รายงานการวิจัย

ผลของแนฟทาลีนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ DNA และ RNA ของอมีบา (A*moeba proteus*) โดยใช้ Confocal laser scanning microscope

จิราพร ขวัญมุณี [1] และ เริงชัย ตันสกุล[2]

Abstract

Khwanmuni, J. and Tansakul, R.

Effects of Naphthalene on DNA and RNA quantity in *Amoeba proteus* by using confocal laser scanning microscope

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2006, 28(1) : 107-114

Effects of Naphthalene which is a carcinogen on changes of DNA and RNA quantities were studied with acridine orange stained cells under a confocal laser scanning microscope. It was found that DNA and RNA in amoebae nucleus and cytoplasm, reared in 0 (control), 3 and 8.85 mg/l (24h-LD_{50}) at 0 and 12 h. showed a statistically significant difference ($p<0.05$). The more naphthalene concentrations and larger incubation periods had greater effects on DNA and RNA decreases in amoebae nucleus and cytoplasm.

Key words : *Amoeba proteus*, nucleus, Naphthalene

Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร วท.บ. (ชีววิทยา) [2]Ph.D.(Biology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: treungch@yahoo.com

รับต้นฉบับ 1 เมษายน 2548 รับลงพิมพ์ 2 มิถุนายน 2548

บทคัดย่อ

จิราพร ขวัญมุณี และ เริงชัย ตันสกุล

ผลของแนฟทาลีนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ DNA และ RNA ของอมีบา (*Amoeba proteus*)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2549 28(1) : 107-114

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของอมีบา (*Amoeba proteus*) ที่ได้รับสารละลายแนฟทาลีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ความเข้มข้น 0 (การทดลองควบคุม) 3 และ 8.85 มก./ลิตร (24 h - LC_{50}) เป็นเวลา 0 และ 12 ชั่วโมง ย้อมสีด้วย acridine orange ใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์วัดความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม ผลการศึกษาพบว่าอมีบาที่อยู่ในสารละลายแนฟทาลีน ที่ระดับความเข้มข้น 0 (การทดลองควบคุม) 3 และ 8.85 มก./ลิตร (24 h - LC_{50}) เป็นเวลา 0 และ 12 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่ออมีบาได้รับสารละลายแนฟทาลีนที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและที่เวลานานขึ้น จะมีผลทำให้ปริมาณของ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียส และไซโทพลาสซึมลดลงมากขึ้น

แนฟทาลีน (Naphthalene) เป็นสารโพลีไซคลิกอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs) (Pine, 1987) ส่วนใหญ่พบมากในน้ำมันดิน (coal tar) (Morrison and Boyd, 1971) และในส่วนของน้ำมันปิโตรเลียมที่มีจุดเดือดสูง เป็นของแข็งไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว 80ºC จุดเดือด 218ºC ระเหิดได้ที่อุณหภูมิปกติ มีกลิ่นแรง (วิภา, 2530) นิยมใช้ทำลูกเหม็นกันแมลงในตู้เสื้อผ้า น้ำยาดับกลิ่นในห้องน้ำ (Stohs *et al*., 2002) รวมทั้งเป็นสารเคมีที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายอย่างเช่น สีย้อมผ้า (พิมพ์จิต, 2540) ยาฆ่าแมลง พลาสติก และน้ำมันหล่อลื่น (วารุณี, 2535) และสารนี้ยังใช้เป็นสารในห้องปฏิบัติการเคมี (laboratory reagent) (Freeman *et al*., 2003) สารแนฟทาลีนนี้ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำได้หลายทางทั้งจากกระบวนการทางธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า (Kim *et al*., 1999) และกระบวนการที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงที่เป็นสารอินทรีย์พวกถ่านหิน และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งการรั่วไหลของสารปิโตรเลียมและผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียม โดยเฉพาะการรั่วไหลของน้ำมันลงสู่สิ่งแวดล้อม (Jackson *et al*., 1994; Kim *et al*., 1999)

