

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์เม่นทะเลหนามยาว *Diadema setosum* (Leske, 1778) จากบริเวณ
เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย : การศึกษาเบื้องต้น

Gamete Alteration of the Long-Spined Sea Urchin *Diadema setosum* (Leske, 1778)
from Sichang Island, Chonburi Province, Thailand: A Preliminary Study

ศิลปชัย เสนารัตน์^{1,*}, สุชาร์ตน์ สุขใส¹, ทัดพล กำเนิดนิล¹, เจษฎ์ เกษตรระทัต^{1,**}, ละม้าย ทองบุญ², วรณีย์ จีระอังกูรสกุล³,
ชำนาญ ภารา⁴, พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ⁵ และธีรภมร เพ็งสกุล⁶
Sinlapachai Senarat^{1,*}, Sucharat Suksai¹, Thatpon Kamnurdin¹, Jes Kettratad^{1,**}, Lamai Thongboon²,
Wanee Jiraungkoorskul³, Chamman Para⁴, Pisit Poolprasert⁵ and Theerakamol Pengsakul⁶

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

³ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

⁴ภาควิชาภาษาตะวันตกและภาษาศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44150

⁵สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000

⁶คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

¹Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathuman Wan, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand

³Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand

⁴Department of Western Languages and Linguistics, Faculty of Humanities and Social Sciences, Mahasarakham University,
Mahasarakham 44150, Thailand

⁵Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phlai Chumphon,
Muang, Phitsanulok 65000. Thailand.

⁶Department of Medical Technology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand

Corresponding author, e-mail: *senarat.S@hotmail.com; **jes.K@chula.ac.th

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยเลือกเม่นทะเล *Diadema setosum* เป็นสัตว์เป้าหมาย เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ
เซลล์สืบพันธุ์สำหรับทำนายสุขภาพของอวัยวะสืบพันธุ์ของเม่นทะเลจากบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย
เก็บตัวอย่างเม่นทะเลตัวเต็มวัยและเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์จากช่วงฤดูร้อน ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม
พ.ศ. 2560 เพศละ 5 ตัว ทำการวัดความยาวรัศมี ค่าขนาดดัชนีเปอร์เซ็นต์ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ เก็บเนื้อเยื่ออวัยวะ
สืบพันธุ์และรังไข่ เพื่อศึกษาชนิดและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์ทางมิวสิกวิทยา พบว่าเม่นทะเลเพศผู้มีความยาวรัศมี
7.36±0.34 เซนติเมตร และ 7.36±0.78 เซนติเมตร ในเม่นทะเลเพศเมีย และเปอร์เซ็นต์ค่าดัชนีสมบูรณ์เพศของเม่นทะเล
เพศผู้และเพศเมียเท่ากับ 9.85±4.6 และ 10.70±4.16 ตามลำดับ ทั้งนี้ทั้งอวัยวะสืบพันธุ์อยู่ในช่วงพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ พบเซลล์
สืบพันธุ์หลายระยะในเม่นทะเลเพศผู้คือ ระยะสเปอร์มาโทไซต์ สเปอร์มาทิด และ สเปอร์มาโทซอน และพบเพียงแค่ออสุจิ
ระยะก่อนผสมไข่แดงเท่านั้นในเม่นทะเลเพศเมีย สำหรับการเปลี่ยนแปลงทางด้านจุลกายภาพวิทยาเกิดขึ้นเพียงแคใน
เนื้อเยื่อรังไข่เท่านั้น โดยเฉพาะการฝ่อของเซลล์ไข่ในระยะก่อนผสมไข่แดง การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น ดูเหมือนว่า

รังไข่ของเม่นทะเลเพศเมียมีแนวโน้มลดจำนวนเซลล์ไข่และอาจมีผลกระทบต่อสุขภาพของรังไข่ จำเป็นจะต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของเม่นทะเลเพศเมียในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: มิถุนวิทยา จุลกายพยาธิวิทยา กระบวนการพัฒนาเซลล์สุจิ กระบวนการพัฒนาเซลล์ไข่ เม่นทะเล

