บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาเบื้องต้นผู้วิจัยได้คัดเลือกพืชชนิดที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นและสามารถทำให้งอกรากใหม่ได้ในน้ำและสารละลายของสารทดสอบและที่สำคัญคือสามารถตรวจความผิดปกติของโครโมโซมและนิวเคลียสได้ง่าย พืชที่ได้รับคัดเลือกไว้มี 6 ชนิดโดยแบ่งตามลักษณะหรือส่วนของพืชที่ใช้ทดสอบได้เป็น 2 กลุ่มคือประเภทที่ใช้ลำต้นบนดินและประเภทที่ใช้หัวซึ่งมีลำต้นใต้ดิน จากข้อสังเกตในช่วงต้นได้ข้อสรุปว่าพืชทั้ง 6 ชนิดที่นำมาทดลองสามารถใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อมได้ในเบื้องต้น แต่ต้องดำเนินการโดยมีกลุ่มควบคุมควบคู่กันไปก็จะสามารถอธิบายผลได้ แต่หากมลพิษในสิ่งแวดล้อมดังกล่าวมีปริมาณสูงมากพืชบางชนิดอาจไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจสอบเพราะมีความไว ความสม่ำเสมอ และความทนทานของสารพันธุกรรมภายในเซลล์รากไม่มากพอ

การคัดเลือกพืชท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติในการใช้ทดสอบมลพิษ

การทดลองที่ 1.1 ได้เลือกใช้สารละลายแคดเมียมเป็นสารทดสอบเนื่องด้วยเหตุผลหลักๆ คือ ประการแรกแคดเมียมเป็นโลหะหนักที่พบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและเป็นสารที่เป็นอันตรายสูงต่อสิ่งมีชีวิต ดังนั้นหากจะคัดเลือกพืชเพื่อใช้ตรวจสารปนเปื้อนจึงควรนำแคดเมียมมาเป็นสารคัดกรองชนิดพืชที่จะใช้เป็น biomarker และประการที่สอง มีรายงานจำนวนมากกล่าวถึงพิษของแคดเมียมว่ามีผลต่อทั้งระบบการขนส่ง การใช้ธาตุอาหาร การสังเคราะห์ด้วยแสงและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของราก ลำต้นและยอดของพืชและที่สำคัญบทบาทของแคดเมียมยังมีผลในระดับทำลายสารพันธุกรรมซึ่งสามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจน (Das *et al.*, 1997; Wojcik and Tukendorf, 1999; Fiskesjo, 1997) และสำหรับความเข้มข้นของแคดเมียมที่เลือกใช้จะอยู่ในช่วงต่ำกว่าและสูงกว่าค่าที่กระทรวงอุตสาหกรรมอนุญาตให้มีได้ในน้ำทิ้ง (ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินของแคดเมียมเท่ากับ 0.03 mg/Lตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 12 พ.ศ. 2512) ในช่วงการทดลองที่ 1 ดำเนินการโดยใช้ความเข้มข้นของแคดเมียมที่ 0.02 - 0.09 ppm และทั้ง 3 การทดลองที่ใช้ในการคัดเลือกพืชที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น biomarker ผู้วิจัยได้ใช้ผลการทดลองเปรียบเทียบกับหอมหัวใหญ่ซึ่งเป็นพืชที่ได้รับการยอมรับในระดับสากลว่าผลการตรวจสารปนเปื้อนเป็นที่เชื่อถือได้ซึ่งผลจากการทดลองที่ 1.1 ได้ค่า MI ที่แสดงให้เห็นว่าอัตราการแบ่งเซลล์มีแนวโน้มลดลงในพืชทุกชนิด และพบอัตราความผิดปกติของสารพันธุกรรม (MA) มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมเพิ่มขึ้น แต่ไม่ถึงระดับที่มีความแตกต่างในทางสถิติยกเว้นมีพืช 2 ชนิดเท่านั้นคือ กระดุมทองและหอมแดงที่มีค่า MI สูงกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อมีความเข้มข้นของแคดเมียมในระดับต่ำ คือ 0.02 ppm เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Fusconi *et al.*, 2006 ที่ศึกษาผลของแคดเมียมในถั่วลันเตา (*Pissum sativum*) และพบว่าสารละลายแคดเมียมความเข้มข้นต่ำๆจะไม่มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์นอกจากนี้พืชทั้ง 2 ชนิด (กระดุมทอง และหอมแดง) ยังมีความทนทานต่อสารพิษต่ำคือที่ความเข้มข้นของแคดเมียม