แนฟทาลีนสามารถละลายน้ำได้ดีที่สุดในกลุ่ม PAHs มีความเป็นพิษสูง และเป็นสารที่มีความเสี่ยงสูงต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำและการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ (Pacheco and Santos, 2002) แนฟทาลีนเป็นสารก่อมะเร็งที่กระจายตัวอย่างกว้างขวางในสิ่งแวดล้อม (Valdman *et al*., 2004) ถึงแม้ว่าแนฟทาลีนสามารถสลายได้จากกระบวนการทางธรรมชาติ แต่ยังคงตกค้างในดิน (Kim *et al*., 1999) และน้ำ (van Hattum *et al*., 1998) นอกจากนี้ยังมีการสะสมในพืช (Kipopoulou *et al*., 1999) และสัตว์ (van Hattum *et al*., 1998) รวมทั้งยังสามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหาร (Shore *et al*., 1999) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบนิเวศของแหล่งน้ำทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ (กฤษณ์ และศิริพร, 2545)

จุดประสงค์ของการศึกษาผลของแนฟทาลีนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของอมีบา ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวในน้ำ เพื่อและเป็นความรู้พื้นฐานในการศึกษาผลของสารพิษชนิดอื่นต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ของอมีบา ซึ่งนิยมใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างอมีบา

Amoeba proteus สายพันธุ์ P_{Da} เก็บในห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย

สงขลานครินทร์ ซึ่งได้รับจาก Dr. M.J. Ord มหาวิทยาลัย Southampton ประเทศอังกฤษ เมื่อเดือนเมษายน 2539

เลี้ยงอมีบาในกล่องพลาสติกใส ที่มี Modified Chalkley's medium สูงประมาณ 1 ซม. ที่ปรับให้มี pH ประมาณ 5.9±0.1 (Tansakul, 1977) และเมล็ดข้าวสาลีที่ต้มแล้วจำนวน 2-3 เมล็ด นำเมล็ดข้าวสาลีที่มีอมีบาเกาะอยู่ มาใส่ในกล่องที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 22±1ºC ประมาณ 2-3 สัปดาห์ อมีบาจะแบ่งตัวจำนวนมาก อมีบาที่ใช้ในการศึกษามีอายุ 4 ชั่วโมง โดยดูดอมีบาระยะ division sphere จากกล่องพลาสติกที่เลี้ยงไว้ คอยจนมีการแบ่งเซลล์ครบ 4 ชั่วโมง จึงนำเซลล์มาใช้ในการศึกษา

2. ศึกษาผลของแนฟทาลีนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ DNA และ RNA ในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของอมีบา

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม โดยได้รับสารละลายแนฟทาลีนที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0 (การทดลองควบคุม), 3 และ 8.85 มก./ลิตร (24h - LC_{50}) (เตือนตา, 2547) ใช้อมีบากลุ่มละ 3 ตัว (3 ซ้ำ) อยู่ในสารละลายเป็นเวลา 0 และ 12 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำอมีบามาย้อมด้วยสี acridine orange แล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) (OLYMPUS Model BH2-RFL) (เริงชัย, 2527)

วัดความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ DNA และ RNA ในนิวเคลียส และไซโทพลาสซึมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลเลเซอร์ สแกนนิ่ง (OLYMPUS Model FV300) ของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ บันทึกภาพและบันทึกผลความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม (เตือนตา, 2547) วิเคราะห์ผลการศึกษา โดยเปรียบเทียบความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ DNA และ RNA ในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (อภิญญา, 2531)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของแนฟทาลีนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ DNA และ RNA ของอมีบา

จากการศึกษาผลของแนฟทาลีนต่อการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของอมีบา โดยดูการเปลี่ยนแปลงความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมพบว่า

สารละลายแนฟทาลีนมีผลทำให้ปริมาณของ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของอมีบาลดลง (Figures 2-5) เนื่องจากว่าโมเลกุลของแนฟทาลีนเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic organic compound) (วิโรจน์ และสมนึก, 2542) ทำให้สามารถละลายและซึมผ่านชั้นไขมันเข้าสู่เซลล์หรือสามารถสะสมอยู่ภายในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Sikkema *et al*., 1994)

