โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ พิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*

ชื่อนิสิต นางสาวชนิตา ศรีเกื้อกลิ่น รหัสประจำตัว 6032012523

ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ พิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*
Acute toxicity of benzophenone-3 on *Litopenaeus vannamei*

ชื่อนิสิต นางสาวชนิตา ศรีเกื้อกลิ่น **เลขประจำตัว** 6032012523

ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*

Acute toxicity of benzophenone-3 on *Litopenaeus vannamei*

นางสาวชนิตา ศรีเกื้อกลิ่น

อาจารย์ที่ปรึกษา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ
ดร.ธงชัย ฐิติภูรี

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ : พิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ : นางสาวชนิตา ศรีเกื้อกลิ่น
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ
ดร.ธงชัย ฐิติภูรี
ภาควิชา : ชีววิทยา

บทคัดย่อ

สารกรองรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) เป็นส่วนผสมที่สำคัญในผลิตภัณฑ์ดูแลร่างกายที่ใช้ปกป้องผิวจากรังสี UV เช่น ครีมกันแดด เครื่องสำอาง ปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบสารกรองรังสี UV หลายชนิดปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สาร benzophenone-3 (BP-3) ซึ่งเป็นสารกรองรังสี UV ที่พบปนเปื้อนในแม่น้ำ ทะเลสาบ และทะเล โดยการปนเปื้อน BP-3 อาจส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำในฟาร์มที่มีการผันน้ำธรรมชาติมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่มีการเพาะเลี้ยงมากที่สุดชนิดหนึ่งของโลกเป็นตัวแทนของสัตว์น้ำในฟาร์ม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพิษเฉียบพลันของสาร benzophenone-3 ต่อกุ้งขาว โดยนำกุ้งขาวจากกษิดิ์ ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา มาเลี้ยงปรับสภาพในน้ำทะเลธรรมชาติที่ระดับความเค็ม 25 ppt ณ สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ก่อนนำกุ้งขาวระยะ postlarvae (PL) 26-28 มาทดสอบด้วยวิธี static bioassay ในห้องปฏิบัติการ 2 ขั้นตอน คือ การทดสอบเพื่อหาช่วงความเข้มข้นในช่วงกว้าง (range finding test) โดยใช้ BP-3 ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10 mg/L และการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นขั้นสุดท้าย (definitive test) โดยใช้ BP-3 ความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 mg/L บันทึกการตายของกุ้งขาวและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ ค่า pH และค่าไนไตรท์ วิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของ benzophenone-3 ที่ทำให้กุ้งขาวตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 24 ชั่วโมง (median lethal concentration; LC_{50}-24 hr) ด้วยวิธี probit analysis พบว่า BP-3 มีค่า LC_{50} ต่อกุ้งขาวเท่ากับ 1.365 mg/L ซึ่งจัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา เมื่อใช้ร่วมกับการตรวจสอบปริมาณ BP-3 ที่พบในสิ่งแวดล้อม สามารถใช้เฝ้าระวังผลกระทบจากการปนเปื้อน BP-3 ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวและสัตว์น้ำเศรษฐกิจในฟาร์มในอนาคต

คำสำคัญ: ผลิตภัณฑ์ดูแลร่างกาย, สภาพแวดล้อมทางน้ำ, สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำ, สารกรองรังสียูวี, LC_{50}

Research Title	: Acute toxicity of benzophenone-3 on *Litopenaeus vannamei*
Student name	: Miss Chanita Srikueaklin
Advisor	: Assistant Professor Noppadon Kitana, Ph.D.
Co-Advisor	: Assistant Professor Jirarach Kitana, Ph.D. Tongchai Thitiphuree, Ph.D.
Department of	: Biology

Abstract

Ultraviolet-filters (UV-filters) are common ingredients added to personal care products such as sunscreens and cosmetic products to protect the skin from UV light. Presences of UV-filters have been widely reported in aquatic environments. Among UV-filters, benzophenone-3 (BP-3) is a ubiquitous chemicals found in rivers, lakes, and marine environments. Contamination of BP-3 in coastal water may affect seawater used in aquaculture system and the cultured animals. The whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* is one of the most commonly cultured shrimp that could be affected by the contaminated water. However, there is still a lack of report on lethal effects of BP-3 on whiteleg shrimp. This research aims to examine acute toxicity of benzophenone-3 on whiteleg shrimp. Shrimps obtained from a Kasit farm in Chachoengsao Province were transported and acclimatized in natural seawater at Sichang Marine Science Research and Training Station (SMaRT), Chonburi Province. Acute toxicity test of BP-3 on postlarvae (PL) 26-28 whiteleg shrimp was carried out in a 24-hour static bioassay in 2 steps, namely a range finding test (BP-3 at 0, 0.1, 1, 10 mg/L) and a definitive test (BP-3 at 0, 1, 1.5, 2, 2.5 mg/L). At the end of the test, mortality and parameters such as temperature, pH and nitrite were measured. Median lethal concentration of benzophenone-3 in 24-hour exposure (LC_{50}-24 hr) was calculated at 1.365 mg/L, indicating high toxicity of BP-3 to aquatic invertebrate. Combining the data from this study with an analysis of BP-3 in natural water could be useful for the risk assessment of BP-3 contamination on the whiteleg shrimp aquaculture in the future.

Keywords: aquatic environment, aquatic invertebrate, LC_{50}, personal care products, uv-filters

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ และ ดร.ธงชัย ฐิติภูรี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนการติดต่อสถานที่ทำการทดลอง สถานที่พักอาศัย การวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ กษิดิ์ ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ในความดูแลของสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลองและสถานที่พักอาศัย

ขอขอบคุณนางสาวทิพวรรณ บุญเพ็ชร และนางสาววันสิริ มีมานะ ผู้ช่วยวิจัยประจำสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ที่ให้คำแนะนำในการเตรียมและการทดลอง

ขอขอบคุณนางสาวสุรภา ฉินพลิกานนท์ และนายธนกฤต นรสิงห์ เพื่อนนิสิตภายใต้การดูแลของอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการเดียวกัน ที่คอยให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการทำงาน ขอขอบคุณนางสาวกชนิภา เภสัชชะ นางสาวกัญญาวีร์ แก้วหลวง และนายณัฐพงษ์ บุตรรักษ์ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนการทำงาน จนทำให้การทำโครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ดำเนินไปอย่างราบรื่น

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา อาจารย์ ดร.มารุต เฟื่องอาวรณ์ และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอขอบคุณอาจารย์ นิสิตระดับปริญญาเอกและปริญญาโท ประจำห้องปฏิบัติการ BioSentinel ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำ เอื้อเฟื้อสถานที่ในการเตรียมงาน รวมถึงสนับสนุนวัสดุและอุปกรณ์ ในการทดลอง

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกลุ่มวิจัยสิ่งมีชีวิตเฝ้าระวัง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ......ก

Abstract ......ข

กิตติกรรมประกาศ......ค

สารบัญตาราง ......ฉ

สารบัญภาพ......ช

บทที่ 1 บทนำ......1

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม......3

- 2.1. กุ้งขาว 3
  - 2.1.1. อนุกรมวิธาน 3
  - 2.1.2. ถิ่นที่อยู่......3
  - 2.1.3. ลักษณะทั่วไป 4
- 2.2. Benzophenone-3......5
  - 2.2.1. ลักษณะทั่วไปและการออกฤทธิ์ 5
  - 2.2.2. การแพร่กระจายของสารเบนโซฟีโนน-3 ในธรรมชาติ 5
  - 2.2.3. ข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษ......7

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 10

- 3.1. แผนการทดลอง......10
- 3.2. การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง น้ำทะเล และสารเคมี 11
  - 3.2.1. การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง......11
  - 3.2.2. การเตรียมน้ำทะเล 12
  - 3.2.3. การเตรียมสารเคมี......12
- 3.3. วิธีดำเนินงาน......12
  - 3.3.1. range finding test......12
  - 3.3.2. definitive test 13
- 3.4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ......14

บทที่ 4 ผลการศึกษา 15

- 4.1. ร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาว จาก range finding test......15
- 4.2. ร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาว จาก definitive test ครั้งที่ 1 15

4.3. ร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาว จาก definitive test ครั้งที่ 2 16
4.4. การวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit analysis) 17
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา 18
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ...22
6.1. สรุปผลการศึกษา 22
6.2. ข้อเสนอแนะ 22
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ 22
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต 22
เอกสารอ้างอิง..23
ภาษาไทย..23
ภาษาอังกฤษ..23
ภาคผนวกที่ 1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี...29
ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมการทดลอง...30

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2-1 ความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ในตัวอย่างน้ำธรรมชาติจากสถานที่ต่าง ๆ ในช่วงปี 2014-2016 6

ตารางที่ 2-2 พิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ 9

ตารางที่ 3-1 ตัวแปรและพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดลองเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *L. vannamei* 11

ตารางที่ 4-1 การตายสะสมของกุ้งขาว *L. vannamei* ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง และร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง จาก range finding test เพื่อทดสอบพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 15

ตารางที่ 4-2 การตายสะสมของกุ้งขาว *L. vannamei* ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง และร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาวที่เวลา 12 ชั่วโมง จาก definitive test ครั้งที่ 1 เพื่อทดสอบพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 16

ตารางที่ 4-3 การตายสะสมของกุ้งขาว *L. vannamei* ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง และร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง จาก definitive test ครั้งที่ 2 เพื่อทดสอบพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 17

ตารางที่ 5-1 เกณฑ์การจัดระดับความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อ *D. magna* (Du et al., 2017) 18

ตารางที่ 5-2 พิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำจากการศึกษาอื่น ๆ เทียบกับกุ้งขาว *L. vannamei* จากการศึกษาครั้งนี้ 18

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของเบนโซฟีโนน-3 (National Center for Biotechnology Information, 2021)........5

ภาพที่ 3-1 แผนการทดลองเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *L. vannamei*........10

ภาพที่ 3-2 การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง ก) กษิดิ์ ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา ข) กุ้งขาว *L. vannamei*........11

