บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการศึกษา

แบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน

1. การเก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอน การเก็บรักษาตัวอย่างจากพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และการศึกษาคุณภาพน้ำทั่วไป

2. การศึกษาและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงค่า Most Probable Number (MPN) ของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด และแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์มในตัวอย่างน้ำ

3. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถเจริญบนอาหาร TCBS Agar จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน

4. ศึกษาหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจากวิธีนับจำนวนเซลล์โดยตรง (Direct Count) เปรียบเทียบกับริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจากวิธีนับเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Total Plate Count)

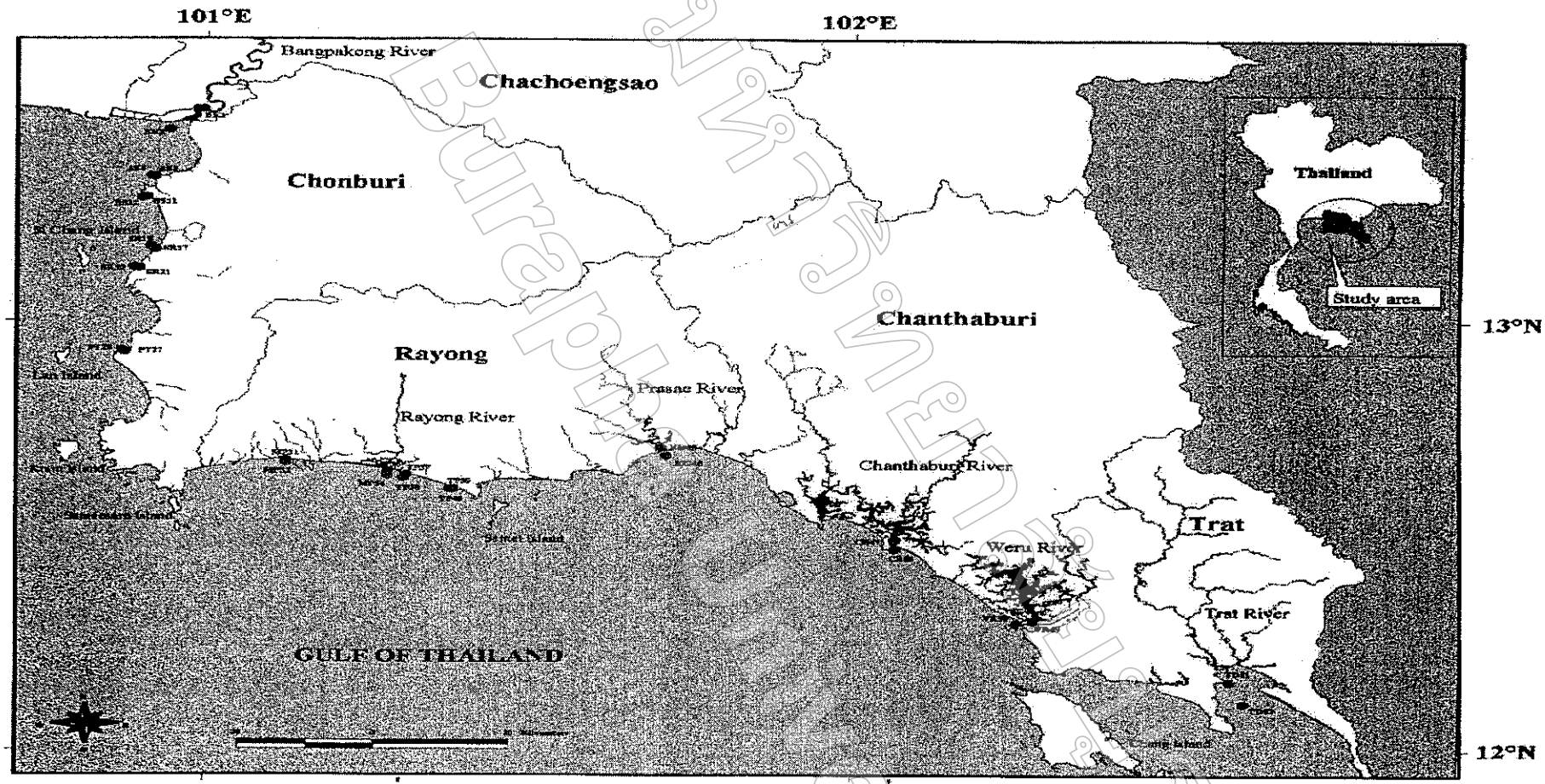
5. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติเพื่อการวิจัย