ปริมาณของ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม (Figure 1) ของอมีบาลดลงมากขึ้นเมื่อได้รับสารละลายแนฟทาลีนที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น (Figures 2-5) ซึ่งได้ผลเหมือนกับการศึกษาของ Ord (1976) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์ DNA ในระยะ S phase เมื่อได้รับ *N*-methyl-*N*-nitrosourethane โดยใช้ *Amoeba proteus* เป็นตัวแทนของสัตว์เซลล์เดียว ศึกษาในระดับ sublethal dose ซึ่งมีผลทำให้การแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตผิดปกติ *N*-methyl-*N*-nitrosourethane ยังมีผลทำให้เกิด mutation และทำให้จำนวนของ [^{3}H] thymidine ลดลงประมาณ 20-30% และมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ในระยะ S phase ถึง 90% ทำให้ thymidine ลดลงในระยะ S phase นอกจากนี้ยังมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงไซโทพลาสซึมหรือเยื่อหุ้มเซลล์ และ *N*-methyl-*N*-nitrosourethane จะมีผลมากต่อการทำลายเยื่อหุ้มนิวเคลียส เมื่อได้รับ *N*-methyl-*N*-nitrosourethane ในความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะมีผลทำให้การสังเคราะห์ DNA ลดลง

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในเซลล์อมีบาที่มีอายุประมาณ 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเซลล์ที่ยังมีอายุน้อยเมื่อได้รับ

แนฟทาลีนจึงมีความไวต่อความเป็นพิษของแนฟทาลีนมาก ทำให้การสังเคราะห์ของ DNA และ RNA ลดลง ซึ่งได้ผลเหมือนกับการศึกษาของ Ord (1974) ซึ่งได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ DNA และ RNA ในนิวเคลียสของอมีบา เมื่อได้รับ *N*-methyl-*N*-nitrosourethane พบว่า *N*-methyl-*N*-nitrosourethane จะมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ และเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ซึ่งเซลล์จะมีความไวต่อ *N*-methyl-*N*-nitrosourethane โดยจะมีผลต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ที่มีอายุน้อย และเซลล์ที่มีอายุมากจะมีความไวต่อ *N*-methyl-*N*-nitrosourethane มากเมื่ออยู่ในระยะที่กำลังมีการแบ่งเซลล์และระหว่างการสังเคราะห์ DNA และ RNA

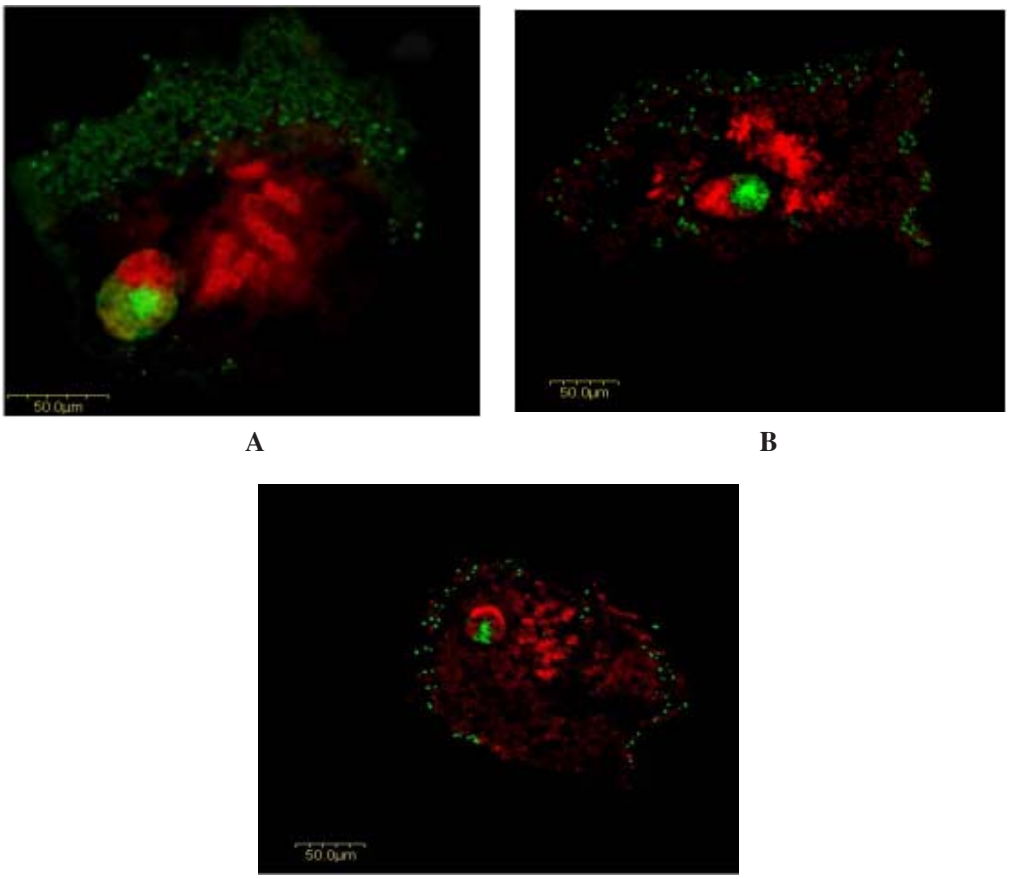
Andresen (1973) รายงานว่าเมื่อได้รับ dimidine bromide ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้ตาย จะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ซึ่งทำให้การสังเคราะห์ DNA และ RNA ลดลง (Figure 1) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ron และ Prescott (1969) ได้พบว่า actinomycin C มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ในช่วงการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ทำให้การสืบพันธุ์ของอมีบาหยุดลงชั่วคราว

การศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของแนฟทาลีน 3 มก./ลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุด พบว่ามีผลทำให้ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมลดลง และเมื่ออมีบาได้รับสารละลายแนฟทาลีนที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น คือที่ความเข้มข้น 8.85 มก./ลิตร (24 h - LC_{50}) (เตือนตา, 2547) ก็จะมีผลทำให้ RNA ทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมลดลงมากขึ้น (Figure 3 and 5) ซึ่งได้ผลเหมือนกับการศึกษาของ Andresen (1973) พบว่า actinomycin D มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม ถึงแม้ว่าจะได้รับในระดับความเข้มข้นที่ต่ำมาก โดยจะทำให้การสังเคราะห์ของ RNA ลดลง และยังมีผลยับยั้ง ribonucleoside ใน RNA ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นของ actinomycin D 500 ไมโครกรัม/มล. จะมีผลยับยั้ง ribonucleoside ถึง 90% และมีผลทำลายเซลล์เมื่อได้รับ actinomycin D เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือน้อยกว่า 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mills และ Bell (1982) พบว่าเมื่อได้รับ actinomycin D จะทำให้มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ RNA แต่ไม่มีผลต่อการทำลายขอบเขตการเคลื่อนย้ายโปรตีน ซึ่ง actinomycin D จะรวมกับ DNA และยับยั้งการเคลื่อนที่ของ RNA polymerase ทำให้เกิดการสังเคราะห์ RNA ไม่ได้

ความเป็นพิษของแนฟทาลีนต่อเซลล์ของอมีบา

การศึกษาของเตือนตา (2547) พบว่า แนฟทาลีนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มไลโซโซมของอมีบา โดยทำให้ความเสถียรของเยื่อหุ้มไลโซโซมลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ord (1968) พบว่า *N*-methyl-*N*-nitrosourethane มีผลทำให้อมีบาตาย ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับ เมื่ออมีบาได้รับ *N*-methyl-*N*-nitrosourethane จะมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความยืดหยุ่นและสูญเสียความสามารถในการซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทำให้การซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์เกิดขึ้นได้ช้ากว่าปกติ

โดยทั่วไปแล้วสารเคมีก่อมะเร็ง (carcinogen) เมื่อเข้าสู่ร่างกาย หากไม่มีการทำลายสารเคมีนั้นหรือการขับออกไปในเวลาที่สมควร สารเคมีก่อมะเร็งจะสะสมไว้ในเซลล์และรวมตัวทางเคมีกับ DNA หรือโปรตีนได้สารเชิงซ้อนที่เรียกว่า DNA-carcinogen adduct หรือ protein-carcinogen adduct ตามลำดับ (ไมตรี, 2543) การจับกันนี้ทำให้ DNA polymerase อ่านลำดับนิวคลิโอไทด์ผิดพลาด และ DNA-carcinogen adduct ขนาดใหญ่อาจบดบังทำให้เบสไม่ถูกอ่าน DNA polymerase อาจเติมตำแหน่งที่อ่านไม่ได้นี้ด้วยเบสชนิดอื่น (ดนัย และอังสนา, 2540) การรวมตัวระหว่างสารเคมีกับชีวโมเลกุลนั้นจะรบกวนการทำงานทางชีวภาพ โดยเฉพาะทางพันธุกรรมมีสารเคมีและสารก่อมะเร็งหลายชนิดเมื่อผ่านเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีในเมตาบอลิสม์แล้ว ปรากฏว่าในปฏิกิริยาขั้นตอนแรกแทนที่สารเคมีเหล่านั้นจะกลายเป็นสารประกอบที่เป็นพิษน้อยลง แต่กลับได้สารใหม่ที่มีฤทธิ์ในการก่อมะเร็งได้มากขึ้น ปฏิกิริยาเช่นนี้เกิดขึ้นได้บ่อยมากกับสารก่อมะเร็งหลายชนิด เช่น PAHs กระบวนการกระตุ้นเซลล์ทางเมทาบอลิสม์นี้เรียกว่า metabolic activation ซึ่งมีความสำคัญมากในการอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีก่อมะเร็ง และบอกความแตกต่างหรือความยากง่ายในการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ ในธรรมชาติถือว่าโรคมะเร็งเป็นพยาธิสภาพหนึ่งที่ร่างกายแสดงปฏิกิริยาโต้ตอบโดยการพยายามกำจัดสารพิษหรือสารก่อมะเร็งไปเก็บไว้ที่เนื้อเยื่อใดเนื้อเยื่อหนึ่งในร่างกาย



