-Point Source และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง



7. ประมวลผลแบบสอบถามความคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

7.1 ข้อมูลผู้ตอบแบบสอบถาม

จากแบบสอบถามความคิดเห็นงานเสวนาพบว่า มีหน่วยงานภาครัฐที่เข้าร่วม 13 คน และภาคการศึกษาจำนวน 12 คน แบ่งเป็นเพศชาย 11 คน และเพศหญิง 12 คน ซึ่งจากผู้เข้าร่วมงานเสวนาในครั้งนี้มีอายุน้อยกว่า 35 ปี จำนวน 8 คน อายุที่อยู่ในช่วง 36-40 ปี จำนวน 6 คน อายุที่อยู่ในช่วง 40-45 ปี จำนวน 4 คน อายุที่อยู่ในช่วง 45-50 ปี จำนวน 3 คน และอายุ 50 ปีขึ้นไปจำนวน 3 คน โดยจบการศึกษาปริญญาปีจำนวน 2 คน และมีผู้ที่จบการศึกษาสูงกว่าปริญญาตรีจำนวน 22 คน

7.2 ความคิดเห็นต่อการจัดงาน

7.2.1 ภาครัฐ

ความคิดเห็นต่อการจัดงาน	เฉลี่ย
ด้านกระบวนการถ่ายทอดความรู้	
1. การถ่ายทอดความรู้มีความชัดเจน	3.8
2. การสร้างบรรยากาศในการประชุม/อบรม/สัมมนา	3.7
3. เปิดโอกาสให้ผู้เข้าร่วมประชุม/อบรม/สัมมนาแสดงความคิดเห็น	4.1
5. การใช้เวลาตามที่กำหนดไว้	3.5
ประโยชน์ที่ได้รับจากหัวข้อต่อไปนี้	
1. บรรยาย หัวข้อ “มลพิษ non-point sources: ความท้าทายจากอดีตถึงปัจจุบัน”	3.8
2. เสวนา หัวข้อ “ความสำเร็จและโอกาสในการจัดการมลพิษยุค Thailand 4.0”	3.6
3. บรรยาย หัวข้อ “นวัตกรรมการระบุแหล่งปล่อยมลพิษ ด้วย Microbial Source Tracking (MST)”	3.8
4. อภิปรายและระดมสมอง หัวข้อ “ก้าวต่อไป...เพื่อต่อยอดงานวิจัยและนำไปสู่นโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำ”	3.8
ด้านสถานที่ / ระยะเวลา / อาหาร/ เจ้าหน้าที่ผู้จัดประชุม	
1. สถานที่และสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสม	3.8
2. ความพร้อมของอุปกรณ์โสตทัศนูปกรณ์ต่างๆ	3.6
3. ระยะเวลาในการอบรมมีความเหมาะสม	3.3
4. อาหาร และเครื่องดื่มต่างๆ มีความเหมาะสม	3.8
5. การบริการ/การอำนวยความสะดวกของเจ้าหน้าที่	3.8
6. ความรวดเร็วในการให้บริการของเจ้าหน้าที่	3.8

7.2.1 เอกชน

ความคิดเห็นต่อการจัดงาน	เฉลี่ย
ด้านกระบวนการถ่ายทอดความรู้ 1. การถ่ายทอดความรู้มีความชัดเจน 3.8 2. การสร้างบรรยากาศในการประชุม/อบรม/สัมมนา 3.7 3. เปิดโอกาสให้ผู้เข้าร่วมประชุม/อบรม/สัมมนาแสดงความคิดเห็น 3.8 5. การใช้เวลาตามที่กำหนดไว้ 2.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากหัวข้อต่อไปนี้ 1. บรรยาย หัวข้อ “มลพิษ non-point sources: ความท้าทายจากอดีตถึงปัจจุบัน” 3.7 2. เสวนา หัวข้อ “ความสำเร็จและโอกาสในการจัดการมลพิษยุค Thailand 4.0” 3.9 3. บรรยาย หัวข้อ “นวัตกรรมการระบุแหล่งปล่อยมลพิษ ด้วย Microbial Source Tracking (MST)” 3.8 4. อภิปรายและระดมสมอง หัวข้อ “ก้าวต่อไป...เพื่อต่อยอดงานวิจัยและนำไปสู่นโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำ” 3.6 ด้านสถานที่ / ระยะเวลา / อาหาร/ เจ้าหน้าที่ผู้จัดประชุม 1. สถานที่และสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสม 3.8 2. ความพร้อมของอุปกรณ์โสตทัศนูปกรณ์ต่างๆ 3.8 3. ระยะเวลาในการอบรมมีความเหมาะสม 3.4 4. อาหาร และเครื่องดื่มต่างๆ มีความเหมาะสม 3.8 5. การบริการ/การอำนวยความสะดวกของเจ้าหน้าที่ 3.7 6. ความรวดเร็วในการให้บริการของเจ้าหน้าที่ 3.7	

7.3 ความคิดเห็นต่อการจัดการมลพิษ non-point sources

1. ท่านเห็นความท้าทายของประเทศไทยในการจัดการมลพิษ non-point sources อะไรบ้าง	1.1. ความท้าทายของไทยเนื่องจาก วิธีตรวจวัด MST ของไทยนั้นยังใหม่มาก จึงทำให้หน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้องอาจเข้ามาใช้ผลลัพธ์ของงานวิจัยเป็นไปได้ยาก 1.2. ปัญหายากมาก 1.3. เป็นปัญหาใหญ่ในระดับหนึ่งเพราะว่าไม่รู้มาจากไหน จึงทำให้การจัดการยากมากขึ้น 1.4. ความใหม่ของแต่ละคนทำให้การจัดการอาจจะยากสำหรับประเทศไทย 1.5. ประเทศไทยควรจัดการ non point source เพราะเป็นพื้นที่ใหญ่และกระจายกระจาย และประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม non point source จะมากมายเกี่ยวข้องกับเกษตรกรซึ่งคิดถึงเรื่องปากท้อง ความเป็นอยู่มากกว่าสิ่งแวดล้อม 1.6. เป็นเรื่องท้าทายเพราะ non point source คนอาจจะไม่ตระหนักว่ามีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม 1.7. ไม่มีหน่วยงานที่รับผิดชอบ นโยบายไม่ชัดเจนของแต่ละกระทรวง 1.8. การรับรู้ของประชาชน 1.9. การจัดการขยะ น้ำเสีย จากชุมชน (บ่อขยะ), การจัดการ
---	---

	ฟาร์ม น้ำขนาดใหญ่ กลาง เล็ก ให้ได้มาตรฐาน, การใช้สารเคมี ปุ๋ย ในการจัดการภาคเกษตรกรรม 1.10. การหาสาเหตุที่ก่อเกิด non point sources เพื่อแก้ปัญหาได้ตรงจุด การจัดการการใช้พื้นที่ในประเทศไทยยังไม่ดีนัก เช่นยังมีการเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจ ในบริเวณที่อยู่อาศัย ดังนั้นการจัดการมลพิษจึงทำให้ยากมากขึ้น 1.11. เป็นเรื่องที่มีความสำคัญและท้าทายเป็นอย่างมาก 1.12. ท้าทายในการจัดการปัญหาอย่างบูรณาการ 1.13. การจัดการมลพิษ non point sources มีความยุ่งยากในการบริหารจัดการ แต่ก็ควรมีการบริหารจัดการแบบเดียวกันหรือคล้ายคลึงกับ point sources เพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหามลพิษ และส่งเสริมให้คุณภาพสิ่งแวดล้อมดีขึ้น 1.14. มีความท้าทายมากมายที่จะจัดการมลพิษ non-point sources ซึ่งเป็นโอกาสในการพัฒนาคุณภาพชีวิตของมนุษย์และความปลอดภัย 1.15. มีเทคโนโลยีในการวัดแบบใหม่ 1.16. ควรต้องมีมาตรการทางกฎหมายและเทคโนโลยีที่สามารถนำไปใช้ได้กับกลุ่ม non point sources เช่น ระบบบำบัดแบบ on-site treatment 1.17. ชุมชนเป็นประเด็นหลักควรร่วมมือ จิตสำนึก การจัดการด้านสิ่งแวดล้อม 1.18. ชุมชนควรมีจิตสำนึกรักษาสิ่งแวดล้อม ความร่วมมือแบบบูรณาการ
2. ท่านมีข้อเสนอแนะในการจัดการปัญหามลพิษ non-point sources อย่างไร	2.1 เสนอพิจารณา ให้ทีมวิจัยสามารถนำผลจากการตรวจวัดมาเปรียบเทียบหรือกำหนดมาตรฐาน ที่สามารถบ่งบอกระดับความรุนแรง และเสนอเป็นนโยบายการบริหารจัดการความเสี่ยงด้านน้ำหรือสุขภาพ 2.2 ทำการวิจัยต่อไป 2.3 MST เป็นวิธีการที่น่าสนใจเพราะมีความแม่นยำในระดับหนึ่ง 2.4 ขึ้นกับการประชาสัมพันธ์ทางภาครัฐและเอกชนร่วมมือ และการให้ความรู้กับทุกส่วนว่า non point sources คืออะไร มาจากไหน 2.5 จัดการในเชิงพื้นที่ เนื่องจากแต่ละพื้นที่มี non point sources ไม่เหมือนกัน ต้องมีข้อมูลการตรวจสอบมลพิษจาก non point sources 2.6 ควรออกค่ามาตรฐาน ให้ความรู้ประชาชน เกษตรกรรม มลพิษ เห็นโทษต่อสิ่งแวดล้อม 2.7 จัดนโยบายของแต่ละกระทรวงให้สอดคล้องกันหรือออกกฎหมาย 2.8 มาตรการการเฝ้าระวังที่เป็นรูปธรรม การมีส่วนร่วมของประชาชน 2.9 ควรบูรณาการทุกภาคส่วนในการจัดการปัญหาน้ำ point sources และ non point sources ที่เป็น ปัญหา ของ

	ประเทศไทยในปัจจุบัน 2.10 หาสาเหตุของปัญหาที่เกิดขึ้น เพื่อสามารถแก้ไขปัญหาได้ถูกต้อง มีการร่วมมือกันทั้งทางภาครัฐและเอกชนเพื่อให้เกิดการแก้ปัญหาที่จริงจัง 2.11 การกำหนดกฎหมายที่ชัดเจนและเคร่งครัด 2.12 ส่งเสริมการมีส่วนร่วมในการลด ละเลิก การใช้สารเคมี และปุ๋ยเคมีในภาคการเกษตร รวมทั้งลดการระบายมลพิษด้วย 2.13 บริหารบุคลากร ทุกภาคส่วนให้สร้างเป็นวัฒนธรรม 2.14 อยากรให้เชื่อมโยง stakeholder ในหลายภาคส่วนในการทำงาน 2.15 ทำวิจัยพัฒนา on site treatment และเทคโนโลยีต่างๆ นำไปใช้กับกลุ่ม non point sources 2.16 เริ่มจากการปลูกฝัง เปลี่ยน mindset ของชุมชน ให้ตระหนักถึงปัญหา (ทำในพื้นที่ต้นแบบก่อน) 2.17 ลดการใช้สารเคมีโดยเด็ดขาด การปลูกข้าวใช้ปุ๋ยอินทรีย์ การปลูกผักใช้วิธีธรรมชาติ ปลอดภัย
3. ท่านคิดว่า MST มีความพร้อมในการใช้งานอยู่ในระดับใด หรือศักยภาพในการใช้งาน	3.1 ระดับวิชาการ วิธี MST มีความพร้อมและศักยภาพสูงมาก แต่ข้อกังวลคือหน่วยงานภาครัฐ จะนำเอาวิธี MST หรือผลงานวิจัยไปใช้ได้อย่างไร 3.2 อยู่ในระดับที่ดี 3.3 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัย 3.4 เนื่องจากยังเป็นช่วงเริ่มต้น MST ยังคงต้องมีการทำวิจัยในพื้นที่จริงอีกระดับหนึ่ง 3.5 ราคาการวิเคราะห์ ยังคงแพงควรจะน้อยกว่า 1000 บาทต่อตัวอย่าง 3.6 เริ่มต้น 3.7 MST ยังใช้งานได้ไม่ทั่วถึงทุกด้าน แต่มีประโยชน์เป็นอย่างมากสำหรับการระบุจุดที่มีปัญหา ดังนั้นควรพัฒนาให้มีศักยภาพมากขึ้น 3.8 พร้อมในระดับหนึ่งในทางทฤษฎี แต่ยากในทางปฏิบัติถ้ากฎหมายหรือนโยบายยังไม่ชัดเจน 3.9 มีความพร้อมแบบจำเพาะ เจาะจงเฉพาะหน่วยงาน 3.10 มีความพร้อมระดับเริ่มต้นถึงปานกลาง ควรต่อยอดต่อไป 3.11 มีความพร้อมพอสมควร 3.12 งาน MST ยังเป็นงานเฉพาะด้าน เฉพาะกลุ่ม อย่างไรก็ตามนับว่าเป็นประโยชน์อย่างมาก ต่อการนำไปใช้จำแนกแหล่งกำเนิดน้ำเสีย 3.13 โอกาสในการพัฒนาต่อยอดต่อไป 3.14 ในห้องปฏิบัติการ มีความพร้อมใช้มาก แต่ในส่วนท้องถิ่นยังมีความยาก ต้องอาศัยความชำนาญของบุคลากรมากกว่านี้ 3.15 ยังต้องศึกษาเพิ่มเติม

