



วิทยานิพนธ์

การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของ
พื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

IDENTIFICATION OF METHANOTROPHS IN LANDFILL
COVER SOIL EFFECTING METHANE OXIDATION

นางสาวพิชญา สัมเกลี้ยง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

Identification of Methanotrophs in Landfill Cover Soil Effecting Methane Oxidation

นามผู้วิจัย นางสาวพิชญา สัมเกลี้ยง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิไล เจียมไชยศรี, D.Tech.Sc.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ชาติ เจียมไชยศรี, D.Eng.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(อาจารย์มงคล ดำรงค์ศรี, Dr.Eng.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
ที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

Identification of Methanotrophs in Landfill Cover Soil Effecting Methane Oxidation

โดย

นางสาวพิชญา สัมเกลี้ยง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)
พ.ศ. 2550

พิชญา สัมเกลี้ยง 2550: การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่
ฝังกลบมูลฝอยที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
(วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม) สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิไล เจียมไชยศรี, D.Tech.Sc. 117 หน้า

เชื้อเมทาโนโทรฟเป็นแบคทีเรียชนิดแอโรบที่พบได้ในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่
ฝังกลบมูลฝอย โดยเมทาโนโทรฟสามารถใช้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งส่งผลให้การปลดปล่อย
มีเทนจากพื้นที่ดังกล่าวที่ปล่อยสู่บรรยากาศของโลกอันเป็นสาเหตุสำคัญของปรากฏการณ์โลก
ร้อนลดลงดังนั้นในการศึกษานี้จึงศึกษาดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยชุมชน อ.ลาด
หลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ที่ความลึกต่างๆ เพื่อวัดอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันรวมทั้งจำนวนและ
ชนิดของเชื้อเมทาโนโทรฟในดินดังกล่าวที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายมีเทนโดยวิธีโมสทรอบเอ
เบิลนัมเบอร์ (วิธีเอ็มพีเอ็น) และฟลูออเรสเซนส์อินซิติวไฮบริไดเซชัน (วิธีฟิช)

ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันของพื้นที่ดังกล่าวมีค่าค่อนข้างต่ำ (0.35-0.61
ไมโครโมลต่อกรัมดินต่อวัน) เนื่องจากดินในพื้นที่มีความเป็นกรดสูง และทำให้พบเชื้อเมทาโน
โทรฟชนิดที่ 2 ซึ่งมีบทบาทในการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกรดมากกว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิด
ที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญในทุกความลึกของดิน ตรวจพบเมทาโนโทรฟชนิดเดบโตในสภาวะกรดได้ดี
คือ *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* ปริมาณสูงที่ความลึก 31-60 ซม.
นอกจากนี้พบว่าการตรวจนับจำนวนเมทาโนโทรฟในตัวอย่างดินกรดด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นมีค่าต่ำกว่า
การตรวจวัดนับด้วยวิธีฟิช เนื่องจากความไม่เหมาะสมความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดย
วิธีเอ็มพีเอ็นแบบปกติ นอกจากนี้ยังพบ *Nitrosomonas spp.* และ *Nitrobacter spp.* ซึ่งชี้บ่งแหล่ง
ไนเตรทสำหรับการเจริญของเมทาโนโทรฟในหน้าดินหลุมฝังกลบมูลฝอย

Pitchaya Somkhang 2007: Identification of Methanotrophs in Landfill Cover Soil
Effecting Methane Oxidation. Master of Engineering (Environmental Engineering),
Major Field: Environmental Engineering, Department of Environmental Engineering.
Thesis Advisor: Assistant Professor Wilai Chiemchaisri, D.Tech.Sc. 117 pages.

Methanotrophs are aerobic bacteria commonly found in landfill final cover soils. They can assimilate methane, a greenhouse gas, as a carbon source consequently in reduction of methane emission from landfills. In this study, we have aims to investigate methane oxidation rates at various depths of the Ladlumkaew landfill cover soil at Prathumthani province. Besides, methanotrophic types and populations in soil samples were identified and enumerated by the fluorescent in situ hybridization techniques (FISH) and the most probable number (MPN) method, respectively.

The results showed that methane oxidation rates of the cover soils were low (0.35-0.61 $\mu\text{mol/g soil.day}$) especially in the extreme acid soils (0-30 cm). In addition, methanotrophs Type II was found in more numbers than methanotrophs Type I significantly at all soil depths, which corresponding to the soil methane oxidation rates (MOR). Moreover, high numbers of the acidophilic methanotrophs, *Methylocella palustris* and *Methylocapsa aciphila*, were found particularly at the soil depths of 31-60 cm. However, it was found that methanotrophic population enumerated by the MPN method was significantly lower than that by FISH technique especially in the extreme acidic soil samples. This was because the inappropriate pH of cultural media that employed in the conventional MPN method might be an important factor. Besides, moderate numbers of nitrifying bacteria i.e. *Nitrosomonas spp.* and *Nitrobacter spp.* were found in all soil depths indicating available nitrate for the growth of methanotrophs in the landfill cover soil.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไล เจียมไชยศรี ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้ความช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยและให้คำปรึกษาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ชาติ เจียมไชยศรี กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ กรรมการที่ปรึกษาวิชารองและอาจารย์ อติชัย พรพรหมินทร์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณองค์กร Swedish International Development Cooperation Agency (SIDA) ที่อนุเคราะห์ทุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อมทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในส่วนของอุปกรณ์ในการทดลองและให้คำแนะนำเกี่ยวกับรายละเอียดในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือชั้นสูงต่างๆ ขอขอบคุณคุณภูเบศร์ ศรีสุนทรศิริ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ยังมีได้กล่าวถึงสำหรับการให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ

คุณความดีและประโยชน์ทั้งหลายของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อเสวก คุณแม่ดารณี สัมเกลี้ยง อันเป็นที่รักและรวมถึงน้องชายและญาติพี่น้องซึ่งอยู่เบื้องหลังในความสำเร็จครั้งนี้เสมอมา

พิชญา สัมเกลี้ยง

มกราคม 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์ และอักษรย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตการศึกษา	3
การตรวจเอกสาร	4
การย่อยสลายมูลฝอยทางชีวภาพในหลุมฝังกลบมูลฝอย	4
องค์ประกอบและอัตราการเกิดก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอย	9
อิทธิพลของก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอยต่อภูมิอากาศของโลก	11
ชั้นวัสดุกลบทับ	12
การเกิดมีเทนออกซิเดชันในหลุมฝังกลบมูลฝอย	14
แบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟ	23
ฟลูออเรสเซนส์อินซิติวไฮบริไดเซชัน	33
ข้อมูลทั่วไปของพื้นที่ที่ทำการศึกษา	37
อุปกรณ์และวิธีการ	40
อุปกรณ์	40
วิธีการ	42
ผลการทดลองและวิจารณ์	47
ลักษณะทางกายภาพและเคมีที่สำคัญของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย	
ต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟ	47
การศึกษาความสามารถในการเกิดมีเทนออกซิเดชัน	53
การตรวจหาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีเอ็มพีเอ็น	57
การตรวจหาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียและไนโตรไฟอิงแบคทีเรียด้วยวิธี	
ฟลูออเรสเซนส์อินซิติวไฮบริไดเซชัน	60

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
สรุปและข้อเสนอแนะ	68
สรุป	68
ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายมูลฝอยแบบไม่ใช้ออกซิเจน	8
2	องค์ประกอบทั่วไปของก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอย	9
3	ชนิดของสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่พบในก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยตามโครงสร้างทางเคมี	10
4	แหล่งกำเนิดก๊าซมีเทน	13
5	ผลของแอมโมเนียและไนเตรทอินทรีย์ต่ออัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน	22
6	เปรียบเทียบลักษณะการจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1, 2 และ X	26
7	โพรป (16s rRNA และ 5s rRNA) ที่ใช้ในการจำแนกเมทิลโอโทรฟและเมทาโนโทรฟแบคทีเรียสกุลต่างๆ	29
8	แบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟที่พบในหน้าดินกลบทับของหลุมฝังกลบมูลฝอยรัสเซีย	32
9	ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟที่ตรวจพบในพื้นที่ที่มีความเป็นกรดโดยวิธีพีช	33
10	โพรปที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีการฟลูออเรสเซนส์อินซิติวไฮบริไดเซชัน	36
11	องค์ประกอบของมูลฝอยในเขตเทศบาลเมืองปทุมธานี	38
12	รายละเอียดพารามิเตอร์และวิธีการในการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน	43
13	องค์ประกอบของก๊าซที่ตรวจพบบริเวณที่ระบายก๊าซภายในหลุมฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี	50
14	อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในช่วงเวลาต่างๆ	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝั่งกลบ มูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึกต่างๆ	87
ข2 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝั่งกลบ มูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร	88
ข3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝั่งกลบ มูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 16-30 เซนติเมตร	89
ข4 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝั่งกลบ มูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 31-45 เซนติเมตร	90
ข5 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝั่งกลบ มูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 46-60 เซนติเมตร	91
ข6 ค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์ก๊าซมีเทนที่ระดับความลึกต่างๆ	93
ค1 ปริมาณขอชดเชยที่ให้ผลบวกในการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟ ด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นที่ระดับความลึกต่างๆ	110

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจนใน หลุมฝังกลบมูลฝอย	7
2	วิธีการในการเกิดมีเทนออกซิเดชันและการดูดซึมฟอสฟอรัสของ เชื้อเมทาโนโทรฟ	25
3	Phylogenetic Tree ของเชื้อเมทิลโดโทรฟ เมทาโนโทรฟและแบคทีเรีย ชนิดอื่นที่จำแนกตามกลุ่มของ Proteobacteria (อาศัย 16s rRNA และ 5s rRNA ในการจำแนก)	28
4	Phylogenetic Tree ของแบคทีเรียตระกูล Methylococcaceae และแบคทีเรีย อื่นๆใน γ Proteobacteria	30
5	Phylogenetic Tree ของเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ใน α Proteobacteria	31
6	เทคนิคการทำฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน	35
7	ลักษณะของชุดดินรังสิตที่ใช้ในการกลบทับพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย ที่ทำการศึกษา	39
8	ตำแหน่งดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยและปากท่อระบายน้ำ ที่ทำการศึกษา	41
9	ความเป็นกรดค่า ความชื้นและอุณหภูมิของดินกลบทับชั้นสุดท้าย พื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆ	48
10	ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์และไนเตรทไนโตรเจนของดินกลบทับชั้น สุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆ	49
11	ปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจน สารอินทรีย์คาร์บอนและฟอสเฟตของ ดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆ	52
12	อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันและปริมาณเอ็กซ์ตราเซลล์ูลาโพลีแซคคาไรด์ ของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆ	53
13	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้าย พื้นที่ฝังกลบมูลฝอยกับความเป็นกรดค่าของดิน	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยและปริมาณมีเทนที่ท่อระบายก๊าซ ณ จุดเก็บต่างๆ	57
15	ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆที่ศึกษาด้วยวิธีเอ็มพีเอ็น	58
16	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยโดยวิธีเอ็มพีเอ็นกับอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ดังกล่าว	60
17	ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดต่างๆที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาในระดับความลึกต่างๆ	62
18	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด Methanotroph type I, Methanotroph type II, <i>Nitrosomonas spp.</i> , <i>Nitrobacter spp.</i> ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาที่ความลึกต่างๆ	63
19	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 และ 2 ในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยกับความเป็นกรดด่างของดิน	64
20	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นและพีช	65
21	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาโดยวิธีพีชกับอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ดังกล่าว	65
22	สัดส่วนของ <i>Nitrosomonas spp.</i> , <i>Nitrobacter spp.</i> , Methanotroph type I, Methanotroph type II เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาที่ความลึกต่างๆ	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก1	แผนที่พื้นที่ฝั่งกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี 83
ก2	พื้นที่ฝั่งกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ที่ทำการศึกษาดินกลบ ทับชั้นสุดท้ายในการวิจัยครั้งนี้ 84
ก3	จุดที่ทำการศึกษาดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝั่งกลบมูลฝอย 84
ก4	ขวดซีรัมขนาด 20 และ 118 มิลลิลิตร ที่ใช้ในการทดลอง 85
ก5	สไลด์หลุมชนิด 14 หลุมที่ใช้ในการทดลอง 85
ข1	ขวดซีรัมที่ทำการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน 92
ข2	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 0-15 ซม. 96
ข3	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 16-30 ซม. 96
ข4	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 31-45 ซม. 97
ข5	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 46-60 ซม. 97
ข6	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 0-15 ซม. 98
ข7	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 16-30 ซม. 98
ข8	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 31-45 ซม. 99
ข9	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 46-60 ซม. 99
ข10	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 0-15 ซม. 100
ข11	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 16-30 ซม. 100
ข12	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 31-45 ซม. 101
ข13	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 46-60 ซม. 101
ข14	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 0-15 ซม. 102
ข15	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 16-30 ซม. 102
ข16	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 31-45 ซม. 103
ข17	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 46-60 ซม. 103
ข18	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 0-15 ซม. 104
ข19	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 16-30 ซม. 104
ข20	ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 31-45 ซม. 105

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข21 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 46-60 ซม.	105
ค1 การศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีเอ็มพีเอ็น ในระบบ 3 ขวด	109
ค2 เปรียบเทียบลักษณะของผลการศึกษาด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นที่ระดับความเข้มข้น เดียวกันในวันที่ 1 และ 45	109
ง1 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบในดินกลบทับ ชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมด้วย DAPI)	114
ง2 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ที่ตรวจพบใน ดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมด้วย MY84 + MY705)	114
ง3 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ที่ตรวจพบใน ดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมด้วย MQ450)	115
ง4 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อ <i>Methylocapsa acidiphila</i> ที่ตรวจพบใน ดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมด้วย Mcaps-1032)	115
ง5 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อ <i>Methylocella palustris</i> ที่ตรวจพบใน ดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมด้วย Mcells-1026)	116
ง6 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อ <i>Nitrosomonas spp.</i> ที่ตรวจพบใน ดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมด้วย NSM156)	116
ง7 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อ <i>Nitrobacter spp.</i> ที่ตรวจพบใน ดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมด้วย NIT3)	117

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

μg	=	Microgram
μl	=	Microlitre
μMol	=	Micromole
cm.	=	Centrimetre
g	=	Grams
K	=	Kalvin
ml	=	millilitre
EPS	=	Extracellular Polysaccharides
FISH	=	Fluorescent In Situ Hybridization
MOR	=	Methane Oxidation Rate
MPN	=	Most Probable Numbers
NMS	=	Nitrate Mineral Salt
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
NH ₃ -N	=	แอมโมเนียมไนโตรเจน
NO ₂ -N	=	ไนไตรต์ไนโตรเจน
NO ₃ -N	=	ไนเตรทไนโตรเจน
TP	=	ฟอสฟอรัสทั้งหมด
Org-N	=	อินทรีย์ไนโตรเจน
TN	=	ไนโตรเจนทั้งหมด
TOC	=	อินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด
TP	=	ฟอสฟอรัสทั้งหมด
°ซ	=	องศาเซลเซียส
ซม.	=	เซนติเมตร

การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

Identification of Methanotrophs in Landfill Cover Soil Effecting Methane Oxidation

คำนำ

ในปัจจุบันปริมาณของขยะมูลฝอยเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากตามอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรจึงส่งผลให้มีการจัดการมูลฝอยมากขึ้น วิธีการฝังกลบมูลฝอยจัดเป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการจัดการมูลฝอยแต่ผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการฝังกลบมูลฝอย คือ การแพร่ระบาดของก๊าซเรือนกระจกสู่บรรยากาศซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของสภาวะโลกร้อนขึ้น โดยองค์ประกอบหลักของก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอย คือ ก๊าซมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งก๊าซมีเทนจะดูดซับความร้อนในชั้นบรรยากาศมากกว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 21 เท่า ดังนั้นการลดปริมาณการแพร่ระบาดของก๊าซมีเทนจากหลุมฝังกลบมูลฝอยจึงเป็นประเด็นที่ได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น

โดยวิธีการหนึ่งในการลดการแพร่ระบาดของก๊าซมีเทนจากหลุมฝังกลบมูลฝอยที่มีความเป็นไปได้ คือ การใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Methane Oxidation) โดยเมทาโนโทรฟแบคทีเรีย (Methanotroph Bacteria) ที่เจริญขึ้นเองตามธรรมชาติและสามารถใช้ก๊าซมีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานแล้วได้ผลิตภัณฑ์ คือ เซลล์ใหม่และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเกิดได้ดีบริเวณหน้าดินกลบทับชั้นสุดท้ายเนื่องจากอากาศสามารถแพร่ผ่านลงไปดินได้

สำหรับเมทาโนโทรฟแบคทีเรียนั้นสามารถจำแนกออกเป็น 2 ตระกูลด้วยกัน คือ *Methylococcaceae* (Type I) และ *Methylocystaceae* (Type II) โดยตระกูล *Methylococcaceae* (Type I) นั้นประกอบไปด้วยสกุล (genus) *Methylobacter* spp., *Methylomonas* spp., *Methylophaga* spp. และ *Methylococcus* spp. สำหรับตระกูล *Methylocystaceae* (Type II) ประกอบไปด้วยสกุล (genus) *Methylosinus* spp., *Methylocystis* spp., *Methylocella* spp. และ *Methylocapsa* spp.

ในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อเมทาโนโทรฟก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาในรูปแบบต่างๆ ซึ่งมีการนับจำนวนด้วยวิธีการ โมสพروبเอเบิลนัมเบอร์หรือเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number, MPN) เป็นวิธีการในการศึกษาปริมาณเชื้อภายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนโทรฟ (Nitrate Mineral Salt Medium, NMS Medium) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคใหม่ คือ ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันหรือฟิช (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาทั้งปริมาณและชนิดโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญและจำเพาะในเซลล์ที่ทำการศึกษาดังนั้นปริมาณเชื้อที่พบด้วยวิธีการดังกล่าวจึงสามารถนำมาหาความสัมพันธ์โดยตรงกับกิจกรรมของเชื้อเมทาโนโทรฟโดยเฉพาะการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่ช่วยลดปริมาณก๊าซมีเทนที่จะปล่อยสู่บรรยากาศของโลกอันเป็นสาเหตุสำคัญของภาวะโลกร้อนต่อไป

ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้จึงเป็นการศึกษาเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1, 2 เชื้อเมทาโนโทรฟสายพันธุ์ *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* ในเชิงปริมาณในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ที่มีอายุการใช้งานประมาณ 8 ปีที่ระดับความลึกต่างๆ โดยอาศัยวิธีการเอ็มพีเอ็นและฟิชในการตรวจวัดเพื่อจำแนกประเภทของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนโทรฟที่มีบทบาทในการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ที่ทำการศึกษานอกจากนี้ยังทำการศึกษาเชื้อ *Nitrosomonas spp.* และ *Nitrobacter spp.* ในเชิงปริมาณเพื่อตรวจสอบบทบาทของเชื่อดังกล่าวต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. จำแนกชนิดและนับจำนวนเชื้อเมทาโนโทรฟที่มีบทบาทต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
2. ศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีลักษณะเป็นดินเหนียว

ขอบเขตการศึกษา

- 1) ตัวอย่างดินจากดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีอายุการใช้งานประมาณ 8 ปี
- 2) การศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพและทางเคมีในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ที่ทำการศึกษาประกอบด้วยอุณหภูมิ, ความชื้น, ความเป็นกรดด่าง, ประเภทของดิน, แอมโมเนีย ไนโตรเจน, อินทรีย์ไนโตรเจน, ไนไตรต์ไนโตรเจน, ไนเตรทไนโตรเจน, ไนโตรเจนทั้งหมด, ฟอสเฟต, ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมดและปริมาณเอ็กซ์ตราเซลล์ลูลาโพลีแซคคาไรด์ (Extracellular Polysaccharides, EPS)
- 3) การศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันโดยอาศัยความชื้นเริ่มต้นของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาและปริมาณก๊าซมีเทนเริ่มต้นร้อยละ 10 ของปริมาตรขวดที่ใช้ในการทดลอง
- 4) การตรวจหาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็น
- 5) การตรวจหาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดที่ 1 ชนิดที่ 2 และแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิงด้วยวิธีการพีช

การตรวจเอกสาร

1. การย่อยสลายมูลฝอยทางชีวภาพในหลุมฝังกลบมูลฝอย

การย่อยสลาย (Decomposition Processes) ของมูลฝอยมี 3 กระบวนการ ได้แก่ การสลายตัวทางชีววิทยา การสลายตัวทางเคมีและการสลายตัวทางฟิสิกส์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 การสลายตัวทางชีววิทยา (Biological Decomposition) ได้แก่ การเปลี่ยนธาตุคาร์บอนในสารอินทรีย์โดยกระบวนการทางชีววิทยาของจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปของก๊าซ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และก๊าซมีเทน (CH₄) เป็นต้น การสลายตัวนี้นับว่ามีความสำคัญมากที่สุดเพราะมูลฝอยมีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ กระบวนการย่อยสลายทางชีววิทยาสามารถแบ่งได้ 2 ขั้นตอนดังนี้

1.1.1 การย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic Decomposition) กระบวนการย่อยสลายจะเริ่มเมื่อมีการทิ้งมูลฝอยสู่หลุมฝังกลบ โดยในช่วงแรกมูลฝอยที่ทับถมกันยังมีก๊าซออกซิเจนที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์และให้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) น้ำ สารอินทรีย์ที่ย่อยสลายไม่สมบูรณ์และความร้อน โดยปกติการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนจะเกิดได้รวดเร็วกว่าแบบไม่ใช้ออกซิเจน นอกจากนี้พบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สำคัญของกระบวนการมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 90 ของปริมาณก๊าซทั้งหมดและจากคุณสมบัติที่ละลายน้ำค่อนข้างดีดังนั้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) บางส่วนจึงละลายลงสู่น้ำ ผลจากการละลายน้ำนี้ส่งผลให้น้ำชะมูลฝอยมีฤทธิ์ค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อย สำหรับปริมาณของก๊าซออกซิเจนลดลงในขณะที่ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) สูงขึ้น ส่วนก๊าซไนโตรเจน (N₂) นั้นในทางทฤษฎีจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Tchobanoglous *et al.*, 1993)

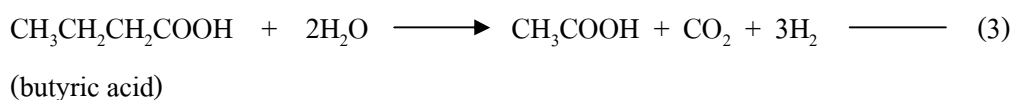
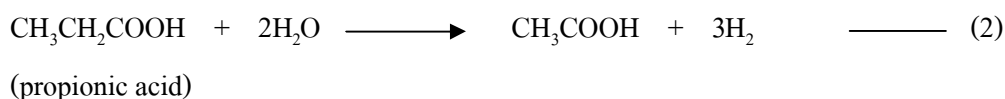
1.1.2 การย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic Decomposition) กระบวนการย่อยสลายจะให้ผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย (Final product) ดังสมการที่ 1



ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในส่วนที่เป็นก๊าซจะส่งกลิ่นเหม็นฟุ้งกระจาย กระบวนการนี้เกิดได้ช้ากว่าแบบใช้อากาศประมาณ 2 - 6 เดือน หรือ 1 ปี โดยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1) **ปฏิกิริยาการแตกสลายสารโมเลกุล (Hydrolysis)** เป็นกระบวนการแตกสลายสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนที่อาจอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เช่น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบหลักของเซลลูโลสและส่วนประกอบต่างๆของเนื้อเยื่อพืช เช่น เซลลูโลสและลิกนิน ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนแรกของกระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนเพื่อเปลี่ยนขนาดและรูปร่างโมเลกุลของสารให้เล็กลงทำให้แบคทีเรียสามารถนำสารอาหารผ่านผนังเซลล์เพื่อให้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้ โดยแบคทีเรียจะขับเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ทำให้สารโมเลกุลขนาดใหญ่เหล่านี้แตกตัวเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก เอนไซม์ที่ขับออกมา ได้แก่ cellulose, lipolytic และ proteolytic

2) **กระบวนการเกิดกรด (Acidogenesis)** สารอินทรีย์ที่มีขนาดเล็กที่ได้จากปฏิกิริยา Hydrolysis จะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่สร้างกรด (Acid forming bacteria) อาจเป็นพวก Facultative การย่อยสลายในขั้นตอนนี้พบว่าการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ออกมาอย่างรวดเร็วพร้อมกับกรดอินทรีย์และพลังงานความร้อนเล็กน้อย นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจะรวมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) มีผลทำให้เกิดสภาพความเป็นกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นกรดอะซิติก (acetic acid) , กรดโพรไพโอนิก (propionic acid) , กรดแลคติก (lactic acid) และกรดบิวไทริก (butyric acid) จากนั้นแบคทีเรียจำพวกอะซิโตจีนิก (acetogenic bacteria) จะทำหน้าที่เปลี่ยนกรดบิวไทริก (butyric acid) และกรดโพรไพโอนิก (propionic acid) เป็นกรดอะซิติก (acetic acid) ดังสมการ



3) กระบวนการเกิดก๊าซมีเทน (Methanogenesis) กระบวนการย่อยสลายเริ่มเมื่อออกซิเจนถูกใช้ไปหมดแล้วพร้อมกับสภาวะ reducing ซึ่งอำนวยความสะดวกการเจริญของแบคทีเรียชนิดที่สร้างก๊าซมีเทน (Methane former) และเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ช้า สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) น้ำและก๊าซมีเทน (CH₄) และพลังงานความร้อน การย่อยสลายกรดอินทรีย์ที่มีผลทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำชะมูลฝอยลดลงและการลดลงของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของน้ำชะมูลฝอยมีค่าสูงขึ้นแสดงดังสมการ

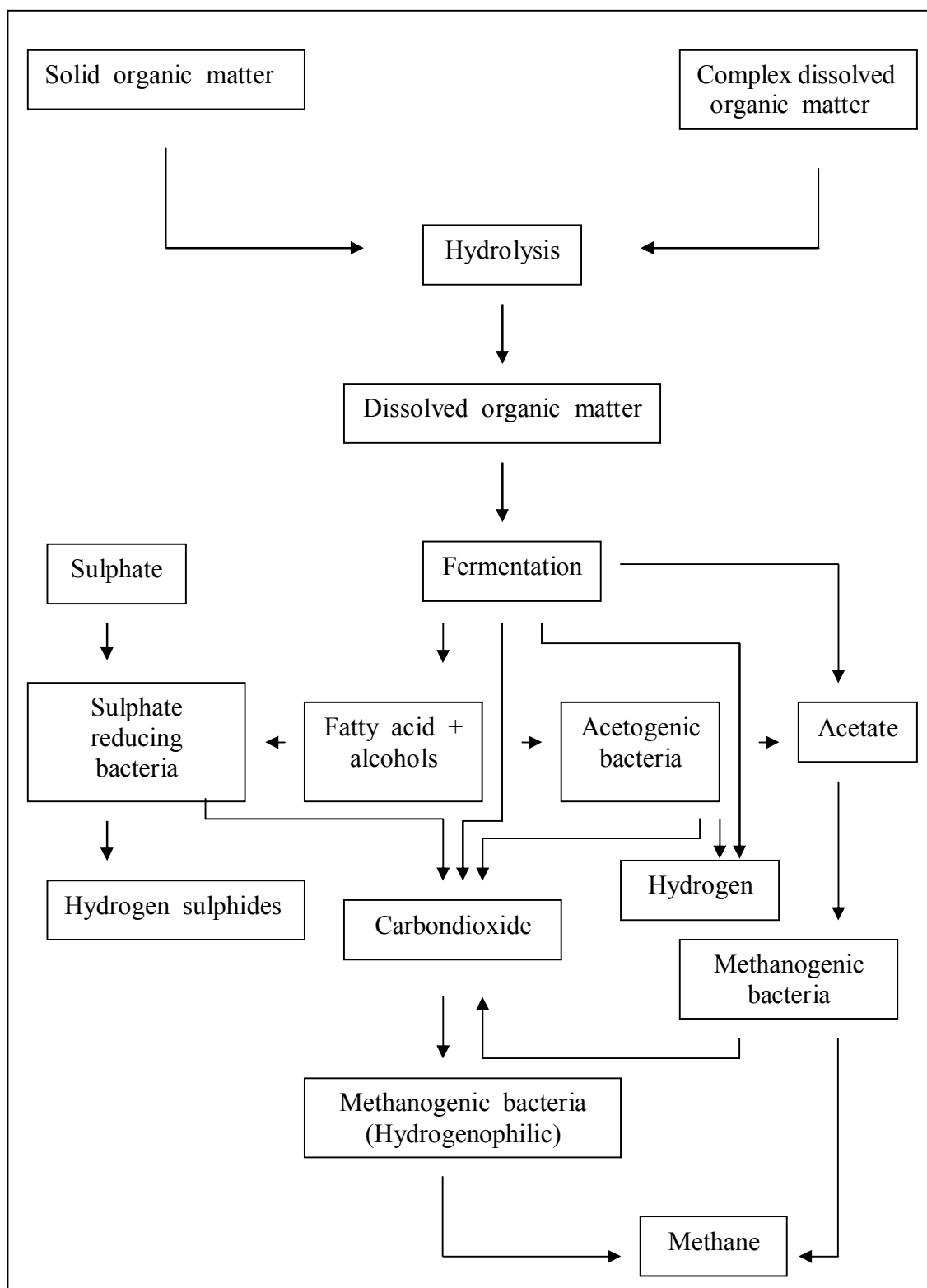


โดยได้แสดงภาพกระบวนการในการย่อยสลายมูลฝอยในกระบวนการต่างๆดังแสดงในภาพที่ 1

1.2 การสลายตัวทางเคมี (Chemical Decomposition) ได้แก่ ปฏิกริยาของไฮโดรไลซิส การดูดซึม การดูดซับหรือปฏิกริยาการแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) ผลที่เกิดขึ้นจะทำให้น้ำชะมูลฝอยมีปริมาณสารอนินทรีย์ เช่น ไฮดรอกไซด์ คาร์บอเนตหรือโลหะต่างๆ (Tchobanoglous *et al.*, 1993)

1.3 การสลายตัวทางกายภาพ (Physical Decomposition) ได้แก่ การที่สารต่างๆที่เกิดจากปฏิกริยาทางชีววิทยาและกายภาพถูกเคลื่อนย้ายผ่านหรือออกจากหลุมฝังกลบมูลฝอยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีน้ำไหลผ่านในอัตราที่สูง (Tchobanoglous *et al.*, 1993)

ปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายมูลฝอยแบบไม่ใช้ออกซิเจนโดยจุลินทรีย์แสดงดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจนในหลุมฝังกลบมูลฝอย
ที่มา : Christensen *et al.* (1996)

ตารางที่ 1 ปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายมูลฝอยแบบไม่ใช้ออกซิเจน

สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์
Hydrolysis	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O$	$\longrightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$
$C_6H_{12}O_6$	$\longrightarrow CH_3C_2H_2COOH + 2H_2 + 2CO_2$
$C_6H_{12}O_6$	$\longrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$
Acidogenesis	
$CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	$\longrightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$
$CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	$\longrightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$
$CH_3CH_2OH + H_2O$	$\longrightarrow CH_3COOH + 2H_2$
$C_6H_5COOH + 6H_2O$	$\longrightarrow 3CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$
Methanogenesis	
$4H_2 + CO_2$	$\longrightarrow CH_4 + 2H_2O$
CH_3COOH	$\longrightarrow CH_4 + CO_2$
$HCOOH + 3H_2$	$\longrightarrow CH_4 + 2H_2O$
$CH_3OH + 3H_2$	$\longrightarrow CH_4 + CO_2$
Sulphate Reducing Process	
$4H_2 + SO_4^{2-} + H^+$	$\longrightarrow HS^- + 2H_2O$
$CH_3COOH + SO_4^{2-}$	$\longrightarrow CO_2 + HS^- + HCO_3^- + H_2O$
$2CH_3C_2H_2COOH + SO_4^{2-} + H^+$	$\longrightarrow 4CH_3COOH + HS^-$

ที่มา : Christensen *et al.* (1996)

2. องค์ประกอบและอัตราการเกิดก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอย

2.1 องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอย

ก๊าซที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายในหลุมฝังกลบมูลฝอย เรียกว่า ก๊าซชีวภาพ (biogas) ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นก๊าซมีเทน (CH_4) ประมาณร้อยละ 45 – 60 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ประมาณร้อยละ 40 – 50 และก๊าซอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทั่วไปของก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอย

องค์ประกอบ	ร้อยละโดยปริมาตร
มีเทน	45 - 60
คาร์บอนไดออกไซด์	40 - 50
ไนโตรเจน	2 - 5
ออกซิเจน	0.1 - 1
ไฮโดรเจนซัลไฟด์	0 - 1
แอมโมเนีย	0 - 0.2
ไฮโดรเจน	0 - 0.2
คาร์บอนมอนอกไซด์	0 - 0.2
ก๊าซอื่นๆ	0.01 - 0.6

ที่มา : Tchobanoglous *et al.* (1993)

จากการวิจัยของ Nozhevnikova *et al.* (1993) พบว่าในแต่ละหลุมฝังกลบมูลฝอยในประเทศไทยจะมีความเข้มข้นของก๊าซมีเทน (CH_4) แตกต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของมูลฝอยและจะเกิดก๊าซมีเทนมากที่สุดที่ระดับความลึกประมาณ 2 – 6 เมตร โดยจุลินทรีย์ที่ทำการผลิตก๊าซมีเทน (CH_4) อยู่ในจำพวก mesophilic methanobacteria นอกจากนี้อาจพบสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ (Volatile Organic Compound : VOC) เกิดขึ้นในหลุมฝังกลบมูลฝอยเนื่องมาจาก

การปนเปื้อนของมูลฝอยจำพวกของใช้จากบ้านเรือนที่ทำจากสารเคมีที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ โดยจากการวิจัยของ Allen *et al.* (1997) พบว่าการแพร่กระจายของสารอินทรีย์ระเหยง่ายจากหลุมฝังกลบมูลฝอย 7 แห่งในประเทศอังกฤษทั้งหมด 140 ชนิด ได้แก่ alkane, aromatic compounds, cycloalkane, terpene, alcohol, ketone และ halogen compounds ดังแสดงในตารางที่ 3 ทั้งนี้ Bounicor and Wayne (1992) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของก๊าซที่แพร่กระจายออกจากหลุมฝังกลบมูลฝอยประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าองค์ประกอบหลักของก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยประกอบด้วยก๊าซมีเทนร้อยละ 50 และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อีกประมาณร้อยละ 50 นอกจากนี้ยังมีก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ก๊าซไนโตรเจน (N_2) ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และสารอินทรีย์ระเหยง่าย (VOC)

ตารางที่ 3 ชนิดของสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่พบในก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยตามโครงสร้างทางเคมี

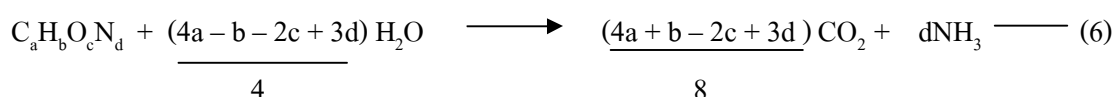
ชนิดของสารอินทรีย์ระเหยง่าย	ความเข้มข้น (mg / m^3)
อัลเคน	302 – 1,543
สารประกอบอะโรมาติก	94 – 1,906
ไซโคลอัลเคน	80 - 487
เทอร์พีน	35 - 652
แอลกอฮอล์และคีโตน	2 - 2,069
สารประกอบฮาโลเจน	327 - 1,239

ที่มา : Allen *et al.* (1997)

2.2 อัตราการเกิดก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอย

อัตราการเกิดก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอยปกติจะถูกควบคุมจากหลายๆปัจจัย เช่น ขนาดและองค์ประกอบของมูลฝอย อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณสารอาหาร ความชื้น เป็นต้น ดังนั้นจึงมีนักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาเพื่อหาอัตราการเกิดก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยขนาดเล็กที่จำลองขึ้นพบว่าอัตราการเกิดก๊าซอยู่ในช่วง $0.007 - 3.16 \text{ m}^3 / \text{kg wet solid waste. Year}$

(USEPA, 1985) ในหลุมฝังกลบมูลฝอยจริงจะมีอัตราการเกิดก๊าซอยู่ระหว่าง $187 - 424 \text{ m}^3 / \text{ton wet solid waste. Year}$ (Rees, 1985) หรือ $0.009 - 0.02 \text{ m}^3 / \text{kg wet solid waste. Year}$ (คาดการณ์จากอัตราการเกิด 20 ปี) ซึ่งเป็นผลมาจากองค์ประกอบของมูลฝอยและฤดูกาลที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อัตราการเกิดก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยที่จำลองขึ้นจะสูงกว่าหลุมฝังกลบมูลฝอยจริงเพราะสามารถควบคุมสภาวะได้ เช่น พีเอช ความชื้นและการเติมสารอาหารของมูลฝอยได้มากกว่า ในขณะที่หลุมฝังกลบมูลฝอยจริงไม่สามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ได้ เช่น อาจมีปริมาณความชื้นที่ต่ำเกินไป การรั่วไหลของก๊าซ เป็นต้น จึงทำให้ผลผลิตก๊าซที่ได้ต่ำกว่าปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นจากหลุมฝังกลบมูลฝอยจะมีสมการทั่วไปของปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซมีเทน ดังสมการ (Tchobanoglous *et al*, 1993)