A B C

Figure 1. Photomicrographs under confocal laser scanning microscope of *Amoeba proteus* stained with acridine orange, showed the presence of DNA fluoresces (green) and RNA fluoresces (red) treated with several naphthalene concentrations for 12 hours. A: 0 mg/l (control) B: 3 mg/l C: 8.85 mg/l (24 h - LC_{50})

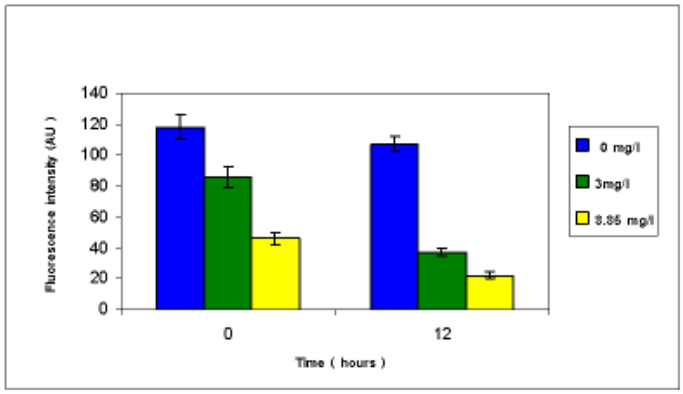


Figure 2. Fluorescence intensity of nucleus DNA in *Amoeba proteus* treated with naphthalene 0 mg/l (control), 3 mg/l and 8.85mg/l (24h - LC_{50}) for 0 and 12 hours (n=3).

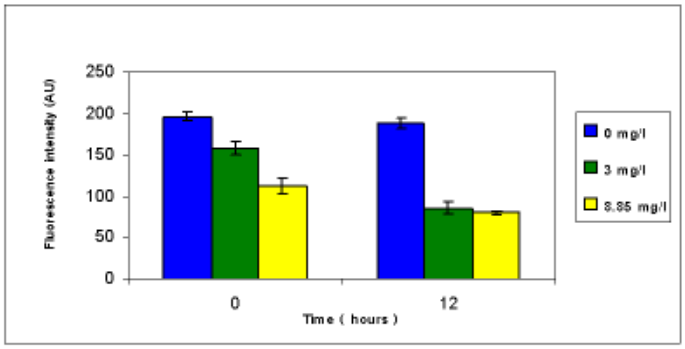


Figure 3. Fluorescence intensity of nucleus RNA in *Amoeba proteus* treated with naphthalene 0 mg/l (control), 3 mg/l and 8.85 mg/l (24h - LC_{50}) for 0 and 12 hours (n=3).

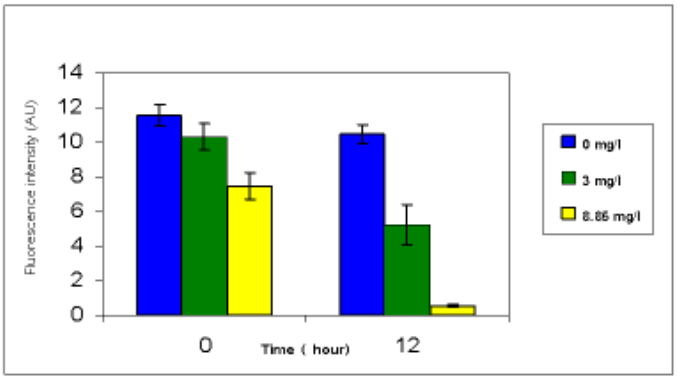


Figure 4. Fluorescence intensity of cytoplasmic DNA in *Amoeba proteus* treated with naphthalene 0 mg/l (control), 3 mg/l and 8.85 mg/l (24h - LC_{50}) for 0 and 12 hours.