	3.16 อยู่ในระดับที่เป็นไปได้และเหมาะกับการใช้ในการสืบสวนสอบสวนหาแหล่งกำเนิดมลพิษ 3.17 ไม่มีความเชี่ยวชาญ ไม่สามารถตอบได้ในระดับหนึ่ง
4. ท่านมีข้อเสนอแนะอย่างไรในการพัฒนาให้ MST นำไปสู่การใช้งานได้จริง	4.1 การนำไปใช้จริงอาจยังไม่ค่อยเห็นภาพชัดเจนนัก เพราะการวัดด้วยวิธี MST ยังไม่สามารถบ่งบอกความรุนแรง หรือระดับการปนเปื้อนได้ ดังนั้นทีมวิจัยอาจจะสรุปหรือ ระดับการปนเปื้อนได้ ดังนั้นทีมวิจัยอาจจะสรุปหรือแนวทางการพัฒนาให้เป็นคู่มือเหมือนนโยบาย brief ให้หน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้อง นำไปใช้หรือปฏิบัติตาม 4.2 พัฒนาเทคนิคให้ง่ายขึ้น 4.3 ทำวิจัยเพิ่มเติมโดยการใช้ MST และเมื่อรู้แหล่งกำเนิดก็ไปจัดการและแสดงให้เห็น ถึงผลลัพธ์ (คุณภาพน้ำดีขึ้น) 4.4 พัฒนา MST ให้ใช้งานได้สะดวก ราคาไม่แพง บ่งชี้แหล่งกำเนิดได้ชัด 4.5 เชื่อมโยงกับฝ่ายนโยบายนำไปใช้ 4.6 ในอนาคตควรพัฒนา MST ให้ใช้ได้หลากหลายเช่น ด้านแบคทีเรีย ด้านสารพิษ ด้านโลหะหนัก 4.7 การศึกษา 4.8 การระบุแหล่งที่มา ให้ได้จริง หรือแน่ชัดว่าเกิดจากฟาร์มใด โรงงานใด ชุมชนใด จะได้ใช้มาตรการทางกฎหมายดำเนินการต่อไป 4.9 นำไปประยุกต์ ใช้ในหลายๆพื้นที่ เพื่อทดสอบความแม่นยำและใช้งานจริง 4.10 นำไปสร้างความน่าเชื่อถือให้ประชาชน เพื่อให้ประชาชนสามารถแน่ใจในผลการตรวจวัดที่ออกมา 4.11 เผยแพร่ประชาสัมพันธ์ การใช้ MST ต่อสาธารณชน และผลักดันให้เป็นค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งที่ผิวดิน แหล่งน้ำทะเล แหล่งกำเนิดมลพิษ 4.12 ลงพื้นที่และดูเรื่อง cost affection 4.13 พัฒนาให้วิธีการง่าย ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง เช่น test kit 4.14 พัฒนาเทคนิค และพัฒนาเครื่องมือให้ได้ได้อย่างกว้างขวาง 4.15 ไม่มีข้อเสนอแนะ
5. โปรดระบุความเชี่ยวชาญของท่าน เพื่อการผลักดัน MST สู่งานใช้ประโยชน์จริง	5.1 Envi management 5.2 การควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในน้ำ และ health related water microbiology 5.3 การจัดการน้ำเสียจากภาคเกษตร ปศุสัตว์และนาข้าว 5.4 วิเคราะห์และวิจัยการแก้ปัญหาด้านคุณภาพน้ำ ทางแบคทีเรีย สามารถนำมาระบุแหล่งกำเนิดแบคทีเรียได้ 5.5 ตรวจวัดคุณภาพน้ำทางด้านจุลชีววิทยา 5.6 การผลิตและการทดสอบไวรัส แบคทีเรีย รวมทั้งการกำจัดของเสียจากกระบวนการผลิต

	5.7 มีความเชี่ยวชาญน้อยเนื่องจากไม่เคยใช้นวัตกรรมนี้ 5.8 ในการปฏิบัติที่มีความเกี่ยวข้องต่อการนำ MST ไปใช้ หากเป็นมาตรฐานนำไปใช้ในการติดตามการตรวจสอบคุณภาพสิ่งแวดล้อม การระบายมลพิษ 5.9 Bacteriology identification and virulence in pathogen 5.10 Environment microbiology 5.11 การตรวจงานด้านกลุ่ม Bacterial indicator 5.12 การสร้างการมีส่วนร่วม สนับสนุนการมีสุขภาพที่ดี 5.13 ไม่มีความเชี่ยวชาญในเรื่อง MST จึงไม่สามารถระบุและผลักดันได้
--	--

ภาคผนวก ฅ1. รายชื่อผู้เข้าร่วมงานเสวนาฯ และอีเมลติดต่อ

รายชื่อทีมงานและวิทยากร ที่เข้าร่วมงานเสวนา โครงการ "Thailand 4.0 กับนวัตกรรมการจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources"

ที่	ชื่อ - นามสกุล	หน่วยงาน	E-mail
1	คุณกฤตยพงษ์ จันทระเดช	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	aom_krit@hotmail.com
2	คุณกฤษกร สานอินจักร	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล	Krisakorn@cri.or.th
3	คุณกุลพล คุปรัตน์	นักวิชาการอิสระ	kkuparat@gmail.com
4	ดร.ขวัญวีร์ สิริกาญจน	ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์	kwanrawee@cri.or.th
5	ศ.ดร.จรงค์ ผลประเสริฐ	ภาควิชาวิศวกรรมโยธา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	pchongrak@gmail.com
6	รศ.ดร.ชนาธิป ผาริโน	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายสวัสดิภาพสาธารณะ	chanathipp@gmail.com
7	คุณณัฐชา ไร่โรจน์	ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์	natcha@cri.or.th
8	คุณณิกานต์ พุทธิภูมิ	ภาควิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	Nichakarn63@gmail.com
9	นพ.दनัย ธีวันดา	กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข	danaidoh07@gmail.com
10	ดร.ปิณิดา ลีลพนัง กำแพงทอง	ส่วนแหล่งน้ำจัด สำนักงานจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ	pinida.l@pcd.go.th
11	คุณพรจิรา สมนาค	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพประยุกต์ สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์	pornjira.somnark@gmail.com
12	ดร.พรศรี สุทธนารักษ์	สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ	Pornsri.s@pcd.go.th
13	รศ.ดร.พิสุทธิ เพียรมนกุล	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	pisut114@hotmail.com
14	ศ.ดร.ศกรณ์ มงคลสุข	ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์	skorn@cri.or.th
15	ดร.สมสิทธิ์ มูลสถาน	สถาบันน้ำและสิ่งแวดล้อมเพื่อความยั่งยืน สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย	somsittherm@hotmail.com
16	คุณเอกชัย คงประจักษ์	ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์	akechai@cri.or.th
17	คุณอานนท์ จรรย์นเรศเรษฐ์	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย	Daew44809@gmail.com

รายชื่อผู้แทนภาคการศึกษา/วิจัย(อาจารย์) ที่เข้าร่วมงานเสวนา โครงการ "Thailand 4.0 กับนวัตกรรมการจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources"

ที่	ชื่อ - นามสกุล	หน่วยงาน	E-mail
1	ผศ.ดร.กำพล นันทพงษ์	คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	kampol.n@fph.tu.ac.th
2	ดร.ดวงสิทธิ์ เด่นเพชรกุล	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมและการจัดการภัยพิบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี	thuangsit.den@mahidol.edu
3	รศ.ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี	คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	benjaphorn.pra@mahidol.ac.th
4	ดร.ปิยธิดา เรืองรัมย์	ภาควิชาวิศวกรรมแหล่งน้ำ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	piyatida.h@chula.ac.th
5	รศ.ดร.พงศ์ศักดิ์ หนูพันธ์	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	fengpsn@ku.ac.th
6	อ.ดร.พรพรรณ สอนเชื้อ	สถานวิทยาศาสตร์รีคลินิก สาขาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	p.sornchuer@gmail.com
7	ผศ.ดร.รุจิภาณุจน์ นาสนิท	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรมมหาวิทยาลัยศิลปากร	masanit@gmail.com
8	ดร.วิลาสินี อยู่ซั่วล	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	wilasinee.y@gmail.com
9	ดร.สุภัทรา วิเศษศรี	ภาควิชาวิศวกรรมแหล่งน้ำ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	Supattra.vi@chula.ac.th
10	ดร.สุรพงษ์ รัตนกุล	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	surapong.rat@kmutt.ac.th
11	รศ.ดร.สุวรรณา บุญตานนท์	ภาควิชาวิศวกรรมโยธาและสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	suwanna.boo@mahidol.ac.th
12	ผศ.สุวรรณี จุฑามณีพงษ์	คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	juthamaneepong@gmail.com
13	ดร.อดิศักดิ์ ร่มแสง	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	adisak.rom@mahidol.ac.th
14	ผศ.ดร.อัจฉรา อัครจุฑิลชัย	คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	achara.uss@mahidol.ac.th
15	รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส	สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	uraiwani@buu.ac.th
16	รศ.ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	Ekawan.L@chula.ac.th

รายชื่อผู้แทนหน่วยงาน ที่เข้าร่วมงานเสวนา โครงการ "Thailand 4.0 กับนวัตกรรมจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources"

ที่	ชื่อ - นามสกุล	หน่วยงาน	E-mail
1	คุณกาญจน์ แสงสุกดี	สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 5	Sangsukdee_g@hotmail.com
2	คุณจรัส เทพอวยพร	สำนักงานทรัพยากรน้ำแห่งชาติ	Charanonep@hotmail.com
3	คุณจารุวรรณ โลไธสง	กรมอนามัย	Jaruwan.l@anamai.mail.go.th
4	คุณชัชชนันท์ นิवासวงษ์	การประปาส่วนภูมิภาค	Chatchanunn@pwa.co.th
5	คุณเชิดศักดิ์ โกศลวัฒน์	กรมอนามัย	chirdsak.k@anamai.mail.go.th
6	น.สพ.ไชยา ส่งาประโคน	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์	Chaiyas@dld.go.th
7	คุณธงชัย มหัจฉริยวงศ์	องค์การจัดการน้ำเสีย	Thongchai.m@wma.mail.go.th
8	คุณนรี ทรัพย์เจริญ	สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์	Air_sapc@hotmail.com
9	คุณบุปผา อุ่นแสงจันทร์	สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ	
10	คุณบุสดี เอี่ยมสวัสดิ์	สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 5	
11	นางสาวปภัสรา คุณเลิศ	กรมวิชาการเกษตร	Daeng_khu29@hotmail.co.th
12	ดร.ประกิจ จันทร์ดี	กรมวิชาการเกษตร	Prakit.c@doa.in.th
13	คุณปริยณิตย์ ใหม่เจริญศรี	สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย	preyanit.m@anamai.mail.go.th
14	พญ.รชนีกร วีระเจริญ	สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค	Rachaneekorn.occmcd@gmail.com
15	คุณรัตนารณณ์ ถาวรยุติธรรม	การประปาส่วนภูมิภาค	Rattanapornt@pwa.co.th

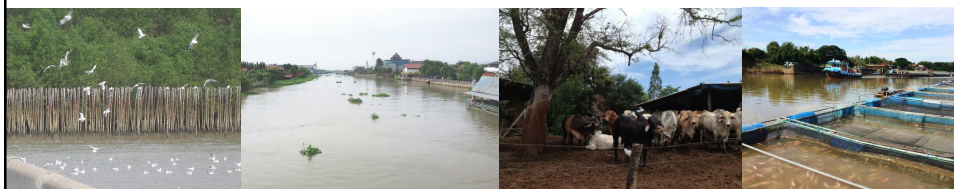
รายชื่อผู้แทนหน่วยงาน ที่เข้าร่วมงานเสวนา โครงการ "Thailand 4.0 กับนวัตกรรมการจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources"

ที่	ชื่อ - นามสกุล	หน่วยงาน	E-mail
16	คุณสุชัย เจนพจนารถ	องค์การจัดการน้ำเสีย	Suchai.j@wma.mail.go.th
17	คุณสุดา อิทธิสุภรณ์รัตน์	กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม	Suwimolteam@yahoo.com
18	คุณสุนันท์ นาคกร	สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค	Sunan_nark@hotmail.com
19	นายพชร พลายพิชิต	กรมการพัฒนาชุมชน	Palmcc38n@gmail.com
20	คุณสุวรรณ สัตววรรณ	กรมการพัฒนาชุมชน	
21	คุณอังกร บุญญะ	ส่วนแหล่งน้ำตะวันออก ฝ่ายคุณภาพน้ำ การประปานครหลวง	Tojotg@hotmail.com
22	นายเอกราช บุญล้อมรักษ์	กรมส่งเสริมการเกษตร	Lang_one@hotmail.com
23	นายสังสรรค์ ที่ปโยบล	การประปานครหลวง	sangsanteep59@gmail.com

ภาคผนวก ฅ2. เอกสารนำเสนอที่ 1
“มลพิษ non-point sources: ความท้าทายจากอดีตถึงปัจจุบัน”โดย ดร.ขวัญรวิ สิริกาญจน นักวิจัยชำนาญการ
สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ หัวหน้าโครงการ

มลพิษ non-point sources: ความท้าทายจากอดีตถึงปัจจุบัน

ดร. ขวัญวีร์ สิริกาญจน
ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์



Thailand 4.0 กับนวัตกรรมจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ *non-point sources*

วันพุธที่ 25 กรกฎาคม 2561

City of Avalon, Catalina Island, California



ปัญหาค่าแบคทีเรียเกินมาตรฐาน



ชายหาด **Avalon** เป็นชายหาดที่มีค่าแบคทีเรียเกินมาตรฐานสูงที่สุดในรัฐแคลิฟอร์เนีย โดยในปี 2010 มีจำนวนวัน 42-83 วันที่ถูกประกาศให้ปิดชายหาด (ค่าระดับแบคทีเรียสูงมาก) หรือแค่ประกาศเตือน (ค่าแบคทีเรียสูงปานกลาง)

3

สาเหตุที่แบคทีเรียเกินมาตรฐาน



- ตัวอย่างน้ำมีการตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อที่มาจากนกทะเลถึง 63% ของตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ ในขณะที่พบการปนเปื้อนจากคน เพียง 2% (Schriewer et al. 2010; Boehm et al. 2003)

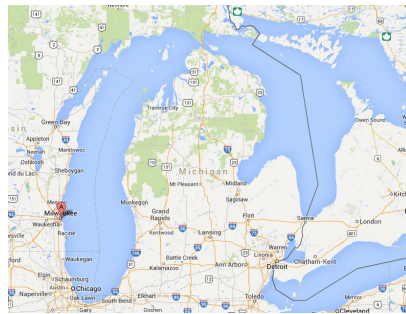
- สภาพที่รวบรวมน้ำเสียได้ดินที่ร่วนซุย เนื่องจากถูกกัดกร่อนด้วยน้ำทะเลที่ใช้ในส้วม เนื่องจากน้ำจืดมีจำกัด



