การศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคที่สำคัญจากตัวอย่างน้ำขยะในเขตกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี และอยุธยา

นางสุภาพ เหมืองแก้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN : 974-17-5951-7
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY OF TYPE AND QUANTITY OF PATHOGENIC MICROORGANISMS FROM LEACHATE IN BANGKOK, PATHUMTHANEE, AND AYUTTHAYA

Mrs. Suphap Muangkeao

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for The Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health
Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN : 974-17-5951-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคที่สำคัญจากตัวอย่างน้ำขยะในเขตกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี และอยุธยา
โดย	นางสุภาพ เหมืองแก้ว
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.อรรณพ คุณาวงศ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อลงกร อมรศิลป์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ เกรียงศักดิ์ พูนสุข)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุภาพ เหมืองแก้ว : การศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคที่สำคัญจากตัวอย่างน้ำขยะในเขตกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี และอยุธยา (STUDY OF TYPE AND QUANTITY OF PATHOGENIC MICROORGANISMS FROM LEACHATE IN BANGKOK, PATHUMTHANEE, AND AYUTTHAYA) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.น.สพ.ดร.อลงกร อมรศิลป์; 67 หน้า, ISBN 974-17-5951-7

การศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจหาชนิดและ ปริมาณของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคจากตัวอย่างน้ำขยะ จากสถานีขนถ่ายขยะและสถานที่ฝังกลบขยะ ในเขตกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี และอยุธยา จำนวน 5 สถานี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 150 ตัวอย่าง ทำการเก็บ 3 ช่วงฤดูกาล ระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2547 ถึง กรกฎาคม 2548 นำมาตรวจด้วยวิธีมาตรฐานเพื่อหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพทั้ง 5 ชนิดได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, และ *Candida albicans* โดยเลือกลักษณะโคโลนีเฉพาะของแต่ละเชื้อ นำมาตรวจยืนยันด้วย API medium kit และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อด้วยปฏิกิริลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ผลการวิเคราะห์พบว่าน้ำขยะจากทุกสถานีและทุกฤดูกาลมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด, *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, และ *C. albicans* เท่ากับ 3.6×10^5-3.4×10^9, 3.3×10^4-5.8×10^8, 1.8×10^2-2.5×10^5, 1.3×10^3-2.6×10^5 และ 2.6×10^1-5.8×10^3 CFU/ml. ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค PCR พบว่าเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella* spp., และ *C. albicans* ให้ผลบวก 100 % จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบเชื้อ *S.* Typhi ในน้ำขยะทุกตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม.....

4675588831 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEYWORD : LEACHATE / *Salmonella* Typhi / *Escherichia coli* / *Bacillus cereus* / *Staphylococcus aureus* / *Candida albicans*

SUPHAP MUANGKEAO : STUDY OF TYPE AND QUANTITY OF PATHOGENIC MICROORGANISMS FROM LEACHATE IN BANGKOK, PATHUMTHANEE, AND AYUTTHAYA.THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUTHEP RUANGWISES, Ph.D.THESIS COADVISOR : ASST. PROF.ALONGKORN AMONSIN, D.V.M., Ph.D. 67 PP. ISBN 974-17-5951-7.

The aim of this study was to assess type and quantity of pathogenic microorganisms from leachate in rubbish transfer station and landfill in Bangkok, Patumthani, and Ayutthaya of Thailand. One hundred and fifty leachate samples were collected from three seasons between November 2004 to July 2005. Samples were examined for total viable microorganisms by standard plate count method. The samples were also detected for potentially pathogenic microorganism; *Escherichia coli, Salmonella* Typhi, *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, and Candida albicans.* The typical colonies of those indicator microorganisms were isolated by selective media, and the suspected colonies were confirmed by API medium kits and amplified with specific primers to those microorganisms by polymerase chain reaction (PCR). The total viable count, *E .coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, and *C. albicans* of the leachate samples were found in mean of 3.6×10^5-3.4×10^9, 3.3×10^4-5.8×10^8, 1.3×10^3-2.6×10^5, 1.8×10^2-2.5×10^5, and 2.6×10^1-5.2×10^3 CFU/ml respectively. The incidence of *B. cereus*, *S. aureus*, *C. albicans*, and *Salmonella* spp. Are 100% . *S.* Typhi was not found in all leachate samples.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Veterinary Public Health
Field of Veterinary Public Health
Academic year 2005

Student's signature .....
Advisor's signature .....
Co-advisor's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. อลงกร อมรศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ส.พญ. ดร.รุ่งทิพย์ ชวนชื่น ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และแก้ไขในสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ประจำภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขทุกท่านให้การศึกษาและข้อคิดเห็นเพิ่มเติม รวมทั้งอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทดลอง

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จันเพ็ญ วิวัฒน์ และผู้ช่วยวิจัย คุณ วรัญญา วรดุลยพินิจ และคุณรัชนีกร บุญชัยสุข ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ สารเคมี และเครื่องมือในการศึกษาวิจัยช่วงแรก

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ น.สพ. เกรียงศักดิ์ พูนสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณไฉไล คูวัฒนานุกูล น. สพ. ศุภสวัสดิ์ บุรณเวช และ ส.พญ.นวลอนงค์ ปริโยธร ส.พญ.นุชนารถ ทิพย์มงคลศิลป์ นักวิทยาศาสตร์และนิสิตปริญญาโท ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ที่ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจอย่างมากในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวของผู้วิจัยที่สนับสนุนให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

ขยะ..... 6

ลักษณะทั่วไปของขยะและน้ำขยะ..... 7

ประเภทของขยะตามแหล่งที่มา..... 7

ความสำคัญของขยะ..... 8

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำขยะ..... 9

รายงานการพบเชื้อแบคทีเรียจุลินทรีย์จากน้ำเสีย น้ำทิ้ง และน้ำขยะ..... 10

ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย..... 12

Salmonella Typhi..... 12

Escherichia coli..... 13

Staphylococcus aureus..... 14

Bacillus cereus..... 14

Candida albicans..... 15

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 16

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 16

ตัวอย่างที่ทำการศึกษา..... 16

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 17

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย..... 19

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย..... 19

หน้า

นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ (primers) ที่ใช้ในงานวิจัย..... 20
วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 20
1.การตรวจวิเคราะห์จำนวนและชนิดแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค..... 22
2.การตรวจยืนยันชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค..... 23
3.การตรวจสอบเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 24
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 27
4.1 ผลการวิเคราะห์จำนวนและชนิดแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค..... 27
4.2 ผลการตรวจยืนยันชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค..... 31
4.3 ผลการตรวจสอบเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส..... 32
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ..... 37
รายการอ้างอิง..... 43
ภาคผนวก..... 50
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 67

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการยืนยันเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส..... 20

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ..... 23

ตารางที่ 3 PCR-conditions สำหรับที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส..... 26

ตารางที่ 4 ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด..... 28

ตารางที่ 5 ผลการตรวจนับจำนวน *E. coli* 29

ตารางที่ 6 ผลการตรวจนับจำนวน *S. aureus* 29

ตารางที่ 7 ผลการตรวจนับจำนวน *B. cereus* 30

ตารางที่ 8 ผลการตรวจนับจำนวน *C. albicans* 30

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนของแบคทีเรียและเชื้อราที่ตรวจลักษณะทางชีวเคมี
ด้วย API medium kit..... 32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 สัดส่วนปริมาณการเกิดขยะทั่วประเทศปี พ.ศ. 2548……..…… 2

รูปที่ 2 ปริมาณการใช้ประโยชน์จากขยะระหว่างปี พ.ศ. 2544- 2548…….. 2

รูปที่ 3 ปริมาณขยะในเขตกรุงเทพมหานครที่เกิดขึ้นระหว่างปี พ.ศ. 2546- 2548…… 3

รูปที่ 4 แผนผังการจัดการขยะของกรุงเทพมหานคร……. 4

รูปที่ 5 สัดส่วนองค์ประกอบของขยะเทศบาลทั่วประเทศในปี พ. ศ.2547…….. 7

รูปที่ 6 แผนที่แสดงที่ตั้งสถานีขนถ่ายขยะและสถานที่ฝังกลบขยะ…….. 17

รูปที่ 7 แผนภาพแสดงขั้นตอนของการดำเนินการวิจัย…….. 21

รูปที่ 8 แสดงอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส PCR product ของ *S. aureus* …… 33

รูปที่ 9 แสดงอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส PCR product ของ *Salmonella* Typhi …… 34

รูปที่ 10 แสดงอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส PCR product ของ *B. cereus* …… 35

รูปที่ 11 แสดงอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส PCR product ของ *C. albicans* …….. 36

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

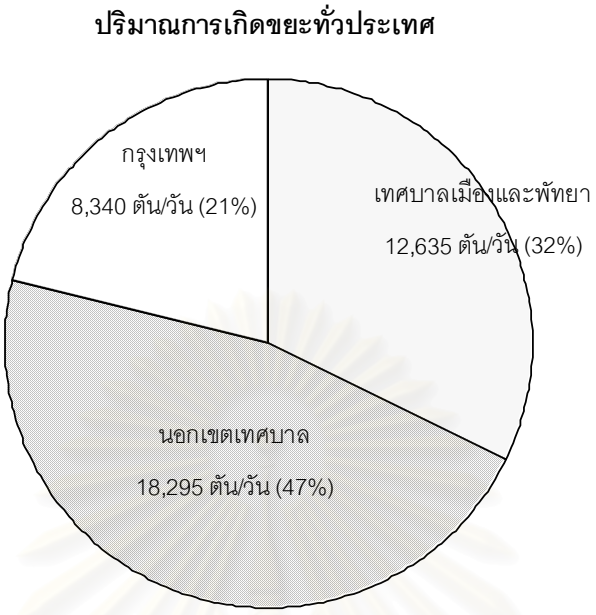
บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

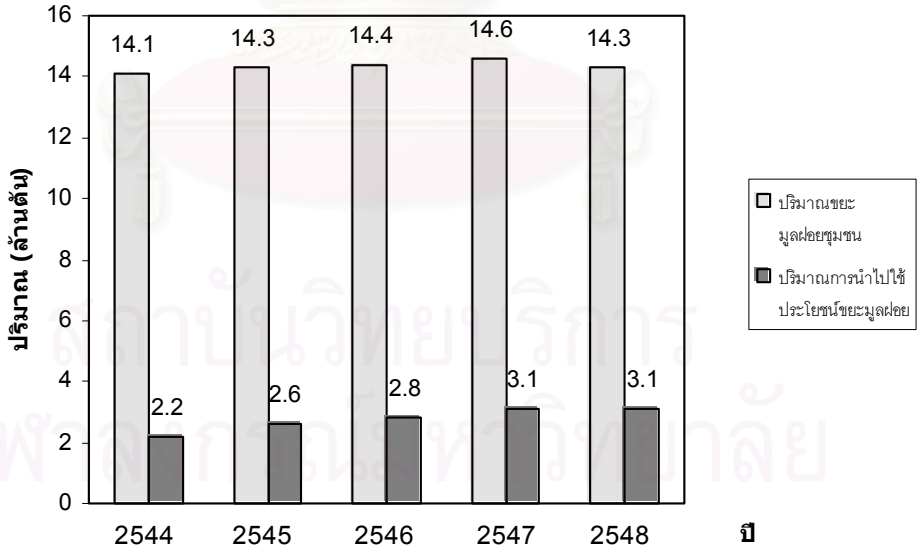
ในปัจจุบัน ขยะเป็นปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมและสังคมที่สำคัญมากของประเทศไทย เนื่องจากการพัฒนาประเทศอย่างต่อเนื่อง และการเพิ่มจำนวนของประชากรอย่างสม่ำเสมอ ตลอดจนมาตรฐานการดำรงชีวิตที่ดีขึ้นทำให้เกิดปริมาณขยะ วัสดุเหลือใช้ และของเสียต่างๆ เพิ่มมากขึ้นซึ่งได้แก่ ขยะทิ้งจากบ้านเรือน ซึ่งเป็นเศษอาหารที่เหลือจากการบริโภค รวมถึงพลาสติกและของที่ไม่ใช้แล้ว ขยะจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีลักษณะต่างๆ ตามประเภทของอุตสาหกรรมนั้นๆ ขยะที่ถูกทิ้งตามถนน แม่น้ำ ลำคลอง ที่สาธารณะส่วนใหญ่จะเป็นใบไม้กิ่งไม้ เศษกระดาษ ถุงพลาสติกและ เศษอาหาร เป็นต้น

ในปี พ.ศ. 2548 พบว่าประเทศไทยมีปริมาณขยะเกิดขึ้นทั่วประเทศประมาณ 14.3 ล้านตันซึ่งลดลงจากปี พ.ศ. 2547 (0.40 ล้านตัน) เฉพาะในเขตกรุงเทพมหานคร มีปริมาณขยะเกิดขึ้นวันละ 8,340 ตันต่อวัน ในขณะที่ปริมาณขยะในเขตเทศบาลและเมืองพัทยามีปริมาณวันละ 12,635 ตันต่อวัน และนอกเขตเทศบาลซึ่งครอบคลุมพื้นที่องค์การบริหารส่วนตำบลทั้งหมดประมาณวันละ 18,295 ตันต่อวัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2548) โดยสัดส่วนปริมาณขยะทั่วประเทศแสดงดังรูปที่ 1 ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ขยะในกรุงเทพมหานครลดลง จากรูปที่ 2 และ 3 จะเห็นได้ว่าขยะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดลงสืบเนื่องมาจากภาวะเศรษฐกิจที่ถดถอย ทั้งภาคธุรกิจและเอกชน ประกอบกับนโยบายของกรุงเทพมหานครที่ให้มีโครงการรณรงค์และส่งเสริมการคัดแยกขยะเพื่อนำกลับไปรีไซเคิล และมุ่งเน้นให้ประชาชนมีส่วนร่วมรับผิดชอบการดำเนินการลดและคัดแยกขยะ การเรียกคืนซากบรรจุภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ รวมทั้งมีการนำขยะกลับมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุด สำนักงานสถิติแห่งชาติคาดการณ์ว่าภายในปี พ.ศ. 2558 จะมีปริมาณขยะในกรุงเทพมหานคร เพิ่มขึ้นเป็น 18,750 ตันต่อวัน หมายความว่าในแต่ละปีจะมีขยะเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 8 ต่อปี หรืออัตราการผลิตขยะของคนกรุงเทพมหานครเพิ่มขึ้นเป็น 1.63 กิโลกรัมต่อวันต่อคน (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2547) ในขณะที่สำนักรักษาความสะอาดของกรุงเทพมหานคร สามารถเก็บรวบรวมขยะได้ค่อนข้างคงที่ประมาณร้อยละ 68.5 ของปริมาณขยะที่เกิดขึ้นทั้งหมด ดังนั้นจึงยังมีขยะที่เหลือร้อยละ 31.5 กระจายตามสถานที่ต่างๆ เช่น บ้านเรือน บนถนน ในแหล่งน้ำ ท่อระบายน้ำและที่ดินว่างเปล่า ฯลฯ ซึ่งบางส่วนจะแห้งหรือย่อยสลายไปตามธรรมชาติ และบางส่วนถูกชะล้างด้วยน้ำหรือน้ำฝนกลายเป็นสิ่งปฏิกูลหมักหมมอยู่ในที่ต่างๆ ไหลสู่ใต้ดิน และแหล่งน้ำต่างๆ เช่น คูคลอง แม่น้ำ กลายเป็นปัญหามลพิษทางน้ำ



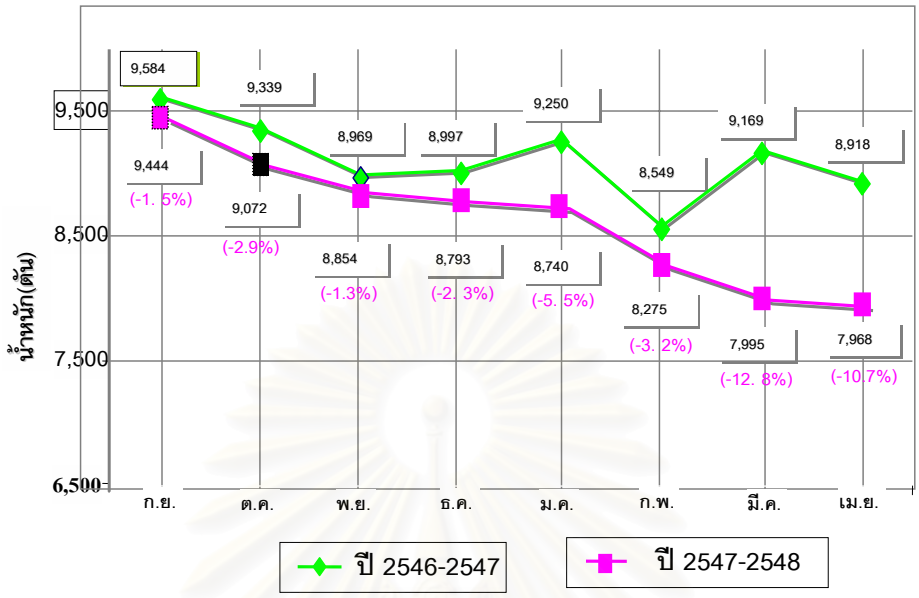
รูปที่ 1 สัดส่วนปริมาณการเกิดขยะทั่วประเทศปี พ.ศ. 2548

ที่มา : ดัดแปลงจากข้อมูลกรมควบคุมมลพิษ (2548)



รูปที่ 2 ปริมาณการใช้ประโยชน์ขยะระหว่างปี พ.ศ. 2544-2548

ที่มา : ดัดแปลงจากข้อมูลกรมควบคุมมลพิษ (2548)

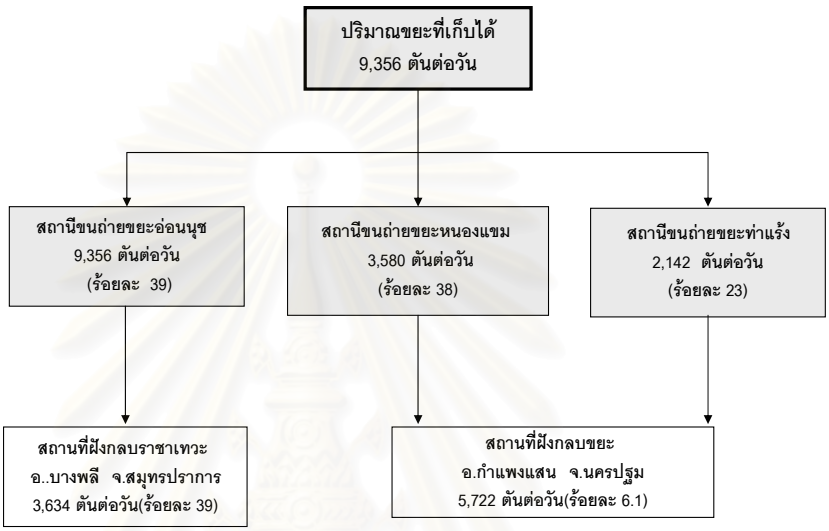


รูปที่ 3 ปริมาณขยะในเขตกรุงเทพมหานครที่เกิดขึ้นระหว่างปี 2546-2548

ที่มา : ดัดแปลงจากข้อมูลกรมควบคุมมลพิษ (2548)