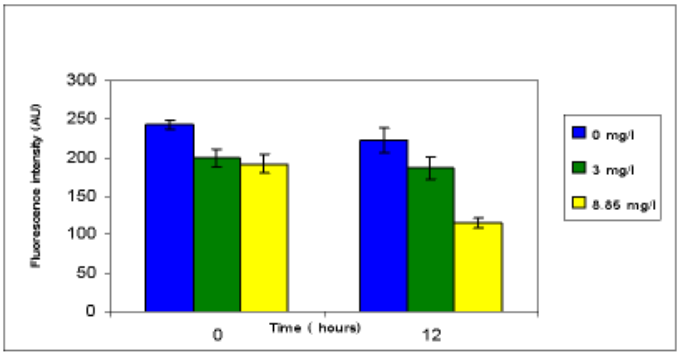


Figure 5. Fluorescence intensity of cytoplasmic RNA in *Amoeba proteus* treated with naphthalene 0 mg/l (control), 3 mg/l and 8.85 mg/l (24h - LC_{50}) for 0 and 12 hours.

ทำให้เซลล์ในเนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหรือมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น เซลล์ที่เปลี่ยนไปนี้แบ่งตัวไปเรื่อยๆ อย่างรวดเร็ว กลายเป็นก้อนเนื้องอกขึ้นมาและนำไปสู่การก่อโรคมะเร็งขึ้น (ไมตรี, 2543)

โดยปกติเยื่อหุ้มนิวเคลียสจะทำหน้าที่ป้องกันโครงสร้างของ DNA เมื่อเยื่อหุ้มนิวเคลียสถูกทำลาย สารพิษ

จึงเข้าสู่นิวเคลียสได้ จะทำให้สามารถเข้าไปจับกับ DNA และ RNA ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ผิดปกติ และยังมีผลต่อการทำลาย DNA และ RNA จึงมีผลทำให้การสังเคราะห์ DNA และ RNA ลดลง (ดนัย และ อังสนา, 2540)

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงของ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม เมื่ออมีบาได้รับสารละลายแนฟทาลีน ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณของ DNA และ RNA ภายในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมลดลง เมื่อได้รับสารละลายแนฟทาลีนที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และที่เวลานานขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ขึ้น และเนื่องจากแนฟทาลีนเป็นสารในกลุ่มสารก่อมะเร็ง เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารนี้จึงมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม นำไปสู่การกลายพันธุ์และส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ได้สำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณ รศ.ลัดดา เอกสมทรา-เมษฐ์ และนายพรพจน์ หนูทอง ที่ให้คำแนะนำในการศึกษาที่มีประโยชน์ยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ เฑียรฆประสิทธิ์ และ ศิริพร พงษ์สันติสุข. 2545. การกำจัดคราบน้ำมันโดยใช้วัสดุธรรมชาติเป็นตัวดูดซับ. ภาควิชาวิศวกรรมสุขาภิบาล คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

เชาว์ ชิโนรักษ์ และ พรรณี ชิโนรักษ์. 2541. ชีววิทยา 2. สำนักพิมพ์ศิลปาบรรณาคาร. กรุงเทพฯ .

ดนัย บุณยเกียรติ และ อังสนา อัครพิศาล. 2540. ชีวโมเลกุลของเซลล์. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เตือนตา ร่าหม่าน. 2547. ผลของแนฟทาลีนต่อไลโซโซมในอมีบา (*Amoeba proteus*), วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บพิธ จารุพันธุ์. 2546. โพรโทซัววิทยา. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

บพิธ จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์. 2539. โพรโทซัวในแหล่งน้ำจืด. ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ บางเขน. กรุงเทพฯ.

พิมพ์จิต ดามพวรรณ. 2540. เอกสารคำสอนเคมีอินทรีย์ 2. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์.

ไมตรี สุทธจิตต์. 2543. สารเคมีก่อมะเร็ง. โรงพิมพ์ดาวคอมพิวกราฟฟิก. เชียงใหม่.

เริงชัย ตันสกุล. 2527. ปฏิบัติการเซลล์วิทยาขั้นสูง. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เริงชัย ตันสกุล. 2527. เอกสารคำสอนวิชาเซลล์วิทยาขั้นสูง. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์.