0.09 ppm เซลล์บริเวณปลายรากเริ่มเสียสภาพทำให้ไม่สามารถตรวจสอบอัตราการแบ่งเซลล์และความผิดปกติของโครโมโซมและนิวเคลียสได้ ดังนั้นในการทดลองที่ 1.2 ผู้วิจัยจึงได้ตัดพืช 2 ชนิดนี้ออก และสำหรับพลับพลึงถึงแม้ว่าการตอบสนองจะไม่ด้อยกว่าบัวจีน คือมีการลดลงของค่า MI เมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมสูงขึ้น แต่จะเห็นว่าความไวในการตอบสนองต่อแคดเมียมที่ 0.03, 0.06 และ 0.09 ppm จะให้ค่า MI เท่ากันหมดจึงอาจกล่าวได้ว่าพลับพลึงมีความไวด้อยกว่าบัวจีน และว่านหาลาภประกอบกับพลับพลึงงอกรากในน้ำและในสารทดสอบยาก และให้รากจำนวนน้อยจึงอาจเป็นพืชทดสอบที่ด้อยกว่าพืชชนิดอื่น

การทดลองที่ 1.2 ใช้พืชเพียง 2 ชนิดที่คัดเลือกไว้คือบัวจีน และว่านมหาลาภโดยทดลองควบคู่ไปกับหอมหัวใหญ่และยังคงใช้แคดเมียมเป็นสารทดสอบซึ่งเลือกใช้เพียงความเข้มข้นเดียวได้แก่ 0.06 ppm เพราะเป็นความเข้มข้นที่เห็นการเปลี่ยนแปลงทั้งค่า MI และ MA ได้ชัดเจนในทุกพืชทดลอง และเพื่อเป็นการทดสอบที่ยืนยันความเสถียรของพืชที่คัดเลือกไว้จึงเพิ่มเวลาการทดสอบสารละลายแคดเมียมกับพืชเป็น 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าพืชทดลองทั้ง 3 ชนิด ในกลุ่มทดลองที่ทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่า MI ลดลงจากกลุ่มควบคุมเป็นลำดับ และค่า MA ในกลุ่มทดลองที่ทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เมื่อพิจารณาค่า MI ที่เป็นผลต่าง (ต่อ 1000 เซลล์) ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าหอมหัวใหญ่มีค่า MI ที่ลดลงเป็น 29.6 และ 68.0 เช่นเดียวกับว่านมหาลาภที่ค่า MI ที่ลดลงเท่ากับ 21.6 และ 44.2 ซึ่งแสดงว่าเมื่อเพิ่มเวลาให้รากพืชอยู่ในสารทดสอบนานขึ้นอัตราการยับยั้งการแบ่งเซลล์ยิ่งสูงขึ้น แต่สำหรับบัวจีนแสดงคุณสมบัติในข้อนี้ไม่เด่นชัดคือที่เวลาทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมง ค่า MI ลดลงเท่ากับ 43.8 และ 42.0 ส่วนค่า MA พืชที่มีการตอบสนองได้ดีที่สุดคือว่านมหาลาภคือที่เวลาทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมง ค่า MA ที่เพิ่มจากกลุ่มควบคุมเป็น 3.0 และ 4.4 ส่วนบัวจีนและหอมหัวใหญ่แสดงค่าดังกล่าวไม่ชัดเจนคือไม่แสดงการเพิ่มขึ้นเป็นลำดับเช่นว่านมหาลาภ

