



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ โครงสร้างระดับจุลภาคและธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่านา
Malayemys macrocephala ในพื้นที่เกษตร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
Ultrastructure and elemental component of eggshell of
Malayemys macrocephala in agricultural area at Phra Nakhon Si
Ayutthaya Province

ชื่อนิสิต นายชนกฤต นรสิงห์ เลขประจำตัว 6032023423

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงสร้างระดับจุลภาคและธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่านา
Malayemys macrocephala ในพื้นที่เกษตร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

Ultrastructure and elemental component of eggshell of *Malayemys macrocephala* in agricultural area at Phra Nakhon Si Ayutthaya Province

นายธนกฤต นรสิงห์

อาจารย์ที่ปรึกษา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ

โครงการวิทยาสตรฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงการวิทยาสตรฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ : โครงสร้างระดับจุลภาคและธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่านา
Malayemys macrocephala ในพื้นที่เกษตร จังหวัด
พระนครศรีอยุธยา
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ : นายธนภุต นรสิงห์
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
ภาควิชา : ชีววิทยา

บทคัดย่อ

พื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีการทำเกษตรอย่างกว้างขวางและมีรายงานการใช้สารเคมีในการทำการเกษตร เช่น สารกำจัดศัตรูพืช สารกำจัดวัชพืช และปุ๋ยเคมี ที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนักและส่งผลต่อและสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ โดยสิ่งมีชีวิตที่อาจได้รับผลกระทบคือ เต่านา *Malayemys macrocephala* เนื่องจากมีแหล่งอาศัยและวางไข่ขนาดใหญ่อยู่ในพื้นที่เกษตร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเต่านาเป็นสิ่งมีชีวิตเป้าหมายและเลือกไข่ไข่ในการศึกษาการปนเปื้อนโลหะหนักในเปลือกไข่เนื่องจากโลหะหนักสามารถถ่ายทอดจากแม่เต่าสู่ไข่เต่า และยังมีโอกาสสะสมในเปลือกไข่ได้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่านาในพื้นที่เกษตร โดยการนำตัวอย่างไข่เต่านาจากตลาดท้องถิ่นในอำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา มาชั่งน้ำหนักและวัดขนาดก่อนแยกไข่ออกมา จากนั้นทำความสะอาดเปลือกไข่ และรักษาสภาพในสารละลายฟอร์มาลิน 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บในเอทานอล 70% นำตัวอย่างไปทำให้แห้ง และเก็บในโหลสุญญากาศก่อนนำไปวิเคราะห์สัณฐานวิทยาและธาตุองค์ประกอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และอุปกรณ์ตรวจจับสัญญาณเอ็กซ์เรย์ (energy dispersive X-ray หรือ EDX) เพื่อแยกแยะสัญญาณของธาตุที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาพบโครงสร้าง 2 ชั้น ได้แก่ 1) ชั้น calcareous ซึ่งพบ shell unit ที่มีผลึกลักษณะคล้ายเข็มและรัศมีซี่ออกจากรูศูนย์กลางและมีรูแทรกระหว่าง shell unit และ 2) ชั้น shell membrane เป็นเส้นใยที่สานทับกันอย่างไม่เป็นระเบียบ โดยที่ shell unit พบผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งในรูป aragonite และ calcite ผลการตรวจสอบธาตุองค์ประกอบพบธาตุ O, C, Ca, N, P, S, Cl, Na, Al, K, Mg และ Si โดยพบสัดส่วนของธาตุ O, C และ Ca สูงกว่าธาตุอื่น ๆ สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาที่พบการสะสมผลึก CaCO_3 ในชั้น calcareous แต่ไม่พบธาตุจำพวกโลหะหนักในเปลือกไข่เต่านาจากพื้นที่เกษตร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ผลการศึกษาที่ได้ทำให้เข้าใจถึงสัณฐานวิทยาและธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่านาซึ่งสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อติดตามแนวโน้มการปนเปื้อนโลหะหนักในพื้นที่เกษตรในอนาคต

คำสำคัญ: กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด, เต่าน้ำจืด, โลหะหนัก, สัณฐานวิทยา, energy dispersive X-ray

Research Title : Ultrastructure and elemental component of eggshell of
Malayemys macrocephala in agricultural area at Phra
Nakhon Si Ayutthaya Province

Student name : Mr. Thanakrit Norasing

Advisor : Assistant Professor Noppadon Kitana, Ph.D.

Department of : Biology

Abstract

Central plain of Thailand is an area with intensive agricultural activity. Use of agrochemicals such as pesticides, herbicides and chemical fertilizers in this area could lead to heavy metal contamination and adverse effect on organisms in ecosystem. The snail-eating turtle, *Malayemys macrocephala*, is one of the organisms that may be affected by such activities since their habitat and nesting site locate in agricultural area at Pha Nakhon Si Ayutthaya province. In this study, *M. macrocephala* was selected as a sentinel animals and their eggshell was used as a sample for studying heavy metal contamination since the contamination may transfer from maternal tissues to egg component, including the eggshell. Objective of this research is to examine an ultrastructure and elemental component of eggshell of *M. macrocephala*. Turtle eggs were purchased from a local market at Bang Ban District, Phra Nakhon Si Ayutthaya Province. After cleaning, weighing, measuring and separating egg content, eggshell samples were rinsed, fixed in 10% formalin solution for 24 hours and stored in 70% ethanol. Before analysis, the samples were air-dried and stored in desiccator. Morphology and elemental component were analyzed using scanning electron microscope (SEM) equipped with has an X-ray detector (energy dispersive X-ray or EDX) for differentiating elemental components. The result on eggshell morphology showed that eggshells composed of two layers including, 1) calcareous layer with well-distinguished shell units where needle-like crystallites radiating outwards from the core, and sporadically distributed of pores, and 2) shell membrane consisted of rough fibers weaved disorderly. Shell unit in the calcareous layer consisted of calcium carbonate in form of aragonite and calcite crystals. The results on elemental analysis showed that O, C, Ca, N, P, S, Cl, Na, K, Mg and Si were detected, with O, C and Ca being the major constituent. This correlates with result on morphology that shell unit composed of CaCO_3 crystal. However, heavy metal was not detected in the eggshell of turtle in this study. The results on morphology and elemental component of turtle eggshell could be further used as a baseline for monitoring heavy metal contamination in agricultural areas in the future.

Keywords: Energy dispersive X-ray, freshwater turtle, heavy metal, morphology, scanning electron microscope

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในด้านการจัดหาตัวอย่างไขเต้านาจาก อ่าเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา การวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนตรวจตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.ธงชัย ฐิติภูรี ที่ช่วยเหลือในขั้นตอนการเตรียมสารและให้คำแนะนำต่าง ๆ เกี่ยวกับการทำโครงการครั้งนี้ นางสาวลลิตา ศรีอ่อน ที่ช่วยเตรียมซิลิกาเจลเพื่อให้การเคลื่อนย้ายตัวอย่างเป็นไปอย่างเรียบร้อย นายรชตะ มณีอินทร์ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับภาพถ่ายในการทำแลป และการทำรูปเล่ม นางสาวพิชชาพร สร้อยกระโทก ที่ช่วยเหลือในขั้นตอนเตรียมตัวอย่าง นายอินทัช คุณานพรัตน์ ที่ช่วยบันทึกภาพในขณะเตรียมตัวอย่าง นางสาวสุรภา ฉิมพลิกานนท์, นางสาวชนิตา ศรี เกื้อกลิ่น, และ นางสาวรุ่งลาวัลย์ ชากักดี ที่ให้คำแนะนำและตอบคำถามข้อข้องใจในการทำรูปเล่ม ตลอดจนให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณนางสาวภัทรญา สระบัว เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ ประจำศูนย์เครื่องมือวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเครื่องมือที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำการศึกษานี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา อาจารย์ ดร. มารุต เพ็ญอวรณ์และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา senior project ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ BioSentinel Research Group และโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
ABSTRACT	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1. ปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนัก.....	3
2.2. การกระจายตัวของเต่านา <i>M. macrocephala</i> (ภาพที่ 2-2).....	4
2.3. เปลือกไข่เต่านา.....	5
2.4. เทคนิคตรวจสอบ	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	8
3.1 สัตว์ทดลอง.....	8
3.2 การวัดขนาดสัณฐานและการประเมินภายนอกของเปลือกไข่เต่า.....	8
3.3 การเตรียมตัวอย่าง.....	8
3.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาและธาตุองค์ประกอบ	9
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	10
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการศึกษา.....	11
4.1 สัณฐานวิทยาและโครงสร้างระดับจุลภาค	11
4.1.1 ความหนาของชั้น calcareous.....	11
4.1.2 ความหนาของชั้น shell membrane	12
4.1.3 ลักษณะทางสัณฐานอื่น ๆ ที่ตรวจสอบ	12
4.2 ผลการตรวจสอบธาตุองค์ประกอบ.....	12
บทที่ 5	16
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	16
เอกสารอ้างอิง	17
ภาษาไทย	17
ภาษาอังกฤษ	17
ภาคผนวกที่ 1	22
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	22
ภาคผนวกที่ 2	23

ข้อมูลธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่า <i>Malayemys macrocephala</i> จาก พื้นที่เกษตรกรรม อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (%).....	23
--	----