วารุณี ยงสกุลโรจน์. 2535. เคมีอินทรีย์ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ.

วิภา พลันสังเกตุ. 2530. เคมีอินทร์ทรีย์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วิโรจน์ บุญอำนวยวิทยา และ สมนึก จารุดิลกกุล. 2547. การศึกษาผลของการเติมโอโซนในการย่อยสลายทางเคมีและชีวภาพของไพรีน. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์. 2545. เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิญญา วงศ์กิดาการ. 2531. สถิติสำหรับชีววิทยา. ภาควิชาคณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

Andresen, N. 1973. General morphology. **In** Joen,K.W. (ed.). The Biology of Amoeba. New York. Academic Press. pp. 467-566.

Freeman, W.A., Oxtoby, W. and Block, T.F. 2003. Chemistry: Science of change. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole; Thomson. USA.

Jackson, T.J., Wade, T.L., McDonald, T.J., Wilkinson, D.L. and Brooks, J.M. 1994. Polynuclear aromatic hydrocarbon contaminates in oyster from the Gulf of Mexico (1986-1990). Env. Poll., 83: 291-298.

Kim, G.B., Maruya, K.A., Lee, R.F, Lee, J., Koh, C. and Tanabe, S. 1999. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbon in sediment from Kyeonggi Bay, Korea. Mar. Poll. Bull., 38(1): 7-15.

Kipopoulou, A.M., Manoli, E. and Samara, C. 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. Env. Poll., 106: 369-380.

Mayers, P. and Couillard, P. 1991. Direct membrane effects of morphin and endophins on *Amoeba proteus*. Life Sciences., 50: 137-145.

Mills, K.I. and Bell, L.G.E. 1982. The relation to the cell cycle and RNA migration, as studied by autoradiography. Exp. Cell Res., 142(1): 207-213.

Morrison, R.T. and Boy, R.N. 1971. Organic chemistry, 2nd ed., New Delhi: Prentice-Hall of India.

Ord, M.J. 1968. Immediate and delayed effects of *N*-methly-*N*-nitrosourethane on *Amoeba proteus*. Exp. Cell Res., 53(1): 73-84.

Ord, M.J. 1974. A relationship between nuclear DNA and RNA synthesis activities and the changes produced by *N*-methly-*N*-nitrosourethane: A study using *Amoeba proteus* as a single cell model. Chem. Biol. Interact., 8(4): 269-283.

Ord, M.J. 1976. A study of the change in DNA synthesis of S phaes cells treated with *N*-methyl-*N*-nitrosourethane: A study using *Amoeba proteus* as a single cell model. Chem. Biol. Interact., 12(3-4): 325-340.

Pacheco, M. and Santos, M.A. 2002. Naphthalene and β- naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. Env. Int.., 28 (4): 285-593.

Pechenik, J.A. 2000. Biology of the invertebrates, 4th ed., McGraw - Hill Companies Inc., New York.

Pine, S.H. 1987. Organic chemistry, 5th ed., Mc Graw-Hill Companies Inc., New York.

Ron, A. and Prescott, D.M. 1969. The timing of DNA synthesis in *Amoeba proteus*. Exp. Cell Res., 56 (2): 430-434.

Shore, R.F., Wright, J., Horne, J.A. and Sparks, T.H. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues in the eggs of coastal-nesting brids from Britain. Mar. Poll. Bull., 38(6): 509-513.

Sikkema, J., deBont, J.A. and Poolman, B. 1994. Injections of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J. Biol. Chem., 269(11): 8022-8028.

Stohs, S., Ohia, S. and Bagchi, D. 2002. Naphthalene toxicity and antioxidant nutrients. Tox., 180(1): 97-105.

Tansakul, R. 1977. The Golgi apparatus and membrane system in *Amoeba proteus*. Ph.D. Thesis, Southampton University, UK.

Timberlake, K.C. 2003. Chemistry: an introduction to general, organic and biological chemistry, 8th ed., San Francisco: Benjamin Cummings.

Valdman, E., Battagglini, F., Leite, S.G.F. and Valdman, B. 2004. Naphthalene detection by bioluminescence censor applied to waste water samples. Sensors and Actuators B., 103(1): 7-12.

van Hattum, B., Pons, M.J.C. and Montanes, J.F.C. 1998. polycyclic aromatic hydrocarbon in freshwater isopods and field-partitioning between abiotic phases. Arch. Env. Cont. Tox., 35: 257-267.