การเก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอน การเก็บรักษาตัวอย่างจากพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกและการศึกษาคุณภาพน้ำพื้นฐาน

1. สถานีเก็บตัวอย่างกำหนดให้ครอบคลุมพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเริ่มจากบริเวณปากแม่น้ำบางปะกงจังหวัดฉะเชิงเทราตัดออกสู่บริเวณชายฝั่งทะเลถึงปากแม่น้ำตราดจังหวัดตราด จำนวน 28 สถานี ดังรูปที่ 5 และตารางที่ 2 ในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลและบริเวณปากแม่น้ำสายต่าง ๆ ที่ไหลลงสู่พื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกซึ่งครอบคลุมพื้นที่การใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกันได้แก่ เขตสงวนรักษาธรรมชาติ เขตเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งทะเล เขตนันทนาการเพื่อการว่ายน้ำ เขตเมืองและการใช้ประโยชน์อื่น ๆ และเขตอุตสาหกรรม โดยกำหนดสถานีเป็น 2 ประเภท

1.1 สถานีใกล้ฝั่ง (ห่างจากฝั่ง 100 เมตร หรือจากปากแม่น้ำเข้าไป3 กิโลเมตร) เพื่อศึกษาแหล่งกำเนิดสารมลพิษบริเวณชายฝั่งทะเลและบริเวณปากแม่น้ำ เพื่อศึกษาปริมาณของเสียที่ระบายสู่ทะเล การเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลจะเก็บ 2 ระดับคือ ระดับผิวน้ำ ระดับกลางน้ำและบริเวณปากแม่น้ำจะเก็บ 2 ระดับคือที่ระดับผิวน้ำและที่ระดับกลางน้ำหรือระดับเหนือพื้นดิน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 5 แสดงสถานีการเก็บตัวอย่างให้ครอบคลุมพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก เริ่มจากบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ตัดออกสู่บริเวณชายฝั่งทะเล ถึงปากแม่น้ำตราด จังหวัดตราด จำนวน 28 สถานี

Burapha University มหาวิทยาลัยบูรพา

ตารางที่ 2 แสดงสถานีการเก็บตัวอย่างบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