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4-1 ความกว้าง ความยาว และน้ำหนักของเปลือกไข่เต่า <i>M. macrocephala</i> ที่เก็บจากพื้นที่เกษตร อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564).....	11
ตารางที่ 4-2 สัดส่วนความหนาของชั้น calcareous และ shell membrane ของเปลือกไข่เต่า <i>M. macrocephala</i> ที่เก็บจากพื้นที่เกษตร อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564)	14
ตารางที่ 4-3 Mean \pm S.D. ร้อยละธาตุองค์ประกอบที่พบในเปลือกไข่เต่า <i>M. macrocephala</i> ที่เก็บจากพื้นที่เกษตร อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564).....	15

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 แหล่งที่มาของการปนเปื้อนโลหะหนักที่เกิดจากการประกอบกิจกรรมของมนุษย์ (Alengebawy et al., 2021).....3

ภาพที่ 2-2 แผนที่การกระจายตัวของเต่านา *M. macrocephala* แทนด้วยสัญลักษณ์วงกลมสีฟ้า และเต่านาแม่น้ำโขง *M. subtrijuga* แทนด้วยสัญลักษณ์วงกลมสีเขียว (Brophy, 2005).....5

ภาพที่ 2-3 แบบจำลององค์ประกอบของโครงสร้างเปลือกไข่เต่าแบบเปลือกแข็ง (rigid eggshell) พบในเต่าน้ำจืด *Trionyx spiniferus* ซึ่งประกอบด้วยชั้น calcareous ที่ประกอบด้วย shell unit และชั้น shell membrane (Packard et al., 1991).6

ภาพที่ 2-4 แผนภาพจำลองเทคนิค electron dispersive x-ray เมื่อมีการหลุดจากวงโคจรของอิเล็กตรอนวงในสุด (ระดับชั้นพลังงาน K) เนื่องจากการชนด้วยลำอิเล็กตรอน เพื่อรักษาเสถียรภาพอิเล็กตรอนวงโคจรถัดไป (ระดับชั้นพลังงาน L) จึงเคลื่อนเข้ามาแทนที่พร้อมปล่อยพลังงานในรูปรังสีเอ็กซ์ (X-ray) ซึ่งมีค่าเฉพาะตามชนิดของธาตุสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบได้ (ดลฤดี โตเย็น, 2562).....7

ภาพที่ 3-1 ไข่ของเต่านา *M. macrocephala* ที่เก็บจากพื้นที่เกษตรและนำมาจำหน่ายที่ตลาดน้ำ ลุมพินี อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เมื่อวันที่ 7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564.....8

ภาพที่ 3-2 การแยกไข่แดงและไข่ขาวของไข่เต่านา *M. macrocephala* ที่ซื้อจากตลาดน้ำลุมพินี อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เมื่อวันที่ 7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 25649

ภาพที่ 3-3 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา sputter coater (a) sem (b) 10

ภาพที่ 4-1 ภาพถ่าย cross-section view โครงสร้างระดับจุลภาคของชั้น calcareous และชั้น shell membrane ของเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ไข่หมายเลข 3 โดย SEM กำลังขยาย 200X..... 11

ภาพที่ 4-2 ภาพถ่ายโครงสร้างระดับจุลภาคของผลึก aragonite ในชั้น calcareous ของเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ไข่หมายเลข 9 โดย SEM กำลังขยาย 5000X..... 12

ภาพที่ 4-3 ภาพถ่าย cross-section view โครงสร้างระดับจุลภาคของผลึก calcite ในชั้น calcareous ของเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ไข่หมายเลข 6 โดย SEM กำลังขยาย 10000X 13

ภาพที่ 4-4 ภาพถ่ายโครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใยชั้น shell membrane ของเปลือกไข่เต่านานา *M. macrocephala* ไข่หมายเลข 6 โดย SEM กำลังขยาย 2000X..... 13

บทที่ 1

บทนำ

พื้นที่ตอนกลางของประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นพื้นที่เกษตรกรรม มีรายงานการปนเปื้อนโลหะหนักในพื้นที่เกษตรอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเกิดจากการกระทำของมนุษย์ไม่ว่าจะเป็นการใช้สารเคมีในการทำอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม เช่น ยาฆ่าแมลง ปุ๋ยเคมี และสารเร่งการเจริญอื่น ๆ สารเหล่านี้มักมีความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำ จึงทำให้กำจัดได้ยาก (Perry et al., 1998) และเป็นสาเหตุของปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Alloway, 2013) นอกจากนี้การปนเปื้อนโลหะหนักยังสามารถเพิ่มระดับการปนเปื้อนผ่านสายใยอาหารเข้าสู่ในระบบนิเวศได้ ส่งผลกระทบต่อเนื่องในระยะยาวต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ

สิ่งมีชีวิตที่ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนโลหะหนัก ได้แก่ สัตว์จำพวกนก ปลา กบ และเต่าน้ำจืด (Yu et al., 2011) การปนเปื้อนโลหะหนักที่สะสมในไข่ของสัตว์เลื้อยคลานสามารถถ่ายทอดผ่านเพศเมียไปยังเปลือกไข่ได้ (Smith et al. 2007; Tryfonas et al. 2006) และส่งผลให้สิ่งมีชีวิตเกิดความผิดปกติต่าง ๆ เช่น ความผิดปกติระหว่างการเจริญของเอ็มบริโอ พฤติกรรมและการเจริญเติบโต หรืออาจส่งผลถึงขั้นเสียชีวิตได้

เต่าน้ำจืดถือเป็นสัตว์เลื้อยคลานที่ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนโลหะหนัก เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำ ไม่ว่าจะเป็นบริเวณชุ่มน้ำ ทุ่งนา ร่องสวน แม่น้ำลำคลองและบึง (Bonin et al., 2006; Chan-ard et al., 2015) และมีแหล่งที่อยู่อาศัยและการกระจายตัวครอบคลุมหลายพื้นที่ นอกจากนี้เต่าน้ำจืดยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ทั้งในแหล่งน้ำและบนบก รวมทั้งมีอายุชั้ยาวนาน จึงเหมาะสมในการใช้เป็นสิ่งมีชีวิตเพื่อติดตามการปนเปื้อนในระยะยาว (Meyers-Schöne et al., 1993) และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนภายในบริเวณพื้นที่ที่มีความจำเพาะได้ (Beresford et al., 1981; Overmann and Krajicek, 1995)

เต่านา (snail-eating turtle) เป็นเต่าน้ำจืดวงศ์เต่าน้ำจืดโลกเก่า (Family Geoemydidae) สกุลเต่านา (Genus *Malayemys*) ซึ่งต่อมาจำแนกออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เต่านาโคราช (*Malayemys khoratensis*) เต่านาแม่น้ำโขง (*Malayemys subtrijuga*) และเต่านามลายู เต่านามลายู (*Malayemys macrocephala*) เป็นเต่าน้ำจืดที่มีขนาดเล็ก พบการแพร่กระจายตัวอยู่ในภาคกลาง (มนทกานต์ โมฆรัตน์ และคณะ, 2019) ในปี พ.ศ. 2558 กฎกระทรวงได้ประกาศให้เต่านามลายูเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองในบัญชีแนบท้ายกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มีสถานภาพอยู่ในกลุ่มที่มีความน่ากังวลน้อยที่สุด (least concern) ตามบัญชีดังกล่าว (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2560)

จากปัญหาผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมทั้งด้านกายภาพและชีวภาพจากการทำเกษตรกรรมและการประกอบกิจการต่าง ๆ ของมนุษย์ที่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ การปนเปื้อนที่เกิดขึ้นสามารถเพิ่มระดับได้จากการถ่ายทอดผ่านสายใยอาหาร จึงจำเป็นต้องอาศัยการติดตามเฝ้าระวังระดับการปนเปื้อนอย่างต่อเนื่องผ่านตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย โดยในการศึกษานี้ได้พิจารณาเลือกใช้เต่านามลายู *M. macrocephala* เป็นตัวแทนของเต่านาในประเทศไทยในการศึกษาเพื่อติดตามและบ่งชี้ถึงระดับการปนเปื้อนโลหะหนักในบริเวณพื้นที่เกษตร จังหวัด

พระนครศรีอยุธยา เนื่องจากเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและวางไข่แหล่งใหญ่ของเต่านามลายู (Keithmaleesatti, 2008) โดยศึกษาจากการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เพื่อลดการกระทำต่อตัวสัตว์และมุ่งเน้นศึกษาธาตุกลุ่มโลหะหนักด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy: SEM) และอุปกรณ์ตรวจจับสัญญาณเอกซ์เรย์ (X-ray detector: EDS หรือ EDX) เพื่อแยกแยะสัญญาณเอกซ์เรย์ของธาตุที่แตกต่างกัน (วิทยากร กรองทอง, 2559) ซึ่งถือเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและข้อมูลที่ได้จากการศึกษาอาจมีความสำคัญในแง่ของการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์ด้วย (Hopkins, 2006)

