



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
การประเมินระบบจุลินทรีย์ดัชนีและคุณภาพน้ำในระบบลุ่มน้ำของระเบียง
เศรษฐกิจพิเศษภาคภาคตะวันออกด้วยการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ของ
จุลินทรีย์ (Assessment of microbial indicator system and water
quality of the river basin system in Eastern Economic Corridor
based on metagenomics analysis)

นางสาวจันทิมา ปิยะพงษ์ หัวหน้าโครงการ
นายสุรศักดิ์ ชันคำ ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวนิชชา จำเริญศักดิ์ศรี ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวนุชสุภา สุนทมาลา ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวสุนิรัตน์ รัตนะ ผู้ร่วมวิจัย
นางลาวัลย์ เอียวสวัสดิ์ ผู้ร่วมวิจัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2562A10903001

สัญญาเลขที่ 57.3/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินระบบจุลินทรีย์ดัชนีและคุณภาพน้ำในระบบลุ่มน้ำของระเบียงเศรษฐกิจพิเศษภาคภาคตะวันออกด้วยการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ของจุลินทรีย์ (Assessment of microbial indicator system and water quality of the river basin system in Eastern Economic Corridor based on metagenomics analysis)

นางสาวจันทิมา ปิยะพงษ์ หัวหน้าโครงการ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

นายสุรศักดิ์ ชันคำ ผู้ร่วมวิจัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

นางสาวนิชชา จำเริญศักดิ์ศรี ผู้ร่วมวิจัย

ธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

นางสาวนุชสุภา สุนทมาลา ผู้ร่วมวิจัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

นางสาวสุนิรัตน์ รัตน์ะ ผู้ร่วมวิจัย

สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 7 (สระบุรี)

นางลาวัลย์ เอียวสวัสดิ์ ผู้ร่วมวิจัย

สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 13 (ชลบุรี)

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินระบบจุลินทรีย์ดัชนีและคุณภาพน้ำในแม่น้ำบางปะกงซึ่งเป็นแม่น้ำสายหลักในระบบลุ่มน้ำของระบียงเศรษฐกิจพิเศษภาคตะวันออกด้วยการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ของจุลินทรีย์ เก็บข้อมูลจากพารามิเตอร์คุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพ เคมีและชีวภาพจาก 6 สถานีของแม่น้ำบางปะกง ครอบคลุม ต้นน้ำ กลางน้ำและปลายน้ำ ในปี พ. ศ. 2563 และศึกษาข้อมูลอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์ที่ได้จากการวิเคราะห์หุ้มน้ำจุลินทรีย์ด้วย shotgun metagenomics ผลการศึกษาที่คำนวณจาก ดัชนีคุณภาพน้ำแหล่งน้ำผิวดิน (Water Quality Index, WQI) พบว่า สถานีปากน้ำมีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์เสื่อมโทรม ส่วนสถานีกลางน้ำและต้นน้ำที่อยู่ในชุมชนมีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์พอใช้ ขณะที่สถานีต้นน้ำและเป็นพื้นที่ป่าคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ดี ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์ที่ได้จากการวิเคราะห์โดย shotgun metagenomics นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์เด่น (dominant taxon) คือ *Pseudomonas* spp. ซึ่งพบที่สถานีปากแม่น้ำมากกว่าสถานีอื่นๆ ที่เป็นแหล่งน้ำคุณภาพดีมากกว่า ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้อาจใช้เป็นจุลินทรีย์ดัชนีเพื่อประเมินมลพิษทางน้ำในเขตนํ้ากร่อยหรือแม่น้ำบางปะกงได้

Abstract

This study was aimed to investigate assessment of microbial indicator system and water quality of Bangpakong River as the major river basin system in Eastern Economic Corridor based on metagenomic analysis. We collected the water quality data: physical, chemical and biological parameters from 6 stations (from upstream, middle-stream, and downstream of Bangpakong River) in 2020. We also explored microbial taxonomy from shotgun metagenomic analysis of microbial community. From Surface Water Quality Index (WQI), the station at the river mouth was poor while the stations at middle-stream and upstream with human settlement were fair and the stations at the upstream with the forest were good. These WQI results were corresponded to the taxonomy profiles from the shotgun metagenomic analysis. Also, *Pseudomonas* spp. were dominant taxa at the station at the river mouth and were more abundant when comparing to other stations with better water quality. Therefore, it is possible that these bacterial groups could be used as indicators for assessment of water pollution in estuary or Bangpakong River.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 57.3/2562

งานวิจัยนี้สำเร็จได้เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากหลายหน่วยงานได้แก่ กองบริหารการวิจัยและนวัตกรรม ภาควิชาชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 13 (ชลบุรี) ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดฉะเชิงเทราและอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่

งานวิจัยนี้ไม่อาจสำเร็จลุล่วงได้ถ้าปราศจากความอนุเคราะห์รวมทั้งการให้คำปรึกษาอย่างน้อยช่วงใดช่วงหนึ่งของงานวิจัยนี้ ได้แก่ นายภัครธรณ์ เทียนไชย (ผู้ว่าราชการจังหวัดชลบุรี) รศ. ดร. สยาม อรุณศรีมรกด ดร. ปัญญา วรเพชรายุทธ ดร. ชวีณูรวิ สิริกาญจน ผศ. ดร. ศศิธร มั่นเจริญ ดร. กฤษณัยน์ เจริญจิตร นางสาวนิภาภรณ์ แสนภาษา Dr. Julien Claude Prof. Marco Ciolli Dr. Clara Tattoni Prof. Ruben Sommaruga Dr. Emmanuel Paradis และ ผศ. เผชญิโชค จินตเศรณี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้มีพระคุณที่ไม่ได้เอ่ยนามที่มีส่วนร่วมให้ความช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญภาพ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
วิธีดำเนินการวิจัย	
การตรวจวัดคุณภาพน้ำและการเก็บตัวอย่างน้ำ.....	4
การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ shotgun metagenomics.....	7
ผลการศึกษา	
ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำ.....	9
Taxonomy profile จากการศึกษาชุมชนจุลินทรีย์ (microbial community) ด้วย shotgun metagenomics.....	18
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา.....	28
บรรณานุกรม.....	30
ภาคผนวก	

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 สถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ จำนวน 6 สถานี บริเวณแม่น้ำบางปะกง.....	5
2 ช่วงเวลาตรวจวัดคุณภาพน้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ เก็บตัวอย่างวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2563.....	6
3 ช่วงเวลาตรวจวัดคุณภาพน้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ เก็บตัวอย่างวันที่ 10 กันยายน 2563.....	6
4 ช่วงเวลาตรวจวัดคุณภาพน้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ เก็บตัวอย่างวันที่ 10 พฤศจิกายน 2563.....	6
5 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Temperature °c) และความเค็ม (Salinity psu) ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง.....	11
6 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณสารแขวนลอยในน้ำ (Suspended Solids mg/L) ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง.....	12
7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen, DO mg/L) และความต้องการออกซิเจนในกระบวนการทางชีวภาพ (Biological Oxygen Demand, BOD mg/L) ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง.....	13
8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจนละลายน้ำ (Dissolved Inorganic Nitrogen, DIN) ได้แก่ แอมโมเนีย (Ammonia, NH ₃ -N µg/L) ไนไตรท์ (Nitrite, NO ₂ -N µg/L) และไนเตรท (Nitrate, NO ₃ -N µg/L) ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง..	14
9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ฟอสฟอรัสละลายน้ำ (Dissolved Inorganic Phosphorous, DIP) ได้แก่ ออโรฟอสเฟต (Phosphate, PO ₄ -P µg/L) ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง.....	15
10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย ได้แก่ แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria, FCB MPN/100mL) แบคทีเรียโคลิฟอร์มรวมทั้งหมด (Total Coliform Bacteria, TCB MPN/100mL) และ <i>Escherichia coli</i> ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง.....	16
11 กราฟแสดงการวิเคราะห์ค่าของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis).....	17
12 แผนภูมิแท่งแสดง phylum-profile ของจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบตามระดับของความชุกชุมสัมพันธ์ในแต่ละแห่งของแต่ละซ้ำในแต่ละสถานีที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics ในฤดูฝน (กันยายน 2563) จาก 6 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำ ตั้งแต่ปากน้ำแม่น้ำบางปะกง (BK-01) ถึงต้นน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ แก่งหินเพิง (BK-06) สถานีละ 3 ซ้ำ.....	20
13 แผนภูมิแท่งแสดง phylum-profile ของจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบตามระดับของความชุกชุมสัมพันธ์ในแต่ละแห่งของแต่ละซ้ำในแต่ละสถานีที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metaagenomics ในฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2563) จาก 6 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำ ตั้งแต่ปากน้ำแม่น้ำบางปะกง (BK-01) ถึงต้นน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ แก่งหินเพิง (BK-06) สถานีละ 3 ซ้ำ.....	21

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
14	
<p>แผนภูมิแท่งแสดง strain profile ของจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบตามระดับของความชุกชุมสัมพันธ์ในแต่ละสถานีที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics โดยแผนภูมิลำดับแสดงในฤดูฝน (กันยายน 2563) และแผนภูมิลำดับแสดงในฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2563) จาก 6 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำ ตั้งแต่ปากน้ำแม่น้ำบางปะกง (BK-01) ถึงต้นน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ แก่งหินเพิง (BK-06) สถานีละ 3 ซ้ำ.....</p>	
	22
15	
<p>แผนที่ความร้อนทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy heatmap) แสดงความชุกชุมสัมพันธ์ของ 50 สายพันธุ์ (strain) แรกของจุลินทรีย์ที่มีค่าสูงสุด ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics โดยการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มตามลำดับชั้น (hierarchical clustering) ตามความไม่คล้ายคลึงกันแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis dissimilarity).....</p>	
	23
16	
<p>แผนที่ความร้อนทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy heatmap) แสดงความชุกชุมสัมพันธ์ของ 50 สายพันธุ์ (Strain) ชนิดแรกของจุลินทรีย์ที่มีค่าสูงสุด ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics โดยการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (Cluster analysis) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มตามลำดับชั้น (Hierarchical clustering) ตามความไม่คล้ายคลึงกันแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis dissimilarity).....</p>	
	24
17	
<p>การเปรียบเทียบความหลากหลายระหว่างสถานี (Beta diversity) วัดความแตกต่างความหลากหลายของจุลินทรีย์ระหว่างตัวอย่างโดยใช้ Principal Coordinate Analysis (PCoA) plots แสดงแบบ 3 มิติโดยใช้ matrix ของระยะทางในแต่ละคู่ระหว่างตัวอย่างมาใช้คำนวณหาความไม่คล้ายคลึงกันแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis dissimilarity) ในระดับสายพันธุ์ (Strian).....</p>	
	26

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตำแหน่งสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ.....	5
2 ปัจจัยคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ และวิธีการตรวจวัด.....	7
3 ผลจากการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมีและชีวภาพแยกตามพารามิเตอร์และฤดูกาล ...	10
4 สรุปข้อมูลจุลินทรีย์ดักจับที่สามารถบ่งชี้มลพิษทางน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics ทั้ง 2 ฤดูตลอดการศึกษา.....	27

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

นโยบายระเบียงเขตเศรษฐกิจภาคตะวันออก (Eastern Economic Corridor : EEC) เป็นนโยบายตามแผนยุทธศาสตร์ประเทศภายใต้นโยบายไทยแลนด์ 4.0 มีโครงการพัฒนาขนาดใหญ่เป็นจำนวนมาก โดยมีมติคณะรัฐมนตรีมีมติเห็นชอบให้ 3 จังหวัดภาคตะวันออก ได้แก่ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และระยอง เป็นพื้นที่เป้าหมายของโครงการพัฒนาระเบียงเศรษฐกิจพิเศษภาคตะวันออก (ECC) เพื่อสนับสนุนการยกระดับขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ ส่งเสริมการขยายตัวทางเศรษฐกิจ เพิ่มการจ้างงาน ยกระดับคุณภาพชีวิตและรายได้ของประชาชน ซึ่งการส่งเสริมพื้นที่เขตระเบียงเศรษฐกิจพิเศษภาคตะวันออกจะส่งผลให้พื้นที่มีประชากรหนาแน่นและมีประชากรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีผลต่อความต้องการทรัพยากรธรรมชาติที่มากขึ้น ทั้งนี้รวมถึงนโยบายหรือโครงการขนาดใหญ่ (Mega Project) อื่นๆ ที่ภาครัฐผลักดัน ก็อาจส่งผลกระทบต่อความต้องการการใช้ทรัพยากรที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วได้เช่นกัน

จากการพัฒนา EEC จะทำให้จำนวนประชากรและการพัฒนาทางเศรษฐกิจเพิ่มสูงขึ้น จึงมีความต้องการการใช้ทรัพยากรน้ำ ซึ่งเป็นปัจจัยต้นทุนที่สำคัญที่สุดในระบบนิเวศที่จะได้รับผลกระทบอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาอันสั้น เกิดการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดินในลุ่มน้ำ ซึ่งกิจกรรมการใช้ที่ดินส่วนใหญ่เป็นที่พักอาศัย การเกษตร อุตสาหกรรม ที่ล้วนเป็นสาเหตุทำให้แหล่งน้ำเสื่อมโทรมเกิดมลพิษทางน้ำ เนื่องด้วยระบบนิเวศแหล่งน้ำไม่สามารถฟื้นฟูตัวเองได้ทันกับสถานการณ์ที่มีการใช้ทรัพยากรน้ำมากขึ้นกว่าที่ระบบนิเวศสามารถรับได้ และอาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศในเชิงลบ อีกทั้งมีผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศแหล่งน้ำ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญในระบบนิเวศของแหล่งน้ำ เพราะจุลินทรีย์ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย ทำให้เกิดการหมุนเวียนวัฏจักรของสารต่างๆ ในระบบนิเวศ มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของสาร และเป็นที่ยึดกันดีอยู่แล้วว่า จุลินทรีย์ที่พบในแหล่งน้ำมีทั้งชนิดที่ดีและช่วยรักษาระบบนิเวศ และมีทั้งชนิดที่เป็นอันตรายต่อระบบนิเวศและก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ และเมื่อระบบนิเวศแหล่งน้ำไม่ดีก็เกิดปัญหาด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจ สังคมและสิ่งแวดล้อม

การประเมินความเสี่ยงและการจัดการคุณภาพน้ำเป็นสิ่งสำคัญ และเกี่ยวข้องกับการออกกฎระเบียบและการควบคุมของภาครัฐ ปัจจุบันมุ่งเน้นและให้ความสำคัญกับแหล่งน้ำที่สามารถนำไปใช้ในการบริโภค และประกอบกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ ซึ่งก็คือน้ำดื่มและน้ำประปา โดยกลยุทธ์นี้ยังไม่เพียงพอต่อการป้องกันการระบาดของโรคที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ความสำเร็จของการประเมินความเสี่ยงและการจัดการคุณภาพน้ำไม่เพียงแต่มุ่งเน้นสุขภาพของมนุษย์ แต่ต้องมุ่งเน้นสุขภาพของระบบนิเวศแหล่งน้ำด้วย เพื่อให้ครอบคลุมความสำเร็จดังกล่าว จึงจำเป็นต้องประเมินระบบน้ำในระบบนิเวศทั้งหมด ซึ่งเป็นการจัดการน้ำ ตั้งแต่แหล่งของน้ำ ต้นทางของน้ำ จนถึงน้ำที่พร้อมนำไปใช้บริโภคและกิจกรรมต่างๆ (Source-to-tap framework)

ประชากรจุลินทรีย์พบในทุกระบบนิเวศ ตั้งแต่ในลำไส้ของแมลงไปจนถึงในทะเล หรือในตะกอนดินใต้ทะเล ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบมีทั้งชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงเพื่อคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ได้ ซึ่งพบว่ามีเพียงประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และที่เหลือเป็นชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนจานอาหารในห้องปฏิบัติการได้ซึ่งเป็นการจำกัดการศึกษาวิจัยด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์ ดังนั้น การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศแหล่งน้ำโดยการใช้เทคโนโลยีเมตาจีโนมิกส์ในแม่น้ำบางปะกงที่เป็นแม่น้ำสายหลักในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกและพื้นที่สนับสนุน ECC บริเวณต้นน้ำ กลางน้ำ และปลายน้ำ โดยแต่ละบริเวณของแม่น้ำให้บริการทางนิเวศที่สนับสนุนกิจกรรมมนุษย์ที่แตกต่างกัน การปลดปล่อยสารเคมีลงสู่แหล่งน้ำแตกต่างกัน และสภาพภูมิอากาศในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน ล้วนเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศแหล่งน้ำ ซึ่งการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์เป็นการใช้ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปบูรณาการกับข้อมูลการตรวจวัดคุณภาพแหล่งน้ำทางเคมีและกายภาพที่หน่วยงานภาครัฐดำเนินการ เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินความเสี่ยงและการจัดการคุณภาพน้ำสำหรับพื้นที่พัฒนาระเบียงเศรษฐกิจภาคตะวันออกให้เกิดประโยชน์สูงสุด และเป็นรูปธรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อได้ข้อมูลความหลากหลายของจุลินทรีย์ และการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในแม่น้ำบางปะกงจากตัวอย่างแหล่งน้ำในบริเวณต้นน้ำ กลางน้ำ และ ปลายน้ำ ซึ่งเป็นแหล่งที่มีกิจกรรมการใช้ประโยชน์จากประชาชนในพื้นที่ ทั้งเพื่อการอยู่อาศัย การเกษตร และ อุตสาหกรรม ในแต่ละฤดูกาล
2. เพื่อใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ดัชนี ที่สามารถใช้เป็นอ้างอิงในการประเมินความเสี่ยงและการจัดการคุณภาพของระบบนิเวศน้ำจืดในเขตพื้นที่ ECC ในแต่ละฤดูกาล
3. เพื่อให้ประชาชน เกษตรกร และผู้ประกอบการอุตสาหกรรม ที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นที่วิจัย ทราบ และตระหนักถึงการใช้น้ำในการอุปโภคบริโภคอย่างปลอดภัย และร่วมกันดูแลสภาพแวดล้อมรวมทั้งป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และสิ่งปนเปื้อนลงสู่แม่น้ำ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้องค์การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ จากตัวอย่างแหล่งน้ำในตัวอย่างแหล่งน้ำในบริเวณต้นน้ำ กลางน้ำ และ ปลายน้ำ ของแม่น้ำบางปะกง ด้วยเทคโนโลยีเมตาจีโนมิกส์ซึ่งเป็นแหล่งที่มีกิจกรรมการใช้ประโยชน์จากประชาชนในพื้นที่ ทั้งเพื่อการอยู่อาศัย การเกษตร และอุตสาหกรรม ในแต่ละฤดูกาลในช่วงเวลา 1 ปี ของแหล่งน้ำในเขตพื้นที่พัฒนาระเบียงเศรษฐกิจภาคตะวันออก (ECC)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลความหลากหลาย และการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในเขตพื้นที่ EEC จากตัวอย่างแหล่งน้ำในแม่น้ำบางปะกงบริเวณต้นน้ำ กลางน้ำและปลายน้ำซึ่งเป็นแหล่งที่มีกิจกรรมการใช้

ประโยชน์จากประชาชนในพื้นที่ และแหล่งที่ใช้ประโยชน์ทางการเกษตรในแต่ละฤดูกาล เพื่อวางแผนการจัดการน้ำแบบบูรณาการต่อไป

2. สามารถใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์ในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ดัชนีที่สามารถใช้เป็นอ้างอิงในการออกแบบการจัดการคุณภาพของระบบนิเวศน้ำจืดในเขตพื้นที่ EEC และเขตเศรษฐกิจอื่น ๆ ของประเทศได้

3. ประชาชน เกษตรกร และผู้ประกอบการอุตสาหกรรม ที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นที่วิจัยทราบ และตระหนักถึงการใช้น้ำในการอุปโภคบริโภคอย่างปลอดภัย และร่วมกันดูแลสภาพแวดล้อม รวมทั้งป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และสิ่งปฏิกูลลงสู่แม่น้ำ

วิธีดำเนินการวิจัย

การตรวจวัดคุณภาพน้ำและการเก็บตัวอย่างน้ำ

เนื่องจากสถานการณ์โรคระบาดของไวรัสโคโรนา (COVID-19) ทางสำนักอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช ประกาศปิดการเข้าในอุทยานแห่งชาติและวนอุทยานทุกแห่ง ระหว่างวันที่ 25 มีนาคมถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2563 ทำให้การออกภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำที่ใน สถานีอ้างอิง BK-06 (Reference site) ซึ่งอยู่ในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ไม่สามารถดำเนินการได้ตามแผนงานที่วางไว้ ดังนั้นเพื่อให้การดำเนินการวิจัยสอดคล้องกับวัตถุประสงค์หลัก การออกภาคสนามตามฤดูเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อศึกษา shotgun metagenomics จึงเก็บข้อมูลได้เพียง 3 ครั้ง ในรอบปีตามฤดูกาลของประเทศไทยที่สอดคล้องกับประกาศของกรมอุทยานวิทยา ที่แบ่งเป็น 3 ฤดู คือ ฤดูร้อนเก็บตัวอย่างในภาคสนามในเดือนกุมภาพันธ์ 2563 ฤดูฝนในเดือนกันยายน 2563 และฤดูหนาวเดือนพฤศจิกายน 2563 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จาก shotgun metagenomics มีเพียงแค่ 2 ฤดูคือฤดูน้ำมาก/ฤดูฝนในเดือนกันยายน 2563 และฤดูน้ำน้อย/ฤดูหนาวในเดือนพฤศจิกายน 2563 เท่านั้น เนื่องจากปัญหาทางเทคนิคในการกรองตัวอย่างน้ำและการสกัดดีเอ็นเอ และคุณภาพดีเอ็นเอเพื่อส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ shotgun metagenomics ในเดือนกุมภาพันธ์ 2563

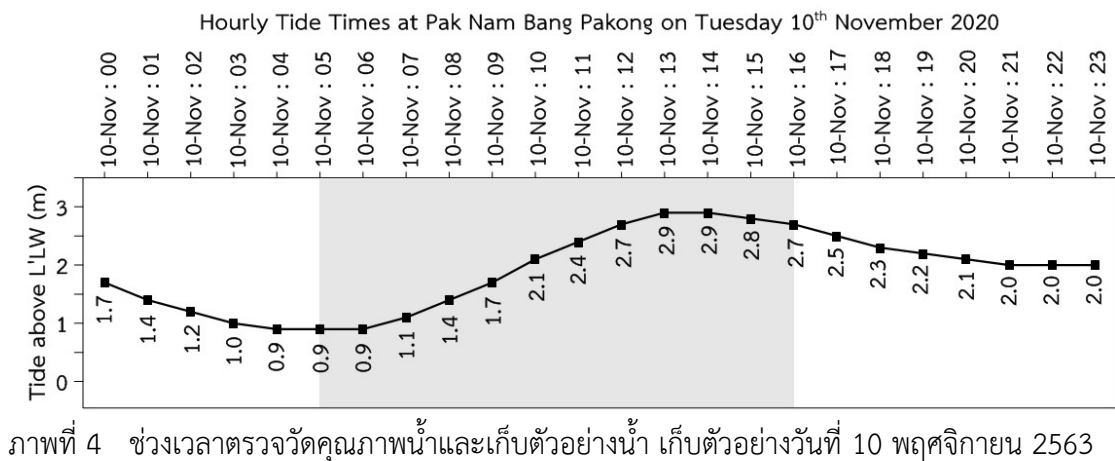
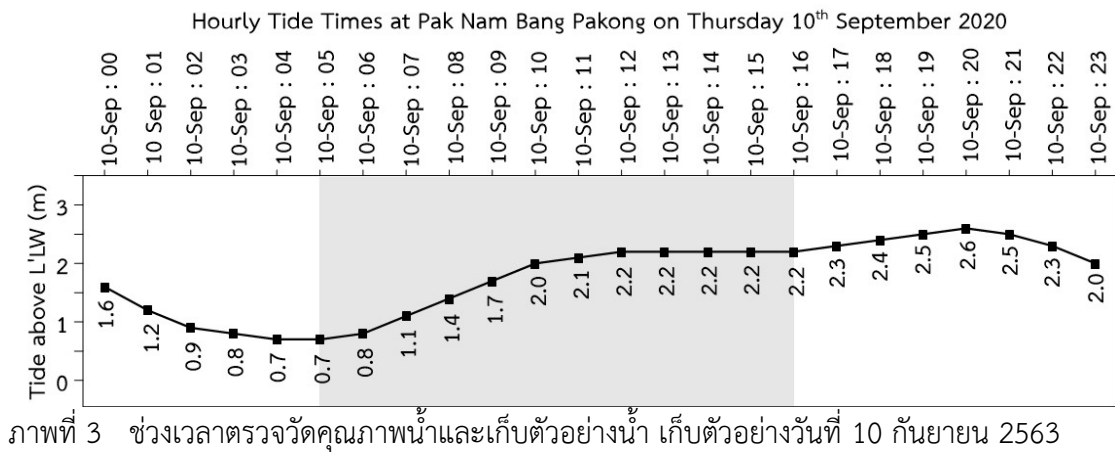
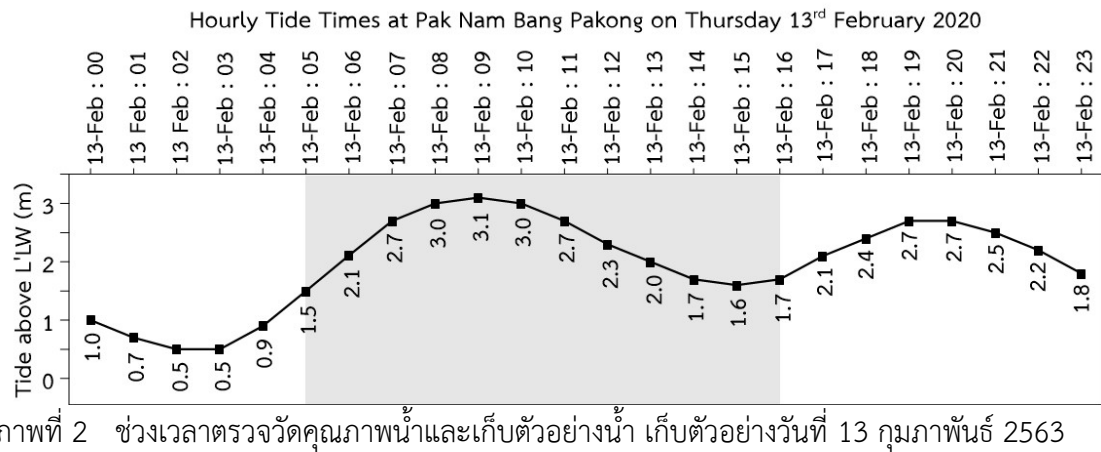
ตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพ และเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อตรวจวัดคุณภาพน้ำทางเคมี และชีวภาพ ตลอดความยาวแม่น้ำบางปะกงรวม 177 กิโลเมตร จำนวน 6 สถานี ได้แก่ สถานี BK-01 ศูนย์ฝึกรบกรมบางปะกง การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ) ตำบลท่าข้าม อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ตั้งอยู่บริเวณปากแม่น้ำบางปะกงซึ่งรองรับคุณภาพน้ำจากทุกสถานีก่อนระบายออกสู่บางปะกงเอสทรี สถานี BK-02 วัดสมานรัตนาราม ตำบลก้อนแก้ว อำเภอมะนิคมฉะเชิงเทรา จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่เป็นชุมชนและพื้นที่รับน้ำจากเขื่อนทดน้ำบางปะกง มีระยะทางห่างจากศูนย์ฝึกรบกรมบางปะกง กฟผ. ประมาณ 45 กิโลเมตร สถานี BK-03 วัดหัวไทร ตำบลหัวไทร อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นพื้นที่รับน้ำจากชุมชนและพื้นที่เกษตรกรรมในพื้นที่ มีระยะทางห่างจากวัดสมานรัตนารามประมาณ 20 กิโลเมตร สถานี BK-04 สะพานต้นน้ำบางปะกง ตำบลวังดาล อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ซึ่งรับน้ำจากชุมชนและเกษตรกรรมจากคลองพระปรังและแม่น้ำหนุมาน มีระยะทางห่างจากวัดหัวไทรประมาณ 80 กิโลเมตร สถานี BK-05 สะพานหิน (รอบนอกเขตอุทยาน) ตำบลสะพานหิน อำเภอนาดี จังหวัดปราจีนบุรี ซึ่งรับน้ำจากชุมชนบริเวณคลองใส่น้อยแม่น้ำหนุมาน มีระยะทางห่างจากสะพานต้นน้ำบางปะกงประมาณ 22 กิโลเมตร และสถานี BK-06 แก่งหินเพิงในอุทยานฯ (จุดอ้างอิงต้นน้ำ) ในแม่น้ำหนุมานใสใหญ่ อำเภอนาดี จังหวัดปราจีนบุรี มีระยะทางห่างจากสะพานหินประมาณ 10 กิโลเมตร(ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) ดำเนินการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพและเก็บตัวอย่างน้ำรวมจำนวน 3 ครั้งในรอบปี ตามฤดูกาลของประเทศไทยที่สอดคล้องกับประกาศของกรมอุทยานวิทยา ได้แก่ ช่วงฤดูร้อนในวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2563 ช่วงฤดูฝนในวันที่ 10 กันยายน 2563 และช่วงฤดูหนาวในวันที่ 10 พฤศจิกายน 2563 ตามลำดับ โดยทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำและเก็บตัวอย่างน้ำในช่วงน้ำขึ้นตามตารางน้ำ (กรมอุทกศาสตร์, 2563) แสดงในภาพที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ตำแหน่งสถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ

สถานี	ลองจิจูด	แลตติจูด
BK-01 ศูนย์ฝึกรบกรมบางปะกง กฟผ.	100° 58' 55.6" E	13° 28' 33.2" N
BK-02 วัดสมานรัตนาราม	101° 08' 30.3" E	13° 42' 07.4" N
BK-03 วัดหัวไทร	101° 12' 10.3" E	13° 46' 39.4" N
BK-04 สะพานต้นน้ำบางปะกง	101° 42' 19.3" E	13° 59' 11.8" N
BK-05 สะพานหิน รอบนอกเขตอุทยาน	101° 43' 38.4" E	14° 08' 48.1" N
BK-06 แก่งหินเพิงในอุทยานฯ (จุดอ้างอิง)	101° 43' 46.5" E	14° 10' 03.1" N



ภาพที่ 1 สถานีตรวจวัดคุณภาพน้ำและเก็บตัวอย่างน้ำ จำนวน 6 สถานี บริเวณแม่น้ำบางปะกง (ดัดแปลงจากภาพถ่ายดาวเทียมจาก www.google.co.th)



ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพที่ผิวน้ำ ณ สถานีเก็บตัวอย่าง (in-situ) ในภาคสนาม ได้แก่ อุณหภูมิ (Temperature, T °c) ความเค็ม (Salinity, S psu) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen, DO mg/L) ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (Total Dissolved Solids, TDS g/L) ด้วยเครื่องวัดคุณภาพน้ำแบบหลายตัวแปร (Multi

parameter sensors / Multi-probe) ยี่ห้อ YSI รุ่น 6600 และเก็บตัวอย่างน้ำที่ผิวน้ำเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนจากตะกอนพื้นท้องน้ำ นำตัวอย่างน้ำกลับมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทางเคมีได้แก่ ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids, SS mg/L) ความต้องการออกซิเจนทางชีวภาพ (Biological Oxygen Demand, BOD mg/L) สารอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจนละลายน้ำ (Dissolved Inorganic Nitrogen, DIN) ได้แก่ แอมโมเนีย (Ammonia, NH₃-N µg/L) ไนไตรท์ (Nitrite, NO₂-N µg/L) ไนเตรท (Nitrate, NO₃-N µg/L) สารอาหารอนินทรีย์ฟอสฟอรัสละลายน้ำ (Dissolved Inorganic Phosphorous, DIP) ได้แก่ ออโรฟอสเฟต (Phosphate, PO₄-P µg/L) และวิเคราะห์ทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria, FCB MPN/100mL) แบคทีเรียโคลิฟอร์มรวมทั้งหมด (Total Coliform Bacteria, TCB MPN/100mL) และ *Escherichia coli* (*E. coli*) วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีและชีวภาพสรุปไว้ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยข้อมูลของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำข้างต้นจะนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบหลายตัวแปรโดยใช้การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) ในโปรแกรม R

ตารางที่ 2 ปัจจัยคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ และวิธีการตรวจวัด

Parameters	Equipments/Methods
Temperature, T °c	Multi parameter sensors / Multi-probe
Salinity, S psu	Multi parameter sensors / Multi-probe
pH	Multi parameter sensors / Multi-probe
Dissolved Oxygen, DO mg/L	Multi parameter sensors / Multi-probe
Total Dissolved Solids, TDS g/L	Multi parameter sensors / Multi-probe
Suspended Solid, SS mg/L	GF/C Filter Gravimetric Method
Biological Oxygen Demand, BOD mg/L	Azide Modification (Strickland & Parsons, 1972)
Ammonia, NH ₃ -N µg/L	Phenol-hypochloride (Grasshoff <i>et al.</i> , 1999)
Nitrite, NO ₂ -N µg-N/L	Diazotization (Strickland & Parsons, 1972)
Nitrate, NO ₃ -N µg/L	Cd reduction & Diazotization (Strickland & Parsons, 1972)
Phosphate, PO ₄ -P µg/L	Ascorbic acid (Strickland & Parsons, 1972)
Fecal Coliform Bacteria, FCB MPN/100 mL	Multiple Tube Fermentation Technique (APHA, AWWA & WEF, 2017)
Total Coliform Bacteria, TCB MPN/100 mL	Multiple Tube Fermentation Technique (APHA, AWWA & WEF, 2017)
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	Multiple Tube Fermentation Technique (Feng <i>et al.</i> , 2002)

การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ shotgun metagenomics

ภายหลังทดลองหาและคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ ชุดสกัดดีเอ็นเอจาก ZymoBIOMICS[®] นำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอในโครงการนี้ โดยนำกระดาศกรองที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาจากกระบวนการกรองน้ำที่ได้จากการเก็บตัวอย่างน้ำของแต่ละตัวอย่างในแต่ละสถานีมาตัดให้มีขนาดเล็กและดำเนินการสกัดดีเอ็นเอด้วยตามขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอด้วย ZymoBIOMICS[®]

DNA kit ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก 3 กระจาดของของแต่ละซ้ำของแต่ละสถานีถูกนำมาวัดคุณภาพดีเอ็นเอของแต่ละชุดของการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละกระจาดของ เมื่อได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์มากพอและไม่ปนเปื้อนโปรตีนหรือสารตัวอื่นๆ ตัวอย่างที่ได้ที่มีคุณภาพที่ดีที่สุดถูกนำไปวิเคราะห์ที่ Zymo Research สำหรับ shotgun metagenomics ต่อไปและตัวอย่างที่เหลือถูกเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาในอนาคต

การเตรียม library จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย shotgun metagenomics ทำด้วย Nextera® DNA Flex Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA) โดยการใช้ internal dual-index 8 bp barcodes กับ with Nextera® adapters (Illumina, San Diego, CA) library ทั้งหมดถูกวัดด้วย TapeStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) แล้วนำรวมกันเป็น abundance ในสัดส่วนที่เท่ากันโดยการรวมรอบสุดท้ายถูกวัดด้วย qPCR และ library สุดท้ายถูกนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย platform ของ NovaSeq® (Illumina, San Diego, CA) ส่วนตัวอย่างควบคุมในการศึกษา ใช้ ZymoBIOMICS® microbial community DNA standard (Zymo Research, Irvine, CA) เป็น positive control สำหรับการเตรียม library เป้าหมายในแต่ละครั้ง ส่วน negative control เช่น การควบคุมการสกัดหรือการเตรียม library ถูกรวมในการประเมินในกระบวนการในห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์โดยชีวสารสนเทศ ดำเนินการโดย Zymo Research ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ที่มีส่วนที่มีคุณภาพต่ำถูกขจัดออกและปรับด้วย Trimmomatic-0.33 (Bolger *et al.*, 2014) การระบุยีนที่แสดงการดื้อยาของจุลินทรีย์ (antimicrobial resistance) และปัจจัยสำคัญในการก่อโรค (virulence factor) ถูกแสดงโดย DIAMOND sequence aligner (Buchfink *et al.*, 2015) ส่วนข้อมูลองค์ประกอบจุลินทรีย์ถูกแสดงโดย Centrifuge (Kim *et al.*, 2016) จากชุดข้อมูลจีโนมของ มนุษย์ หนู รา ไวรัสและแบคทีเรีย สำหรับข้อมูลความชุกชุมในระดับสายพันธุ์ (Strain-level abundance) ได้มาจากการสกัดผลลัพธ์จาก Centrifuge เพื่อนำไปวิเคราะห์เพิ่มเติมดังนี้ (1) การวิเคราะห์ความหลากหลายชนิดทั้งระดับ alpha-diversity และ beta-diversity (2) การสร้างแผนภูมิแท่งแสดงองค์ประกอบของจุลินทรีย์ QIIME (Caporaso *et al.*, 2012) 3 แผนที่มีความร้อน (heatmap) แสดงความชุกชุมของกลุ่มทางอนุกรมวิธานด้วยการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มตามลำดับชั้น (hierarchical clustering) ตามความไม่คล้ายคลึงกันแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis dissimilarity) และ 4 การค้นหา biomarker ด้วย LEfSe (Segata *et al.*, 2011) โดยการตั้งค่าปรีายาไว้ที่ $p > 0.05$ และ LDA effect size > 2 อย่างไรก็ตามด้วยสถานการณ์โควิดทำให้เกิดความล่าช้าในรับตัวอย่างและผลการวิเคราะห์โดยชีวสารสนเทศทั้งทางฝั่ง Zymo Research และคณะผู้วิจัย ทำให้การรายงานผลที่ได้มาจากการวิเคราะห์ที่เป็นข้อมูลมหาศาล (big data) ไม่สามารถแสดงผลได้ทั้งหมด ดังนั้นในการแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศในรายงานฉบับนี้จะแสดงผลเฉพาะ taxonomy profile ส่วนผลการวิเคราะห์อื่นๆ จะนำมาศึกษาอย่างละเอียดในอนาคตเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารต่อไป

ผลการศึกษา

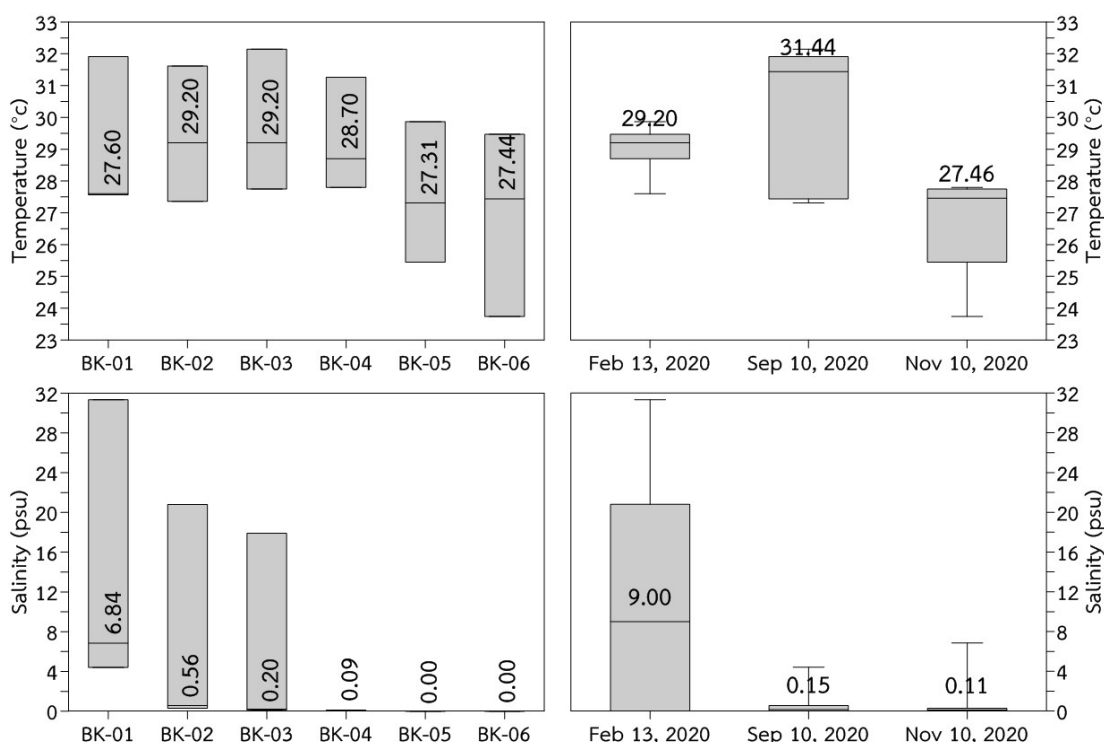
ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำ

ผลจากการตรวจวัดคุณภาพน้ำที่ผิวหน้าน้ำในแม่น้ำบางปะกงทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ แยกตามพารามิเตอร์และฤดูกาลสรุปดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยข้อมูลในแต่ละสถานีและฤดูกาลแสดงด้วยกราฟแบบ Box and Whisker plots (ภาพที่ 5 ถึงภาพที่ 10)

ตารางที่ 3 ผลจากการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมีและชีวภาพแยกตามพารามิเตอร์และฤดูกาล

Parameters	Sampling on 13 th Feb, 2020 ฤดูร้อน		Sampling on 10 th Sep, 2020 ฤดูฝน		Sampling on 10 th Nov, 2020 ฤดูหนาว	
	min-max	mean ± SD	min-max	mean ± SD	min-max	mean ± SD
Physical						
Temp. [°C]	27.60–29.87	29.01 ± 0.79	27.31–32.15	30.28 ± 2.27	23.74–27.80	26.61 ± 1.66
Sal. [psu]	0.00–31.33	11.69 ± 13.53	0.00–4.41	0.88 ± 1.74	0.00–6.84	1.22 ± 2.76
pH	7.25–9.06	8.05 ± 0.70	5.59–7.38	6.57 ± 0.69	6.97–7.74	7.22 ± 0.27
DO [mg/L]	3.47–7.40	5.51 ± 1.91	1.56–7.67	4.99 ± 2.56	2.09–8.58	4.93 ± 2.91
TDS (g/L)	No Data	No Data	0.01–5.24	1.07 ± 2.06	0.01–7.73	1.40 ± 3.10
Chemical						
TSS [mg/L]	1.87–152.28	63.51 ± 70.72	4.69–53.22	23.21 ± 17.09	2.72–58.42	32.18 ± 24.22
BOD [mg/L]	1.20–5.93	3.79 ± 2.18	0.43–3.83	2.11 ± 1.31	0.73–3.23	1.82 ± 0.94
NH ₃ -N [mg/L]	0.01–0.02	0.01 ± 0.00	0.01–0.06	0.03 ± 0.03	0.02–0.12	0.06 ± 0.04
NO ₂ -N [µg/L]	0.15–1.78	0.86 ± 0.61	0.96–38.62	15.32 ± 17.07	1.27–59.91	27.79 ± 25.80
NO ₃ -N [µg/L]	0.51–21.63	6.19 ± 7.77	55.00–405.60	213.12 ± 137.98	33.79–226.66	134.73 ± 71.82
PO ₄ -P [µg-/L]	0.00–2.52	1.05 ± 1.19	10.97–109.90	44.65 ± 36.64	26.17–85.67	51.11 ± 22.92
Microbial						
FCB (MPN/100 mL)	32.50–144.33	74.97 ± 40.30	36.67–636.67	298.17 ± 243.35	19.33–2,010.00	565.20 ± 828.75
TCB (MPN/100 mL)	146.67–2,710.00	747.67 ± 987.30	56.00–4666.67	2,300.44 ± 1,578.35	206.67–13,900.00	3,857.22 ± 5,268.62
E.coli (MPN/100 mL)	No Data	No Data	14.33–856.67	358.50 ± 315.96	7.20–16,00.00	316.19 ± 633.93

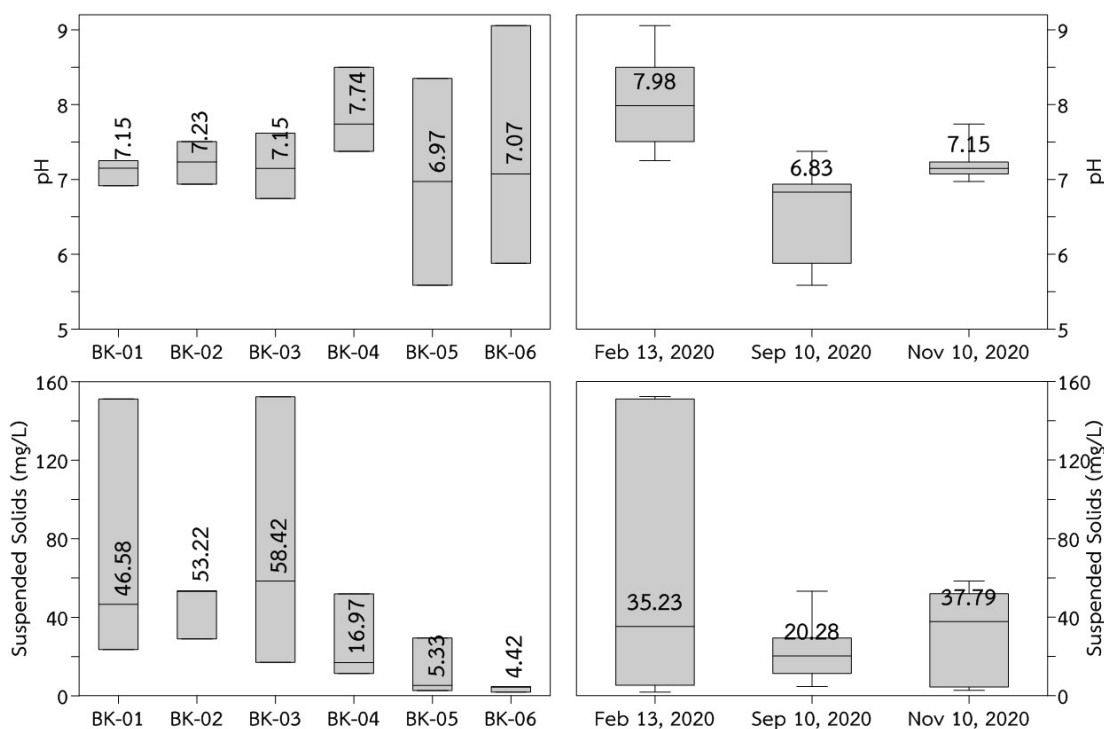
คุณภาพน้ำทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ (Temperature °c) และความเค็ม (Salinity psu) (ภาพที่ 5) มีความแตกต่างกันในแต่ละสถานีเก็บตัวอย่างและฤดูกาล โดยพบอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดที่สถานี BK-06 โดยมีค่าเฉลี่ย 27.44 °c และเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดที่สถานี BK-04 โดยมีค่าเฉลี่ย 28.70 °c ส่วนค่าความเค็มพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดที่สถานี BK-01 โดยมีค่าเฉลี่ย 6.84 psu และไม่เปลี่ยนแปลงเลยที่สถานี BK-05 และ BK-06 ซึ่งมีค่าความเค็ม 0.00 psu และยังพบว่าอุณหภูมิต่างตามฤดูกาลมากที่สุดในช่วงฤดูฝนและน้อยที่สุดในช่วงฤดูร้อน ส่วนความเค็มพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดในฤดูร้อน ส่วนในฤดูฝนและฤดูหนาวแทบจะมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มที่ผิวหน้าน้ำในแม่น้ำบางปะกง



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Temperature °c) และความเค็ม (Salinity psu) ตามสถานี และฤดูกาลที่ผิวหน้าน้ำในแม่น้ำบางปะกง

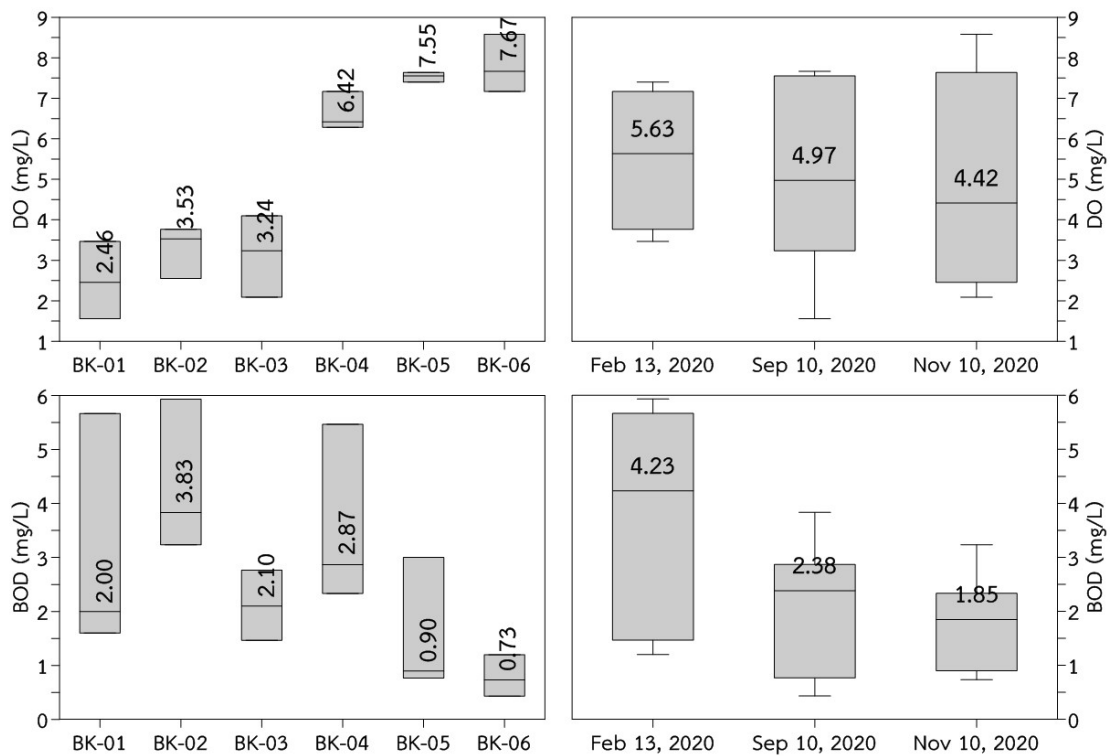
ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH) และปริมาณสารแขวนลอยในน้ำ (Suspended Solids, SS mg/L) (ภาพที่ 6) มีความแตกต่างกันในแต่ละสถานีเก็บตัวอย่างและฤดูกาล โดยพบว่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดที่สถานี BK-05 และ BK-06 โดยมีค่าเฉลี่ย 6.97 และ 7.07 ตามลำดับ และเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดที่สถานี BK-01 โดยมีค่าเฉลี่ย 7.15 และค่าปริมาณสารแขวนลอยในน้ำพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดในรอบปีที่สถานี BK-01 และ BK-03 โดยมีค่าเฉลี่ย 46.58 mg/L และ 58.42 mg/L ตามลำดับ และแทบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลยที่สถานี BK-06 ซึ่งมีค่าปริมาณสารแขวนลอยในน้ำเฉลี่ย 4.42 mg/L และพบว่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำมีความแตกต่างตามฤดูกาลอย่างมากในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน โดยมีค่าเฉลี่ย 7.98 และ 6.83 ตามลำดับ และน้อยที่สุดในช่วงฤดูหนาวมีค่าเฉลี่ย 7.15 ส่วนปริมาณสารแขวนลอยในน้ำพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงมาก

ที่สูงสุดในฤดูร้อนมีค่าเฉลี่ย 35.23 mg/L ส่วนในฤดูฝนและฤดูหนาวมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแขวนลอยในน้ำน้อยกว่ามาก โดยมีค่าเฉลี่ย 20.28 mg/L และ 37.79 mg/L ตามลำดับ



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณสารแขวนลอยในน้ำ (Suspended Solids mg/L) ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง

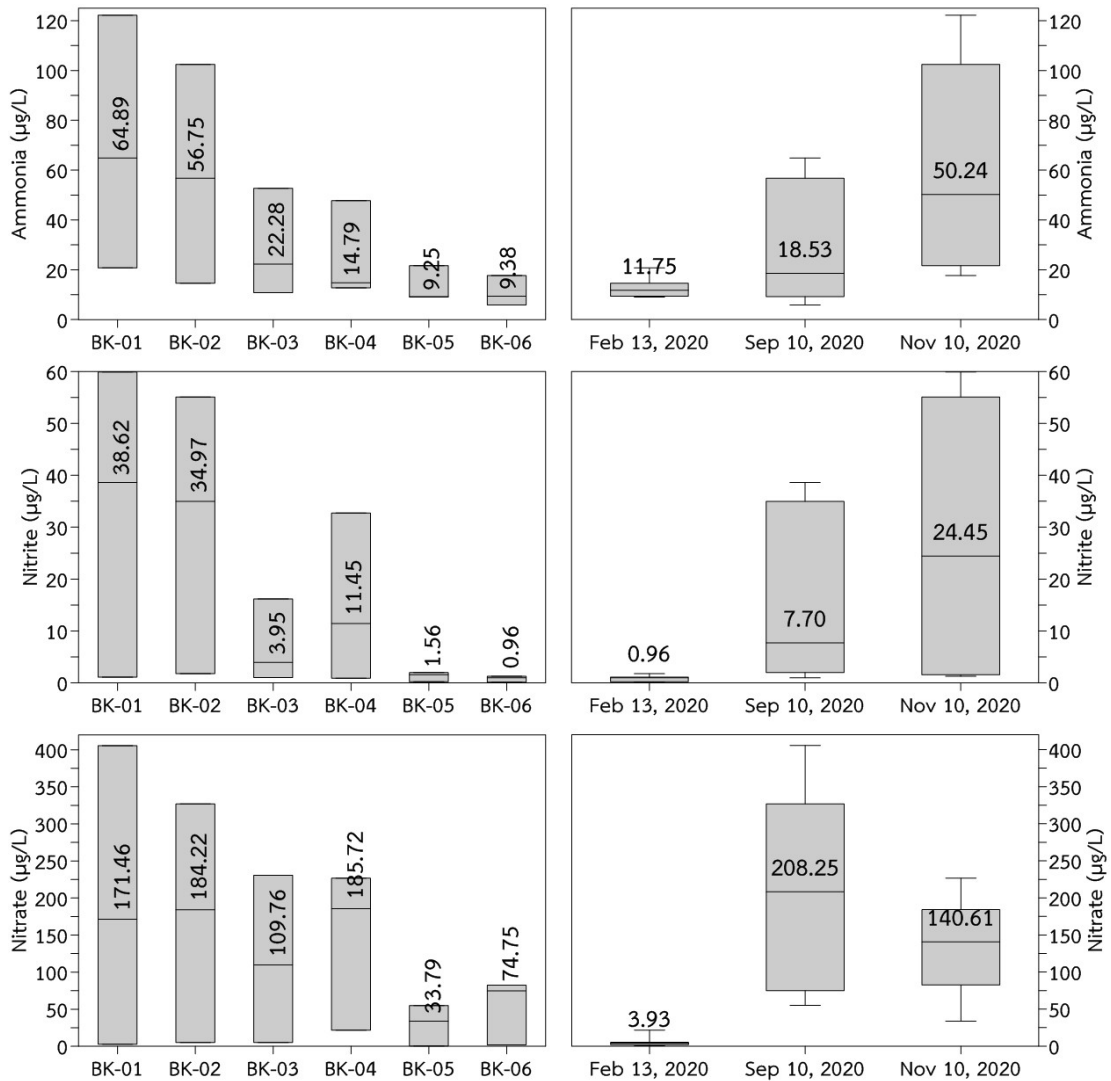
คุณภาพน้ำทางเคมี ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen, DO mg/L) และความต้องการใช้ออกซิเจนทางชีวภาพ (Biological Oxygen Demand, BOD mg/L) (ภาพที่ 7) พบว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละสถานีเก็บตัวอย่างและฤดูกาล โดยพบปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากที่สถานี BK-01, BK-03 และ BK-06 และยังสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำน้อยกว่าระหว่างสถานี BK-01 ถึง BK-03 โดยมีค่าเฉลี่ย 2.46 mg/L, 3.53 mg/L และ 3.24 mg/L ตามลำดับ และกลุ่มที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมากกว่าระหว่างสถานี BK-04 ถึง BK-06 โดยมีค่าเฉลี่ย 6.42 mg/L, 7.55 mg/L และ 7.67 mg/L ตามลำดับ ในขณะที่ค่าความต้องการใช้ออกซิเจนทางชีวภาพพบว่าการเปลี่ยนแปลงอย่างมากที่สถานี BK-01, BK-02, BK-04 และ BK-05 โดยมีค่าเฉลี่ย 2.00 mg/L, 3.83 mg/L, 2.87 mg/L และ 0.90 mg/L ตามลำดับ แต่พบว่าสถานี BK-03 และ BK-01 มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า โดยมีค่า 2.10 mg/L และ 0.73 mg/L ตามลำดับ และพบว่าทั้งการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและความต้องการใช้ออกซิเจนทางชีวภาพตามฤดูกาลมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากตามฤดูกาลทั้งหมด โดยพบปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยในฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาวมีค่า 5.63 mg/L, 4.97 mg/L และ 4.42 mg/L ตามลำดับ และความต้องการใช้ออกซิเจนทางชีวภาพเฉลี่ยในฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาวมีค่า 4.23 mg/L, 2.38 mg/L และ 1.85 mg/L ตามลำดับ



