



ความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอทต่อเซลล์เยื่อบุผิว
ลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29



โดย
นายภูริทัต แซ่ตัน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2

ภาควิชาชีววิทยา

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

ความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอทต่อเซลล์
เยื่อชีวเคมีในมนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2

ภาควิชาชีววิทยา

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

CYTOTOXICITY OF MICROPLASTICS AND MERCURY-ADSORBED
MICROPLASTICS ON HT-29 MUCOUS-SECRETING HUMAN INTESTINAL
EPITHELIAL CELLS.



By
Mr. Puretat SAETAN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science BIOLOGY
Department of BIOLOGY
Academic Year 2025
Copyright of Silpakorn University

650720090 : ชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2

คำสำคัญ : ไมโครพลาสติก, พอลิไสตรีน, พอลิบิวทิลีน ซัคซิเนต, พอลิแลคติกแอซิด, สารปรอท, เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้

นาย ภูริทัต แซ่ตัน: ความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอทต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. อติศรี เจริญพานิช

ไมโครพลาสติกเป็นสิ่งปนเปื้อนที่พบสะสมอย่างแพร่หลายในสิ่งแวดล้อมและอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ รวมทั้งอาจสามารถเป็นตัวพาสารพิษที่สะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิไสตรีน (PS) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (PBS) และพอลิแลคติกแอซิด (PLA) รวมถึงไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท ต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือกสายพันธุ์ HT-29 ไมโครพลาสติกที่ถูกใช้ในการศึกษานี้ถูกเตรียมให้มีขนาด 400, 200 และ 140 mesh (น้อยกว่า 30, 30-70 และ 70-100 ไมโครเมตร ตามลำดับ) และทดสอบที่ความเข้มข้น 10-800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยประเมินอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค resazurin based assay และตรวจสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมจากการเกิดการควบแน่นของโครมาตินด้วยการย้อมสี DAPI รวมทั้งศึกษาความสามารถในการดูดซับและปลดปล่อยไอออนปรอทของไมโครพลาสติกภายหลังการแช่ในสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (0.2 μM) เป็นเวลา 7 วัน โดยตรวจสอบด้วยการย้อมสีเซนเซอร์ NF09 และวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุด้วยเทคนิค SEM-EDX พร้อมทั้งประเมินความเป็นพิษของไมโครพลาสติกที่ดูดซับปรอทต่อเซลล์เป็นระยะเวลา 3, 7 และ 14 วัน ผลการศึกษาพบว่า ไมโครพลาสติกทั้งสามชนิดสามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการทดสอบ โดยไมโครพลาสติกชนิดพอลิไสตรีนขนาด 140 mesh ที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่งผลให้ความเป็นพิษต่อเซลล์สูงที่สุดเมื่อทดสอบระยะยาว 28 วัน โดยส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 62% รวมทั้งก่อให้เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ PBS และ PLA ที่ขนาด 140 mesh ที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่ำกว่า เมื่อทำการทดสอบเป็นระยะเวลา โดยส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 70% และ 65% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไมโครพลาสติกทุกชนิดสามารถดูดซับไอออนปรอทได้ โดย PBS แสดงแนวโน้มการดูดซับและปลดปล่อยปรอทได้มากที่สุด เมื่อเซลล์ได้รับไมโครพลาสติกที่ดูดซับปรอท พบการลดลงของอัตราการรอดชีวิตและการเพิ่มขึ้นของการควบแน่นของโครมาติน สะท้อนถึงความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไมโครพลาสติกที่ไม่ผ่านการแช่ปรอท ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า ไมโครพลาสติกไม่เพียงก่อให้เกิดความเป็นพิษโดยตรงต่อเซลล์

เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ แต่ยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวพาโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ เพิ่มความรุนแรงของผลกระทบทางชีวภาพ ดังนั้น การประเมินความเสี่ยงของไมโครพลาสติกควรพิจารณาทั้งความเป็นพิษของพอลิเมอร์และศักยภาพในการเป็นพาหะของสารปนเปื้อนควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดแนวทางจัดการปัญหาสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาวัสดุที่ปลอดภัยยิ่งขึ้นในอนาคต



650720090 : Major BIOLOGY

Keyword : Microplastics, polystyrene, Polylactic acid, Polybutylene succinate, Mercury, Intestinal epithelial cells

Mr. Puretat SAETAN : Cytotoxicity of microplastics and mercury-adsorbed microplastics on HT-29 mucous-secreting human intestinal epithelial cells. Thesis advisor : Associate Professor Adisri Charoenpanich, Ph.D.

Microplastics are widespread environmental contaminants that may pose risks to human health and can act as carriers of toxic substances accumulated in the environment into the human body. This study aimed to evaluate the cytotoxicity of polystyrene (PS), polybutylene succinate (PBS), and polylactic acid (PLA) microplastics, as well as mercury ion-adsorbed microplastics, on mucus-secreting human intestinal epithelial HT-29 cells. The microplastics used in this study were prepared in sizes of 400, 200, and 140 mesh (corresponding to <math><30</math>, $30-70$, and $70-100\ \mu\text{m}$, respectively) and tested at concentrations ranging from $10-800\ \mu\text{g/mL}$ for 7, 14, 21, and 28 days. Cell viability was assessed using a resazurin-based assay, and genotoxicity was evaluated by detecting chromatin condensation through DAPI staining. The adsorption and release capacity of mercury ions were investigated after incubating the microplastics in mercuric chloride solution ($0.2\ \mu\text{M}$) for 7 days. Mercury uptake was detected using the NF09 fluorescent sensor, and elemental composition was analyzed by SEM-EDX. The cytotoxic effects of mercury-adsorbed microplastics were further evaluated after 3, 7, and 14 days of exposure. The results demonstrated that all three types of microplastics reduced cell viability in a concentration- and time-dependent manner. PS microplastics (140 mesh) at $800\ \mu\text{g/mL}$ exhibited the highest cytotoxicity after 28 days of exposure, reducing cell viability to 62% and inducing significant genotoxic effects. In contrast, PBS and PLA at the same size and concentration showed lower toxicity, with cell viabilities of 70% and 65%, respectively. Nevertheless, all microplastics were capable of adsorbing mercury ions, with PBS showing the highest adsorption and release capacity. Exposure to mercury-adsorbed microplastics led to decreased cell viability and increased chromatin condensation compared to non-adsorbed microplastics, indicating enhanced genotoxicity. These findings suggest that microplastics not only exert direct cytotoxic

effects on human intestinal epithelial cells but also act as carriers of heavy metals, thereby amplifying adverse biological effects. Therefore, risk assessment of microplastics should consider both the intrinsic toxicity of the polymers and their potential role as vectors of environmental contaminants to support the development of safer materials and environmental management strategies.



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อดิสรีย์ เจริญพานิช ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสั่งสอนให้ความรู้ ให้กำลังใจ แนะนำการเรียนรู้อะไรและการทำวิจัยอย่างเอาใจใส่เสมอมา รวมถึงให้แง่คิดในการดำเนินชีวิต และการเป็นแบบอย่างที่ดี ทำให้ข้าพเจ้าได้เรียนรู้ทั้งด้านวิชาการ การทำงาน วิจัย และการดำเนินชีวิต ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศุภกิจ สุทธิเรืองวงศ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ไมโครพลาสติกสำหรับใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชชีวะ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซนเซอร์ตรวจวัดปรอท เพื่อใช้ในการตรวจวัดไอออนปรอท และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณฎิภา เสี่ยงสาย ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการในการสอบพิจารณาหัวข้อวิทยานิพนธ์และการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศรัณยพร มากทรัพย์กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. วิทยา พิมพ์ทอง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังให้แง่คิดและข้อแนะนำในประเด็นที่น่าสนใจในการทำงานวิจัย ในอนาคต และข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิภาห์ ตุ่มน้อย และอาจารย์ ดร.พรวิภา พวงบุบผา สำหรับความกรุณาช่วยเหลือ และการให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและภาควิชาชีววิทยา ที่คอยให้การสนับสนุน ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณนางสาวนงนุช กำลิ่งแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ บุคลากรฝ่ายสนับสนุนของภาควิชาชีววิทยา ผู้มีส่วนช่วยเหลือในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัตว์ได้แก่ นางสาวฐิติพร หลักฐาน, นายพัศวีร์ ศรีบุญเอียด, และสมาชิกในห้องปฏิบัติการคนอื่น ๆ ที่คอยช่วยเหลือซึ่งกันและกันในการทำงานวิจัย ทำให้ห้องปฏิบัติการของเราเต็มไปด้วยบรรยากาศของความรักใคร่กลมเกลียวกัน สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนและคอยเป็นกำลังใจในการเรียนและการทำสิ่งที่รักเสมอมา

ภูริทัต แซ่ตัน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	15
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	15
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	17
ขอบเขตของงานวิจัย.....	17
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	18
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
ประเภทของพลาสติกและไมโครพลาสติก.....	19
การปนเปื้อนของไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต.....	23
การปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมและไมโครพลาสติก.....	26
การวิเคราะห์โลหะหนักในไมโครพลาสติก.....	29
การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาความเป็นพิษของไมโครพลาสติก.....	30
การตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis).....	32
การศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมภายในเซลล์.....	35
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	36
เซลล์เพาะเลี้ยง.....	36

วัสดุและอุปกรณ์.....	36
สารเคมี.....	37
ภาพรวมการศึกษา.....	39
39	
การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture).....	40
การเตรียมไมโครพลาสติกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไมโครพลาสติก (particle shape) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM).....	40
ความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและ.....	41
พอลิแลคติกแอซิดต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29.....	41
การเตรียมไมโครพลาสติกเพื่อทดสอบกับเซลล์.....	41
การตรวจวัดการดูดซับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ของไมโครพลาสติก.....	41
การตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin based assay.....	42
การตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอท.....	43
ความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและ พอลิแลคติกแอซิดต่อสารพันธุกรรมของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29.....	44
การศึกษาความผิดปกติของสารพันธุกรรมโดยการย้อมสี DAPI.....	44
ตรวจสอบการปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิด หลังเมือก HT-29.....	45
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	45
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	46
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไมโครพลาสติก (particle shape) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM).....	46
ความเป็นพิษของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ด้วยวิธี Resazurin based assay.....	47

ผลการศึกษาความเป็นพิษของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และ พอลิแลคติกแอซิดต่อสารพันธุกรรมของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29	49
ผลการศึกษาการดูดซับสารปรอทของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และ พอลิแลคติกแอซิดด้วยเทคนิค SEM-EDX และการย้อมสีด้วยเซนเซอร์ตรวจวัดปรอท (NF09)	50
ผลการตรวจสอบการปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29.....	52
ผลความเป็นพิษของไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอทต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ด้วยวิธี resazurin based assay	53
ผลการศึกษารูปแบบการตายของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อได้รับ ไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอท.....	55
ผลการศึกษาความเป็นพิษของไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทต่อสารพันธุกรรมของเซลล์ เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29	56
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการศึกษา	58
ภาคผนวก.....	64
การเตรียมสารเคมี.....	64
การเตรียมไมโครพลาสติก.....	66
การเตรียมสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (HgCl ₂).....	67
การเตรียมสารละลาย H ₂ O ₂	67
การเตรียม Resazurin solution.....	68
การเตรียม DAPI solution.....	68
การเตรียมสารละลาย NF09.....	69
รายการอ้างอิง	70
ประวัติผู้เขียน	82

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 โครงสร้างและการใช้ประโยชน์ของพลาสติก.....	22
ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์และผลกระทบของโลหะหนัก.....	28



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างแบบกิ่งของพลาสติกประเภทเทอร์โมพลาสติก และเทอร์โมเซตติง	19
ภาพที่ 2 การย่อยสลายของพลาสติกขนาดใหญ่จากกระบวนการทางกายภาพ ทางเคมีและชีวภาพ	23
ภาพที่ 3 การสะสมไมโครพลาสติกที่มีขนาดแตกต่างกันในแพลงก์ตอนสัตว์	25
ภาพที่ 4 การถ่ายทอดพลังงานเมื่อเซนเซอร์ตรวจพบแคดเมียมไอออนและเกิดการเรืองแสง.....	30
ภาพที่ 5 หลักการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin based assay	31
ภาพที่ 6 การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสผ่าน extrinsic pathway และ intrinsic pathway..	33
ภาพที่ 7 การย้อมสี Annexin V FITC / PI staining in HepG2 cells เพื่อตรวจสอบการตายของ เซลล์ (Zhao et al., 2014).....	34
ภาพที่ 8 การเกิด micronuclei ภายในเซลล์จากการย้อมสี DAPI.....	35
ภาพที่ 9 การถ่ายทอดพลังงานเมื่อ NF09 ตรวจพบ Hg^{2+} (Petdum et al., 2020).....	42
ภาพที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และ พอลิแลคติกแอซิด (A) การกระจายตัว ของขนาดไมโครพลาสติกทั้ง 3 ชนิด (size distribution) และลักษณะพื้นผิวของไมโครพลาสติกขนาด 400 mesh (B) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ ($n \geq 100$).....	47
ภาพที่ 11 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ที่ทดสอบด้วย ไมโคร พลาสติกชนิดพอลิสไตรีน (A) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (B) และพอลิแลคติกแอซิด (C) ขนาด 400 mesh, 200 mesh, และ 140 mesh ที่ความเข้มข้น 0-800 $\mu g/mL$ และ กราฟเปรียบเทียบอัตรา การรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบกับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิ แลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh เป็นระยะเวลา 14, 21, และ 28 วัน (D) โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ($n=3$) *P-value < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) CGM; complete growth medium.....	48
ภาพที่ 12 การหดตัวของโครมาติน (condensed chromatin) ในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิด หลังเมือก HT-29 เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต ขนาด 400 mesh 200 mesh และ 140 mesh เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยการย้อมสี DNA ด้วยสี DAPI	50

- ภาพที่ 13 ผลการตรวจวัดการสะสมปรอทของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh ที่แช่ในสารละลายปรอทเข้มข้น 10 mM เป็นระยะเวลา 7 วัน ด้วยเทคนิค SEM-EDX; วงกลมสีเหลืองแสดงถึงบริเวณที่วิเคราะห์ธาตุ..... 50
- ภาพที่ 14 การดูดซับสารปรอทของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh ที่แช่ในสารละลายปรอทความเข้มข้น 0.2 μ M เป็นระยะเวลา 5 นาที 4 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 3 วัน และ 7 วัน ด้วยการสีไอออนปรอทภายในเซลล์ด้วย NF09 sensor (สีส้ม) 51
- ภาพที่ 15 การปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh ที่ผ่านการแช่ในสารละลายปรอทเข้มข้น 0.2 μ M 7 วันก่อนทดสอบกับเซลล์เป็นระยะเวลา 3, 7, และ 14 วัน โดยการย้อมสีไอออนปรอทภายในเซลล์ด้วย NF09 sensor (สีส้ม) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ CGM (complete growth medium) และกลุ่มควบคุมเชิงบวก $HgCl_2$ 0.2 μ M 52
- ภาพที่ 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh และไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท เมื่อทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน (A) อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด และไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท (B) โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3) *P-value <0.05 เทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท 54
- ภาพที่ 17 รูปแบบการตายของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อทดสอบด้วย ไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด และไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอท 7 วันก่อนทดสอบกับเซลล์เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย annexin V/PI โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (CGM; Complete growth medium, Negative control), และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (DOX; Doxorubicin, Positive control) 56
- ภาพที่ 18 การเกิดการขดตัวแน่นของโครมาตินในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกเป็นระยะเวลา 14 วัน (A), กราฟสัดส่วนระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่เกิดการขดตัวแน่นของโครมาตินเมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอทเป็นระยะเวลา 3, 7, และ 14 วัน โดยการย้อมสี DNA ด้วย DAPI..... 57

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาการจัดการขยะพลาสติกที่ขาดประสิทธิภาพส่งผลให้เกิดการสะสมของขยะพลาสติกในสิ่งแวดล้อม และเกิดการแตกหักกลายเป็น "ไมโครพลาสติก" ปัจจุบันมีการตรวจพบไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิต แสดงถึงการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกในห่วงโซ่อาหาร อีกทั้งยังมีรายงานการตรวจพบโลหะหนักในไมโครพลาสติกจากการเก็บตัวอย่างในธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) ระหว่างไมโครพลาสติกและโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Bowman et al., 2020) ซึ่งเกิดจากปัญหาการจัดการสารเคมี และน้ำเสียที่ขาดประสิทธิภาพ จึงอาจส่งผลให้ไมโครพลาสติกมีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้นจากการดูดซับโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมนุษย์อาจได้รับโลหะหนักในไมโครพลาสติกด้วยเช่นกัน (Crawford & Quinn, 2017) ประเทศไทยมีรายงานการพบการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกในหอยสองฝาบริเวณจังหวัดภูเก็ต และปลาในจังหวัดตรังในปี 2562 (Akkajit et al., 2022; สมิตานัน หงษ์สตาร์, 2562) และรายงานการพบไมโครพลาสติกในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น หอยแมลงภู่ ปลา และกุ้ง (Hossain et al., 2020; Rezanian et al., 2018; Thiele et al., 2021) สัตว์เหล่านี้ล้วนเป็นอาหารที่มนุษย์นิยมรับประทาน และมีรายงานการพบไมโครพลาสติกในอุจจาระของมนุษย์จากการเก็บตัวอย่างอุจจาระของอาสาสมัครจำนวน 18 คน (Schwabl et al., 2019) ดังนั้นมนุษย์จึงมีโอกาสได้รับไมโครพลาสติกผ่านการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนไมโครพลาสติก (Campanale et al., 2020) บริเวณที่คาดว่าจะได้รับความเสียหายจากการได้รับไมโครพลาสติกคือบริเวณลำไส้ เนื่องจากเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่ในการดูดซึมสารอาหาร และสัมผัสกับอาหารเป็นระยะเวลา

ลำไส้ประกอบไปด้วยเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการดูดซึมอาหาร (enterocytes) เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการหลั่งเมือก (goblet cells) และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (microfold (M) cells) เป็นต้น (Lehner et al., 2020) ในการศึกษาผลกระทบของสิ่งแปลกปลอมที่ได้รับผ่านการรับประทานอาหารจึงนิยมใช้เซลล์ในระบบทางเดินอาหารเป็นต้นแบบในการศึกษา เช่น การศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนขนาด 7.0 และ 19.2 ไมโครเมตร ต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดดูดซึม Caco-2 และเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลั่งเมือก HT-29 โดยเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลั่งเมือก HT-29 ร่วมกับไมโครพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีน ความเข้มข้น 0.25-1.0 mg/mL เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงผลการศึกษาพบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงร้อยละ 20-30 ที่ความเข้มข้น 1.0

mg/mL ในเซลล์ Caco-2 และก่อให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ทั้งสองชนิด (Herrala et al., 2023) อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวเป็นเพียงการศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกในระยะเวลานั้นและศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกเพียงชนิดเดียว

ไมโครพลาสติกส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติมักพบไมโครพลาสติก 2 ลักษณะคือเป็นเส้นใยขนาด 100-500 μm และไมโครพลาสติกที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ขนาด 20-50 μm โดยไมโครพลาสติกที่พบส่วนใหญ่เป็นชนิด พอลิเอทิลีนเทเรพทาเลต, พอลิสไตรีน, พอลิเอทิลีน, พอลิไวนิลคลอไรด์, และ พอลิโพรไพลีน (Falakdin et al., 2024) และจากการเก็บตัวอย่างผิวน้ำบริเวณ southern Weddell Sea พบไมโครพลาสติกจากการเก็บตัวอย่าง 3 ช่วงขนาด คือ ขนาดเล็กกว่า 25 μm ขนาด 25-100 μm และขนาด 100-300 μm โดยไมโครพลาสติกส่วนใหญ่ที่พบเป็นไมโครพลาสติกชนิด พอลิสไตรีน พอลิโพรไพลีน และพอลิคาร์บอนเนต (Leistenschneider et al., 2024) โดยไมโครพลาสติกที่พบส่วนใหญ่เป็นเทอร์โมพลาสติกซึ่งใช้เวลาย่อยสลายนานในธรรมชาติ

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าไมโครพลาสติกส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติเป็นไมโครพลาสติกชนิดพอลิโพรไพลีน และพอลิสไตรีน ซึ่งเป็นเทอร์โมพลาสติกที่ใช้เวลานานในการย่อยสลาย ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ และใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายน้อยกว่าเทอร์โมพลาสติก อย่างไรก็ตามการศึกษาค่าความเป็นพิษและผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากเทอร์โมพลาสติกและพลาสติกชีวภาพยังคงมีอยู่อย่างจำกัด

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทต่อเซลล์เยื่อผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ในแง่ความเป็นพิษต่อเซลล์ การก่อให้เกิดการหดตัวของโครมาติน (chromatin condensation) รวมถึงความสามารถในการเป็นตัวพาสารพิษของไมโครพลาสติก โดยพิจารณาความเป็นพิษต่อเซลล์จากการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin based assay การหดตัวของโครมาตินโดยตรวจสอบความผิดปกติของนิวเคลียสด้วยการย้อมสี DAPI ทำการทดสอบโดยการเลี้ยงเซลล์เยื่อผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ร่วมกับไมโครพลาสติก 3 ชนิด ได้แก่ พอลิสไตรีน (polystyrene; PS) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate; PBS) และพอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid; PLA) โดยทดสอบเป็นระยะเวลา 7, 14, 21, และ 28 วัน รวมทั้งศึกษาการดูดซับและปลดปล่อยไอออนปรอทของไมโครพลาสติกทั้งสามชนิดหลังการแช่ในสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (HgCl_2 solution) เป็นระยะเวลา 7 วัน และทดสอบการปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกด้วยการย้อมสีด้วยเซนเซอร์ NF09 ซึ่งเป็นเซนเซอร์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อตรวจวัดไอออนปรอท (Petdum et al., 2020) โดยจะเกิดการเรืองแสงเมื่อจับกับไอออนปรอท รวมถึงตรวจสอบการดูดซับไอออนปรอทของไมโครพลาสติกจากการวิเคราะห์ธาตุด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดด้วยเทคนิคเทคนิค energy dispersive spectroscopy