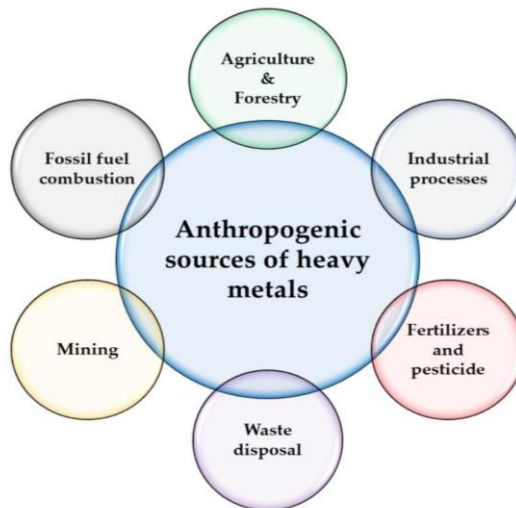
วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อตรวจสอบสัณฐานวิทยาและธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ในพื้นที่เกษตร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

2.1. ปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนัก

ปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักเป็นหนึ่งในปัญหาที่เกิดขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง หากแบ่งประเภทการปนเปื้อนจากแหล่งกำเนิดจะสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ 1) การปนเปื้อนโลหะหนักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยอาจพบแหล่งกำเนิดจากหินตะกอนดิน การระเบิดของภูเขาไฟ การทับถมและการผุกร่อนของหิน 2) การปนเปื้อนโลหะหนักที่มีแหล่งกำเนิดจากการกระทำของมนุษย์ (anthropogenic sources of heavy metals) โดยมีการรายงานแหล่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนส่วนใหญ่มาจากการกระบวนการต่าง ๆ ทางอุตสาหกรรม (industrial processes) การทำเหมืองแร่ (mining) น้ำทิ้งจากเมือง (waste disposal) และเกษตรกรรม (agriculture) (Roozbahani et al., 2015) ส่วนการปนเปื้อนโลหะหนักที่เกิดขึ้นเองธรรมชาติดังกล่าวยังมีรายงานน้อยมากเมื่อเทียบกับการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นจากมนุษย์ (ภาพที่ 2-1)



ภาพที่ 2-1 แหล่งที่มาของการปนเปื้อนโลหะหนักที่เกิดจากการประกอบกิจกรรมของมนุษย์ (Alengebawy et al., 2021)

ในปัจจุบันการทำเกษตรที่มีการใช้สารเคมีเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการใช้สารเคมีกลุ่มกำจัดศัตรูพืช หรือออร์กาโนคลอรีน เช่น DDT (dichloro diphenyl trichloroethane) และ aldrin and dieldrin สารกำจัดวัชพืช บัญ และสิ่ง ปฏิกูล (Alloway, 2013) และเนื่องจากสารเหล่านี้มักมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำจึงมักตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน (Perry et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการใช้ปุ๋ยเร่งการเจริญของพืชก่อให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนักในดิน อากาศ หรือแม้กระทั่งในแหล่งน้ำได้ (Lefrancq et al., 2013) จากที่กล่าวมาพื้นที่เกษตรซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของเต่าน้ำจืดอาจเป็นพื้นที่ที่พบการปนเปื้อนโลหะหนักได้ โดยในประเทศไทยพื้นที่เกษตรตอนกลางถือเป็นพื้นที่ราบลุ่มขนาดใหญ่ที่มีการทำเกษตรอย่างกว้างขวางและยังเป็นแหล่งที่อยู่และวางไข่ของเต่าน้ำจืด *M. macrocephala* และการ

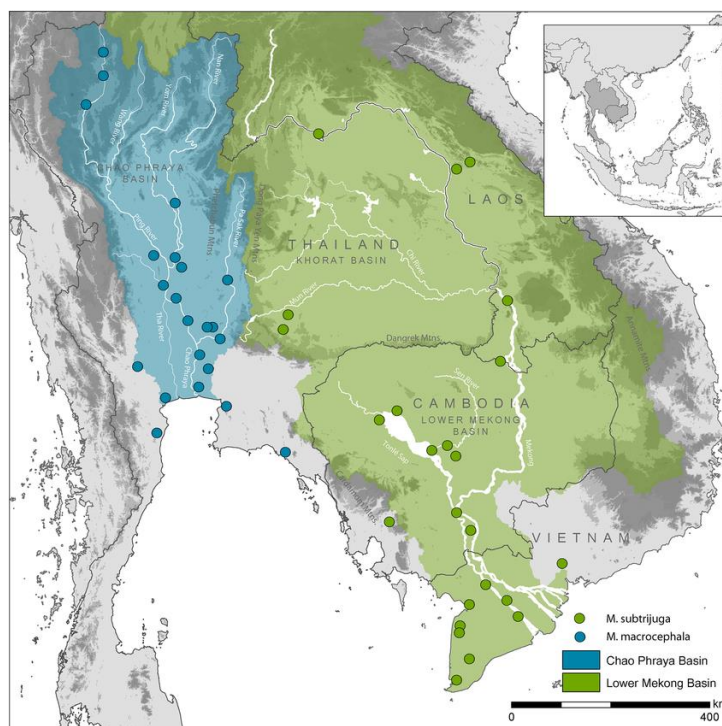
ปนเปื้อนที่เกิดขึ้นยังสามารถเพิ่มระดับการปนเปื้อนโลหะหนักไปยังระบบนิเวศผ่านสายใยอาหารได้ ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ รวมถึงมนุษย์ด้วย

การศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดในหลายพื้นที่ ยกตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ. 2009 Othman และคณะ ได้รายงานการปนเปื้อนโลหะแคดเมียมในกบหนองในพื้นที่เกษตรในอำเภอแม่สอด จังหวัดตากและ ในปี ค.ศ 1982 Polprasert ได้รายงานการตรวจพบสารปนเปื้อนโลหะแคดเมียม (Cd) ตะกั่ว (Pb) และปรอท (Hg) ในปลาที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำเจ้าพระยา และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีแหล่งอาศัยและแหล่งหาอาหารที่อยู่ในพื้นที่เกษตร อาทิ หอย นก และเต่าก็อาจได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนโลหะหนักเช่นกัน และจากการศึกษาพบว่าโลหะหนักสามารถส่งผ่านจากแม่เต่าไปยังไข่ได้ โดยโลหะหนักจะส่งผ่านเข้าไปในไข่ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอ และจะส่งผลเสียต่อร่างกายของแม่เต่า (Bishop et al., 1998)

2.2. การกระจายตัวของเต่านา *M. macrocephala* (ภาพที่ 2-2)

เต่านา (snail-eating turtle) เป็นเต่าน้ำจืดวงศ์เต่าน้ำจืดโลกเก่า (Family Geoemydidae) สกุลเต่านา (Genus *Malayemys*) ซึ่งต่อมาจำแนกออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เต่านาโคราช (*Malayemys khoratensis*) เต่านาแม่น้ำโขง (*Malayemys subtrijuga*) และเต่านามลายู (*Malayemys macrocephala*) เป็นเต่าน้ำจืดที่มีขนาดเล็ก พบการแพร่กระจายตัวอยู่ในภาคกลาง (มนทกานต์ โมฆรัตน์ และคณะ, 2019)

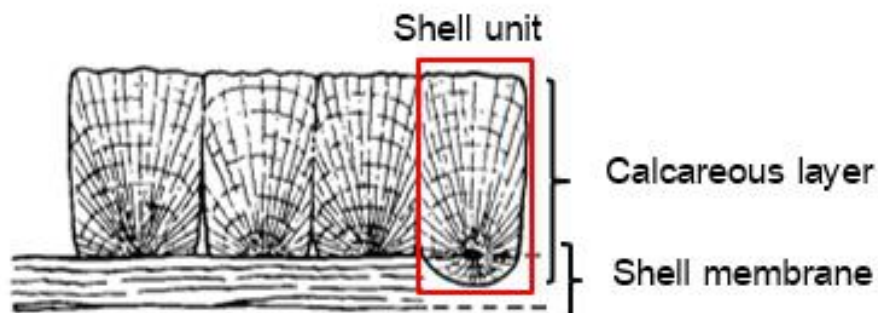
เต่านา *M. macrocephala* พบการกระจายตัวอยู่ในหลายพื้นที่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พื้นที่ตอนเหนือของประเทศมาเลเซีย ประเทศพม่า (Platt et al., 2000) และในประเทศไทยพบการกระจายตัวส่วนใหญ่ในพื้นที่ราบตอนกลางของประเทศโดยเฉพาะจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งเป็นพื้นที่เกษตรขนาดใหญ่ที่มีรายงานการพบการวางไข่ของเต่านา และนอกจากนี้ยังพบในพื้นที่หลายจังหวัด ได้แก่ ชลบุรี เชียงใหม่ กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ ราชบุรี และสมุทรสงคราม (Brophy, 2005)



ภาพที่ 2-2 แผนที่การกระจายตัวของเต่านา *M. macrocephala* แทนด้วยสัญลักษณ์วงกลมสีฟ้า และเต่านาแม่น้ำโขง *M. subtrijuga* แทนด้วยสัญลักษณ์วงกลมสีเขียว (Brophy, 2005)