การทดลองที่ 1.3 เป็นการทดลองนำพืชที่คัดเลือกไว้มาทดสอบกับสารสกัดสะเดา ที่นิยมนำมาใช้ในการทำเกษตรอินทรีย์และยังมีข้อถกเถียงในหมู่นักวิชาการว่ามีผลทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคหรือไม่เนื่องจากมีรายงานการทดลองในหนูว่าสารจากสะเดามีผลทำให้รูปร่างและจำนวนของอสุจิผิดปกติ และยังมีรายงานอีกจำนวนหนึ่งที่ระบุว่ามีความเป็นพิษต่อเด็กถึงระดับทำให้เสียชีวิตได้ (Khan and Awasthy, 2003; Boeke *et al.*, 2004) รวมถึงความไม่แน่ใจเกี่ยวกับการตกค้างอยู่ในผลผลิตทางการเกษตรด้วย การทดลองที่ 1.3 นี้จึงได้นำพืชทั้ง 2 ชนิดที่คัดเลือกไว้และหอมหัวใหญ่มาทดสอบกับสารละลายสารสกัดสะเดาที่มีความเข้มข้นของ Aza เท่ากับ 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 ppm ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่แนะนำให้เกษตรกรใช้ (ช่วงความเข้มข้นที่แนะนำ 1.25-2.5 ppm สำหรับสารสกัดสะเดาชนิดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้)

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาพบว่าเมื่อพิจารณาจากค่า MI แสดงให้เห็นว่าหอมหัวใหญ่และว่านมหาลาภมีการตอบสนองในทิศทางเดียวกันคือค่า MI ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ

Aza เพิ่มมากขึ้น ส่วนบัวจีนไม่มีการตอบสนองที่ดีเพราะค่า MI กลับเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนค่า MA มีการตอบสนองดีในพืชทั้ง 3 ชนิดคือกลุ่มทดลองทุกกลุ่มมีค่า MA มากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้มีผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองของ Akinboro and Bakare (2007) และ Soliman (2001) ที่พบว่าสารสกัดสะเดามีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ในปลายรากหอมหัวใหญ่ และมี chromosomal aberration ทั้งในเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวและเซลล์ที่ไม่แบ่งตัว เช่น การเกิด micronucleus และ multinucleate ในระยะอินเทอร์เฟส และความผิดปกติอื่นๆ เช่น chromosome bridges, stickiness, non-congression ในระยะเมทาเฟส laggards, polyploidy และ disturbed ในระยะแอนาเฟส-เทโลเฟสในเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว

สำหรับการทดลองนี้พบความผิดปกติของโครโมโซมชนิด disturb มากกว่าความผิดปกติชนิดอื่นๆซึ่งจะต่างจากผลการทดลองของ Soliman (2001) ที่ใช้สารสกัดจากส่วนต่างๆของสะเดามาทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของเซลล์รากหอมและพบความผิดปกติของสารพันธุกรรมชนิด bridge มากที่สุดซึ่งอาจเป็นเพราะในการทดลองนี้ใช้ Aza ความเข้มข้นค่อนข้างต่ำคือ 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 ppm. แต่การทดลองของ Soliman (2001) ใช้สารสกัดสะเดาที่สกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 10,000, 20,000, 40,000, 60,000 และ 80,000 ppm.