สถานีที่	สถานี	ระดับความลึกของน้ำในการเก็บตัวอย่าง		
		ผิวน้ำ	กลางน้ำ	เหนือพื้นดิน
1	ปากแม่น้ำบางปะกง (หน้าวัดบน) จังหวัดฉะเชิงเทรา	*		*
2	ปากแม่น้ำบางปะกง (ทุ่น 7) จังหวัดฉะเชิงเทรา	*		*
3	ท่าเรืออ่างศิลา (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*	*	
4	ท่าเรืออ่างศิลา (ห่างฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*		*
5	บางแสนตอนกลาง (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*	*	
6	บางแสนตอนกลาง (ห่างฝั่ง)จังหวัดชลบุรี	*		*
7	เกาะลอย (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*	*	
8	เกาะลอย(ห่างฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*		*
9	อ่าวอุดม (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*	*	
10	อ่าวอุดม (ห่างฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*		*
11	อ่าวพัทยา (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*	*	
12	อ่าวพัทยา (ห่างฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*		*
13	บ้านหนองแฟบ (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*	*	
14	บ้านหนองแฟบ (ห่างฝั่ง) จังหวัดชลบุรี	*		*
15	ปากแม่น้ำระยอง (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดระยอง	*		*
16	ปากแม่น้ำระยอง (ห่างฝั่ง) จังหวัดระยอง	*		*
17	โรงงานปิโตรเลี่ยม (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดระยอง	*	*	
18	โรงงานปิโตรเลี่ยม (ห่างฝั่ง) จังหวัดระยอง	*		*
19	หาดแม่รำพึง, หินขาว (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดระยอง	*	*	
20	หาดแม่รำพึง, หินขาว (ห่างฝั่ง) จังหวัดระยอง	*		*
21	ปากแม่น้ำประแสร์ (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดระยอง	*		*
22	ปากแม่น้ำประแสร์ (ห่างฝั่ง)จังหวัดระยอง	*		*
23	ปากแม่น้ำแหลมสิงห์ (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดระยอง	*		*
24	ปากแม่น้ำแหลมสิงห์ (ห่างฝั่ง) จังหวัดระยอง	*		*
25	ปากแม่น้ำเวฬุ (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดตราด	*		*
26	ปากแม่น้ำเวฬุ (ห่างฝั่ง) จังหวัดตราด	*		*
27	ปากแม่น้ำตราด (ใกล้ฝั่ง) จังหวัดตราด	*		*
28	ปากแม่น้ำตราด (ห่างฝั่ง) จังหวัดตราด	*		*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.2 สถานีห่างฝั่ง (ห่างจากชายฝั่งทะเลประมาณ1 กิโลเมตร หรือจากปากแม่น้ำเข้าไป 1 กิโลเมตร) เพื่อศึกษาสภาพทั่วไปของบริเวณชายฝั่งทะเล และศึกษาการแพร่กระจายของ สารมลพิษที่ถูกระบายลงสู่ทะเล โดยทุกสถานีทำการเก็บตัวอย่าง 2 ระดับ คือ ที่ระดับผิวน้ำ และระดับเหนือพื้นดิน

2. ระยะเวลาสำรวจคุณภาพน้ำการเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก ดำเนินการ 4 ครั้ง เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2543 ถึง เดือนกรกฎาคม 2544

3. วิธีการเก็บตัวอย่าง และดินตะกอน และการรักษาตัวอย่างวัสดุอุปกรณ์

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (Auto-Microipette ของ Gilson) ขนาด 1.0, 5.0 มิลลิเมตร

3.1.2 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำ (Nansen)

3.1.3 เครื่องมือเก็บตัวอย่างดินตะกอน (Grab Sampling)

3.1.4 เครื่องวัดระดับความลึก (Echo Sounder ของ Hondex)

3.1.5 แผ่นวัดความโปร่งใส (Secchi Disc)

3.1.6 เครื่องวัดคุณภาพนน้ำหลายพารามิเตอร์ (Multi Parameters ของ YSI รุ่น 650)

3.1.7 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.1.8 หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร

3.1.9 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish)

3.1.10 ช้อนตักสาร

3.1.11 กระติกน้ำแข็ง

3.2 สารเคมี

3.2.1 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 ฟอร์มาดีไฮด์ (ที่ผ่านการกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร)

3.2.3 นาลิดิซิค แอซิค

3.2.4 ยีสต์สกัด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีทำการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างน้ำโดยใช้กระบอกเก็บตัวอย่างน้ำ จากบริเวณสถานีเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึกจากระดับผิวน้ำ 0.5 เมตร ระดับความลึกกลางน้ำและที่ระดับความลึกเหนือพื้นดิน (ดังตาราง 2) ในขวดเก็บตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ ปิดฝาให้แน่นบันทึกตำแหน่งจุดเก็บ

2. ทำการปิเปตตัวอย่างน้ำแต่ละตัวอย่างปริมาตร10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่ฟอร์มาลิน 0.6 มิลลิลิตร 1 หลอดและหลอดทดลองที่มียีสต์สกัดกับนาลิซิดแอซิดอีก1หลอดเขย่าหลอดทดลองให้สารละลายในตัวอย่างน้ำ ทำการจดบันทึกเวลาในการเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างที่ได้ในที่ร่ม ทำการเติมฟอร์มาลิน 0.6 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่มียีสต์สกัดและนาลิซิดิคแอซิด หลังจากเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บหลอดน้ำตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด จากวิธีนับจำนวนเซลล์โดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ Epifluorescence (Direct Pifluorescence Method) ตัวอย่างที่ได้ไม่ควรเก็บนานเกิน 3 สัปดาห์ (APHA., AWWA., & WEF., 1922)