- พบการเกิดภาวะน้ำใต้ดินตื้นทราย (submarine groundwater discharge) ซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการป่วยของผู้สัมผัสน้ำและกลิ่นน้ำทะเลในช่วงเวลานั้น (Yau et al. 2014)

4

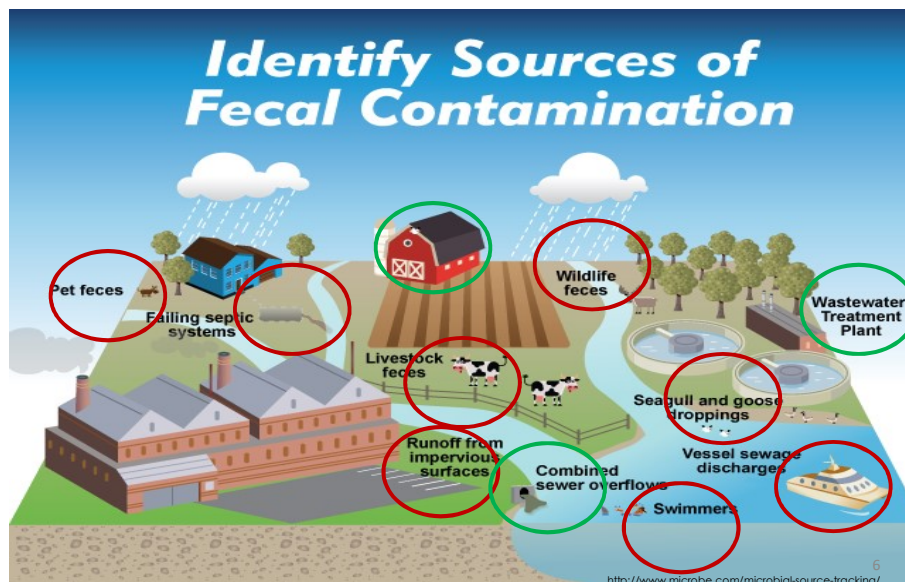
1993 *Cryptosporidium* outbreak in Milwaukee, USA



- เหตุการณ์โรคระบาดจากน้ำที่ปนเปื้อน ที่ใหญ่ที่สุดในสหรัฐอเมริกา (104 รายเสียชีวิต/ 403,000 รายเจ็บป่วย)
- เกิดจากการปนเปื้อนของมูลวัวที่ปนเปื้อนลงทะเลสาบมิชิแกน แหล่งน้ำดิบของโรงประปา
- เหตุการณ์นี้ เป็นที่มาของการกำหนดให้ใช้ ยูวีเป็นกระบวนการฆ่าเชื้อโรคในการผลิตน้ำประปา ในสหรัฐอเมริกา

Point Sources

Non-Point Sources



Point sources

- จุดปล่อยน้ำเสียจากฟาร์มปศุสัตว์
- น้ำล้นจากอาคารดักน้ำเสีย (เป็นน้ำเสียที่ถูกเจือจางกับน้ำฝน)
- จุดปล่อยน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วจากโรงบำบัดน้ำเสีย (หากการบำบัดไม่มีประสิทธิภาพ)

Non-point sources

- ท่อรวบรวมน้ำเสียใต้ดินเกิดการรั่ว
- บ่อเกรอะ
- น้ำท่า (น้ำฝน) ที่พัดพาสิ่งปฏิกูลจาก
 - พื้นที่โล่งเลี้ยงสัตว์
 - พื้นที่เมือง
 - สัตว์เลี้ยงนอกบ้าน เช่น สุนัข แมว
 - พื้นที่สัตว์ป่า
- นกทะเล นกน้ำ
- เรือโดยสาร
- น้ำขุ่นน้ำ

National Nonpoint Source Program ในสหรัฐอเมริกา



National Nonpoint Source Program

— a catalyst for water quality improvements

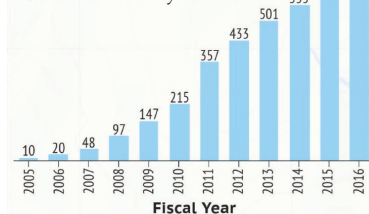


US EPA 2016

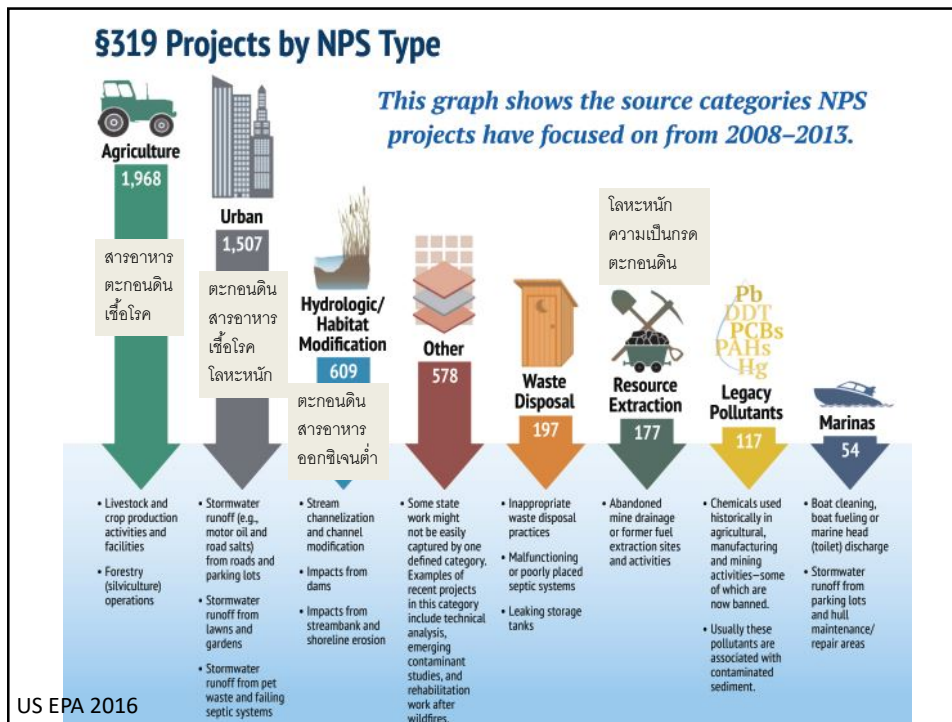
- 85 เปอร์เซ็นต์ของแม่น้ำ และ 80 เปอร์เซ็นต์ของทะเลสาบ ได้รับการปนเปื้อนจากมลพิษ **non-point sources**
- ตั้งแต่ปี 2005 โครงการได้ประสบความสำเร็จในการฟื้นฟูลำธารรวมกว่า 6,000 ไมล์ และทะเลสาบเป็นพื้นที่กว่า 164,000 เอเคอร์ (664 ตร.กม.)

NPS Success Stories

Number of Waterways Restored



Source: NPS Success Stories web site: www.epa.gov/nps/success



ตัวอย่างพื้นที่ที่ประสบความสำเร็จในการฟื้นฟูคุณภาพน้ำ

พื้นที่	ปัญหา	วิธีแก้ไข
Crowdabout Creek, Alabama	DO ต่ำกว่ามาตรฐาน, สารอินทรีย์สูง, ธาตุอาหารสูง จากพื้นที่การเกษตร	ป่าชายน้ำ (Riparian Buffer) กันชนระหว่างพื้นที่เกษตรกับแหล่งน้ำ
Whiskeytown, California	ค่าแบคทีเรีย fecal coliforms เกินมาตรฐานบริเวณชายหาดท่องเที่ยว	จำกัดที่จอดรถ, คิดค่าเข้าชายหาด, ปรับปรุงห้องน้ำสาธารณะและระบบบำบัดน้ำเสีย, ติดตั้งส้วมลอยน้ำสำหรับผู้โดยสารเรือ, จัดการขยะให้มีประสิทธิภาพ ป้องกันสัตว์มารบกวน, ปรับปรุงของชายหาดเพื่อเพิ่มการหมุนเวียนของน้ำทะเล
Christopher Creek, Arizona	ฟอสฟอรัสและแบคทีเรียอีโคโลยีเกินมาตรฐานจากพื้นที่ฝึกลูกเสือ boy scout camp และพื้นที่เลี้ยงม้า	ซ่อมแซมบ่อเกรอะที่รั่วซึม และทำความสะอาดพื้นที่เลี้ยงม้า

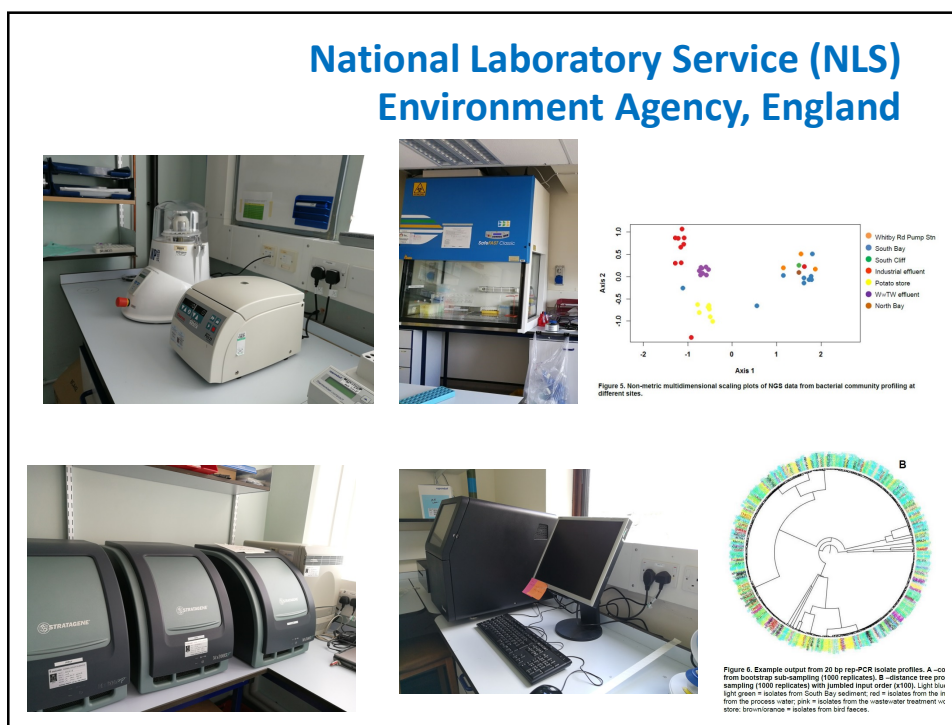
2006 2011

Figure 1. Whiskeytown Lake's Brandy Creek swimming beach.

Figure 2. A new septic system was installed at the Boy Scout campground.

Figure 2. Riparian restoration efforts in Crowdabout Creek have improved water quality and habitat.

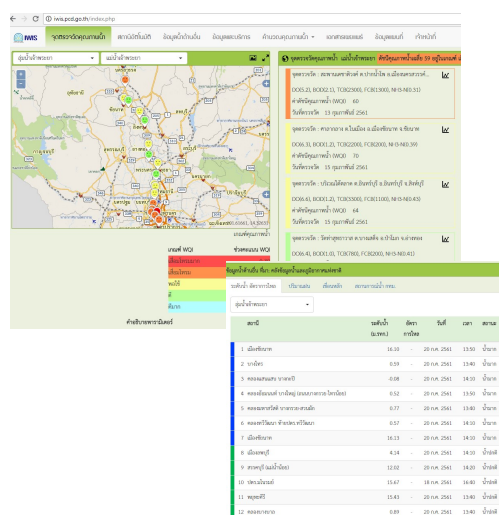
<https://www.epa.gov/nps/nonpoint-source-success-stories>



การรายงานผลคุณภาพน้ำของอังกฤษ

การรายงานผลคุณภาพน้ำผิวดินและน้ำทะเลของไทย

Seasonal monitoring and real-time monitoring system (website and mobile application)



<http://iwis.pcd.go.th/index.php>



คุณภาพน้ำผิวดินของประเทศไทย ปี 2559



สถานการณ์คุณภาพน้ำแหล่งน้ำผิวดิน
ในช่วง 10 ปี (ปี 2550-2559)



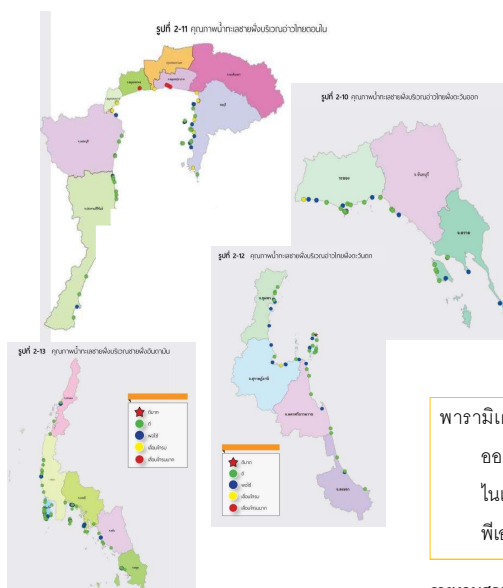
ดัชนีคุณภาพน้ำแหล่งน้ำผิวดิน

(Water Quality Index : WQI)

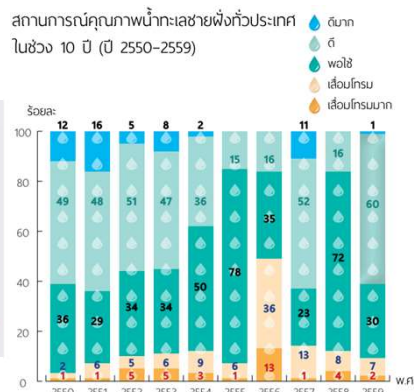
- ออกซิเจนละลาย (DO)
- ความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (BOD)
- แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด
- แบคทีเรียกลุ่มฟิโคไลฟอร์ม
- แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH3-N)

รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทยปี 2559 (กรมควบคุมมลพิษ 2560)

คุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งของประเทศไทย ปี 2559



สถานการณ์คุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งทั่วประเทศ
ในช่วง 10 ปี (ปี 2550-2559)



พารามิเตอร์ที่ใช้ประเมินคุณภาพน้ำทะเล

- | | | |
|------------------|-------------------|----------------|
| ออกซิเจนละลาย | โคลิฟอร์มทั้งหมด | ฟอสเฟตฟอสฟอรัส |
| ไนโตรเจนไนโตรเจน | อุณหภูมิ | สารแขวนลอย |
| พีเอช | แอมโมเนียไนโตรเจน | |

รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทยปี 2559 (กรมควบคุมมลพิษ 2560)

ภาคผนวก ณ3. เอกสารนำเสนอที่ 2 “นวัตกรรมการระบุแหล่งปล่อยมลพิษ ด้วย Microbial Source Tracking (MST)”
โดย ดร.ขวัญรวิ ลีริกาญจน และ ดร.ปิณดา ลีลพนัง กำแพงทอง นักวิชาการสิ่งแวดล้อมชำนาญการ ส่วนแหล่งน้ำจัด
กรมควบคุมมลพิษ, คณะผู้วิจัย



นวัตกรรมการระบุแหล่งปล่อยมลพิษ ด้วย Microbial Source Tracking (MST)



กรมควบคุมมลพิษ
POLLUTION CONTROL DEPARTMENT

ดร.ขวัญวีร์ สิริกาญจน
ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
kwanrawee@cri.or.th

ดร.ปณิดา ลีลพานัง กำแพงทอง
ส่วนแหล่งน้ำจืด สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ
p.leelapanang@gmail.com

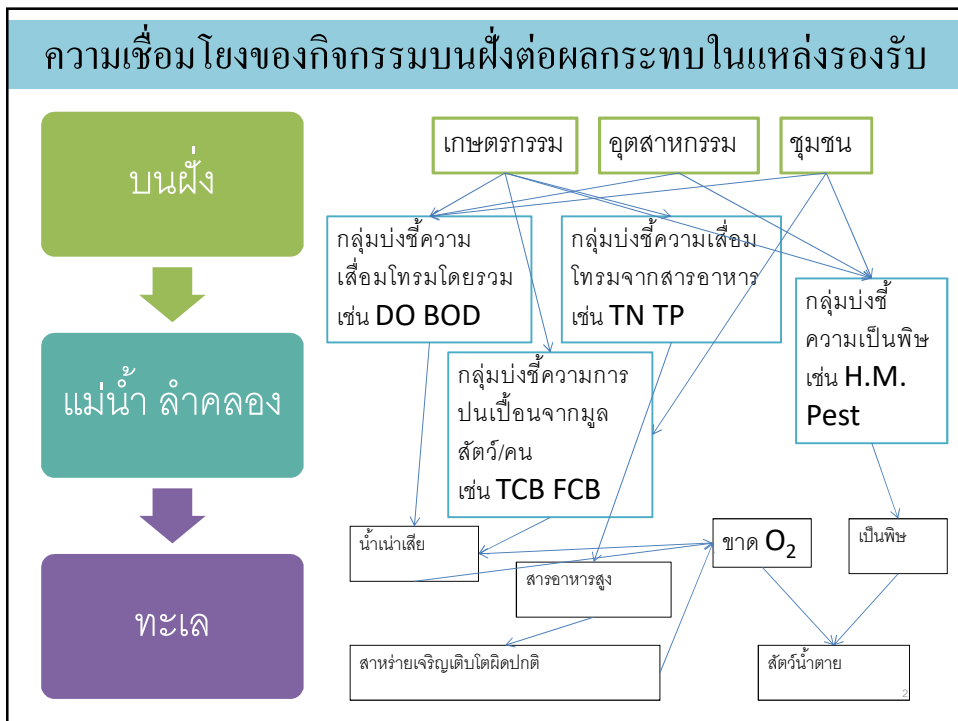


มูลนิธิ
สายน้ำไทย

Thailand 4.0 กับนวัตกรรมการจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ *non-point sources*

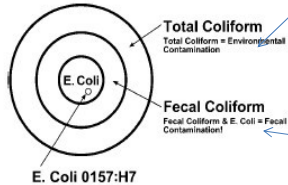
วันพุธที่ 25 กรกฎาคม 2561

1

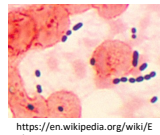
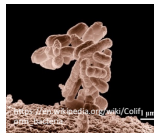


แบคทีเรียชี้แนะคุณภาพน้ำทางชีววิทยา

TOTAL COLIFORM, FECAL COLIFORM AND E. COLI



<http://www.doh.wa.gov/ehp/DW/Programs/coliform.htm>



<https://en.wikipedia.org/wiki/Enterococcus>



แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด คือ กลุ่มของแบคทีเรีย แกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งมีอากาศและไม่มีอากาศ สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทส ให้เกิดกรด และแก๊ส ได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ภายใน 48 ชั่วโมง ไม่ทนความร้อน ไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส

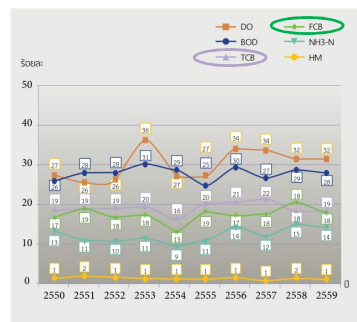
แบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์ม คือ กลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่ทนความร้อนได้สูง ทน bile salts ไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทส ให้เกิดกรด และแก๊ส ได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ภายใน 48 ชั่วโมง

แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรคอคคัส คือ genus ของแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เจริญได้ทั้งมีอากาศและไม่มีอากาศ

ปัญหาแบคทีเรียเกินมาตรฐานในน้ำผิวดิน (แม่น้ำและทะเลสาบน้ำจืด)

ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2537) เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน

ประเภท	การใช้งาน	โคลิฟอร์มทั้งหมด MPN/100 ml	ฟีคัลโคลิฟอร์ม MPN/100 ml
1	เพื่อการอุปโภคบริโภคของแหล่งน้ำ การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตระดับพื้นฐาน และการอุปโภคบริโภคที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรค	5,000	1,000
2	เพื่อการอุปโภคบริโภคที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคและกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไป	20,000	4,000
3	เพื่อการเกษตร และการอุปโภคบริโภคที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคและกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไป	ไม่กำหนด	ไม่กำหนด
4	เพื่อการอุตสาหกรรม การอุปโภคบริโภคที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคและกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำเป็นพิเศษ	ไม่กำหนด	ไม่กำหนด
5	เพื่อการคมนาคม	ไม่กำหนด	ไม่กำหนด

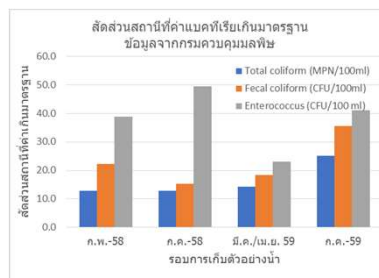


รูปที่ 2-7 ร้อยละของพารามิเตอร์ที่ได้ตามมาตรฐานตามประกาศแหล่งน้ำที่กำหนด ในช่วงปี 2550-2559

ปัญหาเบคทีเรียเกินมาตรฐานในน้ำทะเล

ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล 2560

ประเภท	การใช้งาน	โคลิฟอร์มทั้งหมด (MPN/100 ml)	ฟิเคอลโคลิฟอร์ม (CFU/100 ml)	เอนเทอโรคอกโค (CFU/100 ml)
1	เพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ	ไม่เกิน 1000	ไม่เกิน 70	ไม่กำหนด
2	เพื่อการอนุรักษ์แหล่งประมง	ไม่เกิน 1000	ไม่เกิน 70	ไม่เกิน 35
3	เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	ไม่เกิน 1000	ไม่เกิน 70	ไม่กำหนด
4	เพื่อการนันทนาการ	ไม่เกิน 1000	ไม่เกิน 100	ไม่เกิน 35
5	เพื่อการอุตสาหกรรมและท่าเรือ	ไม่เกิน 1000	ไม่เกิน 100	ไม่กำหนด
6	สำหรับชุมชน	ไม่เกิน 1000	ไม่เกิน 100	ไม่กำหนด



5

มาตรฐานตัวชี้วัดทางชีววิทยาในต่างประเทศ

2012 Recreational Water Quality Criteria (US EPA 2012)

CRITERIA ELEMENTS	Recommendation 1 Estimated Illness Rate 36/1,000		Recommendation 2 Estimated Illness Rate 32/1,000	
	GM (cfu/100 mL)	STV (cfu/100 mL)	GM (cfu/100 mL)	STV (cfu/100 mL)
Enterococci (marine & fresh)	35	130	30	110
<i>E. coli</i> (fresh)	126	410	100	320

*GM = geometric mean

**STV = statistical threshold value = 90th percentile

DIRECTIVE 2006/7/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC

For coastal waters and transitional waters

	A	B	C	D	E
	Parameter	Excellent quality	Good quality	Sufficient	Reference method of analysis
1	Intestinal enterococci (cfu/100 ml)	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-1 or ISO 7899-2
2	Escherichia coli (cfu/100 ml)	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-3 or ISO 9308-1

(*) Based upon a 95-percentile evaluation. See Annex II.

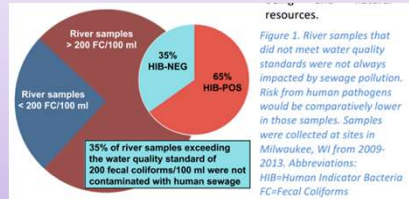
(**) Based upon a 90-percentile evaluation. See Annex II.



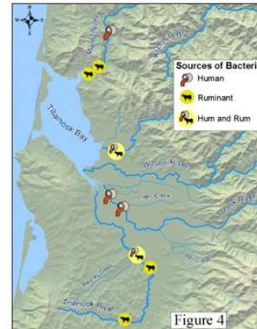
Beach warning and beach closure

แนวทางการแก้ไข...เริ่มจากการระบุแหล่งกำเนิดน้ำเสีย

จากตัวอย่างน้ำที่ค่าแบคทีเรียมาตรฐานไม่ผ่านเกณฑ์ พบว่ามีเพียง 65 เปอร์เซ็นต์เกิดจากการปนเปื้อนน้ำเสียชุมชน!!



Policy brief. Dila and McLellen 2016. Univ of Wisconsin, Milwaukee.



USEPA 2011 Using Microbial Source Tracking to Support TMDL Development and Implementation

- แบคทีเรียชี้แนะคุณภาพน้ำทางชีววิทยา (Total coliforms, fecal coliforms, *E. coli*, enterococci) ในมาตรฐานปัจจุบันไม่สามารถระบุแหล่งกำเนิดที่จำเพาะได้
 - น้ำเสียชุมชน
 - ฟาร์มปศุสัตว์
 - แหล่งกำเนิดแบบ Non-point sources เช่น นกน้ำ บริเวณพื้นที่สัตว์ป่า
 - จากการเติบโตเพิ่มจำนวนในน้ำ (regrowth)

7

Microbial source tracking การใช้จุลินทรีย์เพื่อจำแนกแหล่งกำเนิดน้ำเสีย

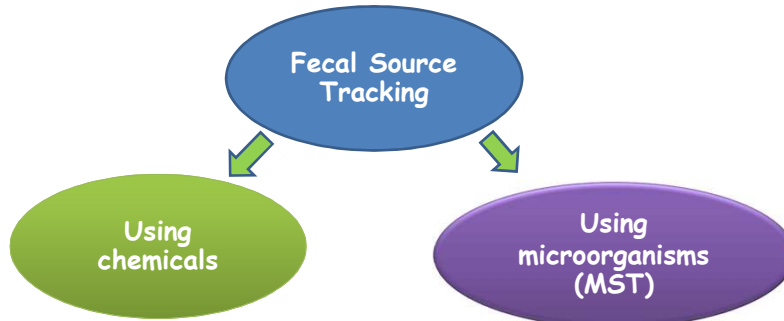


MST คือ การใช้จุลินทรีย์ในลำไส้ที่จำเพาะกับคนหรือสัตว์ประเภทต่างๆ เช่น สุนัข โค ม้า แพะ แกะ ไก่ เป็ด นก เป็นต้น เพื่อบ่งชี้แหล่งปล่อยน้ำเสียลงสู่แม่น้ำ หรือ ทะเล ว่ามาจาก ชุมชน หรือ ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ หรือ แหล่งธรรมชาติ เช่น นกน้ำ นกทะเล เป็นต้น

- เป็นวิธีการระบุแหล่งปล่อยมลพิษน้ำเสียลงสู่สิ่งแวดล้อม
- เป็นเครื่องมือในการจำแนกและประเมินแหล่งปล่อยมลพิษที่อาจมีหลายแหล่ง (ชุมชน ฟาร์มปศุสัตว์ พื้นที่สัตว์ป่า นกน้ำและนกทะเล เป็นต้น)
- สามารถช่วยในการประเมินความเสี่ยงผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ได้

8

Chemical- vs. biological-based methods



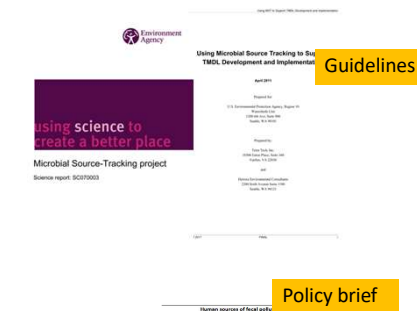
- caffeine and fragrances: human sewage
- steroids: agricultural input or wildlife input

Drawbacks: their spread, transport, and persistence may be not be correlated with those of pathogens

- viruses, bacteria, protozoa
- culture-based vs. non-cultured based methods

9

ความสำเร็จและก้าวหน้าของเทคนิค MST ในต่างประเทศ



United Kingdom (Environment Agency 2008)

- MST could solve water quality problems in Ireland, France, Portugal, and UK

United States (US EPA 2011):

- MST has been adopted in many states, e.g., Virginia, Idaho, Oregon, New Mexico, New Hampshire, Michigan, South Dakota

Private company

Source Molecular
Leader in Microbial Source Tracking

Microbial Source Tracking Services
Identify the Host Sources of Fecal Contamination

- Fast Result Delivery - 5-10 working days
- Detection of 13 fecal pollution host sources
- Packing material, coolers, and sterile bottles provided
- Strict Quality Assurance/Quality Control procedures
- Prompt Response to inquiries within 24 hours

What is Microbial Source Tracking?
Microbial Source Tracking (MST) is a set of methods used to determine the host (different animals or human) that contributes fecal pollution to a variety of water bodies. Fecal pollution is a common problem that occurs in many water systems. When high counts of fecal bacteria are present in a water source, it

10

ความสำเร็จของการพัฒนา MST ในไทย



ENVIRONMENTAL Science & Technology
Q1, Impact 6.653

Integrated Multivariate Analysis with Nondetects for the Development of Human Sewage Source-Tracking Tool
Bacteriophages of *Enterococcus faecalis*
Bencharong Wongsakul^{1,2}, Siorn Mongkolkeha^{1,3} and Kwanruee Srikanchana^{1,3}

¹Chulabhorn Graduate Institute, Bangkok, Thailand 10210
²Department of Biotechnology and Center for Emerging Bacterial Infections, Faculty of Science, Mahidul University, Bangkok 10400
³Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand 10210
⁴Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology, CHE, Ministry of Education, Phitsanulok

Applied Microbiology and Biotechnology 2018, 18(2):25-42
Impact Factor 13.187 (2018) 25-42

ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Q1, Impact 3.340

Comparative persistence of human sewage-specific enterococcal bacteriophages in freshwater and seawater

Nandini Booncharoen¹, Siorn Mongkolkeha^{1,2}, Kwanruee Srikanchana^{1,3}

Received 11 October 2017 | Revised 7 April 2018 | Accepted 7 May 2018 | Published online 21 May 2018
© Springer Nature 2018. This article is part of the journal Nature 2018

Contents lists available at ScienceDirect
Environmental Pollution

Performance evaluation of Bacteriophage and animal microbial source tracking watersheds¹

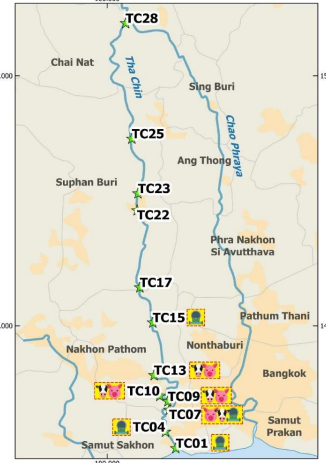
Pongpaka Srikanchana¹, Natcha Chienchana¹, Siorn Mongkolkeha^{1,2}, Kwanruee Srikanchana^{1,3}

¹Chulabhorn Graduate Institute, Bangkok, Thailand 10210
²Department of Biotechnology and Center for Emerging Bacterial Infections, Faculty of Science, Mahidul University, Bangkok 10400
³Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand 10210
⁴Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology, CHE, Ministry of Education, Phitsanulok

Contents lists available at ScienceDirect
Data in Brief

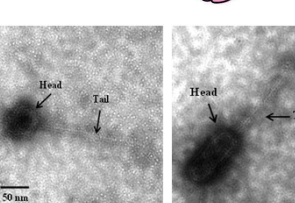
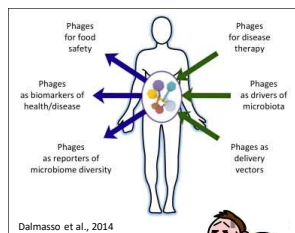
PCR data and comparative performance of Bacterioides microbial source tracking genetic markers

Pongpaka Srikanchana¹, Natcha Chienchana¹, Siorn Mongkolkeha^{1,2}, Kwanruee Srikanchana^{1,3}

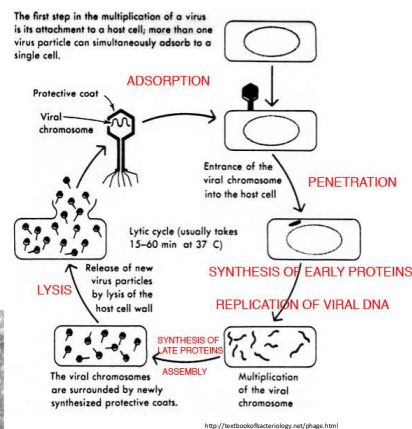
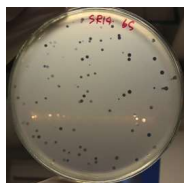


11

วิธีที่ 1 การตรวจวัดแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage)



วงจรชีวิตของไวรัสเฟจ



Booncharoen et al., 2018

วิธีที่ 2 ตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidales

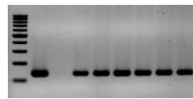
สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำ



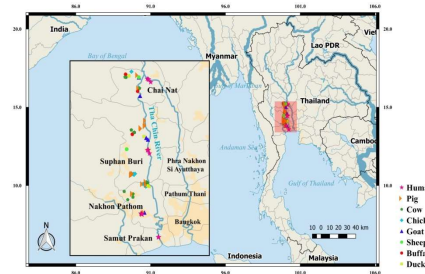
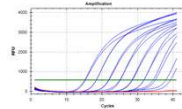
PCR primers and qPCR probes targeting *Bacteroidetes* genes
ทดสอบคัดเลือกจาก 16 ไพรเมอร์ ทดสอบกับตัวอย่างน้ำเสียและมูลสัตว์
100 ตัวอย่าง

Target	Assay name	References
Universal	GenBac3	Siefring et al. 2008
Human sewage	HF183/BFDrev	Haugland et al. 2010
Pig	Pig-2-Bac	Mieszkin et al. 2009
Cow	Bac3	Shanks et al. 2006; this study

ตรวจวัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยพีซีอาร์



ตรวจวัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยพีซีอาร์เชิงปริมาณ



15

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ MST 3 วิธี

วิธี	ปฏิกิริยา แหล่งกำเนิด	ระยะเว ลาตรวจ	ต้นทุน* (บาท)	ประสิทธิภาพ	ข้อดี
เพาะเลี้ยง ไวรัสเฟจ	น้ำเสียชุมชน	5 – 7 ชม.	ค่าเครื่องมืออุปกรณ์ – เครื่องมือ พื้นฐาน ค่ารายตัวอย่าง – 1,000	ความไว 0.90 ความจำเพาะ 1.00	ต้นทุนต่ำ, อุปกรณ์ เครื่องมือไม่ซับซ้อน, วิธีการไม่ซับซ้อน
ตรวจดีเอ็นเอ แบคทีเรีย ด้วยพีซีอาร์	น้ำเสียชุมชน, สุกร, โค, และ รวมทุก แหล่งกำเนิด	5-7 ชม.	ค่าเครื่องมืออุปกรณ์ – 710,000 ค่าวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง** – 3,320 (4 แหล่งกำเนิด), 1,800 (1 แหล่ง)	ความไว 0.89, 1.00, 0.88, 1.00 ความจำเพาะ 0.81, 0.98, 1.00, ไม่ มี	ต้นทุนไม่สูง, มีวิธีสำหรับ แหล่งกำเนิดหลายชนิด
ตรวจดีเอ็นเอ แบคทีเรีย ด้วยพีซีอาร์ เชิงปริมาณ	น้ำเสียชุมชน, สุกร, โค, และ รวมทุก แหล่งกำเนิด	5-6 ชม.	ค่าเครื่องมืออุปกรณ์และกราฟ มาตรฐาน – 1,367,000 ค่าวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง*** - 6,000 (4 แหล่งกำเนิด), 3,200 (1 แหล่ง)	ความไว 1.00, 1.00, 0.68, 0.96 ความจำเพาะ 0.84, 0.97, 0.95, ไม่มี	เปรียบเทียบระดับการ ปนเปื้อนจากหลายๆ แหล่งกำเนิดได้

*ไม่รวมค่าแรงบุคลากร ค่าเครื่องมือพื้นฐาน ค่าบำรุงรักษารายปี และค่าสิทธิหรือ เช่น ผู้ยื่น ผู้เช่าตัวอย่าง เครื่องมือห้องปฏิบัติการ เชื้อแรงต้น เครื่องวัดพีเอช เป็นต้น

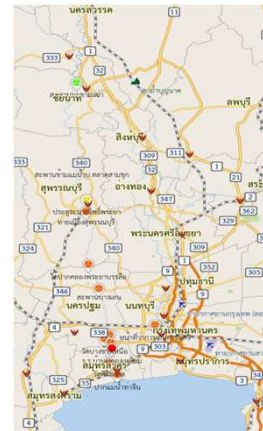
36 ปฏิบัติการต่อตัวอย่าง รวมการทำ 2 ชั่วโมงและตัวอย่างควบคุมคุณภาพ * 60 ปฏิบัติการต่อตัวอย่าง รวมการทำ 2 ชั่วโมงและตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

16

การจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษด้วยกลุ่มเบคทีเรีย กรณีศึกษา กลุ่มน้ำท่าจีน

ชื่อแม่น้ำ	ชื่อย่อ	ตำแหน่งจุดเก็บ	แกน X	แกน Y	คุณภาพน้ำตามประเภทแหล่งน้ำ*
แม่น้ำท่าจีน	TC01	ปากแม่น้ำท่าจีน อ.เมือง จ.สมุทรสาคร	637969N	1493895E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC04	วัดศรีมงคล อ.เมือง จ.สมุทรสาคร	633383N	1501093E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC07	ร.ร.บ้านปล่องเหล็ก อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร	634993N	1510839E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC09	หน้าวัดเทียนดัด บ้านท่าใหม่ อ.สามพราน จ.นครปฐม	634400N	1514600E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC10	วัดบางช้างเหนือ อ.สามพราน จ.นครปฐม	630899N	1517001E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC13	หน้าที่ว่าการ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม	658667N	1525838E	4
แม่น้ำท่าจีน	TC15	สะพานบางเลน อ.บางเลน จ.นครปฐม	627714N	1549429E	3
แม่น้ำท่าจีน	TC17	ใต้ปากคลองพระยาบวรดิษฐ์ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	622055N	1564946E	3
แม่น้ำท่าจีน	TC22	ท้ายเมืองสุพรรณบุรี อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี	620685N	1599046E	3
แม่น้ำท่าจีน	TC23	ประตูระบายน้ำโพธิ์พระยา อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี	621057N	1606545E	3
แม่น้ำท่าจีน	TC25	สะพาน อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี	618291N	1630756E	2
แม่น้ำท่าจีน	TC28	สะพานมะขามเตี้ย อ.วัดสิงห์ จ.ชัยนาท	615384N	1681834E	2

หมายเหตุ * ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน แหล่งที่มา: ประกาศกรมควบคุมมลพิษ เรื่องกำหนดประเภท ของแหล่งน้ำในแม่น้ำท่าจีน ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนที่ 62 ง ลงวันที่ 4 สิงหาคม 2537



- ประเภทที่ 2** (1) การอุปโภคและบริโภคโดยตรงผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไป ก่อน (2) การอนุรักษ์สัตว์น้ำ (3) การประมง (4) การว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ
- ประเภทที่ 3** (1) การอุปโภคและบริโภคโดยตรงผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไป ก่อน (2) การเกษตร
- ประเภทที่ 4** (1) การอุปโภคและบริโภคโดยตรงผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติและผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำเป็น พิเศษก่อน (2) การอุตสาหกรรม

17

แผนความถี่และสถานีในการเก็บตัวอย่าง

รอบที่	ฤดูกาล*	วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานีเก็บน้ำ	ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ
1	ฤดูฝน	29 ก.ค. 60	TC01, TC04, TC07, TC09, TC10, TC13	ตัวอย่างซ้ำที่ TC13
	ฤดูฝน	5 ส.ค. 60	TC15, TC17, TC22, TC23, TC25, TC28	ตัวอย่างเปล่า เก็บที่ TC28
2	ฤดูฝน	19 ส.ค. 60	TC01, TC04, TC07, TC09, TC10, TC13	ตัวอย่างซ้ำที่ TC13
	ฤดูฝน	26 ส.ค. 60	TC15, TC17, TC22, TC23, TC25, TC28	ตัวอย่างเปล่า เก็บที่ TC28
3	ฤดูแล้ง	3 ก.พ. 61	TC01, TC04, TC07, TC09, TC10, TC13	ตัวอย่างซ้ำที่ TC13
	ฤดูแล้ง	10 ก.พ. 61	TC15, TC17, TC22, TC23, TC25, TC28	ตัวอย่างเปล่า เก็บที่ TC28
4	ฤดูแล้ง	3 มี.ค. 61	TC01, TC04, TC07, TC09, TC10, TC13	ตัวอย่างซ้ำที่ TC13
	ฤดูแล้ง	10 มี.ค. 61	TC15, TC17, TC22, TC23, TC25, TC28	ตัวอย่างเปล่า เก็บที่ TC28

หมายเหตุ * ฤดูฝนนับตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม
ฤดูแล้งนับตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน



TC01



TC04



TC07



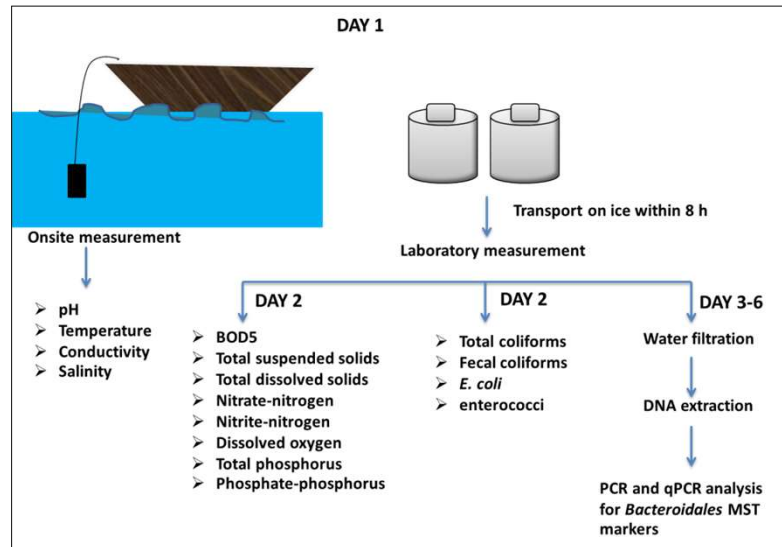
TC23



TC09

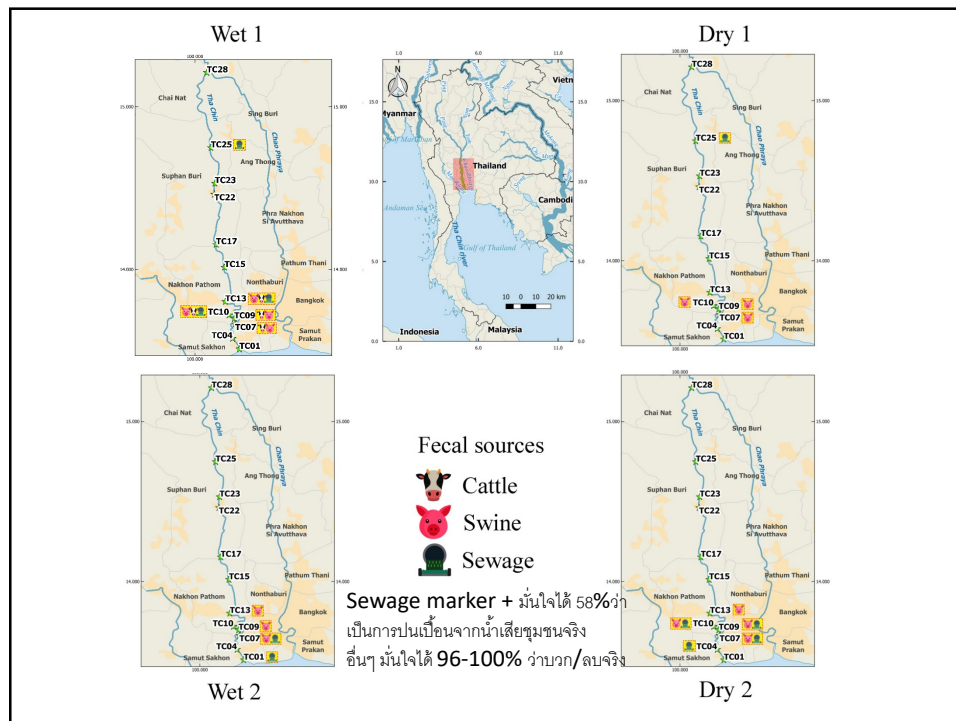
18

พารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่ทำการวิเคราะห์

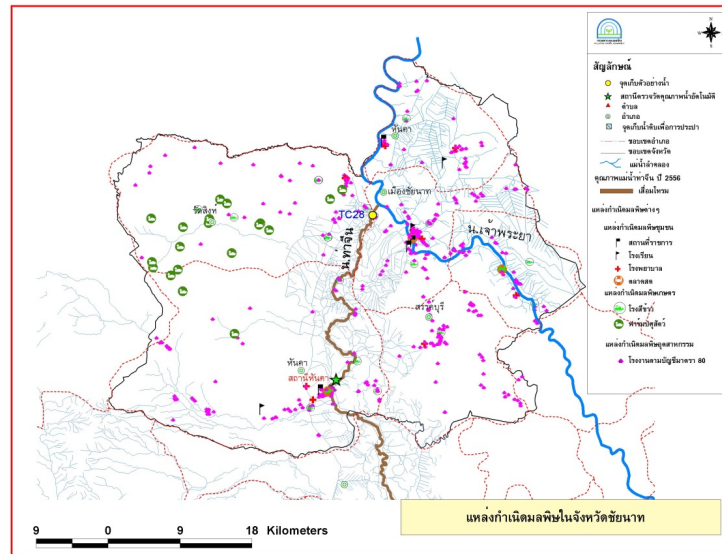


หมายเหตุ: วิเคราะห์ตามวิธีของ Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater (American Public Health Association et al, 2017)

19



แผนที่แหล่งกำเนิดมลพิษ (กรมควบคุมมลพิษ)

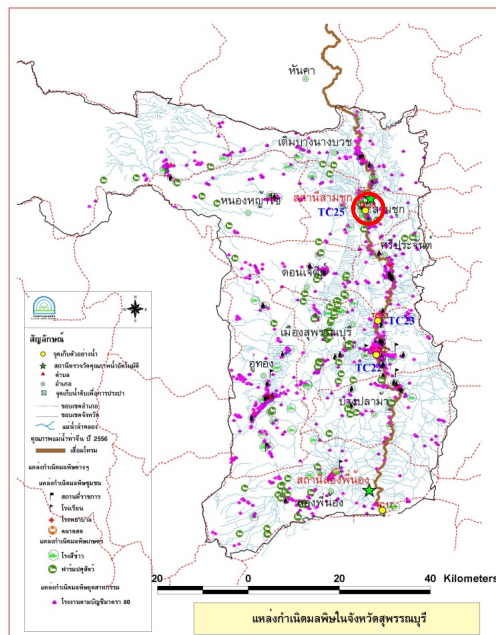


Uni marker: all stations

21

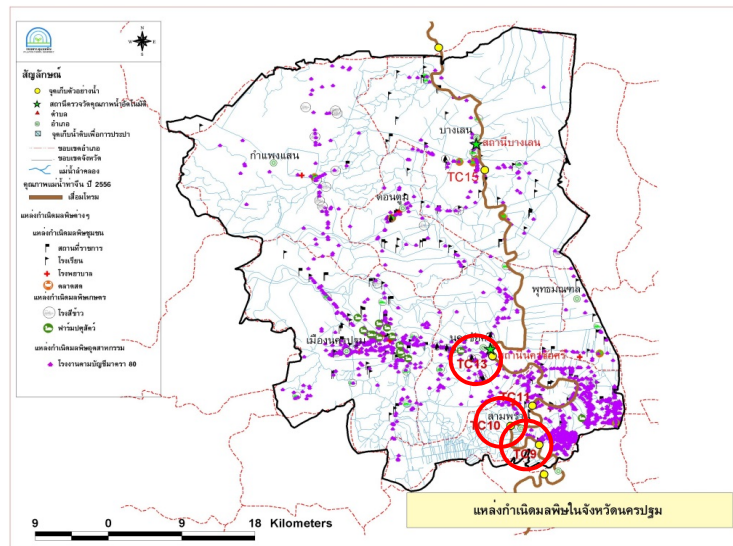
แผนที่แหล่งกำเนิดมลพิษ
(กรมควบคุมมลพิษ)

Uni marker: all stations
TC25: sew marker (2)



22

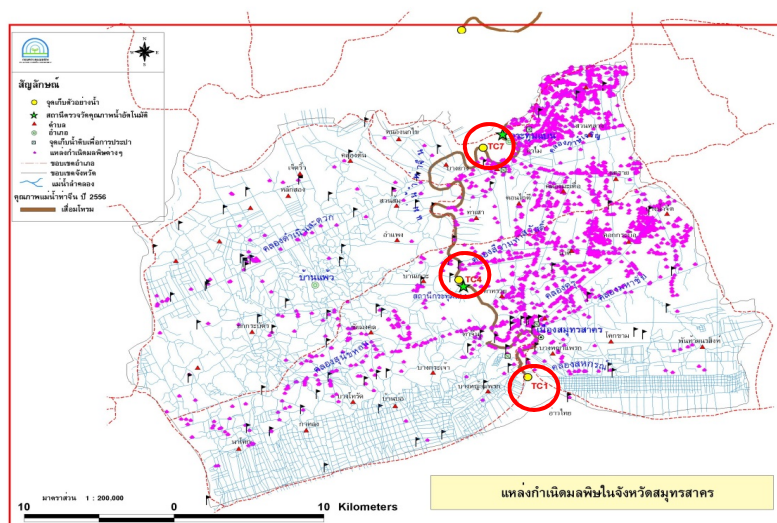
แผนที่แหล่งกำเนิดมลพิษ (กรมควบคุมมลพิษ)



Uni marker: all stations TC10: pig (3), cow (1), sew (1)
 TC13: pig (3), cow (1) TC09: pig (4), cow (1), sew (1)

23

แผนที่แหล่งกำเนิดมลพิษ (กรมควบคุมมลพิษ)

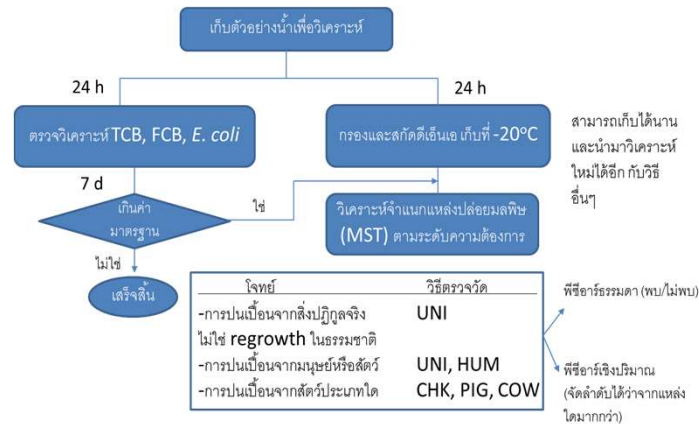


Uni marker: all stations TC04: sew (2)
 TC07: pig (4), cow (1), sew (3) TC01: sew (2)

24

ทางเลือกในการวิเคราะห์ที่นำเสนอแบบเป็นขั้นตอน (tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้นๆ

ตัวอย่าง Tiered Approach และการแปลผล



25

อภิปรายและระดมสมอง “ก้าวต่อไป..เพื่อต่อยอดงานวิจัยและนำไปสู่นโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำ non-point sources”

ภาคการศึกษาวิจัย (ขวัญรวี)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสร้างเครือข่ายนักวิจัย
2. เพื่อระดมแนวทางการพัฒนางานวิจัยไปสู่การแก้ไขปัญหา มลพิษทางน้ำ

ภาคนโยบาย (ปิณิดา)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อระดมแนวทางการจัดทำนโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำ
2. เพื่อนำเสนอโครงสร้างหน้าที่ของหน่วยงานต่างๆ ในการบูรณาการการแก้ไขปัญหา มลพิษ

ภาคผนวก ณ4. ประมวลภาพบรรยากาศงานเสวนาฯ



บรรยากาศการลงทะเบียนของงานเสวนาฯ



ประธานกล่าวเปิดงานเสวนาฯ โดย รศ.ดร.ชนาธิป ผาริโน ผู้อำนวยการสกว. ฝ่ายสวัสดิภาพสาธารณะ (ภาพด้านซ้าย) และ ศ.ดร. ศรณัฏ มงคลสุข ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ (ภาพด้านขวา)



ดร.ชัยพรวี สิริกาญจน นักวิจัยชำนาญการ สถาบันวิจัย
จุฬารักษ์ หัวหน้าโครงการวิจัย กล่าวบรรยายในหัวข้อ
มลพิษ non-point sources: ความท้าทายจากอดีตถึง
ปัจจุบัน



ช่วงเสวนาในหัวข้อ “ความสำเร็จและโอกาสในการจัดการ
มลพิษยุค Thailand 4.0” โดยวิทยากร 5 ท่าน



ท่านแรก รศ.ดร.พิสุทธิ์ เพ็ชรมนกุล ภาควิชาวิศวกรรม
สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ คณะกรรมการ
จัดทำยุทธศาสตร์ชาติ (2560 วาระ 5 ปี) บรรยายในหัวข้อ:
ความก้าวหน้าในการจัดทำยุทธศาสตร์ด้านมลพิษและที่
เกี่ยวข้อง



ท่านที่สอง ดร.พรศรี สุทธนารักษ์ ผู้อำนวยการสำนัก
จัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ บรรยายในหัวข้อ:
นโยบาย กฎหมาย และการจัดการมลพิษ



ท่านที่สาม ศ.ดร.จรงค์ษ์ ผลประเสริฐ ภาควิชาวิศวกรรมโยธา คณะวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ บรรยายในประเด็น: ความก้าวหน้าด้านงานวิจัยและเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้อง



ท่านที่สี่ ดร.สมสิทธิ์ มูลสถาน กรรมการสถาบันน้ำและสิ่งแวดล้อมเพื่อความยั่งยืน สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย บรรยายในประเด็น: เทคโนโลยี มาตรการ และการป้องกันของผู้ประกอบการ



ท่านที่ห้า นายแพทย์ดนัย ธีวันดา รองอธิบดีกรมอนามัย บรรยายในประเด็น: นโยบาย กฎหมาย และปัญหาด้านสาธารณสุข



บรรยากาศผู้เข้าร่วมงานในระหว่างเสวนาหัวข้อความสำเร็จและโอกาสในการจัดการมลพิษยุค Thailand 4.0”



ผู้ร่วมงานเสวนาฯ ชักถามในประเด็นต่างๆ



ประธานและคณะผู้จัดงานมอบของที่ระลึกให้กับวิทยากรทั้ง 5 ท่าน และถ่ายภาพหมู่รวมกันกับผู้เข้าร่วมงานในช่วงเช้า

บรรยากาศงานเสวนาฯ ในช่วงบ่าย



ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน และ ดร.ปณิดา สีสพจน์ กำแพงทอง บรรยายในหัวข้อ “นวัตกรรมการระบุแหล่งปล่อยมลพิษ ด้วย Microbial Source Tracking (MST)” เพื่อเผยแพร่เทคโนโลยีและผลการศึกษาในแม่น้ำท่าจีน



อภิปรายและระดมสมอง หัวข้อ “ก้าวต่อไป...เพื่อต่อยอดงานวิจัยและนำไปสู่นโยบายการจัดการมลพิษทางน้ำ” โดยแบ่งออกเป็น 2 หัวข้อ ตามความสนใจของผู้เข้าร่วม

หัวข้อแรกการพัฒนางานวิจัย MST ในการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมและการสร้างเครือข่ายนักวิจัยในไทย
(ภาคการศึกษาและวิจัย) ดำเนินรายการโดย ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน



กิจกรรมเครือข่ายความรู้: แนะนำตัวและความเชี่ยวชาญของผู้ร่วมกิจกรรมแต่ละท่าน



กิจกรรมสิ่งที่อยากให้เกิดขึ้น: งานวิจัยหรือสิ่งที่อยากให้เกิดขึ้นโดยแบ่งระยะเวลาออกเป็น 1-3 ปี, 3-5 ปี, 5-10 ปี และ 10 ปีขึ้นไป



กิจกรรมสิ่งที่อยากให้เกิดขึ้น: ผู้เข้าร่วมกิจกรรมอธิบายความคิดเห็นของตนเองแก่ผู้เข้ากิจกรรมท่านอื่น



กิจกรรมต้นไม้ปัญหา: นำประเด็นปัญหาที่เกิดขึ้นจากช่วงที่ผ่านมาขอความคิดเห็นและแนวทางแก้ไขจากผู้เข้าร่วมกิจกรรม