ภาพที่ 3-3 การเตรียมน้ำทะเลด้วยถุงกรอง........12

ภาพที่ 4-1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ของความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 และค่า Probit จากการทดสอบพิษฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *L. vannamei*........17

ภาพที่ 5-1 แผนที่ของตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำทะเลในฮ่องกง ซานโถว และเฉาโจว ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกรองรังสียูวี (Tsui et al., 2014)........19

ภาพที่ 5-2 แผนที่ตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำทะเลในอ่าวทรังก์ เกาะเซนต์จอห์น หมู่เกาะเวอร์จิน ประเทศสหรัฐอเมริกา (Downs et al., 2016 และ Cadena-Aizaga et al., 2020) 20

ภาพที่ 5-3 แผนที่ของตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำจืดในกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกรองรังสียูวี (Tsui et al., 2014)........21

ภาพที่ ภ-1 สารเบนโซฟีโนน-3........29

ภาพที่ ภ-2 การชั่งสารเบนโซฟีโนน-3 สำหรับการเตรียมสารละลายเบนโซฟีโนน-3 ใน dimethyl sulfoxide เพื่อใช้เป็นสารละลายตั้งต้น (stock solution)........30

ภาพที่ ภ-3 การติดตั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตู้กระจก น้ำทะเลที่ผ่านการกรอง สายยาง พาสเจอร์ปิเปต และปั๊มลมให้อากาศ........30

ภาพที่ ภ-4 การนำกุ้งขาวใส่ตู้กระจกที่ติดตั้งไว้ก่อนเริ่มทำการทดลองเพื่อปรับสภาพ........30

ภาพที่ ภ-5 การปรับสภาพกุ้งขาวก่อนเริ่มการทดลอง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง........31

ภาพที่ ภ-6 การเติมสารละเบนโซฟีโนน-3 ลงในแต่ละตู้ เมื่อเริ่มการทดลอง........31

ภาพที่ ภ-7 การบันทึกการตายของกุ้งขาว จากการสังเกตกุ้งขาวที่ไม่เคลื่อนที่ และไม่ตอบสนองเมื่อใช้แท่งแก้วสัมผัส........31

ภาพที่ ภ-8 การวัดความเป็นกรดด่าง (pH) ในน้ำทะเลที่ใช้ทดลอง ด้วยกระดาษทดสอบค่า pH (universal indicator) 32
ภาพที่ ภ-9 การวัดค่าไนไตรท์ในน้ำทะเลที่ใช้ทดลอง ด้วยชุดวัดค่าไนไตรต์ AQUA VBC (nitrite test kit) 32

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันกิจกรรมมนุษย์เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดสารปนเปื้อนทางเคมีในธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นการคมนาคม การทำประมง การปล่อยน้ำทิ้งจากโรงงานและครัวเรือน โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีประชากรหนาแน่นหรือมีการท่องเที่ยวจากการที่นักท่องเที่ยวใช้ผลิตภัณฑ์ดูแลส่วนบุคคล (personal care products หรือ PCPs) (Diaz-Cruz and Barcelo, 2009)

จากการศึกษาของ Hopkins และ Blaney (2016) พบว่า สารปนเปื้อนทางเคมีส่วนใหญ่ที่พบในผลิตภัณฑ์ดูแลส่วนบุคคล คือ สารกรองรังสียูวี (ultraviolet-filter) ซึ่งเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ปกป้องผิวโดยการดูดซับรังสียูวี เช่น ครีมกันแดด เครื่องสำอาง เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ดูแลผิวเหล่านี้มักมีส่วนผสมของสารกรองรังสียูวีหลายชนิด (Chisvert and Salvador, 2007) นอกจากนี้ยังมีการเติมสารกรองรังสียูวีในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น สิ่งทอ พลาสติก และสี เพื่อป้องกันการสลายตัวจากแสง (Fent et al., 2010) สารกรองรังสียูวีหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic และคาดว่าจะสามารถแยกออกจากน้ำทะเลเข้าไปอยู่ในตะกอนอินทรีย์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตได้ (Tsui et al., 2017)

สารเบนโซฟีโนน-3 (benzophenone-3 หรือ oxybenzone) เป็นสารกรองรังสียูวีชนิดหนึ่งที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมอย่างแพร่หลาย พบในลำธาร แม่น้ำ ทะเลสาบ และในสภาพแวดล้อมทางทะเลตั้งแต่ Arctic Circle บริเวณเมือง Barrow ของรัฐ Alaska ไปจนถึงชายหาดและแนวปะการังตามเส้นศูนย์สูตร (Tsui et al., 2014; Balmer et al., 2005; Tashiro and Kameda, 2013; Downs et al., 2015) ซึ่งจะพบที่ความเข้มข้นสูงในสระว่ายน้ำและอ่างน้ำร้อน (Ekowati et al., 2016) โดยพบสารเบนโซฟีโนน-3 ปนเปื้อนในสระว่ายน้ำและอ่างน้ำร้อนด้วยระดับความเข้มข้น parts per billion (Sang and Leung, 2016) หากสระว่ายน้ำมีการใช้คลอรีนหรือโบรมีนเป็นสารฆ่าเชื้อ สารเบนโซฟีโนน-3 จะสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีกับคลอรีนหรือโบรมีน จนเกิดเป็นคลอริเนทหรือโบรมิเนทได้ (Li et al., 2016; Zhang et al., 2016) และยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างคลอริเนทที่เกิดจากสารเบนโซฟีโนน-3 มีความเป็นพิษมากกว่าสารเบนโซฟีโนน-3 ปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยทำหน้าที่เป็นตัวทำลายดีเอ็นเอ (Blüthgen et al., 2012; Sherwood et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลกระทบของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อสิ่งมีชีวิตในทะเล เช่น จากการทดลองของ Coronado และคณะ (2008) พบว่า เมื่อปลาเทราต์สายรุ้งและปลาซิวข้าวสารญี่ปุ่นได้รับสารเบนโซฟีโนน-3 ในความเข้มข้นสูงจะทำให้ลดปริมาณไข่ที่ผลิตได้ นอกจากนี้ยังลดอัตราการฟักไข่สำเร็จอย่างเห็นได้ชัด จากการศึกษาของ He และคณะ (2019) พบว่า สารเบนโซฟีโนน-3 ทำให้เกิด

ความเป็นพิษและความเครียด (oxidative stress) ในปะการัง สังเกตได้จากความหนาแน่นที่ลดลงของสาหร่าย zooxanthellae ในปะการังสอดคล้องกับการฟอกสีและการตายที่เพิ่มขึ้น

กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* เป็นหนึ่งในกุ้งที่ได้รับการเพาะเลี้ยงมากที่สุดในโลก (P´erez Farfante and Kens-ley, 1997) เนื่องจากกุ้งขาวมีความสามารถในการปรับตัวต่อช่วงความเค็มที่กว้าง คือ 0.5–40 กรัมต่อลิตร (Van Wyk, 1999) ด้วยความสามารถในการเจริญเติบโตในน้ำทะเลที่มีน้ำเค็มต่ำได้จึงทำให้กุ้งขาวเป็นพันธุ์กุ้งที่ดีอย่างยิ่งสำหรับการเพาะเลี้ยง (Pan et al., 2007) เพราะการลดความเค็มของน้ำทะเลที่ใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียน (recirculating aquaculture system) นำไปสู่กระบวนการผลิตกุ้งในต้นทุนที่ต่ำลง เนื่องจากความต้องการเกลือน้อยลงและการจัดการน้ำเสียที่ง่ายขึ้น แต่ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอาจเกิดปัญหาเกี่ยวกับการตายของกุ้งในช่วงการอนุบาลหรือระหว่างการเลี้ยง โดยมีสาเหตุมาจากโรค ปรสิต หรือคุณภาพของน้ำ ตั้งแต่การเพิ่มขึ้นของค่า pH ไนไตรท์ และแอมโมเนียม ไปจนถึงการได้รับสารปนเปื้อนทางเคมีในธรรมชาติจากการผันน้ำทะเลเข้ามาใช้ในการเพาะเลี้ยง (Racotta et al., 2003) การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* เพื่อประเมินความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากเบนโซฟีโนน-3 ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

ศึกษาผลของเบนโซฟีโนน-3 ต่อการตายของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* เพื่อหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1. กุ้งขาว

กุ้งขาว มีชื่อสามัญที่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) รับรอง คือ Pacific whiteleg shrimp และมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Litopenaeus vannamei* (Synonyms: *Penaeus vannamei*) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006)

2.1.1. อนุกรมวิธาน

Kingdom Animalia
  Phylum Arthropoda
    Subphylum Crustacea
      Superclass Multicrustacea
        Class Malacostraca
          Subclass Eumalacostraca
            Order Decapoda
              Suborder Dendrobranchiata
                Superfamily Penaeoidea
                  Family Penaeidae
                    Genus Litopenaeus
                      Species *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

2.1.2. ถิ่นที่อยู่

กุ้งขาว *L. vannamei* มีถิ่นกำเนิดในแถบชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกของประเทศเม็กซิโก อเมริกากลาง อเมริกาใต้ ไปจนถึงทางใต้ของเปรู ซึ่งเป็นพื้นที่ที่อุณหภูมิของน้ำจะสูงกว่า 20 °C ตลอดทั้งปี (Wyban and Sweeny, 1991; Rosenberry, 2002)

กุ้งขาวถูกนำเข้ามาในภูมิภาคเอเชียครั้งแรกที่ประเทศฟิลิปปินส์ ในปี 1978-1979 และประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ในปี 1988 ซึ่งเป็นเพียงประเทศเดียวที่สามารถรักษาการผลิตได้อย่างต่อเนื่อง สามารถผลิตกุ้งระยะ postlarvae (PL) ได้ และในปี 1996 จึงมีการนำเข้าพ่อพันธุ์แม่พันธุ์กุ้งสำหรับการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์จากฮาวายไปยังไต้หวัน ต่อมาในปี 1998 ประเทศไทยได้นำ