ในการกำจัดขยะของกรุงเทพมหานครได้มีการว่าจ้างบริษัทเอกชนเพื่อเก็บรวบรวมขยะจากทั้ง 50 เขต และขนส่งไปกำจัดด้วยวิธีการฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาลที่อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และที่ตำบล ราชาเทวะ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ (รูปที่ 4) ซึ่งขยะเหล่านั้นจะถูกนำไปเทกองไว้กลางแจ้งเป็นภูเขาขยะตามสถานีกำจัดขยะและสถานที่ฝังกลบขยะ เพื่อรอการกำจัดหรือฝังกลบอย่างหลักถูกสุขาภิบาล นอกจากจะมีกลิ่นเหม็น เป็นแหล่งแพร่เชื้อโรคแล้ว ขยะที่นำไปกองไว้ส่วนใหญ่เป็นขยะเปียกรวมอยู่ด้วยและเมื่อขยะทั้งหมดถูกน้ำฝนชะล้างลงมาก็จะทำให้เกิดน้ำขยะที่เน่าเสีย มีกลิ่นเหม็น และไหลซึมผ่านออกมาจากกองขยะได้ตลอดเวลา น้ำขยะเหล่านี้เป็นผลมาจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักของกองขยะ รวมทั้งมีความชื้นมากกว่าร้อยละ 50 เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับขยะทำให้เชื้อโรคต่างๆเพิ่มปริมาณมากขึ้น หากน้ำขยะไหลลงสู่แหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียง อาจส่งผลกระทบต่อประชาชนได้ปัญหาหนึ่งที่ควรนำมาพิจารณาคือ ปัญหาทางด้านสุขภาพอนามัยของประชาชน โดยเฉพาะชุมชนที่อาศัยภายในบริเวณสถานที่กำจัดขยะ ชุมชนที่อยู่รอบบริเวณแหล่งกำจัดขยะ ซึ่งมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่จากการสัมผัสขยะหรือน้ำขยะหรือสารพิษที่มาจากกองขยะโดยตรง และน้ำขยะบางส่วนมีการปนเปื้อนลงแหล่งน้ำใต้ดิน น้ำบาดาล ในบริเวณที่มีการใช้น้ำเหล่านี้เพื่อการบริโภคและอุปโภค จึงมีโอกาสเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อโรคต่างๆ

นอกจากนั้นกองขยะยังเป็นแหล่งชุมนุมของสัตว์พาหะนำโรค เช่น ยุง แมลงวัน หนู แมลงสาบ และสัตว์เลี้ยงที่เป็นตัวแพร่กระจายเชื้อโรคไปสู่ประชาชนได้อีกทางหนึ่ง



รูปที่ 4 แผนผังการจัดการขยะของกรุงเทพมหานคร
ที่มา : สำนักรักษาความสะอาด, กรุงเทพมหานคร (2548)

ปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพอันเนื่องมาจากขยะที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี ประกอบกับข้อมูลของกรมอนามัยในเรื่องหลักเกณฑ์การควบคุมเชื้อโรคของกรมอนามัย ซึ่งได้จัดแบ่งระดับความเสี่ยงและความรุนแรงของผลกระทบที่จะมีต่อบุคคลและชุมชนออกเป็น 4 ระดับ คือ เชื้อโรคระดับความเสี่ยงที่ 1 ได้แก่ เชื้อโรคที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในคนที่มีสุขภาพดี มีความรุนแรงเล็กน้อยหรือไม่มีผลกระทบต่อบุคคลและชุมชน เชื้อโรคระดับความเสี่ยงที่ 2 ได้แก่ เชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคในคน มีความรุนแรงปานกลางต่อบุคคล แต่มีความรุนแรงเล็กน้อยหรือไม่มีผลกระทบต่อชุมชน เชื้อโรคระดับความเสี่ยงที่ 3 ได้แก่ เชื้อโรคโดยปกติมักก่อให้เกิดโรคในคนที่รุนแรง แต่ไม่สามารถแพร่กระจายจากคนสู่คนโดยการสัมผัส มีความรุนแรงสูงต่อบุคคล แต่มีความรุนแรงเล็กน้อยหรือไม่มีผลต่อชุมชน เชื้อโรคระดับความเสี่ยงที่ 4 ได้แก่ เชื้อที่โดยปกติก่อให้เกิดโรคในคนที่ร้ายแรง มีความรุนแรงสูงมากต่อบุคคลและชุมชน (กรมอนามัย, 2535)

จากข้อกำหนดของกรมอนามัยและปัญหาด้านสาธารณสุข ทำให้เล็งเห็นถึงความสำคัญในเรื่องสุขภาพอนามัยและความเสี่ยงต่อสุขภาพอันเกิดจาการติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารและโรคผิวหนัง จากรายงานของสำนักระบาดวิทยา (2541) กระทรวงสาธารณสุข จะพบว่าในช่วงปี พ.ศ. 2533 ถึง 2540 มีประชาชนป่วยด้วยโรคติดเชื้อที่มีผู้ป่วยมากที่สุดคือ โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน โรคอาหารเป็นพิษ โรคบิด และพบผู้ป่วยติดเชื้อโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมในอัตรา 0.85-1.7 ต่อประชากร 100,000 คน ประมาณ 6 % ที่พบว่าเสียชีวิต จากข้อมูลนี้จึงควรคำนึงถึงสุขภาพของคนที่ทำงานคลุกคลีอยู่กับการขุดคุ้ยหาสิ่งของในกองขยะ ประชาชนที่อาศัยบริเวณใกล้เคียง รวมถึงผู้ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับขยะ ไม่ว่าจะเป็นคนเก็บขยะ คนขับรถขยะ เจ้าหน้าที่ที่ดูแลสถานีขนถ่ายขยะโอกาสที่คนกลุ่มนี้จะได้รับเชื้อจุลินทรีย์จากขยะนั้นย่อมสูงกว่าคนทั่วไป ประกอบกับยังไม่มีรายงานการศึกษาเรื่องเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนมากับน้ำขยะ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเป็นข้อมูลที่นำไปใช้ในงานวิจัยต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาปริมาณและชนิดของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพอนามัยของประชาชน 5 ชนิดคือ *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli, Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus,* และเชื้อรา *Candida albicans* จากตัวอย่างน้ำขยะและน้ำขยะที่ไหลจากกองขยะลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะบริเวณโรงกำจัดขยะในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี และอยุธยา

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาปริมาณและชนิดแบคทีเรียและเชื้อราจากตัวอย่างน้ำขยะ บริเวณสถานีขนถ่ายและสถานที่ฝังกลบขยะในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล 5 สถานีคือ สถานีขนถ่ายขยะอ่อนนุช, สถานีขนถ่ายขยะหนองแขม, สถานีขนถ่ายขยะท่าแร้ง, จังหวัดกรุงเทพมหานคร สถานที่ฝังกลบขยะไทรน้อย จังหวัดอยุธยา และสถานที่ฝังกลบขยะคูคต (เดิม) จังหวัดปทุมธานี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อหาชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่สำคัญต่อสุขภาพของประชาชน และใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและแก้ไขปัญหามลพิษทางน้ำ ที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์เชื้อโรค
2. เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการประเมินความเสี่ยงทางด้านจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้อันตรายต่อสุขภาพอนามัยของประชาชน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

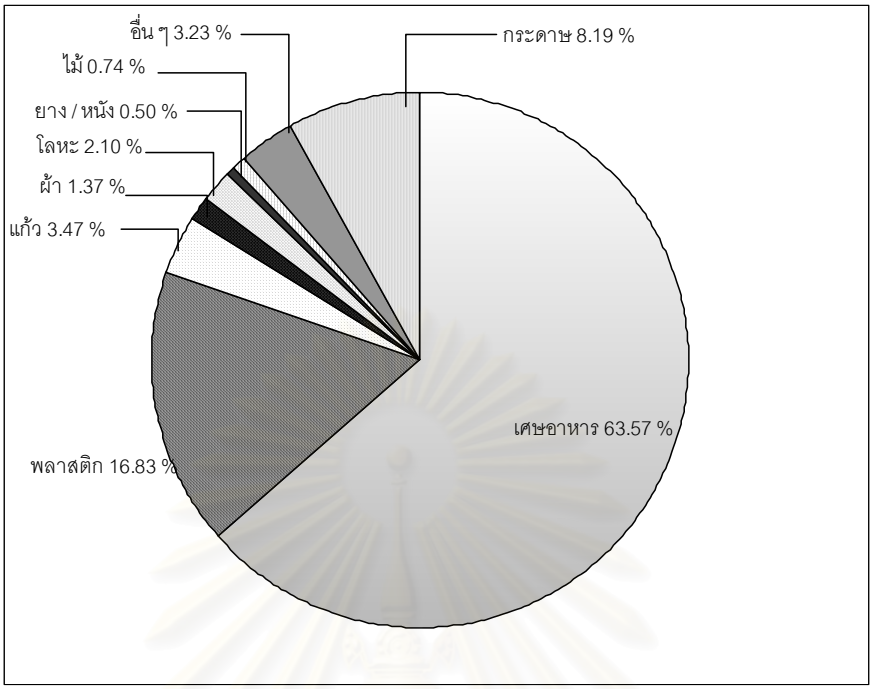
ความหมายของขยะ

ขยะหรือขยะมูลฝอย หมายถึง ของเสียที่อยู่ในรูปของแข็ง ซึ่งอาจจะมีความชื้นปะปนมาด้วยจำนวนหนึ่ง ขยะเหล่านี้มาจากอาคารที่พักอาศัย สถานที่ทำการ โรงงานอุตสาหกรรม หรือตลาดสด ซึ่งมีปริมาณและลักษณะแตกต่างกันออกไป โดยปกติแล้ววัตถุต่างๆ ที่ถูกทิ้งมาในรูปของขยะนั้น มีทั้งอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร สารวัตถุต่างๆ เหล่านี้บางชนิดก็สามารถย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ปนเปื้อนในเวลาอันรวดเร็ว โดยเฉพาะพวกเศษอาหาร เศษพืชผัก ผลไม้ แต่บางชนิดก็ไม่อาจจะย่อยสลายได้เลย เช่น พลาสติก เศษแก้ว โลหะ เป็นต้น (พรบ.สาธารณสุข, 2535)

ลักษณะทั่วไปของขยะและน้ำขยะ

รายงานการศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของขยะเทศบาล (Municipal solid waste) ก่อนมีการนำระบบบำบัดของเสียมาใช้ พบว่าส่วนใหญ่ขยะเทศบาลมีความชื้นมากกว่า 50% สำหรับประเทศไทยขยะมูลฝอยทั้งหมดมีปริมาณขยะสดที่เป็นเศษอาหาร ผัก และผลไม้ อยู่ประมาณร้อยละ 50, เศษกระดาษร้อยละ 10, ใบไม้และเศษกิ่งไม้ร้อยละ 5, ขยะที่ย่อยสลายไม่ได้ พลาสติกร้อยละ 14, เศษแก้ว กระป๋อง หินร้อยละ 5, เศษไม้ร้อยละ 4, โลหะร้อยละ 3, สิ่งทอร้อยละ 3, เศษยาง เครื่องหนังร้อยละ 2, ดิน และอื่นๆ ร้อยละ 4 (Visanathan *et al.,* 2004) ซึ่งข้อมูลสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของกรมควบคุมมลพิษ ปี พ.ศ.2547 ดังรูปที่ 5 (กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 สัดส่วนองค์ประกอบของขยะเทศบาลทั่วประเทศในปี พ. ศ. 2547

ที่มา : ดัดแปลงจากกรมควบคุมมลพิษ (2547)

ประเภทของขยะตามแหล่งที่มา

2.3.1. ขยะมูลฝอยจากถนน (Street Refuse) ได้แก่ เศษสิ่งของต่างๆ ที่ปรากฏและกวาดจากถนนตรอก ซอย เช่น เศษกระดาษ ผงฝุ่น ใบไม้ พลาสติก อิฐ หิน ทราย กรวด

2.3. 2. ขยะมูลฝอยที่เกิดจากสิ่งที่เหลือจากการเผาไหม้ที่เรียกว่า ขี้เถ้า (Ashes) เช่น เถ้าที่เกิดจากเตาไฟ, การเผาถ่าน ฯลฯ

2.3. 3. ขยะมูลฝอยจากการก่อสร้าง (Contruction Refuse) ได้แก่ เศษวัสดุก่อสร้าง เช่น เศษไม้ เศษกระเบื้อง เศษปูน อิฐหัก ฯลฯ

2.3. 4. ขยะมูลฝอยจากการรื้อถอนสิ่งก่อสร้าง (Demolition Refuse) ได้แก่ เศษสิ่งที่ไม่ต้องการที่เกิดจากการรื้อถอนอาคาร บ้านเรือนเก่า ฯลฯ

2.3.5. ซากสัตว์ (Dead Animal) จากสัตว์ตาย เน่าเปื่อย เหม็น

2.3. 6. ซากยานพาหนะ (Abandond Vehicles ทุกชนิดที่หมดสภาพ ใช้งานไม่ได้ รวมทั้งชิ้นส่วนประกอบ เช่น แบตเตอรี่ ยาง ฯลฯ

2.3.7. ขยะมูลฝอยจากโรงงานอุตสาหกรรม (Industrial Refuse) ได้แก่ เศษวัตถุที่เกิดจากการผลิต หรือขั้นตอนการผลิต

2.3.8. ขยะมูลฝอยประเภทที่เป็นอันตราย (Hazardous Refuse) ได้แก่ ขยะมูลฝอยที่ต้องการใช้

กรรมวิธีทำลายเป็นพิเศษ เช่น พลาสติก ฟิล์มถ่ายรูป กากแร่ธาตุต่างๆ

2.3. 9. ขยะสด (Garbage)

2.3.10. ขยะแห้ง (Rubbish)

2.3.11. ขยะพิเศษ (Special Wastes)

2.3.12. ของใช้ชำรุด (Buldy Wastes)

2.3.13. ขยะจากการกสิกรรม (Agricultural Wastes)

2.3.14. กากตะกอนของน้ำโสโครก (Sewage treatment residues)

ความสำคัญของขยะ

ขยะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมและมีผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของประชาชน เช่น มลพิษทางน้ำ (Water Pollution) มลพิษทางดิน (Soil Pollution) และมลพิษทางอากาศ (Air pollution) ทั้งยังเป็นแหล่งเพาะพันธุ์เชื้อโรคและแมลง (Breeding Places) ในขยะอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระดับสูง (Gaby, 1975) เนื่องจากขยะเป็นแหล่งรวมของสิ่งสกปรกที่ประกอบด้วย ของเสียจากเศษอาหาร ขยะจากบ้านเรือน อุจจาระของสัตว์เลี้ยง ผ้าอ้อมสำเร็จรูปของเด็ก รวมถึงกากตะกอนของน้ำขยะ (Lu,1985) ซึ่งเชื้อโรคต่างๆ เหล่านั้นบางชนิดมีความทนทานและสามารถเจริญต่อไปอีกระยะหนึ่ง โดยอาศัยขยะเป็นแหล่งเพาะพันธุ์และแพร่กระจายของเชื้อโรค และมีแมลงวันเป็นสัตว์นำโรคต่างๆ มาสู่คน นอกจากนี้น้ำเสียหรือน้ำทิ้งยังมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น เชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา รายงานส่วนใหญ่พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคทางเดินอาหาร โรคผิวหนัง และโรคระบบทางเดินหายใจ การกำจัดขยะที่ไม่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาลจะส่งผลกระทบทั้งสิ่งแวดล้อม สุขภาพอนามัย และสูญเสียเศรษฐกิจด้านอื่นๆ ตามมาอีกด้วย เช่น ขยะที่ทิ้งลงในแหล่งน้ำ น้ำขยะจากแหล่งรวบรวม และสถานที่ฝังกลบขยะ จำนวนไม่น้อยปล่อยลงสู่แหล่งน้ำซึ่งประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ แอมโมเนีย โลหะหนักและจุลินทรีย์จำนวนมาก ก่อให้เกิดการปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำผิวดิน และน้ำใต้ดินทำให้น้ำสกปรกและเน่าเสียได้ (Chistensen *et al*., 2001) รวมทั้งสัตว์น้ำซึ่งเป็นทรัพยากรทางธรรมชาติไม่อาจจะอยู่อาศัยต่อไปได้ จากสำรวจคุณภาพแหล่งของกรมควบคุมมลพิษในปี 2548 แหล่งน้ำผิวดินทั่วประเทศมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดีเพียงร้อยละ 48 เสื่อมโทรมร้อยละ 27 และเสื่อมโทรมมากร้อยละ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับปี 2547 พบว่าคุณภาพน้ำโดยรวมมีแนวโน้มเสื่อมโทรมมากขึ้น ซึ่งปัญหาส่วนใหญ่มาจากการระบายน้ำทิ้งจากกิจกรรมต่างๆ โดยไม่ผ่านการบำบัดทำให้มีความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (Biological Oxygen Demand) และแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliforms Bacteria) ค่อนข้างสูง แหล่งน้ำที่อยู่ในเกณฑ์เสื่อมโทรมมากส่วนใหญ่เป็นพื้นที่เดิม ได้แก่ แม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง แม่น้ำท่าจีนตอนล่าง และแม่น้ำลำตะคองตอนล่าง (กรมควบคุมมลพิษ, 2548)

นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งรวบรวมขยะมูลฝอย หรือบริเวณฝังกลบขยะส่วนใหญ่มีปัญหาเรื่องการปล่อยน้ำเสียที่ไหลออกมาจากกองน้ำขยะ หรือ รถขนถ่ายขยะ และน้ำขยะที่เกิดจากการล้างรถขนขยะ โดยปล่อยทิ้งลงบริเวณพื้นที่รอบๆ สถานีนั้นๆ ทั้งยังส่งกลิ่นเหม็นเป็นที่รำคาญของผู้ที่อาศัยบริเวณใกล้เคียง น้ำขยะ (leachate) หรือน้ำชะละลายจากกองขยะ คือ น้ำเสียเกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายสารอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน ในปฏิกิริยาระยะแรกเป็นการย่อยสลายโดยกระบวนการใช้ออกซิเจนทำให้มีปริมาณน้ำขยะออกมามาก หลังจากนั้นเป็นการย่อยสลายโดยกระบวนการไม่ใช้ออกซิเจนก่อให้เกิดก๊าซหลายชนิด เช่น แอมโมเนีย (Ammonia), ก๊าซมีเทน (Methane), ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide), ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen), ไนตรัสออกไซด์ (Nitrousoxide) ออกซิเจน (Oxygen), และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide) ก๊าซแหล่านี้บางชนิดอาจมีผลร้ายแรงต่อสิ่งแวดล้อมได้ (สำนักรักษาความสะอาด, 2547)