มีรายงานจำนวนหนึ่งกล่าวว่าการลดปริมาณการแบ่งเซลล์ (ค่า MI) เป็นผลสืบเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงช่วงเวลาในวัฏจักรเซลล์ เช่น Van't Hoff (1968) เสนอว่า การที่สารเคมีมีผลในการยับยั้งการแบ่งเซลล์เป็นผลมาจาการเพิ่มเวลาใน G2 period ซึ่งแนวคิดนี้ได้รับการสนับสนุนจาก Brunori (1971) ซึ่งเชื่อว่าวัฏจักรของเซลล์จะพักอยู่ที่ G2 แต่อย่างไรก็ตามยังมีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายคนเชื่อว่าการขัดขวางกระบวนการไมโทซิสเกิดขึ้นที่ S-phase โดยเพิ่มช่วงเวลา S-phase ให้มากขึ้น (Webster and Davidson, 1969; Macleod, 1969)

สำหรับในการทดลองครั้งนี้พบความผิดปกติทั้งหมด 6 แบบคือ disturb bridge laggard fragment micronucleus และ binucleate

Disturb พบในระยะเมทาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟส เป็นความผิดปกติที่พบมากที่สุดในการทดลองนี้อาจเกิดเนื่องจากการถูกรบกวนที่ spindle apparatus และโครโมโซมเสียหายอันเนื่องมาจากสารเคมีที่มีผลต่อ DNA (Grant, 1978)

Bridges มักพบในระยะ แอนาเฟส และเทโลเฟส ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากโครโมโซมแตกหัก และพยายามเชื่อมต่อกันใหม่ทำให้การแยกของโครโมโซมลูกเกิดขึ้นโดยไม่สมบูรณ์ยังมีบางส่วนของโครโมโซมยังยึดกันอยู่ทำให้เห็นเส้นโครโมโซมลักษณะคล้ายสะพาน (Kabarity *et al.*, 1974 และ Badr *et al.*, 1992)

Micronuclei เป็นความผิดปกติจากการแบ่งเซลล์อาจเกิดจากโครโมโซมที่เคลื่อนที่ช้าโดยแยกตัวออกจากกลุ่ม (lagging chromosome) หรือโครโมโซมที่หักเป็นท่อน (fragment) พบได้ในระยะ

อินเทอร์เฟส Amer and Mikhael (1972) ศึกษาพบว่าความผิดปกติชนิด micronucleus จะพบได้มากเมื่อเซลล์ได้รับรังสี

อย่างไรก็ตามสำหรับผลของสารสกัดสะเดาที่ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลง เชื่อว่าเป็นเพราะการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ซึ่งเป็นการชักนำโครโมโซมให้เกิดความผิดปกติ และอาจทำให้สารพันธุกรรมบางส่วนสูญเสียไป และส่วนใหญ่อาจมีผลต่อการรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนด้วย (Soliman, 2001)

การเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาที่ใช้ในเชิงการค้า

จากการประเมินการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาความเข้มข้น 2.00 ppm (การทดลองที่ 2.1) ที่ทดสอบกับเซลล์ปลายรากพืชทดลอง 3 ชนิดได้แก่ หอมหัวใหญ่ บัวจีน และว่านมหาลาภ พารามิเตอร์ที่ใช้บ่งชี้การเสื่อมฤทธิ์ คือค่าที่แสดงถึงอัตราการแบ่งเซลล์ (MI) และอัตราความผิดปกติของโครโมโซมและการแบ่งเซลล์ (MA) การทำให้เสื่อมฤทธิ์ใช้วิธีให้สารสกัดสะเดาสัมผัสกับแสงแดดเป็นเวลา 3 วัน และ 7 วัน การทดสอบรากพืชกับสารทดสอบใช้เวลา 24 ชั่วโมง ผลการประเมินพบว่าทั้งค่า MI และ MA จากเซลล์ปลายรากหอมใหญ่ และว่านมหาลาภให้ผลตรงกัน คือ สารสกัดสะเดาเสื่อมฤทธิ์ได้เมื่อผ่านการตากแดดเป็นเวลา 3 วัน และ 7 วัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับรายงานของ Rodehroen *et al.* (1997) ที่กล่าวว่าช่วงเวลาครึ่งชีวิตของสารละลาย Aza ในน้ำ <1-12 วัน โดยจะให้ค่า MI ที่สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม (ไม่เสื่อมฤทธิ์) และค่า MA ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนบัวจีนจะมีการตอบสนองของค่า MI ไม่ชัดเจน แต่สำหรับค่า MA ก็สามารถใช้บ่งชี้การเสื่อมฤทธิ์ทั้งกลุ่มทดลอง 3 วันและ 7 วันได้เช่นกัน ดังนั้นคุณสมบัติของบัวจีนในแง่ของการเป็น biomarker ในลักษณะนี้จึงไม่มีความโดดเด่นเท่าว่านมหาลาภและหอมหัวใหญ่