Abstract

In this study, we selected the long-spined sea urchin, *Diadema setosum*, as sentinel species to investigate its gamete alteration to predict its reproductive health, from Sichang island, Chonburi province, Thailand. Ten adult samples including five male and five females were collected from February to May 2017. Radial measurement, gonadosomatic index (GSI) and collection of the testes and ovaries to observe the type and changes of the gametogenesis based on standard histological technique. The results revealed that radial measurement of the male *D. setosum* was 7.36 ± 0.34 cm. and 7.36 ± 0.78 cm. in the female *D. setosum*. The GSI of the male and female *D. setosum* were 9.85 ± 4.6 and 10.70 ± 4.16 , respectively. Also, the gonadal development of both sexes was considered to be a growing stage. Several germ cells including spermatocyte, spermatid and spermatozoon in male *D. setosum* were observed, whereas previtellogenic stage was only occurred in female *D. setosum*. Interestingly, histopathological alteration was only found in the ovarian tissue of female *D. setosum*, especially in the appearance of the atretic pre-vitellogenic stage. From this preliminary study, it appeared that female *D. setosum* was in a potential risk to a reduction in oocytes, probably leading to a decline in the ovarian health. The influential factors in the fertility of female sea urchin *Diadema setosum* will be examined in further studies.

Keywords: Histology, Histopathology, Spermatogenesis, Oogenesis, Sea urchin

บทนำ

เกาะสีชัง จัดเป็นแหล่งท่องเที่ยวและแหล่งประมงที่สำคัญแห่งหนึ่งของประเทศไทย แต่ในทางกลับกันบริเวณนี้ก็เกิดปัญหาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะเรื่องมลภาวะและสภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรมลง จนกลายเป็นประเด็นร้อนอยู่ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา เนื่องจากแหล่งน้ำชายฝั่งรอบเกาะสีชังเป็นแหล่งรองรับของเสียจากบ้านเรือน กิจกรรมการเดินเรือและการทำประมงในเชิงพาณิชย์ ด้วยเหตุเหล่านี้ทำให้มีการรายงานการตรวจพบสารพิษหลากหลายกลุ่มทั้งโลหะหนักและน้ำมัน โดยเฉพาะสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Aromatic hydrocarbon) (Wattanayakorn and Rungsupa, 2012) ทั้งในน้ำและดินตะกอน เชื่อว่าการปนเปื้อนของสารพิษเหล่านี้ไม่เพียงมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม แต่มีผลโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในบริเวณอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ (Wattanayakorn and Rungsupa, 2012; USEPA, 1996; Quddus Khan et al., 2005) ดังนั้นการติดตามสุขภาพของสัตว์น้ำในบริเวณนี้จึงเป็นประเด็นและเป็นคำถามงานวิจัยที่จะต้องทำการศึกษา เพื่อให้เข้าใจถึงสถานะหรือสุขภาพของสัตว์น้ำได้อย่างทันทั่วทั้ง แต่อย่างไรก็ตามกลับไม่เคยมีการรายงานหรือการนำเสนอข้อมูลทางวิชาการจบจนถึงปัจจุบัน ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเม่นทะเลนามยาว *Diadema setosum* (อันดับ Diadematoidea, วงศ์ Diademataidae) มาเป็นสัตว์เฝ้าระวัง (Sentinel species) เนื่องจากสัตว์น้ำชนิดนี้ถูกใช้สำหรับใช้เป็นโมเดลเพื่อศึกษางานวิจัยอย่างแพร่หลายทั้งทางด้านนิเวศวิทยา ชีววิทยาการสืบพันธุ์ และอนุชีววิทยา (Alsaffar and Lone, 2000; Bronstein et al., 2016) อีกทั้งเม่นทะเลชนิดนี้ยังสามารถพบได้เป็นจำนวนมาก ง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง และยังอาศัยอยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกับพื้นที่ที่มีการรายงานถึงการตรวจพบอะโรมาติก