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำขยะ

น้ำขยะที่ไหลจากกองขยะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาเนื่องจากปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำขยะ เช่น ส่วนประกอบของขยะ, ลักษณะของขยะ, ความชื้น, ปริมาณออกซิเจน, ค่าความเป็นกรดด่าง, อุณหภูมิ, อายุของกองขยะ, รูปแบบการฝังกลบขยะ, และกิจกรรมการย่อยสลายของเชื้อจุลินทรีย์ในขยะ (Chen and Bowerman., 1974) ขยะเทศบาลส่วนใหญ่ประกอบด้วยขยะอินทรีย์ที่ย่อยสลายง่าย เช่น เศษอาหาร ผัก ผลไม้ และของเสียจากสัตว์เลี้ยง หากมีการย่อยสลายเป็นน้ำขยะจะมีคุณสมบัติทางเคมีคือ มีสีน้ำตาลจนถึงสีดำ มีค่าความเป็นกรดด่างที่ (pH) 4.5-9 ความสามารถในการใช้ออกซิเจน BOD ประมาณ 20-40,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า COD 500 - 6,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โลหะหนัก เช่น ตะกั่ว สารหนู โครเมี่ยม ฯลฯ 15,000 ถึง 105,000 มคก. ต่อลิตร (µg/L) (Debra and Caroline., 1998)

รายงานการพบเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำเสีย น้ำทิ้ง และน้ำขยะ

การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์โดยทั่วไปจาก น้ำเสีย น้ำทิ้งจากกองขยะและน้ำทิ้งจากชุมชน พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียชนิด Coliforms, fecal coliforms, fecal streptococci, และ Total viable counts ซึ่งปริมาณของเชื้อแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงตามอายุและสัดส่วนของสารเคมีในน้ำขยะ (Debra and Caroline., 1998) แม้ในน้ำขยะจะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียจำนวนมาก แต่ลักษณะทางเคมีของน้ำขยะก็มีอิทธิพลต่อการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่ง Ware (1980) ทำการศึกษา พบว่าอายุของขยะมีผลต่อการตายของเชื้อแบคทีเรียในน้ำขยะ โดยกองขยะอายุน้อยประมาณ 5-10 ปีจะมีกิจกรรมการย่อยสลายสูงมากเป็นผลให้อุณหภูมิสูงขึ้น pH ต่ำลง สภาวะเหล่านี้ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโต

และการอยู่รอดของแบคทีเรีย ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียจึงมีการตายอย่างรวดเร็วที่ pH ต่ำ ในทางเดียวกันอุณหภูมิและ pH ที่ไม่เหมาะสมมีผลต่อกิจกรรมของแบคทีเรียได้ (Lu, 1985)

แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในน้ำทิ้ง น้ำเสียจากชุมชนและน้ำขยะเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 27-32°ซ (Mesophilic bacteria) มักพบว่ามาจากการปนเปื้อนอุจจาระของคนและสัตว์เลี้ยง คือ กลุ่ม Colifroms, *E. coli* บางชนิด (APHA, 1992) เพราะแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตและปรับตัวได้ดีในสิ่งแวดล้อม หากเชื้อในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงจัดว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Thermotolerant Coliforms ซึ่งอาจมาจากการปล่อยน้ำเสียที่ของโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงฆ่าสัตว์ที่ทันสมัย โรงงานแปรรูปอาหารที่มีการใช้ความร้อนในขบวนการผลิต

การศึกษาวิจัยทางด้านจุลชีววิทยาเกี่ยวกับน้ำเสีย น้ำทิ้ง น้ำชะล้างจากกองขยะ (leachate) บริเวณขยะฝังกลบเมือง Snohomish ประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีน้ำขยะไหลออกมาปีละ 50-100 ล้านลิตร (Donnelly and Scarpino, 1974) พบเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลัยฟอร์มเป็นหลักจากทุกตัวอย่างที่เก็บในท่อระบายน้ำขยะ ต่อมาในปี ค.ศ. 1974 EPA ศึกษาเพิ่มเติมจากน้ำใต้ดิน และดินรอบๆ ที่ฝังกลบขยะ พบเชื้อแบคทีเรีย *C. perfringens*, *S. aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ รวมทั้งแบคทีเรียที่พบเมื่อนำมาศึกษาพบว่าเป็นตัวชี้วัดในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อม

จากรายงานของ U. S. Environmental Protection Agency (EPA) ได้ทำการสำรวจบริเวณฝังกลบขยะเมือง Snohomish, Washington สหรัฐอเมริกาพบว่าในแต่ละปีมีน้ำขยะไหลออกมาปริมาณมากขึ้นทุกปีและมีการปนเปื้อนดิน น้ำใต้ดิน น้ำผิวดินและแหล่งน้ำใช้ (U.S.EPA, 2004)

Donnelly และ Scarpino (1974) ทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ ปริมาณแบคทีเรียในน้ำขยะบริเวณที่ฝังกลบขยะเมือง Snohomish สหรัฐอเมริกา พบว่ามีปริมาณแบคทีเรีย Fecal Streptococci, Total Coliforms, Anaerobic plate count, Fecal Coliform และ *E. coli* เป็น 3.5×10^5, 4.9×10^4, 4.5×10^4, 1.7×10^3, และ 7.8 X 10 CFU/ml ตามลำดับ และยังพบเชื้อ *S. aureus* ซึ่งมียีนตรงกับเชื้อที่ได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลในเขตที่ทำการศึกษา

ในประเทศอิตาลีมีการศึกษาตัวอย่างน้ำเสียจากชุมชน น้ำทิ้งจากเทศบาล และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ปล่อยลงสู่บริเวณชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน พบเชื้อ *S.* Typhi, Fecal

coliforms, และ *E. coli* จากน้ำเสียลงบริเวณชายฝั่งทะเล ทำให้เชื้อเหล่านี้ปนเปื้อนน้ำทะเลที่เป็นแหล่งท่องเที่ยวและสัตว์ทะเลที่ใช้เป็นอาหาร (Pertrilli *et al*., 1979)

Chartrain และ Zeikus (1986) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งที่ผ่านระบบบำบัดในสภาวะขาดออกซิเจน (anaerobic degradation) พบว่ามีจำนวน 10^8- 10^{10} เซลล์ต่อ 1 มล.ของน้ำเสีย เมื่อทำการวิเคราะห์พบ *Stretococcus spp., Bacillus spp., Clostridium spp.* และ Enteric bacteria สอดคล้องกับรายงานของ Ueki และคณะ (1978) ที่ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไม่ใช้ออกซิเจน นอกจากนี้ยังเขายังพบว่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้อีกด้วย

Sonja และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาน้ำเสียและน้ำใต้ดิน จากสถานที่ฝังกลบสารยูเรเนียมเมือง Saxony ประเทศเยอรมันนี พบเซลล์ปกติและสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*, *B. sphaericus*, และ *Bacillus spp*. ที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้โดยมีการพัฒนาของยีนให้มีการนำโลหะหนักจากน้ำเสียมาใช้ในการเจริญเติบโต

ส่วนในประเทศเดนมาร์คได้ทำการศึกษาเชื้อ *B. cereus* จากน้ำทิ้งจากชุมชนและน้ำเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ พบว่าเชื้อเหล่านี้มีการปนเปื้อนลงแหล่งน้ำใต้ดิน แหล่งน้ำผิวดิน วัตถุดิบอาหาร และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารไปยังมนุษย์และพบว่าเชื้อ *B. cereus* มียีนชนิดเดียวกับเชื้อที่พบในคน อาหารสัตว์และสัตว์เลี้ยง และสิ่งแวดล้อม (Lars *et al.,* 2001)

Lucia และคณะ (2002) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นตัวชี้วัดคุณภาพของน้ำใช้เพื่อการอุปโภคบริโภคและมีความสัมพันธ์กับสุขภาพอนามัยของมนุษย์ คือ แบคทีเรียกลุ่ม Enteric Diseases ที่ทำให้เกิดไข้ไทฟอยด์และอหิวาต์ เชื้อนี้มีการปนเปื้อนมากับอุจจาระและน้ำเสีย น้ำทิ้งชุมชน เข้าสู่ห่วงโซ่อาหารโดยบริโภคอาหาร น้ำดื่ม และก่อให้เกิดการติดเชื้ออย่างรวดเร็วในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นอาการของโรคที่พบได้บ่อยที่สุด เชื้อที่พบได้แก่ Thermotolerant Coliforms และ *E. coli* (Calbelli *et al*., 1983) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถอยู่รอดและคงทนต่อสภาพแวดล้อมในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดได้ (Grismes *et al.,* 1986)

Carola และ Stefan (2003) ศึกษาเชื้อ *S. aureus*, *Salmonella* spp., และ *Listeria monocytogenese* ในน้ำเสียชุมชน (sewage) และน้ำทิ้งจากเทศบาล (Municipal solid waste)

โดยการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวแล้วแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกเฉพาะ จากนั้นตรวจสอบด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (PCR) ด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีน *S. aureus* สามารถตรวจพบได้มีปริมาณตั้งแต่น้อยกว่า 10 - 10^4 CFU/ml แต่ไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. และเชื้อ *L. monocytogenese*

Chitnis และคณะ (2004) ศึกษาน้ำทิ้งจากที่ผ่านระบบบำบัดของโรงพยาบาลขนาดกลางประเทศอินเดีย พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable bacteria), Total Coliforms, Fecal Enterococci, *Staphylococci*, *Pseudomonas*, และ Multidrug Resistant ประมาณ 10^5, 10^5, 10^3, 10^3, และ 10^3 ตามลำดับ โดยนำน้ำเสียผ่านกระดาษกรองมาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรคตามขั้นตอนการเพาะแยกเชื้อแต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกเฉพาะ

สำหรับในประทศไทย เยาวลักษณ์ (2534) ศึกษาทางด้านจุลชีววิทยา ฟิสิกส์ และเคมีของขยะชุมชนในกรุงเทพมหานคร โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างที่มีขบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยการวัดค่า pH อุณหภูมิ คาร์บอน ไนโตรเจน และลักษณะทางกระบวนการจุลชีววิทยา โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ Mesophillic, Thermophillic, และการทำงานของเอนไซม์ protease, amylase, และ cellulose ซึ่งพบว่าเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถแยกได้เป็นเชื้อในกลุ่ม Mesophile, Thermotolerance mesophile, และ Thermophile ส่วนชนิดของเอนไซม์ ที่พบเป็นเอนไซม์ amylase และ protease เป็นส่วนใหญ่

การศึกษาเกี่ยวกับน้ำขยะส่วนใหญ่เป็นการศึกษาวิจัยด้านโลหะหนัก สารพิษปนเปื้อน และผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อม แต่ยังขาดข้อมูล จึงควรทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของประชาชน เช่น เชื้อโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ และโรคผิวหนัง เพราะมีโอกาสการเกิดโรคค่อนข้างสูง โดยเฉพาะประชาชนในชุมชนที่อยู่อาศัยกันอย่างแออัดบริเวณสถานีกำจัดขยะ กลุ่มคนเหล่านี้ส่วนใหญ่ยังไม่ค่อยให้ความสนใจเกี่ยวกับสุขลักษณะการอุปโภคบริโภคเท่าที่ควร กอปรกับสภาพอากาศของประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นซึ่งเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ดังนี้

ลักษณะที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ที่ทำการศึกษาวิจัย

1. *Salmonella* Typhi

S. Typhi เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ (species) หนึ่งในตระกูล (Genus) *Salmonella* จัดอยู่ใน Family *Enterobacteriaceae* แบคทีเรีย *Salmonella* พบมากกว่า 2000 serotype เชื้อนี้ไม่

สามารถ ferment lactose ติดสีแกรมลบ รูปร่างแท่ง มีขนาดประมาณ 0.5-3.0 μm ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ด้วยแฟลเจลลา (flagella) ที่ยาวและมีอยู่รอบเซลล์ (Peritrichous fagella) เป็นแบคทีเรีย facultative anaerobe สามารถเจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างแคปซูล การแยกเชื้อ (Isolation) พิสูจน์เชื้อ (Identification) ของ *Salmonella* นิยมใช้การทดสอบทางชีวเคมี และทางซีรั่มวิทยาซึ่งง่ายต่อการพิสูจน์เชื้อ *S.* Typhi ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron agar (TSI) ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้แยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียใน Family *Enterobacteriaceae* โดยปกติ *Salmonella* พบอยู่ในลำไส้หรือทางเดินอาหารของคนและสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ปีก เช่น ไก่ เป็ด และห่าน จึงมีโอกาสปนเปื้อนในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ เชื้อนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) ในคน (จักรพันธุ์, 2542) นอกจากนี้ยังสามารถแพร่กระจายไปกับอุจจาระ น้ำ และสิ่งแวดล้อม เชื้อ *Salmonella* เพียง 15-20 เซลล์ สามารถก่อให้เกิดอันตรายได้ ทั้งนี้ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ อายุ และสุขภาพของผู้ป่วยเป็นสำคัญ *S.* Typhi และ *S.* Paratyphi A, B, และ C เป็น *Salmonella* ชนิดที่ทำให้เกิดอาการไข้ไทฟอยด์ในมนุษย์ทุกกลุ่มอายุ ส่วนใหญ่เป็นทารก ผู้ป่วยสูงอายุ และผู้ที่มีสุขภาพอ่อนแอ จะพบว่ามีอาการที่รุนแรง โดยผู้ป่วยจะได้รับเชื้อโดยกิน (fecal oral route) อาหารหรือเครื่องดื่มที่มีเชื้อปนเปื้อน (Calva *et al.,* 2003) จากนั้นเชื้อจะผ่านกระเพาะอาหารและลำไส้ แล้วจึงเข้าสู่กระแสโลหิตไปยังอวัยวะต่างๆ ซึ่งจะพบเชื้อได้ในปอด ตับ ม้าม ถุงน้ำดี ไขกระดูก ขณะเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตจะสร้าง endotoxin ก่อให้เกิดอาการไข้ เชื้อที่อยู่ในกระแสเลือดเมื่อผ่านไตจะถูกขับออกทางปัสสาวะ เนื่องจากน้ำดีเป็นปัจจัยที่ช่วยในการเจริญของเชื้อ จึงพบเชื้ออยู่ที่ถุงน้ำดี เชื้อเพิ่มจำนวนและไหลออกมากับน้ำดีลงสู่ลำไส้เล็ก และขับถ่ายเชื้อออกทางอุจจาระ (Huang and DuPont., 2005) ส่วนใหญ่โรคนี้ไม่ทำให้เสียชีวิต แต่ผู้ป่วยที่หายจากโรค salmonellosis แล้วยังเป็นพาหะของเชื้อได้ซึ่งต้องระมัดระวังการสัมผัสอาหารเพราะมีโอกาสที่จะแพร่เชื้อสู่อาหารได้ จากการสำรวจพบ *Salmonella* หลายซีโรวาร์ ที่สามารถแยกได้จากสิ่งแวดล้อมเช่น แม่น้ำ น้ำกร่อย และน้ำทะเล ซึ่งปนเปื้อนอุจจาระของคนและสัตว์ (Baudart *et al*., 2000., Winfield and Groisman., 2003) นอกจากนี้เชื้อนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาและสามารถอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมได้นานหลายเดือน (Hinton and Bales., 1991)

2. *Escherichia coli*

เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลเจลลา ไม่มีสปอร์ เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 8-44 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *E. coli* ชนิดที่สร้างสารพิษและที่ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มคือ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic

E. coli (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (VTEC), และ Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ETEC และ EHEC สามารถสร้างสารพิษที่มีผลทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษแบบ Infection และ Intoxication ตัวอย่างของ EHEC ที่สำคัญคือ *E. coli* O157: H7 ซึ่งระบาดครั้งใหญ่ในสหรัฐอเมริกา เมื่อปี 2540 (Kennedy *et al*., 2002) ผู้ป่วยจะมีอาการเลือดออกจากลำไส้ใหญ่ มีเลือดปนกับอุจจาระ มีอาการปวดท้องรุนแรง อาเจียน ไม่มีไข้ มีอาการไตล้มเหลว หากเกิดในเด็กและผู้สูงอายุจะมีผลทำให้เสียชีวิตจากอาการไตวายได้ (Haemolytic uremic syndrome, HUS) (Pradel *et al*., 2001) ปกติเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กตอนปลายและลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์เลือดอุ่นซึ่งสามารถแพร่กระจายเชื้อ โดยปนเปื้อนมากับอุจจาระ ดิน น้ำใช้ เนื้อสัตว์ ผักสดที่นำมาประกอบอาหาร รวมทั้งอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนของน้ำเสีย อาหารที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของการระบาดของ *E. coli* มักจะเป็นอาหารประเภทที่มีการปรุงสุกไม่เพียงพอ โดยเฉพาะอาหารประเภทที่ทำจากเครื่องในหรือเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก แฮม เนื้อบด นมที่ผ่านการแปรรูปไม่ถูกวิธี น้ำดื่มและน้ำผลไม้ (Frazier *et al*., 1988)

3.Staphylococcus aureus

เชื้อ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก อยู่ในวงศ์ Family *Micrococcaceae* สกุล *Staphylococcus* มีรูปร่างทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.2 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่มีการเรียงตัวอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (grape like) หรือกลุ่มสี่ (tetrad) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเกือบทุกชนิด เป็นพวก facultative anaerobes คือเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (oxygen) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic) เป็นเชื้อที่ทนต่อความร้อนและความแห้งได้ดี พบได้ทั่วไปตามผิวหนัง หรือบริเวณจมูกผู้ที่มีสุขภาพดี การติดเชื้อมักไม่รุนแรงและหายได้เอง ปกติเชื้อนี้จะอาศัยอยู่ตามร่างกายของคนโดยไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เมื่อใดที่ร่างกายเกิดความผิดปกติ เช่น ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือมีบาดแผล เชื้อที่อาศัยอยู่เหล่านั้นจะก่อโรคได้ทันที โดยสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย จึงพบสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล บางครั้งเชื้อนี้อาจทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงได้ เช่น ปอดบวม และเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษจากการรับประทานอาหาร หรือดื่มน้ำที่มีเชื้อหรือสารพิษ enterotoxin ของเชื้อ *S. aureus* เข้าไป การเกิดโรคเป็นแบบ Intoxication (Dinges *et al*., 2000) สารพิษชนิดนี้ สามารถทนความร้อนได้ดีมาก หากอาหารที่มีเชื้อและสารพิษปนเปื้อนจะไม่มีกลิ่น สี หรือ รสชาติที่ผิดปกติไป ผู้ป่วยที่ได้รับจะเกิดอาการอาหารเป็นพิษภายใน 1- 6 ชั่วโมง เนื่องสารพิษไปออกฤทธิ์ที่เยื่อบุลำไส้เล็ก ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้องและท้องเดิน (Bennett *et al*., 1986)