3. นำขวดตัวอย่างน้ำเก็บไว้ในกระติกน้ำแข็งอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส เก็บไว้ในร่มในการขนถ่ายตัวอย่างมาห้องปฏิบัติการไม่ควรเกิน 6 ชั่วโมง

4. ทำการเก็บตัวอย่างดินตะกอนจากเครื่องเก็บตัวอย่างดินตะกอน ทำการเก็บตัวอย่างดินตะกอนที่ได้ในจานเลี้ยงเชื้อหุ้มปิดขอบจานด้วยพาราฟิล์ม และเก็บไว้ในร่มที่อุณหภูมิไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส

5. ทำการวัดค่าคุณภาพน้ำทั่วไป ได้แก่ ค่าอุณหภูมิ ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าความเค็มของน้ำทะเลบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง และทำการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ไนไตรทไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน สารแขวนลอย ฟอสเฟต และซิลิเกท (รายละเอียดดังภาคผนวก ก)

การศึกษาและการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงค่า Most Probable Number (MPN) ของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมดและแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม ในตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (Auto-Microipette ของ Gilson) ขนาด 0.1, 1.0, 5.0 มิลลิลิตร

1.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

1.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อเพิ่มความดัน (Autoclave)

1.3.1 สไลด์

1.3.2 กล้องจุลทรรศน์ (Compound Microscope)

1.3.3 Water Bath

1.3.4 หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตรพร้อมฝาครอบ

1.3.5 หลอดดักก๊าซ (Durham Tube)

1.3.6 ช้อนตักสาร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1 Double Strength Lactose Broth (DSLB) พร้อมหลอดดักก๊าซ

2.2 Single Strength Lactose Broth (SSLB) พร้อมหลอดดักก๊าซ

2.3 Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB) พร้อมหลอดดักก๊าซ

2.4 EC Medium พร้อมหลอดดักก๊าซ

2.5 Levine's Eosin Methylene Blue (EMB) Agar

2.6 Crystal Violet

2.7 Safanin

2.8 Gram's Iodine

2.9 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

วิธีทำการทดลอง (APHA., AWWA., & WPCE, 1992)

1. นำตัวอย่างน้ำจากขวดเก็บตัวอย่างมาทำการตรวจสอบ เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด และแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลจากสถานีเก็บตัวอย่าง โดยใช้เครื่องดูดสารปริมาณน้อย ดูดตัวอย่างน้ำถ่ายลงในชุดอาหาร Fermentation Tube ทำการทดสอบเป็นขั้นตอน ดังนี้

1.1 การตรวจสอบขั้นแรก (Presumtive Test)

เป็นการตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์ม โดยใช้เครื่องดูดสารปริมาณน้อย ดูดตัวอย่างน้ำใส่หลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

ชุดที่ 1 Double Strength Lactose Broth (DSLB) 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด ใส่ตัวอย่างน้ำหลอดละ 10 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชุดที่ 2 Single Strength Lactose Broth (SSLB) 7 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด ใส่ตัวอย่างน้ำหลอดละ 1.0 มิลลิลิตร

ชุดที่ 3 Brilliant Green Lactose bile Broth (BGLB) 7 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด ใส่ตัวอย่างน้ำหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 -48 ชั่วโมง ตรวจดูก๊าซที่เกิดขึ้น แสดงผลเป็นบวก ถ้าไม่มีแสดงผลเป็นลบ (ถ้าตัวอย่างมีความขุ่นและสกปรกมาก อาจเพิ่ม Single Strength Lactose Broth (SSLB) 7 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด ใส่ตัวอย่างน้ำ 0.01 มิลลิลิตร ที่เจือจางแบบอนุกรม (Serial Dilution) หลังจากนั้นเมื่อตรวจสอบขั้นยืนยันแล้ว ให้นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบดังตารางแสดงค่าดัชนี MPN ต่อ 100 มิลลิลิตร และคูณด้วย 10 จะได้ค่าดัชนี MPN ต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ถูกต้องตามความเจือจาง 1.0, 0.1 และ 0.01 ตามลำดับ