ไฮโดรคาร์บอน (Wattanayakorn and Rungsupa, 2012) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงเข้าหลักเกณฑ์การคัดเลือกและเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสตัฟฟ์เฟรมะวัง (Frame and Dickerson., 2006; NRC, 1991) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คณะผู้วิจัยสนใจถึงการเปลี่ยนแปลงของพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ของเม่นทะเลที่อาศัยในบริเวณเกาะสีชังของประเทศไทย เพื่อใช้สำหรับการคาดการณ์ถึงสุขภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เนื่องจากระบบสืบพันธุ์ในสัตว์น้ำจัดเป็นอวัยวะที่มีความไวต่อมลพิษ (Blazer, 2002; Senarat et al., 2013) สอดคล้องกับการรายงานในเม่นทะเล *Strongylocentrotus Intermedius* พบความเสียหายกับเซลล์สืบพันธุ์และระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอ เมื่อได้รับความเข้มข้นของไฮโดรคาร์บอนตั้งแต่ 0 ถึง 0.44 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลามากกว่า 45 วัน (Naidenko, 1997)

วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเม่นทะเล *Diadema setosum* ทั้งสองเพศจำนวน 10 ตัว โดยเลือกใช้เพศละ 5 ตัว ในช่วงฤดูร้อนระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560 จากบริเวณเกาะสีชัง ประเทศไทย นำตัวอย่างเม่นทะเลทั้งหมดมาทำการสลบด้วยการแช่น้ำแข็ง (Rapid cooling method) ตามวิธีมาตรฐานของ Wilson et al. (2009) หลังจากนั้นทำการเก็บวัดความยาวรัศมีของเม่นทะเล (หน่วยเซนติเมตร) และนำเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาชั่งน้ำหนัก (กรัม) เพื่อใช้สำหรับการคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Gonadosomatic index (GSI); คำนวณจากน้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์หารด้วยน้ำหนักทั้งหมดคูณด้วย 100) ค่าข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) และนำตัวอย่างทั้งหมดไปเก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) ประมาณ 48 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำตัวอย่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งหมดมาผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างสไลด์ถาวรด้วยวิธี Paraffin method ตามหลักการมาตรฐานทางด้านมิถุวิทยา (Presnell and Schreibman, 1997; Suvarna et al., 2013) ตัดชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome ขนาดความหนา 4 ไมโครเมตร และย้อมด้วยสี Masson's trichrome (MT) นำสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเม่นมาตรวจหาระยะการเจริญและความผิดปกติที่เกิดขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงส่องผ่าน โดยเปรียบเทียบกับการศึกษาโครงสร้างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปกติของเม่นทะเลชนิดเดียวกันนี้ตามการรายงานของ Bronstein et al. (2016) แล้วทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูปสไลด์รุ่น Leica TE750-U นอกจากนี้ยังทำการนับจำนวนของไข่ฝ่อ (Atretic follicle) (จำนวน 100 เซลล์ จาก 5 แผ่นบาง (20 เซลล์ต่อ 1 แผ่นบาง) และท้ายสุดนำมาคำนวณหาร้อยละของจำนวนของไข่ฝ่อ