3. อิทธิพลของก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอยต่อภูมิอากาศของโลก

หลุมฝังกลบมูลฝอยถูกนำมาพิจารณาให้เป็นหนึ่งในแหล่งการแพร่กระจายก๊าซมีเทน (CH_4) ที่สำคัญของโลกเพราะองค์ประกอบของก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยประกอบด้วยก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งเป็นก๊าซที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจกทั้งคู่แต่ก๊าซมีเทนจะส่งผลกระทบมากกว่าเพราะก๊าซมีเทนสามารถดูดซับความร้อนในชั้นบรรยากาศมากกว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ถึง 21 เท่า ก่อนหน้านี้ได้มีการประมาณการว่าหลุมฝังกลบมูลฝอยเป็นแหล่งพลังงานที่แพร่กระจายก๊าซมีเทนเป็นจำนวนถึงร้อยละ 8 – 20 ของการแพร่กระจายก๊าซมีเทนสู่บรรยากาศโลกนั้นคิดเป็น 360 ล้านตันต่อปี (IPCC, 1992) ดังนั้นการควบคุมการแพร่กระจายก๊าซมีเทนจากหลุมฝังกลบมูลฝอยจึงเป็นเป้าหมายส่วนหนึ่งในการลดปริมาณก๊าซเรือนกระจก ส่วนก๊าซอื่นๆที่ปลดปล่อยออกมาจากหลุมฝังกลบมูลฝอย เช่น สาร CFC (Chlorofluorocarbons) ก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลกในรูปของการดูดซับรังสีอินฟราเรดและไปทำลายชั้นบรรยากาศโอโซน ผลกระทบของก๊าซเรือนกระจกที่มีต่อโลกมีดังนี้ (IPCC, 1992)

- 1) ผลกระทบต่อภูมิอากาศ คือ ทำให้เกิดภาวะความกดดันของอากาศเพิ่มขึ้นซึ่งก่อให้เกิดมรสุมพัดแรงกว่าปัจจุบัน เกิดหิมะละลายและเกิดน้ำเซาะดินพังทลาย

2) ผลกระทบต่อแหล่งน้ำ คือ เกิดความแห้งแล้งขึ้นในบางพื้นที่ เกิดปัญหาพืชมีความต้องการน้ำสูงขึ้นเนื่องจากเกิดการเร่งอัตราการสังเคราะห์แสงของพืช

3) ผลกระทบต่อพลังงาน คือ ความแปรปรวนของภูมิอากาศซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการสำรวจค้นหาแหล่งน้ำมันดิบ

4) ผลกระทบต่อเกษตรกรรม คือ อาจมีพืชบางพันธุ์สูญพันธุ์ไปเนื่องจากไม่สามารถปรับตัวได้กับการแปรปรวนของภูมิอากาศ

5) ผลกระทบต่อระดับน้ำทะเล คือ ถ้าโลกมีอุณหภูมิสูงขึ้น $1.5 - 4.5^{\circ}\text{C}$ จะทำให้ระดับของน้ำทะเลสูงขึ้น $0.4 - 1.2$ เมตร เนื่องจากการละลายของน้ำแข็งบริเวณขั้วโลก

การประเมินแหล่งที่มีการแพร่กระจายของก๊าซมีเทน (CH_4) แสดงดังตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าก๊าซมีเทน (CH_4) ได้มาจากแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติมากมาย เช่น พื้นที่ชุ่มน้ำ บ่อ นาข้าว ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีการแพร่กระจายออกมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม มูลสัตว์ โรงงานบำบัดน้ำเสียและหลุมฝังกลบมูลฝอยซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการแพร่กระจายของก๊าซมีเทน (CH_4) จากหลุมฝังกลบมูลฝอยประมาณอยู่ในช่วง $30 - 60$ ล้านตันต่อปี (Kreileman and Bouwman, 1994) ดังนั้นหลุมฝังกลบมูลฝอยจึงเป็นแหล่งที่มีการแพร่กระจายของก๊าซมีเทน (CH_4) ที่สำคัญมากที่สุด

4. ขั้นตอนการกลบทับ

โดยทั่วไปขั้นตอนการกลบทับแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (กรมควบคุมมลพิษ, 2542) คือ

1) ขั้นตอนการกลบทับชั้นกลาง หมายถึง วัสดุธรรมชาติหรือสังเคราะห์ที่ใช้กลบทับบนหลุมของขยะมูลฝอยก่อนที่จะฝังขยะมูลฝอยในวันต่อไปหรือระหว่างชั้นของขยะมูลฝอย

2) ขั้นตอนการกลบทับชั้นสุดท้าย หมายถึง วัสดุธรรมชาติหรือสังเคราะห์ที่ใช้สำหรับการกลบชั้นบนสุดของสถานที่ฝังกลบขยะมูลฝอยหลังจากการฝังกลบได้สิ้นสุดลง

ตารางที่ 4 แหล่งกำเนิดก๊าซมีเทน

แหล่งกำเนิด	ปริมาณการปลดปล่อยก๊าซมีเทน (Tg / year)		
	1970	1990	2050
นาข้าวที่ข่มน้ำ	53	59	52
หลุมข่มน้ำตามธรรมชาติ	111	111	111
หลุมฝังกลบมูลฝอย	24	36	81
การบำบัดของเสียชุมชน	17	25	47
สัตว์เคี้ยวเอื้อง	66	79	161
มูลสัตว์	12	14	28
ปลวก	20	20	20
แหล่งน้ำ	15	15	15
การเผาไหม้มวลชีวภาพ			
- การตัดไม้ทำลายป่า	16	14	12
- การเผาทุ่งหญ้า	17	16	6
- การเผาของเสียจากการเกษตร	7	8	9

ที่มา : Kreieman and Bouwman (1994)

โดยวัสดุกลบทับชั้นสุดท้ายนี้จะมีหน้าที่

- ช่วยลดการซึมผ่านของน้ำสู่ชั้นฝังกลบขยะมูลฝอย
- ควบคุมปริมาณก๊าซจากหลุมฝังกลบขยะมูลฝอยที่จะปล่อยสู่บรรยากาศ
- ความลาดชันด้านข้างชั้นสุดท้ายต้องเหมาะสมเพื่อระบายน้ำผิวดินและลดการกัดเซาะของวัสดุกลบทับชั้นสุดท้าย
- ป้องกันการแพร่กระจายกลิ่นและเชื้อโรคสู่สิ่งแวดล้อม

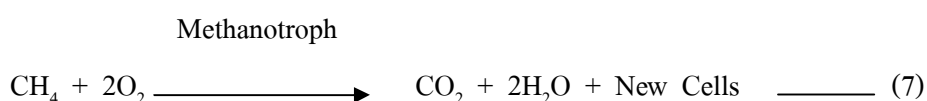
5. การเกิดมีเทนออกซิเดชันในหลุมฝังกลบมูลฝอย

5.1 กระบวนการมีเทนออกซิเดชัน

ก๊าซมีเทนจากหลุมฝังกลบมูลฝอยที่แพร่กระจายสู่บรรยากาศมีปริมาณลดลง เนื่องจากเกิดกระบวนการมีเทนออกซิเดชันโดยจุลินทรีย์ในชั้นดินกลบทับหลุมฝังกลบมูลฝอย โดยกระบวนการมีเทนออกซิเดชันสามารถเกิดได้ใน 2 สถานะ คือ

1) สถานะที่มีอากาศเพียงพอ

ในสถานะดังกล่าวพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ คือ แบคทีเรียชนิดที่ใช้ประโยชน์จากมีเทน (Methane Utilizing Bacteria) หรือจุลินทรีย์กลุ่มเมทาโนโทรฟซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าว Whittenbury *et al*, (1970) พบว่ามีลักษณะหลากหลายทางชีวภาพทั้งยังได้ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับเทคนิคการแบ่งชนิดจุลินทรีย์ และลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์ดังกล่าว ด้วยวิธีการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าโครงสร้างเนื้อเยื่อที่ซับซ้อนภายในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้ยังอธิบายว่าจุลินทรีย์กลุ่มเมทาโนโทรฟสามารถใช้มีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นแหล่งพลังงานซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียชนิดนี้ โดยมีเอนไซม์ทำหน้าที่ออกซิไดส์มีเทนในสถานะที่มีออกซิเจนและได้ผลผลิตออกมา คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Baratt, 1995) ดังแสดงในสมการที่ 7



โดยในทางทฤษฎีของปฏิกิริยาทางเคมี 1 โมลของมีเทนทำปฏิกิริยากับออกซิเจน 2 โมล ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ คาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมล แต่ในสภาพความเป็นจริงการผลิตคาร์บอนต่ำกว่าซึ่งแตกต่างกับทฤษฎีเนื่องจากการย่อยและดูดซึมของคาร์บอนไปใช้ในการสร้างเซลล์ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนรูปคาร์บอนสูงสุดจากการสังเกตเกิดขึ้นเพียงร้อยละ 43

2) สภาวะไร้อากาศ

ปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชันในสภาวะไร้อากาศสามารถเกิดขึ้นได้โดยอาศัยตัวรับอิเล็กตรอนชนิดอื่น (Pareek *et al.*, 1998) ตัวอย่างเช่น การเกิดมีเทนออกซิเดชันในสภาวะไร้อากาศโดยใช้ซัลเฟตที่เกิดขึ้นในทะเลส่วนใหญ่อยู่ในสภาวะไร้อากาศ ปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชันเกิดโดยใช้เหล็กเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ในขณะที่ตัวรับอิเล็กตรอนชนิดอื่นๆมีน้อยมาก อย่างไรก็ตามที่สภาวะไร้อากาศเกิดมีเทนออกซิเดชันในสัดส่วนที่น้อยมากเมื่อเทียบกับในสภาวะที่มีอากาศเพียงพอ (มากกว่าร้อยละ 5) ฉะนั้นในสภาวะดังกล่าวจึงไม่ค่อยจะนำมาพิจารณามากนักในหน้าดินทั่วไป

5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

1) ความเข้มข้นของออกซิเจน

สภาวะที่มีอากาศเพียงพอ ความเข้มข้นของออกซิเจน ในช่วงว่างระหว่างเม็ดดินมีบทบาทสำคัญในการกำหนดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชันในสภาวะที่อากาศ

William and Zobell (1949) พบว่าช่วงความเข้มข้นออกซิเจนร้อยละ 10–40 เหมาะสมต่อปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชัน ในขณะที่ King *et al.* (1996) พบว่าระดับความเข้มข้นออกซิเจนต่ำส่งผลให้อัตราออกซิเดชันของก๊าซมีเทนมีค่าต่ำ

2) ความเข้มข้นของก๊าซมีเทน

William and Zobell (1949) พบว่าในช่วงความเข้มข้นของมีเทนร้อยละ 0–40 เมื่อระดับความเข้มข้นของมีเทนสูงขึ้น อัตราการออกซิเดชันของก๊าซมีเทนก็เพิ่มขึ้นด้วยแต่เมื่อความเข้มข้นของก๊าซมีเทนมากกว่าร้อยละ 40 พบว่าอัตราออกซิเดชันของก๊าซมีเทนมีแนวโน้มใกล้เคียงกับที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40

3) ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

ในการเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าร้อยละ 20 – 30 เป็นผลให้เกิดการลดลงของอัตราออกซิเดชันของก๊าซมีเทน ซึ่งการที่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์มีปริมาณสูง หมายถึง การมีส่วนปริมาณออกซิเจนและมีเทนในปริมาณต่ำ ทั้งสองปัจจัยนี้จำเป็นสำหรับปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชันส่งผลให้อัตราของปฏิกิริยาดังกล่าวลดลง

4) ความชื้น

โดยปกติในดินจะไม่อยู่ในรูปน้ำบริสุทธิ์แต่จะมีสารต่างๆละลายอยู่โดยเฉพาะสารอาหาร ดังนั้นน้ำในดินจึงอาจเรียกว่า สารละลายดิน (Soil Solution) ซึ่งน้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมและการดึงสารอาหารมาใช้โดยผ่านฟิล์มของน้ำที่อยู่ระหว่างอาหารและเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากดินแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกันจึงทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำต่างกัน ดังนั้นปริมาณความชื้นของดินจึงขึ้นกับชนิดของดินและปริมาณน้ำจะมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์เพราะหากมีน้อยเกินไปการเจริญจะหยุดชะงักและหากมีปริมาณมากเกินไปน้ำก็จะเข้ามาแทนที่อากาศในดิน ซึ่งเป็นผลลบต่อจุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะจำพวกเฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) ที่ใช้อากาศ (สมศักดิ์, 2528)

Nesbit and Breitenbeck (1992) รายงานว่าความชื้นบรรจุร้อยละ 25-75 โดยน้ำหนักยับยั้งอัตราการออกซิเดชันของก๊าซมีเทนถึงร้อยละ 56 เนื่องจาก โมเลกุลน้ำแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่างอนุภาคดิน ทำให้ก๊าซแพร่ได้น้อยลงในขณะที่ Pokhrel (1998) พบว่าความชื้นที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชัน คือ ร้อยละ 15 – 20 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราออกซิเดชันของก๊าซมีเทนมีค่าเท่ากับ 11.5×10^{-7} กรัมมีเทนต่อชั่วโมงต่อกรัมดินแห้ง ที่ความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก อัตราามีเทนออกซิเดชันมีค่าเกือบเป็นศูนย์และหากเพิ่มความชื้นมากกว่าร้อยละ 18 โดยน้ำหนักอัตรามีเทนออกซิเดชันไม่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับ Whalen *et al.* (1990) ที่พบว่าความชื้นที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชัน คือ ร้อยละ 11 โดยน้ำหนัก และงานวิจัยของ Chiemchaisri (2000) พบว่าความชื้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชันมากที่สุด เท่ากับ 2.36 นาโนกรัมมีเทนต่อชั่วโมงต่อกรัมดินแห้งแต่เมื่อเพิ่มความชื้นเป็นร้อยละ 30 โดยน้ำหนักอัตราออกซิเดชันของก๊าซมีเทนลดลงเหลือ 1.6

นาโนกรัมมีเทนต่อชั่วโมงต่อกรัมดินแห้ง เนื่องจากก๊าซสามารถแพร่ผ่านเข้าสู่ช่องว่างดินได้น้อย และที่ความชื้นบรรจุต่ำๆ อัตราการออกซิเดชันของก๊าซมีเทนลดลงเหลือ 0.84 นาโนกรัมมีเทนต่อชั่วโมงต่อกรัมดินแห้ง

Boechx and Cleemput (1996) ได้ศึกษาผลของปริมาณน้ำในดินที่มีต่ออัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับของหลุมฝังกลบมูลฝอยจริง พบว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันเกิดขึ้นได้ดีในช่วงความชื้นระหว่างร้อยละ 10 - 30 และมีค่าสูงสุดที่ความชื้นร้อยละ 15 ในขณะที่ Visvanathan *et al.* (1999) ทำการศึกษาความสามารถในการเกิดมีเทนออกซิเดชันของคอลัมน์ดินพบว่าความชื้นที่ให้ค่าอัตรามีเทนออกซิเดชันสูงสุดที่ร้อยละ 10

5) อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์และเกี่ยวข้องกับลักษณะทางกายภาพและเคมี กล่าวคือ ศักยภาพในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ การเคลื่อนย้ายและแพร่กระจายของของเหลวภายในมวลดิน อัตราการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีความสำคัญต่อความสามารถในการดำรงชีพของจุลินทรีย์

Chiemchaisri (2000) พบว่าช่วงอุณหภูมิ 31–36 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชันแต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 36 องศาเซลเซียส อัตราออกซิเดชันของก๊าซมีเทนมีแนวโน้มลดลงและมีค่าเกือบเป็นศูนย์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Nesbit (1992) พบว่าอัตรามีเทนออกซิเดชันมีค่าสูงสุดในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส แต่ที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราออกซิเดชันของก๊าซมีเทนลดลงเหลือร้อยละ 10–12 ของอัตราออกซิเดชันของก๊าซมีเทนสูงสุดและช่วงอุณหภูมิ 4 และ 50 องศาเซลเซียส ไม่เกิดปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชันเช่นเดียวกับ Pascal and Cleemput (1996) ซึ่งพบว่าช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการออกซิเดชันของก๊าซมีเทนและพลังงานจากกระบวนการออกซิเดชันของก๊าซมีเทนเท่ากับ 56.5 กิโลจูลต่อเคลวินต่อโมล

6) อันตรกิริยาทางเคมี (Chemical Interaction) ในสารละลายดิน

อันตรกิริยาทางเคมี (Chemical Interaction) ในสารละลายดินมีความเกี่ยวข้องกับ ความแรง (strength) องค์ประกอบของไอออน ความเป็นกรดต่างและศักยภาพการเกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันรีดักชัน โดยทั่วไปสารอาหารที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์จะพบมากในรูปของแคตไอออน และแอนไอออนซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับอันตรกิริยาทางเคมีในมวลของดินและเซลล์ ความแรงของ ไอออนส่วนใหญ่เป็นผลรวมของแคตไอออนชนิดโมโนและไดวาเลนต์ (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) และ H^+ (H_3O^+) โดยมีความสำคัญในการดูดซับและการรวมตัวของเซลล์ อนุภาค ไวรัส ดินเหนียว คอลลอยด์และฮิวมิก

โดยปกติความเป็นกรดต่างของดินอยู่ระหว่าง 4 - 8.5 ในดินชั้นบนจะเป็นกรด มากกว่าดินชั้นล่างและในดินที่มีความชื้นจะเป็นมากกว่าดินที่แห้ง ส่วนใหญ่ดินที่มีค่าความเป็น กรดต่าง 5.5 หรือต่ำกว่าก็จะมีกรเจริญของเห็ดและรามากกว่าแบคทีเรีย ในขณะที่ความเป็นกรด ต่างเป็นกลางหรือเบสอ่อน (6-8) จะพบแบคทีเรียและแอคติโนไมเนสเนื่องจากเมทาโนโทรฟ แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 6-8 (Whittenbury *et al.*, 1970) และ ดินเหนียวมีความเป็นกรด ส่วนดินทรายค่อนข้างเป็นเบสอ่อน ส่วนดินร่วนจะมีความเป็นกลาง ดังนั้นดินร่วนและดินทรายจึงมีความเหมาะสมสำหรับเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียดังรายงานการ วิจัยของ USEPA (1991) พบว่าดินประเภทดินร่วนที่มีความเป็นกรดต่างประมาณ 6.5-7.5 มีความ เหมาะสมต่อการเจริญของพืชและเชื้อแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟ

7) โครงสร้างของดิน

ดินเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์และมีความเกี่ยวข้องกับกิจกรรมและกระบวนการ เมทาบอลิซึมที่เกิดขึ้นภายในดิน โดยดินสามารถแบ่งตามโครงสร้างหรือสัดส่วนของอนุภาคได้ 3 กลุ่ม คือ ดินทราย ดินร่วนและดินเหนียว โดยดินทรายมีขนาดอนุภาคระหว่าง 0.2 - 2.0 มิลลิเมตร ดินร่วนมีขนาดอนุภาคระหว่าง 0.02-0.20 มิลลิเมตร และดินเหนียวมีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.02 มิลลิเมตร (สมศักดิ์, 2528)

เนื้อดินแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

- 1) ดินเนื้อหยาบ คือ ดินที่มีอนุภาคของทรายเป็นส่วนประกอบมากกว่าร้อยละ 70
- 2) ดินเนื้อละเอียด คือ ดินที่มีดินเหนียวเป็นส่วนประกอบมากกว่าร้อยละ 35-40
- 3) ดินร่วน คือ ดินที่มีอนุภาคดินทรายเป็นส่วนประกอบน้อยกว่าร้อยละ 70 และมีดินเหนียวเป็นส่วนประกอบน้อยกว่าร้อยละ 35 - 40

ในดินที่เป็นดินเหนียวและมีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่น้อยมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมีที่เหมาะสมต่อกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์ นอกจากนี้การจัดเรียงตัวและการเกาะกันระหว่างเม็ดดินตลอดจนช่องว่างในดินมีผลต่อการเคลื่อนที่ของน้ำและก๊าซในดินซึ่งมีผลต่อกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์ (Metting, 1993) หากดินมีลักษณะที่พรุนขึ้นการแพร่ผ่านของอากาศจากชั้นบรรยากาศลงสู่ผิวดินดีขึ้น โดยจะเป็นผลดีต่อปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชัน

จากการวิจัยของ USEPA (1991) พบว่าดินประเภทดินร่วนที่มีปริมาณสารอาหารเพียงพอเป็นดินที่มีความเหมาะสมต่อการปลูกพืชคลุมดินและระบบดินกลบทับชั้นบนควรใช้ดินประเภทดินร่วนมากกว่าดินเหนียวที่มีความหนาแน่นประมาณ 1450 – 1500 กิโลกรัมต่อตารางเมตร เพราะจะช่วยให้กระบวนการมีเทนออกซิเดชันเกิดขึ้นได้ดี (Pokhrel, 1998 ; Chiemchaisri, 2000) และชนิดของดินที่มีความเหมาะสมสำหรับการใช้การออกแบบเป็นดินกลบทับบริเวณหลุมฝังกลบมูลฝอย คือ ดินทรายหรือดินร่วนที่ระดับความลึก 40 เซนติเมตรหรือต่ำกว่า (Chiemchaisri, 2000)

8) แเอ็กซ์ตราเซลลูลาโพลีแซคคาไรด์ (EPS) ของเมทาโนโทรฟแบคทีเรีย

แเอ็กซ์ตราเซลลูลาโพลีแซคคาไรด์หรืออีพีเอส (Extracellular Polysaccharide, EPS) เป็นโพลีเมอร์ของคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะเกิดขึ้นและปลดปล่อยออกมาในรูปอิสระภายนอกผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ โพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียโดยปกติจะอยู่ในรูปของแคปซูล เมือกหรือของเหลวเหนียวที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ

อีพีเอสส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพของดิน เช่น การเกาะกันของอนุภาคดิน ถ้ามีการสะสมของอีพีเอสในดินมากขึ้นจะทำให้อนุภาคดินเกาะกันมากขึ้นทำให้ออกซิเจนแพร่ผ่านลงไปในพื้นที่ดินได้น้อย (Miller and Donahue, 1995; Atlas and Bartha, 1992)

การศึกษาชั้นดินกลบทับในหลุมฝังกลบมูลฝอยจริงของ Hilger *et al.* (1999) พบว่าการสะสมของอีพีเอสระหว่างกระบวนการมีเทนออกซิเดชันจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้อัตราามีเทนออกซิเดชันลดลง

ปัจจัยที่ควบคุมการผลิตอีพีเอสในดินที่เกิดมีเทนออกซิเดชัน ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณความชื้นและสัดส่วนของก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซมีเทน การผลิตอีพีเอสมักพบในดินที่มีปริมาณความชื้นร้อยละ 5-33 อย่างไรก็ตามการแปรค่าอุณหภูมิระหว่าง 20-45 °C ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตอีพีเอสและการเพิ่มสัดส่วนของก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซมีเทนจะมีผลให้การผลิตอีพีเอสเพิ่มสูงตามไปด้วย (Chiemchaisri *et al.*, 2001)

9) สารอินทรีย์ในดิน

สารอินทรีย์จะช่วยทำให้สภาวะแวดล้อมของดินมีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในรูปของแหล่งอาหารเนื่องจากสัดส่วนของสารอินทรีย์ในดินมีปริมาณของคาร์บอนและไนโตรเจนมากซึ่งเป็นแหล่งที่สำคัญในการสะสมอาหารในดิน สารอินทรีย์ในดินส่วนใหญ่พบในรูปของฮิวมัส ทั้งยังช่วยส่งเสริมกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์โดยใช้เป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้ถ้าปริมาณสารอินทรีย์ในดินสูงมากเกินไปจะเกิดผลในทางตรงข้าม คือ มีผลต่อการแพร่ของก๊าซสู่ช่องว่างของอนุภาคดินน้อยลง เนื่องจากการเกาะกันแน่นของอนุภาคดิน (Glinski and Stepniewski, 1986)

จากการศึกษา Borjesson and Svensson (1997) ซึ่งทำการศึกษาในสวีเดนพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ในชั้นดินกลบทับ (สัดส่วน C / N สูง) ส่งผลให้อัตราออกซิเดชันก๊าซมีเทนมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย

10) ธาตุอาหารในดิน

โดยปกติธาตุอาหารเป็นปัจจัยสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด อย่างไรก็ตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อสารอาหารแตกต่างกัน เพราะมีความต้องการธาตุอาหารต่างชนิดกัน แบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้ธาตุอาหารเป็นแหล่งอาหารหลัก เช่น แอมโมเนียม ไนโตรเจนและไนเตรตเป็นแหล่งอาหารสำหรับแบคทีเรียจำพวกไนตริไฟอิงและดีไนตริไฟอิง ดินมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์คาร์บอน สารอนินทรีย์และอินทรีย์ใน ไตรเจนและแบคทีเรียสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของไนเตรตและฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต

ปริมาณธาตุอาหารมีผลต่อกระบวนการออกซิเดชันของกำขี้มีเทนในดินโดย Rosvlev *et al.* (1997) รายงานว่าปริมาณแอมโมเนียมีผลต่อกระบวนการออกซิเดชันของกำขี้มีเทนในดิน โดยที่สภาวะความเข้มข้นของแอมโมเนีย 0.1-1.0 โมลต่อกรัมดินแห้ง พบว่าอัตราออกซิเดชันกำขี้มีเทนมีค่าลดลงประมาณร้อยละ 85 – 99

จากการศึกษาของ Boechx and Cleemput (1996) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียในดินจาก 4 เป็น 104 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินแห้งส่งผลให้อัตราการออกซิเดชันกำขี้มีเทนในชั้นดินมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นไนเตรตจาก 2.5 - 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมดินแห้งพบว่าไม่มีผลต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันดังแสดงในตารางที่ 5

11) จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน

นอกจากจุลินทรีย์กลุ่มเมทาโนโทรฟแล้วยังพบจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆที่อาศัยอยู่ในดินและใช้ออกซิเจนเช่นเดียวกับเมทาโนโทรฟทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเมทาโนโทรฟลดลงและทำให้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันต่ำลงโดยจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าว ได้แก่ โปรโตซัวกลุ่ม Actinomycetes กลุ่ม Chemoautotroph (Nitrosomonas, Nitrobacter, Carboxydomonas) และกลุ่ม Heterotrophs (Azotobacter, Arthrobacter, Azotomonas)

ตารางที่ 5 ผลของแอมโมเนียมและไนเตรทอออนต่ออัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

แอมโมเนียมอออน		ไนเตรทอออน	
ความเข้มข้น (mg / kg ดินแห้ง)	อัตราการเกิดมีเทน ออกซิเดชัน (ng CH ₄ / g . h)	ความเข้มข้น (mg / kg ดินแห้ง)	อัตราการเกิดมีเทน ออกซิเดชัน (ng CH ₄ / g . h)
4	2.36	0	1.82
29	2.01	2.5	1.86
54	1.52	50	1.81
79	0.78	75	1.84
104	0.53	100	1.73

ที่มา : Boechx and Cleemput (1996)

12) การปลูกพืชคลุมชั้นดิน

Hilger *et al.* (1999) พบว่าการปลูกพืชคลุมหน้าดินจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพทางฟิสิกส์ของดินโดยรากของพืชจะซอนไซลงไปในดินทำให้การกระจายตัวของอากาศลงสู่ดินดีขึ้นซึ่งเหมาะสำหรับการเกิดปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชัน

Schutz *et al.* (1999) พบว่ามีเทนสามารถถูกกล้ำเลียงในต้นพืช โดย Aerenchyma of Vascular โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของโมเลกุลก๊าซเนื่องจากผลของความแตกต่างระหว่างความดันและสำหรับผิวดินที่บริเวณรากพืชมีลักษณะกึ่งไร้อากาศ (Anoxic) พืชอาจมีการดึงก๊าซมีเทนเข้าสู่ต้นพืชทางราก

Maurice and Lagerkvist (1998) พบว่าพืชสามารถดึงคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงซึ่งผลที่ได้คือ ออกซิเจน โดยก๊าซดังกล่าวเป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชัน ปฏิกิริยาสังเคราะห์แสงจะเกิดมากบริเวณส่วนของพืชที่มีคลอโรพลาสต์ โดยร้อยละ 90 ปฏิกิริยาสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่ใบพืช ในขณะที่กระบวนการหายใจของพืชเป็น

กระบวนการออกซิเดชันคาร์โบไฮเดรตเกิดขึ้นที่ไมโทคอนเดรียของพืชจะมีการใช้ออกซิเจนบางส่วนในดิน โดยอาจมีการดึงก๊าซดังกล่าวผ่านทางรากพืชส่งผลให้มีปริมาณออกซิเจนในดินลดลงเป็นผลกระทบต่อการดึงออกซิเจนไปใช้ในปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชัน เช่นเดียวกับ Glinski and Stepnicaski (1986) ซึ่งได้อธิบายว่ากระบวนการหายใจของพืชส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของก๊าซในชั้นดินที่มีการปลูกพืช โดยพืชจะมีการนำออกซิเจนจากดินไปใช้ในกระบวนการหายใจ โดยมีอัตราการใช้ออกซิเจน 0.15 - 0.52 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง สำหรับดินร่วนปนทรายและให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาในอัตรา 0.14 - 1.63 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมงในดินชนิดเดียวกันและหากพบว่าความพรุนในดินต่ำ (น้อยกว่า 0.2) อัตราการหายใจของพืชจะลดลง

6. แบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟ

เมทิลโลโทรฟแบคทีเรีย (Methylo troph bacteria) คือ กลุ่มของแบคทีเรียที่ใช้ก๊าซในการเจริญและสามารถดึงสารประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่ 1 อะตอมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ โดยสารประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่ 1 อะตอมนั้น ได้แก่ มีเทน (CH_4), เมทานอล (CH_3OH), เมทิลเลทเอมีน, ฮาโลมีเทน และสารประกอบเมทิลที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เป็นต้น ดังนั้นเมทาโนโทรฟแบคทีเรีย (Methanotroph bacteria) จึงเป็นสมาชิกของเมทิลโลโทรฟแบคทีเรียเนื่องจากเชื้อเมทาโนโทรฟใช้คาร์บอนอะตอมจากก๊าซมีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ (Anthony, 1982, 1986, 1991)

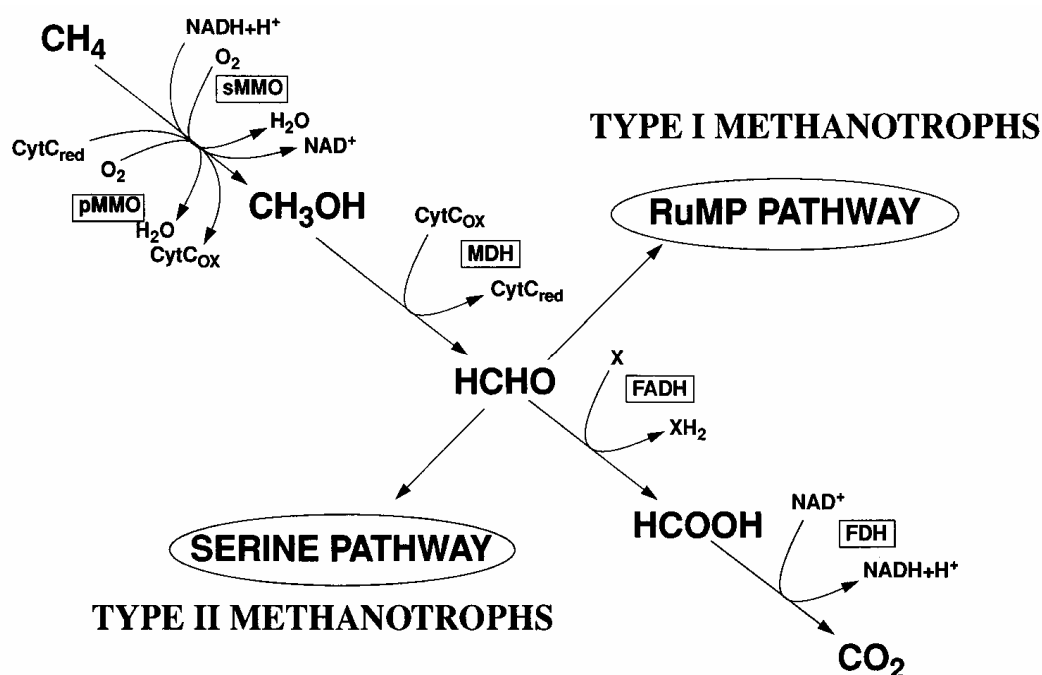
6.1 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อเมทาโนโทรฟ

ในการจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟนั้นได้มีการจำแนกเชื่อดังกล่าวโดยอาศัยเกณฑ์ในการจำแนกหลายรูปแบบด้วยกัน กล่าวคือ การจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพและชีวเคมี การจำแนกโดยอาศัยรหัสทางพันธุกรรม โดยการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีนั้นเป็นการจำแนกที่นิยมใช้มาแต่เดิมเนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีลักษณะเฉพาะของโคโลนี (การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง) ที่สามารถจำแนกได้ด้วยตาและปฏิกิริยาทางชีววิทยาแต่ต้องใช้เวลานานในการวิเคราะห์และไม่เหมาะกับการจำแนกเชื้อที่อยู่รวมกันในพื้นที่ลุ่มเนื่องจากมีข้อจำกัดของสารอาหารที่ไม่สามารถเตรียมได้เหมือนธรรมชาติได้ทั้งหมด ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยม

ใช้รหัสทางพันธุกรรมในการจำแนกเนื่องจากยีนที่ใช้ในการจำแนกนั้นมีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์และสามารถบอกได้ถึงความใกล้ชิดของแต่ละสายพันธุ์ทั้งยังใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานและเหมาะกับการตรวจหาเชื้อที่อาศัยในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีการในการวิเคราะห์โดยอาศัยรหัสทางพันธุกรรมนี้ในปัจจุบันมีหลายวิธีด้วยกัน คือ วิธีการฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันหรือฟิช (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) และวิธีการ โพลีเมอร์เชนรีแอคชันหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

1) การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟทางกายภาพและชีวเคมี

เมทาโนโทรฟเป็นแบคทีเรียที่ใช้คาร์บอนอะตอมจากก๊าซมีเทนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญซึ่งค้นพบโดย Whittenbury *et al.* (1970, 1984) ซึ่งจำแนกเมทาโนโทรฟได้กว่า 100 ชนิดโดยอาศัยลักษณะรูปร่างของเซลล์ (Cell Morphology) รูปแบบของระยะพัก (Resting stages formed) ลักษณะโครงสร้างของเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Fine structure intracytoplasmic membrane) และลักษณะภายนอกทั่วไป (Physiological Characteristics) โดยสามารถแบ่งเชื้อเมทาโนโทรฟดังกล่าวออกเป็น 2 ชนิดด้วยกัน คือ เมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ซึ่งมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งหรือรูปร่างเป็นทรงกลม ไม่สามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงได้ (ประมาณ 45°C) ลักษณะของเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมมีลักษณะเรียงเป็นแผ่นซ้อนกันคล้ายแผ่นจานภายในเซลล์ มีรูปแบบของระยะพักอยู่ในรูปของซิสต์ (cyst) ได้แก่ สายพันธุ์ *Methylobacter spp.* และ *Methylobacter spp.* ในขณะที่เชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งและในบางชนิดมีรูปร่างเป็นวงรี ไม่สามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงได้ (ประมาณ 45°C) ลักษณะของเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมมีลักษณะเป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ขนานไปกับผนังเซลล์ รูปแบบของระยะพักอยู่ในรูปของซิสต์ (cyst) และสปอร์ (Exospores) ได้แก่ สายพันธุ์ *Methylosinus.*, *Methylocystis spp.* ต่อมาได้มีการศึกษาโดยนักวิจัยหลายท่านซึ่งได้สรุปว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้จะอาศัยเอนไซม์มีเทนโมโนออกซิเจเนสหรือเอ็มเอ็มโอ (Methane Monooxygenase, MMO) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการออกซิเดชันก๊าซมีเทนให้เปลี่ยนรูปเป็นเมทานอลและฟอร์มัลดีไฮด์ตามลำดับซึ่งฟอร์มัลดีไฮด์นี้เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของเซลล์และผลของปฏิกิริยาล่าสุดท้าย คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยฟอร์มัลดีไฮด์ซึ่งเซลล์จะสามารถดูดซึมเข้ามาใช้ประโยชน์ในเซลล์นั้นจะมีทางในการนำเข้าสู่เซลล์ 2 รูปแบบด้วยกัน คือ วิถีอาร์ยูเอ็มพี (RumP Pathways) และวิถีซีรีน (Serine Pathways) โดยรูปแบบในการนำเอาฟอร์มัลดีไฮด์เข้าสู่เซลล์นั้นทำให้สามารถจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟออกเป็น 2 ชนิดด้วยกัน คือ ชนิดที่นำเอาฟอร์มัลดีไฮด์เข้าสู่