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด และไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29
2. ศึกษาการดูดซับและการปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29
3. ตรวจสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมภายในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อได้รับไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติก 3 ชนิด ได้แก่ พอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดขนาด 400, 200 และ 140 mesh ความเข้มข้น 10, 100, 200, 400 และ 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ด้วยวิธี resazurin based assay เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกเป็นระยะเวลา 7, 14, 21, และ 28 วัน และศึกษาความผิดปกติของสารพันธุกรรม ด้วยการย้อมสีสารพันธุกรรมด้วยสี 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด เป็นระยะเวลา 28 วัน รวมถึงศึกษาการดูดซับสารปรอทของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดขนาด 400 mesh ($<30 \mu\text{m}$) ที่ผ่านการแช่ในสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (HgCl_2) เป็นระยะเวลา 7 วัน ด้วยการย้อมสีไมโครพลาสติกด้วยเซนเซอร์ NF09 และตรวจสอบการดูดซับไอออนปรอทของไมโครพลาสติกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดโดยใช้เทคนิค energy dispersive spectroscopy (SEM-EDX) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของไมโครพลาสติกที่ผ่านการแช่ในสารละลายปรอทเป็นระยะเวลา 7 วันก่อนการทดสอบกับเซลล์ โดยตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin based assay เมื่อเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไมโครพลาสติกเป็นระยะเวลา 3, 7, และ 14 วัน และศึกษาการปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์โดยการย้อมสีเซลล์ด้วยเซนเซอร์ NF09 รวมถึงการเกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทด้วยการย้อมสี DAPI

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความเป็นพิษของไมโครพลาสติกชนิดพอลิไทรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด การดูดซับและปลดปล่อยสารพิษจากไมโครพลาสติก เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความเป็นพิษของไมโครพลาสติกและสารพิษชนิดอื่นในอนาคต รวมถึงเป็นแนวทางในการเลือกใช้พลาสติกในชีวิตประจำวันและนโยบายที่เกี่ยวข้องกับการจัดการขยะพลาสติก ในอนาคต



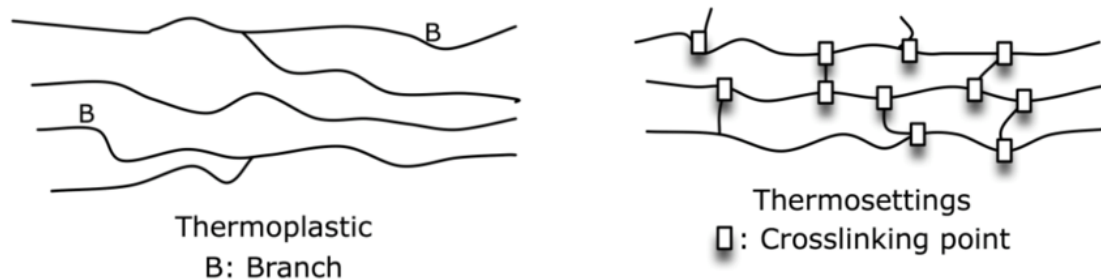
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประเภทของพลาสติกและไมโครพลาสติก

ผลิตภัณฑ์พลาสติกถูกผลิตเพิ่มขึ้นจาก 1.7 ล้านตันต่อปีในปี 2493 เป็น 303.1 ล้านตันต่อปีในปี 2553 และมีการผลิตพลาสติกเพิ่มขึ้นประมาณ 396 ล้านตันต่อปีในปี 2561 ซึ่งในแต่ละปีประเทศตามแนวชายฝั่งทะเลมักมีการทิ้งขยะพลาสติกลงสู่ทะเลมากซึ่งเฉลี่ยมากถึง 14 ล้านตัน (Moore, 2023) ปัญหาขยะพลาสติกที่ขาดการจัดการอย่างเหมาะสมส่งผลให้เกิดผลกระทบเป็นวงกว้างต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต รวมถึงส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ด้วยเช่นกัน ผลกระทบที่เห็นได้ชัดคือ การสะสมขยะพลาสติกในสัตว์ทะเล ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของสิ่งมีชีวิตและอาจร้ายแรงส่งผลกระทบต่อชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับขยะพลาสติก โดยขยะพลาสติกที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ ถุงบรรจุภัณฑ์ จาน ช้อนพลาสติก ขวดน้ำดื่ม รวมถึงเครื่องสำอางบางประเภท ขยะเหล่านี้ส่วนใหญ่เกิดจากผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ใช้แล้วทิ้ง (Jambeck et al., 2015)

พลาสติกสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามคุณสมบัติทางความร้อน ได้แก่ เทอร์โมเซตติง (thermosetting) และเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) โดยเทอร์โมเซตติงเป็นพลาสติกที่มีโครงสร้างเป็นร่างแหมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ปฏิกิริยาเคมีและ ความดัน จึงไม่สามารถนำมารีไซเคิลได้ ส่วนใหญ่นิยมผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องใช้ในครัวเรือน เช่น หม้อ ฝาขวด เป็นต้น ในขณะที่เทอร์โมพลาสติกเป็นพลาสติกที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบโซ่ตรงมีการเชื่อมต่อระหว่างโซ่ย่อยสามารถหลอมเหลวและขึ้นรูปได้ง่าย (ภาพที่ 1) จึงเป็นพลาสติกที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเทอร์โมพลาสติกเมื่อได้รับความร้อนจะอ่อนตัวและสามารถนำมารีไซเคิล (recycle) ได้ เช่น โพลีไวนิลคลอไรด์ (PVC) โพลีคาร์บอเนต (PC) โพลีโพรไพลีน (PP) และ โพลิสไตรีน (PS) (Yang et al., 2022; Zhou et al., 2022) พลาสติกแต่ละประเภทมีลักษณะแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ดังนี้



ภาพที่ 1 โครงสร้างแบบกิ่งของพลาสติกประเภทเทอร์โมพลาสติก และเทอร์โมเซตติง

(Alves et al., 2012)

พอลิไวนิลคลอไรด์เป็นหนึ่งในพลาสติกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีราคาถูก คงทน และง่ายต่อการขึ้นรูป การผลิต PVC จะใช้คลอรีนเป็นองค์ประกอบในการขึ้นรูป โดยส่วนใหญ่นิยมผลิตเป็นขวดน้ำ กล่อง ลัง พลาสติกห่ออาหาร บัตรเครดิต ของเล่นเด็ก ท่อน้ำ รวมถึงสายไฟ (Munir et al., 2023)

พอลิคาร์บอเนตเป็นเทอร์โมพลาสติกที่นิยมใช้ เนื่องจากมีความใสใกล้เคียงกับกระจก มีน้ำหนักเบาสามารถขนส่งและจัดเก็บได้ง่าย รวมถึงมีช่วงอุณหภูมิในการใช้งานกว้างตั้งแต่ -20°C ถึง 140°C โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติเชิงกลและไม่เสียรูปทรง เป็นฉนวนความร้อนสามารถใช้งานกลางแจ้งได้ นิยมผลิตเป็นคอมไฟ ที่ครอบหลอดไฟ สวิตช์ไฟ ซีดี กรอบโทรศัพท์ ไฟหน้ารถ ไฟจราจร เป็นต้น (Song et al., 2023)

พอลิสไตรีนเป็นพลาสติกที่มีสไตรีนมอนอเมอร์เป็นสารตั้งต้น ส่งผลให้มีความแข็งแต่เปราะ แตกหักง่าย รวมถึงมีอุณหภูมิหลอมเหลวสูงประมาณ $161-165^{\circ}\text{C}$ นิยมนำมาผลิตเป็น แผ่นฉนวนกันความร้อนในอาคารบ้านเรือน รวมถึงภาชนะบรรจุอาหาร (Awasthi et al., 2021)

จากปัญหาการย่อยสลายของพลาสติกที่ใช้เวลานาน ในปัจจุบันมีการผลิตพลาสติกจากวัสดุธรรมชาติ (bio-based) รวมถึงวัสดุที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) หรือเรียกว่า พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) ซึ่งถือเป็นทางเลือกในการลดการสร้างขยะพลาสติกในสิ่งแวดล้อม พลาสติกที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติส่วนใหญ่นิยมใช้ขยะทางการเกษตรเป็นสารตั้งต้นในการผลิต เช่น เส้นใยจากพืช อ้อย มันสำปะหลัง และซังข้าวโพด เป็นต้น (Kharb & Saharan, 2022) พลาสติกชีวภาพสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่

1. พลาสติกที่ได้จากการกลั่นน้ำมัน (fossil resources) และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น พอลิบิวทีลีนอดิเพทาเทอราเลท (polybutylate adipate terephthalate: PBAT) ซึ่งเป็นโคพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่งของกรดอดิพิค (adipic acid), 1,4-บิวเทนไดออล (1,4-butanediol) และ dimethyl terephthalate ผลิตภัณฑ์ที่ทำจาก PBAT ส่วนใหญ่จะเป็นถุงพลาสติก พลาสติกที่ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น (Rengasamy & Ghosh, 2010)

2. พลาสติก biobased หรือ partly biobased เป็นพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (non-biodegradable plastic) ตัวอย่างเช่น

พอลิเอทิลีน (polyethylene: PE) เป็นเม็ดพลาสติกที่เหนียวมีความแข็งแรงทนทาน ป้องกันความชื้นไม่ให้ผ่านเข้าออกได้ แต่อากาศสามารถผ่านเข้าออกได้ นิยมใช้ผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์และหีบห่อ เช่น กระจอบ ถูร้อน ขวดน้ำดื่ม รวมถึงชิ้นส่วนรถยนต์ เป็นต้น (Nisa et al., 2023)

พอลิเอทิลีน เทเรฟทาเลต (polyethylene Terephthalate: PET) เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากมอนอเมอร์หลาย ๆ ตัวที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) ระหว่างกรดเทราฟาลิก (terephthalic acid) และ เอทาลีนไกลคอล (ethylene glycol) เป็นที่นิยมใช้ในการผลิตบรรจุภัณฑ์

ทั้งอุตสาหกรรมอาหารและของใช้ เนื่องจาก PET เป็นพลาสติกที่มีความใสแวววาว แข็งแรงทนทาน ต่อแรงยืด ไม่เปราะแตกง่าย (Schaerer et al., 2023)

พอลิโพรไพลีน (polypropylene: PP) เป็นพลาสติกที่มีสังเคราะห์จากโพรพิลีน (propylene) ซึ่งมีความแข็งแรงทนทานต่อแรงกระแทก สารเคมี และความร้อน จึงนิยมผลิตเป็นภาชนะบรรจุอาหาร ซ้อนและซอมนพลาสติก โดย PP สามารถนำกลับมารีไซเคิลใหม่ได้ (Gijisman & Fiorio, 2023)


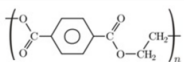

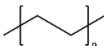

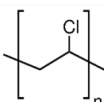

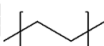

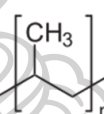

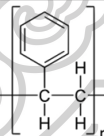

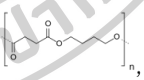
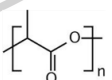
3. พลาสติกที่เป็นทั้งพลาสติกชีวภาพและสามารถย่อยสลายทางชีวภาพ (biobased and biodegradable plastic) ตัวอย่างเช่น

พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (polyhydroxyalkanoates: PHA) เป็นไบโอพอลิเอสเทอร์ที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เนื่องจากผลิตโดยจุลินทรีย์ PHA มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ นิยมใช้เป็นวัสดุตั้งต้นในการทำภาชนะบรรจุอาหาร รวมถึงไหมละลายทางการแพทย์ (Chandra et al., 2023)

พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate: PBS) เป็นพลาสติกที่ใช้กรดซัคซิินิก (succinic acid) และ 1,4 บิวเทนไดออล (1,4 butanediol) ซึ่งผลิตจากขยะทางการเกษตรโดยเปลี่ยนเป็นน้ำตาลและมอนอเมอร์ มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น มีความยืดหยุ่น และสามารถทนความร้อนสูงถึง 200 °C นิยมใช้ผลิตเป็นอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น พลาสติกคลุมดิน กระจ่างต้นไม้ รวมถึงแก้วน้ำดื่ม (Roostaie et al., 2023)

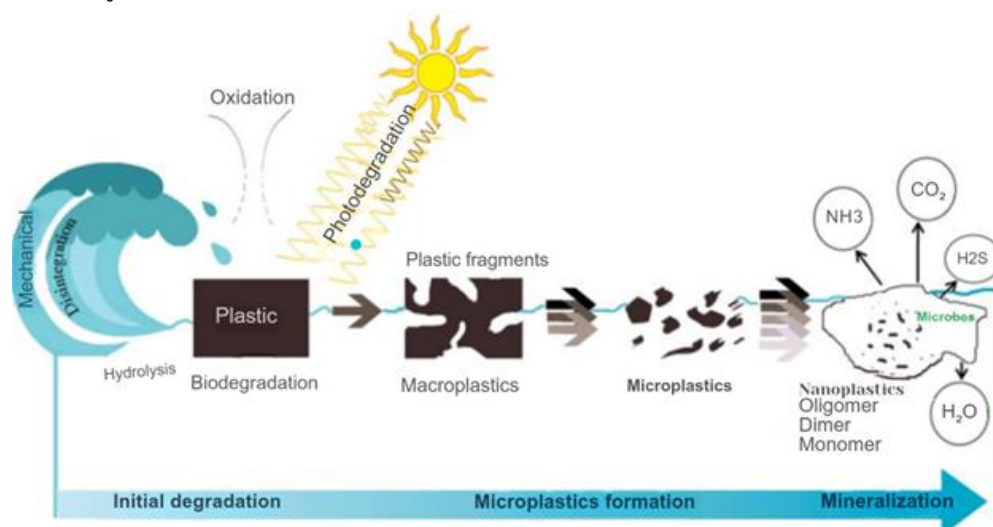
พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid: PLA) เป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดย PLA ผลิตจากขยะทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด อ้อย และมันสำปะหลัง โดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติก ส่วนใหญ่นิยมผลิตเป็น ถ้วย จาน ซ้อน ซ่อม มีด และแก้วน้ำที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง รวมไปถึงวัสดุทางการแพทย์ เช่น นีตสำหรับยึดกระดูก เป็นต้น (Wang et al., 2023)

ตารางที่ 1 โครงสร้างและการใช้ประโยชน์ของพลาสติก
ดัดแปลงจาก (Vibhatabandhu, 2021)

Plastic Code	Name	Density (g/cm ³)	Structure	Typical application
	Polyethelene terephthalate (PET)	1.37-1.45		Beverage bottles Food containers Film and sheeting
	High-density polyethylene (HD-PE)	0.92-0.97		Chemical containers Beverage bottles Food containers
	Polyvinyl chloride (PVC)	1.16-1.58		Containers Electrical conduct Pipes/Gutters
	Low-density polyethylene (LD-PE)	0.92-0.97		Bags/Film Food packaging Shrink wrap
	Polypropylene (PP)	0.9-0.91		Bottle caps Packaging tape Pipe
	Polystyrene	1.04-1.1		Disposable container Packaging foam Thermal insulation
	Polybutylene succinate (PBS), (Example) Polylactic acid (PLA)	1.02-1.05	 	Beverage bottles Food containers Packaging

จากคุณสมบัติของพลาสติกที่มีความทนทานสูงส่งผลให้พลาสติกที่ขาดการจัดการดูแลอย่างเหมาะสมเกิดการย่อยสลายช้าและเกิดการสะสมตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานโดยขยะพลาสติกที่สะสมในสิ่งแวดล้อมมีโอกาสย่อยสลายเป็นพลาสติกที่มีขนาดเล็กเรียกว่า “ไมโครพลาสติก” (microplastic: MPs) ไมโครพลาสติกคือพลาสติกมีขนาดน้อยกว่า 5 ไมโครเมตร (Crawford & Quinn, 2017; Lehner et al., 2019; Rezania et al., 2018) ไมโครพลาสติกสามารถแบ่งได้ 2 ชนิดคือ ไมโครพลาสติกปฐมภูมิ (primary microplastic) และไมโครพลาสติกทุติยภูมิ (secondary microplastic) (Rezania et al., 2018) ความแตกต่างของไมโครพลาสติกทั้ง 2 ชนิดคือ ไมโครพลาสติกปฐมภูมิ (primary microplastic) เกิดจากการผลิตให้มีขนาดเล็ก

เพื่อใช้ประโยชน์เฉพาะด้าน เช่น เม็ดพลาสติกที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดใบหน้า เครื่องสำอาง ยาสีฟัน (plastic scrub) หรือมักเรียกว่า ไมโครบีดส์ (microbeads) ซึ่งไมโครพลาสติกประเภทนี้สามารถปนเปื้อน ลงสู่สิ่งแวดล้อมผ่านการทิ้งของเสียโดยตรงสู่แหล่งน้ำ ไมโครพลาสติกชนิดทุติยภูมิ (secondary microplastic) เป็นไมโครพลาสติกซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของพลาสติกขนาดใหญ่ จากกระบวนการย่อยสลายเชิงกล (mechanical degradation) เชิงเคมี (chemical degradation) และการย่อยสลายทางชีวภาพ (biological degradation) กลายเป็นไมโครพลาสติกที่มีขนาดและรูปร่างที่ไม่แน่นอน (ภาพที่ 2) (Sarkar et al., 2020)



ภาพที่ 2 การย่อยสลายของพลาสติกขนาดใหญ่จากกระบวนการทางกายภาพ ทางเคมีและชีวภาพที่มา (Sarkar et al., 2020)

การปนเปื้อนของไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต

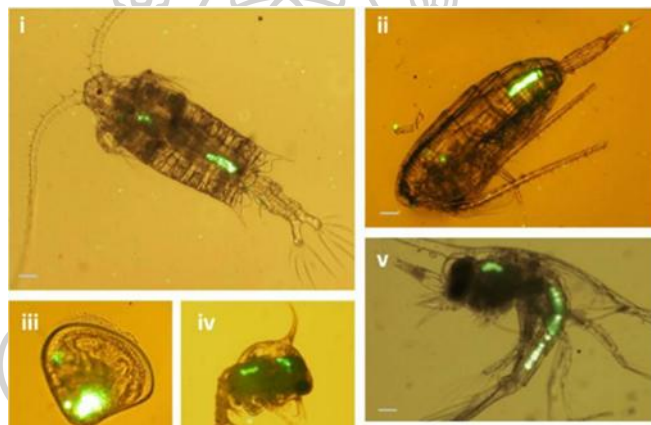
ในประเทศสวีเดนมีรายงานการศึกษาความสามารถการผ่านตะแกรงกรองในระบบบำบัดน้ำเสียของไมโครพลาสติกพบว่าไมโครพลาสติกสามารถผ่านการกรองด้วยตะแกรงกรองจากระบบบำบัดน้ำเสียได้ และส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (Yee et al., 2021) ปัจจุบันมีรายงานการพบการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อม เช่น การปนเปื้อนของไมโครพลาสติกบริเวณปากแม่น้ำ ชายหาด ธารน้ำแข็ง จากการเก็บตัวอย่างใบ foliage โดยพบไมโครพลาสติกมีลักษณะไม่แน่นอน (ขนาด 20-50 μm) และมีลักษณะเป็นเส้นใย (ขนาด 100-500 μm) โดยพบไมโครพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีน เทเรพทาเลต พอลิเอทิลีน พอลิไวนิลคลอไรด์ พอลิโพรไพลีน และพอลิสไตรีน (Falakdin et al., 2024) รวมถึงจากการเก็บตัวอย่างผิวน้ำบริเวณ southern Weddell Sea พบไมโครพลาสติก 3 ช่วงขนาดคือ ขนาดน้อยกว่า 25 μm

ขนาด 25-100 μm และขนาด 100-300 μm โดยพบไมโครพลาสติกชนิดพอลิโพรไพลีน และพอลิสไตรีน (Leistenschneider et al., 2024) เป็นหลัก รวมถึงพบการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในธรรมชาติ เช่น สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง หอย และปลา (Fournier et al., 2020; Hwang et al., 2019; Irfan et al., 2022) ไมโครพลาสติกที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ เนื่องจากไมโครพลาสติกมีความหนาแน่นต่ำและมีน้ำหนักเบาสามารถลอยตัวเหนือผิวน้ำได้ส่งผลให้แพลงก์ตอนซึ่งเป็นอาหารของสัตว์น้ำบางชนิดใช้ไมโครพลาสติกเป็นที่อยู่อาศัย เมื่อสัตว์น้ำกินแพลงก์ตอนเข้าไปจึงมีโอกาสได้รับไมโครพลาสติกเข้าไปด้วยโดยไมโครพลาสติกเหล่านี้สามารถเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำส่งผลให้ไมโครพลาสติกเกิดการปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารและสามารถถ่ายทอดไปยังมนุษย์ได้ (Panagos et al., 2013)

ในปัจจุบันมีการศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับไมโครพลาสติก เช่น การศึกษาของคุณ Matthew Cole และคณะ (2013) ทำการศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกต่ออัตราการกินอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์โดยพบว่าแพลงก์ตอนสัตว์ 13 ชนิดที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนขนาด 1.7–30.6 μm ที่มีการติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ หลังจากที่ได้รับไมโครพลาสติกผ่านการกินผู้วิจัยพบว่าไมโครพลาสติกสามารถหลุดออกมาพร้อมกับอุจจาระของแพลงก์ตอนสัตว์ได้ในขณะเดียวกันมีบางส่วนที่ติดอยู่บริเวณอวัยวะภายในของแพลงก์ตอนสัตว์ รวมถึงพบไมโครพลาสติกติดอยู่บริเวณเปลือกของแพลงก์ตอนสัตว์ (ภาพที่ 3) ผลการศึกษาพบว่าอัตราการกินอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์ลดลง โดยแตกต่างกันตามสายพันธุ์ อายุ และขนาดของไมโครพลาสติกที่แพลงก์ตอนสัตว์ได้รับ

ในปี 2562 ประเทศไทยมีรายงานการพบไมโครพลาสติกจากตัวอย่างปลาหูในจังหวัดตรัง จากการเก็บตัวอย่างปลาหูทั้งหมด 60 ตัว พบไมโครพลาสติกเฉลี่ย 78 ชิ้นต่อตัว ซึ่งลักษณะของไมโครพลาสติกที่พบประกอบไปด้วย เป็นเส้นใย แท่งสีดำ และกลิตเตอร์ โดยชนิดที่พบมากที่สุดมีลักษณะเป็นแท่งสีดำ (สมิตานัน หยงสตาร์, 2562) รวมทั้งมีรายงานการพบไมโครพลาสติกในหอยหวาน (*Marcia opima*) และหอยปากเปิด (*Lingula anatina*) จากการเก็บตัวอย่างในจังหวัดภูเก็ต โดยพบไมโครพลาสติกเฉลี่ยจำนวน 1.86 และ 1.24 ชิ้นต่อตัว ตามลำดับ โดยไมโครพลาสติกที่พบเป็นชนิดพอลิเอทิลีนเทเรพทาเลต พอลิเอสเตอร์ พอลิไวนิล และพอลิไวนิลคลอไรด์ (Akkajit et al., 2022)

รายงานการพบไมโครพลาสติกในอุจจาระของมนุษย์จากการศึกษาของนักวิจัยจาก Medical University of Vienna ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากอาสาสมัคร 8 คน จาก 8 ประเทศทั่วโลก ได้แก่ ฟินแลนด์ อิตาลี เนเธอร์แลนด์ โปแลนด์ รัสเซีย สหราชอาณาจักร และออสเตรเลีย โดยให้อาสาสมัครทุกคนจดบันทึกการรับประทานอาหารในแต่ละวันเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนการเก็บตัวอย่างอุจจาระ จากการจดบันทึกพบว่าอาสาสมัครทุกคนมีการสัมผัสกับพลาสติกจากการบริโภคอาหารที่ห่อด้วยพลาสติก รวมถึงมีอาสาสมัคร 6 คนบริโภคปลาทะเล จากการเก็บตัวอย่างอุจจาระของอาสาสมัครพบไมโครพลาสติกที่แตกต่างกัน 9 ชนิด และมีขนาดตั้งแต่ 50–500 μm โดยพบพอลิโพรไพลีน และโพลิเอทิลีนมากที่สุด (Schwabl et al., 2019)



ภาพที่ 3 การสะสมไมโครพลาสติกที่มีขนาดแตกต่างกันในแพลงก์ตอนสัตว์

(i) การสะสมของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนขนาด 7.3 μm ในแพลงก์ตอนสัตว์ชนิด *Centropages typicus* (ii) การสะสมของ ไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนขนาด 20.6 μm ในแพลงก์ตอนสัตว์ชนิด *Calanus helgolandicus* (iii) การสะสมของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนขนาด 7.3 μm ในตัวอ่อนระยะ D-stage ของหอยสองฝา (iv) การสะสมของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนขนาด 20.6 μm ในตัวอ่อนระยะ zoea stage (v) การสะสมของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนขนาด 30.6 μm ในตัวอ่อนปูปากกาทะเล (Cole et al., 2013)

การปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมและไมโครพลาสติก

โลหะหนัก (heavy metal) คือกลุ่มธาตุที่มีความหนาแน่นมากกว่า 5 กรัมต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสามารถสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ เนื่องจากโลหะหนักไม่สามารถสลายตัวในกระบวนการทางธรรมชาติ (non-biodegradation) และมีความเสถียรสูง โดยการสะสมโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม (bioaccumulation) เกิดจากการสลายตัวของแร่โลหะชนิดต่าง ๆ รวมทั้งการปล่อยน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ไม่ผ่านการบำบัดหรือการบำบัดที่ขาดประสิทธิภาพลงสู่แหล่งน้ำ โดยโลหะหนักที่พบในธรรมชาติและมีการนำมาใช้ประโยชน์ (ตารางที่ 2) ได้แก่ ทองแดง เงิน ตะกั่ว ดีบุก โครเมียม แคดเมียม สารหนู และปรอท เป็นต้น (Guevara-García et al., 2017; The Agency for Toxic Substances and Disease Registry ATSDR, 2016)

ในอดีตประเทศญี่ปุ่นประสบปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักจากโรงงานอุตสาหกรรมลงสู่แหล่งน้ำ เช่น “โรคมินามาตะ” ซึ่งเกิดจากการปล่อยน้ำเสียที่มีสารปรอท และโลหะหนักอื่น ๆ ปนเปื้อนจากโรงงานอุตสาหกรรมลงสู่อ่าวมินามาตะ ต่อมาพบผู้ป่วยที่มีอาการกระดูกเปราะซึ่งเกิดจากการได้รับแคดเมียมที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรมเดียวกัน รวมถึงมีรายงานพบความผิดปกติในเด็กแรกเกิด รวมถึงสัตว์ต่าง ๆ ในธรรมชาติ เช่น นก ปลา และแมว (Wang et al., 2019) โดยโลหะหนักในรูปสารประกอบอินทรีย์สามารถซึมเข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิตได้ เนื่องจากไม่ละลายในน้ำ บริเวณที่สารปรอทมักสะสมอยู่คือบริเวณที่เป็นไขมัน เช่น สมอง เมื่อแพทย์ผ่าสมองของผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรคมินามาตะพบว่าสมองของผู้ป่วยมีลักษณะพรุณคล้ายฟองน้ำ เนื่องจากสมองถูกทำลายจากสารปรอท โดยผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการมือเท้าชาลามไปถึงแขนขาและริมฝีปาก (Matsuyama et al., 2021)

ปรอท (mercury) สามารถจำแนกได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ 1. ปรอทในรูปโลหะหนัก (elemental mercury) เป็นปรอทที่มีความบริสุทธิ์สูงมีลักษณะมันวาวเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง โดยปรอทชนิดนี้พบได้ยากในธรรมชาติ 2. ปรอทในรูปของสารประกอบอินทรีย์ (organic mercury compounds) เป็นปรอทที่รวมตัวกันกับคาร์บอนและโลหะอื่น ๆ ซึ่งสามารถพบมากที่สุด ในธรรมชาติ เช่น เมทิลเมอร์คิวรี (methylmercury) 3. ปรอทในรูปของสารประกอบอนินทรีย์ (inorganic mercury compounds) เป็นปรอทที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น เมอร์คิวริกซัลไฟด์ (HgS) เมอร์คิวริกออกไซด์ (HgO) และเมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl₂) เป็นต้น (Habuer et al., 2022)

รายงานการปนเปื้อนสารปรอทในประเทศไทยพบว่า แหล่งโรงงานไฟฟ้าถ่านหินและโรงผลิตเยื่อกระดาษ ตำบลท่าตุม อำเภอศรีมหาโพธิ จังหวัดปราจีนบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่อุตสาหกรรมที่ใหญ่ที่สุดในจังหวัดปราจีนบุรี เนื่องจากในถ่านหินมีส่วนประกอบของสารปรอทซึ่งสามารถแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้เมื่อเกิดการเผาไหม้ โดยการแพร่กระจายทางอากาศจากโรงงานไฟฟ้าซึ่งมีระบบควบคุมต่ำสามารถก่อให้เกิดการปลดปล่อยสารปรอทจำนวนมากและสามารถตกสู่พื้นดินได้ รวมถึงโรงผลิตเยื่อกระดาษเป็นอีกหนึ่งแหล่งกำเนิดของสารปรอท เนื่องจากในการผลิตกระดาษมีการเติมสารฟีนิลเมอร์คิวริกอะซิเตต (phenyl mercuric acetate) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของสารปรอทในแหล่งน้ำเสียจากกระบวนการผลิต (กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2554) รวมทั้งจากการศึกษาในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่ามีสารปรอทปนเปื้อนสูงถึง 0.70 ppm ในพื้นดินบริเวณโดยรอบแหล่งคัดแยกและเผาขยะอิเล็กทรอนิกส์ (เพ็ญโฉม แซ่ตั้ง และคณะ, 2552) จากการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2521 โดยการเก็บตัวอย่างปลาจากบริเวณใกล้เคียงกับโรงงานผลิตโซดาไฟ TACSCO ในประเทศไทยเมื่อเดือนพฤศจิกายนและธันวาคม ในปี พ.ศ. 2521 พบว่ามีสารปรอทปนเปื้อนอยู่ในเนื้อเยื่อปลาสูงถึง 0.10–1.38 ppm ในขณะที่ตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาจากพื้นที่ควบคุมพบการปนเปื้อนของสารปรอทเพียง 0.10–0.30 ppm (Suckcharoen, 1978) รวมทั้งเหตุการณ์ท่อส่งน้ำมันดิบรั่วกลางทะเลอ่าวไทยในพื้นที่จังหวัดระยอง นายวิเชียร จุ่งรุ่งเรือง อธิบดีกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ในขณะนั้น แถลงผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำทะเลบริเวณชายหาดและอ่าวต่าง ๆ รอบเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจาก 12 หาด พบว่าค่าปรอทส่วนใหญ่มีค่าไม่เกินมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลที่กำหนดคือ 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ยกเว้นตัวอย่างน้ำทะเลจากบริเวณอ่าวทับทิมพบปรอทปนเปื้อน 0.25 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างน้ำทะเลจาก อ่าวพร้าวซึ่งมีค่าปรอทปนเปื้อนสูงถึง 2.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงถึง 29 เท่าจากค่ามาตรฐาน (กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2556)

ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์และผลกระทบของโลหะหนัก

โลหะหนัก	การใช้ประโยชน์	ความเป็นพิษ
As	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นส่วนประกอบของยากำจัดศัตรูพืช - ใช้ในอุตสาหกรรมสี ดอกไม้เพลิง แก้ว ผ้า แบตเตอรี่ 	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นพิษต่อระบบประสาททำให้คลื่นไส้ อาเจียน - หากได้รับ 70-180 mg/Kg อาจส่งผลให้เสียชีวิตได้ (Fatoki & Badmus, 2022)
Cd	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้เป็นสารหล่อลื่น - เป็นส่วนประกอบของสี - ใช้ในกระบวนการผลิตแบตเตอรี่ - ใช้ในกระบวนการผลิตพลาสติก 	<ul style="list-style-type: none"> - ชัดขวางการสร้างเม็ดเลือดแดง - แย่งจับกับธาตุสังกะสีทำให้เอนไซม์ไม่ทำงาน - หากได้รับเกิน 20-30 mg/Kg จะส่งผลให้เสียชีวิตได้ (Cheng et al., 2023)
Pb	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้ในอุตสาหกรรมการเชื่อมโลหะ - ใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและส่วนประกอบของน้ำมันเชื้อเพลิง 	<ul style="list-style-type: none"> - ส่งผลถึงเวียนศีรษะ อาเจียน - ในผู้ใหญ่หากพบ Pb ในเลือดมากกว่า 10 µg/dL อาจส่งผลให้เสียชีวิตได้ (Abduro Ogo et al., 2022)
Hg	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นส่วนประกอบในการทำเทอร์โมมิเตอร์ - ใช้ในอุตสาหกรรมไฟฟ้า - ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ - เป็นส่วนประกอบของยากำจัดศัตรูพืช 	<ul style="list-style-type: none"> - โรคมึนมาตะ: เกิดจากการได้รับสารปรอท โดยมีอาการท้องเสียรุนแรง ระบบประสาทเกิดความผิดปกติ สายตามัว มองไม่เห็น ความจำเสื่อม เป็นต้น - หากได้รับทางการหายใจมากกว่า 20 µg/m³ ก่อให้เกิดอันตรายต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Schwartz et al., 2023)

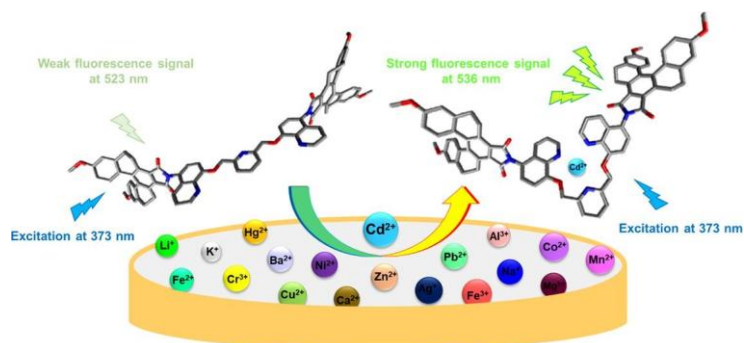
จากการเก็บตัวอย่างปลาตะไกรงขาว (*Atropus atropos*) บริเวณอ่าวเปอร์เซีย จำนวน 20 ตัว พบไมโครพลาสติกสะสมบริเวณลำไส้ของปลาตะไกรงขาวเฉลี่ย 1.5 ชิ้นต่อกรัมและตรวจวิเคราะห์ไมโครพลาสติกด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ซึ่งเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ธาตุที่อาศัยการวัดการคายพลังงานของธาตุเมื่อได้รับพลังงานความร้อนจากพลาสมา พบการสะสมของโลหะหนักในตัวอย่างไม่โครพลาสติกได้แก่ ตะกั่ว แคดเมียม สารหนู และปรอท โดยพบปรอทเข้มข้น 0.33-0.66 µg/g (Esmaeilbeigi et al., 2023) และจากการศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกที่มีการดูดซับสารปรอทต่อหอยแมลงภู่ว่า ไมโครพลาสติกสามารถสะสมและปลดปล่อยสารปรอทเข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกและทางเดินอาหารของหอยแมลงภูได้ (Rivera-Hernandez et al., 2019) รวมถึงการศึกษาความสามารถในการดูดซับสารพิษของไมโครพลาสติกในปี 2019 โดยผู้วิจัยทำการแช่ไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนในสารละลายสารหนู ก่อนนำมาทดสอบกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดดูดซึม Caco-2 พบว่าไมโครพลาสติกที่มีการแช่ในสารละลายสารหนูส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง (Wu et al., 2019)

การวิเคราะห์โลหะหนักในไมโครพลาสติก

โดยทั่วไปการศึกษาร่วมกันขององค์ประกอบของธาตุในวัตถุต่าง ๆ นิยมศึกษาโดยใช้เทคนิค fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) ซึ่งอาศัยการกระตุ้นสารตัวอย่างด้วยพลังงานแสงอินฟราเรดที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ ซึ่งสามารถให้ข้อมูลหมู่ฟังก์ชันของธาตุที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง (Depciuch et al., 2023) รวมถึงการใช้เทคนิค X-ray diffraction (XRD) เป็นเทคนิคที่นำการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์เมื่อกระทบกับโครงสร้างภายในของวัตถุตัวอย่างมาใช้ในการวิเคราะห์และระบุชนิดสารประกอบที่อยู่ภายในโครงสร้าง (Yang et al., 2023) จากการเก็บตัวอย่างตะกอนดินจากแม่น้ำที่อยู่ใกล้กับโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศเยอรมนีจำนวน 8 จุดสำรวจ โดยเก็บตัวอย่างตะกอนดิน 4–5 กิโลกรัมต่อจุดสำรวจ จากนั้นนำมาละลายและกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 5 มิลลิเมตร พบไมโครพลาสติกขนาด 63–5,000 ไมโครเมตร จากการตรวจวิเคราะห์ไมโครพลาสติกที่พบในตะกอนดินด้วยเทคนิค FT-IR พบการปนเปื้อนของสารหนู แคดเมียม และปรอท ในตัวอย่างไมโครพลาสติกจากตะกอนดินจากทุกจุดสำรวจ (Huppertsberg & Knepper, 2020; Klein et al., 2015)

นอกจากการวิเคราะห์ไมโครพลาสติกด้วยเทคนิค FT-IR แล้วยังมีการศึกษาที่ใช้เทคนิค inductivity coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) ในการตรวจวิเคราะห์สิ่งปนเปื้อนในไมโครพลาสติก ตัวอย่างเช่น การศึกษาในปี 2023 ผู้วิจัยทำการเก็บ ตัวอย่างจากชายหาดบริเวณเมดิเตอร์เรเนียนจำนวน 14 จุดสำรวจ ผู้วิจัยพบไมโครพลาสติก 3 ชนิดหลัก ๆ ได้แก่ พอลิเอทิลีน พอลิโพรไพลีน และพอลิสไตรีน และเมื่อตรวจวิเคราะห์ไมโครพลาสติกที่พบด้วยเทคนิค ICP-MS ผู้วิจัยพบการปนเปื้อนของโลหะหนักในไมโครพลาสติกโดยพบการปนเปื้อนของสารหนู แคดเมียม และ แกโดลิเนียม (Elseblani et al., 2023)

ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวัดโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมเช่นการใช้ฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์ในการตรวจวัดซึ่งเป็นวิธีการที่ประหยัดทรัพยากรทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายเนื่องจากใช้ตัวอย่างในการตรวจวัดน้อย มีความเที่ยงตรงสูง และสามารถใช้งานภาคสนามได้ ตัวอย่างเช่น การวิจัยและพัฒนา tetrahydro-[5]helicene-based fluorescence sensor เพื่อตรวจวัดแคดเมียมไอออน โดยเซนเซอร์ดังกล่าวจะเกิดการเรืองแสงเมื่อจับกับแคดเมียมไอออน (ภาพที่ 4) จากผลการศึกษาผู้วิจัยระบุว่าเซนเซอร์ดังกล่าวสามารถตรวจวัดแคดเมียมไอออนในน้ำดื่มรวมถึงภายในเซลล์ที่มีชีวิตได้ (Petdum et al., 2022)

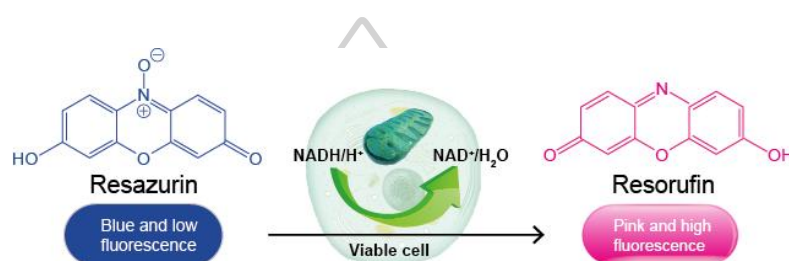


ภาพที่ 4 การถ่ายทอดพลังงานเมื่อเซนเซอร์ตรวจพบแคดเมียมไอออนและเกิดการเรืองแสงที่ตามมา (Petdum et al., 2022)

การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาความเป็นพิษของไมโครพลาสติก

การวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) เป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษของสิ่งทดสอบต่อเซลล์ เช่น ยา สารสกัด สารเคมี รวมไปถึงไมโครพลาสติกที่อาจมีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์หรือสร้างความเสียหายให้กับสารพันธุกรรมซึ่งท้ายที่สุดแล้วจะส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ การวัดความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์มีข้อดีคือ สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการทดสอบรวมถึงลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองลง โดยส่วนใหญ่การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์จะใช้สารในกลุ่ม tetrazolium เช่น 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromine assay (MTT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) และ (sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium) inner salt; 2PMS = (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) (XTT) เมื่อ tetrazolium ซึ่งมีสีเหลือง ถูกรีดิวซ์ด้วย nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADH) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตเรียกว่า mitochondrial dehydrogenase ให้อยู่ในรูปของผลึก formazan ซึ่งมีสีม่วง หรือใช้สารในกลุ่มของ resazurin ที่มีสีชมพู (ภาพที่ 5) การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin based assay มีข้อดีคือประหยัดเวลามากกว่าวิธี tetrazolium assay โดยผลิตภัณฑ์ resorufin ที่เกิดขึ้นไม่จำเป็นต้องนำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่วิธี tetrazolium assay เมื่อเกิดผลึก formazan จะต้องละลายด้วย DMSO ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เซลล์ตาย

นอกจากการตรวจวัดอัตราการตายของเซลล์ด้วยวิธีการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิตยังสามารถตรวจวัดอัตราการตายของเซลล์จากการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ด้วย เนื่องจากเซลล์ที่ตายแล้วจะเกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารต่าง ๆ ผ่านเข้าออกเซลล์ได้ง่ายซึ่งการย้อมสีเซลล์ในกรณีนี้จะใช้สีประเภท vital dye เช่น trypan blue เป็นสีที่ใช้ย้อมเซลล์ที่ตายแล้วให้เกิดการติดสีฟ้าของ trypan blue ภายในเซลล์ที่ตายแล้ว ในขณะที่เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะไม่ติดสีฟ้าภายในเซลล์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 5 หลักการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin based assay

ที่มา <https://www.creative-bioarray.com/support/resazurin>

จากการพบการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ เช่น กุ้ง หอย ปู และปลา จึงเป็นเหตุให้เกิดความตระหนักถึงอันตรายของไมโครพลาสติกต่อสุขภาพของมนุษย์ การศึกษาเกี่ยวกับอันตรายของไมโครพลาสติกต่อร่างกายมนุษย์โดยตรงไม่สามารถทำได้ ดังนั้นนักวิจัยส่วนใหญ่จึงนิยมทำการทดสอบกับสัตว์ทดลองรวมถึงเซลล์เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) และความรู้ทางด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) เช่น การศึกษาความเป็นพิษของไมโครพลาสติกชนิด พอลิสไตรีนกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิด HT-29 โดยแบ่งไมโครพลาสติกออกเป็น 2 ขนาดคือ 3 กับ 10 μm และ 5 ความเข้มข้น คือ 100, 200, 400, 800 และ 1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้รับไมโครพลาสติกขนาด 10 μm ที่ความเข้มข้น 100–1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงร้อยละ 6.7, 6.31, 8.78, 15.01, และ 21.6 ตามลำดับ เมื่อเซลล์ที่ได้รับไมโครพลาสติกขนาด 3 μm ที่ความเข้มข้น 100–1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลงร้อยละ 6.05, 15.99, 18.68, 21.37 และ 29.63 ตามลำดับ (Visalli et al., 2021)

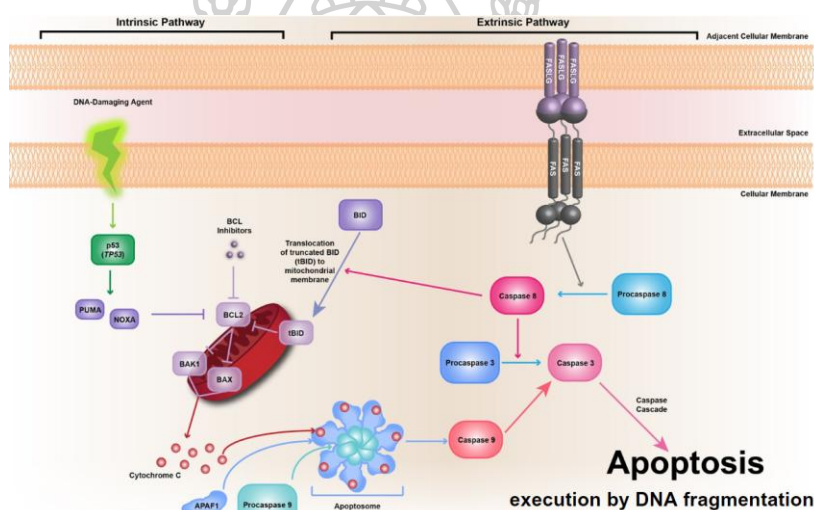
รวมถึงการสร้างแบบจำลองสามมิติของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ชนิด HT-29 และ HT29-MTX เพื่อศึกษาการหลังสารก่อการอักเสบของเซลล์เมื่อได้รับไมโครพลาสติกโดยผู้วิจัยใช้ไมโครพลาสติก 4 ชนิด ได้แก่ พอลิโฟฟิริน, โพลียูทรีน, เทอร์โมพลาสติก พอลียูทรีน และโพลิเอไมด์ ไมโครพลาสติกทุกชนิดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 100 μm เมื่อนำเซลล์ที่ได้รับไมโครพลาสติกเป็นระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง และตรวจสอบการหลังไซโตไคน์ (cytokine) พบว่าไมโครพลาสติกไม่ส่งผลต่อการหลังไซโตไคน์ในแบบจำลองที่ได้รับไมโครพลาสติก ผู้วิจัยแนะนำว่าในการศึกษาต่อไปควรศึกษาในไมโครพลาสติกที่มีขนาดเล็กลง และแตกต่างกัน รวมไปถึงควรศึกษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น เพื่อประเมินผลกระทบของไมโครพลาสติกที่อาจเกิดขึ้นในระยะยาว (Lehner et al., 2020)

การตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis)

นอกจากการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์จากการทำงานของเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียแล้วการตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากสามารถใช้ในการประเมินระดับความรุนแรงของสิ่งทดสอบต่อเซลล์ได้ โดยการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (apoptosis) เป็นการตายที่มีแบบแผนโดยมีการควบคุมของยีนหรือโมเลกุลภายในเซลล์หลายกลุ่ม เช่น p53 ในกลุ่ม anti-apoptotic protein รวมถึงกลุ่ม pro-apoptotic (Kader et al., 2021) เป็นต้น สาเหตุของการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis สามารถเกิดได้หลายปัจจัย เช่น ไมโครคอนเดรียได้รับความเสียหาย เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ (free radicals) รวมถึงเกิดจากการได้รับสารพิษ (Li et al., 2024) เป็นต้น ซึ่งเซลล์ที่เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสสามารถสังเกตได้เบื้องต้นจากลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คือ เยื่อหุ้มเซลล์จะมีลักษณะหดตัวนิวเคลียสหดตัวแน่น โครมาตินมีการรวมกลุ่มเป็นก้อนและเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (Wang & Shen, 2024)

กลไกการตายของเซลล์สามารถแบ่งได้ 2 รูปแบบที่ทำงานร่วมกันคือ extrinsic pathway และ intrinsic pathway ซึ่งการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสด้วยวิถี extrinsic pathway จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ถูกระตุ้นด้วยโมเลกุลของสารพิษหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น การได้รับไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอทโดยจะเกิดการกระตุ้นบริเวณ tumor necrosis factor receptor (TNFR) และ Fas receptor (FasR) และเกิดการสร้างโปรตีน death-inducing signaling complex (DISC) และทำงานร่วมกันกับ procaspase 8 ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ caspase 8 และจับกับ procaspase 3 ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และสารพันธุกรรมภายในเซลล์ และก่อให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในที่สุด (ภาพที่ 6)

(Braun et al., 2010) ในขณะที่การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสที่ผ่านวิถี intrinsic pathway จะเกิดจากการที่ไมโทคอนเดรียและอะพอพโทโซมถูกกระตุ้นจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น การเกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอรวมทั้งควบคุมโปรตีนในกลุ่ม p53 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการตายของเซลล์ (pro-apoptotic protein) เช่น PUMA และ NOXA ส่งผลให้ไมโทคอนเดรียเกิดการรั่วและปลดปล่อย cytochrome C จับกับ apoptosis protein-activating factor1 (Apaf-1) และรวมตัวกับ pro-caspase 9 เกิดเป็น apoptosome จากนั้นเกิดการกระตุ้น caspase 9 และ caspase 3 ตามลำดับ ซึ่งส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส อย่างไรก็ตามการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสเซลล์มักถูกกระตุ้นให้เกิดการตายร่วมกันผ่านวิถี extrinsic pathway และ intrinsic pathway (Wei et al., 2024)

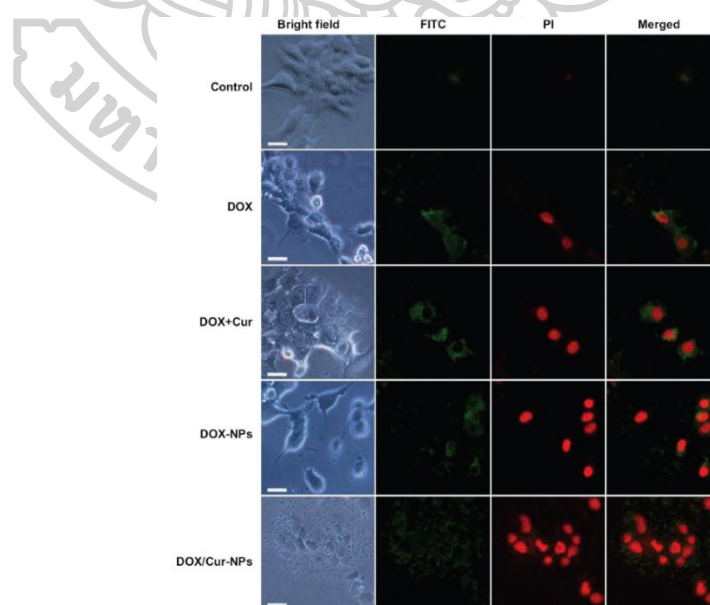


ภาพที่ 6 การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสผ่าน extrinsic pathway และ intrinsic pathway (Braun et al., 2010)

การศึกษาการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสสามารถสังเกตเบื้องต้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสเยื่อหุ้มเซลล์จะโป่งพอง (bleb) นอกจากการสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แล้วสามารถตรวจสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ เช่น Annexin V FITC, Propidium iodide (PI), 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) และ Hoechst 33258 ซึ่งจะพบนิวเคลียสที่มีขนาดเล็กและเกิดการหดตัวแน่นของโครมาตินภายในนิวเคลียส (Lin et al., 2021) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ที่กล่าวข้างต้นสามารถตรวจสอบการตายของเซลล์ได้แต่ไม่สามารถจำแนกระยะการตายของเซลล์ได้

ดังนั้นจึงนิยมย้อมสีร่วมกันระหว่าง Annexin V FITC/PI (Zhao et al., 2014) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถจำแนกกระยะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสได้ โดยสังเกตการติดสีย้อมที่ต่างกัน โดยเซลล์ที่เริ่มเกิดการตายจะเกิดความเสียหายบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้ phosphatidyl serine พลิกมาอยู่ด้านนอกเซลล์จึงทำให้ติดสีย้อม Annexin V FITC ซึ่งมีสีเขียวเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ ในขณะที่เดียวกันจะไม่พบการติดสีแดงของ PI เนื่องจากเซลล์ยังไม่เกิดรอยร้าวทำให้ PI ไม่สามารถย้อมติดนิวเคลียสภายในเซลล์ได้ แต่เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่ว PI จะสามารถย้อมติดบริเวณนิวเคลียสภายในเซลล์ได้และจะสามารถสังเกตเห็นการติดสีแดงของ PI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ ในขณะที่เซลล์ที่ไม่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสจะไม่สามารถสังเกตเห็นการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ดังกล่าว (ภาพที่ 7) โดยการตายของเซลล์สามารถแบ่งได้ 4 ระยะ ได้แก่

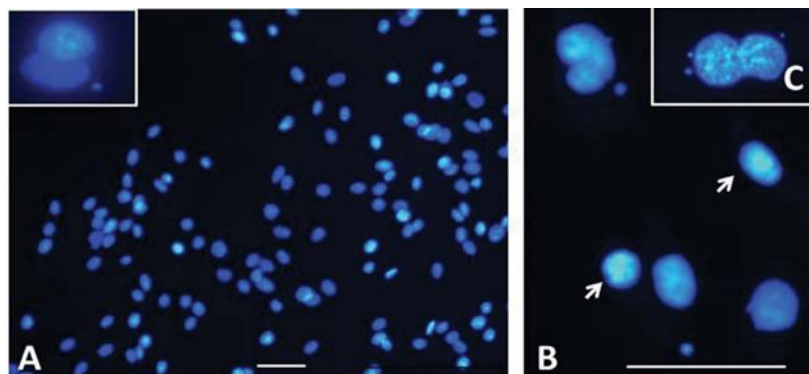
1. เซลล์ที่มีชีวิต คือเซลล์ที่ไม่เกิดการติดสีของ Annexin V FITC/PI
2. เซลล์ที่เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในระยะ early apoptotic cells เซลล์ในกลุ่มนี้จะสังเกตเห็นการติดสีของ Annexin V FITC เพียงสีเดียว
3. การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในระยะ late apoptotic cells เซลล์ที่เกิดการตายในระยะนี้จะสามารถสังเกตเห็นการติดสีทั้ง Annexin V FITC และ PI
4. การตายของเซลล์ในระยะ necrotic cell จะพบการติดสีแดงของ PI เพียงสีเดียว เนื่องจากเซลล์เกิดความเสียหายและเกิดรอยร้าวบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์



ภาพที่ 7 การย้อมสี Annexin V FITC / PI staining in HepG2 cells เพื่อตรวจสอบการตายของเซลล์ (Zhao et al., 2014)

การศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมภายในเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อสารพันธุกรรมภายในเซลล์ สามารถใช้วิธี micronucleus assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ ซึ่งจะทำการหยุดกระบวนการแบ่งไซโตพลาสซึม (cytokinesis) ของเซลล์เพื่อตรวจสอบการเกิด micronucleus หรือวิธี comet assay เป็นวิธีที่อาศัยหลักการการแยกขนาดของสารพันธุกรรมที่แตกหักออกจากกันภายใต้สนามไฟฟ้าเพื่อประเมินระดับความเสียหายต่อสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้น เป็นต้น (Hagger et al., 2011) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมได้ด้วยการย้อมสีเซลล์โดยตรง ซึ่งสีย้อมที่ใช้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สีย้อมที่สามารถมองเห็นได้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและสีย้อมที่สามารถมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ในงานที่เกี่ยวกับการตรวจสอบความเป็นพิษของสารส่วนใหญ่นิยมใช้สีฟลูออเรสเซนซ์ เนื่องจากทำให้เห็นถึงความผิดปกติของสารพันธุกรรมได้ โดยสังเกตจากการติดสีฟลูออเรสเซนซ์สามารถใช้ทั้งในเซลล์ที่ยังมีชีวิต และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต สีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ที่นิยมใช้ในการย้อมสารพันธุกรรม (ภาพที่ 8) คือ 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) และ Hoechst 33258 ซึ่งสีย้อมทั้ง 2 ชนิดนี้เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์จะให้แสงสีฟ้าเหมือนกัน แต่ความสามารถในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสีย้อมทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกัน สีย้อม Hoechst มีความสามารถในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี เมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถย้อมสารพันธุกรรมได้ทั้งในเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ในขณะที่สีย้อม DAPI นั้นมีความสามารถในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิตน้อย จึงต้องใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ที่ไม่มีชีวิตหรือเซลล์ที่คงสภาพด้วยแอลกอฮอล์ใช้ความเข้มข้นของสี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 8 การเกิด micronuclei ภายในเซลล์จากการย้อมสี DAPI

(A) glial cell, (B, C) glial cell with micronuclei (Falugi et al., 2015)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

เซลล์เพาะเลี้ยง

1. เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก (HT-29) (ATCC ® HTB-38)
จากบริษัท American Type Culture Collection (ATCC)

วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยง 96-well plate
(Nunclon, China, Catalog #167008, Lot#60108442)
2. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture flask T-25 cm²)
(Thermo Fisher Scientific, China Lot #60258758)
3. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture flask T-75 cm²)
(Thermo Fisher Scientific, China Lot #60221726)
4. กระจาดอาหาร (Membrane filter, 47 mm diameter, 0.2 µm pore size)
(Whatman™, Japan, Catalog #7001-0004, Lot #71006306)
5. พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur Pipette)
(NEST, China Lot #20171010)
6. ขวดแก้ว (Laboratory bottle)
7. ปิเปต (Pipette)
8. ไมโครปิเปตต์ทิว (Micropipette tip) ขนาด 10, 200, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
9. หลอดเซนติฟิวต์พลาสติก (Centrifuge tube) ขนาด 5, 15, และ 50 มิลลิลิตร
10. ปีกเกอร์ (Beaker)
11. ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet classII)
(บริษัท Haier รุ่น 1200-IIA2-D, China)
12. ถังแช่แข็งไนโตรเจนเหลว (Liquidnitrogen freezer)
(บริษัท ANTECH, รุ่น CryoMaster750,ประเทศไทย)
13. ไมโครปิเปต (Micropipette / Autopipette)
14. ไมโครปิเปตแบบหลายช่อง (Multichannel pipette)

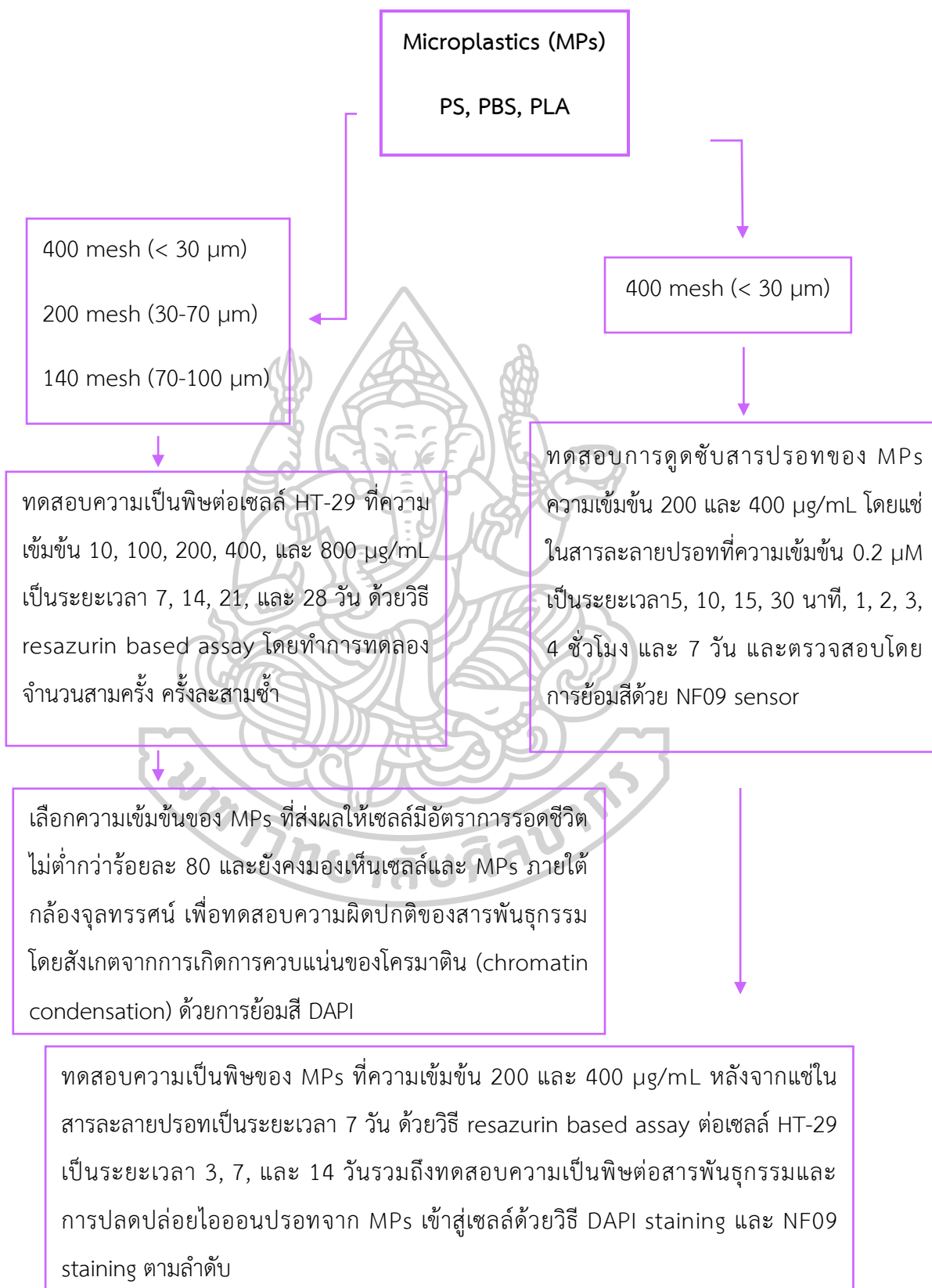
15. เครื่องควบคุมการดูดจ่ายสาร (Pipette controller)
(Thermo Fisher scientific, China, Catalog#9531)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
(บริษัท Hittich universal, รุ่น D700, Germany)
17. สไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer) (BOECO, Germany)
18. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope) (บริษัท Olympus, รุ่น CK30)
19. กล้องฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent microscope)
(บริษัท Olympus, รุ่น CKX53, USA)
20. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SE)
(บริษัท Czech Republic ยี่ห้อ Tescan รุ่น K850)
21. ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) (บริษัท SHELLAB, รุ่น SC06AD-2)
22. เครื่องชั่งสารเคมี (Balance) (บริษัท Satorius Basic)
23. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) (บริษัท Bio-active จำกัด รุ่น A066974)
24. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (บริษัท DAIHAN Scientific, รุ่น WB-11)
25. เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader)
(PACKARD, USA, รุ่นVICTORNivo)

สารเคมี

1. ไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลีแลคติกแอซิด
ขนาด 400, 200 และ 140 mesh ได้รับความอนุเคราะห์จาก
รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภกิจ สุทธิเรืองวงศ์ ภาควิชาวิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ
คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. Annexin V FIT C
(Immuno Tools, Germany, Catalog #31490013, Lot #490237)
3. Binding buffer
(Immuno Tools, Germany, Catalog #3149001BU, Lot #140216AnxBuff)
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Biochemical, USA, Catalog #PC0906)
5. 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)
(Sigma-Aldrich, USA, Catalog #28718903)

6. Doxorubicin (Sigma-Aldrich, USA, Lot #0000169091)
7. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
(DMEM low glucose) (Hyclone, USA, Catalog #SH30021.02 Lot#AG29741368)
8. Ethanol
9. Fetal Bovine Serum (FBS)
(Hyclone, USA, Catalog #SV30160.03, Lot #RB35957)
10. Hoechst 33342 solution 5 mL (abcam Catalog #228551 Lot.GR3359109-5)
11. L-glutamine (Corning®, USA, Catalog #SH30034.03, Lot #RB35957)
12. Mercury (II) chloride (HgCl_2)
(Daejung Chemicals, Catalog #7487-94-7, Lot #M3249OE1)
13. NF09 sensor ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.นันทินิตย์ วานิชชีวะ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (Petdum et al., 2020)
14. Phosphate Buffered Saline (PBS buffer) (Hyclone, USA, Catalog #SH30258.3)
15. Propidium iodide (Immuno Tools, Germany, Catalog #3149001, Lot #A0006)
16. Penicillin Streptomycin sulfate (M&H manufacturing)
17. Resazurin cell viability assay (Sigma-aldrich, USA, Catalog #SIA-R7017)
18. 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (Sigma-aldrich, USA, Cat #28718903)
19. Trypan blue (Fiuka, Cat #093590)
20. 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco Cat #25300054)
21. น้ำกลั่น (Distilled water)
22. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) (Omnipur, USA, Catalog #22619002)

ภาพรวมการศึกษา



การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

เลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 จำนวน 1×10^6 เซลล์ ในขวดเพาะเลี้ยง เซลล์ขนาด T-75 cm² ด้วยอาหารสูตร Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose (DMEM) (Hyclone, USA, Catalog #SH30021.02 Lot#AG29741368) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, USA, Catalog #SV30160.03, Lot #RB35957), 1% L-glutamine (Corning[®], USA, Catalog #SH30034.03 Lot #RB35957) และ 1% Penicillin Streptomycin (M&H manufacturing) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 วันและตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ หัวกลับ (inverted microscope) จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตได้ 80% confluent ทำการเก็บเซลล์ ด้วย trypsin-EDTA และปั่นตกตะกอน จากนั้นนำเซลล์ไปใช้ในการทดลองถัดไป เซลล์ HT-29 ที่ใช้ในการทดสอบอยู่ใน Passage ที่ 24 - 26 โดยเก็บเซลล์ทั้งหมดจำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อหลอด cryovial tube ด้วยอาหารสูตร DMEM ที่มี 20% FBS, 1% L-glutamine และ 5% DMSO ที่อุณหภูมิ -196 °C

การเตรียมไมโครพลาสติกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไมโครพลาสติก (particle shape) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM)

การเตรียมไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ทำการปั่นเม็ดพลาสติกให้มีขนาดเล็กลงจนเป็นผงไมโครพลาสติกด้วยเครื่อง ball mill การศึกษาครั้งนี้แบ่งไมโครพลาสติกเป็น 3 ช่วงขนาดตามขนาด mesh sieves ที่ใช้ร่อนไมโครพลาสติก คือขนาด 400, 200 และ 140 mesh โดยร่อนจนได้ไมโครพลาสติกที่มีขนาดเล็กกว่า 30 และ 30-70 และ 70-100 ไมโครเมตร ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยนำตัวอย่างไมโครพลาสติกที่ร่อนแล้วติดลงบนกระดาษคาร์บอนและนำไปเคลือบด้วย gold palladium จากนั้นถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด วิเคราะห์ความเป็นรูพรุน (Kalavizhi et al., 2022) และขนาดของไมโครพลาสติกด้วยโปรแกรม ImageJ โดยวิเคราะห์ไมโครพลาสติกอย่างน้อย 100 ชิ้น

ความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิस्टาไทรีนพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและ

พอลิแลคติกแอซิดต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29

การเตรียมไมโครพลาสติกเพื่อทดสอบกับเซลล์

สำหรับการเตรียมไมโครพลาสติกเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขั้นแรกจะเตรียม stock solution โดยซึ่งไมโครพลาสติกชนิดพอลิस्टาไทรีน ขนาด 400, 200 และ 140 mesh ตัวอย่างละ 0.015 กรัม จากนั้นเติมอาหารสูตร DMEM ที่มี 5% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin/Streptomycin ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ไมโครพลาสติกเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ทำเช่นเดียวกันกับไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและพอลิแลคติกแอซิด จากนั้นเจือจางสารละลายไมโครพลาสติกด้วยอาหารสูตร DMEM ที่มี 5% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin/Streptomycin ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายไมโครพลาสติกที่ 10, 100, 200, 400 และ 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

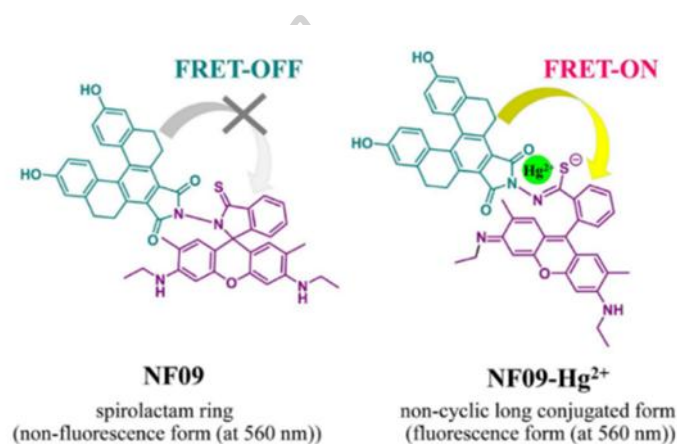
การตรวจวัดการดูดซับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ของไมโครพลาสติก

ดัดแปลงจาก (Petdum et al., 2020; Wu et al., 2019)

เตรียมสารละลาย HgCl_2 stock solution โดยการชั่ง HgCl_2 หนัก 1.10 mg จากนั้นผสม HgCl_2 ที่ชั่งได้กับน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 4 mL ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลาย HgCl_2 เข้มข้น 1,000 μM จากนั้นเจือจางสารละลาย HgCl_2 ด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้สารละลายปรอทความเข้มข้น 0.2 μM (0.5 ppm) เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของสารปรอทที่พบสะสมในตะกอนดินโดยพบอยู่ในช่วง 0.03 - 0.6 ppm (Gworek et al., 2020) เพื่อใช้ในการแช่ไมโครพลาสติกในการทดลองถัดไป

การเตรียมไมโครพลาสติกที่ดูดซับ Hg^{2+} ทำโดยการแช่ไมโครพลาสติกชนิดพอลิस्टาไทรีนพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดขนาด 400 mesh ความเข้มข้น 200 และ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ลงในสารละลาย HgCl_2 ความเข้มข้น 0.2 μM ในหลอดแก้วขนาด 1.5 mL เป็นระยะเวลา 5, 10, 15, 30 นาที, 1, 2, 3, 4 ชั่วโมง และ 7 วัน จากนั้นนำไมโครพลาสติกที่อยู่ในสารละลาย HgCl_2 มาปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 1,200 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที และดูสารละลายเหนือตะกอนที่ตกลงในภาชนะสำหรับทิ้งสารปนเปื้อนโลหะหนัก ล้างปรอทส่วนเกินด้วยน้ำปราศจากไอออนจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นตก และดูสารละลายเหนือตะกอนที่ ทำเช่นเดียวกันกับกลุ่มควบคุม โดยแช่ในน้ำปราศจากไอออนแทนการแช่ในสารละลาย HgCl_2

ตรวจสอบการดูดซับ Hg^{2+} ของไมโครพลาสติกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM-EDX) โดยใช้รังสีเอ็กซ์ในการให้พลังงานกับตัวอย่างและตรวจวัดการปลดปล่อยพลังงานที่ตัวอย่างปล่อยออกมา รวมถึงใช้เซนเซอร์ NF09 ในการตรวจสอบไอออนปรอทที่อยู่ภายในไมโครพลาสติกซึ่งอาศัยหลักการ การถ่ายทอดพลังงานระหว่างหมู่ที่ดูดกลืนแสง และหมู่ที่ได้รับพลังงาน และเกิดการเรืองแสงภายในโมเลกุลเดียวกัน หรือที่เรียกว่า “Fluorescence resonance energy transfer (FRET)” โดย NF09 จะเปลี่ยนจากจะเกิดการเรืองแสงสีส้ม เมื่อเข้าจับกับ Hg^{2+} และจะมีสีที่เข้มขึ้นตามความเข้มข้นของ Hg^{2+} (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การถ่ายทอดพลังงานเมื่อ NF09 ตรวจพบ Hg^{2+} (Petdum et al., 2020)

การตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin based assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 จำนวน 1.5×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 well plate ด้วยอาหารสูตร DMEM ที่มี 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin/Streptomycin เป็นระยะเวลา 2 วัน ในสภาวะที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบ 2 วัน เปลี่ยนอาหารเก่าออกจนหมดและเติมอาหารสูตร DMEM ที่มี 5% FBS, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin และไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิবিวทีลินซักซิเนต และพอลีแลคติกแอซิดขนาด 400, 200 และ 140 mesh ที่ความเข้มข้น 10, 100, 200, 400 และ 800 $\mu g/mL$ ตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง ด้วยวิธี resazurin based assay เมื่อครบระยะเวลา เปลี่ยนอาหารเก่าออกจนหมดและล้างด้วย PBS buffer จำนวน 2 ครั้ง ก่อนเติมอาหาร DMEM ที่ผสม 10% ของ 440 μM resazurin solution นำไปปมในที่มืดเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ถ่ายสารละลายลงเพลทใหม่และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 และ 600 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยเปรียบเทียบ %Reduced ของกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ

ซึ่งเป็นกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารสูตร DMEM ที่มี 5% FBS, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin และกลุ่มควบคุมเชิงบวก DOX (Doxorubicin) จากนั้นเลือกความเข้มข้นของไมโครพลาสติกที่ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80 และยังคงมองเห็นเซลล์และไมโครพลาสติก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในการทดลองถัดไป ทำเช่นเดียวกันกับไมโครพลาสติกที่ผ่านการแช่ในสารละลายปรอท โดยทำการทดลองจำนวนสามครั้ง (experimental triplicate) ครั้งละสามซ้ำ (biological triplicate)

วิธีการคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{TestOD570} - \text{TestOD600}) - (\text{BlankOD570} - \text{BlankOD600})}{(\text{ControlOD570} - \text{ControlOD600}) - (\text{BlankOD570} - \text{BlankOD600})} * 100$$

การตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์เยื่อปิวลาไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอท

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อปิวลาไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 จำนวน 5,000 เซลล์ต่อหลุมในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 well plate โดยเลี้ยงด้วยอาหารสูตร DMEM ที่มี 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% penicillin/streptomycin เป็นระยะเวลา 2 วัน ในสภาพที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบระยะเวลา 2 วัน จะทำการเปลี่ยนอาหารเก่าออกจนหมดและแทนที่ด้วยอาหารสูตร DMEM ที่มี 5% FBS, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin และไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดขนาด 400 mesh ที่ความเข้มข้น 400 µg/mL ตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ในวันที่ 3 ของการทดลองด้วยการย้อมสี annexin V/PI เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าวจะทำการเปลี่ยนอาหารเก่าออกจนหมดและล้างด้วย PBS buffer จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย 1X binding buffer (Immuno Tools, Germany, Cat. No. 3149001) ย้อมสีด้วย annexin V FITC/PI ตามคำแนะนำของบริษัท (Immuno Tools, Germany) และตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ CGM (complete growth medium) และกลุ่มควบคุมเชิงบวก DOX (doxorubicin)

**ความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสต์ชนิดพอลิไทรินพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและ
พอลิแลคติกแอซิดต่อสารพันธุกรรมของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29**

การศึกษาความผิดปกติของสารพันธุกรรมโดยการย้อมสี DAPI

เพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 จำนวน 1.5×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96-well plate ด้วยอาหารสูตร DMEM ที่มี 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin-Streptomycin เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 2 วัน ในสภาวะที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบระยะเวลา เปลี่ยนอาหารเก่าออกจนหมดและแทนด้วยอาหารสูตร DMEM ที่มี 5% FBS, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin และไมโครพลาสต์ชนิดพอลิไทริน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและพอลิแลคติกแอซิดขนาด 400 mesh ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL โดยตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในวันที่ 28 ของการทดลอง โดยการย้อมสี DAPI เมื่อครบระยะเวลา จะเปลี่ยนอาหารเก่าออกจนหมดและ ล้างด้วย PBS buffer จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นคงสภาพเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นระยะเวลา 10 นาที ล้างด้วย PBS buffer จำนวน 1 ครั้ง ทำให้ผนังเซลล์รั่วด้วย 0.1% Triton X-100 เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้สี DAPI สามารถเข้าติดนิวเคลียสได้ จากนั้นล้างด้วย PBS buffer จำนวน 2 ครั้ง และย้อมด้วยสี DAPI 1 µg/mL 5 นาที และล้างด้วย PBS buffer ก่อนนำไปถ่ายรูปรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อตรวจสอบการเกิดการควบแน่นของโครมาติน (condensation chromatin) โดยการนับจำนวนนิวเคลียสอย่างน้อย 1,000 เซลล์ต่อกลุ่มทดสอบ ทำเช่นเดียวกันกับไมโครพลาสต์ที่ผ่านการแช่ในสารละลายปรอท โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ CGM (complete growth medium) และกลุ่มควบคุมเชิงบวก H₂O₂ (hydrogen peroxide) โดยทำการทดลองจำนวนสามครั้ง (experimental triplicate) ครั้งละสามซ้ำ (biological triplicate)

ตรวจสอบการปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิด หลังเมือก HT-29

ดัดแปลงจาก (Petdum et al., 2020; Wu et al., 2019)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 จำนวน 1.5×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 well plate ด้วยอาหารสูตร DMEM ที่มี 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin/Streptomycin เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 2 วัน ในสภาวะที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบระยะเวลา 2 วัน เปลี่ยนอาหารเก่าออกจนหมดและเติมอาหารสูตร DMEM ที่มี 5% FBS, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin และไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิবিทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดขนาด 400 mesh ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL ที่ผ่านการแช่ในสารละลายปรอทมาแล้ว 7 วัน เก็บผลการทดลองในวันที่ 3, 7 และ 14 ของการทดลอง โดยการย้อมสีด้วยเซนเซอร์ NF09 เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าวทำการเปลี่ยนอาหารเก่าออกจนหมดและล้างด้วย PBS buffer จำนวน 2 ครั้ง คงสภาพเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde 10 นาที และย้อมสีเซลล์ด้วย NF09 sensor ที่ความเข้มข้น 30 µM เป็นระยะเวลา 5 นาทีและนำไปถ่ายรูปรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อตรวจสอบการสะสมของไอออนปรอทภายในเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ CGM (complete growth medium) และกลุ่มควบคุมเชิงบวก HgCl₂ 0.2 µM

การวิเคราะห์ทางสถิติ

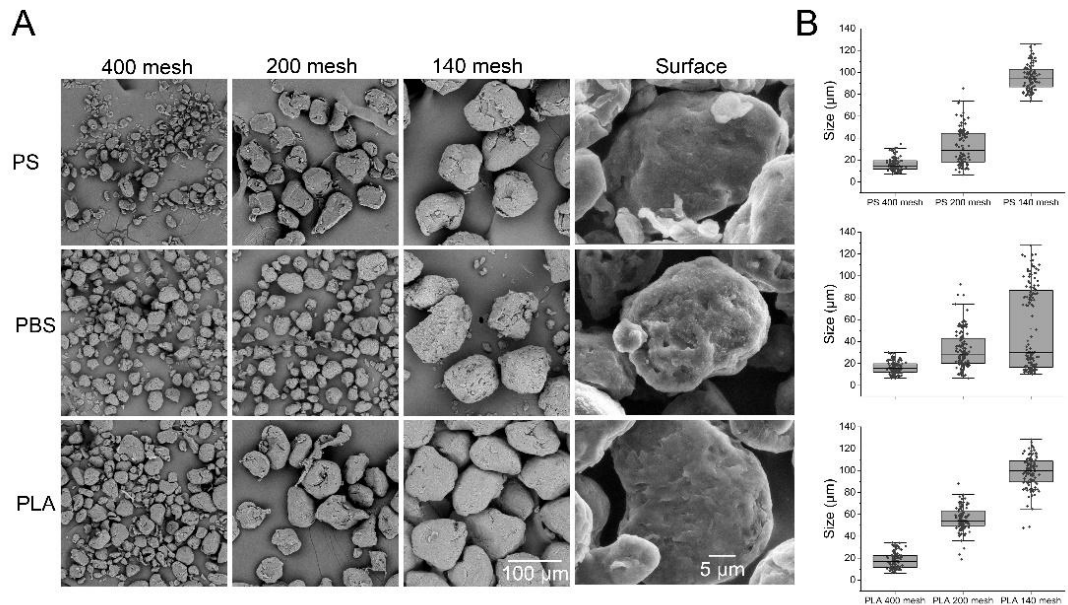
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการศึกษาครั้งนี้ ใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) โดยจะทำการตรวจสอบรูปแบบการแจกแจงของข้อมูลด้วยวิธี shapiro-wilk test หากข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ แต่มีค่า variances ไม่เท่ากัน จะใช้คำสั่ง Dunnett's C โดยใช้สถิติแบบ Kruskal-Wallis ในการวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ถ้ามีค่า variances เท่ากันจะใช้คำสั่ง one-way ANOVA แบบ Tukey ในการวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3) และค่า *p-value* < 0.05

บทที่ 4

ผลการศึกษา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไมโครพลาสติก (particle shape) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM)

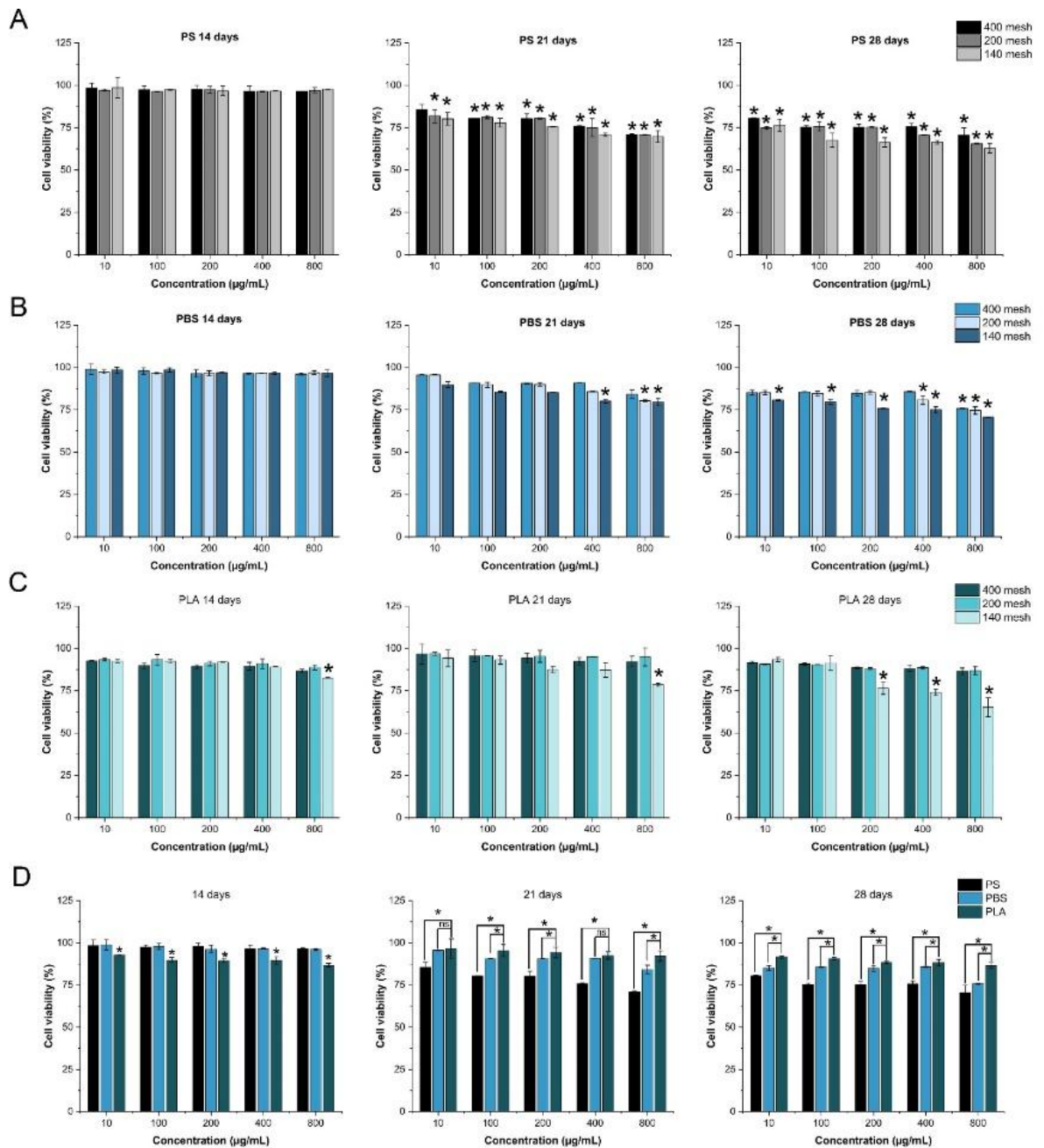
ผลการศึกษาตัวอย่างเม็ดพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน (PS) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (PBS) และพอลิแลคติกแอซิด (PLA) ที่ผ่านการบดด้วยเครื่อง ball mill และร่อนด้วย mesh sieves ขนาด 400 200 และ 140 mesh เพื่อให้ได้ไมโครพลาสติกขนาดเล็กกว่า 30, 30-70 และ 70-100 ไมโครเมตร ตามลำดับ และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไมโครพลาสติก พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด มีลักษณะเป็นเกล็ด มีรูปร่างไม่แน่นอน (ภาพที่ 10A) คล้ายกับไมโครพลาสติกที่พบในสิ่งแวดล้อม และเมื่อพิจารณาลักษณะพื้นผิวของไมโครพลาสติกพบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน และพอลิแลคติกแอซิดมีลักษณะพื้นผิวเรียบกว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และเมื่อวิเคราะห์ความเป็นรูพรุน (porosity) ของไมโครพลาสติกจากภาพถ่าย SEM ด้วยโปรแกรม ImageJ ผลการคำนวณความเป็นรูพรุน (percentage of porosity) ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด มีค่าความเป็นรูพรุนเท่ากับ 4.94%, 11.02%, และ 7.10% ตามลำดับ และเมื่อนำภาพถ่ายที่ได้มาวิเคราะห์การกระจายตัวของขนาด (size distribution) ด้วยโปรแกรม ImageJ โดยวิเคราะห์จากภาพถ่ายไมโครพลาสติกอย่างน้อย 100 เม็ด พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ที่ผ่านการร่อนด้วย mesh sieves ขนาด 400 mesh มีขนาดเม็ดไมโครพลาสติกเฉลี่ย 16.22 ± 6.25 , 16.23 ± 5.45 และ 18.07 ± 7.29 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อร่อนผ่าน mesh sieves ขนาด 200 mesh พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และชนิดพอลิแลคติกแอซิด มีขนาดเม็ดไมโครพลาสติกเฉลี่ย 32.50 ± 16.62 , 32.32 ± 16.45 , และ 55.95 ± 11.12 ตามลำดับ และไมโครพลาสติกที่ร่อนผ่าน mesh sieves ขนาด 140 mesh พบว่าไมโครพลาสติก ชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และชนิดพอลิแลคติกแอซิด มีขนาดเม็ดไมโครพลาสติกเฉลี่ย 95.49 ± 11.21 , 50.92 ± 37.39 , และ 98.52 ± 14.17 ตามลำดับ (ภาพที่ 10B)



ภาพที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด (A) การกระจายตัว ของขนาดไมโครพลาสติกทั้ง 3 ชนิด (size distribution) และลักษณะพื้นผิวของไมโครพลาสติกขนาด 400 mesh (B) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ ($n \geq 100$)

ความเป็นพิษของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ด้วยวิธี Resazurin based assay

จากการทดสอบความเป็นพิษของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดขนาด 400 mesh (30 μm), 200 mesh (30-70 μm), และ 140 mesh (70-100 μm) ที่ความเข้มข้น 10-800 μg/mL ต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 โดยทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 7, 14, 21, และ 28 วัน ผลการศึกษาพบว่าเมื่อทำการทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน และพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตเริ่มพบความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 21 วัน (ภาพที่ 11A, B) ในขณะที่เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติก ชนิดพอลิแลคติกแอซิดขนาด 140 mesh ที่ความเข้มข้น 800 μg/mL ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง ตั้งแต่วันที่ 14 ของการทดลอง โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เฉลี่ย $82.59 \pm 0.17\%$ (ภาพที่ 11C) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด พบว่าเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน ไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน และพอลิแลคติกแอซิด ในขณะที่เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 21 และ 28 วัน พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและพอลิแลคติกแอซิด (ภาพที่ 11D)

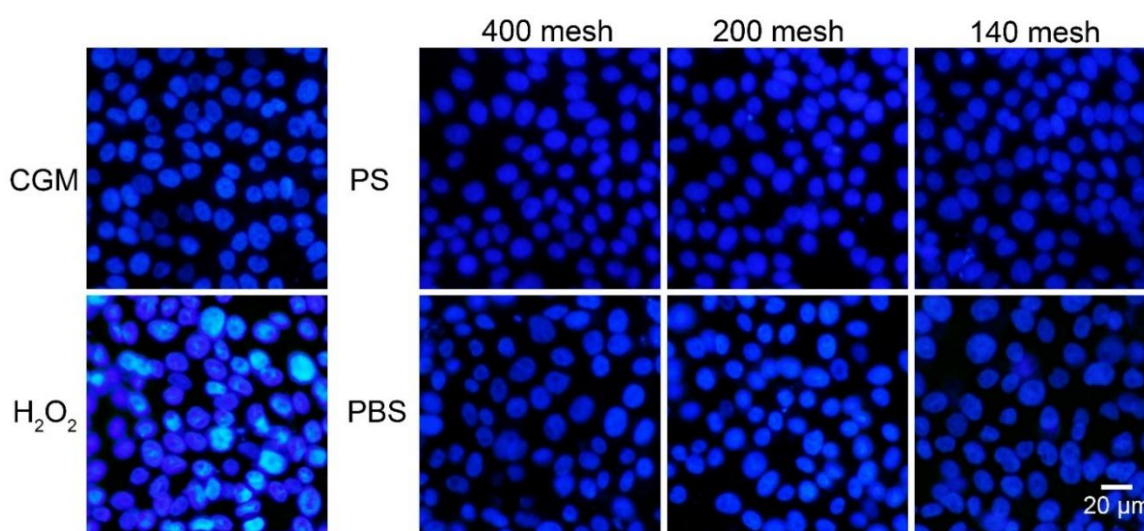


ภาพที่ 11 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน (A) พอลิবিวิทิลีนซัคซิเนต (B) และพอลิแลคติกแอซิด (C) ขนาด 400 mesh, 200 mesh, และ 140 mesh ที่ความเข้มข้น 0-800 $\mu\text{g/mL}$ และกราฟเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบกับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิবিวิทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh เป็นระยะเวลา 14, 21, และ 28 วัน

(D) โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3) *P-value <0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) CGM; complete growth medium

ผลการศึกษาความเป็นพิษของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิবিทิลีนซัคซิเนต และ พอลิแลคติกแอซิดต่อสารพันธุกรรมของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29

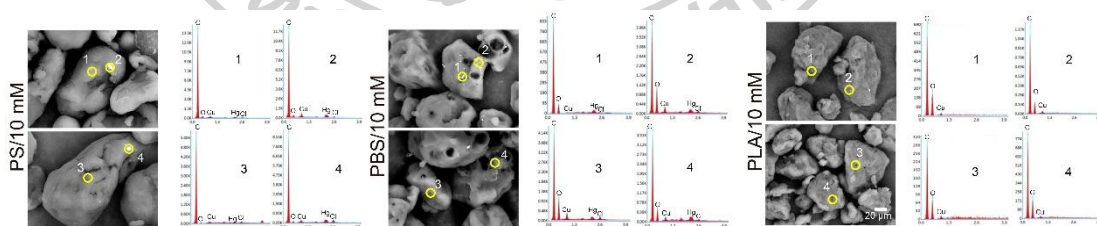
จากการตรวจสอบการเกิดการขดตัวแน่นของโครมาติน (condensed chromatin) ภายในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ด้วยการย้อมสี DAPI เมื่อได้รับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิবিทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh (30 μ m), 200 mesh (30-70 μ m), และ 140 mesh (70-100 μ m) ที่ความเข้มข้น 10-800 μ g/mL โดยทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน และพอลิবিทิลีนซัคซิเนตที่ใช้ในการทดสอบทุกขนาดและทุกความเข้มข้นไม่ส่งผลให้เกิดการขดตัวแน่นของโครมาตินภายในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 (ภาพที่ 12) ในขณะที่เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดไม่สามารถตรวจวัดได้ เนื่องจากการย้อมสี DAPI จำเป็นต้องล้างหลายครั้ง จึงส่งผลให้เซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดหลุดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการศึกษา จึงไม่สามารถถ่ายภาพนิวเคลียสของเซลล์และตรวจวิเคราะห์ได้



ภาพที่ 12 การขจัดตัวแน่นของโครมาติน (condensed chromatin) ในเซลล์เยื่อปิวลาไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต ขนาด 400 mesh 200 mesh และ 140 mesh เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยการย้อมสี DNA ด้วยสี DAPI

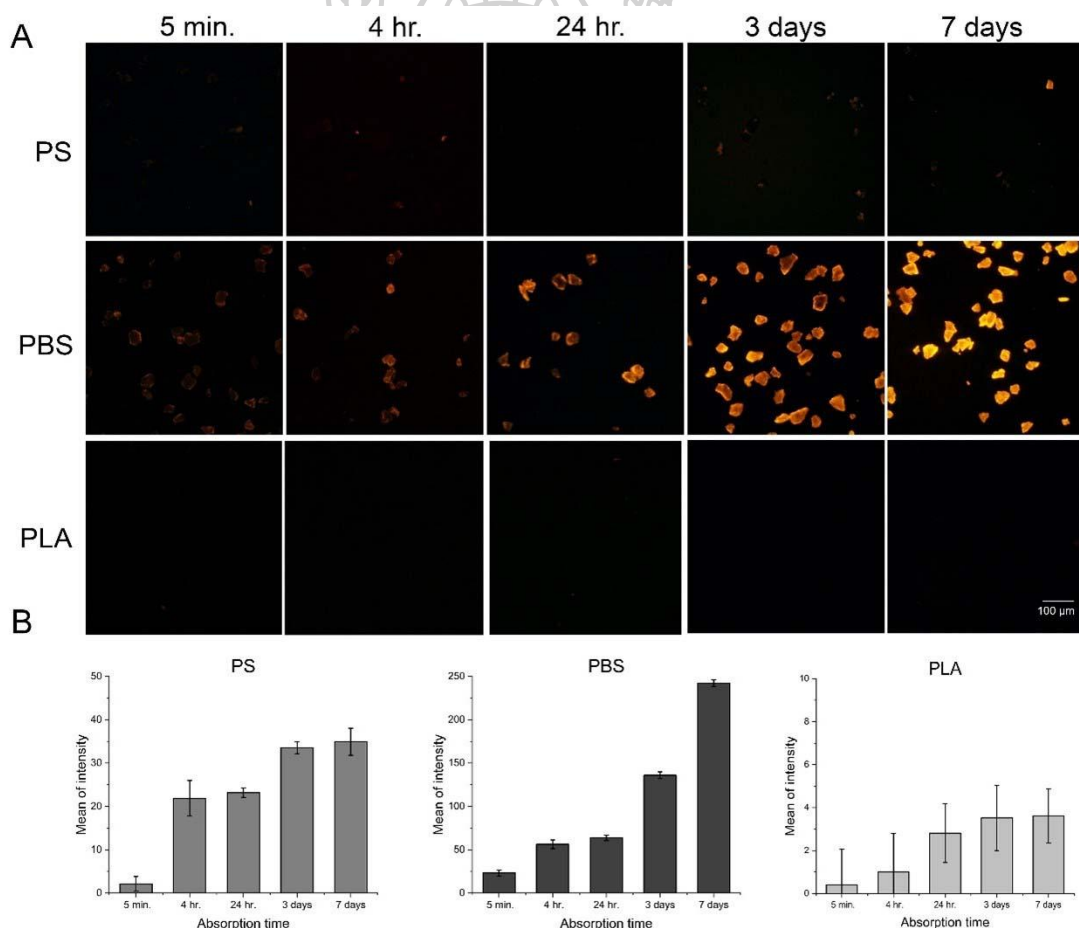
ผลการศึกษาการดูดซับสารปรอทของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดด้วยเทคนิค SEM-EDX และการย้อมสีด้วยเซนเซอร์ตรวจวัดปรอท (NF09)

จากการตรวจวัดการดูดซับสารละลายปรอท (HgCl_2) ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ด้วยการถ่ายภาพภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด และวิเคราะห์ธาตุด้วยเทคนิค EDX โดยเฉลี่ยจาก 4 บริเวณ พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนที่แช่ในสารละลายปรอทเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ เป็นระยะเวลา 7 วัน มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักธาตุ คาร์บอน (C) ออกซิเจน (O) คอปเปอร์ (Cu) คลอรีน (Cl) และปรอท (Hg) เท่ากับ 94.72%, 4.43%, 0.29%, 0.39%, และ 0.42% ตามลำดับ ไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตที่แช่ในสารละลายปรอทเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ เป็นระยะเวลา 7 วัน มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักธาตุ คาร์บอน ออกซิเจน คอปเปอร์ คลอรีน และปรอท เท่ากับ 84.51%, 5.32%, 1.89%, 0.75%, และ 7.51% ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ SEM-EDX ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดแช่ในสารละลายปรอทเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ เป็นระยะเวลา 7 วัน มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักธาตุ คาร์บอน ออกซิเจน คอปเปอร์ คลอรีน และปรอท เท่ากับ 74.31%, 23.44%, 0.7%, 1.8%, และ 0.17% ตามลำดับ (**ภาพที่ 13**)



ภาพที่ 13 ผลการตรวจวัดการสะสมปรอทของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh ที่แช่ในสารละลายปรอทเข้มข้น 10 mM เป็นระยะเวลา 7 วัน ด้วยเทคนิค SEM-EDX; วงกลมสีเหลืองแสดงถึงบริเวณที่วิเคราะห์ธาตุ

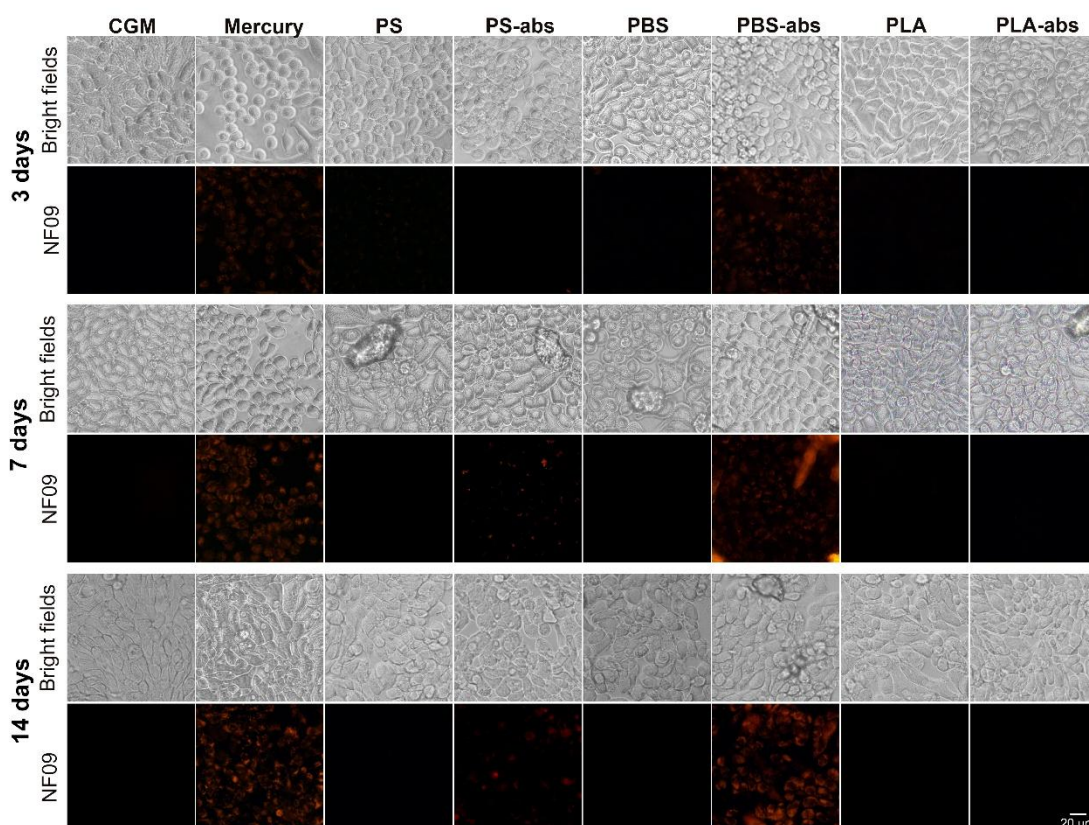
จากการตรวจสอบการดูดซับสารละลายปรอท ($HgCl_2$) ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิไวนิลิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ด้วยการย้อมสีเซนเซอร์ตรวจวัดปรอท (NF09) ผลการศึกษาพบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิไวนิลิลีนซัคซิเนตสามารถดูดซับสารละลายปรอทได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนและพอลิแลคติกแอซิด โดยสังเกตจากการย้อมสี NF09 ตั้งแต่การแช่ในสารละลายปรอทเป็นระยะเวลา 5 นาที (ภาพที่ 14A) และเมื่อวิเคราะห์ความเข้มการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ด้วยโปรแกรม ImageJ ผลการศึกษาพบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนพอลิไวนิลิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดที่แช่ในสารละลายปรอทเป็นระยะเวลา 7 วัน มีค่าการเรืองแสง 34.91 ± 3.12 , 242.03 ± 3.87 , 3.61 ± 1.26 (ภาพที่ 14B) ตามลำดับ



ภาพที่ 14 การดูดซับสารปรอทของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิไวนิลิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh ที่แช่ในสารละลายปรอทความเข้มข้น $0.2 \mu M$ เป็นระยะเวลา 5 นาที 4 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 3 วัน และ 7 วัน ด้วยการย้อมสีปรอทภายในเซลล์ด้วย NF09 sensor (สีส้ม)

ผลการตรวจสอบการปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ ชนิดหลังเมือก HT-29

จากการตรวจสอบการปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 และทดสอบด้วยไมโครพลาสติก ที่ผ่านการแช่ในสารละลายปรอท (HgCl_2) ที่ความเข้มข้น $0.2 \mu\text{M}$ เป็นระยะเวลา 7 วันก่อนทดสอบกับเซลล์เป็นระยะเวลา 3, 7, และ 14 วัน ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิไวนิลพิลิซินซ์ซินเนตเริ่มพบการเรืองแสงของ NF09 ภายในเซลล์ในวันที่ 3 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่าเกิดการปลดปล่อยสารปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 โดยสังเกตจากการเรืองแสงสีส้มของ NF09 ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดสอบกับเซลล์ (ภาพที่ 15)

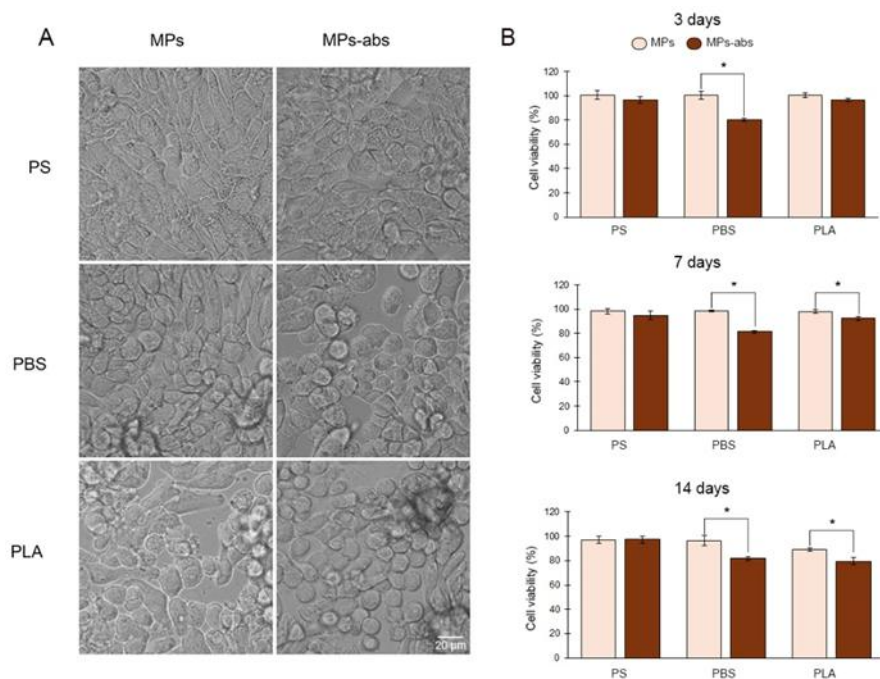


ภาพที่ 15 การปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิไวนิลพิลิซินซ์ซินเนต และพอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh ที่ผ่านการแช่ในสารละลายปรอทเข้มข้น $0.2 \mu\text{M}$ 7 วันก่อนทดสอบกับเซลล์เป็นระยะเวลา 3, 7, และ 14 วัน โดยการย้อมสีไอออนปรอทภายในเซลล์ด้วย NF09 sensor (สีส้ม) โดย

เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ CGM (complete growth medium) และกลุ่มควบคุมเชิงบวก HgCl_2 0.2 μM

ผลความเป็นพิษของไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอทต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ด้วยวิธี resazurin based assay

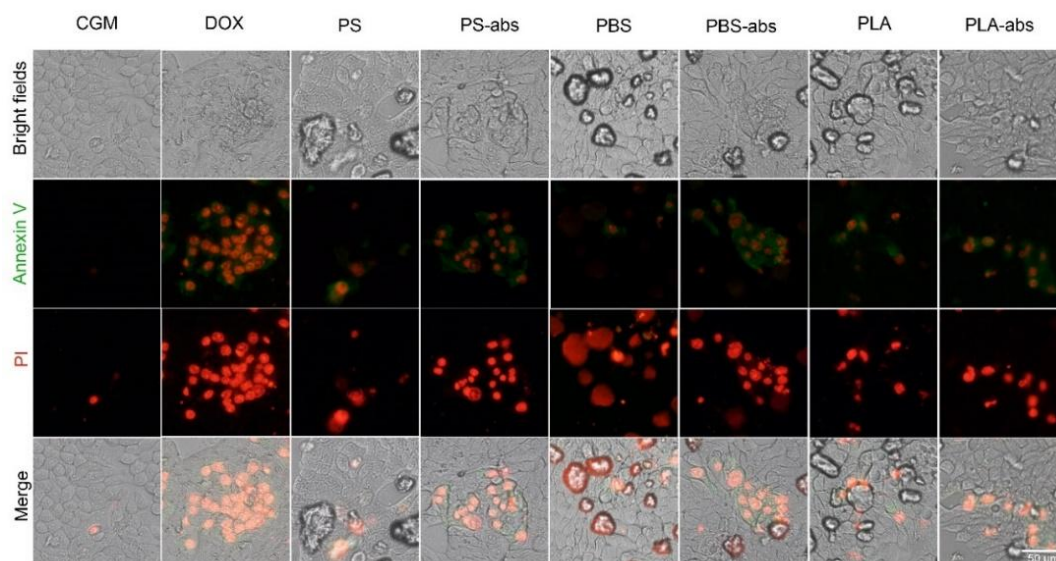
จากการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ร่วมกับไมโครพลาสติกที่แช่ในสารละลายปรอท (HgCl_2) เป็นระยะเวลา 7 วันก่อนทดสอบกับเซลล์เป็นระยะเวลา 3, 7, และ 14 วัน ผลการศึกษาพบว่าเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ที่ทดสอบกับไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและพอลิแลคติกแอซิดที่ดูดซับไอออนปรอทมีลักษณะกลม ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษต่อของเซลล์ (ภาพที่ 16A) เมื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนและไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนที่แช่ในสารละลายปรอทเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เฉลี่ย $100.75 \pm 3.54\%$ และ $96.70 \pm 2.64\%$ ตามลำดับ เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดและไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดที่แช่ในสารละลายปรอทมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เฉลี่ย $100.85 \pm 2.0\%$ และ $96.81 \pm 1.17\%$ ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตที่แช่ในสารละลายปรอทพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่าเฉลี่ย $100.63 \pm 3.05\%$ และ $80.50 \pm 1.24\%$ ตามลำดับ และเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 7 วันพบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดที่แช่ในสารละลายปรอทส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลงแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้แช่ในสารละลายปรอทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เฉลี่ย $81.26 \pm 1.12\%$ และ $92.50 \pm 1.70\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นเช่นเดียวกันกับกลุ่มที่ทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตและไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดที่แช่ในสารละลายปรอทมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เฉลี่ย $81.53 \pm 1.83\%$ และ $79.52 \pm 2.63\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 16B)



ภาพที่ 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิวิทีลีน-ซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh และไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท เมื่อทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน (A) อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิวิทีลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด และไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท (B) โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3) *P-value <0.05 เทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท

ผลการศึกษาแบบการตายของเซลล์เยื่อหุ้มเซลล์ไขมันชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อได้รับ ไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอท

การตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (apoptosis) มักเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับความเสียหายโดยเริ่มจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการขาดตัว เกิดการแตกหักของสารพันธุกรรม และโครมาตินหดตัวแน่น (condensed chromatin) จากนั้นเซลล์จะเริ่มเกิดการหดตัวและกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อให้เกิดการทำลายชิ้นส่วนของเซลล์ที่เสียหาย ในการแยกกระยะการตายของเซลล์สามารถตรวจสอบได้โดยการย้อมสีเรืองแสง โดยย้อมสี annexin V FITC เพื่อตรวจสอบกระยะการตายของเซลล์ในระยะเริ่มต้น (early apoptosis) และย้อมสี propidium iodide (PI) เพื่อย้อมสารพันธุกรรมภายในเซลล์ จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์เยื่อหุ้มเซลล์ไขมันชนิดหลังเมือก HT-29 ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิবিทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh ที่ความเข้มข้น 400 µg/mL รวมถึงไมโครพลาสติกที่ผ่านการแช่ในสารละลายปรอทที่ความเข้มข้น 0.2 µm เป็นระยะเวลา 7 วันก่อนทดสอบกับเซลล์เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทมีการติดสี annexin V/PI มากกว่ากลุ่มควบคุมโดยเฉพาะกลุ่มที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท เมื่อตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์จากการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) โดยสังเกตได้จากการติดสีของ annexin V เนื่องจาก phosphatidyl serine (PS) เคลื่อนที่จากเยื่อหุ้มเซลล์ด้านใน (inner membrane) ออกมาอยู่บริเวณด้านนอกทำให้เกิดการจับกับ annexin V และการติดสีของ PI ซึ่งเกิดจากการที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรอยรั่วจึงทำให้สี PI สามารถเข้าจับกับสารพันธุกรรมภายในเซลล์ (ภาพที่ 17)

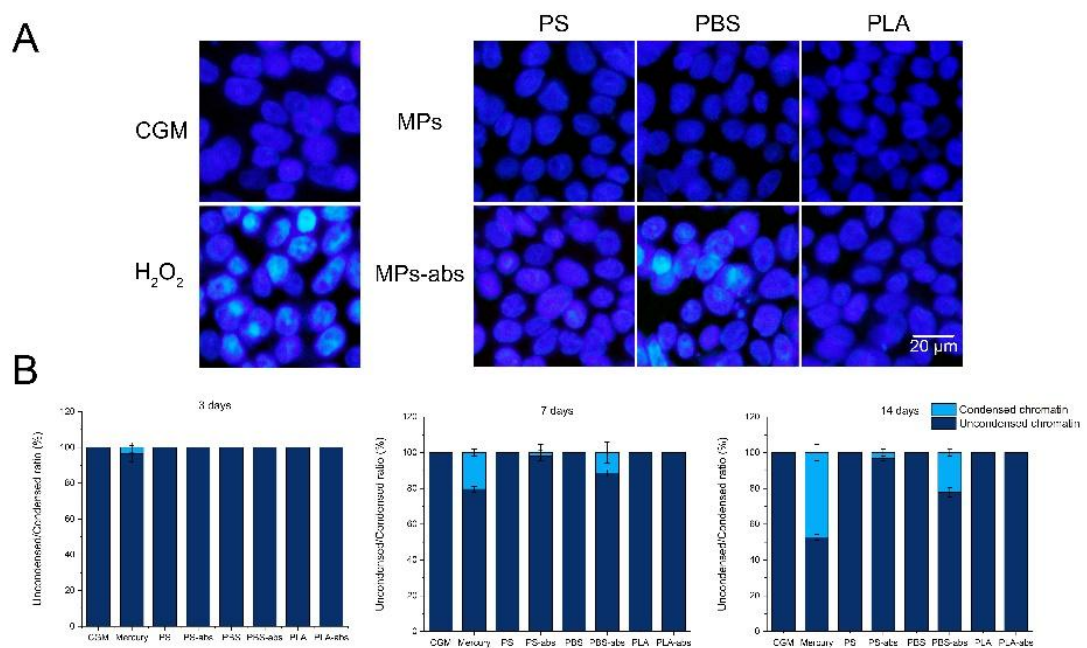


ภาพที่ 17 รูปแบบการตายของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด และไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอท 7 วันก่อนทดสอบกับเซลล์เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย annexin V/PI โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (CGM; Complete growth medium, Negative control), และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (DOX; Doxorubicin, Positive control)

ผลการศึกษาความเป็นพิษของไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทต่อสารพันธุกรรมของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29

จากการตรวจสอบการเกิดการหดตัวแน่นของโครมาติน (condensed chromatin) ภายในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ด้วยการย้อมสี DAPI เมื่อได้รับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh ที่ความเข้มข้น 400 µg/mL และไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอท พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ร่วมกันกับไมโคร-พลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทไม่ส่งผลให้เกิดการหดตัวแน่นของโครมาติน ในขณะที่เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 7 วันพบว่าเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนและพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตที่ดูดซับไอออนปรอทส่งผลให้เซลล์เกิดการหดตัวแน่นของสารพันธุกรรมภายในเซลล์และเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน ในขณะที่เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดพบว่าทั้งไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดและไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดที่ดูดซับไอออนปรอทไม่ส่งผลให้เซลล์เกิดการหดตัวแน่นของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ (**ภาพที่ 18A**) และเมื่อวิเคราะห์สัดส่วนระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่เกิดการหดตัวแน่นของโครมาตินเมื่อทดสอบด้วย

ไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนที่ดูดซับไฮออนปรอทเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าสัดส่วนระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่เกิดการหดตัวของโครมาติน (uncondensed chromatin \pm SD/condensed chromatin \pm SD) คือ $98.16 \pm 3/1.84 \pm 4.58$ และเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิวิทิลีนซัคซิเนตที่ดูดซับไฮออนปรอทมีสัดส่วนระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่เกิดการหดตัวของโครมาตินคือ $88.61 \pm 2/11.39 \pm 5.86$ และพบการเกิดการหดตัวของโครมาตินเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน (ภาพที่ 18B)



ภาพที่ 18 การเกิดการหดตัวของโครมาตินในเซลล์เยื่อลำไส้มนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 เมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกเป็นระยะเวลา 14 วัน (A), กราฟสัดส่วนระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่เกิดการหดตัวของโครมาตินเมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอทเป็นระยะเวลา 3, 7, และ 14 วัน โดยการย้อมสี DNA ด้วย DAPI

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

จากรายงานการพบการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ รวมถึงพบโลหะหนักในตัวอย่างไมโครพลาสติกที่สะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เกิดความกังวลต่อผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการได้รับไมโครพลาสติกต่อร่างกายมนุษย์ (Kuroiwa et al., 2023; Kutralam-Muniasamy et al., 2021; Lehner et al., 2020) การศึกษาครั้งนี้เป็นหนึ่งในการศึกษาเพื่อประเมินผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับร่างกายมนุษย์เมื่อได้รับไมโครพลาสติกและไมโครพลาสติกที่ดูดซับโลหะหนัก โดยทำการศึกษาความเป็นพิษระดับเซลล์ของไมโครพลาสติก 3 ชนิด ซึ่งเป็นพลาสติกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและสามารถตรวจพบสะสมในสิ่งแวดล้อม คือ พอลิสไตรีน (PS) รวมถึงพลาสติกชีวภาพที่ผลิตขึ้นเพื่อทดแทนเทอร์โมพลาสติกซึ่งใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลายในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (PBS) และพอลิแลคติกแอซิด (PLA) โดยไมโครพลาสติกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไมโครพลาสติกที่มีรูปร่างไม่แน่นอน และมีขนาดอยู่ในช่วง 25-100 μm ซึ่งคล้ายกับที่ตรวจพบสะสมในสิ่งแวดล้อม (Falakdin et al., 2024; Leistenschneider et al., 2024)

เพื่อประเมินผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการได้รับไมโครพลาสติกต่อมนุษย์การศึกษานี้จึงทำการทดสอบความเป็นพิษของไมโครพลาสติกต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ของมนุษย์ชนิดหลังเมือก HT-29 ด้วยวิธี resazurin based assay โดยทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh, 200 mesh, และ 140 mesh ที่ความเข้มข้น 0-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 28 วัน ผลการศึกษาพบว่าเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน เซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน และพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบเป็น 21 และ 28 วันพบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดยใช้ไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนขนาด 460 nm-100 μm ที่ความเข้มข้น 1-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยทำการทดสอบกับเซลล์ผิวหนังมนุษย์เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนไม่เป็นพิษต่อเซลล์ รวมถึงการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ต่อเซลล์ผิวหนัง และเซลล์ bone marrow stem cells (BMSCs) ทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 3 วัน ไม่เป็นพิษ

ต่อเซลล์ โดยพบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 90% (Yan et al., 2023) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของไมโครพลาสติก

จากการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin based assay พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิแลคติกแอซิดขนาด 140 mesh ที่ความเข้มข้น 800 µg/mL ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเมื่อทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วันโดย มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย $82.59 \pm 0.17\%$ ซึ่งอาจเกิดจากสารเติมแต่ง (additive) เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับพลาสติก เช่น สารในกลุ่มของ phthalate esters (PAEs) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จากการศึกษาการปลดปล่อย di-(2-ethylhexyl) phthalate จากพลาสติกทางการค้าที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และพลาสติกที่ได้จากการกลั่นน้ำมัน (fossil resources) 3 ชนิด ได้แก่ พอลิไวนิลคลอไรด์ พอลิสไตรีน และพอลิแลคติกแอซิด โดยทดสอบเป็นระยะเวลา 0, 8, 15, และ 30 วัน โดยบ่มไมโครพลาสติกด้วยสาร persulfate oxidation (PO) ซึ่งเป็นหนึ่งในสารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในการบำบัดดินและน้ำ รวมถึงช่วยส่งเสริมการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ และให้ความร้อน ผลการศึกษาพบว่าไมโครพลาสติกทั้ง 3 ชนิดมีการปลดปล่อยสาร di-(2-ethylhexyl) phthalate เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 30 วันพบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์ พอลิสไตรีน และพอลิแลคติกแอซิดมีการปลดปล่อยสาร di-(2-ethylhexyl) phthalate 0.702%, 0.751%, และ 0.571% ตามลำดับ (Mao et al., 2024)

เมื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด พบว่าไมโครพลาสติกที่มีขนาด 140 mesh (70-100 µm) ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่ที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าไมโครพลาสติกขนาด 400 mesh (<30 µm) และ 200 mesh (30-70 µm) ทั้งนี้อาจเกิดจากไมโครพลาสติกขนาดใหญ่ส่งผลให้เกิดความเสียหายทางกายภาพ และรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรีย ทั้งนี้ การศึกษาส่วนใหญ่นิยมตรวจประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของนาโนพลาสติกและไมโครพลาสติกขนาดเล็ก (20 nm-50 µm) ซึ่งผลการศึกษาพบว่านาโนพลาสติกและไมโครพลาสติกขนาดเล็กสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และเป็นพิษต่อเซลล์ (Ruan et al., 2023) ในความเป็นจริงแล้วไมโครพลาสติกที่พบในธรรมชาติและมีการสะสมในสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายช่วงขนาดซึ่งพบอยู่ในช่วงขนาดตั้งแต่น้อยกว่า 25-5,000 µm จากรายงานการเก็บตัวอย่างไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมพบการสะสมของไมโครพลาสติกมีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ขนาดน้อยกว่า 100 µm (Ma et al., 2020), และขนาด 100-400 µm (Yu et al., 2023; Yu et al., 2022) รวมถึงรายงานการพบไมโครพลาสติก

ในปลาซึ่งเป็นอาหารของมนุษย์มีขนาดเฉลี่ยอยู่ในช่วงตั้งแต่ 10-5,000 μm โดยพบไมโครพลาสติกขนาด 100-500 μm มากที่สุด (Arshad et al., 2023) ดังนั้นมนุษย์จึงมีโอกาสได้รับไมโครพลาสติกทั้งขนาดเล็ก และขนาดใหญ่

เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิด ขนาด 400 mesh ที่ทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด ซึ่งอาจเกิดจากไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนมีสไตรีนมอนอเมอร์เป็นองค์ประกอบในการผลิต ทั้งนี้สไตรีนมอนอเมอร์สามารถแพร่ออกจากไมโครพลาสติกได้เมื่อได้รับความร้อน จากการศึกษาทดสอบความเป็นพิษของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนโดยตรวจพบสไตรีนมอนอเมอร์ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ และเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตลดลง เกิดการหลั่งสารอนุมูลอิสระ และสารก่อการอักเสบ (Choi et al., 2020) และหากสัมผัสจะส่งผลให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง ดวงตา รวมถึงระบบประสาทได้ (Andrady, 2011)

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของไมโครพลาสติกพบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนและพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต ขนาด 400 mesh ($<30 \mu\text{m}$), 200 mesh (30-70 μm), และ 140 mesh (70-100 μm) ที่ความเข้มข้น 10-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยทดสอบเป็นระยะเวลา 28 วัน ไม่ส่งผลให้เกิดการขดตัวของโครมาติน ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของไมโครพลาสติกต่อเซลล์สืบพันธุ์ของเม่นทะเล (*Paracentrotus lividus*) โดยพบว่าไมโครพลาสติกส่งผลให้เซลล์สืบพันธุ์ของเม่นทะเลเกิดความผิดปกติแต่ไม่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อสารพันธุกรรม (Mottola et al., 2024)

ผลการศึกษาการดูดซับไอออนปรอทของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต และพอลิแลคติกแอซิดเมื่อแช่ในสารละลายปรอทเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตมีการดูดซับไอออนปรอทมากที่สุดโดยสังเกตจากการติดสีของ NF09 และเมื่อวิเคราะห์ค่าการเรืองแสงของลูออเรสเซนซ์ด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 242.03 ซึ่งไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตสามารถดูดซับไอออนปรอทได้มากเมื่อเทียบกับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนและพอลิแลคติกแอซิด เนื่องจากพื้นที่ผิวของไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตมีความขรุขระมากกว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนและพอลิแลคติกแอซิด โดยสังเกตจากภาพถ่าย SEM และเมื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นรูพรุนของไมโครพลาสติกทั้ง 3 ชนิด

พบว่าไมโคร-พลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตมีค่าความเป็นรุกรานมากที่สุด ดังนั้นไมโครพลาสติกชนิด พ อ ลี บิว - ทิลีนซัคซิเนตจึงมีพื้นที่สัมผัสกับสารละลายปรอทมากกว่าไมโครพลาสติกชนิดอื่นและส่งผลให้สามารถดูดซับสารปรอทได้มากกว่าไมโครพลาสติกชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการดูดซับสารตะกั่ว (Pb^{2+}) ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต ซึ่งเกิดจากการจับกันระหว่างหมู่คาร์บอกซิลบนเม็ดไมโครพลาสติกและไอออนบวกของโลหะหนัก โดยจับกันด้วยอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิต (Li et al., 2022; Wang et al., 2024) และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนมีการดูดซับไอออนปรอทน้อยที่สุด ซึ่งอาจเกิดจากการที่ไอออนปรอทจับกับไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนด้วยพันธะไฮโดรเจน จากการศึกษาการดูดซับสารหนู (As^{3+}) ของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนพบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนสามารถดูดซับสารหนูได้เช่นกัน (Dong et al., 2020)

จากการตรวจวัดการปลดปล่อยไอออนปรอทจากไมโครพลาสติกเข้าสู่เซลล์ด้วยการย้อมสี NF09 พบว่าไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทสามารถปลดปล่อยไอออนปรอทเข้าสู่เซลล์ได้ โดยสังเกตจากการเรืองแสงของ NF09 ซึ่งเมื่อทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนและไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตที่ดูดซับไอออนปรอท พบว่าเซลล์มีการเรืองแสงของ NF09 ซึ่งแสดงถึงการสะสมไอออนปรอทภายในเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาเปรียบเทียบการดูดซับและปลดปล่อยสาร rhodamine B ของไมโครพลาสติก 3 ชนิดได้แก่ พอลิบิวทิลีนอติเพทเทรฟทาเลท, พอลิสไตรีน, และพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พบว่าไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตมีความสามารถในการดูดซับและปลดปล่อยสาร rhodamine B มากที่สุดซึ่งเกิดจากไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตมีความเป็นประจุลบสูงรวมถึงมีพื้นที่ผิวมากซึ่งเกิดจากความเป็นรุกรานพื้นที่ผิวขรุขระของไมโครพลาสติกจึงทำให้สามารถดูดซับสารและเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงประจุ เช่น การเปลี่ยนแปลงค่า pH จึงทำให้ไมโครพลาสติกชนิดพอลิบิวทิลีนซัคซิเนตสามารถปลดปล่อยสารออกมาสู่สิ่งแวดล้อมได้ (Wang et al., 2024)

จากการศึกษาความเป็นพิษของไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ มนุษย์ชนิดหลังเมื่อพบว่าเซลล์มีลักษณะกลม อาจเกิดจากสารปรอทส่งผลให้เกิดการรบกวนการทำงานของโปรตีน Tight junction protein ZO-1 (ZO1) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการยึดกันระหว่างเซลล์ รวมถึงทำให้โปรตีน F-actin ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงร่าง (cytoskeleton) ของเซลล์ เสื่อมสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลกระทบของสารปรอทในรูปสารประกอบอินทรีย์ (Hg^{2+}) และสารประกอบอินทรีย์ (CH_3Hg) ต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ Caco-2 โดยทำการทดสอบด้วยสารปรอทที่ความเข้มข้น

0.1-2 mg/L พบว่าสารปรอททั้ง 2 ประเภทส่งผลให้เซลล์หลังสารก่อการอักเสบ รวมถึงเมื่อย้อมสี F-actin ด้วย TRITC-phalloidin พบว่าเซลล์มีการสร้าง F-actin ที่มีความผิดปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการจัดเรียงตัวของ F-actin และเมื่อย้อมสี ZO1 ด้วย immunofluorescent staining of ZO1 พบว่าเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารปรอทมีการจัดเรียงตัวที่ห่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vázquez et al., 2014)

จากการศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต พอลิแลคติกแอซิด และไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทพบว่าเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกที่ดูดซับสารปรอทเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis มากกว่ากลุ่มที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกเพียงอย่างเดียว โดยสังเกตจากการติดสีของ annexin V/PI ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษของไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีนต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ Caco-2 จากการได้รับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเป็นปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ด้วยวิถี mitochondrial apoptosome mediated apoptotic intrinsic pathway เนื่องจากไมโครพลาสติกและไอออนปรอทส่งผลให้ไมโครคอนเดรียเกิด mitochondria depolarization โดยไมโทคอนเดรียจะปล่อยสารอนุมูลอิสระออกมา ส่งผลให้เซลล์เกิดความผิดปกติของ mitochondria outer membrane permeabilization ทำให้เกิดรอยรั่วบริเวณเยื่อหุ้มไมโครคอนเดรียชั้นนอกส่งผลให้ Caspase-1 และ caspase-9 เกิดการทำงานและกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Yan et al., 2023) และนอกจากสารอนุมูลอิสระจะส่งผลกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสแล้ว สารอนุมูลอิสระยังส่งผลให้เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรมได้อีกด้วย โดยอาจเกิดการส่งผลให้เกิดการขาดตัวแน่นของโครมาตินจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์ที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทส่งผลให้เกิดการขาดตัวแน่นของโครมาติน โดยเริ่มพบเมื่อทำสอบเป็นระยะเวลา 7 วัน และเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในปี 2024 โดยพบว่าสารก่อการอักเสบส่งผลให้การทำงานของ γ -H2AX เกิดความผิดปกติ โดยส่งผลให้เกิดการพันสายดีเอ็นเอขาดตัวแน่น (Zhang et al., 2024)

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น จึงสรุปได้ว่าไมโครพลาสติกนอกจากจะส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงโดยพิจารณาจากการลดกิจกรรมของเซลล์ (metabolism) ทั้งนี้ ความเป็นพิษของเซลล์ขึ้นอยู่กับชนิด ขนาด และความเข้มข้นของไมโครพลาสติก รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบด้วย อีกทั้งไมโครพลาสติกยังคงสามารถเป็นตัวพาโลหะหนักที่สะสมในสิ่งแวดล้อม และสามารถปลดปล่อยเข้าสู่เซลล์ได้ โดยพิจารณาจากการย้อมสี NF09 sensor ที่ติดสีไอออนปรอท

ภายในเซลล์ รวมถึงเมื่อทดสอบเซลล์ด้วยไมโครพลาสติกที่มีการดูดซับไอออนปรอทพบว่าไมโคร-พลาสติกที่มีการดูดซับไอออนปรอทส่งผลให้มีความเป็นพิษกับเซลล์เพิ่มมากขึ้นโดยพิจารณาจากการลดลงของกิจกรรมภายในเซลล์เทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยไมโครพลาสติกเพียงอย่างเดียว รวมถึงพบการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในกลุ่มที่ได้รับไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทมากกว่ากลุ่มที่ได้รับไมโครพลาสติกเพียงอย่างเดียว รวมถึงพบว่าไมโครพลาสติกที่ดูดซับไอออนปรอทส่งผลให้เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ โดยส่งผลให้เกิดการขาดตัวของโครมาติน ทั้งนี้นอกจากสารปรอทที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ในธรรมชาติยังคงมีสารพิษชนิดอื่นที่สามารถสะสมในไมโครพลาสติกและสามารถส่งผ่านห่วงโซ่อาหารมายังมนุษย์ได้



ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

Complete growth medium DMEM low glucose + 10% Fetal bovine serum

(CGM low glucose + 10% FBS)

Supplements	Stock concentration	Final concentration	Volume (mL)
Dulbecco' Modi fied Eagle Medium low glucose (DMEM)			88
Fetal bovine serum (FBS)	100%	10%	10
Penicillin/Streptomycin	100x	1X	1
L-glutamine	200 mM	2 mM	1
		Final volume (mL)	100

Complete growth medium DMEM low glucose + 5% Fetal bovine serum

(CGM low glucose + 5% FBS)

Supplements	Stock concentration	Final concentration	Volume (mL)
Dulbecco' Modi fied Eagle Medium low glucose (DMEM)			93
Fetal bovine serum (FBS)	100%	5%	5
Penicillin/Streptomycin	100x	1X	1
L-glutamine	200 mM	2 mM	1
		Final volume (mL)	100

การเตรียม Phosphate Buffered Saline (PBS)

Component	Stock concentration	Final concentration	Volume (mL)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	10x	1x	50
น้ำ Autoclave	-	-	450
		Final volume (mL)	500

การเตรียมไมโครพลาสติก

1.1 การเตรียมไมโครพลาสติก stock solution

1. ชั่งไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน และพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต ชนิดละ 0.015 กรัม จากนั้นผสมกับอาหารสูตร DMEM ที่มี 5% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin-Streptomycin ปริมาตร 15 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL}$

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Microplastic stock solution (mL)	CGM + 5% FBS (mL)	Final Volume (mL)
10	0.05	3.95	4
100	0.5	3.5	4
200	1	3	4
400	2	2	4
800	4	-	4

การเตรียมไมโครพลาสติกสำหรับการดูดซับสารปรอท

1. ชั่งไมโครพลาสติกชนิดพอลิสไตรีน และพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต ชนิดละ 0.0013 กรัม จากนั้นผสมกับน้ำปราศจากไอออน 1.3 มิลลิลิตร จะได้ microplastic solutionเข้มข้น 1 $\mu\text{g/mL}$

การเตรียมสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (HgCl₂)

4.1 การเตรียมสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (HgCl₂) stock solution

1. ชั่งเมอคิวริกคลอไรด์ (HgCl₂) หนัก 1.09 mg ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 4 mL จะได้สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์เข้มข้น 1,000 μ M
2. เตรียมสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (HgCl₂) stock solution เข้มข้น 10 μ M จากการผสมสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์เข้มข้น 1,000 μ M ปริมาตร 40 μ L กับน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1.96 mL จากนั้นเจือจางสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ปริมาตร 40 μ L กับน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1.96 mL เพื่อเตรียมเป็นสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 μ M เพื่อใช้ในการแช่ไมโครพลาสติกต่อไป

การเตรียมสารละลาย H₂O₂

การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H₂O₂) stock solution เข้มข้น 1,000 μ M

- ผสมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้มข้น 32,630 μ M ปริมาตร 3 μ L กับ PBS buffer 9.997 mL
- การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H₂O₂) working solution เข้มข้น 100 μ M
- ผสมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H₂O₂) stock solution เข้มข้น 1,000 μ M ปริมาตร 400 μ L กับ CGM + 5% FBS ปริมาตร 3.6 mL

การเตรียม Resazurin solution

การเตรียม 44 mM Resazurin stock solution

- ชั่งผง Resazurin sodium salt หนัก 5 กรัม ละลายใน PBS buffer ปริมาตร 500 mL กรอง Resazurin solution ด้วยกระดาษกรอง Whatman ขนาด 0.22 μm เก็บ Resazurin stock solution ใน Freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- การเตรียม 440 μM Resazurin solution

Component	Stock concentration	Final concentration	Volume (mL)
Resazurin solution	1,000x	10x	0.05
PBS buffer	-	1x	4.95
Final volume (mL)			5

- การเตรียม 1% (v/v) Resazurin solution ใน CGM + 5% FBS

Component	Stock concentration	Final concentration	Volume (mL)
10% Resazurin solution	100%	10%	0.5
CGM + 5% FBS			4.5
Final volume (mL)			5

การเตรียม DAPI solution

- จาก DAPI stock solution เข้มข้น 5 mg/mL
 1. ผสม DAPI stock solution เข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 2.1 μL กับ PBS buffer ปริมาตร 100 μL เพื่อเตรียม DAPI solution เข้มข้น 300 μM
 2. Dilute DAPI solution เข้มข้น 300 μM กับ PBS buffer ด้วยอัตราส่วน 1:1,000 เพื่อเตรียม DAPI working solution เข้มข้น 300 nM

การเตรียมสารละลาย NF09

- การเตรียม NF09 stock solution เข้มข้น 3 mM ปริมาตร 400 μ L โดยการชั่ง NF09 หนัก 0.97 mg ละลายใน DMSO ปริมาตร 400 μ L
- การเตรียม NF09 working solution เข้มข้น 30 μ M ปริมาตร 15 mL ด้วยการผสม NF09 stock solution เข้มข้น 3 mM ปริมาตร 150 μ M กับ PBS buffer ปริมาตร 14.85 mL



รายการอ้างอิง

- Akkajit, P., Khongsang, A., & Thongnonghin, B. (2022). Microplastics accumulation and human health risk assessment of heavy metals in *Marcia opima* and *Lingula anatina*, Phuket. *Mar Pollut Bull*, 186, 114404.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114404>
- Alves, P., Ferreira, P., & Gil, H. (2012). Biomedical Polyurethane-Based Materials. In.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Arshad, N., Alam, M. M., Su'ud, M. B. M., Imran, S., Siddiqui, T., Saleem, K., Bashir, A., & Batool, A. (2023). Microplastic contamination from surface waters and commercially valuable fishes of Karachi Coast, Pakistan. *Regional Studies in Marine Science*, 62, 102955.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rsma.2023.102955>
- Awasthi, A. K., Shivashankar, M., & Chandrasekeran, N. (2021). Analytical characterization of color changing waste polystyrene plastic. *Materials Today: Proceedings*, 45, 3945-3949. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.070>
- Bowman, K. L., Lamborg, C. H., & Agather, A. M. (2020). A global perspective on mercury cycling in the ocean. *Sci Total Environ*, 710, 136166.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136166>
- Braun, S., Gaza, N., Werdehausen, R., Hermanns, H., Bauer, I., Durieux, M. E., Hollmann, M. W., & Stevens, M. F. (2010). Ketamine induces apoptosis via the mitochondrial pathway in human lymphocytes and neuronal cells. *British Journal of Anaesthesia*, 105(3), 347-354. <https://doi.org/10.1093/bja/aeq169>
- Campanale, C., Massarelli, C., Savino, I., Locaputo, V., & Uricchio, V. F. (2020). A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *Int J Environ Res Public Health*, 17(4).
<https://doi.org/10.3390/ijerph17041212>
- Chandra, R., Thakor, A., Mekonnen, T. H., Charles, T. C., & Lee, H.-S. (2023). Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from food waste using mixed culture for

- carboxylate production and *Pseudomonas putida* for PHA synthesis. *Journal of Environmental Management*, 336, 117650.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117650>
- Choi, D., Bang, J., Kim, T., Oh, Y., Hwang, Y., & Hong, J. (2020). In vitro chemical and physical toxicities of polystyrene microfragments in human-derived cells. *Journal of Hazardous Materials*, 400, 123308.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123308>
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environmental Science & Technology*, 47(12), 6646-6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>
- Crawford, C. B., & Quinn, B. (2017). 3 - Plastic production, waste and legislation. In C. B. Crawford & B. Quinn (Eds.), *Microplastic Pollutants* (pp. 39-56). Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809406-8.00003-7>
- Depciuch, J., Czarny, W., Płonka, A., Podgórski, R., Bajorek, W., Dziadek, B., Kula-Maximenko, M., Sznajder, M., Paja, W., Shpotyuk, Y., Cebulski, J., & Król, P. (2023). Investigation of novel methods for stress level measurements in athletes employing FTIR and Raman spectroscopy techniques. *Measurement*, 220, 113316.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.measurement.2023.113316>
- Dong, Y., Gao, M., Song, Z., & Qiu, W. (2020). As(III) adsorption onto different-sized polystyrene microplastic particles and its mechanism. *Chemosphere*, 239, 124792.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124792>
- Elseblani, R., Cobo-Golpe, M., Godin, S., Jimenez-Lamana, J., Fakhri, M., Rodríguez, I., & Szpunar, J. (2023). Study of metal and organic contaminants transported by microplastics in the Lebanese coastal environment using ICP MS, GC-MS, and LC-MS. *Science of The Total Environment*, 887, 164111.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164111>
- Esmailbeigi, M., Kazemi, A., Gholizadeh, M., & Rezaeiyyeh, R. D. (2023). Microplastics and heavy metals contamination in *Atropus atropus* and associated health risk assessment in the northwest of the Persian Gulf, Iran. *Regional Studies in Marine Science*, 57, 102750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102750>
- Falakdin, P., Lopez-Rosales, A., Andrade, J., Terzaghi, E., Di Guardo, A., & Muniategui-

- Lorenzo, S. (2024). Comparison of microplastic type, size, and composition in atmospheric and foliage samples in an urban scenario. *Environmental Pollution*, 349, 123911. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123911>
- Fournier, S. B., D'Errico, J. N., Adler, D. S., Kollontzi, S., Goedken, M. J., Fabris, L., Yurkow, E. J., & Stapleton, P. A. (2020). Nanopolystyrene translocation and fetal deposition after acute lung exposure during late-stage pregnancy. *Part Fibre Toxicol*, 17(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00385-9>
- Gijsman, P., & Fiorio, R. (2023). Long term thermo-oxidative degradation and stabilization of polypropylene (PP) and the implications for its recyclability. *Polymer Degradation and Stability*, 208, 110260. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2023.110260>
- Guevara-García, Á. A., Lara F, P., Juárez L, K., & Herrera-Estrella, L. R. (2017). Heavy Metal Adaptation. In *eLS* (pp. 1-9). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001318.pub3>
- Gworek, B., Dmuchowski, W., & Baczewska-Dąbrowska, A. H. (2020). Mercury in the terrestrial environment: a review. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00401-x>
- Habuer, Fujiwara, T., & Takaoka, M. (2022). Developing a dataset for the expected anthropogenic mercury release in China in response to the Minamata convention on mercury. *Data in Brief*, 42, 108280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108280>
- Herrala, M., Huovinen, M., Järvelä, E., Hellman, J., Tolonen, P., Lahtela-Kakkonen, M., & Rysä, J. (2023). Micro-sized polyethylene particles affect cell viability and oxidative stress responses in human colorectal adenocarcinoma Caco-2 and HT-29 cells. *Science of The Total Environment*, 867, 161512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161512>
- Hossain, M. S., Rahman, M. S., Uddin, M. N., Sharifuzzaman, S. M., Chowdhury, S. R., Sarker, S., & Nawaz Chowdhury, M. S. (2020). Microplastic contamination in Penaeid shrimp from the Northern Bay of Bengal. *Chemosphere*, 238, 124688. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124688>

- Huppertsberg, S., & Knepper, T. P. (2020). Validation of an FT-IR microscopy method for the determination of microplastic particles in surface waters. *MethodsX*, 7, 100874. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100874>
- Hwang, J., Choi, D., Han, S., Choi, J., & Hong, J. (2019). An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. *Sci Total Environ*, 684, 657-669. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.071>
- Irfan, M., Ahmad, M., Fareed, Z., Iqbal, N., Sharif, A., & Wu, H. (2022). On the indirect environmental outcomes of COVID-19: short-term revival with futuristic long-term implications. *International Journal of Environmental Health Research*, 32(6), 1271-1281. <https://doi.org/10.1080/09603123.2021.1874888>
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768-771. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1260352>
- Kader, G. A., Ibrahim, M. A., Khalifa, A. M., Mirza, U., Rashwan, E. K., & Abdel-Hady, Z. (2021). Evaluation of vitamin C protective effect on the cerebrocortical antioxidant defense, histopathological, pro-apoptotic p53 and anti-apoptotic Bcl2 expressions against tramadol neurotoxicity in rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 112, 101893. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ichemneu.2020.101893>
- Kalaivizhi, R., Danagody, B., & Yokesh, A. (2022). ACs@ZnO incorporated with a PSF/PU polymer membrane for dye removal [10.1039/D2MA00794K]. *Materials Advances*, 3(23), 8534-8543. <https://doi.org/10.1039/D2MA00794K>
- Kharb, J., & Saharan, R. (2022). Design and synthesis of eco-friendly cucumber peel-based bioplastic materials. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.12.109>
- Klein, S., Worch, E., & Knepper, T. P. (2015). Occurrence and Spatial Distribution of Microplastics in River Shore Sediments of the Rhine-Main Area in Germany. *Environmental Science & Technology*, 49(10), 6070-6076. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00492>
- Kuroiwa, M., Yamaguchi, S.-I., Kato, Y., Hori, A., Toyoura, S., Nakahara, M., Morimoto, N., & Nakayama, M. (2023). Tim4, a macrophage receptor for apoptotic cells, binds

polystyrene microplastics via aromatic-aromatic interactions. *Science of the Total Environment*, 875, 162586.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162586>

Kutralam-Muniasamy, G., Pérez-Guevara, F., Martínez, I. E., & Shruti, V. C. (2021).

Overview of microplastics pollution with heavy metals: Analytical methods, occurrence, transfer risks and call for standardization. *Journal of Hazardous Materials*, 415, 125755.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125755>

Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2019). Emergence of

Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environ Sci Technol*, 53(4), 1748-1765.

<https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512>

Lehner, R., Wohlleben, W., Septiadi, D., Landsiedel, R., Petri-Fink, A., & Rothen-

Rutishauser, B. (2020). A novel 3D intestine barrier model to study the immune response upon exposure to microplastics. *Arch Toxicol*, 94(7), 2463-2479.

<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02750-1>

Leistenschneider, C., Wu, F., Primpke, S., Gerds, G., & Burkhardt-Holm, P. (2024).

Unveiling high concentrations of small microplastics (11–500 μm) in surface water samples from the southern Weddell Sea off Antarctica. *Science of the Total Environment*, 927, 172124.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172124>

Li, H., Zhang, G., Liu, Y., Gao, F., Ye, X., Lin, R., & Wen, M. (2024). Hypoxia-inducible factor

1 α inhibits heat stress-induced pig intestinal epithelial cell apoptosis through eif2 α /ATF4/CHOP signaling. *Science of The Total Environment*, 924, 171649.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171649>

Li, Y., Wang, X., Wang, Y., Sun, Y., Xia, S., & Zhao, J. (2022). Effect of biofilm colonization

on Pb(II) adsorption onto poly(butylene succinate) microplastic during its biodegradation. *Sci Total Environ*, 833, 155251.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155251>

Lin, Y.-R., Liu, Y.-Y., Lan, H.-C., Shen, C.-C., Yao, Y.-L., & Yang, W.-M. (2021). M33 condenses

chromatin through nuclear body formation and methylation of both histone H3 lysine 9 and lysine 27. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell*

Research, 1868(11), 119100.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119100>

Ma, J., Niu, X., Zhang, D., Lu, L., Ye, X., Deng, W., Li, Y., & Lin, Z. (2020). High levels of microplastic pollution in aquaculture water of fish ponds in the Pearl River Estuary of Guangzhou, China. *Science of the Total Environment*, 744, 140679.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140679>

Mao, S., He, C., Niu, G., & Ma, Y. (2024). Effect of aging on the release of di-(2-ethylhexyl) phthalate from biodegradable and petroleum-based microplastics into soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 272, 116006.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116006>

Matsuyama, A., Yano, S., Taniguchi, Y., Kindaichi, M., Tada, A., & Wada, M. (2021). Trends in mercury concentrations and methylation in Minamata Bay, Japan, between 2014 and 2018. *Marine Pollution Bulletin*, 173, 112886.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112886>

Moore, C. (2023, Mar 5, 2023). *Plastic pollution*. britannica.

<https://www.britannica.com/science/plastic-pollution>

Mottola, F., Carannante, M., Barretta, A., Palmieri, I., & Rocco, L. (2024). Reproductive cytotoxic and genotoxic impact of polystyrene microplastic on *Paracentrotus lividus* spermatozoa. *Current Research in Toxicology*, 6, 100173.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crttox.2024.100173>

Munir, M., Sholikhah, U. N., Lestari, E., Pujiyanto, A., Prasetya, K. E., Nurmanjaya, A., Yanto, Sarwono, D. A., Subechi, M., & Suseno, H. (2023). Iodine-131 radiolabeled polyvinylchloride: A potential radiotracer for micro and nanoplastics bioaccumulation and biodistribution study in organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 188, 114627.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114627>

Nisa, S. A., Vasantharaja, R., Supriya, S., Inbakandan, D., Dharani, G., & Govindaraju, K. (2023). Biodeterioration of polyethylene by jellyfish nematocyst protein. *Marine Pollution Bulletin*, 188, 114682.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114682>

Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y., & Montanarella, L. (2013). Contaminated Sites

in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *Journal of Environmental and Public Health*, 2013, 158764.

<https://doi.org/10.1155/2013/158764>

Petdum, A., Faichu, N., Sirirak, J., Khammultri, P., Promarak, V., Panchan, W., Sooksimuang, T., Charoenpanich, A., & Wanichacheva, N. (2020). [5] Helicene-rhodamine 6 G hybrid-based sensor for ultrasensitive Hg²⁺ detection and its biological applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, 394. <https://doi.org/ARTN.112473>

10.1016/j.jphotochem.2020.112473

Petdum, A., Kaewnok, N., Panchan, W., Charoenpanich, A., Sirirak, J., Sahasithiwat, S., Sooksimuang, T., & Wanichacheva, N. (2022). Novel rapid “turn on” tetrahydro-[5]helicene-based fluorescence sensor for selective detection of Cd²⁺ with a remarkable large Stokes shift and its applications in food samples and living cell. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 423, 113578.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113578>

Rengasamy, R. S., & Ghosh, S. (2010). 15 - Technical sewing threads. In R. Alagirusamy & A. Das (Eds.), *Technical Textile Yarns* (pp. 495-533). Woodhead Publishing.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845699475.2.495>

Rezania, S., Park, J., Md Din, M. F., Mat Taib, S., Talaiekhosani, A., Kumar Yadav, K., & Kamyab, H. (2018). Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 191-208.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.022>

Rivera-Hernandez, J. R., Fernandez, B., Santos-Echeandia, J., Garrido, S., Morante, M., Santos, P., & Albentosa, M. (2019). Biodynamics of mercury in mussel tissues as a function of exposure pathway: natural vs microplastic routes. *Sci Total Environ*, 674, 412-423.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.175>

Roostaie, A., Haji Abdolrasouli, M., Mohammadiazar, S., & Hosseinipour, A. (2023). Polybutylene succinate/modified cellulose bionanocomposites as sorbent for needle trap microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1689, 463715.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463715>

- Ruan, Y., Zhong, Z., Liu, X., Li, Z., Li, J., Sun, L., & Sen, H. (2023). Correlation between cellular uptake and cytotoxicity of polystyrene micro/nanoplastics in HeLa cells: A size-dependent matter. *PLOS ONE*, 18.
- Sarkar, D. J., Sarkar, S. D., Manna, R., Samanta, S., & Das, B. (2020). Microplastics pollution: an emerging threat to freshwater aquatic ecosystem of India. *J Inland Fish Soc India*, 52(1), 05-15.
- Schaerer, L. G., Wu, R., Putman, L. I., Pearce, J. M., Lu, T., Shonnard, D. R., Ong, R. G., & Techtmann, S. M. (2023). Killing two birds with one stone: chemical and biological upcycling of polyethylene terephthalate plastics into food. *Trends in Biotechnology*, 41(2), 184-196.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.06.012>
- Schwabl, P., Koppel, S., Konigshofer, P., Bucsecs, T., Trauner, M., Reiberger, T., & Liebmann, B. (2019). Detection of Various Microplastics in Human Stool: A Prospective Case Series. *Ann Intern Med*, 171(7), 453-457.
<https://doi.org/10.7326/M19-0618>
- Song, P., Trivedi, A. R., & Siviour, C. R. (2023). Mechanical response of four polycarbonates at a wide range of strain rates and temperatures. *Polymer Testing*, 121, 107986.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2023.107986>
- Suckcharoen, S., P. Nuorteva, E. Hasanen. (1978). *Mercury accumulation in ipomoea aquatica (fork) near a caustic soda factory in Thailand*. (Vol. 10(4)). Water, Air, & Soil Pollution.
- The Agency for Toxic Substances and Disease Registry ATSDR. (2016).
- Thiele, C. J., Hudson, M. D., Russell, A. E., Saluveer, M., & Sidaoui-Haddad, G. (2021). Microplastics in fish and fishmeal: an emerging environmental challenge? *Scientific Reports*, 11(1), 2045. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81499-8>
- Vázquez, M., Vélez, D., & Devesa, V. (2014). In vitro evaluation of inorganic mercury and methylmercury effects on the intestinal epithelium permeability. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 349-359.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.10.022>
- Vibhatabandhu, P. (2021). *Spatial heterogeneity distributions and seasonal variations of*

microplastic contaminations in surface waters and sediments and microplastic pollution level assessments of the inner Gulf of Thailand Chulalongkorn University].

- Visalli, G., Facciola, A., Pruiti Ciarello, M., De Marco, G., Maisano, M., & Di Pietro, A. (2021). Acute and Sub-Chronic Effects of Microplastics (3 and 10 microm) on the Human Intestinal Cells HT-29. *Int J Environ Res Public Health*, 18(11).
<https://doi.org/10.3390/ijerph18115833>
- Wang, F., Outridge, P. M., Feng, X., Meng, B., Heimbürger-Boavida, L.-E., & Mason, R. P. (2019). How closely do mercury trends in fish and other aquatic wildlife track those in the atmosphere? – Implications for evaluating the effectiveness of the Minamata Convention. *Science of the Total Environment*, 674, 58-70.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.101>
- Wang, K., Kou, Y., Guo, C., Wang, K., Li, J., Schmidt, J., Wang, M., Liang, S., Wang, W., Lu, Y., & Wang, J. (2024). Comparison of rhodamine B adsorption and desorption on the aged non-degradable and degradable microplastics: Effects of charge-assisted hydrogen bond and underline mechanism. *Environmental Technology & Innovation*, 35, 103739. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103739>
- Wang, K., & Shen, H. (2024). Identification of tumor necrosis factor receptor 1 and its association with LPS-induced apoptosis in *Onchidium reevesii*. *Aquaculture and Fisheries*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aaf.2024.03.006>
- Wang, Y., Hu, T., Zhang, W., Lin, J., Wang, Z., Lyu, S., & Tong, H. (2023). Biodegradation of polylactic acid by a mesophilic bacteria *Bacillus safensis*. *Chemosphere*, 318, 137991. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137991>
- Wei, J., Wei, J., & Wang, S. (2024). Hydroxytyrosol acetate from olive leaves (*Olea Europaea* L.) induces apoptosis via mitochondrial pathway in BEL7402 cell line. *Natural Product Research*, 1-4. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2348679>
- Wu, B., Wu, X., Liu, S., Wang, Z., & Chen, L. (2019). Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells. *Chemosphere*, 221, 333-341.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.056>

- Yan, L., Yu, Z., Lin, P., Qiu, S., He, L., Wu, Z., Ma, L., Gu, Y., He, L., Dai, Z., Zhou, C., Hong, P., & Li, C. (2023). Polystyrene nanoplastics promote the apoptosis in Caco-2 cells induced by okadaic acid more than microplastics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114375.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114375>
- Yang, F., Gong, H., Cong, L., Shi, J., Guo, G., & Mei, Z. (2022). Investigating on polymerization process and interaction mechanism of thermosetting polyurethane modified asphalt. *Construction and Building Materials*, 335, 127261.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2022.127261>
- Yang, Y., Zhong, Z., Li, J., Du, H., Li, Q., Zheng, X., Qi, R., Zhang, S., Ren, P., & Li, Z. (2023). Experimental and theoretical-based study of heavy metal capture by modified silica-alumina-based materials during thermal conversion of coal at high temperature combustion. *Applied Energy*, 351, 121829.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2023.121829>
- Yee, M. S.-L., Hii, L.-W., Looi, C. K., Lim, W.-M., Wong, S.-F., Kok, Y.-Y., Tan, B.-K., Wong, C.-Y., & Leong, C.-O. (2021). Impact of Microplastics and Nanoplastics on Human Health. *Nanomaterials*, 11(2), 496. <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/2/496>
- Yu, F., Pei, Y., Zhang, X., Wu, X., Zhang, G., & Ma, J. (2023). Occurrence and distribution characteristics of aged microplastics in the surface water, sediment, and crabs of the aquaculture pond in the Yangtze River Delta of China. *Science of the Total Environment*, 871, 162039.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162039>
- Yu, X., Huang, W., Wang, Y., Wang, Y., Cao, L., Yang, Z., & Dou, S. (2022). Microplastic pollution in the environment and organisms of Xiangshan Bay, East China Sea: An area of intensive mariculture. *Water Research*, 212, 118117.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118117>
- Zhang, B., Huang, C., Xu, D., Huang, K., Li, Y., Jiao, L., Fu, B., Li, S., & Li, Y. (2024). Patulin induces ROS-dependent cardiac cell toxicity by inducing DNA damage and activating endoplasmic reticulum stress apoptotic pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 269, 115784.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115784>

Zhao, X., Chen, Q., Liu, W., Li, Y., Tang, H., Liu, X., & Yang, X. (2014). Codelivery of doxorubicin and curcumin with lipid nanoparticles results in improved efficacy of chemotherapy in liver cancer. *International journal of nanomedicine*, 10, 257-270. <https://doi.org/10.2147/IJN.S73322>

Zhou, Y., Xu, B., Zhang, X., & Yang, Y. (2022). A comparative study on horizontal flame spread behaviors of thermoplastic polymers with different melt flow indexes under external radiation. *Thermal Science and Engineering Progress*, 35, 101463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tsep.2022.101463>

กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2554). รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย ปี 2554.

กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2556). หมายเหตุมลพิษ สิงหาคม-กันยายน 2556. https://www.pcd.go.th/wp-content/uploads/2020/05/pcdnew-2020-05-31_07-08-20_423111.pdf

เพ็ญโฉม แซ่ตั้ง และคณะ. (2552). การศึกษาเชิงปฏิบัติการเบื้องต้นเพื่อศึกษาผลกระทบและแสวงหาแนวทางการจัดการขยะอย่างมีส่วนร่วม กรณีตำบลโคกสะอาด อำเภอข่อยชัย จังหวัดกาฬสินธุ์.

สมิตานันท์ หงษ์สตาร์. (2562). นักวิจัยศูนย์ฯ ทะเล จ.ตรัง พบไมโครพลาสติกในกระเพาะปลาทุ. <https://www.bbc.com/thai/thailand-49671448>.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายภูริทัต แซ่ตัน
วุฒิการศึกษา	ระดับปริญญาตรี มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาศาสตร์บัณฑิต ชีววิทยา 2564
ผลงานตีพิมพ์	Phuangbubpha P, Thara S, Sriboonaied P, Saetan P, Tumnoi W, Charoenpanich A. Optimizing THP-1 Macrophage Culture for an Immune-Responsive Human Intestinal Model. <i>Cells</i> . 2023 May 19;12(10):1427.doi: 10.3390/cells12101427. PMID: 37408263; PMCID: PMC10217152. Sriboonaied, P., Phuangbubpha, P., Saetan, P., Charoensuksai, P., & Charoenpanich, A. (2025). Dual Modulation of Adipogenesis and Apoptosis by PPARG Agonist Rosiglitazone and Antagonist Betulinic Acid in 3T3-L1 Cells. <i>Biomedicines</i> , 13(6), 1340. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biomedicines13061340 Saetan, P., Phuangbubpha, P., Kaewnok, N., Wanichacheva, N., Suttiruengwong, S., & Charoenpanich, A. (2026). Hazard potential of polystyrene and polybutylene succinate microplastics: Cellular toxicity following long-term exposure and Mercury(II) carrier effects. <i>Science of the Total Environment</i> , 1017, 181502. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2026.181502
รางวัลที่ได้รับ	ทุนการศึกษาสำหรับนักศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต เพื่อเป็นผู้ช่วยวิจัย สัญญาเลขที่ SCSU-STA-2566-01 รางวัลภาพถ่ายที่ได้รับความนิยมสูงสุด (Popular Vote) จากการส่งผลงานเข้าร่วมประกวด Photo Contest ชื่อภาพ Micro(plastic) mercury งานประชุมวิชาการประจำปีจุลทรรศน์แห่งประเทศไทยครั้งที่ 39 ระหว่างวันที่ 29-31 มีนาคม พ.ศ. 2565 จัดโดยสมาคมจุลทรรศน์แห่งประเทศไทยร่วมกับศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

ทุนการศึกษาสนับสนุนนักศึกษาไปศึกษาหรือทำงานวิจัยระยะสั้นใน
ต่างประเทศ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 ณ National Central
University (NCU) สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) ระหว่างเดือนกันยายน -
ธันวาคม 2566