การตรวจสอบความเป็นพิษของแหล่งน้ำในสวนเกษตรอินทรีย์

การทดลองที่ 2.2 ผลการประเมินความเป็นพิษของน้ำในแหล่งน้ำของสวนเกษตรอินทรีย์โดยสุ่มตัวอย่างน้ำในเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงที่ไม่มีฝนตกและทำการเก็บตัวอย่างน้ำในวันแรก วันที่ 2 และวันที่ 3 ของการฉีดพ่นสารสกัดสะเดาแก่พืชผัก และผลไม้ประเมินโดยใช้เซลล์ปลายรากหอมหัวใหญ่ บัวจีน และว่านมหาลาภ โดยการทดลองในน้ำตัวอย่างเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าค่า MI บ่งชี้ไปในทิศทางเดียวกันคือ น้ำในแหล่งน้ำให้ค่า MI สูงกว่ากลุ่มควบคุม (น้ำประปา) โดยพบในพืชทุกชนิดแต่จะเห็นความชัดเจนได้ดีในว่านมหาลาภ ส่วนบัวจีนมีผลการทดลองไม่สม่ำเสมอคือมีการแกว่งของค่า MI อย่างชัดเจน และสำหรับหอมหัวใหญ่จะให้ผลการทดสอบชัดเจนเฉพาะที่เวลาทดสอบ 24 ชั่วโมงเท่านั้น ส่วนที่ 48 ชั่วโมง ค่า MI จะแกว่งเช่นกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะรากของหอมหัวใหญ่ไม่มีความทนทานต่อจุลินทรีย์ที่เริ่มแบ่งตัวหนาแน่นขึ้นเมื่อเวลาทดสอบนานขึ้น

สำหรับค่า MI ของพืชทุกชนิดที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มทดลองอาจเป็นผลมาจากการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ในแปลงพืช และแร่ธาตุในดินที่ละลายออกมาในแหล่งน้ำ อย่างไรก็ตามค่า MA จากการทดลองบ่งชี้ว่า

น้ำในแหล่งน้ำมีผลทำให้โครโมโซมและการแบ่งเซลล์ผิดปกติอย่างชัดเจนเมื่อใช้หอมหัวใหญ่และว่านมหาลาภเป็นพืชทดลอง ซึ่งพบค่า MAของกลุ่มทดลองมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่า ค่า MA ที่เพิ่มขึ้นนั้นมีผลมาจากสารสกัดสะเดาเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เพราะน้ำในแหล่งน้ำของสวนเกษตรอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นแหล่งน้ำที่มีระบบเปิดคือเป็นร่องน้ำที่ต่อเนื่องกันทั้งสวนและต่อเนื่องไปยังแหล่งน้ำของสวนอื่นที่อยู่ใกล้เคียงด้วย และอีกประการหนึ่งจากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าหากค่า MA หรือค่าที่บ่งบอกความผิดปกติของโครโมโซม เกิดจากพิษของ Aza ในสารสกัดสะเดาจริง ผลของค่า MI ก็ควรลดต่ำลงจากค่า MI ของกลุ่มควบคุมด้วยแต่ในการทดลองนี้ค่า MI กลับเพิ่มขึ้นในทุกพืชทดลอง ดังนั้นจึงอาจสรุปได้เพียงว่าในแหล่งน้ำของสวนเกษตรอินทรีย์มีสารที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ และมีสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรมของพืชทดสอบ