



วิทยานิพนธ์

การใช้วิธีโคเมทในพืชติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพ
และน้ำชะมูลฝอย

USE OF PLANT COMET ASSAY AS A MONITORING
METHOD FOR LANDFILL GAS AND LEACHATES IMPACT

นางสาวประดิษฐา ณ ร้อยเอ็ด

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)
ปริญญา

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้วิธี โคเมทในพืชติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอย

Use of Plant Comet Assay as a Monitoring Method for Landfill Gas and Leachates
Impact

นามผู้วิจัย นางสาวประดิษฐา ณ ร้อยเอ็ด

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

๖๖ ๑๕ ✓
(รองศาสตราจารย์ วิไล เจียมไชยศรี, D.Tech.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

๗๕
(รองศาสตราจารย์ ชาติ เจียมไชยศรี, D.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา

Amo ๐๒๓๑๖
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มงคล ดำรงค์ศรี, Dr.Ing.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

๗๕๗ ๕๗๑
(รองศาสตราจารย์ กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ๑๑ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๑

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้วิธีโคเมทในพืชติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอย

Use of Plant Comet Assay as a Monitoring Method for Landfill Gas and Leachates Impact

โดย

นางสาวประดิษฐา ณ ร้อยเอ็ด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)

พ.ศ. 2551

ประดิษฐา ณ ร้อยเอ็ด 2551: การใช้วิธีโคเมทในพืชติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและ
น้ำชะมูลฝอย ปรินญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)
สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วิไล เจียมไชยศรี, D.Tech.Sc. 112 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้วิธีโคเมท (comet assay) ในการติดตามผลกระทบ
ของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอยต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งใช้ระดับการทำลายดีเอ็นเอของพืชเป็นดัชนีวัด โดย
การทดลองชุดที่ 1 ทำการปลูกพลูด่าง (*Epipremnum aureum*) ให้เจริญเติบโตภายใต้บรรยากาศที่มี
ก๊าซชีวภาพผสมอยู่ในระดับความเข้มข้นของมีเทนร้อยละ 0, 1, 5 และ 10 แล้วทดสอบพืชอีก 2 ชนิด
คือ ต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*), และหญ้าโคสโครอส (*Spoloborus virginicus*) ในสภาวะ
ที่มีมีเทนร้อยละ 1 เพื่อหาพืชที่เหมาะสมกับการเป็นดัชนีชี้วัด การทดลองที่ 2 ปลูกพืชในน้ำชะมูล
ฝอยสองลักษณะ คือ น้ำชะมูลฝอยสดและน้ำชะมูลฝอยเก่า ซึ่งทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของซี
โอดีเท่ากับ 100, 1,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และตรวจวัดระดับการทำลายดีเอ็นเอโดย
ใช้วิธีโคเมทตลอดระยะเวลาการทดลอง

ผลการทดลองพบว่าการทำลายดีเอ็นเอของพืชมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อพืชได้สัมผัสก๊าซชีวภาพ
ที่มีความเข้มข้นสูงมากขึ้นและมีระยะเวลาในการสัมผัสมากขึ้น พบระดับการถูกทำลาย
ดีเอ็นเอของใบพลูด่างสูงสุดเท่ากับร้อยละ 62 ± 0.20 ที่ระดับความเข้มข้นของมีเทนในบรรยากาศร้อยละ
10 ที่มีระยะเวลาสัมผัส 288 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของใบพลู
ด่าง ในแต่ละระดับความเข้มข้นของมีเทนพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ
แตกต่างกันมากที่สุด ที่ระยะเวลาสัมผัส 72 ชั่วโมง ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบพืชที่ใช้ทดสอบทั้งสาม
ชนิดพบว่า พลูด่างเป็นพืชที่เหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดผลกระทบจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย การ
ทดสอบด้วยน้ำชะมูลฝอย พบว่าแนวโน้มของการทำลายดีเอ็นเอมีทิศทางเดียวกันกับก๊าซชีวภาพ แต่
มีระดับการทำลายต่ำกว่าที่ระยะเวลาสัมผัสใกล้เคียงกัน โดยที่น้ำชะมูลฝอยสดให้ระดับการทำลายดี
เอ็นเอสูงกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่าที่ค่าความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากัน ผลที่ได้จากการวิจัยสรุปได้ว่าวิธีโค
เมทในพืชสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามและบอกระดับของผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต
เนื่องจากก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอยได้ดี

ประดิษฐา ณ ร้อยเอ็ด

ลายมือชื่อนิสิต

๐๖ ๐๐

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

15 / ๕๕ / 51

Praditha Na Roi-Et 2008: Use of Plant Comet Assay as a Monitoring Method for Landfill Gas and Leachates Impact. Master of Engineering (Environmental Engineering), Major Field: Environmental Engineering, Department of Environmental Engineering. Thesis Advisor: Associate Professor Wilai Chiemchaisri, D.Tech.Sc. 112 pages.

This study aims to investigate the application of plant comet assay, a DNA damage determination, as the monitoring method for landfill gas and leachate impacts. In the first experiment, Pothos (*Epipremnum aureum*) had been growing in the stimulated-landfill atmospheric chamber which containing methane in various concentrations of 0, 1, 5 and 10%. To find appropriate plant species, Pothos with Periwinkle (*Catharanthus roseus*) and Coastcross (*Spoloborus virginicus*) had been grown in the same time under 1% methane. In the second experiment, Pothos had been grown in fresh and old leachates having the COD concentrations of 0, 100, 1000 and 10,000 mg/L. Plant leaves were examined for comet assay at interval time of experiments.

The results appeared that degrees of DNA damages of Pothos had tended to increase with the increasing concentration of methane and exposure time. Highest DNA damage of $62 \pm 0.20\%$ was found at 10% methane, 288 exposing hours. Comparison the damage levels at interval exposure times, it was found that at 72 hours there was the highest statistic differences ($P < 0.05$) in damage levels among various methane concentrations. Moreover, Pothos was the best species for comet assay in this study. For leachate exposure, same trends of DNA damage as landfill gas exposure were found, however, the degrees of DNA damages were lower at the same exposure time. Furthermore, fresh leachate gave more damages than old leachate at the same COD level. In summery, this study suggests that plant comet assay was an interesting method and applicable for monitoring impacts of landfill gas and leachate on lives.

Praditha Na Roi-Et

Student's signature

W. Chiemchaisri

Thesis Advisor's signature

15 / 05 / 08

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล เจียมไชยศรี อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้ความกรุณาอย่างดียิ่งในการช่วยเหลือวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์
ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ หาทุนสนับสนุนงานวิจัยและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชาติ เจียมไชยศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. จัตรณัย จิระเดชะ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธรรมรัตน์ กุดตะเทพ
อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการตรวจทาน
วิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ Prof. Kazuo Yamamoto มหาวิทยาลัยโตเกียว รองศาสตราจารย์ ดร.
สมศักดิ์ อภิสทิวาณิช ภาควิชาพันธุศาสตร์ และ ดร. วันวิสา สูดประเสริฐ ภาควิชารังสีประยุกต์
และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำในการทดสอบ
โคเมท

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ทุก ๆ ท่านในภาควิชาวิศวกรรม
สิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการ
ดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุน
งานวิจัยรหัส ว-ท(ค)7251 จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้อง รวมถึงเพื่อน ๆ ทุกคน ที่คอยให้
กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือ และสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ประดิษฐา ณ ร้อยเอ็ด

เมษายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	4
ขอบเขตงานวิจัย	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	35
ผลการและวิจารณ์	42
สรุปและข้อเสนอแนะ	59
สรุป	59
ข้อเสนอแนะ	60
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	61
ภาคผนวก	66
ภาคผนวก ก ผลการศึกษาองค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซ	67
ภาคผนวก ข ตัวอย่างข้อมูลการวิเคราะห์เซลล์โคเมท	72
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมี	97
ภาคผนวก ง เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 7	100
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	112

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยทั่วไป	11
2	ส่วนประกอบและความเข้มข้นของน้ำชะมูลฝอย	15
3	ผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตของพืช	18
4	ผลของความเข้มข้นของก๊าซต่อพืช	19
5	ขนาดของดีเอ็นเอกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่เหมาะสม	23
6	รายละเอียดพารามิเตอร์และวิธีการในการวิเคราะห์น้ำชะมูลฝอย	36
7	ลักษณะสมบัติและความเข้มข้นของน้ำชะมูลฝอยสดและเก่าที่ใช้ทำการทดสอบ	43
8	ลักษณะสมบัติและความเข้มข้นของน้ำชะมูลฝอยสดและเก่าแต่ละระดับความเข้มข้น	44
9	การเจริญเติบโตของพื้ต่างที่ใช้ในการทดสอบด้วยน้ำชะมูลฝอย	45
10	องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ	49
11	ผลของก๊าซชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของพื้ต่าง	53
ตารางผนวกที่		
ก1	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (control)	68
ก2	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (methane1%)	69
ก3	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (methane5%)	70
ก4	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (methane10%)	71
ข1	ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 1 ระยะเวลา 72 ชั่วโมง	73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข2 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 1 ระยะเวลา 144 ชั่วโมง	75
ข3 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 1 ระยะเวลา 216 ชั่วโมง	77
ข4 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 1 ระยะเวลา 288 ชั่วโมง	79
ข5 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 5 ระยะเวลา 72 ชั่วโมง	81
ข6 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 5 ระยะเวลา 144 ชั่วโมง	83
ข7 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 5 ระยะเวลา 216 ชั่วโมง	85
ข8 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 5 ระยะเวลา 288 ชั่วโมง	87
ข9 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 10 ระยะเวลา 72 ชั่วโมง	89
ข10 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 10 ระยะเวลา 144 ชั่วโมง	91
ข11 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 10 ระยะเวลา 216 ชั่วโมง	93
ข12 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น ร้อยละ 10 ระยะเวลา 288 ชั่วโมง	95

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วิธีการฝังกลบบนพื้นที่	6
2	วิธีการฝังกลบแบบขุดร่อง	6
3	การเกิดก๊าซในพื้นที่ฝังกลบ	10
4	ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นในระยะต่างๆจากการย่อยสลายน้ำชะมูลฝอย	14
5	ลักษณะการรวมตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอในกระบวนการวิเคราะห์แบบโคเมท	21
6	ขั้นตอนทั่วไปของการทดสอบการถูกทำลายดีเอ็นเอด้วยวิธีโคเมท	24
7	การวิเคราะห์ภาพเซลล์โคเมท	25
8	ลักษณะการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์โคเมท	26
9	พื้นที่ส่วนหัว (Head area) และพื้นที่ส่วนหาง (Tail area) ของเซลล์โคเมท	27
10	แบบจำลองผู้ควบคุมคุณภาพอากาศ	35
11	การทดสอบผลของก๊าซชีวภาพต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช	37
12	การทดสอบผลของน้ำชะมูลฝอยต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช	38
13	ขั้นตอนการเก็บและเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบด้วยวิธีโคเมท	41
14	ตัวอย่างลักษณะดีเอ็นเอของใบพลูด่างที่ถูกทำลายเมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยเก่าที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ	46
15	ตัวอย่างลักษณะดีเอ็นเอของใบพลูด่างที่ถูกทำลายเมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยสดที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ	47
16	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการถูกทำลายดีเอ็นเอของพลูด่างเมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยเก่าแต่ละระดับความเข้มข้นของซีไอดี	48
17	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการถูกทำลายดีเอ็นเอของพลูด่างเมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยสดแต่ละระดับความเข้มข้นของซีไอดี	48
18	องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในผู้ควบคุมคุณภาพอากาศในชุดควบคุม	50
19	องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในผู้ควบคุมคุณภาพอากาศในชุดการทดลองที่ 1	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
20 องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศในชุดการทดลองที่ 2	51
21 องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศในชุดการทดลองที่ 3	52
22 ตัวอย่างลักษณะของเซลล์พลาสมาที่ถูกทำลายดีเอ็นเอเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นระดับต่างๆ ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ	54
23 ค่าเฉลี่ยร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพลาสมาในแต่ละความเข้มข้นของก๊าซมีเทน	55
24 ตัวอย่างลักษณะของเซลล์พลาสมา แพลงพวยฝรั่ง หนุ่ยโคสโครอส ที่ถูกทำลายดีเอ็นเอเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 1 ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ	56
25 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชในแต่ละชนิดเมื่อสัมผัสกับบรรยากาศที่มีก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 1	58

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

sBOD	=	Soluble biochemical demand
sCOD	=	Soluble chemical oxygen demand
TKN	=	Total kjeldahl nitrogen
NH ₃ -N	=	Ammonia nitrogen
NO ₂ -N	=	Nitrite nitrogen
NO ₃ -N	=	Nitrate nitrogen
TP	=	Total phosphate
EC	=	Electrical conductivity
O ₂	=	Oxygen gas
CO ₂	=	Carbondioxide gas
CH ₄	=	Methane gas
DNA	=	Deoxy – ribo nucleic acid
OL	=	Old Leachate
FL	=	Fresh Leachate

การใช้วิธีโคเมทในพืชติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอย

Use of Plant Comet Assay as a Monitoring Method for Landfill Gas and Leachates Impact

คำนำ

การกำจัดขยะมูลฝอยที่ง่ายและประหยัดซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอยู่ทั่วไปในกรณีที่ยังมีพื้นที่พอเฟียง คือ วิธีการฝังกลบ (Landfilling) สำหรับในประเทศไทยมีทั้งหลุมฝังกลบมูลฝอยและหลุมกองเทเปิด (Open dumping sites) รวมจำนวน 425 แห่งในปี พ.ศ. 2547 และมีแนวโน้มสูงขึ้นตามอัตราการทิ้งมูลฝอยและปริมาณประชากรที่เพิ่มขึ้นทุกปี (ทิพย์สุริย์ และคณะ, 2549)

อย่างไรก็ตามการกำจัดมูลฝอยด้วยวิธีดังกล่าวมักก่อให้เกิดมลพิษอื่นๆ ตามมา ได้แก่ การปล่อยก๊าซชีวภาพ (biogas or landfill gas) ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายมูลฝอย ในสภาวะไร้ออกซิเจนภายในพื้นที่หลุมฝังกลบ องค์ประกอบหลักในก๊าซชีวภาพจะประกอบด้วย ก๊าซมีเทน (45- 60%) และคาร์บอนไดออกไซด์ (40-50%) ซึ่งจัดเป็นสาเหตุสำคัญของภาวะโลกร้อน (global warming) ซึ่งมีการคาดการณ์ว่าการปลดปล่อยมีเทนในประเทศไทยจะเพิ่มขึ้นเป็น 180% ในปี พ.ศ. 2563 หรือเท่ากับ 338,600 ตันต่อปี (ทิพย์สุริย์ และคณะ, 2549) นอกจากนี้หลุมฝังกลบมูลฝอยยังปล่อยน้ำชะมูลฝอย (leachate) ซึ่งเกิดจากผลของการย่อยสลายมูลฝอยแบบไร้อากาศรวมกับการชะของน้ำฝนที่ไหลผ่านหลุมฝังกลบ โดยปกติแล้วน้ำชะมูลฝอยมีปริมาณแปรผันตามปริมาณน้ำฝนที่ตกในพื้นที่ สารพิษที่ชะละลายออกมาจากมูลฝอยที่สำคัญ ได้แก่ โลหะหนัก สารอินทรีย์ในรูปต่างๆ และสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งสามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ผ่านทางโซ่อาหารเมื่อปนเปื้อนแหล่งน้ำผิวดิน น้ำบาดาลและดินในบริเวณใกล้เคียง

การติดตามผลกระทบของมลพิษต่างๆ จากหลุมฝังกลบมักใช้วิธีวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทางกายภาพและทางเคมีอย่างต่อเนื่อง ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถบ่งชี้ได้เฉพาะปริมาณความเข้มข้นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงและโอกาสของการปนเปื้อน แต่ไม่สามารถบ่งชี้ถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่แท้จริงในพื้นที่ได้ และในการดำเนินการตรวจวัดและติดตามยังก่อให้เกิดสารพิษเนื่องจากการวิเคราะห์ รวมทั้งยังมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงอีกด้วย

ปัจจุบันการตรวจวัดผลกระทบของมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้สิ่งมีชีวิตในการติดตาม (biomonitoring) เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เนื่องจากมีข้อดีคือสามารถบอกระดับของผลกระทบของมลพิษที่เกิดขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตได้โดยตรง จึงนิยมใช้วิธีติดตามดังกล่าวมากขึ้นในพื้นที่เสี่ยงมลพิษ โดยใช้พืชหรือสัตว์เป็นดัชนีติดตามก็ได้ แล้ววิเคราะห์ผลได้ทั้งจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ หรือการเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุล

วิธีโคเมท (comet assay หรือ single cell gel electrophoresis assay) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุล สามารถใช้ตรวจสอบมลพิษที่ทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลาย (DNA damage) โดยอาศัยหลักความแตกต่างของการเคลื่อนที่โมเลกุลดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า ดีเอ็นเอที่ถูกทำลายจะมีขนาดเล็กและสามารถวิ่งในสนามไฟฟ้าได้เร็ว มีลักษณะกระจายตัวเป็นส่วนหาง (tail) ดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่ไม่ถูกทำลายวิ่งได้ช้าจะจับกลุ่มรวมกันเป็นส่วนหัว (head) เมื่อนำมาข้อมด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ แล้วมองผ่านกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ของดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย มีลักษณะคล้ายดาวหาง ด้วยลักษณะของเซลล์เช่นนี้จึงเรียกการทดสอบนี้ว่า comet assay ความยาวของเซลล์จะขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกทำลายภายในเซลล์ ถ้าเซลล์ใดดีเอ็นเอถูกทำลายมาก ก็จะทำให้เซลล์นั้นมีส่วนหางยาวมาก เซลล์ที่ดีเอ็นเอไม่ถูกทำลายก็จะมีไม่มีส่วนหาง ซึ่งวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวจัดเป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจสอบเซลล์ที่ได้รับความเสียหายจากการสัมผัสกับภาวะมลพิษ ง่ายและสะดวกในการตรวจสอบ ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อยและสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างหลายชนิด (Collins *et al.*, 1997)

จากการศึกษาพบว่า สามารถใช้วิธีโคเมทพีชในการตรวจติดตามและชี้วัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม เช่น มลพิษทางอากาศที่เกิดจากการจราจรบนท้องถนน มลพิษที่เกิดในบริเวณพื้นที่เตาเผาขยะ ดินที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักหรือยาฆ่าแมลงพบว่า พืชที่สัมผัสกับมลพิษต่างๆ ถูกทำลายดีเอ็นเอมากขึ้นเมื่อมีระยะสัมผัสมลพิษและความเข้มข้นของมลพิษมากขึ้น (Knasmüller *et al.*, 1998; Shimazaki *et al.*, 1999; Gichner *et al.*, 2006)

อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาน้อย สำหรับการใช่วิธีโคเมทในการติดตามระดับของผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอยจากหลุมฝังกลบมูลฝอยในระดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงในการนำมาประยุกต์ใช้งาน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความเป็นไปได้ของการนำวิธีโคเมทมาใช้ชี้วัดการทำลายดีเอ็นเอของพืช สำหรับติดตามผลกระทบของมลพิษจากหลุมฝังกลบมูลฝอยชุมชน โดยศึกษามลพิษหลักที่เกิดจากหลุมฝังกลบมูลฝอย ได้แก่

ก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอย โดยพืชที่ใช้ในการศึกษา 3 ชนิด คือ พุด่าง (*Epipremnum aureum*) ต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) และหญ้าโคสโครอส (*Spoloborus virginicus*) เนื่องจากเป็นพืชที่มีความไวในการติดตามมลพิษทางอากาศ มีความทนทาน และสามารถปรับตัวเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่เขตร้อนชื้น (สายัณห์, 2540; Fukushi *et al.*, 2005)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาของความสัมพันธ์ของปริมาณก๊าซชีวภาพและความเข้มข้นของการปนเปื้อนน้ำชะมูลฝอยในน้ำต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืชและหาพืชที่เหมาะสมกับการเป็นดัชนีชี้วัดและทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วยวิธีโคเมทสำหรับพืชที่เลือกใช้เป็นดัชนีชี้วัด โดยผลที่ได้จากการวิจัยสามารถนำมาเป็นข้อมูลสนับสนุนการนำวิธีการวิเคราะห์แบบโคเมทในพืชมาใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามและบอกระดับของผลกระทบเนื่องจากมลพิษที่เกิดขึ้นในบริเวณพื้นที่หลุมฝังกลบมูลฝอย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการประเมินผลกระทบและความเสี่ยงสิ่งแวดล้อม รวมถึงการกำหนดมาตรการในการควบคุมภาวะมลพิษในหลุมฝังกลบมูลฝอยและพื้นที่ใกล้เคียงในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณก๊าซชีวภาพและความเข้มข้นของการปนเปื้อนน้ำชะมูลฝอยในน้ำต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช
2. เพื่อหาพืชที่เหมาะสมกับการเป็นดัชนีชี้วัดและทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วยวิธีโคเมทสำหรับพืชที่เลือกใช้เป็นตัวชี้วัด

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยปลูกพืชที่ต้องการทดสอบในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ ซึ่งทำด้วยพลาสติก ชนิดอะคริลิก ใช้แสงเทียมโดยหลอดฟลูออเรสเซนต์สำหรับปลูกพืช ที่ให้ความเข้มแสง 35,000-50,000 ลักซ์ จำลองสภาพอากาศโดยพ่นก๊าซผสมระหว่างก๊าซมีเทนกับคาร์บอนไดออกไซด์ (อัตราส่วน 60:40) เข้าในช่องปล่อยก๊าซ
2. พืชที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมดสามชนิด ได้แก่ พุด่าง (*Epipremnum aureum*) ต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) และหญ้าโคสโครอส (*Spoloborus virginicus*)
3. น้ำชะมูลฝอยสำหรับการใช้ในการทดลองมีสองชนิด ได้แก่ น้ำชะมูลฝอยสดที่เก็บรวบรวมจากโรงเก็บขยะภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และน้ำชะมูลฝอยเก่าจากหลุมฝังกลบมูลฝอยไทรน้อย จ.นนทบุรี ศึกษาลักษณะสมบัติและความเข้มข้น ประกอบด้วยค่าซีโอดี บีโอดี ทีเคเอ็น แอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนไตรต์ ไนเตรต และฟิเอช
4. ตรวจวัดระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชด้วยวิธีโคเมท (comet assay)

การตรวจเอกสาร

1. การฝังกลบมูลฝอย

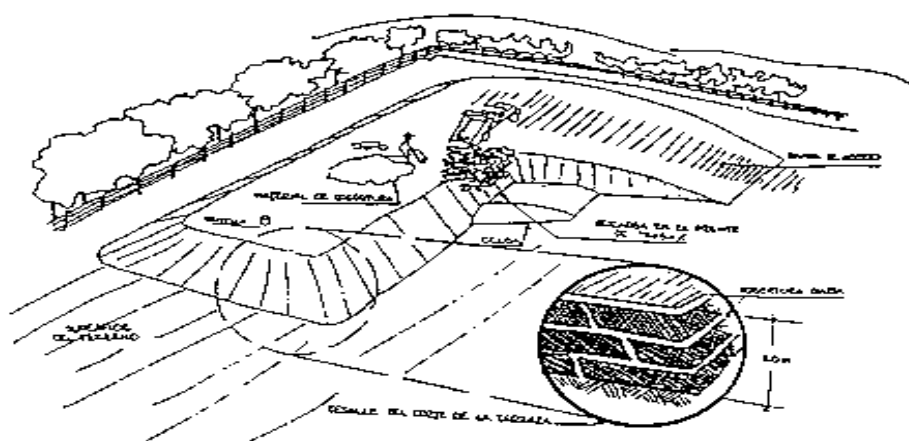
การกำจัดมูลฝอย (Solid Waste Disposal) เป็นขั้นตอนสุดท้ายของระบบจัดการมูลฝอยที่ได้รวบรวมมา และไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อีก เพื่อให้มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด วิธีการกำจัดขยะมูลฝอยที่ถูกหลักวิชาการ และก่อให้เกิดผลกระทบต่อคุณภาพสิ่งแวดล้อมน้อยที่นิยมใช้ในปัจจุบันมีอยู่ 3 วิธี ได้แก่ การฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาล (Sanitary Landfill) การหมักทำปุ๋ย (Composting) และการเผาในเตาเผา (Incineration) ซึ่งวิธีการฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาลเป็นการกำจัดมูลฝอยที่นิยมใช้ในประเทศไทยเนื่องจากต้นทุนและค่าบำรุงรักษาต่ำกว่าวิธีการกำจัดมูลฝอยวิธีอื่น พบว่าในประเทศไทยมีจำนวนหลุมฝังกลบมูลฝอยและหลุมกองเทเปิด (Open dumping sites) 425 แห่งในปี พ.ศ. 2547 (ทิพย์สุริย์และคณะ, 2549)

การฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาล (Sanitary Landfill) เป็นการกำจัดขยะโดยการนำไปฝังกลบในพื้นที่ที่ได้จัดเตรียมไว้ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับการคัดเลือกตามหลักวิชาการ จากนั้นจึงทำการออกแบบและก่อสร้างโดยมีการวางมาตรการป้องกันผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้น รูปแบบฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาล อาจใช้วิธีการถมให้สูงขึ้นจากระดับพื้นดิน (Area Method) หรือขุดให้ลึกลงไปในพื้นที่ดิน (Trench Method) หรืออาจจะใช้ผสมสองวิธี ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสภาพภูมิประเทศ ดังนี้

1.1 วิธีฝังกลบบนพื้นที่ (Area Method) เป็นการฝังกลบที่เริ่มจากระดับดินเดิม โดยทำการบดอัดมูลฝอยตามแนวราบก่อน แล้วค่อยบดอัดทับในชั้นถัดไปสูงขึ้นเรื่อยๆ จนได้ระดับที่กำหนด การฝังกลบวิธีนี้จำเป็นต้องทำคันดิน (Embankment) เพื่อทำหน้าที่เป็นผนัง และทำหน้าที่ป้องกันน้ำเสียที่เกิดจากการย่อยสลายของมูลฝอยที่บดอัดและฝังกลบแล้ว ไม่ให้ซึมออกทำให้เกิดมลภาวะน้ำเสียได้ ลักษณะพื้นที่ที่จำเป็นต้องใช้วิธีนี้ คือที่ราบลุ่ม หรือที่มีระดับน้ำใต้ดินสูง หรือน้ำใต้ดินต่ำกว่าผิวดินไม่เกิน 1 เมตร เพราะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำเสียต่อน้ำใต้ดินได้ การกำจัดด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องจัดหาดินมาจากที่อื่นเพื่อมาทำคันดิน ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูงขึ้น

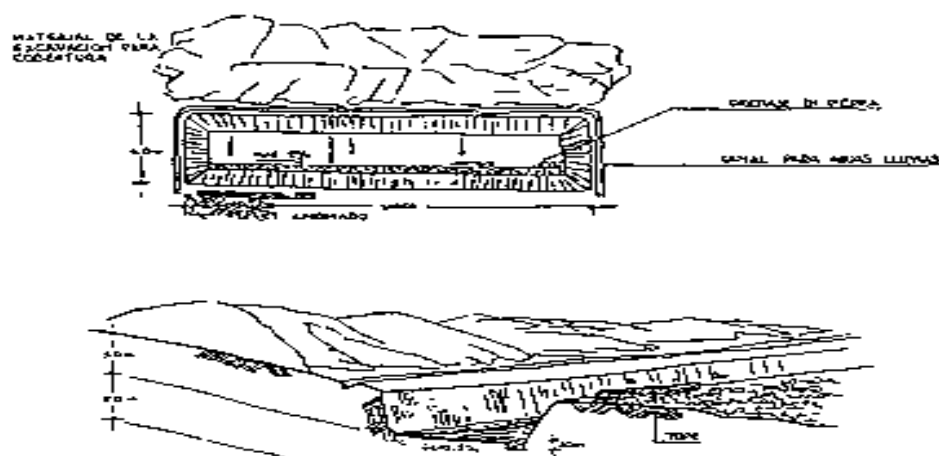
1.2 วิธีฝังกลบแบบขุดร่อง (Trench Method) เป็นวิธีฝังกลบที่เริ่มจากระดับที่ต่ำกว่าดินเดิมโดยการขุดดินให้ได้ระดับตามที่กำหนด แล้วเริ่มบดอัดมูลฝอยให้เป็นชั้นบางๆ ทับกัน หนาขึ้นเรื่อยๆ จนได้ระดับตามที่กำหนดของมูลฝอยบดอัดแต่ละชั้น โดยทั่วไปความลึกของการขุดร่องจะ

ถูกกำหนดด้วยระดับน้ำใต้ดิน ก้นร่องควรอยู่สูงกว่าระดับน้ำใต้ดินไม่น้อยกว่า 1 เมตร โดยยี่ระดับน้ำในฤดูฝนเป็นเกณฑ์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนต่อน้ำใต้ดิน ไม่ต้องทำคันดิน เพราะสามารถใช้ผนังของร่องชุดเป็นกำแพงยัน ทำให้ไม่จำเป็นต้องขนดินมาจากข้างนอก และสามารถใช้ดินที่ขุดออกมากลับมูลฝอยได้อีก



ภาพที่ 1 วิธีฝังกลบบนพื้นที่ (Area method)

ที่มา: Organización Panamericana de la Salud (n.d.)



ภาพที่ 2 วิธีฝังกลบบนร่อง (Trench Method)

ที่มา: Organización Panamericana de la Salud (n.d.)