4. *Bacillus cereus*

เชื้อ *B. cereus* จัดอยู่ใน family *Bacillaceae* group I แกรมบวก รูปร่างแท่ง มีขนาดใหญ่ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลเจลลาและสร้างสปอร์ เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน พบได้ในดิน และสิ่งแวดล้อม ส่วนใหญ่ เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษจากการรับประทานอาหาร หรือดื่มน้ำที่มีเชื้อหรือสารพิษ enterotoxin ของเชื้อ *B. cereus* เข้าไป การเกิดโรคเป็นแบบ Intoxication คือสร้างสารพิษในอาหารจำนวนมาก เมื่อเข้าสู่ร่างกายจึงทำให้เกิดอาการจากสารพิษทั้ง 2 ชนิด คือ diarrheal toxin ซึ่งเป็นสารพิษที่มีขนาดใหญ่ (large molecular weight) และไม่ทนความร้อน (heat labile toxin) ทำให้เกิดอาการท้องเสียเป็นน้ำ ปวดท้อง มีระยะฟักตัวของโรคประมาณ 8-10 ชั่วโมง ส่วน emetic toxin เป็นสารพิษที่มีขนาดเล็ก (low molecular weight) สามารถทนความร้อนสูง (Heat stable toxin) ทำให้เกิดอาการอาเจียน ภายในระยะเวลา 30 นาที จนกระทั่งถึง 5 ชั่วโมง อาจมีอาการท้องเสียร่วมด้วย มีรายงานการเกิดโรคส่วนใหญ่พบในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ เช่น ข้าว ผลิตภัณฑ์จากข้าว แป้ง เมล็ดธัญพืช ผลิตภัณฑ์นม พืชผักประเภทเครื่องเทศ ซึ่งอาจพบลักษณะของเชื้อในรูปเซลล์ปกติ (vegetative cell) หรือสปอร์ (spore) ซึ่งส่วนใหญ่พบได้ในสิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ อากาศทั่วไป สปอร์ของเชื้อสามารถเจริญและผลิตท็อกซินที่ทำให้เกิดเป็นพิษได้ (Granum, and Lund, 1997, Agata *et al*., 2002)

5. *Candida albicans*

เชื้อ *C. albicans* เป็นเชื้อราจัดอยู่ในตระกูล *Cryptococcaceae* ไฟลัม *Deuteromycota* หรือ Fungi Imperfecti ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นอาศัยอยู่ในตัวคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม โดยจะพบเชื้อนี้ได้ในช่องปาก คอหอย ลำไส้ใหญ่ ช่องคลอด และผิวหนัง เชื้อนี้มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ ด้วยการแตกหน่อหรือ blastoconnidia ซึ่งหน่อมีลักษณะ กลมรี หรือรูปไข่ ขนาด 2-5 X 3-14 ไมครอน การเรียงตัวแบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มหรือเรียงต่อกันเป็นสาย เชื้อนี้สามารถก่อโรคในระดับความรุนแรงน้อยจนถึงรุนแรงเสียชีวิต เชื้อ *C. albicans* มี 2 ซีโรไทป์คือ A และ B พบว่า Type A ก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนในคนมากกว่า Type B โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ มีรายงานการก่อโรคในผู้ป่วยที่มีหลอดใยสังเคราะห์สอดในหลอดเลือด หรือผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดหัวใจ ผู้ติดยาเสพติด และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่ำ การก่อโรคเป็นแบบเชื้อจากภายในตัวผู้ป่วย ส่วนความรุนแรงของโรคขึ้นกับความต้านทานของผู้ป่วย (Tagami *et al*., 1985) นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อนี้เป็นเชื้อที่ฉวยโอกาส (opportunistic microorganisms) พบได้บ่อยจากน้ำเสียชุมชน น้ำทิ้งจากที่พักอาศัย น้ำเสียที่ผ่านระบบบำบัด และแหล่งน้ำเพื่อการพักผ่อนสาธารณะ ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของน้ำได้ (Buck and Bubucis., 1978)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

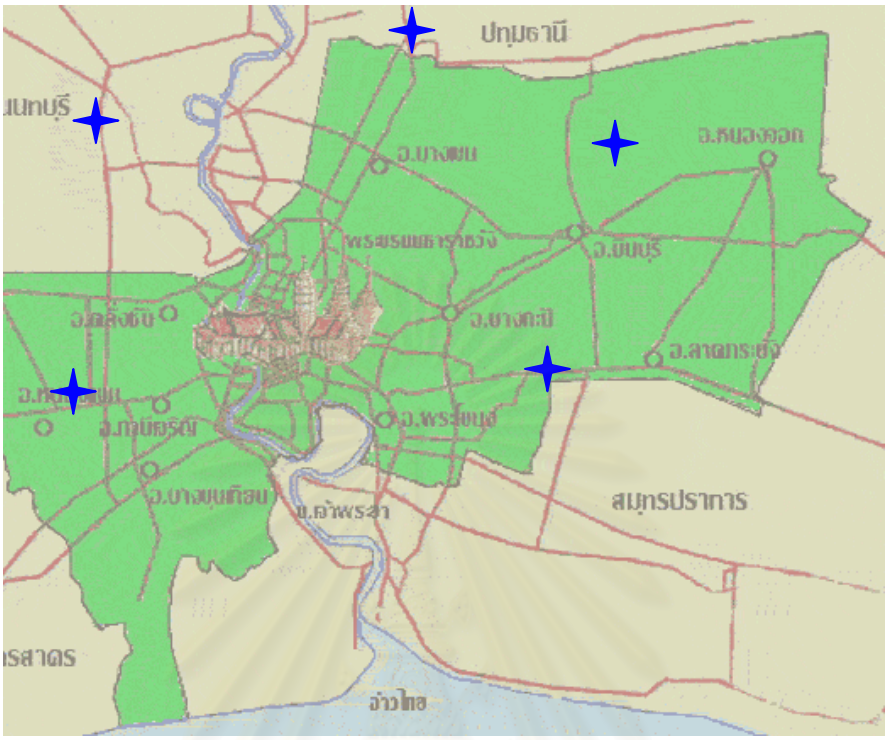
1. ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

1.1 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำขยะที่ไหลออกจากกองขยะ น้ำขยะบำบัดแล้ว และน้ำขยะที่ไหลลงแหล่งน้ำสาธารณะบริเวณใกล้กองขยะ จากสถานีขนถ่ายขยะและสถานที่ฝังกลบขยะในเขตกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี และอยุธยา 5 สถานี (รูปที่ 5) คือ

- สถานีขนถ่ายขยะหนองแขม
- สถานีขนถ่ายขยะอ่อนนุช
- สถานีขนถ่ายขยะท่าแร้ง
- . สถานที่ฝังกลบขยะคูคต
- สถานที่ฝังกลบขยะไทรน้อย

โดยเก็บตัวอย่างมาตรวจ 3 ครั้ง คือ ช่วงฤดูหนาว, (4 พฤศจิกายน 2547) ฤดูร้อน, (31 มีนาคม 2548) และฤดูฝน (5 กรกฎาคม 2548) รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 150 ตัวอย่าง ในแต่ละสถานีสุ่มเก็บตัวอย่าง 5 จุดๆ ละ 2 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างใส่ขวดขนาด 500 มล. ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วบรรจุจนเต็มขวดเพื่อไม่ให้มีช่องว่างของอากาศ ซึ่งแบคทีเรียสามารถนำไปใช้เพิ่มปริมาณระหว่างทำการขนส่งไปทำการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและทำการตรวจภายในเวลา 24 ชม. ระหว่างขนส่งโดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 °ซ ตลอดเวลา นำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

1.2 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เป็นเชื้อมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบกับเชื้อตัวอย่างจากน้ำขยะ ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ได้แก่ *Staphyloccus aureus* ATCC (American Type Cultured Collection) 29523, *Bacillus cereus* ATCC. 14579, *Candida albicans*, ATCC 71023, *Salmonella* Typhi DMST16122 และ *Escherichia coli* ATCC 29522



รูปที่ 6 แผนที่แสดงที่ตั้งสถานีขนถ่ายขยะและสถานที่ฝังกลบขยะ

2. **สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ**

2.1 **อาหารเลี้ยงเชื้อ** (เทคนิควิธีการเตรียมดูได้ในภาคผนวก)

2.1.1 Plate Count Agar (PCA) (Difco, USA)

2.1.2 Levin Eosin-Methylene Blue (EMB) agar (Merck, Germany)

2.1.3 Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) agar (Merck, Germany)

2.1.4 Manitol-egg Yolk-Polymyxin (MYP) (Merck, Germany)

2.1.5 Vogel-Johnson (VJ) agar (Merck, Germany)

2.1.6 Candida Elective Agar (Merck, Germany)

2.1.7 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, USA)

2.1.8 Soybean-Casein Digest Agar (TSA) (Difco, USA)

2.1.9 Nutrien Agar (NA) (Merck, Germany)

2.1.10 Yeast-Peptone Dextrose (YPD) (Difco, USA)

2.1.11 Luria –bertani broth (LB) (Difco, USA)

2.2 สารเคมีและยาปฏิชีวนะ

2.2.1 Absolute ethanol (Carlo Erba, Italy)

2.2.2 Chloroform (Carlo Erba, Italy)

2.2.3 Ethidium bromide (Sigma Aldrich Inc., USA)

2.2.4 Ethylene diacidaminetetra acetic (EDTA) (Amresco, USA)

2.2.5 General lysis buffer (QIAGEN, Germany)

2.2.6 Glycerol (Merk, Germany)

2.2.7 Hydrochloric acid (Lab-scan Asia Co., LTD., Thailand)

2.2.8 Iso-amyl alcohol (Carlo Erba, Italy)

2.2.9 Isopropyl alcohol (Carlo Erba, Italy)

2.2.10 Neomycin sulphate (Merck, Germany)

2.2.11 Saturated Phenol (Amresco, USA)

2.2.12 Potassium tellurite (Merck, Germany)

2.2.13 Polymixin-B-sulfate (Merck, Germany)

2.2.14. 70% alcohol (กรมสรรพสามิต)

2.2.15 Sodium chloride (Merck, Germany)

2.2.16 β-Mercaptoethanol (Pharmacia, Biotech Sweden)

2.3 สารเคมีและสารต่าง ๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

2.3.1 Agarose gel powder (Promega, USA)

2.3.2 2,3-dideoxynucleoside triphosphate (dNTPs)

2.3.3 DNA ladder marker, and (Fermentas Inc., USA)

2.2.4 6 X Loading Dye Solution (Fermentas Inc., USA)

2.2.5 Nuclease free water (Amresco, USA)

2.2.6 Taq polymerase (FINZYMES, Finland และ Fermentas Inc., USA)

2.2.7 Protenase K enzyme (Amresco, USA and Sigma Aldrich Inc., USA)

2.2.8 TE buffer pH 8.0

2.2.9 Zymolase enzymes (US. Biological)

2.2.10 Tris-boric acid-EDTA (TBE) powder (Amresco, USA)

3. **อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย**

3.1 หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 15 มล.

3.2 ไมโครไปเปต ขนาด 2-20 , 0-200, 100-1,000 µl

3.3 ไมโครไปเปตทิป ขนาด 10 และ 200 µl

3.4 พีซีอาร์ทิวป์ ขนาด 10 µl

3.5 จานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาด 90 ซม.

3.6 หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 20x 200 มล.

3.7 ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5, และ 10 มล.

3.8 กระติกน้ำแข็ง

3.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.10 Beaker ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มล.

3.11 ลูกแก้วสำหรับทำให้เซลล์แตก (Minibead)

3.12 ลวดเขี่ยเชื้อ

3.13 ตะแกรงใส่หลอด

4. **เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย**

4.1 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ

4.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ

4.3 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler (PCR) Hybrid/PCRSprint, Bio-Active co., Ltd., USA)

4.4 ตู้อบสำหรับทำให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

4.5 เครื่องเขย่าตัวอย่าง (Vortex mixer Geinie 2)(Scientific Industries, USA)

4.6 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler, Germany)

4.7 เครื่องวัดความเป็นกรด ด่าง (pH meter) (Hanna Instruments, Singapore)

4.8 เครื่องแยกดีเอนเอด้วยกระแสไฟฟ้า

4.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Bio-Active co., Ltd., USA)

5. นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ (primers) ที่ใช้ในงานวิจัย

Primers ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีนที่ใช้ในการตรวจยืนยัน *S. aureus, B. cereus, S.* Typhi, และ *C. albicans* โดยอาศัยข้อมูลจากผลงานวิจัยที่ผ่านมา (Zhu *et al*., 1996, Asano *et al*., 1997, Granum *et al*., 1999, Stephan *et al*., 2001, Arancia *et al*., 1997) และสังเคราะห์โดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) รายละเอียดของลำดับเบสและขนาดของ PCR product แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการยืนยันเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ชนิดของเชื้อ	Primer*	ลำดับเบส	ขนาดของ PCR products (bp)	อ้างอิง
S. Typhi	Fst	5'-TGCCGCAAACGAATC T-3'	300	Zhu *et al*., 1996
	Rst	5'-GGTTGTCATGCCAATGCACT-3'		
B. cereus	TY123	5'GGTTTAGCAGCAGCTTCTGTAGCTGGCG-3'	1222	Asano .,*et al*., 1997 and Granum *et al*., 1999
	TY127	5'-CAGAACTAATACGTACACCAGTTG-3'		
	nheA	5'-TACGCTAAGGAGGGGCA-3'	499	
	nheB	5'-GTTTTTATTGCTTCATCGGCT-3'		
S. aureus	JIRS-1	5'-GTTTCAATACATCAACTGC-3'	826	Stephan *et al*., 2001
	JIRS-2	5'-AAAAACACT TGTCGATATGG-3'		
C.albicans	Ca2	5'-GAAATGAAAGATAAGATTGGTGCA-3'	335	Arancia *et al*., 1997
	Ca3	5'-CCACAGTAAATTACCTATTTCTTCCTC-3'		

* ในแต่ละเชื้อ primer ตัวแรกเป็น Forward primers และ primer ตัวที่ 2 เป็น Reverse primer

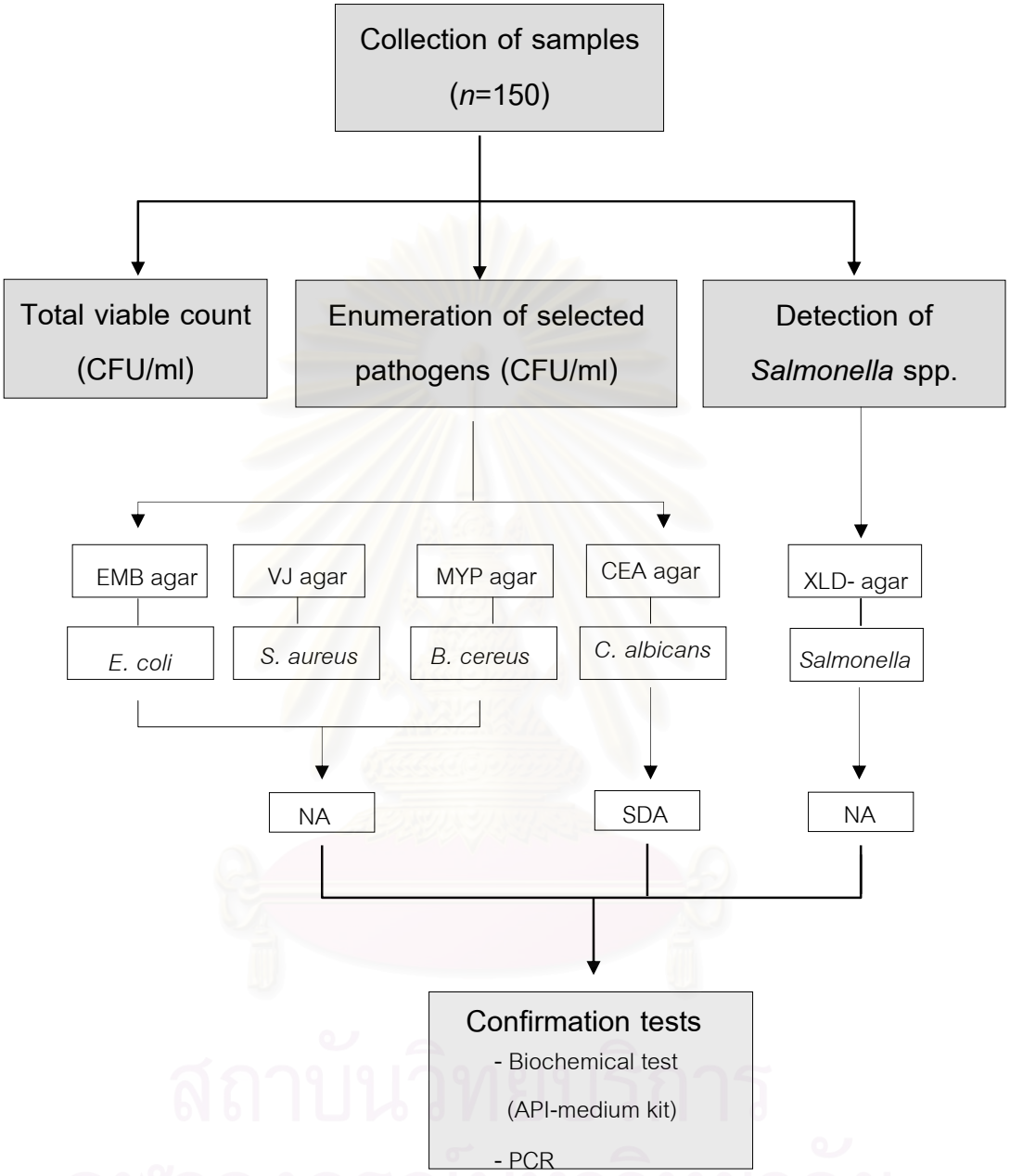
วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. การตรวจวิเคราะห์จำนวนและชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค

2. การตรวจยืนยันชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี

3. การตรวจยืนยันชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยสรุปวิธีดำเนินการวิจัย รูปที่ 4



รูปที่ 7 แผนภาพแสดงขั้นตอนของการดำเนินการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การตรวจวิเคราะห์จำนวนและชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค

1.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำขยะ

ตัวอย่างน้ำขยะที่อุณหภูมิ 4-6°ซ นำออกมาไว้อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีเขย่าตัวอย่างให้เข้ากัน แล้วทำการเจือจางด้วยวิธีเจือจางแบบ 10 เท่า (ten-fold dilution) โดยไปเปตน้ำขยะ 1 มล. ใส่ในสารละลาย Phosphate Saline Buffer (PBS) 9 มล. ให้ได้ความเข้มข้นของสารเจือจางจาก 10^{-1} ถึง 10^{-9}

1.2 การตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable count)

ไปเปตตัวอย่างน้ำขยะที่เจือจางแล้วในข้อ 1.1 ปริมาตร 1 มล. จากความเข้มข้นที่ 10^{-6} ถึง 10^{-9} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อเปล่าจำนวนความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ซึ่งหลอมไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 45°ซ ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 15 มล. หมุนจานเพาะเชื้อให้ตัวอย่างผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24-48 ชม. ตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกจานที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น โคโลนีต่อมล. (CFU/ml)

1.3 การตรวจนับจำนวนเชื้อ *E. coli, S. aureus, B. cereus,* และ *C. albicans*

ไปเปตตัวอย่างน้ำขยะที่เจือจางแล้วในข้อ 1.1 ปริมาตร 1 มล. จากความเข้มข้นที่ 10^{-3} - 10^{-6} ปริมาตร 0.1 มล. ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งตัวแล้วเกลี่ยให้ตัวอย่างกระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด และเชื้อราดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับ *E. coli, S. aureus,* และ *B. cereus* บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชม. สำหรับ *C. albicans* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ นาน 24 ชม. นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิด (ดูตารางที่ 2) และรายงานเป็น CFU/ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ

เชื้อจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
E. coli	Eosin-Methylen Blue (EMB) agar	โคโลนีมีลักษณะ metallic sheen
S. Typhi	Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) agar	โคโลนี มีสีชมพู เรียบ โปร่งแสง ไม่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี
B. cereus	Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar	โคโลนีแห้ง ผิวขรุขระ สีแดง หรือสีชมพู พร้อมเกิด precipitation zone
S. aureus	Vogel-Johnson (VJ) agar	โคโลนีเล็ก สีดำ อาหารเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
C. albicans	Candida Elective agar	โคโลนีสีน้ำตาลหรือสีดำ

1.4 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp.