ผู้เข้าร่วมกิจกรรมแลกเปลี่ยนความคิดเห็นของปัญหาที่เกิดขึ้น



ดร.ขวัญรวี สิริกาญจน สรุปรวมความคิดเห็นที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมแก่ผู้เข้าร่วมกิจกรรมทุกท่าน

ภาพแผนผังความคิดเห็นที่ได้จากทั้งภาคการศึกษาและรัฐบาลในกิจกรรมการพัฒนางานวิจัย MST ในการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมและ
การสร้างเครือข่ายนักวิจัยในไทย (ภาคการศึกษาและวิจัย)



หัวข้อที่ส่องการนำผลการวิจัยไปสู่นโยบายและ/หรือมาตรการที่เกี่ยวข้อง (หน่วยงานภาครัฐและรัฐวิสาหกิจ)
ดำเนินรายการโดย ดร.ปณิดา สีสพนัง กำแพงทอง



กิจกรรมเครือข่ายความรู้: แนะนำตัวและความเชี่ยวชาญของผู้ร่วมกิจกรรมแต่ละท่าน



กิจกรรมต้นไม้ปัญหา: ทำไมปัจจุบันยังไม่มียุทธศาสตร์ non-point source เพื่อขอความคิดเห็นและแนวทางแก้ไขจากผู้เข้าร่วมกิจกรรม



ผู้ร่วมกิจกรรมแต่ละท่านกำลังเสนอความคิดและข้อเสนอแนะต่างๆ



กิจกรรมนโยบายและกฎหมายที่อยากให้เกิดในอนาคต

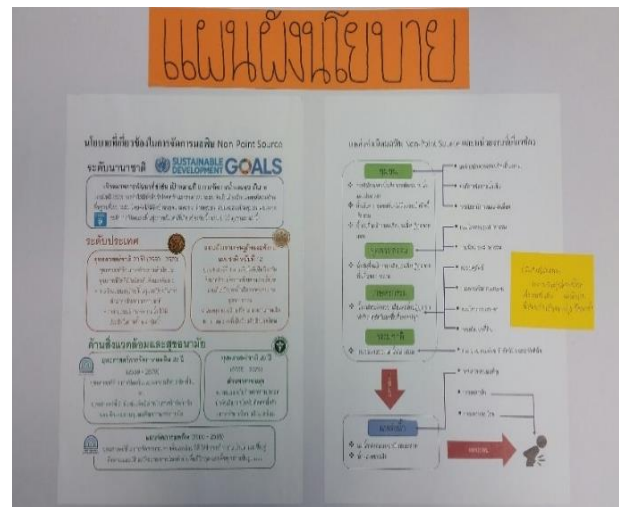


รับฟังความคิดเห็นต่อแผนผังนโยบายที่จะเกิดเกี่ยวกับนโยบายด้าน non-point source ที่จะเกิดขึ้นในอนาคต



ดร.ปณิดา สีสพนัง กำแพงทองสรุปรวมความคิดเห็นที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมแก่ผู้เข้าร่วมกิจกรรมทุกท่าน

ภาพแผนผังความคิดเห็นที่ได้จากทั้งภาคการศึกษาและรัฐบาลในกิจกรรมการนำผลการวิจัยไปสู่นโยบายและ/หรือมาตรการที่เกี่ยวข้อง
(หน่วยงานภาครัฐและรัฐวิสาหกิจ)





ดร.ขวัญวี สิริกาญจน หัวหน้าโครงการกล่าวสรุปและขอขอบคุณผู้เข้าร่วมงานทุกท่านที่เข้าร่วมงานเสวนาฯ



คณะผู้จัดงานและผู้เข้าร่วมงานเสวนาฯ ร่วมกันถ่ายภาพหมู่ในช่วงปิดงาน



คณะผู้จัดงานถ่ายภาพหมู่ร่วมกันเป็นที่ระลึกในการจัดงานเสวนาฯ

ภาคผนวก ญ ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์และแผนการดำเนินงานพร้อมทั้งขั้นตอนตลอดแผนการวิจัย

ตารางที่ ๑๖ กิจกรรมที่ดำเนินการในหกเดือนแรกเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย (เปรียบเทียบแผนที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่แท้จริง)

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก/กิจกรรมรอง	ช่วงเวลาดำเนินการ						ผู้รับผิดชอบ
		ก.ย.-59	ต.ค.-59	พ.ย.-59	ธ.ค.-59	ม.ค.-60	ก.พ.-60	
1.เพื่อจัดทำรายงานประเมินสถานการณ์มลพิษปัจจุบันในแหล่งน้ำและศึกษาวิเคราะห์ความจำเป็นในการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรม	1.1 รวบรวมข้อมูลที่ผ่านมาในเรื่องปัญหามลพิษ ความไม่พอเพียงของข้อมูลการเชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิด ข้อมูลการร้องเรียน และข้อห่วงใยของมาตรฐานน้ำในแหล่งน้ำผิวดินปัจจุบัน							ดร.ปิณิดา
	1.2 วิเคราะห์สถานการณ์ที่มีความจำเป็นต้องเชื่อมโยงข้อมูลการปนเปื้อนกับแหล่งกำเนิด							
	1.3 ทบทวนนโยบายที่เกี่ยวข้อง							
	1.4 ทบทวนแนวทางการแก้ไข โดยใช้กรณีศึกษาในต่างประเทศ							
	1. (ที่ดำเนินการจริง)							
2.เพื่อพัฒนาวิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับตรวจวิเคราะห์กลุ่มพารามิเตอร์แบคทีเรีย ที่สามารถจำแนกสิ่งปฏิจุจากแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรม ที่สำคัญในพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน ด้วยความจำเพาะ (specificity) ไม่น้อยกว่า 90 เปอร์เซนต์ และความไว (sensitivity) ไม่น้อยกว่า 65 เปอร์เซนต์	2.1 เก็บตัวอย่างมูลสัตว์และน้ำเสียชุมชนในพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีน							ดร.ขวัญรรี
	2.1 (ที่ดำเนินการจริง)							
	2.1.1 ศึกษาประเภทและที่ตั้งของแหล่งกำเนิดมลพิษที่สำคัญในลุ่มน้ำท่าจีน ซึ่งประกอบด้วยชุมชน และฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่สำคัญ ได้แก่ สุกร โค และไก่ รวมเรียกว่า แหล่งกำเนิดหลัก							
	2.1.1 (ที่ดำเนินการจริง)							
	2.1.2 กำหนดจำนวนตัวอย่างและสถานที่เก็บตัวอย่างของแหล่งกำเนิดหลัก ตามสัดส่วนการกระจายตัวของแหล่งกำเนิด โดยอ้างอิงข้อมูลกรมปศุสัตว์ (สำหรับสุกร โค และไก่) และข้อมูลจำนวนประชากร จากสำนักงานสถิติแห่งชาติ ปีล่าสุด (สำหรับน้ำเสียชุมชนในพื้นที่) จำนวนรวมทั้งสิ้น 80 ตัวอย่าง (มูลสัตว์ 60 ตัวอย่าง น้ำเสีย 20 ตัวอย่าง)							
	2.1.2 (ที่ดำเนินการจริง 119 ตัวอย่าง)							
	2.1.3 กำหนดประเภทและที่ตั้งของแหล่งกำเนิดรอง เช่น แพะ แกะ กระบือ เป็ด เป็นต้น เพื่อใช้ตรวจสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ และกำหนดจำนวนตัวอย่างและสถานที่เก็บ ตามสัดส่วนการกระจายตัวของแหล่งกำเนิด จำนวนรวมทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง							
	2.1.3 (ที่ดำเนินการจริง 26 ตัวอย่าง)							
	2.1.4 ทำการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ โดย 1 ตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้น มาจากการผสมมูลสดของสัตว์ชนิดเดียวกันตั้งแต่ 20 ตัวขึ้นไป เพื่อเป็นตัวแทนที่ดีของกลุ่มประชากร จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด							
	2.1.4 (ที่ดำเนินการจริง)							

ตารางที่ ญ1 (ต่อ) กิจกรรมที่ดำเนินการในหกเดือนแรกเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย (เปรียบเทียบแผนที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง)

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก/กิจกรรมรอง	ช่วงเวลาดำเนินการ						ผู้รับผิดชอบ
		ก.ย.-59	ต.ค.-59	พ.ย.-59	ธ.ค.-59	ม.ค.-60	ก.พ.-60	
	2.1.5 ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสียชุมชนจากอาคารพักอาศัยหรืออาคารสำนักงาน จากนั้นทำการกรองและนำกระดาษกรองมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด	←			→			
	<u>2.1.5 (ที่ดำเนินการจริง)</u>		←	---	---	---	→	
	2.2 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียด้วยวิธีพีซีอาร์					←	→	
	<u>2.2 (ที่ดำเนินการจริง)</u>				←	---	---	→
	2.2.1 ทดสอบไพรเมอร์ 10-12 คู่กับตัวอย่างจากแหล่งกำเนิดเป้าหมาย (targets) และแหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมาย (non-targets)					←	→	
	<u>2.2.1 (ที่ดำเนินการจริง 22 คู่ไพรเมอร์)</u>				←	---	---	→
	2.2.2 คำนวณหาความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity)						←	→
	<u>2.2.2 (ที่ดำเนินการจริง)</u>				←	---	---	→
	2.2.3 ประเมินคัดเลือกไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสมสำหรับทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณต่อไป โดยให้มือน้อย 1-2 คู่ต่อหนึ่งชนิดแหล่งกำเนิดหลัก (ชุมชน สุกร โค ไก่ และแหล่งกำเนิดรวม)						←	→
	<u>2.2.3 (ที่ดำเนินการจริง) ได้คัดเลือกไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสมสำหรับแหล่งกำเนิดรวม 3 คู่, ชุมชน 3 คู่, สุกร 1 คู่, และ โค 1 คู่</u>				←	---	---	→

ตารางที่ ญ2 กิจกรรมที่ดำเนินการในรอบหกเดือนที่สองเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย (เปรียบเทียบแผนที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง)

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก/กิจกรรมรอง	ช่วงเวลาดำเนินการ						ผู้รับผิดชอบ
		มี.ค.-60	เม.ย.-60	พ.ค.-60	มิ.ย.-60	ก.ค.-60	ส.ค.-60	
2.เพื่อพัฒนาวิธีทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณสำหรับตรวจวิเคราะห์กลุ่มพารามิเตอร์แบบที่เรีย ที่สามารถจำแนกสิ่งปฏิกลจากแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรม ที่สำคัญในพื้นที่ลุ่มน้ำทำจัน ด้วยความจำเพาะ (specificity) ไม่น้อยกว่า 90 เปอร์เซนต์ และความไว (sensitivity) ไม่น้อยกว่า 65 เปอร์เซนต์	2.3 พัฒนาและทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์แบบที่เรีย ด้วยวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ	←			→			ดร.ขวัญรวี
	2.3.1 ทำ positive controls โดยใช้พลาสมิด และสร้าง standard curves สำหรับไพรเมอร์แต่ละคู่	←	→					
	2.3.1 (ที่ดำเนินการจริง)	← - - - - - →						
	2.3.2 ทดสอบแต่ละไพรเมอร์กับตัวอย่างจากแหล่งกำเนิดเป้าหมายและแหล่งกำเนิดที่ไม่ใช่เป้าหมาย		←		→			
	2.3.2 (ที่ดำเนินการจริง)		← - - - - - →					
	2.3.3 คำนวณหาความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity)				←	→		
	2.3.3 (ที่ดำเนินการจริง)				← - - - - - →			
	2.3.4 ประเมินเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจติดตามในปีที่ 2 ต่อไปโดยให้มีอย่างน้อย 1 คู่ต่อหนึ่งชนิดแหล่งกำเนิดเป้าหมาย (ชุมชน สุกร โค ไก่ และรวมทุกแหล่งกำเนิด)				←	→		
	2.3.4 (ที่ดำเนินการจริง)				← - - - - - →			
	2.4 วิเคราะห์ความเหมาะสมระหว่างเทคนิคพีซีอาร์ และพีซีอาร์เชิงปริมาณเปรียบเทียบกันในด้านต้นทุน ข้อได้เปรียบและข้อจำกัดเชิงเทคนิค	←			→			
	2.4 (ที่ดำเนินการจริง)	← - - - - - →						

ตารางที่ ญ2 (ต่อ) กิจกรรมที่ดำเนินการในรอบหกเดือนที่สองเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย (เปรียบเทียบแผนที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง)

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก/กิจกรรมรอง	ช่วงเวลาดำเนินการ						ผู้รับผิดชอบ
		มี.ค.-60	เม.ย.-60	พ.ค.-60	มิ.ย.-60	ก.ค.-60	ส.ค.-60	
3. เพื่อป้องกันกิจกรรมที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเกินมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินในแม่น้ำท่าจีนพร้อมวิเคราะห์และนำเสนอทางเลือกแบบเป็นขั้นตอน (tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้น ๆ	3.1 ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นจากปีที่ 1 ควบคู่กับการตรวจสอบคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ FCB และ TCB ตามที่กำหนดในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน							ดร.ขวัญรวี
	3.1.1 คัดเลือกสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำของกรมควบคุมมลพิษ จำนวน 11 สถานีในแม่น้ำท่าจีน ที่พบประวัติการปนเปื้อน FCB และ TCB เกินมาตรฐาน					↔		
	3.1.1 (ที่ดำเนินการจริง จำนวน 12 สถานี)					← - - - - - →		
	3.1.2 เก็บตัวอย่างน้ำตามสถานีดังกล่าว ครอบคลุมฤดูฝนและฤดูแล้งเป็นระยะเวลา 1 ปี จำนวน 4 ครั้ง (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61) ทำการกรองและสกัดดีเอ็นเอ					↔		
	3.1.2 (ที่ดำเนินการจริง จำนวน 2 ครั้งเพื่อเป็นตัวแทนฤดูฝน คือ 29 ก.ค. 60 และ 19 ส.ค. 60)					← - - - - - →		
	3.1.3 ตรวจวัดคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ FCB, TCB และ E. coli (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61)					↔		
	3.1.3 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างน้ำที่เก็บ 2 ครั้ง)					← - - - - - →		
	3.1.4 ตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณที่พัฒนาขึ้น (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61)					↔		
	3.1.4 (ที่ดำเนินการจริง)					← - - - - - →		
	3.2 รวบรวมข้อมูลคุณภาพน้ำพารามิเตอร์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง จากการติดตามตรวจสอบประจำปีของกรมควบคุมมลพิษ เช่น พีเอช อุณหภูมิ บีโอดีของแข็งทั้งหมด โคลิฟอร์ม เป็นต้น					↔		
	3.2 (ที่ดำเนินการจริง ทำการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ในตัวอย่างน้ำเอง เนื่องจากรอบการเก็บน้ำไม่พร้อมกับการติดตามตรวจสอบประจำปีของกรมควบคุมมลพิษ)					← - - - - - →		