ภาพที่ 2 วิธีการในการเกิดมีเทนออกซิเดชันและการดูดซึมฟอร์มัลดีไฮด์ของเชื้อเมทาโนโทรฟ
ที่มา : Hanson and Hanson (1996)

เซลล์ด้วยวิธีอาร์ยูเอ็มพีจัดเป็นเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 และชนิดที่นำเอาฟอร์มัลดีไฮด์เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีซีรีนจัดเป็นเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 (Anthony, 1982, 1986, 1991; Large and Bamforth, 1998) นอกจากนี้ยังพบเมทาโนโทรฟสายพันธุ์ใหม่คือเมทาโนโทรฟชนิดเอกซ์ (X) คือ *Methlococcus capsulatus* เนื่องจากมีลักษณะบางประการร่วมกันระหว่างเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 และ 2 แต่มีลักษณะรูปร่างโดยส่วนใหญ่เป็นทรงกลมและมักพบเป็นคู่ (dicocci) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 °ซ และมีลักษณะของเยื่อหุ้มไซโตพลาสมีดเรียงเป็นแผ่นซ้อนกันคล้ายแผ่นจาน รูปแบบของระยะพักอยู่ในรูปของซิสต์ (cyst) อาศัยกระบวนการอาร์ยูเอ็มพีและซีรีนในการดูดซึมฟอร์มัลดีไฮด์เข้าไปใช้ประโยชน์ภายในเซลล์โดยสามารถสรุปลักษณะเฉพาะของเมทาโนโทรฟแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในโทรฟอนิดที่ 1, 2 และ X

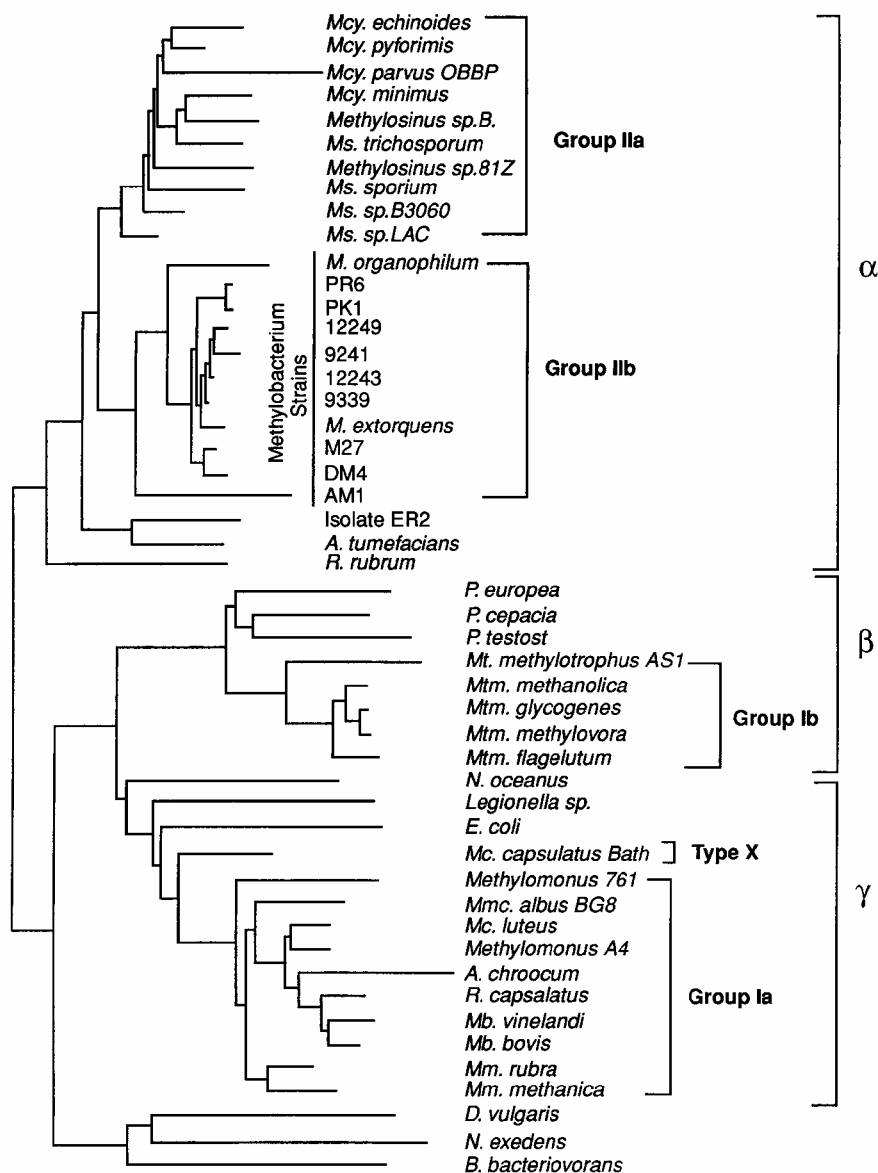
Characteristics	Type I	Type II	Type X
Cell morphology	Short rods, usually occur singly ; some cocci or ellipsoids	Crescent-shaped rods, rods, pear-shaped cells, sometimes occur in rosettes	Cocci, often found as pair
Growth at 45 °C	No	No	Yes
Membrane arrangement			
Bundles of vesicular disks	Yes	No	Yes
Paired membranes aligned	No	Yes	No
Nitrogen fixation	No	Yes	Yes
Resting stages formed			
Exospores	No	Some strains	No
Cysts	Some strains	Some strains	Some strains
RuMP pathway	Yes	No	Yes
Serine pathway	No	Yes	Sometimes
Phylogenetic signature probe	1041 (5'-CTCCGGCTATCTTAACAGATT-3')	1034 (5'-CCATACCGGACATGTCCAAAGC-3')	No specific probe has been tested
	1035 (5'-GATTCTGGATGTCAGGG-3')		
	MM650(5'-CCTCTACTCAACTCTAGT-3')		
	MM850(5'-TACGTTAGTCCACCACTAA-3')		

ที่เก็บ : Bowman *et al.* (1993)

ในปัจจุบันมีการตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟในพื้นที่วิกฤต เช่น ในพื้นที่ที่มีความเป็นกรด อาทิ Sphagnum peat bogs ซึ่งมีค่าความเป็นกรดค่าประมาณ 4-4.5 สามารถตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟที่เจริญในพื้นที่ดังกล่าว ได้แก่ *Methylocella palustis* และ *Methylocapsa acidiphila* โดยลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรียทั้งสองนั้นมีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างแบบแท่งหรือวงรีคล้ายไข่ขนาด 0.6 - 1 ไมโครเมตรและขยายพันธุ์ด้วยวิธีการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้แบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดค่าประมาณ 4.2-7.5 อุณหภูมิระหว่าง 4–30 °C (อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 15–25 °C) และเป็นแบคทีเรียที่มีการดูดซึมฟอर्मัลดีไฮด์เข้าไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ด้วยวิธีซีรีน (Dedysh *et al.*, 1998a; 1998b; 2000) ดังนั้นจึงจัด *Methylocella palustis* และ *Methylocapsa acidiphila* เป็นเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ที่เจริญได้ในสภาวะกรด (acidophilic methanotrophs)

2) การจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟโดยอาศัยรหัสทางพันธุกรรม

ในปัจจุบันได้มีการใช้ยีน 16s rRNA และ 5s rRNA มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเนื่องจากรหัสทางพันธุกรรมนี้เป็นกลุ่มยีนที่เป็นองค์ประกอบย่อยภายในไรโบโซมของแบคทีเรียที่มีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์และยังคงลักษณะจำเพาะของสายพันธุ์นั้นๆ ไว้ถึงแม้ว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะเกิดการกลายพันธุ์ โดยในการจำแนกด้วยยีนดังกล่าวทำให้ทราบว่าแบคทีเรียกลุ่มเมทิลโลโทรฟและเมทาโนโทรฟจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Proteobacteria คือ แบคทีเรียที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ประกอบไปด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมแตกต่างกันไปซึ่งมีลักษณะยื่นแตกต่างกันทำให้สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเมทิลโลโทรฟออกเป็น 3 กลุ่มด้วยกัน คือ กลุ่มที่เป็น γ Proteobacteria, α Proteobacteria และ β Proteobacteria ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยเมื่อพิจารณาวิธีการในการดูดซึมฟอर्मัลดีไฮด์และความสามารถในการใช้มีเทนของแบคทีเรียกลุ่ม Proteobacteria แล้วพบว่าเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ซึ่งอยู่ในตระกูลเมทิลโคคคาเซ (Family Methylococcaceae) จัดเป็นเชื้อเมทาโนโทรฟในกลุ่ม γ Proteobacteria และเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 จัดเป็นเมทาโนโทรฟในตระกูล α Proteobacteria ดังแสดงในภาพที่ 3 โดย 16s rRNA และ 5s rRNA ที่ Bowman *et al.*, 1995 ใช้ในการศึกษานั้นแสดงในตารางที่ 7



ภาพที่ 3 Phylogenetic Tree ของเชื้อเมทิลโอโทรฟ เมทาโนโทรฟและแบคทีเรียชนิดอื่นที่จำแนกตามกลุ่มของ Proteobacteria (อาศัย 16s rRNA และ 5s rRNA ในการจำแนก)

หมายเหตุ : *M.*, *Methylobacterium* ; *Mcy.*, *Methyloystis*; *Ms.*, *Methylosinus*; *Mb.*, *Methylobacterium*;

Mc., *Methylococcus*; *Mp.*, *Methylophilus*; *Mmc.*, *Methylomicrobium*; *Mm.*, *Methylomonas*;

Mtm., *Methanomonas*.

Group Ia ; methanotrophic bacteria that employ the RuMP pathway for formaldehyde assimilation,

Group Ib ;methylotrophs that employ the RuMP pathway for formaldehyde oxidation but do not oxidize or grow with methane as a source of carbon and energy.

Group IIa ; methanotrophic bacteria that employ the serine pathway for formaldehyde assimilation,

Ggroup IIb methanotrophic bacteria that utilize the serine pathway for formaldehyde oxidation but do not utilize methane.

ที่มา : Hanson and Hanson (1996)

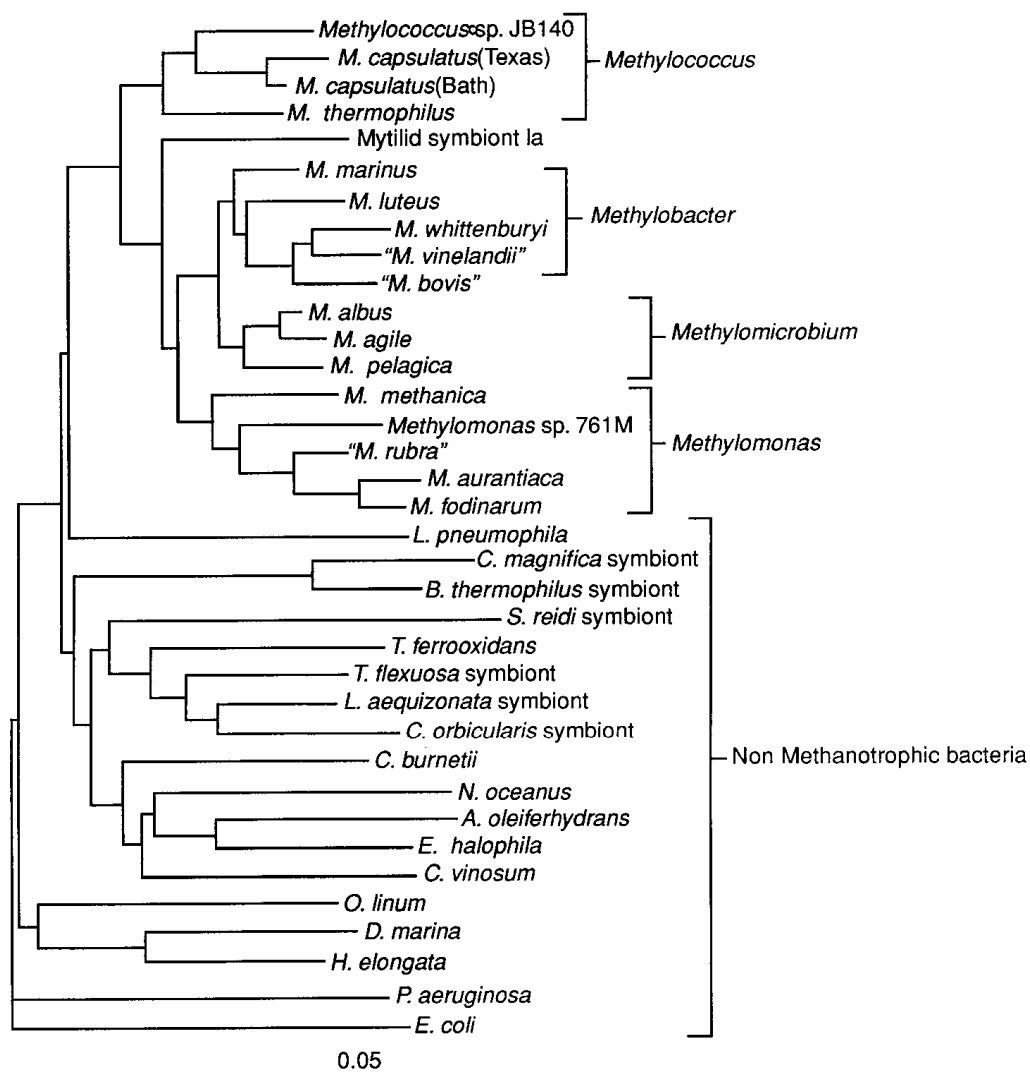
ตารางที่ 7 โพรบ (16s rRNA และ 5s rRNA) ที่ใช้ในการจำแนกเชื้อเมทิลโลโทรฟและเมทาโนโทรฟแบคทีเรียสกุลต่างๆ

Probe	Target group	Target Site	Sequence (3' → 5')
10γ	RuMP Methylophs, including Type I Methanotrophs	197-216	TTCGCCCCCTAGAAGCCTGG
MM650	Type I Methanotrophs	650-667	TGATCTCAACTCATCTCC
MM850	Type I Methanotrophs	850-869	AATCACCACCTCGATTGCAT
9α	Serine Methylophs, including Type II Methanotrophs	142-159	CAAGCCTTATTGAGTCCC
1034	Type II Methanotrophs	1034-1055	CGAAACCTGTACAGGCCATACC
Mγ669	<i>Methylobacter and Methylomonas</i>	669-690	CTCACCTTAAAGTCCACATCG
Mγ1004	<i>Methylomicrobium spp.</i>	1004-1022	TTAGACACTCTCTAGCAT
Mα450	<i>Methylosinus and Methylocystis</i>	450-470	CTATTACTGCCATGGACCTA
Mα84	Type I Methanotrophs	84-103	AGCCCGCGACTGCTCACC
Mα705	Type I Methanotrophs	705-724	CTAGACTTCCTTGTGGTC
Mcell-1026	<i>Methylocella palustris</i>	1026-1043	TGAAGCCCACCGCTCTTG
AcidM-181	<i>Methylocella palustris and Methylocapsa acidiphila</i>	181-198	GCAGGCGTTCCTCTTTCT
Mcaps-1032	<i>Methylocapsa acidiphila</i>	1032-1049	CTCGGCCCTGTGTCCAC
Msint-1268	<i>Methylosinus trichosporium</i>	1268-1285	TGGGCCTCGTTTAGAGGT
Msins-647	<i>Methylosinus sporium</i>	647-664	CCAGATCTCAGGCCCTCT
Mcyst-1432	<i>Methylocystis spp.</i>	1432-1449	TTCCGCAAAGCGGTTGGC

ที่มา : Bratina *et al.* (1992); Bruseau *et al.* (1994); Bulygina *et al.* (1990); Hanson *et al.* (1991); Tsien *et al.* (1990); Dedysh *et al.* (2001,2003); Eller *et al.* (2001)

นอกจากนี้ Bowman *et al.* (1995) ยังอาศัยกลุ่มยีน 16s rRNA และ 5s rRNA ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในตระกูลเมทิลโลคอคคาเซ (Family Methylococcaceae) เพื่อใช้ในการจำแนกในแต่ละสกุล (genus) ของเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 โดยพบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ประกอบไปด้วย *Methylococcus spp.*, *Methylobacter spp.*, *Methylomicrobium spp.* และ *Methylomonas spp.* ดังแสดงในภาพที่ 4 และสำหรับเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 นั้นประกอบไปด้วยสกุล *Methylosinus spp.*, *Methylocystis spp.*, *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* (Bowman, 1995;

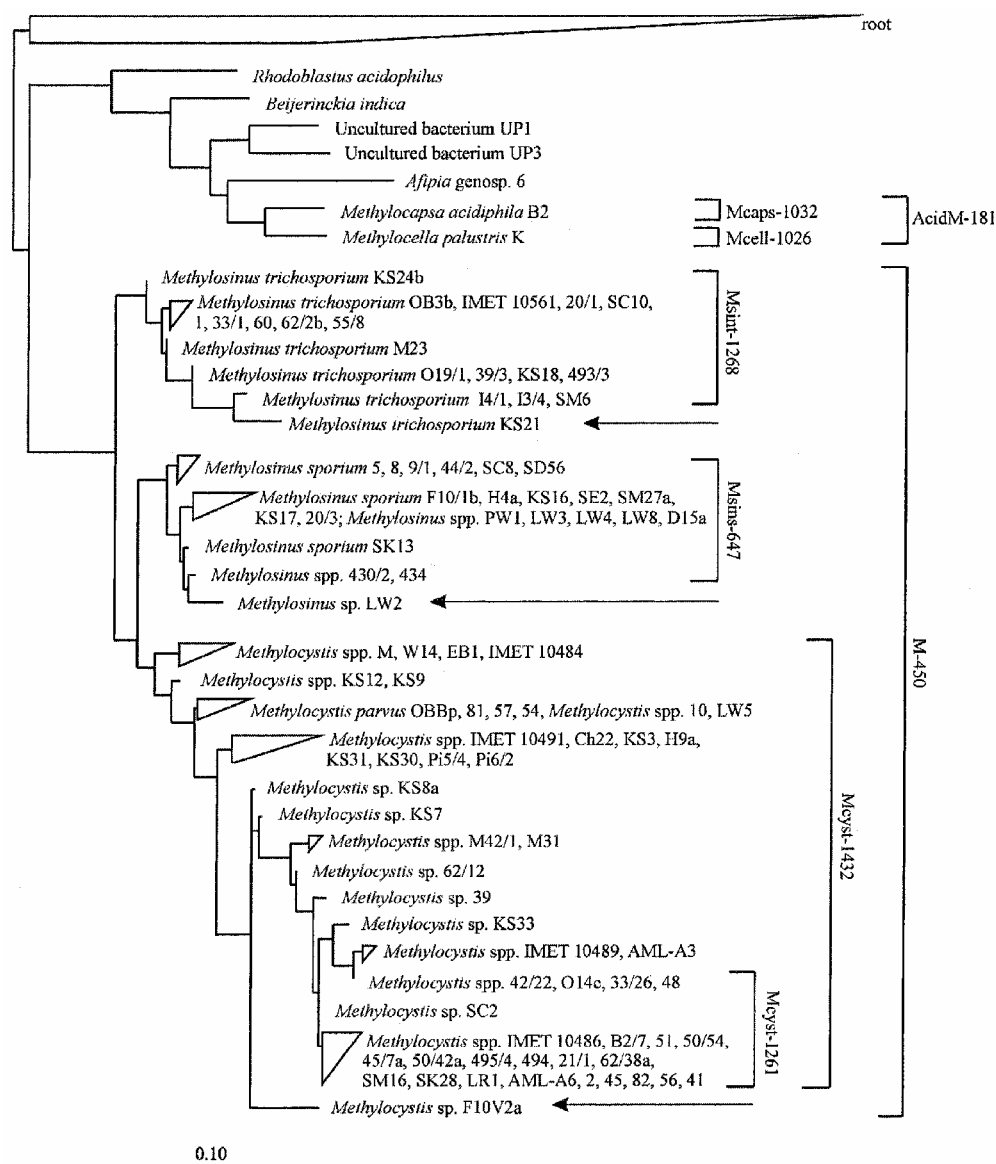
Dedysh *et al.*, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 5 โดย 16s rRNA และ 5s rRNA ที่ใช้ในการจำแนกสกุล (genus) ต่างๆของเชื้อเมทาโทรฟนีดังแสดงในตารางที่ 7



ภาพที่ 4 Phylogenetic Tree ของแบคทีเรียตระกูล Methylococcaceae และแบคทีเรียอื่นๆใน

γ Proteobacteria

ที่มา : Hanson and Hanson (1996)



ภาพที่ 5 Phylogenetic Tree ของเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ใน α Proteobacteria
ที่มา : Dedysh *et al.* (2003)

6.2 การตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟในสิ่งแวดล้อม

ในงานวิจัยที่ศึกษามาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับเชื้อเมทาโนโทรฟพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียในบริเวณต่างๆ ได้แก่ พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย พื้นที่ในนาข้าว ทะเลสาบ เป็นต้น โดยในงานวิจัยที่ศึกษาเมทาโนโทรฟแบคทีเรียในหน้าดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยจริง เช่น Nozhevnikova (1993) พบว่าในรัสเซียมีแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟทั้ง 2 แบบ

แสดงดังตารางที่ 8 โดยเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 มักพบในสภาพอากาศหนาวเย็น ส่วนงานวิจัยที่ศึกษาแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟในหน้าดินกลับทับจำลอง เช่น เชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 สามารถเจริญได้ดีในบริเวณด้านบนของคอลัมน์ดิน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนต่ำ ในขณะที่เชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 นั้นสามารถเจริญได้ดีในบริเวณด้านล่างของคอลัมน์ดินซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นก๊าซมีเทนสูงและมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำแต่อย่างไรอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยนั้นจะมีค่าลดลงตามระดับความลึกเนื่องด้วยข้อจำกัดทางด้านปริมาณออกซิเจน (Hanson and Hanson, 1996)

ตารางที่ 8 แบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟที่พบในหน้าดินกลับทับของหลุมฝังกลบมูลฝอยรัสเซีย

สปีชีส์	ชนิดแบคทีเรีย Methanotrophs	ความถี่ที่พบใน การสุ่มตัวอย่าง (ร้อยละ)	ความสามารถในการเจริญเติบโตที่ 6 °C (นับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้อง จุลทรรศน์)
<i>Methylococcus capsulatus</i>	II	30	-
<i>Methylomonas methanica</i>	I	0	-
<i>Methylomonas albus</i>	I	90	++
<i>Methylobacter bovis</i>	I	90	+++
<i>Methylobacter vinelandii</i>	I	0	-
<i>Methylobacter chroococcum</i>	I	95	+++
<i>Methylobacter capsulatus</i>	I	30	-
<i>Methylosinus sporium</i>	II	60	+
<i>Methylosinus triosporium</i>	II	30	-
<i>Methylocystis parvas</i>	II	100	+++
<i>Methylocystis minimus</i>	II	30	+
<i>Methylocystis methanolicus</i>	II	0	-
<i>Methylocystis periformis</i>	II	40	-
<i>Methylocystis echinoids</i>	II	70	+/-

หมายเหตุ (-) : 0 เซลล์, (+/-) : 1-2 เซลล์, (+) : 5-20 เซลล์, (++) : 20-50 เซลล์,
(+++): 50-100 เซลล์

ที่มา : Nozhevnikova (1993)

ในการศึกษาในพื้นที่ที่มีความเป็นกรดตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 สามารถเจริญได้ดีกว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 และพบเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 สายพันธุ์ *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญในพื้นที่ที่มีความเป็นกรดโดยเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 นี้สามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 5.5-6.7 (Dedysh *et al.*, 1998a) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Dunfield *et al.*, 1993 ยังพบว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ที่เป็นกรดนั้นสามารถเกิดได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 6-7 โดยในการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟโดยวิธีพีชในพื้นที่ที่มีความเป็นกรดระหว่าง 4-4.5 สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนโทรฟชนิดต่างๆดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟที่ตรวจพบในพื้นที่ที่มีความเป็นกรดโดยวิธีพีช

พื้นที่ที่ทำการศึกษา	จำนวนเซลล์ที่ตรวจพบในโพรบต่างๆ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อกรัมดินเปียก)				
	MX450	Mcyst-1432	Mcaps-1032	Mcell-1026	MY84+MY705
ไซบีเรียตอนใต้	180 $\pm$ 10.0	180 $\pm$ 10.0	14 $\pm$ 5.0	119 $\pm$ 11.0	0.2 $\pm$ 0.2
เยอรมันนีตอนเหนือ	570 $\pm$ 60.0	550 $\pm$ 6.0	14 $\pm$ 9.0	6 $\pm$ 4.0	6.1 $\pm$ 3.6

ที่มา : Dedysh *et al.* (2003)

7. ฟลูออเรสเซนส์อินซิทูไฮบริไดเซชัน

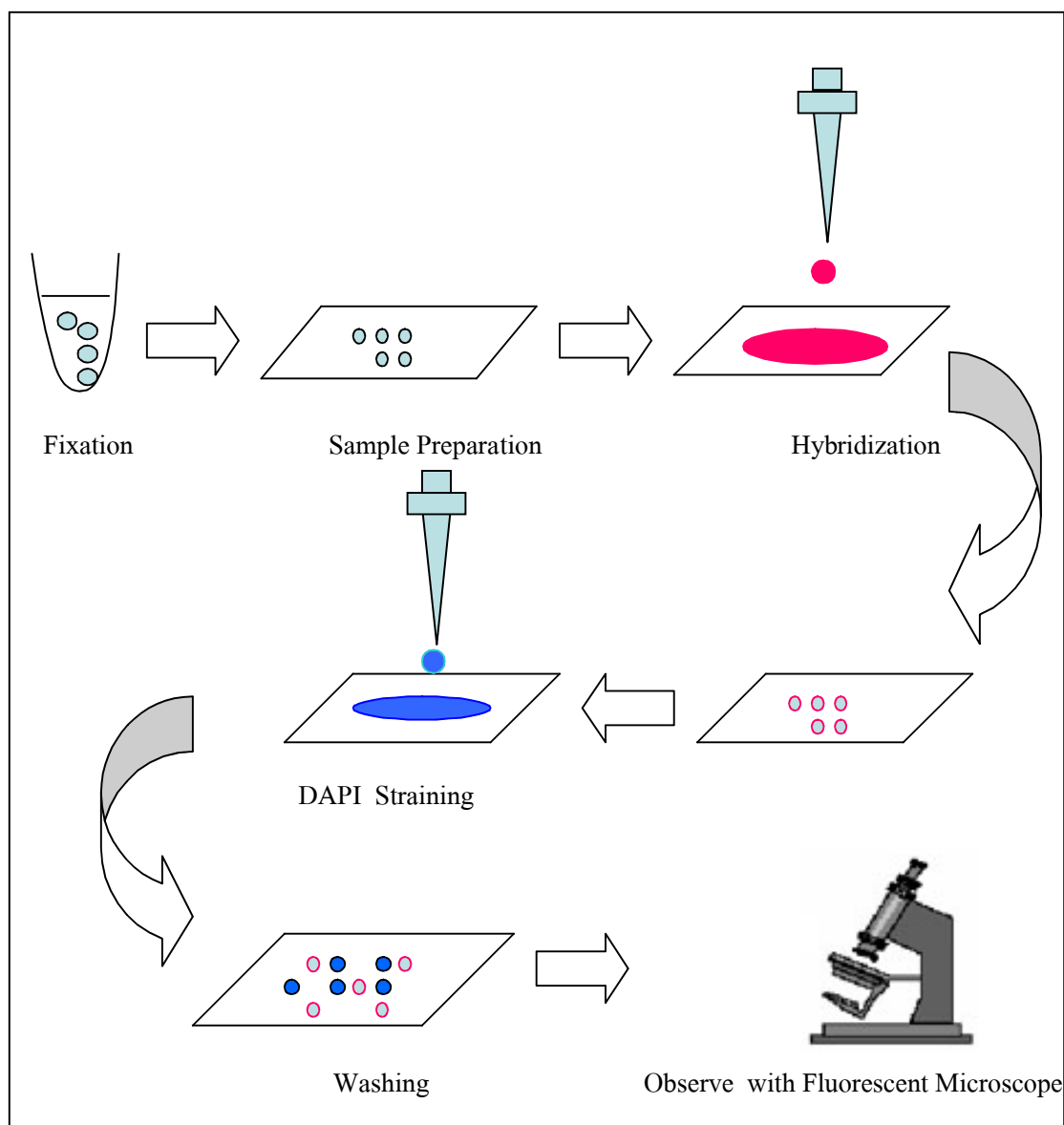
เทคนิคการทำฟลูออเรสเซนส์อินซิทูไฮบริไดเซชันหรือฟิช (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) นั้นเป็นวิธีการในการตรวจหาชนิดของจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมและยังมีความแม่นยำจำเพาะต่อจุลินทรีย์นั้นๆ โดยการใช้โพรบ (probe) ซึ่งโพรบที่ใช้นี้คือลำดับของเบสในสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาดังกล่าวโดยโพรบนี้จะทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่สามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสงเมื่อถูกซึมหรือกระทบเข้ากับพลังงานสูง เช่น แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื่อดังกล่าวในเชิงปริมาณของเชื่อดังกล่าว

การใช้โพรบติดฉลากเข้าจับกับกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ เกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อปี 1969 โดย Gall และ John ได้ใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารรังสี (Gall *et al.*, 1969) ต่อมาปี 1980 Bauman ได้พัฒนาการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงแทนการใช้สารรังสีเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างสารรังสีและสารปลดปล่อยที่สามารถเรืองแสงแล้ว สารเรืองแสงจะช่วยให้ทำงานได้สะดวก รวดเร็วและมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น สัญญาณมีความคมชัดมากขึ้นและมีความคงตัวมากกว่า (Bauman *et al.*, 1980) ในปลายปี ค.ศ. 1980 ได้มีการใช้โพรบหลายประเภทติดฉลากเรืองแสงแต่ที่นิยมในงานพืชเป็นโพรบที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดออกซิจีนิน (digoxigenin) แล้วใช้อะวีดิน (avidin) หรือแอนติไดออกซิจีนิน (anti-digoxigenin) มาเชื่อมต่อกับสารเรืองแสงหรือโรดามีน (rhodamine) เข้าจับอีกชั้นหนึ่งเมื่อโพรบที่ติดสารเรืองแสงเข้าสร้างพันธะกับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายแล้วสามารถตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ภายในกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์

สำหรับการทำอินซิทูไฮบริไดเซชันนั้นสามารถทำได้โดยที่กรดนิวคลีอิกจะไม่ถูกแยกสกัดออกจากตัวอย่างตรวจโดยจะถูกรักษาให้อยู่ในสภาพเดิมของมันให้มากที่สุดและนำมาปะติดบนสไลด์ ในขั้นตอนของการทำไฮบริไดเซชันจะทำบนแผ่นสไลด์ซึ่งปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันจะเกิดขึ้นภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อจึงทำให้ทราบว่าในตัวอย่างดังกล่าวมีกรดนิวคลีอิกเป้าหมายหรือไม่พร้อมทั้งยังสามารถระบุตำแหน่งที่อยู่ของกรดนิวคลีอิกอีกด้วยหลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจมาทำการล้าง (washing) แล้วสามารถตรวจหาสัญญาณด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ทันทีดังแสดงในภาพที่ 6

แต่ในปัจจุบันการตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากโพรบที่ได้รับการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงโดยตรง ไม่เป็นปัญหาอีกต่อไปเนื่องจากมีอุปกรณ์การตรวจจับสัญญาณแสงที่มีความไวสูง เช่น cooled CCD cameras ที่ต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์ประสิทธิภาพสูงเพื่อช่วยในการขยายสัญญาณและประมวลผล การใช้โพรบติดฉลากสารเรืองแสงโดยตรงมีข้อที่ควรระวัง คือ แสงอาจจะอ่อนหรือจางลงในช่วงการทำไฮบริไดเซชัน (hybridization) จึงควรหลีกเลี่ยงไม่ให้กระทบกับแสงสว่างมากเกินไป

สำหรับโพรบที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อเมทาโนโทรฟที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้นั้นเป็นโพรบที่มีความจำเพาะต่อเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 (*Methylobacter* spp., *Methylobacter* spp., *Methylococcus* spp., *Methylobacterium* spp.) และชนิดที่ 2 (*Methylosinus* spp. และ *Methylocystis* spp.) นอกจากนี้ยังมีเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 อีกบางส่วนที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยโพรบ



ภาพที่ 6 เทคนิคการทำฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

ดังกล่าว คือ *Methylocella spp.* และ *Methylocapsa spp.* ดังนั้นจึงต้องใช้โพรบ Mcell-1026, Mcaps-1032 ในการตรวจหาปริมาณเชื้อดังกล่าวตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการศึกษแบคทีเรียชนิดไนโตรไฟอิงซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนรูปแอมโมเนียไนโตรเจนให้กลายเป็นไนไตรต์และไนเตรทซึ่งก็คือ *Nitrosomonas spp.* และ *Nitrobacter spp.* ตามลำดับ โดยรายละเอียดของโพรบที่ใช้นั้นดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 โพรบที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีการฟลูออเรสเซนส์อินซิทูไฮบริไดเซชัน

Probe	Target group	Target Site	Formamide in FISH (%)	Probe and Target sequence	Reference
MY84	Type I Methanotroph	84-103	20	Probe : 3' AGCCCGCGACTGCTCACC 5' Target :5' UCGGGCGCUGACGAGUGG 3'	Eller <i>et al.</i> , 2001
MY705	Type I Methanotroph	705-724	20	Probe : 3' CTAGACTTCCTTGTGGTC 5' Target :5' GAUCUGAAGGAACACCAG 3'	Eller <i>et al.</i> , 2001
MO450	Type II Methanotroph	450-470	20	Probe : 3' CTATTACTGCCATGGACCTA 5' Target :5' GAUAAUGACGGUACCUUGAU 3'	Eller <i>et al.</i> , 2001
Mcell-1026	<i>Methylocella palustris</i>	1026-1043	0	Probe : 3' GTTCTCGCCACCCGAAAGT 5' Target :5' CAAGAGCGGTGGGCTTCA 3'	Dedysh <i>et al.</i> , 2001
Mcaps-1032	<i>Methylocapsa acidiphila</i>	1032-1049	0	Probe : 3' CACCTGTGTCCTGGGCTC 5' Target :5' GTGGACACAGGGACCCGAG 3'	Dedysh <i>et al.</i> , 2003
NSM-156	<i>Nitrosomonas spp.</i>	156 - 174	5	Probe :3' TATTAGCACATCTTTTCGAT 5' Target :5' ATAATCGGTAGAAAAGCTA 3'	Mobarry <i>et al.</i> ,1996
NIT-3	<i>Nitrobacter spp.</i>	1032 - 1052	40	Probe :3' CCAGTGCTCCATGCTCCG 5' Target :5' GGTCACGAGGTACGGGC 3'	Wagner <i>et al.</i> , 1996

8. ข้อมูลทั่วไปของพื้นที่ทำการศึกษา

8.1 ข้อมูลทั่วไปของจังหวัดปทุมธานี

ปทุมธานีเป็นจังหวัดในภาคกลางของประเทศไทยพื้นที่ส่วนใหญ่ของจังหวัดเป็นที่ราบลุ่มริมสองฝั่งแม่น้ำโดยมีแม่น้ำเจ้าพระยาไหลผ่านใจกลางจังหวัดในเขตอำเภอเมืองปทุมธานีและอำเภอสามโคก ทำให้พื้นที่ของจังหวัดปทุมธานีถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ฝั่งตะวันตกของจังหวัดหรือบนฝั่งขวาของแม่น้ำเจ้าพระยา ได้แก่ พื้นที่ในเขตอำเภอลาดหลุมแก้วกับพื้นที่บางส่วนของอำเภอเมืองและอำเภอสามโคก กับฝั่งตะวันออกของจังหวัดหรือบนฝั่งซ้ายของแม่น้ำเจ้าพระยา ได้แก่ พื้นที่อำเภอเมืองบางส่วนของอำเภอธัญบุรี อำเภอลองหลวง อำเภอหนองเสือ อำเภอลำลูกกาและบางส่วนของอำเภอสามโคก

โดยปกติระดับน้ำในแม่น้ำเจ้าพระยาในฤดูฝนจะเพิ่มสูงขึ้นเฉลี่ยประมาณ 50 เซนติเมตร ซึ่งทำให้เกิดภาวะน้ำท่วมในบริเวณพื้นที่ราบริมฝั่งแม่น้ำเจ้าพระยาเป็นบริเวณกว้างและก่อให้เกิดปัญหาอุทกภัยในพื้นที่ฝั่งขวาของแม่น้ำเจ้าพระยาสำหรับพื้นที่ทางฝั่งซ้ายของแม่น้ำเจ้าพระยานั้นเนื่องจากประกอบด้วยคลองซอยเป็นคลองชลประทานจำนวนมากจึงสามารถควบคุมปริมาณน้ำได้ทำให้ปัญหาเกี่ยวกับอุทกภัยในบริเวณดังกล่าวมีน้อยกว่า