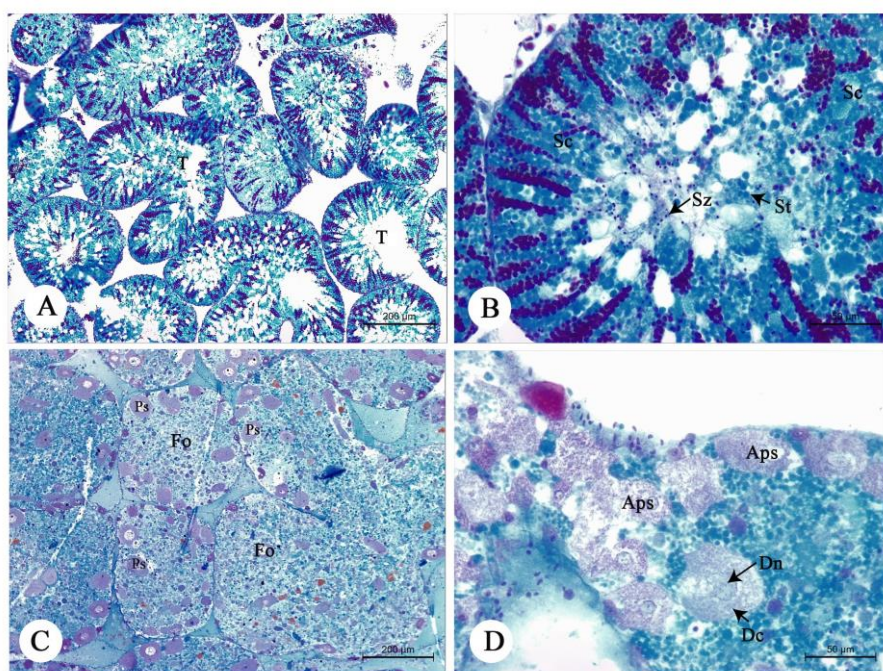
ผลและอภิปรายผล

มิถุวิทยาและจุลกายพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออัณฑะ (Histology and histopathology of testis)

เม่นทะเลเพศผู้ทั้งหมดมีค่าความยาวรัศมีเฉลี่ยเท่ากับ 7.36 ± 0.34 เซนติเมตร และมีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศเฉลี่ยร้อยละ 9.85 ± 4.6 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาโครงสร้างทางด้านมิถุวิทยาพบว่าการเจริญอยู่ระยะกำลังพัฒนา (Growing stage) (ภาพที่ 1A) และพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้หลายระยะภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ สเปิร์มาโทไซต์ สเปิร์มาทิด และสเปิร์มาโทซอน (ภาพที่ 1B) สอดคล้องกับระยะการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของเม่นทะเลชนิดเดียวกันที่รายงานโดย Bronstein et al. (2016) และยังมีความคล้ายคลึงในเม่นทะเลชนิดต่างๆ เช่น *Stomatopneustes variolaris* (Drummond, 2011), *Echinometra mathaei* และ *Diadema savignyi* (Drummond, 1995), *Paracentrotus lividus* (Byrne, 1990) และ *Strongylocentrotus droebachiensis* (Meidel and Scheibling, 1998) จึงยืนยันได้อย่างชัดเจนว่าลักษณะดังกล่าวเป็นการอนุรักษ์หรือร่วมกันทางวงวิวัฒนาการนั่นเอง ทั้งนี้เมื่อทำการศึกษาจุลกายพยาธิวิทยาไม่พบความผิดปกติของอัณฑะของเม่นทะเล

จุลกายวิภาคและจุลกายพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อรังไข่ (Histology and histopathology of ovary)

ตัวอย่างเม่นทะเลเพศเมีย มีรัศมีเฉลี่ยเท่ากับ 7.36 ± 0.78 เซนติเมตร และมีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศเฉลี่ยเท่ากับ 10.70 ± 4.16 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาลักษณะทางโครงสร้างทางด้านมิถุนวิทยาชี้ให้เห็นว่าการเจริญของตัวอย่างรังไข่ทั้งหมดอยู่ในระยะพัฒนา เช่นเดียวกับลักษณะปรากฏในเม่นทะเลเพศผู้ ทำให้สามารถพบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในโครงสร้างฟอลลิเคิล (Follicle) (ภาพที่ 1C) เพียงแค่ระยะเดียว คือ ระยะก่อนสะสมไข่แดง (Previtellogenic stage) (ภาพที่ 1C) เซลล์จึงมีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้น (ขนาดประมาณ 40 ไมโครเมตร) นิวเคลียสกลมหรือรี ติดสีเขียวยาว และล้อมรอบด้วยไซโทพลาสซึมติดสีม่วงอ่อน จากการศึกษาจุลกายพยาธิวิทยาของเซลล์ไข่พบการฝ่อของเซลล์ไข่เป็นจำนวนมาก โดยมีค่าเฉลี่ยการฝ่อของเซลล์ไข่มากถึงร้อยละ 91.2 แต่ละเซลล์ไข่มีหลายรูปร่าง เกิดการเสื่อมสลายทั้งนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม (ภาพที่ 1D) สอดคล้องกับการพบเซลล์ไข่ฝ่อของเม่นทะเล *Psammochinus miliaris* เป็นจำนวนมาก ภายหลังได้รับสารพอลิไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAH) ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 วัน (Schäfer and Köhler, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสารฟิเนนทีน (Phenanthrene) ที่มีความเข้มข้น 5 และ 150 ไมโครกรัมต่อลิตร มีผลชักนำให้เกิดการฝ่อของเซลล์ไข่เม่นทะเล *Psammochinus miliaris* บ่งชี้ให้เห็นว่าสารเคมีชนิดนี้มีผลโดยตรงต่อระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (Schäfer et al., 2011) ทั้งนี้ยังมีรายงานถึงผลของไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันต่อสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นเช่นกัน ดังการรายงานพบว่าการฝ่อของเซลล์ไข่เพิ่มขึ้นในหอยกาบน้ำเค็ม *Mytilus edulis* หลังได้รับสารกลุ่มไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง (hydrocarbon, high oil เท่ากับ 127.7 ± 28.3 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 144 วัน (Lowe and Pipe, 1986)



ภาพที่ 1 ภาพตัดขวางแสดงของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเม่นทะเล *Diadema setosum*. A-B: อัณฑะ (testis, T) ระยะขั้นพัฒนาและภายในประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ระยะสเปอร์มาโทไซต์ (spermatocyte, Sc), สเปอร์มาทิด (spermatid, St) และ สเปอร์มาโทซูน (spermatozoon, Sz); C: มิถุนวิทยาของรังไข่ระยะขั้นพัฒนาและภายในถุงฟอลลิเคิล (follicle, Fo)) พบเซลล์ไข่ระยะก่อนสะสมไข่แดง (previtellogenic stage, Ps); D: การฝ่อของเซลล์ไข่ระยะก่อนสะสมไข่แดง (atretic oocyte of previtellogenic stage (Aps)).หมายเหตุ: Dn, การเสื่อมสลายของนิวเคลียส (degeneration of nucleus) และ Dc, การเสื่อมของไซโทพลาสซึม (degeneration of cytoplasm)

สรุป

การศึกษาครั้งนี้เป็นการรายงานเบื้องต้น แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไข่เม่นทะเลเพศเมียไวต่อการเปลี่ยนแปลง การฟ่อของเซลล์ไข่เป็นจำนวนมากอาจมีผลกระทบต่อความสำเร็จของการสืบพันธุ์ และการลดลงของสุขภาพของรังไข่ในเม่นทะเลที่อาศัยในบริเวณเกาะสีชัง ประเทศไทย อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลด้านสิ่งแวดล้อมมาสนับสนุนในงานวิจัยครั้งนี้ ดังนั้น การศึกษาและติดตามผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมต่อเม่นทะเล โดยการเก็บข้อมูลทางด้านสารเคมีในน้ำ ดินตะกอน และเนื้อเยื่อรังไข่ ตลอดจนคุณภาพน้ำในบริเวณเกาะสีชัง ประเทศไทย ในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาของปลาและสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้องปฏิบัติการไมโครเทคนิค ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยอนุเคราะห์สำหรับการเตรียมตัวอย่าง และหน่วยวิจัยพิษวิทยาสัตว์น้ำ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการถ่ายรูปลดด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Alsaffar, A.H. & Lone, K.P. (2000). Reproductive cycles of *Diadema setosum* and *Echinometra mathaei* (Echinoidea: Echinodermata) from Kuwait (Northern Arabian Gulf). *Bulletin of Marine Science*, 67, 845-856.
- Blazer, V.S. (2002). Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 85-101.
- Bronstein, O., Kroh, A. & Loya, Y. (2016). Reproduction of the long-spined sea urchin *Diadema setosum* in the Gulf of Aqaba - implications for the use of gonad-indexes. *Scientific Reports*, 6, 29569.
- Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered sub-tidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 104, 275-289.
- Drummond, A. E. (2011). Reproduction of the sea urchin *Stomopneustes variolaris* (Lam.) on the east coast of South Africa. *Invertebrate Reproduction & Development*, 20, 259-266.
- Drummond, A. E. (1995). Reproduction of the sea urchins *Echinometra mathaei* and *Diadema savignyi* on the South African Eastern Coast. *Marine and Freshwater Research*, 46, 751-755.
- Frame, L., & Dickerson, R.L. (2006). Fish and wildlife as sentinels of environment contamination. In D.O. Norris and J.A. Carr (eds.), *Endocrine disruption: biological bases for health effects in wildlife and humans*, pp. 202-222. New York: Oxford University Press.
- Lowe, V.L. & Pipe, R.K. (1986). Hydrocarbon exposure in mussels: a quantitative study of the responses in the reproductive and nutrient storage cell systems. *Aquatic Toxicology*, 20(3), 259-265.
- National Research Council (NRC). (1991). *Animals as sentinel of environmental health hazards*. Washington D.C.: National Academy Press.

- Meidel, S. K. & Scheibling, R.E. (1998). Annual reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, in differing habitats in Nova Scotia, Canada. *Marine Biology*, 131, 461-478.
- Naidenko, T. (1997). Abnormality of development in *Strongylocentrus intermedius* (A. Agassiz) Larvae from polluted habitat in Amursky Bay, Peter the Great Bay. *The Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, 38, 1-11.
- Presnell, J. K. and Schreibman, M. P. (1997). *Humason's Animal Tissue Techniques*. (5th ed.). USA: Johns Hopkins University Press.
- Quddus Khan, M. A., Al-Ghais, S. M., Catalin, B. & Khan, Y. H. (2005). Effects of petroleum hydrocarbons on aquatic animals. In *Oil Pollution and its Environmental Impact in the Arabian Gulf Region*. M. Al-Azab, W. El-Shorbagy and S. Al-Ghais, (editors), pp. 159–185, Elsevier B. V.
- Senarat, S., Poolprasert, P. & Yenchum, W. (2013). Histological changes of gonadal tissues in Red-tailed Tinfoil, *Barbonymus altus* from Tapee River, Nakhon Sri Thammarat Province. *Journal of Science & Technology of Ubonratchathane University*, 15, 10-20. (Abstract in English)
- Schäfer, S. and Köhler, A. (2009). Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. *Marine Environmental Research*, 68, 128-136.
- Schäfer, S., Abele, D., Weihe, E. & Köhler, A. (2011). Sex-specific biochemical and histological differences in gonads of sea urchins (*Psammechinus miliaris*) and their response to phenanthrene exposure. *Marine Environmental Research*, 71, 70-78.
- Suvarna, K.S., Layton, C. & Bancroft, J.D. (2013). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. (7th ed.) Canada: Elsevier.
- USEPA. (1996). *Drinking water regulation and health advisories*, USEPA Office of Water, Washinton, DC.
- Wattanayakorn, G. and Rungsupha, S. (2012). Petroleum hydrocarbon residues in the marine environment of Koh Sichang-Sriracha, Thailand. *Coastal Marine Science*, 35, 122-128.
- Wilson, J. M., Bunte, R. M., Carty, A. J. (2009). Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS 222) as methods of euthanasia in zebra fish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48, 785-789.