2.3. เปลือกไข่เต่านา

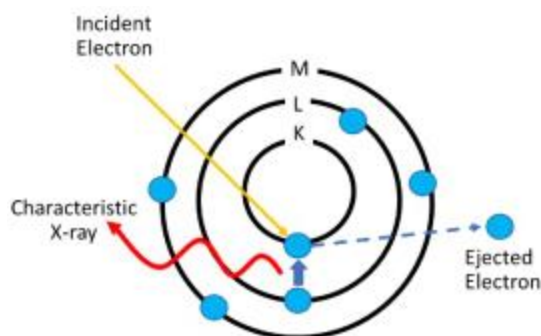
เปลือกไข่เต่าเป็นโครงสร้างที่อยู่ชั้นนอกสุดซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มและปกป้องเอ็มบริโอเพื่อให้อยู่รอดจนกระทั่งฟักและสามารถแบ่งออกได้ 2-3 ชั้น ขึ้นกับชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยในชั้นนอกสุดของเปลือกไข่ คือ ชั้น calcareous ซึ่งประกอบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ที่เรียงตัวกันแบบ aragonite เป็น shell unit (Packard and Packard, 1979; Packard, 1980; Packard and Hirsch, 1984; Woodall, 1984; Packard and Hirsch, 1986 และ Kittimasak, 2003) และชั้น shell membrane ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยที่เรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ และหากเป็นเปลือกไข่ที่มี 3 ชั้นจะพบเปลือกไข่ชั้นกลาง (middle layer) ร่วมด้วย (Youngsabanant and Nuamsukon, 2020) หากพิจารณาสัดส่วนความกว้างต่อความสูงของ shell unit จะสามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภท ได้แก่ เปลือกไข่แข็ง (rigid eggshell) ลักษณะ shell unit จะความสูงมากกว่าความกว้างอย่างเห็นได้ชัด พบได้ในวงศ์ Testudinidae, Trionychidae และ Kinosternidae และเปลือกไข่แบบยืดหยุ่น (flexible eggshell) ลักษณะของ shell unit จะมีความกว้างมากกว่าความสูง (Packard and Hirsch, 1986) มักพบในวงศ์ Emydidae และ Chelydridae และในเต่าทะเลวงศ์ Cheloniidae และ Dermochelyiidae (Packard and Hirsch, 1984) (ภาพที่ 2-3)



ภาพที่ 2-3 แบบจำลององค์ประกอบของโครงสร้างเปลือกไข่เต่าแบบเปลือกแข็ง (rigid eggshell) พบในเต่าน้ำจืด *Trionyx spiniferus* ซึ่งประกอบด้วยชั้น calcareous ที่ประกอบด้วย shell unit และชั้น shell membrane (Packard et al., 1991)

2.4. เทคนิคตรวจสอบ

เทคนิคก่อนหน้าที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น เทคนิค atomic absorption spectroscopy หรือ AAS เป็นเทคนิควิเคราะห์ธาตุที่อาศัยหลักการจากการชนและดูดซับแสงจากแหล่งกำเนิดของอะตอมอิสระที่เป็นไอและอยู่ในสภาวะพื้น โดยปัญหาที่พบในวิธีการตรวจสอบด้วยเครื่อง AAS คือ สัญญาที่วัดได้ต่ำกว่าที่ควร ไม่เสถียรและมีการรบกวนสูง นอกจากนี้ยังต้องบำรุงรักษาสภาพเครื่องมืออยู่ตลอด (ฐิติรัตน์ จารุวาระกุล, 2548) และเทคนิค inductively coupled plasma mass spectrometry หรือ ICP-MS เป็นเทคนิควิเคราะห์ธาตุที่อาศัยหลักการของอะตอมมิสเปกโตรมิเตอร์ (atomic spectroscopy) โดยอาศัยพลังงานจากพลาสมาในการทำให้อะตอมกลายเป็นไอออนประจุบวกก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ต่อไป วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ธาตุได้หลากหลายชั้นแล้วมีความไวในการวิเคราะห์สูง สามารถวัดธาตุที่มีปริมาณต่ำได้ แต่การให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่ต้องการจะต้องมีความเข้าใจหลักการ วิธีการวิเคราะห์ ข้อจำกัดต่าง ๆ และความละเอียดอ่อนในการเตรียมสารมาตรฐาน (ลาวัลย์ ศรีพงษ์, 2552) จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าวิธีการข้างต้นเป็นกระบวนการทางเคมีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนซับซ้อน เพื่อให้ง่ายต่อศึกษาการปนเปื้อนโลหะหนักในไข่เต่า การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้เทคนิค EDX (energy dispersion X-ray) ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องสเปกโตรเมตรีรังสีเอกซ์โดยอาศัยหลักการจากการชนตัวอย่างที่ต้องการศึกษาด้วยลำอิเล็กตรอนเพื่อให้แตกตัวเป็นไอออนและปลดปล่อยรังสีเอกซ์ (X-ray) (ภาพที่ 2-4) ซึ่งมีค่าเฉพาะตามชนิดธาตุ ผลที่ได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าซึ่งจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อประเมินและรายงานผลเป็นรังสีสเปกตรัมต่อไป (ดลฤดี โตเย็น, 2562)



ภาพที่ 2-4 แผนภาพจำลองเทคนิค electron dispersive X-ray เมื่อมีการหลุดจากวงโคจรของอิเล็กตรอนวงในสุด (ระดับชั้นพลังงาน K) เนื่องจากการชนด้วยลำอิเล็กตรอน เพื่อรักษาเสถียรภาพ อิเล็กตรอนวงโคจรถัดไป (ระดับชั้นพลังงาน L) จึงเคลื่อนเข้าแทนที่พร้อมปล่อยพลังงานในรูปรังสีเอ็กซ์ (X-ray) ซึ่งมีค่าเฉพาะตามชนิดของธาตุสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบได้ (ดลฤดี โต้เย็น, 2562)

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

3.1 สัตว์ทดลอง

โครงการนี้ใช้ตัวอย่างเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ที่เก็บจากพื้นที่เกษตรและนำมาจำหน่ายที่ตลาดน้ำลุ่มน้ำ อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยาเมื่อวันที่ 7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564 โดยทำการศึกษาตัวอย่างไข่ทั้งหมด 9 ฟอง (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 ไข่ของเต่านา *M. macrocephala* ที่เก็บจากพื้นที่เกษตร อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564)

3.2 การวัดขนาดพื้นฐานและการประเมินภายนอกของเปลือกไข่เต่า

วัดความกว้าง และความยาวของเปลือกไข่เต่า ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier calipers) แบบดิจิตอลและชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งดิจิตอล รวมถึงบันทึกรูปและประเมินลักษณะภายนอกของเปลือกไข่เต่านา

3.3 การเตรียมตัวอย่าง

แยกไข่ภายในออกจากเปลือกไข่และเก็บในหลอดพลาสติก หลังจากนั้นล้างเปลือกไข่ด้วยน้ำกลั่นจนสะอาดและนำตัวอย่างแช่ใน 10% neutral buffered formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพ 3-2) เปลี่ยนไปแช่ใน 40% ethanol และ 70% ethanol เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาตากให้แห้ง (air dry) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเก็บในโหลดูดความชื้นที่บรรจุซิลิกาเจล



ภาพที่ 3-2 การแยกไข่แดงและไข่ขาวของไข่เต่านา *M. macrocephala* ที่เก็บจากพื้นที่เกษตรอำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564)

3.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาและธาตุองค์ประกอบ

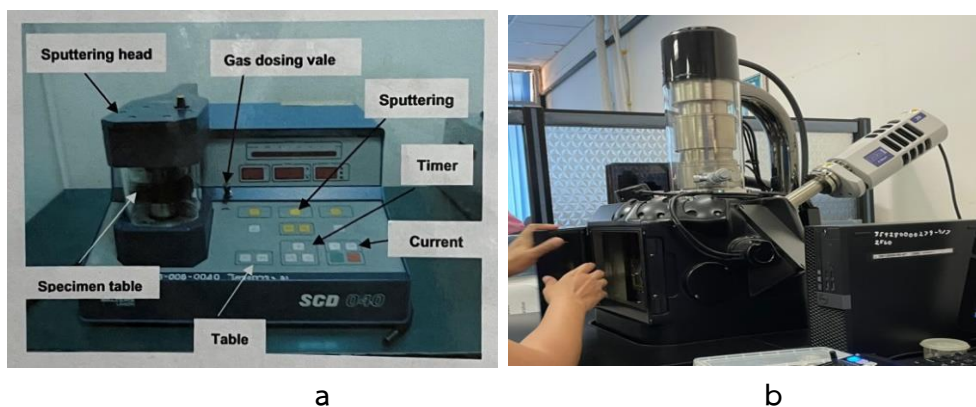
ทำการหักเปลือกไข่ที่แห้งให้มีขนาดประมาณ 0.5×0.5 ตารางเซนติเมตร ทั้ง 9 ตัวอย่าง ติดบนแท่นทองเหลือง (stub) ด้วยเทปคาร์บอน (carbon tape) โดยให้หันด้านที่หักใหม่ขึ้นด้านบน ก่อนนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM-EDS รุ่น IT300) เพื่อ