ตารางที่ ๓ กิจกรรมที่ดำเนินการในรอบหกเดือนที่สามเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย (เปรียบเทียบแผนที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่แท้จริง)

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก/กิจกรรมรอง	ช่วงเวลาดำเนินการ						ผู้รับผิดชอบ
		ก.ย.-60	ต.ค.-60	พ.ย.-60	ธ.ค.-60	ม.ค.-61	ก.พ.-61	
3. เพื่อป้องกันกิจกรรมที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเกินมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินในแม่น้ำท่าจีนพร้อมวิเคราะห์และนำเสนอทางเลือกแบบเป็นขั้นตอน (tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้นๆ	3.1 ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นจากปีที่ 1	←						ดร.ขวัญรวี
	ควบคู่กับการตรวจสอบคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ FCB และ TCB ตามที่กำหนดในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน (แผนดำเนินการ ก.ค. 60 - เม.ย. 61)							
	3.1.2 เก็บตัวอย่างน้ำตามสถานีดังกล่าว					←	→	
	ครอบคลุมฤดูฝนและฤดูแล้งเป็นระยะเวลา 1 ปี จำนวน 4 ครั้ง (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61) ทำการกรองและสกัดดีเอ็นเอ							
	3.1.2 (ที่ดำเนินการจริง เก็บน้ำฤดูแล้ง 1 ครั้ง ในเดือน ก.พ. 61)						←---	
	3.1.3 ตรวจวัดคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ FCB, TCB และ E. coli (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61)					←	→	ดร.ขวัญรวี
	3.1.3 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูแล้ง 1 ครั้งในเดือน ก.พ. 61)						←---	
	3.1.4 ตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีพีซีอาร์และพีซีอาร์เชิงปริมาณที่พัฒนาขึ้น (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61)	←						
	3.1.4 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูฝน 2 ครั้ง และฤดูแล้ง 1 ครั้ง)	←---	---	---	---		←---	
	3.2 รวบรวมข้อมูลคุณภาพน้ำพารามิเตอร์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง จากการติดตามตรวจสอบประจำปีของกรมควบคุมมลพิษ เช่น พีเอช อุณหภูมิ บีโอดี ของแข็งทั้งหมด โคลิฟอร์ม เป็นต้น					←	→	
	3.2 (ที่ดำเนินการจริง ทำการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ในตัวอย่างน้ำเอง เนื่องจากการเก็บน้ำไม่พร้อมกับการติดตามตรวจสอบประจำปีของกรมควบคุมมลพิษ)						←---	
	3.3 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ (แผนดำเนินการ ก.ค. 60 - มิ.ย. 61)	←						ดร.ปิณิดา
	3.3.1 วิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์คุณภาพน้ำอื่นๆ	←						
	3.3.1 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูฝน 2 ครั้ง)	←---	---	---	---	---	---	
	3.3.2 วิเคราะห์ทางสถิติเพื่อประเมินความเชื่อมโยงของแหล่งที่มาหลักของการปนเปื้อนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในแม่น้ำท่าจีน และสัดส่วนที่มาจากชุมชน ฟาร์มสุกร และฟาร์มโค	←						
	3.3.2 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูฝน 2 ครั้ง)	←---	---	---	---	---	---	

ตารางที่ ๑๔ กิจกรรมที่ดำเนินการในรอบหกเดือนสุดท้ายเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย (เปรียบเทียบแผนที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่แท้จริง)

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก/กิจกรรมรอง	ช่วงเวลาดำเนินการ						ผู้รับผิดชอบ
		มี.ค.-61	เม.ย.-61	พ.ค.-61	มิ.ย.-61	ก.ค.-61	ส.ค.-61	
3. เพื่อบ่งชี้กิจกรรมที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเกินมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินในแม่น้ำท่าจีน พร้อมวิเคราะห์และนำเสนอทางเลือกแบบเป็นขั้นตอน (tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความรุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้น ๆ	3.1 ตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นจากปีที่ 1 ควบคู่กับการตรวจสอบคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ FCB และ TCB ตามที่กำหนดในมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน (แผนดำเนินการ ก.ค. 60 - เม.ย. 61)	←	→					ดร.ขวัญรวี
	3.1.2 เก็บตัวอย่างน้ำตามสถานีดังกล่าวสำหรับฤดูแล้ง 1 ครั้ง (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61) ทำการกรองและสกัดดีเอ็นเอ	←	→					
	3.1.2 (ที่ดำเนินการจริง เก็บน้ำฤดูแล้ง 1 ครั้ง ในเดือน มี.ค. 61)	←	→					
	3.1.3 ตรวจวัดคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ FCB, TCB และ E. coli (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61) สำหรับฤดูแล้ง 1 ครั้ง	←	→					
	3.1.3 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูแล้ง 1 ครั้งในเดือน มี.ค. 61)	←	→					
	3.1.4 ตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดด้วยวิธีพีซีอาร์ และพีซีอาร์เชิงปริมาณที่พัฒนาขึ้น (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61) สำหรับฤดูแล้ง 1 ครั้ง	←	→					
	3.1.4 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูแล้ง 1 ครั้ง)	←	→					
	3.2 ตรวจวัดคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ FCB, TCB และ E. coli (แผนครอบคลุมเดือน ก.ค. 60 - เม.ย. 61)	←	→					
	3.2 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูแล้ง 1 ครั้ง)	←	→					
	3.3 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ (แผนดำเนินการ ก.ค. 60 - มิ.ย. 61)	←	→					ดร.ปิณิดา
	3.3.1 วิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์คุณภาพน้ำอื่นๆ	←	→					
	3.3.1 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูแล้ง 2 ครั้ง)	←	→					
	3.3.2 วิเคราะห์ทางสถิติเพื่อประเมินความเชื่อมโยงของแหล่งที่มาหลักของการปนเปื้อนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในแม่น้ำท่าจีน และสัดส่วนที่มาจากชุมชนฟาร์มสุกร และฟาร์มโค	←	→					
	3.3.2 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูแล้ง 2 ครั้ง)	←	→					

ตารางที่ ๓๔ (ต่อ) กิจกรรมที่ดำเนินการในรอบหกเดือนสุดท้ายเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย (เปรียบเทียบแผนที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง)

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก/กิจกรรมรอง	ช่วงเวลาดำเนินการ						ผู้รับผิดชอบ
		มี.ค.-61	เม.ย.-61	พ.ค.-61	มิ.ย.-61	ก.ค.-61	ส.ค.-61	
4. เพื่อจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำผิวดิน และจัดทำข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย (Policy brief)	4.1 จัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำผิวดิน			←				ดร.ปิณดา/ดร.ขวัญรวี
	4.1.1 สรุปรายงานพารามิเตอร์ที่บ่งชี้กิจกรรมได้ ตามที่ได้พัฒนาในปีที่ 1			←				
	4.1.1 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูฝน 2 ครั้ง ฤดูแล้ง 2 ครั้ง)			← - - - - - →				
	4.1.2 สรุปเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์วิธีการเก็บตัวอย่างและการรักษาสภาพตัวอย่างสำหรับส่งให้ห้องปฏิบัติการ			←				
	4.1.2 (ที่ดำเนินการจริง สำหรับตัวอย่างฤดูฝน 2 ครั้ง ฤดูแล้ง 2 ครั้ง)			← - - - - - →				
	4.2 จัดทำข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย (Policy brief)			←				
	4.3 จัดประชุมเพื่อเผยแพร่ข้อเสนอแนวทางและผลงานวิจัยต่อสาธารณะและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และจัดพิมพ์เอกสารเผยแพร่			←				
	4.3 (ที่ดำเนินการจริง)			← - - - - - →				

โดยการประเมินผลที่ได้ (Output) ดังแสดงในตารางที่ ๓๕, ๓๖, ๓๗ และ ๓๘

ตารางที่ ญ5 ผลที่ได้จากโครงการในหกเดือนแรก (เปรียบเทียบผลที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และผลที่ได้จริง)

Output	ผลสำเร็จ (%)	สาเหตุและการแก้ไขที่ ดำเนินการในกรณี ล่าช้า
1. รายงานความจำเป็นของการจำแนกแหล่งกำเนิดมลพิษในบริบทของประเทศไทย การวิเคราะห์ช่องว่างของกฎระเบียบข้อบังคับและมาตรฐานน้ำผิวดินในปัจจุบันของประเทศไทย รวมถึงกรณีศึกษาจากต่างประเทศในการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่เชื่อมโยงกับแหล่งกำเนิดมลพิษมาสนับสนุนระดับนโยบายในการจัดการมลพิษแหล่งน้ำ	100% (โปรดดูภาคผนวก ก.)	-
2. มาตรฐานการปฏิบัติงานวิธีพีซีอาร์สำหรับตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียที่เชื่อมโยงแหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมได้ อย่างน้อย 1-2 คู่มือเมอร์สำหรับแต่ละชนิดแหล่งกำเนิดหลัก	100% (โปรดดูภาคผนวก ข.)	-
3. บทความวิชาการจำนวน 2 เรื่อง	100% Pornjira Somnark, Natcha Chyerochana, Skorn Mongkolsuk, and Kwanrawee Sirikanchana (2018) Performance evaluation of Bacteroidales genetic markers for human and animal microbial source tracking in tropical agricultural watersheds. Environmental Pollution. 236C, 100-110. (impact factor 5.099) (โปรดดูภาคผนวก ช.)	-
	100% PCR data and comparative performance of <i>Bacteroidales</i> microbial source tracking genetic markers (โปรดดูภาคผนวก ช.)	-

ตารางที่ ญ6 ผลที่ได้จากโครงการในรอบหกเดือนที่สอง (เปรียบเทียบผลที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และผลที่ได้จริง)

Output	ผลสำเร็จ (%)	สาเหตุและการแก้ไขที่ดำเนินการ ในกรณีล่าช้า
1.มาตรฐานการปฏิบัติงานวิธีพีซีอาร์เชิงปริมาณ สำหรับตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียที่เชื่อมโยง แหล่งกำเนิดมลพิษเฉพาะกิจกรรมได้ อย่างน้อย 1-2 คู่ไพรเมอร์ สำหรับแต่ละชนิดแหล่งกำเนิด เป้าหมาย	100% (โปรดดู ภาคผนวก ข11.)	-
2. รายงานการวิเคราะห์ความเหมาะสมของ วิธีการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ โดย เปรียบเทียบระหว่างวิธีพีซีอาร์ และพีซีอาร์เชิง ปริมาณ ในด้านต้นทุน ข้อได้เปรียบและข้อจำกัด ต่างๆทางเทคนิค	100% (โปรดดู หัวข้อ 3.4)	-
3. บทความวิชาการจำนวน 1 เรื่อง หัวข้อ “Validation of quantitative PCR assays specific to human-, swine-, cattle-, and chicken-fecal pollution in a tropical river”	80%	ขณะนี้ได้ผลการทดลองครบถ้วนตรง ตามเวลา แต่อยู่ในระหว่างดำเนินการ เขียน คาดว่าจะส่งตีพิมพ์ได้ในเดือน ตุลาคม 2561

ตารางที่ ญ7 ผลที่ได้จากโครงการในรอบหกเดือนที่สาม (เปรียบเทียบผลที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และผลที่ได้จริง)

Output	ผลสำเร็จ (%)	สาเหตุและการแก้ไขที่ ดำเนินการในกรณีล่าช้า
1. บทวิเคราะห์สัดส่วนและแหล่งที่มาหลักของ การปนเปื้อนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในแหล่ง น้ำท่าจีน จากการเก็บน้ำ 2 ครั้ง	100% (โปรดดูหัวข้อ 3.6)	-
2. บทวิเคราะห์และทางเลือกในการวิเคราะห์ที่ นำเสนอแบบเป็นขั้นตอน (tier approach) เพื่อให้เหมาะสมกับงบประมาณและความ รุนแรงของปัญหาในพื้นที่นั้นๆ	100% (โปรดดูหัวข้อ 3.7)	-

ตารางที่ ๗8 ผลที่ได้จากโครงการในรอบหกเดือนสุดท้าย (เปรียบเทียบผลที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และผลที่ได้จริง)

Output	ผลสำเร็จ (%)	สาเหตุและการแก้ไขที่ดำเนินการ ในกรณีล่าช้า
1. คู่มือปฏิบัติการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในแหล่งน้ำผิวดิน	100%	—
2. ข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย (Policy brief) เพื่อเผยแพร่แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง	100%	—
3. จัดทำเอกสารเผยแพร่และจัดประชุมเผยแพร่สู่หน่วยงานผู้ใช้และสาธารณะ	70%	ได้ทำการจัดการประชุมในหัวข้อ “Thailand 4.0 กับนวัตกรรมการจัดการแหล่งกำเนิดมลพิษ non-point sources” วันพุธที่ 25 กรกฎาคม 2561 ณ ห้องคริสตัล 1-2 โรงแรมเซ็นจูรี พาร์ค กรุงเทพมหานคร ซึ่งกำลังอยู่ในการดำเนินการเผยแพร่
4. บทความวิชาการจำนวน 1 เรื่อง หัวข้อ “Identification of fecal sources using quantitative PCR assays in Tha Chin river, Thailand”	80%	ขณะนี้ได้ผลการทดลองครบถ้วนตรงตามเวลา แต่อยู่ระหว่างดำเนินการเขียน คาดว่าจะส่งตีพิมพ์ได้ในเดือนตุลาคม 2561