จังหวัดปทุมธานีอยู่ห่างจากกรุงเทพฯ ประมาณ 46 กิโลเมตร และมีพื้นที่ทั้งหมดประมาณ 1,565.856 ตารางกิโลเมตร แบ่งเขตการปกครองออกเป็น 7 อำเภอ คือ อำเภอเมืองปทุมธานี อำเภอสามโคก อำเภอลาดหลุมแก้ว อำเภอธัญบุรี อำเภอหนองเสือ อำเภอลองหลวงและอำเภอลำลูกกา โดยจำนวนประชากรของทั้งจังหวัดประมาณ 731,711 คน (ที่ทำการปกครองจังหวัดปทุมธานี, 2547)

8.2 ปริมาณมูลฝอยในเขตเทศบาลเมืองปทุมธานี

เทศบาลเมืองปทุมธานี ตั้งอยู่ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี มีพื้นที่ 38.90 ตารางกิโลเมตร มีจำนวนประชากรทั้งสิ้น 18,916 คน จำนวนครัวเรือน 5,324 ครัวเรือน ภายในเขตเทศบาลฯ มีปริมาณขยะมูลฝอยเกิดขึ้นเฉลี่ยประมาณวันละ 34.05 ตัน สำหรับอัตราการเกิดขยะมูลฝอยของเทศบาลเมืองปทุมธานีมีอัตราเท่ากับ 1.80 กิโลกรัมต่อคนต่อวัน การจัดการขยะมูลฝอยที่เกิดขึ้นในปัจจุบันกำจัดโดยการฝังกลบอย่างถูกสุขลักษณะ บริเวณสถานที่กำจัดขยะมูลฝอยของ

เทศบาลเมืองปทุมธานี ตั้งอยู่หมู่ 4 ตำบลบ่อเงินอ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี (กรมควบคุมมลพิษ, 2546)

8.3 ลักษณะสมบัติของมูลฝอยในเขตเทศบาลเมืองปทุมธานี

สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของมูลฝอยในเขตเทศบาลเมืองปทุมธานีพบว่า องค์ประกอบของมูลฝอยในเขตเทศบาลเมืองปทุมธานีมีปริมาณของเศษอาหาร เศษกระดาษ พลาสติก เศษแก้ว อลูมิเนียม เหล็กไม้ ยาง เศษผ้า หนังสือ ถ่านไฟฉาย แบตเตอรี่ โทรศัพท์ หลอดไฟฟ้าและอื่นๆดังแสดงในตารางที่ 11 และเมื่อนำเอามูลฝอยดังกล่าวทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่ามีความชื้นเท่ากับ (MC%) เท่ากับร้อยละ 54.73 ปริมาณของแข็งรวมทั้งหมด (TS%) เท่ากับร้อยละ 45.27 ปริมาณของของแข็งระเหยทั้งหมด (VS%) เท่ากับร้อยละ 89.51 ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (C%) เท่ากับร้อยละ 49.73 ปริมาณไฮโดรเจนทั้งหมด (H%) เท่ากับร้อยละ 5.59 ปริมาณออกซิเจนทั้งหมด (O%) เท่ากับร้อยละ 33.63 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (N%) เท่ากับร้อยละ 0.27 ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (P%) เท่ากับร้อยละ 0.28 ปริมาณซัลเฟอร์ (S%) เท่ากับร้อยละ 0.001 และปริมาณความร้อน (Heat of combustion) มีค่าเท่ากับ 4,589.99 แคลอรีต่อกรัม (กรมควบคุมมลพิษ, 2546)

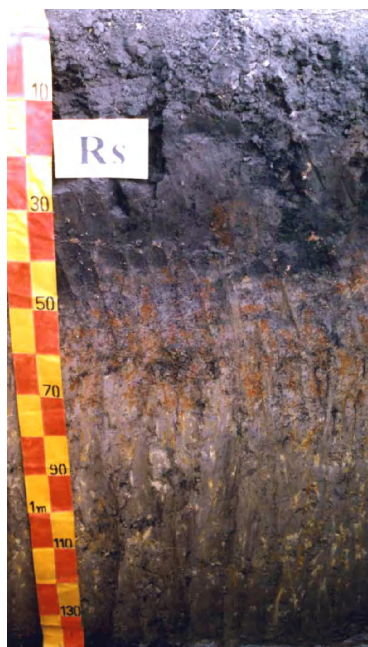
ตารางที่ 11 องค์ประกอบของมูลฝอยในเขตเทศบาลเมืองปทุมธานี

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)	องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
เศษอาหาร	63.36	ยาง	0.53
เศษกระดาษ	2.57	เศษผ้า	1.82
พลาสติก	24.25	หนังสือ	0.02
เศษแก้ว	1.09	ถ่านไฟฉาย, แบตเตอรี่	0.01
อลูมิเนียม	0.62	หลอดไฟฟ้า	0.01
เหล็ก	1.06	อื่นๆ	4.87
ไม้	0.34		
รวม	93.72	รวม	6.28

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ, (2546)

8.4 สถานกำจัดมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี

สถานกำจัดมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี เป็นพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยแบบถูกสุขลักษณะตั้งอยู่บริเวณหมู่ 4 ตำบลบ่อเงิน อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี โดยรองรับปริมาณมูลฝอยที่เกิดขึ้นในพื้นที่เขตเทศบาลต่างๆ ในจังหวัดปทุมธานี โดยพื้นที่ที่ทำการศึกษานั้นเป็นพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีอายุการใช้งานประมาณ 8 ปี และปิดการใช้งานไปแล้วตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 พื้นที่ฝังกลบมูลฝอยดังกล่าวเป็นแบบถมที่เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีระดับน้ำใต้ดินสูง โดยดินที่นำมาใช้ในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยดังกล่าวเป็นดินในพื้นที่ดังกล่าว โดยจากการสำรวจของสำนักสำรวจดินและวางแผนการใช้ที่ดินพบว่าดินมีลักษณะเป็นดินเหนียวจัด สภาพดินเป็นกรดปานกลางถึงเป็นกรดจัดมีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 4-6 และเรียกกลุ่มดินดังกล่าวว่าชุดดินรังสิต โดยบริเวณด้านบนซึ่งมีความลึกประมาณ 0-50 เซนติเมตรจะมีลักษณะเนื้อดินเป็นดินเหนียวสีดำหรือสีเทาเข้มและมีจุดสีประเป็นสีน้ำตาลปนเหลือง ปฏิกริยาดินเป็นกรดจัดมากถึงกรดจัด (pH 4.0–5.0) และมักมีรอยแตกแหว่งที่ผิวหน้าดินในฤดูแล้ง ส่วนดินตอนล่างซึ่งเป็นดินที่มีความลึกตั้งแต่ 100 เซนติเมตรลงไปจะมีสีน้ำตาลปนเทาหรือน้ำตาลปนเทาเข้มมีจุดสีประเป็นสีแดงหรือสีแดงปนเหลือง สำหรับดินตอนล่างมีลักษณะเป็นดินเหนียวหรือดินเลนและมีปฏิกริยาเป็นกรดจัดมาก (pH < 4.0) ดังแสดงในภาพที่ 7 (สธิระ, 2542)



ภาพที่ 7 ลักษณะของชุดดินรังสิตที่ใช้ในการกลบทับพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษา
ที่มา : สธิระ (2542)

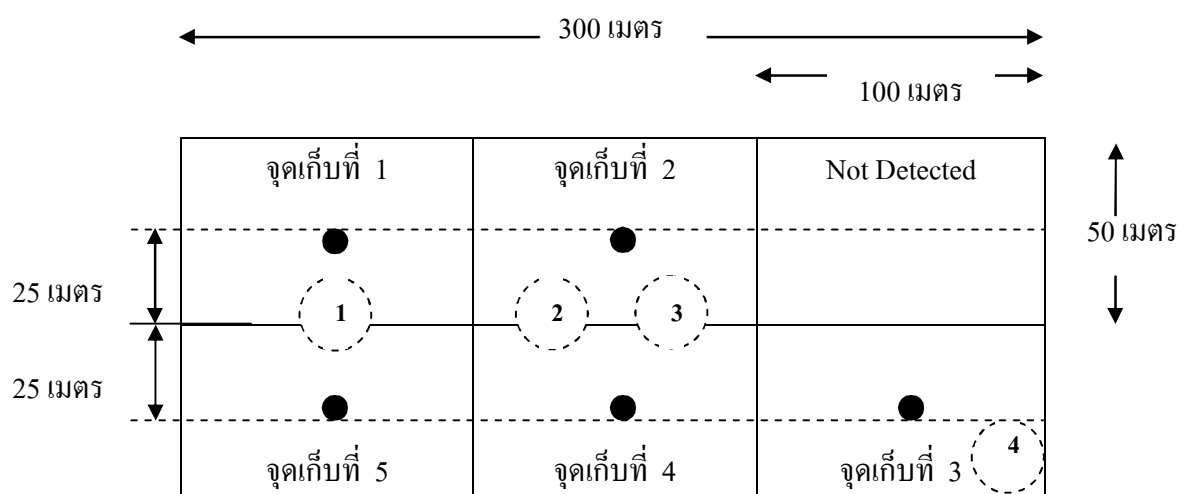
อุปกรณ์และวิธีการ

สำหรับการวิจัยครั้งนี้เป็นการจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีผลต่อการเกิดมีเทนออกซิเดชัน โดยในงานวิจัยครั้งนี้ประกอบไปด้วยอุปกรณ์และวิธีการดังต่อไปนี้

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดินสำหรับการทดลอง

ในการดำเนินการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยของสถานกำจัดมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยของจังหวัดปทุมธานีที่มีอายุการใช้งาน 8 ปีและมีขนาดพื้นที่ 30,000 ตารางเมตร (100 X 300 ตารางเมตร) ดังแสดงในภาคผนวกที่ ก1 และ ก2 โดยได้ทำการศึกษาที่ระดับความลึกต่างๆ คือ 0–15, 16–30, 31–45, และ 46–60 เซนติเมตร ในการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยนี้ได้ดำเนินการเก็บในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน โดยอาศัยเครื่อง Core soccer ในการขุดเจาะเพื่อเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึกดังกล่าวและทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มทั้งหมด 5 จุดด้วยกันโดยตำแหน่งและบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างดินและก๊าซจากปากท่อระบายก๊าซนั้นดังแสดงในภาพที่ 8 หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างดินดังกล่าวมาวิเคราะห์ลักษณะสมบัติต่างๆทางเคมีเบื้องต้นทันทีและเก็บรักษาตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาและกิจกรรมของเชื้อเมทาโนโทรฟต่อไป (APHA,1997)



ภาพที่ 8 ตำแหน่งดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยและปากท่อระบายก๊าซที่ทำการศึกษา

2. ก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) รุ่น GC 6890 Agilent Technologies Model : G 1530A

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซ

ช่องนำตัวอย่างชนิด EPC Purged Packed Inlet ตั้งอุณหภูมิที่ 105 °ซ คอลัมน์ยี่ห้อ Alltech CTRT (Part No. 8700) อุณหภูมิของคอลัมน์ 35 °ซ อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อนาที และช่วงเวลาในการวิเคราะห์นาน 11 นาที และใช้ดีเทกเตอร์ (Detector) ชนิดทีซีดี (TCD ; Thermal Conductivity Detector) อุณหภูมิของ Detector เท่ากับ 150 °ซ

3. ก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 99.9 ซึ่งเป็น standard gas ใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับจุลินทรีย์
4. ขวดซีรัมขนาด 20 และ 118 มิลลิลิตร
5. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ยี่ห้อ OLYMPUS
6. โพรปชนิดต่างๆ สั่งเคราะห์จากบริษัท Bioservice Unit
7. สไลด์ชนิดหลุมขนาด 14 หลุม
8. เครื่อง Laminar Flow Biological Safety Cabinets (Class II)
9. เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด ยี่ห้อ Precisa รุ่น 240A

10. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Metrohm
11. ตู้อบ 105 °ซ ยี่ห้อ Memmert
12. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000U
13. เครื่องวิเคราะห์เจดดาห์ไนโตรเจน (Kjedahl Nitrogen)
14. เครื่อง Ultrasonic
15. ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิต่ำ -20 °ซ
16. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ยี่ห้อ Yamato
17. อ่างต้มน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert
18. โถสุญญากาศ (Desicator)

วิธีการ

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเมทาโนโทรฟที่มีบทบาทในการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย โดยได้ทำการจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีการต่างๆเพื่อหาความสัมพันธ์กับการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ส่วนด้วยกัน นอกจากนี้ภายหลังจากการทำการทดลองเป็นระยะเวลา 1 ปีจึงเก็บก๊าซบริเวณปากท่อระบายก๊าซในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยดังกล่าวในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2549 เพื่อตรวจสอบปริมาณก๊าซที่ปล่อยออกมาจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยดังกล่าว โดยได้ทำการเก็บก๊าซในบริเวณที่ลึกลงไปจากปล่องระบายก๊าซประมาณ 1 เมตรและนำก๊าซมาจำแนกองค์ประกอบของก๊าซในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph)

1. การศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพและทางเคมีในดินของพื้นที่ที่ทำการศึกษา

ในการศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีในดินกลบชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ทำการศึกษาอุณหภูมิ (Temperature) ความชื้น (Moisture Content) ความเป็นกรดด่าง (pH) ประเภทของดิน (Soil Texture) แอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) อินทรีย์ไนโตรเจน (Organic-N) ไนไตรต์ไนโตรเจน ($\text{NO}_2\text{-N}$) ไนเตรตไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) ไนโตรเจนทั้งหมด (TN) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP) ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC) และปริมาณเอ็กสัค

ราเซลล์ูลาโพลีแซคคาไรด์ (Extracellular Polysaccharides, EPS) โดยวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 รายละเอียดพารามิเตอร์และวิธีการในการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
Temperature	Thermometer
Moisture Content	Gravimetric Method
Soil Texture	Hydrometer Method
pH	pH Meter
Organic-N	Total N - [(NH ₃ -N) + (NO ₂ -N) + (NO ₃ -N)]
NH ₃ -N	Colorimetric Method
NO ₂ -N	Colorimetric Method
NO ₃ -N	Colorimetric Method
Total N	Colorimetric Method
Total PO ₄ ⁻³	Acid digestion-ascorbic Acid
Total Organic Carbon	Colorimetric Method
Extracellular Polysaccharides ,EPS	Colorimetric Method

ที่มา : APHA (1997) ; Lowe (1993)

2. การศึกษาความสามารถในการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

ในการศึกษามีเทนออกซิเดชันได้ดำเนินการศึกษาตามวิธีการที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ (Kightley *et al.*, 1995) กล่าวคือ นำตัวอย่างดินสดหนัก 10 กรัม ใส่ลงในขวดซีรัมขนาด 118 มิลลิลิตรแล้วจึงปิดปากขวดด้วยจุกยางและรัดด้วยฝาอลูมิเนียมให้แน่นก่อนฉีดก๊าซมีเทนที่ความเข้มข้นร้อยละ 99.9 ลงไป 12 มิลลิลิตรเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศภายในขวดมีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรของขวด หลังจากนั้นจึงใช้แผ่นพาราฟิล์มปิดปากขวดอีกครั้งหนึ่งเพื่อป้องกันก๊าซภายในขวดซีรัมออกมาด้านนอกขวดและจึงทำการตรวจวัดองค์ประกอบของก๊าซภายในขวดเริ่มต้นและทุกๆ 3 วันจนกว่าปริมาณก๊าซมีเทนภายในขวดที่

ทำการศึกษาลดลงจนเป็นศูนย์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของก๊าซภายในขวดด้วยวิธีเครื่องแกสโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) โดยในการทดลองหาค่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันดังกล่าวได้ทำการทดลองแบบ 2 ซ้ำต่อตัวอย่างและหาค่าเฉลี่ยของปริมาณก๊าซมีเทนที่ลดลงจากตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้ง 5 จุด ก่อนนำค่าดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันโดยการพลอตกราฟระหว่างปริมาณมีเทนกับเวลา โดยในการวัดอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันนี้ทำการวัดเฉพาะช่วงที่มีการเกิดปฏิกิริยาลำดับศูนย์ (Zero Reaction) ค่าที่ได้จากการเกิดอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันดังกล่าวเป็นค่าสูงสุดบนพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย

3. การตรวจหาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีโสมพรอบเอเบิลนัมเบอร์ (เอ็มพีเอ็น)

ในการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีการโสมพรอบเอเบิลนัมเบอร์หรือเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number, MPN) นั้นเป็นการศึกษาหาปริมาณเชื้อที่ทำการศึกษาทั้งหมดโดยการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามวิธีของ ASA (1982) โดยการนำตัวอย่างดินสด 1 กรัมใส่ในน้ำเกลือสำหรับเชื้อจาง (NaCl 0.85%) 9.5 มิลลิลิตร ปิดฝาและนำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาทีที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วจึงนำสารละลายที่สกัดได้มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 10^0 - 10^{-6} (จำนวน 7 เท่า) โดยทำในระบบ 3 หลอดแล้วจึงดูดสารละลายดินเชื้อจาง 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดอาหารซีรัมขนาด 20 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวชนิดไนเตรทมิเนอร์รัลซอลท์หรือเอ็นเอ็มเอสอยู่ 5 มิลลิลิตร (Nitrate Mineral Salt Medium, NMS Medium) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้อุณหภูมิและความดันสูงเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นเจริญภายในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยอาหารเหลวเอ็นเอ็มเอสนี้จัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่เป็นกลางเนื่องจากมีค่าความเป็นกรดค่าที่ 8.3 หลังจากนั้นจึงปิดฝาขวดและฉีดก๊าซมีเทนที่ความเข้มข้นร้อยละ 99.9 ลงไป 2 มิลลิลิตรเพื่อให้ความเข้มข้นของบรรยากาศภายในขวดมีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรของขวด แล้วจึงทำการตรวจวัดองค์ประกอบของก๊าซภายในขวดเริ่มต้นด้วยเครื่องวิเคราะห์ก๊าซ (Gas Chromatography) แล้วจึงเก็บขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °C) นาน 45 วัน และทำการตรวจวัดองค์ประกอบของก๊าซอีกครั้งเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของก๊าซที่เกิดขึ้นภายในขวด (ASA, 1982) ก่อนนำค่าผลจำนวนขวดทดลองที่มีการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟที่ความเข้มข้นใดๆ ไปเปรียบเทียบกับตารางเอ็มพีเอ็นมาตรฐานหรือสามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 8

$$\text{MPN / g Soil} = \frac{\text{จำนวนขวดที่ให้ผลบวก} \times \text{ปริมาตรน้ำเชื้อจางที่ใช้ (ml.)}}{\text{[ปริมาตรตัวอย่างที่ให้ผลลบ(ml) x ปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด(ml)]}^{0.5} \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)}} \quad (8)$$

$$\text{[ปริมาตรตัวอย่างที่ให้ผลลบ(ml) x ปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด(ml)]}^{0.5} \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)}$$

4. การตรวจหาปริมาณและจำแนกเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 , 2 และแบคทีเรียชนิดไนโตรไฟอิง ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

ในการศึกษาเชื้อเมทาโนโทรฟในเชิงปริมาณด้วยวิธีการฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันหรือฟิช (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) นั้นได้อาศัยวิธีการของ Amann and Ludwig (2000) สามารถทำได้โดยการนำดินสด 3 กรัมใส่ในน้ำเกลือสำหรับเชื้อจาง (NaCl 0.85%) 9.5 มิลลิลิตร ปิดฝาและนำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาทีที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีและนำสารละลายที่สกัดได้ทำการปั่นเป็นเนื้อเดียว (Homogenizer) เพื่อบดย่อยอนุภาคดินให้ละเอียดมากยิ่งขึ้นและทำการปั่นตกที่ความเร็วรอบ 10000 xg

ดูดส่วนใสจากสารละลายดินที่สกัดออกมา 300 ไมโครลิตรลงใน 900 ไมโครลิตรของ 4% paraformaldehyde (เตรียมใน 3 PBS, pH 7.2) เพื่อตรึงเซลล์แล้วจึงนำตัวอย่างดังกล่าวเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้าง 3 PBS ด้วย 1 PBS โดยทำการปั่นตกและดูดส่วนใสออกประมาณ 3 ครั้ง แล้วจึงเติมเอทานอลและ 1 PBS ในอัตราส่วน 1 : 1 จึงจะสามารถคงสภาพเซลล์เพื่อเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ ไว้ได้นาน 3 เดือน (Eller *et al.*, 2001)

เมื่อต้องการวิเคราะห์นำสารละลายดังกล่าว 3 ไมโครลิตรหยดลงบนสไลด์แบบหลุมที่ผ่านการเคลือบเจลาตินให้กระจายทั่วหลุมปล่อยให้แห้งแล้วจึงทำให้เซลล์แห้งโดยการจุ่มสไลด์ลงในเอทานอลที่ความเข้มข้น 50, 80 และ 98% นานอย่างละ 3 นาที ตามลำดับ แล้วจึงทำการไฮบริไดเซชัน (สร้างพันธะอย่างจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างโพรบที่ทำการศึกษากับเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยในตัวอย่างดิน) ด้วยการเติม Hybridization Buffer 8 ไมโครลิตรและโพรบที่ทำการศึกษา 1 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุมของสไลด์โดยโพรบที่ทำการศึกษา ได้แก่ NSM-156, NIT-3, MY84+MY705, M0450, Mcell-1026 และ Mcap-1032 โดยรายละเอียดของโพรบที่ทำการศึกษาได้แสดงไว้ในตารางที่ 10 หลังจากนั้นจึงนำสไลด์ดังกล่าวใส่ใน 50 มิลลิลิตร plastic centrifuge tube ที่ภายในมีกระดาษที่ชุ่มไปด้วย Hybridization Buffer ที่มีความเหมาะสมต่อโพรบดังกล่าวแล้วจึงนำไปอบภายใต้อุณหภูมิ Hybridization เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ภายหลังจากทำการไฮน์บริดเซลล์ด้วยโพรปที่ทำการศึกษาแล้วจึงล้างโพรปด้วย 500 ไมโครลิตรของ Washing Buffer และนำสไลด์ดังกล่าวจุ่มลงใน Washing Buffer และนำไปใส่ในอ่างต้มน้ำที่อุณหภูมิ Washing เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อกำจัดโพรปส่วนเกินที่ไม่เกิดพันธะกับลำดับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ภายในเซลล์ที่ทำการศึกษา หลังจากนั้นจึงใช้ Milli Q Water (น้ำกลั่นที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรและนั่งภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง) ในการล้างอีกครั้งแล้วปล่อยให้แห้งก่อนหยด DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 10 ไมโครลิตรเพื่อติดตามเชื้อทั้งหมดที่อาศัยอยู่ในตัวอย่างดินกลบทับชั้นสุดท้าย (Total Microorganisms) ย้อมทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีและล้างออกด้วย Milli Q Water อีกครั้งก่อนปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงหยด SlowFade – Light เพื่อป้องกันการหนี (Fade) ของแสงลงในแต่ละหลุมของสไลด์ก่อนปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover Slip) และนำไปตรวจวัดการเรืองแสงของเชื้อที่ทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์

ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเชื้อแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟที่อาศัยอยู่ในบริเวณดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยขนาด 30,000 ตารางเมตรที่มีอายุการใช้งานประมาณ 8 ปีและทำการปิดพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยดังกล่าวเมื่อปี พ.ศ. 2546 โดยได้ทำการศึกษาดินกลบทับชั้นสุดท้ายที่ระดับความลึกต่างๆ คือ 0–15 เซนติเมตร, 16–30 เซนติเมตร, 31–45 เซนติเมตร และ 46–60 เซนติเมตร

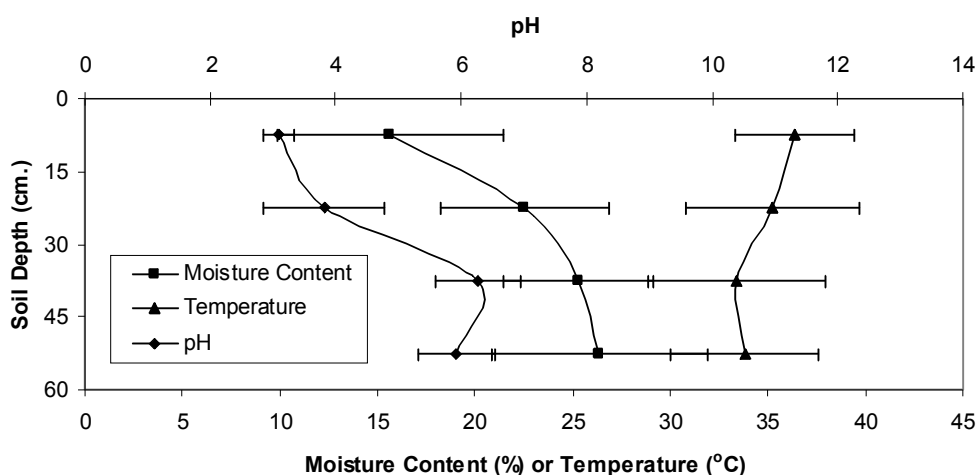
ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันกับเชื้อแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 และ 2 ในเชิงปริมาณโดยวิธีเอ็มพีเอ็นและพีชที่ระดับความลึกดังกล่าว ทั้งนี้ยังทำการศึกษาแบคทีเรียชนิดไนตริไฟอิงซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในการลดปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียดังกล่าวซึ่งต่อต้านปฏิกิริยาการเกิดมีเทนออกซิเดชัน โดยในการศึกษาเชื้อเมทาโนโทรฟในเชิงปริมาณนั้นได้ทำการศึกษาด้วย 2 วิธีการด้วยกัน คือ วิธีเอ็มพีเอ็นและวิธีพีช นอกจากนี้ยังทำการศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาโดยผลการทดลองดังกล่าวดังจะได้นำเสนอต่อไป

1. ลักษณะทางกายภาพและเคมีที่สำคัญของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟ

ในเบื้องต้นได้ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี พบว่าคุณลักษณะของดินที่ทำการศึกษาดังกล่าวมีค่าความเป็นกรดสูงในดินระดับบน กล่าวคือ ที่ระดับความลึก 0–15 เซนติเมตร และ 16–30 เซนติเมตร มีค่า 3.09 ± 0.24 และ 3.82 ± 0.96 ตามลำดับ ส่วนดินในระดับล่างมีความเป็นกรดอ่อนคือ ที่ระดับความลึก 31–45 เซนติเมตร และ 46–60 เซนติเมตร มีค่า 6.27 ± 0.69 และ 5.93 ± 0.60 ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อเมทาโนโทรฟเจริญได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง คือ 6.5 – 7.5 (Whittenbry *et al.*, 1970) ดังนั้นความเป็นกรดของดินอาจเป็นข้อจำกัดต่อปริมาณและชนิดของเชื้อเมทาโนโทรฟในหน้าดินนี้ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าผลการวิเคราะห์ความเป็นกรดดังกล่าวนี้อาจสัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์ชุดดินรังสีของสำนักสำรวจดินและวางแผนการใช้ที่ดินได้กล่าวมาข้างต้นแต่ที่ระดับความลึกด้านล่าง คือ 31–60 เซนติเมตร จะเห็นได้ว่าดินมีความเป็นกรด

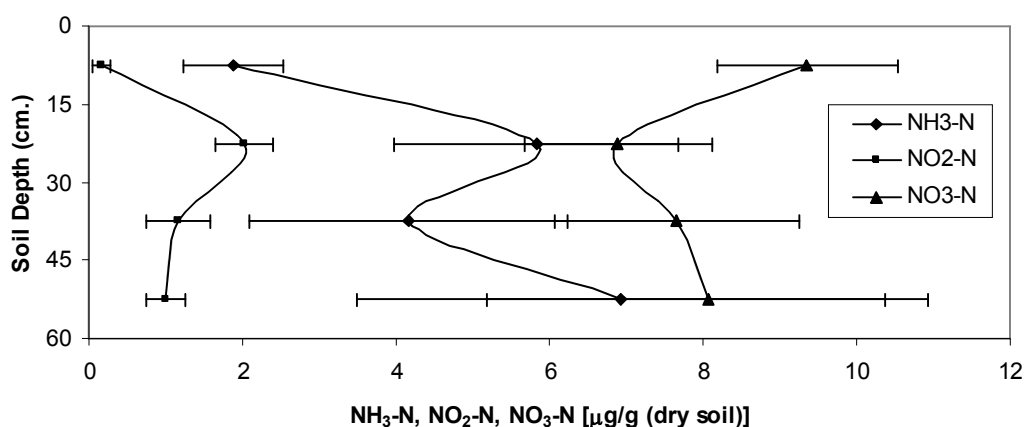
อ่อนทั้งนี้ น่าจะมีสาเหตุเนื่องมาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในดิน กล่าวคือ ในกระบวนการย่อยสลาย มูลฝอยและกิจกรรมของเซลล์ที่เกิดขึ้นภายใน หลุมฝังกลบมูลฝอยทำให้เกิดก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นมาและเมื่อก๊าซดังกล่าวทำปฏิกิริยากับความชื้นที่อยู่ในดินจึงทำให้เกิด สารประกอบคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนตขึ้นซึ่งสารประกอบดังกล่าวจะเกิดปฏิกิริยาในการ สะเทินความเป็นกรดในชั้นดินและลดความเป็นกรดแก่ในชั้นดินลงมาจนเป็นกรดอ่อนที่ความลึก 31-60 เซนติเมตรจึงทำให้ตรวจพบความเป็นกรดต่ำในดินด้านล่างมีความเป็นกรดน้อยกว่าด้านบน

นอกจากความเป็นกรดต่ำที่เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเชื้อดังกล่าว ยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีบทบาทอีกเช่นกัน อาทิ อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น โดยอุณหภูมิในดินที่ทำการศึกษามีค่าอยู่ระหว่าง $36.4 - 33.4^{\circ}\text{C}$ ดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวมีค่าลดลงตามระดับความลึกของดินที่ทำการศึกษาและจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิดังกล่าวมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิที่เชื้อเมทาโนโทรฟเจริญได้ดีไม่มากนัก คือ $25-30^{\circ}\text{C}$ (Pascal and Cleemput 1996 ; Visvanathan *et al.*, 1999) และเมื่อพิจารณา ค่าความชื้นพบว่าค่าความชื้นมีค่าสูงขึ้นตามระดับความลึก กล่าวคือ ที่ความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตร พบว่าความชื้นมีค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 15.65 ± 5.77 , 22.51 ± 4.33 , 25.28 ± 3.81 , 26.37 ± 5.54 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งความชื้นนี้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนโทรฟซึ่งควรอยู่ระหว่างร้อยละ 10 - 30 (Boechx and Cleemput 1996 ; Visvanathan *et al.*, 1999) ดังนั้นความชื้นในดินหลุมฝังกลบนี้จึงมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟ



ภาพที่ 9 ความเป็นกรดต่ำ ความชื้นและอุณหภูมิของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆ

สำหรับปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรท (โดยเฉพาะแอมโมเนียมซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชัน (Rosvlev *et al.*, 1997)) พบว่าปริมาณแอมโมเนียมในดินดังกล่าวมีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำมาก กล่าวคือ ที่ความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรมีปริมาณแอมโมเนียมเฉลี่ย 3.89 ± 0.65 , 5.83 ± 1.85 , 4.16 ± 2.07 , 6.94 ± 3.44 ไมโครกรัมต่อกรัมดินแห้งดังแสดงในภาพที่ 10 โดยการลดลงของปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชันอันเนื่องมาจากแอมโมเนียมนั้นเนื่องจากแอมโมเนียมสามารถเป็นสารตั้งต้นให้เอนไซม์มีเทนโมโนออกซิเจเนสเข้าทำปฏิกิริยาจึงเป็นผลให้มีเทนที่จะเข้าทำปฏิกิริยานั้นไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ไม่เต็มที่โดยปริมาณของแอมโมเนียมที่ทำให้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันมีค่าลดลง คือ ในปริมาณที่มากกว่า 104 ไมโครกรัมต่อกรัมดิน (King and Schnell, 1994) แต่จากปริมาณของแอมโมเนียมในตัวอย่างดินที่ทุกระดับความลึกดังกล่าวจะเห็นได้ว่ามีปริมาณแอมโมเนียมน้อยมากที่จะก่อให้เกิดการลดลงของปฏิกิริยามีเทนออกซิเดชัน นอกจากนี้ Dunfield and Knowles. (1995) ยังพบอีกว่าในภาวะแข่งขันของการใช้มีเทนหรือแอมโมเนียมของเอนไซม์มีเทนโมโนออกซิเจเนสนั้นแอมโมเนียมจะลดการต่อต้านการเกิดมีเทนออกซิเดชันในสถานะที่มีปริมาณมีเทนอยู่สูงซึ่งจากการวัดปริมาณมีเทนในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ที่บริเวณปากท่อระบายก๊าซที่เกิดขึ้นภายในหลุมฝังกลบมูลฝอยพบปริมาณก๊าซต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 13 โดยตำแหน่งของปากท่อระบายก๊าซที่ทำการตรวจวัดปริมาณก๊าซนี้เป็นปากท่อที่อยู่ใกล้เคียงกับบริเวณจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างดินกลบทับชั้นสุดท้ายทั้ง 5 จุดมากที่สุดดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 10 ปริมาณแอมโมเนียม ไนไตรต์ และไนเตรทในโตรเจนของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆ

ตารางที่ 13 องค์ประกอบของก๊าซที่ตรวจพบบริเวณที่ระบายก๊าซภายในหลุมฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี

ปากท่อ ระบายก๊าซ	องค์ประกอบของก๊าซในหลุมฝังกลบมูลฝอย (%)			
	CH ₄	CO ₂	O ₂	N ₂
1	10.77	8.84	16.96	63.43
2	36.24	22.82	9.37	31.57
3	7.11	1.43	19.06	72.40
4	13.73	0.31	19.36	66.60

ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณก๊าซมีเทนที่พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี มีค่าสูง อีกทั้งปริมาณแอมโมเนียมที่ตรวจพบมีค่าต่ำจึงทำให้แอมโมเนียมไม่ใช่ข้อจำกัดในการทำให้เกิดมีเทนออกซิเดชันต่ำในพื้นที่ที่ทำการศึกษา

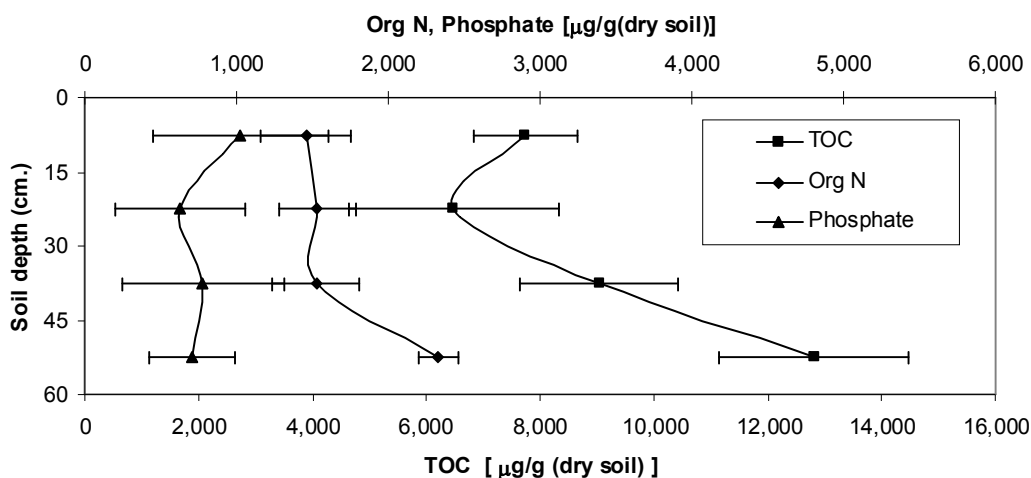
นอกจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้วแอมโมเนียมสามารถถูกออกซิไดซ์ได้ด้วยเมทาโนโทรฟและได้สารประกอบของไฮดรอกซีลาไมด์ (hydroxylamide) (Hubley *et al.*, 1975) และไนไตรต์ (King and Schnell, 1994 ; Neill and Wilkinson, 1977) ซึ่งสารประกอบทั้งสองนี้จะต่อต้านการเกิดมีเทนออกซิเดชันเนื่องจากไฮดรอกซีลาไมด์จะลดความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์มีเทนโมโนออกซิจีเนส ในขณะที่ไนไตรต์จะส่งผลต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์และความสามารถของเอนไซม์ฟอร์เมทไฮโดรจีเนสซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสร้าง NADH + H⁺ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเชื้อเมทาโนโทรฟ (Sylvia and King, 1994) โดยในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษานี้ตรวจพบปริมาณไนไตรต์ค่อนข้างต่ำ กล่าวคือ พบไนไตรต์ที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตร เฉลี่ย 0.16 ± 0.12 , 2.02 ± 0.38 , 1.16 ± 0.42 , 0.99 ± 0.26 ไมโครกรัมต่อกรัมดินแห้งดังแสดงในภาพที่ 10 จึงทำให้ปริมาณไนไตรต์ที่พบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาทุกระดับความลึกไม่ใช่ข้อจำกัดในการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรีย

สำหรับปริมาณไนเตรตซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยโดยที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตร ตรวจพบ