ไปเปตตัวอย่างน้ำขยะ 25 มล. ลงใน BPW ปริมาตร 225 มล. ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ปิดจุกสำลี และนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 18-24 ชม. ทำการถ่ายเชื้อจาก BPW 1 มล.ลงในอาหารเหลว Rappaport-Vassiliadis broth (RVB) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 42°ซ เป็นเวลา 18-24 ชม. จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar โดยบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 18-24 ชม.

2. การตรวจยืนยันชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี

คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E. coli, S. aureus, B. cereus, C. albicans* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB, VJ, MYP, CEA, ในข้อ 1.3 และ *Salmonella* spp.จากอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD ในข้อ 1.4 และ XLD ชนิดละ 3 โคโลนี นำมาเพาะเลี้ยงให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยแบคทีเรียทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 18-24 ชม. ส่วนเชื้อราทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA และบ่มเพาะเชื้อที่ 25°ซ นาน 18-24 ชม. จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี จากเชื้อแต่ละชนิดมาทดสอบลักษณะทางชีวเคมีด้วย API medium kit ดังนี้

2.1 *E. coli* และ *Salmonella* spp.

นำโคโลนีที่ได้มาละลายใน สารละลาย 0.85% NaCl 5 มล. ปรับให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 (10^6 CFU/ml). หยดเชื้อลงใน API 20E strip สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม *Enterbacteriaceae* บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ อ่านผลที่ 18-24 ชม.

2.2 *B. cereus*

นำโคโลนีที่ได้มาละลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHB/E medium สำหรับ *B. cereus* ปรับให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 2 (10^9 CFU/ml) หยดเชื้อลงใน API 50 CHB/E strip จากนั้นนำไปบ่มที่จากนั้นอุณหภูมิ 37°ซ ตรวจผลที่ 18-24 ชม. และ 48 ชม.

2.3 *S. aureus*

นำเชื้อที่ได้มาละลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ API Staph medium ปรับให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 (10^6 CFU/ml) หยดเชื้อลงใน API Staph strip จากนั้นนำไปบ่มที่จากนั้นอุณหภูมิ 37°ซ ตรวจผลที่ 18-24 ชม.

2.4 *C. albicans*

นำเชื้อที่ได้มาละลายใน 0.85% NaCl 2 มล. ปรับความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 3 (10^8 CFU/ml) หยดเชื้อลงใน API Candida strip จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ตรวจผลที่ 18-24 ชม.

นำผลที่ได้จากข้อ 2.1, 2.2, 2.3, และ 2.4 ไปจำแนกชนิดของเชื้อด้วยโปรแกรม APILAB Plus automated interpretation

3. การตรวจสอบเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละชนิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ SDA ที่ได้รับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย API medium kit ในข้อ 2 มาทำการทดสอบดังนี้

3.1 การเตรียมตัวอย่าง DNA จากเชื้อแบคทีเรีย

สกัด DNA จากแบคทีเรียด้วย Boiling method (ดัดแปลงมาจาก Hensen and Hendriksen, 2001) โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหาร LB 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 24 ชม. เก็บตะกอนเชื้อจาก 1 มล. โดยการปั่นด้วย

ความเร็ว 3,000 xg นาน 2 นาที ละลายตะกอนเชื้อใน TE buffer 0.2 มล. นำไปต้มที่ 100°ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วย ความเร็ว 8,000 xg นาน 5 นาที เพื่อแยกกากเซลล์ออก ไปเปตของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ และแช่ในน้ำแข็ง

3.2 การเตรียมตัวอย่าง DNA จากเชื้อรา

สกัด DNA จากเชื้อราด้วยวิธี Phenol -chloroform extraction (Arancia *et al*., 1997) โดยนำเชื้อรา 1 โคโลนี มาเลี้ยงใน YPD broth 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 24 ชม. เก็บตะกอนเชื้อจาก 3 มล. โดยการปั่นด้วยความเร็ว 3,000 xg นาน 2 นาที ล้างตะกอนเชื้อด้วย TE buffer 0.5 มล. ละลายเซลล์ใน General lysis Buffer 1 มล. ใส่เอนไซม์ zymolase 10 µl บ่มที่ 37°ซ นาน 30 นาที แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยลูกแก้วขนาดเล็ก ปั่นด้วยความเร็ว 8,000 xg นาน 10 นาที ดูดของเหลวใสใส่หลอดใหม่ เติม phenol: chloroform : isoamyl (25:24:1) ปริมาตรเท่าตัว ผสมให้เข้ากัน และปั่นด้วยความเร็ว 16,000 xg นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl (24:1) ปริมาตรเท่าตัว ปั่นด้วยความเร็ว 16,000 xg นาน 15 นาที ดูดของเหลวใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอน DNA ด้วย iso-propanol ปริมาตรเท่าตัว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ปั่น 16,000 xg นาน 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วยการเติม 70 % alcohol ที่อุณหภูมิ -20°ซ ปริมาตร 1 มล. ปั่นที่ 16,000 xg นาน 15 นาที ไปเปตของเหลวใสทิ้งโดยไม่รบกวนตะกอน และทำให้ตะกอน DNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอน DNA ใน TE buffer 30 µl และแช่ในน้ำแข็ง

3.3 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

เตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ในปริมาตรทั้งหมด 25 µl ซึ่งประกอบด้วย 1 X PCR buffer (50 mM Tris-HCL pH 9.0, 15 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 % TritonX – 100), $MgCl_2$, Dntp 2 mM, 100 µM, Forward primer 20 pmol, Reverse primer 20 pmol, Taq polymerase 1 unit และ DNA template 10-150 ng นำไปเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายโดยใส่ในเครื่อง Gene Ampyyy® PCR System 2700 (Applied Biosystem, Perkin Elmer Cetus) ในการทดลองแต่ละครั้งใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) โดยเชื้อแต่ละชนิดใช้ PCR-conditions ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 PCR-conditions สำหรับที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

เชื้อ / PCR-conditions	*S. aureus*	*B. cereus*	*S.* Typhi	*C. albicans*
1. Predenaturation	94 °ซ 5 นาที	94 °ซ 2 นาที	94 °ซ 5 นาที	94 °ซ 10 นาที
2. Denaturation	94 °ซ 2 นาที	94 °ซ 1 นาที	94 °ซ 2 นาที	94 °ซ 2 นาที
3. Annealing	44 °ซ 1 นาที	65 °ซ 30 วินาที	50 °ซ 1 นาที	57 °ซ 1 นาที
4. Extension	74 °ซ 2 นาที	72 °ซ 1 นาที	72 °ซ 30 วินาที	72 °ซ 1 นาที
5. Final extension	74 °ซ 5 นาที	74 °ซ 5 นาที	72 °ซ 10 นาที	72 °ซ 10 นาที
6. จำนวนรอบ	35 รอบ	25 รอบ	30 รอบ	30 รอบ

3.4 การตรวจสอบขนาดของ PCR products ด้วย agarose gel electrophoresis

เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1.2 % ใน 1 X Tris borate –EDTA buffer นำ PCR product ปริมาตร 12 µl ผสมกับ loading buffer 3 µl และ load ลงในชุด gel electrophoresis ให้ DNA เคลื่อนที่บนแผ่น gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 40 นาที ย้อม DNA ในแผ่น gel ด้วย ethidium bromide และนำไปถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต (Ultraviolet, UV)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

จากการสำรวจพื้นที่บริเวณสถานีขนถ่ายขยะและสถานที่ฝังกลบขยะ ซึ่งเป็นเขตความรับผิดชอบของสำนักงานรักษาความสะอาดกรุงเทพมหานคร 3 แห่งคือ สถานีขนถ่ายขยะหนองแขม, ท่าแร้ง, อ่อนนุช ส่วนสถานที่ฝังกลบขยะคูคต (เดิม) และไทรน้อย อยู่ในความรับผิดชอบขององค์การบริหารส่วนท้องถิ่นจังหวัดปทุมธานี และจังหวัดอยุธยา พบว่าลักษณะพื้นที่โดยทั่วไปเป็นพื้นที่นอกเขตชุมชนเมือง บริเวณพื้นที่รวบรวมขยะในแต่ละสถานีมีลักษณะคล้ายกันคือ นำขยะมากองรวมไว้บนพื้นที่โล่งกลางแจ้ง เพื่อรอการขนย้ายไปกำจัด ดังนั้นขยะที่กองรวมไว้จึงมีการย่อยสลายเป็นน้ำขยะไหลออกมาตามร่องระบายน้ำ และไหลลงสู่ที่ต่ำรอบๆ บริเวณสถานี นอกจากนี้น้ำฝนที่ตกลงมาทำให้น้ำขยะมีปริมาณเพิ่มขึ้น และไหลไปยังพื้นที่ใกล้เคียง ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยชุมชนกลุ่มหนึ่งที่มีอาชีพคัดแยกขยะไปขาย สภาพที่อยู่อาศัยโดยรวมค่อนข้างแออัดเพราะมีพื้นที่จำกัด และเสื่อมโทรม ชุมชนเหล่านี้มีการบุกรุกเพื่อสร้างที่อยู่อาศัยโดยไม่ได้รับการอนุญาตจนกระทั่งขยายอาณาเขตเป็นชุมชนขนาดใหญ่ ตัวอย่างเช่น สถานที่ฝังกลบขยะไทรน้อยเป็นที่รวบรวมขยะมานานกว่า 30 ปี จึงมีปริมาณขยะสูงมาก โดยบางส่วนทำการฝังกลบไปบ้างแล้ว ที่เหลือกองเป็นภูเขาขยะยังคงมีปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องจากขยะที่มีปริมาณมาก แต่ไม่สามารถกำจัดได้ทั้งหมด ขยะบางส่วนมีการคัดแยกนำกลับไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้ บางส่วนนำไปทำปุ๋ยอินทรีย์ใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรรอบๆ บริเวณสถานีมีการทำการเกษตร เช่น ปลูกผัก ปลูกข้าว และสวนผลไม้ จากการสอบถามประชาชนในพื้นที่ พบว่าได้รับความเดือดร้อนจากน้ำเสียที่ไหลจากกองขยะลงแปลงพื้นที่ทำการเกษตรทำให้ได้ผลผลิตลดลง ทั้งยังได้รับความรำคาญจากกลิ่นเหม็นของขยะ จำนวนแมลงวัน หนู จำนวนมากที่มารบกวนอยู่ตลอดเวลา

4.1 ผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนและชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค

4.1.1 ผลการตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

ผลการตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA เป็นเพียงค่าประมาณที่ตรวจนับได้จากตัวอย่างน้ำขยะ พบว่าจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (รายละเอียดตารางที่ 4) มีปริมาณมากที่สุดในเดือนมีนาคม 1.2×10^{8} - 3.4×10^{9} CFU/ml, เดือนพฤศจิกายนมีค่า 1.0×10^{7} - 3.1×10^{8} CFU/ml และเดือนกรกฎาคมมีปริมาณ 3.6×10^{5} - 4.5×10^{6} CFU/ml ซึ่งลดลงประมาณ 2 log/CFU อาจเป็นเพราะน้ำขยะถูกเจือจางด้วยปริมาณน้ำฝนที่ตกลงมาในแต่ละพื้นที่

4.1.2 **ผลการตรวจนับจำนวนเชื้อ** ***E. coli, S. aureus, B. cereus,*** **และ** ***C. albicans*** (รายละเอียดตารางที่ 4, 5, 6, 7, และ 8)

(1) เชื้อ *E. coli* มีปริมาณมากที่สุดในมีนาคม 3.3 X 10^6 - 3.2 X 10^8 CFU/ml, ส่วนเดือนพฤศจิกายนมีปริมาณระหว่าง 2.7 X 10^5 - 5.8 X 10^8 CFU/ml, และเดือนกรกฎาคมมีปริมาณ 3.3 X 10^4 - 4.1 X 10^6 CFU/ml ตามลำดับ

(2) เชื้อ *S. aureus* มีปริมาณโดยรวมจากทุกสถานีไม่แตกต่างกันมากนักคือ 1.8 X 10^2 – 2.5 X10^5 CFU/ml ในเดือนพฤศจิกายนมีปริมาณสูงถึง 2.5 X 10^5 CFU/ml ที่สถานีไทรน้อย และน้อยที่สุดที่สถานีหนองแขม 1.8 X 10^2 CFU/ml ส่วนเดือนมีนาคมทุกสถานีมีปริมาณใกล้เคียงกันคือ 10^3 และ 10^4 CFU/ml

(3) เชื้อ *B. cereus* มีปริมาณ 1.3 X 10^3 - 2.6 X 10^5 CFU/ml มากที่สุดและน้อยที่สุดในเดือนมีนาคมที่สถานีขนถ่ายขยะอ่อนนุช

(4) เชื้อ *C. albicans* ที่ตรวจนับได้มีปริมาณ 2.6 X 10^1 - 5.2 X 10^3 CFU/ml เดือนมีนาคมปริมาณเชื้อ *C. albicans* มากกว่าเดือนพฤศจิกายนและเดือนกรกฎาคมในทุกๆ สถานีที่ทำการตรวจ ส่วนเดือนกรกฎาคมทุกสถานีมีปริมาณเชื้อลดลง 1 log CFU

ตารางที่ 4 ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

สถานีขนถ่ายหรือสถานที่ฝังกลบขยะ	**จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด** (CFU/ml)		
	เดือนพฤศจิกายน	**เดือนมีนาคม**	**เดือนกรกฎาคม**
สถานีหนองแขม	2.4 X 10^8	4.5 X 10^8	3.6 X 10^5
สถานีอ่อนนุช	2.9 X 10^8	2.8 X 10^9	4.5 X 10^6
สถานีท่าแร้ง	2.3 X 10^8	3.3 X 10^8	2.5 X 10^6
สถานีคูคต	1.0 X 10^7	1.2 X 10^8	2.4 X 10^6
สถานีไทรน้อย	3.1 X 10^8	3.4 X 10^9	3.7 X 10^6

ตารางที่ 5 ผลการตรวจนับจำนวน *E. coli*

สถานีขนถ่ายหรือสถานที่ฝังกลบขยะ	จำนวน *E. coli* (CFU/ml)		
	เดือนพฤศจิกายน	เดือนมีนาคม	เดือนกรกฎาคม
สถานีหนองแขม	2.1×10^6	5.7×10^7	4.7×10^5
สถานีอ่อนนุช	5.8×10^8	3.0×10^8	4.1×10^6
สถานีท่าแร้ง	4.8×10^5	3.3×10^6	2.7×10^5
สถานีคูคต	2.7×10^5	4.2×10^6	3.3×10^4
สถานีไทรน้อย	2.8×10^6	3.2×10^8	3.5×10^4

ตารางที่ 6 ผลการตรวจนับจำนวน *S. aureus*

สถานีขนถ่ายหรือสถานที่ฝังกลบขยะ	จำนวน *S. aureus* (CFU/ml)		
	เดือนพฤศจิกายน	เดือนมีนาคม	เดือนกรกฎาคม
สถานีหนองแขม	8.0×10^2	2.1×10^3	1.8×10^2
สถานีอ่อนนุช	2.4×10^3	8.6×10^4	3.6×10^2
สถานีท่าแร้ง	2.0×10^3	3.3×10^3	1.5×10^3
สถานีคูคต	3.5×10^3	3.0×10^3	2.7×10^2
สถานีไทรน้อย	2.5×10^5	4.4×10^3	6.3×10^3

ตารางที่ 7 ผลการตรวจนับจำนวน *B. cereus*

สถานีขนถ่ายหรือสถานที่ฝังกลบขยะ	จำนวน *B. cereus* (CFU/ml)		
	เดือนพฤศจิกายน	เดือนมีนาคม	เดือนกรกฎาคม
สถานีหนองแขม	8.2×10^4	2.9×10^4	4.4×10^3
สถานีอ่อนนุช	2.1×10^4	2.6×10^5	1.3×10^3
สถานีท่าแร้ง	3.1×10^4	2.7×10^4	3.0×10^3
สถานีคูคต	2.7×10^4	3.6×10^4	2.7×10^3
สถานีไทรน้อย	3.3×10^4	2.7×10^4	2.6×10^4

