รายงานผลการดำเนินงาน

ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การประยุกต์ใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของซิลิเอตทะเลหน้าดิน จากหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักในห้องปฏิบัติการ

ผู้รับผิดชอบโครงการ

อาจารย์ ดร. ชิดชัย จันทร์ตั้งสี

รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การประยุกต์ใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของซิลิเอตทะเลหน้าดินจากหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักในห้องปฏิบัติการ

Application of Biodiversity of Marine Benthic Ciliates from Look-Lom Beach, Samaesarn Island, Chonburi Province in Assessing Toxicity of Heavy Metals in Laboratory

อาจารย์ ดร.ชิดชัย จันทร์ตั้งสี
สุดาสวรรค์ ลิ้มรักษา
สุชา เฉยศิริ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และหน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันพบมีการปนเปื้อนของโลหะหนักลงสู่ระบบนิเวศแหล่งน้ำทั้งแหล่งน้ำจืดและน้ำทะเลในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น การปนเปื้อนเหล่านี้นอกจากจะส่งผลให้เกิดความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำแล้ว ยังสร้างสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณดังกล่าวด้วย มีงานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นถึงผลและความเป็นพิษของโลหะหนักต่อจุลชีพที่ดำรงชีวิตอยู่ในแหล่งน้ำจืด อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงผลกระทบของการปนเปื้อนของโลหะหนักต่อจุลชีพที่อาศัยอยู่ในทะเลยังมีไม่มากนัก การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษของโลหะหนัก ได้แก่ แคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี ต่อซิลิเอต *Euplotes quinquecarinatus* สายพันธุ์ที่ดำรงชีวิตอยู่ในทะเลซึ่งสกัดแยกได้จากหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของซิลิเอต ระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น อัตราการเจริญเติบโต และค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิลิเอตตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) เมื่อซิลิเอตได้รับสารละลายโลหะหนักที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงและทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่า สารละลายโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด มีผลต่อรูปร่างของ *E. quinquecarinatus* โดยทำให้เซลล์เสียสภาพเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลมและตายในที่สุด นอกจากนี้ยังมีผลยืดระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นและลดอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต เมื่อพิจารณาค่า LC_{50} พบว่า สังกะสีมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด รองลงมาคือ แคดเมียมและนิกเกิล ตามลำดับ โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 56, 183 และ 269 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยค่า LC_{50} ที่คำนวณได้มีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นมาตรฐานของกรมควบคุมมลพิษสำหรับโลหะทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นถึงความทนของ *Euplotes* สายพันธุ์นี้ต่อโลหะหนักและศักยภาพที่เป็นไปได้ในการใช้ซิลิเอตชนิดนี้ เพื่อการกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำต่อไป

คำสำคัญ: จุลชีพ โพรติสต์ เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น สารปนเปื้อน *Euplotes*

Abstract

Contamination of heavy metals into aquatic ecosystems both freshwater and marine has currently been found to be continuously increasing. The contamination has not only resulted in deterioration of water resources but also generated adverse environment to organisms living in such polluted conditions. Many research studies of toxic effects of heavy metals on microbes have usually been focused on those living in freshwater habitats. However, there is little information available on such effects on marine species. The aim of this present study was therefore to assess toxicity of three heavy metals, including cadmium, nickel, and zinc, to a marine ciliate – *Euplotes quinquecarinatus* – isolated from Look-Lom Beach, Samaesarn Island, Chonburi Province. Morphological alterations, generation time, growth rate, and the 24-h median lethal concentrations (LC_{50}) were examined and documented after the ciliates were inoculated in the culture media mixed with different concentrations of the three metals for 24 h. The results indicated that all three metals have morphological effects on the tested *Euplotes quinquecarinatus*, causing the cells losing their shape and becoming oval, ultimately leading to mortality. In addition, the prolonged generation time and reduced growth rate were observed in the cells inoculated with heavy metals. Based on the 24-h LC_{50}, Zn (LC_{50} = 56 mg/l) is the most toxic metal while Cd (183 mg/l) and Ni (269 mg/l) show less toxic effects on this *Euplotes* species, respectively. The LC_{50} values for the three metals obtained from this study are much higher than the standard concentrations approved by the Pollution Control Department, suggesting the resistance to heavy metals of this *Euplotes* isolate and implying the possible potential of using this ciliate for removing heavy metals contaminated in water resources.

Keywords: microorganism, protist, generation time, contaminant, *Euplotes*

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญเรื่อง ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญภาพ ..... ฉ
บทนำ 1
โลหะหนัก 2
แคดเมียม 2
นิกเกิล 3
สังกะสี 3
ปัญหาการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม 3
โพรติสต์กลุ่มซิลิเอต 4
ซิลิเอตและโลหะหนัก 4
วัตถุประสงค์ของโครงการ 6
วิธีดำเนินการวิจัยและแผนการปฏิบัติงาน 6
การปฏิบัติงานในภาคสนาม 6
การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ 6
สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล 10
ผลการดำเนินงาน 11
การสกัดคัดแยกและสัณฐานวิทยาของซิลิเอต 11
การระบุอัตลักษณ์ของซิลิเอตสายพันธุ์ที่ใช้ในการประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนัก 11
การประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนักต่อซิลิเอต *E. quinquecarinatus* 15
ความเป็นพิษของโลหะหนักต่อซิลิเอต *E. quinquecarinatus* 17
ผลของโลหะหนักต่ออัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต *E. quinquecarinatus* 18
ผลของโลหะหนักต่อเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของซิลิเอต *E. quinquecarinatus* 20
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 21
เอกสารอ้างอิง 23
ภาคผนวก 26
ประวัติคณะผู้วิจัย 40

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *E. quinquecarinatus* เมื่อทดสอบกับความเป็นพิษของสารประกอบแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี.....18
ตารางที่ 2 เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *E. quinquecarinatus* เมื่อได้รับสารประกอบแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี.....20

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 พื้นที่ศึกษาบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี.....7
ภาพที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงของเซลล์ซิลิเอต *E. quinquearinatus*.....11
ภาพที่ 3 ลักษณะของซิเลียในเซลล์ปกติ และเซลล์ที่ได้รับสารประกอบโลหะหนัก.....16
ภาพที่ 4 เซลล์ที่ได้รับสารประกอบโลหะหนัก 17
ภาพที่ 5 เซลล์หลังได้รับสารประกอบโลหะหนักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 17
ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโลหะหนักที่ใช้ในการทดสอบกับจำนวนเซลล์ของ *E. quinquecarinatus* 19

การประยุกต์ใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของซิลิเอตทะเลหน้าดินจากหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักในห้องปฏิบัติการ

Application of Biodiversity of Marine Benthic Ciliates from Look-Lom Beach, Samaesarn Island, Chonburi Province in Assessing Toxicity of Heavy Metals in Laboratory

ชิดชัย จันทร์ตั้งสี, สุดาสวรรค์ ลิ้มรักษา และ สุชา เฉยศิริ
Chitchai Chantangsi, Sudasawan Limraksa, and Sucha Choeisiri

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทสรุป

การคัดแยกซิลิเอตทะเลหน้าดินจากหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ได้ซิลิเอตสายพันธุ์บริสุทธิ์จำนวน 1 สายพันธุ์ จากการศึกษาสัณฐานวิทยาและระบุอัตลักษณ์โดยใช้ข้อมูลทางอณูชีววิทยา พบว่าซิลิเอตสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ คือ *Euplotes quinquecarinatus* เมื่อนำซิลิเอตสายพันธุ์นี้ไปทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนักเบื้องต้น พบว่า โลหะหนักมีผลทำให้โครงสร้างและรูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยโครงสร้างของซิเลียจะหงิกงอและแตกปลาย ตัวเซลล์เกิดการพุพองเสียสภาพเปลี่ยนรูปร่างกลายเป็นทรงกลมและตายในที่สุด นอกจากนี้สารประกอบโลหะหนักยังมีผลยืดระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นและลดอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอตสายพันธุ์นี้อีกด้วย

บทนำ

ทะเล เป็นลักษณะที่อยู่อาศัยที่มีขนาดใหญ่ที่สุดบนผืนพิภพและเป็นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดตั้งแต่จุลชีพขนาดเล็กไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันเราพบความรุนแรงที่เพิ่มขึ้นของปัญหามลพิษ และการปนเปื้อนของโลหะหนักในระบบนิเวศทางน้ำจากกิจกรรมต่างๆ ตลอดจนความประมาทเลินเล่อของมนุษย์ เช่น การปล่อยน้ำเสียลงสู่แม่น้ำลำธาร การไหลชะของสารต่างๆ ที่ใช้ในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมลงสู่แหล่งน้ำ การรั่วไหลของน้ำมันลงสู่ทะเล เป็นต้น กิจกรรมและมูลเหตุต่างๆ เหล่านี้อาจนำไปสู่การขาดแคลนน้ำเพื่อการอุปโภคและบริโภคในอนาคตอันใกล้ อีกทั้งยังนำไปสู่ความเสื่อมโทรมของระบบนิเวศทางน้ำจนส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศแห่งนี้ ถึงแม้เราจะมีระบบบำบัดและประเมินคุณภาพน้ำอยู่ในปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนดังกล่าวส่วนใหญ่อาศัยการตรวจวัดค่าทางกายภาพและมุ่งเน้นประเมินแต่ระบบนิเวศน้ำจืดเท่านั้น การประเมินผลกระทบดังกล่าวต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศทางทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับจุลชีพยังพบมีผู้ศึกษาไม่มากนัก

ซิลิเอตจัดเป็นจุลชีพกลุ่มยูแคริโอตเซลล์เดียวที่พบในได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อลักษณะที่อยู่อาศัย อีกทั้งยังมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงและการปนเปื้อนของมลพิษในสิ่งแวดล้อมที่มันอาศัยอยู่ ด้วยเหตุนี้เองเราจึงสามารถใช้ซิลิเอตเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพและศึกษาถึงผลกระทบจากการปนเปื้อนของมลพิษลงสู่แหล่งน้ำต่อสิ่งมีชีวิตในเบื้องต้นได้ จากงานศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ถึงความ

หลากหลายทางชีวภาพ โดยอาศัยการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า พื้นที่บริเวณหาดลูกลมของเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี พบจุลชีพกลุ่มซิลิเอตที่มีความหลากหลายทั้งชนิดและจำนวนสูง งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของซิลิเอตทะเลหน้าดินจากหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ซึ่งพบมากในพื้นที่นี้ ในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ อันจะเป็นแนวทางนำไปสู่การประยุกต์ใช้สิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ในการศึกษาถึงผลกระทบของโลหะหนักต่อจุลชีพและสิ่งมีชีวิตอื่น ที่อาจพบการปนเปื้อนของมลพิษประเภทนี้เกิดขึ้นได้ในอนาคตต่อไป

โลหะหนัก

โลหะหนัก หมายถึง โลหะที่มีความหนาแน่นเกินกว่า 5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวอย่างเช่น ปรอท ตะกั่ว สารหนู แคดเมียม โคบอลต์ สังกะสี และ นิกเกิล เป็นต้น โลหะเหล่านี้เป็นสารคงตัวที่ไม่สามารถสลายตัวได้ด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ ความเป็นพิษของโลหะหนักเกิดจากการที่ร่างกายได้รับสารโลหะหนัก โดยสารเหล่านี้จะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ และยึดเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การควบคุมการลำเลียงของสารต่างๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติไป ความเป็นพิษของโลหะหนักขึ้นอยู่กับรูปแบบทางเคมีของสารประกอบของโลหะหนักแต่ละชนิด และเส้นทางที่ร่างกายได้รับเข้าไป เช่น ทางระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และผิวหนัง เป็นต้น โดยสารพิษเหล่านี้เมื่อสะสมอยู่ในร่างกายจนถึงระดับหนึ่ง จะแสดงอาการออกมาให้เห็นถึงผลของความเป็นพิษต่อกลไกระดับเซลล์ เช่น ทำให้เซลล์ตาย เปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ อีกทั้งยังเป็นตัวการทำให้เกิดมะเร็ง เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม และสร้างความเสียหายต่อโครโมโซม ซึ่งเป็นหน่วยพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (Rai et al., 1996)

ปัจจุบันประเทศไทยพยายามพัฒนาประเทศในด้านต่างๆ ทั้งในด้านเทคโนโลยี อุตสาหกรรม การเกษตร การปศุสัตว์ และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ น้ำทิ้งอันเนื่องมาจากกิจกรรมการพัฒนาเหล่านี้ หรือแม้แต่จากชุมชนเมืองล้วนเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำ ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของบรรดาสิ่งมีชีวิต โดยมลพิษที่พบปนเปื้อนบ่อยในแหล่งน้ำอย่างหนึ่งก็คือ โลหะหนัก ซึ่งถูกนำมาใช้ในภาคส่วนต่างๆ เช่น ด้านอุตสาหกรรม ใช้ในอุปกรณ์ไฟฟ้า อุปกรณ์ผลิตพลาสติก พีวีซี สี ถ่านไฟฉาย ด้านการเกษตรใช้เป็นส่วนผสมของยาฆ่าแมลงและปุ๋ย ด้านการแพทย์ใช้เป็นส่วนผสมของยา อุปกรณ์ทางการแพทย์และเครื่องสำอาง โลหะหนักที่สะสมในสิ่งแวดล้อมเมื่อมีปริมาณสูงเกินไปจะเป็นสารพิษที่จัดอยู่ในประเภทที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพทั้งทางตรงและทางอ้อม ในชีวิตประจำวันมนุษย์มีความเสี่ยงต่อการนำโลหะหนักเข้าสู่ร่างกายผ่านทางการบริโภคอาหาร หรือดื่มน้ำที่มีโลหะหนักปนเปื้อนเข้าไป โลหะหนักบางชนิดให้ทั้งประโยชน์และโทษต่อร่างกาย ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตและปริมาณโลหะหนักที่ได้รับเข้าไป อย่างไรก็ตาม ปริมาณโลหะที่มากเกินไปจะสร้างสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ โดยโลหะหนักบางชนิด เช่น แคดเมียม นิกเกิล และ สังกะสี จัดเป็นสารพิษต่อร่างกาย เนื่องจากมีพิษร้ายแรงและสามารถสะสมในมนุษย์ได้

<u>แคดเมียม (cadmium: Cd)</u>

แคดเมียม เป็นโลหะมีสีเงิน พบอยู่น้อยตามธรรมชาติ โดยทั่วไปแคดเมียมที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมจะพบในแหล่งทำเหมืองสังกะสีและตะกั่ว ในอุตสาหกรรมยาสูบและบุหรี่ พลาสติกและยาง นอกจากนี้แคดเมียมยังนิยมใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตแบตเตอรี่ อุปกรณ์ไฟฟ้า อะไหล่รถยนต์ แคดเมียมเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกดูดซึมในกระเพาะอาหาร แล้วแพร่กระจายไปที่ตับ ม้าม และลำไส้ ถ้าสะสมเพิ่มขึ้นในปริมาณสูงจะทำให้เกิดมะเร็ง ไตทำงานผิดปกติ หากได้รับจากการสูดดมหรือการหายใจเอาควันที่มีแคดเมียมปนเปื้อนเข้าไปเล็กน้อย จะ

มีอาการอ่อนเพลีย คอแห้ง ระคายคอ แน่นหน้าอก ปวดศีรษะ เมื่อได้รับมากขึ้นจะมีอาการหายใจไม่ออก ไอไม่หยุด และอาจถึงแก่ชีวิตได้หากได้รับอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้แคดเมียมยังก่อให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง ปวดกระดูกสันหลัง แขนขา และทำให้ไตพิการได้ โรคที่เกิดจากพิษของแคดเมียม เรียกว่า โรคอิไต-อิไต การได้รับแคดเมียมจำนวนมากอาจทำให้เกิดพิษเฉียบพลันได้ แต่ส่วนใหญ่มักพบเป็นแบบชนิดเรื้อรังจากการได้รับแคดเมียมติดต่อกันเป็นเวลานาน เช่น โรคปอดเรื้อรัง และ โรคไตอักเสบ เป็นต้น (Nordberg et al., 2015)

นิกเกิล (nickel: Ni)

นิกเกิล เป็นโลหะที่มีสีเงิน มันวาว มักนำมาใช้ในการทำเหล็กกล้า อัลลอยด์ แม่เหล็ก เครื่องยนต์ เคลือบโลหะ เหรียญกษาปณ์ เครื่องประดับ แบตเตอรี่ อุปกรณ์ทางการแพทย์ และทันตกรรม เครื่องกระตุ้นหัวใจชนิดฝังในตัวผู้ป่วย นิกเกิลเป็นโลหะที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือ มีความเงา ความทนต่อการกัดกร่อนและความร้อน อีกทั้งยังเป็นโลหะที่ยืดงอได้ นิกเกิลอาจถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย ทางการหายใจ ทางผิวหนัง และทางเดินอาหาร การรับสัมผัสทางการหายใจโดยการดูดซึมขึ้นกับความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบนิกเกิล สารประกอบนิกเกิลที่ละลายน้ำได้ดี ได้แก่ นิกเกิลคาร์บอนิล การสัมผัสนิกเกิลคาร์บอนิลทางการหายใจจะทำให้เกิดอาการไข้ ไอ เจ็บหน้าอก หายใจลำบาก ปวดศีรษะ และอาจเกิดภาวะปอดอักเสบเฉียบพลัน ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตจากภาวะการหายใจล้มเหลว การสัมผัสที่ผิวหนัง อาจทำให้เกิดภาวะผิวหนังอักเสบเป็นผื่นสัมผัส หรือเป็นผื่นแพ้ในส่วนอื่นๆ ของร่างกาย ผู้ที่ดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของนิกเกิล อาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดมวนท้อง และท้องเสีย (Klein and Costa, 2015)

สังกะสี (zinc: Zn)

สังกะสี เป็นโลหะสีเงิน แต่สีจะหมองคล้ำเมื่อถูกกับอากาศ เพราะเกิดเป็นออกไซด์เคลือบบางๆ ที่ผิว เมื่อเผาให้ร้อนในอากาศจะเป็น ZnO ซึ่งมีสีขาว และสีไม่หมองคล้ำ พบในอุตสาหกรรมการทำเหมืองแร่ ส่วนประกอบของรั้วบ้านหลังคา หรือวัสดุอื่นที่ใช้สังกะสีเป็นโลหะผสม ใช้ในอุตสาหกรรมถ่านไฟฉาย ชุบเหล็กกล้า ทำถังบรรจุน้ำ ใช้หล่อวัสดุสำเร็จรูปจากแบบพิมพ์ถาวร นอกจากนี้ยังใช้หล่อทำเครื่องซักผ้า เครื่องดูดฝุ่น ตู้เย็น สังกะสียังเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตยางรถยนต์ ใช้เป็นส่วนผสมของสีขาว และใช้ทำยาจำพวกขี้ผึ้ง หรือเครื่องสำอาง เมื่อมนุษย์ได้รับสังกะสีเข้าสู่ร่างกาย จะทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย วิงเวียนศีรษะ และอาการท้องร่วง ถ้าได้รับไอฝุ่นของสังกะสีเข้าร่างกายมากๆ จะเกิดอาการไข้ที่เรียกว่า Zinc chills ซึ่งมีอาการจับไข้หนาวสั่น ปวดกล้ามเนื้อ และ อาเจียน (Sandstead, 2015)

ปัญหาการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันมีการนำโลหะหนักมาใช้ในอุตสาหกรรมเป็นจำนวนมาก ก่อให้เกิดการปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อม จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาถึงผลกระทบจากการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งมีชีวิต เพื่อประกอบการประเมินและหาแนวทางในการป้องกันและกำจัดโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคดเมียมที่เป็นปัญหาต่อการส่งออกอาหารทะเลของไทย

สุชาดา มะแส (2538) ศึกษาการสะสมของแคดเมียม และปรอทในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำเพื่อการส่งออก ในเขตภาคใต้ตอนล่าง ระหว่างเดือนตุลาคม 2536 ถึงเดือนกันยายน 2537 จำนวน 965 ตัวอย่าง พบว่า หมึกกระป๋องและหมึกแช่แข็งมีปริมาณการสะสมของแคดเมียมสูงกว่าผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำชนิดอื่น โดยมีค่าเฉลี่ย 0.44 และ 0.62 มก./กก. ตามลำดับ แต่ยังมีปริมาณต่ำกว่าค่าที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

อภิรดี เมืองเดช (2545) วิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ สังกะสี แคดเมียม ปรอท และตะกั่ว ในหอยแครงบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง พบว่า ไม่มีความแตกต่างของโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ระหว่างหอยแครงเลี้ยงกับหอยแครงที่จับได้ตามธรรมชาติ แต่พบว่าความแตกต่างระหว่างฤดูมีผลต่อการสะสมของโลหะหนักอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ปริมาณโลหะหนักตะกั่ว สังกะสี และปรอทที่พบในหอยแครงบริเวณปากแม่น้ำบางปะกงยังอยู่ในเกณฑ์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98

วีระวงค์ ตางาม (2543) ศึกษาปริมาณโลหะหนัก สังกะสี ทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของปลาในแม่น้ำและคลองรอบเกาะเมืองพระนครศรีอยุธยา พบว่า ปริมาณโลหะหนักในอวัยวะส่วนต่างๆ ของปลา ในตับจะมีปริมาณทองแดงสูงสุด ลำไส้มีปริมาณสังกะสีและแคดเมียมสูงสุด เหงือกมีปริมาณตะกั่วสูงสุด ในเนื้อพบปริมาณโลหะหนักทั้ง 4 ชนิดต่ำสุด ปริมาณโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ที่พบในปลาตะเพียนขาวมีค่าสูงสุดในตับ มีปริมาณต่ำสุดในเนื้อ ในอวัยวะทุกส่วนมีปริมาณแคดเมียมต่ำที่สุด และในอวัยวะส่วนต่างๆ ของปลาแขยงและปลาตะเพียนขาว พบว่า ฤดูร้อนปริมาณสังกะสีมีค่าสูงสุดในเหงือกและตับ ฤดูฝนและฤดูหนาวจะมีค่าสูงสุดในตับ ปริมาณทองแดง พบว่า ในช่วงฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว มีค่าสูงสุดในตับ ปริมาณแคดเมียม พบว่าในช่วงฤดูร้อนมีค่าสูงสุดในตับ ส่วนฤดูฝนและฤดูหนาวมีปริมาณสูงสุดในลำไส้และตับ ปริมาณตะกั่ว พบว่าในช่วงฤดูร้อนมีค่าสูงสุดในลำไส้และเหงือก ฤดูฝนมีค่าสูงสุดในลำไส้ ส่วนฤดูหนาวปริมาณตะกั่วในปลาแขยงมีค่าสูงสุดในเหงือก และตรวจไม่พบในปลาตะเพียนขาว

โพรติสต์กลุ่มซิลิเอต

ซิลิเอตเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวประเภทยูแคริโอตสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในดิน แหล่งน้ำจืด และในทะเล โดยจะดำรงชีวิตขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์ในแหล่งน้ำเป็นส่วนใหญ่ (Farmer, 1980) ซิลิเอตแต่ละชนิดจะมีช่วงความทนต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้โพรติสต์กลุ่มนี้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำในแหล่งน้ำได้ (Wetzel, 2001) การศึกษาศักยภาพของซิลิเอตที่สกัดแยกจากโรงบำบัดน้ำเสียของโรงงานฟอกหนังในประเทศปากีสถาน พบว่า *Euplotes mutabilis* มีความทนทานต่อโลหะหนักและสามารถดูดซับโลหะหนักได้ โดยมีความทนต่อแคดเมียมถึง 22 ไมโครกรัมต่อลิตร, คอปเปอร์ 22 ไมโครกรัมต่อลิตร, โครเมียม 60 ไมโครกรัมต่อลิตร และตะกั่ว 75 ไมโครกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังสามารถดูดซับโครเมียมได้ถึง 98% และตะกั่ว 97% (Rehman et al., 2009)

ซิลิเอตและโลหะหนัก

ซิลิเอต เป็นจุลชีพยูแคริโอตกลุ่มโพรติสต์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและดำรงชีวิตได้ในเกือบทุกลักษณะที่อยู่อาศัย ทั้งบนบก ในแหล่งน้ำจืด และแหล่งน้ำเค็ม สิ่งมีชีวิตเหล่านี้นอกจากจะมีประโยชน์ทั้งในแง่ของการเป็นผู้บริโภคหมุนเวียนส่งถ่ายสารอาหารไปสู่ผู้บริโภคในลำดับที่สูงขึ้น ควบคุมประชากรของแบคทีเรียและจุลชีพอื่นๆ แล้ว (Dopheide et al., 2009) ซิลิเอตยังสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (bioindicator) ถึงสภาวะของสิ่งแวดล้อมที่มันดำรงชีวิตอยู่ได้ (Farmer, 1980; Lee et al., 2004; Madoni, 2005; Wetzel, 2001) เนื่องจากสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้บางชนิดบางสกุลมีความจำเพาะต่อลักษณะที่อยู่อาศัย (habitat) กล่าวคือ สามารถดำรงชีวิตหรือเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความจำเพาะเฉพาะต่อตัวมันเท่านั้น อีกทั้งแต่ละชนิดแต่ละสกุลจะมีช่วงความทนต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ซิลิเอตในสกุล *Metopus* และ *Plagiopyla* จะพบได้ในแหล่งน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) ต่ำเท่านั้น (Bick, 1972; Curds, 1992) ด้วยคุณสมบัติเช่นนี้เอง ซิลิเอตจึงสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดถึงคุณภาพและสภาวะของสิ่งแวดล้อมได้ (Foissner, 1999)

ยิ่งไปกว่านั้น จุลชีพกลุ่มซิลิเอตหลายชนิดยังสามารถตอบสนองต่อการปนเปื้อนของมลพิษในสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีอัตราการสืบพันธุ์สูง จึงมีการนำซิลิเอตมาใช้ในการประเมินความเป็นพิษของมลพิษหรือสารปนเปื้อนต่างๆ ในแหล่งน้ำ เช่น ยาฆ่าแมลง (Twagilimana et al., 1998; Venkateswara Rao et al., 2006, 2008) และ โลหะหนัก (Díaz et al., 2006; Madoni et al., 1992, 1994, 1996; Martín-González et al., 2006; Twagilimana et al., 1998) เป็นต้น

โลหะ เป็นธาตุหรือสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำกระแสฟ้าและความร้อนได้ดี และมีความหนาแน่นจำเพาะมากกว่า 5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (Järup, 2003) โลหะบางชนิดมีความจำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมและการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต เช่น สังกะสี เนื่องจากเป็นองค์ประกอบในโปรตีนและเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์ (Lovley, 2000; Vallee and Falchuk, 1993) อย่างไรก็ตาม โลหะหนัก เป็นสารคงตัวที่ไม่สามารถสลายตัวได้ด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ (Martín-González et al., 2006) จึงมีบางส่วนตกตะกอนสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมตามลักษณะที่อยู่อาศัยแบบต่างๆ เช่น สะสมอยู่ในดิน อยู่ตามดินตะกอนที่อยู่ในแหล่งน้ำ อยู่ในน้ำ นอกจากนี้ โลหะหนักยังสามารถสะสมในสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีโลหะหนักปนเปื้อนอยู่ โดยโลหะหนักเหล่านี้เมื่อรวมตัวกับสารอินทรีย์จะกลายเป็นสารประกอบอินทรีย์โลหะ ซึ่งมีความเป็นพิษและสามารถถ่ายทอดเข้าสู่สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้ โดยส่งผ่านไปตามห่วงโซ่และสายใยอาหารของระบบนิเวศ (Alluri et al., 2007) เนื่องจากตัวของโลหะหนักเองเป็นสารที่เป็นอันตรายและมีความเป็นพิษสูง (Järup, 2003) ปริมาณโลหะหนักที่มากเกินไปในระบบจะสร้างสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่อยู่อาศัยเหล่านั้น ส่งผลให้ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Alluri et al., 2007) โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบนิเวศแหล่งน้ำซึ่งถือเป็นระบบอันเป็นที่อยู่อาศัยของสรรพชีวิตที่มีความเกี่ยวข้องและมีความสำคัญยิ่งต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ ยิ่งไปกว่านั้น น้ำ ยังเป็นปัจจัยจำเป็นพื้นฐานที่มีความสำคัญต่อการดำรงอยู่ของทุกชีวิตที่อาศัยอยู่บนผืนพิภพแห่งนี้ (Ricklefs and Miller, 2000) ดังนั้นการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้งจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ลงสู่แหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อม จึงเป็นจัดเป็นปัญหาที่มีความสำคัญปัญหาหนึ่ง และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาวิธีในการประเมินถึงความเป็นพิษของสารดังกล่าวต่อสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการเฝ้าระวังหรือเตือนภัยถึงผลกระทบจากการปนเปื้อนของโลหะหนัก การประเมินนี้นอกจากจะเป็นแนวทางในการบรรเทาและช่วยลดปัญหามลพิษทางน้ำอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของโลหะหนักแล้ว ยังเป็นการช่วยอนุรักษ์ทรัพยากรน้ำให้คงอยู่กับเราและสรรพชีวิตอื่นต่อไปอีกนานเท่านาน

การประเมินความเป็นพิษของสารต่างๆ รวมไปถึงโลหะหนักต่อสิ่งมีชีวิตสามารถพิจารณาได้หลายองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น พิจารณาจากสัณฐานวิทยาและการตอบสนองของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับสาร และจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิลิเอตตายไปครึ่งหนึ่ง (lethal concentration 50: LC_{50}) จากการศึกษาถึงความเป็นพิษของโลหะหนัก 3 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม (Cd), สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) ต่อซิลิเอต 3 ชนิด คือ *Drepanomonas revoluta*, *Uronema nigricans* และ *Euplotes* sp. โดยพิจารณาจากค่า LC_{50} พบว่าแคดเมียมและทองแดงมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง โดยมีลำดับความเป็นพิษ ดังนี้ Cd > Cu >> Zn หรือ Cu > Cd >> Zn ขึ้นอยู่กับชนิดของซิลิเอตที่พิจารณา (Martín-González et al., 2006) นอกจากนี้ จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของซิลิเอต 3 ชนิด คือ *Colpoda steinii*, *Cyrtolophosis elongata* และ *Drepanomonas revoluta* เมื่อได้รับสารละลายโลหะหนัก 2 ชนิด คือ แคดเมียมและสังกะสี พบว่า โลหะหนักมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงภายในไซโทพลาสซึมของซิลิเอตทั้ง 3 กล่าวคือ มีผลทำลายไมโทคอนเดรีย เซลล์เกิดการสร้างแวควิโอลขึ้นภายในไซโทพลาสซึม เกิดการรวมกันของนิวคลีโอลัส (nucleolar fusion) ในแมคโครนิวเคลียส มีการ

สะสมของเศษเยื่อหุ้มเซลล์ขึ้นภายในเซลล์ และเกิดการสร้างออโตฟาโกโซม (autophagosome) เพิ่มขึ้น เพื่อใช้ในการกำจัดออร์กาเนลล์ที่ถูกทำลายหรือเสียสภาพ (Martín-González et al., 2005)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบงานวิจัยที่เกี่ยวกับการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักต่อสิ่งมีชีวิต โดยใช้ซิลิเอตน้ำจืดเป็นตัวตรวจสอบค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตาม การศึกษาในลักษณะเดียวกันกับซิลิเอตที่ดำรงชีวิตอยู่ในน้ำเค็มหรือทะเลยังพบมีไม่มากนัก โดยทะเลจัดเป็นลักษณะที่อยู่อาศัยรูปแบบหนึ่ง ซึ่งอาจได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของโลหะหนักได้เช่นเดียวกันจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ และบ่อยครั้งเรามักได้ยินถึงการปนเปื้อนรั่วไหลของน้ำมันดิบลงสู่ทะเล โดยโลหะหนักก็เป็นองค์ประกอบหนึ่งของน้ำมันดิบถึงแม้ว่าจะเป็นองค์ประกอบในปริมาณน้อยก็ตาม จากการศึกษาโดย สุชา เฉยศิริ และคณะ (2554) และ ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และคณะ (2555) พบว่า พื้นที่บริเวณหาดลูกลมของเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี มีความหลากหลายทั้งชนิดและจำนวนของซิลิเอตสูง และจากคุณสมบัติของซิลิเอตที่กล่าวมาข้างต้นทำให้เห็นถึงศักยภาพในการนำซิลิเอตมาใช้ทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ งานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจบทบาทหน้าที่ของโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตทะเลในแง่ความสามารถในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกซิลิเอตบางสายพันธุ์จากพื้นที่บริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร ให้บริสุทธิ์ และนำซิลิเอตสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ไปใช้ในการทดสอบประเมินความเป็นพิษของโลหะหนัก 3 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม (Cd), นิกเกิล (Ni) และ สังกะสี (Zn) ต่อเซลล์ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ซิลิเอตจากพื้นที่นี้ให้เกิดประโยชน์ในแง่ของการเป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพของคุณภาพแหล่งน้ำที่อาจพบมีการปนเปื้อนโลหะหนักในเบื้องต้น อีกทั้งยังชี้ให้เห็นถึงผลกระทบจากการปนเปื้อนของโลหะหนักต่อจุลชีพ โดยอาศัยซิลิเอตเป็นตัวประเมินเบื้องต้นและสะท้อนให้เห็นถึงผลกระทบดังกล่าวต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศเดียวกัน

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของซิลิเอตทะเลหน้าดินจากหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ในการประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนักที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการวิจัยและแผนการปฏิบัติงาน

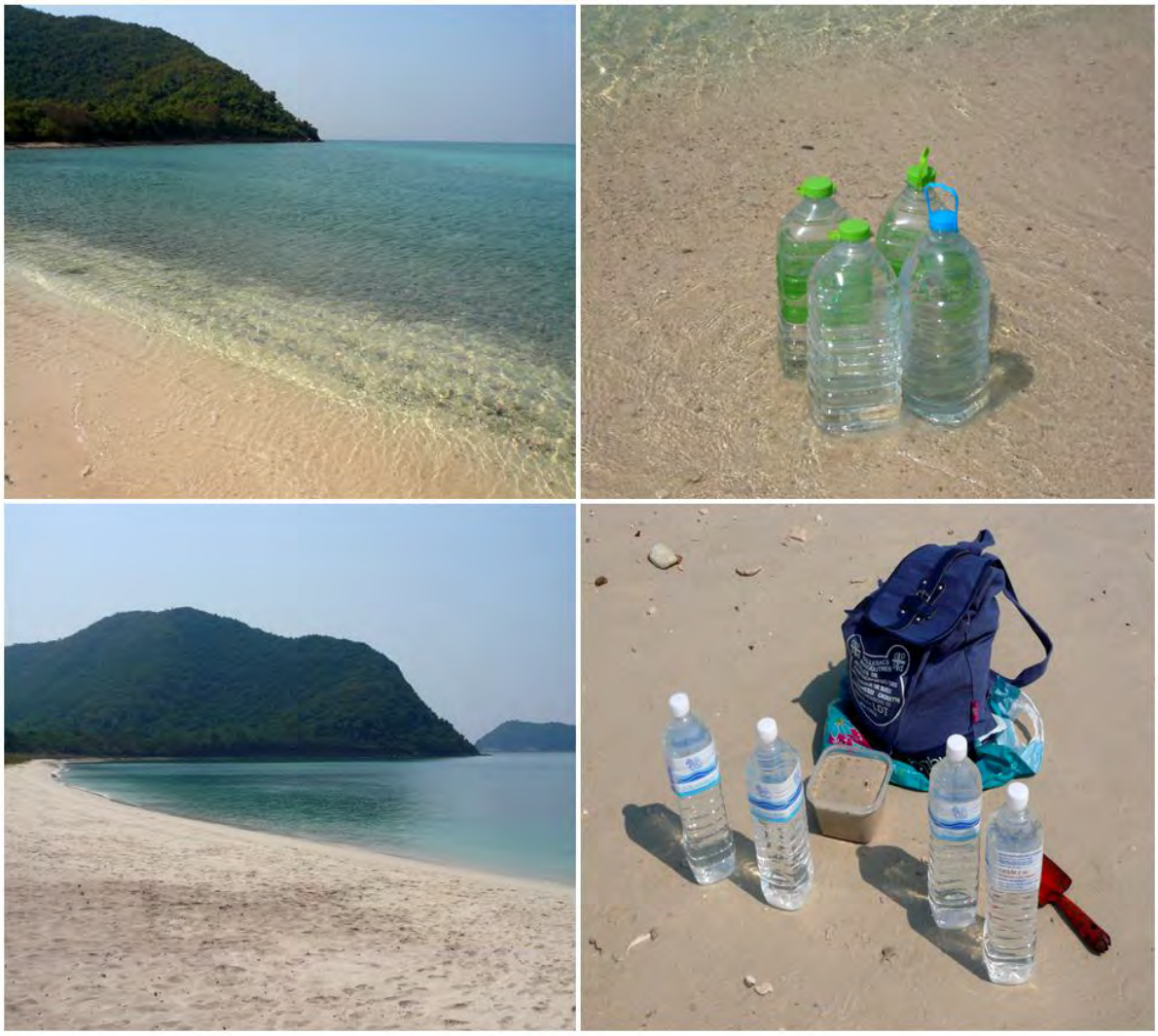
<u>การปฏิบัติงานในภาคสนาม</u>

การเก็บตัวอย่างทราย ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทรายตามบริเวณชายฝั่งทะเลของหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยใช้ช้อนพรวน และเก็บทรายตัวอย่างไว้ในกล่องโฟมรักษาอุณหภูมิ จากนั้นนำกลับมาศึกษาต่อยังห้องปฏิบัติการ การเก็บตัวอย่างน้ำ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณชายฝั่งทะเลของหาดลูกลมบรรจุใส่ขวดเพื่อใช้ในการศึกษาผลของโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเอตในห้องปฏิบัติการ (ภาพที่ 1)

<u>การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ</u>

การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการแบ่งออกเป็น 3 ส่วนหลักๆ ได้แก่

1) การสกัดและคัดแยกเซลล์ซิลิเอตออกจากทรายตัวอย่าง
2) การระบุอัตลักษณ์ของซิลิเอตสายพันธุ์ที่ใช้ในการประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนัก
3) การประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเอตที่คัดแยกได้



ภาพที่ 1 พื้นที่ศึกษาบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี (บนซ้าย), น้ำทะเลตัวอย่างที่เก็บจากหาดลูกลม (บนขวา), บริเวณชายหาดของหาดลูกลม ซึ่งเป็นพื้นที่เก็บทรายตัวอย่างเพื่อนำมาสกัดแยกซิลิเอตทะเลหน้าดิน (ล่างซ้าย) และทรายตัวอย่างที่เก็บจากหาดลูกลม (ล่างขวา)

1) การสกัดและคัดแยกเซลล์ซิลิเอตออกจากทรายตัวอย่าง

1.1) ทำการสกัดเซลล์ซิลิเอตออกจากทรายตัวอย่าง โดยซิลิเอตที่อาศัยตามหน้าดินและดำรงชีวิตแทรกอยู่ตามช่องว่างระหว่างเม็ดทรายจะถูกสกัดไล่ด้วยน้ำแข็งตามวิธีของ Uhlig (1964) ผ่านผ้าตาข่ายแพลงก์ตอนขนาดรู 60 ไมโครเมตร

1.2) ทำการคัดแยกเซลล์ซิลิเอตที่สนใจให้บริสุทธิ์ (pure and clonal culturing) เพื่อใช้ในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนัก โดยดูดแยกเซลล์ด้วยปาสเจอร์ปิเปตต์ปลายแหลมที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วทีละเซลล์ ล้างเซลล์ที่คัดแยกได้ด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเซลล์ใส่หลุมของจานเพาะเชื้อที่มีน้ำทะเลที่ผ่านการอบฆ่าเชื้ออยู่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวน

1.3) เพาะเลี้ยงเซลล์ซิลิเอตที่คัดแยกจนบริสุทธิ์ในน้ำทะเลที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ใส่ยีสต์ผงที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วเป็นอาหาร รอให้เซลล์เพิ่มจำนวนเพื่อใช้เซลล์ดังกล่าวในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักต่อไป

2) การระบุอัตลักษณ์ของซิลิเอตสายพันธุ์ที่ใช้ในการประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนัก

2.1) ทำการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างซิลิเอตทะเลหน้าดินที่ใช้ในการประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนักสายพันธุ์ข้างต้น โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ MasterPure™ Complete DNA & RNA Purifiction Kit ของ EPICENTRE (Madison, WI, USA, Cat. No. MC85200) หรือ QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Madison, WI, USA, Cat. No. QE0905T)

2.2) ทำการเพิ่มจำนวนยีนหรือช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการระบุอัตลักษณ์ของซิลิเอตหน้าดินสายพันธุ์ข้างต้น โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction: PCR) ไพรเมอร์ (primer) และสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม ด้วย One*Taq*® Hot Start DNA Polymerase (New England Biolabs, MA, USA, Cat. No. M0481S) โดยยีนและช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจศึกษา คือ บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA: rDNA) ที่ประกอบด้วย ยีน 18S หรือสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (small subunit ribosomal DNA: SSU), ช่วงลำดับ ITS1 (internal transcribed spacer 1), ยีน 5.8S, ช่วงลำดับ ITS2 (internal transcribed spacer 2) และส่วนต้นของยีน 28S หรือลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (large subunit ribosomal DNA: LSU) ตามลำดับ

2.3) ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการ โดยการทำ agarose gel electrophoresis และทำความสะอาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยชุดทำความสะอาดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสสำเร็จรูป UltraClean™ 15 DNA Purification Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Cat. No. 12100-300)

2.4) ทำการโคลนยีนและช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ ด้วยชุดโคลนนิ่ง Strata Clone™ PCR Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, CA, Cat. No. 240205) โดยใช้แบคทีเรีย Strata Clone™ competent cells

2.5) ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ของยีนที่ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการระบุอัตลักษณ์ด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคการหาลำดับนิวคลีไทด์อัตโนมัติแบบธรรมดา (normal automatic sequencing) ด้วยเครื่อง 3730XL DNA sequencer โดยส่งผลิตภัณฑ์ที่โคลนได้ไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

2.6) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) เวอร์ชั่น 6 (Tamura et al., 2013) และทำการวิเคราะห์ตรวจกับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เพื่อช่วยในการระบุอัตลักษณ์ของซิลิเอตทะเลหน้าดินสายพันธุ์ที่ใช้ในการประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนักในงานวิจัยครั้งนี้

3) การประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเอตที่คัดแยกได้

ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเอตที่คัดแยกได้ ในงานวิจัยครั้งนี้จะใช้สารประกอบของโลหะหนัก 3 ชนิด ได้แก่

$3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ สำหรับทดสอบความเป็นพิษของ Cd

$NiSO_4 \cdot 6H_2O$ สำหรับทดสอบความเป็นพิษของ Ni

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ สำหรับทดสอบความเป็นพิษของ Zn

3.1) การศึกษาผลของโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเอต เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (lethal concentration 50: LC_{50})

I) เตรียมสารละลายโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด ให้มีความเข้มข้นตั้งต้น (stock solution) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารประกอบโลหะหนักในน้ำทะเลกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำสารละลายโลหะหนักตั้งต้นไปเจือจางให้ได้ช่วงความเข้มข้นต่างๆ ประมาณ 8 ความเข้มข้น โดยความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบต้องทำให้เซลล์ตายมากกว่าครึ่งหนึ่งของเซลล์ทั้งหมด (LC_{50}) ที่ใช้ทดสอบ และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดต้องไม่ทำให้เซลล์ตาย

II) นำเซลล์ซิลิเอตที่คัดแยกจนบริสุทธิ์ได้ข้างต้นมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน ให้มีความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 1,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คำนวณความหนาแน่นเซลล์โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์จากภาชนะเพาะเลี้ยงมา 20 ไมโครลิตร นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ สุ่มนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้ จากนั้นคำนวณปริมาณเซลล์ต่ออาหารเพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตร แล้วบันทึกผล

III) ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์ซิลิเอตจากจานเพาะเลี้ยงที่มีความหนาแน่นเซลล์พร้อมใช้ในการทดลองมา 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกชนิด 24 หลุม เติมสารละลายโลหะหนักที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการอีกหลุมละ 500 ไมโครลิตร ทำเช่นเดียวกันกับทุกๆ ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ ความเข้มข้นละ 4 หลุม สำหรับกลุ่มควบคุมให้เติมน้ำทะเลกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วที่ไม่มีสารละลายโลหะหนักหลุมละ 500 ไมโครลิตรแทน อีก 4 หลุม

IV) นับจำนวนเซลล์ซิลิเอตที่อยู่รอดหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงอย่างสุ่ม โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดตัวอย่างเซลล์ซิลิเอตจากแต่ละหลุมมาหลุมละ 20 ไมโครลิตร นับจำนวนเซลล์ซิลิเอตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ทำการนับซ้ำทั้งหมด 3 ครั้งในแต่ละหลุม หาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ซิลิเอตที่นับได้ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ซิลิเอตในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักเมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ทำการนับเช่นเดียวกันในชุดการทดลองซ้ำทั้ง 4 ชุด (หลุม) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในการทดลองแต่ละความเข้มข้น}}{\text{จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตาย} = 100 - \text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด}$$

V) ทำการทดลองซ้ำในข้อ II-IV ทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง โดยเว้นช่วงการทดลองในแต่ละชุดการทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อเตรียมเซลล์ซิลิเอตให้พร้อมในการทดสอบแต่ละครั้ง

VI) ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารละลายโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ $3CdSO_4 \bullet 8H_2O$, $NiSO_4 \bullet 6H_2O$ และ $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$

VII) วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ซิลิเอตตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธี probit analysis โดยใช้โปรแกรม StatPlus 2009

3.2) การศึกษาผลของโลหะหนักต่ออัตราการเจริญเติบโต (growth rate) ของซิลิเอต

วัดอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอตที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยคำนวณจากการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเอต (ข้อ 3.1) แล้วนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้จากการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักมาคิดเป็นความหนาแน่นของเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสร้างกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตที่แต่ละความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ $3CdSO_4 \bullet 8H_2O$, $NiSO_4 \bullet 6H_2O$ และ $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในแต่ละชุดการทดลองที่ปราศจากสารประกอบโลหะหนัก

3.3) การศึกษาผลของโลหะหนักต่อเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (generation time) ของซิลิเอต

I) เติมน้ำทะเลที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อและกรองผ่าน Nylon Syringe Filter ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร (เพื่อให้น้ำทะเลที่นำมาใช้สะอาดปราศจากตะกอน) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกชนิด 96 หลุม จากนั้นใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วดึงปลายให้แหลม โดยใช้ความร้อนจากตะเกียงดูดเซลล์ซิลิเอตปริมาตร 20 ไมโครลิตรมา 1 เซลล์

II) ใส่สารละลายโลหะหนักที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 20% (LC_{20}) ลงไปหลุมละ 70 ไมโครลิตร สำหรับกลุ่มควบคุมให้เติมน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อลงไปหลุมละ 70 ไมโครลิตรแทน

III) นับจำนวนเซลล์ซิลิเอตทั้งหมดหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ซิลิเอตที่นับได้ เพื่อคำนวณหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นในแต่ละสารละลายโลหะหนักเมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุม โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{จำนวนชั่วรุ่น (n)} = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2}$$

$$\text{เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (g)} = \frac{\text{ระยะเวลา}}{\text{จำนวนชั่วรุ่น}}$$

เมื่อ N_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง

N_0 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น (เท่ากับ 1 เซลล์)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโต เท่ากับ 24 ชั่วโมง

IV) ทำการทดสอบหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น โดยใช้ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 20% ในสารประกอบโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ $3CdSO_4 \bullet 8H_2O$, $NiSO_4 \bullet 6H_2O$ และ $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$

3.4) การศึกษาผลของโลหะหนักต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์ซิลิเอต โดยทำการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ซิลิเอตทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารละลายโลหะหนัก โดยใช้ปิเปตต์ดูดเซลล์ซิลิเอตที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีและไม่มีสารละลายโลหะหนักมาหยดลงบนสไลด์ 2-3 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงที่กำลังขยายต่างๆ พร้อมบันทึกภาพ

สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

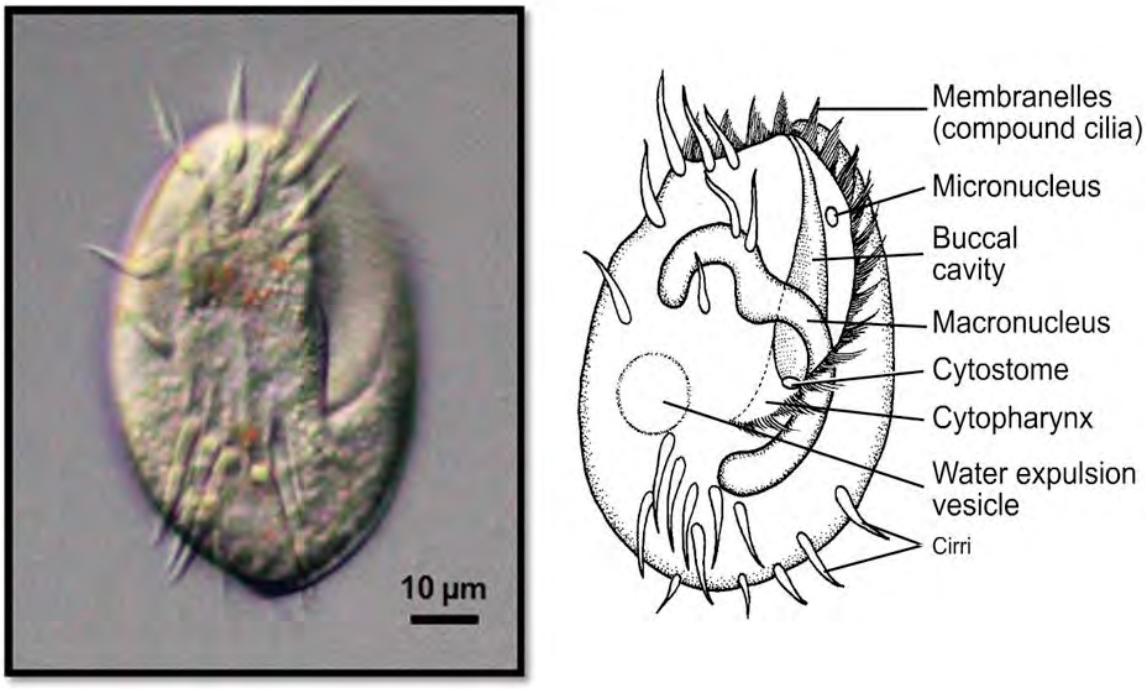
ภาคสนาม: ทำการเก็บตัวอย่างทรายและน้ำในพื้นที่ อพ.สธ. บริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยตัวหาดเป็นหาดทรายที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศเหนือของเกาะแสมสาร

ห้องปฏิบัติการ: ทำการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักและระบุอัตลักษณ์ของซิลิเอต ณ ห้องปฏิบัติการ Protistology Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการดำเนินงาน

การสกัดคัดแยกและสัณฐานวิทยาของซิลิเอต

จากการเก็บตัวอย่างทรายบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี เพื่อนำมาสกัดคัดแยกซิลิเอตและใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ สามารถคัดแยกและเพาะเลี้ยงซิลิเอตจนได้สายพันธุ์บริสุทธิ์จำนวน 1 สายพันธุ์ การศึกษาสัณฐานวิทยาของซิลิเอตสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง พบว่าซิลิเอตที่คัดแยกได้อยู่ในสกุล *Euplotes* โดยเซลล์มีขนาดลำตัวกว้างประมาณ 39-48 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 62-80 ไมโครเมตร ว่ายน้ำอย่างอิสระ แต่ส่วนใหญ่ชอบคืบคลานอยู่ตามพื้นผิว เซลล์รูปไข่ (oval body) และไม่ยืดหดตัว ด้านหลังเซลล์นูน ด้านท้องแบน ช่องปากกว้างเป็นรูปสามเหลี่ยมและมีซิเลียล้อมรอบ เซลล์มีเซอร์ไร (cirri) ซึ่งเกิดจากซิเลีย (cilia) อัดแน่นรวมกันเป็นมัดทั้งทางด้านหน้า, ด้านท้อง, ด้านท้าย และ ด้านก้น เซลล์มีแมคโครนิวเคลียส (macronucleus) รูปตัว c อยู่ภายในเซลล์ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงของเซลล์ซิลิเอตสกุล *Euplotes* ที่สกัดแยกจากหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี และใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนัก (ซ้าย) เปรียบเทียบกับภาพวาดของซิลิเอตในสกุลเดียวกัน (ขวา) (ที่มา: http://biodidac.bio.uottawa.ca/ thumbnails/filedet.htm?Filename=PROT013B&Filetype=cdr)

การระบุอัตลักษณ์ของซิลิเอตสายพันธุ์ที่ใช้ในการประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนัก

การเพิ่มจำนวนยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอของซิลิเอตสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และไพรเมอร์ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 3,600 คู่เบส โดยเมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการโคลนนิ่งจำนวน 2 สาย (1-5 และ 1-6) เพื่อใช้ในการระบุอัตลักษณ์ของซิลิเอตสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า มีความยาว 3,615 และ 3,627 คู่เบส ตามลำดับ ดังแสดงด้านล่าง

```
1(1-5)  ACCTGGTTGA TCCTGCCAGT AGTCATACGC TTGTCTCAAA GATTAAGCCA  50
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  50

1(1-5)  TGCATGTCTA AGTATAAAGG TTACATACAA TGAAACTGCG AATGGCTCAT  100
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  100

1(1-5)  TCAAACAGTT ATAGTTTATT TGGATTAAAA CATTTGTTTA AATGGATAAC  150
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  150

1(1-5)  CGTAGTAATT CTAGGGCTAA TACATGCGTT ACGAGGGACT TTACGGAACC  200
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  200

1(1-5)  TCAGTATTTA TTAGATTTCA AACCAATATT CCGCAAGGTC TACTGAGATG  250
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  250

1(1-5)  ATTCATGATA ACTTATCGGA TTGCTGGTCT TCCGACAATG AACCATTCAT  300
2(1-6)  .......... .......... .......... ....G..... ..........  300

1(1-5)  GTTTCTGCTT CCCATCAGCT TGATGGTAGT GTATTGGACA ACCATGGCAT  350
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  350

1(1-5)  TCACGGGCTA TCGGGGGATT AGGGTTCGAT TCCGGAGAGG GAGCCTGAGA  400
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... .....C....  400

1(1-5)  AACGGCTACC ACTTCTACGG AAGGCAGCAG GCGCGAAAAT TATCCAATCC  450
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  450

1(1-5)  TGATTCAGGG AGGTAGTGAA AGAAATAATG AACTAGGATT TATCCTGGGG  500
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  500

1(1-5)  TCACAATGGG CTTGATTTGC AAACTTTCTA GCGAGGAACA ATTGGAGGGC  550
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  550

1(1-5)  AAGTCTGGTG CCAGCAGCCG CGGTAATTCC AGCTCCAATA GTGTATATTA  600
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  600

1(1-5)  ATGTTCCTGC AGTTATTCGA TGCTCGTAGT TGGATTTCTG GAGGCTGAGA  650
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  650

1(1-5)  CAGGAGGGCA GCCAAGGTTG TCGCCAGTCT CTTCCTTCAT CCGCCTGTTA  700
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  700

1(1-5)  ACGTTGCCCG GGATTCACTT CTCGGCTTCG GGCTCAGGTA CTCTTGTTTT  750
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..T.......  750

1(1-5)  TATTTTTACC CTTTCCTCTA TATTCATTTA TATCTTCTCT TTGAGCAAAT  800
2(1-6)  .......... .......... .......... ........T. ..........  800

1(1-5)  TATAGTGTTT CAGGCAGGCG TGCGCCGGAA TACATTAGCA TGGAATAATC  850
2(1-6)  .......... .......... .......... .........G ..........  850

1(1-5)  GAATTGGACC GTGTATTCAC TATGTGAATT CTTCCTTATT TGTTGGTTCT  900
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  900

1(1-5)  AAGGACACGG ATATGGTTAA TAGGGATAGT AATTTTCAGG GGAGGCATTA  950
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  950
```

```
1(1-5)  GTATTTAATT TCCAGAGGTG AAATTCTTTG AAATATTAAA GACTAACTTA  1000
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1000

1(1-5)  TGCGAAAGCA TTTATTTTGC CAATAATGTT TTCATTAATC ATTGAACGAA  1050
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1050

1(1-5)  AGTTAGGGGA TCAAAGACGA TCAGATACCG TCCTAGTCTT AACCATAAAC  1100
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1100

1(1-5)  GTTGCCGACT AGGGATCGGA GGGCGTGCAC ATTCCGCCTT CGGCACCTTA  1150
2(1-6)  A......... .......... .......... .......... ..........  1150

1(1-5)  CGAGAAATCA AAGTCTTTTG GGTTCTGGGG GTAGTATGGT CGCAAGGCTG  1200
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1200

1(1-5)  AAACTTAAAG GAATTGACGG AAGGGCACCA CCAGGAGTGG AGCTTGCGGC  1250
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1250

1(1-5)  TCAATTTGAC TCAACACGGG AAATCTTACC AGGTCCAGAC ATAGCGAGGA  1300
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1300

1(1-5)  TTGACAGATT GATAGCTCTT TCTTGATTCT ATGGGTATTT TTGGTGGTGC  1350
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1350

1(1-5)  ATGGCCGTTC TTAGTTGGTG GAGTGATTTG TCTGGTTAAT TCCGTTAAAC  1400
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1400

1(1-5)  GAACGAGACC TCAGCCTGCT AAATAGTTAC CTGTCTTTCT TTTCGAGACT  1450
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1450

1(1-5)  TGATAACTTC TTAGAGGGAC GTTGTGTGCA ACCACAAGGA AGTTGAGGCA  1500
2(1-6)  .......... .......... .......... G......... ..........  1500

1(1-5)  ATAACAGGTC TGTGATGCCC TTAGATGTCC TGGGCCGCAC GCGTGCTACA  1550
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1550

1(1-5)  CTGATACGTA CAACGAGGTA TATGCATTCA TGCATCGTTG CTGCTCCGAA  1600
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1600

1(1-5)  ATAGACACAG CTAAATCTTC TAAAATACGT ATCGTGCTGC GGATAGATCG  1650
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1650

1(1-5)  TTGAAATTAT GGATCTTGAA GGTGGAATTC CTAGTAAGCG CGGGTCATCA  1700
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ......G...  1700

1(1-5)  ACCCGCGTTG ATTACGTCCC TGCCCTTTGT ACACACCGCC CGTCGCTCCT  1750
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1750

1(1-5)  ACCAATTTCG AGTGGCTCGG TGAACCTCTT TGGACTGTCG AGCAATCGCG  1800
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1800

1(1-5)  AAATTAGAGT GAACCTGGTC ACTTAGAGGA AGGAGAAGTC GTAACAAGGT  1850
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1850

1(1-5)  TTCCGTAGGT GAACCTGCGG AAGGATCAAT CTTAAATACT ATACTAACCT  1900
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1900

1(1-5)  AAACTCAGCC AGTGCTCCAC GTGAGTAAAG CGAACAAAAC TTTATTACTT  1950
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  1950
```

```
1(1-5)  CTCAAACGCT TGCGTTTGTG CAGTAAAACT TAACATCCTA AAATTTTCAA  2000
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2000

1(1-5)  CGGTGGATGT CTTGGCTCTC ATATCGATGA AGAGCGCAGC AAAGTGCGAT  2050
2(1-6)  .......C.. .......... .......... ...A...... ..........  2050

1(1-5)  AAGCAATGCG AATTGCAGGC CGTGAGTCAT TAGAATTTCG AAAGCAACTT  2100
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2100

1(1-5)  GCGCCTCCGC CTGGCGAGAG GCATGTTTGC TTCAGTGTAT CTTTAACAAC  2150
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2150

1(1-5)  AATTAAAGAC AACTAACCAA ATCATGAAGT GAGTGAGCTG TAAAGCTCTC  2200
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2200

1(1-5)  GTTCACAACG TATGCAAGTA GCTGTATTTA CATTACTCAT TAACCCGATC  2250
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2250

1(1-5)  ACCTTGTGTG AACTTGGTCT AATAGAGGGT AACTGCAGGA GTTCTACTCG  2300
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2300

1(1-5)  ACTACTTGTG AGTTAGTAAA CTAAAATATC ATATCTGAAG TCAAGCAAGA  2350
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2350

1(1-5)  GCACGCGCTG AACTTAAGCA TATCACTAAG CGCAGGTAAA AGAAAATAAC  2400
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2400

1(1-5)  TATGATTGCC TCAGTAACGG CGAGTGAACC GGCAATAGCC CAAGATGAGA  2450
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2450

1(1-5)  ACCGCTGCTC TGCGAGCACG CGGGTTGTAA TCTAAAGAGG GGTCGCTGAC  2500
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2500

1(1-5)  AGGTTCTTCT GACGCCCAAG TGTCTTGGAA TAGACCGCCA GGGAGGGTGA  2550
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2550

1(1-5)  AAGCCCCGTA CGGTGTCGGA GGAGCGCTAG GTGGCTTCTT GAAGAGTCGA  2600
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2600

1(1-5)  GTTGTTCGGG ACTGCAGCTC TAAGTGGGAG GTAGACTTCT CCTAAGGCTA  2650
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2650

1(1-5)  AATAACTATG AGAGACCGAT AGCGAACAAG TAATGTGAAT GAAAGATGAA  2700
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2700

1(1-5)  AAATAAATTT CCTTCCGTAA GAACTTTGAA TGAACAAAAG AGAATTAAAG  2750
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2750

1(1-5)  AGACCTGAAA CCGTTGAGGT GGAAGCGATA GGGAGTTTTC ATTTGGGATG  2800
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2800

1(1-5)  GAGCTGGGAA GGCAGGTTCG CCTGCCCACT TGCTCCAGCC CGAAACGGTT  2850
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2850

1(1-5)  GTTTATCTTT GAGCGCTTCA AAAGCCTGTC TGGGTCAGAG CTTCGGCATC  2900
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2900

1(1-5)  ACTCAGGCAG AGAATGTTGC GGTCGAGGCT AAGGAACCCT TGATTTTTCC  2950
2(1-6)  .......... .......... .......... .......... ..........  2950
```

```
1(1-5)   TACCGACCCG TCTTGAAACA CGGACCAAGG AGTCTAACAG ACATGCGATT  3000
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3000

1(1-5)   ATGTTGGTGC TTTGGAAACC ATACATGAGC AATGAAAGTA AGCGGTGCCA  3050
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3050

1(1-5)   ATCGTAAGAT GCAGCATCGG CCAGTTGTGA TCCTCTGGAG AAGCGTACTG  3100
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3100

1(1-5)   GCTGCGAGCA TATCTGTTAG GACCCGAAAG ATGGTGAACT ACGCTTGAGT  3150
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3150

1(1-5)   AGGGTGAAGC CAGGGGAAAC TCTTGTGGAA GCCCGAAGCG GTACTGACGT  3200
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3200

1(1-5)   GCAAATCGTT CGTCAAACTT GAGTGTAGGG GCGAAAGACT AATCGAACCA  3250
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3250

1(1-5)   TCTAGTAGCT GGTTCCCTCC GAAGTTTCTC TCAGGATAGC AAGGACAGTT  3300
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3300

1(1-5)   AAAGCAGTTT TTATTTCAAT TAGGTAAAGA ATAAATGATT AGAAGCATCT  3350
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3350

1(1-5)   GGGGGCGTTT TAGTGTTCTC GACTTAGTTC TCAAACTCTA AATATTTGTA  3400
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3400

1(1-5)   ATAACTCGGT ATTCCTTAAC TGAAGATCGA GGCAGAATGC TTGTCCTTAG  3450
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3450

1(1-5)   TGGGCCATTT TTGGTAAGCA GAACTGGCGA TGAGGGATGA ACCTAACTCT  3500
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3500

1(1-5)   GGGTTAAGGT GCCCAACTGC ACGCGCATCA GATACCTCAA AGGGTGTGTT  3550
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3550

1(1-5)   GATTCATTTA GACAGCAGGA CGGTGGCCAT GGAAGTCGGA ATCCGCTAAG  3600
2(1-6)   .......... .......... .......... .......... ..........  3600

1(1-5)   GAGTGTGTAA CAACT----- ------- 3615
2(1-6)   .......... .....CACCT GCCGAAT 3627
```

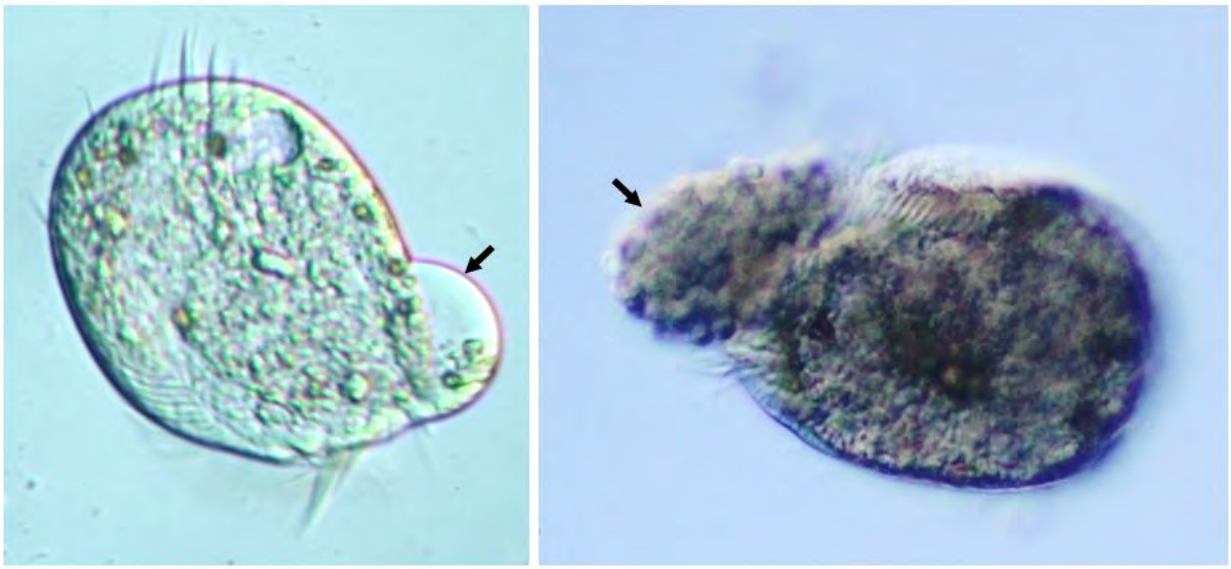
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อการระบุอัตลักษณ์โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่า ชนิดซิลิเอตสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงได้ คือ *Euplotes quinquecarinatus* โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *E. quinquecarinatus* ในฐานข้อมูลถึง 99%

การประเมินความเป็นพิษของสารประกอบโลหะหนักต่อซิลิเอต *E. quinquecarinatus*

การศึกษาสัณฐานวิทยาของ *E. quinquecarinatus* (ภาพที่ 3) เมื่อเซลล์ได้รับสารประกอบโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารประกอบโลหะหนักมีผลทำให้โครงสร้างและรูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันเพียงระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดมีผลต่อเซลล์เท่านั้น เซลล์ที่ได้รับสารละลายโลหะหนักจะค่อยๆ หยุดการเคลื่อนที่ และโครงสร้างของซิเลียเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง โดยซิเลียจะหงิกงอและแตกปลาย (ภาพที่ 3)

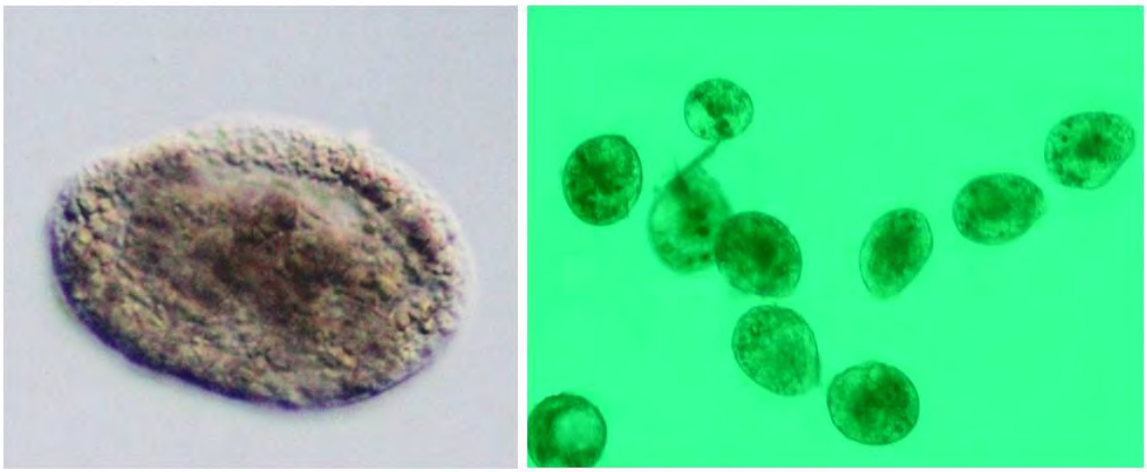
ภาพที่ 3 ลักษณะของซิเลีย (ลูกศร) ในเซลล์ปกติ (บนซ้าย) และเซลล์ที่ได้รับสารประกอบโลหะหนักจะค่อยๆ หยุดการเคลื่อนที่ (บนขวา) จากนั้นโครงสร้างของซิเลีย (ลูกศร) เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง โดยซิเลียจะหงิกงอและแตกปลาย (ภาพล่าง)

เมื่อผ่านไประยะเวลาหนึ่ง ตัวเซลล์จะเกิดการพุพอง (blebbing) คือ มีส่วนของเซลล์ที่ปูดพองออกและมีของเหลวใสไหลออกจากตัวเซลล์ (ภาพที่ 4) โครงสร้างภายในเกิดการเสียสภาพและหลอมรวมกับส่วนไซโทพลาสซึม จากนั้นไซโทพลาสซึมจะค่อยๆ ไหลออกมาจากตัวเซลล์ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 เซลล์ที่ได้รับสารประกอบโลหะหนัก โดยเซลล์จะเกิดการพุพอง (blebbing) ซึ่งมีส่วนของเซลล์ที่ปูดพองออกและมีของเหลวใสไหลออกจากตัวเซลล์ (ลูกศร) (ซ้าย) และเซลล์ที่ไซโทพลาสซึมไหลออกจากตัวเซลล์ (ลูกศร) (ขวา)

เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ที่ได้รับสารประกอบโลหะหนัก เกิดการเสียสภาพอย่างรุนแรง โดยซิเลียจะหลุดออกจากตัวเซลล์จนหมด (ภาพที่ 5) เซลล์เปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลมและตายในที่สุด (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 เซลล์ที่สูญเสียซิเลียหลังจากได้รับสารประกอบโลหะหนัก (ซ้าย) และเซลล์ที่เสียรูปร่างเปลี่ยนแปลงเป็นทรงกลมและตายในที่สุดหลังจากได้รับสารประกอบโลหะหนักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ขวา)

ความเป็นพิษของโลหะหนักต่อซิลิเอต *E. quinquecarinatus*

การทดสอบความเป็นพิษโดยใช้สารประกอบโลหะหนัก 8 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ และทำการทดสอบซ้ำด้วยเงื่อนไขเดียวกันทั้งหมด 3 ครั้ง และนำค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบและเปอร์เซ็นการอยู่รอดโดยเฉลี่ยไปคำนวณค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรม StatPlus 2009 ได้ค่า LC_{50} ของแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี เท่ากับ 183 มิลลิกรัมต่อลิตร, 269 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 56 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสังกะสีมีความเป็นพิษต่อ *E. quinquecarinatus* มากที่สุด รองลงมา คือ แคดเมียม และนิกเกิล ตามลำดับ

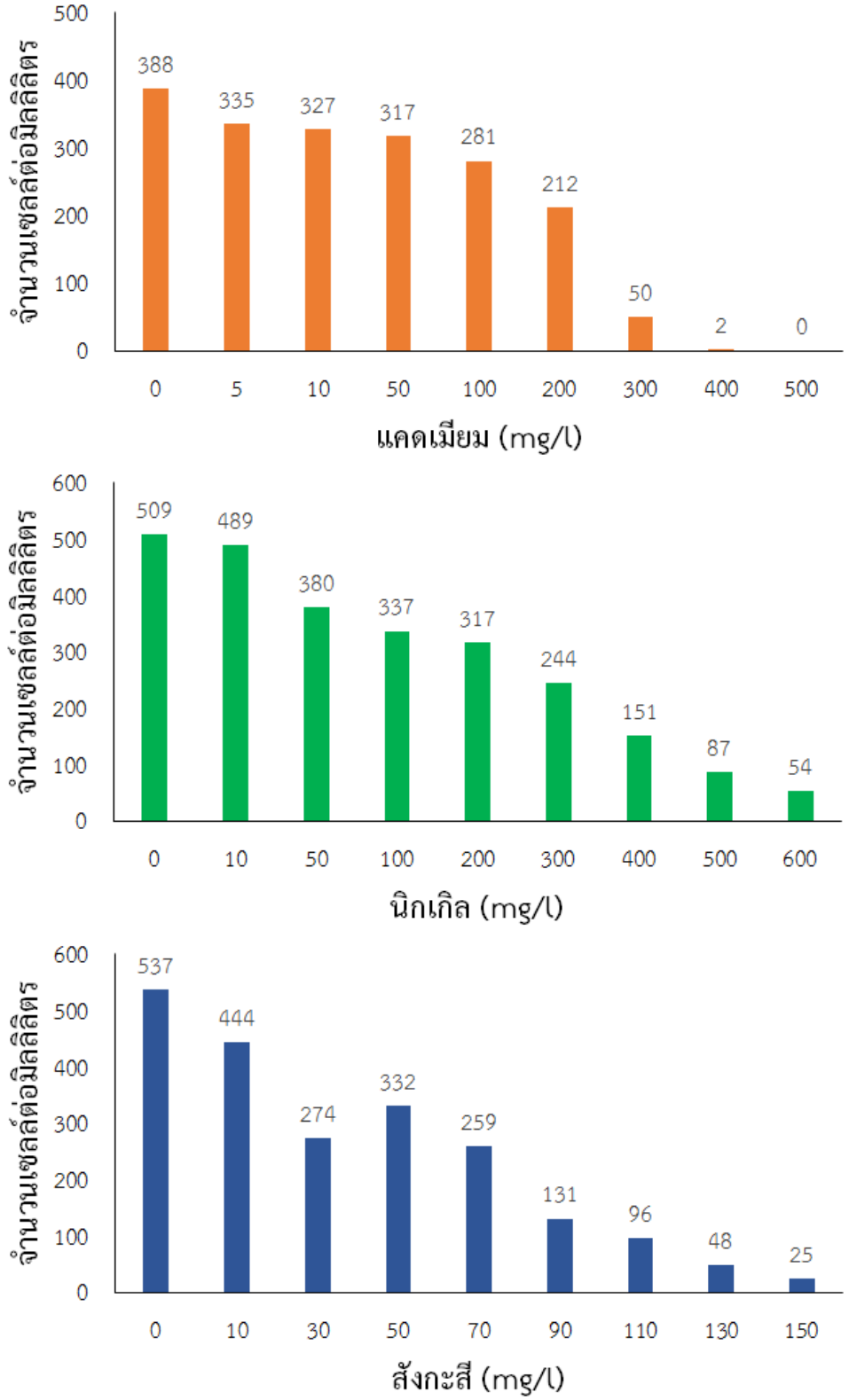
ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเฉลี่ยของ *E. quinquecarinatus* เมื่อทดสอบกับความเป็นพิษของแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี ที่ความเข้มข้นต่างๆ 8 ความเข้มข้น ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ และแต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง

แคดเมียม		นิกเกิล		สังกะสี	
ความเข้มข้น (mg/l)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/l)	การอยู่รอด (%)	ความเข้มข้น (mg/l)	การอยู่รอด (%)
5	86.22	10	93.85	10	82.34
10	86.16	50	73.46	30	50.52
50	81.21	100	64.94	50	62.16
100	74.56	200	62.58	70	47.90
200	56.52	300	47.89	90	24.97
300	14.05	400	29.21	110	19.38
400	0.66	500	16.60	130	9.30
500	0	600	9.70	150	5.09

เมื่อนำค่า LC_{50} ของโลหะหนักแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบ และพิจารณาความเป็นพิษและความไวของ *E. quinquecarinatus* ต่อพิษของโลหะหนัก พบว่า *E. quinquecarinatus* มีความไวต่อความเป็นพิษของสังกะสีมากที่สุดที่ความเข้มข้น 56 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทางกลับกันเมื่อพิจารณาถึงความทนต่อพิษของโลหะหนัก พบว่าซิลิเอตชนิดนี้สามารถทนต่อพิษของนิกเกิลได้ถึง 269 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลของโลหะหนักต่ออัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต *E. quinquecarinatus*

การศึกษาถึงผลของโลหะหนักต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *E. quinquecarinatus* เมื่อได้รับสารประกอบแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยคำนวณค่าจากการทดสอบความเป็นพิษของแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี ต่อเซลล์ซิลิเอต แล้วนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้จากการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักทั้งสามมาคิดเป็นความหนาแน่นเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบว่า สารประกอบโลหะหนักมีผลทำให้การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ *E. quinquecarinatus* ลดลง โดยอัตราการเจริญเติบโตจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบโลหะหนักเพิ่มขึ้น และสังกะสีมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตมากที่สุด รองลงมาคือ แคดเมียม และนิกเกิล ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสีที่ใช้ในการทดสอบกับจำนวนเซลล์ของ *E. quinquecarinatus* ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

ผลของโลหะหนักต่อเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของซิลิเอต *E. quinquecarinatus*

จากการหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *E. quinquecarinatus* ในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารประกอบโลหะหนัก พบว่า *E. quinquecarinatus* มีค่าเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น เท่ากับ 7 ชั่วโมง 4 นาที 12 วินาที อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *E. quinquecarinatus* เมื่อได้รับสารประกอบแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 20% (LC_{20}) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด ส่งผลให้เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *E. quinquecarinatus* เพิ่มมากขึ้น โดยแคดเมียมทำให้ซิลิเอตใช้เวลาในแต่ละชั่วรุ่นมากที่สุด คือ 32 ชั่วโมง 25 นาที 48 วินาที รองลงมาคือ สังกะสี 28 ชั่วโมง 51 นาที และ นิกเกิล 21 ชั่วโมง 28 นาที 12 วินาที (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *E. quinquecarinatus* เมื่อได้รับสารประกอบแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี ที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 20% (LC_{20}) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

สารประกอบโลหะหนัก	จำนวนชั่วรุ่น (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น เฉลี่ย (ชั่วโมง:นาที:วินาที)
กลุ่มควบคุม	3.396	7 ชั่วโมง 4 นาที 12 วินาที
แคดเมียม (Cd)	0.740	32 ชั่วโมง 25 นาที 48 วินาที
นิกเกิล (Ni)	1.118	21 ชั่วโมง 28 นาที 12 วินาที
สังกะสี (Zn)	0.832	28 ชั่วโมง 51 นาที

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

โลหะหนักเป็นหนึ่งในมลพิษที่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย โดยอาจทำให้เกิดอาการเล็กน้อย เช่น ผดผื่นคัน ไปจนถึงอาการรุนแรง เช่น ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง หรือทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ เพื่อเป็นการรับมือกับปัญหาที่เกิดขึ้น จึงควรมีการศึกษาความเป็นพิษของโลหะหนัก รวมทั้งหาวิธีกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการนำเอาสิ่งมีชีวิตมาใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพแหล่งน้ำและนำมาใช้เป็นตัวดูดซับทางชีวภาพในการกำจัดโลหะหนัก เช่น แบคทีเรีย แพลงก์ตอน โปรโตซัว สาหร่าย เชื้อรา พืชน้ำ หรือพืชชั้นสูง (Gin et al., 2002) การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักต่อ *E. quinquecarinatus* ซึ่งเป็นซิลิเอตที่ดำรงชีวิตอยู่ในทะเล และมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศทะเลในฐานะการเป็นผู้บริโภคอันดับต้นๆ

การศึกษาสัณฐานวิทยาของ *E. quinquecarinatus* เมื่อได้รับสารประกอบโลหะหนักพบว่า สารประกอบโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด มีผลทำให้โครงสร้างและรูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ได้รับ เซลล์ที่ได้รับสารประกอบโลหะหนักที่ความเข้มข้นสูง จะหยุดการเคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ช้าลงในทันที โครงสร้างของซิเลียมีการเปลี่ยนแปลง โดยซิเลียจะหงิกงอและแตกปลาย จากนั้นภายในเซลล์จะเห็นแวคิวโอชัดเจนมากขึ้น รูปร่างเซลล์กลมขึ้นจากเดิม เซลล์เกิดการพุพองและแตกตายในที่สุด Arora และคณะ (1999) ศึกษาผลกระทบของแคดเมียมต่อรูปแบบการพัฒนาโครงสร้างของซิเลียในซิลิเอต *Stylonychia mytilus* พบว่า แคดเมียมรบกวนกระบวนการพัฒนาของซิเลียตั้งต้น (ciliary primordia) ส่งผลให้จำนวนและรูปแบบการเกิดซิเลียผิดไปจากเดิม นอกจากนี้ Martín-González และคณะ (2005) ได้รายงานผลของสารละลายแคดเมียม และสังกะสี ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของซิลิเอต 3 ชนิด ได้แก่ *Colpoda steinii*, *Cyrtolophosis elongata* และ *Drepanomonas revoluta* พบว่า โลหะหนักทั้งสองชนิดส่งผลทำลายไมโทคอนเดรีย ทำให้เซลล์สร้างแวคิว-โอลขึ้นในไซโทพลาสซึม เกิดการสะสมของเศษเยื่อหุ้มเซลล์และการสร้างออโตฟาโกโซม พร้อมๆ กับการเข้าเกราะ (encystment) ของเซลล์ซิลิเอต เกิดการรวมกันของนิวคลีโอลัสในแมคโครนิวเคลียสและการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มไมโครนิวเคลียส ในการศึกษาพิษของสารฆ่าแมลงต่อ *Paramecium caudatum* พบว่า ซิลิเอตชนิดนี้มีการตอบสนองต่อสารฆ่าแมลงในลักษณะคล้ายคลึงกับซิลิเอตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ กล่าวคือ *P. caudatum* ที่ได้รับสารฆ่าแมลงจะเกิดการพุพองที่ผิวเซลล์ โครงสร้างภายในเกิดการเสียสภาพ จากนั้นไซโทพลาสซึมจะค่อยๆ ไหลออกมาจากตัวเซลล์ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Venkateswara Rao et al., 2008)

การศึกษาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *E. quinquecarinatus* เมื่อได้รับสารประกอบแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ค่าเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *E. quinquecarinatus* ในกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7 ชั่วโมง 4 นาที 12 วินาที ซึ่งใกล้เคียงกับเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *Euplotes vannus* คือ 6.2-6.9 ชั่วโมง (Gast and Horstmann, 1983) อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่ได้รับสารประกอบโลหะหนักแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี มีค่าเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นเปลี่ยนแปลงไป คือ 32 ชั่วโมง 25 นาที 48 วินาที, 21 ชั่วโมง 28 นาที 12 วินาที และ 28 ชั่วโมง 51 นาที ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารละลายโลหะหนักมีผลยืดระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของซิลิเอต สอดคล้องกับพิษของสารฆ่าแมลงต่อซิลิเอต *P. caudatum* ที่ทำให้เซลล์มีระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นเพิ่มมากขึ้นเช่นดียวกัน (Venkateswara Rao et al., 2008) นอกจากนี้โลหะหนักยังส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ของ *E. quinquecarinatus* โดยทำให้การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของซิลิเอตชนิดนี้ลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rehman และคณะ (2009) ที่พบว่า แคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี ส่งผลให้การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ *Euplotes mutabilis* ลดลง

การทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ซิลิเอต พบว่าโลหะหนักมีความเป็นพิษต่อซิลิเอตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะหนัก ความเป็นพิษสูงสามารถแสดงโดยค่า LC_{50} ที่ต่ำ โดยซิลิเอตที่มีค่า LC_{50} ต่ำแสดงว่ามีความไวต่อความเป็นพิษของโลหะหนักชนิดนั้นๆ สูง การทดสอบความเป็นพิษของแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสี ต่อ *E. quinquecarinatus* เมื่อพิจารณาจากค่า LC_{50} พบว่า สังกะสีมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด รองลงมาคือ แคดเมียม และนิกเกิล ตามลำดับ ลำดับความเป็นพิษของโลหะนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Madoni และคณะ (1996) ที่พบว่า สังกะสีมีความเป็นพิษสูงกว่าแคดเมียม เมื่อทดสอบกับซิลิเอต 4 ชนิด ได้แก่ *Euplotes* sp., *Trochilia minuta*, *Vorticella convallaria* และ *Vorticella octava* นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงลำดับความเป็นพิษของแคดเมียมและนิกเกิล พบว่า แคดเมียมมีความเป็นพิษต่อ *E. quinquecarinatus* สูงกว่านิกเกิล การตอบสนองต่อความเป็นพิษของแคดเมียมที่สูงกว่านิกเกิลนี้ยังพบรายงานในซิลิเอตชนิดอื่นด้วย เช่น *Dexiostoma campylum*, *Euplotes moebiusi* และ *Paramecium caudatum* ที่คัดแยกโดย Madoni และคณะ (1992, 1994) และ Madoni (2000) รวมไปถึง *Colpidium colpoda* และ *Halteria grandinella* ที่คัดแยกโดย Madoni และ Romeo (2006) *E. quinquecarinatus* ที่คัดแยกได้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถทนต่อพิษของแคดเมียม (LC_{50} = 183 มิลลิกรัมต่อลิตร) และนิกเกิล (269 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับซิลิเอตสายพันธุ์อื่นที่เคยมีรายงาน อีกทั้งยังสามารถทนต่อพิษของสังกะสี (56 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้มากกว่า *Euplotes* sp. ที่คัดแยกโดย Madoni และคณะ (1996) เกือบ 24 เท่า (2.39 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากการศึกษาพบว่า เมื่อซิลิเอตได้รับพิษจากสารละลายโลหะหนัก ภายในเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลง เพื่อให้ทนต่อพิษของโลหะหนักได้ในระดับหนึ่ง กล่าวคือ เซลล์จะมีการดูดซับโลหะหนัก (biosorption) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงการสะสมภายในเซลล์และสร้างแวคิวโอลหรือถุงขนาดเล็กขึ้นมาหุ้มไว้ จากนั้นโปรตีน metallothioneins ที่อยู่ภายในเซลล์จะจับตัวกับโลหะหนัก ทำให้ความเป็นพิษของโลหะหนักต่อเซลล์ลดลง (Martín-González et al., 2006; Rehman et al., 2008) โดยโปรตีนชนิดนี้ถูกพบในซิลิเอตบางชนิด เช่น *Paramecium* และ *Tetrahymena* (Piccinni et al., 1999; Shuja and Shakoori, 2009)

อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียม นิกเกิล และสังกะสีต่อ *E. quinquecarinatus* พบว่า ซิลิเอตชนิดนี้สามารถทนต่อพิษของแคดเมียม และสังกะสี ได้สูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลของกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2550) ที่กำหนดค่ามาตรฐานของปริมาณโลหะหนักที่ยอมให้มีได้ในน้ำ ดังนี้ แคดเมียมอนุญาตให้มีได้ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อลิตร สังกะสีมีได้ไม่เกิน 50 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยไม่ได้กำหนดค่ามาตรฐานปริมาณนิกเกิลในน้ำทะเล จากผลการศึกษาแสดงว่า *E. quinquecarinatus* มีความทนต่อพิษของโลหะหนักสูงกว่าค่ามาตรฐาน จึงไม่สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของคุณภาพน้ำทะเลที่อาจปนเปื้อนโลหะหนักได้ แต่อาจมีศักยภาพในการใช้ซิลิเอตชนิดนี้เพื่อการกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนออกจากแหล่งน้ำได้ ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ชิดชัย จันทร์ตั้งสี, สุชา เฉยศิริ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2555. *การจำแนกชนิดของโพรติสต์บางชนิดที่พบในเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยวิธีทางชีวโมเลกุล*. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล. 2550, 1 กุมภาพันธ์. ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 124 ตอนที่ 11 ง. หน้า 123–133.

สุชา เฉยศิริ, ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 36–47.

สุชาดา มะแส. 2538. การสะสมของแคดเมียมและปรอทในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. *เอกสารวิชาการฉบับที่ 7/2538 ฝ่ายตรวจรับรองคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำกองพัฒนาสัตว์น้ำ กรมประมง*. หน้า 20.

วีระวงค์ ตางาม. 2543. *การศึกษาปริมาณโลหะหนักบางชนิดในน้ำ ดินตะกอน และเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของปลาบางชนิดในแม่น้ำ และคลองรอบเกาะเมืองพระนครศรีอยุธยา*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิรดี เมืองเดช. 2545. ปริมาณโลหะหนักในหอยแครง บริเวณปากแม่น้ำบางปะกง. *การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 40 สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. หน้า 312–323.

Alluri, K. H., Ronda, R. S., Settalluri, S. V., Bondili, S. J., Suryanarayana, V., and Venkateshwar, P. 2007. Biosorpsion: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *Afr. J. Biotechnol*. 25: 2924–2932.

Arora, S., Gupta, R., Machwe, S., and Sapra, G. R. 1999. Influence of cadmium on development of surface ciliary structures in the ciliate *Stylonychia mytilus* (Ciliophora, Oxytrichidae). *Eur. J. Protistol*. 35: 281–289.

Bick, H. 1972. *Ciliated protozoa*. Switzerland: World Health Organization.

Curds, C. R. 1992. *Protozoa and the water industry*. Cambridge: Cambridge University Press.

Díaz, S., Martín-González, A., and Gutiérrez, J. C. 2006. Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. *Environ. Int*. 32: 711–717.

Dopheide, A., Lear, G., Stott, R., and Lewis, G. 2009. Relative diversity and community structure of ciliates in stream biofilms according to molecular and microscopy methods. *Appl. Environ. Microbiol*. 75: 5261–5272.

Farmer, J. N. 1980. *The protozoa: Introduction to protozoology*. London: The C.V. Mosby.

Foissner, W. 1999. Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, method, diversity, representative example. *Agric. Ecosyst. Environ*. 74: 95–112.

Gast, V. and Horstmann, U. 1983. N-remineralization of phyto- and bacterioplankton by the marine ciliate *Euplotes vannus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 13: 55–60.

Gin, Y. H. K., Tang, Y. Z., and Aziz, M. A. 2002. Derivation and application of a new model for heavy metal biosorption by algae. *Water Res.* 3: 1313–1323.

Järup, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull*. 68: 167–182.

Klein, C. and Costa, M. 2015. Nickel. In: Nordberg, G. F., Fowler, B. A., and Nordberg, M. (eds). *Handbook on the Toxicology of Metals*. 4th ed. Vol. II, pp. 1091–1111. London, UK: Academic Press.

Lee, S., Basu, S., Tyler, C. W., and Wei, I. W. 2004. Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. *Adv. Environ. Res*. 8: 371–378.

Lovley, D. R. 2000. *Environmental microbe–metal interactions*. Washington, DC: ASM Press

Madoni, P. 2000. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environ. Pollut*. 109: 53–59.

Madoni, P. 2005. Ciliate communities and saprobic evaluation of water quality in the hilly zone of some tributaries of the Po River (northern Italy). *Hydrobiologia*. 541: 55–69.

Madoni, P. and Romeo, M. G. 2006. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environ. Pollut.* 141: 1–7.

Madoni, P., Esteban, G., and Gorbi, G. 1992. Acute toxicity of cadmium, copper, mercury, and zinc to ciliates from activated sludge plants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 49: 900–905.

Madoni, P., Davoli, D., and Gorbi, G. 1994. Acute toxicity of lead, chromium, and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 53: 420–425.

Madoni, P., Davoli, D., Gorbi, G., and Vescovi, L. 1996. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. *Water Res*. 30: 135–141.

Martín-González, A., Díaz, S., Borniquel, S., Gallego, A., and Gutiérrez, J. C. 2006. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Res. Microbiol*. 157: 108–118.

Martín-González, A., Díaz, S., Borniquel, S., Ortega, R., and Gutiérrez, J. C. 2005. Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure. *Cell Biol. Int*. 29: 119–126.

Nordberg, G. F., Nogawa, K., and Nordberg, M. 2015. Cadmium. In: Nordberg, G. F., Fowler, B. A., and Nordberg, M. (eds). *Handbook on the Toxicology of Metals*. 4th ed. Vol. II, pp. 667–716. London, UK: Academic Press.

Piccinni, E., Bertaggia, D., Santovito, G., Miceli, C., and Kraev, A. 1999. Cadmium metallothionein gene of *Tetrahymena pyriformis. Gene* 234: 51–59.

Rai, L. C., Rai, P. K., and Mallick, N. 1996. Regulation of heavy metal toxicity in acid-tolerant *Chlorella*: Physiological and biochemical approaches. *Environ*. *Exp*. *Bot*. 36: 99–109.

Rehman, A., Shakoori, F. R., and Shakoori, A. R. 2008. Heavy metal resistant freshwater ciliate, *Euplotes mutabilis*, isolated from industrial effluents has potential to decontaminate wastewater of toxic metals. *Bioresour. Technol.* 99: 3890–3895.

Rehman, A., Shakoori, F. R., and Shakoori, A. R. 2009. Heavy metal uptake by *Euplotes mutabilis* and its possible use in bioremediation of industrial wastewater. *Bull*. *Environ*. *Contam*. *Toxicol*. 83: 130–135.

Ricklefs, R. E. and Miller, G. L. 2000. *Ecology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company.

Sandstead, H. H. 2015. Zinc. In: Nordberg, G. F., Fowler, B. A., and Nordberg, M. (eds). *Handbook on the Toxicology of Metals*. 4th ed. Vol. II, pp. 1369–1385. London, UK: Academic Press.

Shuja, R. N. and Shakoori, A. R. 2009. Identification and cloning of first cadmium metallothionein like gene from locally isolated ciliate, *Paramecium* sp. *Mol. Biol. Rep.* 36: 549–560.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.

Twagilimana, L., Bohatier, J., Groliere, C. A., Bonnemoy, F., and Sargos, D. 1998. A new low-cost microbiotest with the protozoan *Spirostomum teres*: Culture conditions and assessment of sensitivity of the ciliate to 14 pure chemicals. *Ecotoxicol*. *Environ*. *Saf*. 41: 231–244.

Uhlig, G. 1964. Eine einfache Methode zur Extraktion der vagilen, mesopsammalen Mikrofauna. *Helgol*. *Wiss*. *Meeresunters*. 11: 178–185.

Vallee, B. L. and Falchuk, H. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol*. *Rev*. 73: 79–118.

Venkateswara Rao, J., Srikanth, K., Arepalli, S. K., and Gunda, V. G. 2006. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. *Pest*. *Biochem*. *Physiol*. 86: 131–137.

Venkateswara Rao, J., Arepalli, S. K., Gunda, V. G., and Bharat Kumar, J. 2008. Assessment of cytoskeletal damage in *Paramecium caudatum*: An early warning system for apoptotic studies. *Pest*. *Biochem*. *Physiol*. 91: 75–80.

Wetzel, R. G. 2001. *Limnology*. 3rd ed. San Diego, CA, USA: Academic Press.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักแคดเมียมต่อเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของชุดการทดลองที่ 1 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

แคดเมียม (mg/l)	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอด (เซลล์)													จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเฉลี่ย* (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด** (%)
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4			รวม		
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3			
5	3	3	7	2	11	13	9	4	6	17	16	13	104	433.33	85.22
10	5	6	3	13	4	4	6	6	7	7	6	9	76	316.67	62.27
50	7	8	9	10	15	6	6	6	5	9	8	11	100	416.67	81.94
100	1	7	7	11	4	9	4	7	5	7	7	6	75	312.5	61.46
200	6	5	8	1	0	2	5	5	1	6	5	3	47	195.83	38.51
300	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	7	29.16	5.74
400	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	4.17	0.82
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
Control	16	10	10	5	7	3	11	12	8	13	12	15	122	508.50	100.00

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด/จำนวนครั้งที่นับ x 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) x 100

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักแคดเมียมต่อเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของชุดการทดลองที่ 2 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

แคดเมียม (mg/l)	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอด (เซลล์)													จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเฉลี่ย* (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด** (%)
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4			รวม		
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3			
5	4	5	7	11	5	5	4	6	12	8	7	6	80	333.33	91.95
10	3	4	6	13	10	13	7	11	7	17	8	12	111	462.50	127.59
50	3	5	8	9	5	6	3	11	7	5	4	10	76	316.67	87.36
100	5	6	8	3	7	7	5	2	5	8	3	10	69	287.50	79.31
200	7	3	7	4	8	9	4	5	6	6	4	5	68	283.33	78.16
300	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	4	18	75.00	20.69
400	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4.17	1.15
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
Control	9	7	8	8	3	7	5	5	3	14	12	6	87	362.50	100.00

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด/จำนวนครั้งที่นับ x 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) x 100

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักแคดเมียมต่อเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของชุดการทดลองที่ 3 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

แคดเมียม (mg/l)	จำนวน *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอด (เซลล์)													จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเฉลี่ย* (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด** (%)
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4			รวม		
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3			
5	3	6	5	8	6	5	2	3	7	5	5	2	57	237.50	81.48
10	3	3	5	8	3	4	3	2	4	5	4	4	48	200.00	68.61
50	6	6	6	4	5	2	6	2	3	2	7	3	52	216.67	74.33
100	6	4	6	4	4	5	3	6	6	3	7	4	58	241.67	82.90
200	3	3	1	4	1	2	6	4	4	3	2	4	37	154.17	52.89
300	1	1	1	1	2	0	1	0	0	1	2	1	11	45.83	15.72
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
Control	10	6	13	6	5	2	9	5	6	4	1	3	70	291.5	100.00

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด/จำนวนครั้งที่นับ x 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) x 100

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักนิกเกิลต่อเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของชุดการทดลองที่ 1 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

นิกเกิล (mg/l)	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอด (เซลล์)													จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเฉลี่ย* (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด** (%)
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4			รวม		
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3			
10	3	3	8	3	4	9	8	5	6	3	6	8	66	275.00	61.66
50	3	3	5	8	9	6	2	5	5	3	4	2	55	229.17	51.38
100	2	3	6	7	9	3	3	3	4	4	4	3	51	212.50	47.65
200	5	2	8	13	7	4	6	6	5	3	2	5	66	275.00	61.66
300	4	4	1	1	8	2	1	2	5	8	3	2	41	170.83	38.30
400	0	1	0	5	1	1	3	0	1	1	1	1	15	62.50	14.01
500	1	2	1	2	0	1	1	2	1	0	1	1	13	54.17	12.14
600	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	4	16.67	3.74
Control	5	6	7	12	13	9	11	7	8	5	11	13	107	446.00	100.00

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด/จำนวนครั้งที่นับ x 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) x 100

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักนิกเกิลต่อเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของชุดการทดลองที่ 2 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

นิกเกิล (mg/l)	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอด (เซลล์)													จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเฉลี่ย* (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด** (%)
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4			รวม		
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3			
10	7	1	19	27	12	18	10	21	25	8	7	7	162.00	675.00	117.39
50	11	7	8	9	8	9	12	10	7	9	11	9	110.00	458.33	79.71
100	8	7	14	9	7	6	6	10	4	12	10	12	105.00	437.50	76.09
200	7	5	8	6	8	9	8	4	6	3	6	7	77.00	320.83	55.80
300	3	2	4	2	9	7	4	5	2	3	5	7	53.00	220.83	38.40
400	3	2	4	2	3	3	4	3	5	2	1	0	32.00	133.33	23.19
500	3	3	1	2	2	2	4	5	3	3	0	0	28.00	116.67	20.29
600	0	2	3	4	0	1	3	4	4	3	1	2	27.00	112.50	19.57
Control	12	11	10	4	11	11	9	16	10	8	12	24	138.00	575.00	100.00

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด/จำนวนครั้งที่นับ x 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) x 100

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักนิกเกิลต่อเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของชุดการทดลองที่ 3 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

นิกเกิล (mg/l)	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอด (เซลล์)													จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเฉลี่ย* (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด** (%)
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4			รวม		
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3			
10	7	18	9	7	14	13	8	16	11	10	6	5	124	516.67	102.51
50	8	6	12	8	4	7	13	9	9	15	9	8	108	450.00	89.29
100	4	7	10	4	4	7	6	4	12	7	15	6	86	358.33	71.09
200	10	5	8	7	4	10	10	4	3	9	8	7	85	354.16	70.27
300	12	7	5	4	5	6	4	5	9	8	9	7	81	337.50	66.96
400	6	5	3	6	4	6	9	3	3	4	5	7	61	254.16	50.43
500	0	1	4	2	2	2	4	1	2	1	1	1	21	87.50	17.36
600	0	0	0	0	0	2	3	1	0	1	0	0	7	29.16	5.79
Control	10	5	13	7	6	8	18	16	15	5	7	11	121	504.00	100.00

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด/จำนวนครั้งที่นับ x 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) x 100

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักนิกเกิลต่อเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของชุดการทดลองที่ 1 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

สังกะสี (mg/l)	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอด (เซลล์)													จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเฉลี่ย* (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด** (%)
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4			รวม		
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3			
10	8	8	7	6	6	6	5	6	5	9	8	7	81	337.50	81.03
30	3	3	5	2	2	4	5	1	11	6	2	3	47	195.83	47.02
50	3	7	4	6	5	7	4	4	5	7	6	8	66	275.00	66.03
70	5	5	1	2	6	4	5	1	4	5	3	5	46	191.67	46.02
90	5	3	3	0	1	2	4	2	4	3	1	3	31	129.17	31.01
110	1	6	3	2	5	0	3	5	2	2	3	1	33	137.50	33.01
130	2	0	0	0	1	5	1	0	2	1	0	2	14	58.33	14.01
150	0	0	2	0	1	0	0	2	0	2	1	1	9	37.50	9.00
Control	11	6	11	5	7	7	9	6	13	9	9	7	100	416.5	100.00

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด/จำนวนครั้งที่นับ x 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) x 100

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักนิกเกิลต่อเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของชุดการทดลองที่ 2 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

สังกะสี (mg/l)	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอด (เซลล์)													จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเฉลี่ย* (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด** (%)
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4			รวม		
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3			
10	11	10	14	6	11	5	10	6	6	14	11	9	113	470.83	77.95
30	5	6	8	9	10	5	4	7	6	5	6	6	77	320.83	53.12
50	11	7	8	6	6	7	5	11	7	5	15	9	97	404.17	66.92
70	5	4	7	3	4	3	5	7	9	9	6	2	64	266.67	44.15
90	1	6	0	3	2	6	2	3	2	3	3	2	33	137.50	22.76
110	2	0	1	0	1	1	0	0	3	1	5	1	15	62.50	10.35
130	2	2	0	2	2	2	0	2	0	1	1	0	14	58.33	9.66
150	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	5	20.83	3.45
Control	10	14	13	6	10	12	14	12	17	11	13	13	145	604.00	100.00

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด/จำนวนครั้งที่นับ x 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) x 100

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักนิกเกิล ต่อเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของชุดการทดลองที่ 3 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

สังกะสี (mg/l)	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอด (เซลล์)													จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเฉลี่ย* (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด** (%)
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3			การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4			รวม		
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3			
10	4	10	10	16	7	12	14	13	7	11	8	13	125	520.83	88.05
30	5	5	12	4	5	4	4	4	4	7	10	9	73	304.17	51.42
50	2	7	7	11	6	8	9	3	6	5	7	5	76	316.67	53.54
70	7	6	5	3	6	8	4	8	9	4	10	6	76	316.67	53.54
90	3	2	2	3	1	7	4	3	1	1	2	1	30	125.00	21.13
110	0	2	1	0	1	0	0	0	2	5	4	6	21	87.50	14.79
130	0	0	1	0	1	0	2	0	1	0	1	0	6	25.00	4.23
150	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	4	16.67	2.82
Control	12	9	10	11	16	8	14	15	13	13	11	10	142	591.50	100.00

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด/จำนวนครั้งที่นับ x 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)/จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของการทดลองชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) x 100

ตารางที่ 10 ผลการหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของเซลล์ *E. quinquecarinatus* ของกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารประกอบโลหะหนัก

กลุ่มควบคุม	**จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง***						**เฉลี่ย**	**จำนวนชั่วรุ่น (n)**	**เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นเฉลี่ย (ชั่วโมง:นาที:วินาที)**
	หลุมที่ 1	**หลุมที่ 2**	**หลุมที่ 3**	**หลุมที่ 4**	**หลุมที่ 5**	**หลุมที่ 6**			
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1	12	13	11	9	7	8	10	3.322	7 ชั่วโมง 13 นาที 12 วินาที
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2	13	15	12	10	9	13	12	3.585	6 ชั่วโมง 42 นาที
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3	13	0**	8	9	6	12	9.6	3.263	7 ชั่วโมง 21 นาที 36 วินาที
เฉลี่ย							10.53	3.396	7 ชั่วโมง 4 นาที 12 วินาที

* เริ่มต้นจากหลุมละ 1 เซลล์

** หากไม่มีเซลล์ *E. quinquecarinatus* เพิ่มจำนวนขึ้นจะไม่นำมาใช้ในการคำนวณ

ตารางที่ 11 ผลการหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่ได้รับสารประกอบแคดเมียม

กลุ่มควบคุม	**จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง***						**เฉลี่ย**	**จำนวนชั่วรุ่น (n)**	**เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นเฉลี่ย (ชั่วโมง:นาที:วินาที)**
	หลุมที่ 1	**หลุมที่ 2**	**หลุมที่ 3**	**หลุมที่ 4**	**หลุมที่ 5**	**หลุมที่ 6**			
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1	1	1	1	2	1	1	1.17	0.226	106 ชั่วโมง 11 นาที 24 วินาที
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2	2	2	2	1	1	2	1.67	0.740	32 ชั่วโมง 25 นาที 48 วินาที
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3	1	2	4	3	2	1	2.17	1.118	21 ชั่วโมง 28 นาที 12 วินาที
เฉลี่ย							1.67	0.740	32 ชั่วโมง 25 นาที 48 วินาที

* เริ่มต้นจากหลุมละ 1 เซลล์

ตารางที่ 12 ผลการหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *E. quinquecarinatus* ที่ได้รับสารประกอบนิกเกิล

กลุ่มควบคุม	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง*						เฉลี่ย	จำนวนชั่วรุ่น (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นเฉลี่ย (ชั่วโมง:นาที:วินาที)
	หลุมที่ 1	หลุมที่ 2	หลุมที่ 3	หลุมที่ 4	หลุมที่ 5	หลุมที่ 6			
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1	3	1	2	2	2	2	2	1	24 ชั่วโมง
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2	2	3	2	1	3	4	2.5	1.322	18 ชั่วโมง 9 นาที
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3	2	1	2	3	2	2	2	1	24 ชั่วโมง
เฉลี่ย							2.17	1.118	21 ชั่วโมง 28 นาที 12 วินาที

* เริ่มต้นจากหลุมละ 1 เซลล์

ตารางที่ 13 ผลการหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของเซลล์ *E. quinquecarinatus* ที่ได้รับสารประกอบสังกะสี

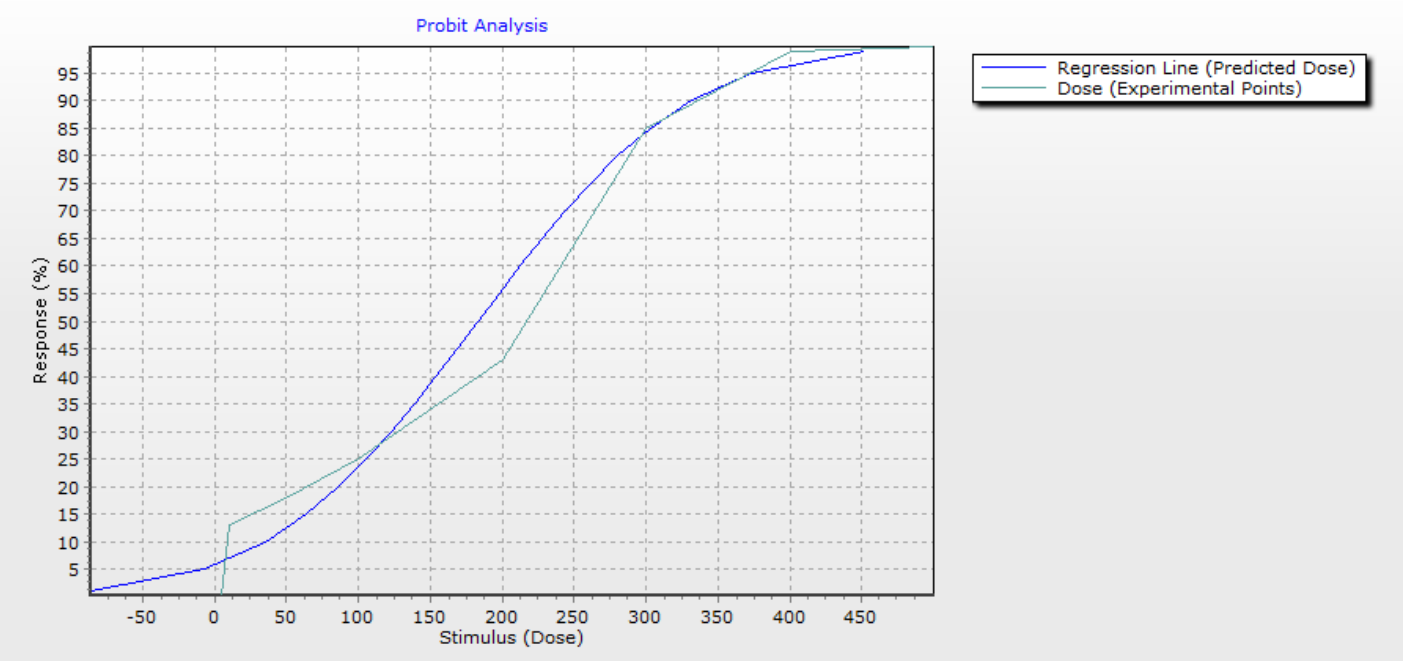
กลุ่มควบคุม	จำนวนเซลล์ *E. quinquecarinatus* เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง*						เฉลี่ย	จำนวนชั่วรุ่น (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นเฉลี่ย (ชั่วโมง:นาที:วินาที)
	หลุมที่ 1	หลุมที่ 2	หลุมที่ 3	หลุมที่ 4	หลุมที่ 5	หลุมที่ 6			
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1	1	2	4	1	2	2	2	1	24 ชั่วโมง
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2	2	3	1	1	2	2	1.83	0.872	27 ชั่วโมง 31 นาที 12 วินาที
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3	1	1	2	2	1	2	1.5	0.585	41 ชั่วโมง 1 นาที 12 วินาที
เฉลี่ย							1.78	0.832	28 ชั่วโมง 51 นาที

* เริ่มต้นจากหลุมละ 1 เซลล์

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ Probit analysis ของความเข้มข้นของสารประกอบแคดเมียมที่ทำให้เซลล์ *E. quinquecarinatus* ตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50})

Regression Statistics

LD50	183.1746	LD50 Standard Error	7.3183
LD50 LCL	168.796	LD50 UCL	197.5531
Beta	0.0086	Intercept	3.417
Beta Standard Error	0.0016		

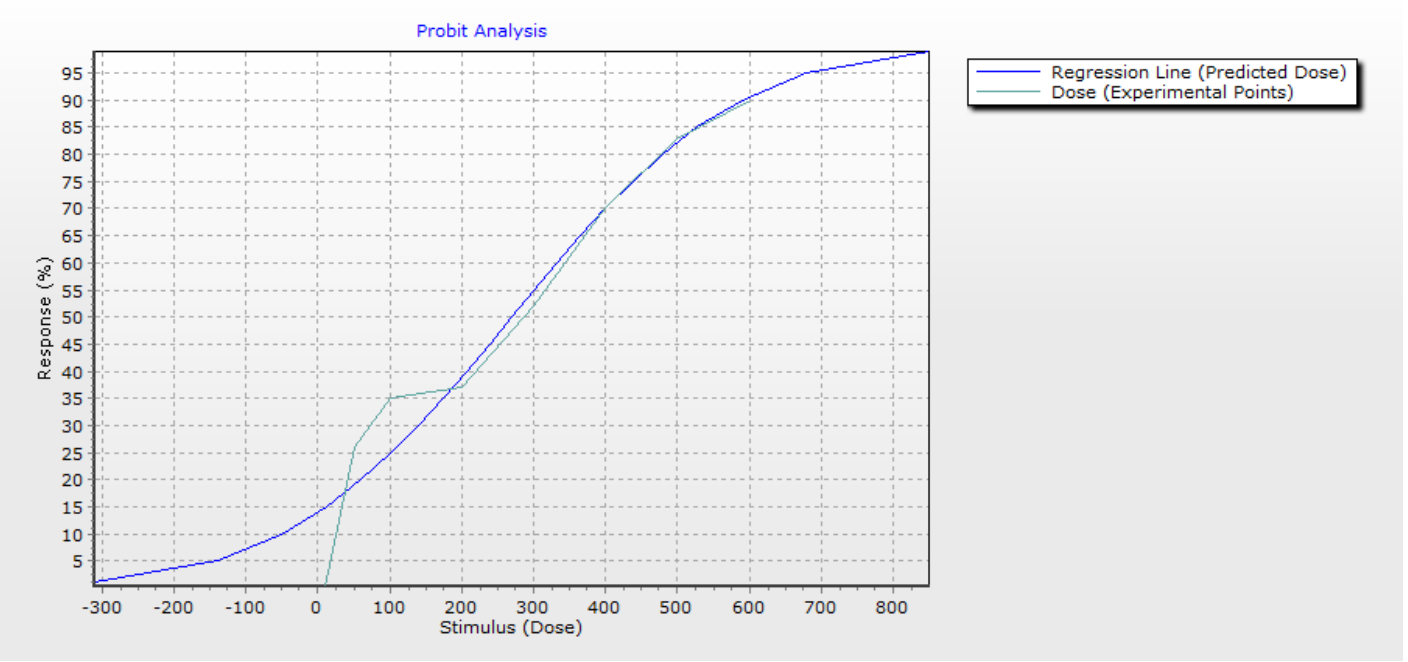


ภาพที่ 1 กราฟแสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารประกอบแคดเมียมที่ทำให้เซลล์ *E. quinquecarinatus* ตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธี Probit analysis

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ Probit analysis ของความเข้มข้นของสารประกอบนิกเกิลที่ทำให้เซลล์ *E. quinquecarinatus* ตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50})

Regression Statistics

LD50	269.6362	LD50 Standard Error	13.3244
LD50 LCL	243.4756	LD50 UCL	295.7969
Beta	0.004	Intercept	3.9183
Beta Standard Error	0.001		

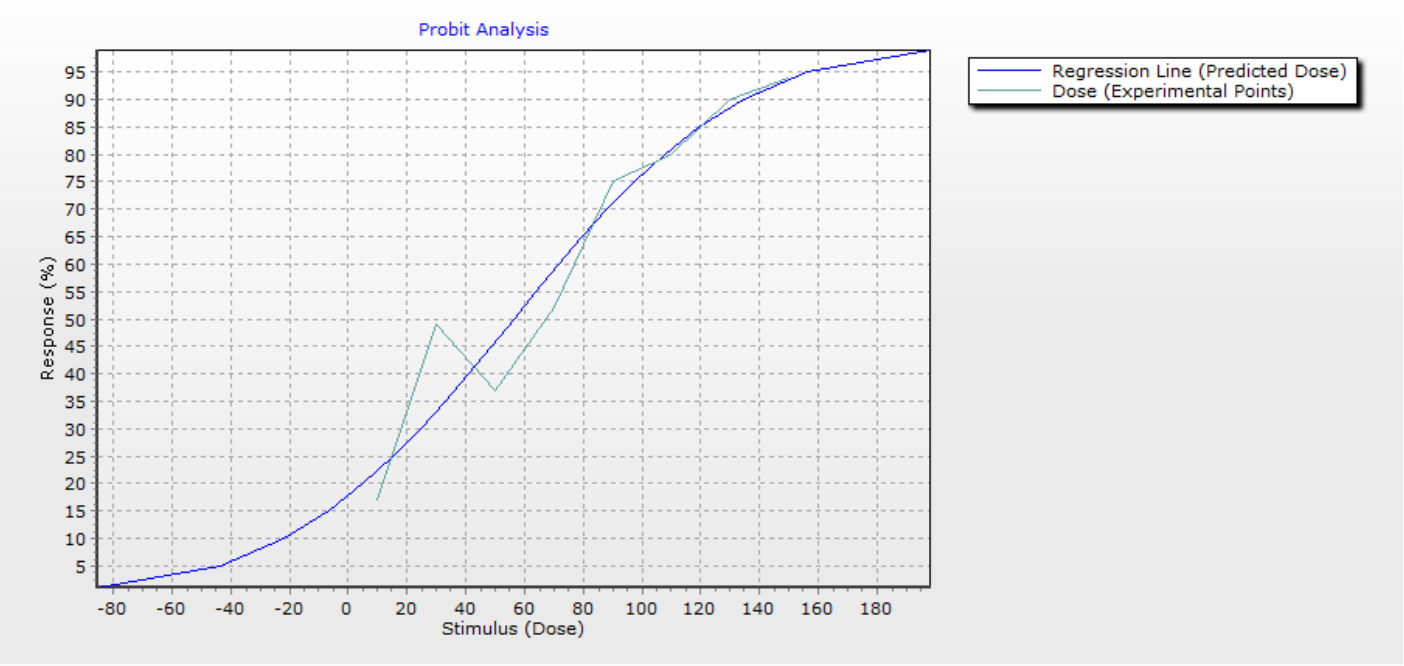


ภาพที่ 2 กราฟแสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารประกอบนิกเกิลที่ทำให้เซลล์ *E. quinquecarinatus* ตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธี Probit analysis

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ Probit analysis ของความเข้มข้นของสารประกอบสังกะสีที่ทำให้เซลล์ *E. quinquecarinatus* ตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50})

Regression Statistics

LD50	56.3647	LD50 Standard Error	3.2556
LD50 LCL	49.9727	LD50 UCL	62.7566
Beta	0.0164	Intercept	4.0746
Beta Standard Error	0.0044		



ภาพที่ 3 กราฟแสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารประกอบสังกะสีที่ทำให้เซลล์ *E. quinquecarinatus* ตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธี Probit analysis

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. อาจารย์ ดร.ชิดชัย จันทร์ตั้งสี

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายชิดชัย จันทร์ตั้งสี
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chitchai Chantangsi
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1002 00170 19 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-218-5378
โทรสาร 02-218-5386
E-mail Chitchai.C@Chula.ac.th, chantangsi01@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

2544 วท.บ. (ชีววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2549 M.Sc. (Zoology) University of Guelph ประเทศแคนาดา
2552 Ph.D. (Zoology) University of British Columbia ประเทศแคนาดา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ โพรติสต์วิทยา (Protistology)
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.1.1 การประเมินศักยภาพในการกำจัดโลหะหนักของโพรติสต์ที่สกัดจากบ่อบำบัดน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำของกรุงเทพมหานคร

7.1.2 ความหลากหลายทางชีวภาพและการระบุชนิดของโพรติสต์บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยอาศัยรหัสดีเอ็นเอ

7.2 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 ความหลากหลายของโพรโตซัวและแพลงก์ตอนในพื้นที่ อพ.สธ.

7.2.2 ปรสิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ อพ.สธ.

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ผลงานวิจัย)

7.3.1 Book

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ชิดชัย จันทร์ตั้งสี. 2548. *แพลงก์ตอน*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท เวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 352 หน้า.

7.3.2 Journal articles

สุชา เฉยศิริ, ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี, ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 36–47.

Chantangsi, C. and Leander, B. S. 2010. An SSU rDNA barcoding approach to the diversity of marine interstitial cercozoans, including descriptions of four new genera and nine new species. *Int*. *J*. *Syst*. *Evol*. *Microbiol*. 60: 1962–1977.

Chantangsi, C. and Leander, B. S. 2010. Ultrastructure, life cycle and molecular phylogenetic position of a novel marine sand-dwelling cercozoan: *Clautriavia biflagellata* sp. nov. *Protist*. 161: 133–147

Chantangsi, C., Hoppenrath, M., and Leander, B. S. 2010. Evolutionary relationships among marine cercozoans as inferred from combined SSU and LSU rDNA sequences and polyubiquitin insertions. *Mol*. *Phylogenet*. *Evol*. DOI:10.1016/j.ympev.2010.07.007.

Rueckert, S., Chantangsi, C., and Leander, B. S. 2010. Molecular systematics of marine gregarines (Apicomplexa) from North-eastern Pacific polychaetes and nemerteans, with descriptions of three novel species: *Lecudina phyllochaetopteri* sp. nov., *Difficilina tubulani* sp. nov. and *Difficilina paranemertis* sp. nov. *Int*. *J*. *Syst*. *Evol*. *Microbiol*. 60: 2681–2690.

Okamoto, N., Chantangsi, C., Horák, A., Leander, B. S., and Keeling, P. J. 2009. Molecular phylogeny and description of the novel katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and establishment of the Hacrobia taxon nov. *PLoS ONE*. 4: e7080. doi:10.1371/journal.pone.0007080.

Chantangsi, C. and Lynn, D. 2008. Phylogenetic relationships within the genus *Tetrahymena* inferred from the cytochrome *c* oxidase subunit 1 and the small subunit ribosomal RNA genes. *Mol*. *Phylogenet. Evol*. 49: 979–987.

Chantangsi, C., Esson, H. J., and Leander, B. S. 2008. Morphology and molecular phylogeny of a marine interstitial tetraflagellate with putative endosymbionts: *Auranticordis quadriverberis* n. gen. et sp. (Cercozoa). *BMC Microbiol*. 8: 123.

Chantangsi, C., Lynn, D. H., Brandl, M. T., Cole, J. C., Hetrick, N., and Ikonomi, P. 2007. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of genus *Tetrahymena*. *Int*. *J*. *Syst*. *Evol*. *Microbiol*. 57: 2412–2425.