กุ้งขาวจากไต้หวันเข้ามาเพาะเลี้ยง เพื่อทดแทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ซึ่งมีปัญหาการเจริญเติบโต (Wyban, 2002)

2.1.3. ลักษณะทั่วไป

อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate)

กุ้งขาว *L. vannamei* สามารถเติบโตได้รวดเร็วสูงสุด ที่ 3 g ต่อสัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงแบบ intensive condition จนมีขนาด 20 g (ขนาดสูงสุด ที่มักเพาะเลี้ยง) แม้ว่ากุ้งขาวจะเติบโตต่อไปเกินกว่าขนาด 20 g ได้ แต่การเจริญเติบโตอาจช้าลง (Wyban and Sweeny, 1991) โดยมีอัตราการเจริญเติบโตโดยทั่วไป 1.0-1.5 g ต่อสัปดาห์ และอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 80-90 (Chamberlain, 2003)

ความเค็ม (Salinity)

กุ้งขาว *L. vannamei* มีความสามารถในการทนต่อความเค็มที่กว้าง คือ 0.5-45 ppt โดยมีช่วงความเค็มที่เหมาะสม คือ 7-34 ppt แต่จะเติบโตได้ดีที่ช่วงความเค็มต่ำ คือ ประมาณ 10-15 ppt (Wyban and Sweeny, 1991) ความสามารถนี้ทำให้กุ้งขาวเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงบนพื้นที่ที่ไม่ติดกับทะเล

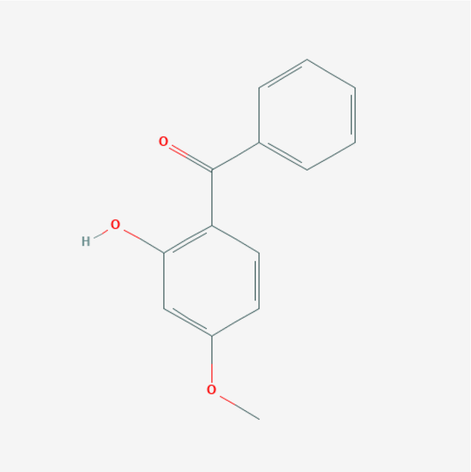
อุณหภูมิ (Temperature)

กุ้งขาว *L. vannamei* สามารถทนต่ออุณหภูมิได้หลากหลาย แต่จะเติบโตได้ดีที่สุดระหว่าง 23-30 °C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้งขนาดเล็ก (1 g) คือ 30 °C และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้งขนาดใหญ่ (12 -18 g) คือ 27 °C กุ้งขาวสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ต่ำสุดถึง 15 °C และสูงสุดถึง 33 °C ได้ แต่อัตราการเติบโตจะลดลง (Wyban and Sweeny, 1991)

2.2. Benzophenone-3

2.2.1. ลักษณะทั่วไปและการออกฤทธิ์

เบนโซฟีโนน-3 (benzophenone-3 (BP-3) หรือ oxybenzone) เป็นอนุพันธ์ของเบนโซฟีโนนที่ใช้เป็นสารกันแดด ซึ่งสามารถดูดซับรังสี UVB และ UVA II ลดการแทรกซึมของรังสีที่ผิวหนัง มีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง และส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ดูแลส่วนบุคคล นอกจากนี้ยังถือเป็นสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (National Center for Biotechnology Information, 2021)



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของเบนโซฟีโนน-3 (National Center for Biotechnology Information, 2021)

2.2.2. การแพร่กระจายของสารเบนโซฟีโนน-3 ในธรรมชาติ

เนื่องจากปริมาณการผลิตและการใช้สารกรองรังสียูวีอย่างแพร่หลายมากขึ้น ทำให้มีสารกรองรังสียูวี แพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติ โดยเฉพาะในแหล่งน้ำ สารกรองรังสียูวีสามารถเข้าสู่แหล่งน้ำโดยตรงจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การว่ายน้ำ หรือทางอ้อมจากการบำบัดน้ำเสียจากการอาบน้ำ หรือการปล่อยของเสียอุตสาหกรรม รวมถึงไหลของน้ำชุมชนลงสู่แหล่งน้ำ (Giokas et al., 2007)

การศึกษาการเกิด การกระจาย และการประเมินความเสี่ยงของสารกรองรังสียูวีในน้ำจากประเทศต่าง ๆ โดย Tsui และคณะ (2014) ได้ทำการเก็บข้อมูลสารกรองรังสียูวี 12 ชนิดที่ใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งปนเปื้อนแหล่งน้ำใน 8 เมืองใน 4 ประเทศ (สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และไทย) และแถบอาร์กติกในอเมริกาเหนือ พบว่า ค่ามัธยฐานของความเข้มข้นสารกรองรังสียูวี 12 ชนิด (median concentration) ในตัวอย่างน้ำ มีค่าตั้งแต่ <LOD ถึง 230 ng/L ในการศึกษานี้ตรวจพบสารเบนโซฟีโนน-3 (BP-3) ออกทิลเมท็อกซีซินนาเมท (EHMC) และออกโตคริลีน (OC) ใน

ทุกสถานที่ศึกษาและทั้งสามชนิดมีความถี่ในการตรวจพบ (คำนวณจากจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละสถานที่) มากกว่าร้อยละ 30 ในแต่ละสถานที่ และสารเบนโซฟีโนน-3 มีความถี่ในการตรวจพบ มากกว่าร้อยละ 71 ในแต่ละสถานที่ (ตารางที่ 2-1)

ตารางที่ 2-1 ความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ในตัวอย่างน้ำธรรมชาติจากสถานที่ต่าง ๆ ในช่วงปี 2014-2016

สถานที่	ความเข้มข้น (ng/L)	Detection frequency (%)	ที่มา
ฮ่องกง (Hong Kong, China)	39-5429	95 (n=60)	Tsui et al., 2014
โตเกียว (Tokyo, Japan)	24-86	100 (n=8)	
นิวยอร์ก (New York, United States)	23-178	100 (n=6)	
ลอสแองเจลิส (Los Angeles, United States)	227-601	100 (n=4)	
ซานโถว (Shantou, China)	55-188	100 (n=4)	
เฉาโจว (Chaozhou, China)	37-49	100 (n=3)	
กรุงเทพมหานคร (Bangkok, Thailand)	86-116	100 (n=2)	
อาร์กติก (Arctic region)	17-33	71 (n=1)	
เซาเปาลู (São Paulo State, Brazil)	18-115	-	Silva et al., 2015
หนานจิง (Nanjing, China)	3.63–104	-	Ma et al., 2016

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่น ๆ ที่ศึกษาเกี่ยวกับการเกิด การกระจาย และการประเมินความเสี่ยงของสารกรองรังสียูวีในน้ำ เช่น การศึกษาของ Silva และคณะ (2015) มีการตรวจพบสารเบนโซฟีโนน-3 ในเซาเปาโล ประเทศบราซิล รวมถึงการศึกษาของ Ma และคณะ (2016) ที่มีการตรวจพบสารเบนโซฟีโนน-3 เช่นกันในหนานจิง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน (ตารางที่ 2-1)

การตรวจพบสารเบนโซฟีโนน-3 ในหลายสถานที่แสดงถึงการกระจายตัวอย่างแพร่หลายในสิ่งแวดล้อมซึ่งมาจากกิจกรรมของมนุษย์ เนื่องจากสถานที่ที่มีการตรวจพบส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ที่มีทั้งการพัฒนาเชิงพาณิชย์และอุตสาหกรรมสูง

2.2.3. ข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษ

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเคมี หมายถึง ผลกระทบที่เกิดขึ้นภายหลังจากการได้รับสารเคมีทางปากหรือผิวหนังในปริมาณหนึ่ง เพียงครั้งเดียวหรือหลายครั้งภายในเวลาที่กำหนด ความเป็นพิษเฉียบพลันนั้นได้จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity test) ซึ่งเป็นการทดสอบความปลอดภัยของสารเคมีที่ให้สัตว์ทดลองในระยะสั้น เพื่อหาค่า LD_{50} (lethal dose 50%) ซึ่งหมายถึง ปริมาณของสารเคมีที่ให้กับสัตว์ทดลองทั้งหมดเพียงครั้งเดียว แล้วทำให้กลุ่มของสัตว์ทดลอง ร้อยละ 50 (ครึ่งหนึ่ง) ตาย หรือค่า LC_{50} (lethal concentration 50%) หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารเคมีในอากาศหรือในน้ำที่เป็นสาเหตุทำให้กลุ่มของสัตว์ทดลอง ร้อยละ 50 (ครึ่งหนึ่ง) ตาย (ศริศักดิ์ สุนทรไชย, 2558) หรือค่า EC_{50} (half maximal effective concentration) หมายถึง ความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ทำให้การเติบโตของสัตว์ทดลองผิดปกติครึ่งหนึ่ง (Graphpad Software, 2003)

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและความเสี่ยงต่อสิ่งแวดล้อมของสารเบนโซฟีโนน-3 และเบนโซฟีโนน-4 โดย Du และคณะ (2017) ในสิ่งมีชีวิต 3 ชนิด พบว่า สาหร่ายคลอเรลลา *Chlorella vulgaris* มีค่า EC_{50}-96 hr เท่ากับ 2.98 mg/L ไรน้ำ *Daphnia magna* มีค่า LC_{50}-48 hr เท่ากับ 1.10 mg/L และปลาม้าลาย *Brachydanio rerio* มีค่า LC_{50}-96 hr เท่ากับ 3.90 mg/L (ตารางที่ 2-2)

การศึกษาการเกิด การกระจาย และการประเมินความเสี่ยงของสารกรองรังสียูวีในน้ำจากประเทศต่าง ๆ โดย Tsui และคณะ (2014) ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Desmodesmus subspicatus* มีค่า EC_{50}-72 hr เท่ากับ 0.96 mg/L ไรน้ำ *D. magna* มีค่า EC_{50}-48 hr เท่ากับ 1.67 mg/L และการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารเบนโซฟีโนน-3 พบว่า ไรน้ำ *D. magna* ไม่พบผลกระทบจากความเข้มข้น 0.50 mg/L ภายใน 21 วัน และปลาซิวข้าวสารญี่ปุ่น *Oryzias latipes* ไม่พบผลกระทบจากความเข้มข้น 0.13 mg/L ภายใน 21 วัน (ตารางที่ 2-2)

การศึกษาผลกระทบของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อการทำงานของต่อมไร้ท่อโดยเน้นที่การศึกษาพฤติกรรมก้าวร้าว (agonistic behavior) ในปลากัดเพศผู้ *Betta splendens* โดย Chen และคณะ (2016) พบว่า ปลากัดเพศผู้ที่ได้รับสารเบนโซฟีโนน-3 ความเข้มข้น 1000 μg/L เป็นเวลา 28 วัน มีค่าสุขภาวะโดยรวม (condition factor) ซึ่งคำนวณจากความยาวมาตรฐานและมวลตัว ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้จากการวัดความเร็วสูงสุด (maximum velocity) ซึ่งเป็นเกณฑ์ในการวัดพฤติกรรมก้าวร้าว พบว่า ปลากัดเพศผู้ที่ได้รับ 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 100 ng/L (positive control) และสารเบนโซฟีโนน-3 ความเข้มข้น 1000 μg/L มีค่าความเร็วสูงสุดลดลง (ตารางที่ 2-2) ซึ่งจากการศึกษาของ Trainor และคณะ (2006) พบว่า 17α-ethynylestradiol สามารถควบคุมพฤติกรรมก้าวร้าวของเพศผู้ได้ แสดงให้เห็นว่าเบนโซฟีโนน-3 มีผลสอดคล้องกับ 17α-ethynylestradiol ที่สามารถรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ ทำให้พฤติกรรมก้าวร้าวของปลากัดเพศผู้ลดลง

ตารางที่ 2-2 พิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ

ประเภท	สัตว์ทดลอง	ความเป็นพิษ	ความเข้มข้น	ที่มา
Acute	สาหร่ายคลอเรลลา *C. vulgaris*	EC_{50}-96 hr	2.98 mg/L (2.70–3.39 mg/L)*	Du et al., 2017
Acute	ไรน้ำ *D. magna*	LC_{50}-48 hr	1.09 mg/L (0.76–1.73 mg/L)*	
Acute	ปลาม้าลาย *B. rerio*	LC_{50}-96 hr	3.89 mg/L (2.86–6.53 mg/L)*	
Acute	สาหร่ายสีเขียว *D. subspicatus*	EC_{50}-72 hr	0.96 mg/L	Tsui et al., 2014
Acute	ไรน้ำ *D. magna*	EC_{50}-48 hr	1.67 mg/L	
Chronic	ไรน้ำ *D. magna*	NOEC**21 วัน	0.50 mg/L	
Chronic	ปลาซิวข้าวสารญี่ปุ่น *O. latipes*	NOEC**21 วัน	0.13 mg/L	
Chronic	ปลากัดเพศผู้ *B. splendens*	พฤติกรรม ก้าวร้าว	1000 µg/L	Chen et al., 2016

หมายเหตุ

*95% confidence interval [CI] คือ ช่วงความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

**NOEC : No Observed Effect Concentration คือ ความเข้มข้นที่ไม่พบผลกระทบ

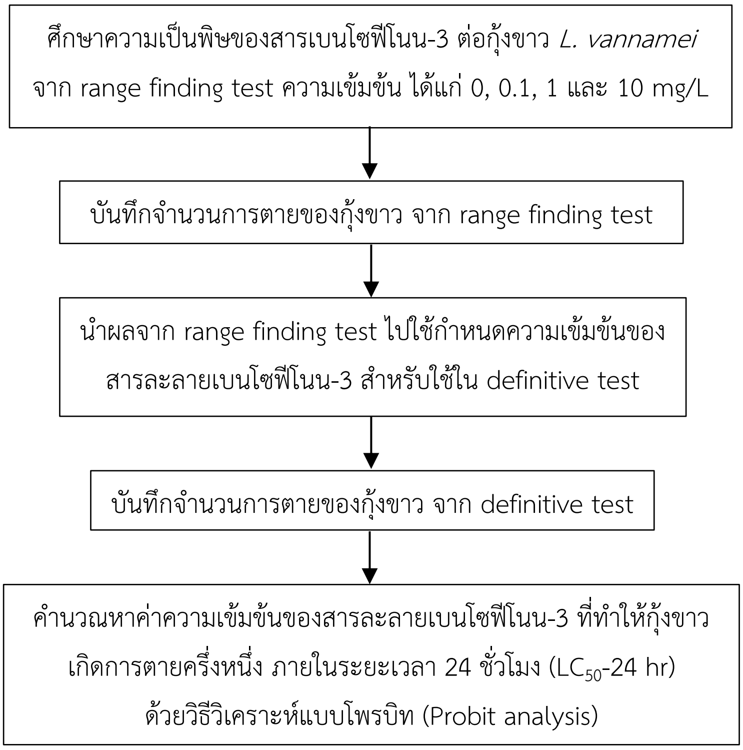
EC_{50}: ความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ทำให้การเติบโตของสัตว์ทดลองผิดปกติครึ่งหนึ่ง จากจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด

LC_{50}: ความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองเกิดการตายครึ่งหนึ่ง จากจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1. แผนการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *L. vannamei* ระยะ postlarvae (PL) 26-28 โดยกำหนดค่าความเข้มข้นของสารละลายเบนโซฟีโนน-3 สำหรับใช้ใน range finding test จำนวน 4 ความเข้มข้น 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ 0 (ชุดควบคุมที่ไม่มี DMSO), 0 (ชุดควบคุมที่มี DMSO), 0.1, 1 และ 10 mg/L บันทึกจำนวนการตายของกุ้งขาว นำช่วงความเข้มข้นของสารละลายเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่งไปใช้กำหนดค่าความเข้มข้นของสารละลายเบนโซฟีโนน-3 สำหรับใช้ใน definitive test บันทึกจำนวนการตายของกุ้งขาว คำนวณหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันจากการทดลอง (acute toxicity test) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลายเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาว postlarvae (PL) 26-28 เกิดการตายครึ่งหนึ่ง (lethal median concentration) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (LC_{50}-24 hr) ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit analysis) (ภาพที่ 3-1) พารามิเตอร์ที่ทำการตรวจวัดระหว่างการทดลอง ได้แก่ ปริมาณน้ำทะเล ความเค็ม ความเป็นกรดด่าง (pH) ค่าไนไตรท์ และอุณหภูมิของน้ำทะเล (ตารางที่ 3-1)


ศึกษาความเป็นพิษของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว L. vannamei
จาก range finding test ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.1, 1 และ 10 mg/L
บันทึกจำนวนการตายของกุ้งขาว จาก range finding test
นำผลจาก range finding test ไปใช้กำหนดความเข้มข้นของ
สารละลายเบนโซฟีโนน-3 สำหรับใช้ใน definitive test
บันทึกจำนวนการตายของกุ้งขาว จาก definitive test
คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาว
เกิดการตายครึ่งหนึ่ง ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (LC50-24 hr)
ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit analysis)

ภาพที่ 3-1 แผนการทดลองเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *L. vannamei*

ตารางที่ 3-1 ตัวแปรและพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดลองเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *L. vannamei*

ตัวแปร	พารามิเตอร์
ตัวแปรอิสระ	- ความเข้มข้นเบนโซฟีโนน-3
ตัวแปรตาม	- การตายของกุ้งขาว *L. vannamei* ระยะ postlarvae (PL) 26-28
ตัวแปรควบคุม	- ปริมาณน้ำทะเลที่ใช้ในการทดลอง - ความเค็มของน้ำทะเล - ความเป็นกรดด่างของน้ำทะเล (pH) - ค่าไนไตรท์ - อุณหภูมิของน้ำทะเล

3.2. การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง น้ำทะเล และสารเคมี

3.2.1. การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาว *L. vannamei* ระยะ postlarvae (PL) 3 และ 17 จากกษิดิ์ ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา (ภาพที่ 3-2) ส่งไปทำการทดลองที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ปรับสภาพกุ้งขาวเป็นเวลา 10 วัน ในถังน้ำขนาด 500 L ด้วยน้ำทะเลที่เตรียมไว้ น้ำทะเลที่มีค่าความเค็ม 25 ppt อุณหภูมิ 28 °C ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง จากนั้นงดอาหารกุ้งขาว ก่อนเริ่มทำการทดลอง 2 ชั่วโมง

ภาพที่ 3-2 การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง ก) กษิดิ์ ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา ข) กุ้งขาว *L. vannamei*

3.2.2. การเตรียมน้ำทะเล

นำน้ำทะเลธรรมชาติจากสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี มากรองด้วยถุงกรอง (ภาพที่ 3-3) เพื่อกำจัดอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ เจือจางด้วยน้ำประปาจนน้ำทะเลมีค่าความเค็ม 25 ppt สำหรับใช้ปรับสภาพกุ้งขาวก่อนการทดลองและนำไปใช้ในการทดลอง (ดัดแปลงจาก Liu et al., 2015)

ภาพที่ 3-3 การเตรียมน้ำทะเลด้วยถุงกรอง

3.2.3. การเตรียมสารเคมี

นำสารเบนโซฟีโนน-3 (benzophenone-3 หรือ oxybenzone) จาก Tokyo Chemical Industry (TCI) มาเตรียมเป็นสารละลายเบนโซฟีโนน-3 ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 10 mg/mL เพื่อใช้เป็นสารละลายตั้งต้น (stock solution) (ดัดแปลงจาก Paredes et al., 2014) เก็บไว้ในที่เย็นและมืด ก่อนนำไปทำการทดลองจะนำสารละลายตั้งต้นมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง โดยจะต้องมีปริมาณ dimethyl sulfoxide น้อยกว่า 0.1% (v/v) (Brayton, 1986)

3.3. วิธีดำเนินงาน

การทดลองเพื่อหาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity test) โดยใช้วิธี static bioassay