2. การย่อยสลายมูลฝอย

การย่อยสลาย (Decomposition Processes) ของมูลฝอยต่าง ๆ มี 3 กระบวนการ ได้แก่ การสลายตัวทางชีววิทยา การสลายตัวทางเคมี และการสลายตัวทางฟิสิกส์ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

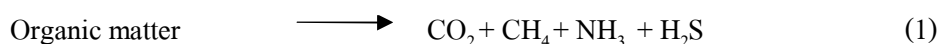
2.1 การสลายตัวทางชีววิทยา (Biological Decomposition) ได้แก่ การเปลี่ยนธาตุคาร์บอนในสารอินทรีย์ โดยกระบวนการทางชีววิทยาของจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปของก๊าซ เช่น ก๊าซมีเทน (CH_4) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นต้น การสลายตัวนี้นับว่ามีความสำคัญมากที่สุด เพราะมูลฝอยประกอบด้วยส่วนที่เป็นสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบส่วนมาก

กระบวนการย่อยสลายทางชีววิทยาหรือทางชีวภาพแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน โดยที่แต่ละขั้นตอนจะมีความต้องการสภาวะแวดล้อม และสารอาหารที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ผลผลิตของแต่ละขั้นตอนก็มีคุณสมบัติที่เฉพาะตัว และสามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่อกระบวนการย่อยสลายของขั้นตอนต่าง ๆ อีกด้วย ดังรายละเอียดต่อไปนี้ (Tchobanoglous *et al.*, 1993)

2.1.1 การย่อยสลายแบบใช้ออกาศ (Aerobic Decomposition) กระบวนการย่อยสลายจะเริ่มขึ้นเมื่อมีการทิ้งมูลฝอยลงสู่บริเวณหลุมฝังกลบ โดยในช่วงแรกนี้กองมูลฝอยที่ทิ้งทับถมกันยังคงมีออกซิเจนเหลืออยู่ แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนอิสระจะนำไปใช้ทำปฏิกิริยาย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยให้ผลผลิตออกมาเป็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ สารอินทรีย์ที่ย่อยสลายไม่สมบูรณ์และความร้อน กระบวนการย่อยสลายแบบใช้ออกาศ มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้เร็วกว่ากระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกาศ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ระหว่างเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสามารถปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมา ซึ่งมีผลทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นถึง 35-40 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นผลผลิตที่สำคัญของกระบวนการ พบว่ามีปริมาณที่สูงถึงร้อยละ 90 ของก๊าซทั้งหมด และเนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ค่อนข้างดี ดังนั้น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บางส่วนจึงละลายลงสู่ น้ำ ซึ่งการละลายได้มากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับสภาวะสมดุลกับ gaseous phase และจากผลการละลายน้ำนี้ส่งผลให้น้ำในกองมูลฝอยมีฤทธิ์เป็นกรด สำหรับปริมาณออกซิเจน พบว่ามีปริมาณลดลง ขณะที่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้น ส่วนก๊าซไนโตรเจนนั้นในทางทฤษฎีจะไม่เปลี่ยนแปลง

2.1.2 การย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic Decomposition) การหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในอากาศ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะให้ผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย (Final Product) ดังสมการที่ 1 ของการเกิดปฏิกิริยาทั่วไป

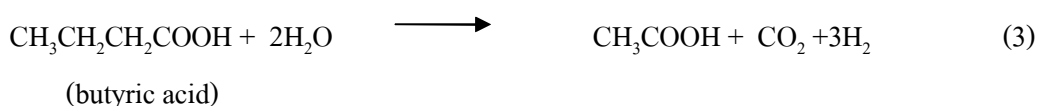
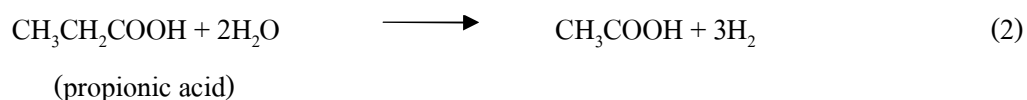


ผลผลิตที่เกิดขึ้นในส่วนที่เป็นก๊าซจะลอยตัวขึ้นสู่บรรยากาศผ่านชั้นหน้าดินหลุมฝังกลบ และส่งกลิ่นฟุ้งกระจายไปทั่ว กระบวนการนี้เกิดช้ากว่าการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนประมาณ 2-6 เดือน หรือ 1 ปี กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ก. ปฏิกิริยาการแตกสลายสารโมเลกุล (Hydrolysis) เป็นกระบวนการแตกสลายสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน และอาจอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เช่น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์โลส และส่วนประกอบต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อพืช เช่น เซลล์โลสและลิกนิน ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนแรกของกระบวนการย่อยสลายที่มีความสำคัญในกระบวนการปล่อยก๊าซออกซิเจน ทั้งนี้เพื่อเปลี่ยนขนาดและรูปร่างโมเลกุลของสารให้เล็กลงทำให้แบคทีเรียสามารถนำสารอาหารผ่านผนังเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้ โดยแบคทีเรียจับเอนไซม์ออกนอกเซลล์เพื่อทำให้โมเลกุลใหญ่เหล่านี้แตกตัวออกมาเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ เอนไซม์ที่แบคทีเรียจับออกมา คือ Cellulolytic Lipolytic และ Proteolytic โดยเอนไซม์ Cellulolytic จะทำหน้าที่ในขั้นวิกฤตที่สุด คือ ทำให้สารประกอบเชิงซ้อนแตกตัวออกเป็นสารประกอบอย่างง่าย หรือ สารละลาย และสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน กรดไขมันสายยาว เป็นต้น

กระบวนการสร้างกรด (Acidogenesis) สารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงนี้ จะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่สร้างกรดที่เรียกว่า Acid forming bacteria อาจเป็นพวก Facultative bacteria การสลายในขั้นตอนนี้ยังพบว่าการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาอย่างรวดเร็ว พร้อมกับกรดอินทรีย์ และพลังงานความร้อนเล็กน้อย นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายรวมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลทำให้สภาพความเป็นกรดของน้ำในกองมูลฝอยมีค่าสูงมากกว่าในขั้นตอนการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนอิสระ กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นกรดอะซิติก (Acetic acid) กรดโพรไพโอนิก (Propionic acid) กรดแลคติก

ข. (Lactic acid) และกรดบิวทิริก (Butyric acid) แต่แบคทีเรียพวก Acetogenic bacteria จะทำหน้าที่เปลี่ยนกรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิกเป็นกรดอะซิติก ดังสมการที่ 2 และ 3



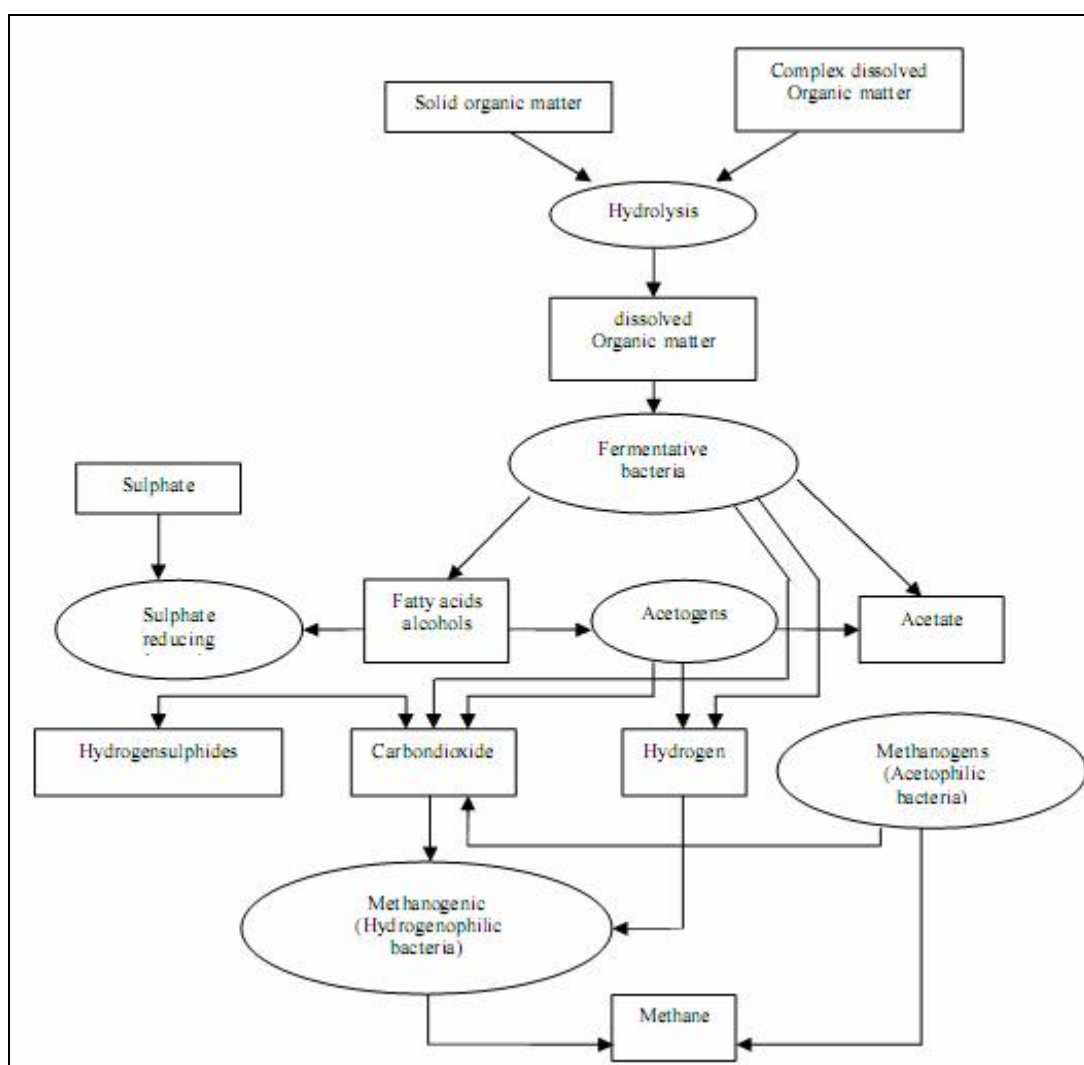
ค. กระบวนการเกิดก๊าซมีเทน (Methanogenesis) กระบวนการย่อยสลายเริ่มเมื่อปริมาณออกซิเจนถูกใช้ไปหมดแล้ว พร้อมกับสภาวะ Reducing condition ซึ่งเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างก๊าซมีเทน (Methane former) และแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นพวก Strictly anaerobes ซึ่งเจริญเติบโตช้าแต่มีประสิทธิภาพสูง สำหรับผลผลิตที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายนี้ประกอบด้วย ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ ก๊าซมีเทน และพลังงานความร้อน นอกจากนี้การที่กลุ่มแบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญเติบโตอย่างช้าๆ โดยการย่อยสลายกรดอินทรีย์ดังสมการที่ 4 มีผลทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำของกองมูลฝอยลดลง ประกอบการลดลงของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ดังสมการที่ 5 ส่งผลให้ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำในกองมูลฝอยมีค่าสูงขึ้น



2.2 การสลายตัวทางเคมี (Chemical decomposition) ได้แก่ ปฏิกิริยาของ Hydrolysis การดูดซึม การดูดซับหรือปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไอออน (Ionic exchange) ผลที่เกิดขึ้นจะทำให้ให้น้ำในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยมีปริมาณของสารอนินทรีย์ เช่น ไฮดรอกไซด์ คาร์บอเนตหรือโลหะต่างๆ (Tchobanoglous, 1993)

2.3 การสลายตัวทางฟิสิกส์ (Physical decomposition) ได้แก่ การที่สารต่างๆ ที่เกิดจากปฏิกิริยาทางชีววิทยา และฟิสิกส์ถูกเคลื่อนย้ายผ่าน หรือออกจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่น้ำไหลผ่านในอัตราที่สูง (Tchobanoglous, 1993)

การสลายตัวทางชีววิทยาหรือทางชีวเคมี จะมีความสำคัญอย่างมากต่อปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในหลุมฝังกลบมูลฝอย โดยการทำงานของจุลินทรีย์ในสภาวะที่อับอากาศ ซึ่งผลที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าวจะได้ปริมาณก๊าซต่างๆ ขึ้น โดยสรุปแล้วถึงแม้ว่าจะมีปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดขึ้นพร้อมกันๆ กันหลายกระบวนการ แต่จะมีปฏิกิริยาเดียวที่แสดงบทบาทเด่นในช่วงเวลาหนึ่ง และกระบวนการที่เหลือจะมีบทบาทในระดับต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลายเป็นปฏิกิริยาแบบ Dynamic growth ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การเกิดก๊าซในพื้นที่ฝังกลบ

ที่มา: Christensen *et al.* (1992)

3. องค์ประกอบและอัตราการเกิดก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบ

องค์ประกอบก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอย พบว่าก๊าซที่เกิดขึ้นจากการฝังกลบมูลฝอยจะประกอบด้วยก๊าซต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งก๊าซที่เกิดขึ้นมีสัดส่วนของก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากที่สุดถึงร้อยละ 45-60 และ 40-50

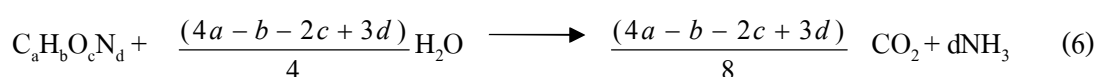
ตารางที่ 1 องค์ประกอบของก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยทั่วไป

องค์ประกอบของก๊าซ	ร้อยละโดยปริมาตร
มีเทน	45-60
คาร์บอนไดออกไซด์	40-50
ไนโตรเจน	2-5
ออกซิเจน	0.1-1.0
ไฮโดรเจนซัลไฟด์	0-1.0
แอมโมเนีย	0-0.2
ไฮโดรเจน	0-0.2
คาร์บอนมอนอกไซด์	0-0.2
ก๊าซอื่นๆ	0.01-0.6

ที่มา: Tchobanoglous. (1993)

อัตราการเกิดก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอย อัตราการเกิดก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอยปกติจะถูกควบคุมจากหลายๆปัจจัย เช่น ขนาดและองค์ประกอบของมูลฝอย อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณสารอาหาร ความชื้น เป็นต้น ดังนั้นจึงมีนักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาเพื่อหาอัตราการเกิดก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยขนาดเล็กที่จำลองขึ้นพบว่าอัตราการเกิดก๊าซอยู่ในช่วง 0.007-3.16 m³ / kg wet solid waste/ year (USEPA, 1985) ในหลุมฝังกลบจริงจะมีอัตราการเกิดก๊าซอยู่ระหว่าง 187-424 m³ / ton wet solid waste/ year (Lee *et al*, 1986) หรือ 0.009-0.02 m³ / kg wet solid waste/ year (คาดการณ์จากอัตราการเกิด 20 ปี) ซึ่งเป็นผลมาจากองค์ประกอบของมูลฝอยและฤดูกาลที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อัตราการเกิดก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอยที่จำลองขึ้นจะสูงกว่าหลุมฝังกลบมูลฝอย

จริงเพราะสามารถควบคุมสภาวะได้ เช่น พีเอช ความชื้นและการเติมสารอาหารของมูลฝอยได้มากกว่า ในขณะที่หลุมฝังกลบมูลฝอยจริงไม่สามารถควบคุมสภาวะต่างๆได้ เช่น อาจมีปริมาณความชื้นต่ำเกินไป มีการรั่วไหลของก๊าซ เป็นต้น จึงทำให้ผลผลิตก๊าซที่ได้ต่ำกว่าปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดจากหลุมฝังกลบจำลอง มีสมการทั่วไปของปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซมีเทนดังสมการ (Tchobanoglous, 1993)



4. การเกิดน้ำชะมูลฝอย (Leachate Generation)

น้ำชะมูลฝอยที่เกิดจากการที่มีน้ำไหลผ่านมูลฝอยแล้วละลายสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ปนออกมาซึ่งน้ำไหลผ่านชั้นมูลฝอยอาจเกิดจากน้ำที่เป็นส่วนประกอบของมูลฝอย น้ำฝนที่ตกในบริเวณที่ฝังกลบมูลฝอย หรือน้ำใต้ดินที่มีการไหลซึมเข้ามาจากภายนอกหลุมฝังกลบ ปัจจัยเบื้องต้นที่มีอิทธิพลต่อการเกิดน้ำชะมูลฝอย คือ สภาพภูมิอากาศบริเวณที่ทำการฝังกลบ สภาพภูมิประเทศ ลักษณะดิน สภาพอุทกธรณีวิทยา ดินและวัสดุกลบทับชั้นสุดท้าย รวมทั้งลักษณะมูลฝอยที่ฝังกลบ ปริมาณของน้ำชะมูลฝอยจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของน้ำที่ซึมเข้าสู่บริเวณฝังกลบ ซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณฝนตก การระเหยกลับ และการสูญเสียน้ำอื่น ๆ โดยปริมาณของน้ำชะมูลฝอยจะเพิ่มขึ้น ถ้าอัตราการซึมได้ของน้ำผ่านดินรองชั้นฝังกลบ (Underlying) และดินกลบทับ

(Intermediate and Final Cover Soil) สูง

5. กระบวนการย่อยสลายน้ำชะมูลฝอยในหลุมฝังกลบ

ซึ่งในการย่อยสลายในหลุมฝังกลบจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นก๊าซ ซึ่งขั้นตอนในการย่อยสลายประกอบด้วย 5 ขั้นตอนดังนี้ (King and Eliassen, 1993)

1) Initial Adjustment Phase เป็นขั้นแรกของการย่อยสลาย ซึ่งในขั้นนี้จะเป็นการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic Condition) เนื่องจากยังมีออกซิเจนหลงเหลืออยู่ในหลุมฝังกลบ

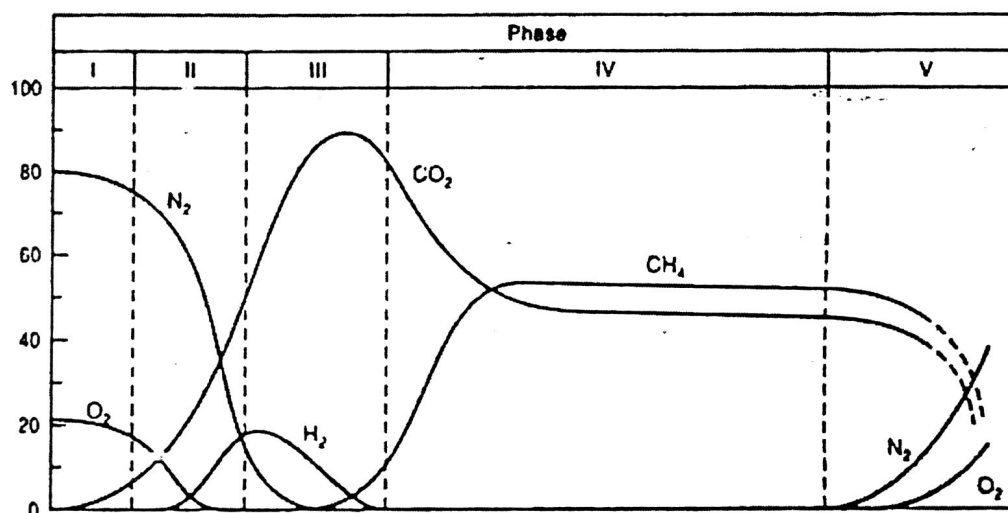
2) Transition Phase เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นเมื่อออกซิเจนเริ่มขาดแคลน กำลังจะเกิดสภาพไร้ออกซิเจน (Anaerobic Condition) ในขั้นนี้จะใช้ไนโตรเจนและซัลเฟตในกระบวนการย่อยสลาย

เกิดผลิตภัณฑ์เป็น ก๊าซไนโตรเจน (N_2) และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ค่าพีเอชของน้ำชะมูลฝอยจะเริ่มลดต่ำลงเนื่องมาจากเกิดกรดอินทรีย์ (Organic acid) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ขึ้นในกระบวนการย่อยสลาย

3) Acid Phase ในขั้นตอนนี้จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนย่อย ๆ คือ การเปลี่ยนรูปของสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูง (เช่น ไขมันและโปรตีน เป็นต้น) ไปเป็นสารประกอบที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและเซลล์คาร์บอน และในส่วนถัดไปเป็นขั้นตอนการเปลี่ยนสารประกอบที่ได้จากขั้นตอนแรกไปเป็นสารประกอบที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ของกรดฟุลวิก (Fulvic Acid) และกรดอินทรีย์ประเภทอื่น ๆ ซึ่งการย่อยสลายในขั้นตอนที่ 3 นี้ก๊าซที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ส่วนก๊าซไฮโดรเจน (H_2) จะเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนนี้เรียกว่า Facultative Bacteria และ Obligate Anaerobic Bacteria ในขั้นตอนนี้ค่าพีเอช (pH) จะลดต่ำลง เนื่องจากการเพิ่มมากขึ้นของกรดอินทรีย์ (Organic acid) และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ส่วนค่าความสกปรกในรูปของบีโอดี (BOD) ซีโอดี (COD) และค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) ของน้ำชะมูลฝอยจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากพีเอชที่ต่ำจะทำให้ความสามารถในการละลายของกรดอินทรีย์และธาตุอาหารในน้ำชะมูลฝอยดีขึ้น

4) Methane Fermentation Phase จุลินทรีย์ในขั้นตอนนี้จะเปลี่ยนกรดอะซิติกและก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดที่สร้างกรด (Acid Former) ในขั้นตอนที่ 3 ไปเป็นก๊าซมีเทน (CH_4) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายนี้นี้เป็นจุลินทรีย์ที่สร้างก๊าซมีเทน (Methane Former) ซึ่งอยู่ได้ในสภาพไร้อากาศเท่านั้น ในขั้นตอนนี้ Acid Former และ Methane Former จะทำงานควบคู่กัน โดยอัตราการสร้างกรดจะลดลงเรื่อย ๆ ส่งผลให้ค่าพีเอชของน้ำชะมูลฝอยเพิ่มสูงขึ้น ทำให้โลหะหนักละลายน้ำได้น้อยลง ส่งผลให้ค่าโลหะหนักในน้ำชะมูลฝอยลดลงด้วย

5) Maturation Phase ขั้นตอนที่สุดท้ายนี้จะเกิดขึ้นภายหลังจากสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้ว เมื่อความชื้นยังคงหลงเหลืออยู่ในช่องว่างของมูลฝอย อินทรีย์สารที่ยังไม่ได้สัมผัสกับความชื้นจะถูกย่อยสลายและเปลี่ยนรูปต่อไป ในขั้นตอนนี้อัตราการเกิดก๊าซจะลดลงเรื่อย ๆ เนื่องจากสารอินทรีย์ที่เหลืออยู่เป็นประเภทที่ย่อยสลายยาก ก๊าซที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ได้แก่ ก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนน้ำชะมูลฝอยจะมีฮิวมิก (Humic) และกรดฟุลวิก (Fulvic Acid) เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากเป็นสารที่ย่อยได้ยาก



ภาพที่ 4 ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นในระยะเวลาต่างๆ จากการย่อยสลายน้ำชะมูลฝอย

ที่มา: Tchobanoglous (1993)

6. ลักษณะสมบัติของน้ำชะมูลฝอย (Leachate Characteristics)

คุณสมบัติของน้ำชะมูลฝอยแปรผันตาม ชนิดของขยะ สภาพอากาศ ฤดูกาล อายุของหลุมฝังกลบมูลฝอย ความสูงของขยะมูลฝอย และความชื้นที่มาจากขยะมูลฝอย (พิมลรัตน์, 2544) ลักษณะทั่วไปของน้ำชะมูลฝอยจากขยะมูลฝอยชุมชน มีความเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์ละลายอยู่สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดคาร์บอกซิลิกที่มีพันธะสั้น แอมโมเนีย คลอไรด์ ซัลเฟต และสารประกอบโลหะหนัก เช่น เหล็ก แคลเซียม โซเดียม และโพแทสเซียม ซึ่งพบค่าความเข้มข้นอยู่ในระดับสูง ข้อมูลลักษณะทั่วไปของน้ำชะมูลฝอยจากหลุมฝังกลบมูลฝอยชุมชน ดังแสดงในตารางที่ 2 (Lee *et al.*, 1986)

7. การใช้พืชในการตรวจวัดมลพิษ (Bio monitoring)

โดยทั่วไปเราเรียกสิ่งมีชีวิตที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลง ต่อเนื่องสิ่งแวดล้อมเป็นพิเศษว่าเป็นสิ่งมีชีวิตบ่งชี้ ในสิ่งแวดล้อม เช่น แม่น้ำ หรือ ทะเล ส่วนใหญ่จะนำสัตว์ เช่น ปลา มาใช้แต่สำหรับสิ่งแวดล้อมบนบกจะใช้พืช ซึ่งอยู่กับที่จะเป็นการสะดวกกว่า เกี่ยวกับมลพิษทางอากาศ เริ่มมีการทดลองที่จะใช้พืชบ่งชี้ในการตรวจวัดสารมลพิษร่วมกับวิธีการอื่นมากขึ้น

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและความเข้มข้นของน้ำชะมูลฝอย

สาร	หน่วย	ระดับความเข้มข้น	ระดับความเข้มข้นทั่วไป
BOD ₅	mg/l	4-57,700	1,000-30,000
COD	mg/l	39-89,250	1,000-50,000
TOC	mg/l	0-28,500	700-10,000
Total volatile acids	mg/l	70-27,700	-
BOD ₅ /COD	-	0.02-0.87	0.6-0.8
COD/TOC	-	0.4-4.8	1-4.0
Total Kjeldahl nitrogen (as N)	mg/l	7-1,970	10-500
Nitrate (as N)	mg/l	0-51	0.1-10
Ammonia (as N)	mg/l	0-1,966	-
Total phosphate	mg/l	0.2-130	0.5-50
Orthophosphate	mg/l	0.2-130	-
Total alkalinity (as CaCO ₃)	mg/l	0-20,850	500-10,000
Total hardness (as CaCO ₃)	mg/l	0-22,800	500-10,000
Total Solid	mg/l	0-59,200	3,000-50,000
Total dissolved solid	mg/l	584-44,900	1,000-20,000
Specific conductance	μmhos/cm	1,400-17,100	2,000-8,000
pH	-	3.7-3.8	5-7.5
Calcium	mg/l	60-7,200	100-3,000
Magnesium	mg/l	17-15,600	30-500
Chromium	mg/l	0.02-18	0.05-1
Cadmium	mg/l	0.03-17	0.001-0.1
Copper	mg/l	0.005-9.9	0.02-1
Lead	mg/l	0.001-2.0	0.1-1
Nickel	mg/l	0.02-79	0.1-1
Iron	mg/l	4.0-2,820	10-1,000
Zinc	mg/l	0.06-370	0.5-30

ที่มา: Lee *et al.* (1986)

การอธิบายถึงระดับความปนเปื้อนโดยวิธีใช้สิ่งมีชีวิตจะเป็นแบบเชิงคุณภาพ (Quantitative-semi quantitative) ไม่สามารถแสดงผลเชิงปริมาณเช่นเดียวกับเครื่องตรวจวัดตามหลักการทางฟิสิกส์และเคมีได้ แต่สามารถให้เก็บข้อมูลการเพิ่มขึ้นของภาวะมลพิษสิ่งแวดล้อมในพื้นที่กว้างอย่างต่อเนื่องในระยะยาว ได้นอกจากนี้ยังตรวจวัดมลพิษภาวะมลพิษเชิงซ้อนในภาพรวมได้ การใช้พืชบ่งชี้เพื่อแสดงภาวะมลพิษนี้ จะช่วยให้รู้ถึงระดับของมลพิษได้จากการเปรียบเทียบกับพืชชนิดเดียวกันที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่ซึ่งไม่มีมลพิษ หรือด้วยการนำพืชดัชนีที่เหมาะสมซึ่งมีความไวต่อสารก่อมลพิษตามที่ต้องการเข้าไปปลูกโดยตรง หรือ ใส่กระถางนำไปวางในพื้นที่ที่มีปัญหา เพื่อทำการสังเกต ตรวจวัดและประเมินผล

การตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ใบไม้ เนื่องจากพืชไม่มีระบบขับถ่ายจึงแทบจะไม่มีการระบายหรือขับสารพิษที่ดูดซึมเข้าไปภายในลำต้นออกทางรากเลย โดยทั่วไปสารพิษส่วนใหญ่ก็จะยังคงสะสมอยู่ในจุดที่ดูดซึมเข้าไปหรือบริเวณใกล้เคียง จึงนำคุณสมบัติดังกล่าวของพืชมาใช้ประโยชน์ คือ การวิเคราะห์ DNA ของใบไม้ ตามปกติในพื้นที่ภาวะมลพิษทางอากาศจะมีการเก็บตัวอย่างใบพืช ชนิดเดียวกันในตระกูลเดียวกัน จากหลายๆจุดเป็นจำนวนหลายร้อยกรัมโดยให้ครอบคลุมทั้งอายุของใบและตำแหน่งของใบบนต้น และในขณะเดียวกันก็จะต้องมีการเก็บใบไม้ปกติจากพื้นที่ซึ่งไม่มีภาวะมลพิษ จำนวน 2-3 แห่งจากตำแหน่งเดียวกันบนต้นมาเป็นตัวอย่างสำหรับเปรียบเทียบด้วย (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2547)

Oyabu *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาความสามารถของพืชในการกำจัดมลพิษอากาศภายในอาคารสถานดูแลผู้สูงอายุ ที่ประกอบด้วยมลพิษ ได้แก่ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) แอมโมเนีย (NH_3) และเมทิลเมอร์แคปแทน (CH_3SH) โดยนำพุ่มต่างขนาดความสูงประมาณ 40 เซนติเมตรมาวางในตู้ปิดขนาด 300 ลิตรจากนั้นฉีดสาร acetone, ammonia, formaldehyde เข้าไปในตู้ซึ่งสารเหล่านี้ก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นและเป็นมลพิษในอากาศ วัดระดับความเข้มข้นของกลิ่นโดย a tin oxide gas sensor ทำการแปรผันความเข้มข้นจากความเข้มข้นที่มีอยู่ในบรรยากาศทั่วไปจนกระทั่งถึง 20 ppm. ติดตั้งระบบกระจายน้ำอัตโนมัติรดน้ำในเวลา 8.30 น. ของทุกวัน ควบคุมแสงโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ให้ความเข้มแสงที่ 1,000 ลักซ์ ผลที่ได้พบว่า สามารถทำนายการลดลงของก๊าซแอมโมเนียได้จากสมการ $y = a \exp^{(-bx)} + c$ ซึ่ง b แทนค่า ประสิทธิภาพในการกำจัดก๊าซ c แทนค่าระดับความเข้มข้นที่อ่านได้จาก sensor และ a แทนค่า intercept จากแต่ละระดับความเข้มข้น ซึ่งสามารถใช้สมการดังกล่าวคำนวณจำนวนของพืชแต่ละชนิดที่จะนำมาใช้ในการกำจัดสารพิษ

8. การเจริญเติบโตของพืชในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย

พืชที่เจริญในแต่ละพื้นที่ฝังกลบจะมีลักษณะ และชนิดแตกต่างกันไปตามสิ่งแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ ส่วนใหญ่พบว่าพืชในพื้นที่ฝังกลบจะเจริญเติบโตช้า เนื่องจากก๊าซที่แพร่จากพื้นที่ฝังกลบ ความแห้งแล้งและการบดอัดดิน ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืช

Wong and Yu (1989) ศึกษาพืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ฝังกลบของฮ่องกงพบว่า ความเข้มข้นของมีเทน ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ เอทิลีนและตะกั่ว มีผลในทางลบต่อการเจริญเติบโตของพืช Moffat and Houston (1991) พบว่าเมื่อเปลี่ยนความหนาของวัสดุกลบทับจาก 0.2 เมตร เป็น 1.5 เมตร ช่วยลดผลกระทบของก๊าซที่แพร่ต่อพืช ทำให้พืชสามารถเติบโตและรอดชีวิตได้

8.1 ผลของก๊าซต่อการเจริญเติบโตของพืช

8.1.1 ความเข้มข้นของออกซิเจน จากการศึกษาของ Gendebien (1992) พบว่าก๊าซที่แพร่จากพื้นที่ฝังกลบ ส่งผลทำให้รากพืชขาดออกซิเจนและยังช่วยกระตุ้นให้บริเวณรากผลิตสารประกอบที่เป็นพิษ เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ใบพืชมีลักษณะซีดเหลือง เนื่องจากคลอโรฟิลล์สังเคราะห์อาหารน้อยลง Maurice and Langerkvist (1998) รายงานว่าความเข้มข้นออกซิเจนเหลือเพียงช่วงร้อยละ 5-10 ในพื้นที่ฝังกลบจะเริ่มส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของพืชในหน้าดินกลบทับมูลฝอย (ตารางที่ 4)

8.1.2 ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ จากการศึกษาของ Gendebien (1992) พบว่าเนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์เป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์แสง โดยมีช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมประมาณ 0.04-2 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยมีปริมาณสูงมาก ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อพืช แม้ว่าปริมาณออกซิเจนในดินเพียงพอ ปริมาณความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลกระทบต่อสังเคราะห์แสง และระบบการหายใจของพืช (ตารางที่ 4)

8.1.3 ความเข้มข้นของมีเทน จากการศึกษาของ Maurice and Langerkvist (1998) พบว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันของก๊าซมีเทนช่วยกระตุ้นความต้องการของออกซิเจนของพืช

เนื่องจากพืชต้องใช้พลังงานมากขึ้นในการไซซอนราก กล่าวโดยสรุปได้ว่า ความเข้มข้นออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อพืชโดยตรงมากกว่าก๊าซมีเทน โดยก๊าซมีเทนจะส่งผลทางอ้อมต่อพืช เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของก๊าซมีเทนทำให้ปริมาณออกซิเจนในดินน้อยลงทำให้รากพืชขาดออกซิเจน

8.2 ผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตของพืช

ความเค็มของดินมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช พบว่าค่าการนำไฟฟ้าของดินในช่วง 0-0.8 dS./m.เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชและค่าการนำไฟฟ้าของดินในช่วง 0.8-1.6 dS./m. ส่งผลลบต่อพืช ทำให้ผลผลิตน้อยลง และถ้าค่าการนำไฟฟ้าของดินมากกว่า 1.6 dS./m. (ตารางที่ 3) ทำให้ดินมีความเค็มสูงส่งผลให้พืชส่วนใหญ่ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ ยกเว้นพืชบางชนิดเท่านั้นที่ทนต่อดินเค็มได้

ตารางที่ 3 ผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตของพืช

EC (dS./m.)	ระดับความเค็ม	ผลกระทบต่อพืช
< 0.40	-	ไม่ส่งผลต่อพืช
0.40-0.80	ต่ำ	ส่งผลต่อพืชเล็กน้อย
0.81-1.20	ปานกลาง	ส่งผลต่อผลผลิต
1.21-1.60	ค่อนข้างสูง	ส่งผลต่อผลผลิต
1.61-3.20	สูง	ลดผลผลิต, พืชค่อยๆตาย
>3.20	สูงมาก	พืชส่วนใหญ่ไม่สามารถอยู่รอดได้ (ยกเว้นหญ้าหรือพืชบางชนิดที่ทนต่อดินเค็มได้)

ที่มา : Soil and Plant Analysis Council (1999)

ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้นก๊าซต่อพืช

พืชที่ศึกษา	% O ₂	%CO ₂	%CH ₄	ผลกระทบต่อพืช
Apple tree	5-10	-	-	เจริญเติบโตช้า
Red raspberry	10	-	-	เจริญเติบโตช้า
Black raspberry	10	-	-	เจริญเติบโตช้า
Tomato (<i>Lycopersion esculentum</i>)	-	18	-	ส่วนต่างๆของพืชเสียหาย
Tomato (<i>Lycopersion esculentum</i>)	20	-	-	เจริญเติบโตปกติ
Tomato (<i>Lycopersion esculentum</i>)	7	-	-	เจริญเติบโตปกติ
Tomato (<i>Lycopersion esculentum</i>)	7	-	45	เจริญเติบโตปกติ
	7	34	-	พืชตาย
Tomato (<i>Lycopersion esculentum</i>)	17	18	-	พืชตาย
Tomato (<i>Lycopersion esculentum</i>)	-	1	-	พืชตาย
Pea seed (<i>Pisum Sativum</i> L.)	-	20	-	เจริญเติบโตปกติ
Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	7.5	10	-	เจริญเติบโตปกติ
Cotton seed	-	30-45	-	พืชตาย
Cotton seed	-	5.5	-	ส่งผลกระทบต่อรากพืช
Broad bean	-	5.5	-	ส่งผลกระทบต่อรากพืช
Kidney bean	3	40	50	เจริญเติบโตช้า
Red Maple (<i>Acer rubrum</i>)	3	40	50	เจริญเติบโตช้า
Sugar Maple (<i>Acer rubrum</i>)	11.5	15	22	พืชตาย
Cystitis racemosis				

ที่มา : Maurice and Langerkvist (1998)

8.3 ผลของน้ำชะมูลฝอยต่อพืช

จากการศึกษา Ettala (1987) พบว่าการปลูกไม้ยืนต้นและหญ้าบนพื้นที่ฝังกลบ จะช่วยลดปริมาณน้ำชะมูลฝอยที่ต้องนำไปเข้ากระบวนการบำบัด และลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำชะมูลฝอย นอกจากนี้การศึกษานี้ของ Christensen *et al.* (1992) พบว่า พืชตระกูล willow (*Salix dasyclados* *Salix viminalis* และ *Dactylis Glomerata*) สามารถเจริญเติบโตในพื้นที่ฝังกลบ ที่รดด้วยน้ำชะ