ไนเตรทปริมาณ 9.36 ± 1.18 , 6.89 ± 1.22 , 7.66 ± 1.60 , 8.06 ± 2.88 ไมโครกรัมต่อกรัมดินแห้ง ดังแสดงในภาพที่ 10 ซึ่งจากการศึกษาของ Dunfield and Knowles (1995) พบว่าปริมาณไนเตรทนั้นสามารถใช้เป็นสารอาหารในการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟและปริมาณที่มีความเหมาะสมนั้นควรอยู่ในช่วงไม่เกิน 75 ไมโครกรัมต่อกรัมดิน ดังนั้นจึงกล่าวโดยสรุปได้ว่าไนเตรทมีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟในหน้าดินที่ทำการศึกษา

นอกจากนี้ปริมาณของแอมโมเนียมและไนไตรต์ยังเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญของเชื้อไนไตรไฟอิง คือ *Nitrosomonas spp.*, *Nitrobacter spp.* ตามลำดับซึ่งตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยจึงทำให้สามารถลดปริมาณแอมโมเนียมและไนไตรต์ซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นตัวการในการต่อต้านการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียและผลิตไนเตรทซึ่งมีผลต่อกิจกรรมของเชื้อเมทาโนโทรฟ โดยปริมาณของเชื้อทั้งสองสกุลนั้นจะได้กล่าวในหัวข้อถัดไป

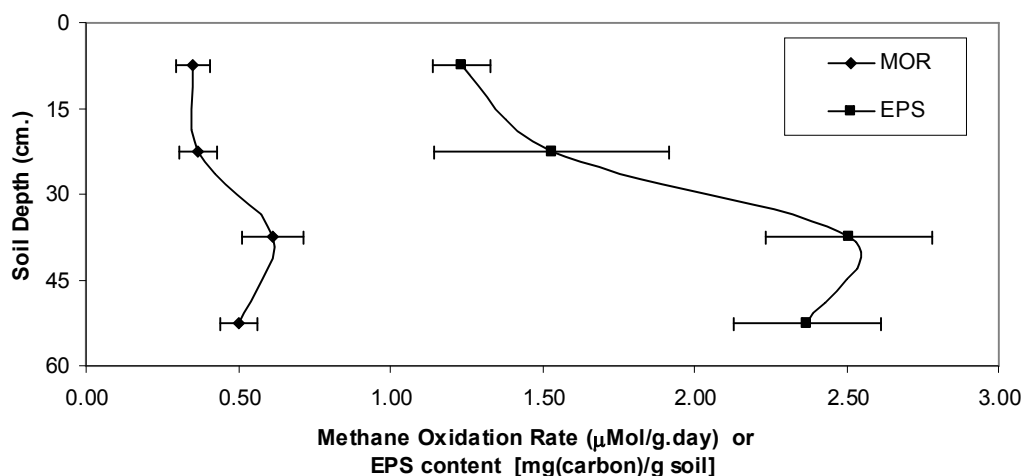
สำหรับในตัวอย่างดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษายังพบปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจน ฟอสเฟตและสารอินทรีย์คาร์บอนในปริมาณที่ค่อนข้างสูงกล่าวคือ ตรวจพบสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรเฉลี่ย $1,457.93 \pm 297.51$; $1,532.87 \pm 255.33$; $1,524.13 \pm 288.09$; $2,329.77 \pm 132.13$ ไมโครกรัมต่อกรัมดินแห้ง นอกจากนี้ตรวจพบสารอินทรีย์คาร์บอนที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรเฉลี่ย $7,738.82 \pm 905.98$; $6,478.80 \pm 1,849.40$, $9,033.78 \pm 1,399.23$, $12,812.04 \pm 1,668.92$ ไมโครกรัมต่อกรัมดินแห้งและฟอสเฟตที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรมีปริมาณเฉลี่ย $1,025.56 \pm 578.71$; 628.26 ± 429.14 ; 780.42 ± 533.91 ; 707.93 ± 286 ไมโครกรัมต่อกรัมดินแห้งดังแสดงในภาพที่ 11 โดยปริมาณของสารอินทรีย์ไนโตรเจน คาร์บอนและฟอสเฟตดังกล่าวจะเห็นได้ว่ามีปริมาณที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสารประกอบอินทรีย์อื่นๆที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยในทุกระดับความลึก โดยสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน สารอินทรีย์คาร์บอนและฟอสเฟตนี้จะเป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียชนิดเฮทาโลโทรฟ (Heterotrophs) ซึ่งมีปริมาณมากเกินไปซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวจะเป็นคู่แข่งของเชื้อเมทาโนโทรฟในการใช้ออกซิเจน



ภาพที่ 11 ปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจน สารอินทรีย์คาร์บอนและฟอสเฟตของดินกลบทับชั้น
สุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆ

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาคาดว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดความสามารถในการดำเนินกิจกรรมของเชื้อเมทาโนโทรฟในหน้าดินที่ศึกษาเนื่องจากปัจจัยทั้งสองนั้นมีค่าที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟแต่อย่างไรก็ตามในการดำเนินการวิจัยในการศึกษาความสามารถของเชื้อเมทาโนโทรฟในการเกิดมีเทนออกซิเดชันนั้นได้ทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (30 °ซ) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมในการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรีย (Boechx and Cleemput, 1996 ; Visvanathan *et al.*, 1999) เพื่อตัดปัจจัยผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

นอกจากลักษณะทางกายภาพและเคมีของดินแล้วยังวิเคราะห์ปริมาณเอ็กสตราเซลลูลาโพลีแซคคาไรด์หรืออีพีเอส (Extracellular Polysaccharides, EPS) มาพิจารณาซึ่งค่านี้สามารถบ่งชี้ได้ถึงกิจกรรมของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการเกิดมีเทนออกซิเดชัน (Hilger *et al.*, 1999) โดยพบว่าที่ระดับความลึก 0–15, 16–30, 31–45, 46–60 เซนติเมตร มีปริมาณเอ็กสตราเซลลูลาโพลีแซคคาไรด์อยู่ 1.23 ± 0.10 , 1.53 ± 0.38 , 2.51 ± 0.28 , 2.24 ± 0.24 มิลลิกรัมคาร์บอนต่อกรัมดินแห้งดังแสดงในภาพที่ 12 ซึ่งจากค่าอีพีเอสที่ตรวจพบจะเห็นได้ว่ามีค่าสูงที่ความลึก 31–45 และ 46–60 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันสูงที่ระดับความลึกตอนล่าง (31–60 เซนติเมตร) ดังแสดงในภาพที่ 12 ซึ่งจะได้กล่าวในหัวข้อถัดไป



ภาพที่ 12 อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันและปริมาณเอ็กซ์ตราเซลลูลาโพลีแซคคาไรด์ของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆ

2. การศึกษาความสามารถในการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

สำหรับการศึกษาความสามารถในการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่มีค่าความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างดินที่ทำการศึกษาคือค่าความชื้นเดิมของดินที่ทำการศึกษาจากพื้นที่ศึกษาจริง โดยในการศึกษาการเกิดมีเทนออกซิเดชันของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 0–15, 16–30, 31–45, 46–60 เซนติเมตรและนำค่าการลดลงของปริมาณความเข้มข้นของก๊าซมีเทน ณ จุดเริ่มต้นและลดลงจนกลายเป็นศูนย์พบว่าการเกิดมีเทนออกซิเดชันแบ่งออกเป็น 3 ช่วงด้วยกัน โดยในช่วงแรก ที่ระดับความลึก 0–15, 16–30, 31–45, 46–60 เซนติเมตรพบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันเฉลี่ย 0.35, 0.37, 0.61, 0.50 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้ง ในช่วงที่สองที่ระดับความลึก 0–15, 16–30, 31–45, 46–60 เซนติเมตรพบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันเฉลี่ย 0.47, 0.44, 0.70, 0.59 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้ง และในช่วงที่สามตรวจพบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่ระดับความลึก 0–15, 16–30, 31–45, 46–60 เซนติเมตร เฉลี่ย 0.21, 0.23, 0.12, 0.18 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้งดังแสดงในตารางที่ 14 โดยในช่วงแรกนั้นอยู่ในช่วง 0–12 วัน ซึ่งเป็นช่วง Zero Reaction เนื่องจากเป็นช่วงที่ทำการศึกษาโดยให้ปริมาณก๊าซมีเทนมากเกินไปเพื่อให้เชื้อเมทาโนโทรฟเจริญอย่างเต็มที่ในช่วงที่เชื้อพยายามปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่เนื่องจากการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมจากเดิมที่อาศัยอยู่ในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยมาอยู่ภายในขวดทดลองจึงทำให้การดำเนินกิจกรรมของเชื้อเมทาโนโทรฟในการออกซิไดส์ก๊าซมีเทนทำได้ไม่เต็มที่ (lag phase) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการลดลงของปริมาณมีเทนใน

ช่วงแรกนั้นเป็นช่วงที่แทบจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงของปริมาณก๊าซมีเทน สำหรับในช่วงที่สองนั้นจะเป็นช่วงวันที่ 12-33 ซึ่งพบว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากเชื้อเมทาโนโทรฟสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้แล้วอีกทั้งเซลล์ยังอยู่ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณของอาหารพอเพียง (ก๊าซมีเทน) จึงทำให้เชื้อมีการเพิ่มทั้งในด้านของน้ำหนักและจำนวนอย่างรวดเร็วโดยการแบ่งตัวแบบแบ่งเซลล์ (Binary Fission) จึงทำให้กิจกรรมของเซลล์ในการเกิดมีเทนออกซิเดชันเกิดขึ้นในอัตราที่สูงกว่าระยะเวลาอื่นๆ และช่วงที่สามคือตั้งแต่วันที่ 33 จนปริมาณก๊าซมีเทนกลายเป็นศูนย์ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันมีค่าลดลงเนื่องจากปริมาณอาหารที่เชื้อเมทาโนโทรฟจะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการดำรงชีพและเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ซึ่งก็คือก๊าซมีเทนมีค่าลดลงจนไม่เพียงพอต่อปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟที่อาศัยอยู่ในขวดทดลองจึงทำให้เกิดภาวะแข่งขันในการแย่งอาหารเพื่อการดำรงชีพของเซลล์และเมื่อปริมาณอาหารลดลงเป็นศูนย์ก็จะทำให้เซลล์ต้องดึงอาหารที่เก็บไว้ในเซลล์มาใช้ในการดำรงชีพจึงทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ไม่แข็งแรงและดำเนินกิจกรรมของเซลล์ได้ไม่เต็มที่จึงทำให้อัตราการลดลงของก๊าซมีเทนลดลงจนกลายเป็นศูนย์

ตารางที่ 14 อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในช่วงเวลาต่างๆ

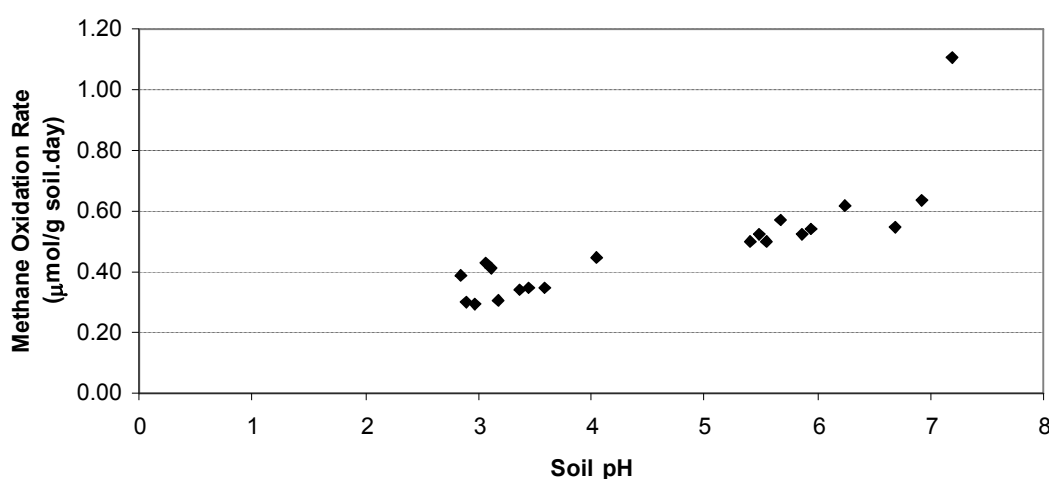
Days	Methane Oxidation Rate ($\mu\text{mol} / \text{g soil.day}$)			
	0-15 cm.	16-30 cm.	31-45 cm.	46-60 cm.
0-12	0.35	0.37	0.61	0.50
12-33	0.47	0.44	0.70	0.59
33 เป็นต้นไป	0.21	0.23	0.12	0.18

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าในการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆ คือ 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรจะต้องทำการศึกษ้อัตราการลดลงของปริมาณก๊าซมีเทนในระยะแรกเนื่องจากเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายยังคงคุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อมเดิมที่เคยอาศัยและยังไม่ปรับสภาพเข้าสู่สิ่งแวดล้อมใหม่และเพิ่มจำนวนเซลล์จนทำให้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันมีค่าสูงกว่าในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาโดยค่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยนี้มีค่าเฉลี่ยดังแสดงในภาพที่ 12

โดยเมื่อนำผลการวิเคราะห์ปริมาณเอ็กสตราเซลลูลาโพลีแซคคาไรด์ (Extracellular Polysaccharides, EPS) มาพิจารณาซึ่งค่านี้สามารถบ่งชี้ได้ถึงกิจกรรมของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการเกิดมีเทนออกซิเดชัน (Hilger *et al.*, 1999) โดยมีแนวโน้มสอดคล้องกับปริมาณอีพีเอสในดินดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟในดินมีการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่ความลึก 31-45 เซนติเมตรสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ความลึกอื่นๆของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาซึ่งต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาเนื่องจากในงานวิจัยของ Chen *et al.* (2003) ซึ่งทำการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึก 10, 30, 100 และ 300 เซนติเมตร โดยพบว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่ระดับความลึก 10 เซนติเมตรมีค่า 5.69 มิลลิโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวันและลดลงมาอยู่ที่ 0.69 มิลลิโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวันที่ระดับความลึก 30 เซนติเมตร สำหรับที่ระดับความลึก 100 และ 300 เซนติเมตร พบว่ามีอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่ 0.44 และ 0.41 มิลลิโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวันตามลำดับ โดยสรุปได้ว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจะมีค่าสูงสุดในบริเวณด้านบนของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยและลดลงตามระดับความลึก นอกจากนี้ Svenning *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยในดินกลบทับชั้นสุดท้ายที่ระดับความลึก 20 เซนติเมตรแรกโดยทำการเปรียบเทียบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในฤดูกาลต่างๆพบว่าในเดือนกรกฎาคมมีอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน 44.64 ± 0.9 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวันและตรวจพบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในเดือนกันยายนซึ่งเป็นช่วงหน้าหนาวมีอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันลดลงเหลือ 8.82 ± 1.62 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวันโดยสรุปได้ว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจะพบได้สูงสุดในช่วงฤดูฝน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Bodelier *et al.* (2004) โดยได้ทำการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ชุ่มน้ำ (wet lands) ที่ระดับความลึก 0-5, 5-10 และ 10-20 เซนติเมตรพบว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันเท่ากับ 16.8, 15.2 และ 8.4 ไมโครโมลต่อกรัมดินต่อวัน จากงานวิจัยเกี่ยวกับอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันของนักวิจัยท่านอื่นๆจะเห็นได้ว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันจะมีค่าลดลงตามระดับความลึกและมีค่าสูงกว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย

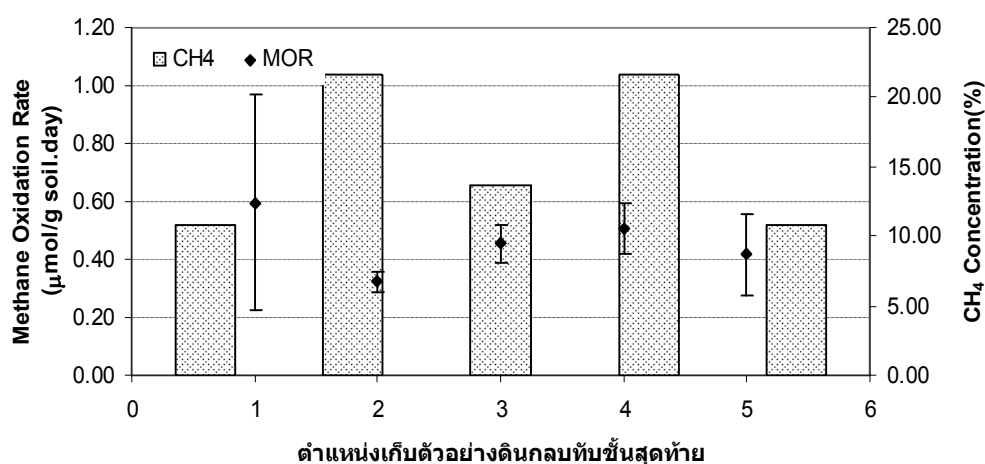
อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี และเห็นได้ว่าจากค่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันซึ่งเก็บตัวอย่างดินในช่วงฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม) ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเกิดมีเทนออกซิเดชันสูงสุดกลับพบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันต่ำโดยเฉพาะที่ระดับความลึก 0-15 และ 16-30 เซนติเมตร และมีค่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่ต่ำกว่าระดับความลึก 31-45 เซนติเมตร และ 46-60 เซนติเมตรทั้งนี้น่าจะมีสาเหตุมาจากปัจจัยที่มีผลให้เชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เต็มที่ในสภาพความเป็นกรดจัดซึ่งเป็นลักษณะของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึก 0-30

เซนติเมตร (3.09 ± 0.24 ถึง 3.82 ± 0.96) แต่สำหรับที่ระดับความลึก 31–60 เซนติเมตร มีค่าความเป็นกรดอ่อน (6.27 ± 0.69 ถึง 5.93 ± 0.60) จึงน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟเจริญได้ดีกว่าที่ระดับความลึก 0–15 เซนติเมตรและ 16–30 เซนติเมตรจึงทำให้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในความลึกที่เป็นกรดอ่อนมีค่าสูงกว่าบริเวณที่มีความเป็นกรดจัดดังแสดงในภาพที่ 13 โดยผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายที่มีความเป็นกรดนี้มีผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Dunfield *et al.* (1993) ที่ทำการศึกษาในพื้นที่ที่เป็นกรดเช่นกันโดยพบว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ที่เป็นกรดนั้นสามารถเกิดได้ดีที่มีความเป็นกรดต่างประมาณ 6-7 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้โดยในการศึกษาเชื้อเมทาโนโทรฟในเชิงปริมาณนั้นจะได้กล่าวในหัวข้อถัดไป



ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยกับความเป็นกรดต่างของดิน

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยในแต่ละจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยนั้นพบว่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในจุดที่ 1 มีค่าสูงสุด คือ 0.60 ± 0.37 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวัน และจุดที่ 2 มีอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันต่ำที่สุด คือ 0.32 ± 0.03 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวันโดยเมื่อนำค่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในแต่ละจุดเก็บทำการเปรียบเทียบกับปริมาณก๊าซมีเทนที่ปล่อยออกมาบริเวณท่อระบายก๊าซแล้วพบว่าไม่มีความสัมพันธ์หรือสอดคล้องกันดังแสดงในภาพที่ 14

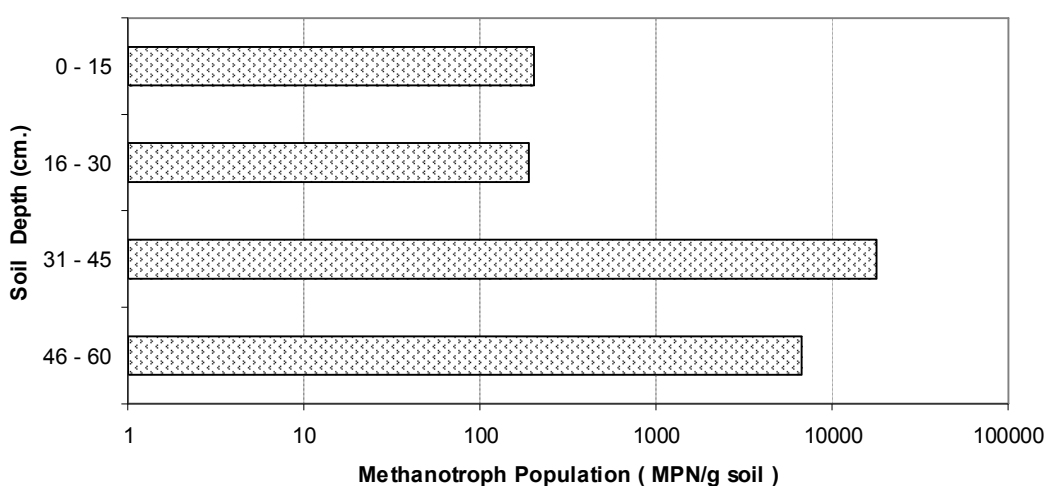


ภาพที่ 14 อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยและปริมาณมีเทนที่ท่อระบายก๊าซ ณ จุดเก็บต่างๆ

3. การตรวจหาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีเอ็มพีเอ็น

การตรวจหาเชื้อเมทาโนโทรฟในเชิงปริมาณโดยอาศัยวิธีการเอ็มพีเอ็นนั้นเป็นการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวให้เจริญภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะกับเชืวดังกล่าว คือ เอ็นเอ็มเอสมีเดีย (NMS Medium) และอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมอื่นๆที่มีความเหมาะสมเพื่อให้เชื้อเมทาโนโทรฟเจริญได้อย่างเต็มที่ โดยสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดเมทาโนโทรฟที่ใช้ในการทดลองนี้คือ อุณหภูมิประมาณ 30°C ค่าความเป็นกรดค่าประมาณ 8.3 และเลี้ยงเชืวดังกล่าวให้เจริญเต็มที่ประมาณ 45 วัน ผลการทดสอบพบว่า การนับปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นมีแนวโน้มสอดคล้องกับอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน กล่าวคือ เชื้อเมทาโนโทรฟจากตัวอย่างดินกลบทับมูลฝอยชั้นสุดท้ายในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึก 31–45 เซนติเมตรพบเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียสูงสุด คือ 17,785.00 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมดินแห้ง สำหรับปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียที่มีปริมาณรองลงมา คือ ที่ระดับความลึก 46–60 เซนติเมตร โดยพบเป็นจำนวน 6,758.74 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมดินแห้งสำหรับดินกลบทับมูลฝอยชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ความลึก 0–15 เซนติเมตร และ 16–30 เซนติเมตรนั้นมีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 202.16 และ 191.56 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมดินแห้งตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 15

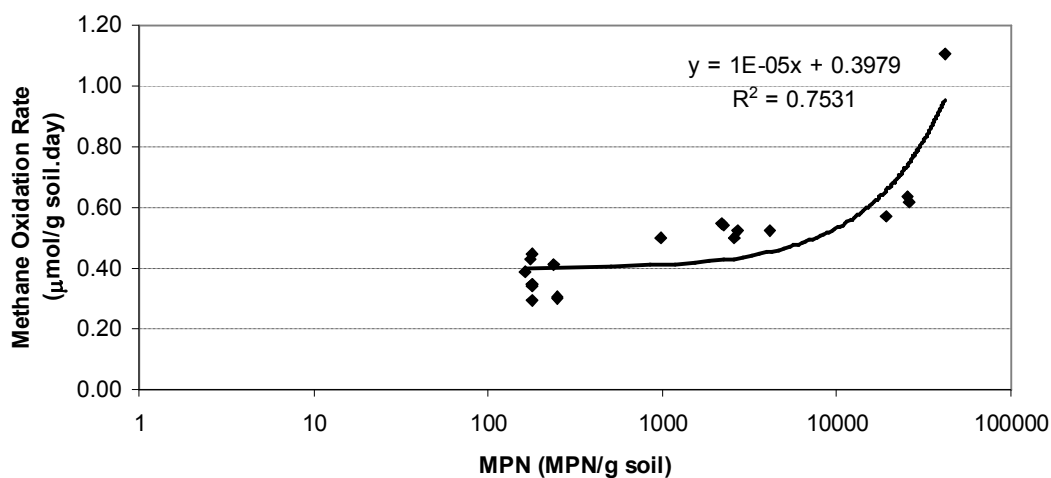
จากผลการศึกษาด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นพบว่าปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟที่เลี้ยงให้เติบโตภายใต้สภาวะที่สมบูรณ์ต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟที่ระดับความลึก 31–60 เซนติเมตร มีปริมาณสูงกว่าระดับความลึก 0–15 เซนติเมตรอย่างมีนัยสำคัญซึ่งพบปริมาณสูงสุดที่ระดับความลึก 31–45 เซนติเมตรเช่นเดียวกันกับการตรวจพบกิจกรรมของเชื่อดังกล่าวในการเกิดมีเทนออกซิเดชัน จึงทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าที่ระดับความลึก 31–45 เซนติเมตรนั้นจะมีเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียสูงสุดจึงทำให้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่ระดับความลึกนี้มีค่าสูงสุดและสำหรับที่ระดับความลึกอื่นๆก็เช่นกันที่ตรวจพบว่าปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟที่ตรวจวัดด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นมีความสัมพันธ์เป็นไปในทางเดียวกันกับอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน



ภาพที่ 15 ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ระดับความลึกต่างๆที่ศึกษาด้วยวิธีเอ็มพีเอ็น

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อและอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันตามความลึกมีความสัมพันธ์ไม่ชัดเจนนัก โดยเฉพาะในช่วงดินระดับ 0-30 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับดินช่วง 31-60 เซนติเมตร กล่าวคือ จำนวนเมทาโนโทรฟมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันซึ่งจากงานวิจัยที่ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ อาทิ Svenning *et al.* (2003) ที่ทำการตรวจวัดด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นได้ถึง 2.7×10^6 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมดินแห้งในเดือนกรกฎาคม และเดือนกันยายนพบเพียง 4.1×10^5 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมดินแห้งตามอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่ลดลง สำหรับการทดลองของ Bodelier *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาในพื้นที่ชุ่มน้ำ (wet lands) พบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันที่ระดับความลึก 0–5 เซนติเมตร เท่ากับ 16.8 ไมโคร

โมลต่อกรัมดินต่อวันและตรวจพบเอมพีเอ็นได้เท่ากับ 5×10^6 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมดิน ที่ระดับความลึก 5–10 เซนติเมตรจะมีอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน 15.12 ไมโครโมลต่อกรัมดินและมีปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟที่ศึกษาด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นเท่ากับ 1.8×10^6 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมดินและที่ระดับความลึก 10–20 เซนติเมตรมีอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน 8.4 ไมโครโมลต่อกรัมดินและปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟเท่ากับ 1.7×10^6 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมดิน นอกจากนี้ในการศึกษาในเชิงเปรียบเทียบถึงปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟในฤดูกาลต่างๆ ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ อาทิ Svenning *et al.* (2003) พบว่าปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟจะมีการเจริญสูงสุดและมีอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันสูงสุดในช่วงฤดูฝน ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ผู้ทำการวิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยในช่วงฤดูฝนแต่ผลการทดลองกลับมีปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียที่เรี่ยรน้อยมาก ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุสำคัญดังที่ได้กล่าวมาแล้วก็คือค่าความเป็นกรดค่าที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟ และอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟที่เจริญในอาหารเหลวเอ็นเอ็มเอสมีค่าน้อยน่าจะเนื่องมาจากค่าความเป็นกรดค่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากในอาหารเหลวเอ็นเอ็มเอสมีค่าพีเอชประมาณ 8.3 ซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญของเมทาโนโทรฟที่เจริญในภาวะที่เป็นกลางจึงทำให้เชื้อเมทาโนโทรฟที่อาศัยในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่เจริญในภาวะที่เป็นกรดไม่สามารถเจริญได้อย่างเต็มที่จึงตรวจพบเชื่อดังกล่าวในปริมาณที่ต่ำกว่าที่ควรจะเป็นและจึงเป็นข้อจำกัดในการตรวจวัดเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นในการวิจัยครั้งนี้โดยเมื่อนำผลการตรวจวัดในเชิงปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นกับอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในแต่ละตัวอย่างมาหาความสัมพันธ์พบว่าในกรณีที่ไม่มีการตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นนั้นจะพบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันเท่ากับ 0.3979 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวันดังแสดงในภาพที่ 16 ซึ่งเห็นได้ว่าการใช้วิธีการเอ็มพีเอ็นในการตรวจวัดเชิงปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟนี้มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริงดังนั้นในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียที่เจริญในดินกลบทับชั้นสุดท้ายที่มีความเป็นกรดจึงควรเตรียมอาหารเหลวเอ็นเอ็มเอสที่มีค่าพีเอชประมาณ 5.5 (Dunfield *et al.*, 2003)



ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบ มูลฝอยโดยวิธีเอ็มพีเอ็นกับอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ดังกล่าว

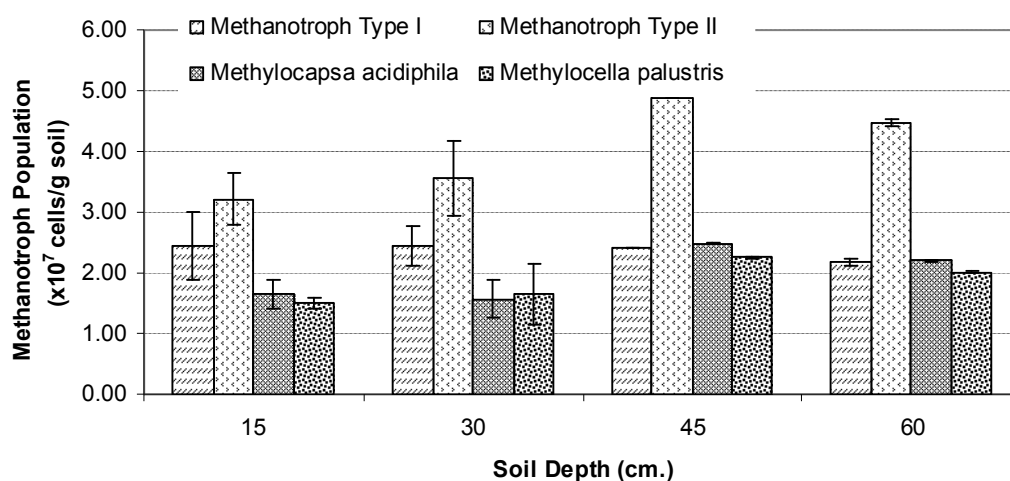
4. การตรวจหาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียและไนตริไฟอิงแบคทีเรียด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

ในการศึกษาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยวิธีการฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน หรือพีชนั้นอาศัยโพรบที่มีความจำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา สำหรับเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียก็เช่นกันที่ต้องอาศัยโพรบที่มีความจำเพาะต่อเชื้อดังกล่าวโดยในการทดลองนี้ได้อาศัยโพรบที่มีความจำเพาะต่อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1, เมทาโนโทรฟชนิดที่ 2, เมทาโนโทรฟสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่สุดในภาวะที่เป็นกรด คือ *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* ซึ่งก็คือ MY84+MY705, MQ450, Mcell-1026 และ Mcaps-1032 ตามลำดับซึ่ง *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* นี้จัดเป็นเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยโพรบ MQ450 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียชนิดไนตริไฟอิงในเชิงปริมาณ คือ *Nitrosomonas spp.* และ *Nitrobacter spp.* โดยอาศัยโพรบ NSM-156, NIT-3 ในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียชนิด *Nitrosomonas spp.* และ *Nitrobacter spp.* จัดเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในการเปลี่ยนรูปอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียให้เปลี่ยนมาเป็นไนไตรต์และทำการเปลี่ยนรูปไนไตรต์ให้เป็นไนเตรทตามลำดับ

โดยผลการศึกษาในเชิงปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรีน้นพบว่าทุกระดับความลึกนั้นพบปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดที่ 2 สูงที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อเมทาโนโทรฟ

แบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยที่ความลึก 31–45 เซนติเมตรจะเป็นระดับความลึกที่พบเมทาโนโทรฟแบคทีเรียสูงที่สุด คือ $4.89 \pm 0.79 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง รองลงมาคือที่ระดับความลึก 46–60, 16–30, 0–15 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยพบเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดที่ 2 ปริมาณ $4.48 \pm 0.89 \times 10^7$, $3.56 \pm 0.62 \times 10^7$, $3.22 \pm 0.42 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัมดินแห้งตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 17 ทั้งนี้จากผลการทดลองของ Dedysch *et al.* (2003) ในการใช้ฟิชในการตรวจสอบเชื้อเมทาโนโทรฟในพื้นที่ที่มีความเป็นกรดประมาณ 3.6–4.5 โดยพบปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 จำนวน $0.2 \pm 0.2 \times 10^4$ เซลล์ต่อกรัมดินเปียก, เชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 จำนวน $1.8 \pm 0.1 \times 10^6$ เซลล์ต่อกรัมดินเปียก, *Methylocapsa acidiphila* จำนวน $1.4 \pm 0.5 \times 10^5$ เซลล์ต่อกรัมดินเปียกและ *Methylocella palustris* จำนวน $11.9 \pm 1.1 \times 10^5$ เซลล์ต่อกรัมดินเปียกโดยสรุปได้ว่าเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 สามารถเจริญในภาวะที่เป็นกรดได้ดีกว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 และในสภาวะที่เป็นกรดดังกล่าวยังพบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟสามารถเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดค่าระหว่าง 5.5 – 6.7 (Dedysch *et al.*, 1998a) จึงทำให้ผลการศึกษาพบเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ที่ระดับความลึกระหว่าง 31–60 เซนติเมตรสูงกว่าที่ระดับความลึก 0–30 เซนติเมตรอย่างมีนัยสำคัญทั้งนี้เนื่องจากเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีกว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ในสภาวะที่เป็นกรด (Dedysch *et al.*, 2000) และเนื่องจากในชั้นดินด้านล่าง (ความลึก 31–60 เซนติเมตร) ของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบนี้ที่เกิดปฏิกิริยากับความชื้นในดินและเกิดสารประกอบคาร์บอนและไบคาร์บอนในการลดความเป็นกรดในดินลงมาที่ 6.27 ± 0.69 และ 5.93 ± 0.60 จึงทำให้พบเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 อย่างโดดเด่นที่ระดับความลึก 31–45 และ 46–60 เซนติเมตรตามลำดับ นอกจากนี้เหตุผลอีกประการหนึ่ง คือ เชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 เป็นเชื้อที่เจริญได้ดีในภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำและมีเทนสูง (Hanson and Hanson, 1996) ซึ่งเป็นลักษณะของดินซึ่งอยู่บริเวณด้านล่างของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย

สำหรับเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดที่ 1 พบว่าที่ในทุกระดับความลึกในปริมาณใกล้เคียงกัน กล่าวคือ ที่ความลึก 0–15, 16–30, 31–45, 46–60 เซนติเมตรตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ในปริมาณเฉลี่ย $2.44 \pm 0.56 \times 10^7$, $2.44 \pm 0.32 \times 10^7$, $2.41 \pm 0.41 \times 10^7$, $2.18 \pm 0.45 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัมดินแห้งตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 17 สำหรับเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดที่ 1 ในทุกระดับความลึกไม่มีความแตกต่างกันในเชิงปริมาณเนื่องจากเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ไม่สามารถเจริญได้ดีในภาวะที่เป็นกรดไม่ว่าจะอยู่ในช่วงของความเข้มข้นมากหรือน้อยจึงทำให้ไม่มีความแตกต่างกันในเชิงปริมาณ (Dedysch *et al.*, 2000) ดังแสดงในภาพที่ 16 แต่หากพิจารณารายละเอียดของตัวเลขพบว่า



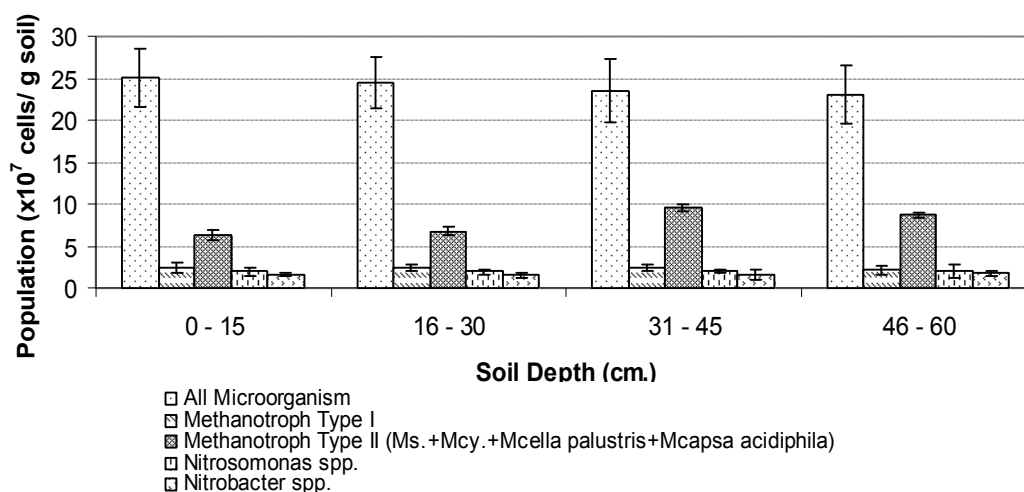
ภาพที่ 17 ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดต่างๆที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาในระดับความลึกต่างๆ

เชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 นี้มีปริมาณลดลงตามระดับความลึก ทั้งนี้เนื่องจากในบริเวณด้านบนของดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยจะมีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนต่ำกว่าในชั้นดินด้านล่างและมีความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนสูงกว่าในชั้นดินด้านล่างซึ่งปัจจัยนี้เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พบเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ในชั้นดินด้านบนสูงกว่าชั้นดินในบริเวณด้านล่างเนื่องจากการศึกษาพบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 สามารถเจริญได้ดีในภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนสูงและมีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนต่ำ ในขณะที่เชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดที่ 2 จะเจริญได้ดีในภาวะที่มีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนสูงความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนต่ำ (Hanson and Hanson, 1996)

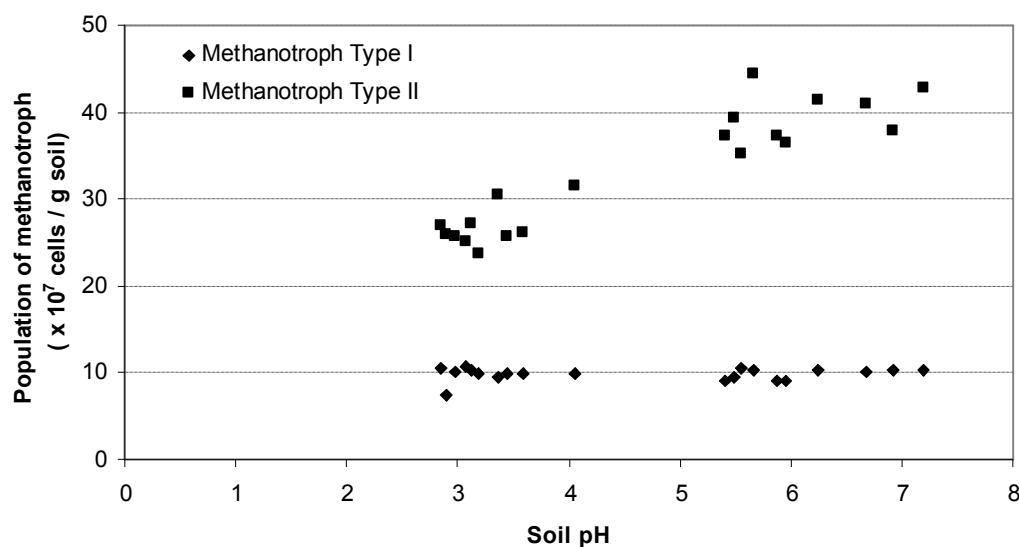
เมื่อพิจารณาถึงเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียที่เจริญในภาวะที่เป็นกรดโดยอาศัย 2 สายพันธุ์ที่เป็นตัวแทนของเชื้อเมทาโนโทรฟดังกล่าวอีกทั้งยังเป็นเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 คือ *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* โดยพบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟ *Methylocella palustris* ที่ความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรเฉลี่ย $1.49 \pm 0.09 \times 10^7$, $1.64 \pm 0.49 \times 10^7$, $2.26 \pm 0.50 \times 10^7$, $2.01 \pm 0.28 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัมดินแห้งตามลำดับและตรวจพบเชื้อ *Methylocapsa acidiphila* ที่ความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรเฉลี่ย $1.64 \pm 0.23 \times 10^7$, $1.57 \pm 0.31 \times 10^7$, $2.48 \pm 0.50 \times 10^7$, $2.28 \pm 0.01 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัมดินแห้งตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 17 เห็นได้ว่า *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* ตรวจพบได้มากที่สุดที่ระดับความลึก 31-60

เซนติเมตร ทั้งนี้เนื่องมาจากค่าความเป็นกรดด่างที่มีค่าเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ โดย Dedysh *et al.* (1998a) พบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟ *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* นั้นเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 5.5-6.7 จึงทำให้ตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟทั้งสองสายพันธุ์ในระดับความลึกดังกล่าวสูงกว่าที่ระดับความลึก 0-30 เซนติเมตรอย่างมีนัยสำคัญ

ทั้งนี้หากพิจารณาปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ทั้งหมดที่ทำการศึกษากับโปรบ MQ450, Mcell-1026 และ Mcap-1032 เห็นได้ว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 มีความโดดเด่นในพื้นที่ดังกล่าวเป็นอย่างมาก กล่าวคือ ที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรพบปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ทั้งหมด $6.36 \pm 0.61 \times 10^7$, $6.78 \pm 0.52 \times 10^7$, $9.63 \pm 0.37 \times 10^7$, $8.68 \pm 0.24 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัมดินแห้งดังแสดงในภาพที่ 18 โดยเฉพาะที่ระดับความลึก 31-60 เซนติเมตรอย่างมีนัยสำคัญด้วยเหตุผลสำคัญคือจากค่าความเป็นกรดด่างในช่วงที่เป็นกรดซึ่งเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 สามารถปรับตัวได้ดีกว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ทำให้ตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ดังแสดงในภาพที่ 19



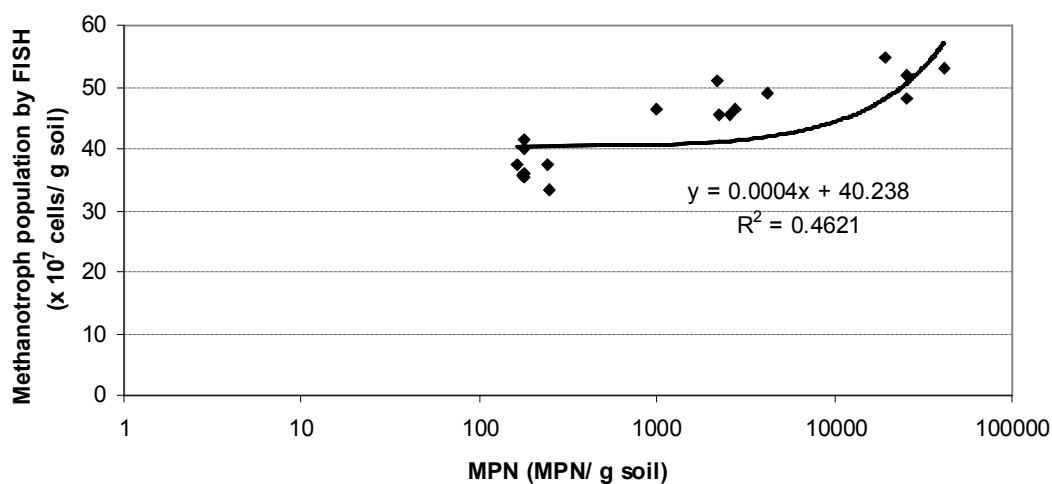
ภาพที่ 18 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด Methanotroph type I, Methanotroph type II, *Nitrosomonas* spp., *Nitrobacter* spp. ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาที่ความลึกต่างๆ



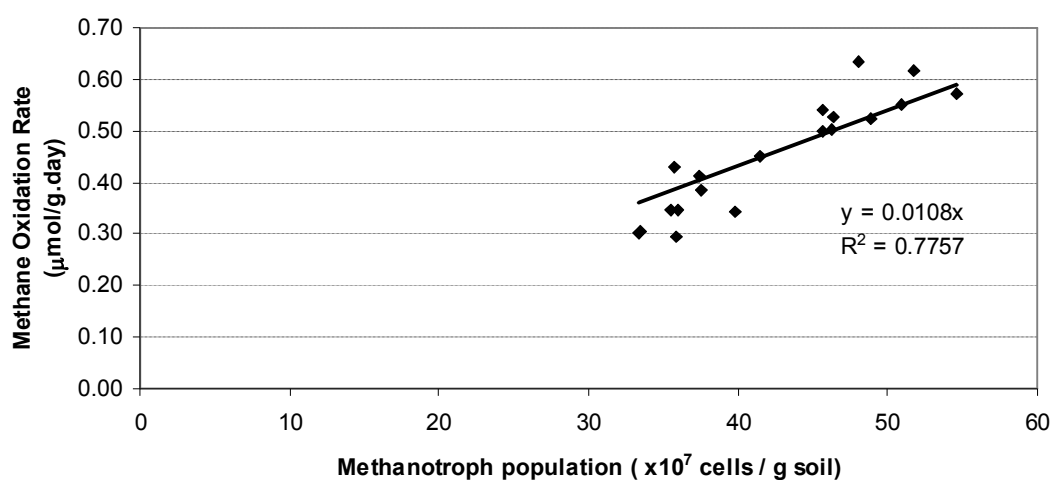
ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 และ 2 ในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยกับความเป็นกรดด่างของดิน

จากปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟที่การศึกษาในเชิงปริมาณด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นและพีชนั้นจะเห็นได้ว่าปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟจากการศึกษาด้วยวิธีพีชและเอ็มพีเอ็นนั้นไม่มีความสัมพันธ์สอดคล้องในแนวทางเดียวกันดังแสดงในภาพที่ 20 ($R^2 < 0.75$) จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าวิธีการศึกษาในการจำแนกชนิดและศึกษาเชื้อเมทาโนโทรฟในเชิงปริมาณด้วยวิธีการพีชมีความเหมาะสมในการตรวจนับปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟในการศึกษานี้ ทั้งนี้จากค่าอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในตัวอย่างดินที่มีความเป็นกรดก็มีความสัมพันธ์สอดคล้องและเป็นไปในทางเดียวกันกับปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟที่ตรวจพบโดยวิธีพีชดังแสดงในภาพที่ 21

สำหรับแบคทีเรียในกลุ่มไนตริไฟอิงนั้นพบว่าที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตร ตรวจพบไนโตรโซโมแนสเฉลี่ย $1.95 \pm 0.57 \times 10^7$, $2.00 \pm 0.24 \times 10^7$, $2.09 \pm 0.77 \times 10^7$, $1.99 \pm 0.77 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัมดินแห้งตามลำดับและมีปริมาณไนโตรแบคเตอร์แบคทีเรียที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรเฉลี่ยอยู่ $1.61 \pm 0.23 \times 10^7$, $1.55 \pm 0.60 \times 10^7$, $1.71 \pm 0.32 \times 10^7$, $1.79 \pm 0.03 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัมดินแห้งตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 18 โดยเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิงที่พบในทุกระดับความลึกนั้นมีปริมาณไม่สูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟที่ทำการศึกษาแต่จากการศึกษาถึงปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจน



ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบ
มูลฝอยที่ทำการศึกษาด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นและฟิช



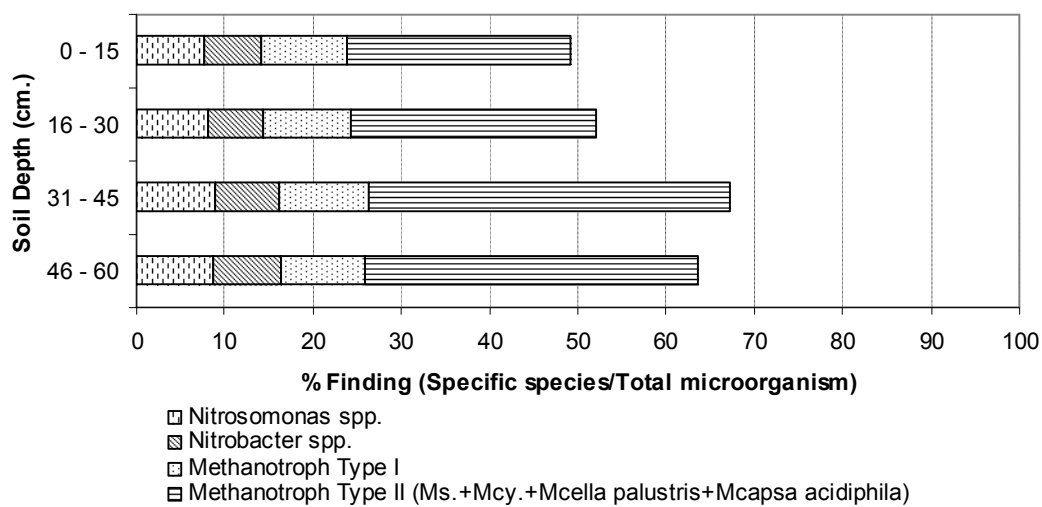
ภาพที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบ
มูลฝอยที่ทำการศึกษาด้วยวิธีฟิชกับอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ดังกล่าว

ในกลุ่มของแอมโมเนียมและไนไตรต์ที่พบในปริมาณต่ำในทุกระดับความลึกและตรวจพบปริมาณสารอินทรีย์ในดินในปริมาณที่สูงจึงสามารถบอกเป็นนัยได้ว่าการใช้แอมโมเนียมและไนไตรต์โดยเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองไปแล้วบางส่วนและด้วยปริมาณของแหล่งอาหารที่พบต่ำนี้จึงทำให้ในภายหลังที่ไนโตรโซโมแนสและไนโตรแบคเตอร์แบคทีเรียใช้แอมโมเนียมและไนไตรต์เป็นแหล่ง

อาหารจนหมดแล้วแบคทีเรียดังกล่าวจะลดจำนวนลงเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของแหล่งอาหารและพลังงานในการดำรงชีพของจุลินทรีย์ทั้งสอง

สำหรับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝั่งกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษพบว่าที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตร มีเชื้อจุลินทรีย์อาศัยเฉลี่ย $25.07 \pm 3.47 \times 10^7$, $24.54 \pm 3.04 \times 10^7$, $23.56 \pm 0.72 \times 10^7$, $23.03 \pm 0.42 \times 10^7$ เซลล์ต่อกรัมดินแห้งดังแสดงในภาพที่ 18 ซึ่งมีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่ผ่านมาเนื่องจากความเป็นกรดในดิน โดยการศึกษาของ Dedysh *et al.* (2003) โดยใช้เทคนิคพีชในการตรวจปริมาณเชื้อในพื้นที่ที่เป็นกรด (Peatlands) ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 3.6-4.5 ที่ความลึก 10-15 เซนติเมตรซึ่งพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด $4.5 \pm 0.4 \times 10^8$, $1.7 \pm 0.2 \times 10^8$ ในไซบีเรียตอนใต้และเยอรมันนีตอนเหนือตามลำดับ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าปริมาณของเชื้อที่ตรวจพบมีค่าลดลงตามระดับความลึกเนื่องจากปริมาณของออกซิเจนที่ลดลงตามระดับความลึกจึงทำให้พบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในชั้นดินด้านล่างต่ำกว่าด้านบน

โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับปริมาณของเชื้อทั้งหมดในตัวอย่างดินที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝั่งกลบมูลฝอย พบว่า ที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรมีไนโตรโซโมแนสอยู่ร้อยละ 7.76, 8.15, 8.87, 8.66 ตามลำดับ สำหรับไนโตรแบคเตอร์พบปริมาณร้อยละ 6.44, 6.31, 7.26, 7.78 ตามลำดับ เชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 มีปริมาณร้อยละ 9.72, 9.93, 10.25, 9.45 ตามลำดับ เชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 มีปริมาณร้อยละ 25.35, 27.62, 40.89, 37.71 ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 22 โดยพบว่าปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีได้ทำการศึกษและอาศัยในดินกลบทับชั้นสุดท้ายที่ระดับความลึกต่างๆมีปริมาณเชื้ออยู่ร้อยละ 49.27, 52.01, 67.27, 63.60 ที่ระดับความลึก 0-15, 16-30, 31-45, 46-60 เซนติเมตรตามลำดับ โดยเห็นได้ว่าปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่อาศัยในพื้นที่ที่ทำการศึกษานี้ คือ เชื้อแบคทีเรียกลุ่มเมทาโนโทรฟ



ภาพที่ 22 สัดส่วนของ *Nitrosomonas spp.*, *Nitrobacter spp.*, Methanotroph type I, Methanotroph type II เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษาที่ความลึกต่างๆ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาความสามารถในการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี เพื่อจำแนกประเภทของเชื้อและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีการโมสพรอบเอเบิลนัมเบอร์และฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริโดเซชัน โดยพิจารณาคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของดินดังกล่าวสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ลักษณะทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ในส่วนของความชื้น ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจนในไตรท สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด ปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดนั้นมีปริมาณที่มีความเหมาะสมในการเจริญของเมทาโนโทรฟแบคทีเรียแต่ปัจจัยที่เป็นข้อจำกัดในการเจริญของเชื้อเมทาโนโทรฟ คือ ความเป็นกรดต่ำ
2. อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยพบสูงสุดที่ระดับความลึก 31–45 เซนติเมตร (0.61 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวัน) รองลงมาคือที่ระดับความลึก 46–60 เซนติเมตร (0.50 ไมโครโมลต่อกรัมดินแห้งต่อวัน) สำหรับที่ระดับความลึก 0–30 เซนติเมตรพบอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในปริมาณที่ต่ำสืบเนื่องมาจากความเป็นกรดต่ำของพื้นที่ดังกล่าว
3. ในการศึกษาปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปกติไม่เหมาะสมต่อการตรวจวัดจำนวนเมทาโนโทรฟที่อาศัยในดินที่เป็นกรดทำให้ตรวจพบเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียในพื้นที่ที่ทำการศึกษาในปริมาณที่ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น
4. การศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีฟิชตรวจพบว่าเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดที่ 2 (ร้อยละ 25.35-37.71) มีปริมาณมากกว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 (ร้อยละ 9.45-10.25) อย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียชนิดที่ 2 สามารถเจริญในสภาวะที่เป็นกรดได้ดีกว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 จึงทำให้เชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 มีบทบาทในการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ดังกล่าวดีกว่าเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1

5. การศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีพีชตรวจพบว่ามีเชื้อเมทาโนโทรฟที่เจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรด (acidophilic methanotroph) สายพันธุ์ *Methylocella palustris* และ *Methylocapsa acidiphila* ตรวจพบแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สูงที่ระดับความลึก 31–60 เซนติเมตรเนื่องจากปัจจัยต่างๆในดินที่มีความเหมาะสมในการเจริญของเชื้อ โดยเฉพาะความเป็นกรดต่ำ

6. การศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิง คือ *Nitrosomonas spp.* และ *Nitrobacter spp.* ด้วยวิธีพีชตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟอิงในปริมาณที่ไม่มากนัก (ร้อยละ 7.76-8.87 และ 6.31-7.78 ตามลำดับ) เพราะเชื้อทั้งสองได้ใช้แอมโมเนียมและไนไตรต์เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญและสร้างไนเตรตสำหรับการเจริญของเมทาโนโทรฟแบคทีเรียไปบางส่วน ทำให้มีข้อจำกัดทางด้านอาหารและความเป็นกรดต่ำที่ไม่เหมาะต่อการเจริญทำให้พบเชื้อทั้งสองในปริมาณต่ำ

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความสามารถในการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี เพื่อจำแนกประเภทและปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟ พบว่ามีสิ่งที่น่าสนใจในการทำการศึกษาคือ

1. ควรทำการเลี้ยงเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะสามารถทำให้เชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียที่อาศัยในดินกลบทับชั้นสุดท้ายในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่มีภาวะเป็นกรดเจริญอย่างเต็มที่

2. จากการทดลอง พบว่า ปริมาณของเชื้อเมทาโน โทรฟที่ทำการศึกษด้วยวิธีพีซีได้มีการหาปริมาณของเชื้อเมทาโน โทรฟทั้งหมดจริง จึงควรใช้โปรปที่จำเพาะต่อเชื้อเมทาโน โทรฟแบคทีเรียในทุกสายพันธุ์เพื่อทราบจำนวนที่แตกต่างระหว่างเมทาโน โทรฟทั้งหมดกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยในตัวอย่างที่ทำการศึกษา

3. ควรทำการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อเมทาโน โทรฟที่มีบทบาทในการเกิดมีเทนออกซิเดชันในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยอายุน้อย (อายุการใช้งาน 1-2 ปี) เพื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาครั้งนี้

4. ควรทำการศึกษาในการใช้สารในการปรับปรุงความเป็นกรดในดินให้มีความเป็นกลางมากขึ้น อาทิ ปูนขาว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2542. **เกณฑ์ มาตรฐาน และแนวทางการจัดการขยะมูลฝอยชุมชน.**
โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว, กรุงเทพฯ.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2546. **โครงการสำรวจและวิเคราะห์องค์ประกอบขยะมูลฝอยชุมชนของ**
เทศบาลทั่วประเทศ. กรุงเทพฯ.
- สถิระ อุดมศรี. 2542. **ชุดดินที่จัดตั้งในภาคกลางของประเทศไทย.** เอกสารวิชาการฉบับที่ 445.
กองสำรวจและจำแนกดิน, กรมพัฒนาที่ดิน, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- สมศักดิ์ วังใน. 2528. **จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน.** ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.
- Allen, M.R., A. Brathwaite and C.C. Hills. 1997. Trace organic compounds in landfill gas
at Seven U.K. waste disposal sites. **Environmental Science and Technology.** 31 :
1054-1061.
- Amann R., Ludeig W. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in
microbial ecology. **FEMS Microbiol. Ecol.** 24 : 555-565.
- Anthony, C. 1982. **The Biochemistry of Methylophs.** Academic Press Ltd., London.
- Anthony, C. 1986. Bacterial Oxidation of Methane and Methanol. **Advanced Microbiology and**
Physiology. 27 : 113-210.
- Anthony, C. 1991. **Assimilation of Carbon in Methylophs.** pp. 79-109. In I. Goldberg and
J. S. Rokem (ed.), **Biology of methylophs.** Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.

- Atlas, R.M. and R. Bartha. 1992. **Microbiol Ecology : Fundamental and Applications**. 3rd ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California, USA.
- Baratt, P.A. 1995. **Microbial methane oxidation and the effective biological treatment of landfill generated methane**. Green'93. Waste Mangement by Landfill, Rotterdam.
- Bauman, J.G.J., Wiegant J, Borst P, Van Duijn P. 1980. **A New method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequence by in situ hybridization of fluochrome-labeled RNA**. 128 : 485-490.
- Bodelier, P.L.E. , M. Meima-Franke, G. Zwart and Laanbroek H. J. 2004. New DGGE strategies for the analyses of methanotrophic microbial communities using different combinations of existing 16S rRNA-based primers. **FEMS Microbiol. Ecol.** 52 : 163–174.
- Boechx, P. and O.V. Cleemput. 1996. Methane oxidation in a neutral landfill soil : influence of moisture content, temperature, and nitrogen turnover. **Environmental Quality**. 25 : 178–183.
- Borjesson, G. and B.H. Svensson. 1997. Seasonal and diurnal methane emissions from a landfill and their regulation by methane oxidation. **Waste Management and Research** 15 : 33-54.
- Bounicor, J.A. and D.T. Wayne. 1992. **Air pollution engineering manual**. Van Nostrand Reinhold, United States of America.
- Bowman, J. P., J. H. Skerratt, P. D. Nichols, and L. I. Sly. 1991. Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.** 85 :15-22.

- Bowman, J. P., L. I. Sly, P. D. Nichols, and A. C. Hayward. 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs : Description of *Methylobacter* gen. nov., Emendation of *Methylococcus*, Validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the Family *Methylococcaceae* Includes only the group I methanotrophs. **Institute Journal Systematic Bacteriology**. 43 : 735-753.
- Bowman, J. P., L. I. Sly, and E. Stackebrandt. 1995. The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae*. **Institute Journal Systematic Bacteriology**. 45 : 182-185.
- Bratina, B. J., G. A. Brusseau, and R. S. Hanson. 1992. Use of 16S rRNA analysis to investigate phylogeny of methylotrophic bacteria. **Institute Journal Systematic Bacteriology**. 42 : 645-648.
- Brusseau, G. A., E. Bulygina, and R. S. Hanson. 1994. Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylotrophic bacteria. **Appl. and Environ. Microbiol.** 60 : 626-636.
- Bulygina, E. S., V. F. Gal_chenko, N. I. Govarakhina, A. I. Netrusov, D. I. Nikitin, Y. A. Trotsenko, and K. M. Chumakov. 1990. Taxonomic studies on methylotrophic bacteria by 5S ribosomal RNA sequencing. **Journal of General Microbiology**. 136 : 441-446.
- Chen, A.C., Ueda K., Ohashi Y. S. and Harada H. 2003. Molecular detection and direct enumeration of methanogenic *Archaea* and methanotrophic bacteria in domestic solid waste landfill soils. **Biotechnology Letters**. 25 : 1563-1569.
- Chiemchaisri, W. 2000. Experiment investigation of nutrient requirements : **EPS Production and VOC Inhibition on Methane Oxidation in Tropical Landfill Cover Soils**. Doctoral thesis, Asian Institute of Technology.

- Chiemchaisri, W., J.S. Wu and C. Visvanathan. 2001. Methanotrophic production of extracellular polysaccharide in landfill cover soils. **Water Science and Technology**. 43(6) : 151-159.
- Christensen , T.H., P.Kjeldsen and R. Stegman. 1996. **Effect of landfill management procedures on landfill stabilization and leachate and gas quality.**
In T.H.Christensen, R. Cossu and R.Stegman. Landfilling of Waste : Leachate. Elsevier Science Publ.Ltd., Essex. :119-138.
- Dedysh,S.N., Derakshani, M. and Liesack, W. 2001. Detection and enumeration of methanotroph in *Sphagnum peat* by 16s rRNA fluorescence in situ hybridization, including the use of developed oligonucleotide probes for *Methylocella palustris*. **Appl. and Environ. Microbiol.** 67 : 4850-4857.
- Dedysh,S.N., Dunfield, P.F., Manigee Dera kshani, Stephan Stubner, Jurgen Heyer and Werner Liesack. 2003. Differential detection of type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly developed 16S rRNA-target fluorescent oligonucleotide probes. **FEMS Microbiol. Ecol.** 43 : 299–308.
- Dedysh, S. N., Liesack, W., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., Semrau, J. D., Bares, A. M., Panikov, N. S. and Tiedje, J. M. 2000. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. **Instituted journal Systematic Evolution Microbiology.** 50 : 955-969.
- Dedysh, S. N., Panikov, N. S. and Tiedje, J. M. 1998a. Acidophilic methanotrophic communities from *Sphagnum* peat bogs. **Appl. and Environ. Microbiol.** 64 : 922-929.

Dedysh, S. N., Panikov, N. S., Liesack, W., Großkopf, R., Zhou, J. and Tiedje, J. M. 1998b.

Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands.

Science. 282 : 281-284.

Dunfield P. and Knowles R. 1995. Kinetic of inhibition of methane oxidation by nitrate,

nitrate and ammonium in humisol. **Appl. and Environ. Microbiol.** 61(8) : 3129–3135.

Dunfield P., Valenina N. Khmelenina, Natalia E. Suzina, Yuri A. Trotsenko and Svetlana

N. Dedysh. 2003. *Methylocella silvestris* sp. nov., A novel methanotroph isolated

from an acidic forest cambisol. **International Journal of Systematic and**

Evolutionary Microbiology. 53 : 1231–1239.

Eller, G., Stubner, S. and Frenzel, P. 2001. Group-specific 16S rRNA targeted probes for the

detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridization.

FEMS Microbiol. Lett. 198 : 91-97.

Glinski, J. and W. Stepniewski. 1986. **Soil Aeration and Its Role for Plants.** 2nd ed.,

CRC Press, Inc., Boca Raton, USA.

Hanson, R. S., A. I. Netrusov, and K. Tsuji. 1991. **The Obligate Methanotrophic Bacteria**

Methylococcus, Methylomonas, Methylosinus and Related Bacteria. In A. Balows,

H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), The prokaryotes.

Springer-Verlag, New York. : 2350-2365.

Hanson, R.S. and T.E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews.**

60 (2) : 439–471.

Hanson, R. S., K. Tsuji, C. Bastien, H.-C. Tsien, B. Bratina, G. Brusseau, and S. Machlin. 1990.

Genetic and Biochemical Studies of Methylophilic Bacteria. In C. Atkin and J.

Smith. Gas, oil and coal biotechnology. Institute of Gas Technology, Chicago. 215-234.

- Hilger, H.A., S.K. Liehr, and M.A. Barlaz. 1999. Exopolysaccharide control of methane oxidation in landfill cover soil. **Journal of Environmental Engineering**. 125 : 1113–1123.
- Hubley, J.H., Thomson, A.W. and Wilkinson, J.F. 1975. Specific inhibitor of methane oxidation in *Methylosinus Trichosporium*. **Arch. Microbiol.** 102 : 199-202.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 1992. **The supplementary report to the IPCC scientific assessment**. J.T. Houghton, B.A. Callender and S.K. Varny(ED). The Press Syndicate of the University of Cambridge, Melbourne, Australia.
- King, G. M., and S. Schnell. 1996. Ammonium and nitrite inhibition of methane oxidation by *Methylobacter albus BG8* and *Methylosinus trichosporium OB3b* at low methane concentrations. **Appl. and Environ. Microbiol.** 60(10) :3508–3513.
- Kreileman, G.J.J. and A.F. Bouwman. 1994. Computing land use emission of greenhouse gases. **Water Air and Soil Pollution**. 76 (2) : 231–257.
- Large, P. J., and C. W. Bamforth. 1988. **Methylotrophy and Biotechnology**. Longman Group, Harlow, United Kingdom.
- Lowe, L.E. 1993. **Soil Sampling and Methods of Analysis Total and Labile Polysaccharide**. Analysis of soils Carter , M.R., Ed., Lewis, Canadian Society of Soil Science, USA.
- Maurice, C. and A. Lagerkvist. 1998. **Landfill gas properties and effects on green plants**. Division of Landfill Science and Technology, Department of Environmental Engineering Lulea.
- Mettings, F.B. 1993. **Soil Microbiology and Ecology. Application in Agriculture and Environmental Management**. Mettings, F.B.,(ed). Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

- Miller, R.W. and R.L.Donahue. 1995. **Soils in Our Environment** : 7th ed., Prentice-Hall Inc., New Jersey, USA.
- Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. **Appl. and Environ. Microbiol.** 62 : 2156-2162.
- Neill O., J. G., and J. F. Wilkinson. 1977. Oxidation of ammonium by methane oxidizing bacteria and the effect of ammonium on methane oxidation. **ZJ. General Microbiology.** 100 : 407 – 412.
- Nesbit, S. P., and G. A. Breitenbeck. 1992. A Laboratory study of factors influencing methane uptake by soil. **Agriculture Ecosystem Environment.** 41 : 39-54.
- Nozhevnikova, A.N., V.K. Nekrasova, V.S. Lebedev and A.B. Lifshits. 1993. **Microbiological Processes in Landfills.** Water Science and Technology. 27(2): 243-252.
- Pareek. S., Matsui, S., and Kim, S.K., 1998. Biodegradation of lignocellulosic material under sulfidogenic conditions in the landfill column reactors. **Environmental Technology.** 19 : 253-261
- Pascal,B., Cleemput, O.V., and Villaralvo, I., 1996. Methane emission from a landfill and the methane oxidizing capacity of its soil. **Soil Biology and Biochemistry.** 28 : 1397-1405
- Pokhrel, D. 1998. **Microbial Methane Oxidation Studies in Laboratory Scale Experiments.** Master Thesis, Asian Institute of Technology.

- Ree, J.F. 1985. **Landfill for Treatment of Solid Wastes. In Comprehensive Biotechnology, Vol.4 : The Principles, Applications, Regulation of Biotechnology in Industry, Agricultural and Medicins.** Moo-Yong, M.(ed). Pergamon Press Ltd., England, UK.
- Rosvlev, P., N. Iversen and K. Henriksen. 1997. Oxidation and assimilation of atmospheric methane by soil methane oxidizers. **Appl. and Environ. Microbiol.** 63(3) : 874–880.
- Schutz, H., W. Seiler, and H. Rennenberg. 1990. **Soil and Land Use Related Sources and Sinks of Methane in the Context of the Global Methane Budget.** pp. 270-285. *In* A. F. Bouwman (ed.), Soils and the greenhouse effect. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Svenning, M.M., I. Warttinen, A. G. Hestnes and Svend J. Binnerup. 2003. Isolation of methane oxidizing bacteria from soil by use of a soil substrate membrane system. **FEMS Microbiol. Ecol.** 44 : 347–354.
- Sylvia Schnell and Gary M. King. 1994. Analysis of ammonium inhibition of atmospheric methane consumption in forest soil. **Appl. and Environ. Microbiol.** 60(10) : 3514–3521.
- Tchobanoglous, G., H. Theisen and S.A. Vigil. 1993. **Integrated Solid Waste Management, Engineering Principal and Management Issue.** McGraw Hill, Inc., New York.
- Tsien, H.C., Bratina, B.J., Tsuji, K. and Hanson, R.S. 1994. Use of oligonucleotide signature probes for identification of physiological groups of methylotrophic bacteria. **Appl. and Environ. Microbiol.** 56 : 2858-2865

United State Environmental Protection agency (USEPA). 1985. **Critical review and summary of leacheate and gas production from landfill. Poland, F.G.,S.R., Harper(ED).** EPA/60012-861073. I.S.EPA Cooperative Agreement CR 809997, Georgia Tech Project No. E-20-G01. Office of Research and Development Cincinnati, Ohio, USA.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1985. **40 CFR Part 257 – 258. RCRA Subtitle D. October 9, 1991.** Fed Regist 50978-51119.

Visvanathan, C., D. Pokhrel, W. Chiemchaisri, J.P.A. Hettiaratchi and J.S. Wu. 1999. Methanotrophic activities in tropical landfill cover soil : effect of temperature, moisture content and methane concentration. **Waste Management and Research.** 17 : 313-323.

Wagner, M., G. Rath, H.-P. Koops, J. Flood, and R. I. Amann. 1996. *In Situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. **Water Sci. Technol.** 34(1/2) : 237-244.

Whalen, S.C., W.S. Reeburgh and K.A. Sanddbeck. 1990. Rapid methane oxidation in a landfill cover soil. **Appl. and Eniron. Microbiol.** 56 : 3405-3411.

Whittenbury, R., and H. Dalton. 1981. **The Methylotrophic Bacteria.** *In* M. P. Starr, H. Stolph, H. G. Tru ¨per, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), The prokaryotes. Springer-Verlag KG, Berlin. : 894-902.

Whittenbury, R., and N. R. Krieg. 1984. **Methylococcacea fam. nov.** *In* N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey_s manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. : 256-262.

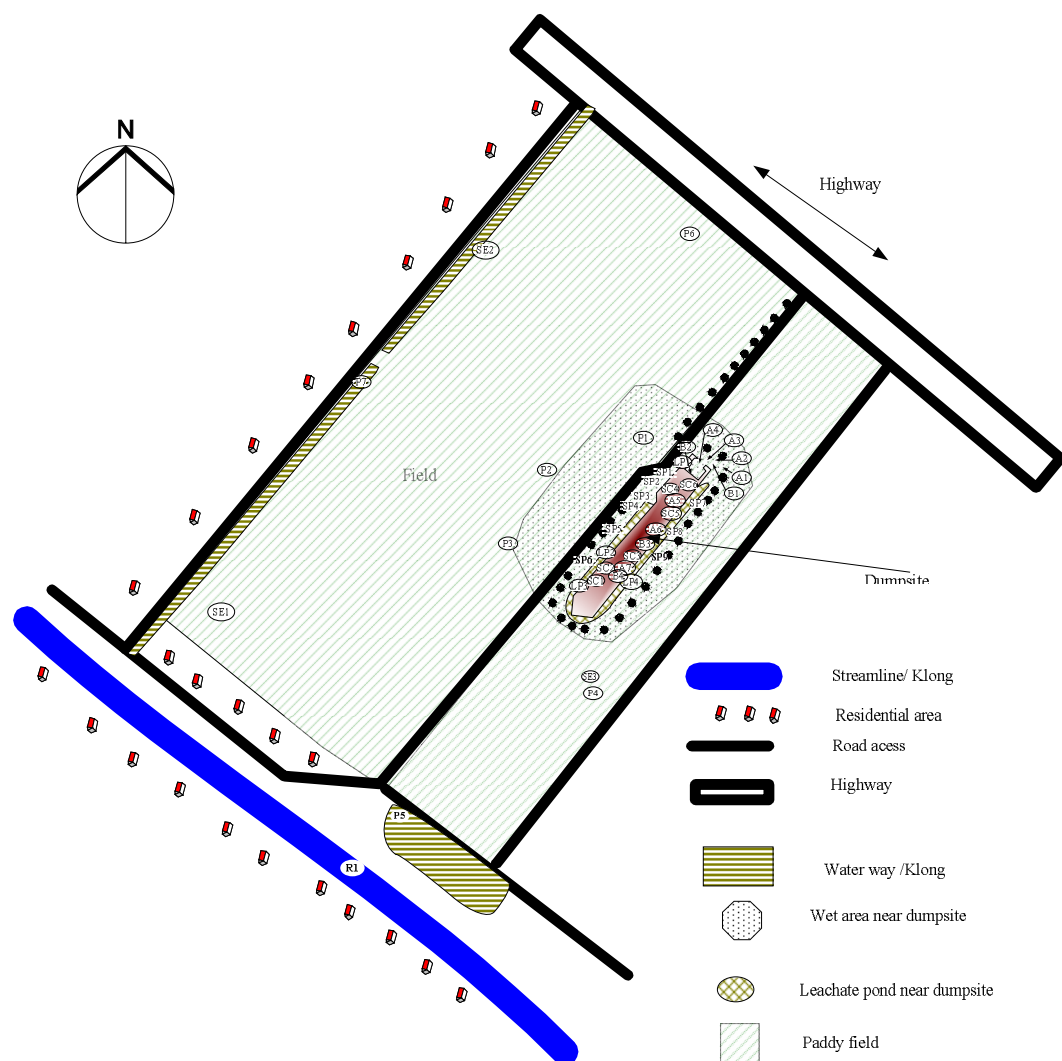
Whittenbury, R., K. C. Phillips, and J. G. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria. **Journal of General Microbiology.** 61(3) : 205-218.

William, G.M. and C. Zobell. 1949. The occurrence and characteristics of methane oxidizing **bacteria** in marine sediment. **Appl. and Environ. Microbiol.** 58 : 462-473.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

พื้นที่ฝังกลบมูลฝอยที่ทำการศึกษา วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง



ภาพผนวกที่ ก1 แผนที่พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี



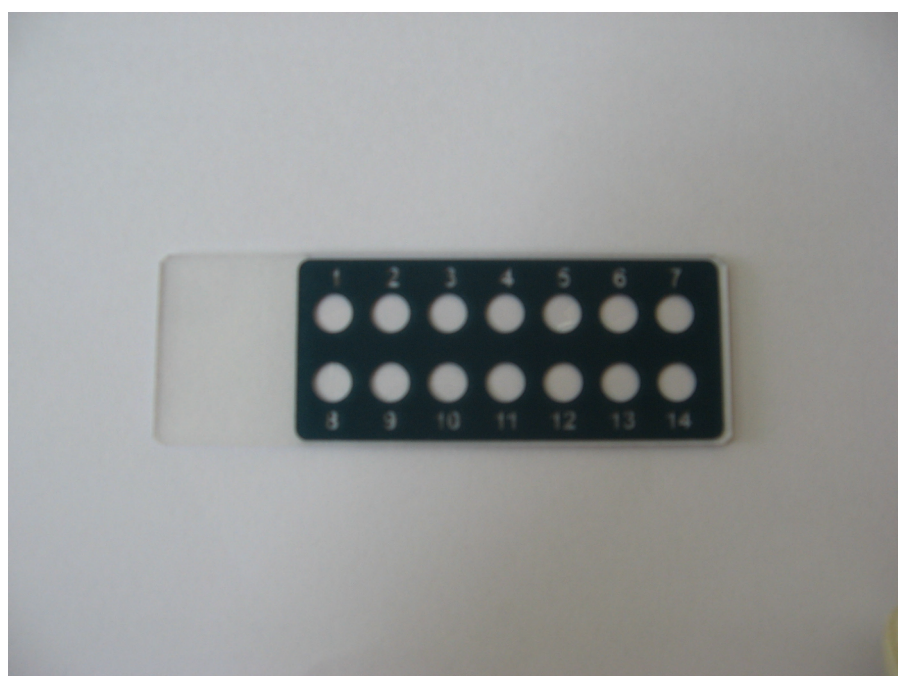
ภาพผนวกที่ ก2 พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ที่ทำการศึกษาดินกลบทับชั้น
สุดท้ายในงานวิจัยครั้งนี้



ภาพผนวกที่ ก3 จุดที่ทำการศึกษาดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย



ภาพผนวกที่ ก4 ขวดซีรัมขนาด 20 และ 118 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง



ภาพผนวกที่ ก5 สไลด์หลุมชนิด 14 หลุมที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ข

ผลการทดลองจากการศึกษาลักษณะดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
และการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิชั่น

ตารางผนวกที่ ๗1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย อ.ลาดหลุมแก้ว

Parameter	Soil				
	µg/g (dry soil)	0-15 cm.	16-30 cm.	31-45 cm.	46-60 cm.
NH ₄ ⁺		3.89 ± 3.28	5.83 ± 4.99	4.16 ± 2.07	6.94 ± 5.96
NO ⁻²		0.16 ± 0.12	2.02 ± 3.64	1.16 ± 1.99	0.99 ± 1.67
NO ³⁻		9.36 ± 2.45	6.89 ± 1.22	7.66 ± 4.89	8.06 ± 4.65
Organic Nitrogen		1,457.93 ± 404.30	1,532.87 ± 454.37	1,524.13 ± 415.58	2,329.77 ± 310.53
TN		1,471.33 ± 403.63	1,547.60 ± 453.14	1,537.11 ± 411.74	2,345.76 ± 307.65
TP		1,025.56 ± 1,243.51	628.26 ± 609.81	780.42 ± 837.44	707.93 ± 520.63
TOC		7,738.82 ± 4,074.12	6,478.80 ± 2,209.17	9,033.78 ± 3,079.55	12,812.04 ± 3,292.54
EPS		1,234.40 ± 95.61	1,528.80 ± 384.91	2,507.20 ± 275.19	2,371.20 ± 240.67
Biomass		6,504.42 ± 4,000.76	4,950.00 ± 2,008.43	6,526.58 ± 3,242.86	10,440.84 ± 3,064.54
Moisture Content		16.28 ± 6.50	22.52 ± 4.33	25.28 ± 3.81	26.37 ± 5.54
Temp (°C)		36.40 ± 3.05	35.20 ± 4.44	33.40 ± 4.56	33.80 ± 3.77
pH		3.09 ± 0.24	3.82 ± 0.96	6.27 ± 0.69	5.93 ± 0.60

ตารางผนวกที่ ข2 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร

Parameter µg/g (dry soil)	Sample Site				
	1	2	3	4	5
NH ₄ ⁺	1.39	1.79	0.92	2.78	2.55
NO ⁻²	0.00	0.07	0.20	0.26	0.26
NO ³⁻	6.84	8.26	13.35	8.68	9.68
Organic Nitrogen	1,808.94	1,950.57	1,104.62	1,379.27	1,056.25
Total Nitrogen	1,817.16	1,960.68	1,119.09	1,390.99	1,068.75
Phosphate	248.03	3,061.35	243.41	1,383.81	191.20
Total Organic Carbon	5,989.50	14,890.40	7,218.80	5,298.90	5,296.50
EPS (mg/g)	1.27	1.38	1.14	1.23	1.16
Biomass	4781.39	14191.05	6460.46	4949.78	4774.10
Moisture Content	11.25	10.69	19.57	23.79	12.95
Temperature (°C)	39.00	36.00	34.00	33.00	40.00
pH	3.18	3.44	2.85	3.07	2.89

ตารางผนวกที่ ข3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 16-30 เซนติเมตร

Parameter	Sample Site				
µg/g (dry soil)	1	2	3	4	5
NH ₄ ⁺	0.46	11.09	11.10	2.31	4.16
NO ⁻²	0.07	0.40	0.93	0.20	8.50
NO ³⁻	5.27	6.19	7.34	7.13	8.50
Organic Nitrogen	2,064.28	1,873.17	1,194.14	974.13	1,558.62
Total Nitrogen	2,070.07	1,890.86	1,213.51	983.77	1,579.78
Phosphate	153.22	1,053.96	215.31	1,493.12	225.69
Total Organic Carbon	9,849.00	6,111.40	6,877.00	3,756.90	5,799.70
EPS (mg/g)	2.15	1.44	1.25	1.62	1.19
Biomass	8817.85	5518.96	6107.60	3452.02	5074.54
Moisture Content	23.15	18.69	23.78	28.78	18.15
Temperature (°C)	40.00	33.00	31.00	32.00	40.00
pH	5.37	3.59	3.12	4.05	2.98

ตารางผนวกที่ ๔ ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 31-45 เซนติเมตร

Parameter μg/g (dry soil)	Sample Site				
	1	2	3	4	5
NH ₄ ⁺	3.24	4.63	1.85	3.70	7.40
NO ⁻²	0.13	0.00	0.79	0.20	4.69
NO ³⁻	1.90	6.45	13.76	11.50	4.69
Organic Nitrogen	1,927.25	1,911.06	929.59	1,371.46	1,481.28
Total Nitrogen	1,932.51	1,922.14	945.99	1,386.87	1,498.05
Phosphate	186.72	1,266.94	2,029.43	255.00	164.02
Total Organic Carbon	5,585.60	11,249.40	9,717.20	6,105.40	12,511.30
EPS (mg/g)	2.88	2.67	2.22	2.50	2.27
Biomass	5173.80	10505.81	9353.33	5623.56	11915.17
Moisture Content	28.40	22.10	25.38	29.63	20.89
Temperature (°C)	40.00	32.00	30.00	29.00	36.00
pH	7.19	6.68	5.55	6.25	5.67

ตารางผนวกที่ ข5 ผลการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 46-60 เซนติเมตร

Parameter µg/g (dry soil)	Sample Site				
	1	2	3	4	5
NH ₄ ⁺	1.39	5.09	2.77	9.25	16.18
NO ⁻²	0.00	0.07	0.40	0.53	3.96
NO ³⁻	3.46	7.82	14.57	10.50	3.96
Organic Nitrogen	2,513.82	2,602.91	1,813.38	2,425.74	2,293.01
Total Nitrogen	2,518.67	2,615.88	1,831.12	2,446.02	2,317.11
Phosphate	190.06	1,247.89	1,218.74	688.01	194.97
Total Organic Carbon	18,104.10	12,397.30	9,163.50	12,945.50	11,449.80
EPS (mg/g)	2.77	2.38	2.20	2.35	2.16
Biomass	16376.17	11904.40	8736.96	12216.65	10739.39
Moisture Content	32.75	20.67	26.76	30.77	20.87
Temperature (°C)	38.00	34.00	30.00	30.00	37.00
pH	6.92	5.95	5.49	5.87	5.41



ภาพผนวกที่ ข1 ขวดซีรัมที่ทำการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

ตารางผนวกที่ ข6 ค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์ก๊าซมีเทนที่ระดับความลึกต่างๆ

Days	Methane Concentration (%)			
	15-30 cm.	16-30 cm.	31-45 cm.	46-60 cm.
0	4.8724	5.5346	5.7486	5.5072
3	4.5822	5.1942	5.3719	5.1442
6	4.3744	5.0113	4.9239	4.8505
9	4.1411	4.7286	4.4990	4.4802
12	3.8830	4.5035	4.0837	4.1198
15	3.7229	4.2618	3.7357	3.8435
18	3.5259	3.9555	3.2273	3.4055
21	3.2491	3.7623	2.7877	2.8471
24	2.8337	3.4285	2.1992	2.3287
27	2.4760	3.1904	1.6426	2.0243
30	2.0206	2.7282	1.2147	1.6869
33	1.7618	2.3802	0.9188	1.4913
36	1.5450	2.2067	0.8232	1.2748
39	1.4834	1.9818	0.7129	1.1576
42	1.3024	1.7993	0.5703	1.0406
45	1.1120	1.6364	0.4902	0.8972
48	0.9185	1.4576	0.3949	0.7616
51	0.8138	1.2599	0.3287	0.6608
54	0.6155	1.1241	0.2490	0.5302
57	0.4216	0.9866	0.2014	0.3711
60	0.3181	0.8359	0.1340	0.3373
63	0.2214	0.7007	0.0624	0.1855
66	0.1573	0.5800	0.0000	0.0656
69	0.0533	0.4894	0.0000	0.0000
72	0.0000	0.3515	0.0000	-
75	-	0.2561	-	-
78	-	0.1447	-	-
81	-	0.0755	-	-
84	-	0.0006	-	-
87	-	0.0000	-	-

การคำนวณการเปลี่ยนหน่วยของก๊าซจากเปอร์เซ็นต์ (%) เป็นไมโครโมล (μmol)

การศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชันในดินกลบทับชั้นสุดท้ายของพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย
อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี ที่ระดับความลึกต่างๆ

สถานะของการทดลอง

ปริมาตรของขวดซีรัมที่ใช้ในการทดลอง 118 มิลลิลิตร (ml)

น้ำหนักเปียกของดิน 10 กรัม (g)

ปริมาณความชื้นของดิน

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร ปริมาณร้อยละ 15.65

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร ปริมาณร้อยละ 22.51

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร ปริมาณร้อยละ 25.28

ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร ปริมาณร้อยละ 26.37

น้ำหนักแห้งของดินเท่ากับ

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร $= 10 - (10 \times 0.1565)$
 $= 8.435$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร $= 10 - (10 \times 0.2251)$
 $= 7.479$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร $= 10 - (10 \times 0.2528)$
 $= 7.572$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร $= 10 - (10 \times 0.2637)$
 $= 7.363$ กรัม (g)

ความหนาแน่นของดิน 1,111 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (1.11 กรัมต่อมิลลิลิตร)

ปริมาตรของดิน $= 10 \text{ กรัม} / 1.11 \text{ กรัมต่อมิลลิลิตร}$
 $= 9.0090$ มิลลิลิตร (ml)

ปริมาตรของอากาศที่เหลือภายในขวดซีรัม $= 118 - 9.0090$ มิลลิลิตร (ml)
 $= 108.991$ มิลลิลิตร (ml)

อุณหภูมิขณะทดลอง 30 องศาเซลเซียส (303 เคลวิน)

สมมติความดันภายในขวดซีรัมเท่ากับ 1 ความดันบรรยากาศ (atm)
ในระบบปิดสามารถคำนวณหน่วยของก๊าซเป็นโมล (mole) จากสมการ

$$PV = nRT$$

เมื่อ P = Partial pressure หรือ เปอร์เซ็นต์ของก๊าซ

$$R = 82.06 \text{ atm} \cdot \text{ml} / \text{mole} \cdot \text{K}$$

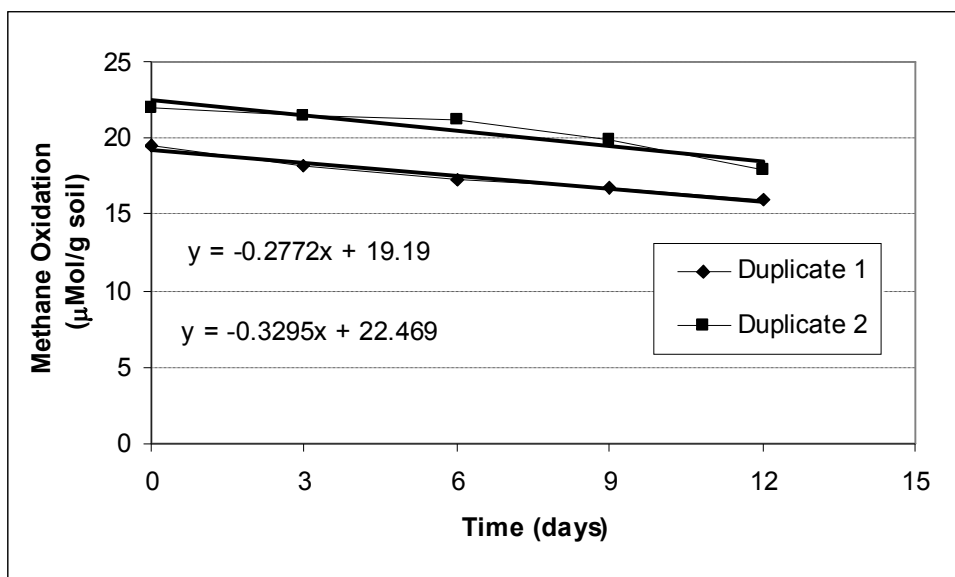
$$K = 303 \text{ K}$$

n = จำนวนโมลของก๊าซ

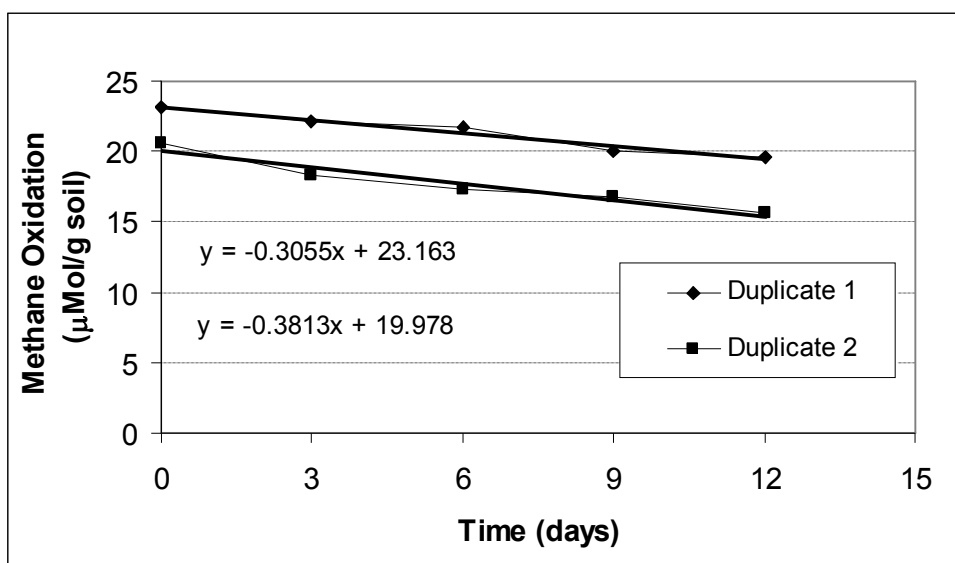
$$\text{จำนวนโมลของก๊าซ CH}_4 \text{ (mole)} = \frac{(A\%)(108.991 \text{ ml})}{82.06 \text{ atm} \cdot \text{ml} / \text{mole} \cdot \text{K}}$$

การคำนวณอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน

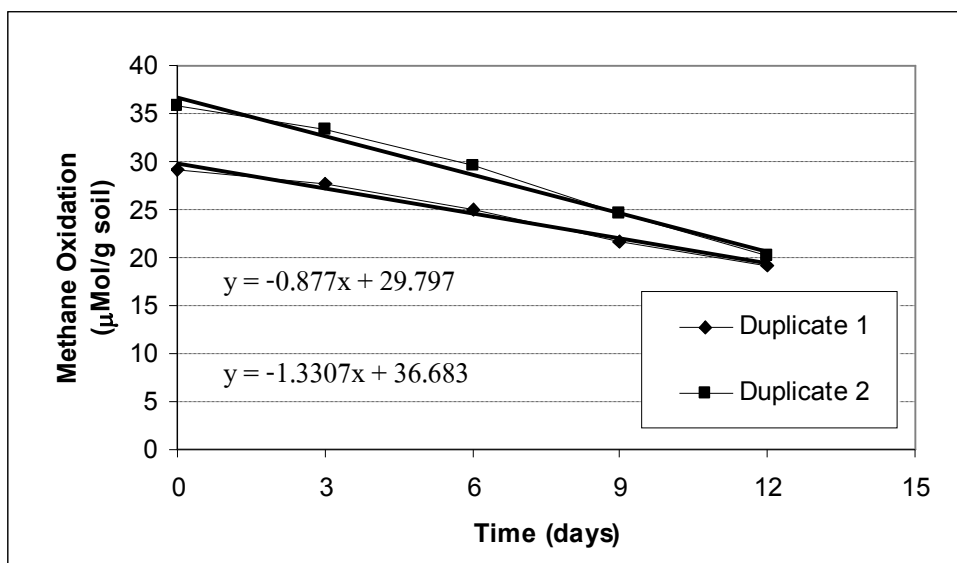
- เริ่มจากการเปลี่ยนหน่วยของก๊าซจากเปอร์เซ็นต์ (%) เป็น ไมโครโมล (μmol)
- นำน้ำหนักแห้งของดินที่ระดับความลึกต่างๆมาหารเพื่อเปรียบเทียบต่อกรัมดิน (น้ำหนักแห้ง)
- และนำข้อมูลในการลดลงของมีเทนต่อกรัมดิน (น้ำหนักแห้ง) เปรียบเทียบกับเวลา จะได้ Methane Oxidation Rate จากความชันของกราฟดังภาพผนวกที่ ข 2 – ข 21



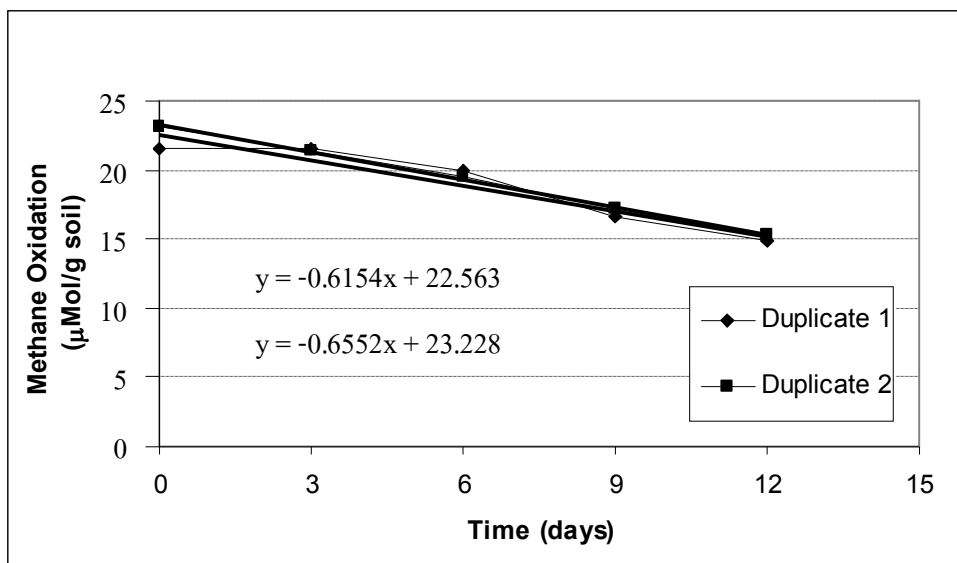
ภาพผนวกที่ ข2 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 0-15 ซม.



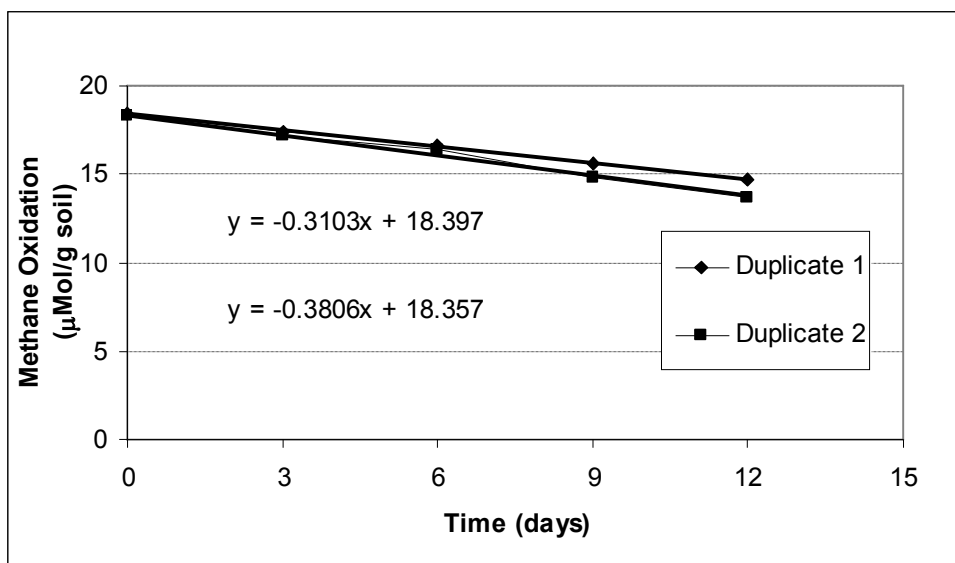
ภาพผนวกที่ ข3 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 15-30 ซม.



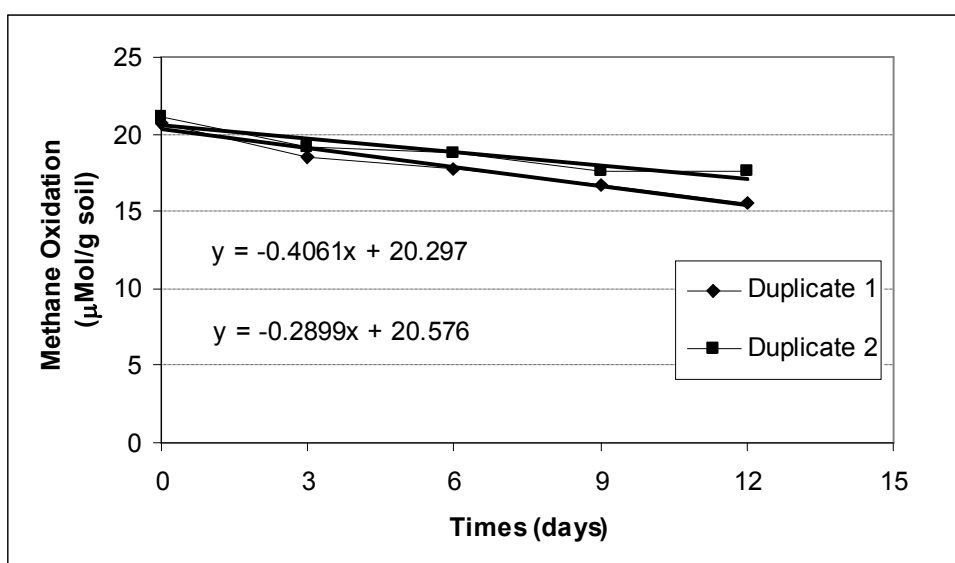
ภาพผนวกที่ ข4 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 31-45 ซม.



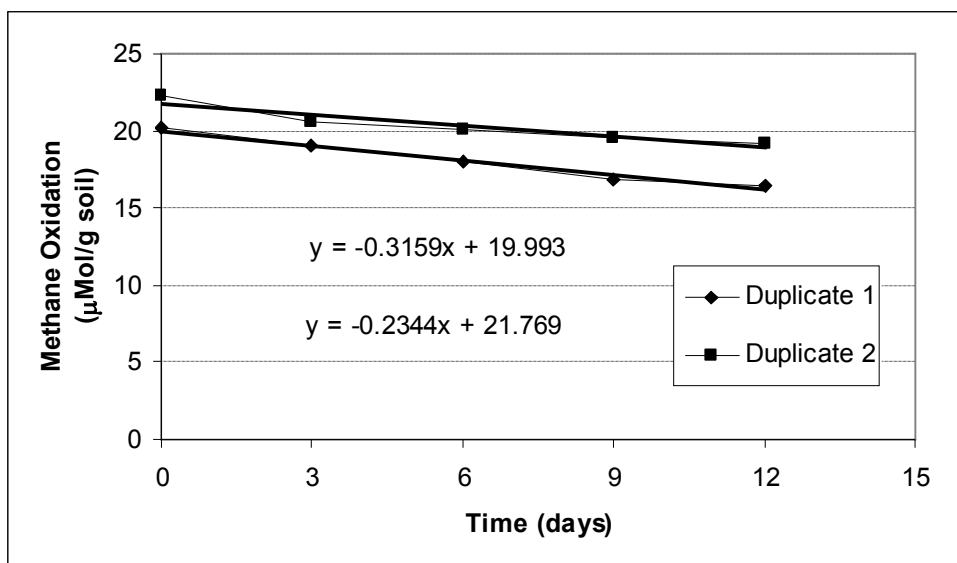
ภาพผนวกที่ ข5 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 46-60 ซม.



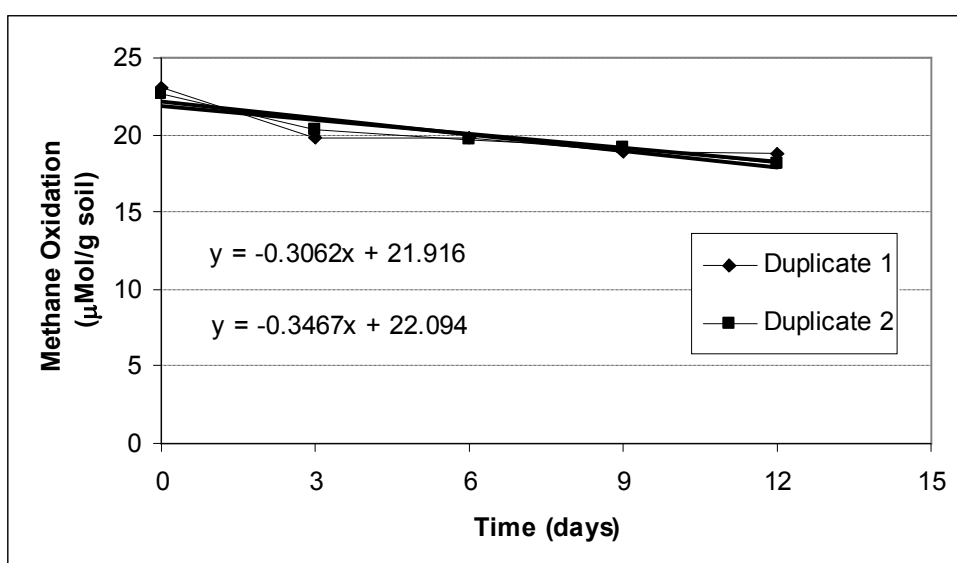
ภาพผนวกที่ ข6 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 0-15 ซม.



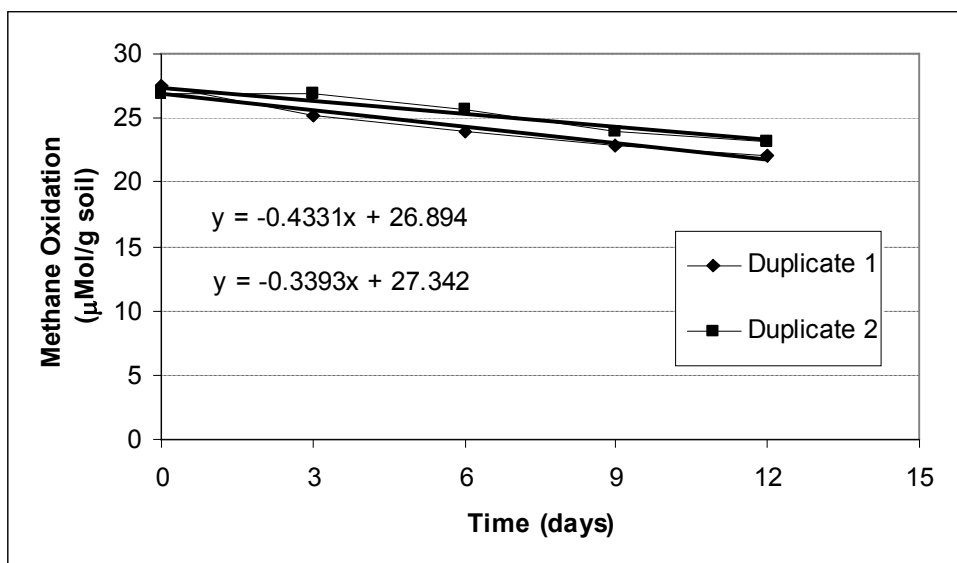
ภาพผนวกที่ ข7 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 1 ที่ความลึก 15-30 ซม.



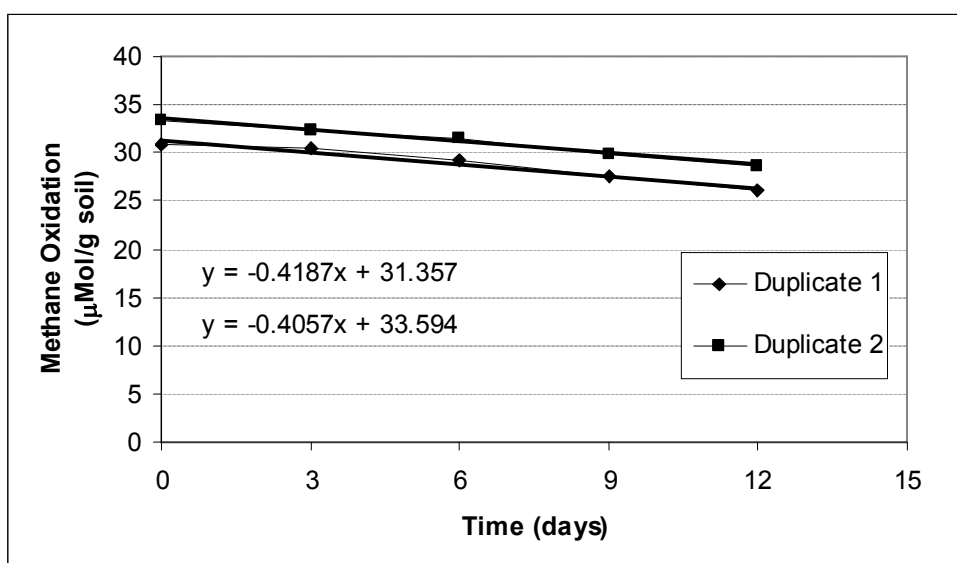
ภาพผนวกที่ ข8 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 31-45 ซม.



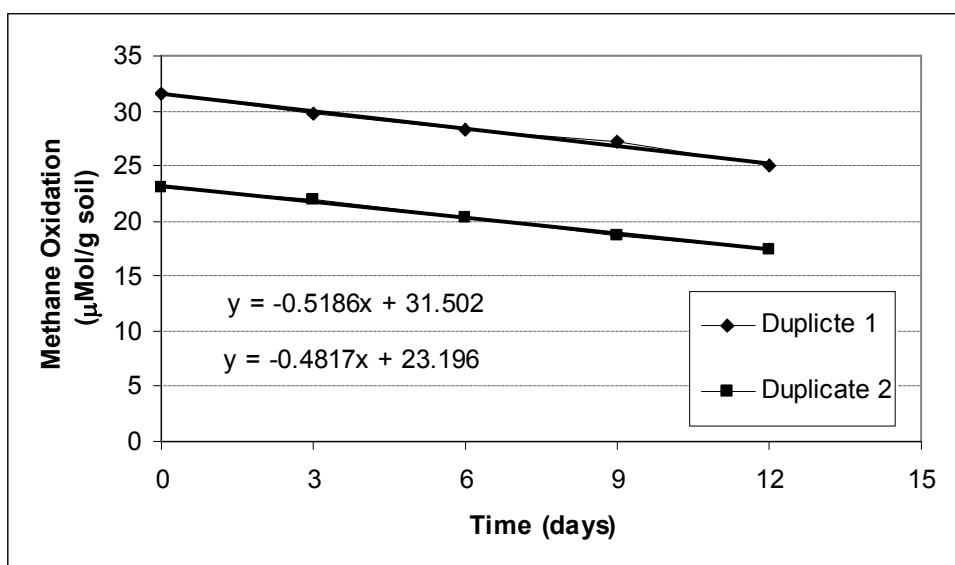
ภาพผนวกที่ ข9 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 2 ที่ความลึก 46-60 ซม.



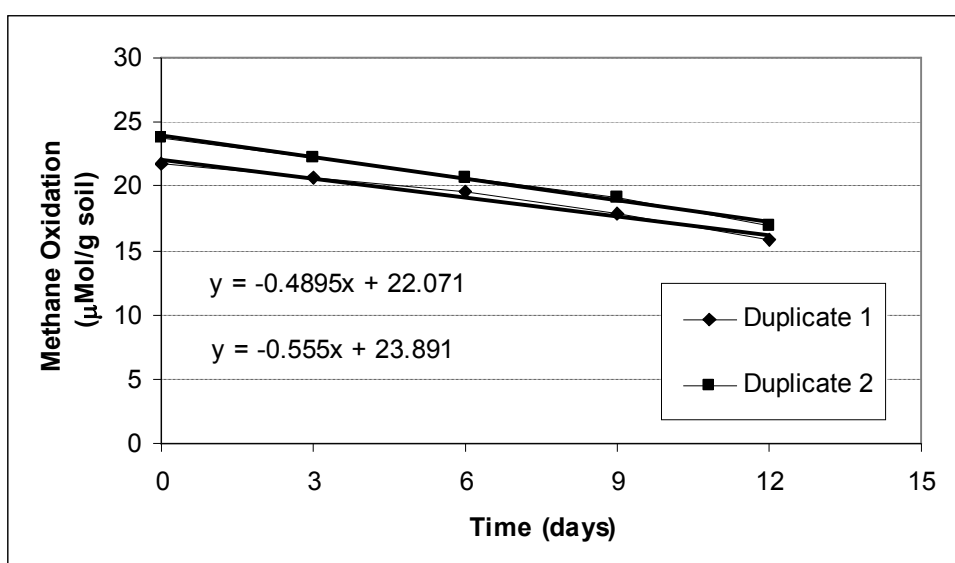
ภาพผนวกที่ ข10 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 0-15 ซม.



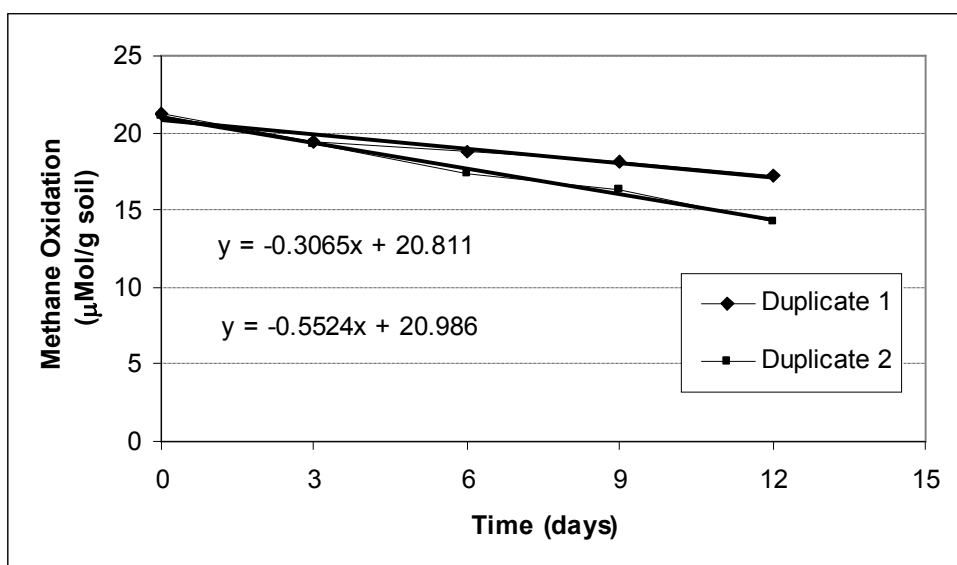
ภาพผนวกที่ ข11 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 15-30 ซม.



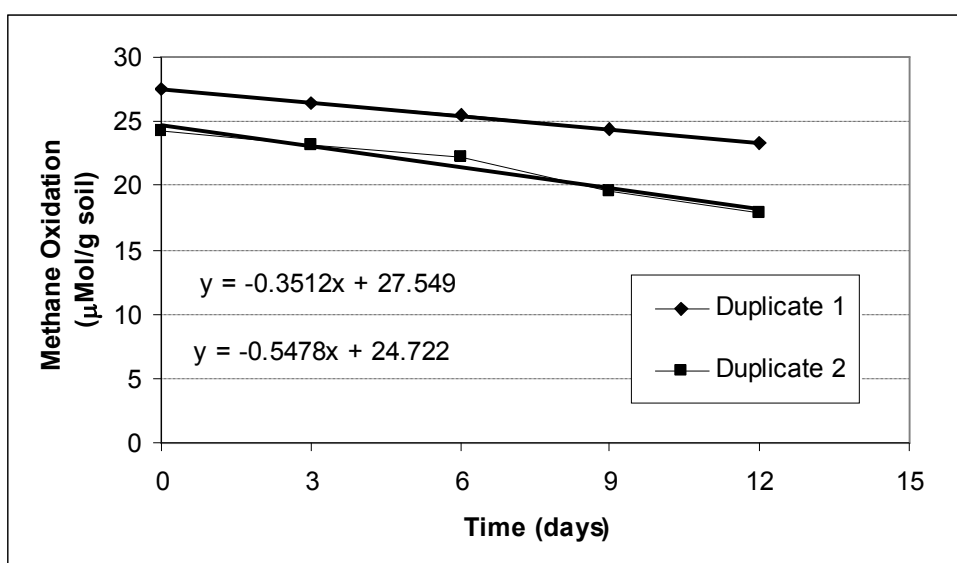
ภาพผนวกที่ ข12 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 31-45 ซม.



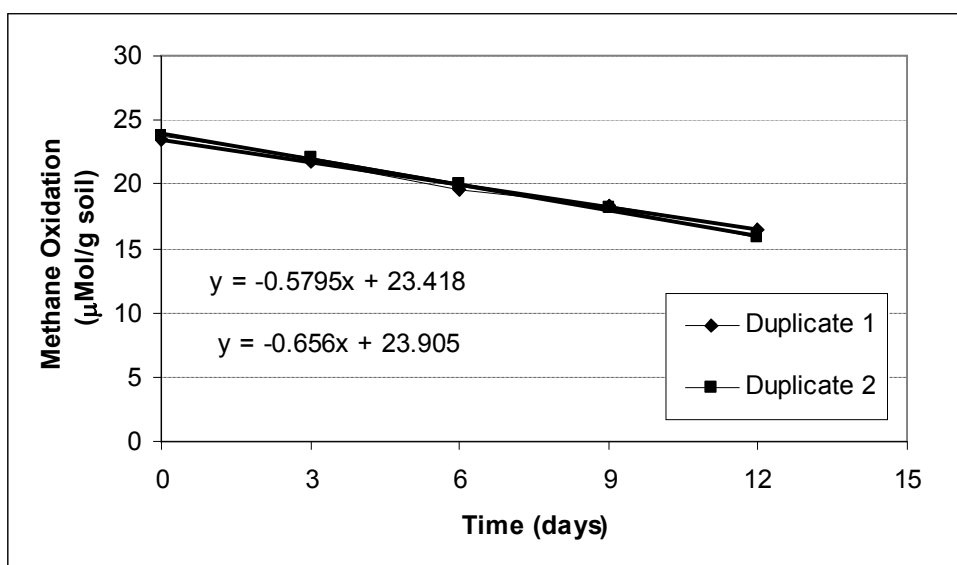
ภาพผนวกที่ ข13 ผลการศึกษ้อัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 3 ที่ความลึก 46-60 ซม.



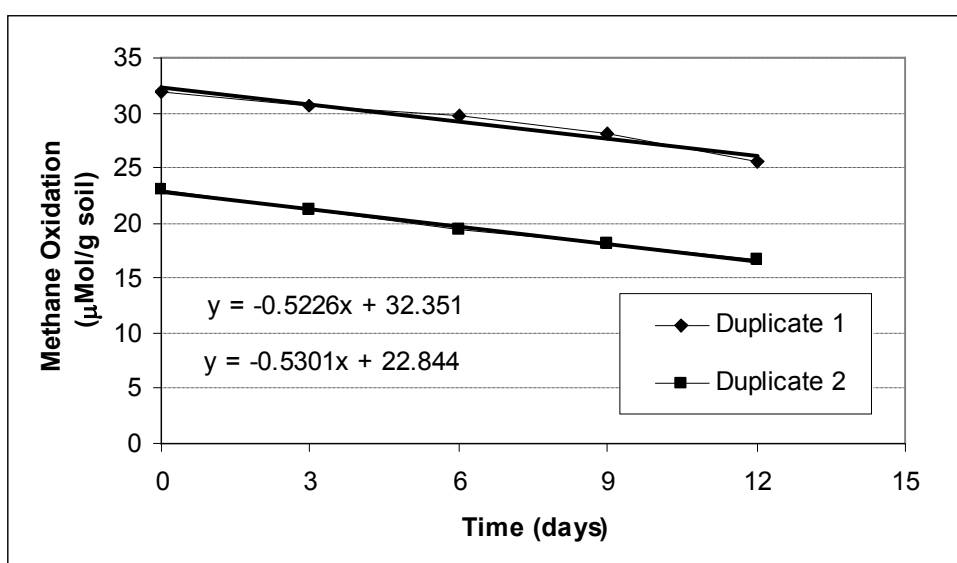
ภาพผนวกที่ ข14 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 0-15 ซม.



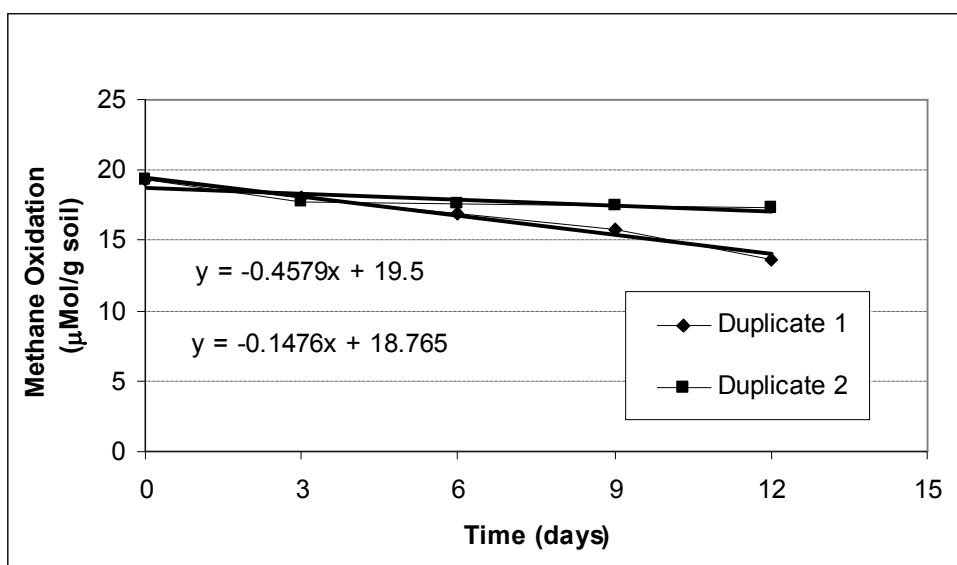
ภาพผนวกที่ ข15 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 15-30 ซม.



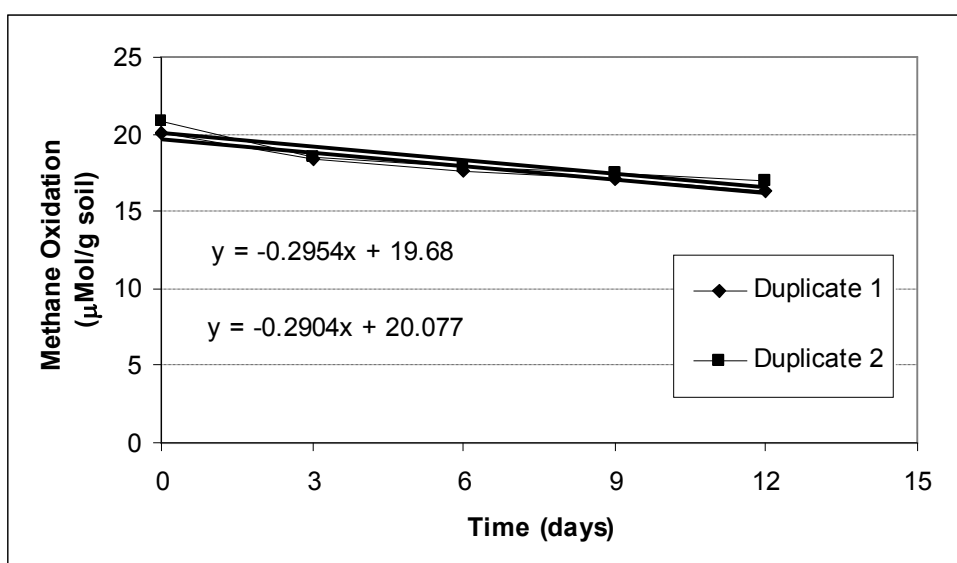
ภาพผนวกที่ ข16 ผลการศึกษายัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 31-45 ซม.



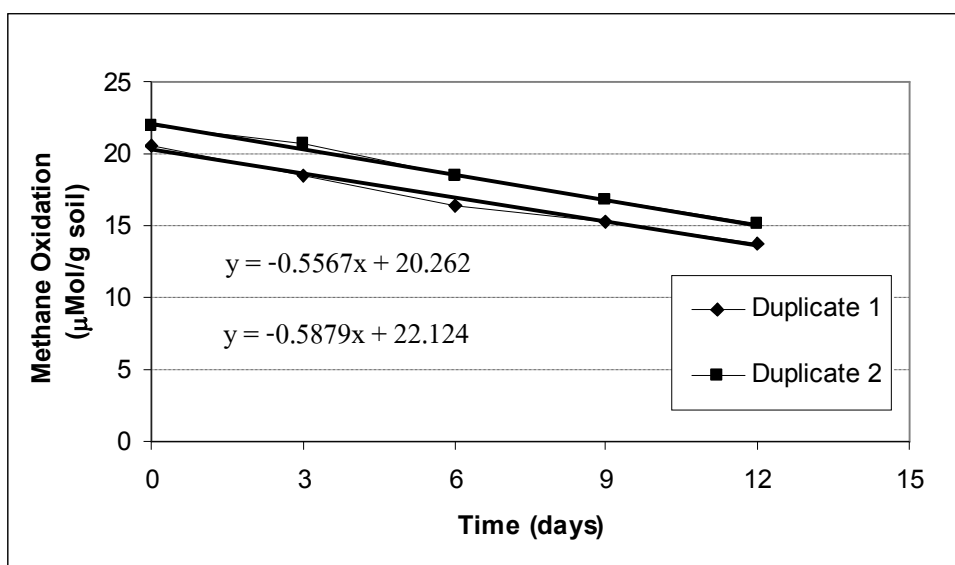
ภาพผนวกที่ ข17 ผลการศึกษายัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 4 ที่ความลึก 46-60 ซม.



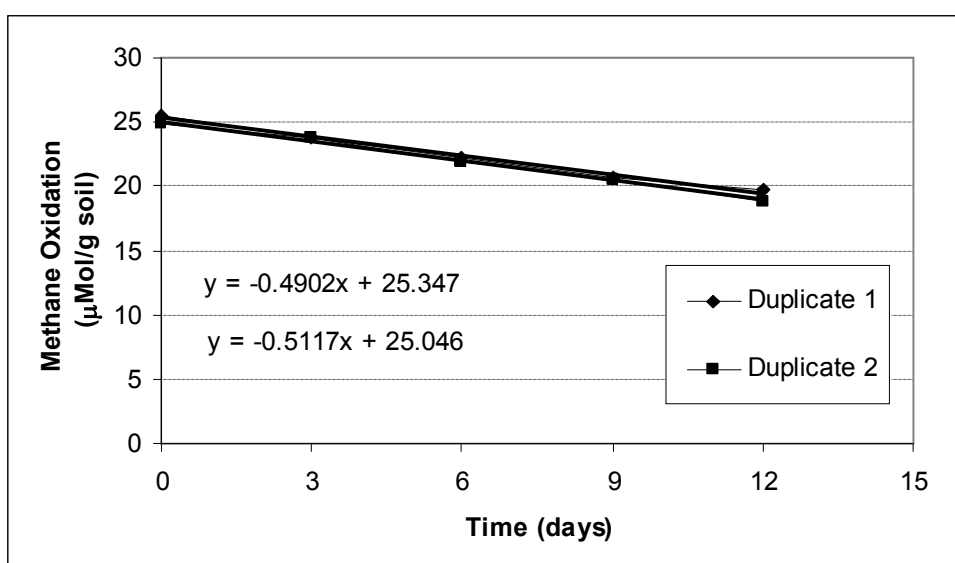
ภาพผนวกที่ ข18 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 0-15 ซม.



ภาพผนวกที่ ข19 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 15-30 ซม.



ภาพผนวกที่ ข20 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 31-45 ซม.



ภาพผนวกที่ ข21 ผลการศึกษาอัตราการเกิดมีเทนออกซิเดชัน ณ จุดเก็บที่ 5 ที่ความลึก 46-60 ซม.

ภาคผนวก ค

การศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธีเอ็มพีเอ็น

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NMS (NMS : Nitrate Mineral Salts Medium)

ส่วนประกอบ

● $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	กรัม
● KNO_3	1	กรัม
● $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.717	กรัม
● KH_2PO_4	0.272	กรัม
● $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
● Ferric ammonium EDTA	0.004	กรัม
● Trace element solution	0.5	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรแล้วจึงนำมาต้มโดยค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิจนกระทั่งเดือด ปรับ pH เป็น 8.3 และนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนำไป Autoclave ที่ความดัน 15 psi, อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

การคำนวณเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟในหน่วย MPN / g soil

สถานะของการทดลอง

น้ำหนักเปียกของดิน 1 กรัม (g) ในสารละลายเจือจาง 9.5 มิลลิลิตร
ปริมาณความชื้นของดิน

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 15.65

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 22.51

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 25.28

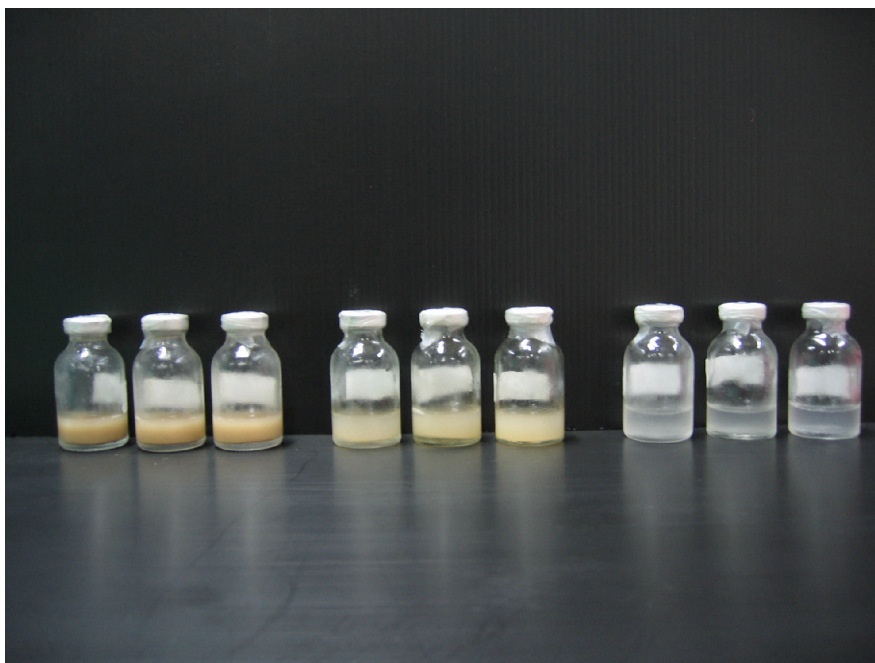
ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 26.37

น้ำหนักแห้งของดินเท่ากับ

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร	= 1 - (1 x 0.1565)	
	= 0.8435	กรัม (g)
ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร	= 1 - (1 x 0.2251)	
	= 0.7479	กรัม (g)
ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร	= 1 - (1 x 0.2528)	
	= 0.7572	กรัม (g)
ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร	= 1 - (1 x 0.2637)	
	= 0.7363	กรัม (g)

$\text{ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (MPN / ml)} = \frac{\text{จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก}}{[\text{ปริมาณตัวอย่างที่ให้ผลลบ(ml) X ปริมาณตัวอย่างในทุกหลอด(ml)}]^{0.5}}$

นำผลการการศึกษาของเชื้อเมทาโนโทรฟที่ให้ผลการทดลองเป็นบวกและลบมาทำการคำนวณดังสมการด้านบนแล้วจึงคูณด้วยปริมาตรของสารละลายเจือจาง (9.5 มิลลิลิตร) และหารด้วยน้ำหนักแห้งของแต่ละตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ค1 การศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟแบคทีเรียด้วยวิธีการเอ็มพีเอ็นในระบบ 3 ขวด



ภาพผนวกที่ ค2 เปรียบเทียบลักษณะของผลการศึกษาด้วยวิธีเอ็มพีเอ็นที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน
ในวันที่ 1 และ 45

ตารางผนวกที่ ก1 ปริมาณขดชีรรมที่ให้ผลบวกในการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟด้วยวิธี
เอ็มพีเอ็นที่ระดับความลึกต่างๆ

Sample	Depth (cm.)	Positive Tube	Concentration
1	0 – 15	3-3-1	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-0	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-2	$10^{-2}-10^{-4}$
	46 - 60	3-3-1	$10^{-2}-10^{-4}$
2	0 – 15	3-3-0	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-0	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-0	$10^{-1}-10^{-3}$
	46 - 60	3-3-1	$10^{-1}-10^{-3}$
3	0 – 15	3-3-0	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-1	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-1	$10^{-1}-10^{-3}$
	46 - 60	3-3-2	$10^{-1}-10^{-3}$
4	0 – 15	3-3-0	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-0	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-1	$10^{-2}-10^{-4}$
	46 - 60	3-3-1	$10^{-1}-10^{-3}$
5	0 – 15	3-3-1	10^0-10^{-2}
	16 – 30	3-3-0	10^0-10^{-2}
	31 – 45	3-3-0	$10^{-2}-10^{-4}$
	46 - 60	3-2-1	$10^{-1}-10^{-3}$

ภาคผนวก ง

การศึกษาและวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน

การคำนวณเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในหน่วย Cells / g soil

สถานะของการทดลอง

น้ำหนักเปียกของดิน 3 กรัม (g) ในสารละลายเจือจาง 9.5 มิลลิลิตร
ปริมาณความชื้นของดิน

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 15.65

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 22.51

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 25.28

ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 26.37

น้ำหนักแห้งของดินเท่ากับ

ที่ระดับความลึก 0 – 15 เซนติเมตร $= 3 - (3 \times 0.1565)$
 $= 2.5305$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 16 – 30 เซนติเมตร $= 3 - (3 \times 0.2251)$
 $= 2.3247$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 31 – 45 เซนติเมตร $= 3 - (3 \times 0.2528)$
 $= 2.2416$ กรัม (g)

ที่ระดับความลึก 46 – 60 เซนติเมตร $= 3 - (3 \times 0.2637)$
 $= 2.2089$ กรัม (g)

ปริมาณสารละลายดินเจือจางที่นำมา Fixed Cells 300 ไมโครลิตร (μl)

ปริมาณ Fixed Cell ที่หยดบนสไลด์แบบหลุม 3 ไมโครลิตร (μl)

กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการขยาย 100 เท่า

Field Number ของกล้อง 22

รัศมีของหลุมในสไลด์ 2.5 มิลลิเมตร (mm.)

ขนาดของพื้นที่ที่มองเห็นจากเลนส์ตา $= \pi r^2$
 $= \pi \times (22 / 2 \times 100)^2$

ขนาดพื้นที่ของหลุมในสไลด์ $= \pi r^2$
 $= \pi \times (2.5)^2$

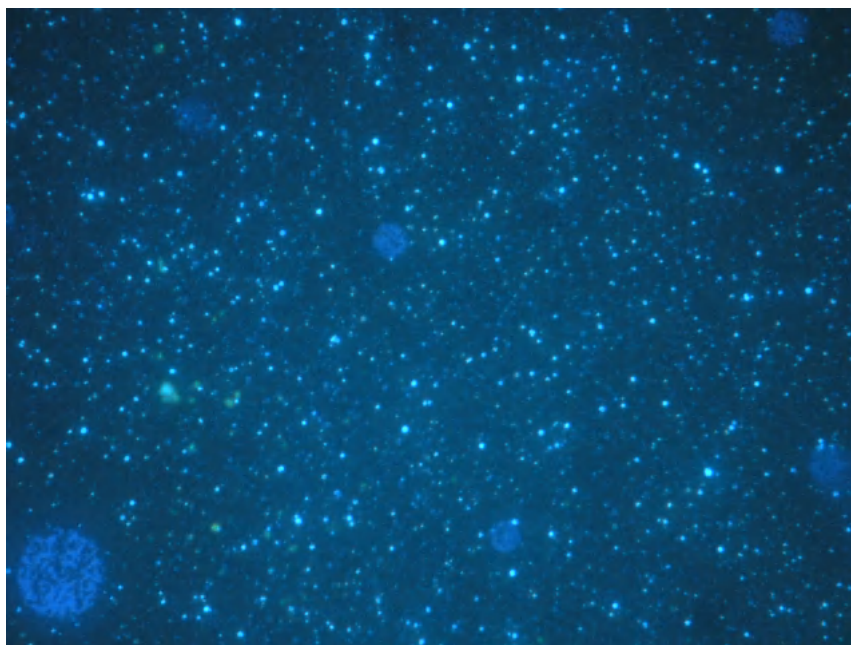
กำหนดจำนวนเซลล์ที่นับได้เฉลี่ยต่อภาพถ่าย $= A$

$$\text{Cell / g soil} = \frac{A \times \pi \times (2.5)^2 \times 9.5 \text{ ml} \times 1000 \mu\text{l}}{\pi \times (22 / 2 \times 100)^2 \times 3 \mu\text{l} \times 1 \text{ ml} \times \text{dry weight}}$$

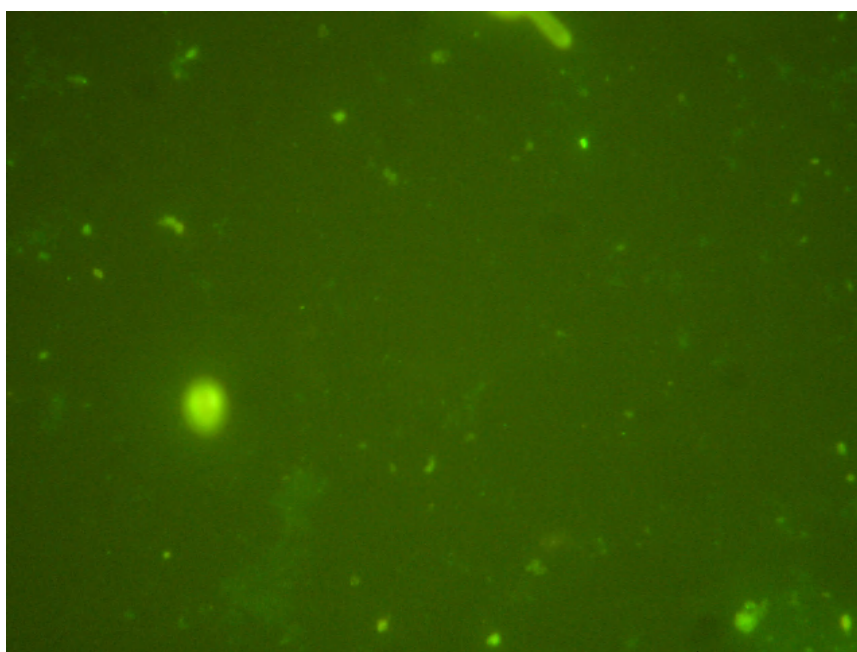
การนับจำนวนเซลล์จากภาพถ่ายในงานฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

ในการนับจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษานั้นอาศัยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ในการนับจำนวนเซลล์ ซึ่งโปรแกรมดังกล่าว คือ โปรแกรม Adobe Photoshop CS2 โดยในการวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 , 2 , *Methylocella palustris* , *Methylocapsa acidiphila* , *Nitrosomonas spp.* และ *Nitrobacter spp.* มีวิธีการดังต่อไปนี้

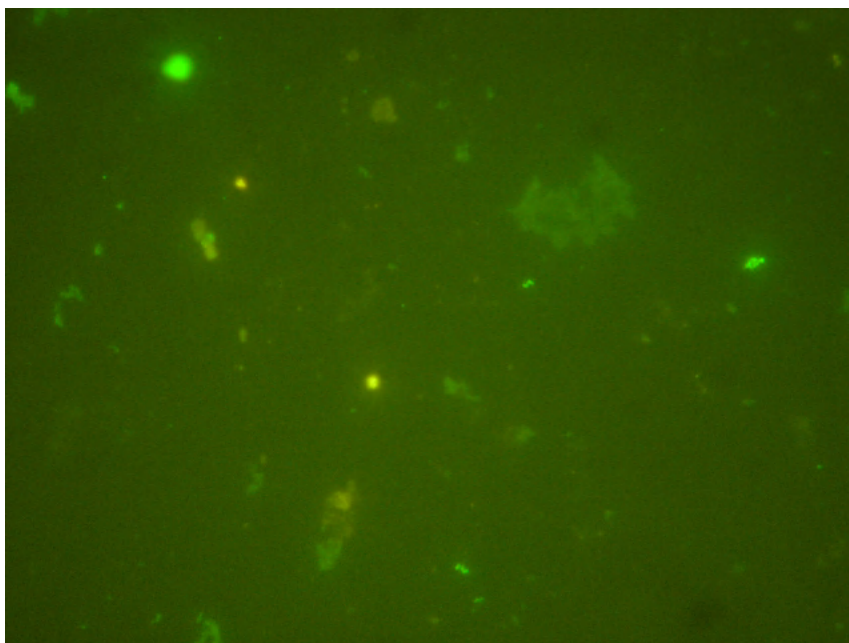
- ใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CS2 ในการเปิด File รูปภาพที่ได้จากการถ่ายภาพเซลล์ที่ทำการศึกษาด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน
- เลือกอุปกรณ์เป็นถังน้ำ (Paint Bucket Tool) เพื่อเปลี่ยนตำแหน่งหรือบริเวณที่ไม่มีการเรืองแสงของเซลล์ (บริเวณที่ไม่ใช่เซลล์ที่ต้องการศึกษา) ให้เปลี่ยนเป็นสีดำจนกว่าจะเหลือเฉพาะจุดหรือเซลล์ที่มีการเรืองแสงเท่านั้น
- คลิกเลือก Image ➡ Adjustments ➡ Threshold ที่ร้อยละ 50 เพื่อเปลี่ยนรูปภาพเป็นสีขาวดำ และเลือก Threshold ที่ร้อยละ 50 เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่ปรากฏเท่ากับที่เลือกไว้ในตอนแรก
- คลิกเลือกกล่อง Histogram และลากลูกศรให้ครบทั้งภาพเพื่อนับจำนวนเซลล์ที่ปรากฏ โดยผลการนับจะแสดงอยู่ใน Count ในกล่อง Histogram ดังกล่าว



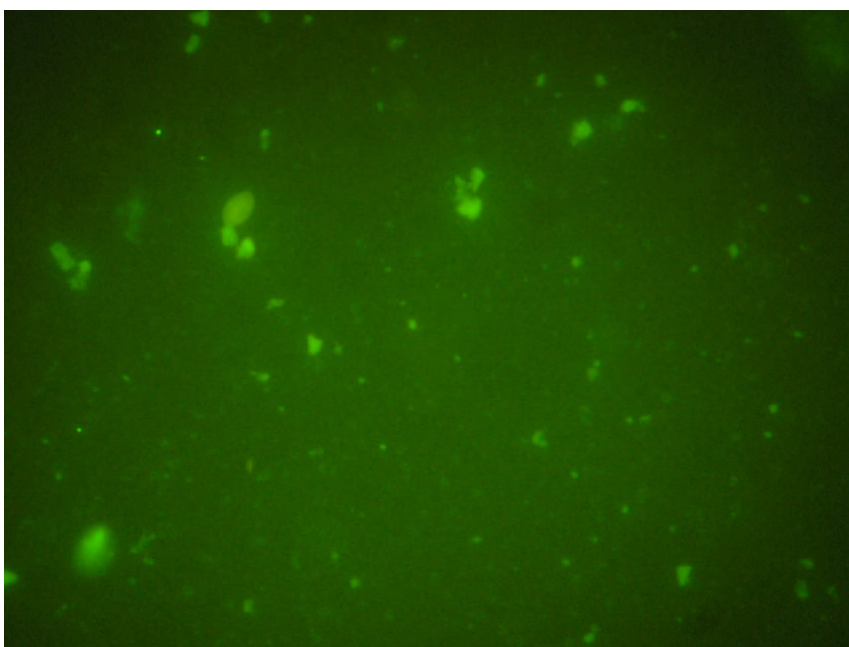
ภาพผนวกที่ ง1 ภาพถ่ายผลการศึกษাপริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้าย
พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย DAPI)



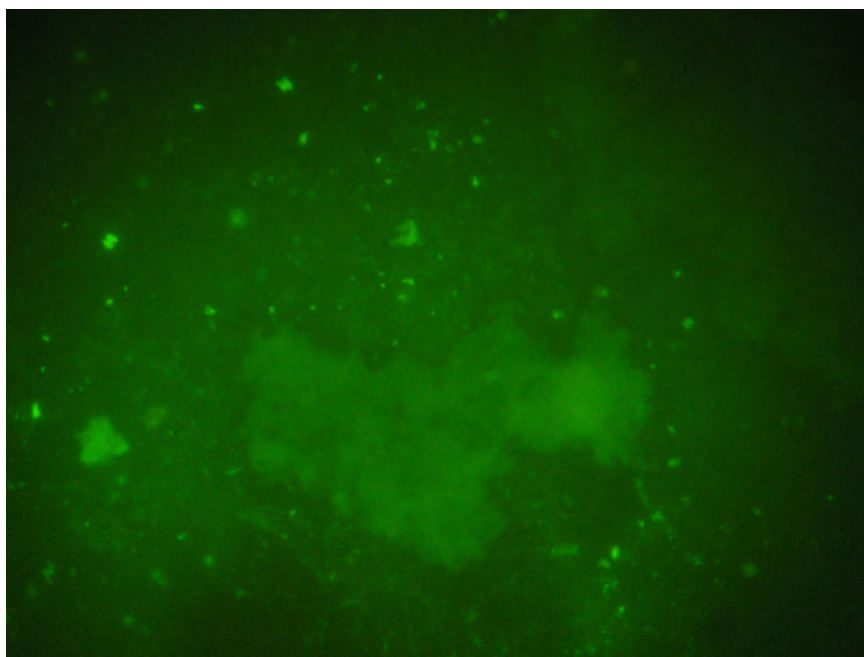
ภาพผนวกที่ ง2 ภาพถ่ายผลการศึกษাপริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 1 ที่ตรวจพบในดินกลบทับ
ชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย MY84+MY705)



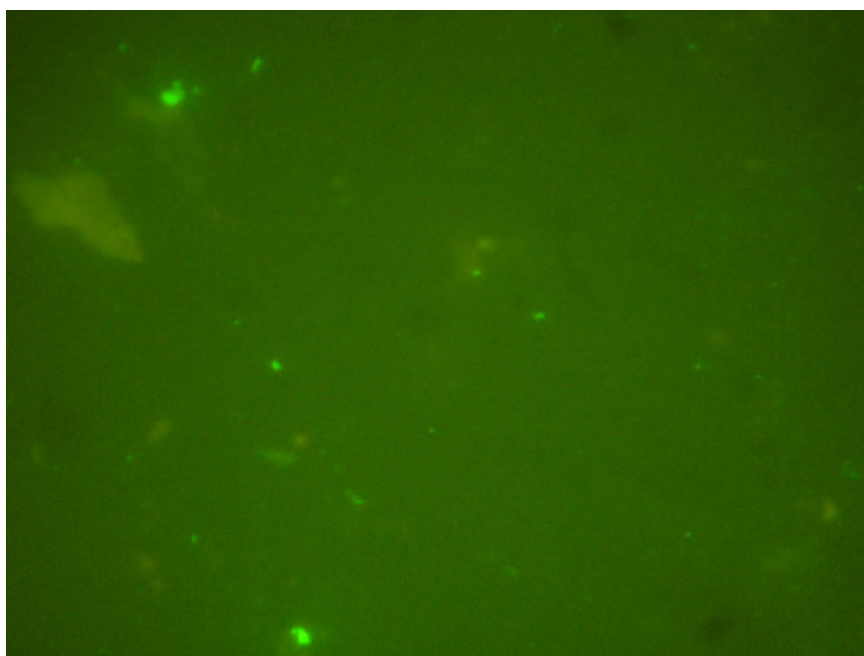
ภาพผนวกที่ ง3 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟชนิดที่ 2 ที่ตรวจพบในดินกลบทับ
ชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย MCA450)



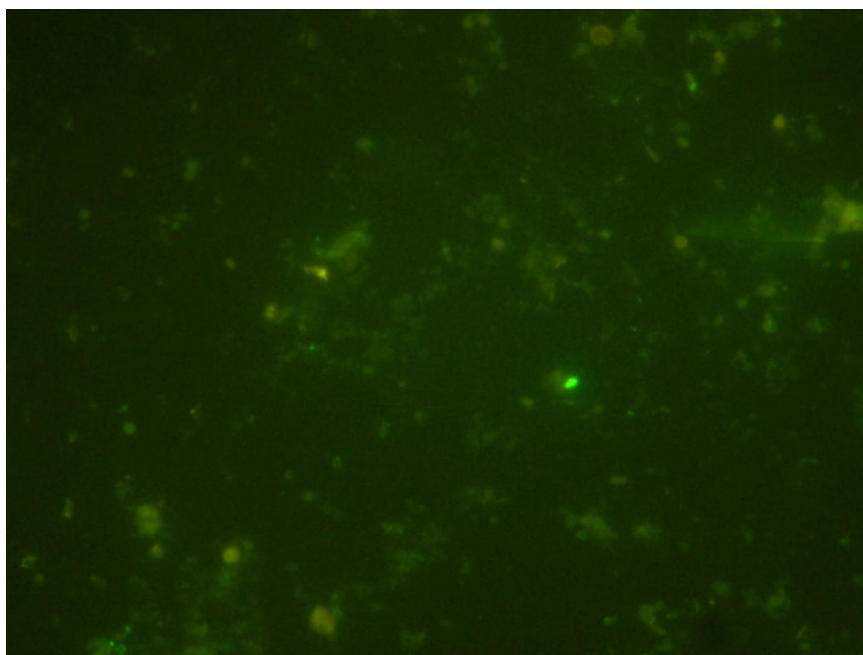
ภาพผนวกที่ ง4 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟสายพันธุ์ *Methylocapsa*
acidiphila ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์
ด้วย Mcaps-1032)



ภาพผนวกที่ ๖5 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อเมทาโนโทรฟสายพันธุ์ *Methylocella palustris* ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย Mcells-1026)



ภาพผนวกที่ ๖6 ภาพถ่ายผลการศึกษาปริมาณเชื้อ *Nitrosomonas spp.* ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้นสุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย NSM 156)



ภาพผนวกที่ ง7. ภาพถ่ายผลการศึกษากิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของ *Nitrobacter* spp. ที่ตรวจพบในดินกลบทับชั้น
สุดท้ายพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย (ย้อมเซลล์ด้วย NIT 3)

การเตรียม Phosphate buffered saline (PBS)

การเตรียม 3X PBS

- NaCl 24 กรัม
- Na₂HPO₄, 7H₂O 3.45 กรัม
- KCl 0.6 กรัม
- KH₂PO₄ 0.6 กรัม
- Milli-Q water 1,000 ml

Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C
นาน 15 นาที