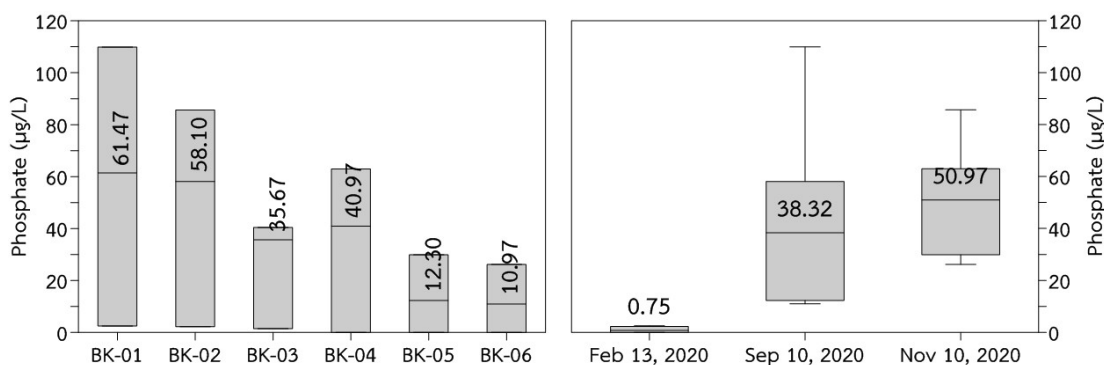
ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen, DO mg/L) และความต้องการออกซิเจนในกระบวนการทางชีวภาพ (Biological Oxygen Demand, BOD mg/L) ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง

ปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจนละลายน้ำ (Dissolved Inorganic Nitrogen, DIN) ได้แก่ แอมโมเนีย (Ammonia, $\text{NH}_3\text{-N}$ $\mu\text{g/L}$) ไนไตรท์ (Nitrite, $\text{NO}_2\text{-N}$ $\mu\text{g/L}$) ไนเตรท (Nitrate, $\text{NO}_3\text{-N}$ $\mu\text{g/L}$) (ภาพที่ 8) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากที่สถานี BK-01 และ BK-02 มีค่าเฉลี่ย $\text{NH}_3\text{-N}$ 64.89 $\mu\text{g/L}$ และ 56.75 $\mu\text{g/L}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 38.62 $\mu\text{g/L}$ และ 34.97 $\mu\text{g/L}$ และ $\text{NO}_3\text{-N}$ 171.46 $\mu\text{g/L}$ และ 184.22 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ ส่วนสถานี BK-03 และสถานี BK-04 พบค่าเฉลี่ยน้อยกว่า มีค่าเฉลี่ย $\text{NH}_3\text{-N}$ 22.28 $\mu\text{g/L}$ และ 14.79 $\mu\text{g/L}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 3.95 $\mu\text{g/L}$ และ 11.45 $\mu\text{g/L}$ และ $\text{NO}_3\text{-N}$ 109.76 $\mu\text{g/L}$ และ 185.72 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ และพบค่าเฉลี่ยน้อยที่สุดระหว่างสถานี BK-02 และสถานี BK-01 มีค่าเฉลี่ย $\text{NH}_3\text{-N}$ 9.25 $\mu\text{g/L}$ และ 9.38 $\mu\text{g/L}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 1.56 $\mu\text{g/L}$ และ 0.96 $\mu\text{g/L}$ และ $\text{NO}_3\text{-N}$ 33.79 $\mu\text{g/L}$ และ 74.75 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ และที่สำคัญพบว่าปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจนละลายน้ำมีความแตกต่างตามฤดูกาลอย่างมากในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว พบว่ามีค่าเฉลี่ย $\text{NH}_3\text{-N}$ 18.53 $\mu\text{g/L}$ และ 50.24 $\mu\text{g/L}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 7.70 $\mu\text{g/L}$ และ 24.45 $\mu\text{g/L}$ และ $\text{NO}_3\text{-N}$ 208.25 $\mu\text{g/L}$ และ 140.61 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ ส่วนในฤดูแล้งพบว่ามีค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด โดยพบค่าเฉลี่ย $\text{NH}_3\text{-N}$ 11.75 $\mu\text{g/L}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 0.96 $\mu\text{g/L}$ และ $\text{NO}_3\text{-N}$ 3.93 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ฟอสฟอรัสละลายน้ำ (Dissolved Inorganic Phosphorus, DIP) ได้แก่ ออโรฟอสเฟต (Phosphate, $\text{PO}_4\text{-P}$ $\mu\text{g/L}$) (ภาพที่ 9) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากที่สถานี BK-01 และ BK-02 มีค่าเฉลี่ย 61.47 $\mu\text{g/L}$ และ 58.10 $\mu\text{g/L}$ พบน้อยกว่าที่สถานี BK-03 และ BK-04 มีค่า

35.67 $\mu\text{g-N/L}$ และ 40.97 $\mu\text{g/L}$ และพบน้อยมากที่สถานี BK-05 และ BK-06 มีค่าเฉลี่ย 12.30 $\mu\text{g/L}$ และ 10.97 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสารอาหารอนินทรีย์ฟอสฟอรัสละลายน้ำ พบว่าการเปลี่ยนแปลงมากในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว โดยมีค่าเฉลี่ย 38.32 $\mu\text{g/L}$ และ 50.97 $\mu\text{g/L}$ ส่วนในฤดูร้อนพบว่ามียค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด โดยพบค่าเฉลี่ย 0.75 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ

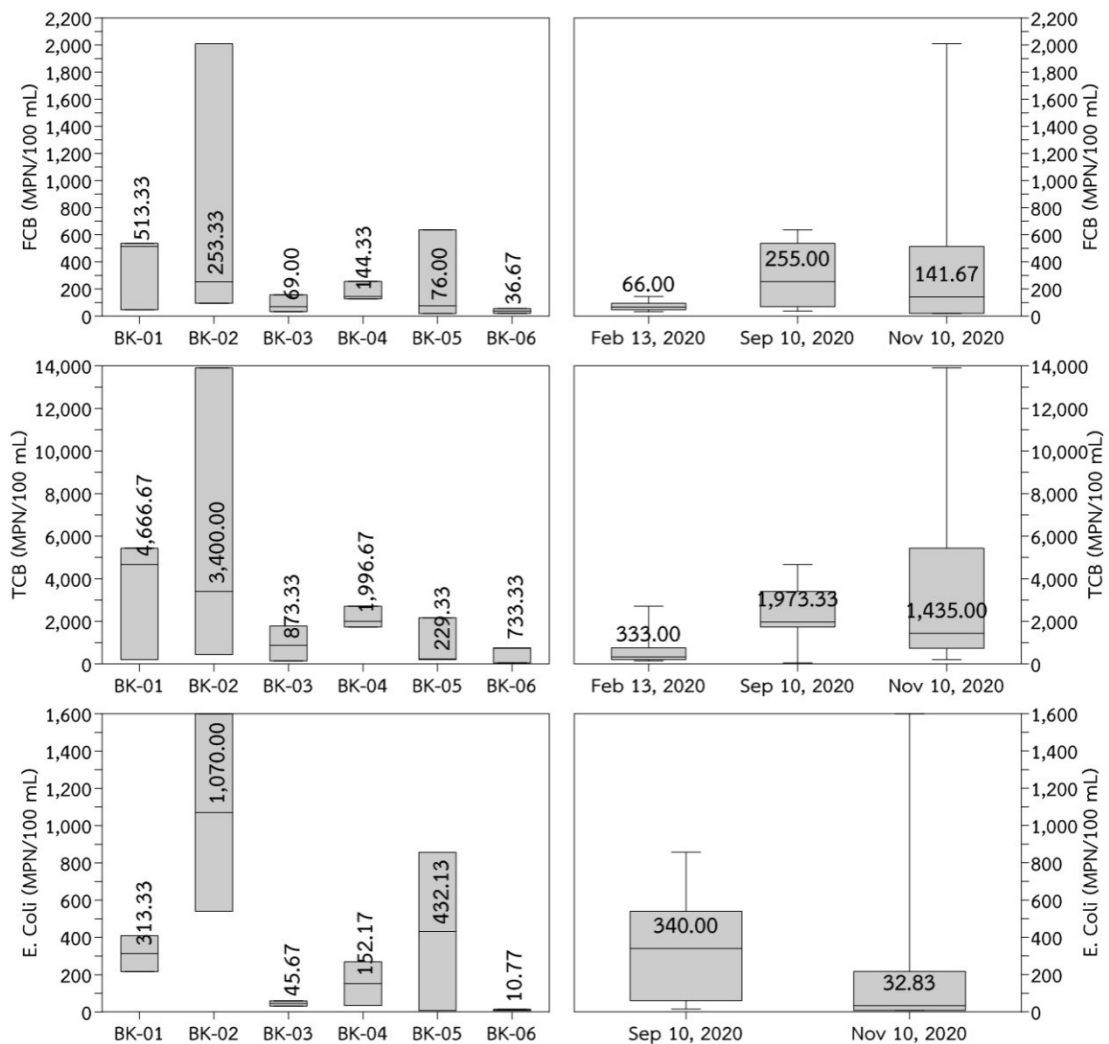


ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจนละลายน้ำ (Dissolved Inorganic Nitrogen, DIN) ได้แก่ แอมโมเนีย (Ammonia, $\text{NH}_3\text{-N}$ $\mu\text{g/L}$) ไนไตรท์ (Nitrite, $\text{NO}_2\text{-N}$ $\mu\text{g/L}$) และไนเตรท (Nitrate, $\text{NO}_3\text{-N}$ $\mu\text{g/L}$) ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง



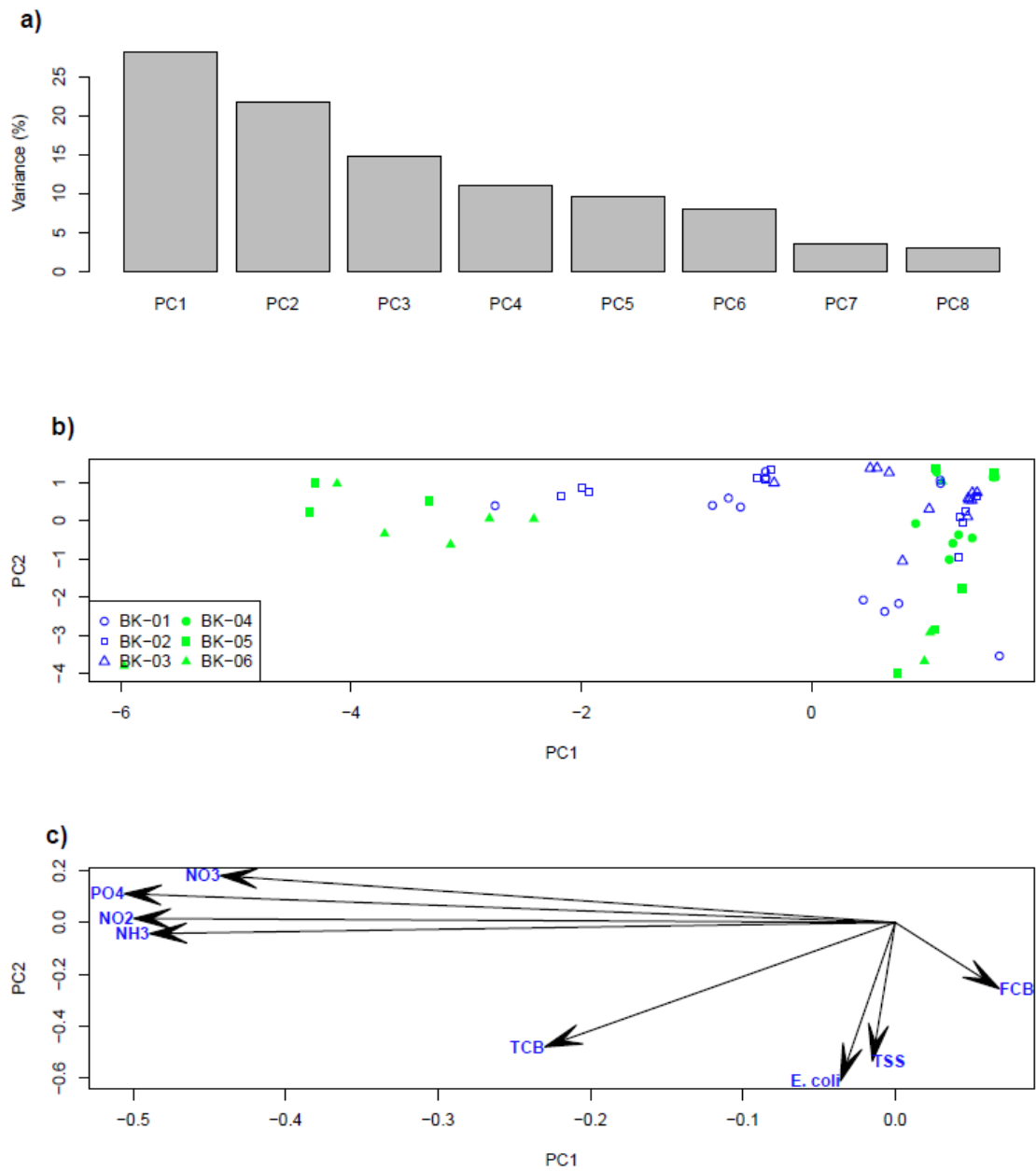
ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ฟอสฟอรัสละลายน้ำ (Dissolved Inorganic Phosphorous, DIP) ได้แก่ ออโรฟอสเฟต (Phosphate, $\text{PO}_4\text{-P}$ µg/L) ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง

คุณภาพน้ำทางชีวภาพ ได้แก่ แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria, FCB MPN/100mL) แบคทีเรียโคลิฟอร์มรวมทั้งหมด (Total Coliform Bacteria, TCB MPN/100mL) และ *Escherichia coli* (*E. coli*) (ภาพที่ 10) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดที่สถานี BK-01 และ BK-02 โดยมีค่าเฉลี่ย FCB 513.33 MPN/100mL และ 253.33 MPN/100mL, TCB 4,666.67 MPN/100mL และ 3,400.00 MPN/100mL และ *E. coli* 313.33 MPN/100mL และ 1,070.00 MPN/100mL ตามลำดับ ในขณะที่สถานี BK-03 ถึง BK-05 กลับพบน้อยกว่า โดยพบ FCB 69.00 MPN/100mL, 144.33 MPN/100mL, และ 76.00 MPN/100mL ตามลำดับ TCB 873.33 MPN/100mL และ 1,996.67 MPN/100mL และ 733.33 MPN/100mL ที่สถานี BK-06 ตามลำดับ และ *E. coli* 45.67 MPN/100mL และ 152.17 MPN/100mL ยกเว้นที่สถานี BK-05 ที่พบ *E. coli* สูงถึง 432.13 MPN/100mL ส่วนที่สถานี BK-06 กลับพบน้อยมากโดยพบ FCB 36.67 MPN/100mL ยกเว้น TCB 229.33 MPN/100mL ที่สถานี BK-05 และ *E. coli* 10.77 MPN/100mL ตามลำดับ ในขณะที่ตามฤดูกาลพบว่า FCB และ TCB มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากในฤดูฝนและฤดูหนาว โดยมีค่า FCB 255.00 MPN/100mL และ 141.67 MPN/100mL และ TCB 1,973.33 และ 1,435.00 MPN/100mL ส่วนในฤดูร้อนพบ FCB 66.00 MPN/100mL และ TCB 333.00 MPN/100mL ซึ่งน้อยกว่ามาก ในทางตรงกันข้ามกลับพบ *E. coli* มากในฤดูฝน มีค่า 340.00 MPN/100mL และพบน้อยกว่าอย่างมากในฤดูหนาว เพียง 32.83 MPN/100mL



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย ได้แก่ แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria, FCB MPN/100mL) แบคทีเรียโคลิฟอร์มรวมทั้งหมด (Total Coliform Bacteria, TCB MPN/100mL) และ *Escherichia coli* ตามสถานีและฤดูกาลที่ผิวน้ำในแม่น้ำบางปะกง

สุดท้ายเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์คุณภาพน้ำและสถานี นำองค์ประกอบหลัก (principal component) มาพล็อตเป็นกราฟ 2 มิติ ประกอบด้วย PC1 และ PC2 ซึ่งอธิบายความแปรปรวนของข้อมูล 28.1% และ 21.1% ตามลำดับ โดยความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำแสดงดังภาพที่ 11 โดยเวกเตอร์ของพารามิเตอร์ที่อยู่ใกล้กันและห่างจากจุด (0,0) ด้วยระยะใกล้เคียงกันจะมีความสัมพันธ์มากกว่าเวกเตอร์ของพารามิเตอร์ที่อยู่ไกลกัน โดยพบว่า แอมโมเนีย (Ammonia, $\text{NH}_3\text{-N}$) ไนไตรท์ (Nitrite, $\text{NO}_2\text{-N}$) ไนเตรท (Nitrate, $\text{NO}_3\text{-N}$) ฟอสเฟต (Phosphate, $\text{PO}_4\text{-P}$ $\mu\text{g/L}$) มีความสัมพันธ์กันมากกว่ากลุ่มอื่น ส่วน *E. coli* และ TSS (Total Suspended Solids) เป็นอีกหนึ่งกลุ่มที่ใช้อธิบายการจัดกลุ่มของสถานีเก็บตัวอย่างได้



ภาพที่ 11 กราฟแสดงการวิเคราะห์ค่าของพารามิเตอร์คุณภาพน้ำด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis)

Taxonomy profile จากการวิเคราะห์ชุมชนชีพจุลินทรีย์ (microbial community) ด้วย shotgun metagenomics

จากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ดัชนี (microbial indicator system) จากตัวอย่างน้ำที่ได้จากสถานีเก็บตัวอย่างสถานีละ 3 ซ้ำ ได้ผลแยกตามฤดูกาล คือฤดูฝน (น้ำมาก) เดือนกันยายน 2563 และฤดูหนาว (น้ำน้อย) ในเดือนพฤศจิกายน 2563 จาก สถานีเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 สถานีครอบคลุมปลายน้ำ กลางน้ำและต้นน้ำ ดังนี้ คือ 1) BK-01 ปากน้ำ บริเวณศูนย์ฝึมือกรมบางปะกง กพพ. 2) BK-02 วัดสมานรัตนาราม 3) BK-03 วัดหัวไทร 4) BK-04 สะพานต้นน้ำบางปะกง 5) BK-05 สะพานหิน รอบนอกเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ และ 6) BK-06 แก่งหินเพิงในอุทยานฯ (จุดอ้างอิง) แยกผลการศึกษาตามฤดูกาลได้ผลดังต่อไปนี้ (ภาพที่ 12 ถึงภาพที่ 14 และตารางที่ 4

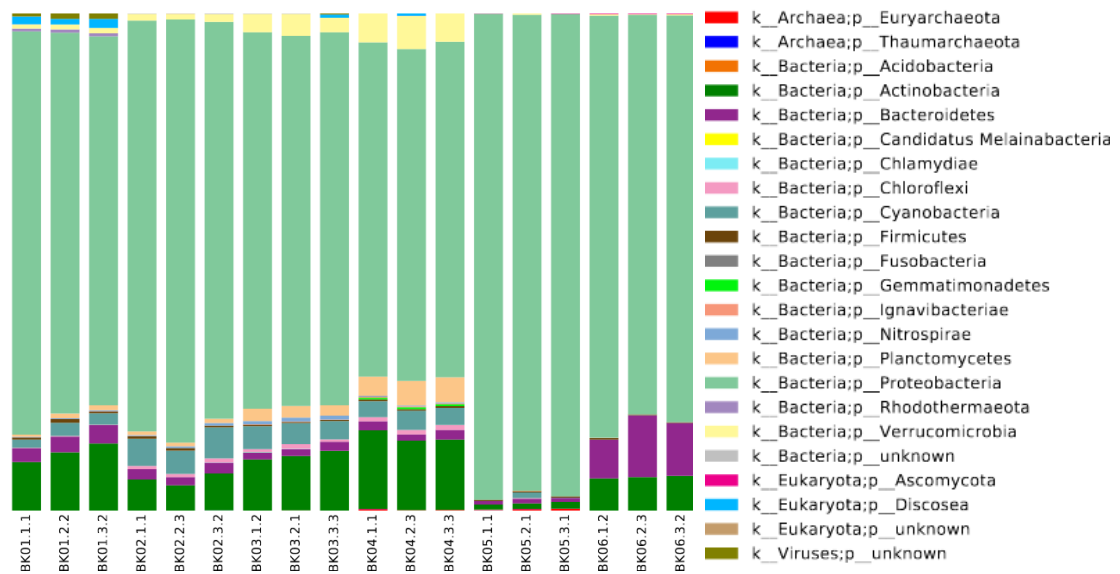
ฤดูฝน (กันยายน 2563)

จากการศึกษาทั้งหมดทุกสถานี ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในฤดูฝน (กันยายน 2563) พบ จุลินทรีย์จำนวนทั้งสิ้น 753 ชนิด จากไฟล์ทั้งหมด 23 Phylum โดยไฟล์ที่มีความชุกชุมสัมพัทธ์ สูงสุด 3 อันดับแรก โดยการรวมผลของทุกสถานี ได้แก่ 1) Proteobacteria (80.2%) 2) Actinobacteria (8.6 %) และ 3) Bacteroidetes (3.2 %) โดยในไฟล์ Proteobacteria พบว่า แบคทีเรียกลุ่มที่พบทุกสถานีคือแบคทีเรียในจีนัส *Limnohabitans* spp. โดยพบที่สถานีต้นน้ำ (BK-04, BK-05 และ BK-06) พบมากกว่าสถานีกลางน้ำและปลายน้ำ (BK-01, BK-02 และ BK-03) ขณะที่ *Pseudomonas* spp. พบที่สถานีต้นน้ำ (BK-04, BK-05 และ BK-06) น้อยกว่าสถานีกลางน้ำและ ปลายน้ำ (BK-01, BK-02 และ BK-03) โดยที่สถานี BK-01 ซึ่งเป็นบริเวณปากแม่น้ำพบ *Pseudomonas* spp. มากที่สุดเมื่อเทียบกับสถานีอื่น นอกจากนี้ยังพบจีนัส *Malikia* spp. โดยมีความชุกชุมสัมพัทธ์สูงกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่สถานีวัดสมานรัตนาราม (BK-02) เมื่อทำการวิเคราะห์ จุลินทรีย์ดัชนีที่ใช้ประเมินมลพิษทางน้ำ พบว่ามี *Pseudomonas* spp. ส่วนจุลินทรีย์ที่ถูกใช้ในการ ประเมินการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลที่เกิดจากมูลขับถ่าย (Fecal pollution) ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. และ *Clostridium perfringens* ไม่พบเลยตลอดการศึกษาจากการเก็บ ตัวอย่างในฤดูฝน เมื่อวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม ตามลำดับชั้น (Hierarchical clustering) ตามความไม่คล้ายคลึงกันแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis dissimilarity) ซึ่งกลุ่มที่มีการกระจายของข้อมูลคล้ายกันถูกรวมไว้ด้วยกัน พบว่าสามารถแบ่งกลุ่ม สถานีที่มีความคล้ายคลึงกันของจุลินทรีย์ได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มสถานีต้นน้ำที่เป็นพื้นที่ ป่า (BK-05 และ BK-06) และกลุ่มสถานีปากน้ำ สถานีกลางน้ำและสถานีต้นน้ำที่เป็นชุมชนเมือง (BK-01, BK-02 และ BK-03, และ BK-04) โดยในกลุ่มนี้สถานีที่เป็นปากน้ำ (BK-01) มีความคล้ายคลึงของ ชุมชีพจุลินทรีย์น้อยกว่า 3 สถานี นอกจากนี้สถานี BK-02 มีความคล้ายคลึงของชุมชีพจุลินทรีย์น้อยกว่ากลุ่มสถานี BK-03 และ BK-04 ซึ่งผลการศึกษการจัดกลุ่มตามลำดับชั้นในฤดูฝนนี้แตกต่างจากฤดู หนาว ที่ในฤดูฝนกลุ่มสถานีปากน้ำ สถานีกลางน้ำและสถานีต้นน้ำที่เป็นชุมชนเมือง (BK-01, BK-02 และ BK-03, และ BK-04) ที่ในแต่ละซ้ำของทุกสถานีอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ไม่ผสมกันระหว่างสถานี ส่วน การเปรียบเทียบความหลายหลายระหว่างสถานี (Beta diversity) โดยวัดความแตกต่างความ

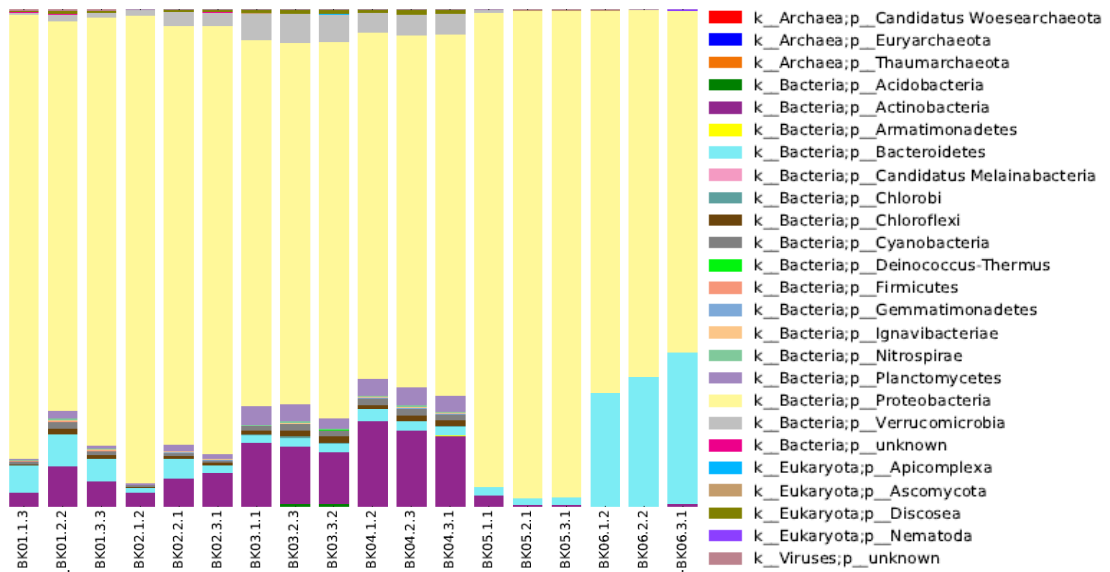
หลากหลายของจุลินทรีย์ระหว่างตัวอย่างโดยใช้ Principal Coordinate Analysis (PCoA) พบว่า ได้ผลคล้ายคลึงกับการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มข้างต้นเช่นเดียวกัน

ฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2563)

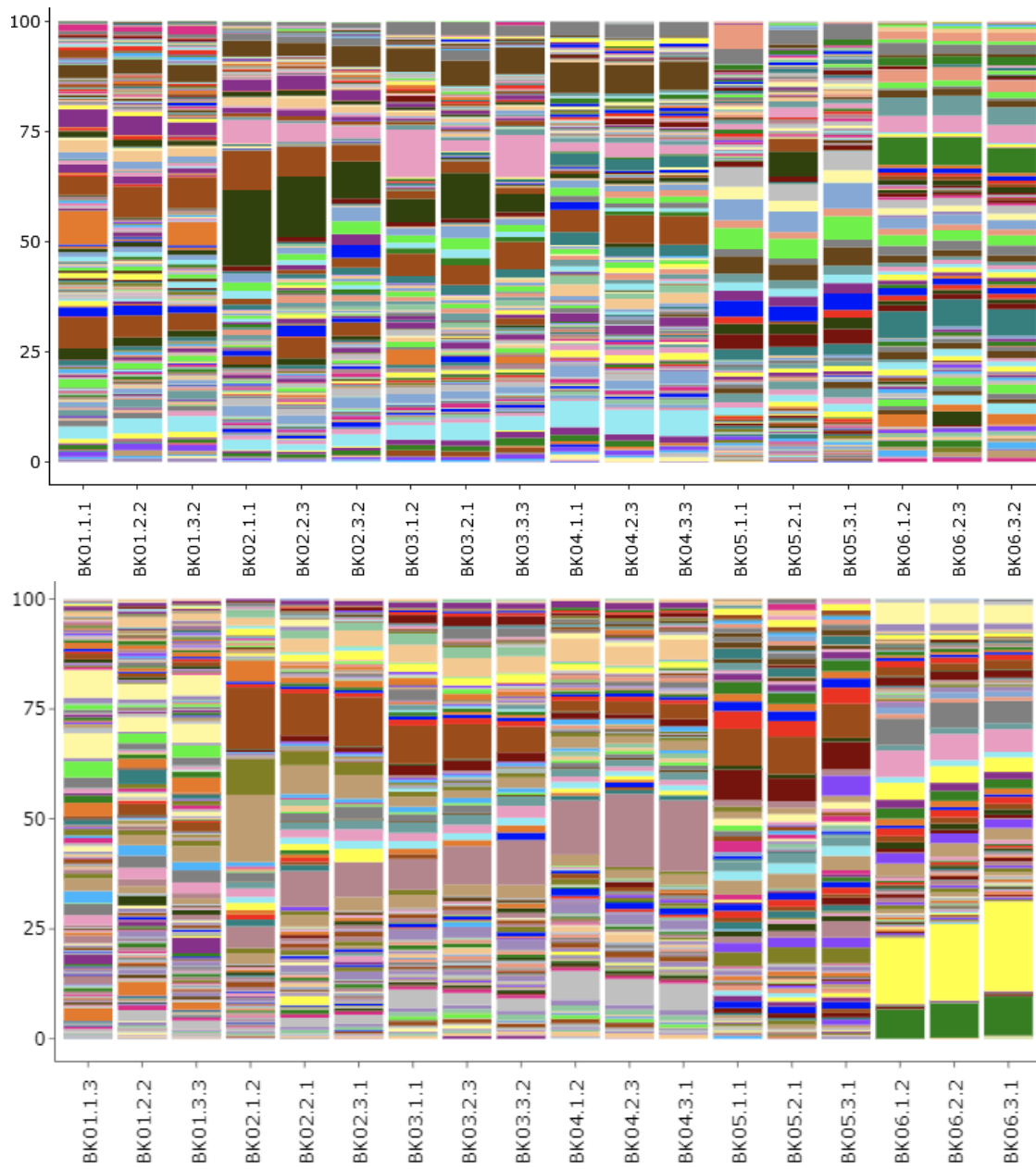
จากการศึกษาทั้งหมดทุกสถานี ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2563) พบจุลินทรีย์จำนวนทั้งสิ้น 658 ชนิด จากไฟล์ทั้งหมด 26 Phylum โดยไฟล์ที่มีความชุกชุมสัมพัทธ์สูงสุด 3 อันดับแรกโดยการรวมผลของทุกสถานี ได้แก่ 1) Proteobacteria (81.4 %) 2) Bacteroidetes (6.6 %) และ 3) Actinobacteria (6.5 %) โดยในไฟล์ Proteobacteria เมื่อเปรียบเทียบภายในสถานีของทุกสถานีมีความชุกชุมสัมพัทธ์สูงสุด และพบว่า แบคทีเรียกลุ่มที่พบทุกสถานีคือแบคทีเรียในจีนัส *Limnohabitans* spp. โดยภาพรวมพบที่สถานีต้นน้ำ (BK04 BK05 และ BK06) มากกว่าสถานีกลางน้ำและปลายน้ำ (BK-01, BK-02 และ BK-03) ขณะที่ *Pseudomonas* spp. พบที่สถานีต้นน้ำ (BK-04, BK-05 และ BK-06) และ สถานีกลางน้ำ BK-03 (วัดหัวไทร) น้อยกว่าสถานีกลางน้ำ BK-02 (วัดสมาน) และสถานี BK-01 ซึ่งเป็นบริเวณปากแม่น้ำโดยพบ *Pseudomonas* spp. ที่สถานีนี้มากที่สุดและมีความชุกชุมสัมพัทธ์สูงสุดภายในสถานีปากน้ำ (30.6%–49.4%) เมื่อเทียบกับสถานีอื่นที่เปรียบเทียบความชุกชุมสัมพัทธ์ภายในสถานีเดียวกัน (0.1 %–5.9%) นอกจากนี้ยังพบจีนัส *Malikia* spp. โดยมีความชุกชุมสัมพัทธ์สูงกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่สถานีวัดสมานฯ (BK-02) เมื่อทำการวิเคราะห์จุลินทรีย์ดัชนีที่ใช้ประเมินมลพิษทางน้ำ พบว่า มี *Pseudomonas* spp. ส่วนจุลินทรีย์ที่ถูกใช้ในการประเมินการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลที่เกิดจากมูลขับถ่าย (Fecal pollution) ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. และ *Clostridium perfringens* ไม่พบเลยตลอดการศึกษาจากการเก็บตัวอย่างในฤดูหนาว เมื่อวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (Cluster analysis) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มตามลำดับชั้น (Hierarchical clustering) ตามความไม่คล้ายคลึงกันแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis dissimilarity) ซึ่งกลุ่มที่มีการกระจายของข้อมูลคล้ายกันถูกรวมไว้ด้วยกัน วิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มสถานีที่มีความคล้ายคลึงกันของจุลินทรีย์ได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มสถานีต้นน้ำที่เป็นพื้นที่ป่า (BK-05 และ BK-06) และกลุ่มสถานีปากน้ำ สถานีกลางน้ำและสถานีต้นน้ำที่เป็นชุมชนเมือง (BK-01, BK-02 และ BK-03 และ BK-04) เช่นเดียวกับกับผลการศึกษาในฤดูฝน โดยในกลุ่มนี้สถานีที่เป็นปากน้ำ (BK-01) มีความคล้ายคลึงของชุมชนจุลินทรีย์น้อยกว่า 3 สถานี อย่างไรก็ตามสถานี BK-02 ของ 3 ตัวอย่าง (ซ้ำ) ไม่ได้ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันโดยอยู่ระหว่างกลุ่มของสถานี BK-03 และ BK-04 อีกนัยหนึ่งคือ สถานี BK-02 มีความคล้ายคลึงของชุมชนจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับกลุ่มสถานี BK-03 และ BK-04 มากกว่าแต่คล้ายคลึงกับสถานี BK-01 น้อยกว่า ซึ่งผลการศึกษารูปการจัดกลุ่มตามลำดับชั้นในฤดูหนาวนี้ไม่เหมือนกับฤดูฝน ที่ในฤดูหนาวกลุ่มสถานีปากน้ำ สถานีกลางน้ำและสถานีต้นน้ำที่เป็นชุมชนเมือง (BK-01, BK-02 และ BK-03 และ BK-04) ที่ในแต่ละซ้ำของทุกสถานีอยู่ในกลุ่มเดียวกันยกเว้นสถานี BK-02 ที่แทรกอยู่ระหว่างสถานี BK03 และ BK04 ส่วนการเปรียบเทียบความหลากหลายระหว่างสถานี (Beta diversity) ในฤดูหนาวโดยวัดความแตกต่างความหลากหลายของจุลินทรีย์ระหว่างตัวอย่างโดยใช้ Principal Coordinate Analysis (PCoA) พบว่าได้ผลคล้ายกับการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มข้างต้นเช่นเดียวกัน



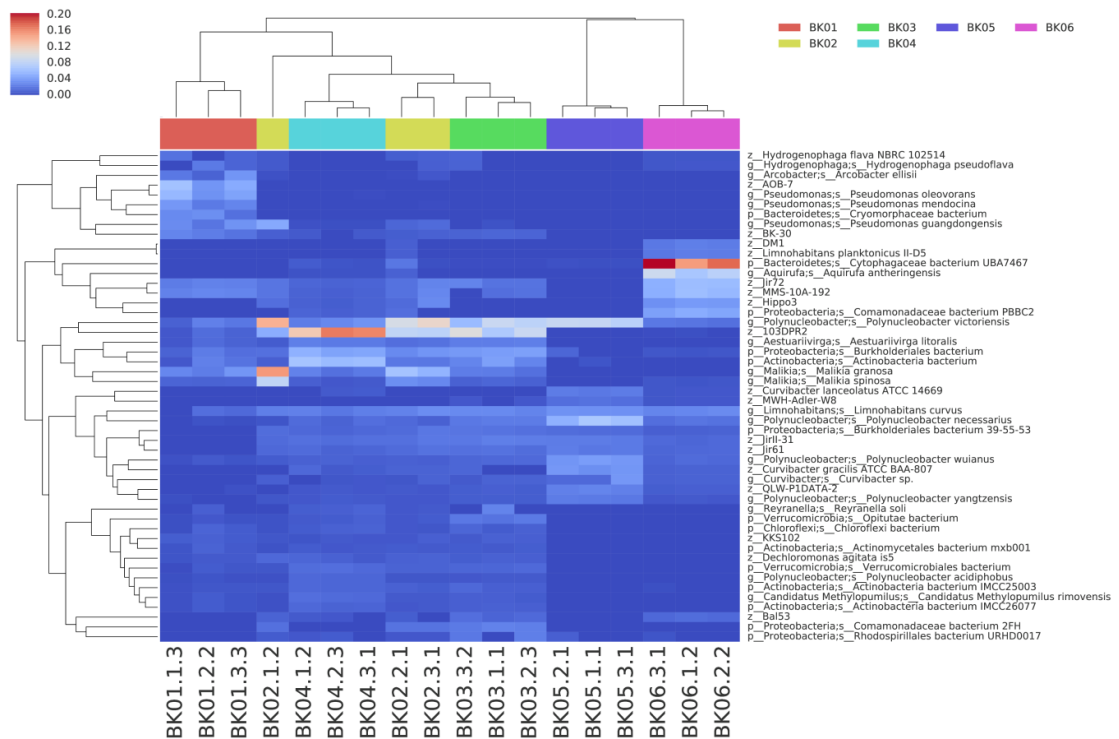
ภาพที่ 12 แผนภูมิแท่งแสดง Phylum-profile ของจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบตามระดับของความชุกชุมสัมพันธ์ในแต่ละแห่งของแต่ละซ้ำในแต่ละสถานีที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics ในฤดูฝน (กันยายน 2563) จาก 6 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำ ตั้งแต่ปากน้ำแม่น้ำบางปะกง (BK-01) ถึงต้นน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ แก่งหินเพิง (BK-06) สถานีละ 3 ซ้ำ *คำอธิบายแกนในแผนภูมิแท่ง สีในแต่ละแผนภูมิแท่งแสดงด้วยสีของฟิล์มนั้น



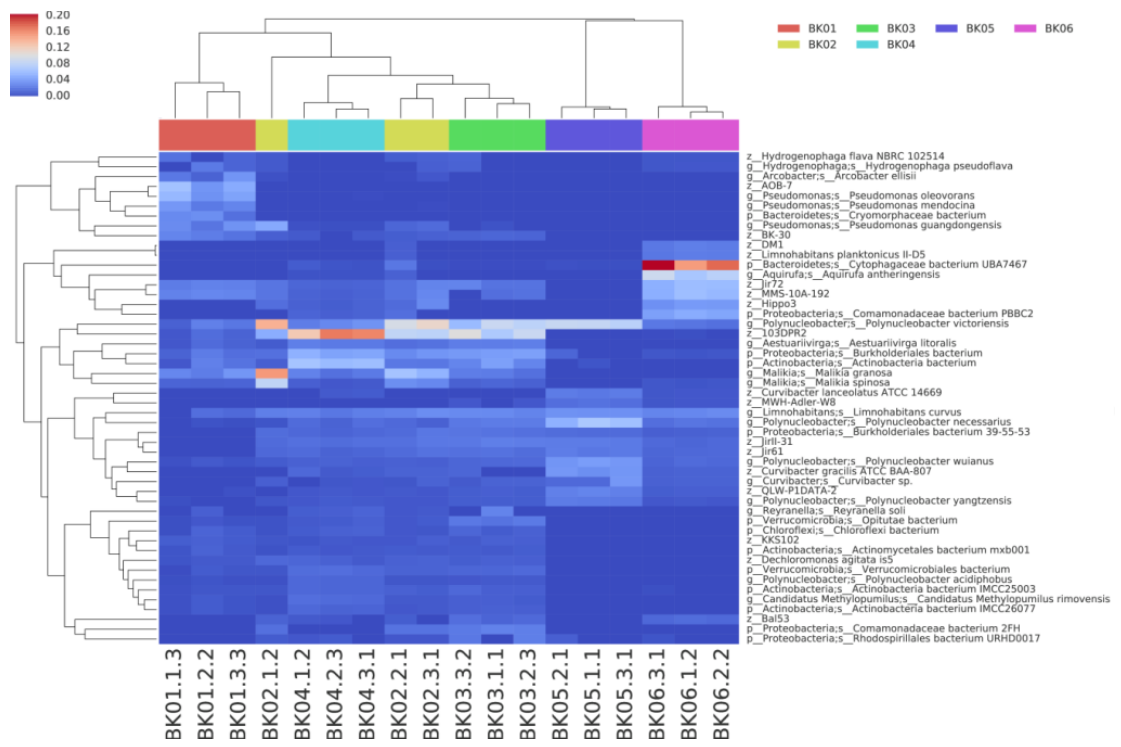
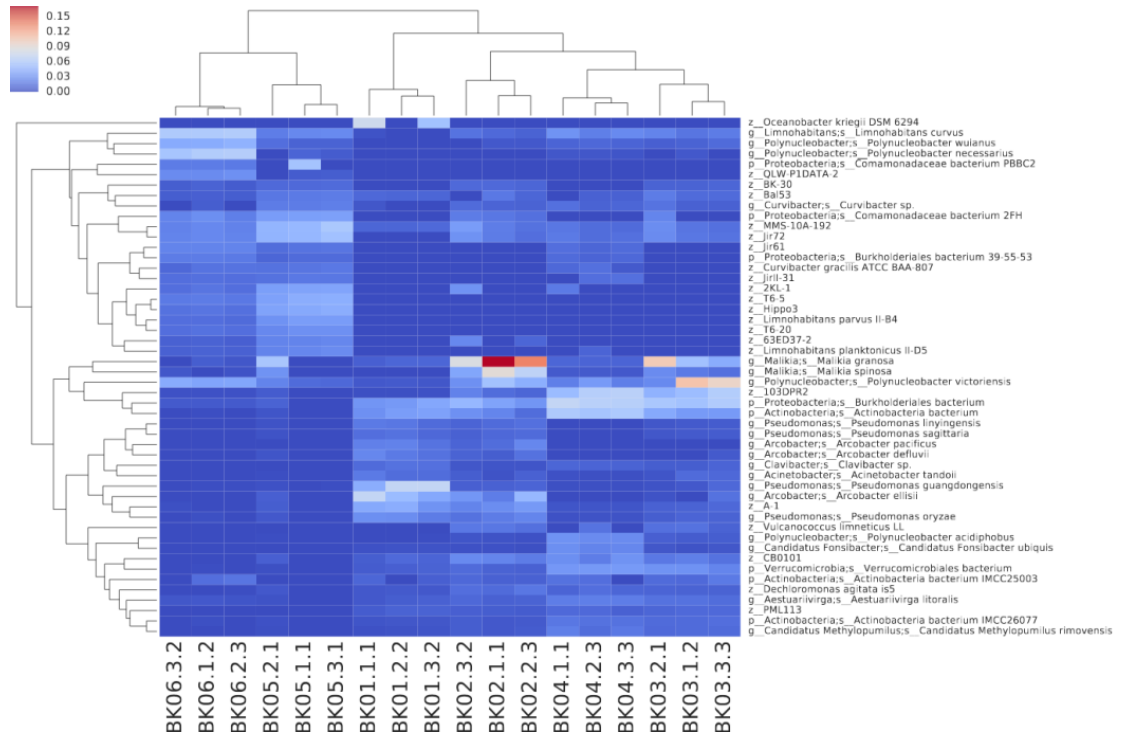
ภาพที่ 13 แผนภูมิแท่งแสดง phylum-profile ของจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบตามระดับของความชุกชุมสัมพันธ์ในแต่ละแห่งของแต่ละซ้ำในแต่ละสถานีที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metaagenomics ในฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2563) จาก 6 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำ ตั้งแต่ปากน้ำแม่น้ำบางปะกง (BK-01) ถึงต้นน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ แก่งหินเพิง (BK-06) สถานีละ 3 ซ้ำ *คำอธิบายแกนในแผนภูมิแท่ง สีในแต่ละแผนภูมิแท่งแสดงด้วยสีของโพลีเมอร์นั้น



ภาพที่ 14 แผนภูมิแท่งแสดง Strain profile ของจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบตามระดับของความชุกชุมสัมพันธ์ในแต่ละสถานีที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics โดยแผนภูมิต่างแสดงในฤดูฝน (กันยายน 2563) และแผนภูมิต่างแสดงในฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2563) จาก 6 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำ ตั้งแต่ปากน้ำแม่ น้ำบางปะกง (BK-01) ถึงต้นน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ แก่งหินเพิง (BK-06) สถานีละ 3 ซ้ำ

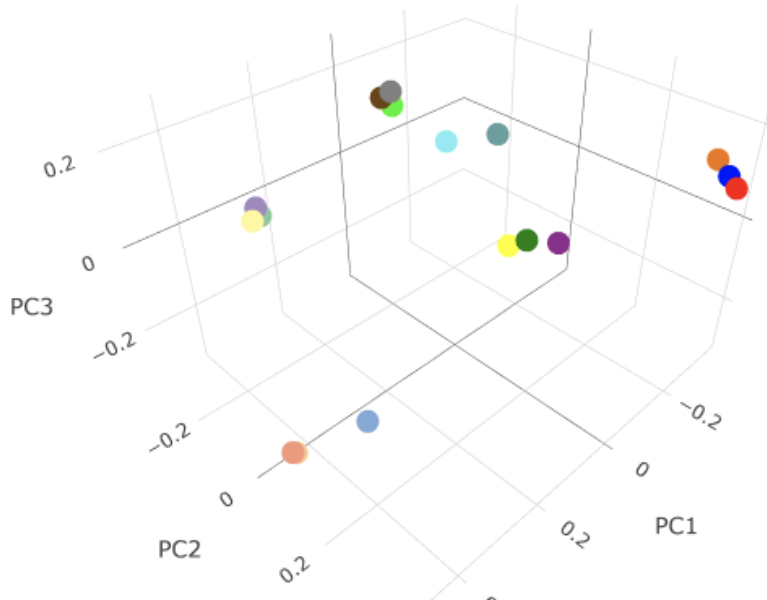


ภาพที่ 15 แผนที่ความร้อนทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy heatmap) แสดงความชุกชุมสัมพันธ์ของ 50 สายพันธุ์ (strain) แรกของจุลินทรีย์ที่มีค่าสูงสุด ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics โดยการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มตามลำดับชั้น (hierarchical clustering) ตามความไม่คล้ายคลึงกันแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis dissimilarity) ซึ่งกลุ่มที่มีการกระจายของข้อมูลคล้ายกันถูกรวมไว้ด้วยกัน โดยในแต่ละแถวแสดงความชุกชุมสัมพันธ์ของแต่ละชนิดโดยมีชื่อชนิดอยู่ทางขวามือ แผนที่ความร้อนแสดงในฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2563) จาก 6 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำ ได้แก่ ศูนย์ฝึกการไฟฟ้าท่าข้าม ปากน้ำแม่น้ำบางปะกง (BK-01) วัดสมานฯ (BK-02) วัดหัวไทร (BK-03) สะพานต้นน้ำบางปะกง (BK-04) สะพานหินรอบนอกเขตอุทยานฯ (BK-05) และสถานีต้นน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ แก่งหินเพิง (BK-06) สถานีละ 3 ซ้ำ



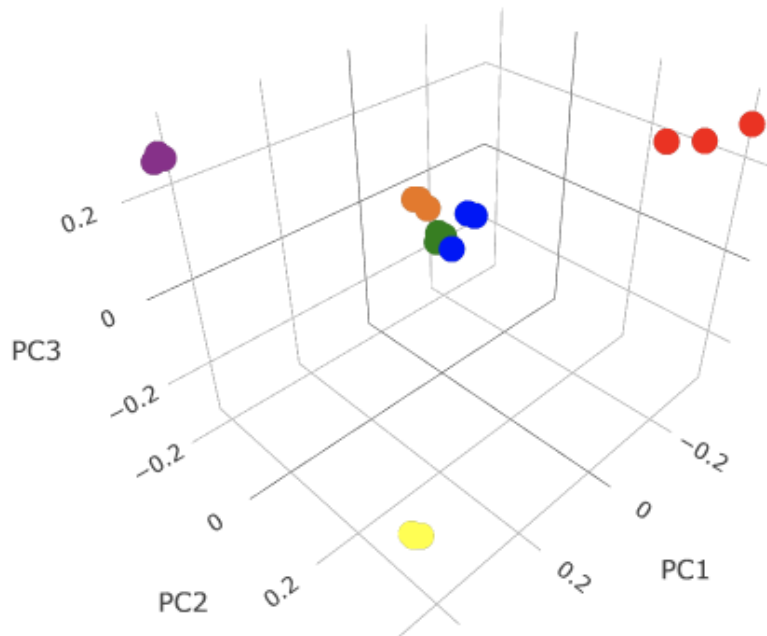
ภาพที่ 16 แผนที่ความร้อนทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy heatmap) แสดงความชุกชุมสัมพันธ์ของ 50 สายพันธุ์ (Strain) ชนิดแรกของจุลินทรีย์ที่มีค่าสูงสุด ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics โดยการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (Cluster analysis) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มตามลำดับชั้น (Hierarchical clustering) ตามความไม่คล้ายคลึงกันแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis dissimilarity) ซึ่งกลุ่มที่มีการกระจายของข้อมูลคล้ายกันถูกรวมไว้ด้วยกัน โดยในแต่ละแถวแสดงความชุกชุมสัมพันธ์ของแต่ละชนิดโดยมีชื่อชนิดอยู่ทางขวามือ แผนที่ความร้อนบนแสดงในฤดูฝน (กันยายน 2563) และแผนที่ความร้อนล่างแสดงในฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2563) จาก 6 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำ ได้แก่ ศูนย์ฝึกการไฟฟ้า ท่าข้าม ปากน้ำแม่น้ำบางปะกง (BK-01) วัดสมานฯ (BK-02) วัดหัวไทร (BK-03) สะพานต้นน้ำบางปะกง (BK-04) สะพานหินรอบนอกเขตอุทยานฯ (BK-05) และสถานีต้นน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ แก่งหินเพิง (BK-06) สถานีละ 3 ซ้ำ

Beta Diversity Plot (Bray Curtis)



- BK01.1.1
- BK01.2.2
- BK01.3.2
- BK02.1.1
- BK02.2.3
- BK02.3.2
- BK03.1.2
- BK03.2.1
- BK03.3.3
- BK04.1.1
- BK04.2.3
- BK04.3.3
- BK05.1.1
- BK05.2.1
- BK05.3.1
- BK06.1.2
- BK06.2.3
- BK06.3.2

Beta Diversity Plot (Bray Curtis)



- BK01
- BK02
- BK03
- BK04
- BK05
- BK06

ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบความหลากหลายระหว่างสถานี (Beta diversity) วัดความแตกต่างความหลากหลายของจุลินทรีย์ระหว่างตัวอย่างโดยใช้ Principal Coordinate Analysis (PCoA) plots แสดงแบบ 3 มิติโดยการใช้ matrix ของระยะทางในแต่ละคู่ระหว่างตัวอย่างมาใช้คำนวณหาความไม่คล้ายคลึงกันแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis dissimilarity) ในระดับสายพันธุ์ (Strian) โดยจุดแต่ละจุดใน plot แทน profile ที่เป็นองค์ประกอบจุลินทรีย์ทั้งหมดของแต่ละตัวอย่าง โดยจุดที่แทนตัวอย่างใดที่อยู่ใกล้กันมี Profile ของจุลินทรีย์ดังกล่าวคล้ายกันมากกว่าจุดที่อยู่ไกลมากกว่า พล็อตบนแสดงในฤดูฝน (กันยายน 2563) และพล็อตล่างแสดงฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2563)

ตารางที่ 4 สรุปข้อมูลจุลินทรีย์ดัชนีที่สามารถบ่งชี้มลพิษทางน้ำที่ได้จากการวิเคราะห์ shotgun metagenomics ทั้ง 2 ฤดูตลอดการศึกษา

ชนิดจุลินทรีย์	พบ	ไม่พบ
<i>E. coli</i>		<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Enterococcus</i> spp.		<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Clostridium perfringens</i>		<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Pseudomonas</i> spp.	<input checked="" type="checkbox"/>	

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำและผล Taxonomy profile จากการวิเคราะห์ชุมชนชีพจุลินทรีย์ (Microbial community) ด้วย shotgun metagenomics โดยตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำบางปะกงทั้งหมด 6 สถานีครอบคลุม ต้นน้ำ กลางน้ำ ปลายน้ำ จาก 2 ฤดูกาล คือ ฤดูฝน (น้ำมาก) เดือนกันยายน 2563 และฤดูหนาว (น้ำน้อย) ในเดือนพฤศจิกายน 2563 พบว่าโดยภาพรวมสอดคล้องกัน ประกอบกับการวิเคราะห์เพิ่มเติม ตามการตรวจวัดและประเมินคุณภาพของแหล่งน้ำของสำนักงานจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ โดยใช้การพิจารณาจากดัชนีคุณภาพน้ำ 5 พารามิเตอร์คือ ออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen, DO) ความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ (Biological Oxygen Demand, BOD) ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total Coliform Bacteria, TCB) และแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (Fecal Coliform Bacteria, FCB) ตาม WQI พบว่าผลของคุณภาพน้ำของทั้งสองฤดูที่สถานีเก็บตัวอย่างน้ำของแม่น้ำบางปะกงข้างต้นสอดคล้องกับผล Taxonomy profile จากการวิเคราะห์โดย shotgun metagenomics เช่นกัน ดังนี้ สถานี BK-01 ปากน้ำบริเวณศูนย์ฝึกการไฟฟ้า ท่าข้าม มีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์เสื่อมโทรม ส่วนสถานี BK-02 วัดสมาน BK-03 วัดหัวไทร BK-04 สะพานต้นน้ำบางปะกง มีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์พอใช้ ขณะที่สถานี BK-05 สะพานหิน รอบนอกเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ และ BK-06 Reference site ต้นน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ แก่งหินเพียงมีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ดี อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายชนิด/สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำแต่ละบริเวณกับค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพ เคมีและชีวภาพเพื่อให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้นควรวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดด้วยกันมากกว่าวิเคราะห์แบบแยกส่วน

จากผลการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์และการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในแม่น้ำบางปะกงจากตัวอย่างแหล่งน้ำในบริเวณต้นน้ำ กลางน้ำ และปลายน้ำ โดยใช้ shotgun metagenomics พบว่า ความหลากหลายชนิดหรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์มีมากกว่าในฤดูฝน โดยสถานีเก็บตัวอย่างที่อยู่ใกล้แหล่งที่มีกิจกรรมการใช้ประโยชน์จากประชาชนในพื้นที่ ทั้งเพื่อการอยู่อาศัย การเกษตร และ อุตสาหกรรม ในกลางน้ำและปลายน้ำ รวมทั้งอาจเกิดจากในฤดูฝนเกิดการชะล้างนำจุลินทรีย์จากดินลงสู่แหล่งน้ำ โดยเฉพาะที่ปากน้ำพบที่มีความชุกชุมของจุลินทรีย์ก่อโรคมมากกว่าสถานีอื่นคือ *Pseudomonas* spp. เบื้องต้นการศึกษานี้ไม่พบ จุลินทรีย์ที่ถูกใช้ในการประเมินการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลที่เกิดจากมูลขับถ่าย (Fecal pollution) ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. และ *Clostridium perfringens* ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มนี้เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยาโดยทั่วไป (Scott et al., 2002 & Saingam et al. 2020)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า *Pseudomonas* spp. เป็น Dominant taxon โดยเฉพาะที่ปากแม่น้ำซึ่งจัดว่ามีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์เสื่อมโทรม ในอนาคตถ้าสามารถยืนยันได้ว่าผล metagenomics ในครั้งนี้สอดคล้องกับการยืนยันชนิดด้วยเทคนิค qPCR แล้ว *Pseudomonas* spp.

อาจจะเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีที่ชี้วัดการปนเปื้อนของน้ำทิ้งจากบ้านเรือนหรือมลพิษทางน้ำในเขตน้ำกร่อยหรือแม่น้ำบางปะกงได้ (Sumampouw & Risjani, 2014)

บรรณานุกรม

- APHA, AWWA & WEF. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd Edition*. American Public Health Association.
- Bolger, A.M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**, 2114-2120.
- Bordalo, A.A., Nilsunranchit, W., & Chalermwat, K. (2001). Water quality and used of the Bangpakong River (Eastern Thailand). *Water Research*, **35**(15), 3635-3642.
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D.H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, **12**, 59-60.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., & Costello, E.K. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, **7**, 335-336.
- Feng, P., Weagant, S.D., & Grant, M.A. (2002). *Enumeration of Escherichia Coli and the Coliform Bacteria, In Bacteriological Analytical Manual (BAM Chapter 4)*. เข้าถึงได้จาก <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria> เมื่อวันที่ 23 มีนาคม 2564.
- Grasshoff, K., Kremling, K., & Ehrhardt, M. (1999). *Methods of Seawater Analysis 3rd Edition*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Jintasaeranee, P., Buranapratheprat, A., & Sawangwong, P. (2000). Dynamics of some water Qualities of the Bangpakong Estuary. *Proceedings of the 11th Joint Seminar on Marine Science*, 9-15.
- Kim, D., Song, L., Breitwieser, F.P., & Salzberg, S.L. (2016). Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Research*, **12**, 1721-1729.
- Saingam, P., Li, B., & Yan, T. (2020). Fecal indicator bacteria, direct pathogen detection, and microbial community analysis provide different microbiological water quality assessment of a tropical urban marine estuary. *Water Research*, **185**, 116280.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., & Huttenhower, C. (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*, **12**, R60
- Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., & Lukasik, J. (2002). Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Direction. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(12), 5796-5803.

- Strickland, J.D.H., & Parsons, T.R. (1972). *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fishery Research Board of Canada, Ottawa.
- Sumampouw, O.J., & Risjani, Y. (2014). Bacteria as Indicators of Environmental Pollution: Review. *International Journal of Ecosystem*, 4(6), 251-258.
- กรมควบคุมมลพิษ. (2550). รายงานประจำปีสำนักจัดการคุณภาพน้ำ พ.ศ. 2550. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร.
- กรมควบคุมมลพิษ. (2551). รายงานประจำปีสำนักจัดการคุณภาพน้ำ พ.ศ. 2551. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร.
- กรมควบคุมมลพิษ. (2552). รายงานประจำปีสำนักจัดการคุณภาพน้ำ พ.ศ. 2552. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร.
- กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. (2548). ระบบนิเวศน้ำกร่อยแม่น้ำบางปะกง. กรุงเทพฯ.
- กรมอุทกศาสตร์. (2563). หนังสือมาตรฐานน้ำ น่านน้ำไทย พ.ศ. 2563. กรมอุทกศาสตร์. กองทัพเรือ.
- พิชาญ สุว่างวงศ์. (2541). รายงานวิจัยโครงการวิจัยร่วม NRCT-JSPS. การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมี และชีวภาพ ในบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง 2537-2540, NRCT-JSPS.
- ฉลวย มุสิกะ แวตตา ทองระอา วันชัย วงสุตาวรรณ และอาวุธ หมั่นหาผล. (2549). สถานการณ์คุณภาพน้ำชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ปี 2547. *วารสารการประมง*, 59(3), 235-241.
- ฉลวย มุสิกะ วันชัย วงสุตาวรรณ อาวุธ หมั่นหาผล และแวตตา ทองระอา. (2550). สถานการณ์คุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งภาคตะวันออก ปี 2548. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 12(1), 33-44.
- รวมทรัพย์ ชำนาญธนา. (2549). แพลงก์ตอนพืชที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2549. สถาบันวิจัยและพัฒนาทางทะเลชายฝั่งทะเล และป่าเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- ราชกิจจานุเบกษา. (2550). ประกาศคณะกรรมการ สิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 27 (พ.ศ. 2549) เรื่องกำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล. เล่มที่ 124 ตอนที่ 11 ง (1 กุมภาพันธ์ 2550). 123-133.
- สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. (2537). การศึกษาคุณภาพน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. (2545). รายงานการวิจัยสภาวะแวดล้อมทางทะเลในบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. (2549). รายงานการวิจัยโครงการเฝ้าระวังและการวางแผนป้องกันกาเกิดปรากฏการณ์ซีบลาวาฟในบริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรี. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี.
- สุขุม ไร่ใจ. (2547). การศึกษาผลกระทบของความเค็มต่ำที่มีต่อการตายของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis* Linneaus). *วารสารการประมง*, 54(3), 229-233.

สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2549). *การบริหารจัดการนิเวศลุ่มน้ำบางปะกง*. กรุงเทพฯ.

อนุกุล บุรณประทีปรัตน์ และประสาร อินทเจริญ. (2554). คุณภาพน้ำในอ่าวชลบุรี พ.ศ. 2551. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 16(1), 94-106.

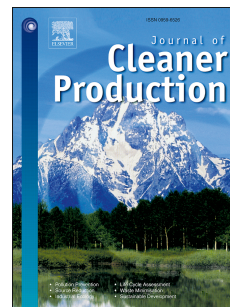
อนุกุล บุรณประทีปรัตน์ และเผชิญโชค จินตเศรษฐี. (2554). คุณภาพน้ำบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง พ.ศ. 2545. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 17(2), 72-85.

ภาคผนวก

กิจกรรมที่ดำเนินการเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัยตามกิจกรรมที่ทำจริง

กิจกรรมที่ดำเนินการหลัก	ผู้รับผิดชอบหลัก
การกำหนดสถานีเก็บตัวอย่าง	นางสาวสุนิรัตน์ รัตนะและ นางสาวจันทิมา ปิยะพงษ์
การสำรวจพื้นที่เหมาะสมที่ใช้เป็นสถานีและออกภาคสนามสำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำ	นางสาวจันทิมา ปิยะพงษ์
การวิเคราะห์ TCB และ FCB ณ ห้องปฏิบัติการ	นางสาวลาวัลย์ เอียวสวัสดิ์
การวิเคราะห์ <i>E. coli</i> ณ ห้องปฏิบัติการ	นางสาวนิชชา จำเริญศักดิ์ศรี
การวิเคราะห์พารามิเตอร์คุณภาพน้ำทางกายภาพและทางเคมี ณ ห้องปฏิบัติการ	นางสาวจันทิมา ปิยะพงษ์
การกรองน้ำเพื่อการสกัด DNA ณ ห้องปฏิบัติการ	นางสาวจันทิมา ปิยะพงษ์
การสกัด DNA ณ ห้องปฏิบัติการ	นางสาวนิชชา จำเริญศักดิ์ศรี
การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศเมตาจีโนมิกส์	นางสาวนิชชา จำเริญศักดิ์ศรี และนางสาวจันทิมา ปิยะพงษ์
การวิเคราะห์พารามิเตอร์คุณภาพน้ำ	นางสาวจันทิมา ปิยะพงษ์
การเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์ มอบรายงานให้หน่วยงานภาครัฐ และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน	นางสาวจันทิมา ปิยะพงษ์

Journal Pre-proof



A predictive model of the impact of urbanization on bacterial loads in watersheds

Chantima Piyapong, Nitcha Chamroensaksri, Sayam Aroonsrimorakot, Lawan Eyosawat, Surasak Khankhum, Sunirat Rattana, Nuchsupha Sunthamala, Panya Warapetcharayut, Emmanuel Paradis

PII: S0959-6526(21)00924-0

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126704>

Reference: JCLP 126704

To appear in: *Journal of Cleaner Production*

Received Date: 6 May 2019

Revised Date: 2 March 2021

Accepted Date: 9 March 2021

Please cite this article as: Piyapong C, Chamroensaksri N, Aroonsrimorakot S, Eyosawat L, Khankhum S, Rattana S, Sunthamala N, Warapetcharayut P, Paradis E, A predictive model of the impact of urbanization on bacterial loads in watersheds, *Journal of Cleaner Production*, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126704>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Chantima Piyapong: Writing – Review & Editing, Project Administration, Funding Acquisition. **Nitcha Chamroensaksri:** Conceptualization, Writing – Original Draft. **Sayam Aroonsrimorakot:** Supervision. **Lawan Eyosawat:** Conceptualization, Investigation. **Surasak Khankhum:** Conceptualization, Writing – Review & Editing. **Sunirat Rattana:** Conceptualization, Investigation, Writing – Original Draft. **Nuchsupha Sunthamala:** Conceptualization, Writing – Review & Editing. **Panya Warapetcharayut:** Supervision, Resources, Data Curation. **Emmanuel Paradis:** Software, Formal Analysis, Visualization, Writing – Review & Editing.

A predictive model of the impact of urbanization on bacterial loads in watersheds

Chantima Piyapong¹, Nitcha Chamroensaksri², Sayam Aroonsrimorakot³, Lawan Eyosawat⁴,
Surasak Khankhum⁵, Sunirat Rattana⁶, Nuchsupha Sunthamala⁵, Panya Warapetcharayut⁷,
Emmanuel Paradis^{8*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

²National Biobank of Thailand (NBT), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 144 Thailand Science Park, Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

³Program in Appropriate Technology and Innovation for Environmental Security, Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

⁴Regional Environmental Office 13, Ministry of Natural Resources and Environment, Chonburi, 20000, Thailand

⁵Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44150, Thailand

⁶Regional Environmental Office 7, Ministry of Natural Resources and Environment, Saraburi, 18120, Thailand

⁷Environmental Research and Training Center, Department of Environmental Quality Promotion, Ministry of Natural Resources and Environment, Technopolis, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

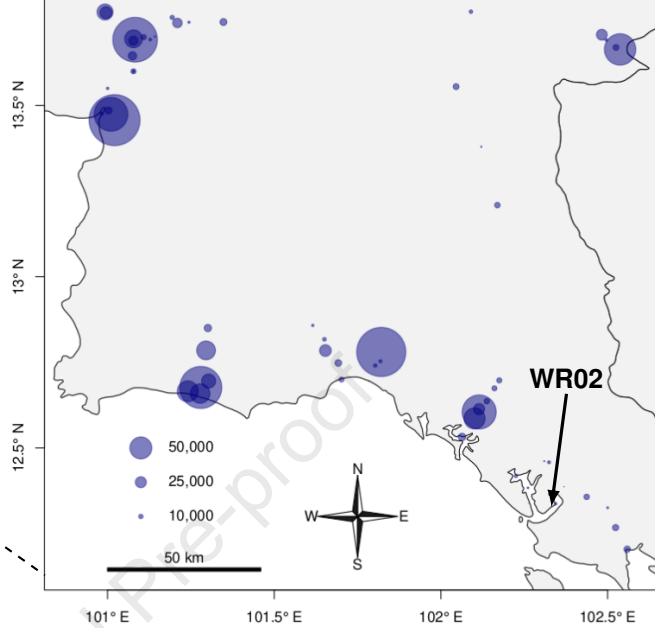
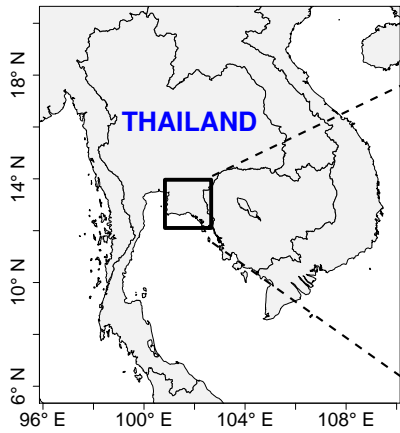
⁸ISEM, IRD, Univ. Montpellier, CNRS, EPHE, Montpellier, France

* Corresponding author: e-mail: Emmanuel.Paradis@ird.fr, phone: +66-61-716-4769, fax: +66-38393489.

Chantima Piyapong	chantimap@go.buu.ac.th
Nitcha Chamroensaksri	nitcha.cha@nstda.or.th
Sayam Aroonsrimorakot	sayamthai88@gmail.com
Lawan Eyosawat	lawan_e@hotmail.com
Surasak Khankhum	surasak.kk@msu.ac.th

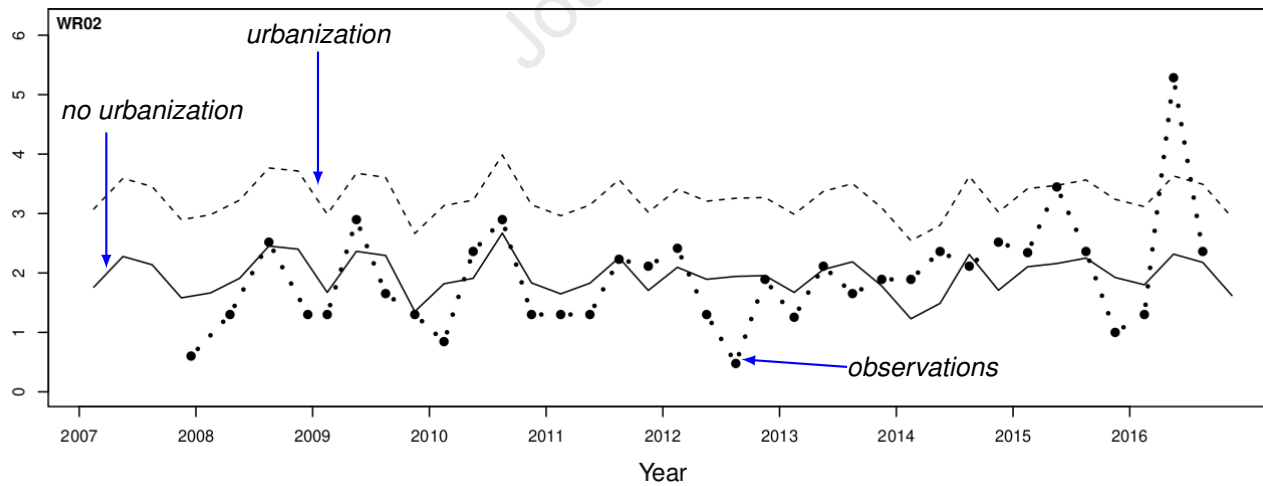
Sunirat Rattana	<u>osunirat@gmail.com</u>
Nuchsupha Sunthamala	<u>nuchsupha.s@msu.ac.th</u>
Panya Warapetcharayut	<u>panya41@hotmail.com</u>
Emmanuel Paradis	<u>Emmanuel.Paradis@ird.fr</u>

Journal Pre-proof



Coliform concentration (log-scale)

PREDICTIONS FOR STATION WR02



A predictive model of the impact of urbanization on bacterial loads in watersheds

Chantima Piyapong^a, Nitcha Chamroensaksri^b, Sayam Aroonsrimorakot^c, Lawan Eynosawat^d, Surasak Khankhum^e, Sunirat Rattana^f, Nuchsupha Sunthamala^e, Panya Warapetcharayut^g, Emmanuel Paradis^{h,*}

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

^bNational Biobank of Thailand (NBT), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 144 Thailand Science Park, Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

^cProgram in Appropriate Technology and Innovation for Environmental Security, Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

^dRegional Environmental Office 13, Ministry of Natural Resources and Environment, Chonburi, 20000, Thailand

^eDepartment of Biology, Faculty of Science, Maharakham University, Maharakham, 44150, Thailand

^fRegional Environmental Office 7, Ministry of Natural Resources and Environment, Saraburi, 18120, Thailand

^gEnvironmental Research and Training Center, Department of Environmental Quality Promotion, Ministry of Natural Resources and Environment, Technopolis, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

^hISEM, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

Abstract

Bacterial concentration is one of the most important aspects of water quality. Many regions in the world are affected by increasing urbanization and a potential increase in bacterial concentrations in waters. We used long-term data from 68 stations in eight watersheds in Eastern Thailand to quantify the temporal and geographical variation in total and fecal coliform bacteria. Descriptive statistics showed considerable seasonal, inter-annual, and geographical variation. In order to quantify this multi-level variation, we built a predictive model of bacterial loads. Using fixed- and mixed-effects regression models, we built a model including the effects of urbanization and other significant variables. The best model, fitted by restricted maximum likelihood, included the effects of season, year, urbanization as fixed effects, and of watershed and station as nested, random effects. Temporal variation was related to seasonal and annual variations. Spatial variation had a very significant impact on the bacterial concentrations. Urbanization was an important factor controlling concentrations of bacteria in rivers: we found that the proportion of urban area around a station had a statistically significant effect on log-transformed total coliform bacterial concentration with a slope equal to 1.3 (SE = 0.3), and on log-transformed fecal coliform bacterial concentration with a slope equal to 1.4 (SE = 0.3). Our model predicts that bacterial concentrations would be multiplied by 20 if land is transformed from non-urban to fully urban.

Keywords: Coliforms, Microbiological water quality, Mixed-effect models, Rivers, Thailand

*Corresponding author

Email address: Emmanuel.Paradis@ird.fr (Emmanuel Paradis)

1. Introduction

The growth of urban areas is a major environmental issue around the world. Conversion of lands into either agricultural lands or urban areas have different consequences with the former case being generally associated with increased soil erosion and increased chemical inputs in water (particularly nitrogen), whereas increased human population density is generally associated to increased waste disposal from urban areas which affect directly bacterial concentrations (Cabral and Marques, 2006; Diwan et al., 2018; Shukla et al., 2018). These issues affect water quality in rivers and waterbodies at different scales and depending on ecological factors and the management of waste (Causse et al., 2015; Jeong et al., 2019). Furthermore, land use change is a dynamic process taking place at different scales of time and space (Song et al., 2018), so we may expect the relationship between land use changes and water quality to be complex.

One of the most important components of water quality is the quantity of bacteria in rivers, and particularly coliforms, as some of them are produced by human waste (Abraham, 2011; Rochelle-Newall et al., 2015). A crucial challenge is to predict the changes in concentrations of coliforms in relation to land use (Lyautey et al., 2010; St Laurent and Mazumder, 2012; Rochelle-Newall et al., 2016). These predictions are critical for environmental sustainability, but also to be able to take preventive decisions to avoid negative impacts on human and ecosystem health.

Bacterial contamination is one of the most important issues related to water pollution. The scientific literature on this subject points to two main sources of coliforms in surface waters: agriculture (Lyautey et al., 2010; St Laurent and Mazumder, 2012) and urbanization (DiDonato et al., 2009). The considerable ongoing changes in land use and occupation in Southeast Asia result in challenges in the management of environmental resources. Such challenges may be local (Soytong and Perera, 2017) or regional (Taylor, 2010; Paradis, 2018, 2020). Thailand is a country characterized by heterogeneous socioeconomic development among its provinces, resulting in intense rural-urban migration (Shatkin, 2004; Soytong and Perera, 2017). Eastern Thailand is characterized by highly contrasted land use: it includes large tracks of tropical forest in its interior, extensive agricultural lands, and fast-growing urban areas on the coast. The past and current projects of economic development in this area, particularly on the sea coast, raise concerns about water quality and its evolution with respect to changes in land use (Water Environmental Partnership in Asia, 2018; Eastern Economic Corridor Office, 2019).

In the context of increased urbanization in Eastern Thailand, the risk of water contamination by coliforms could be increased because of the increasing local population densities in industrial areas (Soytong and Perera, 2014; Water Environmental Partnership in Asia, 2018). Surface waters in Thailand

are classified into five categories according to different quantitative criteria; these categories are labelled
33 as: (1) extra clean, (2) very clean, (3) fairly clean, (4) moderately clean, and (5) unclassified in the previous
classes (http://www.secot.co.th/secot_ww/std-e.html}; accessed 2021-01-14). Only the
categories 1–3 are proper for human consumption. The main water quality problems in four major river
36 basins of Thailand are high loads in coliform bacteria (36% of the problems; [Simachaya et al., 2000](#)). In
the Eastern Region, fecal coliform contaminations represent 17% of the water quality problems compared
to other parameters such as total solids, turbidity, biochemical oxygen demand, or dissolved oxygen. Fecal
39 coliform bacteria in the Bang Pakong River Basin, a watershed situated in the North of the Eastern
Thailand Region, exceeded surface water standard category 3, which is specified as equal to or less than
4000 bacteria per 100 mL ([Simachaya, 2003](#)). This previous study suggested that organic loading caused
42 by human communities, industry, pig farms, and aquaculture were the sources of pollution in this basin.

In this paper, we present a predictive model of bacterial concentrations in rivers and waterways. We
assessed the variability in total and fecal coliform bacteria throughout Eastern Thailand using data from a
45 long-term monitoring program of water quality. Using fixed- and mixed-effects regression models, we
built a model that includes the effects of urbanization and other significant variables. We used this model
to predict changes in bacterial concentrations caused by urbanization taking other effects into account. We
48 conclude with some perspectives on water quality management in the context of growing urban areas.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

51 Sampling took place over the Eastern Thailand region in eight watersheds covering a variety of ecological
situations (Fig. [1](#)). In order to consider seasonal variation, sampling was conducted four times each year in
February, May, August, and November which made possible to cover the range of weather regimes in
54 Eastern Thailand: end of dry (cool) season, first peak of rainy season, start of second peak of rainy season,
and start of dry season, respectively (<http://www.climate.tmd.go.th/content/file/75>).
The data used in this paper cover a period from December 2007 until August 2016. For logistic reasons,
57 sampling was done in December instead of November in 2007 and in 2008, and in April 2008 instead of
May 2008. Additionally, several stations were added to the monitoring program in order to increase its
geographical coverage. Four stations (NK01, NK02, PT01, and PT02) were discontinued after four
60 sampling sessions because they could not be accessed continuously to sample water. A total of 68 stations
were sampled between four and 36 times resulting in a total of 1999 samples. Five stations were sampled

four or six times, while the 63 others were sampled at least 19 times. The geographical coordinates
 63 (longitude, latitude) of each station were recorded. The water samples were collected in sterile 250-mL
 plastic bottles and transported on ice to the laboratory of the Regional Environment Office of the Chonburi
 Province within 24 hours.

66 2.2. Laboratory analyses

The enumerations of total coliform bacteria (TCB) and fecal coliform bacteria (FCB) were done by means
 of the multiple-tube fermentation (MTF) method according to the protocols of the American Public Health
 69 Association (APHA, 1992). For TCB counts, a series of five fermentation tubes of lauryl sulphate broth
 (LSB, Merck; also known as lauryl tryptose broth) were inoculated with appropriate volumes of 10-fold
 dilutions of water samples and incubated at 37 °C for 48 h. The number of five-tube series and the
 72 inoculation volumes were chosen depending on the quality and character of the water to be examined
 (American Public Health Association, 1992, p. 9-46). All gas-positive LSB tubes were subcultured to
 tubes of brilliant green lactose bile broth (BGLB, Merck) and incubated at 37 °C for 48 h. Gas-positive
 75 BGLB tubes were considered positive for the presence of TCB. Gas-positive LSB tubes were subjected to
 further analysis with *Escherichia coli* broth (ECB, Merck). The EC tubes were incubated at 44.5 °C for
 24 h. Gas-positive ECB tubes were considered positive for the presence of FCB. The values of TCB and
 78 FCB (expressed in units of most probable number per 100 mL, or MPN/100 mL) were inferred using the
 following formula (American Public Health Association, 1992, p. 9-50):

$$\text{Bacterial concentration} = \frac{100 \times \text{number of positive tubes}}{\sqrt{\left(\frac{\text{mL sample in}}{\text{negative tubes}}\right) \times \left(\frac{\text{mL sample in}}{\text{all tubes}}\right)}}$$

2.3. Land cover data

81 The land cover data were downloaded from the European Space Agency Climate Change Initiative
 (ESACCI, <http://maps.elie.ucl.ac.be/CCI/viewer/download.php>, accessed
 2018-04-18). These remote sensing data provide land cover and land use from 1992 to 2015 with a
 84 resolution of 10'' (ten arcseconds), which is equivalent to a distance of approximately 300 m. Land cover
 was classified into 38 categories ranging from “No data” to “Permanent snow and ice”. The land cover
 data were extracted for Eastern Thailand (12.1–14° N, 100.8–102.7° E) and for the years 2007–2015. We
 87 calculated an index of urbanization (variable called ‘Urbanization’ below) for each station as the

percentage of land use classified as “Urban areas” one kilometer around the point defined by the coordinates of the station. This index was calculated for each station and each year from 2007 to 2015; its value varied between 0 (no urban area around the station) and 1 (only urban area around the station). We also summarized land use changes, evaluated pixel by pixel, during this period with a focus on urbanization by calculating the proportion of urban areas over Eastern Thailand and land conversion related to urbanization.