1.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน (Confirm Test)

การตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม

นำหลอด Lactost Broth (LTB) ที่ให้ผลบวกถ่ายเชื้อ ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร BGLB Broth 0.1 มิลลิลิตร บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดก๊าซ แสดงผลเป็นบวก ถ้าไม่มีก๊าซแสดงผลเป็นลบ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าตารางแสดงดัชนี MPN ต่อ 100 มิลลิลิตร จะได้ค่าปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำ

การตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม

นำหลอด BGLB Broth ที่ให้ผลบวก ถ่ายเชื้อลงในอาหาร EC Medium 0.1 มิลลิลิตร บ่มในอุณหภูมิที่ 44.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ แสดงผลเป็นบวก ถ้าไม่มีก๊าซแสดงผลเป็นลบ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบค่าตารางแสดงดัชนี MPN ต่อ 100 มิลลิลิตร จะได้ค่าปริมาณฟีคอลโคลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำ

1.3 การตรวจสอบขั้นสมบูรณ์ (Complete Test)

นำหลอดที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลฟอร์มมาลงเชื้อบนอาหาร EMB-Agar สังเกตโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำหลอดที่ให้ผลบวกมาทำการย้อมแกรม

2. นำข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากค่าดัชนี MPN ต่อ 100 มิลลิลิตร และอภิปรายผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถเจริญบนอาหาร TCBB Agar จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (Auto-Microipette ของ Gilson) ขนาด 0.1,10, 5.0 มิลลิลิตร

1.2 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

1.3 จานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish)

1.4 ชุดกรอง (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ)

1.5 เยื่อกรอง (Milipore Nitrocellulose 0.45 µM White Grid HAWG 47 mm)

1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Vortex Mixer)

1.7 ปากคีบ

1.8 แท่งแก้วเกลี่ยกระจาย (Spreader)

1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.10 เครื่องกรองสูญญากาศ (Suction Pump)

1.11 เครื่องชั่งไฟฟ้า

1.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Thiosulface Citrate Bile Sucrose (TCBS Agar)

2.2 น้ำทะเล 90 เปอร์เซ็นต์ ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร

วิธีทำการทดลอง (APHA., AWWA., & WEF., 1922)

1. วิธีการปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถเจริญบนอาหาร TCBS Agar จากตัวอย่างน้ำ และตะกอนดินโดยวิธีการเกลี่ยกระจาย (Spread Plate)

1.1 ตัวอย่างน้ำ

1.1.1 ถ่ายตัวอย่างน้ำด้วยเครื่องดูดสารปริมาณน้อย ในแต่ละระดับความลึกมา 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบอนุกรมด้วยน้ำทะเล 90 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2} ตามลำดับ

1.1.2 ถ่ายตัวอย่างน้ำในแต่ละความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยกระจายบนอาหาร TCBS Agar ทำ 3 ซ้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.1.3 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (ระยะเวลาในการบ่มห้ามเกินกำหนด เพราะอาจทำให้โคโลนีเปลี่ยนสีจากเหลืองเป็นเขียว)

1.1.4 นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร TCBS Agar โดยนับแยกโคโลนีเป็น 2 กลุ่ม คือ โคโลนีสีเหลือง และโคโลนีสีเขียว คำนวณปริมาณเชื้อที่พบต่อตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร

1.2 ตัวอย่างดินตะกอน

1.2.1 ชั่งตัวอย่างตะกอนดิน 1 กรัม ทำการเจือจางแบบอนุกรมด้วยน้ำทะเล 90 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ตามลำดับ

1.2.2 ถ่ายตัวอย่างน้ำที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร นำไปเกลี่ยกระจายบนอาหาร TCBS Agar โดยทำ 3 ซ้ำ

1.2.3 นำบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.2.4 นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร TCBS Agar ในดิน 1 กรัม