3.3.1. range finding test

1. เตรียมตู้กระจกขนาดกว้าง 12 ยาว 12 สูง 20 cm จำนวน 15 ตู้ ใส่น้ำทะเลที่ผ่านการกรองและปรับความเค็มแล้ว ตู้ละ 1998 mL ต่อสายยางเข้ากับพาสเจอร์ปิเปตและปั๊มลมให้อากาศ ปรับอัตราการไหลอากาศแต่ละตู้ให้เท่ากัน

2. นำกุ้งขาวใส่ตู้กระจก ตู้ละ 20 ตัว ก่อนเริ่มการทดลอง 2 ชั่วโมง เพื่อให้กุ้งปรับสภาพ

3. เตรียมชุดการทดลองที่มีสารเบนโซฟีโนน-3 ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมที่ไม่มี DMSO), 0 (ชุดควบคุมที่มี DMSO), 0.1, 1 และ 10.0 mg/L โดยเตรียมแต่ละชุดการทดลองจากการเติมน้ำทะเล dimethyl sulfoxide และสารละลายเบนโซฟีโนน-3 ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 mg/mL ตู้ละ 2 mL ตามลำดับ แต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ และจะเติมสารเพียงครั้งเดียวเมื่อเริ่มการทดลองเท่านั้น ตามวิธีของ American Public Health Association (APHA) (1992)

4. บันทึกค่าพารามิเตอร์ที่เป็นตัวแปรควบคุมในการทดลอง ได้แก่ ความเค็มของน้ำทะเล ความเป็นกรดด่างของน้ำทะเล (pH) ค่าไนไตรท์ และอุณหภูมิน้ำทะเล ตอนเริ่มการทดลอง (0 hr) และสิ้นสุดการทดลอง (24 hr) โดยไม่มีการให้อาหารและไม่เปลี่ยนน้ำในตู้ตลอดการทดลอง (ดัดแปลงจาก US EPA, 1991)

5. บันทึกการตายของกุ้งขาวแต่ละตู้ที่เวลา 30 นาที 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง หลังจากเริ่มการทดลอง การตายของกุ้งขาวพิจารณาจากการที่กุ้งขาวไม่เคลื่อนที่ และไม่ตอบสนองเมื่อใช้แท่งแก้วสัมผัส และเมื่อกุ้งขาวตายจะนำออกจากตู้กระจกทันที (Ramírez-Rochín et al., 2017)

6. นำช่วงความเข้มข้นของเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่งมากำหนดความเข้มข้นสำหรับใช้ใน definitive test

3.3.2. definitive test

1. เตรียมตู้กระจกขนาดกว้าง 12 ยาว 12 สูง 20 cm จำนวน 18 ตู้ ใส่น้ำทะเลที่ผ่านการกรองและปรับความเค็มแล้ว ตู้ละ 1998 mL ต่อสายยางเข้ากับพาสเจอร์ปิเปตและปั๊มลมให้อากาศ ปรับอัตราการไหลอากาศแต่ละตู้ให้เท่ากัน

2. นำกุ้งขาวใส่ตู้กระจก ตู้ละ 20 ตัว ก่อนเริ่มการทดลอง 2 ชั่วโมง เพื่อให้กุ้งปรับสภาพ

3. เตรียมชุดการทดลองที่มีสารเบนโซฟีโนน-3 ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6 ชุดการทดลอง ได้แก่ ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมที่ไม่มี DMSO), 0 (ชุดควบคุมที่มี DMSO) และความเข้มข้นที่กำหนดจาก range findind test 4 ความเข้มข้น ในหน่วย mg/L ตามลำดับ แต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4. บันทึกค่าพารามิเตอร์ที่เป็นตัวแปรควบคุมในการทดลอง ได้แก่ ความเค็มของน้ำทะเล ความเป็นกรดด่างของน้ำทะเล (pH) ค่าไนไตรท์ และอุณหภูมิน้ำทะเล ตอนเริ่มการทดลอง (0 hr) และสิ้นสุดการทดลอง (24 hr) โดยไม่มีการให้อาหารและไม่เปลี่ยนน้ำในตู้ตลอดการทดลอง (ดัดแปลงจาก US EPA, 1991)

5. บันทึกการตายของกุ้งขาวแต่ละตู้ที่เวลา 30 นาที 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง หลังจากเริ่มการทดลอง การตายของกุ้งขาวพิจารณาจากการที่กุ้งขาวไม่เคลื่อนที่ และไม่ตอบสนองเมื่อใช้แท่งแก้วสัมผัส และเมื่อกุ้งขาวตายจะนำออกจากตู้กระจกทันที (Ramírez-Rochín et al., 2017)

6. นำความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 และร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาวมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่ง (lethal median concentration) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (LC_{50}-24 hr) ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit analysis)

3.4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่ง ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (LC_{50}-24 hr) โดยวิธีวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit analysis) (Finney, 1952) ด้วยโปรแกรม SPSS และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 และค่า Probit ด้วยโปรแกรม Excel

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1. ร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาว จาก range finding test

ผลของสารเบนโซฟีโนน-3 ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมที่ไม่มี DMSO), 0 (ชุดควบคุมที่มี DMSO), 0.1, 1 และ 10 mg/mL ต่อการตายของกุ้งขาวที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ช่วงความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่ง ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง คือ ช่วง 1 ถึง 10 mg/L คิดเป็นร้อยละการตายสะสม คือ ร้อยละ 15 และ 100 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 การตายสะสมของกุ้งขาว *L. vannamei* ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง และร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง จาก range finding test เพื่อทดสอบพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3

ความเข้มข้นเบนโซฟีโนน-3 (mg/L)	การตายสะสม (ตัว)				ร้อยละการตายสะสม 24 hr (%)
	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	
0	0	0	0	1	1.7
0 (DMSO)	0	0	2	2	3.3
0.1	0	0	1	2	3.3
1	8	8	9	9	15
10	60	60	60	60	100

นำช่วงความเข้มข้นเบนโซฟีโนน-3 ความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/L จาก range finding test มากำหนดความเข้มข้นเบนโซฟีโนน-3 สำหรับใช้ใน definitive test

4.2. ร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาว จาก definitive test ครั้งที่ 1

ผลของสารเบนโซฟีโนน-3 ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมที่ไม่มี DMSO), 0 (ชุดควบคุมที่มี DMSO), 1, 3, 5 และ 7 mg/mL ต่อการตายของกุ้งขาวที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 3, 5, และ 7 mg/L กุ้งเกิดการตายทั้งหมด คิดเป็นร้อยละการตายสะสม คือ ร้อยละ 100 ทำให้ไม่สามารถนำไปหาช่วงความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่ง ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (LC$_{50}$-24 hr) ได้ จึงหยุด

การทดลองที่เวลา 12 ชั่วโมง และนำความเข้มที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่ง ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง คือ ช่วง 1 ถึง 3 mg/L คิดเป็นร้อยละการตายสะสม คือ ร้อยละ 6.67 และ 100 ตามลำดับ มากำหนดความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 สำหรับใช้ใน definitive test ครั้งที่ 2 (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-2 การตายสะสมของกุ้งขาว *L. vannamei* ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง และร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาวที่เวลา 12 ชั่วโมง จาก definitive test ครั้งที่ 1 เพื่อทดสอบพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3

ความเข้มข้นเบนโซฟีโนน-3 (mg/L)	การตายสะสม (ตัว)				ร้อยละการตายสะสม 12 hr (%)
	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	
0	0	0	N/A	N/A	0
0 (DMSO)	0	0	N/A	N/A	0
1	2	4	N/A	N/A	6.67
3	59	60	N/A	N/A	100
5	60	60	N/A	N/A	100
7	60	60	N/A	N/A	100

N/A = not available คือ ไม่มีข้อมูล เนื่องจากหยุดการทดลองที่เวลา 12 ชั่วโมง

4.3. ร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาว จาก definitive test ครั้งที่ 2

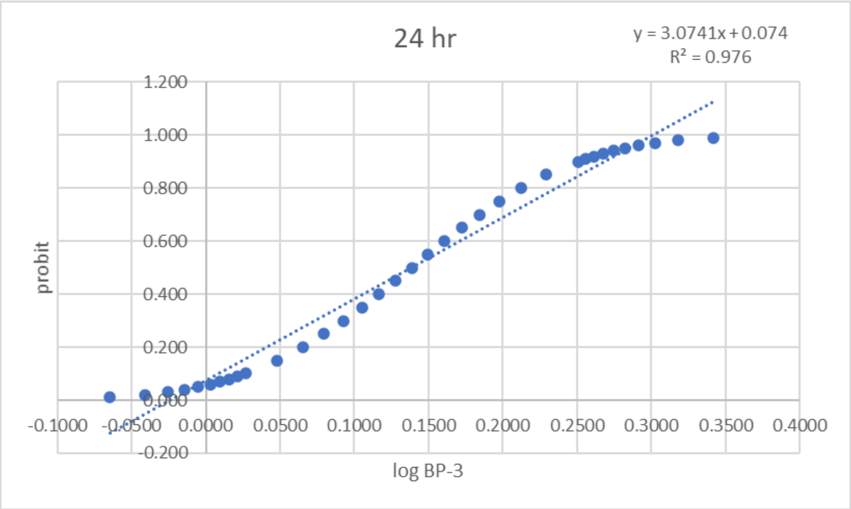
ผลของสารเบนโซฟีโนน-3 ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุมที่ไม่มี DMSO), 0 (ชุดควบคุมที่มี DMSO), 1, 1.5, 2 และ 2.5 mg/mL ต่อการตายของกุ้งขาวที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ช่วงความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่ง ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง คือ ช่วง 1 ถึง 1.5 mg/L คิดเป็นร้อยละการตายสะสม คือ ร้อยละ 8.8 และ 58.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-3)

ตารางที่ 4-3 การตายสะสมของกุ้งขาว *L. vannamei* ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง และร้อยละการตายสะสมของกุ้งขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง จาก definitive test ครั้งที่ 2 เพื่อทดสอบพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3

ความเข้มข้นเบนโซฟีโนน-3 (mg/L)	การตายสะสม (ตัว)				ร้อยละการตายสะสม 24 hr (%)
	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	
0	0	0	0	0	0
0 (DMSO)	0	0	0	1	1.7
1	2	3	5	5	8.8
1.5	20	25	31	35	58.3
2	58	60	60	60	100
2.5	60	60	60	60	100

4.4. การวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit analysis)

เมื่อนำค่าร้อยละการตายสะสมจาก definitive test ครั้งที่ 2 ไปคำนวณโดยใช้การวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit analysis) ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่า ค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่ง ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (LC_{50}-24 hr) เท่ากับ 1.376 mg/L โดยมีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 1.304-1.447 mg/L สามารถแสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ของความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 และค่า Probit ดังภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ของความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 และค่า Probit จากการทดสอบพิษฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อกุ้งขาว *L. vannamei*

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

ค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาว *L. vannamei* เกิดการตายครึ่งหนึ่ง ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (LC_{50}-24 hr) เท่ากับ 1.376 mg/L โดยมีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 1.304-1.447 mg/L ซึ่งจัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันระดับสูง เมื่อเทียบจากเกณฑ์การจัดระดับความเป็นพิษเฉียบพลันต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำที่ใกล้เคียง คือ เกณฑ์การจัดระดับความเป็นพิษเฉียบพลันต่อไรน้ำ *D. magna* (Du et al., 2017) (ตารางที่ 5-1) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อสาหร่ายคลอเรลลา *C. vulgaris* สาหร่ายสีเขียว *D. subspicatus* ไรน้ำ *D. magna* และปลาม้าลาย *B. rerio* จากการศึกษาอื่น ๆ พบว่า สารเบนโซฟีโนน-3 มีความเป็นพิษเฉียบพลันระดับสูงต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ 5 ชนิดข้างต้น (ตารางที่ 5-2)

ตารางที่ 5-1 เกณฑ์การจัดระดับความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อ *D. magna* (Du et al., 2017)

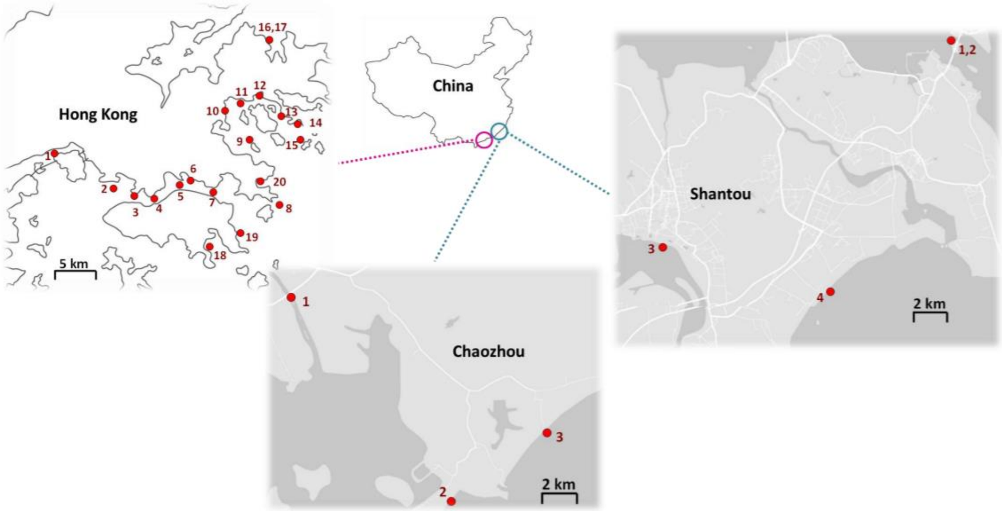
LC_{50}-24 hr (mg/L)	ระดับความเป็นพิษ (toxicity level)
<1	ระดับสูงมาก (very high-level)
1–10	ระดับสูง (high-level)
10–100	ระดับกลาง (medium-level)
>100	ระดับต่ำ (low-level)

ตารางที่ 5-2 พิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำจากการศึกษาอื่น ๆ เทียบกับกุ้งขาว *L. vannamei* จากการศึกษาครั้งนี้

สัตว์ทดลอง	ความเป็นพิษ	ความเข้มข้น mg/L	ที่มา
กุ้งขาว *L. vannamei*	LC_{50}-24 hr	1.376 (1.304–1.447)	การศึกษาครั้งนี้
สาหร่ายคลอเรลลา *C. vulgaris*	EC_{50}-96 hr	2.98 (2.70–3.39)	Du et al., 2017
ไรน้ำ *D. magna*	LC_{50}-48 hr	1.09 (0.76–1.73)	
ปลาม้าลาย *B. rerio*	LC_{50}-96 hr	3.89 (2.86–6.53)	
สาหร่ายสีเขียว *D. subspicatus*	EC_{50}-72 hr	0.96	Tsui et al., 2014
ไรน้ำ *D. magna*	EC_{50}-48 hr	1.67	

จากข้อมูลค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของกุ้งขาวเทียบกับข้อมูลความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ในตัวอย่างน้ำธรรมชาติจากสถานที่ต่าง ๆ พบว่า ค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของกุ้งขาว (LC_{50}-24 hr) เท่ากับ 1.376 mg/L หรือ 1,376,000 ng/L ซึ่งมีค่ามากกว่าความเข้มข้นที่ตรวจพบในสิ่งแวดล้อม

การศึกษาการเกิด การกระจาย และการประเมินความเสี่ยงของสารกรองรังสียูวีในตัวอย่างน้ำธรรมชาติจากประเทศต่าง ๆ โดย Tsui และคณะ (2014) พบว่า สถานที่ที่ตรวจพบความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 สูงสุด จาก 8 สถานที่ ใน 4 ประเทศ คือ ฮ่องกง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ซึ่งมีค่าความเข้มข้น เท่ากับ 39-5,429 ng/L โดยมีจุดเก็บตัวอย่างน้ำ ได้แก่ (1) ริมอ่าววิคตอเรีย ซึ่งได้รับน้ำเสียร้อยละ 70 ของจำนวนประชากรทั้งหมดของฮ่องกง ถือเป็นเส้นทางการปนเปื้อนสารกรองรังสียูวีทางอ้อม (2) ไซกุง (Sai Kung) ซึ่งมีจุดดำน้ำตื้นยอดนิยมสำหรับดูแนวปะการังและพื้นที่สำหรับกิจกรรมสันทนาการประเภทต่าง ๆ ถือเป็นช่องทางการปนเปื้อนทางตรงจากร่างกายของมนุษย์ และ (3) ชายหาดในฮ่องกง (จุดที่ 16 และ 17) เป็นจุดดำน้ำตื้นสำหรับแนวปะการัง ถือเป็นอีกช่องทางการปนเปื้อนทางตรง (ภาพที่ 5-1) อย่างไรก็ดีการที่ฮ่องกงมีจุดเก็บตัวอย่างทั้งจุดที่มีการปนเปื้อนทางตรงและทางอ้อมล้วนเป็นสาเหตุที่ทำให้ฮ่องกงมีการตรวจพบสารเบนโซฟีโนน-3 ในความเข้มข้นสูงกว่าสถานที่อื่น แต่ถึงอย่างนั้นความเข้มข้นที่ตรวจพบยังคงไม่มากพอที่จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อกุ้งขาว *L. vannamei* ที่เพาะเลี้ยงในฮ่องกงได้

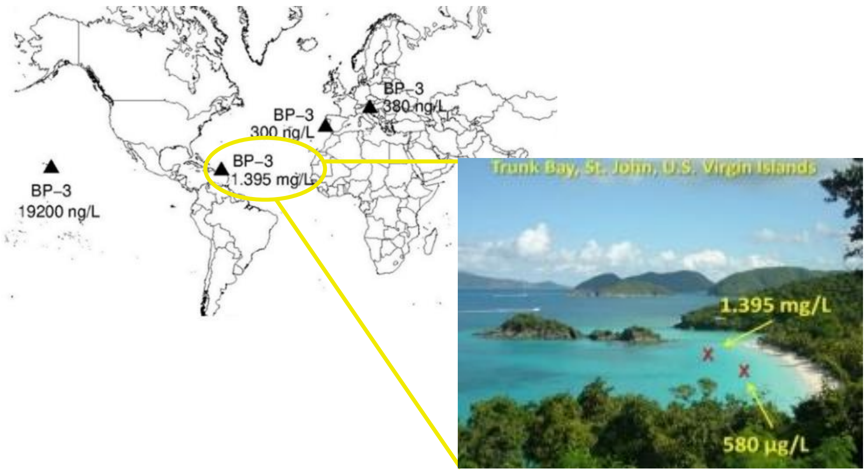


ภาพที่ 5-1 แผนที่ของตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำทะเลในฮ่องกง ซานโถว และเฉาโจว ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกรองรังสียูวี (Tsui et al., 2014)

การรายงานความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจากการศึกษาอื่น ๆ พบว่า ความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 จะแปรผันตรงกับกิจกรรมมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม หากจุดเก็บตัวอย่างน้ำมีความเกี่ยวข้องกับการปล่อยน้ำเสียหรือเป็นบริเวณที่มีการทำกิจกรรมสันทนาการสูง ก็จะยิ่งมีความเข้มข้นของเบนโซฟีโนน-3 สูง (Owen et al., 2005; Giokas et al.,2007; Hopkins and Blaney, 2016)

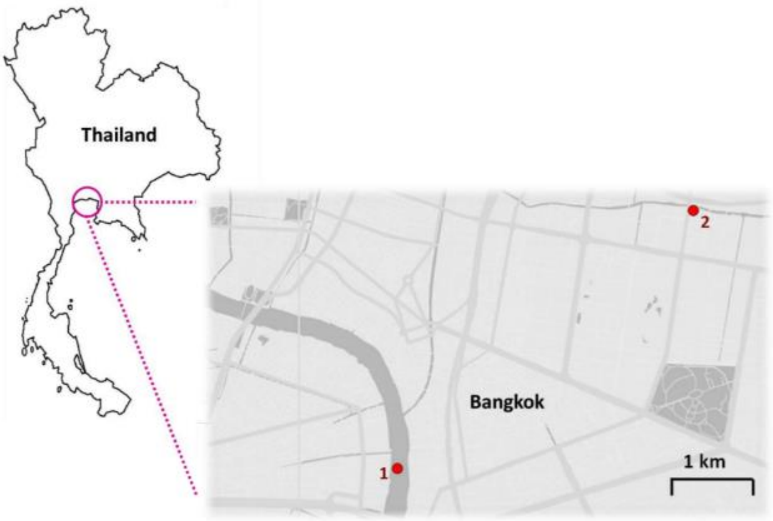
ปัจจุบันความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่มีการรายงานในสิ่งแวดล้อม มีค่าความเข้มข้นอยู่ในหน่วย ng/L-μg/L ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าความเป็นพิษเฉียบพลันต่อกุ้งขาวจากการศึกษาครั้งนี้และค่าความเป็นพิษเฉียบพลันต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำจากการศึกษาอื่น ๆ และถือว่าต่ำมากในสภาพแวดล้อมทางน้ำ จึงยังไม่สามารถสร้างผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวได้

อย่างไรก็ดีการศึกษาสารกรองรังสียูวีในสภาพแวดล้อมทางทะเล ฉบับปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ การเกิด และการกระจาย โดย Cadena-Aizaga และคณะ (2020) พบความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 สูงสุดในอ่าวทรังก์ เกาะเซนต์จอห์น หมู่เกาะเวอร์จิน ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีความเข้มข้น เท่ากับ 1.395 mg/L ซึ่งมากกว่าค่าความเป็นพิษเฉียบพลันที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ (1.376 mg/L) ค่าความเข้มข้นที่สูงมากในการรายงานนี้มีสาเหตุมาจากการเก็บตัวอย่างน้ำในช่วงเวลาที่มีนักท่องเที่ยวเข้ามาว่ายน้ำและอาบแดดบริเวณรอบจุดเก็บตัวอย่าง มากกว่า 200 คน และเป็นการเก็บตัวอย่างน้ำเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น จึงถือเป็นค่าความเข้มข้นที่สูงขึ้นเพียงชั่วคราวในช่วงเวลาหนึ่ง (ภาพที่ 5-2) แต่ถ้าหากสารเบนโซฟีโนน-3 มีความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานมากกว่า 24, 48, 72 หรือ 96 ชั่วโมง อาจก่อนให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำในอ่าวทรังก์ได้



ภาพที่ 5-2 แผนที่ตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำทะเลในอ่าวทรังก์ เกาะเซนต์จอห์น หมู่เกาะเวอร์จิน ประเทศสหรัฐอเมริกา (Downs et al., 2016 และ Cadena-Aizaga et al., 2020)

นอกจากนี้การศึกษาความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ในกรุงเทพ ประเทศไทย พบว่ามีค่าความเข้มข้น เท่ากับ 86-116 ng/L จากจุดเก็บตัวอย่างน้ำ ได้แก่ คลองแสนแสบ และแม่น้ำเจ้าพระยา (Tsui et al., 2014) (ภาพที่ 5-3) ซึ่งความเข้มข้นของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ตรวจพบในประเทศไทยเท่าที่เคยมีการรายงานยังมีค่าน้อยกว่าความเป็นพิษเฉียบพลันของกุ้งขาว *L. vannamei* แต่อย่างไรก็ตามพื้นที่ที่ทำการศึกษาก็ยังไม่มากพอที่จะใช้ประเมินความเสี่ยงของการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในประเทศไทย



ภาพที่ 5-3 แผนที่ของตำแหน่งเก็บตัวอย่างน้ำจืดในกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกรองรังสียูวี (Tsui et al., 2014)

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาผลของสารเบนโซฟีโนน-3 ต่อการตายของกุ้งขาว *L. vannamei* ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคำนวณหาร้อยละการตายสะสมและค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบนโซฟีโนน-3 ที่ทำให้กุ้งขาวเกิดการตายครึ่งหนึ่ง ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (LC_{50}-24 hr) พบว่า มีค่าเท่ากับ 1.376 mg/L โดยมีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 1.304-1.447 mg/L ซึ่งจัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันสูงต่อสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำ เมื่อเทียบจากเกณฑ์การจัดระดับความเป็นพิษเฉียบพลันของสิ่งมีชีวิตในน้ำที่ใกล้เคียง คือ เกณฑ์การจัดระดับความเป็นพิษเฉียบพลันต่อไรน้ำ *D. magna* (Du et al., 2017)

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

- ใช้ข้อมูลความเป็นพิษที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ร่วมกับการตรวจสอบปริมาณเบนโซฟีโนน-3 ที่พบในสิ่งแวดล้อม สามารถใช้เฝ้าระวังผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวและสัตว์น้ำเศรษฐกิจอื่น ๆ ในอนาคต

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

- ควรมีการศึกษาสาเหตุการตายเพื่อดูผลกระทบของเบนโซฟีโนน-3 ต่ออวัยวะและระบบร่างกายของกุ้งขาว
- ควรมีการศึกษากุ้งขาวในระยะอื่นเพื่อดูความแตกต่างของความเป็นพิษ สำหรับใช้เฝ้าระวังในฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวหลายระยะ
- ควรมีการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของกุ้งขาวเพื่อดูผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับเนื้อเยื่อ
- การศึกษาความเป็นพิษส่วนใหญ่จะเน้นศึกษาผลของสารกรองรังสี UV เพียงชนิดเดียว ควรมีการศึกษาความเป็นพิษของสารกรองรังสี UV หลายชนิดร่วมกัน เพื่อดูความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากปฏิสัมพันธ์ของสารกรองรังสี UV หลายชนิด
- ประเทศไทยยังมีการศึกษาปริมาณของสารกรองรังสี UV ที่พบในสิ่งแวดล้อมอยู่น้อย ควรมีการศึกษาปริมาณของสารกรองรังสี UV พบในสิ่งแวดล้อมให้ครอบคลุมพื้นที่มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะบริเวณแหล่งท่องเที่ยวซึ่งมีโอกาสพบสารกรองรังสี UV ตกค้างได้มาก

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

ศริศักดิ์ สุนทรไชย. (2558). ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเคมีตามระบบสากล GHS. วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ ปีที่ 8 ฉบับที่ 30 ประจำเดือนตุลาคม-ธันวาคม 2558.

ภาษาอังกฤษ

American Public Health Association (APHA). 1992. Standard Method for the Examination of Water and Wastwater. 18th edition. American Public Health Association. Washington, D.C.

Balmer, M.E., Buser, H.R., Müller, M.D. and Poiger, T. 2005. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. Environmental Science & Technology. 39: 953–962.

Blüthgen, N., Zucchi, S. and Fent, K. 2012 Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). Toxicology and Applied Pharmacology. 263: 184–194.

Brayton, C.F. 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): A review. Cornell Veterinarian. 76: 61–90.

Cadena-Aizaga, M.I., Montesdeoca-Esponda, S., Torres-Padrón, M.E., Sosa-Ferrera, Z. and Santana-Rodríguez, J.J. 2020. Organic UV filters in marine environments: An update of analytical methodologies, occurrence and distribution. Trends in Environmental Analytical Chemistry. 25: e00079.

Chamberlain, G. 2003.World shrimp farming: progress and trends. World Shrimp Farming 2003, 16. San Diego: Shrimp News International.

Chen, T.H., Wu, Y.T. and Ding, W.H. 2016 UV-filter benzophenone-3 inhibits agonistic behavior in male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Ecotoxicology. 25: 302–309.

Chisvert, A. and Salvador, A. 2018. Ultraviolet filters in cosmetics: Regulatory aspects and analytical methods. In Analysis of Cosmetic Products, 85-106. Cambridge: Elsevier.

Coronado, M., De Haro, H., Deng, X., Rempel, M.A., Lavado, R. and Schlenk, D. 2008. Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish. Aquatic Toxicology. 90: 182–187.

Diaz-Cruz, M.S. and Barcelo, D. 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. Trends in Analytical Chemistry. 28: 708–717.

Downs, C.A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., Ciner, F.R., Jeger, R., Lichtenfeld, Y., Woodley, C.M., Pennington, P., Cadenas, K., Kushmaro, A. and Loya, Y. 2016. Toxicolopathological effects of the sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 70: 265–288.

Du, Y., Wang, W.Q., Pei, Z.T., Ahmad, F., Xu, R.R., Zhang, Y.M. and Sun, L.W. 2017. Acute toxicity and ecological risk assessment of benzophenone-3 (BP-3) and benzophenone-4 (BP-4) in ultraviolet (UV)-filters. International Journal of Environmental Research and Public Health. 14: 1414.

Ekowati, Y., Buttiglieri, G., Ferrero, G., Valle-Sistac, J., Diaz-CruzMS, P.M., Villagrasa, M., Kennedy, M.D. and Rodriguez-Roda, I. 2016. Occurrence of pharmaceuticals and UV filters in swimming pools and spas. Environmental Science and Pollution Research. 23: 14431–14441.

Fent, K., Zenker, A. and Rapp, M. 2010. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. Environmental Pollution. 158: 360–374.

Finney, D.J. 1952. Probit Analysis. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei* [online]. FAO Fisheries Division: Briggs, M. Available from: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en [9 July 2021].

Giokas, D.L., Salvador, A. and Chisvert, D.L. 2007. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. Trends in Analytical Chemistry. 26: 360–374.

Graphpad Software. 2003. Introducing Dose Response Curves [Online]. Available from: https://web.archive.org/web/20070219185355/http://www.graphpad.com/curvefit/introduction89.htm [16 July 2021]

He, T., Tsui, M.M.P., Tan, C.J., Ng, K.Y., Guo, F.W., Wang L.H., Chen, T.H., Fan, T.Y., Lam, P.K.S. and Murphy, M.B. 2019. Comparative toxicities of four benzophenone ultraviolet filters to two life stages of two coral species. Science of the Total Environment. 651: 2391-2399.

Hopkins, Z. and Blaney, L. 2016. An aggregate analysis of personal care products in the environment: identifying the distribution of environmentally-relevant concentrations. Environment International. 92-93: 301–316.

Li, J., Ma, L.Y. and Xu, L. 2016. Transformation of benzophenone-type UV filters by chlorine: Kinetics, products identification and toxicity assessments. Journal of Hazardous Materials. 311: 263–272.

Liu, P.J., Hsin, M.C., Huang, Y.H., Fan, T.Y., Meng, P.J., Lu, C.C., and Lin, H.J. 2015. Nutrient enrichment coupled with sedimentation favors sea anemones over corals. PLoS ONE. 10: e0125175.

Ma, B., Lu, G., Liu, F., Nie, Y., Zhang, Z.H. and Li, Y. 2016. Organic UV filters in the surface water of Nanjing, China: Occurrence, distribution and ecological risk assessment. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 96: 530–535.

National Center for Biotechnology Information. 2021. PubChem Compound Summary for CID 4632, Oxybenzone [Online]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxybenzone [8 July 2021]

Owen, R., Mitchelmore, C., Jones, R. and Readman, J. 2005. A common sense approach for confronting coral reef decline associated with human activities. Marine Pollution Bulletin. 51: 481–485.

Pan, L.Q., Zhang, L.J. and Liu., H.Y. 2007. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquaculture. 273: 711–720.

Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J.B. and Beiras, R. 2014. Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels

Isochrysis galbana, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. Chemosphere. 104: 44–50.

P´erez Farfante, I. and Kensley, B.F. 1997. Penaeid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Muséum national d'histoire naturelle: 1815-1832.

Racotta, I.S., Palacios, E. and Ibarra, A.M. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. Aquaculture. 227: 107–130.

Ramírez-Rochín, J., Frías-Espericueta, M.G., Fierro-Sañudo, J.F., Alarcón-Silvas, S.G., Fregoso-López, M.G. and Páez-Osuna, F. 2017. Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water. Aquaculture Research. 48: 2337–2343.

Rosenberry, B. 2002. Shrimp farming in southeast china. World Shrimp Farming 2002: 42-49.

Sang, Z. and Leung, K.S. 2016. Environmental occurrence and ecological risk assessment of organic UV filters in marine organisms from Hong Kong coastal waters. Science of The Total Environment. 556–567: 489–498.

Sherwood, V.F., Kennedy, S., Zhang, H., Purser, G.H. and Sheaff, R.J. 2012. Altered UV absorbance and cytotoxicity of chlorinated sunscreen agencies. Cutaneous and Ocular Toxicology. 31: 273–279.

Silva, C.P.D., Emídio, E.S. and Marchi, M.R.R.D. 2015. The occurrence of UV filters in natural and drinking water in São Paulo State (Brazil). Environmental Science and Pollution Research. 22: 19706–19715.

Tashiro, Y. and Kameda, Y. 2013. Concentration of organic sun-blocking agents in seawaters of beaches and coral reefs of Okinawa Island, Japan. Marine Pollution Bulletin. 77: 333–340.

Trainor, B.C., Greiwe, K.M. and Nelson, R.J. 2006. Individual differences in estrogen receptor a in select brain nuclei are associated with individual differences in aggression. Hormones and Behavior. 50: 338–345.

Tsui, M.M.P., Leung, H.W., Wai, T.-C., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., Lam, P.K.S. and Murphy, M.B. 2014. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. Water Research. 67: 55–65.

Tsui, M.M.P., Lam, J.C.W. Ng, T.Y., Ang, O.A., Murphy, M.B. and Lam, P.K.S. 2017. Occurrence, distribution and fate of UV-filters in coral communities. Environmental Science & Technology. 51: 4182–4190.

U.S. Environmental Protection Agency. 1991. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organ-isms. EPA 600/4-90/027. Office of Research and Development, U.S. EPA, Cincinnati, OH, USA.

Van Wyk, P.M. 1999. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Florida, USA.

Wyban, J. 2002. White shrimp boom continues. Global Aquaculture Advocate December 2002: 18-19.

Wyban, J.A. and Sweeney, J.N. 1991. Intensive Shrimp Production Technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual. Hawaii: The Institute.

Zhang, S., Wang, X., Yang, H. and Xie, Y.F. 2016. Chlorination of oxybenzone: Kinetics, transformation, disinfection byproducts formation, and genotoxicity changes. Chemosphere. 154: 521–527.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

เครื่องมือ

เครื่องชั่งดิจิตอล TANITA 1579 ความละเอียด 0.01 g
เครื่องวัดความเค็ม แบบส่อง (salt refractometer)
เครื่องวัดอุณหภูมิ (thermometer)
กระดาษทดสอบค่า pH (universal indicator)
ชุดวัดค่าไนไตรต์ AQUA VBC (nitrite test kit)

อุปกรณ์

กระบอกตวง
ช้อนตักสาร
แท่งแก้วคนสาร
บีกเกอร์
ปิเปต
สายยาง
พาสเจอร์ปิเปต
ปั๊มลมให้อากาศ
ถุงกรอง

สารเคมี

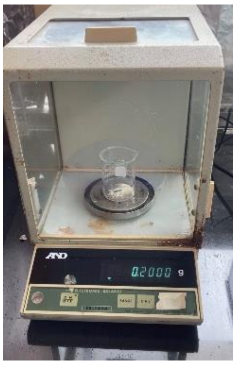
เบนโซฟีโนน-3 (benzophenone-3 (BP-3) หรือ Oxybenzone; Sigma-Aldrich)
dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich)

TCI
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone

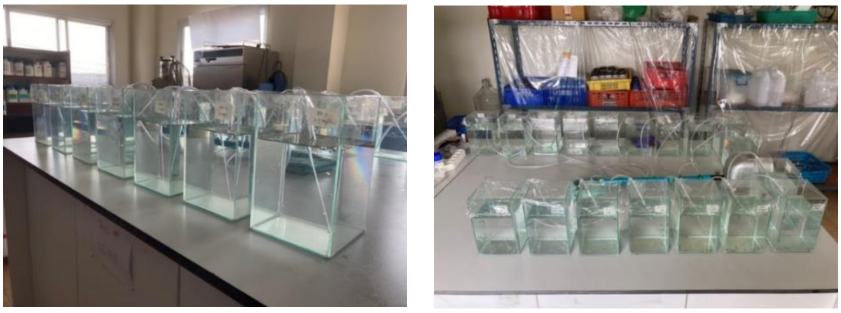
ภาพที่ ภ-1 สารเบนโซฟีโนน-3

ภาคผนวกที่ 2

การเตรียมการทดลอง



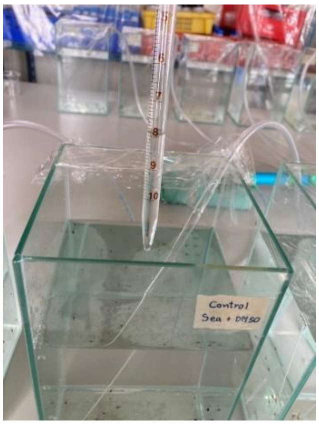
ภาพที่ ภ-2 การชั่งสารเบนโซฟีโนน-3 สำหรับการเตรียมสารละลายเบนโซฟีโนน-3 ใน dimethyl sulfoxide เพื่อใช้เป็นสารละลายตั้งต้น (stock solution)



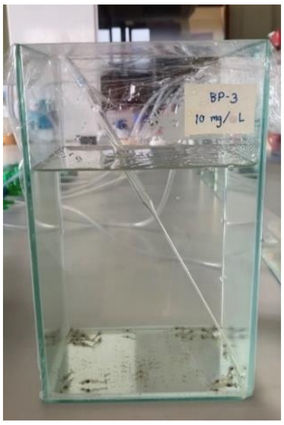
ภาพที่ ภ-3 การติดตั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตู้กระจก น้ำทะเลที่ผ่านการกรอง สายยาง พาสเจอร์ปิเปต และปั๊มลมให้อากาศ

ภาพที่ ภ-4 การนำกุ้งขาวใส่ตู้กระจกที่ติดตั้งไว้ก่อนเริ่มทำการทดลองเพื่อปรับสภาพ

ภาพที่ ภ-5 การปรับสภาพกุ้งขาวก่อนเริ่มการทดลอง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง


Control
Sea + DMSO

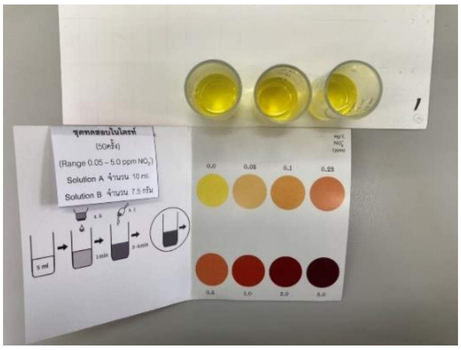
ภาพที่ ภ-6 การเติมสารละเบนโซฟีโนน-3 ลงในแต่ละตู้ เมื่อเริ่มการทดลอง



ภาพที่ ภ-7 การบันทึกการตายของกุ้งขาว จากการสังเกตกุ้งขาวที่ไม่เคลื่อนที่และไม่ตอบสนองเมื่อใช้แท่งแก้วสัมผัส

Control
Sea
pH 5.0 - 10.0
7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5 10.0

ภาพที่ ภ-8 การวัดความเป็นกรดด่าง (pH) ในน้ำทะเลที่ใช้ทดลอง
ด้วยกระดาษทดสอบค่า pH (universal indicator)


ชุดทดสอบไนไตรท์
(50ครั้ง)
(Range 0.05 – 5.0 ppm NO2)
Solution A จำนวน 10 ml
Solution B จำนวน 7.5 กรัม
5 ml
1min
3-4min
0.0
0.05
0.1
0.25
0.5
1.0
2.0
5.0

ภาพที่ ภ-9 การวัดค่าไนไตรท์ในน้ำทะเลที่ใช้ทดลอง
ด้วยชุดวัดค่าไนไตรต์ AQUA VBC (nitrite test kit)