ตารางที่ 8 ผลการตรวจนับจำนวน *C. albicans*

สถานีขนถ่ายหรือสถานที่ฝังกลบขยะ	จำนวน *C. albicans* (CFU/ml)		
	เดือนพฤศจิกายน	เดือนมีนาคม	เดือนกรกฎาคม
สถานีหนองแขม	6.3×10^1	2.3×10^2	9.2×10^1
สถานีอ่อนนุช	4.2×10^2	1.9×10^3	1.5×10^2
สถานีท่าแร้ง	2.8×10^2	5.2×10^3	2.6×10^1
สถานีคูคต	3.3×10^2	3.1×10^3	3.4×10^2
สถานีไทรน้อย	3.9×10^2	2.1×10^3	6.2×10^1

4.1.3 **ผลการตรวจหาเชื้อ** *Salmonella* **spp.**

จากการตรวจหา *S.* Typhi และ *Salmonella spp.*ชนิดอื่นๆ ที่พบในน้ำขยะ ผลการทดลองทุกตัวอย่างของน้ำขยะ 150 ตัวอย่างไม่พบ *S.* Typhi และแต่ละตัวอย่างไม่ได้พบ *Salmonella* ทุกตัวอย่าง จากการสุ่มคัดเลือกโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกจำเพาะมาตรวจด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าส่วนใหญ่เป็น *S.* Arizona และ *Salmonella* spp ชนิดอื่นๆ 36.67 %(11/30), 47.61%(20/42) และโคโลนีอื่นที่คล้าย *Salmonella* พบว่าเป็น *Seratia liquefaciens, Providencia alcalifaciens,* และ *P. stuatii* คิดเป็น 16.67 %(2/12), 9.52%(2/21), และ 20%(1/5) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์จากตัวอย่างทั้งหมดแยกตามฤดูกาลและสถานี พบว่ามี *Salmonella* ในฤดูร้อนคือเดือนมีนาคมมากที่สุด โดยเฉพาะสถานีขนถ่ายขยะหนองแขมและสถานที่ฝังกลบขยะไทรน้อย

4.2. **ผลการตรวจยืนยันชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย** API medium kit

ผลการตรวจยืนยันชนิดแบคทีเรียและเชื้อราด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งมีลักษณะเฉพาะของแต่ละเชื้อดังตารางภาคผนวกที่1, 2, 3, 4, 5 จากตัวอย่างน้ำขยะทั้งหมด 150 ตัวอย่าง และทำการสุ่มโคโลนีที่ตรวจพบตัวอย่างละ 1 โคโลนี เพื่อตรวจลักษณะทางชีวเคมี พบว่าเป็น *E. coli* 124 ตัวอย่าง, *B. cereus* 76 ตัวอย่าง, *S. aureus* 57 ตัวอย่าง, *C. albicans* 40 ตัวอย่าง,*Salmonella* spp. 20 ตัวอย่าง, *S.* Arizonae 11 ตัวอย่าง, *S. hemolyticus* 11 ตัวอย่าง, *S. epidermidis* 5 ตัวอย่าง, *Saccharomyces cereviseae* 3 ตัวอย่าง, *S. liquefaciens* 2 ตัวอย่าง, *P. alcalifaciens* 2 ตัวอย่าง, *P. stuartii* 1 ตัวอย่าง, และ *C. tropicalis* 1 ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนตัวอย่างที่พบแบคทีเรียและเชื้อราที่ตรวจสอบด้วยลักษณะทางชีวเคมีด้วย API medium kit

สถานี / เชื้อ	หนองแขม	อ่อนนุช	ท่าแร้ง	คูคต	ไทรน้อย	รวม
B. cereus	14 (39)**	14 (21)	12 (25)	17 (20)	19 (22)	76 (127)
E. coli	21 (34)	25 (56)	23 (48)	27 (42)	28 (76)	124 (256)
Salmonella spp.	6 (12)	2 (10)	6 (10)	3 (6)	5 (9)	20 (42)
S. Arizonae	ND*	2 (5)	3 (10)	3 (6)	3 (9)	11 (30)
S. liquefaciens	2 (12)	ND*	ND*	ND*	ND*	2 (12)
P. alcalifaciens	1 (12)	ND*	ND*	ND*	1 (9)	2 (21)
P. stuartii	ND*	1 (5)	ND*	ND*	ND*	1 (5)
S. aureus	12 (26)	11 (27)	11 (24)	10 (32)	13 (35)	57 (144)
S. hemolyticus	ND*	1 (27)	4 (24)	3 (32)	3 (35)	11 (118)
S. epidermidis	1 (26)	1 (27)	2 (24)	1 (32)	ND*	5 (109)
C. albicans	7 (15)	7 (7)	10 (12)	8 (9)	9 (12)	41 (55)
C. tropicalis	ND*	ND*	ND*	1 (9)	ND*	1 (9)
S. cereviseae	ND*	ND*	ND*	3 (9)	ND*	3 (9)

ND* = not detected

( )** = ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ตรวจพบในน้ำขยะ

4.3. ผลการตรวจสอบเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

การทำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์เป็นวิธีที่แม่นยำ มีความจำเพาะสูง และช่วยให้การจำแนกเชื้อถูกต้องยิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมาใช้เพื่อตรวจยืนยันลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคที่ได้จากน้ำขยะ และได้ผ่านการตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมี (ด้วย API medium kit) แล้ว โดยผลการตรวจจะได้ PCR product ที่มีขนาดจำเพาะสำหรับเชื้อแต่ละชนิด (รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 1) ซึ่งผลการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส แสดงในรูปที่ 8, 9,

10, และ 11 ผลการวิเคราะห์จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวกจากตัวอย่างน้ำขยะทั้งหมด 150 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella* spp., และ *C. albicans* จากจำนวนตัวอย่างเชื้อที่พบในแต่ละชนิดคือ 76, 62, 40, และ 38 ตามลำดับ สถานีที่ตรวจพบแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคมากที่สุดคือ สถานีไทรน้อย, ท่าแร้ง, หนองแขม, คูคต, และอ่อนนุช ตามลำดับ จากข้อมูลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งแบคทีเรีย ได้แก่ *E. coli, B. cereus, S. aureus, Salmonella* spp. และเชื้อรา *C. albicans* ซึ่งมีปริมาณและชนิดแตกต่างกันได้จากแหล่งที่มาของขยะในแต่ละพื้นที่

รูปที่ 8 แสดงผล PCR product ของ *S. aureus* บนแผ่นอะกาโรสเจล

Lane M : DNA marker

Lane 1 : PCR product ของ *S. aureus* ATCC 25923 (positive control)

Lanes 2,3 : PCR product ของ unknown ONSA 1.1 และ 1.3

Lanes 4-6 : PCR product ของ unknown ONSA 2.1, 2.2, และ 2.5

Lanes 7 -9 : PCR product ของ unknown ONSA 3.1, 3.3, และ 4.1

Lanes 10 : negative control ; เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้เพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วแทน DNA ต้นแบบ

รูปที่ 9 แสดงผล PCR product ของ *Salmonella* Typhi บนแผ่นอะกาโรสเจล

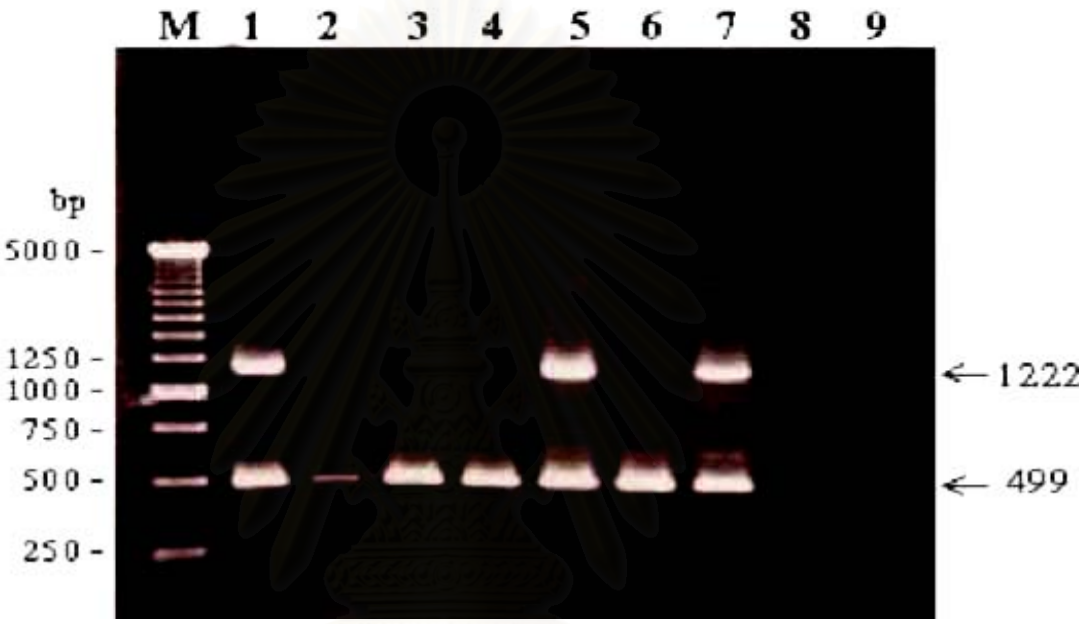
Lane M : DNA marker

Lanes 1,2 : PCR product ของ *S.*Typhi DMSC 16122 (positive control)

Lanes 3-6 : PCR product ของ unknown BTST 2.1, BTST 4.2, BTST 6.1, BTST 6.2

Lanes 7-10 : PCR product ของ unknown TRST 1.1, TRST 2.1, TRST 7.1

Lanes 11: negative control ; เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้เพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วแทน DNA ต้นแบบ



รูปที่ 10 แสดงผล PCR product ของ *B. cereus* บนแผ่นอะกาโรสเจล

Lane M : DNA marker

Lane 1 : PCR product ของ *B. cereus* ATCC 14579 (positive control)

Lanes 2,3 : PCR product ของ unknown BTBC 1.1 และ 2.3

Lanes 4,5 : PCR product ของ unknown BTBC 2.4 และ 3.4

Lanes 6-8 : PCR product ของ unknown BTBC 5.3, 6.1, และ 9.1

Lane 9 : negative control ; เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้เพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วแทน DNA ต้นแบบ

รูปที่ 11 แสดงอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซิส PCR product ของ *C. albicans*

Lane M : DNA marker

Lane 1 : PCR product ของ *C. albicans ATCC* 71023 (positive control)

Lane 2,3 : PCR product ของ unknown KKCA1.1 และ CA 1.3

Lane 4,5: PCR product ของ unknown KKCA 3.1 และ CA 3.2

Lane 6: PCR product ของ unknown KKCA 4.1

Lane 7: negative control ; เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้เพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วแทน DNA ต้นแบบ

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการตรวจหาและตรวจนับจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญที่เคยมีรายงานว่าตรวจพบได้เสมอในกองขยะและน้ำขยะ (Hassen *et al*., 2001) ที่ก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยเฉพาะที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Food borne disease) ทั้งในแบบของการเกิดติดเชื้อจากอาหารและแสดงอาการเป็นพิษ (Food borne infection and intoxication) รวมไปถึงการติดเชื้อในระบบผิวหนังหรืออาจลุกลามไปจนถึงการติดเชื้อในกระแสโลหิต และทางเดินหายใจ รวมไปถึงแบคทีเรียบางชนิด เช่น *E. coli* ที่จัดว่าเป็นตัวก่อโรคได้ในบางโอกาส และเป็นแบคทีเรียตัวบ่งชี้ (Indicator bacteria) ถึงความสกปรกจากการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในน้ำและอาหาร

จุลินทรีย์ก่อโรคที่คัดเลือกมาศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ *B. cereus, E. coli, S. aureus, Salmonella spp.* (*S.* Typhi) และ *C. albicans* จากการศึกษาการตรวจนับโดยวิธีมาตรฐานในตัวอย่างน้ำขยะพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด, *E. coli, S. aureus, B. cereus,* และ *C. albicans* เท่ากับ 3.6×10^{5}-3.4×10^{9}, 3.3×10^{4} -5.8×10^{8}, 1.8×10^{2} -2.5×10^{5}, 1.3×10^{3} -2.6×10^{5}, และ 2.6×10^{1} -5.8×10^{3} CFU/ml. ตามลำดับ ส่วนการตรวจหา *S.* Typhi ในครั้งนี้ไม่พบทุกตัวอย่างตลอดการศึกษา แต่จะพบแบคทีเรียในตระกูล *Salmonella* ซีโรทัยป์อื่น ๆ เช่น *S.* Arizona, *Salmonella* spp และโคโลนีอื่นที่คล้าย *Salmonella* พบว่าเป็น *Seratia liquefaciens, Providencia alcalifaciens,* และ *P. stuatii*

การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกันกับรายงานของ Hassen และคณะ (2001) ที่พบว่าจำนวนของ Total viable bacteria, *E. coli, Bacilli,* และ Fungi เท่ากับ 5.8×10^{9}ม 2.0×10^{7}, 7.9×10^{4}, และ 6.3×10^{3} CFU/gm ของขยะ นอกจากนี้ยังอธิบายว่าการย่อยสลายของกองขยะ จะมีการเปลี่ยนแลงเป็น 3 ระยะ คือ ระยะแรก mesophilic phase ที่อุณหภูมิระหว่าง 35-40°ซ เป็นช่วงอุณหภูมิที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม mesophillic มากที่สุดใช้เวลา 25-30 วัน ระยะที่ 2 thermophilic phase มีอุณหภูมิเพิ่มสูงระหว่าง 60-65°ซ ในระยะเวลา 30-110 วัน ระยะนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้จุลินทรีย์กลุ่ม mesophilic มีความทนทานมากขึ้นพร้อมกับมีการพัฒนาตัวเองจนสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิสูง และที่ช่วงระยะนี้จะมีกิจกรรมของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นด้วย เป็นผลให้เกิดการย่อยสลายของ

สารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของขยะเทศบาลเพิ่มสูงขึ้นตามมา ระยะสุดท้ายคือ cooling phase อุณหภูมิเริ่มลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งลดลงมาที่ 30°ซ ใช้ระยะเวลา 20 วัน เป็นผลมาจากการย่อยสลายในช่วงแรกและช่วงที่ 2 ที่เกิดการย่อยสลายอย่างมากทำให้มีปริมาณน้ำขยะ ความชื้นที่เป็นผลพวงจากการย่อยสลายมีผลต่ออุณหภูมิที่ลดต่ำลงในระยะนี้

การเกิดการย่อยสลาย (Decompose) ของขยะนั้น ถึงแม้ว่าในช่วงระยะที่ 2 ที่มีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นอยู่ในระหว่าง 60-65°ซ เป็นเวลานานก็ยังไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้งหมด เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นนั้นเป็นอุณหภูมิที่วัดจากตรงกลางของกองขยะ แต่อุณหภูมิบริเวณผิวหรือภายนอกกลางกองขยะอยู่ในระดับที่ต่ำ จึงยังคงมีแบคทีเรียหลายชนิดหลายสายพันธุ์สามารถรอดชีวิตอยู่ได้

จากการศึกษา สามารถตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในน้ำขยะได้ปริมาณค่อนข้างสูง อาจเนื่องมาจากเชื้อนี้สามารถสร้างสปอร์ในช่วงที่สภาวะสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ (vegetative cell) จากการศึกษาที่ทำการวิจัยน้ำเสีย มูลสัตว์จากฟาร์มปศุสัตว์หลายฟาร์มในประเทศเดนมาร์ก พบว่าเชื้อนี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน และคงอยู่ในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเชื้อนี้สามารถสร้างสปอร์ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม (Lars, *et al*., 2001) เช่นเดียวกันกับการศึกษา Hassen และคณะ (2001) พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus spp* ในระยะแรกและช่วงที่ 2 ของการย่อยสลายมีปริมาณน้อย แล้วค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งมีปริมาณมากในช่วงระยะสุดท้ายคือระยะ cooling phase ที่กองขยะมีอุณหภูมิลดลงจากผลของปริมาณน้ำขยะที่มากขึ้น น้ำขยะเหล่านี้มีสารปรกอบของเกลือชนิดต่างๆ สูงมากกว่า 10 % ซึ่งเชื้อ *Bacillus spp*. สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในระดับความเค็มนี้ (Fujio and Kume., 1991) เชื้อ *Bacillus spp* ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงคือ 50-60°ซ จัดอยู่ในกลุ่ม thermophilic bacteria นอกจากนี้เชื้อนี้ยังสามารถปรับตัวให้อยู่สิ่งแวดล้อมได้นานด้วยความสามารถในการสร้างสปอร์ของเชื้อให้มีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมเช่น อาหารมีความเป็นกรดด่างมากเกินไปเป็นต้น และจากการศึกษาของ Pohland และ Harper (1987) พบว่าขยะที่นำมาฝังกลบมีระยะการย่อยสลาย 3 ระยะ คือระยะแรก (Initial adjustment phase) ระยะนี้จะมีความชื้นค่อนข้างสูงเนื่องจากกองขยะมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์มากกว่า 50 % การย่อยสลายส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ออกซิเจนในการทำงาน ผลผลิตที่ได้ คือ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และความร้อน น้ำขยะที่ได้ในระยะนี้มีค่าความเป็นกรดด่างสูงมาก ระยะที่ 2 Transition phase การย่อยสลายส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ทั้งที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน มีค่า COD ประมาณ 480-18,000 มก. ต่อลิตรและกรดอินทรีย์ (VOA) 100 -3,000 มก. ต่อลิตร ระยะที่ 3 Acid formation phase การย่อยสลายส่วนใหญ่เกิด

จากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มไม่ใช้ออกซิเจน และจุลินทรีย์กลุ่ม Facultative anaerobes ผลผลิตที่ได้คือ VOA, ammonia, hydrogen, และ CO_2 มีค่า BOD ประมาณ 1,000-57,700 มก.ต่อลิตร และค่า COD ประมาณ 1,500-71,100 มก.ต่อลิตรซึ่งมีปริมาณค่อนข้างสูงมาก ระยะสุดท้ายคือ Methane fermentation phase เกิดการสร้างแก๊สมีเทนและคาร์บอนมอนนอกไซด์ในระดับสูง ซึ่งแก๊สทั้งสองชนิดเป็นแก๊สที่มีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ส่วนค่า BOD และ COD ในระยะนี้ค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องตามปริมาณสารอินทรีย์ถูกย่อยสลายเหลือน้อยลง

จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้สรุปได้ว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ตรวจได้ในน้ำขยะมีปริมาณไม่สูงมากนักเป็นเพราะน้ำขยะมีปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปริมาณเชื้อที่พบได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง อายุของกองขยะ สารพิษ โลหะหนัก กรดอินทรีย์ที่เกิดจากการย่อยสลายบางชนิดอาจมีผลไปยับยั้งหรือทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายและตายลง จึงไม่สามารถตรวจพบได้