2.4. Statistical model-building

We modelled the variation in TCB and FCB with regression models using different approaches, starting from simple linear models and then building more complex models. We first used simple linear regressions to assess the form and the significance of the variation of these relationships. We then performed multiple regression models to test the relative statistical significance of several predictors (‘Year’, ‘Season’, ‘Station’, ‘Urbanization’) using *F*-tests, assessing the significance of each effect while taking others into account. Hereafter, variable names considered as effects in a model are written within single quotes. However, these models must be interpreted with caution because of confounding effects. For instance, it is difficult to test the effects of ‘Station’ and ‘Urbanization’ in the same model because these two effects are mostly confounded (i.e. both variables are geographically linked). Therefore, we used linear mixed-effects (LME) models using ‘Watershed’ and ‘Station’ as random-effect terms. This made it possible to test for the effect of ‘Urbanization’ while considering ‘Watershed’ and ‘Station’ as repeated, nested, correlated measures. Each individual effect was tested with a χ^2 -based likelihood-ratio test where the null hypothesis is that the predictor has no effect on either TCB or FCB concentration while taking the effects of the other predictors in the model into account. Different LME models were compared with their Akaike information criteria (AIC; Akaike, 1973) after fitting the models by maximum likelihood (Pinheiro and Bates, 2000): the model with the smallest AIC was selected as the best one among those considered. TCB and FCB both had strongly skewed distributions so they were \log_{10} -transformed before analyses, as commonly done when analyzing such data (e.g. Lyautey et al., 2010). Since ‘Urbanization’ was a continuous variable, its effect in the model was linear; however, it could be that such an effect might not be linear, for instance, urbanization may have no effect if its index is less than a threshold. Nonlinear effects of ‘Urbanization’ were tested by transforming the urbanization index into two categories: a threshold was chosen and a new categorical variable was defined as “urban” for the stations with ‘Urbanization’ greater than or equal to the threshold, or as “non-urban” if ‘Urbanization’ was less than the threshold. Different values of threshold

were assessed. Predictions for LME models were done with best linear unbiased predictors (BLUP) which include predictions for the random and the fixed effects (Robinson, 1991). The predictive power of a model was calculated as the ratio of its explained variance on the total variance calculated with:

$$R^2 = 1 - \frac{\hat{\sigma}_r^2}{\hat{\sigma}^2},$$

where $\hat{\sigma}_r^2$ is the residual variance of the model, and $\hat{\sigma}^2$ is the total variance.

All data analyses were done with R version 3.5.1 (R Core Team, 2019). The LME models were fitted and analyzed with the package lme4 (Bates et al., 2015). The GIS data were handled with the packages rgdal (Bivand et al., 2018) and raster (Hijmans, 2018). A file with the commands used for these analyses is available as supplementary information.

3. Results

3.1. Summary of coliform bacterial concentrations

Very low or very large bacterial concentrations could not be quantified precisely in the laboratory with the MTF method because the required numbers of dilutions are not achievable in practice. The detection thresholds in our study were found to be $18 \text{ MPN}/100 \text{ mL} \leq \text{bacterial concentration} \leq 160,000 \text{ MPN}/100 \text{ mL}$. However, presence of bacteria outside of this interval was found in 124 measures of TCB (6.2%) and 134 measures of FCB (6.7%). Out of the 1999 measures of TCB, 47 (2.4%) were below the lower-bound of the detection threshold (TCB concentration $< 18 \text{ MPN}/100 \text{ mL}$), and 77 (3.9%) were above the upper-bound limit (TCB concentration $> 160,000 \text{ MPN}/100 \text{ mL}$). For FCB, these numbers were 110 (5.5%) and 24 (1.2%), respectively. It is therefore possible to infer the presence of bacteria in very low or very large concentrations in these 258 measures. In order to include this information in the subsequent quantitative analyses, these values were replaced by values drawn randomly in the interval [1, 17] for those below $18 \text{ MPN}/100 \text{ mL}$, or in the interval [160,000; 200,000] for those above $160,000 \text{ MPN}/100 \text{ mL}$.

Table 1 gives a summary of the distributions of TCB and FCB. Bacterial concentration exceeded $10,000 \text{ MPN}/100 \text{ mL}$ in 599 (30%) of the measures of TCB and in 246 measures (12.3%) of those of FCB. A small number of measures exceeded $100,000 \text{ MPN}/100 \text{ mL}$: 131 (6.6%) for TCB and 45 (2.2%) for FCB. The concentrations of FCB were greater than $4000 \text{ MPN}/100 \text{ mL}$ in 405 measures (20%). Both TCB and FCB displayed extensive spatial and temporal variation (Figs. 2 and 3 for TCB and FCB,

respectively). All stations displayed strong seasonal variation in both TCB and FCB with the highest levels measured in summer. Some inter-annual variation were visible for some stations (e.g. BK13, CB02, RY01, TE01). The five stations with four or six measures (BTR01, NK01, NK02, PT01, and PT02) were dropped for the subsequent analyses which were thus done with the 63 stations with at least 19 measures out of the 36 sampling occasions (see Sampling subsection). The mean TCB for each station averaged over years and seasons ranged between 479 MPN/100 mL (Station WR01 located upstream of the River Chantaburi) and 115,576 MPN/100 mL (Station BPT01 near the seamount of the River Bang Pakong). The mean FCB ranged between 48 MPN/100 mL (Station WR01) and 83,659 MPN/100 mL (Station BPT01). Three stations had a mean TCB larger than 100,000 MPN/100 mL: PR04 (upstream of the River Phang Rat on the border of the Provinces Rayong and Chantaburi), TE02 (upstream the River Bang Pakong), and BPT01 (see Table 1). The geographical distribution of the means for all stations showed considerable variation among basins (Fig. 4). Large mean TCB were observed throughout the study area, particularly downstream the rivers close to their seamounts.

3.2. Land cover use and changes between 2007 and 2015

The area considered for the land cover analysis covered 42,031 km² (including 10,323 km² covered by water) and showed little change in land use between 2007 and 2015 with only 287 km² (0.7%) of land that changed during this period. Out of these, 221 km² (77%) were converted into urban areas, mostly from cropland (204 km²). The extent of urban areas changed from 283 km² in 2007, to 504 km² in 2015, an increase of 78%. The three main categories of land use in the study area in 2015 were: rainfed cropland (15,360 km², 48.4%, excluding water), herbaceous cover (5,966 km², 18.8%), and evergreen, broadleaved forest (3,429 km², 10.8%).

3.3. Linear models

All effects were highly significant when considered alone in a regression model (Table 2). The variable 'Year' was considered either as a continuous variable or as a categorical one: in both cases the relationship was significant, but more variation was explained when 'Year' was a categorical variable, which indicates that TCB and FCB did not increase linearly over time. 'Year' was considered as a categorical variable in the subsequent analyses. 'Station' explained 47% of the variance in both TCB and FCB, whereas 'Watershed' explained 18%. On the other hand, 'Year' or 'Season' explained low quantities of variance. This shows that geographical variation is far more important than temporal variation.

174 A multiple regression model with the effects of ‘Year’, ‘Season’, and ‘Station’, as well as the
 interactions between ‘Season’ and ‘Station’ and between ‘Season’ and ‘Year’, was fitted. ‘Watershed’ and
 ‘Urbanization’ were not considered in this model because they are confounded with ‘Station’ (see
 177 subsection Statistical model-building). All effects as well as the interactions were highly significant
 (Table 3). This model explained 66% of the variation of TCB, and 64% of FCB.

3.4. Mixed-effects models

180 To further elaborate our models, we fitted an LME model considering ‘Station’ and ‘Watershed’ as random
 effects, with the former nested in the latter, and including ‘Season’, ‘Year’, the interaction between these
 two variables, and ‘Urbanization’, as main effects. All fixed effects of this model were strongly significant
 183 with either TCB or FCB as the response (Table 4). For TCB, the final model with all the above effects had
 AIC = 4494. Transforming the urbanization index as a categorical variable did not improve the fit: AIC =
 4501 with a threshold of 0.5 (i.e. stations with less than 50% of urban areas around 1 km were considered
 186 as “non-urban”), or AIC = 4506 with a threshold of 0. The estimated variance associated with the random
 effect of ‘Station’ was $\hat{\sigma}_{\text{Station}}^2 = 0.26$ (SE = 0.52), and the variance associated with ‘Watershed’ was
 $\hat{\sigma}_{\text{Watershed}}^2 = 0.11$ (SE = 0.33), both smaller than the residual variance $\hat{\sigma}^2 = 0.47$ (SE = 0.68).

189 For FCB, the final model had AIC = 4516. Transforming the urbanization index as a categorical
 variable did not improve the fit (AIC = 4527 with a threshold at 0.5, or AIC = 4535 with a threshold at 0).
 The estimated variances associated with the random effects were $\hat{\sigma}_{\text{Station}}^2 = 0.24$ (SE = 0.49) and
 192 $\hat{\sigma}_{\text{Watershed}}^2 = 0.11$ (SE = 0.33), again smaller than the residual variance $\hat{\sigma}^2 = 0.47$ (SE = 0.69).

In order to use this final model for prediction, an artificial data set was built with all possible
 combinations of the five predictors (‘Urbanization’, ‘Season’, ‘Year’, ‘Station’, and ‘Watershed’). The
 195 predicted value of the response (TCB or FCB) was calculated for each combination of the predictors. This
 made it possible to predict the effect of a given predictor while taking into account the effect of the others.
 Figure 5 shows the predictions of TCB for each effect in the final model, taking the variation from other
 198 effects into account. Since ‘Urbanization’ is a continuous variable, the predicted values of TCB are on
 parallel straight lines with a slope equal to the estimated coefficient from the final model. These lines have
 different intercepts because they represent the variation in the other predictors. For the other predictors,
 201 which are all discrete, the variability from the others is represented with boxplots. This representation
 makes it possible to visualize the variability associated with the two random effects, ‘Watershed’ and
 ‘Station’, which are nested. In particular, some stations which are in the same watershed have different

204 predicted values. Note that the predictions are made on the scale of the transformed response (i.e. \log_{10}).
There is clearly considerable variability outside of each significant effect, meaning that a single effect
explains only a portion of the global variability. Figure 6 shows the predictions for FCB which are very
207 similar to those for TCB. The plots of the predicted values against the observed ones show that the
predictions were best in the range between 1000 MPN/100 mL and 10,000 MPN/100 mL (Fig. S3).
Predictions tended to be overestimated for concentrations less than 1000 MPN/100 mL, and
210 underestimated for concentrations above 10,000 MPN/100 mL. The largest discrepancies were (on the
log-scale) 3.6 and 2.8 for TCB and FCB, respectively.

The slope of the parallel lines associated with the effect of 'Urbanization' was estimated to be equal to
213 1.3 (SE = 0.3) for TCB and 1.4 (SE = 0.3) for FCB. Therefore, the process of urbanization in this region
(increase of 'Urbanization' from 0 to 1) is predicted to result in a 20-times increase in TCB and 25-times
increase in FCB (since the responses were \log_{10} -transformed).

216 To further assess the precision of these predictions, we focused on three stations with contrasting
features: a station characterized by an urbanization index equal to one (RY03), a station with an
urbanization index equal to zero but in the same watershed than the first one (RY02), and a station in an
219 area with increasing urbanization during the study period (WR02). This makes it possible to formulate
predictions without the additional effects of the predictors 'Watershed' and 'Station'. Furthermore,
focusing on a specific station is likely to be more meaningful for management purposes. Figure 7 shows
222 the predicted values of TCB for each year and each season for these three stations. Since the effect of
'Urbanization' is linear in the final model, the predicted effect of this variable is to simply shift the
temporal curves downwards (decreasing 'Urbanization') or upwards (increasing 'Urbanization'). For
225 simplicity, only the predictions for Urbanization = 0 (continuous curve) and for Urbanization = 1 (dashed
curve) are displayed. Clearly, the predictions for RY03 and for RY02 are very similar. In the case of
WR02, the urbanization will increase the values of TCB, although not reaching the values predicted for the
228 two other stations. For the three stations, the observations are well predicted by the model. Figure 8 shows
the predictions of FCB.

4. Discussion

231 In this study of bacterial concentrations in waters of Eastern Thailand, we showed that total and fecal
coliform bacteria showed considerable variation in the area studied both spatially and temporally. Several
studies have shown similar extensive variation in bacteria in Portugal (Cabral and Marques, 2006), Canada

234 (Lyautey et al., 2010), and India (Shukla et al., 2018). Temporal variation in our study was related to both
seasonal and annual variation: the highest levels of TCB/FCB were measured in summer which could be
explained by the highest temperatures over the year during this season. However, Vermeulen and Hofstra
237 (2014) observed that concentrations of *Escherichia coli* in several major rivers in Netherlands and Belgium
decreased with increasing temperatures because of bacterial die-off. On the other hand, summer in
Thailand is also the season with high precipitation which could lead to increased transport of bacteria. We
240 also observed considerable inter-annual variation in both TCB and FCB with no obvious trend. It is not
clear what caused these variations, though a potential candidate explanation could be weather. This is
currently under further investigation.

243 Spatial variation had a huge impact on the measured TCB and FCB. It is complicated to assess this
variation because of the nestedness of the effects (e.g. 'Station' and 'Watershed'). This nestedness implies
that these effects must be included as random effects in a mixed model. The variance associated with the
246 effect of 'Station' was estimated to be twice as large than the one associated with the effect of 'Watershed'.
This was apparent also when plotting the predicted values associated with each effect (Figs. 5 and 6).
Interestingly, urbanization appeared as a distinct effect from these two variables since the urbanization
249 index was strongly significant even after including 'Station' and 'Watershed' as random effects. It is still
unclear what could explain the important variation among stations and we are currently investigating other
potential variables (e.g. distance to the shore, land use around the stations).

252 It is difficult to compare our results with those from the literature because of possible (unreported)
differences in the field and laboratory protocols, which could add some systematic or random variation in
the data. Furthermore, the different methods may have different specificities towards bacterial species. On
255 the other hand, the particularities of different studies (e.g. climate, landscape) may help to better
understand the mechanisms controlling bacterial concentrations in rivers. Keeping in mind these caveats,
previous studies reported maximum values of MPN equal to 2420 MPN/100 mL in Canada (Butler et al.,
258 2014), 5172 MPN/100 mL in Ecuador (Rao et al., 2015), 8000 MPN/100 mL in Belgium (de Brauwere
et al., 2011), and 10,000 MPN/100 mL in Netherlands (Vermeulen and Hofstra, 2014) or in a rural area of
Laos (Causse et al., 2015). Lyautey et al. (2010) reported 2004 measures of *E. coli* concentration in
261 Ontario (Canada) with annual means between 10 MPN/100 mL and 1000 MPN/100 mL (global median:
64 MPN/100 mL) and only three measures larger than 10,000 MPN/100 mL. Jeong et al. (2019) found that
67% of the *E. coli* in a watershed in Texas (U.S.A.) was contributed by wildlife. However, increase in
264 wastewater discharges and urban lands due to population growth resulted in increased concentration of *E.*

coli (Jeong et al., 2019). By contrast with these values from the literature, our results showed large values of MPNs, particularly for TCB, with 38 out of 63 stations (60%) showing a mean TCB above
267 10,000 MPN/100 mL. Most of the studies cited above were conducted in temperate countries or in rural tropical areas (Laos and Ecuador), which could explain these differences. Besides, our study covered several watersheds and a substantial geographic area and thus the data we analyzed were probably more
270 heterogeneous than those in these studies. As an illustration of this point, our models predicted a mean TCB around 100 MPN/100 mL for some stations (CB01, WR01) and above 50,000 MPN/100 mL for others (e.g. BPT01). Nevertheless, it might be very useful to further assess the precision of the measures
273 reported here by analyzing some samples with different methods. Because of its location, BPT01 receives impacts from several land use activities, mainly shrimp and fish aquaculture, compared to CB01 and WR01 where agriculture is the main activity.

276 Urban growth and its environmental impacts are very general issues in many countries. Several studies have shown that the growth of urban areas is not random and usually follows a dendritic pattern known as urban sprawl (Pan et al., 2020; Xu et al., 2020). Studies in China, North America, and Europe showed that
279 the impact of urbanization is very likely to have different impacts on different areas (Tang et al., 2005; Du and Huang, 2017). This impact is also very likely to differ with respect to sociological factors, for instance in relation to commuting behaviours which is typical of many large European and North American urban
282 systems (Pan et al., 2019). The growth of urban areas is expected to increase the proportion of impervious surfaces as well as surface water runoff (Tang et al., 2005).

In the present study, we used a statistical approach based on linear mixed-effect models which was
285 motivated by the geographical spread of the stations which covered several watersheds. The inclusion of random effects (here 'Station' and 'Watershed') makes it possible to fit complex models that would be impossible to fit with standard linear models. Additionally, linear models, even with random effects, make
288 it possible to formulate predictions in a straightforward way which are easily interpretable.

An important result from our analyses is the importance of urbanization as a factor controlling concentrations of bacteria in rivers. Our models predict that TCB and FCB would be multiplied by 20 and
291 25, respectively, if land is transformed from non-urban to fully urban (i.e. urbanization index changed from zero to one). One motivation of monitoring water quality in this study area is its control in relation to the development of the Eastern Seaboard (ESB) or the Eastern Economic Corridor (EEC). The
294 transformation of the area started in 1982 and ESB has now the largest number of industrial estates in Thailand (i.e. 18 out of 38; Soyong and Perera, 2017). ESB, together with the Bangkok area, is a recipient

of rural migrants from other regions of Thailand (Jampaklay et al., 2007). Special economic zones (SEZ) with extensive industrial and urban development have undeniable social and economic benefits, but their environmental sustainability is generally questionable (see review in Ślusarczyk and Grondys, 2018). Previous studies have focused on social conflict arising from industrialization in ESB (Soytong and Perera, 2017). Zhang and Tripathi (2018) found a relationship between atmospheric pollution by fine particulate matter and lung cancer in Eastern Thailand (actually a subset of the area considered in the present study). Therefore, health hazard is likely to be a general concern in ESB as in other SEZs. Other studies showed the importance of urban areas in the concentrations of bacteria in rivers (Wu and Jackson, 2016), lakes (Newton and McLellan, 2015), or creeks (DiDonato et al., 2009).

5. Conclusions

The present study shows that coliform bacterial concentrations in waters of Eastern Thailand varied considerably both spatially and temporally. Temporal variation was related to both seasonal and annual variation with the highest levels of bacterial concentrations measured in summer. These concentrations varied extensively among stations and among watersheds. The concentrations of fecal coliforms were greater than 4000 MPN/100 mL, the upper limit for consumable surface water, in 20% of the measures. The study also shows that urbanization is a very significant driver of bacterial concentrations in the rivers of Eastern Thailand and is predicted to cause a 20-fold increase of these concentrations. These results bring important information for land management. First, wastewater treatment in urban areas is a crucial element in improving water quality. Second, it is crucial to investigate the proximate, causal factors that affect TCB and FCB as a consequence of urbanization. Other components such as cleaner production, legal framework, institutional and financial arrangements, monitoring and enforcement, and cooperation with related agencies and local communities, should be taken into account as well. Most of all, an ecosystem approach is the key to development planning strategies as rivers themselves provide several basic ecosystem services.

Declaration of interest statement

None.

Acknowledgements

We are grateful to all the staff members who contributed to the data from the Regional Environmental
 324 Office 13 (Chonburi), Ministry of Natural Resources and Environment, including water sampling and
 laboratory analyses. We thank five anonymous reviewers for their constructive comments on previous
 versions of our paper. Many thanks to Colin Tosh for checking and correcting the English. Financial
 327 support was provided by a research grant from Burapha University through the National Research Council
 of Thailand (grant number: 57.3/2562). This is publication ISEM 2021-041 SUD.

Supplementary information

330 **Fig. S1.** Geographical distribution of sampling stations displayed with the main waterways in Eastern
 Thailand. The stations located inside the rectangle are detailed in Fig. S2.

Fig. S2. Geographical distribution of sampling stations within the watershed of the River Bang Pakong.

333 **Fig. S3.** Scatterplots of predicted against observed values for TCB (top) and FCB (bottom). The dashed
 lines are the line with $x = y$.

script.R. File with the R commands used in the analyses.

336 Abraham, W.R., 2011. Megacities as sources for pathogenic bacteria in rivers and their fate downstream.
 International Journal of Microbiology 2011, 798292. doi:[10.1155/2011/798292](https://doi.org/10.1155/2011/798292)

Akaike, H., 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle, in: Petrov,
 339 B.N., Csaki, F. (Eds.), Proceedings of the Second International Symposium on Information Theory.
 Akadémia Kiado, Budapest, pp. 267–281.

American Public Health Association, 1992. Standard methods for the examination of water and
 342 wastewater, 18th edn. American Public Health Association, American Water Works Association, Water
 Environment Federation, Washington DC, USA.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4.
 345 Journal of Statistical Software 67, 1–48. doi:[10.18637/jss.v067.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01).

Bivand, R., Keitt, T., Rowlingson, B., 2018. rgdal: bindings for the 'Geospatial' Data Abstraction Library.
 URL: <https://CRAN.R-project.org/package=rgdal>. R package version 1.3-6.

348 de Brauwere, A., de Brye, B., Servais, P., Passerat, J., Deleersnijder, E., 2011. Modelling *Escherichia coli*

- concentrations in the tidal Scheldt river and estuary. *Water Research* 45, 2724–2738.
doi:[10.1016/j.watres.2011.02.003](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.003)
- 351 Butler, S., Webster, T., Redden, A., Rand, J., Crowell, N., Livingstone, W., 2014. Using remote sensing to identify changes in land use and sources of fecal bacteria to support a watershed transport model. *Water* 6, 1925–1944. doi:[10.3390/w6071925](https://doi.org/10.3390/w6071925)
- 354 Cabral, J.P., Marques, C., 2006. Faecal coliform bacteria in Febros river (Northwest Portugal): temporal variation, correlation with water parameters, and species identification. *Environmental Monitoring and Assessment* 118, 21–36. doi:[10.1007/s10661-006-0771-8](https://doi.org/10.1007/s10661-006-0771-8)
- 357 Causse, J., Billen, G., Garnier, J., Henri-des Tureaux, T., Olaso, X., Thammahacksa, C., Latsachak, K.O., Souleleuth, B., Sengtaheuanghoung, O., Rochelle-Newall, E., Ribolzi, O., 2015. Field and modelling studies of *Escherichia coli* loads in tropical streams of montane agro-ecosystems. *Journal of Hydro-environment Research* 9, 496–507. doi:[10.1016/j.jher.2015.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jher.2015.03.003)
- 360 DiDonato, G.T., Stewart, J.R., Sanger, D.M., Robinson, B.J., Thompson, B.C., Holland, A.F., Van Dolah, R.F., 2009. Effects of changing land use on the microbial water quality of tidal creeks. *Marine Pollution Bulletin* 58, 97–106. doi:[10.1016/j.marpolbul.2008.08.019](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.08.019)
- 363 Diwan, V., Hanna, N., Purohit, M., Chandran, S., Riggi, E., Parashar, V., Tamhankar, A.J., Lundborg, C.S., 2018. Seasonal variations in water-quality, antibiotic residues, resistant bacteria and antibiotic resistance genes of *Escherichia coli* isolates from water and sediments of the Kshipra River in Central India. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, 1281. doi:[10.3390/ijerph15061281](https://doi.org/10.3390/ijerph15061281)
- 369 Du, X.J., Huang, Z.H., 2017. Ecological and environmental effects of land use change in rapid urbanization: the case of Hangzhou, China. *Ecological Indicators* 81, 243–251. doi:[10.1016/j.ecolind.2017.05.040](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.05.040)
- 372 Dumrongthai, P., 2019. Progress of water environment governance in Thailand. URL: http://wepa-db.net/3rd/en/meeting/20190222/pdf/D2_S3_Thailand.pdf, accessed: 2019-12-20.
- 375 Eastern Economic Corridor Office, 2019. Eastern Economic Corridor development. URL: <http://www.eeco.or.th/en/background>, accessed: 2019-02-20.

- Hijmans, R.J., 2018. raster: geographic data analysis and modeling. URL:
378 <https://CRAN.R-project.org/package=raster> R package version 2.7-15.
- Jampaklay, A., Korinek, K., Entwisle, B., 2007. Residential clustering among Nang Rong migrants in urban settings of Thailand. *Asian and Pacific Migration Journal* 16, 485–510.
381 doi:[10.1177/011719680701600403](https://doi.org/10.1177/011719680701600403).
- Jeong, J., Wagner, K., Flores, J.J., Cawthon, T., Her, Y., Osorio, J., Yen, H., 2019. Linking watershed modeling and bacterial source tracking to better assess *E. coli* sources. *Science of the Total Environment* 648, 164–175. doi:[10.1016/j.scitotenv.2018.08.097](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.097).
384
- Lyautey, E., Lu, Z., Lapen, D.R., Wilkes, G., Scott, A., Berkers, T., Edge, T.A., Topp, E., 2010. Distribution and diversity of *Escherichia coli* populations in the South Nation River Drainage Basin, Eastern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1486–1496.
387 doi:[10.1128/AEM.02288-09](https://doi.org/10.1128/AEM.02288-09).
- Newton, R.J., McLellan, S.L., 2015. A unique assemblage of cosmopolitan freshwater bacteria and higher community diversity differentiate an urbanized estuary from oligotrophic Lake Michigan. *Frontiers in Microbiology* 6, 1028. doi:[10.3389/fmicb.2015.01028](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01028).
390
- Pan, H.Z., Page, J., Zhang, L., Chen, S., Cong, C., Destouni, G., Kalantari, Z., Deal, B., 2019. Using comparative socio-ecological modeling to support Climate Action Planning (CAP). *Journal of Cleaner Production* 232, 30–42. doi:[10.1016/j.jclepro.2019.05.274](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.274).
393
- Pan, H.Z., Page, J., Zhang, L., Cong, C., Ferreira, C., Jonsson, E., Näsström, H., Destouni, G., Deal, B., Kalantari, Z., 2020. Understanding interactions between urban development policies and GHG emissions: a case study in Stockholm Region. *Ambio* 49, 1313–1327.
396 doi:[10.1007/s13280-019-01290-y](https://doi.org/10.1007/s13280-019-01290-y).
- Paradis, E., 2018. Nonlinear relationship between biodiversity and human population density: evidence from Southeast Asia. *Biodiversity and Conservation* 27, 2699–2712.
399 doi:[10.1007/s10531-018-1563-5](https://doi.org/10.1007/s10531-018-1563-5).
- Paradis, E., 2020. Modelling transition in land cover highlights forest losses and gains in Southeast Asia. *Biodiversity and Conservation* 29, 2539–2551. doi:[10.1007/s10531-020-01987-7](https://doi.org/10.1007/s10531-020-01987-7).
402
- Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. Springer, New York.

- 405 R Core Team, 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for
Statistical Computing. Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org>.
- Rao, G., Eisenberg, J.N.S., Kleinbaum, D.G., Cevallos, W., Trueba, G., Levy, K., 2015. Spatial variability
408 of *Escherichia coli* in rivers of Northern Coastal Ecuador. *Water* 7, 818–832.
doi:[10.3390/w7020818](https://doi.org/10.3390/w7020818).
- Robinson, G.K., 1991. The BLUP is a good thing: the estimation of random effects (with discussion).
411 *Statistical Science* 6, 15–51.
- Rochelle-Newall, E., Nguyen, T.M.H., Le, T.P.Q., Sengtehuanghoun, O., Ribolzi, O., 2015. A short
review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions.
414 *Frontiers in Microbiology* 6, 308. doi:[10.3389/fmicb.2015.DD3D8](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.DD3D8).
- Rochelle-Newall, E.J., Ribolzi, O., Viguier, M., Thammahacksa, C., Silvera, N., Latsachack, K., Dinh,
R.P., Naporn, P., Sy, H.T., Soullieuth, B., Hmimum, N., Sisouvanh, P., Robain, H., Janeau, J.L.,
417 Valentin, C., Boithias, L., Pierret, A., 2016. Effect of land use and hydrological processes on
Escherichia coli concentrations in streams of tropical, humid headwater catchments. *Scientific Reports*
6, 32974. doi:[10.1038/srep32974](https://doi.org/10.1038/srep32974).
- 420 Shatkin, G., 2004. Globalization and local leadership: growth, power and politics in Thailand's Eastern
Seaboard. *International Journal of Urban and Regional Research* 28, 11–26.
doi:[10.1111/j.0309-1317.2004.00500.x](https://doi.org/10.1111/j.0309-1317.2004.00500.x).
- 423 Shukla, A.K., Ojha, C.S.P., Mijic, A., Buytaert, W., Pathak, S., Garg, R.D., Shukla, S., 2018. Population
growth, land use and land cover transformations, and water quality nexus in the Upper Ganga River
basin. *Hydrology and Earth System Sciences* 22, 4745–4770.
426 doi:[10.5194/hess-22-4745-2018](https://doi.org/10.5194/hess-22-4745-2018).
- Simachaya, W., 2003. A decade of water quality monitoring in Thailand's four major rivers: the results
and the implications for management, in: *Proceedings of the Sixth International Conference on the*
429 *Environmental Management of Enclosed Coastal Seas (Bangkok, Thailand, November 18–21, 2003)*,
pp. 1–11. URL: <http://infofile.pcd.go.th/water/10yr4majoremecs2003.pdf>.
- Simachaya, W., Watanamahart, P., Kaewkrajang, V., Yenpiem, A., 2000. Water quality situation in the
432 Chao Phraya Delta, in: *The Chao Phraya Delta: Historical Development, Dynamics and Challenges of*

Thailand's Rice Bowl, pp. 199–218. URL:

<http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010024645>.

435 Ślusarczyk, B., Grondys, K., 2018. The concept of sustainable development in the functioning of municipalities belonging to special economic zones in Poland. *Sustainability* 10, 2169. doi:[10.3390/su10072169](https://doi.org/10.3390/su10072169).

438 Song, X.P., Hansen, M.C., Stehman, S.V., Potapov, P.V., Tyukavina, A., Vermote, E.F., Townshend, J.R., 2018. Global land change from 1982 to 2016. *Nature* 560, 639–643. doi:[10.1038/s41586-018-0411-9](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0411-9).

441 Soyotong, P., Perera, R., 2014. Use of GIS tools for environmental conflict resolution at Map Ta Phut Industrial Zone in Thailand. *Sustainability* 6, 2435–2458. doi:[10.3390/su6052435](https://doi.org/10.3390/su6052435).

Soyotong, P., Perera, R., 2017. Spatial analysis of the environmental conflict between state, society and 444 industry at the Map Ta Phut-Rayong conurbation in Thailand. *Environment Development and Sustainability* 19, 839–862. doi:[10.1007/s10668-016-9768-9](https://doi.org/10.1007/s10668-016-9768-9).

St Laurent, J., Mazumder, A., 2012. The influence of land-use composition on fecal contamination of 447 riverine source water in southern British Columbia. *Water Resources Research* 48, W00M03. doi:[10.1029/2012WR012455](https://doi.org/10.1029/2012WR012455).

Tang, Z., Engel, B.A., Pijanowski, B.C., Lim, K.J., 2005. Forecasting land use change and its 450 environmental impact at a watershed scale. *Journal of Environmental Management* 76, 35–45. doi:[10.1016/j.jenvman.2005.01.006](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.01.006).

Taylor, D., 2010. Biomass burning, humans and climate change in Southeast Asia. *Biodiversity and 453 Conservation* 19, 1025–1042. doi:[10.1007/s10531-009-9756-6](https://doi.org/10.1007/s10531-009-9756-6).

Vermeulen, L.C., Hofstra, N., 2014. Influence of climate variables on the concentration of *Escherichia coli* 456 in the Rhine, Meuse, and Drentse Aa during 1985–2010. *Regional Environmental Change* 14, 307–319. doi:[10.1007/s10113-013-0492-9](https://doi.org/10.1007/s10113-013-0492-9).

Water Environmental Partnership in Asia, 2018. Outlook on water environmental management in Asia 2018. URL: http://wepa-db.net/en/publication/2018_outlook/index.html. 459 accessed: 2019-02-21.

Wu, J.Y., Jackson, L., 2016. Association of land use and its change with beach closure in the United States, 2004-2013. *Science of the Total Environment* 571, 67–76.

462 doi:[10.1016/j.scitotenv.2016.07.116](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.116).

Xu, C., Haase, D., Su, M., Wang, Y., Pauleit, S., 2020. Assessment of landscape changes under different urban dynamics based on a multiple-scenario modeling approach. *Environment and Planning B: Urban*

465 *Analytics and City Science* doi:[10.1177/2399808320910161](https://doi.org/10.1177/2399808320910161).

Zhang, H.R., Tripathi, N.K., 2018. Geospatial hot spot analysis of lung cancer patients correlated to fine particulate matter (PM_{2.5}) and industrial wind in Eastern Thailand. *Journal of Cleaner Production* 170,

468 407–424. doi:[10.1016/j.jclepro.2017.09.185](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.185).

Table 1: Distribution summaries of total coliform bacteria (TCB) and fecal coliform bacteria (FCB).

	Number of measures greater than* (in MPN/100 mL)			Number of stations with mean greater than† (in MPN/100 mL)		
	10,000	50,000	100,000	10,000	50,000	100,000
TCB	599	248	131	38	7	3
FCB	246	84	45	14	2	0

*Out of 1999 measures from 68 stations. †Out of 63 stations.

Table 2: Simple linear regressions of total coliform bacteria (TCB) and fecal coliform bacteria (FCB); cont.: continuous; cat.: categorical. F : value of the F -statistic testing the effect of the predictor, df : numbers of degrees of freedom of the test (d_1, d_2), P : P -value of the test, R^2 : proportion of explained variance.

Predictor	TCB				FCB			
	F	df	P	R^2	F	df	P	R^2
Year (cont.)	5.28	1, 1997	0.021	0.00	46.04	1, 1997	< 0.001	0.02
Year (cat.)	5.47	9, 1989	< 0.001	0.02	9.41	9, 1989	< 0.001	0.04
Season	27.27	3, 1995	< 0.001	0.04	18.42	3, 1995	< 0.001	0.03
Station	25.79	67, 1931	< 0.001	0.47	25.80	67, 1931	< 0.001	0.47
Watershed	63.71	7, 1991	< 0.001	0.18	64.51	7, 1991	< 0.001	0.18
Urbanization	282.83	1, 1997	< 0.001	0.12	300.40	1, 1997	< 0.001	0.13

Table 3: Multiple linear regressions of total coliform bacteria (TCB) and fecal coliform bacteria (FCB). The F -tests are for the effect of each predictor taking the effects of the others into account. F : value of the F -statistic testing the effect of the predictor, df : numbers of degrees of freedom of the test (d_1, d_2), P : P -value of the test.

Predictor	TCB			FCB		
	F	df	P	F	df	P
Year (cat.)	9.70	8, 1695	< 0.001	14.30	8, 1685	< 0.001
Season*	46.47	3, 1919	< 0.001	29.94	3, 1919	< 0.001
Station	12.36	67, 1695	< 0.001	9.60	67, 1685	< 0.001
Season \times Station	2.27	201, 1695	< 0.001	1.99	201, 1695	< 0.001
Season \times Year	8.25	23, 1695	< 0.001	6.56	23, 1695	< 0.001

*Effect tested in a model without interactions.

Table 4: Linear mixed-effects model of total coliform bacteria (TCB) and fecal coliform bacteria (FCB). The χ^2 -based tests are likelihood-ratio tests where the null hypothesis is that the predictor in the first column has no effect on either TCB or FCB as response while taking the effects of the others into account. χ^2 : value of the χ^2 -statistic testing the effect of the predictor, df : number of degrees of freedom of the test, P : P -value of the test.

Effect	TCB			FCB		
	χ^2	df	P	χ^2	df	P
Year (cat.)	78.02	9	< 0.001	89.58	9	< 0.001
Season	135.21	3	< 0.001	88.34	3	< 0.001
Urbanization	16.55	1	< 0.001	20.96	1	< 0.001
Season \times Year	159.92	23	< 0.001	132.06	23	< 0.001

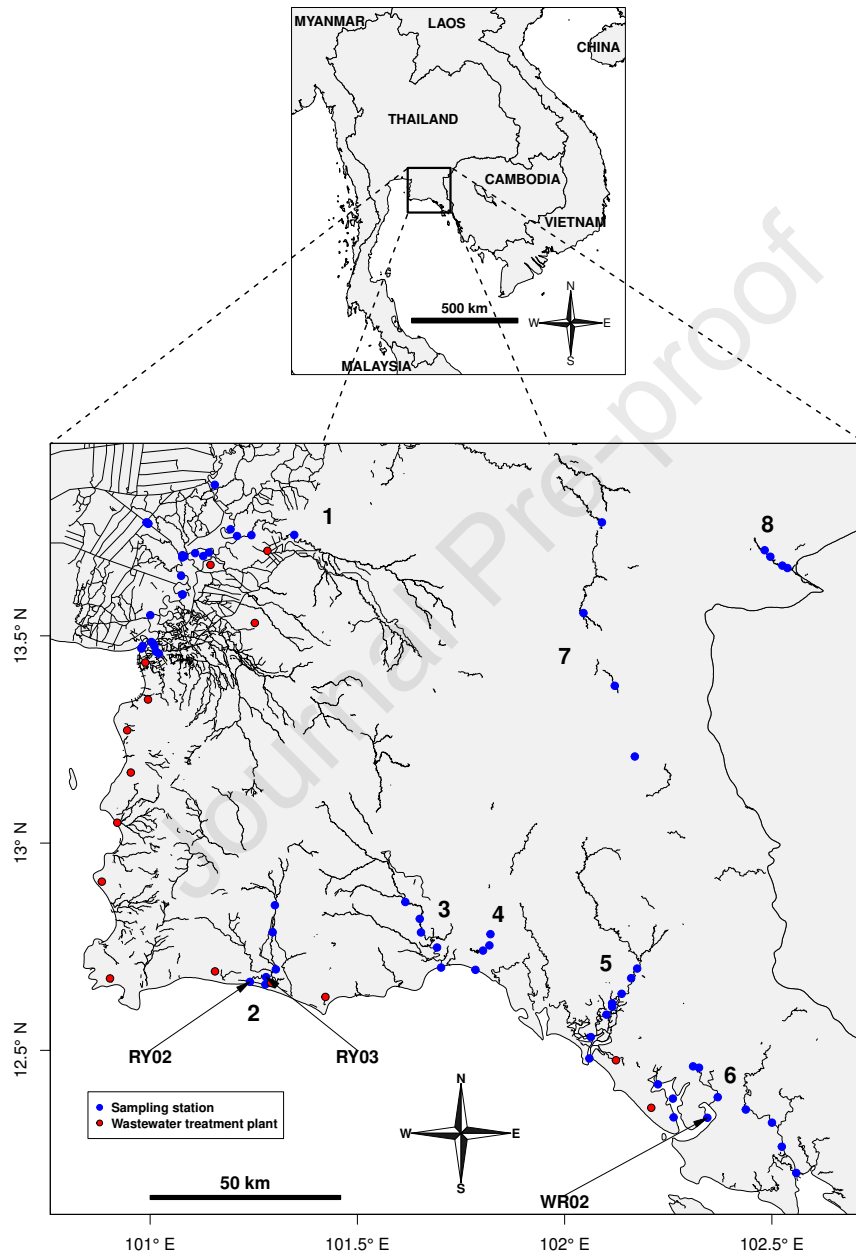


Figure 1: Geographical distribution of sampling stations displayed with the main waterways in Eastern Thailand and the wastewater treatment plants. The bold numbers indicate the watersheds used in the analyses. The stations RY02, RY03, and WR02, which are used in Figures 7 and 8 are shown with arrows. The locations of the wastewater treatment plants are from Dumrongthai (2019).

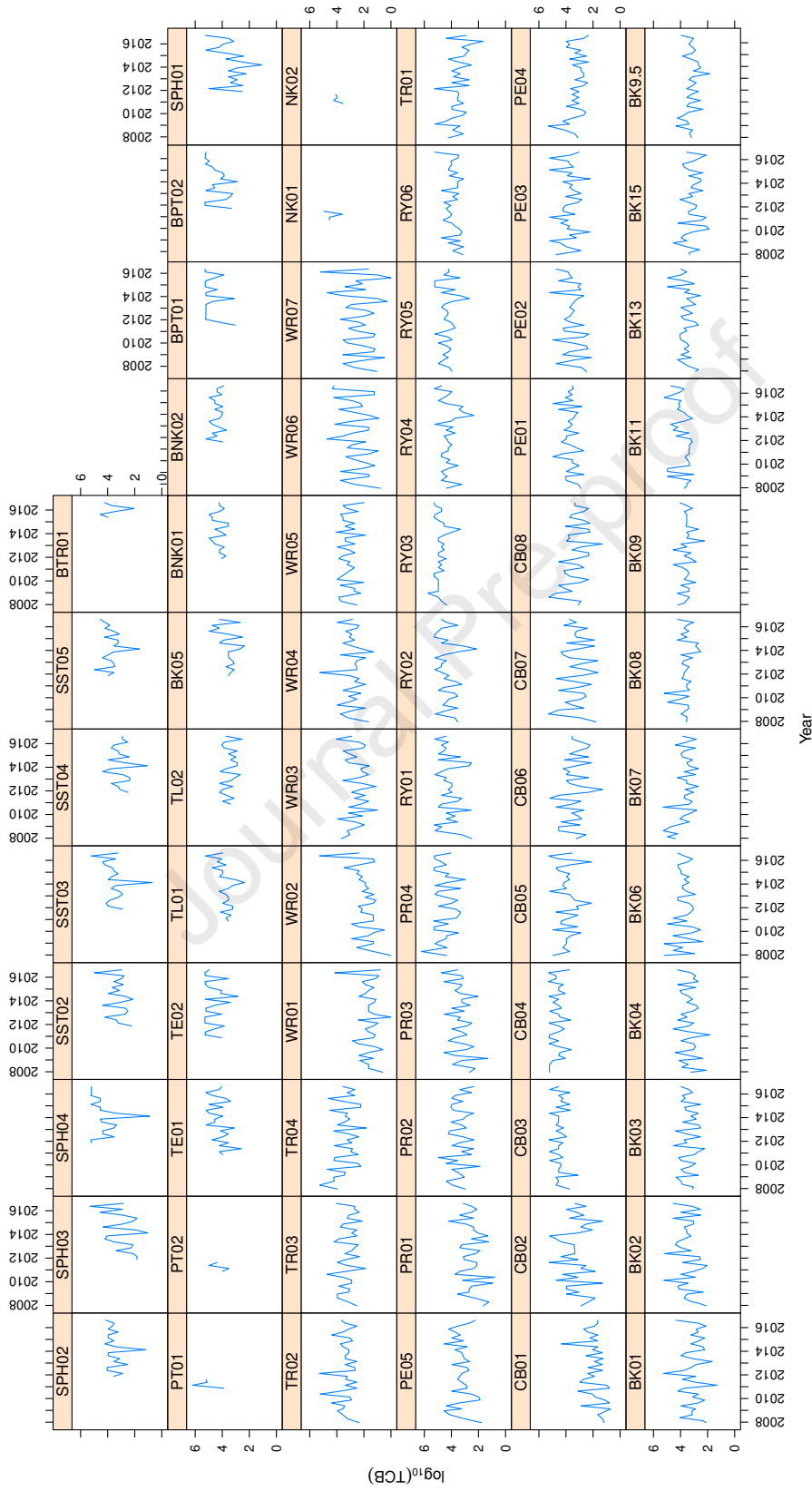


Figure 2: Temporal variation in abundance of total coliform bacteria (TCB, in MPN/100 mL) in 68 stations in Eastern Thailand

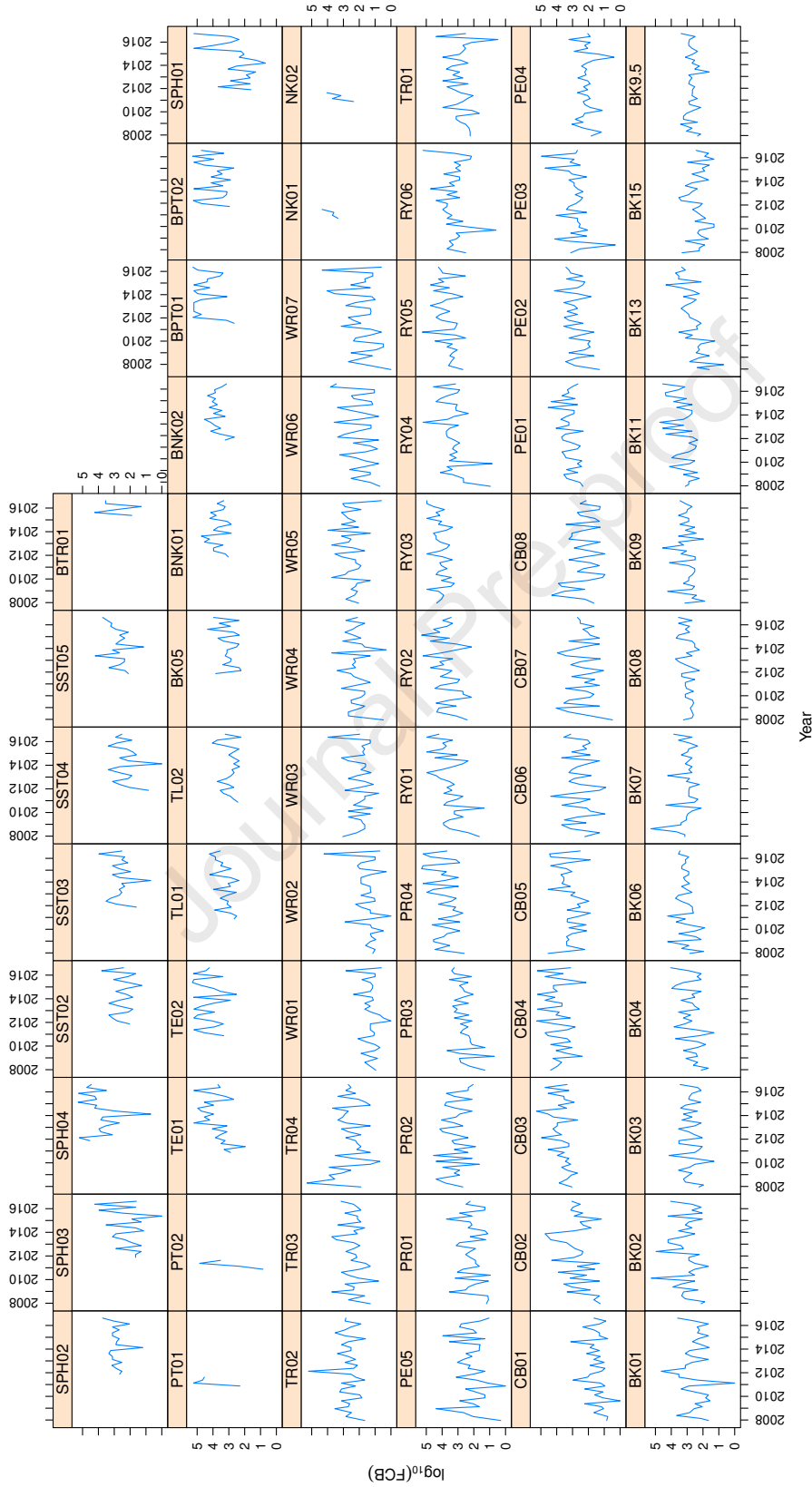


Figure 3: Temporal variation in abundance of fecal coliform bacteria (FCB, in MPN/100 mL) in 68 stations in Eastern Thailand.

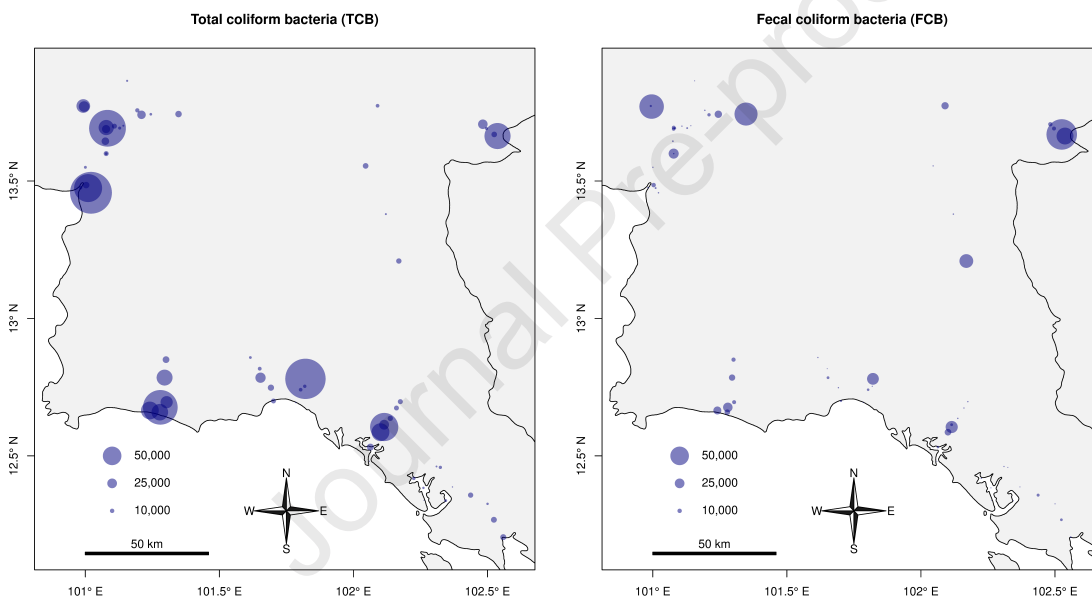


Figure 4: Abundance of total and fecal coliform bacteria (in MPN/100 mL) in Eastern Thailand averaged over all sampling occasions for each station.

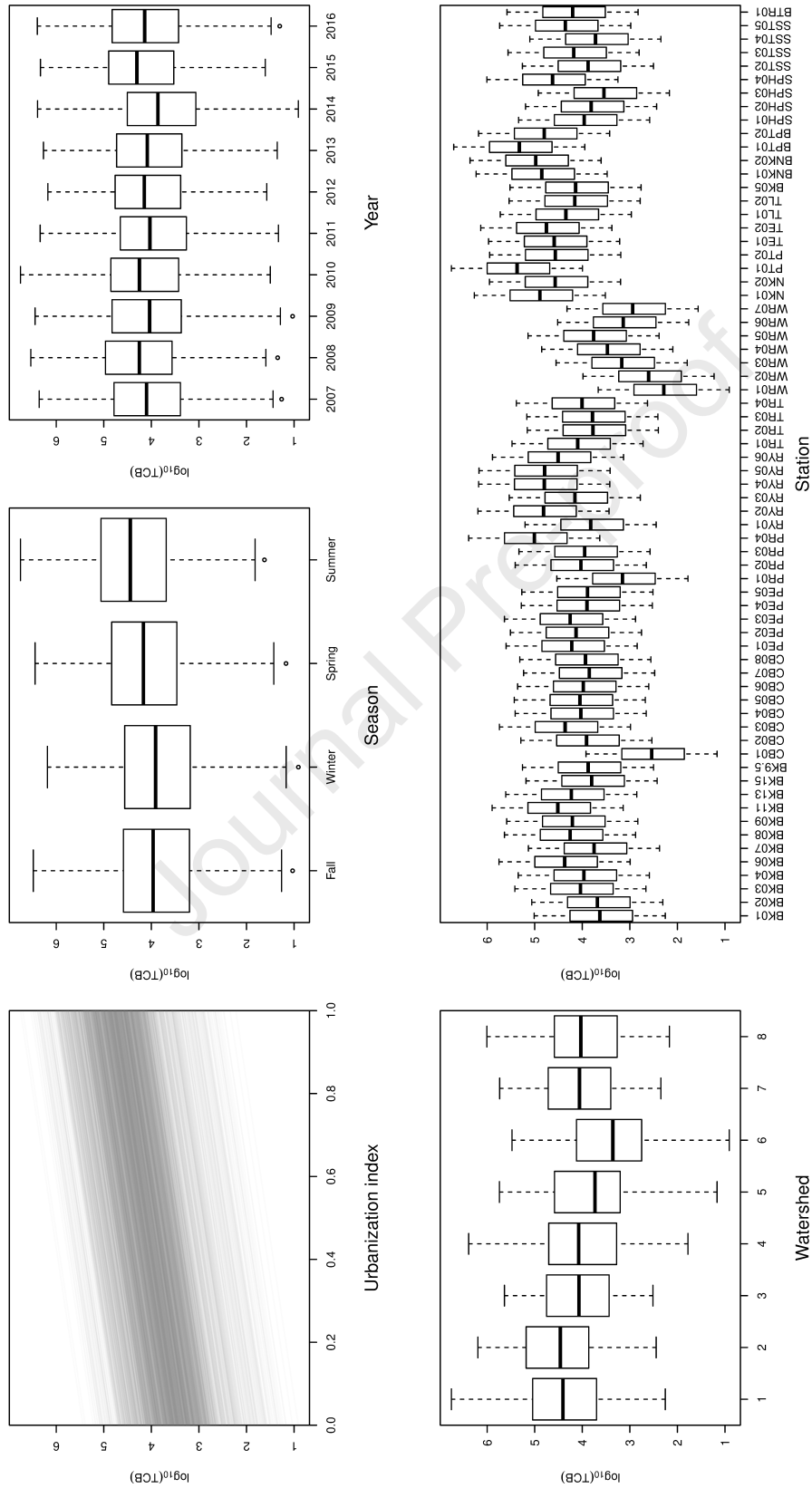


Figure 5: Predictions of TCB (in MPN/100 mL) from the final mixed-effects model. Each panel shows the partial predictions for each effect included in the model; the displayed variation is due to the other effects

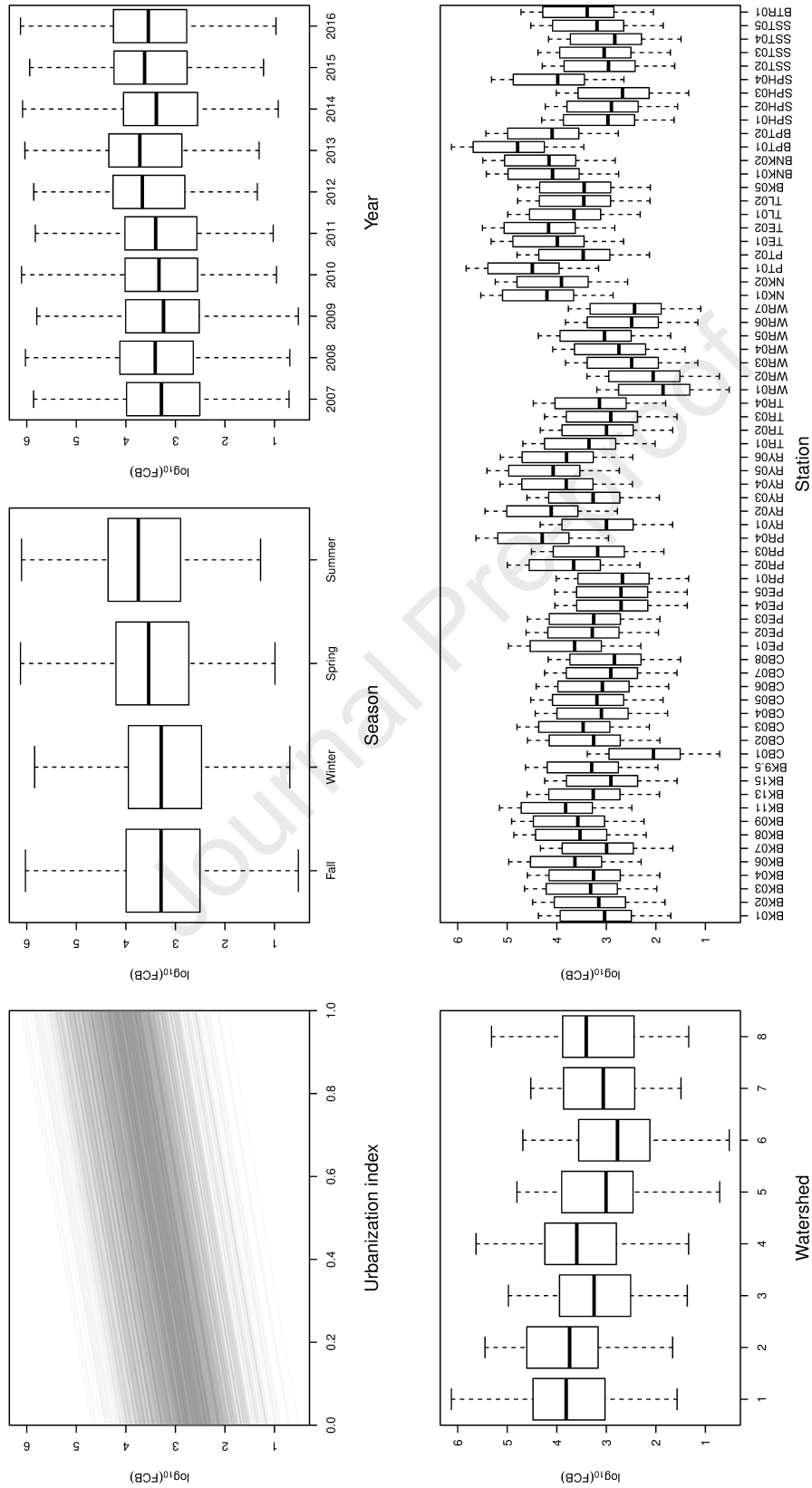


Figure 6: Predictions of FCB (in MPN/100 mL) from the final mixed-effects model. Each panel shows the partial predictions for each effect included in the model; the displayed variation is due to the other effects.

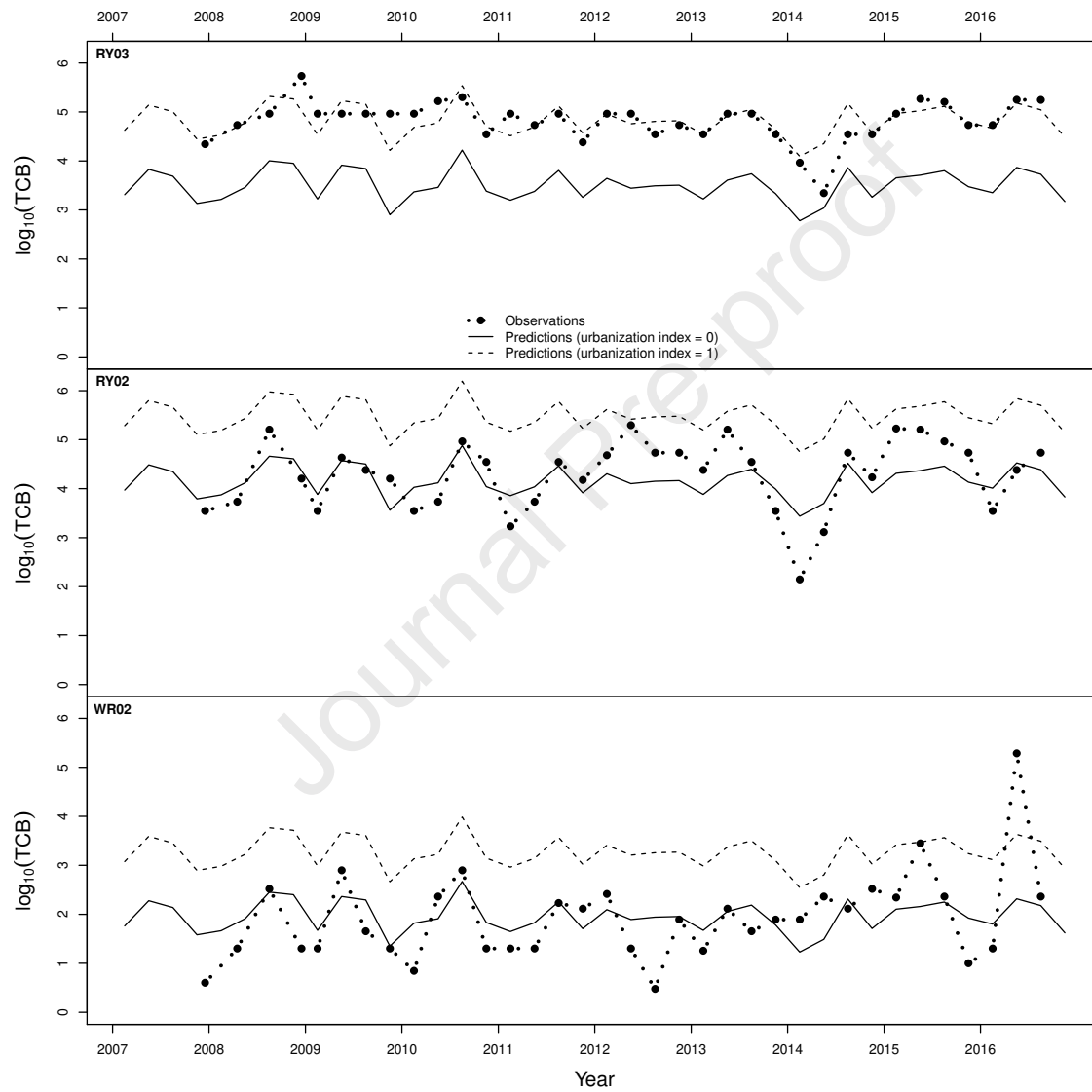


Figure 7: Predicted values of TCB (in MPN/100 mL) for three stations.

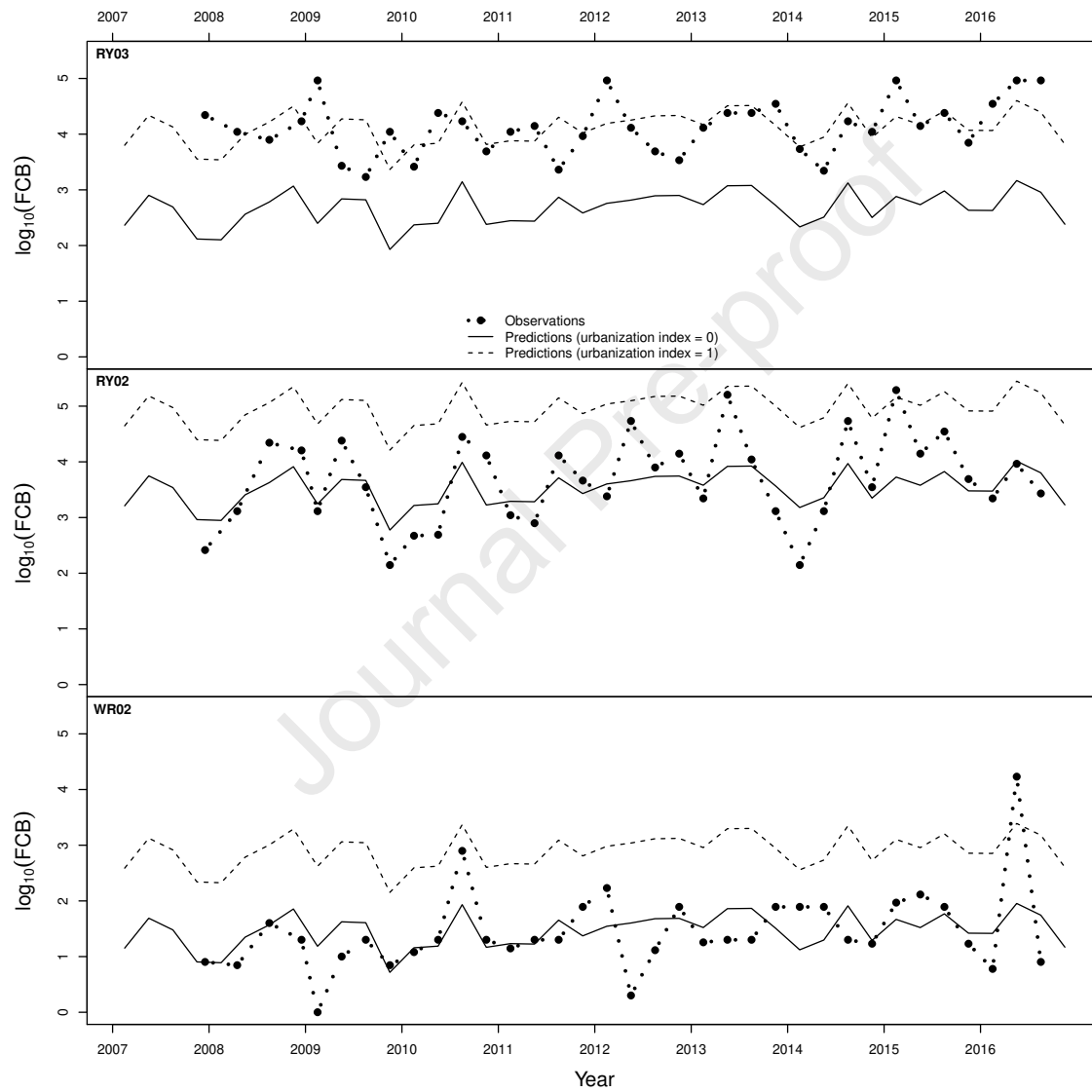
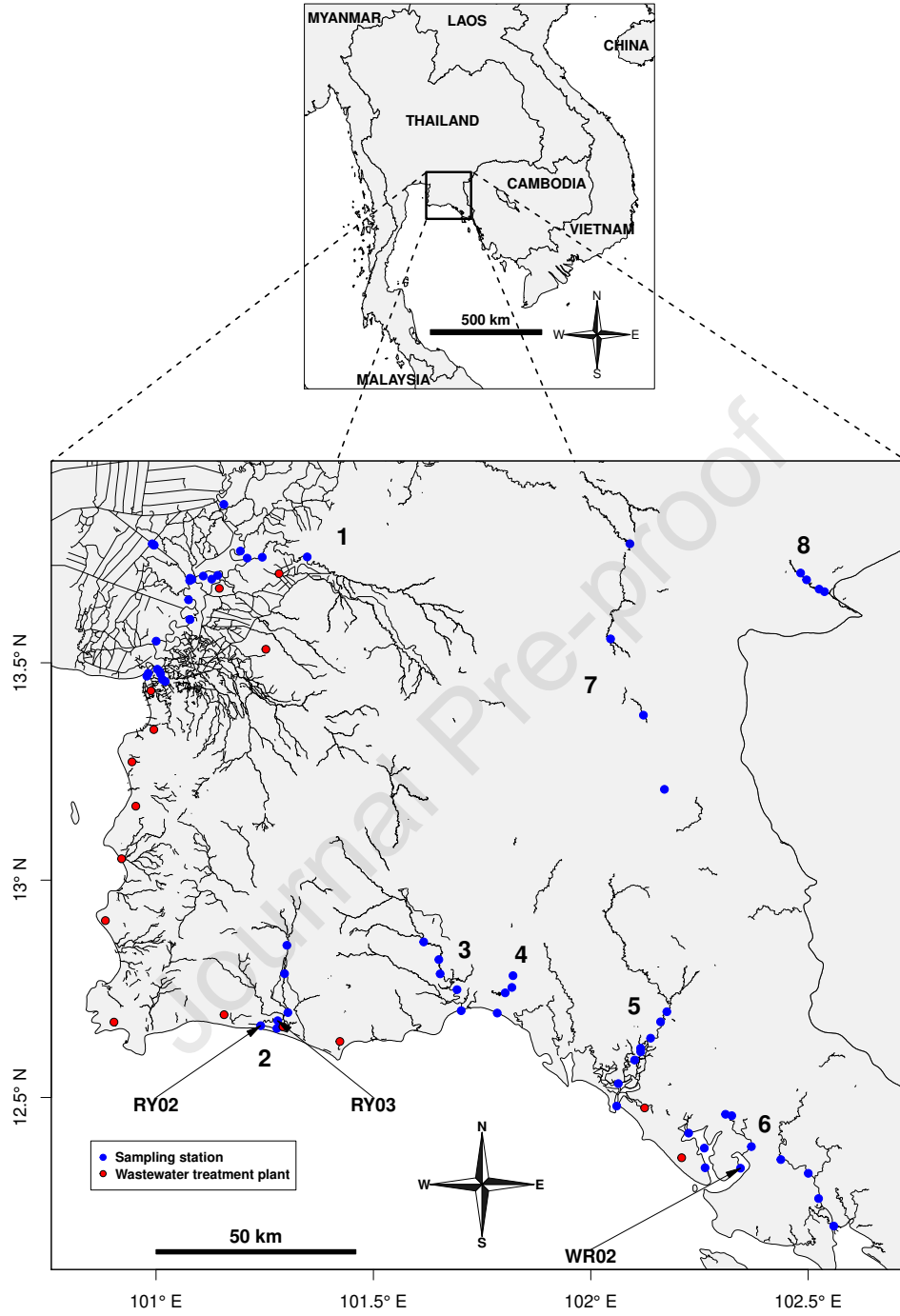
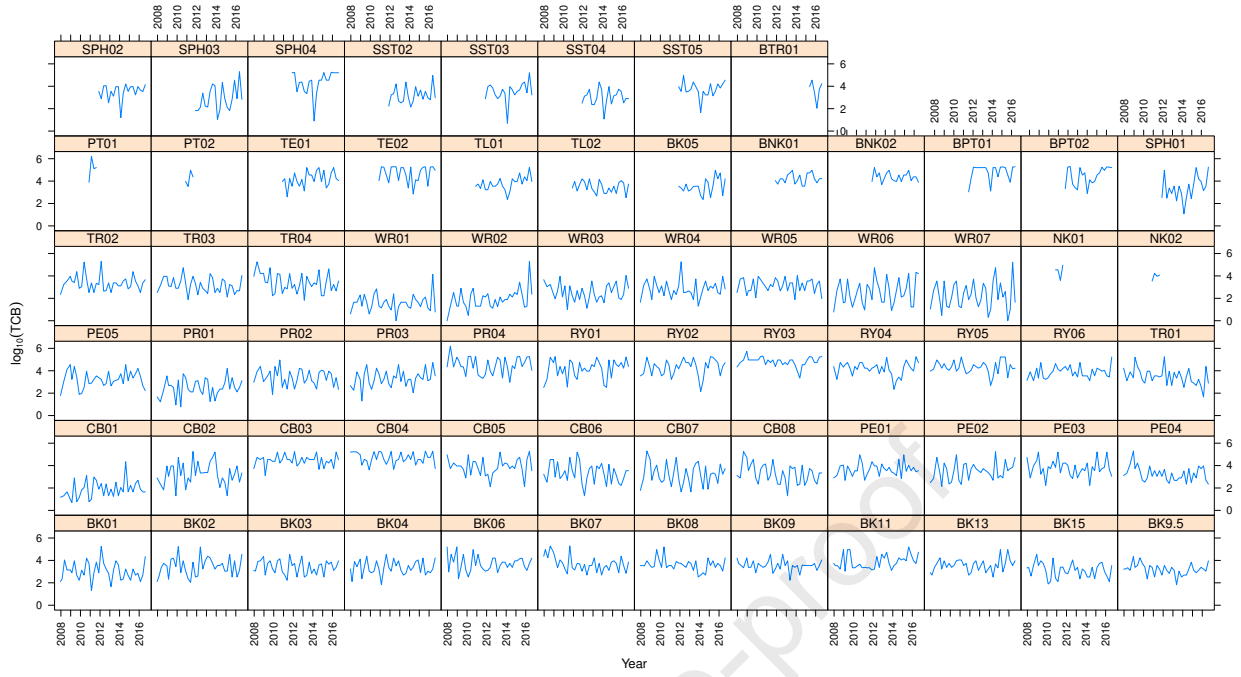
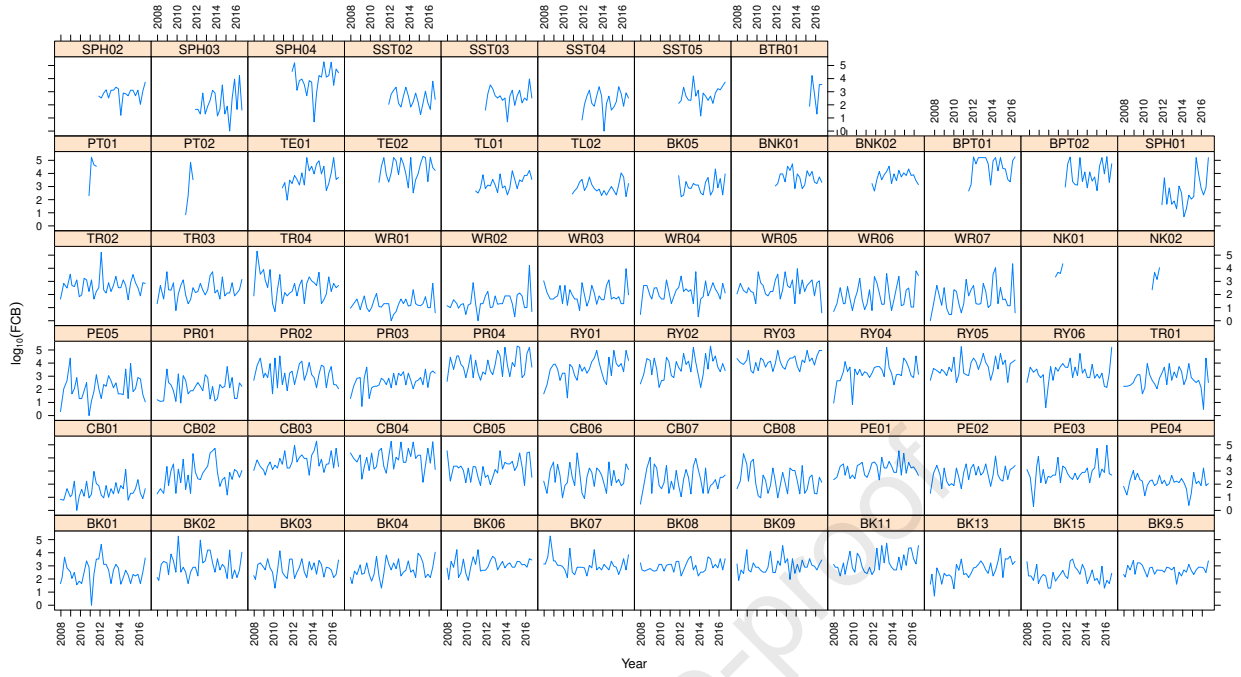


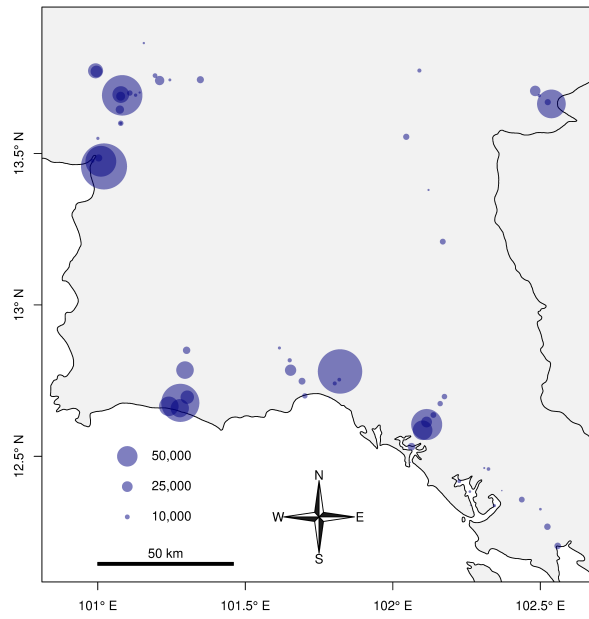
Figure 8: Predicted values of FCB (in MPN/100 mL) for three stations.





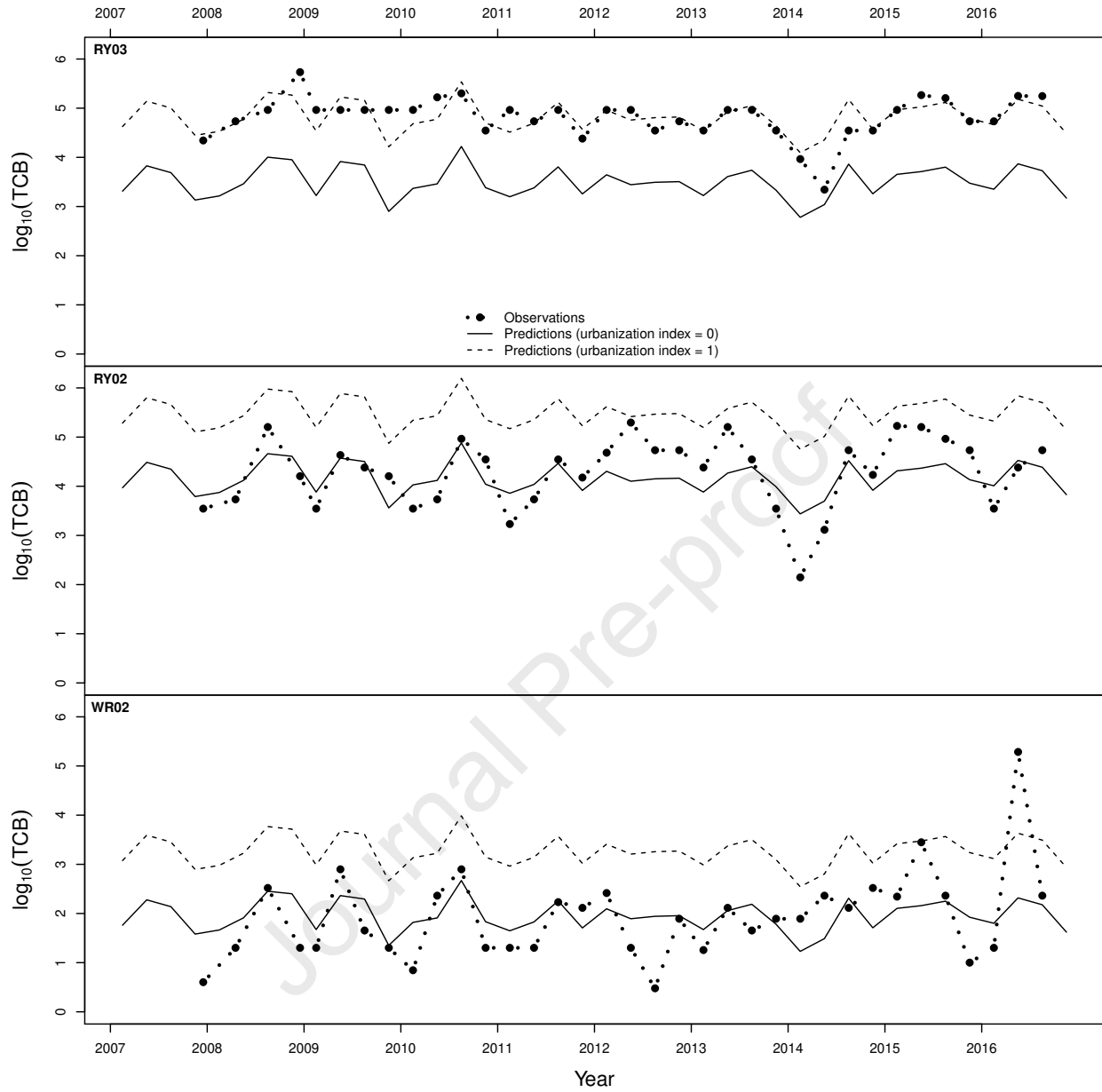


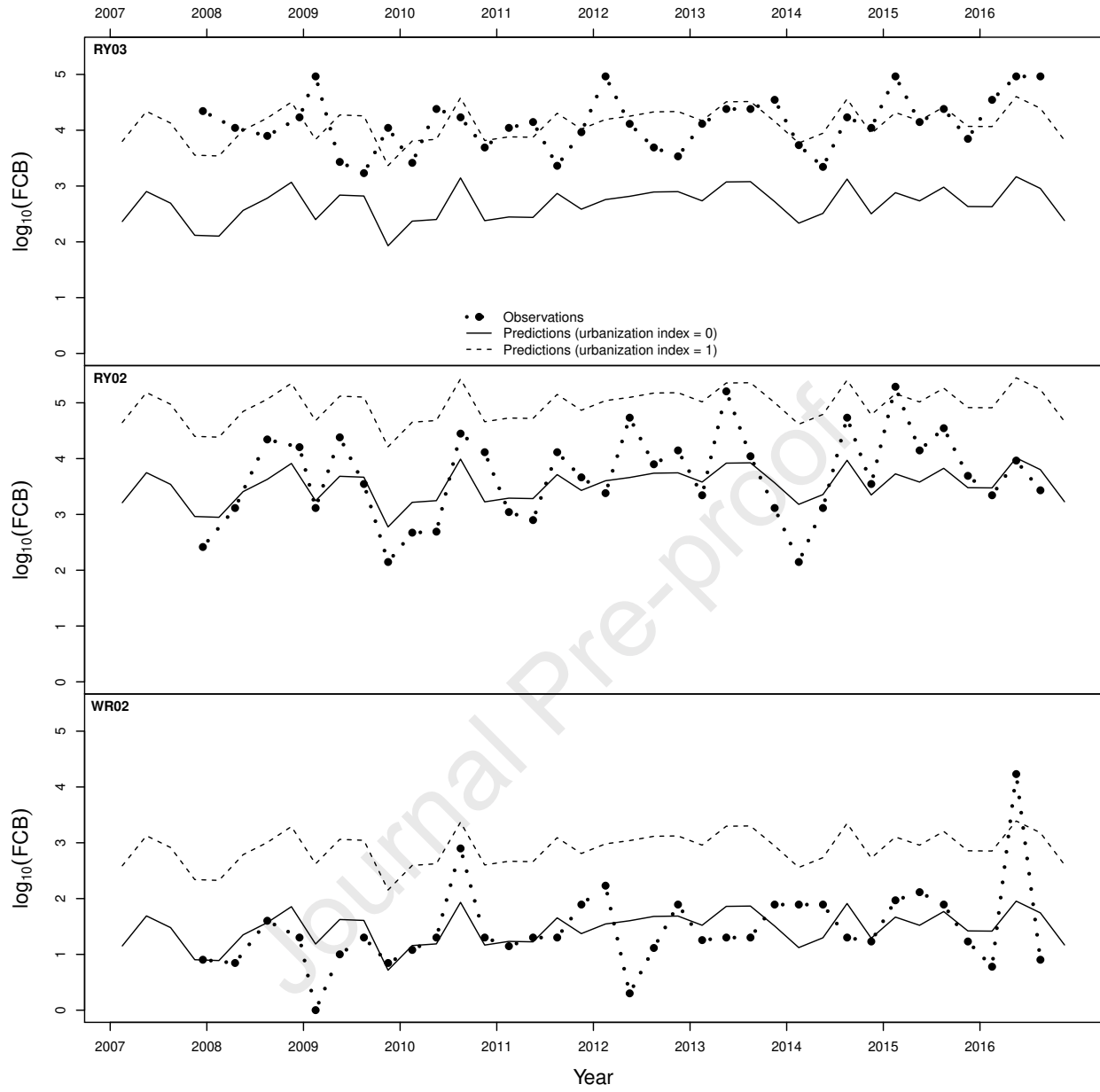
Total coliform bacteria (TCB)



Fecal coliform bacteria (FCB)







A predictive model of bacterial concentrations in rivers in response to urbanization was built using data from 68 stations over 10 years.

Bacterial concentrations varied considerably through time, seasons, and among stations. Linear models with fixed and random effects explained up to 66% of the variance in bacterial concentrations.

Urbanization is predicted to multiply bacterial concentrations by 20.

Journal Pre-proof

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Journal Pre-proof

Cladogram