2. การนำตัวอย่างน้ำและตะกอนดินมาทำการทดลองโดยเคนิคการกรรองด้วยเยื่อกรอง (Membrane Filter)

2.1 ตัวอย่างน้ำ

2.1.1 นำตัวอย่างน้ำที่ความเข้มข้น 100 ปริมาตร 1,2 และ 3 มิลลิลิตร ถ่ายลงในน้ำทะเล 90 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 นำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ด้วยชุดกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเครื่องกรองสูญญากาศจนเยื่อกรองแห้ง

2.1.3 นำแผ่นเยื่อกรองที่ได้วางบนอาหาร TCBS Agar ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.1.4 นับจำนวนโคโลนีที่ได้มาคำนวณปริมาณเชื้อที่พบต่อตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร

2.2 ตัวอย่างดินตะกอน

2.2.1 ชั่งตัวอย่างดินตะกอน 1 กรัม ทำการเจือจางแบบอนุกรมด้วยน้ำทะเล 90 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2} ปริมาตร 1 และ 2 มิลลิลิตร ถ่ายลงในน้ำทะเล 90 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 นำตัวอย่างน้ำที่ได้มากรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ด้วยชุดกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเคราองกรองสูญญากาศจนเยื่อกรองแห้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2.3 นำแผ่นเยื่อกรองที่ได้วางบนอาหาร TCBS Agar ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.2.4 นับจำนวนโคโลนีที่ได้นำมาคำนวณปริมาณเชื้อที่พบต่อตัวอย่างดิน 1 กรัม

การศึกษาหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจากวิธีนับจำนวนเซลล์โดยตรง (Direct Count) เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตจากวิธีนับเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Total Plate Count) บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

1. การศึกษาหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด จากวิธีนับจำนวนเซลล์โดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ Epifluorescence (Direct Epifluorescence Method) ที่พบบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง

วัสดุอุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 กล้องจุลทรรศน์ (Epifluorescence ของ OLYMPUS รุ่น BH 2)

1.1.2 เยื่อกรอง (Milipore Isopore ® Membrane Filters 0.2 μM GTBP)

1.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Vortex Mixer)

ชุดกรอง (Filtration Unit)

1.1.4 เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (Auto-Microipette ของ Gilson) ขนาด 1.0, 5.0 มิลลิลิตร

1.1.5 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร พร้อมฝาครอบ

1.1.6 เครื่องกรองสูญญากาศ

1.1.7 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

2. รีเอเจนต์

2.1 น้ำทะเลที่ผ่านการกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

2.2 น้ำกลั่น ปลอดเชื้อ

2.3 สีย้อมเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Fluorocome) โดยใช้สีย้อม Acridine Orange

2.4 Immersion Oil

2.5 สไลด์ และ Cover Glass

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง (APHA., AWWA., & WEF., 1922)

1. นำตัวอย่างน้ำจากหลอดที่คงสภาพไว้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองเปล่า เติมน้ำทะเล (ที่กรองผ่านเยื่อกรองขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร) 3 มิลลิลิตร และเติมสีย้อม Acridine Orange 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยานาน 3 นาที

2. นำตัวอย่างน้ำที่ได้กรองผ่านเยื่อกรอง Nuclepore (Polycarbonate) ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร ที่แรงดัน 13 kpg จนเกือบแห้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1-2 มิลลิลิตร และกรองจนเกือบแห้งอีกครั้ง

3. นำเยื่อกรองที่ได้วางบนสไลด์ หยดน้ำมัน Immersion ปิดด้วย Cover Glass

4. นำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Epifluorescence โดยสุ่มนับ 10 พื้นที่อย่างทั่วทั้งเยื่อกรองแต่ละพื้นที่ นับจำนวนเซลล์ใน 25 ช่องเล็ก ในกรณีที่เซลล์มีปริมาณมาก (มากเกิน 300 เซลล์ ต่อพื้นที่) ถ้าเซลล์มีปริมาณน้อย ให้นับ 50 ช่อง หรือ 100 ช่อง (สำหรับเซลล์ที่มีปริมาณมากจนนับไม่ได้ หรือมีตะกอนมาก ให้ทำการเจือจางตัวอย่าง และทำการทดลองใหม่) และนำไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อมิลลิลิตร

5. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากผลการทดลองเปรียบเทียบกับวิธี Total Plate Count

6. ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตจากวิธีนับเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Total Plate Count)

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (Auto-Microipette ของ Gilson) ขนาด 0.1, 1.0 มิลลิลิตร

1.2 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

1.3 ตู้กรองอากาศ (Laminar Flow)

1.4 แท่งแก้วเกลี่ยกระจาย (Spreader)

1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า

1.6 จานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish)

1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Vortex Mixer)

1.8 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร พร้อมฝาครอบ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 น้ำทะเล 90 เปอร์เซ็นต์ ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร

2.2 Modified Zobell Agar

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง

ตัวอย่างน้ำ

1. ถ่ายตัวอย่างน้ำด้วยเรื่องดูดสารปริมาณน้อย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบอนุกรมด้วยน้ำทะเล 90 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ความเข้มข้น $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ตามลำดับ

2. หลังจากน้ำดูดตัวอย่างน้ำในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยกระจายลงบนอาหาร Modified Zobell Agar ทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3. นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ขึ้นบนอาหาร Modified Zobell Agar จากน้ำตัวอย่างน้ำ คำนวณปริมาณเชื้อที่พบต่อตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร

4. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากผลการทดลองนำมาเปรียบเทียบกับวิธีนับจำนวนเซลล์โดยตรง (Direct Count)

ตัวอย่างดิน

1. ชั่งตัวอย่างตะกอนดิน 1 กรัม ทำการเจือจางแบบอนุกรม ด้วยน้ำทะเล 90 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ตามลำดับ

2. หลังจากนั้นดูดตัวอย่างน้ำในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยกระจายบนอาหาร Modified Zobell Agar ทำซ้ำ 3 ซ้ำ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3. นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ขึ้นบนอาหาร Modified Zobell Agar จากตัวอย่างตะกอนดิน คำนวณปริมาณเชื้อที่พบต่อดิน 1 กรัม

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิจัย

1. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล เขตพื้นที่การใช้ประโยชน์ สถานี ระยะห่างฝั่งและระดับน้ำ ของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม แบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอร์โรโทรฟิคและแบคทีเรียรวมทั้งหมด ในตัวอย่างน้ำด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS For Windows Version 11.5 ด้วยสถิติ ANOVAโดยทำการแปลงข้อมูลของปริมาณแบคทีเรียด้วย Lox (x) เมื่อ x คือปริมาณแบคทีเรีย เพื่อให้ข้อมูลของปริมาณแบคทีเรียมีการกระจายแบบปกติ และทำการทดสอบหลังการทดสอบความแปรปรวน (Post Hoc Tests) ด้วย LSD หรือ Gemes-Howell

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล เขตพื้นที่การใช้ประโยชน์ สถานี ระยะห่างฝั่ง ของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอและแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอร์โรโทรฟิคในตัวอย่างดินตะกอนด้วย โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Windows Version 11.5 ด้วยสถิติ ANOVAโดยทำการแปลงข้อมูล ของปริมาณแบคทีเรียด้วย Lox (x) เมื่อ x คือปริมาณแบคทีเรีย เพื่อให้ข้อมูลของปริมาณแบคทีเรียมี การกระจายแบบปกติ และทำการทดสอบหลังการทดสอบความแปรปรวน (Post Hoc Tests) ด้วย LSD หรือ Gemes-Howell

3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำทั่วไปต่อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์มแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอร์โรโทรฟิคและ แบคทีเรียรวมทั้งหมด ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Windows Version 11.5 ด้วยสถิติ Correlation Coefficient

4. วิเคราะห์การเปรียบเทียบการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอด้วยวิธีการ เกลี่ยกระจายและวิธีการการกรองด้วยเยื่อกรอง ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Windows Version 11.5 ด้วยสถิติ t-Test

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University