เชื้อ *Salmonella* ที่ตรวจพบในน้ำขยะนั้น แม้จะตรวจไม่พบ *S.* Typhi ไม่ได้หมายความว่าเชื้อนี้อาจตรวจไม่พบเพราะโดยลักษณะของเชื้อนี้สามารถอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมเช่น กากตะกอนของเสียขยะเทศบาลซึ่งผ่านระบบบำบัดมาแล้ว เมื่อนำเชื้อนี้มาตรวจพบโดยการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวจำเพาะ (selective enrichment) พบในอาหารเหลวยัง มีการเจริญเติบโตของเชื้อคู่แข่ง นั่นคือเชื้อกลุ่ม Coliforms *E .coli* และ *Enterobacteriacae* ชนิดอื่นๆ อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อเหล่านี้แย่งอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนมากขึ้น *S.* Typhi ที่มีจำนวนน้อยอยู่แล้วจึงไม่สามารถเจริญให้เห็นในอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกจำเพาะ มีรายงานว่าเชื้อนี้มีการปรับตัวให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในน้ำเสีย น้ำทิ้งจากบ้านเรือน เช่น เดียวกับรายงานของ Polo และ คณะ (1999) เขาพบ *Salmonella* โดยเฉพาะ *S.* Enteritidis จากน้ำเสียจากโรงพยาบาลที่ผ่านการบำบัดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ นั่นแสดงว่าเชื้อเริ่มที่การปรับตัวให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ สรุปได้ว่าสถานีขนถ่ายขยะ และสถานที่ฝังกลบขยะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด อีกทั้งยังเป็นแหล่งแพร่กระจายสิ่งสกปรกไปสู่แหล่งน้ำ และพื้นดินบริเวณใกล้เคียง เนื่องจากกองขยะมูลฝอยที่นำมากองรวมกันไว้นานๆ เกิดการย่อยสลายโดยการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเศษอาหาร ซากสัตว์ มูลสัตว์ต่างๆ ทำให้เกิดการน้ำน้ำขยะ หรือชะมูลฝอย ซึ่งเป็นน้ำเสียที่มีความสกปรกสูงมาก ซึ่งมีทั้งสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ อีกทั้งมีการปนเปื้อนเชื้อโรค และสารพิษต่างๆ ในปริมาณค่อนข้างสูง หากน้ำขยะเหล่านี้ไหลไปตามพื้นที่บริเวณใด ก็จะทำพื้นที่บริเวณนั้น

เกิดความสกปรกและเสื่อมโทรมของพื้นดินนั้นและอาจมีการเปลี่ยนสภาพจนไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น ทำให้ดินมีคุณสมบัติเป็นดินกรดหรือดินด่าง ไม่เหมาะสำหรับทำการปลูกพืช หรืออาจทำให้ผลผลิตมีปริมาณลดลงและไม่ได้ผลผลิตตามต้องการ ในกรณีที่น้ำขยะไหลลงสู่แหล่งน้ำได้แก่ แม่น้ำ ลำคลองก็จะทำให้คุณภาพน้ำนั้นเสียไป ก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำ คุณภาพน้ำต่ำ น้ำใต้ดิน น้ำบาดาลมีการปนเปื้อนเชื้อโรคจากน้ำขยะที่รั่วไหลซึมลงชั้นใต้ดิน เช่น สถานที่ฝังกลบขยะ ตำบลราชาเทวะ ประชาชนได้รับความเดือดร้อนจากการที่นำขยะมาฝังกลบใกล้แหล่งชุมชนมาเกินไป อีกทั้งระบบการฝังกลบยังมีประสิทธิภาพเท่าที่ควรจึงทำให้น้ำขยะที่มีปริมาณมากเกิดการรั่วไหลออกมาสร้างความเดือดร้อนทั้งในเรื่องของกลิ่นเหม็นเน่าของขยะ น้ำประปามีการปนเปื้อนน้ำขยะ ไม่สามารถน้ำไปใช้เพื่อการบริโภคอุปโภคได้ นำมาซึ่งความคัดแย้งระหว่างเจ้าหน้าที่ของรัฐและประชาชนที่ได้รับความเดือดร้อน และไม่สามารถหาข้อสรุปในการแก้ไขปัญหาได้ทั้งหมด (กรมควบคุมมลพิษ, 2548) แหล่งน้ำที่มีความสกปรกหรือมีสารพิษเจือปนในปริมาณสูงส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศของน้ำทำให้สัตว์น้ำที่มีค่าหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป นอกจากนั้นสิ่งสกปรกที่เจือปนในน้ำทำให้สัตว์น้ำเหล่านี้มีการสะสมสารพิษหรือเชื้อโรคที่มาจากน้ำขยะปนเปื้อนในปริมาณค่อนข้างสูง หากประชาชนมีการนำสัตว์น้ำมาบริโภคก็จะได้รับอันตรายเหล่านี้ได้ จากข้อมูลสรุปสถานการณ์คุณภาพแหล่งน้ำผิวดินของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2547-2548 พบว่าแหล่งน้ำส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ดีร้อยละ 48 เสื่อมโทรมร้อยละ 27 และเสื่อมโทรมมากร้อยละ 5 เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำโดยรวมมีแนวโน้มเสื่อมโทรมมากขึ้น ซึ่งปัญหาส่วนใหญ่มาจากการระบายน้ำทิ้งจากกิจกรรมต่างๆ โดยไม่ผ่านการบำบัด ทำให้มีความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (BOD) และแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (FCB) สูง แหล่งน้ำที่อยู่ในเกณฑ์เสื่อมโทรมมากส่วนใหญ่เป็นพื้นที่เดิม ได้แก่ แม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง ท่าจีนตอนล่าง และลำตะคองตอนล่าง

การลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างในบางสถานีหรือบางสถานที่ไม่ได้รับความร่วมมือจากเจ้าหน้าที่ประจำสถานีเท่าที่ควรจึงทำการศึกษาสถานีทั้ง 5 แห่งนี้เพื่อเป็นตัวแทนสำหรับการวิจัย และบางแห่งไม่สามารถเก็บตัวอย่างน้ำขยะได้โดยเฉพาะช่วงฤดูร้อนคือเดือนมีนาคม พ.ศ. 2548 ที่มีปริมาณน้ำขยะค่อนข้างน้อยมาก สถานีบางแห่งให้เข้าเก็บได้บางจุดเท่านั้น การเก็บตัวอย่างเพื่อทำการทดลองในครั้งนี้ เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2547 จนถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 โดยกำหนดช่วงเวลาของการเก็บเป็น 3 ช่วงคือ เดือนพฤศจิกายน เดือนมีนาคม และเดือนกรกฎาคม สภาพอากาศในช่วงปลายปี พ.ศ. 2547 ค่อนข้างแห้งแล้งเนื่องจากปริมาณของน้ำฝนมีน้อยมากส่งผลให้เกิดความแห้งแล้งอย่างรวดเร็วตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนต่อเนื่องจนถึงเดือนมีนาคมของปี พ.ศ. 2548 ยังคงแห้งแล้งมากขึ้น ทำให้น้ำขยะมีปริมาณน้อยลง แต่ยังคงไหลอยู่ตลอดเวลาจากขบวนการย่อยสลายของกองขยะที่มีปริมาณสารอินทรีย์อยู่จำนวนมาก ประมาณปลายเดือนเมษายนของปี พ.ศ. 2548 ในพื้นที่ของกรุงเทพมหานครและพื้นที่จังหวัด

ใกล้เคียงเริ่มมีฝนตกลงมาพอสมควรและตกลงมาอย่างต่อเนื่องเป็นระยะๆ เป็นสัญญาณการเริ่มต้นของฤดูฝนและพบว่าในปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณน้ำฝนค่อนข้างสูงมาก เป็นผลให้น้ำขยะถูกชะล้างรวมกับน้ำฝนมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และไหลลงพื้นที่ลาดต่ำ ตามร่องระบายน้ำ คูคลองขนาดเล็ก และพื้นที่ทำการเกษตรบริเวณใกล้เคียง อีกทั้งยังมีการอุดตันของท่อระบายน้ำเนื่องจากมีเศษขยะจำพวกถุงพลาสติกปิดกั้นทางเดินของน้ำ ทำให้เกิดน้ำท่วมถนนและพื้นที่อยู่อาศัยของประชาชน ประกอบกับบริเวณนั้นส่วนใหญ่เป็นชุมชนที่มีความเป็นอยู่กันอย่างแออัด มีสภาพบ้านเรือนชั่วคราว และมีโอกาสเสี่ยงต่อการได้รับสัมผัสน้ำขยะที่มีความสกปรกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด

ผลการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถตรวจได้ในน้ำขยะจากสถานีขนถ่ายและกำจัดขยะ สถานที่ฝังกลบขยะ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารคัดเลือกจำเพาะนั้นเป็นเพียงค่าประมาณที่อ้างอิงจาก Merck Manual Microbiology 2000 และไม่ได้ตรวจลักษณะทางชีวเคมีและ ยืนยันผลด้วยวิธี PCR ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงเป็นข้อมูลการศึกษาจากตัวอย่างน้ำขยะ และน้ำขยะที่ผ่านระบบบำบัดแล้ว

การนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมาใช้เพื่อตรวจยืนยันแบคทีเรียและเชื้อรา จากน้ำขยะ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องรวดเร็ว มีความจำเพาะสูง และมีความน่าเชื่อถือได้ ปัจจุบันมีการพัฒนานำเทคนิคนี้มาใช้ดัดแปลงให้เหมาะสมกับลักษณะงานวิจัยมากขึ้นเช่น multiplex PCR, Reverse transcriptase PCR เป็นต้น (Simon, 1999) แต่บางครั้งผลการทดลองที่ได้อาจมีข้อผิดพลาดจากผลบวกเท็จ เนื่องจากน้ำเสียเหล่านั้นมีสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดฮิวมิค (humic acid) ไขมัน โปรตีน ที่มีผลไปยับยั้งการทำงานของ Taq polymerase (Carola and Stefan., 2003) ดังนั้นในการทดลองควรมีการแยกเชื้อจากน้ำเสีย น้ำขยะ หรือน้ำทิ้ง ให้มีความบริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ซึ่งจะเพิ่มความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

สรุปผลการศึกษา

การตรวจหาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียและเชื้อราในน้ำขยะ จากสถานีขนถ่ายขยะสถานที่ฝังกลบขยะทั้ง 5 สถานี ในเขตกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี และอยุธยา สรุปว่าตัวอย่างน้ำขยะและน้ำขยะที่ผ่านระบบบำบัดยังมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรคที่สำคัญทั้ง 5 ชนิดได้แก่ *B. cereus, S. aureus, E. coli, Salmonella* spp., and *C. albicans* ทุกสถานี แต่ไม่พบเชื้อ *S.*Typhi ในน้ำขยะทุกตัวอย่าง ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคที่สำคัญกลุ่ม

หนึ่งจากตัวอย่างน้ำขยะ จึงควรทำการศึกษาวิจัยเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ เพิ่มเติมซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของประชาชน และสามารถนำข้อมูลการศึกษานี้มาประกอบในการศึกษาทางด้านประเมินความเสี่ยงของประชาชน หรือผู้ที่อาศัยบริเวณใกล้เคียงสถานที่ฝังกลบขยะ และสถานีขนถ่ายขยะที่ได้รับสัมผัสน้ำขยะทั้งทางตรงและทางอ้อม รวมทั้งสามารถนำเอาข้อมูลการศึกษานี้ไปประเมินการเฝ้าระวังติดตามตรวจสอบการรั่วไหลของน้ำขยะ หรือการปนเปื้อนน้ำขยะลงแหล่งน้ำผิวดิน แหล่งน้ำใต้ดิน หรือระบบน้ำประปาสำหรับการอุปโภคบริโภค เพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์ของคุณภาพน้ำในปัจจุบันพร้อมที่จะนำไปสู่การจัดการคุณภาพน้ำ การแก้ไขและป้องกันผลกระทบที่เกิดจากมลพิษในแหล่งน้ำนั้นได้ทัน ก่อนที่น้ำหรือแหล่งน้ำมีการเปลี่ยนแปลงไป อันก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชาชน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ 2547. ก. รายงาน " สถานการณ์มลพิษของประเทศไทย". กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 2543-2547. หน้า 101.

กรมควบคุมมลพิษ 2548. รายงาน " สถานการณ์มลพิษของประเทศไทย". กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 2543-2548. หน้า 97.

กรมควบคุมมลพิษ, กรม. เกณฑ์ มาตรฐาน และแนวทางการจัดการขยะมูลฝอยชุมชน. กรุงเทพมหานคร: กรมควบคุมมลพิษ, 2547. ข. (จุลสาร), หน้า 39.

กรมอนามัย, 2535 . หลักเกณฑ์การควบคุมเชื้อแบคทีเรีย ริคเก็ตเชีย ไวรัส รา และปรสิต. กรุงเทพมหานครมหานคร (อัดสำเนา)

จักรพันธ์ ปัญจะสุวรรณ. 2542. พิษภัยในอาหาร. โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพฯ. หน้า 66.

พระราชบัญญัติการสาธารณสุข, 2535. การกำจัดสิ่งปฏิกูลและมูลฝอย. ส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ . หน้า 1-2.

เยาวลักษณ์ จันทร์ดาวงศ์, 2534 "การศึกษาทางจุลชีววิทยาจากขยะชุมชนกรุงเทพมหานคร," (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) 85.

สำนักระบาดวิทยา, 2541. " ข้อมูลรายงานโรคเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา".กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2533-2540. หน้า 2-3.

สำนักงานสถิติแห่งชาติ 2547. รายงาน " สถานการณ์ขยะในกรุงเทพมหานคร" กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. หน้า 1-3.

สำนักรักษาความสะอาด กรุงเทพมหานคร. 2547. โครงการส่งเสริมการลดและการแยกมูลฝอยอย่างมีประสิทธิภาพของกรุงเทพมหานคร. ฝ่ายแผนงาน กองวิชาการและแผนงาน สำนักรักษาความสะอาด กรุงเทพมหานคร. หน้า 1-4.

ภาษาอังกฤษ

Agata, N., Ohta, M., Yokohama, K. 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. Int. J. Food. Microbiol. 73: 23-27.

APHA, AWWA, WPCF. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed., American Public Health Association. Wachington, D.C. USA.

APHA, AWWA, WEF, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. Washington, DC, USA ISBN: 0-87553-235-7.

Arancia, S., Sandini, S., Cassone, A., De bernardis, F., and La Valle, R. 1997. Construction and use of PCR primers from a 70 kDa heat shock protein gene for identification of *Candida albicans.* Mol. Cell. Probes. 11: 329 - 336.

Asano, S.I., Nukumizu, Y., Bando, H., Iizuka, T., and Yamamoto, T. 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis.* Appl. Environ. Microbiol. 63: 1054-1057.

Baudart, J., Lemarchand, K.,Brisabois, A., and Lebaron, P. 2000. Deversity of *Salmonella* strain isolate from aquatic environment as determined by serotype and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1544-1552.

Bennett, R. W., M. Yeterian, W. Smith, C. M. Coles, M. Sassaman., and F. D. McClure. 1986. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. J. Food. Sci. 51: 1337-1339.

Buck., J. D. and Bubucis, P. M. 1978. Membrane filter procedure for enumeration of *Candida albicans* in natural waters. Appl. Environ. Microbiol. 35: 237-242.

Calbelli, V.J., Dufour, A.P., McCabe, L.J. and Levin, M.A. 1983. A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. J. Water. Pollut. Control.Fed. 55: 1306-1314.

Carola, B., and Stefan, W. 2003. Evaluation of the use of PCR and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digesters and aerobic composters. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4618-4627.

Calva, E., Puente, J.L., and Calva, J.J. 1988. Research opportunites in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. Bio. Essays. 9: 173-177.

Chartrain, M., Zeikus, J. G. 1986. Microbial ecophysiology of whey biomethanation : characterization of bacterial trophic populations and prevalent species in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 51: 188-196.

Chen, K.Y., and Bowerman, F.R. 1974. Mechanisms of leachate formation in sanitary landfills, "in recycling and disposal of solid wastes: indrustrial, agricultural, domestic,". Ann. Arbor. Science. Pub. 61: 432-439.

Chistensen, T.H., Kjeldsen, P., Bjerg, P.L., Jensen, D.L., Chistensen, J.B., Baum, A., Albrechtsen, H., Heron, G., 2001. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. Appl. Geochem. 16: 659-718.

Chitnis, V., Chitnis, S., Vaidya, K., Ravikant, S., Patil, S., and Chitnis, D.S. 2004. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. Water. Res. 38: 441-447.

Debra, R. Reinhart., and Caroline, J. Grosh. 1998. Analysis of florida msw landfill leachate quality. Florida center Gainesville. 56.

Dinges, M.M., Orwin, P.M, Schlievert, P.M. 2000. Enterotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbial. Rev. 13: 16-34.

Donnelly, J. A., and P. V. Scarpino. 1974. Isolation characterization and identification of microorganisms from laboratory and full-scale landfills. EPA-600/52-84-119.

Fujio, Y., Kume, S.J., 1991. Isolation and identification of thermophilic bacteria from sewage sludge compost. J. Ferment. Bioeng. 72: 334-337.

Frazier, W.C., and Weasthoff, D. C. 1988. Food microbiology, 4th ed. McGraw-hill, New York: 539-540.

Gaby, W.L., 1975. Evaluation of the health hazards associated with solid waste/sewage sludge mixtures, EPA -670/2-75/023, US Environ. Protec. Agency. Cincinnati. 135-146.

Granum, P.E., and Lund, T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS. Microb. Lett. 157: 223-228.

Granum, P.E., O'Sullivan, K., and Lund, T., 1999. The sequence non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. FEMS. Microb. Lett.177: 225-229.

Grismes D.J., Atwell, R.A., Brayton, P.R., Palmer, L.M., Rollins, D.M., RosZak, D.B., Singleton., F.L., Tamplin, M.L., and Colwell, R.R. 1986. The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environment. Microbiol. Sci. 3: 324-329.

Hensen, B.M., and Hendriksen, N.B. 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Appl. Environ. Microbiol. 67: 185-189.

Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M., and Boudabous, A. 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. Bioresource. Technol. 80: 217-225.

Hinton , M., and Bale, M.J. 1991. Bacterial pathogens in domesticated animals and their environment. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 70: 81S-90S.

Huang, D. B., and DuPont, H. L. 2005. Problem pathogens: extra-intestinal complications of *Salmonella* Enteric*a* serotype Typhi infection. Lancet. Infect. Dis. 5: 341-348.

Kennedy, M., Rabatsk-Her, T., Thomas S., Lance-Parker., Mohle-Boetani, J., Smith K., Kenne , W., Sparling, P., Hardnett, F., Mead, P., and the EIP Foodnet Working Group. 2002. Risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157 infection in the United States: a case control study in foodnet sites,1999-2000. International Conference on Emerging Infectious Disease. Atlanta, GA, USA. 51: 425-29.