- ตรวจสอบสัณฐานวิทยา

นำตัวอย่างไปฉาบทองคำด้วยเครื่อง sputter coater รุ่น SCD 040 ตั้งค่าโดยเริ่มจากกดปุ่ม power และรอให้มีความดันภายใน chamber มีค่าประมาณ 0.05 mbar จากนั้นกดปุ่ม sputtering 2 ครั้ง เครื่องจะติดไฟสีเหลือง ขั้นตอนต่อไปกดปุ่ม stop เพื่อปรับกระแสให้เป็น 15 mA โดยปุ่ม current จากนั้นจึงกดปุ่ม start (ภาพที่ 3-3a) รอจนเสร็จกระบวนการก่อนนำไปศึกษาสัณฐานด้วย SEM (ภาพที่ 3-3b) ทำการถ่ายภาพทั้งหมด 4 ภาพ ได้แก่ 1) ภาพถ่าย cross-section view โครงสร้างระดับจุลภาคของชั้น calcareous และชั้น shell membrane 2) ภาพถ่ายแนวการเรียงตัวของผลึก aragonite 3) ภาพถ่ายลักษณะของผลึก aragonite และ calcite และ 4) ภาพถ่ายลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยของชั้น shell membrane

- ตรวจสอบธาตุองค์ประกอบ

ทำการศึกษาโดย SEM เพื่อตรวจสอบธาตุองค์ประกอบที่อาศัยอุปกรณ์ตรวจจับสัญญาณเอ็กซ์เรย์ (energy dispersive X-ray หรือ EDX) เพื่อแยกแยะสัญญาณของธาตุที่แตกต่างกัน เริ่มจากนำตัวอย่างเข้าไปยังเครื่อง SEM ดังภาพ (b) ปิดฝาเครื่องให้เรียบร้อย กดปุ่ม pump รอจนกว่าความดันพร้อมภายในสุญญากาศพร้อมใช้การและกด beam on เพื่อให้ระบบการส่องกราดทำงาน จากนั้นเลื่อน joystick หาตำแหน่งหรือพื้นที่โฟกัสในการส่องกราดในการยิง Beam gun เพื่อตรวจสอบธาตุองค์ประกอบ โดยการศึกษาทั้งสองขั้นตอนนี้ทำโดยอาศัยเครื่องมือในศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3-3 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา sputter coater (a) scanning electron microscope (b)

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติเชิงบรรยาย (descriptive statistic) ในการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งในส่วนของความหนาของเปลือกไข่และร้อยละธาตุองค์ประกอบ โดยรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการศึกษา

4.1 สัณฐานวิทยาและโครงสร้างระดับจุลภาค

ผลการทดลองพบว่าเปลือกไข่เต่านาแบ่งออกเป็น 2 ชั้น ได้แก่ เปลือกไข่ชั้นนอก (calcareous layer) ซึ่งพบ shell unit และเปลือกไข่ชั้นใน (shell membrane) และเมื่อพิจารณาสัดส่วนความกว้างต่อความสูงของ shell unit ทำให้ทราบว่าเปลือกไข่เต่านานี้มีโครงสร้างเปลือกไข่เป็นแบบเปลือกแข็ง (rigid eggshell) (Packard and Hirsch, 1986) ดังภาพที่ 4-1

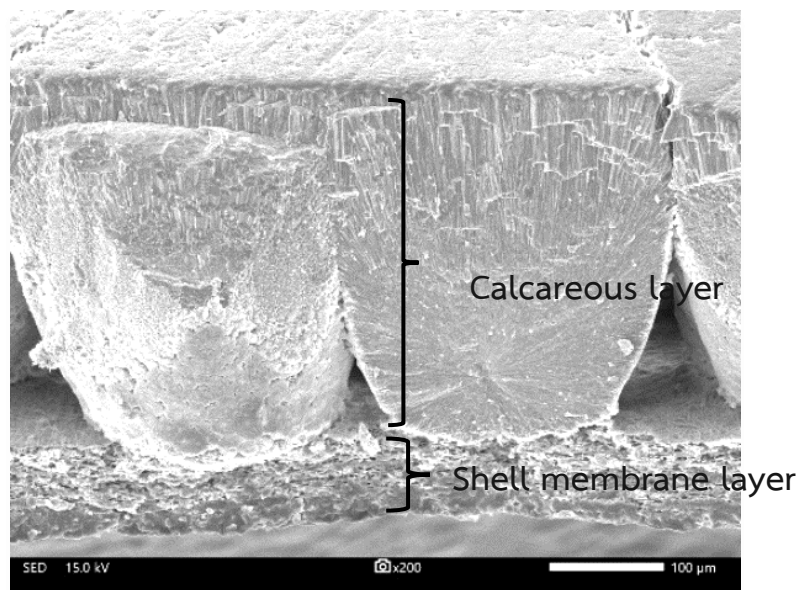
การตรวจสอบสัณฐานวิทยาและการประเมินภายนอกของเปลือกไข่เต่า พบว่ามีน้ำหนักความกว้าง และความยาวของเปลือกไข่ไม่มีความใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ความกว้าง ความยาว และน้ำหนักของเปลือกไข่เต่า *M. macrocephala* ที่เก็บจากพื้นที่เกษตร อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564)

	กว้าง (มิลลิเมตร)	ยาว (มิลลิเมตร)	หนัก (กรัม)
Mean	25.20	37.43	13.00
n = 9			

4.1.1 ความหนาของชั้น calcareous

ชั้น calcareous และเปลือกไข่เต่า *M. macrocephala* มีความหนาเฉลี่ย 141.95 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4-2) มีผลลักษณะคล้ายเข็มและรัศมีชี้ออกจากจุดศูนย์กลางและมีรูแทรกระหว่าง shell unit ดังภาพที่ 4-1



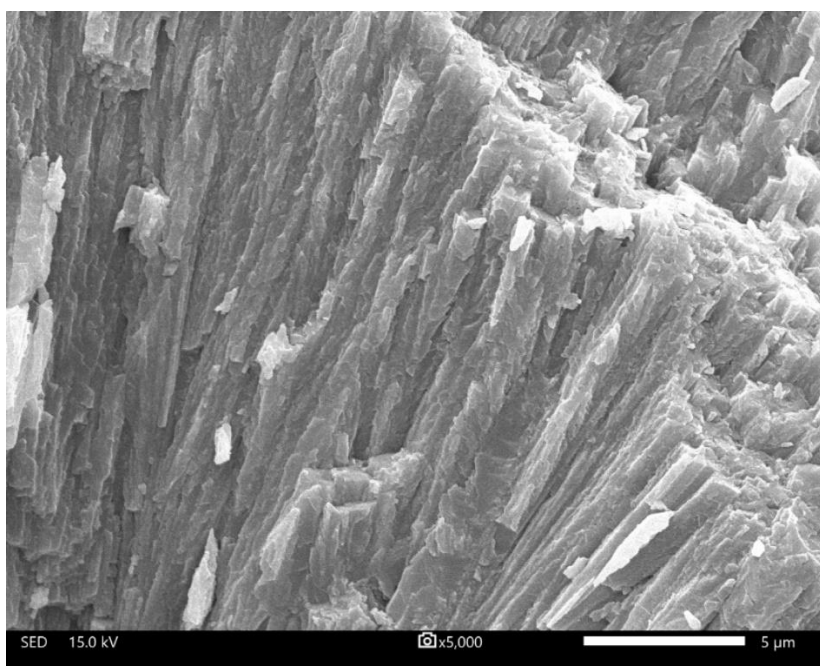
ภาพที่ 4-1 ภาพถ่าย cross-section view โครงสร้างระดับจุลภาคของชั้น calcareous และชั้น shell membrane ของเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ไข่หมายเลข 3 โดย SEM กำลังขยาย 200x

4.1.2 ความหนาของชั้น shell membrane

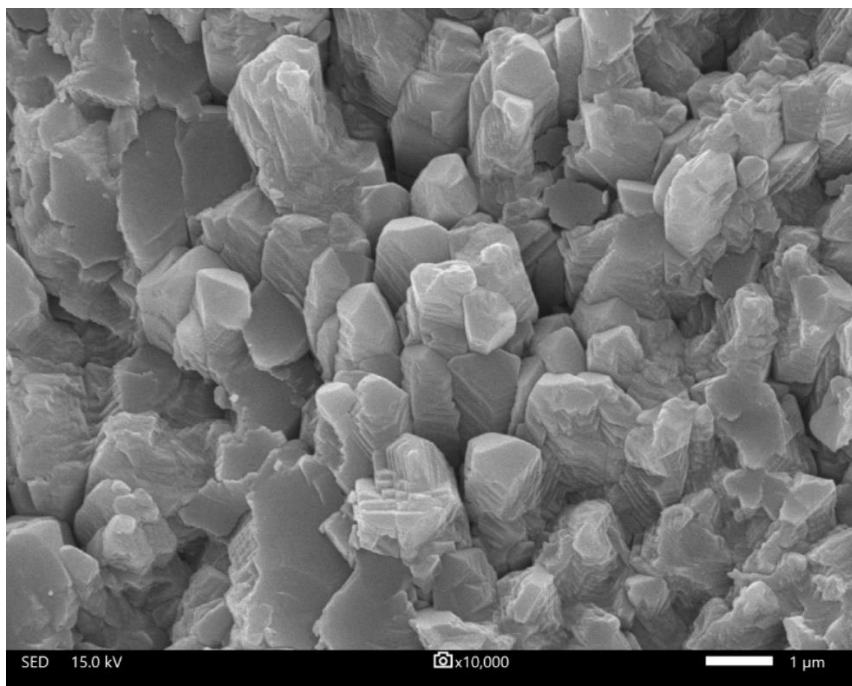
ชั้น shell membrane ของเปลือกไข่เต่า *M. macrocephala* มีความหนาเฉลี่ย 33.60 ไมโครเมตร และพบว่าสัดส่วนความหนาระหว่างชั้น calcareous และ shell membrane คือ 1 : 0.23 ซึ่งเทียบจากค่าเฉลี่ยความหนาของชั้น calcareous ทั้งหมด 9 ตัวอย่างและเนื่องจากไม่พบชั้น shell membrane ใน 3 ตัวอย่าง จึงทำการเทียบสัดส่วนโดยใช้เพียง 6 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4-2)

