

รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2561

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ
สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การประยุกต์ใช้โพรติสต์จากพื้นที่ อพ.สร. ในการประเมินความเป็นพิษของมลพิษในห้องปฏิบัติการ:
กรณีศึกษาของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร

Application of protists isolated from RSPG areas in assessing toxicity of pollutants
in laboratory: A case study of silver nanoparticles

ผู้ดำเนินโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

นางสาวสกุลทิพย์ นุ่มหิณฑ์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

บทคัดย่อ

การใช้อนุภาคเงินขนาดนาโนที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในปัจจุบันอาจนำไปสู่ปัญหาการปนเปื้อนของอนุภาคนีลิ่งสู่สิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดผลกระทบในเชิงลบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศที่ได้รับการปนเปื้อน ถึงแม้ว่าคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนีลิ่งจะเป็นที่ทราบกันดี ผลกระทบของอนุภาคเงินขนาดนาโนต่อจุลชีพกลุ่มยูแคริโอตเซลล์เดียวกลับพบมีรายงานไม่มากนัก การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษของอนุภาคเงินขนาดนาโนในรูปของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซิวเลีย 3 ชนิด ได้แก่ *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp. และ *Telotrochidium* sp. โดยพิจารณาผลของอนุภาคดังกล่าวจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิวเลียตายไปครึ่งหนึ่ง ร่วมกับการตอบสนองของเซลล์ทางสัณฐานวิทยา อัตราการเจริญเติบโต และเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงของซิวเลียเมื่อได้รับสาร จากการทดลองพบว่า *Paramecium* sp. มีความไวต่อสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินมากที่สุด รองลงมาคือ *Bresslauides* sp. และ *Telotrochidium* sp. ตามลำดับ โดยมีค่า LC₅₀ หลังจากได้รับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0.753, 0.978 และ 1.741 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยซิวเลียที่ได้รับสารจะมีการเคลื่อนที่ช้าลง ภายในเซลล์เกิดแวคิวโอล ผิวเซลล์เกิดเม็ดพอง เซลล์เสียรูปร่าง และแตกสลายในที่สุด นอกจากนี้อนุภาคนีลิ่งยังมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต และส่งผลเพิ่มเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงของซิวเลียทั้ง 3 ชนิดขึ้นอีกเท่าตัว ความไวของ *Paramecium* sp. ต่อสารแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ซิวเลียสายพันธุ์นี้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของแหล่งน้ำที่อาจพบมีการปนเปื้อนของอนุภาคเงินขนาดนาโนได้ต่อไป

คำสำคัญ: การเกิดเม็ดพอง ความเข้มข้นที่ทำให้ตายครึ่งหนึ่ง ซิวเลีย โลหะหนัก เวลาที่ใช้ในแต่ละช่วง

Abstract

The rapidly increasing use of silver nanoparticles (silver NPs) nowadays may have led to contamination of silver NPs into environments, generating adverse effects on organisms dwelling in polluted ecosystems. Although the antibacterial property of these particles is widely accepted, their effects on unicellular eukaryotic microorganisms are not frequently reported. The objective of this study was therefore to assess toxicity of the silver NP prepared in a colloidal solution form to three species of ciliates, namely *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp., and *Telotrochidium* sp. Morphological response at cellular level, growth rate, and generation time of each ciliate as well as concentrations of the silver NP that produce mortality in 50% of the treated cells (LC₅₀) after 24 h incubation were investigated. The results indicated that *Paramecium* sp. showed the highest sensitivity to the silver NP, followed by *Bresslauides* sp. and *Telotrochidium* sp. with the LC₅₀ values of 0.753, 0.978, and 1.741 mg/l, respectively. In addition, the three examined ciliates treated with the silver NP demonstrated slower swimming locomotion and exhibited several morphological alterations, including formation of intracellular vacuoles, plasma membrane blebbing, cellular deformities, and subsequent disintegration. Furthermore, the silver NP was observed to decrease growth rates and to double generation times of all tested ciliates. The highest sensibility of *Paramecium* sp. to the silver NP suggests the feasibility of using this isolate as a biological assessor for detecting possible contaminations of the nanoparticle in aquatic environments.

Keywords: blebbing, median lethal concentration, ciliate, heavy metal, generation time

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญเรื่อง.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
บทที่ 2 วัตถุประสงค์ ขอบเขตของโครงการ และ วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	5
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	5
วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
สารที่ใช้ในการศึกษาและทดสอบ.....	5
สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษาและทดสอบ.....	5
การเพาะเลี้ยงซิติโอตเพื่อใช้ในการศึกษาและทดสอบ.....	5
การทดสอบผลของสารต่อการอยู่รอดของซิติโอต.....	6
การศึกษาผลของสารต่อสัณฐานวิทยา (cell morphology) ของเซลล์ซิติโอต.....	7
การศึกษาผลของสารต่ออัตราการเจริญเติบโต (growth rate).....	7
การศึกษาผลของสารต่อระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (generation time).....	7
สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล.....	8
บทที่ 3 ผลการศึกษา.....	9
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อการอยู่รอดของซิติโอต.....	9
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อการอยู่รอดของ <i>Breslauides</i>	9
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อการอยู่รอดของ <i>Paramecium</i>	9
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อการอยู่รอดของ <i>Telotrochidium</i>	10
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์ซิติโอต.....	12
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของ <i>Breslauides</i>	12
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของ <i>Paramecium</i>	13
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของ <i>Telotrochidium</i>	14
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่ออัตราการเจริญเติบโตของซิติโอต.....	16
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่ออัตราการเจริญเติบโตของ <i>Breslauides</i>	16
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่ออัตราการเจริญเติบโตของ <i>Paramecium</i>	17

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่ออัตราการเจริญเติบโตของ <i>Telotrochidium</i>	18
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงของซีลีเอต	19
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	21
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก.....	28
ประวัติคณะผู้วิจัย	44

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	เปอร์เซ็นต์การตายของ <i>Bresslauides</i> sp. เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสาร คอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ที่ 7 ความเข้มข้น ๑ ละ 4 ซ้ำ และทำ การทดสอบ 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน..... 9
ตารางที่ 2	เปอร์เซ็นต์การตายของ <i>Paramecium</i> sp. เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสาร คอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ที่ 7 ความเข้มข้น ๑ ละ 4 ซ้ำ และทำ การทดสอบ 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน..... 10
ตารางที่ 3	เปอร์เซ็นต์การตายของ <i>Telotrochidium</i> sp. เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของ สารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ที่ 7 ความเข้มข้น ๑ ละ 4 ซ้ำ และ ทำการทดสอบ 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน..... 11
ตารางที่ 4	ผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่ออัตราการ เจริญเติบโตของซิวเลีย <i>Bresslauides</i> sp. เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง..... 16
ตารางที่ 5	ผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่ออัตราการ เจริญเติบโตของซิวเลีย <i>Paramecium</i> sp. เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง..... 17
ตารางที่ 6	ผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่ออัตราการ เจริญเติบโตของซิวเลีย <i>Telotrochidium</i> sp. เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง..... 19
ตารางที่ 7	เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของซิวเลีย <i>Bresslauides</i> sp., <i>Paramecium</i> sp. และ <i>Telotrochidium</i> sp. เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน เปรียบ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร หลังผ่านไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 20

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	กราฟแสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ทำให้ <i>Bresslauides</i> sp. ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC ₅₀) ด้วยวิธี Probit analysis	10
ภาพที่ 2	กราฟแสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ทำให้ <i>Paramecium</i> sp. ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC ₅₀) ด้วยวิธี Probit analysis	11
ภาพที่ 3	กราฟแสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ทำให้ <i>Telotrochidium</i> sp. ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC ₅₀) ด้วยวิธี Probit analysis.....	12
ภาพที่ 4	ซिलิเอต <i>Bresslauides</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงในสภาวะปกติ ที่มีรูปร่างเหมือนไตหรือเม็ดถั่ว ภายในเซลล์มีคอนแทร็กไทล์แควิวโอล (*) และที่กลางตัวเซลล์มีลักษณะคอดเว้า (ลูกศร) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีช่องปากของเซลล์อยู่ [แถบเทียบขนาด 10 ไมโครเมตร].....	12
ภาพที่ 5	ซिलิเอต <i>Bresslauides</i> sp. เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง แสดงเซลล์ในระยะแรกที่ผิวเซลล์ปรากฏเม็ดพุพองขนาดเล็ก (ลูกศร) และการเปลี่ยนรูปร่างและเสียดสภาพของเซลล์ จนกระทั่งเซลล์แตกสลายและมีการไหลของไซโทพลาซึมออกมาจากตัวเซลล์ (หัวลูกศร)	13
ภาพที่ 6	ซिलิเอต <i>Paramecium</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงในสภาวะปกติ ที่มีรูปร่างยาวแบนเหมือนรองเท้าแตะ ภายในมีคอนแทร็กไทล์แควิวโอล (*) และกลางตัวเซลล์ที่มีลักษณะเป็นร่อง (ลูกศร) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีช่องปากของเซลล์อยู่	14
ภาพที่ 7	ซिलิเอต <i>Paramecium</i> sp. เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง แสดงเซลล์ที่เกิดการขยายพองบริเวณกลางตัวเซลล์กว้างออกขึ้นอย่างชัดเจน และเซลล์ที่มีรูปร่างเสียดสภาพ นอกจากนี้ที่บริเวณผิวเซลล์จะเกิดเม็ดพุพอง (ลูกศร) ขึ้นหลายตำแหน่งและขยายขนาดขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งแตกในที่สุด	15
ภาพที่ 8	ซिलิเอต <i>Telotrochidium</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงในสภาวะปกติ ที่เซลล์มีรูปร่างคล้ายถังเปียร์ ภายในมีคอนแทร็กไทล์แควิวโอล (*) และวงของซิวเลียที่ทางด้านหน้าและด้านท้ายของเซลล์ (ลูกศร) [แถบเทียบขนาด 10 ไมโครเมตร].....	15
ภาพที่ 9	ซिलิเอต <i>Telotrochidium</i> sp. เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง แสดงเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากถังเปียร์ทรงกระบอกไปเป็นทรงกลม และภายในเซลล์ที่เกิดแควิวโอล (*) ขึ้นเป็นจำนวนมาก.....	16
ภาพที่ 10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินกับจำนวนเซลล์ของ <i>Bresslauides</i> sp. หลังจากที่ได้รับสารผ่านไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	17
ภาพที่ 11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินกับจำนวนเซลล์ของ <i>Paramecium</i> sp. หลังจากที่ได้รับสารผ่านไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	18

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินกับจำนวนเซลล์ของ <i>Telotrochidium</i> sp. หลังจากที่ใช้ลิเอตได้รับสารผ่านไประยะเวลา 24 ชั่วโมง	19

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันมีการศึกษาทางด้านนาโนเทคโนโลยีเป็นจำนวนมาก เทคโนโลยีกลุ่มนี้ได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมสินค้านาโนที่มีการผลิตออกมาวางจำหน่ายอย่างแพร่หลาย อาทิเช่น เครื่องสำอาง, ยา, เส้นใยต่าง ๆ, เครื่องนุ่งห่ม, อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ และเครื่องใช้ภายในบ้าน เป็นต้น (Biswas and Wu, 2005) โดยอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร จัดเป็นอนุภาคขนาดนาโนเมตรชนิดหนึ่งที่มีการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังพบมากในสินค้าที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรคและป้องกันการเกิดกลิ่น เนื่องจากอนุภาคชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี (Rai et al., 2009) อย่างไรก็ตาม การใช้อนุภาคเหล่านี้เป็นจำนวนมากอาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ หากเกิดการแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมในปริมาณที่มากเกินไป การศึกษาอนุภาคขนาดนาโนเมตรที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ พบว่า อนุภาคเหล่านี้มีโอกาสเกิดการแพร่กระจายและปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม (Klaine et al., 2008) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศผ่านทางห่วงโซ่อาหาร ทำให้สภาพแวดล้อมเสียสมดุลและก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมตามมาภายหลังได้ การประเมินผลกระทบหรือความเป็นพิษของอนุภาคขนาดนาโนเมตรเหล่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุภาคขนาดนาโนเมตรของโลหะเงิน จึงถือเป็นสิ่งที่มีความสำคัญตามความนิยมและการใช้ประโยชน์ของอนุภาคโลหะชนิดนี้ในปัจจุบัน

ซิลิเกต เป็นจุลชีพกลุ่มยูแคริโอตเซลล์เดียวที่พบในได้เกือบทุกลักษณะที่อยู่อาศัย ไม่ว่าจะเป็นน้ำจืด น้ำเค็ม ตลอดจนพื้นดินที่มีความชื้นแฉะ จุลชีพกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อลักษณะที่อยู่อาศัย อีกทั้งยังมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่มันอาศัยอยู่ เนื่องจากตัวเซลล์โดยปกติไม่มีผนังหุ้มและยังมีวงชีวิตสั้น จึงสามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็ว (Foissner, 1999; Lee et al., 2004) ดังนั้นการปนเปื้อนของมลพิษหรือสารเคมีต่อสิ่งแวดล้อมที่ซิลิเกตอาศัย จะส่งผลต่อการอยู่รอดและการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ (Amanchi and Hussain, 2010) ด้วยคุณลักษณะเช่นนี้เองเราจึงสามารถใช้ซิลิเกตเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ และใช้เป็นสิ่งมีชีวิตจำลองในการศึกษาถึงผลกระทบจากการปนเปื้อนของมลพิษลงสู่แหล่งน้ำต่อสิ่งมีชีวิตในเบื้องต้นได้ งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรต่อเซลล์ซิลิเกตภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ โดยพิจารณาผลของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรต่อสัญญาณวิทยาของเซลล์, อัตราการเจริญเติบโต และเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงของซิลิเกตที่ได้รับการคัดแยกจากแหล่งน้ำในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจนได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางนำไปสู่การเฝ้าระวังถึงผลกระทบจากการใช้วัสดุอุปกรณ์ที่มีส่วนผสมของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรในกิจกรรมของมนุษย์ อีกทั้งยังเป็นข้อมูลในการใช้สิ่งมีชีวิตกลุ่มซิลิเกต ในการตรวจสอบการปรากฏของสารประเภทอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรที่อาจพบการปนเปื้อนเกิดขึ้นในแหล่งน้ำได้ต่อไปในอนาคต

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นาโนเทคโนโลยี คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการผลิต หรือการใช้วัสดุที่มีขนาดเล็กในช่วง 1-100 นาโนเมตร เพื่อการประดิษฐ์ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติใหม่ ๆ อาทิเช่น สมบัติพิเศษในการกักน้ำ การซึมซาบได้ดี ช่วยเพิ่มการสะท้อนรังสี ยับยั้งการเกิดและเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยสารที่อยู่ในช่วงนาโนนี้มีคุณสมบัติพิเศษต่างจากสารที่มีขนาดใหญ่ ด้วยเหตุนี้เองจึงมีการนำอนุภาคขนาดนาโนเมตรมาใช้ในการ

ผลิตภัณฑ์อุปกรณ์ต่าง ๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็นวัสดุอุปกรณ์ในด้านการสื่อสาร พลังงาน เครื่องใช้ไฟฟ้า เครื่องนุ่งห่ม อาหาร ยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น (Sanvicensm and Marco, 2008) โดยหนึ่งในอนุภาคขนาดนาโนเมตรซึ่งเป็นที่นิยมและมีการใช้อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวงการแพทย์ ก็คือ อนุภาคขนาดนาโนเมตรของโลหะเงิน (nanosilver หรือ silver nanoparticle) (Chen and Schluesener, 2008)

อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร เป็นอนุภาคของโลหะเงินที่มีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร โดยโลหะชนิดนี้มีคุณสมบัติเฉพาะตัวในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย จึงมีการนำมาใช้เพื่อการผลิตวัสดุอุปกรณ์ในทางการแพทย์ต่าง ๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็นผ้าปิดแผล อุปกรณ์คุมกำเนิด เครื่องมือผ่าตัด เนื่องจากอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรมีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อแบคทีเรียนี้เอง ทำให้อนุภาคชนิดนี้มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดกลิ่น จึงมักนำมาผสมในสเปรย์กำจัดกลิ่น สเปรย์ระงับกลิ่นกาย น้ำยาซักผ้า หรือแม้แต่ผสมอยู่ในเสื้อผ้าเครื่องนุ่งห่ม รวมไปถึงสีทาบ้าน (Chen and Schluesener, 2008) การประยุกต์ใช้อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรเหล่านี้เกิดขึ้นทั้งทางตรงและทางอ้อมในกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ ทำให้มนุษย์มีการสัมผัสสารชนิดนี้ในชีวิตประจำวันเกือบตลอดเวลา อย่างไรก็ตาม การใช้อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน อาจนำไปสู่ปัญหาการปนเปื้อนของอนุภาคนี้ในสิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศตามมาภายหลังได้ (Klaine et al., 2008) นอกจากนี้การประยุกต์ใช้อนุภาคเงินที่หลากหลายในปัจจุบัน ยังอาจเป็นอีกหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้มนุษย์มีโอกาสได้รับอนุภาคขนาดนาโนเมตรเพิ่มขึ้น อีกทั้งในปัจจุบันยังไม่มีระบบรองรับการปนเปื้อนจากอนุภาคที่มีขนาดเล็กมากเหล่านี้ และด้วยขนาดที่เล็กมากนี้เองอนุภาคเหล่านี้จึงสามารถเคลื่อนตัวไปตามกระแสเลือดสู่อวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายได้

Ansari และคณะ (2016) ศึกษาผลของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรต่อเนื้อเยื่อตับ ไต ม้าม ของหนูขาว พบว่า ที่อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรความเข้มข้น 3,000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของหนูขาว ส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยาชีวเคมีในร่างกายหนู โครงสร้างภายในเซลล์ตับและไตเกิดความผิดปกติ กล่าวคือ เยื่อหุ้มนิวเคลียสและร่างแหโครมาตินเกิดการเปลี่ยนแปลง เซลล์ตับเสียสภาพ ไมโทคอนเดรียบวมและเยื่อหุ้มชั้นในบิดเบี้ยว รวมไปถึงความผิดปกติอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นต่อโครงสร้างภายในเซลล์ของอวัยวะเหล่านี้ ไม่ว่าจะเป็นไซโทพลาสซึมถูกทำลายและการขยายตัวของ endoplasmic reticulum ชนิดหยาบ จากข้อมูลทางการแพทย์ที่รายงานไว้พบว่า การได้รับโลหะเงินในปริมาณมากอาจก่อให้เกิดโรคอาร์ไจเรีย (argyria) หรือโรคอาร์ไจโรซิส (argyrosis) ซึ่งเป็นภาวะที่มีซิลเวอร์มาอยู่ที่ผิวหนังหรือที่ดวงตาในปริมาณมาก ตามลำดับทำให้สีผิวหรือสีรอบดวงตาเปลี่ยนเป็นสีเทาหรือสีน้ำเงิน ภาวะนี้เกิดจากการได้รับสารที่มีโลหะเงินในปริมาณมากเข้าสู่ร่างกาย เช่น ยาหยอดจุกที่มีโลหะเงินเป็นองค์ประกอบ หรือกลุ่มที่บริโภคคอลลอยด์ของโลหะเงิน (colloidal silver) ด้วยความเชื่อว่าเป็นสารบำรุงร่างกาย (Chang et al., 2006; Trop et al., 2006)

จากคุณสมบัติในการกำจัดกลิ่นและแบคทีเรียของอนุภาคชนิดนี้ ทำให้มีการนำโลหะเงินขนาดนาโนเมตรไปผสมในเส้นใย ในการศึกษาของ Kulthong และคณะ (2010) ซึ่งจำลองการสัมผัสทางผิวหนังของมนุษย์ผ่านเหงื่อเทียม พบว่า อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรสามารถปลดปล่อยออกจากผ้าหรือสิ่งทอที่มีอนุภาคนี้ผสมอยู่ได้ โดยอนุภาคเงินที่หลุดออกมาจะขึ้นอยู่กับปริมาณของอนุภาคเงินที่เคลือบไว้ที่ผิวผ้า, คุณภาพของเส้นใย และ pH ของเหงื่อเทียมที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ในการศึกษาของ Larese และคณะ (2009) พบว่า อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรสามารถเข้าสู่ผิวหนังชั้นกำพวด (stratum corneum) ได้ โดยสามารถเข้าสู่ผิวหนังที่มีบาดแผล (damaged skin) ได้ดีกว่าผิวหนังปกติ (intact skin) ถึง 5 เท่า ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาคความเป็นพิษของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรต่อมนุษย์ พบว่า อนุภาคดังกล่าวที่

ความเข้มข้น 6.25–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีผลทำให้เซลล์เนื้องอกไฟโบรซาร์coma (human fibrosarcoma) และเซลล์มะเร็งผิวหนัง (human skin/carcinoma) เปลี่ยนแปลงรูปร่าง และทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายแตกเป็นชิ้น ๆ (DNA fragmentation) เกิดกระบวนการตายของเซลล์ขึ้น (Arora et al., 2008)

นอกจากการศึกษาในมนุษย์แล้ว ยังมีการศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคเงินขนาด 5–20 นาโนเมตร ต่อตัวอ่อนของปลา zebrafish พบว่า อนุภาคดังกล่าวส่งผลให้ตัวอ่อนของปลาชนิดนี้มีแกนร่างกายผิดปกติ แกนค้ำจุนร่างกายบิดเบี้ยว การไหลเวียนโลหิตช้าลง เกิดการบวมของเยื่อหุ้มหัวใจ และยังพบการกระจายของอนุภาคดังกล่าวไปตามสมอง หัวใจ ไช้แดง และเลือดของตัวอ่อนปลา รวมไปถึงการตายของเซลล์ ส่งผลยับยั้งการเจริญตามปกติของตัวอ่อน (Asharani et al., 2008) ความผิดปกติต่อตัวอ่อนในลักษณะนี้สามารถพบได้เช่นเดียวกันในปลา Japanese medaka (*Oryzias latipes*) ที่ได้รับอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร จากรายงานของ Wu และคณะ (2010) ที่พบว่าปลา Japanese medaka มีพัฒนาการช้าลง ลดการผลิตเม็ดสีโดยเฉพาะในระยะวัยอ่อน ทำให้โครงสร้างผิดปกติ เช่น มีอาการบวม น้ำ ไช้สันหลังผิดปกติ หัวใจผิดปกติ และตาเกิดความบกพร่อง Farkas และคณะ (2010) ศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรต่อเซลล์ตับของปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าอนุภาคเงินส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ตับ อีกทั้งยังทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมระดับเซลล์ลดลง

ในจุลชีพอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรมีผลยับยั้งและทำลายเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแบคทีเรีย Panáček และคณะ (2006) แสดงให้เห็นว่า อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรที่ความเข้มข้นต่ำน้อยกว่า 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถฆ่าเซลล์แบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ รวมไปถึงสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด โดยความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเซลล์แบคทีเรียได้อยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.69 ไปจนถึง 13.5 mg/L ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ทำการศึกษา และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นกับความเข้มข้นของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรที่ทำให้จุลชีพกลุ่มซิลิเอตตายแล้ว พบว่าต่ำกว่ามาก กล่าวคือความเข้มข้นของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรที่ทำให้ซิลิเอต *Paramecium caudatum* ตายจะอยู่ในช่วง 16–39 mg/L แสดงให้เห็นว่าอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรมีคุณสมบัติเลือกทำลาย และมีความเป็นพิษกับแบคทีเรียสูงกว่าเซลล์ยูแคริโอต (Kvitek et al., 2009)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า งานวิจัยที่ศึกษาถึงความเป็นพิษของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรส่วนใหญ่มุ่งเน้นในจุลชีพกลุ่มแบคทีเรีย รวมไปถึงสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น ปลา และ หนู เป็นต้น โดยพบการศึกษาบ้างในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวกลุ่มยูแคริโอต เช่น ในซิลิเอต *Paramecium* ถึงแม้ว่า *Paramecium* จะเป็นสิ่งมีชีวิตจำลองกลุ่มซิลิเอตที่มักใช้ในการศึกษาทางชีววิทยาหลายแขนง อาทิเช่น การทดสอบสารพิษไม่ว่าจะเป็นยาฆ่าแมลง หรือ โลหะหนัก (Amanchi and Hussain, 2010; Madoni et al., 1992, 1994; Venkateswara Rao et al., 2006) อย่างไรก็ตาม ยังมีซิลิเอตสกุลอื่นในธรรมชาติอีกหลายชนิดที่อาจมีความไวหรือตอบสนองต่อมลพิษเหล่านี้ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เนื่องจากซิลิเอตเป็นจุลชีพกลุ่มยูแคริโอตเซลล์เดียวที่สามารถตอบสนองต่อการปนเปื้อนของสารเคมีได้อย่างรวดเร็ว เพราะมีอัตราการสืบพันธุ์สูงและมีความจำเพาะต่อสภาพที่อยู่อาศัย ทำให้สามารถติดตามผลได้ในระยะเวลาไม่นาน จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพถึงการปนเปื้อนของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรในแหล่งน้ำ กอปรกับในปัจจุบันข้อมูลด้านการวิจัยเกี่ยวกับผลของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรต่อสิ่งมีชีวิตกลุ่มโพรติสต์ยังมีไม่มากนัก งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรต่อซิลิเอตที่ได้รับการคัดแยกจากแหล่งน้ำในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจนได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยพิจารณาผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology), อัตราการเจริญเติบโต (growth rate) และระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (generation time) เพื่อเป็นข้อมูลที่แสดงถึงผลของอนุภาคชนิด

นี่คือจุลชีพ อันจะเป็นแนวทางประกอบการใช้อุณหภูมิเงินขนาดนาโนเมตรในปริมาณที่ไม่ส่งผลกระทบต่อ
จุลชีพในสิ่งแวดล้อม และเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

บทที่ 2

วัตถุประสงค์ ขอบเขตของโครงการ และ วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงต่อเซลล์ซิลิเกตน้ำจืด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp. และ *Telotrochidium* sp. ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาคูผลของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรต่อเซลล์ซิลิเกตน้ำจืด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp. และ *Telotrochidium* sp. ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ โดยพิจารณาผลของสารต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์, อัตราการเจริญเติบโต และเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงรุ่นของซิลิเกตที่ได้รับอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรผสมในอาหารเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับซิลิเกตในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้รับอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรผสมในอาหารเพาะเลี้ยง

วิธีดำเนินการวิจัย

สารที่ใช้ในการศึกษาและทดสอบ

งานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาคูผลของอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรที่อยู่ในรูปสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินโดยมีน้ำแป้งเป็นตัวทำให้เสถียร (stabilizer) ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยอุปกรณ์รับรู้ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีลักษณะอนุภาคเป็นทรงกลมขนาด 5–20 นาโนเมตรขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย 14 นาโนเมตร และมีความเข้มข้น 800 ส่วนในล้านส่วน (ppm)

สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษาและทดสอบ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ซิลิเกตน้ำจืด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp. และ *Telotrochidium* sp. เป็นสิ่งมีชีวิตทดสอบ โดยได้รับเซลล์ซิลิเกตตั้งต้นจากห้องปฏิบัติการ Protistology 223 ตึกกลุ่ม วัชโรบล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดย *Bresslauides* sp. และ *Paramecium* sp. เป็นซิลิเกตที่คัดแยกจนได้สายพันธุ์บริสุทธิ์มาจากบ่อน้ำบริเวณตึกพุดตาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ *Telotrochidium* sp. เป็นซิลิเกตที่คัดแยกจนได้สายพันธุ์บริสุทธิ์มาจากบ่อรวมน้ำเสียโรงควบคุมคุณภาพน้ำสีพระยา เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร

การเพาะเลี้ยงซิลิเกตเพื่อใช้ในการศึกษาและทดสอบ

ซิลิเกตทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำต้มฟางและยีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำการต้มฟางข้าว 5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้เดือดเป็นเวลาประมาณ 5–10 นาที สังเกตสีน้ำต้มฟางจนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองคล้ายสีเบียร์ ทิ้งให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 จากนั้นแบ่งน้ำต้มฟางที่ได้ลงหลอดทดลองฝาเกลียวหลอดละ 6 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาหลวม ๆ นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ซิลิเกตตั้งต้นที่ได้รับมา เพาะเลี้ยงในน้ำต้มฟางที่เตรียมไว้ และเติมยีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วลงไป 0.5 กรัมต่อน้ำต้มฟาง 1 ลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3–4 วัน จนมีซิลิเกตจำนวนมากพอสำหรับการทดลอง เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ซี

ลิเอตให้ต่อเนื่องเพียงพอตลอดการทดลอง จะทำการถ่ายเซลล์ซิลิเอตใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ (subculture) ทุก ๆ 1 สัปดาห์ สำหรับ *Paramecium* sp. และ *Tetrahymena* sp. แต่จะทำการถ่ายเซลล์ทุก ๆ 3 วัน สำหรับ *Bresslauides* sp. ซึ่งเพาะเลี้ยงแยกเฉพาะในจานแก้ว Petri dish ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

การทดสอบผลของสารต่อการอยู่รอดของซิลิเอต

ทำการศึกษาผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ดูดเซลล์ซิลิเอตโดยใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วมาประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำต้มฟาง เต็มยีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อเพาะเลี้ยงให้ได้ซิลิเอตจำนวนประมาณ 500–700 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินในน้ำต้มฟางที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารตั้งต้นที่ได้ไปเจือจางในน้ำต้มฟางที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงกว้าง (range-finding test) เพื่อหาช่วงที่เหมาะสมในการทดสอบเบื้องต้น เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว จึงนำค่าความเข้มข้นช่วงกว้างที่ได้มาใช้เป็นเกณฑ์ในการเจือจางสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินกับน้ำต้มฟางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ อีก 7 ความเข้มข้น ซึ่งความเข้มข้นใหม่จะต้องอยู่ในช่วงที่ได้จาก range-finding test เพื่อใช้ในการทดสอบผลของสารในช่วงแคบ (definitive test) ซึ่งความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบผลของสารในช่วงแคบนี้ จะต้องทำให้เซลล์ตายมากกว่าครึ่งหนึ่ง (lethal concentration 50: LC₅₀) และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดต้องไม่ทำให้เซลล์ตาย โดยเตรียมสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินในน้ำต้มฟางให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ

3. ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์ซิลิเอตที่เลี้ยงไว้ในข้อ (1) จากหลอดทดลองมา 20 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ทำการสุ่มนับจำนวนเช่นนี้ทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นหาค่าเฉลี่ย เพื่อนำค่าที่ได้ไปใช้คำนวณปริมาณเซลล์ต่ออาหารเพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตร

4. ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์ซิลิเอตจากหลอดทดลองที่นับจำนวนแล้ว ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกชนิด 24 หลุม ๆ ละ 500 ไมโครลิตร

5. ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดสารที่จะใช้ทดสอบที่เตรียมไว้จากข้อ (2) ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการทั้ง 7 ความเข้มข้น ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกชนิด 24 หลุม ที่มีเซลล์อยู่หลุมละ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำความเข้มข้นละ 4 หลุม โดยชุดควบคุมให้เติมน้ำต้มฟางซึ่งปราศจากสารที่ใช้ทดสอบหลุมละ 500 ไมโครลิตร จำนวน 4 หลุมแทน ตั้งจานเพาะเลี้ยงทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์ซิลิเอตมาหลุมละ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ทำการสุ่มนับจำนวน 3 ครั้งต่อหลุม

7. ทำการนับเช่นเดียวกันในชุดการทดลองซ้ำทั้ง 4 ชุด (หลุม)

8. หาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้ และคำนวณปริมาณเซลล์ต่ออาหารเพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตร เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ซิลิเอต ในแต่ละความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน เทียบกับชุดควบคุม โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในชุดทดลองแต่ละความเข้มข้น}}{\text{จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม}} \times 100$$

9. ทำการทดลองซ้ำในข้อ (2)–(8) ทั้งหมด 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน (independent test) โดยเว้นช่วงการทดลองในแต่ละชุดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อเตรียมเซลล์ให้เพียงพอในการทดลอง

10. ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับซิลิเอตทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp. และ *Telotrochidium* sp.

11. วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ซิลิเอตตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC₅₀) ด้วยวิธี Probit analysis โดยใช้โปรแกรม StatPlus 2009

การศึกษาผลของสารต่อสัณฐานวิทยา (cell morphology) ของเซลล์ซิลิเอต

ทำการศึกษาสัณฐานวิทยา รูปร่าง และลักษณะของซิลิเอต ทั้งเซลล์กลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในภาวะปกติและเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ คือ สารคอลลอยด์อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร เพื่อการตอบสนองและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ซิลิเอต โดยดูเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทำการทดสอบมาหยดลงบนสไลด์ประมาณ 2 หยด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่งดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง พร้อมบันทึกภาพ ทำการศึกษาเช่นเดียวกันในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารกับซิลิเอตทั้ง 3 ชนิด

การศึกษาผลของสารต่ออัตราการเจริญเติบโต (growth rate)

นำซิลิเอตที่เพาะเลี้ยงไว้ 3–4 วัน มาหาความหนาแน่น และใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์ซิลิเอตมา 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานพลาสติกชนิด 24 หลุม หลังจากนั้นเติมสารคอลลอยด์อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการลงไปอีก 500 ไมโครลิตร สำหรับชุดควบคุมไม่ต้องเติมสารคอลลอยด์อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร แต่เติมน้ำต้มฟางปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปแทน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสูบน้ำจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้ โดยทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง ในแต่ละความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร และบันทึกผล ในการวัดอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอตที่เวลา 24 ชั่วโมงนี้ สามารถคำนวณได้จากการทดสอบผลของสารต่อการอยู่รอดของซิลิเอตข้างต้น จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอตในแต่ละความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคเงินของโลหะเงิน ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับซิลิเอตทั้ง 3 ชนิด

การศึกษาผลของสารต่อระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (generation time)

การศึกษาผลของสารต่อระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของซิลิเอต จะทำทั้งในเซลล์ที่ได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร และเซลล์ในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้รับสาร ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมจานเพาะเลี้ยงพลาสติกชนิด 96 หลุม แล้วใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดน้ำต้มฟางใส่ลงในหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร

2. นำปาสเจอร์ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ดึงปลายให้แหลมโดยใช้ความร้อนจากตะเกียงแอลกอฮอล์

3. ใช้ปิเปตต์ปลายแหลมดูดเซลล์ซิลิเอตที่มีชีวิตจากอาหารเพาะเลี้ยงมาเพียง 1 เซลล์

4. ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติที่ปรับปริมาตรตั้งต้นไว้ที่ 20 ไมโครลิตร ดูดเซลล์ซิลิเอต 1 เซลล์ ที่ได้จากข้อ 3 ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกชนิด 96 หลุม ที่มีน้ำต้มฟางอยู่แล้ว หลุมละ 50 ไมโครลิตรข้างต้น

5. ใช้ปิเปตต์ที่บีบตะยีสต์ 1 ก้อน ใส่ลงในหลุมที่มีเซลล์อยู่

6. ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่น้อยกว่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (LC₅₀) ลงไปหลุมละ 70 ไมโครลิตร ส่วนการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำต้มฟางแทนสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน

7. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8. นับจำนวนเซลล์หลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

9. นำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อนำมาคำนวณหาเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (generation time) จากสูตร (Venkateswara Rao et al., 2006)

$$\text{Number of generations (n)} = (\log N_1 - \log N_0) / \log 2$$

$$\text{Generation time (g)} = \text{Time of growth} / \text{Number of generations}$$

เมื่อ N_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง

N_0 คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้น

Time of growth เท่ากับ 24 ชั่วโมง

10. ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับซิติเอตทั้ง 3 ชนิด

สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

ทำการทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนเมตรต่อซิติเอต ณ ห้องปฏิบัติการ Protistology ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 ผลการศึกษา

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อการอยู่รอดของซีลิเอต

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อการอยู่รอดของ *Bresslauides*

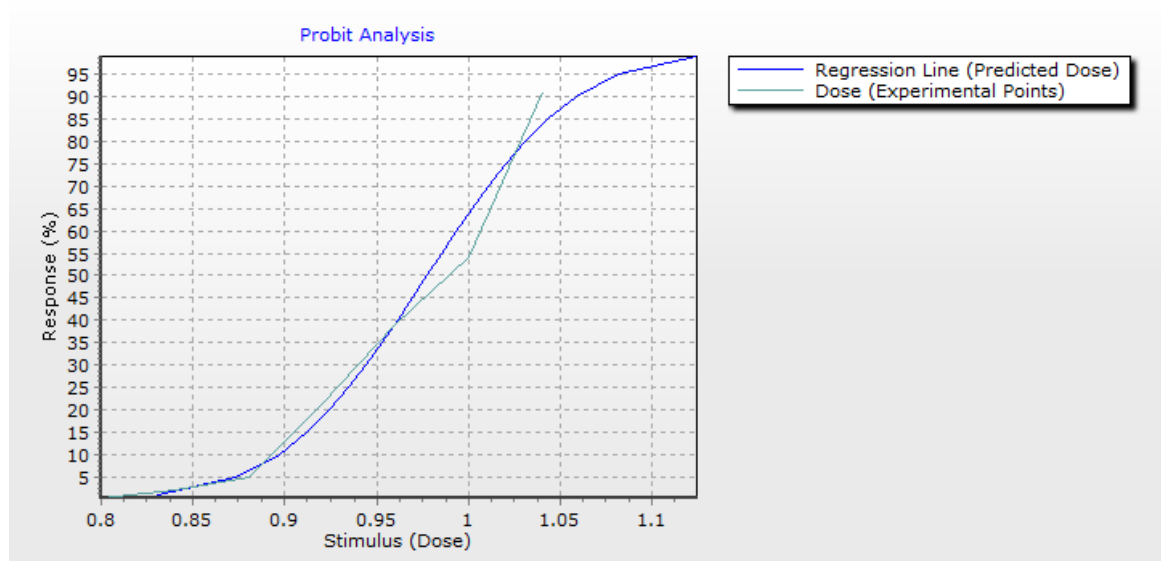
เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซีลิเอต *Bresslauides* sp. โดยใช้สารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินในน้ำต้มฟาง 7 ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.80–1.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการทดสอบภายใต้เงื่อนไขเดียวกันทั้งหมด 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ทำให้ *Bresslauides* sp. ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC₅₀) ด้วยวิธี Probit analysis ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 และค่า LC₅₀ ของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซีลิเอต *Bresslauides* sp. เท่ากับ 0.978 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 1) โดยความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ 1.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการตายของ *Bresslauides* sp. มากกว่า 90% และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารส่งผลให้เกิดการตายของ *Bresslauides* sp. เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตายของ *Bresslauides* sp. เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ที่ 7 ความเข้มข้น ๆ ละ 4 ชั่วโมง และทำการทดสอบ 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน

ความเข้มข้นของ สารคอลลอยด์อนุภาค นาโนของโลหะเงิน (mg/L)	เปอร์เซ็นต์การตายของ <i>Bresslauides</i> sp. (%)			
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.80	0	0	0	0
0.84	0	0	7.93	2.64
0.88	1.66	2.74	10.98	5.13
0.92	20.25	12.33	31.10	21.23
0.96	42.57	30.14	45.73	39.48
1.00	65.29	36.99	60.37	54.22
1.04	93.39	93.15	87.81	91.45

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อการอยู่รอดของ *Paramecium*

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซีลิเอต *Paramecium* sp. โดยใช้สารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินในน้ำต้มฟาง 7 ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.1–1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการทดสอบภายใต้เงื่อนไขเดียวกันทั้งหมด 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ทำให้ *Paramecium* sp. ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC₅₀) ด้วยวิธี Probit analysis ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 และค่า LC₅₀ ของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของ



ภาพที่ 1 กราฟแสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ทำให้ *Bresslauides* sp. ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC₅₀) ด้วยวิธี Probit analysis

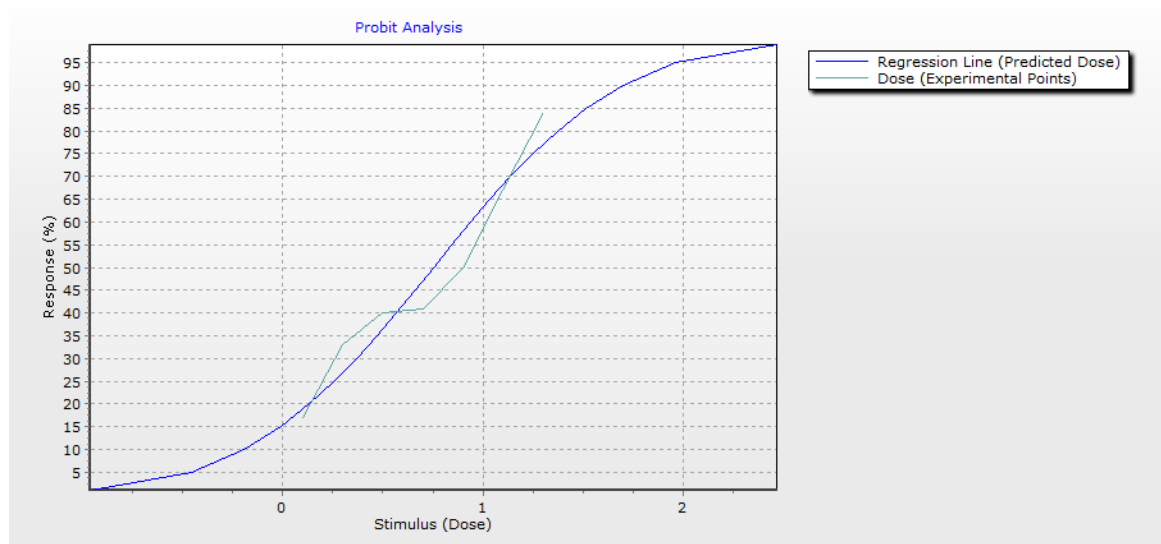
โลหะเงินต่อซิลิเกต *Paramecium* sp. เท่ากับ 0.753 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 2) โดยความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการตายของ *Paramecium* sp. มากกว่า 80% และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารส่งผลให้เกิดการตายของ *Paramecium* sp. เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์การตายของ *Paramecium* sp. เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ที่ 7 ความเข้มข้น ๆ ละ 4 ซ้ำ และทำการทดสอบ 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน

ความเข้มข้นของ สารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/L)	เปอร์เซนต์การตายของ <i>Paramecium</i> sp. (%)			
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.1	0	36.05	22.23	19.43
0.3	19.31	51.16	29.63	33.37
0.5	24.57	65.12	31.49	40.39
0.7	28.07	60.46	35.19	41.24
0.9	49.13	65.12	37.04	50.43
1.1	52.63	91.86	59.26	67.92
1.3	57.90	100.00	96.30	84.73

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อการอยู่รอดของ *Telotrochidium*

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซิลิเกต *Telotrochidium* sp. โดยใช้สารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินในน้ำต้มฟาง 7 ความเข้มข้น ตั้งแต่ 1.5–4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการทดสอบภายใต้เงื่อนไข

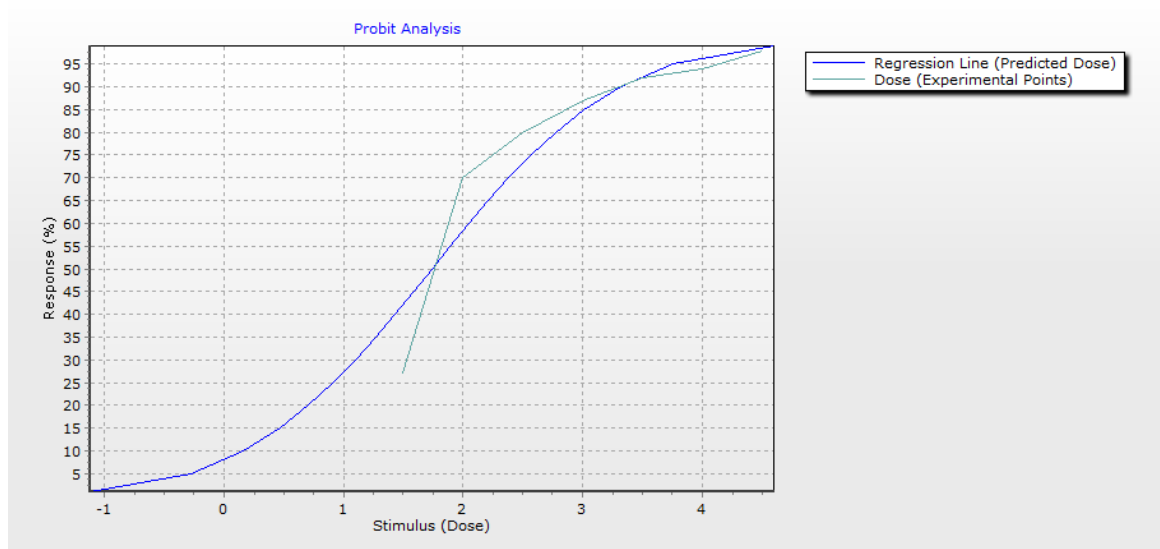


ภาพที่ 2 กราฟแสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ทำให้ *Paramecium* sp. ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธี Probit analysis

เดียวกันทั้งหมด 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ทำให้ *Telotrochidium* sp. ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธี Probit analysis ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 และค่า LC_{50} ของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อชิลิเอต *Telotrochidium* sp. เท่ากับ 1.741 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 3) โดยความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินตั้งแต่ 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการตายของ *Telotrochidium* sp. มากกว่า 90% และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารส่งผลให้เกิดการตายของ *Telotrochidium* sp. เพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายของ *Telotrochidium* sp. เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ที่ 7 ความเข้มข้น ๆ ละ 4 ซ้ำ และทำการทดสอบ 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน

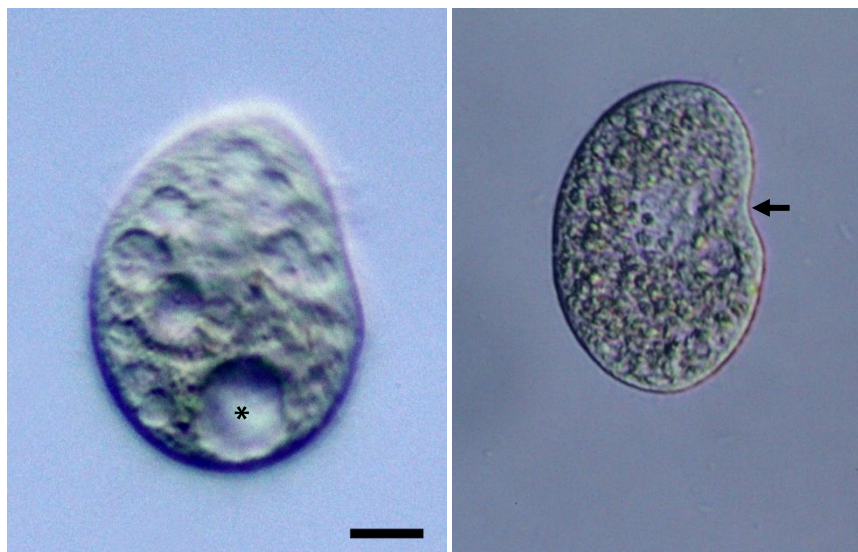
ความเข้มข้นของ สารคอลลอยด์อนุภาค นาโนของโลหะเงิน (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การตายของ <i>Telotrochidium</i> sp. (%)			
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1.5	39.37	3.63	38.22	27.07
2.0	60.64	69.76	80.31	70.24
2.5	73.97	79.44	87.26	80.22
3.0	89.53	82.26	91.89	87.89
3.5	97.78	85.08	93.82	92.23
4.0	96.51	91.13	97.30	94.98
4.5	98.10	99.19	97.30	98.20



ภาพที่ 3 กราฟแสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ทำให้ *Telotrochidium* sp. ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ด้วยวิธี Probit analysis

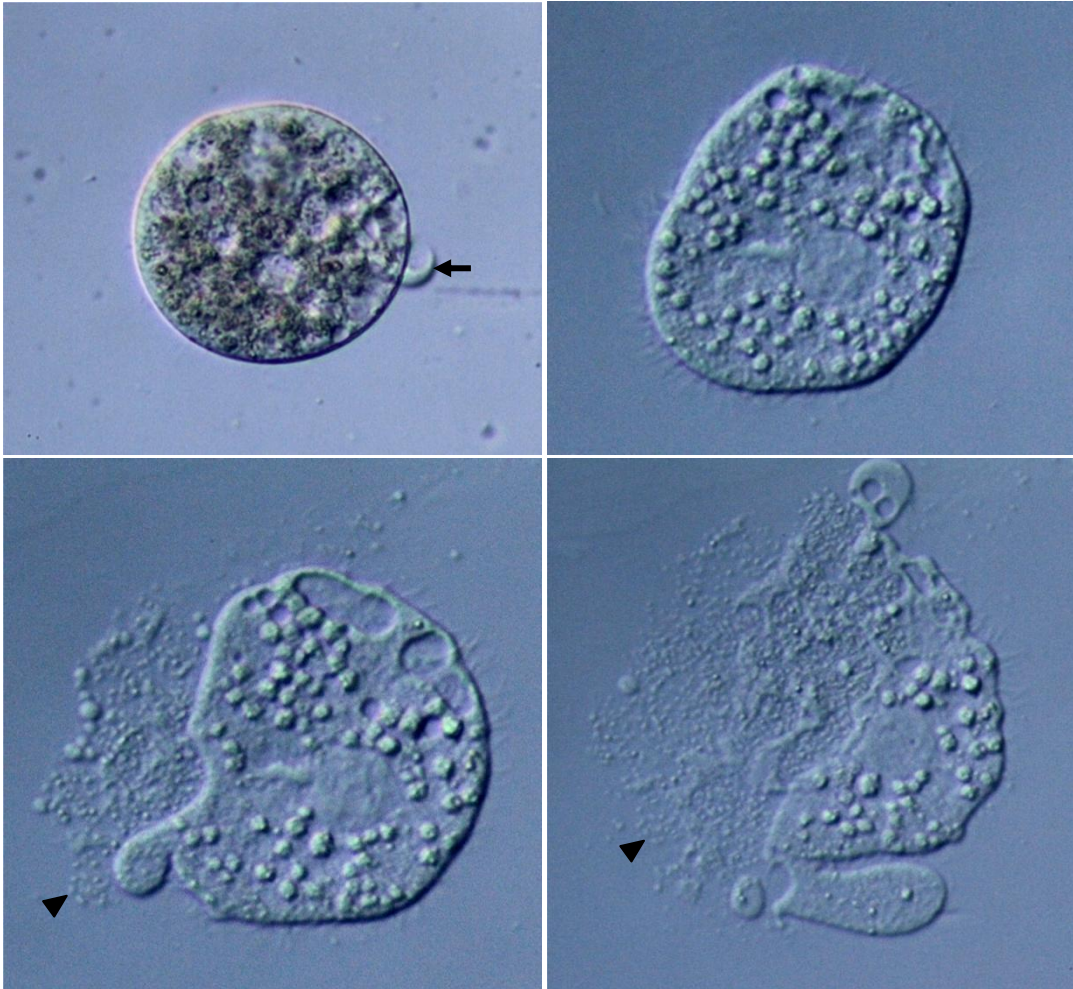
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์ซิลิเอต
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของ *Bresslauides*

จากการศึกษาผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของ *Bresslauides* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง พบเซลล์ของ *Bresslauides* sp. ในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับสาร มีลักษณะของตัวเซลล์รูปร่างไต (kidney-shaped) และมีซิเลียปกคลุมอยู่โดยรอบ ที่กลางเซลล์มีลักษณะคอดเว้าเป็นบริเวณที่มีช่องปากของเซลล์อยู่ เซลล์ของ *Bresslauides* sp. ที่ใช้ทดสอบพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินมีขนาดกว้างประมาณ 37 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 49 ไมโครเมตร และว่ายน้ำเป็นอิสระ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ซิลิเอต *Bresslauides* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงในสภาวะปกติ ที่มีรูปร่างเหมือนไตหรือเม็ดถั่ว ภายในเซลล์มีคอนแทร็กไทล์แควิวโอล (*) และที่กลางตัวเซลล์มีลักษณะคอดเว้า (ลูกศร) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีช่องปากของเซลล์อยู่ [แถบเทียบขนาด 10 ไมโครเมตร]

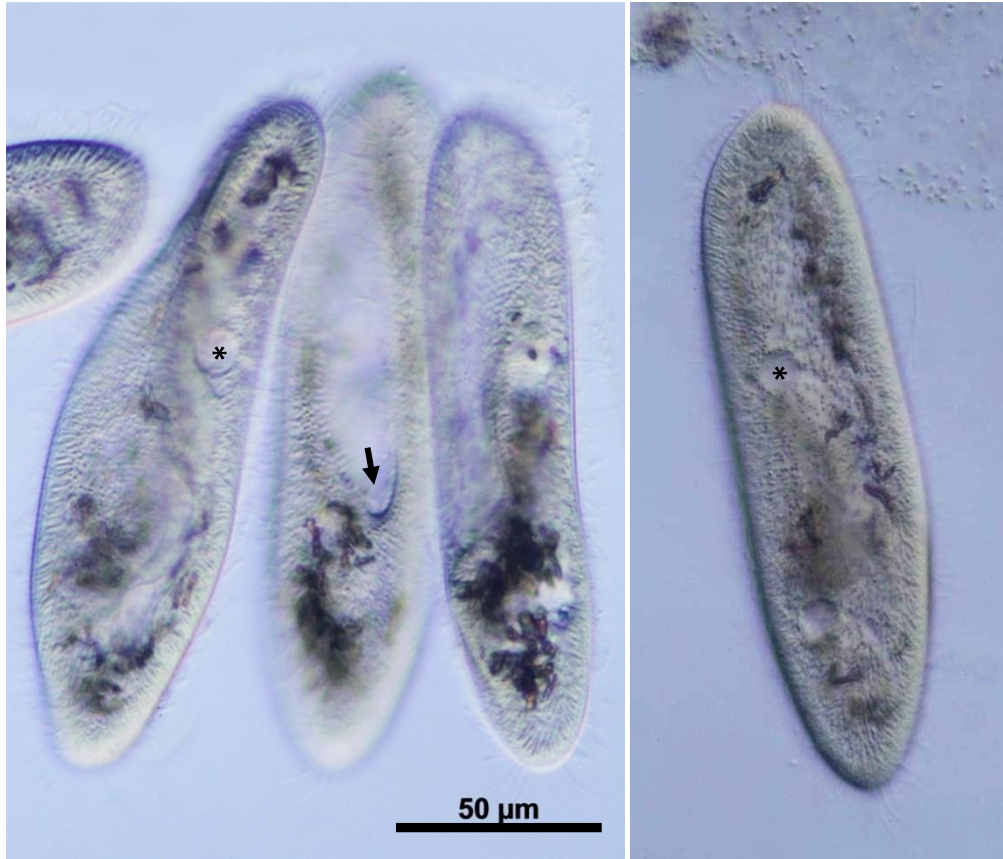
เมื่อทำการทดสอบสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซีเลียต *Bresslauides* sp. พบว่า เซลล์ที่ได้รับสารในระยะแรกจะมีการเคลื่อนที่ช้าลง และเคลื่อนที่เป็นวงกลมในแนวราบ จนกระทั่งหยุด การเคลื่อนที่เป็นวงกลม รูปร่างของเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นทรงกลม ต่อมาเซลล์จะค่อย ๆ เกิด การพองขนาดเล็ก (blebbing) ขึ้นที่บริเวณผิวเซลล์ และเม็ดพองจะแตกออก จากนั้นไซโทพลาซึม ภายในจะค่อย ๆ ไหลออกมาจากตัวเซลล์ จนกระทั่งเซลล์แตกสลายไปในที่สุด (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ซีเลียต *Bresslauides* sp. เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง แสดงเซลล์ในระยะแรกที่ผิวเซลล์ปรากฏเม็ดพองขนาดเล็ก (ลูกศร) และการเปลี่ยนรูปร่างและเสถียรภาพของเซลล์ จนกระทั่งเซลล์แตกสลายและมีการไหลของไซโทพลาซึม ออกมาจากตัวเซลล์ (หัวลูกศร)

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของ *Paramecium*

จากการศึกษาผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของ *Paramecium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง พบเซลล์ของ *Paramecium* sp. ในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับสาร มีตัวเซลล์รูปร่างยาวแบนคล้ายรองเท้าแตะและมีซิเลียปกคลุมอยู่โดยรอบ ตัวเซลล์ทางด้านหน้าและด้านหลังมีลักษณะมน ที่กลางเซลล์ด้านข้างเป็นบริเวณที่มีร่องปากของเซลล์อยู่ เซลล์มีไมโครนิวเคลียสเห็นเป็นบริเวณใสขนาดใหญ่อยู่ภายใน เซลล์ของ *Paramecium* sp. ที่ใช้ทดสอบพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินมีขนาดกว้างประมาณ 47 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 169 ไมโครเมตร และดำรงชีวิตว่ายน้ำเป็นอิสระ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ซิลิเอต *Paramecium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงในสภาวะปกติ ที่มีรูปร่างยาวแบนเหมือนรองเท้าแตะ ภายในมีคอนแทร็กไทล์แควิวอล (*) และกลางตัวเซลล์ที่มีลักษณะเป็นร่อง (ลูกศร) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีช่องปากของเซลล์อยู่

เมื่อทำการทดสอบสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซิลิเอต *Paramecium* sp. พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารในระยะแรกจะมีการเคลื่อนที่ผิดปกติ จากเดิมซึ่งว่ายน้ำอย่างอิสระไปเป็นการเคลื่อนที่หมุนเป็นวงกลมในแนวราบอยู่กับที่ และความเร็วลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งเซลล์หยุดการเคลื่อนที่เป็นวงกลม จากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ กล่าวคือ เซลล์เกิดการขยายพองที่บริเวณกลางตัวเซลล์กว้างออกขึ้นอย่างชัดเจน เซลล์ที่เดิมมีลักษณะด้านหัวและด้านท้ายมนเรียวยาวจะเสียสภาพ จากนั้นที่ผิวเซลล์จะค่อย ๆ เกิดการพองขึ้นหลายตำแหน่งบนตัวเซลล์ โดยเมื่อพองจะขยายขนาดขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งแตกในที่สุด (ภาพที่ 7)

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของ *Tetotrochidium*

จากการศึกษาผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของ *Tetotrochidium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง พบเซลล์ของ *Tetotrochidium* sp. ในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับสาร มีตัวเซลล์รูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel-shaped) และมีวงของซิเลียทางด้านหน้าและด้านท้ายของเซลล์ ภายในเซลล์มีไมโครนิวเคลียสเป็นแถบรูปตัว “C” และคอนแทร็กไทล์แควิวอลอยู่ทางด้านหน้าของเซลล์ เซลล์ของ *Tetotrochidium* sp. ที่ใช้ทดสอบพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินมีขนาดกว้างประมาณ 39 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 59 ไมโครเมตร และว่ายน้ำเป็นอิสระ (ภาพที่ 8)

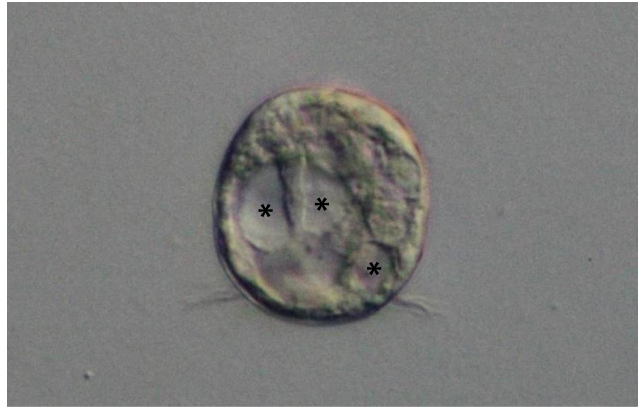


ภาพที่ 7 ซิลิเอต *Paramecium* sp. เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง แสดงเซลล์ที่เกิดการขยายพองบริเวณกลางตัวเซลล์กว้างออกขึ้นอย่างชัดเจน และเซลล์ที่มีรูปร่างเสียสภาพ นอกจากนี้ที่บริเวณผิวเซลล์จะเกิดเม็ดพอง (ลูกศร) ขึ้นหลายตำแหน่งและขยายขนาดขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งแตกในที่สุด



ภาพที่ 8 ซิลิเอต *Telotrochidium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงในสภาวะปกติ ที่เซลล์มีรูปร่างคล้ายถังเปียร์ ภายในมีคอนแทร็กไทล์แวคิวโอล (*) และวงของซิเลียที่ทางด้านหน้าและด้านหลังของเซลล์ (ลูกศร) [แถบเทียบขนาด 10 ไมโครเมตร]

เมื่อทำการทดสอบสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซิลิเอต *Telotrochidium* sp. พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารในระยะแรกจะมีการเคลื่อนที่ช้าลง จากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ กล่าวคือ เซลล์ที่เดิมมีลักษณะคล้ายถังเปียร์ทรงกระบอกจะเปลี่ยนเป็นรูปทรงกลม ภายในเซลล์เกิดแวคิวโอลขึ้นจำนวนมาก จนกระทั่งเซลล์หยุดการเคลื่อนที่และตายในที่สุด (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ซิลิเอต *Telotrochidium* sp. เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง แสดงเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากถังเปียร์ทรงกระบอกไปเป็นทรงกลม และภายในเซลล์ที่เกิดแควิวอล (*) ขึ้นเป็นจำนวนมาก

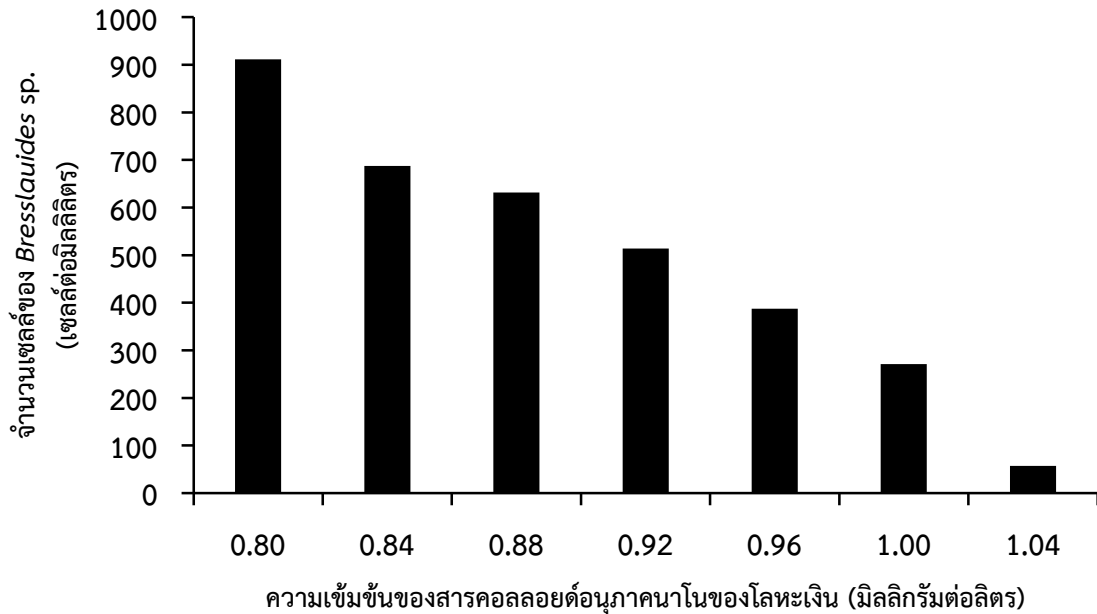
การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่ออัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *Bresslauides*

จากการวัดอัตราการเจริญเติบโตของ *Bresslauides* sp. ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากซิลิเอตได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน โดยคำนวณผลความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ซิลิเอต แล้วนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคิดเป็นความหนาแน่นของเซลล์ต่อมิลลิลิตร เทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร พบว่าความเข้มข้นของสารในช่วง 0.80–1.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของซิลิเอต *Bresslauides* sp. เท่ากับ 56.94–911.11 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ 0.80 และ 0.84 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลกระตุ้นอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต ในขณะที่ความเข้มข้นของสารที่เพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ 0.88 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ *Bresslauides* sp. มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงหรือมีการตายเพิ่มมากขึ้น โดยความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้น 1.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์น้อยที่สุด คือ 56.94 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 10

ตารางที่ 4 ผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่ออัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต *Bresslauides* sp. เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/L)	จำนวนเซลล์ของ <i>Bresslauides</i> sp. (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.80	1154.16	350.00	1229.16	911.11
0.84	1120.83	312.50	629.16	687.50
0.88	991.66	295.83	608.33	631.94
0.92	804.16	266.66	470.83	513.88
0.96	579.16	212.50	370.83	387.50
1.00	350.00	191.66	270.83	270.83
1.04	66.66	20.83	83.33	56.94
control	1008.33	304.16	683.33	665.27



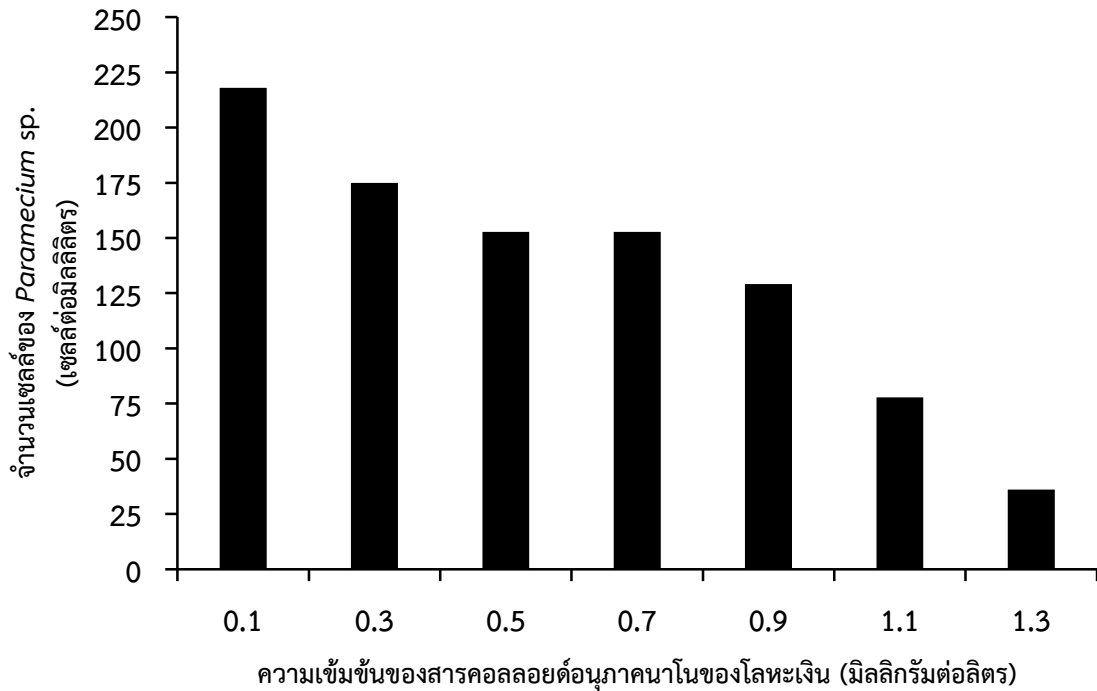
ภาพที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินกับจำนวนเซลล์ของ *Bresslauides* sp. หลังจากที่ใช้ชิเลียตได้รับสารผ่านเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *Paramecium*

จากการวัดอัตราการเจริญเติบโตของ *Paramecium* sp. ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากชิเลียตได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน โดยคำนวณผลความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ชิเลียต แล้วนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคิดเป็นความหนาแน่นของเซลล์ต่อมิลลิลิตร เทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร พบว่าความเข้มข้นของสารในช่วง 0.1–1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของชิเลียต *Paramecium* sp. เท่ากับ 36.11–218.06 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบส่งผลให้ *Paramecium* sp. มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงหรือมีการตายเพิ่มมากขึ้น โดยความเข้มข้นของสารที่ 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์เหลือน้อยที่สุด คือ 36.11 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 11

ตารางที่ 5 ผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่ออัตราการเจริญเติบโตของชิเลียต *Paramecium* sp. เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/L)	จำนวนเซลล์ของ <i>Paramecium</i> sp. (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.1	250.00	229.17	175.00	218.06
0.3	191.66	175.00	158.33	175.00
0.5	179.16	125.00	154.16	152.77
0.7	170.83	141.67	145.83	152.78
0.9	120.83	125.00	141.66	129.16
1.1	112.50	29.17	91.66	77.78
1.3	100.00	0.00	8.33	36.11
control	237.50	358.33	225.00	273.61



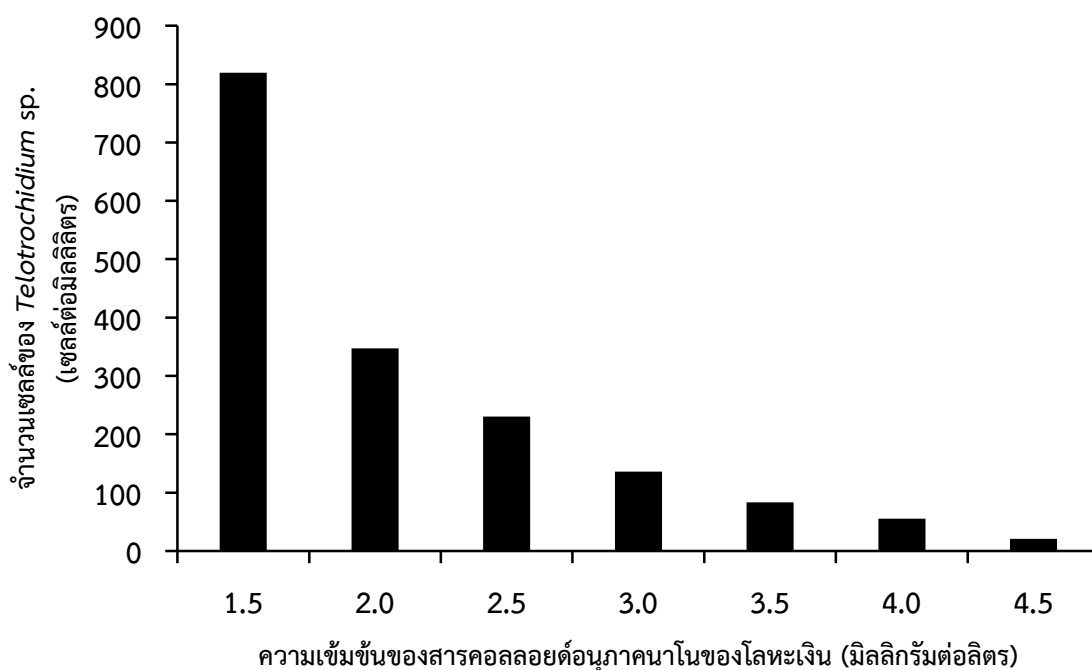
ภาพที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินกับจำนวนเซลล์ของ *Paramecium* sp. หลังจากที่ซิวเลียตได้รับสารผ่านเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *Telotrochidium*

จากการวัดอัตราการเจริญเติบโตของ *Telotrochidium* sp. ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากซิวเลียตได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน โดยคำนวณผลความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ซิวเลียต แล้วนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคิดเป็นความหนาแน่นของเซลล์ต่อมิลลิลิตร เทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร พบว่าความเข้มข้นของสารในช่วง 1.5–4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของซิวเลียต *Telotrochidium* sp. เท่ากับ 20.83–819.44 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ *Telotrochidium* sp. มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง และที่ความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ *Telotrochidium* sp. มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงหรือมีการตายเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก โดยความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้น 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์น้อยที่สุด คือ 20.83 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 12

ตารางที่ 6 ผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่ออัตราการเจริญเติบโตของซีลิเอด *Tetrotrochidium* sp. เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ สารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ของ <i>Tetrotrochidium</i> sp. (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1.5	795.83	995.83	666.66	819.44
2.0	516.66	312.50	212.50	347.22
2.5	341.66	212.50	137.50	230.55
3.0	137.50	183.33	87.50	136.11
3.5	29.16	154.16	66.66	83.33
4.0	45.83	91.66	29.16	55.55
4.5	25.00	8.33	29.16	20.83
control	1312.50	1033.33	1079.16	1141.66



ภาพที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินกับจำนวนเซลล์ของ *Tetrotrochidium* sp. หลังจากซีลิเอดได้รับสารผ่านไประยะเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของซีลิเอด

จากการทดสอบผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (generation time) ของซีลิเอดทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp. และ *Tetrotrochidium* sp. ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากซีลิเอดได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้น 0.929, 0.135 และ 0.707 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร พบว่าสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินมีผลทำให้ซีลิเอดทุกชนิดที่ได้รับการทดสอบมีระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นต่างจากการทดลองชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

95% ($p \leq 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี student's *t* test โดยสารที่ใช้ทดสอบส่งผลให้ซีลิเอตทุกชนิดที่ได้รับสารมีระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงเพิ่มขึ้นเท่าตัว จาก 7.19 ± 0.24 , 10.39 ± 0.86 และ 6.86 ± 0.33 ชั่วโมงต่อจำนวนชั่วโมง ใน *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp. และ *Telotrochidium* sp. กลุ่มควบคุม ตามลำดับ เป็น 14.52 ± 1.39 , 19.73 ± 1.27 และ 11.90 ± 1.02 ชั่วโมงต่อจำนวนชั่วโมง ในกลุ่มที่ได้รับสาร ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของซีลิเอต *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp. และ *Telotrochidium* sp. เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร หลังผ่านไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ซีลิเอต	กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้นของสาร (mg/l)	จำนวนชั่วโมง (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมง (g)	
				ชั่วโมง / จำนวนชั่วโมง *	ชั่วโมง : นาที : วินาที
<i>Bresslauides</i>	กลุ่มควบคุม	-	3.53	7.19 ± 0.24	7 : 11 : 24
	กลุ่มทดสอบ	0.929	1.961	14.52 ± 1.39	14 : 31 : 12
<i>Paramecium</i>	กลุ่มควบคุม	-	2.55	10.39 ± 0.86	10 : 23 : 24
	กลุ่มทดสอบ	0.135	1.169	19.73 ± 1.27	19 : 43 : 48
<i>Telotrochidium</i>	กลุ่มควบคุม	-	3.946	6.86 ± 0.33	06 : 51 : 36
	กลุ่มทดสอบ	0.707	2.305	11.90 ± 1.02	11 : 54 : 00

* ค่าเฉลี่ยจำนวนชั่วโมงหรือเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมง \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error)

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

เทคโนโลยีนาโนของโลหะเงินถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งในผลิตภัณฑ์เพื่อการอุปโภคและบริโภค อย่างไรก็ตามการใช้นาโนอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตรที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน อาจก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของอนุภาคดังกล่าวลงสู่สิ่งแวดล้อม จนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงความสมดุลของระบบนิเวศได้มากที่สุด (Bondarenko et al., 2013) ด้วยคุณสมบัติของอนุภาคเงินขนาดนาโนที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Choi et al., 2008) อนุภาคเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อระบบนิเวศได้ ตัวอย่างเช่นแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา แบคทีเรียที่ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน หรือแม้แต่ส่งผลให้เกิดการเพิ่มความต้านทานของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงผลกระทบของอนุภาคเงินขนาดนาโนต่อจุลินทรีย์กลุ่มยูแคริโอตยังพบมีไม่มากนัก การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซิลิเอต 3 ชนิด ได้แก่ *Breslauoides* sp., *Paramecium* sp. และ *Tetrahymena* sp. โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิลิเอตตายไปครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) เมื่อเพาะเลี้ยงซิลิเอตในน้ำต้มฟางข้าวที่มีสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากได้รับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร่วมกับการศึกษาผลของอนุภาคเงินขนาดนาโนต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์, อัตราการเจริญเติบโต และระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงรุ่น เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้ซิลิเอตเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของแหล่งน้ำที่อาจมีการปนเปื้อนสารที่มีอนุภาคนาโนของโลหะเงินเป็นองค์ประกอบ และเพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำผลการศึกษาที่ได้ไปกำหนดเกณฑ์เบื้องต้นในการระบายน้ำทิ้งที่จะไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศต่อไป

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซิลิเอตทั้ง 3 ชนิด โดยพิจารณาจากค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *Paramecium* sp. มีความไวต่อสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินมากที่สุด รองลงมาคือ *Breslauoides* sp. และ *Tetrahymena* sp. ตามลำดับ โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.753, 0.978 และ 1.741 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยในการศึกษาที่ผ่านมาของ Kvitek และคณะ (2009) ที่ทำการทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคเงินขนาดนาโนที่ดัดแปลงและไม่ดัดแปลงพื้นผิวต่อ *Paramecium caudatum* ซึ่งเป็นชนิดที่อยู่ในสกุลเดียวกันกับซิลิเอตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า LC_{50} ของ *P. caudatum* ต่ออนุภาคเงินขนาดนาโนหลังจากได้รับสารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 39 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าค่า LC_{50} ของ *Paramecium* sp. ต่อสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้กว่า 52 เท่า ถึงแม้ว่าระยะเวลาในการสัมผัสสารระหว่างการศึกษานี้ [24 ชั่วโมง] กับการศึกษาของ Kvitek และคณะ (2009) [1 ชั่วโมง] จะต่างกันมากก็ตาม ค่า LC_{50} ที่ต่างกันหลายสิบเท่านี้ อาจบ่งชี้ให้เห็นถึงความไวต่อสารของ *Paramecium* sp. สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ที่มากกว่า *P. caudatum* ในการศึกษาของ Kvitek และคณะ (2009) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Juganson และคณะ (2017) ที่ทำการทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคเงินขนาดนาโนต่อซิลิเอต *Tetrahymena thermophila* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ CU427 และ CU428 พบว่าความเข้มข้นที่ชักนำให้ซิลิเอตจำนวนครึ่งหนึ่งตอบสนองต่อสาร (effective concentration 50: EC_{50}) มีค่าสูงถึง ~100 และ ~75 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดย EC_{50} เป็นความเข้มข้นที่ยังไม่ส่งผลให้เกิดการตายของ *T. thermophila* แสดงให้เห็นว่าหากต้องการให้ประชากรของ *T. thermophila* ทั้ง 2 สายพันธุ์ตายไปจำนวนครึ่งหนึ่ง ซึ่งจะได้ค่า LC_{50} ควรต้องเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคเงินขนาดนาโนให้สูงกว่า 100 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเพียงค่า EC_{50} ที่รายงานในการศึกษาของ Juganson และคณะ (2017) เปรียบเทียบกับค่า LC_{50} ของ *Paramecium* sp. ที่ได้จาก

การศึกษาครั้งนี้ พบว่าแตกต่างกันถึง ~133 และ ~100 เท่า ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอที่จะยืนยันให้เห็นถึงความไวของ *Paramecium* sp. ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อีกทั้งยังแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมในการใช้ *Paramecium* sp. สายพันธุ์นี้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของแหล่งน้ำที่อาจพบมีการปนเปื้อนของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อไป

การศึกษาสัณฐานวิทยาของซิลิเอตทั้ง 3 ชนิด เมื่อเซลล์ได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน พบว่าสารที่ใช้ทดสอบมีผลต่อรูปร่างของซิลิเอตทั้ง 3 ชนิดคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ซิลิเอตที่ได้รับสารจะมีการเคลื่อนที่ช้าลง ภายในเซลล์เกิดแควิวอล ที่ผิวเยื่อหุ้มเซลล์เกิดเม็ดพุงพอง เซลล์เสียรูปร่าง โดยไซโทพลาสซึมจะค่อย ๆ ไหลออกมาจากตัวเซลล์ทำให้เซลล์ตายในที่สุด การตอบสนองของรูปแบบนี้พบรายงานเช่นเดียวกันในการศึกษาของ Pudpong และ Chantangsi (2015) ถึงความเป็นพิษของโลหะหนัก 4 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม, ทองแดง, สังกะสี และ ตะกั่ว ต่อเซลล์ของซิลิเอต *Bresslauides* sp. สายพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ กล่าวคือ เซลล์ *Bresslauides* sp. ที่ได้รับโลหะหนักจะเกิดการสร้างแควิวอลขึ้นภายใน ต่อมาเซลล์จะเสียรูปร่างและแตกสลายในที่สุด นอกจากนี้ Martín-González และคณะ (2005) ยังรายงานผลการตอบสนองในลักษณะนี้จากพิษของสารละลายแคดเมียมและสังกะสี ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์ของซิลิเอต 3 ชนิด ได้แก่ *Colpoda steinii*, *Cyrtolophosis elongata* และ *Drepanomonas revoluta* โดยพบว่าโลหะหนักทั้งสองชนิดส่งผลทำลายไมโทคอนเดรีย ทำให้เซลล์สร้างแควิวอลขึ้นในไซโทพลาสซึม เกิดการสะสมของเศษเยื่อหุ้มเซลล์และการสร้างอโตฟาโกโซม มีงานวิจัยพบว่าโลหะหนักมีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและกระบวนการทำงานของ actin filament ซึ่งเป็นเส้นใยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการรักษารูปร่างของเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เสียรูปร่างและแตกสลายในที่สุด (Prozialeck and Niewenhuis, 1991) การเกิดเม็ดพุงพองจะนำไปสู่การแตกสลายของเซลล์นี้ นอกจากนี้ จะเกิดจากผลของสารประเภทโลหะหนักแล้ว ยังพบว่าสามารถเกิดจากการที่เซลล์ของซิลิเอตตอบสนองต่อสารพิษประเภทอื่นได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น การเกิดเม็ดพุงพองและเซลล์เสียสภาพใน *P. caudatum* (Amanchi and Hussain 2010; Venkateswara Rao et al., 2006, 2007, 2008) และ ในซิลิเอต *Oxytricha fallax* (Amanchi and Hussain 2010) จากสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นเพิ่มเติมถึงผลกระทบของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาของซิลิเอตอีก 3 สายพันธุ์ ใน 3 สกุล ที่แตกต่างกัน ยิ่งไปกว่านั้นสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน ยังส่งผลทำให้ซิลิเอตที่ศึกษาทั้ง 3 สายพันธุ์เคลื่อนที่ช้าลง สอดคล้องกับการทดลองของ Amanchi และ Hussain (2010) ที่ทำการศึกษาผลของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตต่อสัณฐานวิทยาของ *P. caudatum* พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารฆ่าแมลงจะมีการเคลื่อนที่ผิดปกติไปจากเดิม กล่าวคือ เซลล์มีการเคลื่อนที่เร็วขึ้นในช่วง 2 นาทีแรก และเคลื่อนที่ช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที เช่นเดียวกับการรายงานผลความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงกลุ่มเดียวกันต่อการเคลื่อนที่ของซิลิเอตชนิดเดียวกันในการศึกษาของ Venkateswara Rao และคณะ (2006, 2007) รวมไปถึงการตอบสนองของซิลิเอตทั้ง 3 ชนิด เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่พบในการศึกษาครั้งนี้อีกด้วย

การศึกษาผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่ออัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอตทั้ง 3 ชนิด เมื่อได้รับสารเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยคำนวณจากการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อซิลิเอต พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินสูงขึ้น จะส่งผลให้การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของซิลิเอตทั้ง 3 ชนิดลดลง แสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้เกิดความผิดปกติกับเซลล์เพิ่มขึ้น โดยมีผลลดอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rehman และคณะ (2009) ที่พบว่าโลหะหนักแคดเมียม, นิกเกิล และสังกะสี ส่งผลให้การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ *Euplotes mutabilis* ลดลง นอกจากนี้ในการศึกษาของ

Mihalikova และคณะ (2005) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอต *Entodinium caudatum* จะลดลงหากถูกนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายโลหะหนักของปรอท, ทองแดง และโครเมียมผสมอยู่ กล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ สารละลายโลหะหนักเหล่านี้นอกจากจะทำให้เซลล์ตายแล้ว ยังมีผลทำให้ซิลิเอตมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนน้อยลงเช่นเดียวกัน อัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอตที่ลดลงนี้สามารถเกิดได้เช่นเดียวกันกับซิลิเอตที่ถูกทดสอบภายใต้สภาวะที่มีสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสผสมในอาหารเพาะเลี้ยง (Venkateswara Rao et al., 2006, 2007) อีกทั้งยังสอดคล้องกับระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงที่เพิ่มขึ้นอีกเท่าตัวในซิลิเอตทั้ง 3 ชนิด เมื่อได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของ *Bresslauides* sp., *Paramecium* sp. และ *Telotrochidium* sp. ของกลุ่มที่ได้รับสารจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 14.52 ± 1.39 [14:31:12 ชั่วโมง], 19.73 ± 1.27 [19:43:48 ชั่วโมง] และ 11.90 ± 1.02 [11:54:00 ชั่วโมง] ชั่วโมงต่อจำนวนรุ่น ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.19 ± 0.24 [7:11:24 ชั่วโมง], 10.39 ± 0.86 [10:23:24 ชั่วโมง] และ 6.86 ± 0.33 [6:51:36 ชั่วโมง] ชั่วโมงต่อจำนวนรุ่น แสดงให้เห็นว่าสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินมีผลเพิ่มเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของซิลิเอตทั้ง 3 ชนิด กล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ในระยะเวลาที่เท่ากันเซลล์ซิลิเอตที่ไม่ได้รับสารจะใช้เวลาในการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองน้อยกว่าเซลล์ที่ได้รับสาร โดย *Paramecium* sp. มีระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงมากที่สุดทั้งในกลุ่มควบคุมและในกลุ่มที่ได้รับสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน นอกจากนี้อนุภาคนาโนของโลหะเงินซึ่งมีผลยี้ระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของซิลิเอตที่พบในการศึกษาครั้งนี้แล้ว มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้โดย ชิดชัย จันทรตั้งสี่ และคณะ (2559) ที่พบว่าโลหะหนัก 3 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม, นิกเกิล และสังกะสี สามารถเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของซิลิเอตทะเล *Euplotes quinquecarinatus* จาก 7 ชั่วโมง 4 นาที 12 วินาที ในกลุ่มควบคุม เป็น 32:25:48, 21:28:12 และ 28:51:00 ชั่วโมง ในกลุ่มที่ได้รับโลหะหนัก ตามลำดับ อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของซิลิเอตทะเลสายพันธุ์นี้ร่วมด้วย นอกจากนี้โลหะหนักแล้วในการศึกษาของ Venkateswara Rao และคณะ (2006) ถึงเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของ *P. caudatum* ยังพบว่า *P. caudatum* ที่ได้รับสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตจะมีระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงเพิ่มขึ้นเป็น 9.74 ± 0.48 , 10.38 ± 0.51 , 11.29 ± 0.56 และ 13.37 ± 0.66 ชั่วโมงต่อจำนวนรุ่น ในกลุ่มที่ได้รับสารฆ่าแมลงที่ความเข้มข้น 30, 60, 120 และ 240 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ต่างจากในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสารที่มีค่าเพียง 7.63 ± 0.38 ชั่วโมงต่อจำนวนรุ่น แสดงให้เห็นว่าสารพิษไม่เพียงแต่จะส่งผลกระทบต่อระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของ *P. caudatum* แล้ว แต่ระยะเวลาจะยาวนานขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มมากขึ้นด้วย การเพิ่มของระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของซิลิเอตเมื่อได้รับสารที่พบในการศึกษาครั้งนี้และที่ได้รับการรายงานจากการศึกษาอื่น ๆ ก่อนหน้า อาจสะท้อนให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการเสียความสมดุลในระบบนิเวศ หากสภาวะของระบบนิเวศเหล่านั้นได้รับการปนเปื้อนของสารพิษหรือมลพิษที่มาจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ เนื่องด้วยซิลิเอตถือเป็นหนึ่งในจุลชีพยูแคริโอตที่ช่วยควบคุมประชากรของแบคทีเรียและเชื้อราในระบบ อีกทั้งยังเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ช่วยหมุนเวียนสารต่าง ๆ ของระบบ การเพิ่มขึ้นของระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วโมงของซิลิเอตอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของสารพิษในระบบ อาจนำไปสู่การลดลงของจำนวนประชากรของซิลิเอต ส่งผลให้หนึ่งในจุลชีพที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมประชากรของแบคทีเรียและเชื้อราลดลงก่อให้เกิดการเสียความสมดุลของระบบนิเวศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสายใยและห่วงโซ่ของระบบที่มีจุลชีพกลุ่มซิลิเอตเป็นตัวขับเคลื่อนหลัก

การศึกษานี้ครั้งนี้นอกจากจะทำให้ทราบถึงผลของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อซิลิเอตเพิ่มขึ้นอีก 3 ชนิดแล้ว ยังสะท้อนให้เห็นถึงผลกระทบที่อาจมีขึ้นต่อซิลิเอตชนิดอื่น ๆ ที่ดำรงชีวิตอยู่ใน

ระบบนิเวศทางธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็ผลที่อาจเกิดขึ้นได้หากมีการปนเปื้อนของสารลงสู่ระบบ ทั้งในด้านความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อสัณฐานวิทยาหรือการอยู่รอดของซิลิเอตโดยตรง หรือผลของสารต่ออัตราการเจริญเติบโต รวมไปถึงระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงของซิลิเอตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศที่ปนเปื้อน ด้วยความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีซึ่งเป็นไปเพื่อความสะดวกสบายและสวัสดิภาพอันดีขึ้นของมนุษย์ นวัตกรรมที่เกิดขึ้นเหล่านี้ในทางกลับกันอาจส่งผลทำลายระบบนิเวศในทางอ้อม และในที่สุดอาจส่งผลกระทบต่อมนุษย์ซึ่งเป็นเพียงส่วนหนึ่งของระบบนิเวศเท่านั้น การคำนึงถึงปริมาณและความพอดีต่อการใช้สาร อาทิ อนุภาคนาโนของโลหะเงิน ในกิจกรรมหรือผลิตภัณฑ์เพื่อการอุปโภคและบริโภคของมนุษย์ โดยเพิ่มความตระหนักถึงผลกระทบของสารต่อสิ่งมีชีวิตอื่น รวมไปถึงตัวของมนุษย์เองจึงเป็นสิ่งที่พึงกระทำและมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้การเฝ้าระวังถึงผลกระทบจากการกระทำโดยรู้เท่าไม่ถึงการณ์จากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ที่เกิดขึ้นแล้วเมื่อในอดีตก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญเช่นเดียวกัน จากความไวในการตอบสนองต่อสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินของ *Paramecium* sp. เมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้ซิลิเอตตายไปครึ่งหนึ่ง (LC₅₀) และระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงของซิลิเอต *Paramecium* sp. สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จึงถือเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำคัญ ที่สามารถนำไปใช้เพื่อการเฝ้าระวังและประเมินความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่อาจพบปนเปื้อนได้ในสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงเพื่อประโยชน์ต่อการวิจัยทางด้านพิษวิทยาสิ่งแวดล้อมของอนุภาคนาโนชนิดอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ชิดชัย จันทร์ตั้งสี, สุดาสุวรรณค์ ลิ้มรักษา และ สุชา เฉยศิริ. 2559. การประยุกต์ใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของซิลิเกตทะเลหน้าดินจากหาดลูกกลม เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี ในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักในห้องปฏิบัติการ. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Amanchi, N. R. and Hussain, M. M. 2010. Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. *J. Environ. Biol.* 31: 603–607.
- Ansari, M. A., Shukla, A. K., Oves, M., and Khan, H. M. 2016. Electron microscopic ultrastructural study on the toxicological effects of AgNPs on the liver, kidney and spleen tissues of albino mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 44: 30–43.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., and Paknikar, K. M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. *Toxicol. Lett.* 179: 93–100.
- Asharani, P. V., Wu, Y. L., Gong, Z., and Valiyaveetil, S. 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology.* 19: 255102.
- Biswas, P. and Wu, C. Y. 2005. Critical review: nanoparticles and the environment. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 55: 708–746.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., and Kahru, A. 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch. Toxicol.* 87: 1181–1200.
- Chang, A. L., Khosravi, V., and Egbert, B. 2006. A case of argyria after colloidal silver ingestion. *J. Cutan. Pathol.* 33: 809–811.
- Chen, X. and Schluesener, H. J. 2008. *Nanosilver: a nanoproduct in medical application.* *Toxicol. Lett.* 176: 1–12.
- Choi, O., Deng, K. K., Kim, N. -J., Ross, Jr., L., Surampalli, R. Y., and Hu, Z. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* 42: 3066–3074.
- Farkas, J., Christian, P., Urrea, J. A., Roos, N., Hassellöv, M., Tollefsen, K. E., and Thomas, K. V. 2010. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 96: 44–52.
- Foissner, W. 1999. Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, method, diversity, representative example. *Agric. Ecosyst. Environ.* 74: 95–112.
- Juganson, K., Mortimer, M., Ivask, A., Pucciarelli, S., Miceli, C., Orupöld, K., and Kahru, A. 2017. Mechanisms of toxic action of silver nanoparticles in the protozoan *Tetrahymena thermophila*: From gene expression to phenotypic events. *Environ. Pollut.* 225: 481–489.

- Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., and Lead, J. R. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 1825–1851.
- Kulthong, K., Srisung, S., Boonpavanitchakul, K., Kangwansupamonkon, W., and Maniratanachote, R. 2010. Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. *Part. Fibre Toxicol.* 7: 8.
- Kvitek, L., Vanickova, M., Panacek, A., Soukupova, J., Dittrich, M., Valentova, E., Pucek, R., Bancirova, M., Milde, D., and Zboril, R. 2009. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *J. Phys. Chem. C* 113: 4296–4300.
- Larese, F. F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M., and Maina, G. 2009. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology.* 255: 33–37.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mihalikova, K., Javorsky, P., Varadyova, Z., and Kisidayova, S. 2005. The effect of heavy metals on the rumen ciliate *Entodinium caudatum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52: 35–38.
- Panáček, A., Kvitek, L., Pucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., Sharma, V. K., Nevěčná, T., and Zbořil, R. 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* 110: 16248–16253.
- Prozialeck, W. C. and Niewenhuis, R. J. 1991. Cadmium (Cd^{2+}) disrupts intercellular junctions and actin filaments in LLC-PK1 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 107: 81–97.
- Pudpong, S. and Chantangsi, C. 2015. Effects of four heavy metals on cell morphology and survival rate of the ciliate *Bresslauides* sp. *Trop. Nat. Hist.* 15: 117–125.
- Raj, M., Yadav, A., and Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 27: 76–83.
- 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.
- Sanvicensm, N. and Marco, M. P. 2008. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.* 26: 425–433.
- Trop, M., Novak, M., Rodl, S., Hellbom, B., Kroell, W., and Goessler, W. 2006. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J. Trauma.* 60: 648–652.
- 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.
- Venkateswara Rao, J., Gunda, V. G., Srikanth, K., and Arepalli, S. K. 2007. Acute toxicity bioassay using *Paramecium caudatum*, a key member to study the effects of monocrotophos on swimming behaviour, morphology and reproduction. *Toxicol. Environ. Chem.* 89: 307–317.
- 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.
- Wu, Y., Zhou, Q., Li, H., Liu, W., Wang, T., and Jiang, G. 2010. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquat. Toxicol.* 100: 160–167.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ *Bresslauides* sp. ของชุดการทดลองที่ 1 สุ่มนับครึ่งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ <i>Bresslauides</i> sp. ที่อยู่รอด (เซลล์)															จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*	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					
0.80	26	30	37	28	19	13	24	23	18	14	31	14	14	14	277	1154.16	114.46
0.84	15	17	29	14	32	30	17	18	18	21	26	32	26	32	269	1120.83	111.15
0.88	18	17	34	24	21	10	13	22	21	27	25	6	25	6	238	991.66	98.34
0.92	4	25	11	8	21	12	12	29	15	19	16	21	16	21	193	804.16	79.75
0.96	7	12	25	4	12	8	25	15	5	2	4	20	4	20	139	579.16	57.43
1.00	5	6	6	1	4	7	9	4	3	14	13	12	13	12	84	350	34.71
1.04	0	0	0	0	3	2	1	4	3	1	1	1	1	1	16	66.66	6.61
control	10	11	12	17	28	29	17	23	29	23	21	22	21	22	242	1008.33	100

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *Bresslauides* sp. ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่นับ × 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) / จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) × 100

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ *Bresslauides* sp. ของชุดการทดลองที่ 2 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ <i>Bresslauides</i> sp. ที่อยู่รอด (เซลล์)												จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*	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					
0.80	10	4	6	9	5	4	6	9	2	3	16	4	5	6	84	350	115.07
0.84	11	6	13	6	3	7	5	5	3	3	3	3	6	7	75	312.5	102.74
0.88	1	8	9	3	6	8	4	5	5	8	5	2	7	9	71	295.83	97.26
0.92	5	8	4	4	6	5	5	9	2	4	4	7	4	4	64	266.66	87.67
0.96	4	4	3	3	4	4	6	4	4	4	7	5	3	4	51	212.5	69.86
1.00	4	4	3	3	2	2	7	2	2	7	1	1	0	4	46	191.66	63.01
1.04	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	5	20.83	6.85
control	8	7	7	9	5	8	4	3	4	8	4	4	6	4	73	304.16	100

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *Bresslauides* sp. ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่นับ × 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) / จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) × 100

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ *Bresslauides* sp. ของชุดการทดลองที่ 3 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ <i>Bresslauides</i> sp. ที่อยู่รอด (เซลล์)															จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*	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					
0.80	25	34	32	21	9	14	27	26	1	2	3	27	28	29	295	1229.16	179.87
0.84	6	12	8	15	5	14	3	3	5	30	4	38	4	11	151	629.16	92.07
0.88	8	19	6	12	5	20	7	7	21	9	3	3	5	31	146	608.33	89.02
0.92	10	6	3	5	7	3	7	7	14	9	17	10	6	15	113	470.83	68.90
0.96	8	6	5	5	3	9	11	10	10	6	10	7	2	10	89	370.83	54.27
1.00	8	9	5	3	4	5	4	8	0	7	0	2	7	3	65	270.83	39.63
1.04	1	0	5	4	3	5	0	1	1	0	0	0	0	1	20	83.33	12.19
control	10	13	13	9	17	7	16	15	15	11	21	13	19	19	164	683.33	100

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *Bresslauides* sp. ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่นับ × 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) / จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) × 100

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ *Paramecium* sp. ของชุดการทดลองที่ 1 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ <i>Paramecium</i> sp. ที่อยู่รอด (เซลล์)												จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*	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				
0.1	2	2	7	9	8	3	3	7	3	3	5	3	6	60	250	105.26
0.3	3	4	4	12	3	2	1	4	4	1	4	1	4	46	191.66	80.69
0.5	3	5	7	1	1	2	8	3	3	3	3	2	5	43	179.16	75.43
0.7	4	2	1	4	3	8	2	6	4	3	3	1	3	41	170.83	71.93
0.9	3	1	5	3	3	2	3	2	0	3	2	2	2	29	120.83	50.87
1.1	0	2	1	4	2	4	2	1	3	1	4	3	3	27	112.50	47.37
1.3	0	0	1	2	4	2	3	4	3	1	2	2	2	24	100	42.10
control	5	2	5	3	7	3	8	2	3	7	6	6	57	237.5	100	

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *Paramecium* sp. ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่นับ × 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) / จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) × 100

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ *Paramecium* sp. ของชุดการทดลองที่ 2 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ <i>Paramecium</i> sp. ที่อยู่รอด (เซลล์)												จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)**	
	การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1		การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2		การทดสอบซ้ำครั้งที่ 3		การทดสอบซ้ำครั้งที่ 4		รวม		จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*				
	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 4	นับครั้งที่ 1	นับครั้งที่ 2	นับครั้งที่ 3	นับครั้งที่ 4	รวม						
0.1	8	5	4	6	3	6	2	4	3	5	3	6	55	229.17	63.95
0.3	3	5	7	2	4	6	3	2	3	3	1	3	42	175	48.84
0.5	1	2	5	4	3	3	4	1	2	1	3	1	30	125	34.88
0.7	3	2	5	2	2	4	1	1	6	3	2	2	34	141.67	39.54
0.9	1	5	1	2	4	1	1	1	3	4	5	2	30	125	34.88
1.1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	3	0	1	7	29.17	8.14
1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
control	8	2	12	13	5	8	7	8	9	6	3	5	86	358.33	100

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *Paramecium* sp. ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่นับ × 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) / จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) × 100

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ *Paramecium* sp. ของชุดการทดลองที่ 3 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ <i>Paramecium</i> sp. ที่อยู่รอด (เซลล์)															จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*	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					
0.1	5	4	5	2	4	3	5	3	2	4	3	2	4	2	42	175	77.77
0.3	7	4	3	3	1	4	3	4	3	3	1	2	3	1	38	158.33	70.37
0.5	6	3	2	0	3	2	1	1	1	7	4	3	4	5	37	154.16	68.51
0.7	2	4	2	3	2	7	3	4	1	2	4	2	4	1	35	145.83	64.81
0.9	2	5	2	2	2	4	3	7	2	2	1	2	2	34	141.66	62.96	
1.1	0	0	0	0	4	0	1	4	1	5	6	1	22	91.66	40.74		
1.3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	8.33	3.70		
control	7	3	4	6	3	6	4	3	8	5	4	1	54	225	100		

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *Paramecium* sp. ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่นับ × 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) / จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) × 100

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ *Telotrochidium* sp. ของชุดการทดลองที่ 1 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ <i>Telotrochidium</i> sp. ที่อยู่รอด (เซลล์)												จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*	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			
1.5	31	23	20	7	10	18	12	14	17	13	17	9	191	795.83	60.63
2.0	11	8	8	18	16	15	10	4	9	9	6	10	124	516.66	39.36
2.5	6	3	6	10	7	7	6	5	7	10	6	9	82	341.66	26.03
3.0	5	1	2	1	2	9	3	1	2	4	2	1	33	137.5	10.47
3.5	1	1	0	2	1	1	0	0	0	1	0	0	7	29.16	2.22
4.0	0	0	0	0	0	0	2	5	4	0	0	0	11	45.83	3.49
4.5	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	6	25	1.90
control	31	32	20	21	24	33	21	18	33	23	23	36	315	1312.5	100

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *Telotrochidium* sp. ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่นับ $\times 50$

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) / จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) $\times 100$

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยค้อนภูมิภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ *Telotrochidium* sp. ของชุดการทดลองที่ 2 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยค้อนภูมิภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ <i>Telotrochidium</i> sp. ที่อยู่รอด (เซลล์)												จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*	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			
1.5	16	20	17	17	10	15	28	18	19	28	25	26	239	995.83	96.37
2.0	5	1	21	7	5	4	7	5	3	15	9	12	75	312.50	30.24
2.5	2	2	2	3	4	4	7	8	4	7	5	3	51	212.50	20.56
3.0	3	1	5	4	4	3	2	6	2	5	2	7	44	183.33	17.74
3.5	5	2	3	3	3	4	1	4	2	0	3	7	37	154.16	14.92
4.0	2	0	1	0	2	1	3	2	0	3	6	2	22	91.66	8.87
4.5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8.33	0.81
control	30	22	13	28	21	16	13	11	24	31	25	14	248	1033.33	100

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *Telotrochidium* sp. ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่นับ $\times 50$

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) / จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) $\times 100$

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินต่อเซลล์ *Telotrochidium* sp. ของชุดการทดลองที่ 3 สุ่มนับครั้งละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงิน (mg/l)	จำนวนเซลล์ <i>Telotrochidium</i> sp. ที่อยู่รอด (เซลล์)															จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)*	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					
1.5	10	16	6	19	9	10	13	12	18	18	21	8	160	666.66	61.78		
2.0	5	2	6	8	3	1	4	3	6	5	5	3	51	212.50	19.69		
2.5	7	3	6	2	3	1	1	2	1	2	3	2	33	137.50	12.74		
3.0	2	5	2	1	1	1	3	1	0	1	4	0	21	87.50	8.11		
3.5	2	4	2	1	0	0	2	3	0	1	1	0	16	66.66	6.18		
4.0	0	1	0	0	0	4	1	3	0	0	0	0	7	29.16	2.7		
4.5	0	0	0	0	1	2	1	3	0	0	0	0	7	29.16	2.7		
control	22	36	29	18	26	17	16	17	18	25	16	19	259	1079.16	100		

* จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คำนวณจาก จำนวนเซลล์ *Telotrochidium* sp. ที่อยู่รอดที่นับได้ทั้งหมด / จำนวนครั้งที่นับ × 50

** เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด คำนวณจาก จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) / จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดของชุดควบคุม (control) (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) × 100

ตารางที่ 10 จำนวนข้าวรุ้นและเวลาที่ใช้ในแต่ละข้าวรุ้นของ *Bresslauides* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มฟางข้าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เซลล์ที่*	จำนวนเซลล์เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง	จำนวนข้าวรุ้น (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละข้าวรุ้น (g)
1	10	3.322	7.22
2	10	3.322	7.22
3	6	2.585	9.28
4	15	3.907	6.14
5	7	2.807	8.55
6	10	3.322	7.22
7	6	2.585	9.28
8	7	2.807	8.55
9	8	3.000	8.00
10	6	2.585	9.28
11	26	4.700	5.11
12	14	3.807	6.30
13	14	3.807	6.30
14	14	3.807	6.30
15	14	3.807	6.30
16	15	3.907	6.14
17	12	3.585	6.69
18	14	3.807	6.30
19	7	2.807	8.55
20	10	3.322	7.22
21	14	3.807	6.30
22	15	3.907	6.14
23	9	3.170	7.57
24	6	2.585	9.28
25	16	4.000	6.00
26	14	3.807	6.30
27	13	3.700	6.49
ค่าเฉลี่ย			7.19±0.24

* จำนวนเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 1 เซลล์

0.19 คือ 19 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(19 \times 60) / 100 = 11.40$

0.40 คือ 40 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(40 \times 60) / 100 = 24$

ดังนั้น *Bresslauides* sp. แบ่งตัวแต่ละครั้งใช้เวลาเฉลี่ย เท่ากับ 7 ชั่วโมง 11 นาที 24 วินาที

ตารางที่ 11 จำนวนข้าวรุ้นและเวลาที่ใช้ในแต่ละข้าวรุ้นของ *Bresslauides* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มฟางข้าวที่ผสมสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินความเข้มข้น 0.929 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เซลล์ที่*	จำนวนเซลล์เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง	จำนวนข้าวรุ้น (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละข้าวรุ้น (g)
1	7	2.807	8.55
2	3	1.585	15.14
3	7	2.807	8.55
4	3	1.585	15.14
5	4	2.000	12.00
6	3	1.585	15.14
7	5	2.322	10.34
8	7	2.807	8.55
9	2	1.000	24.00
10	2	1.000	24.00
11	3	1.585	15.14
12	2	1.000	24.00
13	9	3.170	7.57
14	10	3.322	7.22
15	2	1.000	24.00
16	10	3.322	7.22
17	7	2.807	8.55
18	4	2.000	12.00
19	2	1.000	24.00
20	3	1.585	15.14
21	6	2.585	9.28
22	2	1.000	24.00
ค่าเฉลี่ย			14.52±1.39

* จำนวนเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 1 เซลล์

0.52 คือ 52 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(52 \times 60) / 100 = 31.20$

0.20 คือ 20 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(20 \times 60) / 100 = 12$

ดังนั้น *Bresslauides* sp. ในสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้น 0.929 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งตัวแต่ละครั้งใช้เวลาเฉลี่ย เท่ากับ 14 ชั่วโมง 31 นาที 12 วินาที

ตารางที่ 12 จำนวนชั่วคราวและเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วคราวของ *Paramecium* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มฟางข้าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เซลล์ที่*	จำนวนเซลล์เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง	จำนวนชั่วคราว (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วคราว (g)
1	12	3.585	6.69
2	7	2.807	8.55
3	4	2.000	12.00
4	4	2.000	12.00
5	6	2.585	9.28
6	4	2.000	12.00
7	7	2.807	8.55
8	3	1.585	15.14
9	6	2.585	9.28
ค่าเฉลี่ย			10.39±0.86

* จำนวนเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 1 เซลล์

0.39 คือ 39 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(39 \times 60) / 100 = 23.40$

0.40 คือ 40 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(40 \times 60) / 100 = 24$

ดังนั้น *Paramecium* sp. แบ่งตัวแต่ละครั้งใช้เวลาเฉลี่ย เท่ากับ 10 ชั่วโมง 23 นาที 24 วินาที

ตารางที่ 13 จำนวนชั่วรุ่นและเวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่นของ *Paramecium* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มฟางข้าวที่ผสมสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินความเข้มข้น 0.135 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เซลล์ที่*	จำนวนเซลล์เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง	จำนวนชั่วรุ่น (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละชั่วรุ่น (g)
1	3	1.585	15.14
2	3	1.585	15.14
3	2	1.000	24.00
4	3	1.585	15.14
5	2	1.000	24.00
6	2	1.000	24.00
7	2	1.000	24.00
8	2	1.000	24.00
9	2	1.000	24.00
10	4	2.000	12.00
11	2	1.000	24.00
12	3	1.585	15.14
13	2	1.000	24.00
14	4	2.000	12.00
15	2	1.000	24.00
16	3	1.585	15.14
ค่าเฉลี่ย			19.73±1.27

* จำนวนเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 1 เซลล์

0.73 คือ 73 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(73 \times 60) / 100 = 43.80$

0.80 คือ 80 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(80 \times 60) / 100 = 48$

ดังนั้น *Paramecium* sp. ในสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้น 0.135 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งตัวแต่ละครั้งใช้เวลาเฉลี่ย เท่ากับ 19 ชั่วโมง 43 นาที 48 วินาที

ตารางที่ 14 จำนวนซัวร์ุ่นและเวลาที่ใช้ในแต่ละซัวร์ุ่นของ *Telotrochidium* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มฟางข้าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เซลล์ที่*	จำนวนเซลล์เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง	จำนวนซัวร์ุ่น (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละซัวร์ุ่น (g)
1	44	5.459	4.40
2	27	4.755	5.05
3	24	4.585	5.23
4	13	3.700	6.49
5	11	3.459	6.94
6	16	4.000	6.00
7	15	3.907	6.14
8	8	3.000	8.00
9	27	4.755	5.05
10	7	2.807	8.55
11	6	2.585	9.28
12	10	3.322	7.22
13	8	3.000	8.00
14	30	4.907	4.89
15	16	4.000	6.00
16	15	3.907	6.14
17	5	2.322	10.34
18	31	4.954	4.84
19	6	2.585	9.28
20	14	3.807	6.30
21	10	3.322	7.22
22	8	3.000	8.00
23	7	2.807	8.55
24	12	3.585	6.69
ค่าเฉลี่ย			6.86±0.33

* จำนวนเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 1 เซลล์

0.86 คือ 86 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(86 \times 60) / 100 = 51.60$

0.60 คือ 60 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(60 \times 60) / 100 = 36$

ดังนั้น *Telotrochidium* sp. แบ่งตัวแต่ละครั้งใช้เวลาเฉลี่ย เท่ากับ 6 ชั่วโมง 51 นาที 36 วินาที

ตารางที่ 15 จำนวนข้าวรุ้นและเวลาที่ใช้ในแต่ละข้าวรุ้นของ *Telotrochidium* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มฟาง ข้าวที่ผสมสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินความเข้มข้น 0.707 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เซลล์ที่*	จำนวนเซลล์เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง	จำนวนข้าวรุ้น (n)	เวลาที่ใช้ในแต่ละข้าวรุ้น (g)
1	4	2.000	12.00
2	5	2.322	10.34
3	4	2.000	12.00
4	3	1.585	15.14
5	5	2.322	10.34
6	5	2.322	10.34
7	4	2.000	12.00
8	2	1.000	24.00
9	5	2.322	10.34
10	3	1.585	15.14
11	6	2.585	9.28
12	5	2.322	10.34
13	5	2.322	10.34
14	15	3.907	6.14
15	9	3.170	7.57
16	3	1.585	15.14
ค่าเฉลี่ย			11.90±1.02

* จำนวนเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 1 เซลล์

0.90 คือ 90 ใน 100 ถ้าใน 60 ส่วน จะเท่ากับ $(90 \times 60) / 100 = 54$

ดังนั้น *Telotrochidium* sp. ในสารคอลลอยด์อนุภาคนาโนของโลหะเงินที่ความเข้มข้น 0.707 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งตัวแต่ละครั้งใช้เวลาเฉลี่ย เท่ากับ 11 ชั่วโมง 54 นาที

ประวัติคณะผู้วิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายชิตชัย จันทรงตั้งสี
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chitchai Chantangsi
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1002 00170 19 1
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ E-mail
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
โทรศัพท์ 02-218-5378
โทรศัพท์มือถือ 086-733-7080
โทรสาร 02-218-5386
E-mail Chitchai.C@Chula.ac.th, chantangsi01@hotmail.com
- ประวัติการศึกษาต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วท.บ. (ชีววิทยา) ปี 2544
University of Guelph ประเทศแคนาดา M.Sc. (Biology) ปี 2549
University of British Columbia ประเทศแคนาดา Ph.D. (Zoology) ปี 2552
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมหาบัณฑิต) ระบุสาขาวิชาการ
โปรติสต์วิทยา (Protistology), ปรสิตวิทยา (Parasitology)
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ (โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)
 - หัวหน้าโครงการวิจัย :
 - การจำแนกชนิดของโปรติสต์บางชนิดที่พบในเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยวิธีทางชีวโมเลกุล (หัวหน้าโครงการวิจัย)
 - การศึกษาสัณฐานวิทยาและวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลของแอลวีโอเลตที่เป็นปรสิตบางชนิด (หัวหน้าโครงการวิจัย)
 - การตรวจหาสาเหตุและวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคตายด่วนในกุ้งทะเลเลี้ยงของไทย (ผู้ร่วมวิจัย)
 - ความหลากหลายเชิงโมเลกุลของซิลิเอตหน้าดินจากหาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี (หัวหน้าโครงการวิจัย)
 - สัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของปรสิตบางชนิด (ผู้ร่วมวิจัย)
 - การประยุกต์ใช้ความหลากหลายทางชีวภาพของซิลิเอตทะเลหน้าดินจากหาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักในห้องปฏิบัติการ (หัวหน้าโครงการวิจัย)
 - การหาช่วงรหัสดีเอ็นเอที่เหมาะสมในลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการระบุชนิดของซิลิเอตทะเลหน้าดินจากหาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี (หัวหน้าโครงการวิจัย)
 - การประยุกต์ใช้โปรติสต์จากพื้นที่ อพ.สธ. ในการประเมินความเป็นพิษของมลพิษในห้องปฏิบัติการ: กรณีศึกษาของผงซักฟอก (หัวหน้าโครงการวิจัย)

7.2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและทำเสร็จแล้ว :

- (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)
- Chantangsi, C., Lynn, D. H., Rueckert, S., Prokopowicz, A. J., Panha, S., and Leander, B. S. 2013. *Fusiforma themisticola* n. gen., n. sp., a new genus and species of apostome ciliate infecting the hyperiid amphipod *Themisto libellula* in the Canadian Beaufort Sea (Arctic Ocean), and establishment of the Pseudocolliniidae (Ciliophora, Apostomatia). *Protist*. 164: 793–810. [IF2012 = 4.140] [ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (สกว. ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยต้นสังกัด) (2555–2557)]
 - Pudpong, S. and Chantangsi, C. 2015. Effects of four heavy metals on cell morphology and survival rate of the ciliate *Bresslauides* sp. *Tropical Natural History*. 15(2): 117–125. [ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช]
 - Gentekaki, E. and Chantangsi, C. 2017. Low-level genetic diversity of opalinid morphotypes from the digestive tract of *Hoplobatrachus rugulosus* (Batrachia, Amphibia) in Thailand. *Acta Protozoologica*. 56(4): in press. [IF2015 = 1.491] [กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย]
 - สุขชา ฉวยศิริ, มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ชิตชัย จันทน์ตั้งสี. 2556. การเปิดเผยความหลากหลายของซิลิเอตที่ ถูกซ่อนเร้น: กรณีศึกษาซิลิเอตที่อาศัยตามทรายชายฝั่งทะเล พื้นที่หาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย. *การประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 6 “ทรัพยากรไทย: นำสิ่งดี งามสู่ทั่วโลก” 21–23 ธันวาคม พ.ศ. 2556 ณ เชื้อนครินทร์รินทร์ อำเภอบางบาล จังหวัดกาฬสินธุ์*. หน้า 279–287. [ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และ โครงการวิจัยภายใต้ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สมองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (อพ.สธ.-จพ.)]
 - มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา และ ชิตชัย จันทน์ตั้งสี. 2556. ระบบนิเวศแหล่งน้ำจืด. ใน ผุ สตี ปริญญาพันธ์ (บรรณาธิการ), *การวิจัยและพัฒนาทรัพยากรอย่างยั่งยืนสู่เศรษฐกิจพอเพียง*. หน้า 10–32. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท สิริบุตรการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ. [โครงการวิจัยภายใต้โครงการ อพ.สธ.-จพ.]
 - ศุภสิณี ผุดผ่อง และ ชิตชัย จันทน์ตั้งสี. 2558. การใช้ซิลิเอต *Telotrochidium* sp. ที่คัดแยกจากน้ำทิ้ง อุตสาหกรรมในการประเมินความเป็นพิษและการกำจัดโลหะหนักในห้องปฏิบัติการ. *วารสารวิทยาศาสตร์*. 69(4): 83–89. [ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช]
 - ชิตชัย จันทน์ตั้งสี, สถาพร บุตรน้ำเพชร, สุขชา ฉวยศิริ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2559. การศึกษาความ หลากหลายเชิงโมเลกุลของซิลิเอตหน้าดินจากหาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. ใน ผุ สตี ปริญญาพันธ์ (บรรณาธิการ), *อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ “ทรัพยากรจากผืนทรายสู่ใต้ทะเล”*. หน้า 8–10. โครงการอนุรักษ์ พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท สิริ บุตรการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ. [โครงการวิจัยภายใต้โครงการ อพ.สธ.-จพ.]
 - ชิตชัย จันทน์ตั้งสี, สุขชา ฉวยศิริ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2559. การจำแนกโพรติสต์บางชนิดที่พบในเกาะ แสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยวิธีทางชีวโมเลกุล. ใน ผุ สตี ปริญญาพันธ์ (บรรณาธิการ), *อนุรักษ์และใช้ประโยชน์*

“ทรัพย์สินจากผืนทรายสู่ใต้ทะเล”. หน้า 11–14. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท สิริบุตรการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ.

[โครงการวิจัยภายใต้โครงการ อพ.สธ.-จพ.]

- ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และ สุชา เฉยศิริ. 2560. *ซิลิเกต...ชีวิตในผืนทราย*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท สิริบุตรการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ. 104 หน้า. [ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และโครงการวิจัยภายใต้โครงการ อพ.สธ.-จพ.]

7.3. งานวิจัยที่กำลังทำ :

(ชื่อโครงการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย (ผู้บริหารโครงการ หัวหน้าโครงการ และ/หรือผู้ร่วมวิจัย) ระบุเดือน และปีที่เริ่มต้นและสิ้นสุด)

- ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยร่วมกับมหาวิทยาลัยต้นสังกัด) (หัวหน้าโครงการวิจัย) [มิถุนายน 2557–ปัจจุบัน]

เรื่อง “การศึกษาสัณฐานวิทยาและการระบุเชิงโมเลกุลของปรสิตกรีนในกุ้งขาวเลี้ยง *Litopenaeus vannamei*”

- โครงการวิจัย Sci-Super โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชปี 2558 (คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) (หัวหน้าโครงการวิจัย) [กรกฎาคม 2557–ปัจจุบัน]

เรื่อง “การตรวจจำแนกเชิงโมเลกุลหาปรสิตที่พบติดเชื่อในหอยแครง *Tegillarca granosa* (Linnaeus, 1758) จากจังหวัดสมุทรปราการ โดยการวินิจฉัยด้วยเทคนิคพีซีอาร์”