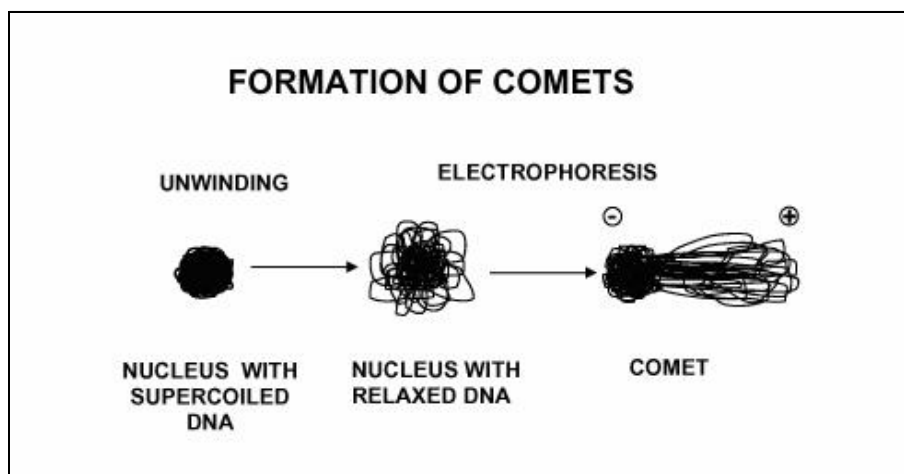
มูลฝอย ทนต่อสภาพน้ำขังและดินเค็มได้ดี ช่วยลดปริมาณ สารประกอบไนโตรเจนในน้ำชะมูลฝอย และช่วยลดปริมาณน้ำชะมูลฝอยที่ต้องบำบัด ในทางตรงข้ามถ้าปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำชะมูลฝอยมีค่าสูงมากๆ ส่งผลต่อปริมาณก๊าซออกซิเจนในดิน เนื่องจากอัตราการใช้ก๊าซออกซิเจนของจุลินทรีย์ที่ใช้ก๊าซออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์มีค่าสูง ทำให้ในดินมีก๊าซออกซิเจนอยู่ในปริมาณน้อย อาจทำให้รากพืชขาดออกซิเจนและทำให้พืชตายได้

9. วิธีโคเมท (comet assay หรือ single cell gel electrophoresis assay)

วิธีโคเมทเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุล ผู้ริเริ่มใช้วิธีโคเมทคนแรก คือ Ostling and Johanson (1984) ได้ทำการทดสอบในสถานะที่เป็นกลาง ต่อมาได้มีการพัฒนาโดย Singh *et al.* (1988) ซึ่งทำการทดสอบในสถานะที่เป็นด่าง (pH>13) ทำให้การทดสอบมีความไว (Sensitivity) มากขึ้น และมีการปรับปรุงพัฒนาเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน

วิธีโคเมท มีประโยชน์ในการนำมาใช้ตรวจสอบสารเคมีที่ทำให้ดีเอ็นเอขาดและแตก (DNA damage) สามารถใช้เป็นวิธีทดสอบเบื้องต้น (screening test of mutagen and carcinogen) ทำได้ทั้งในเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ ข้อดีของวิธีโคเมท คือ เป็นการทดสอบที่ไม่ยุ่งยาก ทำได้รวดเร็ว มีความไวสูง ใช้ตัวอย่างเซลล์เพียงเล็กน้อย และทดสอบกับ eukaryotic cells ได้เกือบทุกชนิด (McCarthy *et al.*, 1997)

หลักการทดสอบ ทำได้โดยการใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงในการสกัดเซลล์ จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกจากกัน (DNA unwinding) ด้วยสารละลายที่เป็นด่างแก่ แล้วนำไปผ่านสนามไฟฟ้าที่มีสารละลายต่างเป็นตัวกลาง ทำการวิเคราะห์โดยอาศัยความแตกต่างในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า ทั้งนี้ดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบจะวิ่งไปหาขั้วบวก ดีเอ็นเอที่ถูกทำลายจะมีขนาดเล็ก สามารถวิ่งในสนามไฟฟ้าได้เร็ว จะกระจายตัวเป็นส่วนหาง (tail) ดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่ไม่ถูกทำลายจะจับกลุ่มรวมกันเป็นส่วนหัว (head) เมื่อย้อมด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ แล้วมองผ่านกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ของดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย มีลักษณะคล้ายดาวหาง ความยาวของเซลล์จะขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกทำลายภายในเซลล์ ถ้าเซลล์ใดดีเอ็นเอถูกทำลายมาก ก็จะทำให้เซลล์นั้นมีส่วนหางยาวมาก เซลล์ที่ดีเอ็นเอไม่ถูกทำลายก็จะมีไม่มีส่วนหาง (Gichner, 2003)



ภาพที่ 5 ลักษณะการรวมตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอในกระบวนการวิเคราะห์แบบโคเมท
ที่มา : Gichner (2003)

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง ดังนี้ (ศิริพร, 2531)

1. ขนาดของดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะผ่านเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก ดังนั้นในเวลาเท่ากันและสภาวะเดียวกันดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก
2. รูปร่างของดีเอ็นเอ (Conformation of DNA) ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างที่ต่างกันแม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากัน เมื่ออยู่ในสภาวะเดียวกันจะเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยความเร็วที่ต่างกัน ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวง (Super helical circular) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้น (Linear DNA) และดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่คลายเกลียว (open circular หรือ Nick circular DNA)
3. ความเข้มข้นของเจล (Gel concentration: pore size of the gel) เจลที่มีความเข้มข้นสูง จะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุล (Pore) น้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นเจลที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ส่วนเจลที่มีความเข้มข้นต่ำเหมาะจะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่เหมาะสมสำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ดังที่แสดงในตารางที่ 5

4. ความต่างศักย์ไฟฟ้า (Applied voltage) อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความต่างศักย์ไฟฟ้า ในสถานะที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำๆ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่เร็วขึ้นเมื่อความต่างศักย์ไฟฟ้ามากขึ้น (ประมาณ 1 โวลต์ต่อเซนติเมตร) แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้น การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่ๆ จะเพิ่มมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กส่งผลให้ประสิทธิภาพของการแยกดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลลดลง ดังนั้นหากต้องการให้การแยกดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดี และชัดเจนที่สุดในกรณีที่ดีเอ็นเอมีขนาดไม่เกิน 2 กิโลเบส ควรใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ คือ ไม่เกิน 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร

5. ทิศทางของกระแสไฟฟ้า (Direction of the electric field) ดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วงไม่เกิน 100 กิโลเบส จะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วเดียวกันถ้าอยู่ในสนามไฟฟ้าที่มีทิศทางเดียวกันและคงที่

6. ส่วนประกอบของเบสและอุณหภูมิ (Base composition and temperature) พบว่า ส่วนประกอบของเบสและอุณหภูมิไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล ช่วงอุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงมักทำที่อุณหภูมิห้อง แต่อะกาโรสที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.5% จะมีความหนาแน่นน้อยส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในขณะทำการผ่านกระแสไฟฟ้าที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นการผ่านกระแสไฟฟ้าจึงควรทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะช่วยให้เจลแข็งขึ้น มีความหนาแน่นมากขึ้น ทำให้การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอดีขึ้นด้วย

7. บัฟเฟอร์ (Buffer) การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ ถ้ามีการเตรียมความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผิด เช่น เจือจางมาก ตัวนำกระแสไฟฟ้าจะนำกระแสไฟฟ้าได้ไม่ดี และดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้ามาก และในกรณีที่เตรียมความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ สูงมากเกินไป จะทำให้การนำกระแสไฟฟ้ามีประสิทธิภาพดี แต่ความร้อนจะเพิ่มมากขึ้น เจลละลายและดีเอ็นเอสูญเสียธรรมชาติ บัฟเฟอร์ที่ใช้ต้องปรับ pH ให้สองขั้วเท่ากันเพราะเมื่อทำการผ่านกระแสไฟฟ้าไประยะหนึ่ง ขั้วบวกมักจะมีค่า pH สูงขึ้นและขั้วลบจะมีค่า pH ต่ำลง ดังนั้นจึงนิยมใช้บัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง (buffer capacity)

ตารางที่ 5 ขนาดของดีเอ็นเอกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่เหมาะสม

ความเข้มข้นของ Agarose gel (%)	ขนาดของดีเอ็นเอ (กิโลเบส)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

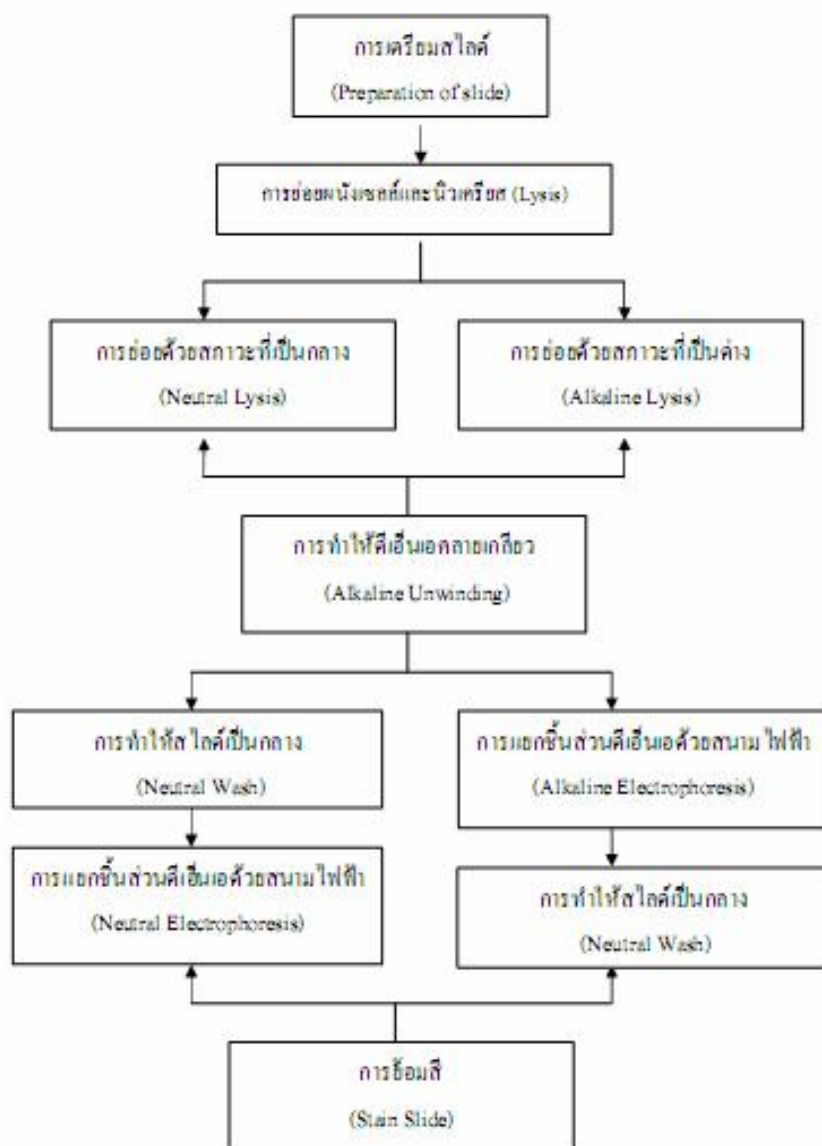
ที่มา: ศิริพร (2531)

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการผ่านกระแสไฟฟ้า ประกอบด้วย EDTA กับ TRIS-acetate (TAE) หรือ TRIS-borate (TBE) ที่ pH ประมาณ 7.5-8.0 บัฟเฟอร์มีหลายชนิด และมักเตรียมในรูปแบบสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้จริง 10 เท่า (10X) เมื่อต้องการใช้จึงนำมาทำให้เจือจางลงให้ได้ความเข้มข้นปกติ การเลือกใช้บัฟเฟอร์ชนิดใดขึ้นอยู่กับบัฟเฟอร์ชนิดนั้นๆ ดังนี้

1) TRIS-acetate (TAE) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุต่ำ แต่นิยมใช้กันมาก ดังนั้นระหว่าง electrophoresis ต้องคอยผสมบัฟเฟอร์ระหว่างขั้วทั้งสองให้เข้ากัน การเก็บบัฟเฟอร์ให้ได้نانต้องนำไปนิ่งฆ่าเชื้อก่อน และเก็บใน 4 องศาเซลเซียส เพราะจุลินทรีย์จะสามารถเจริญเติบโตได้

2) TRIS-borate (TBE) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง แลบดีเอ็นเอที่แยกได้จะคมชัดและเล็ก เมื่อเตรียมที่มีความเข้มข้น 10 เท่า สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโต เนื่องจากมี boric acid เป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อ

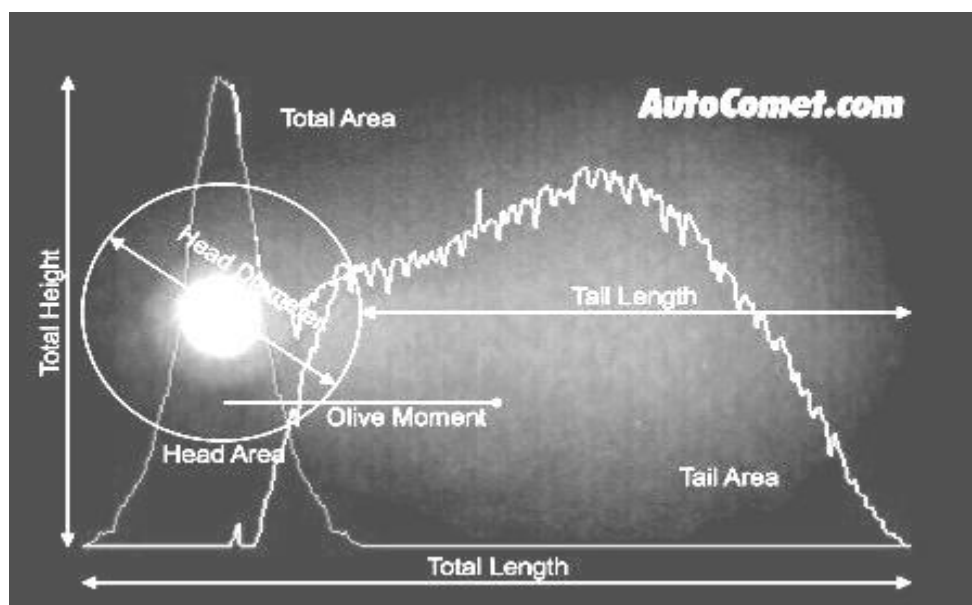
10. ขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธีโคเมท ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลัก ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ขั้นตอนทั่วไปของทดสอบการถูกทำลายดีเอ็นเอด้วยวิธีโคเมท

11. การวิเคราะห์เซลล์ที่ได้จากการทดสอบ

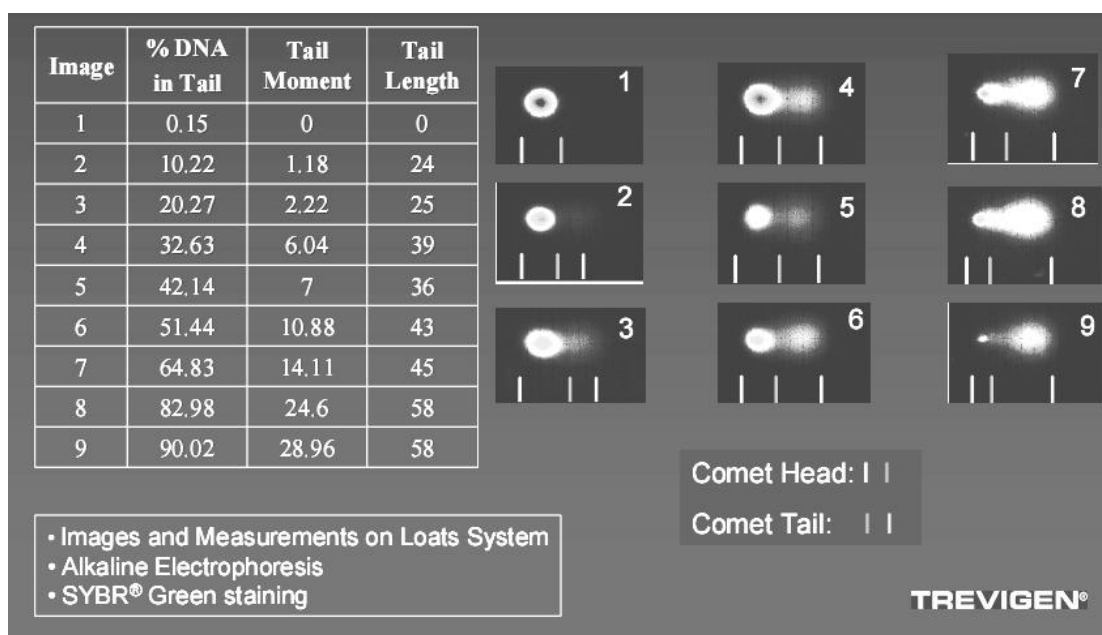
McCarthy *et al.* (1997) เปรียบเทียบการวัดขนาดของเซลล์ที่ได้จากการทดสอบโคเมทด้วย software image analysis และ manual image analysis โดยใช้ hydrogen peroxide ในเซลล์ 707 FEL ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเกิดการแตกหัก แล้วนำมาทดลองตามขั้นตอนของการทดสอบโคเมท ตรวจวิเคราะห์เซลล์จำนวน 50 เซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ แล้วใช้ (1) software image analysis ในการวิเคราะห์ % head DNA, % tail DNA, tail length, tail length/head radius (L/H) และ tail moment ดังแสดงในภาพที่ 7 (2) manual image analysis ถ่ายภาพเซลล์แล้วนำมาวัดเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนหัวของเซลล์ ความยาวตั้งแต่หัวจรดหาง และส่วนหาง ผลปรากฏว่าทั้งสองวิธีให้ผลที่ดี เชื่อถือได้และไม่แตกต่างกัน แต่วิธี manual image analysis มีข้อเสีย คือการทำยุ่งยากและใช้เวลามาก



ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ภาพเซลล์โคเมท (image analysis)

ที่มา: TriTek Corporation, (2007)

ซึ่งในแต่ละระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ที่แตกต่างกัน พบว่าภาพของเซลล์โคเมทก็จะมีลักษณะแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ลักษณะการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์โคเมทในแต่ละระดับ

ที่มา: Trevigen Inc. (n.d.)

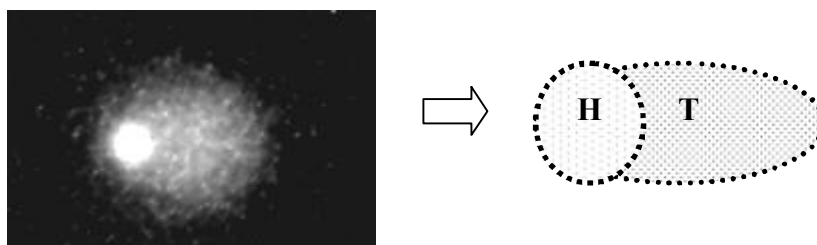
ในการตรวจวิเคราะห์เซลล์ที่ได้จากการทดสอบโคเมทด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่มีฟิลเตอร์สำหรับกระตุ้นสารฟลูออเรสเซนซ์ (excitation filter) ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และมีฟิลเตอร์สำหรับป้องกันผลกระทบจากฟลูออเรสเซนซ์ (barrier filter) ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์นั้น ทำได้ 4 วิธี คือ (Speit *et al.*, 1998)

1) นับจำนวนเซลล์ที่มีหาง (tail) และเซลล์ที่ไม่มีหาง

2) ประเมินเซลล์เป็น 5 ระดับตามความยาวของหางคือ 0, 1, 2, 3, 4 โดย 0 หมายถึง เซลล์ที่ไม่มีหาง และ 4 หมายถึง เซลล์ที่มีหางยาวที่สุด ทำการประเมินอย่างน้อย 50 เซลล์ และนับคะแนนจากระดับคูณด้วยจำนวนเซลล์ นำคะแนนแต่ละระดับมารวมกันในการประเมิน 50 เซลล์ และนับคะแนนจากระดับศูนย์ด้วยจำนวนเซลล์ นำคะแนนแต่ละระดับมารวมกันในการประเมิน 50 เซลล์ จะได้คะแนนต่ำสุดเป็น 0 และคะแนนสูงสุดเป็น 200

3) วัดความยาวของเซลล์โดยใช้ eyepiece micrometer วัดความยาวของเซลล์ตั้งแต่หัวจรดหางโดยมีหน่วยความยาวเป็นไมโครเมตร วัดอย่างน้อย 50 เซลล์

4) ใช้เครื่อง image analyzer ที่เชื่อมต่อกับ CCD camera วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวของเซลล์ (head diameter) ความยาวของหาง (tail length) ความเข้มของหาง (tail intensity) พื้นที่ส่วนหัว (head area) พื้นที่ส่วนหาง (tail area) และ tail moment (DNA migration x tail intensity) แต่ละ image analysis systems อาจใช้พารามิเตอร์ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 พื้นที่ส่วนหัว (Head area) และพื้นที่ส่วนหาง (Tail area) ของเซลล์โคเมท

ในการคำนวณระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของแต่ละเซลล์ตัวอย่าง ทำได้โดยคำนวณจากสมการ (Sriussadaporn *et al.*, 2003)

$$\text{ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอ} = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{T}{T+H} \right)_i}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{T}{T+H} \right)_{i, \max}} \quad (7)$$

โดยที่

- | | |
|---|---------------------------------|
| T | คือ พื้นที่ส่วนหางของเซลล์โคเมท |
| H | คือ พื้นที่ส่วนหัวของเซลล์โคเมท |
| i | คือ ลำดับของภาพเซลล์โคเมท |
| n | คือ จำนวนภาพเซลล์โคเมททั้งหมด |

$\sum_{i=1}^n \left(\frac{T}{T+H} \right)_i$ คือ ผลรวมของสัดส่วนการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจากภาพเซลล์โคเมทจำนวน n ภาพ

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{T}{T+H} \right)_{i,\max}$$

คือ ผลรวมของสัดส่วนการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่มีค่า
มากที่สุดจากภาพเซลล์โคเมทจำนวน n ภาพ

ในกรณีที่พื้นที่ส่วนหางมากเนื่องจากการทำลายดีเอ็นเอมาก ($T \gg H$)

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{T}{T+H} \right)_{i,\max} \cong n$$

ดังนั้น

$$\text{ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอ} = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{T}{T+H} \right)_i}{n} \quad (8)$$

12. การใช้วิธีโคเมทในการติดตามผลกระทบจากมลพิษ

งานวิจัยที่ศึกษามาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการใช้วิธีโคเมทเพื่อติดตามผลกระทบจากมลพิษ มีดังนี้

วันวิสาและคณะ (2549) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการใช้เทคนิค DNA Comet Assay เพื่อใช้ในการตรวจสอบเมล็ดถั่วเขียวที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา โดยเน้น 2 ปัจจัยหลัก ได้แก่ ปริมาณตัวอย่าง และเวลาที่ใช้อยู่เซลล์ โดยนำมาเมล็ดถั่วเขียวหนัก 300 และ 450 มิลลิกรัม มาฉายรังสีแกมมาจากต้นกำเนิดรังสีซีเซียม-137 ให้ได้ปริมาณรังสีดูดกลืน 0, 0.5 และ 1 กิโลเกรย์ สกัดเซลล์ออกจากเมล็ดถั่วเขียวด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ที่แช่เย็น ผสมเซลล์ที่ได้กับสารละลาย 0.8% low melting agarose แล้วนำไปฝัง (embedded) บนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วยสารละลาย 0.5% agarose ย่อยผนังเซลล์และนิวเคลียสด้วยสารละลาย 2.5% sodium dodecyl sulphate ใน tris-borate EDTA (TBE) เป็นเวลา 25 และ 30 นาที ทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 2 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้สารละลาย TBE เป็นอิเล็กโทรไลต์ แล้วย้อมสีสไลด์ด้วยเทคนิค silver staining ผลจากการตรวจสอบสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด transmission พบว่า ในสถานะที่ใช้ตัวอย่างถั่วเขียวหนัก 450 มิลลิกรัม เวลาอยู่นาน 30 นาที สำหรับเมล็ดถั่วเขียวฉายรังสี จะมองเห็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปยังขั้วแอนโอดมี

ลักษณะคล้ายดาวหาง และความยาวของส่วนหางจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณรังสี สำหรับตัวอย่างเมล็ดถั่วเขียวที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี (control) พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะค่อนข้างกลมหรือมีเพียงหางสั้นๆ สรุปว่า สภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบเมล็ดถั่วเขียวฉายรังสี ด้วยเทคนิค DNA comet assay

ทัศนีย์และคณะ (2550) ได้ศึกษาผลกระทบของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ต่อสัตว์น้ำ โดยทดสอบความเป็นพิษของคลอร์ไพริฟอสต่อเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ ด้วยวิธีซึ่งเกิด เซลล์เจลอิลิคโตรพอร์ริซิส หรือ วิธีโคเมท ผู้วิจัยได้นำเซลล์เม็ดเลือดจำนวน 10^4 เซลล์มาทดสอบ กับสารละลายคลอร์ไพริฟอสที่ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05 และ 0.25 $\mu\text{g/l}$ (N=3) ภายหลังการ ทดสอบเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเทลโมเมนต์อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.25 $\mu\text{g/l}$ ของสารละลายคลอร์ไพริฟอสเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยัง พบว่าความรุนแรงของการทำลายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลาย ผลจากการทดลอง สรุปได้ว่าคลอร์ไพริฟอสเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ

มนธิรา ศรีจักโคตร (2550) ได้ใช้วิธีไมโครนิวเคลียสและโคเมทในการทดสอบความเป็น พิษของสารสีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงห้วรงเงิน รางทอง และรางนาก พบว่า เมื่อทำการสกัดสารสี ด้วยอะซิโตนและระเหยให้อยู่ในรูปผง นำสารสีมาทดสอบความเป็นพิษด้วยการทดสอบไมโครนิว เคลียสจาก reticulocyte ในกระแสเลือดของหนูเม้าส์และการทดสอบโคเมทจากลิมโฟไซต์ของคน ภายหลังการป้อนสารสี 1 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนูให้หนูเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงแล้ว พบว่าจำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสแตกต่างจาก negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ ใน การทรีดเลือดของคนด้วยสารสีความเข้มข้น 0.3, 0.7 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อศึกษาเส้นผ่าศูนย์กลาง ความยาวหาง และ โมเมนต์หางของเซลล์โคเมทนั้นพบว่า มีเพียง ลิมโฟไซต์ที่ทรีดด้วยสารสีจากรางนากความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดเท่านั้นที่ DNA มีความเสียหายและมีค่าโมเมนต์หางแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมี นัยสำคัญ ส่วนทรีดเมนต์อื่นของสารสีไม่เป็นพิษต่อลิมโฟไซต์

Gichner *et al.* (2005) ได้ศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) และการถูกทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) ของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) และมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) โดยนำพืชทั้งสอง ชนิดปลูกบนหลุมฝังกลบที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก (Stirmice site) เปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกบน หลุมฝังกลบที่ไม่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก (Jeseri site) ซึ่งหลุมฝังกลบทั้งสองตั้งอยู่ที่ North

Bohemia Czech เมื่อทำการวิเคราะห์หองค์ประกอบของโลหะ ด้วยวิธี flame atomic absorption spectrometry พบโลหะหนักชนิด Cd, Cu, Pb และ Zn ปนเปื้อนอยู่ในดินและรากพืช ผลการทดลองพบว่าพืชที่ปลูกในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก มีจำนวนใบและอัตราการเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการทดสอบการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชทั้งสองชนิดด้วยวิธีโคเมท พบว่า พืชที่ปลูกบนบริเวณที่มีการปนเปื้อนมีการเพิ่มขึ้นของการถูกทำลายดีเอ็นเอเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญใน เมื่อเปรียบเทียบกับ control แต่การถูกทำลายดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากการบาดเจ็บ (injured) ที่สังเกตได้จากความผิดปกติของใบพืช และไม่มีการเพิ่มขึ้นของ somatic mutation จึงสรุปได้ว่า ดินที่มีการปนเปื้อนของโลหะก่อให้เกิดความเป็นพิษ toxicity แต่ไม่มีผลต่อความเป็นพิษในระดับยีนของพืช

Sriussadaporn *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาคัดเลือกพืชที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวชี้วัดมลพิษทางอากาศ โดยใช้วิธีโคเมทติดตามการถูกทำลายดีเอ็นเอ ในการทดลองผู้วิจัยได้ใช้พืชสามชนิด คือ ต้นแป๊ะก๊วย (*Ginkgo biloba*) ต้นพลูด่าง (*Epipremnum aureum*) และต้นแพงพวยฝรั่ง (*Vinca rosea*) วางไว้ที่ข้างถนน (roadside) และบริเวณที่ไม่ใช่ข้างถนน (non-roadside) ภายในมหาวิทยาลัยโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น แล้วเก็บตัวอย่างพืชมาทดสอบด้วยวิธีโคเมท ค่าความแตกต่างการกระจายของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ (DNA migration ratio) ของพืชแต่ละชนิด ถูกนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างพืชที่วางไว้บริเวณข้างถนนถูกทำลายดีเอ็นเอมากกว่าพืชที่ตั้งบริเวณอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการทดลองในแต่ละช่วงเวลา ถูกนำมาอธิบายการเพิ่มขึ้นของการถูกทำลายดีเอ็นเอด้วยสมการ regression สัดส่วนการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชที่วางและไม่ได้วางข้างถนนถูกนำมาใช้อธิบาย ผลกระทบต่อยีนซึ่งมีสาเหตุจากมลพิษทางอากาศ

Gichner and Muhlfeldove (2002) ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วิธีโคเมทในพืช (pH > 13) ในการตรวจสอบการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืช 10 ชนิด คือ *Arabidopsis thaliana*, *Convolvulus arvensis*, *Bellis perennis*, *Urtica dioica*, *Lamium album*, *Chenopodium rubrum*, *plantago media*, *Poa annua*, *Taraxacum officinale*, *Agropyron repens* โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการทำลายดีเอ็นเอ Ethylmethanesulphonate (EMS) 2 และ 10 mM และแปรผันเวลาที่ใช้ในการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า 0, 20, และ 45 นาที แล้วทำการตรวจวัดโดยใช้โปรแกรม Komet version 3.1 พบว่า ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสกับสารพิษที่มีความเข้มข้นมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

13. ลักษณะบางประการของพืชที่ใช้ในการทดสอบ

13.1 หญ้าโคสโครอส (*Sporobolus virginicus*)

ชื่อสามัญ (ภาษาอังกฤษ): Coastcross grass

แหล่งกำเนิด: ประเทศสหรัฐอเมริกา (รัฐฟลอริดา เท็กซัส อลาบามา และจอร์เจีย)

หญ้าโคสโครอสเป็นหญ้าที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ใหม่โดยเป็นลูกผสมระหว่างหญ้าเบอร์มิวดาพันธุ์ Coastal กับหญ้าเบอร์มิวดาจากประเทศเคนยา ขยายพันธุ์ได้โดยใช้ลำต้นใต้ดินหรือไหล พบว่าสามารถตั้งตัวเร็ว และสร้างไหลได้มากกว่าหญ้าเบอร์มิวดาพันธุ์ Coastal และมีเหง้าขนาดเล็กจำนวนมากเล็กน้อย (เฉลิมพล, 2530)

หญ้าชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ตลอดปีและมีความทนทานต่อความแห้งแล้ง ใบมีลักษณะแหลมยาว 15-40 เซนติเมตร ลำต้นกว้าง 15 มิลลิเมตร ลำต้นตั้งชัน มีการเจริญเติบโตเป็นกอ โดยแต่ละกอมีความหนาแน่นสูง

หญ้าโคสโครอสสามารถอาศัยได้ในดินเกือบทุกชนิดตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินร่วน ทนความเค็มและสามารถปลูกใกล้ชายฝั่งทะเลได้ อีกทั้งยังมีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมขัง โดยสามารถดำรงชีพได้ในสภาวะที่น้ำขังสูงกว่าระดับดิน 5 เซนติเมตร (เฉลิมพล, 2530) นอกจากนี้ยังพบว่าหญ้าชนิดนี้สามารถนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสม และเจริญเติบโตได้ดีในสภาพน้ำเสีย

13.2 พุด่าง (*Epipremnum aureum*)

ชื่อสามัญ (ภาษาอังกฤษ): Golden Pothos, Devil's Ivy, Hunter's Robe

แหล่งกำเนิด: โพลินีเซีย เกาะโซโลมอน

ไม้เลื้อยเนื้ออ่อน ลำต้นอวบน้ำ สีเขียวอ่อน มีรากพิเศษออกตามข้อใช้เลื้อยเกาะใบ เดี่ยว ออกสลับ รูปไข่แกมหัวใจ ปลายใบเรียวแหลม โคนใบเว้า แผ่นใบหนาอวบน้ำ มีสีด่างเขียว-เหลือง สีเขียวอมเหลือง เรียก ราชนิสีทอง และสีด่างเขียว-ครีม เรียก ราชนิหินอ่อน (อรชร, 2544)

พุ่มด่างเป็นไม้กลางแจ้งที่ชอบแสงแดด ต้องการน้ำปานกลาง สามารถปลูกได้ทั้งในกระถางดินและในน้ำโดยตรง ขยายพันธุ์โดยการตัดต้นหรือยอดมาปักชำ

Wolverton (1996) นักวิจัยแห่งสถาบันวิจัยอวกาศนาซ่า ได้ทดสอบความสามารถของไม้ประดับในการกำจัดสารพิษหรือมลภาวะในอากาศบางชนิด เช่น ฟอร์มัลดีไฮด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ เบนซีน ไตรคลอโรเอทิลีน เป็นต้น ผลการทดลองพบว่า พุ่มด่าง สามารถลดก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ได้ร้อยละ 75 เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

13.3 แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*)

ชื่อสามัญ (ภาษาอังกฤษ): Periwinkle, Vinca

แหล่งกำเนิด: ประเทศสหรัฐอเมริกา (เขตร้อน มาดากัสการ์), อินเดีย

เป็นพืชอายุหลายปี สูง 30-60 เซนติเมตร ใบรูปไข่แกมขอบขนาน ปลายมน ใบสีเขียวเป็นมัน ออกดอกตามซอกใบ ดอกรูปหลอดปลายแยก 5 กลีบ ขนาดดอก 3-5 เซนติเมตร กลีบดอกสีขาว ชมพูอ่อน-เข้ม ม่วง และแดง

ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด แพงพวยชอบแสงแดดจ้า ดินร่วนปนทราย ระบายน้ำได้ดี ทนแล้งดีกว่าทนแฉะและพบว่ามีงานวิจัยที่นำต้นแพงพวยฝรั่งไปใช้เป็นดัชนีชี้วัดผลกระทบจากมลพิษทางสิ่งแวดล้อม เช่น มลพิษทางอากาศที่เกิดจากการจราจร หรือ ดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก เป็นต้น (Kang *et al.*, 1999; Sriussadaporn *et al.*, 2003)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พุด่าง (*Epipremnum aureum*), ต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*), และหญ้าโคสโครอส (*Spoloborus virginicus*)
2. ตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ ทำด้วยพลาสติก ชนิดอะคริลิกขนาดกว้าง 50 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร และสูง 80 เซนติเมตร ด้านบนติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สำหรับปลูกพืช ยี่ห้อ Toshiba ขนาด 30 วัตต์จำนวน 6 หลอดให้ความเข้มแสง 35,000-50,000 ลักซ์ดังแสดงในภาพที่ 10
3. ก๊าซผสมมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วนร้อยละ 60:40 ใช้ปล่อยเข้าไปในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ
4. ก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) รุ่น GC 6890 Agilent Technologies Model: G 1530A
5. น้ำชะมูลฝอยที่ใช้ในการทดสอบแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ น้ำชะมูลฝอยเก่า (จากหลุมฝังกลบมูลฝอย อ.ไทรน้อย) และน้ำชะมูลฝอยสด (จากโรงงานขยะมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)
6. อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดสอบด้วยวิธีโคเมท
 - 6.1 ชุดอิเล็กโตรโฟริซิส ซึ่งประกอบด้วย power supply และ electrophoresis chamber
 - 6.2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์ ยี่ห้อ OLYMPUS
 - 6.3 Comet™ Slide ชนิด 2 หลุม ยี่ห้อ Travigen, cover slip

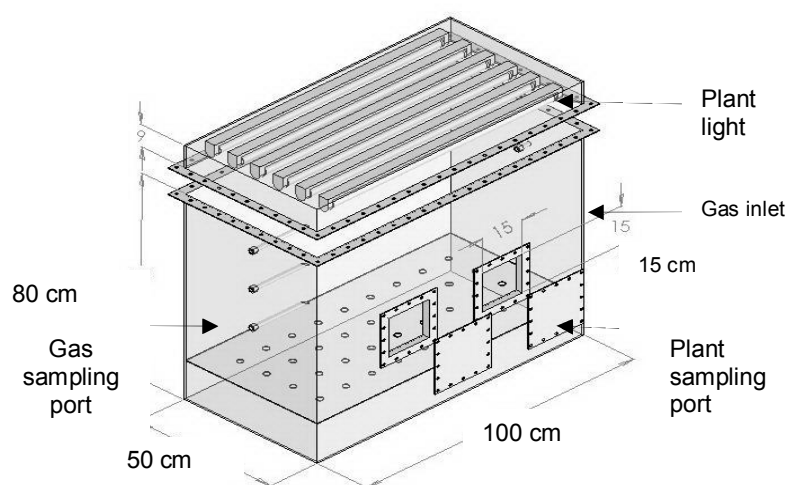
- 6.4 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ยี่ห้อ Yamato และ โถสุญญากาศ (Desicator)
- 6.5 อ่างค้ำน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert และ hot plate
- 6.6 ปากกิบ ใบมีด ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานเลี้ยงเชื้อ และ coplin jar
7. อุปกรณ์และเครื่องมือทั่วไป
 - 7.1 เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด ยี่ห้อ Precisa รุ่น 240 A
 - 7.2 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Metrohm
 - 7.3 ตู้อบ 105 °C ยี่ห้อ Memmert
 - 7.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000U
 - 7.5 ชุดวิเคราะห์เจดดาห์ไนโตรเจน (Kjedahl Nitrogen)
 - 7.6 ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ 4° และ -20° C
 - 7.7 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ ปิเปต กรวยแก้ว แท่งแก้วคน บีกเกอร์ ฯลฯ
8. สารเคมีสำหรับการทดสอบโคเมท
 - 8.1 Low melting point Agarose (LMA)
 - 8.2 Dimethylsulfoxide (DMSO)
 - 8.3 Ethelenediamine tetraacetic acid (EDTA) disodium salt

8.4 Syber safe green

8.5 Phosphate Buffer Saline (PBS)

8.6 Tris (Tris [hydroxymethyl]aminomethane)

8.7 Triton X-100



ภาพที่ 10 แบบจำลองตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ

วิธีการ

1) การเตรียมพืชที่ใช้ในการทดสอบ

นำต้นอ่อนของพืชที่ต้องการทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ พลูด่าง ต้นแพงพวยฝรั่ง และหญ้า โศสโครสที่มีอายุ 15 วันมาอนุบาล ในบริเวณที่สะอาดแล้วรดน้ำทุกวันเป็นเวลา 15 วัน เมื่อพืชเจริญเติบโตและแข็งแรงดีแล้วคัดเลือกพืชที่มีความสูงเฉลี่ยประมาณ 20 เซนติเมตร นำไปใช้ในการทดลองแต่ละชุด ชุดละ 20 ต้น และแยกพืชแต่ละชนิดไว้สำหรับเป็นชุดควบคุม ชนิดละ 20 ต้น เพื่อให้อายุของพืชใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาการทดลอง

2) การเตรียมน้ำชะมูลฝอยที่ใช้ในการทดลอง

นำน้ำชะมูลฝอยที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 2 ชนิดทั้ง น้ำชะมูลฝอยสด และน้ำชะมูลฝอยเก่ามาตรวจวัดลักษณะสมบัติและความเข้มข้น ซึ่งประกอบด้วย ค่าซีโอดี บีโอดี ทีเคเอ็น แอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนไตรต์ ไนเตรต และฟิเอช ด้วยวิธีการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 6 แล้วทำการเจือจางน้ำชะมูลฝอยด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วนร้อยละ 1, 10 และ 100 ตามลำดับ เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 รายละเอียดพารามิเตอร์และวิธีการในการวิเคราะห์น้ำชะมูลฝอย

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
COD (mg/l)	Dichomate Close Reflux
BOD (mg/l)	Azide Modification
TKN (mg/l)	Macro Kjeldahl Method
Ammonia nitrogen(mg/l)	Distillation Titration
Nitrite (mg/l)	Colorimetric Method
Nitrate (mg/l)	Colorimetric Method
pH	pH Meter

ที่มา: APHA (1998)

3) การทดสอบผลของน้ำชะมูลฝอยต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช

หลังจากทำการเจือจางน้ำชะมูลฝอยด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่งน้ำชะมูลฝอยทั้งสองลักษณะ มีความเข้มข้นของซีโอดีประมาณ 0, 100, 1,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วจึงปลูกพุ่มข้าวโดยให้รากสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยที่เตรียมไว้โดยตรงเป็นเวลา 288 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างใบพืชเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีโคเมทาทุก 72 ชั่วโมงตลอดระยะเวลาการทดลอง (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 การทดสอบผลของน้ำชะมูลฝอยต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช

4) การทดสอบผลของก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอยต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช

นำหลอดจำนวน 20 ต้นที่เตรียมไว้ย้ายมาปลูกในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (ภาพที่ 12) แล้วพ่นก๊าซผสมระหว่างก๊าซมีเทนกับคาร์บอนไดออกไซด์ ในอัตราส่วน 60:40 เข้าในช่องปล่อยก๊าซ แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของก๊าซในบรรยากาศภายในตู้โดยมีค่าร้อยละ 0, 1, 5 และ 10 วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของก๊าซมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีชื่อ Agilent 6890 โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ก๊าซ ดังนี้ ช่องนำตัวอย่างชนิด EPC Purged Packed Inlet ตั้งอุณหภูมิที่ 105 °ซ คอลัมน์ยี่ห้อ Altech CTRT (Part No. 8700) อุณหภูมิคอลัมน์ 35 °ซ อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อนาที

แล้วใช้ดีเทคเตอร์ (Detector) ชนิด ทีซีดี (TCD: Thermal Conductivity Detector) ซึ่งตั้งอุณหภูมิดีเทคเตอร์เท่ากับ 150 °ซ จากนั้นเก็บตัวอย่างใบพืชเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีโคเมททุก 72 ชั่วโมงตลอดระยะเวลาการทดลองทั้งหมด 288 ชั่วโมง

5) การทดสอบหาพืชที่เหมาะสมในการเป็นดัชนีชี้วัดผลของก๊าซชีวภาพ

นำพืชทั้ง 3 ชนิดที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ พญาค้าง ดันแพงพวยฝรั่ง และหญ้าโคสโครอส อายุ 30 วันขนาดเฉลี่ยประมาณ 20 เซนติเมตร ชนิดละ 20 ต้น ย้ายมาปลูกในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ พร้อมกัน แล้วทดสอบโดยควบคุมให้บรรยากาศภายในตู้ประกอบด้วยก๊าซชีวภาพความเข้มข้นร้อยละ 1 วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของก๊าซชีวภาพด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เป็นเวลา 288 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างใบพืชแต่ละชนิดมาทำการทดสอบด้วยวิธีโคเมททุก 72 ชั่วโมงตลอดระยะเวลาการทดลอง



ภาพที่ 12 การทดสอบผลของก๊าซชีวภาพต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช

6) การเก็บตัวอย่างและการทดสอบด้วยวิธีโคเมท

ทำการเก็บตัวอย่าง โดยเลือกใบที่มีลักษณะปกติ ไม่หงิกงอ มีสีเขียวสด ขนาดของใบควร จะใกล้เคียงกัน ล้างใบไม้ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้งเบาๆ ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2 เซนติเมตรแล้วชั่งมา 0.6 กรัม เติมสารละลาย Sorensen buffer (50 mM KH_2PO_4 ,

50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM Ethylenediamine tetraacetic acid: EDTA, 0.5% Dimethyl sulfoxide: DMSO, pH 6.8) 2 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่วางไว้บนถาดน้ำแข็ง แล้วตัดใบพืชให้เป็นแผ่นบางด้วยใบมีด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อสกัดเซลล์ออกจากใบพืช

กรองสารละลายด้วยฟิลเตอร์ที่มีขนาดช่องพรุน 20 ไมโครเมตร จากนั้นผสมสารละลายดังกล่าว 150 ไมโครลิตรกับ 300 ไมโครลิตรของ Low Melting Point Agarose (ละลาย LMA 0.15 กรัมใน Phosphate Buffer Solution 10 มิลลิลิตร) เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1% LMA ใช้ข้อโตะเปิดผสมเนื้อสารให้เข้ากันโดยการดูดแล้วปล่อยหลายครั้ง เมื่อผสมกันดีแล้วหยดสารละลายตัวอย่าง 75 ไมโครลิตรลงบน CometSlides™ ที่วางบนแผ่นความร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำสไลด์แช่ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส อีก 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นนำสไลด์จุ่มลงใน Lysis Solution 45 มิลลิลิตร (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris Base), 5 มิลลิลิตร DMSO และ 0.5 มิลลิลิตร Triton X-100 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ไม่น้อยกว่า 12 ชั่วโมงเพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียว

จากนั้นนำสไลด์มาวางบน horizontal gel electrophoresis tank ที่วางอยู่บนถาดน้ำแข็ง ภายในบรรจุด้วย alkaline solution (NaOH 4.2 กรัม, 200 mM EDTA 1.75 มิลลิลิตร, pH>13) ผ่านกระแสไฟฟ้า AC: 300 mA, 15 Volt เป็นเวลา 25 นาที แล้วล้างสไลด์โดยแช่สไลด์ใน Neutralization buffer (Tris-hydroxymethyl-aminomethane 48.5 กรัม, pH 7.5) 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำไปแช่ใน Ethyl alcohol 5 นาที สุดท้ายแช่ในน้ำกลั่นอีก 10 นาที แล้วซับน้ำด้านนอกออกเบาๆ ด้วยทิชชู ทำให้แห้งโดยวางสไลด์บนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

หลังจากสไลด์แห้งทำการย้อมสีโดยหยดสีย้อม SYBERsafe™ Green ยี่ห้อ Invitrogen 1 หยดปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และถ่ายภาพด้วยกล้องซีซีดี (CCD Camera) รับสัญญาณภาพและโปรแกรมแปลงสัญญาณแสดงทางจอคอมพิวเตอร์ ขั้นตอนทั้งหมดดังกล่าวแสดงในภาพที่ 13

7) การวัดอัตราการเจริญเติบโตของพืช

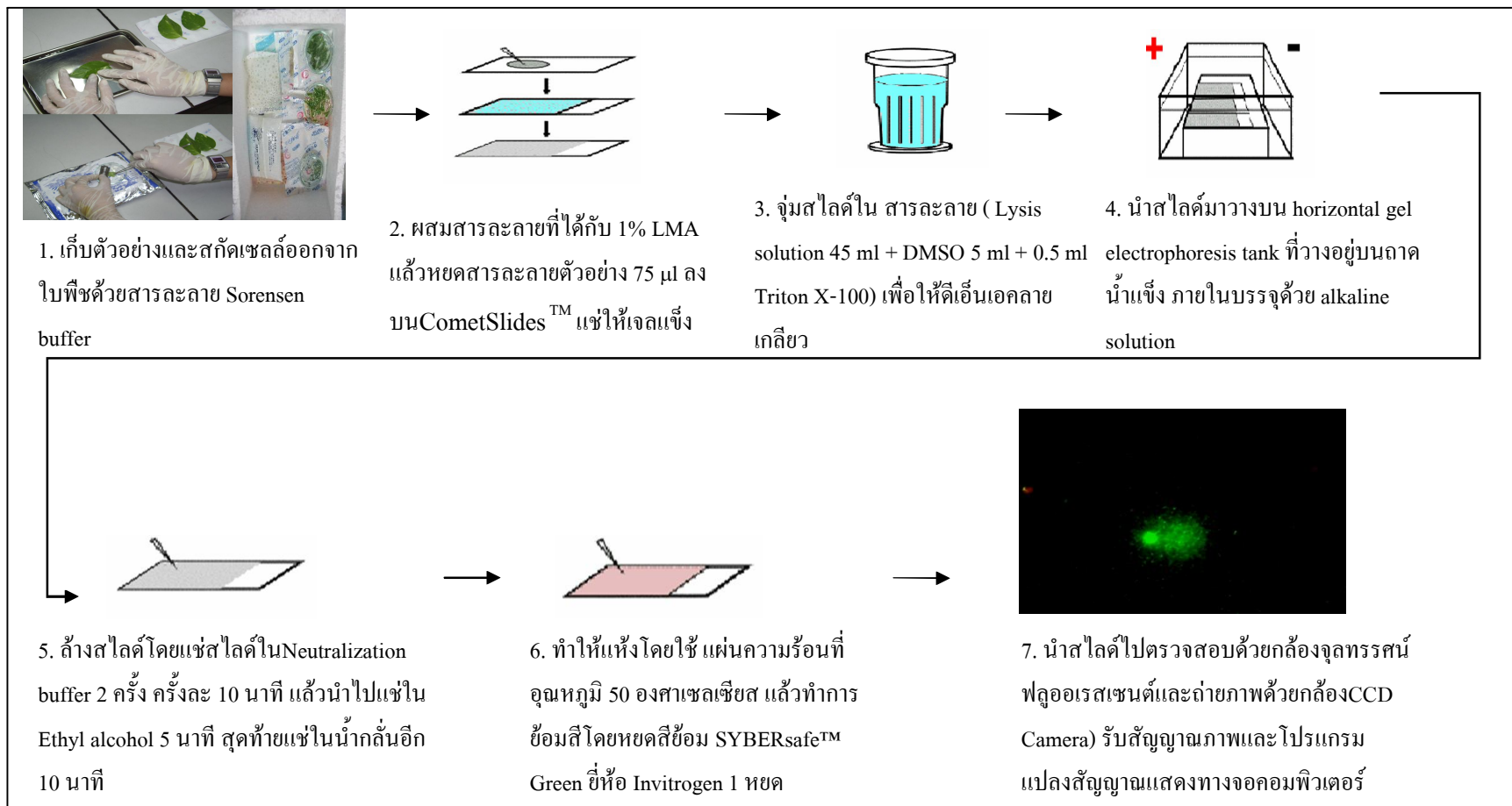
นำพืชที่ใช้ทดสอบการถูกทำลายดีเอ็นเอในแต่ละชุดการทดลองทั้ง 20 ต้น ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากจำนวนพืชที่ใช้ในการทดสอบแต่ละชุดการทดลองทั้งหมด 20 ต้น เมื่อคำนวณแล้วได้จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวัดอัตราการเจริญเติบโตของพืชทั้งหมดเป็นจำนวน 19 ต้น

8) การวิเคราะห์ผลการทดสอบ

ใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ Excitation filter ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และ Barrier filter ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร กำลังขยาย 10 เท่า เพื่อตรวจหาบริเวณที่เซลล์มีการกระจายตัวพоди และใช้กล้องซีซีดี (charge-coupled device, CCD) รับสัญญาณภาพถ่ายทอดไปยังจอคอมพิวเตอร์ (Monteith and Vanstone, 1995) แต่ละการทดลองทำการศึกษาโดยใช้เซลล์จำนวน 50 เซลล์ต่อตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม Tritex Comet [Score] Freeware Version 1.5 วัดค่าพื้นที่ส่วนหัว (head area: H) และพื้นที่ส่วนหาง (tail area: H) จากภาพเซลล์โคเมท ตามวิธีของ Sriussadaporn *et al.* (2003) และนำค่าที่ได้ไปคำนวณร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอจากสมการที่ 10 และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม spss version 15 for window

$$\text{ร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอ} = \frac{\sum_{i=1}^n (T / (T + H))}{n} \times 100 \quad (10)$$

โดย T คือพื้นที่ส่วนหางของเซลล์ H คือพื้นที่ส่วนหัวของเซลล์ และ n คือจำนวนเซลล์ทั้งหมด



ภาพที่ 13 ขั้นตอนการเก็บและเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบด้วยวิธีโคเมท

ผลและวิจารณ์

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการใช้วิธีโคเมท (comet assay) ในการติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอยต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งใช้ระดับการทำลายดีเอ็นเอของพืชเป็นตัวชี้วัด โดยในการทดลองชุดที่ 1 ทำการปลูกพลูด่าง (*Epipremnum aureum*) ในน้ำชะมูลฝอยสองลักษณะ คือ น้ำชะมูลฝอยสดและน้ำชะมูลฝอยเก่า ซึ่งทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของชีโอดีประมาณ 100, 1,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การทดลองชุดที่ 2 ทำการปลูกพลูด่างให้เจริญเติบโตภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซชีวภาพผสมอยู่ในระดับความเข้มข้นของมีเทนร้อยละ 0, 1, 5 และ 10 แล้วทดสอบพืชอีก 2 ชนิด คือ ต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) และหญ้าโคสโครอส (*Spoloborus virginicus*) ในสถานะที่มีมีเทนร้อยละ 1 เพื่อหาพืชที่เหมาะสมกับการเป็นดัชนีชี้วัด จากนั้นตรวจวัดระดับการทำลายดีเอ็นเอด้วยวิธีโคเมทตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยมีผลการศึกษาดังนี้

1. ลักษณะน้ำชะมูลฝอยที่ใช้ในการทดสอบ

ในการทดลองนี้มีการเปรียบเทียบลักษณะน้ำชะมูลฝอย 2 ชนิด คือ น้ำชะมูลฝอยเก่า และน้ำชะมูลฝอยสด โดยทำการตรวจวัดลักษณะสมบัติและความเข้มข้น ซึ่งประกอบด้วย ค่าชีโอดี บีโอดี ทีเคเอ็น แอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนไตรต์ ไนเตรต และฟิเอช ตามลำดับ พบว่า

น้ำชะมูลฝอยเก่าและสด มีค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ COD เท่ากับ $12,400 \pm 736.51$ และ $140,000 \pm 1,237.72$ มิลลิกรัมต่อลิตร และมีลักษณะสมบัติที่สำคัญอื่นๆ ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนี้ น้ำชะมูลฝอยสด จะมีปริมาณสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ง่ายในรูปของ BOD $73,500 \pm 430.84$ ซึ่งสูงกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่าที่มีค่าบีโอดี $2,700 \pm 41.63$ มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณไนโตรเจนของน้ำชะมูลฝอยสดในรูป TKN มีค่า 761.6 ± 51.61 , $\text{NH}_3\text{-N}$ มีค่า 212.8 ± 18.93 , $\text{NO}_3\text{-N}$ มีค่า 25.89 ± 1.23 และ $\text{NO}_2\text{-N}$ 9.57 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่ามากกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่า ซึ่งมี TKN 259.44 ± 23.86 , $\text{NH}_3\text{-N}$ 31.36 ± 1.45 , $\text{NO}_3\text{-N}$ 21.26 ± 0.97 และ $\text{NO}_2\text{-N}$ 3.14 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าฟิเอชและค่าการนำไฟฟ้า พบว่า น้ำชะมูลฝอยสดมีค่า pH เท่ากับ 3.86 ± 0.46 และมีค่า EC เท่ากับ 16.76 ± 0.04 ซึ่งต่ำกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่า ที่มีค่า pH เท่ากับ 9.28 ± 0.16 และมีค่า EC เท่ากับ 18.32 ± 2.11 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ลักษณะสมบัติและความเข้มข้นของน้ำชะมูลฝอยสดและเก่าที่ใช้ทำการทดสอบ

พารามิเตอร์	น้ำชะมูลฝอยเก่า	น้ำชะมูลฝอยสด
COD (mg/l)	12,400±736.51	140,000±1,237.72
BOD (mg/l)	2,700±41.63	73,500±430.84
TKN (mg/l)	259.44±23.86	761.65±51.61
NH ₃ -N (mg/l)	31.36±1.45	212.84±18.93
NO ₂ -N (mg/l)	3.14±0.11	9.57±0.13
NO ₃ -N (mg/l)	21.26±0.97	25.89±1.23
pH	9.28±0.16	3.86±0.46
EC (dS/m)	18.32±2.11	16.76±0.04

หมายเหตุ: Average±SD

จากการศึกษาของอุบลวรรณ (2546) พบว่า น้ำชะมูลฝอยที่ความเข้มข้นซีโอดีสูง ในช่วง 3,540–17,700 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญเติบโตของเหู้าทั้งสามชนิด คือ *P. purpureum*, *C. plectostachyus* และ *C. dactylon* แต่พบว่าเหู้าที่ใช้ทดลองสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อรดด้วยน้ำชะมูลฝอยที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 1,770 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการทดลอง 16 สัปดาห์ ดังนั้น ในการวิจัยนี้จึงทำการเจือจางน้ำชะมูลฝอยด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อควบคุมให้ค่าความเข้มข้นของซีโอดีในน้ำชะมูลฝอยทั้งสองชนิดมีค่าประมาณ 100, 1,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำชะมูลฝอยในแต่ละระดับต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช

หลังจากทำการเจือจาง พบว่า น้ำชะมูลฝอยเก่ามีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 132±8.51, 1,256±22.42 และ 12,400±36.51 ตามลำดับ น้ำชะมูลฝอยสดมีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 172±11.1, 1,342±24.06 และ 13,250±224.32 ตามลำดับ ส่วนลักษณะสมบัติอื่นๆ ซึ่งประกอบด้วย บีโอดี ทีเคเอ็น แอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนไตรต์ ไนเตรต และค่าการนำไฟฟ้า มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากทำการเจือจางไม่มากนัก สมบัติที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดคือ ค่า pH ของน้ำชะมูลฝอยทั้งสองชนิด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลง อยู่ในช่วงประมาณ 6.28-8.62 ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงของค่าพีเอชที่

เป็นกลางใกล้เคียงกับพีเอชของน้ำในสภาวะปกติจึงไม่จัดเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการรอดชีวิต และเจริญเติบโตของพืช ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ลักษณะสมบัติของน้ำชะมูลฝอยสดและเก่าแต่ละระดับความเข้มข้น

พารามิเตอร์	น้ำชะมูลฝอยเก่า			น้ำชะมูลฝอยสด		
	Dilution #1	Dilution #2	Dilution #3	Dilution #1	Dilution #2	Dilution #3
COD(mg/l)	132±8.51	1,256±22.42	12,400±36.51	172±11.1	1,342±24.06	13,250±224.32
BOD (mg/l)	52.3±8.41	75.5±5.00	2,700±41.63	90.7±8.40	259.2±50.00	630.8±86.54
TKN(mg/l)	89±4.50	115±3.11	259.44±23.86	103±6.53	198±8.75	247±10.54
NH ₃ -N(mg/l)	12±4.11	23.71±0.31	31.36±1.45	70±0.03	141±0.04	180±0.05
NO ₂ -N(mg/l)	0.99±0.13	1.17±0.60	3.14±0.11	1.89±0.09	2.57±0.11	7.84±0.03
NO ₃ -N(mg/l)	5.99±0.13	14.30±2.30	21.26±0.97	7±0.05	17.10±0.04	21.34±0.09
pH	7.92±0.04	8.40±0.03	9.28±0.16	7.71±0.08	8.09±0.02	6.28±0.05
EC (dS/m)	12.15±0.06	15.74±0.02	18.32±2.11	7.76±0.04	10.51±0.05	13.73±0.01

หมายเหตุ: Average±SD

2. ผลของน้ำชะมูลฝอยต่อการเจริญเติบโตและการทำลายดีเอ็นเอของพลูด่าง

หลังจากย้ายพลูด่างมาปลูกลงในน้ำชะมูลฝอยเก่ามีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 132±8.51, 1,256±22.42 และน้ำชะมูลฝอยสดมีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 172±11.1, 1,342±24.06 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตของพลูด่าง (ตารางที่ 9) ซึ่งได้ทำการตรวจวัดก่อนและหลังการทดลอง พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 12 วัน มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการปลูกในน้ำสะอาด ใบพลูด่างไม่มีสีเหลือง หรือเหี่ยวแห้ง ส่วนพลูด่างที่ปลูกในน้ำชะมูลฝอยเก่าและสด ที่มีความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากับ 12,400±36.51 และ 13,250±224.32 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า มีความเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ คือ ใบของพลูด่างบางส่วนมีสีเหลือง และมีลักษณะเหี่ยวแห้ง การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามปกติ

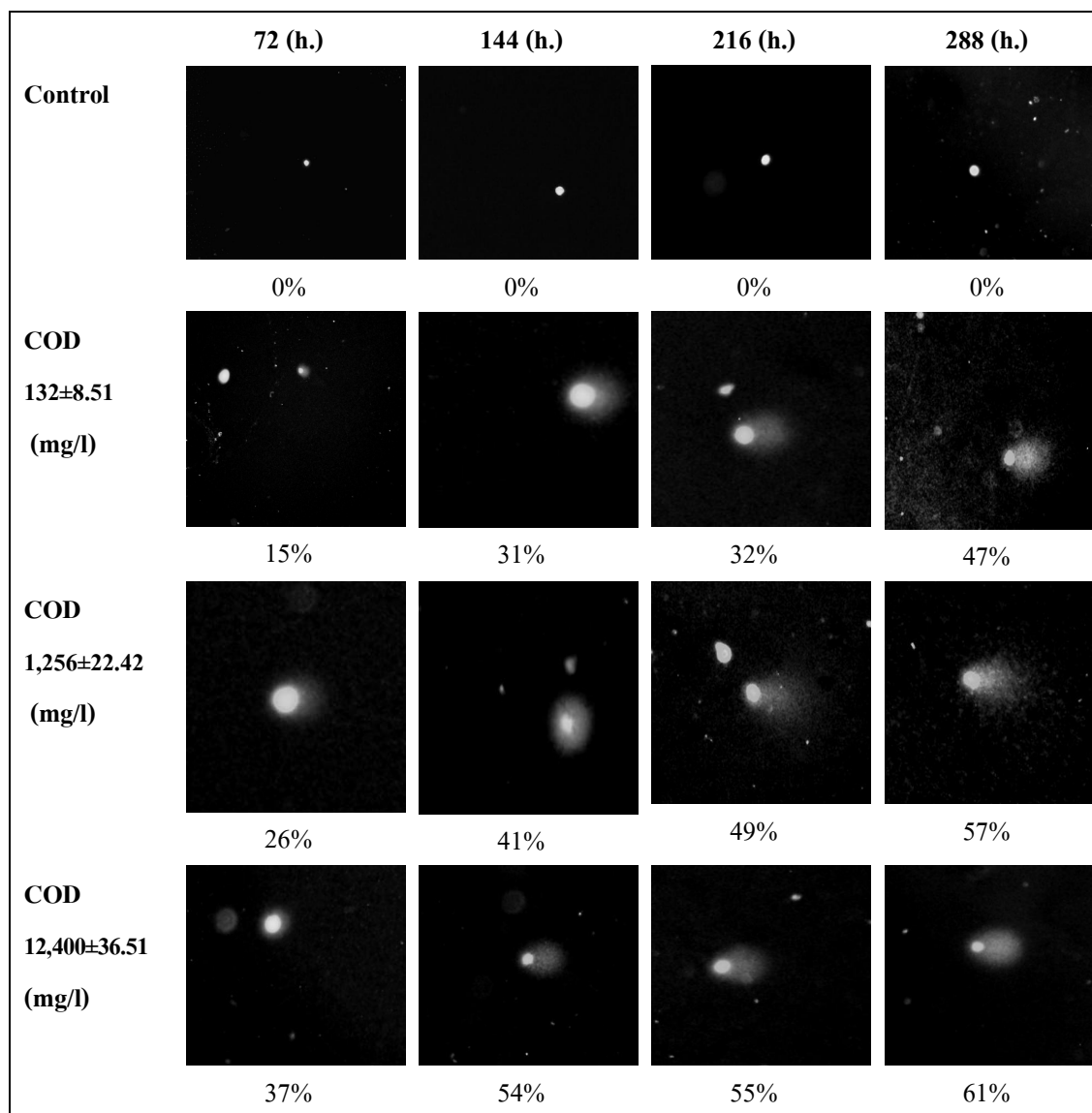
เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีทางสถิติพบว่า การเจริญเติบโตของพืชมุขก่อนและหลังการทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของพืชมุขที่ปลูกในน้ำชะมูลฝอยเก่าและสดในแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เช่นกัน สรุปได้ว่า น้ำชะมูลฝอยทั้งสองชนิดแต่ละระดับความเข้มข้นไม่ให้ผลที่แตกต่างต่อการเจริญเติบโตของพืชมุข

ตารางที่ 9 การเจริญเติบโตของพืชมุขที่ใช้ในการทดสอบด้วยน้ำชะมูลฝอย

	Pre-test (12 day)			Post-test (12 day)		
	Height (cm.)	Dry mass (g.)	Amount of leaves	Height (cm.)	Dry mass (g.)	Amount of leaves
Control	20±0.12	5.4±0.23	6±0.43	30±0.13	10.8±0.10	5±1.97
Fresh leachate(mg/l)						
COD 172±11.1	21.5±0.24	7.8±0.02	5±0.51	35±0.26	15.2±2.57	7±0.05
COD 1,342±24.06	22±0.17	8.6±0.33	7±0.22	42±0.67	14.7±1.13	7±0.31
COD 13,250±224.32 **	20.7±0.06	6.4±0.07	6±0.09	37±1.53	12.3±2.78	8±0.27
Old leachate(mg/l)						
COD 132±8.51	21±0.32	7.5±0.11	5±0.01	38±2.31	14.5±0.05	6±0.53
COD 1,256±22.42	20.3±0.15	6.2±0.35	4±0.15	35±0.56	13.1±0.67	6±0.67
COD 12,400±36.51 **	23±0.34	8.9±0.22	6±0.43	32±1.71	15.6±0.81	5±0.34

หมายเหตุ ** ใบของพืชมุขที่ใช้ในการทดลองบางส่วนมีสีเหลืองและมีลักษณะเหี่ยวแห้ง

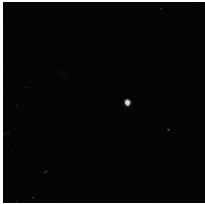
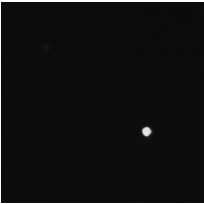
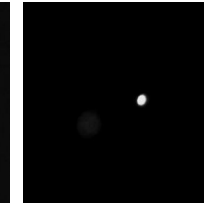
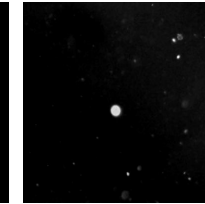
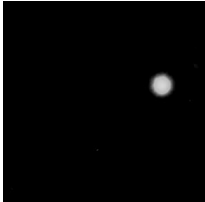
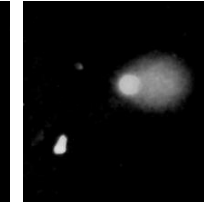
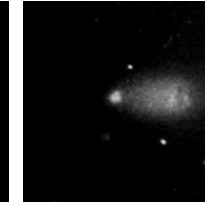
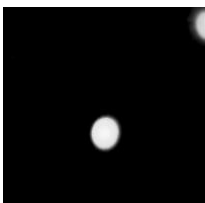
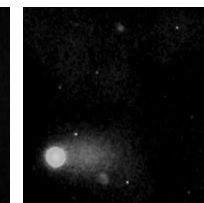
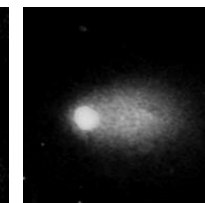
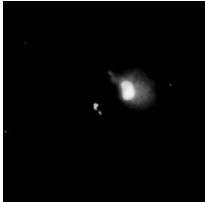
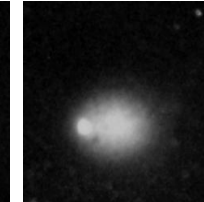
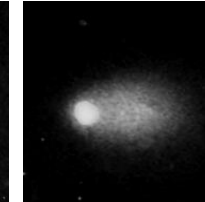
พิจารณาค่าร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชมุขที่ได้รับสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยทั้งสองชนิด พบว่าพืชมุขจะมีแนวโน้มของระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอสูงขึ้นเมื่อมีระยะเวลาในการสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยมากขึ้น และเมื่อความเข้มข้นซีไอดีของน้ำชะมูลฝอยมากขึ้นร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชก็สูงขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นของซีไอดีที่ใกล้เคียงกันพบว่า พืชที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยสดมีระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอสูงกว่าพืชที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยเก่าทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณแอมโมเนียในน้ำชะมูลฝอยสดมีค่ามากกว่า



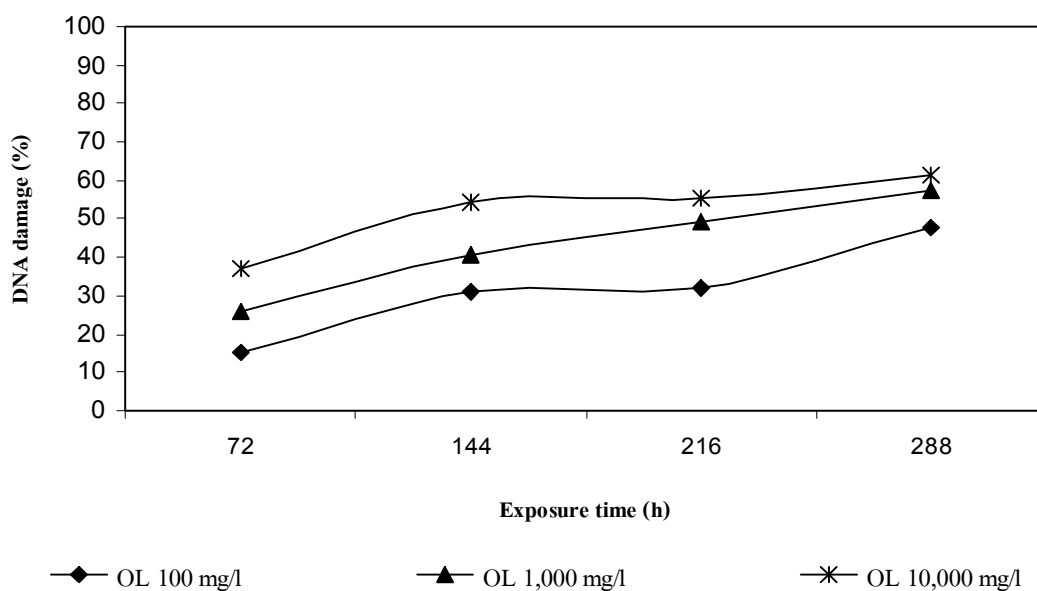
ภาพที่ 14 ตัวอย่างลักษณะดีเอ็นเอของไบพลูต่างที่ถูกทำลายเมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยเก่าที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ

ในการทดสอบผลของน้ำชะมูลฝอยเก่าต่อการทำลายดีเอ็นเอของพลูต่างที่ระยะเวลา 72, 144, 216 และ 288 ชั่วโมง (ภาพที่ 14) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นซีไอดี 132 ± 8.51 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชมีค่าเท่ากับ 15 ± 0.20 , 31 ± 0.27 , 32 ± 0.20 , 47 ± 0.21 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นซีไอดี $1,256 \pm 22.42$ มิลลิกรัมต่อลิตร การถูกทำลายดีเอ็นเอจะมีค่าสูงขึ้น มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 26 ± 0.24 , 41 ± 0.26 , 49 ± 0.20 , 57 ± 0.15 ตามลำดับ และระดับความเข้มข้นซีไอดี $12,400 \pm 36.51$ มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีค่าร้อยละการถูกทำลายสูงที่สุด มีค่าเท่ากับร้อยละ 37 ± 0.29 , 54 ± 0.24 , 55 ± 0.09 , 61 ± 0.16 ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบโดยใช้น้ำชะมูลฝอยสดที่กำหนดให้ระดับความเข้มข้นของ

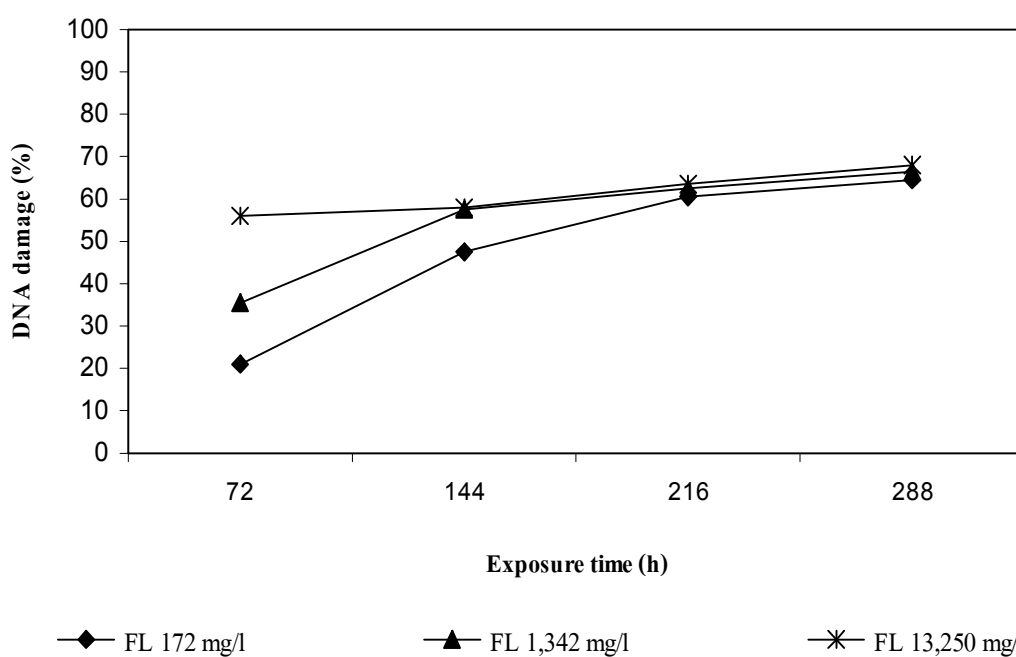
ซีโอดีและระยะเวลาในการทดลองเท่ากัน (ภาพที่ 15) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของซีโอดี 172 ± 11.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชมีค่าเท่ากับ 21 ± 0.24 , 48 ± 0.24 , 60 ± 0.18 , 64 ± 0.13 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของซีโอดี $1,342 \pm 24.06$ มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับร้อยละ 36 ± 0.22 , 58 ± 0.18 , 63 ± 0.12 , 67 ± 0.15 ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นของซีโอดี $13,250 \pm 224.32$ มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับร้อยละ 56 ± 0.27 , 58 ± 0.15 , 64 ± 0.11 , 68 ± 0.12 ตามลำดับ

	72 (h.)	144 (h.)	216 (h.)	288 (h.)
Control				
	0%	0%	0%	0%
COD 172 ± 11.1 (mg/l)				
	21%	48%	60%	64%
COD $1,342 \pm 24.06$ (mg/l)				
	36%	58%	63%	67%
COD $13,250 \pm 224.32$ (mg/l)				
	56%	58%	64%	68%

ภาพที่ 15 ตัวอย่างลักษณะดีเอ็นเอของใบพลูด่างที่ถูกทำลายเมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยสดที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในแต่ละช่วงระยะเวลาของการทดสอบ



ภาพที่ 16 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการถูกทำลายดีเอ็นเอของพื้ต่างเมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยเก่าแต่ละระดับความเข้มข้นของซีโอดี



ภาพที่ 17 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการถูกทำลายดีเอ็นเอของพื้ต่างเมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยสดแต่ละระดับความเข้มข้นของซีโอดี

หมายเหตุ : OL (Old Leachate), FL (Fresh Leachate)

จากการทดสอบด้วยน้ำชะมูลฝอย สรุปได้ว่า พืชต่างมีระดับถูกทำลายดีเอ็นเอสูงขึ้น เมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยที่มีความระดับความเข้มข้นของซีโอดีมากขึ้น พบว่า ที่ระยะเวลาสัมผัส 72 ชั่วโมง จะเห็นความแตกต่างของระดับการทำลายดีเอ็นเอในแต่ละความเข้มข้นของน้ำชะมูลฝอยมากที่สุด และระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชต่างที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยสดจะมีค่ามากกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่า ซึ่งพืชต่างที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยสดที่ระดับความเข้มข้นของซีโอดีประมาณ 13,250 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 288 ชั่วโมง จะมีค่าการถูกทำลายดีเอ็นเอมากที่สุด ซึ่งร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ของพืชต่างในแต่ละระยะเวลาที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยทั้งสองลักษณะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 16 และ 17

3. องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซชีวภาพในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ

หลังจากย้ายพืชต่างไปปลูกในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ เพื่อให้พืชต่างได้สัมผัสก๊าซชีวภาพที่มีการควบคุมระดับความเข้มข้นก๊าซมีเทนของบรรยากาศภายในตู้ ซึ่งจากการศึกษาอัตราการแพร่ระบายของก๊าซมีเทนจากหน้าดินกลับทับมูลฝอยของสุรรัตน์ (2546) พบว่า มีปริมาณความเข้มข้นของก๊าซมีเทนในบรรยากาศพื้นที่หลุมฝังกลบ (กองมูลฝอยเปิด) อยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 0-12.49 ดังนั้น ในการวิจัยนี้จึงได้กำหนดให้มีการแปรผันและควบคุมระดับความเข้มข้นก๊าซมีเทนของบรรยากาศภายในตู้ให้มีค่าประมาณร้อยละ 0, 1, 5 และ 10 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของก๊าซมีเทนต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช และทำการตรวจวัดด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศตลอดระยะเวลาการทดลอง มีค่าเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 10

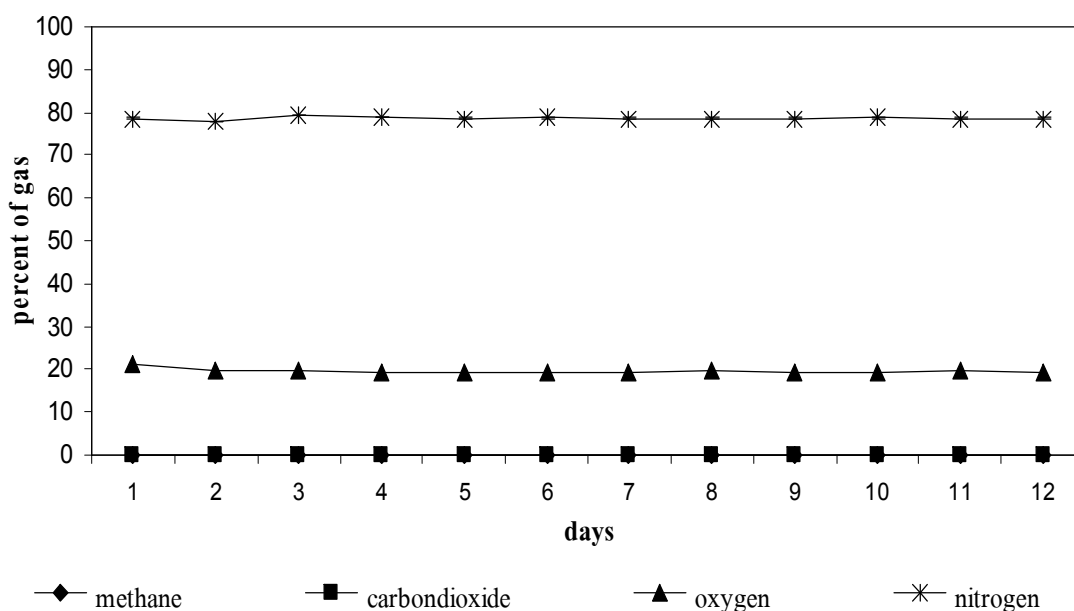
ตารางที่ 10 องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ

parameter	%CH ₄	%CO ₂	%O ₂	%N ₂
control	0.05±0.03	0.08±0.02	19.65±0.49	78.59±0.31
Run 1	1.09±0.11	1.47±0.53	20.70±0.26	77.00±0.89
Run 2	5.06±0.34	8.68±1.60	18.36±0.60	68.52±2.12
Run 3	10.03±0.41	13.85±1.41	16.57±0.50	63.06±1.70

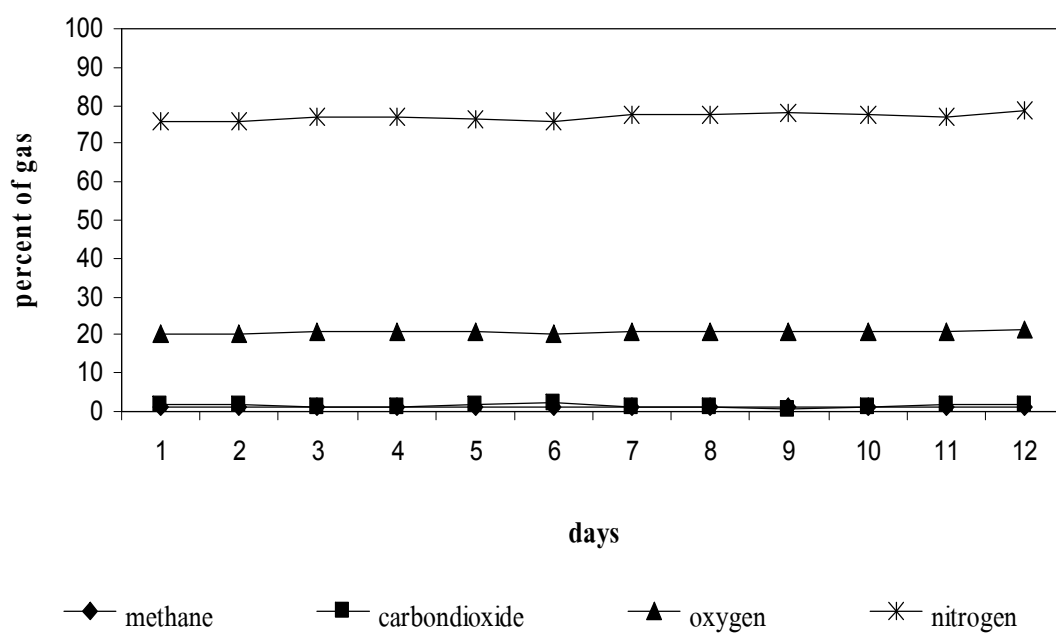
หมายเหตุ: Average±SD

เมื่อพ่นก๊าซชีวภาพซึ่งมีองค์ประกอบของ มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ เข้าไปภายใน ตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ จนกระทั่งมีค่าความเข้มข้นของก๊าซมีเทนเพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณ ก๊าซออกซิเจนภายในตู้จะลดลงตามไปด้วย (ตารางที่ 10)

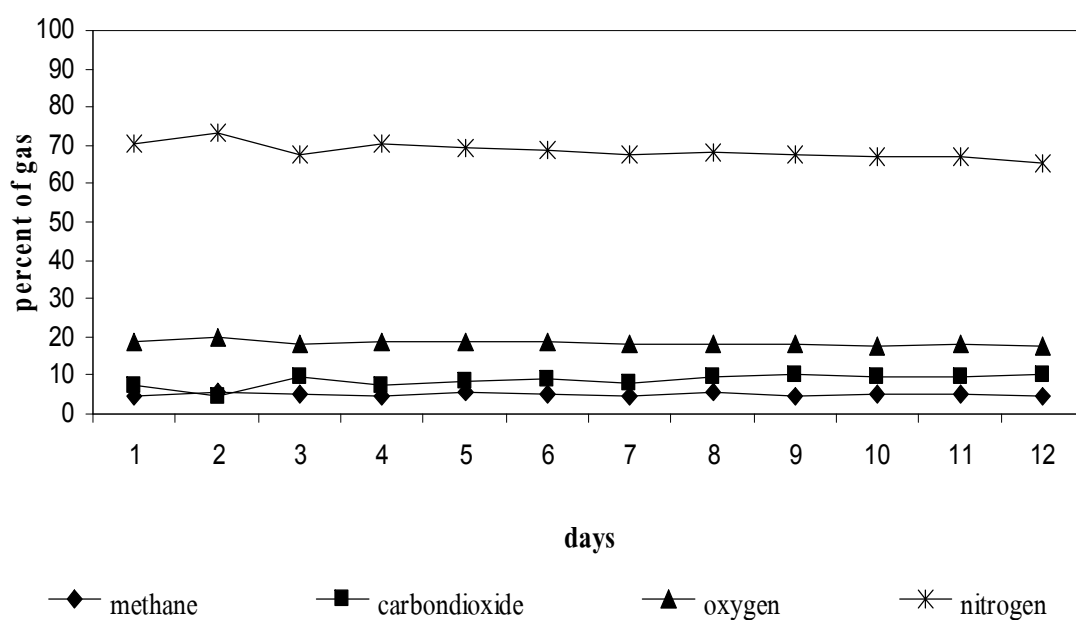
ทำการตรวจวัดที่ระดับความเข้มข้นและองค์ประกอบของก๊าซในชุดควบคุม (control) พบว่า มีความเข้มข้นของก๊าซมีเทน คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน และไนโตรเจน เท่ากับ 0.05 ± 0.03 , 0.08 ± 0.02 , 19.65 ± 0.49 และ 78.59 ± 0.31 ตามลำดับ ระดับความเข้มข้นและองค์ประกอบของก๊าซในการทดลองที่ 1 (Run 1) มีค่าเท่ากับ 1.09 ± 0.11 , 1.47 ± 0.53 , 20.70 ± 0.26 และ 77 ± 0.8 ตามลำดับ ระดับความเข้มข้นและองค์ประกอบของก๊าซในการทดลองที่ 2 (Run 2) มีค่าเท่ากับ 5.06 ± 0.34 , 8.68 ± 1.60 , 18.36 ± 0.60 และ 68.52 ± 2.12 ตามลำดับ และระดับความเข้มข้นและองค์ประกอบของก๊าซในการทดลองที่ 3 (Run 3) มีค่าเท่ากับ 10.03 ± 0.41 , 13.85 ± 1.41 , 16.57 ± 0.50 และ 63.06 ± 1.70 ตามลำดับ (ภาพที่ 18-21) ตลอดระยะเวลาการทดลอง 288 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยของ อุณหภูมิและความชื้นภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ เท่ากับ 31 องศาเซลเซียส และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



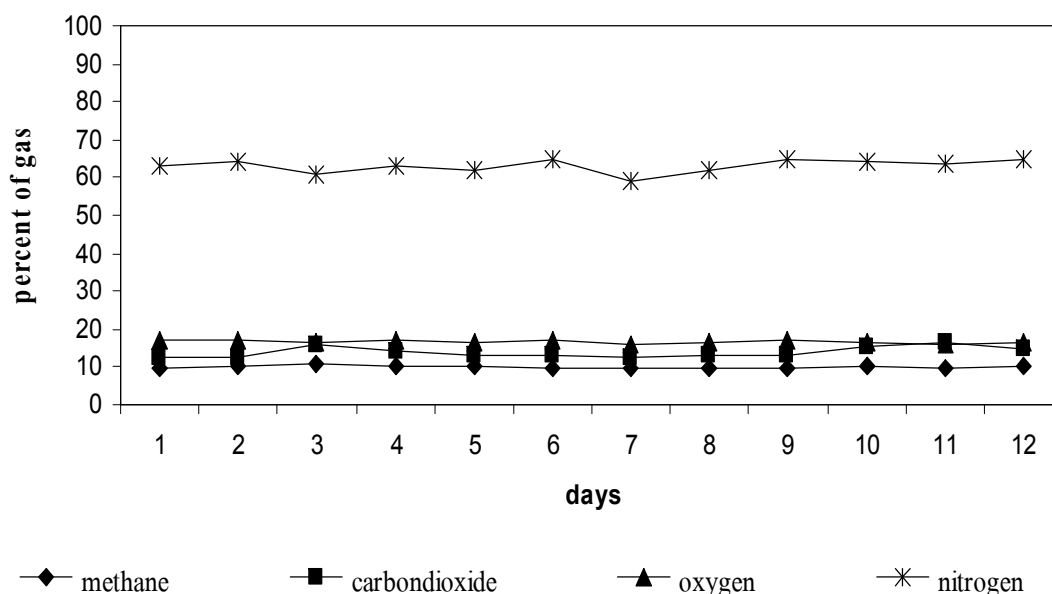
ภาพที่ 18 องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศชุดควบคุม



ภาพที่ 19 องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศชุดการทดลองที่ 1



ภาพที่ 20 องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศชุดการทดลองที่ 2



ภาพที่ 21 องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศชุดการทดลองที่ 3

4. ผลของก๊าซชีวภาพต่อการเจริญเติบโตและการทำลายดีเอ็นเอของพืช

พิจารณาการเจริญเติบโตของพืชมุ่งที่เจริญเติบโตในบรรยากาศที่มีความเข้มข้นของระดับมีเทนภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศร้อยละ 0, 1, 5 และ 10 ซึ่งทำการตรวจวัดก่อนและหลังการทดลอง เมื่อเวลาผ่านไป 12 วัน พบว่า ต้นพืชมุ่งมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 11 และลักษณะทางกายภาพของใบพืชมุ่ง จะไม่พบใบสีเหลือง หรือเหี่ยวแห้ง สามารถสรุปได้ว่าปริมาณก๊าซชีวภาพที่พืชได้สัมผัสในระยะเวลาที่กำหนดในการทดลอง ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตหรือลักษณะทางกายภาพของพืช

เมื่อทำการทดสอบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของพืชมุ่งด้วยวิธีการทางสถิติ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของพืชมุ่งก่อนและหลังการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบในแต่ละชุดการทดลอง พบว่า การเจริญเติบโตของพืชมุ่งในแต่ละชุดการทดลองนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จึงสรุปได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป 12 วัน พืชมุ่งที่นำมาใช้ในการทดสอบมีการเจริญเติบโตมากขึ้น และระดับความเข้มข้นของก๊าซชีวภาพในบรรยากาศภายในตู้ที่ใช้ในการทดสอบไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต

ตารางที่ 11 ผลของก๊าซชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของต้นพลูด่าง

	Pre-test			Post-test (12 day)		
	Height (cm.)	Dry mass (g.)	Amount of leaves	Height (cm.)	Dry mass (g.)	Amount of leaves
Control	20±0.03	5.4±0.40	6±0.04	30±0.12	10.8±0.02	5±0.03
Run 1	22.5±0.02	7.8±0.21	8±0.12	40±0.51	15.2±0.13	7±0.21
Run 2	21±0.11	6.4±0.03	7±0.05	39±0.07	13.2±0.23	8±0.05
Run 3	19±0.09	4.8±0.02	3±0.01	27±0.23	9.6±0.05	5±0.11

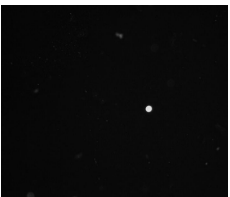
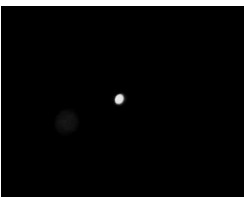
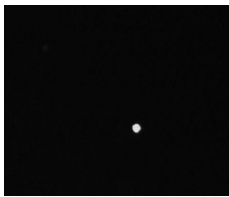
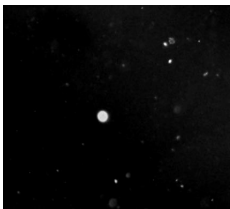
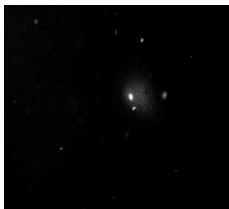
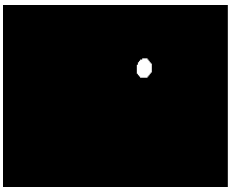
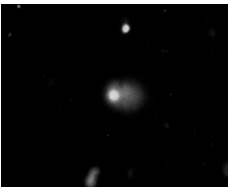
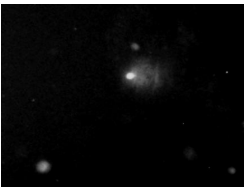
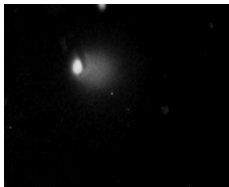
หมายเหตุ: Average±SD.

หลังจากเก็บตัวอย่างใบพลูด่างมาวัดระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ด้วยวิธีโคเมท และทำการวิเคราะห์ภาพของเซลล์ (image analysis) ตัวอย่างละ 50 เซลล์ ในการทดลองชุดที่ 1 ระดับความเข้มข้นของก๊าซมีเทนร้อยละ 1.09 ± 0.11 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 1.47 ± 0.53 ซึ่งความเข้มข้นของก๊าซชีวภาพที่ใช้ในการทดลอง จัดเป็นช่วงที่มีความเหมาะสมต่อการสังเคราะห์แสงของพืช (Gendebien, 1992) พบว่า ร้อยละของระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มีค่าเท่ากับร้อยละ 10 ± 0.13 , 23 ± 0.19 , 41 ± 0.21 และ 59 ± 0.17 ตามลำดับ

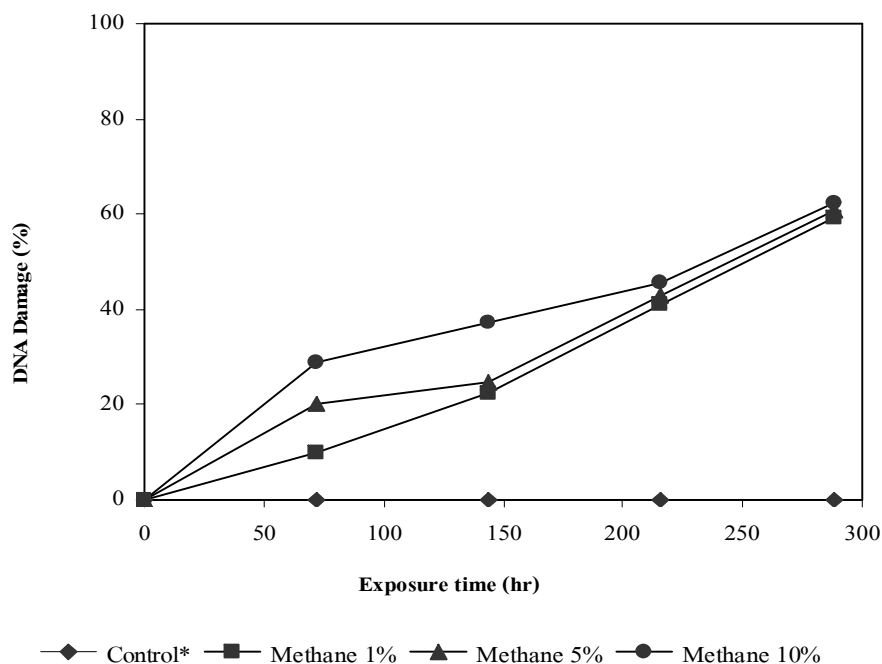
ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซชีวภาพที่ใช้ในการทดลองชุดที่ 2 และการทดลองชุดที่ 3 นั้น จัดเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช จึงพบระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของใบพลูด่างสูงกว่าการทดลองที่ 1 พบว่า ในการทดลองชุดที่ 2 ระดับความเข้มข้นของมีเทนร้อยละ 5.06 ± 0.34 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 8.68 ± 1.60 มีระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอร้อยละ 20 ± 0.26 , 25 ± 0.23 , 42 ± 0.28 , 60 ± 0.17 ตามลำดับ และการทดลองชุดที่ 3 ระดับความเข้มข้นของมีเทนร้อยละ 10.03 ± 0.41 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 13.85 ± 1.41 ดีเอ็นเอของพืชถูกทำลายมากที่สุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 29 ± 0.26 , 37 ± 0.30 , 46 ± 0.30 , 62 ± 0.20 ตามลำดับ (ภาพที่ 22)

เปรียบเทียบกับการศึกษาของ Sriussadaporn *et al.* (2003) ซึ่งทำการศึกษาผลของก๊าซจากห้องถนอมต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช โดยพ่นก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์เข้าไปในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศขนาด 2 ลิตร เมื่อทำการตรวจวัดอากาศภายในตู้พบว่าประกอบด้วย ไนโตรเจนออกไซด์

(NO_x) 28 ppm. ซัลเฟอร์ออกไซด์ (SO_x) น้อยกว่า 0.6 ppm. คาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO) 16 ppm. และ เปอร์เซนต์ออกซิเจน 20.2 เปอร์เซนต์ ที่ระยะเวลาสัมผัส 0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง มีระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอคิดเป็นร้อยละ 22.6, 31.0, 38.2, 42.8 และ 60.7 ตามลำดับ พบว่าการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชที่สัมผัสกับมลพิษจากท้องถนนมีความไว และเปอร์เซ็นต์การทำลายที่สูงกว่าเนื่องจากมีระยะเวลาในการสัมผัสสั้นกว่าแต่ระดับการถูกทำลายมีค่าใกล้เคียงกันระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชที่สัมผัสกับก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอยที่ระยะเวลาสัมผัสที่มากกว่า

	72 (h.)	144 (h.)	216 (h.)	288 (h.)
Control				
	0%	0%	0%	0%
Methane 1%				
	10%	23%	41%	59%
Methane 5%				
	20%	25%	42%	60%
Methane 10%				
	29%	37%	46%	62%

ภาพที่ 22 ตัวอย่างลักษณะของเซลล์ของพื้ด่างที่ถูกทำลายดีเอ็นเอเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นระดับต่างๆ ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ



ภาพที่ 23 ค่าเฉลี่ยของร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพลุด่างในแต่ละความเข้มข้นของก๊าซมีเทน

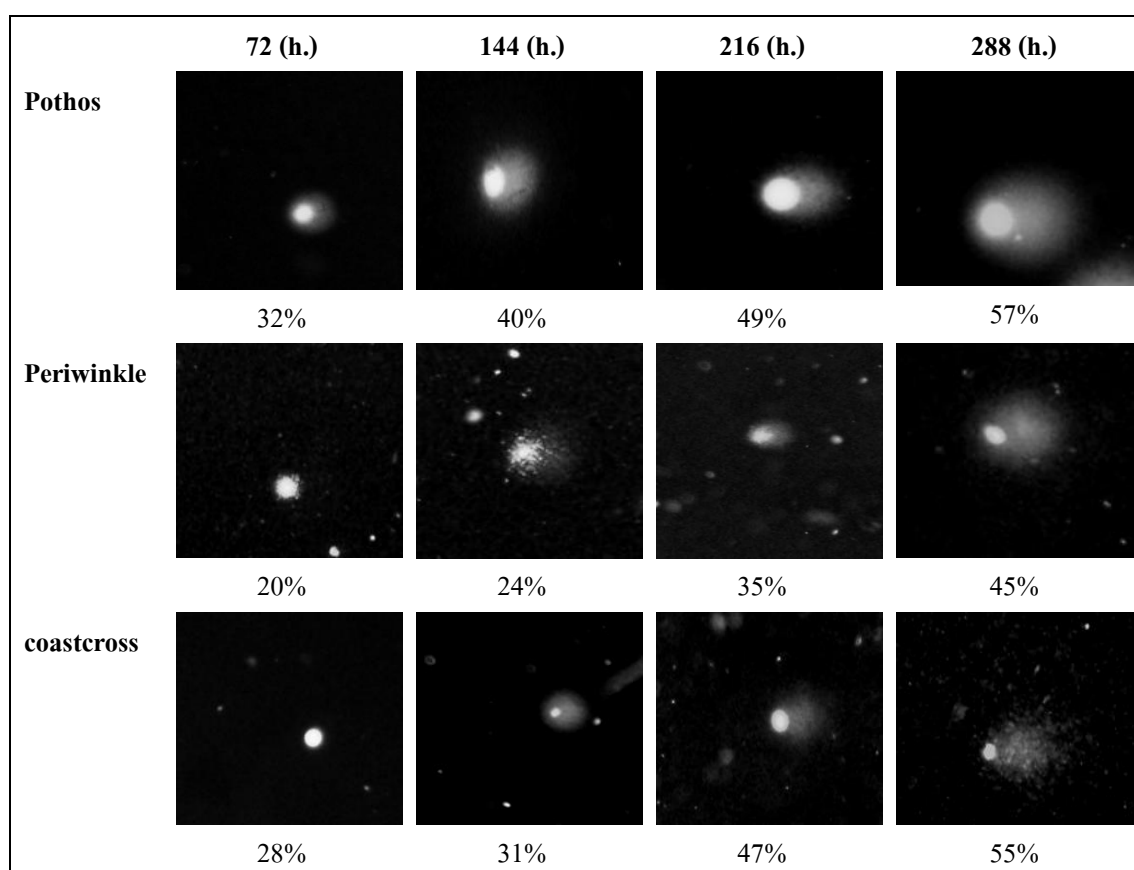
หมายเหตุ * control ของพืชแต่ละชนิด มีค่าต่ำกว่าร้อยละ 0.5

สรุปได้ว่า การถูกทำลายดีเอ็นเอจะมีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่อพลุด่างมีระยะเวลาในการสัมผัสกับก๊าซชีวภาพมากขึ้น และความเข้มข้นของก๊าซชีวภาพที่ต้นพลุด่างได้รับมีค่าสูงขึ้น (ภาพที่ 23) พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีค่าร้อยละการถูกทำลายสูงจะมีปริมาณสูงมากขึ้นตามลำดับ ซึ่งร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอในเซลล์พลุด่างทุกระยะเวลาที่สัมผัสกับก๊าซชีวภาพ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า ณ เวลาสัมผัสที่เท่ากัน ต้นพลุด่างที่สัมผัสกับความเข้มข้นของก๊าซชีวภาพสูงกว่าจะมีร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอที่มากขึ้นตามไปด้วยและมีความแตกต่างกันมากที่สุด ที่ระยะเวลาสัมผัส 72 ชั่วโมง ($P < 0.05$) การถูกทำลายดีเอ็นเอของพลุด่างที่สัมผัสกับก๊าซชีวภาพในระยะเวลา 72 ชั่วโมงจะมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด

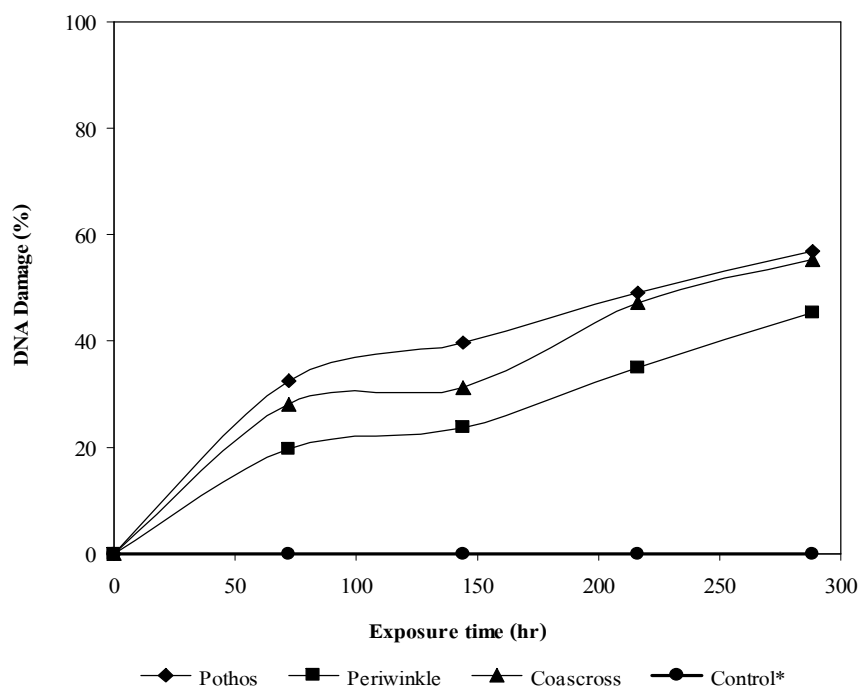
5. ผลการคัดเลือกพืชที่เหมาะสมกับการเป็นดัชนีชี้วัดสำหรับการทดสอบผลกระทบก๊าซมีเทน

หลังจากนำพืชสามชนิดได้แก่ พลุด่าง ต้นแพงพวยฝรั่ง และหญ้าโคสโครอส มาทำการทดสอบโดยปลูกในตู้ควบคุมอากาศ ในสภาวะความเข้มข้นของก๊าซมีเทนในบรรยากาศเท่ากับ

ร้อยละ 1 ผลการทดลองพบว่าพืชแต่ละชนิดมีระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอแตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มของการถูกทำลายสูงขึ้นตามระยะเวลาสัมผัสที่มากขึ้นคล้ายคลึงกัน พืชแต่ละชนิดจะมีลักษณะ และขนาดของเซลล์โคเมทแตกต่างกัน ร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพื้ด่าง จะมีค่ามากที่สุด คือ 32 ± 0.21 , 40 ± 0.19 , 49 ± 0.19 , 57 ± 0.17 ตามลำดับ รองลงมาเป็นอันดับสอง คือหญ้าโคสโครอส มีค่าเท่ากับ 28 ± 0.21 , 31 ± 0.25 , 47 ± 0.24 , 55 ± 0.22 ตามลำดับ และร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของต้นแพงพวยจะมีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 20 ± 0.17 , 24 ± 0.14 , 35 ± 0.10 , 45 ± 0.10 ตามลำดับ (รูปที่ 24) ซึ่งร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชในแต่ละระยะเวลาที่สัมผัสกับก๊าซชีวภาพมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 25



ภาพที่ 24 ตัวอย่างลักษณะของเซลล์พื้ด่าง แพงพวยฝรั่ง หญ้าโคสโครอส ที่ถูกทำลายดีเอ็นเอเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 1 ในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ



ภาพที่ 25 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชในแต่ละชนิดเมื่อสัมผัสกับบรรยากาศที่มีก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 1

หมายเหตุ * control ของพืชแต่ละชนิด มีค่าต่ำกว่าร้อยละ 0.5

เมื่อพิจารณาภาพถ่ายเซลล์โคเมทของพืชแต่ละชนิด พบว่า ภาพเซลล์โคเมทของ พลูต่าง และหญ้าโคสโครอสมีลักษณะชัดเจนขนาดไม่เล็กลงเกินไป ง่ายต่อการวัดพื้นที่ส่วนหัวและหางของเซลล์เพื่อนำมาคำนวณหาร้อยละการถูกทำลายของดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับภาพถ่ายเซลล์โคเมทจากงานวิจัย Gichner and Muhlfeldove (2002) ซึ่งศึกษาความแตกต่างของเซลล์พืชถึง 10 ชนิด สรุปได้ว่า พืชแต่ละชนิดจะมีลักษณะเซลล์เฉพาะตัว พืชต่างชนิดกันก็จะให้ลักษณะของเซลล์ที่แตกต่างกัน

แต่เนื่องจากในการศึกษาระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์นั้นเป็นการคำนวณจากการวัดพื้นที่ส่วนหัวและส่วนหางของแต่ละเซลล์แล้วนำมาคำนวณด้วยสมการที่ 9 (Sriussadaporn *et al.*, 2003) จึงสามารถนำค่าที่ได้จากพืชคนละชนิดมาเปรียบเทียบระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอได้

จากเปอร์เซ็นต์และเส้นแนวโน้มของกราฟที่แสดงในภาพที่ 25 พบว่า พืชที่ใช้ในการทดสอบทั้งสามชนิด มีเส้นแนวโน้มของการถูกทำลายดีเอ็นเอเป็นรูป S-shape ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีการเปลี่ยนแปลงของพืชเมื่อได้สัมผัสกับสารพิษ (Sriussadaporn *et al.*, 2003) และพบว่าพลูด่างมีการถูกทำลายดีเอ็นเอมากที่สุด แสดงว่ามีความไวในการสัมผัสกับมลพิษมากที่สุด จึงควรนำไปใช้เป็นดัชนีชี้วัดมลพิษในพื้นที่ฝั่งกลบ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการใช้วิธีโคเมท (comet assay) ในการติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอยต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งใช้ระดับการทำลายดีเอ็นเอของพืชเป็นตัวชี้วัด สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

การทดสอบการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชโดยก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบด้วยวิธีโคเมทพบว่า การทำลายดีเอ็นเอของพืชมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อพืชได้สัมผัสก๊าซชีวภาพที่มีความเข้มข้นสูงมากขึ้น และมีระยะเวลาในการสัมผัสมากขึ้นจะพบระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของใบพลูด่างสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของมีเทนในบรรยากาศร้อยละ 10 ที่ระยะเวลาสัมผัส 288 ชั่วโมง มีค่าระดับการถูกทำลายร้อยละ 62 ± 0.20 ซึ่งในแต่ละระดับความเข้มข้นของมีเทนระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบพืชที่นำมาทดสอบทั้งสามชนิดพบว่า หญ้าโคสโครอส เป็นพืชที่เหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดผลกระทบจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย เนื่องจากภาพถ่ายเซลล์โคเมทที่สกัดจากหญ้าโคสโครอสนั้นมีขนาดเล็กหรือใหญ่เกินไป มองเห็นได้ชัดเจนและง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม (image analysis) อีกทั้งยังสามารถปลูกได้ง่ายในพื้นที่ฝังกลบ และค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาไม่มาก

การทดสอบด้วยน้ำชะมูลฝอย พบว่าแนวโน้มของการทำลายดีเอ็นเอมีทิศทางเดียวกันกับก๊าซชีวภาพ แต่มีระดับการทำลายต่ำกว่าที่ระยะเวลาสัมผัสใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการทดสอบการถูกทำลายดีเอ็นเอนั้นใช้ใบพืชในการทดสอบ ดังนั้นพืชซึ่งสัมผัสกับก๊าซชีวภาพโดยตรงมาใบจึงมีระดับการถูกทำลายที่สูงกว่าพืชที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยผ่านทางราก

นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำชะมูลฝอยสดให้ระดับการทำลายดีเอ็นเอสูงกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่าที่ค่าความเข้มข้นของซีโอดีเท่ากัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในน้ำชะมูลฝอยสดมีค่าความเป็นกรด ปริมาณไนโตรเจน รวมทั้งค่าความเค็มที่มากกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่า จะพบระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของใบพลูด่างสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของซีโอดีในน้ำชะมูลฝอยสด 13,250 มิลลิกรัมต่อลิตร

ที่ระยะเวลาสัมผัส 288 ชั่วโมง มีค่าระดับการถูกทำลายร้อยละ 68 ± 0.12 และในทุกระยะเวลาของการสัมผัสน้ำชะมูลฝอยระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลการทดลองดังกล่าวเป็นนัยแสดงถึงประสิทธิภาพ และความไวในการตรวจวัดด้วยวิธีโคเมทที่สามารถนำมาวัดระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชที่สัมผัสกับมลพิษที่เกิดจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือจากการตรวจสอบด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาและวิจัยต่อไปเพื่อพัฒนาให้สามารถนำวิธีการดังกล่าวไปใช้กับพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยและนำไปใช้ในการประเมินผลกระทบและความเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการทดสอบด้วยวิธีโคเมทเป็นการทดสอบระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชโดยใช้ใบพืชในการทดสอบ ดังนั้นวิธีการทดสอบดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบมลพิษทางอากาศ และก๊าซชนิดต่างๆ
2. ในการศึกษาการถูกทำลายดีเอ็นเอโดยน้ำชะมูลฝอย เนื่องจากรากของพืชเป็นบริเวณที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยโดยตรง จึงควรมีการศึกษานำวิธีโคเมทมาใช้ทดสอบการถูกทำลายดีเอ็นเอในรากของพืช
3. ควรศึกษาระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของใบพืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยจริงเพื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่ได้ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2547. ตำราระบบบำบัดมลพิษอากาศ. ศูนย์บริการวิชาการแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- เฉลิมพล แซมเพชร. 2530. หนูและถั่วอาหารสัตว์เมืองร้อน. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ เอี่ยมกมล, ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, วิเชษฐ์ คนเชื้อ, กำธร ชีรคุปต์ และ เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต. 2550. ผลของคลอรีไฟรฟอสต่อการทำลายดีเอ็นเอในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ *Penaeus monodon*. **Proceeding of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand.**
- ทิพย์สุริย์ กรบุญรักษา, ชาติ เจียมไชยศรี, วิไล เจียมไชยศรี และสิรินทรเทพ เต้าประยูร. 2549. การวิเคราะห์อัตราการแพร่กระจายก๊าซมีเทนจากพื้นที่กำจัดมูลฝอยในประเทศไทยโดยประยุกต์ใช้ระบบข้อมูลสารสนเทศ. วารสารวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมไทย 19 (3): 11-23.
- พิมลรัตน์ พุทธิมลินประทีป. 2544. อิทธิพลของฤดูกาลต่อองค์ประกอบและอัตราการแพร่กระจายของก๊าซจากหลุมฝังกลบมูลฝอย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มณธีรา ศรีจักรโคตร. 2550. การทดสอบไมโครนิวเคลียสและโคเมทของสารสีที่ได้จากการเพาะเลี้ยง รางเงิน รางทอง และรางนาก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วันวิสา สุดประเสริฐ, พรรณี พักกง และ สิริกัญจน์ เนาวพันธ์. 2549. การใช้วิธี DNA Comet Assay สำหรับตรวจสอบเม็ดเลือดขาว ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา. **Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand**
- ศิริพร สัทธีประณีต. 2531. พันธุวิศวกรรม ปฏิบัติการเบื้องต้น. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สายันห์ ทัดศรี. 2540. พืชอาหารสัตว์เขตร้อน การผลิตและการจัดการ. สำนักพิมพ์ร่วมเขียว, กรุงเทพฯ.

สุรัตน์ โกวานิชย์. 2546. การศึกษาอัตราการแพร่กระจายของก๊าซมีเทนจากชั้นดินกลบทับมูลฝอยชุมชน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุบลวรรณ ขอดแสง. 2546. อิทธิพลของพืชและการร่อนน้ำชะมูลฝอยต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันของก๊าซมีเทนในหน้าดินกลบทับมูลฝอยชุมชน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อฤชร์ พงษ์ไสว. 2544. ไม้เลื้อยประดับ. พิมพ์ครั้งที่ 3. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งเอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. กรุงเทพฯ ฯ.

APHA. 1998. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association, Washington D.C., USA.

Christensen, T.H., R. Cossue and R. Stegmann. 1992. **Landfill of Waste: Leachate**. Elsevier Science Publishers, London.

Collins, A.R., V.L. Dobson., M. Dusinka., G. Kennedy and R. stetina. 1997. The comet assay: What can it really tell us? **Mutat. Res.** 375:183-193.

Ettala, M. 1987. Influence of irrigation with leachate on biomass production and evapotranspiration on a sanitary landfill. **Aqua Fennica** 17(1): 69-86.

Fukushi, K., C. Sriussadaporn., D. Shimazaki and K. Yamamoto. 2005. Assessment of roadside air quality in the Tokyo metropolitan area by a novel biomonitoring method. **AIR POLLUTION XIII**: 563-576.

Gendebien, A. 1992. Potential landfill gas damages to vegetation. **Landfill gas. Environment to Energy** 1: 35-46.

Gichner, T. and Z. Muhlfieldove. 2002. Induce DNA damage measured by the Comet assay in 10 weed species. **Biologia Plantarum** 45 (4): 509-516

- Gichner, T. 2003. Comet assay in higher plants. In: J. Maluszynska, M. Plewa, editors. **Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health**. Katowice: Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego: 123-132.
- Gichner, T., Z. Patkova, J. Szakova and K. Demnerova. 2005. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.
- Gichner, T., Z. Patkova., J. Szakova and K. Demnerrova. 2006. Toxicity and DNA Damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. **Ecotoxicology and environmental safety** 65:420-426.
- Kang, S., M. Choi , I. Oh, D.A. Wright and C. Koh. 1999. Assessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor. **The Science of the Total Environment** 234: 127-137.
- King, P.H. and R.E. Eliassen. 1993. **Integrated Solid Waste Management**. Consulting Ed. McGraw-Hill, Inc., Singapore.
- Knasmuller, S., E. Gottmann., H. Steinkellner., A. Formin., C. Pickl., R. God. and M. Kundi. 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassay. **Mutat. Res.** 420: 37-48.
- Lee, G.F., R.A. Jones and C. Ray. 1986. Sanitary landfill leachate recycle. **Biocycle**. 27: 36-38
- 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 University.

- McCarthy, P.J., S.F. Sweetman, P.G. McKenna and V.J. McKelvy. 1997. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. **Mutagenesis**. 12(4): 209-214
- Moffat, A.J and T.J. Houston. 1991. Tree establishment and growth at pitsea landfill site, Essex, U.K. **Waste Management and Research** 9: 35-46.
- Monteith, D.K. and J. Vanstone. 1995. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. **Mutat Res**. 345: 97-103.
- Ostling, O., and K. J. Johanson. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 123: 291-298.
- Oyabu, T., A. Sawada, T. Onodera, K. Takenaka and B. Wolverton. 2003. Characteristics of potted plants for removing offensive odors. **Sensors and Actuators B** 39: 131-136
- Shimazaki, D., T. Urase. and K. Yamamoto. 1999. Detection of DNA damaging potential in the leachate from waste landfill with comet assay. **Journal of Japan Society on Water Environment**. 22(9): 783-789.
- Singh, N.P., M. T. McCoy, R. R. Tice, E. L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res**. 175: 184-191.
- Soil and Plant Analysis Council Inc. 1999. **Soil Analysis Handbook of Reference Method**. CRC Press, Washington, D.C.
- Speit, G., S. Haupter and A. Hartmann 1998. Evaluation of the genotoxic properties of paraquat in V79 Chinese hamster cells. **Mutat. Res**. 412 : 187-193.

- Sriussadaporn, C., K. Yamamoto., K. Fukushi and D. Simazaki. 2003. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environment. **Mut. Res.** 514:31-44.
- Tchobanoglous, G. 1993. **Integrated Solid Waste Management**. McGraw-Hill International. Singapore.
- United States Environmental Protection Agency. (USEPA). 1985. **40 CFR Part 257-258. RCRA Subtitle D. October 9, 1991**. Fed Regist 50978-51119.
- Wong, M.H. and C. Yu. 1989. Monitoring of Gin Drinker Bay Landfill, Hongkong: II gas content, soil properties, and vegetation performance on the side slope. **Environmental Management** 13: 753-762.
- Wolverton, B.C.1996. **Eco-friendly Houseplants: 50 Indoor Plants that Purify the Air**. Weidenfeld and Nicolson, Ltd. London.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ผลการศึกษาคู่ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซ

ตารางผนวกที่ ก1 ผลการวิเคราะห์ห้องค้ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (control)

	Data from Gas Chromatograph							% gas				
	Air	CH ₄	CO ₂	O ₂	N ₂	CH ₄ out	Total Area	CH ₄	CO ₂	O ₂	N ₂	Total
day 1	13370.000	0.000	10.200	3967.626	14904.800	0.000	32252.600	0.00	0.08	21.12	78.54	99.74
day 2	13070.000	0.000	8.179	3516.977	14100.000	0.000	30800.000	0.00	0.07	19.60	77.80	97.48
day 3	13210.000	0.000	6.985	3549.740	14400.000	0.000	30900.000	0.00	0.06	19.72	79.20	98.98
day 4	12259.800	9.068	10.591	3268.349	13451.400	0.000	28999.100	0.06	0.09	19.35	78.84	98.34
day 5	12381.200	10.091	9.412	3304.075	13495.200	0.000	29200.000	0.06	0.08	19.43	78.55	98.12
day 6	12414.800	8.597	7.694	3302.948	13560.700	0.000	29294.700	0.05	0.07	19.36	78.67	98.15
day 7	12622.300	12.134	11.228	3374.987	13767.500	0.000	29788.200	0.07	0.10	19.45	78.55	98.17
day 8	12944.200	11.430	12.015	3530.955	14183.800	0.000	30682.400	0.07	0.10	19.76	78.57	98.49
day 9	12732.800	6.954	6.622	3389.492	13864.200	0.000	30000.000	0.04	0.06	19.40	78.54	98.04
day 10	12414.800	8.597	7.694	3302.948	13560.700	0.000	29294.700	0.05	0.07	19.36	78.67	98.15
day 11	12944.200	11.430	12.015	3530.955	14183.800	0.000	30682.400	0.07	0.10	19.76	78.57	98.49
day 12	12622.300	12.134	11.228	3374.987	13767.500	0.000	29788.200	0.07	0.10	19.45	78.55	98.17
							average	0.05	0.08	19.65	78.59	98.36
							SD	0.03	0.02	0.49	0.31	0.56

ตารางผนวกที่ ก2 ผลการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (Run 1:Methane 1%)

	Data from Gas Chromatograph							% gas				
	Air	CH ₄	CO ₂	O ₂	N ₂	CH ₄ out	Total Area	CH ₄	CO ₂	O ₂	N ₂	Total
day 1	13346.700	204.299	245.794	3831.479	14449.900	279.274	32357.500	1.16	1.95	20.33	75.90	99.34
day 2	12986.000	210.253	241.103	3726.968	14058.700	291.144	31514.200	1.23	1.96	20.30	75.82	99.31
day 3	13135.000	157.799	149.709	3899.785	14640.800	289.563	32272.700	0.90	1.19	20.75	77.10	99.94
day 4	13180.500	164.595	167.942	3902.797	14630.500	221.308	32267.600	0.94	1.34	20.77	77.06	100.10
day 5	12821.000	184.057	242.817	3803.635	14290.800	325.663	31722.000	1.07	1.96	20.59	76.57	100.18
day 6	12806.700	175.969	281.599	3745.328	14065.200	383.253	31458.100	1.03	2.30	20.44	75.99	99.76
day 7	13287.400	178.300	118.687	3952.911	14836.700	214.619	32541.600	1.01	0.94	20.85	77.49	100.29
day 8	12816.000	185.200	121.677	3782.283	14211.000	189.389	31263.700	1.09	1.00	20.77	77.25	100.11
day 9	13003.600	192.345	74.895	3866.041	14537.200	111.225	31672.900	1.12	0.61	20.96	78.01	100.69
day 10	12761.000	189.565	122.790	3761.367	14140.500	176.478	31087.700	1.12	1.01	20.77	77.31	100.21
day 11	12892.800	187.875	196.538	3820.824	14328.700	326.056	31752.800	1.09	1.59	20.66	76.69	100.03
day 12	13202.700	217.181	226.390	3860.491	14476.900	396.075	31207.000	1.28	1.86	21.24	78.84	103.22
average								1.09	1.47	20.70	77.00	100.27
SD								0.11	0.53	0.26	0.89	1.01

ตารางผนวกที่ ก3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (Run 2:Methane 5%)

	Data from Gas Chromatograph							% gas				
	Air	CH ₄	CO ₂	O ₂	N ₂	CH ₄ out	Total Area	CH ₄	CO ₂	O ₂	N ₂	Total
day 1	11621.400	803.554	884.703	3370.298	12696.400	1270.803	30747.100	4.81	7.38	18.82	70.18	101.19
day 2	12223.600	895.670	554.270	3491.986	13117.900	801.614	30378.000	5.43	4.68	19.74	73.39	103.24
day 3	11525.600	878.700	1154.239	3284.826	12378.700	1589.810	31113.600	5.20	9.52	18.13	67.62	100.46
day 4	11621.400	803.554	884.703	3370.298	12696.400	1270.803	30747.100	4.81	7.38	18.82	70.18	101.19
day 5	11816.800	939.651	1080.121	3469.391	13057.100	1554.534	32017.500	5.40	8.65	18.60	69.31	101.97
day 6	11647.300	882.327	1085.327	3396.845	12794.400	1489.612	31522.600	5.15	8.83	18.50	68.98	101.47
day 7	11737.000	839.778	1044.513	3433.418	12923.900	1462.991	31641.800	4.75	8.23	18.11	67.50	98.60
day 8	11462.100	982.852	1192.711	3346.928	12583.700	1688.006	31456.300	5.79	9.79	18.38	68.41	102.36
day 9	11485.400	810.275	1231.380	3311.251	12510.900	1656.224	31405.400	4.75	10.06	18.10	67.71	100.62
day 10	12510.000	908.964	1225.590	3381.806	12954.100	1591.410	32972.400	5.08	9.54	17.61	66.77	98.99
day 11	12581.800	897.319	1281.492	3565.100	13386.900	1801.214	33913.900	4.87	9.69	18.05	67.09	99.70
day 12	12731.200	867.241	1368.913	3439.573	12920.100	1888.442	33715.500	4.74	10.42	17.51	65.13	97.80
average								5.06	8.68	18.36	68.52	100.63
SD								0.34	1.60	0.60	2.12	1.61

ตารางผนวกที่ ก4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและความเข้มข้นของก๊าซภายในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (Run 3:Methane 10%)

	Data from Gas Chromatograph							% gas				
	Air	CH ₄	CO ₂	O ₂	N ₂	CH ₄ out	Total Area	CH ₄	CO ₂	O ₂	N ₂	Total
day 1	11806.900	1696.324	1556.533	3138.079	11840.900	2087.722	32026.400	9.75	12.47	16.82	62.84	101.88
day 2	10603.700	1698.529	1485.028	3006.761	11333.100	2042.672	29969.700	10.43	12.71	17.22	64.27	104.64
day 3	11073.500	1927.352	1965.194	3056.253	11523.600	2560.155	32106.100	11.05	15.70	16.34	61.00	104.10
day 4	10396.000	1641.590	1664.860	2940.785	11091.100	2268.524	30002.800	10.07	14.24	16.83	62.83	103.96
day 5	12226.000	1796.310	1649.342	3218.145	12100.500	2205.318	33095.600	9.99	12.78	16.69	62.14	101.61
day 6	10823.900	1623.715	1571.222	3072.112	11729.400	2097.136	30817.500	9.70	13.08	17.11	64.69	104.58
day 7	10513.500	1685.913	1557.210	2975.318	11358.100	2021.544	29911.500	9.54	12.28	15.70	59.32	96.83
day 8	10464.600	1655.288	1623.947	2999.688	11441.400	2173.075	30258.000	9.75	13.33	16.47	62.20	101.74
day 9	10524.600	1600.207	1524.623	3000.469	11415.300	2032.653	29997.900	9.82	13.04	17.17	64.67	104.71
day 10	10579.200	1674.986	1810.330	2901.134	11570.000	2172.097	30607.800	10.08	15.17	16.27	64.25	105.77
day 11	10393.900	1627.498	1949.876	2794.640	11342.900	2200.067	30308.900	9.89	16.50	15.83	63.61	105.82
day 12	10481.400	1669.169	1744.426	2854.996	11456.800	1992.853	29999.600	10.24	14.92	16.34	64.91	106.41
average								10.03	13.85	16.57	63.06	103.50
SD								0.41	1.41	0.50	1.70	2.65

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างข้อมูลการวิเคราะห์เซลล์โคเมทด้วยโปรแกรม

Tritek Comet [Score] Freeware version 1.5

(กรณีศึกษา การทดสอบระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซชีวภาพ)

ตารางผนวกที่ ข1 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 1 ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

No.	Comet			Tail			DNA	
	Area	Head	%DNA	Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	(px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
1	217.000	178.000	82.129	39.000	17.871	0.536	0.935	0.180
2	314.000	264.000	81.193	50.000	18.807	0.564	1.036	0.159
3	366.000	340.000	96.993	26.000	3.007	0.060	0.295	0.071
4	184.000	183.000	98.719	1.000	1.281	0.000	0.019	0.005
5	82.000	46.000	52.728	36.000	47.272	1.891	1.683	0.439
6	90.000	72.000	73.265	18.000	26.735	0.535	0.845	0.200
7	55.000	54.000	99.835	1.000	0.165	0.000	0.000	0.018
8	48.000	28.000	49.781	20.000	50.219	1.004	0.954	0.417
9	144.000	96.000	56.765	48.000	43.235	2.594	2.203	0.333
10	73.000	50.000	66.933	23.000	33.067	0.992	1.050	0.315
11	122.000	98.000	79.513	24.000	20.487	0.410	0.821	0.197
12	85.000	76.000	96.227	9.000	3.773	0.038	0.127	0.106
13	1786.000	1785.000	99.777	1.000	0.223	0.020	0.051	0.001
14	1435.000	1434.000	97.172	1.000	2.828	0.170	0.250	0.001
15	79.000	40.000	47.051	39.000	52.949	2.118	1.655	0.494
16	174.000	120.000	70.815	54.000	29.185	0.876	1.406	0.310
17	182.000	170.000	88.977	12.000	11.023	0.220	0.662	0.066
18	225.000	172.000	81.606	53.000	18.394	0.552	0.951	0.236
19	233.000	190.000	77.367	43.000	22.633	0.453	1.222	0.185
20	1200.000	1199.000	73.159	1.000	26.841	2.684	1.932	0.001
21	2050.000	2049.000	95.207	1.000	4.793	0.431	0.298	0.000
22	1332.000	1331.000	68.803	1.000	31.197	0.312	1.845	0.001
23	930.000	929.000	77.415	1.000	22.585	0.000	1.035	0.001
24	1408.000	1407.000	99.673	1.000	0.327	0.039	0.037	0.001
25	1260.000	1259.000	93.929	1.000	6.071	0.729	0.427	0.001
26	952.000	951.000	74.757	1.000	25.243	1.515	1.544	0.001
27	990.000	989.000	75.035	1.000	24.965	0.749	1.268	0.001

ตารางผนวกที่ ข2 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น
ร้อยละ 1 ระยะเวลา 144 ชั่วโมง

No.	Comet							DNA	
	Area	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration	ratio
	(px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment		
1	369.000	196.000	45.292	173.000	54.708	4.377	3.510		0.469
2	853.000	852.000	99.999	1.000	0.001	0.000	0.000		0.001
3	3661.000	1788.000	55.759	1873.000	44.241	13.272	10.207		0.512
4	404.000	403.000	99.997	1.000	0.003	0.000	0.000		0.002
5	1520.000	796.000	29.539	724.000	70.461	11.978	9.176		0.476
6	1781.000	1690.000	87.282	91.000	12.718	0.254	1.507		0.051
7	646.000	610.000	67.692	36.000	32.308	0.646	1.842		0.056
8	2398.000	2397.000	99.999	1.000	0.001	0.000	0.000		0.000
9	2358.000	2357.000	99.999	1.000	0.001	0.000	0.000		0.000
10	5094.000	3207.000	62.622	1887.000	37.378	13.830	8.869		0.370
11	376.000	288.000	75.888	88.000	24.112	0.723	1.524		0.234
12	2120.000	936.000	81.752	1184.000	18.248	7.117	5.656		0.558
13	647.000	646.000	99.857	1.000	0.143	0.000	0.003		0.002
14	650.000	635.000	99.971	15.000	0.029	0.000	0.004		0.023
15	5519.000	2944.000	51.421	2575.000	48.579	28.176	16.969		0.467
16	2975.000	2628.000	95.332	347.000	4.668	0.327	1.129		0.117
17	1706.000	1522.000	81.080	184.000	18.920	0.757	2.270		0.108
18	2972.000	2971.000	99.711	1.000	0.289	0.000	0.010		0.000
19	2107.000	920.000	76.816	1187.000	23.184	8.114	5.533		0.563
20	867.000	688.000	76.992	179.000	23.008	1.381	2.182		0.206
21	1304.000	1278.000	96.597	26.000	3.403	0.000	0.464		0.020
22	2684.000	2676.000	99.716	8.000	0.284	0.000	0.004		0.003
23	3620.000	1722.000	59.290	1898.000	40.710	17.505	9.783		0.524
24	3154.000	2508.000	88.638	646.000	11.362	1.591	1.972		0.205
25	2910.000	1702.000	72.536	1208.000	27.464	9.063	5.881		0.415
26	848.000	847.000	99.999	1.000	0.001	0.000	0.000		0.001
27	1759.000	1344.000	93.945	415.000	6.055	0.848	1.238		0.236

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

ตารางผนวกที่ ข3 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 1 ระยะเวลา 216 ชั่วโมง

No.								DNA
	Comet	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration ratio
	Area (px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	
1	3040.000	1450.000	62.363	1590.000	37.637	10.162	8.765	0.523
2	5216.000	2546.000	58.595	2670.000	41.405	19.046	12.717	0.512
3	7377.000	4071.000	66.304	3306.000	33.696	20.555	12.978	0.448
4	2334.000	1357.000	80.224	977.000	19.776	5.735	5.003	0.419
5	5834.000	2785.000	46.979	3049.000	53.021	34.463	14.526	0.523
6	5706.000	3860.000	83.398	1846.000	16.602	6.973	7.954	0.324
7	4362.000	1732.000	54.037	2630.000	45.963	27.118	14.236	0.603
8	1186.000	1182.000	99.675	4.000	0.325	0.000	0.007	0.003
9	3306.000	1972.000	73.512	1334.000	26.488	9.271	6.688	0.404
10	4675.000	2457.000	71.506	2218.000	28.494	13.392	9.601	0.474
11	4375.000	1838.000	53.708	2537.000	46.292	16.202	13.903	0.580
12	5193.000	3055.000	59.897	2138.000	40.103	27.270	11.301	0.412
13	2885.000	1582.000	57.361	1303.000	42.639	14.924	7.221	0.452
14	2445.000	956.000	50.908	1489.000	49.092	16.691	10.731	0.609
15	1391.000	1390.000	99.999	1.000	0.001	0.000	0.000	0.001
16	3055.000	1738.000	49.336	1317.000	50.664	11.146	9.012	0.431
17	6410.000	6343.000	99.688	67.000	0.312	0.012	0.171	0.010
18	5408.000	1759.000	39.699	3649.000	60.301	38.593	17.782	0.675
19	12835.000	9379.000	73.691	3456.000	26.309	9.734	10.647	0.269
20	6996.000	3220.000	54.589	3776.000	45.411	19.527	15.352	0.540
21	5066.000	5056.000	99.960	10.000	0.040	0.003	0.022	0.002
22	8212.000	3268.000	52.541	4944.000	47.459	38.442	20.016	0.602
23	6517.000	2896.000	48.185	3621.000	51.815	24.871	16.511	0.556
24	4573.000	2564.000	55.627	2009.000	44.373	14.199	10.791	0.439
25	4314.000	2147.000	42.791	2167.000	57.209	18.879	14.001	0.502
26	7964.000	4107.000	56.302	3857.000	43.698	29.278	19.324	0.484
27	32.000	27.000	573.000	570.000	99.997	3.000	0.003	0.005

No.								DNA
	Comet	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	Area (px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
28	6442.000	4786.000	76.185	1656.000	23.815	6.192	6.951	0.257
29	1506.000	1325.000	86.638	181.000	13.362	2.272	1.876	0.120
30	1178.000	952.000	73.380	226.000	26.620	1.597	2.913	0.192
31	2411.000	884.000	46.006	1527.000	53.994	21.058	11.079	0.633
32	1760.000	712.000	50.613	1048.000	49.387	12.347	9.010	0.595
33	1412.000	575.000	59.560	837.000	40.440	10.514	7.790	0.593
34	31.000	39.000	927.000	926.000	99.998	1.000	0.002	0.001
35	1865.000	752.000	49.314	1113.000	50.686	22.302	10.385	0.597
36	3693.000	1916.000	78.130	1777.000	21.870	9.404	6.504	0.481
37	7163.000	3478.000	59.812	3685.000	40.188	24.515	12.196	0.514
38	8339.000	3309.000	57.339	5030.000	42.661	32.849	19.366	0.603
39	1934.000	790.000	64.063	1144.000	35.937	13.656	7.445	0.592
40	3028.000	1430.000	53.980	1598.000	46.020	19.789	10.880	0.528
41	5177.000	2767.000	45.944	2410.000	54.056	29.190	17.481	0.466
42	6731.000	3970.000	59.218	2761.000	40.782	20.391	11.955	0.410
43	2265.000	1270.000	75.794	995.000	24.206	6.294	5.169	0.439
44	1940.000	864.000	77.471	1076.000	22.529	6.308	5.198	0.555
45	7452.000	2963.000	64.330	4489.000	35.670	16.408	11.242	0.602
46	2655.000	2445.000	88.087	210.000	11.913	0.953	1.333	0.079
47	2694.000	2062.000	80.361	632.000	19.639	3.339	3.518	0.235
48	3693.000	1384.000	68.732	2309.000	31.268	14.696	7.732	0.625
49	11469.000	4119.000	39.954	7350.000	60.046	52.840	22.561	0.641
50	42.000	40.000	1190.000	1187.000	76.878	3.000	23.122	0.003
					DNA migratio ratio			0.411
					%DNA damage			41.1245
					SD			0.211983

ตารางผนวกที่ ๔ ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 1 ระยะเวลา 288 ชั่วโมง

No.								DNA
	Comet	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	Area (px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
1	4223.000	1938.000	42.963	2285.000	57.037	24.526	14.666	0.541
2	4362.000	2176.000	66.385	2186.000	33.615	20.841	10.917	0.501
3	2645.000	991.000	48.584	1654.000	51.416	21.595	11.762	0.625
4	5523.000	3261.000	69.288	2262.000	30.712	13.206	9.200	0.410
5	3992.000	2662.000	71.379	1330.000	28.621	4.293	7.391	0.333
6	6210.000	3320.000	36.884	2890.000	63.116	34.083	20.743	0.465
7	3156.000	2418.000	71.442	738.000	28.558	7.140	6.539	0.234
8	5649.000	3187.000	53.071	2462.000	46.929	24.403	13.636	0.436
9	6958.000	2506.000	43.424	4452.000	56.576	37.340	16.336	0.640
10	10720.000	4137.000	47.108	6583.000	52.892	39.669	22.022	0.614
11	4552.000	2184.000	53.038	2368.000	46.962	16.906	13.223	0.520
12	7368.000	2762.000	33.648	4606.000	66.352	40.475	23.522	0.625
13	10462.000	2908.000	30.834	7554.000	69.166	47.724	29.333	0.722
14	5918.000	2033.000	25.754	3885.000	74.246	40.093	24.781	0.656
15	7392.000	3776.000	45.497	3616.000	54.503	15.806	14.350	0.489
16	5728.000	3494.000	55.744	2234.000	44.256	25.226	14.142	0.390
17	5878.000	1125.000	15.458	4753.000	84.542	60.025	36.671	0.809
18	6047.000	2585.000	46.660	3462.000	53.340	28.804	22.439	0.573
19	9806.000	6370.000	65.462	3436.000	34.538	17.614	17.335	0.350
20	9905.000	5368.000	53.531	4537.000	46.469	32.993	27.225	0.458
21	3271.000	1482.000	48.495	1789.000	51.505	39.144	27.460	0.547
22	14090.000	1761.000	10.644	12329.000	89.356	142.076	69.575	0.875
23	17837.000	439.000	2.408	17398.000	97.592	186.401	92.219	0.975
24	7928.000	3862.000	40.725	4066.000	59.275	34.380	23.283	0.513
25	8059.000	6272.000	74.168	1787.000	25.832	14.207	10.881	0.222
26	3916.000	1586.000	45.082	2330.000	54.918	19.771	16.054	0.595
27	6385.000	2187.000	34.680	4198.000	65.320	47.030	34.278	0.657

No.	Comet							DNA
	Area	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	(px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
28	1859.000	898.000	57.550	961.000	42.450	11.886	11.754	0.517
29	2233.000	950.000	41.629	1283.000	58.371	14.009	19.181	0.575
30	3578.000	1729.000	62.383	1849.000	37.617	21.818	17.159	0.517
31	3024.000	1128.000	41.500	1896.000	58.500	18.720	15.271	0.627
32	7314.000	1804.000	22.494	5510.000	77.506	51.929	34.261	0.753
33	3270.000	694.000	23.316	2576.000	76.684	36.041	23.984	0.788
34	2798.000	846.000	42.176	1952.000	57.824	17.926	18.157	0.698
35	2212.000	734.000	47.442	1478.000	52.559	16.819	13.232	0.668
36	3394.000	951.000	34.715	2443.000	65.285	28.072	19.961	0.720
37	1998.000	659.000	41.664	1339.000	58.336	22.168	13.356	0.670
38	3141.000	924.000	32.599	2217.000	67.401	27.634	18.561	0.706
39	3949.000	1460.000	42.022	2489.000	57.978	26.090	17.286	0.630
40	3516.000	1222.000	49.018	2294.000	50.982	39.766	23.893	0.652
41	6814.000	642.000	10.195	6172.000	89.805	95.193	42.038	0.906
42	3985.000	924.000	30.371	3061.000	69.629	50.133	23.981	0.768
43	5195.000	936.000	21.957	4259.000	78.043	51.509	33.460	0.820
44	6157.000	997.000	16.551	5160.000	83.449	60.083	37.729	0.838
45	2672.000	1990.000	77.752	682.000	22.248	2.225	4.954	0.255
46	2870.000	930.000	44.404	1940.000	55.596	23.906	16.961	0.676
47	2690.000	1432.000	56.614	1258.000	43.386	12.148	11.659	0.468
48	1717.000	592.000	52.127	1125.000	47.873	13.883	11.515	0.655
49	2551.000	1568.000	69.563	983.000	30.437	5.783	7.541	0.385
50	2428.000	1185.000	53.757	1243.000	46.243	12.948	10.681	0.512
					DNA migration ratio			0.592
					% DNA damage			59.160
					SD			0.170737

ตารางผนวกที่ ข5 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น
ร้อยละ 5 ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

No.	Comet							DNA
	Area	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	(px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
1	29.000	29.000	829.000	816.000	86.598	13.000	13.402	0.016
2	28.000	32.000	619.000	504.000	91.515	115.000	8.485	0.186
3	49.000	41.000	1704.000	1450.000	69.396	254.000	30.604	0.149
4	39.000	40.000	741.000	564.000	75.853	177.000	24.147	0.239
5	28.000	23.000	506.000	346.000	63.135	160.000	36.865	0.316
6	30.000	30.000	701.000	506.000	71.319	195.000	28.681	0.278
7	29.000	21.000	376.000	290.000	86.795	86.000	13.205	0.229
8	35.000	33.000	509.000	483.000	99.599	26.000	0.401	0.051
9	54.000	46.000	1975.000	1956.000	99.814	19.000	0.186	0.010
10	20.000	19.000	287.000	222.000	82.595	65.000	17.405	0.226
11	24.000	31.000	500.000	389.000	63.871	111.000	36.129	0.222
12	36.000	42.000	1103.000	973.000	94.918	130.000	5.082	0.118
13	51.000	41.000	1617.000	1528.000	95.754	89.000	4.246	0.055
14	22.000	21.000	367.000	260.000	73.678	107.000	26.322	0.292
15	24.000	31.000	500.000	412.000	91.425	88.000	8.575	0.176
16	25.000	22.000	403.000	262.000	58.864	141.000	41.136	0.350
17	42.000	28.000	862.000	732.000	84.702	130.000	15.298	0.151
18	61.000	47.000	2045.000	1964.000	69.634	81.000	30.366	0.040
19	51.000	36.000	1180.000	846.000	72.871	334.000	27.129	0.283
20	21.000	22.000	328.000	188.000	63.635	140.000	36.365	0.427
21	18.000	16.000	204.000	170.000	87.347	34.000	12.653	0.167
22	34.000	33.000	826.000	678.000	82.279	148.000	17.721	0.179
23	33.000	30.000	710.000	627.000	98.800	83.000	1.200	0.117
24	22.000	22.000	373.000	340.000	95.785	33.000	4.215	0.088
25	24.000	23.000	414.000	360.000	92.284	54.000	7.716	0.130
26	39.000	29.000	730.000	648.000	80.448	82.000	19.552	0.112
27	31.000	25.000	540.000	404.000	78.778	136.000	21.222	0.252

No.	Comet							DNA
	Area	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	(px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
28	27.000	26.000	514.000	445.000	91.564	69.000	8.436	0.134
29	31.000	39.000	927.000	926.000	99.998	1.000	0.002	0.001
30	21.000	22.000	328.000	260.000	77.848	68.000	22.152	0.207
31	19.000	16.000	231.000	154.000	66.110	77.000	33.890	0.333
32	45.000	48.000	1170.000	1109.000	64.414	61.000	35.586	0.052
33	19.000	18.000	279.000	136.000	44.130	143.000	55.870	0.513
34	18.000	22.000	318.000	204.000	63.802	114.000	36.198	0.358
35	21.000	18.000	292.000	112.000	29.493	180.000	70.507	0.616
36	28.000	27.000	596.000	590.000	99.833	6.000	0.167	0.010
37	36.000	30.000	817.000	796.000	96.991	21.000	3.009	0.026
38	42.000	40.000	1190.000	1187.000	76.878	3.000	23.122	0.003
39	26.000	32.000	599.000	418.000	58.816	181.000	41.184	0.302
40	22.000	21.000	369.000	194.000	46.049	175.000	53.951	0.474
41	25.000	29.000	546.000	422.000	78.341	124.000	21.659	0.227
42	19.000	19.000	304.000	196.000	63.463	108.000	36.537	0.355
43	23.000	23.000	376.000	306.000	84.161	70.000	15.839	0.186
44	18.000	18.000	238.000	185.000	78.614	53.000	21.386	0.223
45	17.000	15.000	197.000	120.000	55.689	77.000	44.311	0.391
46	32.000	27.000	573.000	570.000	99.997	3.000	0.003	0.005
47	28.000	20.000	429.000	330.000	84.631	99.000	15.369	0.231
48	27.000	33.000	563.000	488.000	87.824	75.000	12.176	0.133
49	63.000	58.000	2201.000	1798.000	85.551	403.000	14.449	0.183
50	26.000	32.000	599.000	418.000	58.816	181.000	41.184	0.302
					DNA migration ratio			0.200
					% DNA damage			20.034
					SD			0.141

ตารางผนวกที่ ข6 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 5 ระยะเวลา 144 ชั่วโมง

No.	Comet							DNA
	Area	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	(px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
1	124.000	67.000	8298.000	8110.000	60.629	188.000	39.371	0.023
2	99.000	64.000	6336.000	6335.000	99.560	1.000	0.440	0.000
3	54.000	66.000	3564.000	3563.000	87.179	1.000	12.821	0.000
4	16.000	16.000	198.000	154.000	87.137	44.000	12.863	0.222
5	49.000	39.000	1911.000	1910.000	99.419	1.000	0.581	0.001
6	61.000	56.000	3416.000	3415.000	99.546	1.000	0.454	0.000
7	70.000	60.000	4200.000	4199.000	83.215	1.000	16.785	0.000
8	73.000	35.000	686.000	563.000	95.371	123.000	4.629	0.179
9	17.000	14.000	177.000	172.000	99.966	5.000	0.034	0.028
10	99.000	58.000	1729.000	742.000	32.257	987.000	67.743	0.571
11	16.000	15.000	187.000	186.000	99.994	1.000	0.006	0.005
12	94.000	57.000	1680.000	759.000	39.837	921.000	60.163	0.548
13	59.000	44.000	1682.000	1543.000	73.452	139.000	26.548	0.083
14	12.000	10.000	92.000	56.000	39.230	36.000	60.770	0.391
15	69.000	49.000	978.000	977.000	99.996	1.000	0.004	0.001
16	58.000	43.000	483.000	304.000	76.595	179.000	23.405	0.371
17	142.000	69.000	4394.000	1124.000	32.669	3270.000	67.331	0.744
18	56.000	52.000	712.000	644.000	57.719	68.000	42.281	0.096
19	22.000	24.000	362.000	242.000	60.455	120.000	39.545	0.331
20	22.000	18.000	286.000	230.000	96.651	56.000	3.349	0.196
21	30.000	28.000	564.000	208.000	69.877	356.000	30.123	0.631
22	18.000	16.000	212.000	144.000	61.644	68.000	38.356	0.321
23	17.000	17.000	231.000	226.000	99.794	5.000	0.206	0.022
24	48.000	35.000	685.000	410.000	45.821	275.000	54.179	0.401
25	39.000	42.000	402.000	389.000	99.824	13.000	0.176	0.032
26	48.000	44.000	910.000	644.000	66.353	266.000	33.647	0.292
27	44.000	46.000	688.000	400.000	30.360	288.000	69.640	0.419

ตารางผนวกที่ ๗ ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 5 ระยะเวลา 216 ชั่วโมง

No.	Comet							DNA
	Area	Head	%DNA in	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	(px)	Area (px)	Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
1	19.000	21.000	292.000	178.000	57.179	114.000	42.821	0.390
2	32.000	30.000	683.000	498.000	65.884	185.000	34.116	0.271
3	143.000	84.000	5779.000	1960.000	31.462	3819.000	68.538	0.661
4	39.000	45.000	774.000	588.000	74.753	186.000	25.247	0.240
5	16.000	20.000	261.000	122.000	36.607	139.000	63.393	0.533
6	20.000	20.000	314.000	272.000	94.990	42.000	5.010	0.134
7	23.000	22.000	389.000	244.000	59.264	145.000	40.736	0.373
8	93.000	70.000	5154.000	1566.000	33.260	3588.000	66.740	0.696
9	144.000	97.000	8567.000	2290.000	26.964	6277.000	73.036	0.733
10	107.000	66.000	5626.000	1708.000	37.949	3918.000	62.051	0.696
11	44.000	36.000	1045.000	616.000	81.808	429.000	18.192	0.411
12	155.000	102.000	7751.000	924.000	16.879	6827.000	83.121	0.881
13	147.000	78.000	3036.000	198.000	13.814	2838.000	86.186	0.935
14	171.000	109.000	10770.000	1944.000	16.663	8826.000	83.337	0.819
15	90.000	69.000	4378.000	950.000	21.181	3428.000	78.819	0.783
16	12.000	13.000	126.000	46.000	27.166	80.000	72.834	0.635
17	179.000	78.000	12026.000	5890.000	37.682	6136.000	62.318	0.510
18	169.000	97.000	11297.000	2229.000	15.660	9068.000	84.340	0.803
19	144.000	76.000	4473.000	2078.000	56.542	2395.000	43.458	0.535
20	31.000	25.000	554.000	470.000	89.310	84.000	10.690	0.152
21	18.000	23.000	313.000	200.000	62.211	113.000	37.789	0.361
22	88.000	57.000	1895.000	1875.000	99.386	20.000	0.614	0.011
23	145.000	103.000	10775.000	4181.000	30.690	6594.000	69.310	0.612
24	27.000	24.000	474.000	473.000	99.998	1.000	0.002	0.002
25	127.000	88.000	6367.000	1788.000	35.175	4579.000	64.825	0.719
26	150.000	78.000	7189.000	1338.000	26.516	5851.000	73.484	0.814
27	86.000	75.000	6450.000	6449.000	66.112	1.000	33.888	0.000

ตารางผนวกที่ ข8 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น
ร้อยละ 5 ระยะเวลา 288 ชั่วโมง

No.	Comet							DNA
	Area	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	(px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
1	101	70	4531	1600	46.634	2931.000	53.366	0.647
2	123	71	6015	2402	44.469	3613.000	55.531	0.601
3	103	61	4350	1494	28.013	2856.000	71.987	0.657
4	103	71	4825	1170	29.113	3655.000	70.887	0.758
5	118	64	5173	1208	33.879	3965.000	66.121	0.766
6	129	69	6957	1977	31.391	4980.000	68.609	0.716
7	70	70	4017	2550	77.717	1467.000	22.283	0.365
8	70	54	2958	1572	58.254	1386.000	41.746	0.469
9	107	66	4200	1166	44.865	3034.000	55.136	0.722
10	111	81	5209	2723	47.308	2486.000	52.692	0.477
11	141	69	3472	1052	49.102	2420.000	50.898	0.697
12	97	65	5212	1894	34.788	3318.000	65.212	0.637
13	113	76	5286	1466	32.866	3820.000	67.134	0.723
14	78	66	3911	1450	29.691	2461.000	70.309	0.629
15	123	74	6061	1443	23.363	4618.000	76.637	0.762
16	128	81	6839	3954	66.127	2885.000	33.873	0.422
17	94	50	2313	970	54.239	1343.000	45.761	0.581
18	83	73	3931	1596	42.871	2335.000	57.129	0.594
19	146	88	9305	4458	35.399	4847.000	64.601	0.521
20	110	86	9428	9032	45.264	396.000	54.736	0.042
21	119	78	8230	4467	45.879	3763.000	54.121	0.457
22	130	74	5678	3105	57.223	2573.000	42.777	0.453
23	139	103	10281	4635	40.779	5646.000	59.221	0.549
24	152	85	10899	3068	31.572	7831.000	68.428	0.719
25	122	80	6263	2188	39.437	4075.000	60.563	0.651
26	142	82	7483	2176	21.118	5307.000	78.882	0.709
27	82	57	3697	1452	48.126	2245.000	51.874	0.607

ตารางผนวกที่ ข9 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น
ร้อยละ 10 ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

No.	Comet							DNA
	Area	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	(px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
1	227.000	226.000	99.996	1.000	0.004	0.000	0.000	0.004
2	795.000	560.000	70.218	235.000	29.782	2.680	3.246	0.296
3	834.000	833.000	99.035	1.000	0.965	0.000	0.109	0.001
4	611.000	474.000	75.224	137.000	24.776	1.239	1.965	0.224
5	449.000	448.000	99.998	1.000	0.002	0.000	0.000	0.002
6	1060.000	965.000	89.821	95.000	10.179	0.000	0.746	0.090
7	375.000	280.000	71.233	95.000	28.767	1.438	1.707	0.253
8	765.000	616.000	81.123	149.000	18.877	1.510	1.736	0.195
9	686.000	380.000	47.831	306.000	52.169	4.174	3.907	0.446
10	313.000	312.000	99.996	1.000	0.004	0.000	0.000	0.003
11	1024.000	942.000	92.147	82.000	7.853	0.157	0.845	0.080
12	640.000	492.000	76.144	148.000	23.856	0.954	1.859	0.231
13	1286.000	1277.000	99.999	9.000	0.001	0.000	0.000	0.007
14	491.000	476.000	95.499	15.000	4.501	0.045	0.334	0.031
15	388.000	336.000	84.671	52.000	15.329	0.307	0.912	0.134
16	1346.000	1274.000	95.352	72.000	4.648	0.000	0.464	0.053
17	796.000	676.000	85.326	120.000	14.674	0.293	1.219	0.151
18	1060.000	1024.000	89.909	36.000	10.091	0.000	0.900	0.034
19	468.000	406.000	80.124	62.000	19.876	0.596	1.358	0.132
20	557.000	442.000	87.924	115.000	12.076	0.483	1.196	0.206
21	642.000	641.000	98.812	1.000	1.188	0.000	0.034	0.002
22	569.000	496.000	84.455	73.000	15.545	0.466	1.138	0.128
23	709.000	624.000	87.512	85.000	12.488	0.375	1.185	0.120
24	738.000	706.000	98.487	32.000	1.513	0.015	0.151	0.043
25	647.000	646.000	99.857	1.000	0.143	0.000	0.003	0.002
26	848.000	788.000	89.706	60.000	10.294	0.206	0.981	0.071
27	787.000	640.000	68.891	147.000	31.109	1.555	2.302	0.187

No.	Comet							DNA
	Area	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	(px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
28	660.000	647.000	99.362	13.000	0.638	0.013	0.074	0.020
29	606.000	590.000	99.459	16.000	0.541	0.005	0.066	0.026
30	1423.000	668.000	70.454	755.000	29.546	14.182	4.738	0.531
31	4767.000	1781.000	41.172	2986.000	58.828	28.238	18.490	0.626
32	4368.000	1262.000	35.016	3106.000	64.984	32.492	21.391	0.711
33	1343.000	554.000	54.603	789.000	45.397	16.343	5.771	0.587
34	3179.000	1988.000	78.016	1191.000	21.984	4.836	5.856	0.375
35	6993.000	1714.000	29.648	5279.000	70.352	63.317	28.795	0.755
36	4091.000	894.000	23.901	3197.000	76.099	41.094	26.420	0.781
37	4423.000	2000.000	46.221	2423.000	53.779	19.898	15.105	0.548
38	7289.000	2206.000	32.800	5083.000	67.200	54.432	28.403	0.697
39	5128.000	2546.000	63.307	2582.000	36.693	21.649	13.118	0.504
40	4451.000	2614.000	51.439	1837.000	48.561	12.140	11.954	0.413
41	5566.000	1674.000	52.836	3892.000	47.164	27.355	17.551	0.699
42	4649.000	2766.000	56.715	1883.000	43.285	11.687	11.547	0.405
43	4274.000	1304.000	41.842	2970.000	58.158	29.079	18.861	0.695
44	4763.000	1394.000	32.577	3369.000	67.423	37.757	21.065	0.707
45	3545.000	818.000	42.460	2727.000	57.540	34.524	19.609	0.769
46	4052.000	2936.000	78.621	1116.000	21.379	4.490	5.746	0.275
47	3313.000	2065.000	82.899	1248.000	17.101	3.933	5.262	0.377
48	4750.000	2652.000	52.250	2098.000	47.750	18.145	11.944	0.442
49	4176.000	3058.000	80.902	1118.000	19.098	4.583	5.230	0.268
50	660.000	647.000	99.362	13.000	0.638	0.013	0.074	0.020
					DNA migratio ratio			0.287
					%DNA damage			28.717
					SD			0.260753

ตารางผนวกที่ ข10 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น
ร้อยละ 10 ระยะเวลา 144 ชั่วโมง

No.								DNA
	Comet	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	Area (px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
1	2841.000	440.000	25.873	2401.000	74.127	41.511	22.031	0.845
2	8837.000	2088.000	31.001	6749.000	68.999	62.099	25.036	0.764
3	12288.000	5092.000	40.030	7196.000	59.970	38.381	22.597	0.586
4	1108.000	899.000	64.143	209.000	35.857	3.944	3.789	0.189
5	1805.000	1617.000	92.656	188.000	7.344	0.294	1.206	0.104
6	1117.000	1116.000	99.999	1.000	0.001	0.000	0.000	0.001
7	3234.000	1146.000	52.044	2088.000	47.956	19.662	12.970	0.646
8	3466.000	1468.000	73.116	1998.000	26.884	12.098	8.517	0.576
9	1503.000	1114.000	95.789	389.000	4.211	0.842	1.017	0.259
10	5457.000	2488.000	56.136	2969.000	43.864	19.739	15.126	0.544
11	307.000	136.000	34.866	171.000	65.134	5.211	3.742	0.557
12	619.000	600.000	99.245	19.000	0.755	0.000	0.034	0.031
13	3229.000	620.000	41.177	2609.000	58.823	48.235	18.247	0.808
14	9839.000	8795.000	92.090	1044.000	7.910	0.554	2.210	0.106
15	5714.000	1988.000	39.912	3726.000	60.088	35.452	18.577	0.652
16	1388.000	1324.000	99.272	64.000	0.728	0.000	0.159	0.046
17	3294.000	278.000	22.243	3016.000	77.757	69.204	32.430	0.916
18	1027.000	1026.000	99.999	1.000	0.001	0.000	0.000	0.001
19	705.000	628.000	96.182	77.000	3.818	0.038	0.183	0.109
20	2445.000	1959.000	82.351	486.000	17.649	1.412	3.508	0.199
21	2561.000	2492.000	90.667	69.000	9.333	0.093	1.205	0.027
22	1231.000	1158.000	88.649	73.000	11.351	0.114	1.202	0.059
23	2894.000	988.000	43.673	1906.000	56.327	23.657	16.082	0.659
24	556.000	366.000	65.861	190.000	34.139	2.731	3.337	0.342
25	334.000	258.000	74.501	76.000	25.499	1.020	1.783	0.228
26	1494.000	1276.000	91.761	218.000	8.239	0.412	1.508	0.146
27	308.000	258.000	87.994	50.000	12.006	0.360	0.906	0.162

ตารางผนวกที่ ข11 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 10 ระยะเวลา 216 ชั่วโมง

No.								DNA
	Comet	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration
	Area (px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	ratio
1	2354.000	1558.000	62.237	796.000	37.763	6.042	7.496	0.338
2	497.000	434.000	85.461	63.000	14.539	0.436	1.083	0.127
3	468.000	446.000	95.399	22.000	4.601	0.046	0.342	0.047
4	927.000	842.000	87.017	85.000	12.983	0.390	1.319	0.092
5	1817.000	1816.000	98.942	1.000	1.058	0.000	0.073	0.001
6	395.000	394.000	99.998	1.000	0.002	0.000	0.000	0.003
7	398.000	302.000	77.763	96.000	22.237	1.112	1.667	0.241
8	523.000	522.000	99.998	1.000	0.002	0.000	0.000	0.002
9	258.000	257.000	99.997	1.000	0.003	0.000	0.000	0.004
10	375.000	350.000	94.461	25.000	5.539	0.055	0.360	0.067
11	318.000	282.000	91.313	36.000	8.687	0.174	0.636	0.113
12	1791.000	1300.000	82.212	491.000	17.788	1.957	2.314	0.274
13	484.000	459.000	95.275	25.000	4.725	0.047	0.301	0.052
14	241.000	218.000	90.049	23.000	9.951	0.100	0.349	0.095
15	1253.000	798.000	54.540	455.000	45.460	5.001	5.190	0.363
16	513.000	432.000	85.542	81.000	14.458	0.578	1.130	0.158
17	27228.000	3120.000	15.680	24108.000	84.320	137.442	71.629	0.885
18	341.000	332.000	99.677	9.000	0.323	0.000	0.025	0.026
19	3826.000	1945.000	79.738	1881.000	20.262	9.726	7.541	0.492
20	4373.000	2111.000	66.981	2262.000	33.019	13.538	10.057	0.517
21	8683.000	580.000	8.278	8103.000	91.722	118.321	65.732	0.933
22	7369.000	696.000	31.335	6673.000	68.665	92.011	50.559	0.906
23	1060.000	993.000	77.619	67.000	22.381	0.000	1.932	0.063
24	486.000	388.000	78.817	98.000	21.183	0.635	1.555	0.202
25	5639.000	1912.000	32.593	3727.000	67.407	34.377	23.070	0.661
26	3432.000	960.000	32.248	2472.000	67.752	44.039	19.222	0.720
27	4764.000	1638.000	32.881	3126.000	67.119	38.258	20.669	0.656

ตารางผนวกที่ ข12 ระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชเมื่อสัมผัสกับก๊าซมีเทนความเข้มข้น
ร้อยละ 10 ระยะเวลา 288 ชั่วโมง

No.								DNA
	Comet	Head	%DNA	Tail Area	%DNA	Tail	Olive	migration ratio
	Area (px)	Area (px)	in Head	(px)	in Tail	Moment	Moment	
1	3911.000	1542.000	44.985	2369.000	55.015	19.805	14.986	0.606
2	5294.000	982.000	14.625	4312.000	85.375	54.640	28.196	0.815
3	2038.000	364.000	27.804	1674.000	72.196	30.323	18.169	0.821
4	5018.000	1386.000	45.896	3632.000	54.104	25.970	18.281	0.724
5	2500.000	656.000	34.331	1844.000	65.669	27.581	17.315	0.738
6	3974.000	3186.000	81.439	788.000	18.561	1.856	4.803	0.198
7	10726.000	3041.000	39.774	7685.000	60.226	52.999	26.696	0.716
8	6228.000	2234.000	31.529	3994.000	68.471	39.028	20.955	0.641
9	5418.000	2138.000	61.263	3280.000	38.737	17.044	14.688	0.605
10	5337.000	2866.000	51.552	2471.000	48.448	23.255	13.404	0.463
11	4857.000	1364.000	32.172	3493.000	67.828	32.557	20.437	0.719
12	6537.000	3296.000	66.300	3241.000	33.700	17.187	12.327	0.496
13	5639.000	2192.000	40.867	3447.000	59.133	33.114	18.990	0.611
14	12884.000	3129.000	33.634	9755.000	66.366	66.366	34.076	0.757
15	4661.000	1042.000	37.919	3619.000	62.081	36.628	23.819	0.776
16	3890.000	846.000	23.827	3044.000	76.173	43.419	21.584	0.783
17	4451.000	2762.000	59.604	1689.000	40.396	15.350	10.625	0.379
18	7317.000	1118.000	19.732	6199.000	80.268	69.833	36.424	0.847
19	2790.000	796.000	22.520	1994.000	77.480	30.992	17.846	0.715
20	5666.000	1217.000	32.563	4449.000	67.437	45.857	29.036	0.785
21	3796.000	1412.000	41.856	2384.000	58.144	23.258	16.629	0.628
22	4814.000	2040.000	53.074	2774.000	46.926	20.178	13.231	0.576
23	5734.000	3205.000	46.557	2529.000	53.443	24.584	13.878	0.441
24	2269.000	1002.000	49.300	1267.000	50.700	13.689	9.746	0.558
25	5038.000	706.000	26.005	4332.000	73.995	59.936	26.840	0.860
26	2951.000	1244.000	72.672	1707.000	27.328	10.931	8.944	0.578
27	4847.000	1852.000	54.386	2995.000	45.614	22.351	16.945	0.618

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารเคมี

1. 200 mM EDTA (Stock Solution)

ละลาย Ethelenediamine tetraacetic acid (EDTA) disodium salt 37.224 กรัมในน้ำ
กลั่นปรับปริมาตร เป็น 500 มิลลิลิตร

2. PBS x1

ละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

- NaCl	8	กรัม
- Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
- KCl	0.2	กรัม
- KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วนำสารละลายที่เตรียมไว้ไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็น)

3. Sorensen Buffer (50 mM KH₂PO₄ : 136.09 , 50 mM Na₂HPO₄ 12 H₂O : 358.14 , 0.1 mM EDTA : 372.24 , 0.5% DMSO , pH 6.8)

ละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็น)

- KH ₂ PO ₄	6.805	กรัม
- Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	17.907	กรัม
- 200 mM EDTA sol	0.5	มิลลิลิตร
- DMSO	5	มิลลิลิตร

4. Lysis solution (2.5 M NaCl , 100 mM EDTA , 10 mM Trizma Base)

ละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร

- NaCl	146.1	กรัม
- EDTA	37.2	กรัม
- Trizma base	1.2	กรัม คนให้เข้ากัน

ผสม NaOH 8 กรัม แล้วคนอีก 20 นาที ปรับ pH 10 (โดยใช้ con. HCl or NaOH)

ปรับปริมาตรให้ได้ 890 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายไว้ในอุณหภูมิห้อง

5. Neutralisation Buffer

ละลาย Trizma 48.5 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย con. HCl
คนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. Syber safe green (สีเขียวอม)

เจือจาง SYBR® Green stock ใน TE Buffer (pH 7.5-8) ให้ได้สัดส่วน 1:10000
(1 μ l SYBR® Green ใน TE buffer 10 ml)

ภาคผนวก จ

เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ สิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 7

เรื่อง การใช้วิธี โคมะทในพืชติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอย

การใช้วิธีโคเมทในพืชติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพ และน้ำชะมูลฝอย

Use of Plant Comet Assay as a Monitoring Method for Landfill Gas and Leachate Impact

Praditha Na Roi-et*, Wilai Chiemchaisri** and Chart Chiemchaisri**

ประดิษฐา ณ ร้อยเอ็ด* วิลัย เจียมไชยศรี** และ ชาร์ต เจียมไชยศรี**

*นิสิตบัณฑิตศึกษา ; **รองศาสตราจารย์ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

*โทรสาร : 0-2579-0730, โทรศัพท์ : 0-2942-8555, E-mail : g4865210@ku.ac.th, fengwlc@ku.ac.th

Received 22 January 2008 ; received in revised form 20 February 2008 ; accepted 22 February 2008

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้วิธีโคเมท (comet assay) ในการติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอยต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งใช้ระดับการทำลายดีเอ็นเอของพืชเป็นตัวชี้วัด การทดลองชุดที่ 1 ทำการปลูกพลูด่าง (*Epipremnum aureum*) ให้เจริญเติบโตภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซชีวภาพผสมอยู่ในระดับความเข้มข้นของมีเทนร้อยละ 0, 1, 5 และ 10 แล้วทดสอบพืชอีก 2 ชนิด คือ ต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*), และหญ้าโคสโครส (*Spoloborus virginicus*) ในสถานะที่มีมีเทนร้อยละ 1 เพื่อหาพืชที่เหมาะสมกับการเป็นดัชนีชี้วัด การทดลองที่ 2 ปลูกพืชในน้ำชะมูลฝอยสองลักษณะ คือ น้ำชะมูลฝอยสดและน้ำชะมูลฝอยเก่า ซึ่งทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของชีโอดีเท่ากับ 100, 1,000 และ 10,000 ตามลำดับ และตรวจวัดระดับการทำลายดีเอ็นเอโดยใช้วิธีโคเมทตลอดระยะเวลาการทดลอง

ผลการทดลองพบว่าการทำลายดีเอ็นเอของพืชมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อพืชได้สัมผัสก๊าซชีวภาพที่มีความเข้มข้นสูงมากขึ้นและมีระยะเวลาในการสัมผัสมากขึ้น พบระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของใบพลูด่างสูงสุดเท่ากับร้อยละ 62 ± 0.20 ที่ระดับความเข้มข้นของมีเทนในบรรยากาศร้อยละ 10 ที่มีระยะเวลาสัมผัส 288 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอของใบพลูด่าง ในแต่ละระดับความเข้มข้นของมีเทนพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแตกต่างกันมากที่สุด ที่ระยะเวลาสัมผัส 72 ชั่วโมง ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบพืชที่ใช้ทดสอบทั้งสามชนิดพบว่า หญ้าโคสโครส เป็นพืชที่เหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดผลกระทบจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย การทดสอบด้วยน้ำชะมูลฝอย พบว่าแนวโน้มของการทำลายดีเอ็นเอมีทิศทางเดียวกันกับก๊าซชีวภาพ แต่มีระดับการทำลายต่ำกว่าที่ระยะเวลาสัมผัสใกล้เคียงกัน และน้ำชะมูลฝอยสดให้ระดับการทำลายดีเอ็นเอสูงกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่าที่ค่าความเข้มข้นของชีโอดีเท่ากัน ผลที่ได้จากการวิจัยสรุปได้ว่าวิธีโคเมทในพืชสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามและบอกระดับของผลกระทบเนื่องจากก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอยได้ดี

คำสำคัญ : ดัชนีทางชีวภาพ; พื้นที่ฝังกลบมูลฝอย; น้ำชะมูลฝอย; วิธีโคเมท; มีเทน; พืช

Abstract

This study aims to investigate the application of plant comet assay, a DNA damage determination, as the monitoring method for landfill gas and leachate impacts. In the first experiment, Pothos (*Epipremnum aureum*) had been growing in the stimulated-landfill atmospheric chamber which containing methane in various concentrations of 0, 1, 5 and 10%. To find appropriate plant species, Pothos with Periwinkle (*Catharanthus roseus*) and Coastcross (*Spoloborus virginicus*) had been grown in the same time under 1% methane. In the second experiment, Pothos had been grown in fresh and old leachates having the COD concentrations of 0, 100, 1000 and 10,000 mg/L. Plant leaves were examined for comet assay at interval time of experiments.

The results appeared that degrees of DNA damages of Pothos had tended to increase with the increasing concentration of methane and exposure time. Highest DNA damage of $62 \pm 0.20\%$ was found at 10% methane, 288 exposing hours. Comparison the damage levels at interval exposure times, it was found that at 72 hours there was the highest statistic differences ($P < 0.05$) in damage levels among various methane concentrations. Moreover, Coastcross was the best species for comet assay in this study. For leachate exposure, same trends of DNA damage as landfill gas exposure were found, however, the degrees of damages were lower at the same exposure time. Furthermore, fresh leachate gave more damages than old leachate at the same COD level. In summery, this study suggest that plant comet assay was an interesting method and applicable for monitoring impacts of landfill gas and leachate on livings.

Keywords : Biomonitoring; landfill; leachate; comet assay; methane; plant

บทนำ

การกำจัดขยะมูลฝอยที่ง่ายและประหยัดซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอยู่ทั่วไป คือ วิธีการฝังกลบ (Landfilling) แต่การกำจัดมูลฝอยด้วยวิธีดังกล่าวก่อให้เกิดมลพิษอื่นๆ ตามมา ได้แก่ การปล่อยก๊าซชีวภาพ (biogas or landfill gas) ซึ่งองค์ประกอบหลักจะประกอบด้วยก๊าซมีเทน (45-60%) และคาร์บอนไดออกไซด์ (40-50%) [1] นอกจากนี้ยังปล่อยน้ำชะมูลฝอย (leachate) สารพิษที่ชะละลายออกมาที่สำคัญ ได้แก่ โลหะหนัก สารอินทรีย์ในรูปต่างๆ และสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งสามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ผ่านห่วงโซ่อาหารเมื่อปนเปื้อนแหล่งน้ำผิวดิน น้ำบาดาลและดินในบริเวณใกล้เคียง ปัจจุบันการตรวจวัดผลกระทบของมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้สิ่งมีชีวิตในการติดตาม (biomonitoring) เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เนื่องจากมีข้อดีคือสามารถบอกระดับของผลกระทบของมลพิษที่เกิดขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตได้โดยตรง จึงนิยมใช้วิธีดังกล่าวมากขึ้นในพื้นที่เสี่ยงมลพิษ โดยใช้พืชหรือสัตว์เป็นดัชนีติดตาม แล้ววิเคราะห์ผลได้ทั้งจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือการเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุล วิธีโคเมท (comet assay หรือ single cell gel electrophoresis assay) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุลสามารถใช้ตรวจสอบมลพิษที่ทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลาย (DNA damage) โดยอาศัยหลักความแตกต่างของการเคลื่อนที่โมเลกุลดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า ดีเอ็นเอที่ถูกทำลายจะมีขนาดเล็กและกระจายตัวเป็นส่วนหาง (tail) ดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่ไม่ถูกทำลายจะจับกลุ่มรวมกันเป็นส่วนหัว (head) เมื่อนำมาเชื่อมด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ แล้วมองผ่านกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ของดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย มีลักษณะคล้ายดาวหาง ความยาวของเซลล์จะขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกทำลายภายในเซลล์ ถ้าเซลล์ใดดีเอ็นเอถูกทำลายมาก ก็จะทำให้เซลล์นั้นมีส่วนหางยาวมาก เซลล์ที่ดีเอ็นเอ

ไม่ถูกทำลายก็จะไม่มีส่วนหาง [2] จากการศึกษาพบว่า สามารถใช้วิธีโคเมทพีชในการตรวจติดตามและชี้วัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม เช่น มลพิษทางอากาศที่เกิดจากการจราจรบนท้องถนน มลพิษที่เกิดในบริเวณพื้นที่เตาเผาขยะ ดินที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เป็นต้นและพบว่าพีชที่สัมผัสกับมลพิษต่างๆ จะถูกทำลายดีเอ็นเอมากขึ้นเมื่อมีระยะสัมผัสมลพิษและความเข้มข้นของมลพิษมากขึ้น [3, 4, 5] งานวิจัยนี้จึงศึกษาความเป็นไปได้ของการนำวิธีโคเมทมาใช้วัดระดับการทำลายดีเอ็นเอของพีช สำหรับติดตามผลกระทบของมลพิษจากหลุมฝังกลบมูลฝอยชุมชน ได้แก่ ก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณก๊าซชีวภาพและความเข้มข้นของการปนเปื้อนน้ำชะมูลฝอยในน้ำต่อการทำลายดีเอ็นเอของพีช และหาพีชที่เหมาะสมกับการเป็นดัชนีชี้วัดและทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วยวิธีโคเมทสำหรับพีชที่เลือกใช้เป็นดัชนีชี้วัด [6, 7] โดยผลที่ได้จากการวิจัยสามารถนำมาเป็นข้อมูลสนับสนุนการนำวิธีการวิเคราะห์แบบโคเมทในพีชมาใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามและบอกระดับของผลกระทบเนื่องจากมลพิษที่เกิดขึ้นในบริเวณพื้นที่หลุมฝังกลบมูลฝอย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการประเมินผลกระทบและความเสี่ยงสิ่งแวดล้อม รวมถึงการกำหนดมาตรการในการควบคุมภาวะมลพิษในหลุมฝังกลบมูลฝอยและพื้นที่ใกล้เคียงในอนาคต

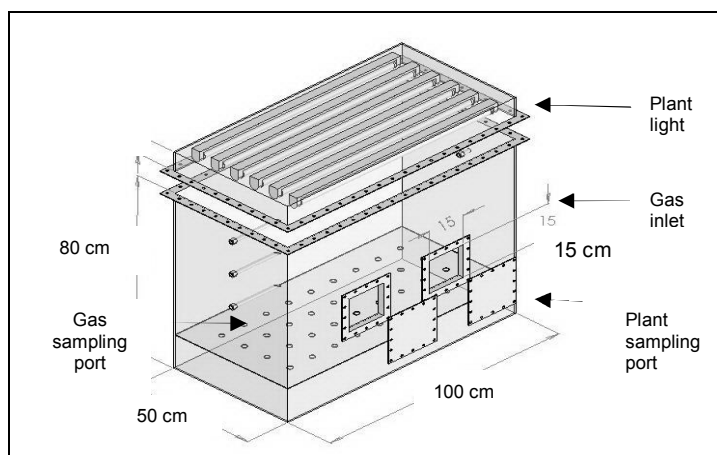
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมพีชที่ใช้ในการทดสอบ

นำต้นอ่อนของพีชที่ต้องการทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ พลุต่าง ต้นแพงพวยฝรั่ง และหญ้าโคสโครอสที่มีอายุ 15 วัน มาอนุบาลในกระถางพลาสติก ขนาดกว้าง 30 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร และสูง 30 เซนติเมตร จำนวน 6 กระถาง ในบริเวณที่สะอาดแล้วรดน้ำทุกวันเป็นเวลา 15 วันเมื่อพีชเจริญเติบโตและแข็งแรงดีแล้วคัดเลือกพีชที่มีความสูงเฉลี่ยประมาณ 20 เซนติเมตร นำไปใช้ทดสอบในการทดลองแต่ละชุด โดยยังเก็บส่วนหนึ่งไว้เป็นชุดควบคุม เพื่อให้อายุของพีชใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาการทดลอง

การทดสอบผลของก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอยต่อการทำลายดีเอ็นเอของพีช

นำพลุต่างจำนวน 20 ต้นที่เตรียมไว้ย้ายมาปลูกในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ (รูปที่ 1) ซึ่งทำด้วยพลาสติกชนิดอะคริลิกขนาดกว้าง 50 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร และสูง 80 เซนติเมตร ด้านบนติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สำหรับปลูกพืช ยี่ห้อ Toshiba ขนาด 30 วัตต์จำนวน 6 หลอดให้ความเข้มแสง 35,000-50,000 ลักซ์ แล้วพ่นก๊าซผสมระหว่างก๊าซมีเทนกับคาร์บอนไดออกไซด์ ในอัตราส่วน 60:40 เข้าในช่องปล่อยก๊าซ แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดโดยทำการแปรผันความเข้มข้นของก๊าซในบรรยากาศภายในตู้โดยมีค่าร้อยละ 0 ± 0.07 , 1 ± 0.21 , 5 ± 0.15 และ 10 ± 0.27 วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของก๊าซมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟยี่ห้อ Agilent 6890 จากนั้นเก็บตัวอย่างใบพีชเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีโคเมททุก 72 ชั่วโมงตลอดระยะเวลาการทดลองทั้งหมด 288 ชั่วโมง



รูปที่ 1 แบบจำลองตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ

การทดสอบหาพืชที่เหมาะสมกับการเป็นดัชนีชี้วัด

นำพืชทั้ง 3 ชนิดที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ พืชต่าง ดันแพงพวยฝรั่ง และหญ้าโคสโครส อายุ 30 วันขนาดเฉลี่ยประมาณ 20 เซนติเมตร ชนิดละ 20 ต้น ข้ายมาปลูกในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศพร้อมกัน แล้วทดสอบโดยควบคุมให้บรรยากาศภายในตู้ประกอบด้วยก๊าซมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 1 ± 0.25 วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของก๊าซมีเทนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เป็นเวลา 288 ชั่วโมงแล้วเก็บตัวอย่างใบพืชแต่ละชนิดมาทำการทดสอบด้วยวิธีโคเมททุก 72 ชั่วโมงตลอดระยะเวลาการทดลอง

การทดสอบผลของน้ำชะมูลฝอยต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช

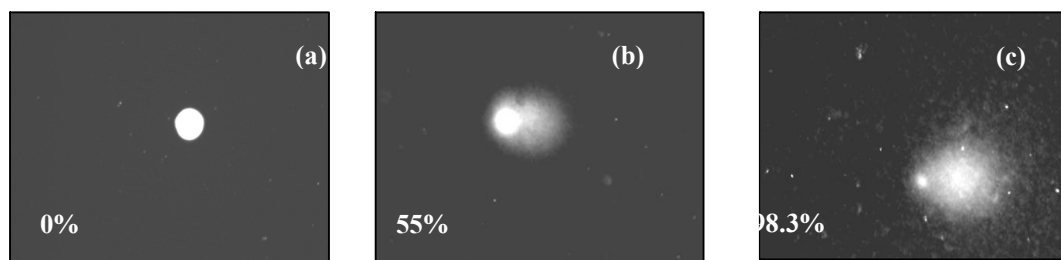
น้ำชะมูลฝอยที่ใช้ในการทดสอบแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ น้ำชะมูลฝอยเก่า (จากหลุมฝังกลบมูลฝอย อ. ไทรน้อย) และน้ำชะมูลฝอยสด (จากโรงงานขยะ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) นำมาตรวจวัดลักษณะสมบัติและความเข้มข้น ซึ่งประกอบด้วยค่าซีไอดี บีไอดี ทีเคเอ็น แอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนไตรต์ ไนเตรต และพีเอช พบว่าน้ำชะมูลฝอยเก่ามีค่าเท่ากับ $12,400 \pm 736.51$, $2,700 \pm 41.63$, 209.44 ± 23.86 , 31.36 ± 1.45 , 9.57 ± 0.13 , 21.26 ± 0.97 และ 9.28 ± 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำชะมูลฝอยสดมีค่าเท่ากับ $140,000 \pm 1,237.72$, $73,500 \pm 430.84$, 761.6 ± 51.61 , 212.8 ± 18.93 , 3.14 ± 0.11 , 25.89 ± 1.23 และ 3.86 ± 0.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แล้วเจือจางน้ำชะมูลฝอยด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วนร้อยละ 1, 10 และ 100 จนกระทั่งน้ำชะมูลฝอยเก่ามีความเข้มข้นของซีไอดีเท่ากับ 100 ± 8.51 , $1,000 \pm 22.42$ และ $10,000 \pm 125.78$ ตามลำดับและน้ำชะมูลฝอยสดมีความเข้มข้นของซีไอดีเท่ากับ 100 ± 11.12 , $1,000 \pm 24.06$ และ $10,000 \pm 224.32$ ตามลำดับ ปลูกพืชมงคลโดยให้รากสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยที่เตรียมไว้โดยตรงเป็นเวลา 288 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างใบพืชเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีโคเมททุก 72 ชั่วโมงตลอดระยะเวลาการทดลอง

ตารางที่ 1 ลักษณะสมบัติและความเข้มข้นของน้ำชะมูลฝอยสดและเก่าที่ใช้ทำการทดสอบ

พารามิเตอร์	น้ำชะมูลฝอยเก่า	น้ำชะมูลฝอยสด
COD (mg/l)	12,400±736.51	140,000±1,237.72
BOD (mg/l)	2,700±41.63	73,500±430.84
TKN (mg/l)	209.44±23.86	761.6±51.61
Ammonia nitrogen(mg/l)	31.36±1.45	212.8±18.93
Nitrite (mg/l)	9.57±0.13	3.14±0.11
Nitrate (mg/l)	21.26±0.97	25.89±1.23
pH	9.28±0.16	3.86±0.46

การเก็บตัวอย่างและการทดสอบด้วยวิธีโคเมท

ทำการเก็บตัวอย่าง โดยเลือกใบที่มีลักษณะปกติ ไม่เหี่ยวงอ มีสีเขียวสด ขนาดของใบควรจะใกล้เคียงกัน ล้างใบไม่ให้อะตาศด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้งเบาๆ ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2 เซนติเมตรแล้ว ชั่งมา 0.6 กรัม เติมสารละลาย Sorensen buffer (50 mM KH_2PO_4 , 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM Ethylenediamine tetraacetic acid: EDTA, 0.5% Dimethyl sulfoxide: DMSO, pH 6.8) 2 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่วางไว้บนถาดน้ำแข็ง แล้วตัดใบพืชให้เป็นแผ่นบางด้วยใบมีด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อสกัดเซลล์ออกจากใบพืช กรองสารละลายด้วยฟیلเตอร์ที่มีขนาดช่องพรุน 20 ไมโครเมตร จากนั้นผสมสารละลายดังกล่าว 150 ไมโครลิตร กับ 300 ไมโครลิตรของ Low Melting Point Agarose (ละลาย LMA 0.15 กรัมใน Phosphate Buffer Solution 10 มิลลิลิตร) เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1% LMA ใช้ออโดปิเปตผสมเนื้อสารให้เข้ากันโดยการดูดแล้วปล่อยหลายๆ ครั้ง เมื่อผสมกันดีแล้วหยดสารละลายตัวอย่าง 75 ไมโครลิตรลงบน CometSlides™[8] ที่วางบนแผ่นความร้อน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำสไลด์แช่ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสอีก 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นนำสไลด์ จุ่มลงใน Lysis Solution 45 มิลลิลิตร (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris Base), 5 มิลลิลิตร DMSO และ 0.5 มิลลิลิตร Triton X-100 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ไม่น้อยกว่า 12 ชั่วโมงเพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียว จากนั้นนำสไลด์มาวางบน horizontal gel electrophoresis tank ที่วางอยู่บนถาดน้ำแข็ง ภายในบรรจุด้วย alkaline solution (NaOH 4.2 กรัม, 200 mM EDTA 1.75 มิลลิลิตร, pH>13) ผ่านกระแสไฟฟ้า AC: 300 mA, 15 Volt เป็นเวลา 25 นาที แล้วล้างสไลด์โดยแช่สไลด์ใน Neutralization buffer (Tris-hydroxymethyl-aminomethane 48.5 กรัม, pH 7.5) 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำไปแช่ใน Ethyl alcohol 5 นาที สูดฟ้ายแช่ในน้ำกลั่นอีก 10 นาที แล้วซับน้ำด้านนอกออกเบาๆ ด้วยทิชชู ทำให้แห้งโดยวางสไลด์บนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากสไลด์แห้งทำการย้อมสีโดยหยดสีย้อม SYBERSafe™ Green ยี่ห้อ Invitrogen 1 หยดปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ที่มีฟیلเตอร์สำหรับกระตุ้นสารฟลูออเรสเซนส์ (Excitation filter) ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และมีฟیلเตอร์สำหรับป้องกันผลกระทบฟลูออเรสเซนส์ (Barrier filter) ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร และถ่ายภาพด้วยกล้องซีซีดี (CCD Camera) รับสัญญาณภาพและโปรแกรมแปลงสัญญาณแสดงทางจอคอมพิวเตอร์



รูปที่ 2 ระดับความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดเป็นร้อยละที่เพิ่มขึ้นของเซลล์โคมเมเมื่อพืชได้รับก๊าซชีวภาพ

(a) ร้อยละ 0 (b) ร้อยละ 55 (c) ร้อยละ 98.3

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เซลล์ 50 เซลล์ต่อตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเฉพาะ Tritex Comet [Score] Freeware Version 1.5 ในการวัดพื้นที่ส่วนหัวและหางของเซลล์เพื่อนำมาคำนวณหาร้อยละการถูกทำลายของดีเอ็นเอ โดยคำนวณจากสัดส่วนการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์ของตัวอย่างโดยใช้สมการที่ 1 [9] และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 15

$$\text{ร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอ} = \frac{\sum_{i=1}^n (T / (T + H))}{n} \times 100 \quad (1)$$

โดย T คือ พื้นที่หางของเซลล์ H คือ พื้นที่หัวของเซลล์ n คือ จำนวนเซลล์ทั้งหมด

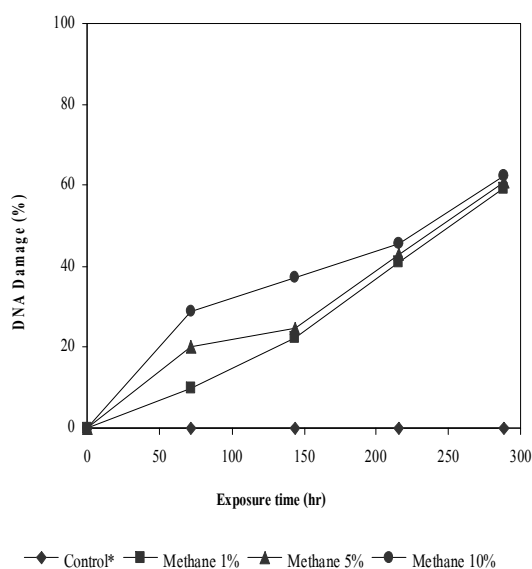
ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของก๊าซชีวภาพจากหลุมฝังกลบมูลฝอยต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช

หลังจากย้ายพลูต่างไปปลูกในตู้ควบคุมคุณภาพอากาศ พบว่าพืชที่ได้สัมผัสก๊าซชีวภาพที่มีระดับความเข้มข้นของก๊าซมีเทนในบรรยากาศภายในตู้ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 5 และ 10 พบว่า การทำลายดีเอ็นเอในเซลล์พืชมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อพืชมีระยะเวลาในการสัมผัสกับก๊าซมีเทนมากขึ้น และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของก๊าซมีเทนให้สูงขึ้น เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของมีเทนในบรรยากาศที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนลดลงทำให้พืชมีการถูกทำลายดีเอ็นเอและมีการเจริญเติบโตลดลง [10] พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีค่าร้อยละการถูกทำลายสูงจะมีปริมาณสูงมากขึ้นตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของก๊าซมีเทนร้อยละ 1 มีค่าเท่ากับร้อยละ 10 ± 0.13 , 23 ± 0.19 , 41 ± 0.21 และ 59 ± 0.17 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของมีเทนร้อยละ 5 มีค่าเท่ากับร้อยละ 20 ± 0.26 , 37 ± 0.30 , 46 ± 0.30 , 62 ± 0.20 ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นของมีเทนร้อยละ 10 ดีเอ็นเอของพืชถูกทำลายมากที่สุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 29 ± 0.26 , 37 ± 0.30 , 46 ± 0.30 , 62 ± 0.20 ตามลำดับ (รูปที่ 3) ซึ่งร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอในเซลล์พืชทุกระยะเวลาที่สัมผัสกับก๊าซมีเทนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีความแตกต่างกันมากที่สุด ที่ระยะเวลาสัมผัส 72 ชั่วโมง ($P < 0.05$)

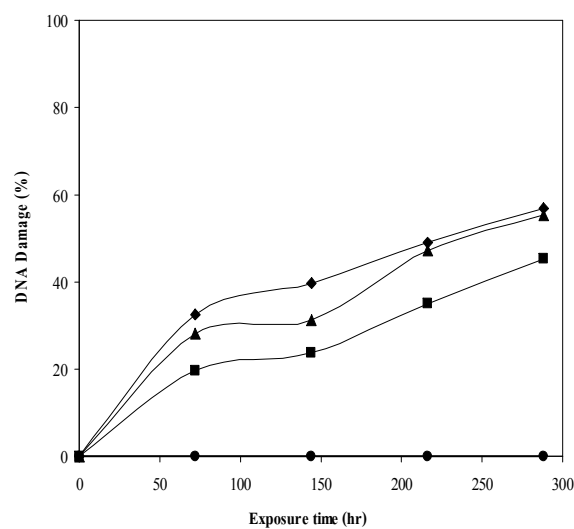
ผลการคัดเลือกพืชที่เหมาะสมกับการเป็นดัชนีชี้วัดสำหรับการทดสอบผลกระทบก๊าซมีเทน

หลังจากนำพืชสามชนิด ได้แก่ พุด่าง ต้นแพงพวยฝรั่ง และหญ้าโคสโครอส มาทำการทดสอบโดยปลูกในตู้ควบคุมอากาศ ในสภาวะความเข้มข้นของก๊าซมีเทนในบรรยากาศเท่ากับร้อยละ 1 ผลการทดลองพบว่าพืชแต่ละชนิดมีระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอแตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มของการถูกทำลายสูงขึ้นตามระยะเวลาสัมผัสที่มากขึ้นคล้ายคลึงกัน พบว่าร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพุด่าง มีค่าเท่ากับ 32 ± 0.21 , 40 ± 0.19 , 49 ± 0.19 , 57 ± 0.17 ตามลำดับ ต้นแพงพวย มีค่าเท่ากับ 20 ± 0.17 , 24 ± 0.14 , 35 ± 0.10 , 45 ± 0.10 ตามลำดับ และหญ้าโคสโครอส มีค่าเท่ากับ 28 ± 0.21 , 31 ± 0.25 , 47 ± 0.24 , 55 ± 0.22 ตามลำดับ (รูปที่ 4) ซึ่งร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชในแต่ละระยะเวลาที่สัมผัสกับก๊าซมีเทนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อพิจารณาภาพถ่ายเซลล์โคเมทของพืชแต่ละชนิด พบว่า ภาพเซลล์โคเมทของ พุด่างและหญ้าโคสโครอสมีลักษณะชัดเจนขนาดไม่เล็กจนเกินไป ง่ายต่อการวัดพื้นที่ส่วนหัวและหางของเซลล์เพื่อนำมาคำนวณหาร้อยละการถูกทำลายของดีเอ็นเอ และจากเส้นแนวโน้มของกราฟที่แสดงในรูปที่ 4 พบว่า หญ้าโคสโครอส มีเส้นแนวโน้มของการถูกทำลายดีเอ็นเอเป็นรูป S-shape ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีการเปลี่ยนแปลงของพืชเมื่อได้สัมผัสกับสารพิษ [9] และเมื่อพิจารณาถึงความทนทาน และสามารถนำไปปลูกได้ง่ายในพื้นที่ฝั่งกลบ หญ้าโคสโครอส จึงเป็นพืชที่เหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบกับ ต้นแพงพวยและพุด่างจึงควรนำไปใช้เป็นดัชนีชี้วัดมลพิษในพื้นที่ฝั่งกลบ



หมายเหตุ * control ของแต่ละความเข้มข้น มีค่าต่ำกว่าร้อยละ 0.5

รูปที่ 3 ค่าเฉลี่ยของร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชในแต่ละระดับความเข้มข้นของก๊าซมีเทนในบรรยากาศ



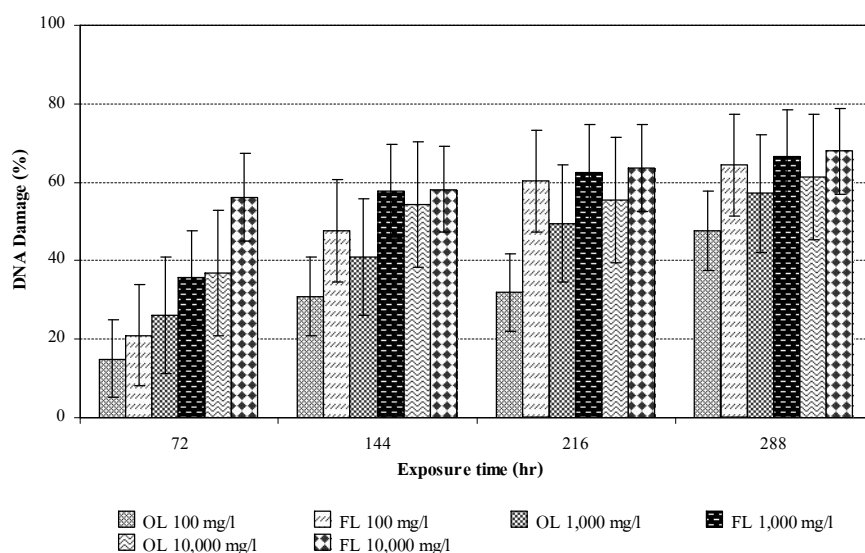
หมายเหตุ * control ของพืชแต่ละชนิด มีค่าต่ำกว่าร้อยละ 0.5

รูปที่ 4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชในแต่ละชนิดเมื่อสัมผัสกับบรรยากาศที่มีก๊าซมีเทน

ความเข้มข้นร้อยละ 1

ผลของน้ำชะมูลฝอยต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช

เมื่อทำการย้ายพุ่มต่างมาปลูกลงในน้ำชะมูลฝอยสดและเก่าที่ความเข้มข้นซีไอดี 100, 1,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า พืชที่ได้รับสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยจะมีแนวโน้มของระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอสูงขึ้นเมื่อมีระยะเวลาในการสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยมากขึ้น เมื่อระดับค่าความเข้มข้นซีไอดีของน้ำชะมูลฝอยมากขึ้นร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชก็สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นของซีไอดีเท่ากันจะพบว่าพืชที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยสดมีระดับการถูกทำลายดีเอ็นเอสูงกว่าพืชที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยเก่าทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ค่าความเป็นกรด ปริมาณไนโตรเจนของน้ำชะมูลฝอยสดที่มีค่าสูงกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่า เป็นต้น ในการทดสอบผลของน้ำชะมูลฝอยเก่าต่อการทำลายดีเอ็นเอของพืช พบว่าที่ระดับความเข้มข้นซีไอดี 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชมีค่าเท่ากับ 15 ± 0.20 , 31 ± 0.27 , 32 ± 0.20 , 47 ± 0.21 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นซีไอดี 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับร้อยละ 26 ± 0.24 , 41 ± 0.26 , 49 ± 0.20 , 57 ± 0.15 ตามลำดับ และระดับความเข้มข้นซีไอดี 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับร้อยละ 37 ± 0.29 , 54 ± 0.24 , 55 ± 0.09 , 61 ± 0.16 ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบโดยใช้น้ำชะมูลฝอยสดที่กำหนดให้ระดับความเข้มข้นของซีไอดีและระยะเวลาในการทดลองเท่ากัน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของซีไอดี 100 มิลลิกรัมต่อลิตรร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชมีค่าเท่ากับ 21 ± 0.24 , 48 ± 0.24 , 60 ± 0.18 , 64 ± 0.13 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของซีไอดี 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับร้อยละ 36 ± 0.22 , 58 ± 0.18 , 63 ± 0.12 , 67 ± 0.15 ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นของซีไอดี 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับร้อยละ 56 ± 0.27 , 58 ± 0.15 , 64 ± 0.11 , 68 ± 0.12 ตามลำดับ (รูปที่ 5) ซึ่งร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอของเซลล์พืชในแต่ละระยะเวลาที่สัมผัสกับน้ำชะมูลฝอยทั้งสองลักษณะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



(หมายเหตุ OL: Old Leachate , FL: Fresh Leachate)

รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการถูกทำลายดีเอ็นเอของพืชในแต่ละความเข้มข้นเมื่อสัมผัสกับน้ำชะมูลฝอย

สรุป

เมื่อทำการทดสอบพืชด้วยวิธีโคเมท พบว่า การทำลายดีเอ็นเอของพืชมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อพืชได้สัมผัสกับก๊าซชีวภาพที่มีความเข้มข้นสูงมากขึ้นและมีระยะเวลาในการสัมผัสมากขึ้นจะพบระดับการทำลายดีเอ็นเอของใบพลูด่างสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของมีเทนในบรรยากาศร้อยละ 10 ที่ระยะเวลาสัมผัส 288 ชั่วโมง ในแต่ละระดับความเข้มข้นของมีเทนระดับการทำลายดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบพืชที่นำมาทดสอบทั้งสามชนิดพบว่า หลู่โกสโครอส เป็นพืชที่เหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดผลกระทบจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอย การทดสอบด้วยน้ำชะมูลฝอย พบว่าแนวโน้มของการทำลายดีเอ็นเอมีทิศทางเดียวกันกับก๊าซชีวภาพ แต่มีระดับการทำลายต่ำกว่าที่ระยะเวลาสัมผัสใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ น้ำชะมูลฝอยสดให้ระดับการทำลายดีเอ็นเอสูงกว่าน้ำชะมูลฝอยเก่าที่ค่าความเข้มข้นของซีไอดีเท่ากัน ในทุกระยะเวลาของการสัมผัส น้ำชะมูลฝอยการถูกทำลายดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการทดลองดังกล่าวเป็นนัยแสดงถึงประสิทธิภาพ และความไวในการตรวจวัดด้วยวิธีโคเมทที่สามารถนำมาวัดระดับการทำลายดีเอ็นเอของพืชที่สัมผัสกับมลพิษที่เกิดจากพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือจากการตรวจสอบด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาและวิจัยต่อไปเพื่อพัฒนาให้สามารถนำวิธีการดังกล่าวไปใช้กับพื้นที่ฝังกลบมูลฝอยและนำไปใช้ในการประเมินผลกระทบและความเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ Prof. Kazuo Yamamoto มหาวิทยาลัยโตเกียว, รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช ภาควิชาพันธุศาสตร์และ ดร. วันวิสา สุดประเสริฐ ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้คำปรึกษาในการทดสอบโคเมท และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- [1] ทิพย์สุรีย์ กรบุญรักษา ชาติ เจริมไชยศรี วิไล เจริมไชยศรี และ สิรินทรเทพ เต้าประยูร. 2549. การวิเคราะห์อัตราการแพร่กระจายก๊าซมีเทนจากพื้นที่กำจัดมูลฝอยในประเทศไทยโดยประยุกต์ใช้ระบบข้อมูลสารสนเทศ, วารสารวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ครั้งที่ 19 ฉบับที่ 3: 11-23
- [2] Collin, A.R., 2002. **The comet assay. principles, applications, and limitation method.** Mol.Biol.203, 63-77
- [3] Knasmuller, S., Gottmann, E., Steinkellner, H., Formin, A., Pickl, C., God, R. and Kundi, M. 1998. **Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassay.** Mutation Research 420, 37-48
- [4] Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., and Demnerova, K. 2006. **Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals.** Ecotoxicology and environmental safety 65, 420-426

- [5] Shimazaki, D., Urase, T., and Yamamoto, K. 1999. **Detection of DNA damaging potential in the leachate from waste landfill with comet assay**, Journal of Japan Society on Water Environmental. 22(9), 783-789
- [6] Peart, V., Indoor Air Quality in Florida: **Houseplants to fight pollution**. FCS 3208, one of a series of the Department of Family, Youth and Community Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Publication date: September 2003.
- [7] Sawada, A, 2005. **Derivation of quantitative evaluation method for plant air-purification capability**. School of Knowledge Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology.
- [8] Travigen Inc, 2002. **TREVIGENT™ Instructions for Comet assay™**.
- [9] Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi., K., and Shimazaki, D, 2003. **Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments**. Mutation Research 541, 31-44
- [10] Gendebien, A., Pauwels, M., Constant, M., Ledrut-Damanet, M.J., Nyns, M.J., Willumsen, H., Butson, J., Fabry, R., 1992. **Potential landfill gas damages to vegetation**. Landfill gas. from environment to energy. Luxembourg, CEE.1, 35-46.

ทำเนียบวิทยากร

ชื่อบทความ	การใช้วิธีโคเมทในพืชติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอย Use of Plant Comet Assay as a Monitoring Method for Landfill Gas and Leachate Impact
ผู้นำเสนอบทความ	นางสาวประคิษฐา ณ ร้อยเอ็ด
สถานที่ทำงาน	ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์	081-320-5390, 0-2942-8555
ประวัติการศึกษา	- ปริญญาตรี คณะสาธารณสุขศาสตร์ (สาขาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยมหิดล - ปริญญาโท คณะบัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กำลังศึกษา)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวประดิษฐา ณ ร้อยเอ็ด
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 10 มีนาคม 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดร้อยเอ็ด
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์