4.1.3 ลักษณะทางสัณฐานอื่น ๆ ที่ตรวจสอบ

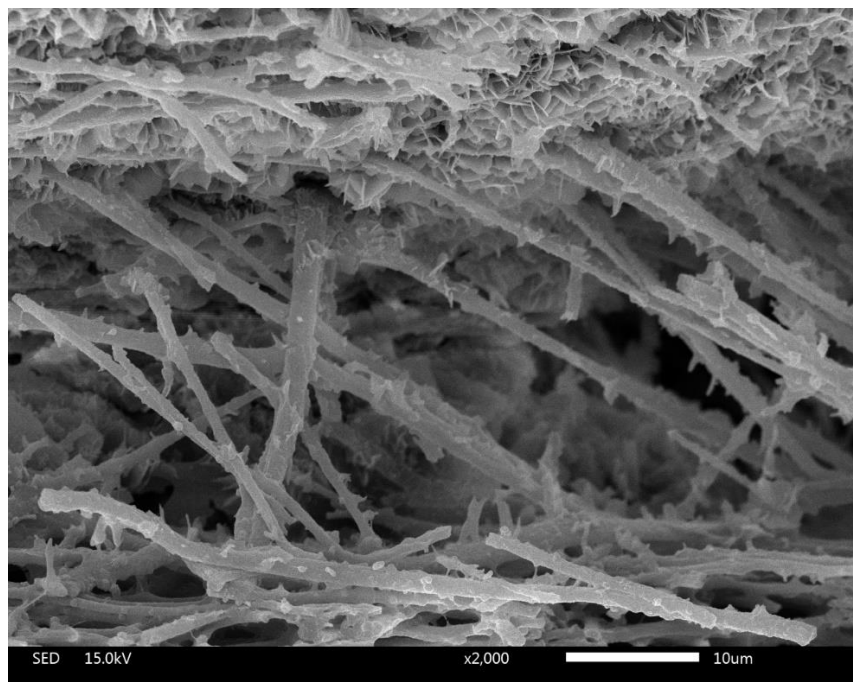
ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบลักษณะอื่น ๆ ของเปลือกไข่เต่า *M. macrocephala* ได้แก่ ภาพถ่ายแนวการเรียงตัวของผลึก aragonite ซึ่งมีการเรียงตัวในลักษณะเรียงชิดติดกันในแนวรัศมีซึ่งออกจากจุดกำเนิด ภาพถ่ายลักษณะผลึก aragonite ซึ่งมีลักษณะคล้ายเข็มพบตั้งแต่บริเวณชั้น shell membrane ไปถึงด้านนอกสุดของเปลือกไข่เต่า (ภาพที่ 4-2) และ calcite ลักษณะคล้ายก้อนหินซึ่งพบค่อนข้างทางด้านล่างใกล้กับชั้น shell membrane (ภาพที่ 4-3) และภาพถ่ายลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยของชั้น shell membrane ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยสานทับกันอย่างไม่เป็นระเบียบ (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-2 ภาพถ่ายโครงสร้างระดับจุลภาคของผลึก aragonite ในชั้น calcareous ของเปลือกไข่เต่า *M. macrocephala* ไข่หมายเลข 9 โดย SEM กำลังขยาย 5000x



ภาพที่ 4-3 ภาพถ่าย cross-section view โครงสร้างระดับจุลภาคของผลึก calcite ในชั้น calcareous ของเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ไข่หมายเลข 6 โดย SEM กำลังขยาย 10000x



ภาพที่ 4-4 ภาพถ่ายโครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใยชั้น shell membrane ของเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ไข่หมายเลข 6 โดย SEM กำลังขยาย 2000x

ตารางที่ 4-2 สัดส่วนความหนาของชั้น calcareous และ shell membrane ของเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ที่เก็บจากพื้นที่เกษตร อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564)

ชั้นของเปลือกไข่	จำนวนไข่ (ฟอง)	ความหนา (μm)	Mean \pm S.D.
Calcareous	1	122.106	141.95 \pm 24.85 μm (n = 9)
	2	140.169	
	3	155.75	
	4	108.56	
	5	105.169	
	6	166.548	
	7	145.619	
	8	162.927	
	9	170.733	
Shell membrane	1	28.671	33.60 \pm 4.60 μm (n = 6)
	2	34.25	
	3	38.513	
	4	36.979	
	5	35.951	
	6	27.247	

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือกไข่เต่านาที่สังเกตได้จากการศึกษาครั้งนี้มีหลายจุดที่เหมือนกับข้อมูลจากก่อนหน้าที่บรรยายไว้ก่อนหน้านี้ เช่น เปลือกไข่ของเต่านาประกอบด้วย 2 ชั้น ได้แก่ ชั้น calcareous และ shell membrane และลักษณะการเรียงตัวของ shell unit หรือแม้กระทั่งการเรียงตัวของผลึกของเปลือกไข่เต่านา (วิเชษฐ คนชื้อ, 2537) และลักษณะที่แตกต่างได้แก่ พบปริมาณผลึกแบบ aragonite และ calcite แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

จากการวิเคราะห์สัดส่วนความหนาของชั้น calcareous และ shell membrane พบว่าเปลือกไข่เต่ามีสัณฐานวิทยาของเปลือกเป็นแบบเปลือกแข็ง (rigid eggshell) ซึ่งมีเซลล์ยูนิต (shell unit) มีขอบเขตแยกแต่ละเซลล์อย่างชัดเจนเรียงเป็นแนวชิดกันเนื่องจากเพื่อการป้องกันการสูญเสียน้ำและอันตรายจากแบคทีเรียและเชื้อรา เพื่อช่วยเพิ่มโอกาสในการฟักตัว ลักษณะข้างต้นประกอบด้วยโครงสร้างของ CaCO_3 ซึ่งพบเป็นผลึกแบบ aragonite ที่มีลักษณะคล้ายเข็มชี้ออกจากจุดกำเนิดที่อยู่ใกล้กับเปลือกไข่ชั้น (shell membrane) โดยทิศทางพุ่งออกแบบรังสี ซึ่งเป็นลักษณะผลึกเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและเป็นโครงสร้างที่ช่วยเสริมความแข็งแรงของเปลือกไข่ และพบผลึก calcite ซึ่งลักษณะคล้ายก้อนหินซึ่งมักพบอยู่บริเวณใกล้กับเปลือกไข่ชั้น โดยจะพบมากบริเวณรอยต่อของเซลล์ยูนิตแต่ละอันซึ่งคาดว่าทำหน้าที่ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับเปลือกไข่ ผลึกทั้งสอง

แบบนี้เกี่ยวข้องกับโครงสร้างแคลเซียมของเปลือกไข่ที่แตกต่างกัน ในส่วนของ shell membrane ที่พบในลักษณะเป็นเส้นใยสานกันอย่างไม่เป็นระเบียบเป็นบริเวณที่พบการฝังตัวของเซลล์ยูนิต์ (Gibbons et al., 2020)

4.2 ผลการตรวจสอบธาตุองค์ประกอบ

จากการตรวจสอบธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่านาพบธาตุทั้งหมด 12 ธาตุ พบธาตุองค์ประกอบหลักของเปลือกไข่เต่านา ได้แก่ O 51.1 ± 13.37 C $25.97\pm 9.51\%$ และ Ca $12.54\pm 8.86\%$ ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น CaCO_3 และ N $19.86\pm 6.92\%$ ที่ตรวจพบอาจเป็นโปรตีนที่หลงเหลืออยู่ในเปลือกไข่ โดยธาตุที่พบรองลงมา ได้แก่ P $4.76\pm 4.27\%$ และ Mg $0.33\pm 0.19\%$ ซึ่งเป็นธาตุที่ถูกนำไปใช้ในการเจริญของเอ็มบริโอ (Packard and Hirsch, 1984; Packard and DeMarco, 1991) Al $0.63\pm 0.47\%$ ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเต่าและสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Frye, 1995; Ikonopoulou et al., 2011) และ S Cl Al Na K และ Si เป็นธาตุองค์ประกอบพื้นฐานที่พบในปริมาณน้อย (Nuamsukon et al., 2009; Sikiwat et al., 2015) (ตารางที่ 4-3)

ตารางที่ 4-3 Mean \pm S.D. ร้อยละธาตุองค์ประกอบที่พบในเปลือกไข่เต่านา *M. macrocephala* ที่เก็บจากพื้นที่เกษตร อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (7 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2564)

ธาตุองค์ประกอบ	Mean	S.D.
O	51.10	13.37
C	25.97	9.51
N	19.86	6.92
Ca	12.54	8.86
P	4.76	4.27
S	1.30	1.11
Cl	0.66	0.55
Al	0.63	0.47
Na	0.62	0.41
K	0.57	0.42
Mg	0.33	0.19
Si	0.26	0.02

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

การศึกษาค้างนี้ได้อใช้ตัวอย่างเปลือกไข่เต่า *M. macrocephala* ที่เก็บจากพื้นที่เกษตรอำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา นำมาตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเปลือกไข่และร้อยละธาตุองค์ประกอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากการศึกษาพบว่าเปลือกไข่เต่าแบ่งออกเป็น 2 ชั้น ได้แก่ 1) เปลือกไข่ชั้นนอก (calcareous layer) ซึ่งประกอบด้วย shell unit ที่มีความสูงมากกว่าความกว้าง ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้ทราบว่าเปลือกไข่เต่ามีลักษณะเป็นเปลือกไข่แข็ง (rigid eggshell) และ 2) เปลือกไข่ชั้นใน (shell membrane) มีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายกับเส้นใยสานทับกันอย่างไม่เป็นระเบียบ และการศึกษาธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่าด้วยเทคนิค EDX ทำให้ทราบว่าธาตุองค์ประกอบหลัก (main component) ของเปลือกไข่คือ O C Ca ซึ่งอยู่ในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) และพบธาตุอื่น ๆ ที่พบน้อย (trace element) เช่น N P S Cl Al Na K Si และในการศึกษาค้างนี้ไม่พบการปนเปื้อนโลหะหนักในตัวอย่างเปลือกไข่เต่าทั้ง 9 ตัวอย่าง ผลการศึกษาที่ได้ทำให้เข้าใจถึงสัณฐานวิทยาและธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่าซึ่งสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อติดตามแนวโน้มการปนเปื้อนโลหะหนักในพื้นที่เกษตรในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่าโดยใช้ EDS ไม่พบโลหะหนักปนเปื้อน ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุต่าง ๆ โดยมีข้อเสนอแนะในการทำวิจัยเพิ่มเติมดังนี้

- ตัวอย่างศึกษา

ควรศึกษาการปนเปื้อนโลหะหนักเพิ่มเติมในตัวอย่างไข่ขาวและไข่แดงที่ได้ทำการแยกออกจากเปลือกไข่ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าตัวอย่างไข่เต่าไม่มีการปนเปื้อนโลหะหนักจริง

- เทคนิคตรวจสอบ

เนื่องจากวิธี EDS ที่ใช้ในการศึกษาอาจมีค่า sensitivity น้อยจนไม่สามารถตรวจสอบโลหะในเปลือกไข่ได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากไม่มีการปนเปื้อนโลหะหนักในพื้นที่ศึกษาหรืออาจไม่มีโลหะสะสมในเปลือกไข่ ดังนั้นจึงควรเปลี่ยนเทคนิคตรวจสอบให้มีความเหมาะสมและมีค่า sensitivity สูง

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

ฐิติรัตน์ จารุวาระกุล. 2548. หลักการและการแก้ปัญหาเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรมิเตอร์. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www1.dpim.go.th/ppr/title.php?> [14 กรกฎาคม 2564]

ดลฤดี โตเย็น. 2562. การวิเคราะห์ธาตุและองค์ประกอบด้วยเทคนิค energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www3.rdi.ku.ac.th/cl/knowledge/EDS.pdf> [14 กรกฎาคม 2564]

มนทกานต์ โมฆรัตน์, จุฬามาศ นาคำ, ภูวนศวรรค์ พยัพพานนท์, อติพร ผลเจริญ, ทศพล ไชยอนันต์พร, เขมิกา ลมไธสง และศรัณย์ เกียรติมาลีสถิตย์. 2562. สันฐานวิทยาของเต่านา (Genus Malayemys) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 47: 296–306.

ลาวัลย์ ศรีพงษ์. 2552. เทคนิค IPC-MS ในงานเภสัชวิเคราะห์. ไทยโภชนาการ. 4: 1–19.

วิทยากร กรองทอง, 2559. รู้จักอุปกรณ์ตรวจจับสัญญาณในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนนิ่ง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www2.mtec.or.th/th/e-magazine/admin/upload/301_11.pdf [14 กรกฎาคม 2564]

วิเชษฐ คนชื่อ, 2537. การศึกษาโครงสร้างเปลือกไข่เต่าที่พบในประเทศไทยบางชนิดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2560. สรุปชนิดพันธุ์ที่คุกคามของประเทศไทย: สัตว์มีกระดูกสันหลัง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

ภาษาอังกฤษ

Alengebawy, A., Abdelkhalek, S.T., Qureshi, S.R., and Wang, M.-Q. 2021. Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. Toxics. 9: 42.

Alloway, B.J. 2013. Sources of heavy metals and metalloids in soils. In: Alloway B. (Ed.), Heavy Metals in Soils. Environmental Pollution, Book. 22. Dordrecht: Springer.

Bereford, W.A., Donovan, M.P., Henninger, J.M., and Waalkes, M.P. 1981. Lead in the bone and soft tissues of box turtles caught near smelters. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 27: 349–352.

Bishop, C.A., Ng, P., Pettit, K.E., Kennedy, S.W., Stegeman, J.J., Norstrom, R.J., and Brooks, R.J. 1998. Environmental contamination and developmental abnormalities in eggs and hatchlings of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from the Great Lakes-St Lawrence river basin. Environmental Pollution. 101: 143–156.

- Bonin, F., Devaux, B., and Dupré, A. 2006. Turtles of the World, 1st edition. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press.
- Brophy, T.R. 2005. Geographic distribution of the Southeast Asian turtle of the genus *Malayemys* (Testudines: Bataguridae). Bulletin of the Chicago Herpetological Society. 40: 21–33.
- Chan-ard, T., Parr, J.W.K., and Nabhitabhata, J. 2015. A Field Guide to the Reptiles of Thailand. New York: Oxford University Press.
- Frye F.L. 1995. Nutritional considerations. In: Warwick C., Frye F.L., Murphy J.B. (Eds.), Health and Welfare of Captive Reptiles, pp 82–97. Dordrecht: Springer.
- Gibbons, J., Nimmagadda, S., and Geetha-Loganathan, P. 2020. The ultrastructure of *Chrysemys picta* eggshell and shell membrane. American Journal of Zoology. 3: 10–16.
- Hopkins, W.A. 2006. Use of tissue residues in reptile ecotoxicology: a call for integration and experimentalism. In: Gardner, S.C. and Oberdörster (Eds.), Toxicology of Reptiles. pp. 35–62. Boca Raton FL: Taylor & Francis.
- Ikonomopoulou, M.P. Olszowy, H., Limpus, C., Francis, R., and Whittier, J., 2011. Trace element concentrations in nesting flatback turtles (*Natator depressus*) from Curtis Island, Queensland, Australia. Marine Environmental Research. 71: 10–16.
- Keithmaleesatti, S. 2008. An assessment of the association of organochlorine pesticide contamination and reproductive effects on the snail-eating turtle (*Malayemys macrocephala*) in the lower Chao Phraya river basin, Thailand. Doctoral dissertation, Ph.D. Program in Environmental Science (Interdisciplinary Program), Graduate school, Chulalongkorn University.
- Kitimasak, W., Thirakhupt, K., and Moll, D.L. 2003. Eggshell structure of the Siamese narrow-headed softshell turtle *Chitra chitra* Nutphand, 1986 (Testudines: Trionychidae). ScienceAsia. 29: 95–98.
- Lefrancq, M., Imfeld, G. Payraudeau, S., and Millet, M. 2013. Kresoxim methyl deposition, drift and runoff in a vineyard catchment. Science of the Total Environment. 442: 503–508.
- Meyers-Schöne, L., Shugart, L.R., Beauchamp, J.J., and Walton, B.T. 1993. Comparison of two freshwater turtle species as monitors of radionuclide and chemical contamination: DNA damage and residue analysis. Environmental Toxicology and Chemistry. 12: 1487–1496.
- Nuamsukorn, S., Chuen-Im, T., Rattanayuvakorn S., Panishkan, K., Narkkong, N., and Areekijsee, M. 2009. Thai marine turtle eggshell: Morphology and

- ultrastructure and composition. Journal of Microscopy Society of Thailand. 23: 52–56.
- Overmann, S.R. and Krajicek, J.J. 1995. Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as biomonitors of lead contamination of the Big River in Missouri's old lead belt. Environmental Toxicology and Chemistry. 14: 689–695.
- Othman, M.S., Khonsue, W., Kitana, J., Thirakhupt, K. Robson, M.G., and Kitana, N. 2009. Cadmium accumulation in two populations of rice frogs (*Fejervarya limnocharis*) naturally exposed to different environmental cadmium levels. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 83: 703–707.
- Packard, M.J., and Packard, G.C. 1979. Structure of the shell and tertiary membrane of egg soft eggshell turtles (*Trionyx spiniferus*). Journal of Morphology. 159: 131–144.
- Packard, M.J. 1980. Ultrastructural morphology of the shell and shell membrane of egg of common snapping turtles (*Chelydra serpentina*). Journal of Morphology. 165: 187–204.
- Packard, M.J., and DeMarco, V.G. 1991. Eggshell structure and formation in egg of oviparous reptiles. In: Deeming, D.C., and Ferguson, M.W. (Eds.), Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles, pp. 53–69. Cambridge: Cambridge University Press.
- Packard, M.J., and Hirsch, K.F. 1984. Structure of shell from egg of Kinosternid turtles. Journal of Morphology. 174: 197–205.
- Packard, M.J., and Hirsch, K.F. 1986. Scanning electron microscopy of eggshells of contemporary reptile. Scanning Electron Microscopy. 8: 1581–1590.
- Perry, A.S., Yamamoto, I., Ishaaya, I., and Perry, R.Y. 1998. Insecticides in agriculture and environment: Retrospects and prospects. In: McNeal, B.L. Tardieu, F. Van Keulen, H. and Van Vleck D. (Eds.), Applied Agriculture, pp. 261. Berlin: Springer.
- Platt, S.G., Kalyar, and Win, K.K. 2000. Exploitation and conservation status of tortoises and freshwater in Myanmar. Chelonian Research Monographs. 2: 95–100.
- Polprasert, C. 1982. Heavy metal pollution in the Chao Phraya River estuary, Thailand. Water Research. 16: 775–784.
- Rauschenberger, R.H., Wiebe, J.J., Buckland, J.E., Smith, J.T., Sepulveda M.S. and Gross, T.S. 2004. Achieving environmentally relevant organochlorine pesticide concentrations in eggs through maternal exposure in *Alligator mississippiensis*. Marine Environmental Research. 58: 851–856.

- Rie, M.T., Lendas, K.A., and Callard, I.P. 2001. Cadmium: Tissue distribution and binding protein induction in the painted turtle, *Chrysemys picta*. Comparative Biochemistry and Physiology. 130: 41–51.
- Roobahani, M.M., Sobhanardakani, S., Karimi, H., and Sorooshnia, R. 2015. Natural and anthropogenic source of heavy metals pollution in the soil samples of an industrial complex: A case study. Iranian Journal of Toxicology. 9: 1336–1341.
- Sikiwat, S., Areekijderree, M., Sribuddhachart, K., Kerdkriankrai, S., Namchote, S., Kittiwattanawong, K., and Thongchai, C. 2015. Comparative eggshell ultrastructure of three species of sea turtle. In Proceeding of 53th Kasetsart University Annual Conference: Science, Genetic Engineering, Architecture and Engineering, Agro-Industry, Natural Resources and Environment. pp. 245–251. Bangkok, Thailand.
- Smith, P.N., Cobb, G.P., Godard-Codding, C., Hoff, D., McMurry, S.T., Rainwater, T.R., and Reynolds, K. D. 2007. Contamination exposure in terrestrial vertebrates. Environmental Pollution. 150: 41–64.
- Tryfonas, A.E., Tucker, J.K., Brunkow, P.E., Johnson, K.A., Hussein, H.S., and Lin, Z.Q. 2006. Metal accumulation in eggs of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in the Lower Illinois River. Chemosphere, 63, 39–48.
- Woodall, P.F. 1984. The structure and some functional aspect of the eggshell of the broad-shelled river tortoise *Chelodina expansa*. (Testudinata: Chelidae). Australian Journal of Zoology. 8: 131–144.
- Youngsabanant, M. and Nuamsukon, S. 2020. Morphology and elemental components of sea turtle eggshell using scanning electron microscopy. Science, Engineering and Health Studies. 14: 73–82.
- Yu, S., Halbrook, R.S., Sparling, D.W., and Colombo, R. 2011. Metal accumulation and evaluation of effects in a freshwater turtle. Ecotoxicology. 20: 1801–1812.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

10 % neutral buffered formalin (pH 4)

Formaldehyde 37% solution	100	mL
Distilled water	900	mL
Sodium phosphate dibasic, anhydrous (Na_2HPO_4)	6.5	g
Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4.0	g

ภาคผนวกที่ 2
ข้อมูลธาตุองค์ประกอบของเปลือกไข่เต่า *Malayemys macrocephala* จาก
พื้นที่เกษตรกรรม อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (%)

ไข่ใบที่	O	C	Ca	N	P	S	Cl	Al	Na	K	Mg	Si
1	58.01	16.48	25.12	-	10.80	-	-	-	0.39	-	-	-
	37.01	10.17	40.66	-	-	-	-	0.33	0.41	0.62	-	-
	57.69	15.68	26.43	-	16.16	-	-	-	0.20	-	-	-
	38.30	13.91	28.97	-	-	-	0.71	0.39	0.95	0.59	-	-
2	61.51	25.00	12.64	-	13.25	-	0.25	-	0.59	-	-	-
	36.93	25.30	22.77	-	-	0.59	-	-	0.77	0.39	-	-
	25.47	42.37	1.37	22.72	-	2.83	1.76	0.82	1.00	1.66	-	-
	61.07	21.79	16.57	-	12.28	-	-	-	0.57	-	-	-
	43.69	24.86	18.53	-	-	-	-	-	0.65	-	-	-
	28.30	47.84	0.25	20.15	-	1.51	0.66	-	0.61	0.44	-	0.24
3	65.01	19.16	15.49	-	4.39	-	-	-	0.25	-	-	-
	60.00	19.70	15.31	-	5.79	-	-	-	0.38	-	0.23	-
	42.51	32.10	15.39	-	-	4.21	-	-	-	-	-	-
	66.95	19.86	13.20	-	6.05	-	-	-	-	-	-	-
	62.24	18.11	12.77	-	2.92	-	-	-	0.56	-	0.23	-
	34.42	35.80	7.26	17.61	-	1.99	-	-	-	-	-	-
4	66.39	25.14	7.89	-	3.11	-	-	-	0.59	-	-	-
	56.67	13.31	26.47	-	8.16	-	-	-	0.44	-	-	-
	44.24	19.17		-	0.36	-	0.70	1.36	1.05	0.45	0.66	-
	61.39	33.50	4.01	-	5.65	-	-	-	0.75	-	-	-
	56.73	14.04	22.85	-	8.95	-	-	-	0.73	-	-	-
	42.91	29.53	14.12	-	-	-	1.48	-	2.32	0.70	-	-
5	67.05	22.40	10.52	1.00	-	-	-	-	-	-	-	-
	61.72	17.79	20.10	-	-	-	-	-	0.39	-	-	-
	65.58	21.92	12.12	-	-	-	-	-	0.38	-	-	-
	62.96	18.84	17.78	-	0.18	-	-	-	0.42	-	-	-
	63.12	18.27	18.01	-	0.14	-	-	-	0.42	-	-	-
6	50.84	30.81	0.28	17.46	6.31	-	0.13	-	0.34	-	-	-
	55.57	26.72	10.97	-	-	-	-	-	0.43	-	-	-

ไฮไบที้	O	C	Ca	N	P	S	Cl	Al	Na	K	Mg	Si
6	27.84	41.97	0.18	28.51	0.39	1.50	-	-	-	-	-	-
	42.70	34.27	0.73	21.28	5.62	-	-	-	0.65	-	-	-
	-	34.27	0.73	21.28	5.62	-	-	-	0.65	-	-	-
	44.27	26.25	9.99	13.59	-	0.29	-	-	-	-	-	-
	30.42	45.54	-	23.20	-	0.85	-	-	-	-	-	-
7	66.10	22.61	10.82	-	5.46	-	-	-	0.46	-	-	-
	61.51	19.25	13.23	-	0.22	-	-	-	0.56	-	-	-
	33.30	37.83	1.11	26.97	-	0.58	-	-	-	-	-	-
	66.36	23.33	9.92	-	4.16	-	-	-	0.39	-	-	-
	59.64	26.29	7.24	-	0.87	-	0.44	-	1.77	0.46	-	-
	35.21	36.01	0.90	26.79	1.94	0.22	-	-	-	-	-	-
8	51.55	28.47	4.70	13.34	2.49	-	-	-	-	-	-	-
	57.24	28.69	10.70	-	0.14	-	-	-	0.69	0.19	-	-
	31.47	45.20	-	21.65	0.13	1.03	0.28	-	0.24	-	-	-
	39.97	35.35	0.17	24.38	7.93	-	-	-	-	-	-	-
	63.38	17.65	10.19	-	-	-	-	-	0.86	-	-	-
	29.77	45.01	0.17	23.26	3.89	1.08	0.17	-	0.37	0.17	-	-
9	65.01	19.85	15.14	-	-	-	-	-	-	-	0.31	-
	58.78	17.02	20.00	-	2.06	-	-	-	-	-	-	-
	30.50	33.21	8.67	24.25	-	1.31	-	-	-	-	-	-
	65.77	20.97	12.94	-	0.90	-	-	0.24	0.33	-	-	-
	61.38	17.38	19.33	-	6.76	-	-	-	0.29	-	0.22	0.27
	49.85	22.81	8.14	11.51	-	0.23	-	-	0.69	-	-	-
Mean	51.10	25.97	12.54	19.86	4.76	1.30	0.66	0.63	0.62	0.57	0.33	0.26
S.D.	13.37	9.51	8.86	6.92	4.27	1.11	0.55	0.466	0.41	0.42	0.188	0.02