Lars, B. J., Suraj, B., Mette, B., and Frank, M. A. 2001. Antimicrobial resistance among *Pseudomonas spp*. and *Bacillus cereus* group isolate from Danish agricultural soil. Environ. Inter. 26: 581-87.

Lucia, B., Rossella, B., Anna, M.C., Maurizio, S., and Dave, S. 2002. Occurrenc of potential bacterial pathogen in costal areas of the Adriatic sea. Environ. Monitor. Assess. 77:31-49.

Lu, J.C.S. 1985. Leachate from municipal landfills, production and management. Noyes. Pub. Park. Ridge. 42: 321-25.

Merck. 2000. Microbiology Manual Laboratory. Berlin, Germany, 53-277.

Pertrilli, F.L., De Renzr, G. P., Morelli Palmerini, R., and De Flora, S. 1979. Survey of the pollution in a coastal area of the Tyrrhenian sea: aerial photography, physico-chemical and microbiological investigations and mutagenic monitoring. Water. Res. 13: 895-96.

Pradel, N., Boukhors, K., Bertin, Y., Forestier, C., Martin, C., Livrelli, V., 2001. Heterogeneity of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Strains Isolated from Hemolytic-Uremic Syndrome Patients, Cattle, and Food Samples in Central France. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2460-2468

Polo, F., Figueras, M.J., Inza, I., Sala, J. Fleisher, J.M. and Guarro, J. 1999. Prevalence of *Salmonella* serotypes in environmental waters and their relationships with indicator Organisms. Antonie van Leevenhoek. 75: 285-292.

Pohland, J.G. and Harper, S.R. 1986. Critical review and summary of Leachate and gas production from landfills. EPA/600/2-86/073. , U.S. Environ. Protec. Agency. Cincinnati, OH, USA .

Scherer, S., and D. A. Stevens. 1987. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. J. Med. Microbiol. 23: 675-679.

Senior, E. 1990. Microbiology of landfill sites. CRC Press Inc., Boca Raton.

Simon Toze. 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. Wat. Res. 33: 3545-3556.

Sonja, S. P., Petra, P., Vanya, M., Ivo, B., Gert, B., and Heino, N. 1998. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus strains, B. cereus, B. megaterium,* and *B. sphaericus* from drain water of a uranium waste pile. FEMS. Microbiol. Ecol. 29: 59-67.

Stephan, J., Pantucek, R., Ruzickova, V., Rosypal, S., Hajek, V., and Doskar., J. 2001. Identification of *Staphylococcus aureus* based on PCR amplification of species specific genomic 826 bp sequence derived from a common 44–kb *Smal* restriction fragment. Mol. Cell. Probes. 15: 249 -257.

Tagami, H., Urano, S., Suchisa, S., and Hatchome, N. 1985. Contact sensitivity to *Candidia albicans* comparative studies in man and animal (guinea-pig). Br. J. Dermatol. 113: 415-424.

Ueki, A., E. Miyagma, H. Minao, R. Azuma, and T. Suto. 1978. Enumeration and isolation of anaerobic bacteria in sewage digestor fluids. J. Gen. Microbiol. 24:317-332.

U.S. Environmental Protection Agency. 2004. *Environmental Indicators Initiative.* [Online]. Available From: http://epa.gov/indicators/roe/html/roeLandWa.htm.

Visanathan, C., Trankler, J., Chiemchaisri, C., Basnayake, B.F.A., Gongming, Z., 2004. Municipal solid waste management in Asia: Asian regional research program on environment technology. AIT Plublication, Thailand. ISBN, 9-744-17258-1.

Winfield, M.D., and Groisman, E.A. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli.* Appl. Environ. Microbiol. 69: 3687-3694.

Zhu Q, Lim C.K., and Chan, Y.N. 1996. Detection of *Salmonella* Typhi by polymerase chain reaction. J. Appl. Bacteriol. 80: 244-251.

Ware, S.A. 1980. A survey of pathogen survival during municipal solid waste and manual treatment processes. EPA-600/8-80-034, U.S. Environ. Protec. Agency. Cincinnati.76-79.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Buffer peptone water (BPW)

อาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวน (Pre-enrichment medium) เชื้อ *Salmonella*

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate	9	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	5	กรัม
Distilled water	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งสารตามอัตราส่วนละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มล. คนให้เข้ากัน ปรับ pH 7.0 ± 0.1
2. แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ปริมาตร 225 มล.ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที.

Candida Elective agar

ส่วนประกอบ

Peptone	2	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Glucose	10	กรัม
Glycine	10	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Bismut sulfite indicator	2	กรัม
Distilled water	1000	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทำ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 40 กรัมลงในภาชนะ (บีคเกอร์) ละลายด้วยน้ำเย็นและเติมน้ำให้ครบ 1,000 มล. กวนให้ละลาย
2. นำไปต้มให้วุ้นละลายเข้ากันดีโดยต้องกวนสม่ำเสมอ ยกลงตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น ปรับ pH 7.0
3. เติมยาปฏิชีวนะ Neomycin sulphate 2 มก./ลิตร เทลงจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้อาหารแข็งตัวและทำให้ผิวหน้าอาหารด้วยความร้อน 55°ซ ก่อนนำไปทำการเพาะเชื้อ

Eosin-Methylene Blue (EMB Agar)

เป็นอาหารสำหรับคัดเลือกแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งให้ลักษณะโคโลนีเฉพาะที่มีสี metallic sheen

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
Lactose	5	กรัม
Sucrose	5	กรัม
K_2HPO_4	2	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Eosin yellow	0.4	มล.
Methylene Blue 0.25 %aq.soln	25	มล.
Distilled water	1000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 36 กรัมลงในภาชนะ (บีคเกอร์) ละลายด้วยน้ำเย็นและเติมน้ำให้ครบ 1,000 มล. กวนให้ละลาย
2. นำไปต้มให้วุ้นละลายเข้ากันดีโดยต้องกวนสม่ำเสมอ ยกลงตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น
3. ปรับ pH 7.0 แบ่งใส่ขวดแก้วขวดละ 200 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. เทลงจานเพาะเชื้อเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้อาหารแข็งตัวและทำให้ผิวหน้าอาหารด้วยความร้อน 55°ซ ก่อนนำไปทำการเพาะเชื้อ

Luria –bertani broth

ส่วนประกอบ

Tryptone	1	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Sodium chloride	0.5	กรัม
Distilled water	100	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งสารตามอัตราส่วน ละลายในน้ำกลั่นจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันปรับ pH 7.2
2. แบ่งใส่หลอดทดลอง 10 มล.นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์เวลา 15 นาที

Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) Agar

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
Beef extract	1	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Phenol red (1 % solution in 95% ethanol)	2.5	มล.
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 56 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้วุ้นละลายเข้ากันดีโดยต้องกวนสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น ปรับ pH 7.0 แบ่งใส่ขวดแก้วขวดละ 200 มล. ปิดฝาขวด
2. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที. อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 50°ซ ใน water bath
3. ใส่สาร Polymyxin B solution 0.1% 5 มล. และสารละลายไข่แดง 10 มล. ต่อปริมาณอาหาร 90 มล. เขย่าให้เข้ากัน
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงจานเพาะเชื้อปริมาณ 12-15 มล. ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว
5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปอบที่อุณหภูมิ 55°ซ นาน 5 นาทีเพื่อให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

Polymyxin B solution, 0.1%

ละลาย polymyxin B sulfate 500,000 units ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 มล. กรองด้วย Filter-sterilize และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

การเตรียมสารละลายไข่แดง

1. นำไข่ไก่ 4 ฟองล้างทำความสะอาดแล้วแช่ในแอลกอฮอล์ 70 % นาน 15 นาที
2. เช็ดเปลือกไข่ให้แห้ง ค่อยๆ เจาะเปลือกไข่เอาไข่ขาวออกให้หมดเหลือแต่ไข่แดง
3. นำไข่แดงใส่ขวดขนาด 200 มล.ที่มีลูกแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วเขย่าให้ไข่แดงแตก
4. ใส่ 0.85 % Normal saline 100 มล.
5. นำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 55°ซ นาน 20 นาที

Rappaport and Vassiliadis (RVS Broth)

อาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวน (Selective enrichment media) เชื้อ *Salmonella* กลุ่มที่มีแฟลเจลลาในการเคลื่อนที่

ส่วนประกอบ

Peptone	15	กรัม
Magnesium chloride hexahydrate	29	กรัม
Sodium chloride	8	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	0.4	กรัม
Potassium di-hydrogen phosphate	0.6	กรัม
Malachite green	0.037	กรัม
Distilled water	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งอาหาร 43 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มล. คนให้เข้ากัน ปรับ pH 5.2 ± 0.2
2. แบ่งใส่หลอดๆ ละ 10 มล.ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 20 นาที.

Triple iron agar (TSI)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อแบคทีเรีย กลุ่ม *Enterobacteriaceae*

ส่วนประกอบ

Peptone	15.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Proteose peptone No.3	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
D (+) glucose	1.0	กรัม
Sodium thiosulfate	0.5	กรัม
Ammonium iron (III) citrate	0.5	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	12-15	กรัม
Distilled water	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งส่วนผสมละลายด้วยน้ำกลั่น ต้มให้เดือดคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอด ขนาด 100 X 150 มม. ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที. นำออกมาเอียงหลอดในขณะที่อาหารยังร้อนอยู่ และให้มีส่วนก้นหลอดหนา 2 นิ้ว ทิ้งไว้ให้เย็น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Motility Indole Lysine Medium (MIL)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบ

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม
Proteose peptone No.3	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
L-Lysine HCL	1	กรัม
D (+) glucose	1	กรัม
Ammonium iron (III) citrate	0.5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
Agar	12	กรัม
Distilled water	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งส่วนผสมละลายด้วยน้ำกลั่นต้มให้เดือดคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอด ขนาด 100 X 100 มม. ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 5 นาที. ทิ้งไว้ให้เย็นเก็บที่อุณหภูมิห้อง

Nutrient agar (NA)

ส่วนประกอบ

Sodium chloride	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อละลายในน้ำกลั่น ต้มให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์เวลา 15 นาที นำมาอุ่นในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 45°ซ เทลงจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD)

การเตรียมอาหารชนิดนี้ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ เพราะมีส่วนประกอบที่เป็นน้ำตาลหลายชนิดอาจสูญเสียได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง

ส่วนประกอบ

Yeast extract	3	กรัม.
Sodium chloride	5	กรัม
D (+) Xylose	3.5	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
L (+) Lysine	5.0	กรัม
Sodium deoxycholate	2.5	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Ammonium iron (III) citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Distilled water	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ต้มให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำมาอุ่นในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 45°ซ
3. เทลงจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้อาหารแข็งตัว และทำให้ผิวหน้าอาหารด้วยความร้อน 55°ซ ก่อนนำไปทำการเพาะเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Vogel Johnson Agar

ส่วนประกอบ

Yeast extract	3	กรัม.
D (-) Mannitol	10	กรัม
di-potassium hydrogen phosphate	5	กรัม
Lithium chloride	5	กรัม
Glycine	10	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	13	กรัม
Distilled water	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 58 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ต้มให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์เวลา 15 นาที นำมาอุ่นในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 45°ซ เติมสาร Potassium tellurite solution 1 % 0.3 มล.
3. เทลงจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้อาหารแข็งตัว และทำให้ผิวหน้าอาหารแห้งด้วยความร้อน 55°ซ ก่อนนำไปทำการเพาะเชื้อ

การเตรียมสาร Potassium tellurite solution 1 %

Potassium tellurite ($K_2Te_2O_3$)	1.0	กรัม
Distilled water	100	มล.

วิธีทำ

1. ละลายสารด้วยไฟอ่อนจนใสไม่มีตะกอนสีขาว
2. กรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 μm เก็บในขวดสะอาดและแช่เย็นได้ไม่เกิน 4 สัปดาห์ ถ้ามีตะกอนสีขาวให้ทิ้งไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Phosphate Buffer Saline (PBS pH 7.2)

ส่วนประกอบ

Sodium chloride	8	กรัม.
Potassium chloride	0.20	กรัม.
Disodium hydrogen phosphate	1.15	กรัม.
Dipotassium hydrogen phosphate	0.20	กรัม.
Distilled water (Autoclaved)	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งสารตามอัตราส่วน ละลายในน้ำกลั่นจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันปรับ pH 7.2
2. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์เวลา 15 นาที

Yeast Peptone Dextrose (YPD)

ส่วนประกอบ

Yeast extract	1	กรัม.
Peptone	2	กรัม.
Dextrose	2	กรัม.
Distilled water	100	มล.

วิธีทำ

1. ชั่งสารตามอัตราส่วน ละลายในน้ำกลั่นจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันปรับ pH 7.2
2. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์เวลา 15 นาที

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)

Chloroform	96	มล.
Isoamyl alcohol	4	มล.

ละลายสารทั้ง 2 ชนิดให้เข้ากัน เก็บในขวดสีน้ำตาล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Phenol Chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)

Phenol	75	มล.
Chloroform	96	มล.
Isoamyl alcohol	4	มล.

ละลายสารทั้ง 3 ชนิดให้เข้ากัน เก็บในขวดสีน้ำตาลปิดฝาให้สนิท

DNA Ladder marker

DNA Ladder marker	20	มคก.
DDW PCR	40	มล.

- เจือจาง DNA ด้วย น้ำสำหรับงาน PCR เก็บที่ -20°ซ

Loading dye

Bromphenol blue	0.25	กรัม.
Xylen cyanol	0.25	กรัม.
Ficoll 400	15.0	กรัม.
Sterilized water	100	มล.

วิธีทำ

1. ละลาย ส่วนผสมในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนละลายเข้ากันดี
2. แบ่งใส่ eppendorf tube เก็บในที่เย็น -20°ซ

TE-buffer (pH 8.0)

ส่วนประกอบ

1. เตรียม stock 0.5 M EDTA (pH 8.0) (MW=372.24 กรัม.)

Sodium Ethylene diaminetetra acetate $2H_2O$ (EDTA)	186.1	กรัม.
Distilled water	1,000	มล.

วิธีทำ

1. ละลาย EDTA ในน้ำกลั่นปรับ pH 8.0 เติมน้ำให้ครบ 1,000 มล.
2. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. 1 M Tris –HCL (pH 8.0)

Tris-base	121	กรัม.
HCL (conc.)	42	กรัม.

วิธีทำ

1. ละลายสาร ในน้ำกลั่นปรับ pH 8.0 เติมน้ำให้ครบ 1,000 มล.
2. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที

TE-buffer

10 mM Tris-HCL (pH 8.0) 1mM EDTA

1 M Tris (pH 8.0)	10	มล.
0.5 M EDTA	2	มล.

วิธีทำ

1. ปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli*

Biochemical test	*E. coli*
ONPG β-galactosidase	+
L-Arginine	-
L-Lysine	+
L-Ornithine	+
Trisodium citrate	-
Sodium thiosulfate	-
Urea	-
L-Tryptophane D aminase	-
L-Tryptophane	+
Sodium pyruvate	-
Gelatin (bovine origin)	-
D-Glucose	+
D-Mannitol	+
Inositol	-
D-Sorbitol	+
L-Rhamnose	+
D-Sucrose	-
D-Melibiose	+
Amygdalin	-
L-Arabinose	+
Oxidase	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* Typhi

Biochemical test	*S.* Typhi
ONPG β-galactosidase	-
L-Arginine	-
L-Lysine	+
L-Ornithine	-
Trisodium citrate	-
Sodium thiosulfate	-
Urea	-
L-Tryptophane Daaminase	-
L-Tryptophane	-
Sodium pyruvate	-
Gelatin (bovine origin)	-
D-Glucose	+
D-Mannitol	+
Inositol	-
D-Sorbitol	+
L-Rhamnose	-
D-Sucrose	-
D-Melibiose	+
Amygdalin	-
L-Arabinose	-
Oxidase	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 3 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *B. cereus*

Biochemical test	*B. cereus*
control	
Glycerol	+
Erythritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	-
D-Ribose	+
D-Xylose	-
L-Xyrose	-
D-Adonitol	-
Methyl- β-D-Xylopyranoside	-
D-Galactose	-
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	-
L-Sorbose	-
L-Rhamnose	-
Dulcitol	-
D-Mannitol	-
D-Sorbitol	-
Methyl-α-D-Manopyranoside	-
Methyl-α-D-Glucopyranoside	-
N-Acetyl Glucosamine	+
Amygdalin	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 3 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *B. cereus* (ต่อ)

Biochemical test	*B. cereus*
Arbutin	+
Esculin ferric citrate	+
Salicin	+
D-celibiose	+
D-Maltose	+
D-Lactose (bovine origin)	-
D-Melibiose	-
D-Saccharose (sucrose)	+
D-Trehalose	+
Inulin	-
D-Melezitose	-
D-Raffinose	-
Amidon (starch)	-
Glycogen	-
Xylitol	-
Gentiobiose	-
D-Turanose	-
D-Xylose	-
D-Tagatose	-
D-fucose	-
L-fucose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 3 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *B. cereus* (ต่อ)

Biochemical test	*B.cereus*
Potassium Gluconate	+
Potassium 2-KetoGluconate	-
Potassium 5-KetoGluconate	-

ตารางภาคผนวกที่ 4 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *S. aureus*

Biochemical test	*S. aureus*
control	0
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
D-Maltose	+
D-Lactose (bovine origin)	+
D-Trehalose	+
D-Mannitol	+
Xylitol	-
D-Melibiose	-
Potassium nitrate	+
β-Naphthyl phosphate	+
Sodium pyruvate	+
D-Saccharose (sucrose)	+
Methyl-**α**-D-Glucopyranoside	-
N-acetyl-glucosamine	+
L-Agrinine	+
Urea	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงผลชีวเคมีของเชื้อ *Candida albicans*

Biochemical test	*C. albicans*
D-Glucose	+
D-Galactose	+
D-Saccharose	+
D-Trehalose	+
D-Raffinose	-
4-Nitrophenyl-β-D-maltopyranoside	-
2-chloro-4-Nitrophenyl-β-D-maltopyranoside	+
4-Nitrophenyl-β-D-xylopyranoside	-
4-Nitrophenyl-β-D-glucuronide	-
Urea	-
5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-acetly-β-D-glucosaminide	+
5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-acetly-β-D-galactopyranoside	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยาพนธ์

นางสุภาพ เหมืองแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2515 ที่จังหวัดสุพรรณบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาสัตวศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยราชมงคล วิทยาเขตบางพระ จังหวัดชลบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2541 เข้ารับราชการในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต่อมา ปี พ.ศ 2546 ภาคการศึกษาปลาย ได้ลาศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย