โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลต่อระบบสืบพันธุ์ของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ในหอยแมลงภู่ *Perna viridis*

Reproductive effect of polystyrene microplastic in green mussel *Perna viridis*

ชื่อนิสิต นางสาวสุรภา ฉินพลิกานนท์ **เลขประจำตัว** 6032063523

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลต่อระบบสืบพันธุ์ของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ในหอยแมลงภู่ *Perna viridis*

Reproductive effect of polystyrene microplastic in green mussel *Perna viridis*

สุรภา ฉินพลิกานนท์

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	: ผลต่อระบบสืบพันธุ์ของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ในหอยแมลงภู่ *Perna viridis*
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวสุรภา ฉินพลิกานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ ดร.ธงชัย ฐิติภูรี
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

ขยะพลาสติกที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน สามารถย่อยสลายหรือแตกตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร หรือไมโครพลาสติกจำนวนมากและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในทะเล โดยมีการรายงานว่าไมโครพลาสติก polystyrene (PS) ที่อยู่ในสภาวะของทางเดินอาหารจำลองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะมีการปลดปล่อยสาร diethylhexyl phthalate ที่ออกฤทธิ์รบกวนระบบต่อมไร้ท่อและระบบสืบพันธุ์ ซึ่งในบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยมีรายงานการปนเปื้อนไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด แต่ยังไม่มีการศึกษาผลกระทบของ polystyrene ต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้หอยแมลงภู่ *Perna viridis* ซึ่งเป็นหอยสองฝาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และมีโอกาสได้รับไมโครพลาสติกผ่านการกรองกิน นำมาเลี้ยงในภาวะที่มีไมโครพลาสติกชนิด polystyrene แล้วตรวจสอบการสะสมและผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ โดยนำหอยแมลงภู่จากแหล่งเพาะเลี้ยงใน อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี มาเลี้ยงปรับสภาพที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ก่อนทดลองเลี้ยงในสภาวะที่มีเม็ด polystyrene ขนาด 0.6 - 1.0 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 0, 2 และ 20 mg/L เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วนำมาตรวจสอบการสะสมไมโครพลาสติกในทางเดินอาหารโดยย่อยเนื้อเยื่อด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% แล้วนำสารแขวนลอยมาตรวจสอบปริมาณไมโครพลาสติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ผลการศึกษาไม่พบเม็ด polystyrene ขนาด 0.6 - 1.0 มิลลิเมตรในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่ แต่พบไมโครพลาสติกชนิดอื่นที่มีขนาดเล็กกว่า ซึ่งคาดว่ามีการสะสมอยู่ในหอยก่อนการทดลอง แสดงให้เห็นแนวโน้มว่าเม็ด PS ที่มีขนาดใหญ่กว่า 0.6 มิลลิเมตร ไม่สามารถเข้าไปสะสมในตัวหอยแมลงภู่ได้ และเมื่อนำอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาเตรียมสไลดเนื้อเยื่อด้วยวิธี paraffin method ย้อมสี hematoxylin และ eosin นำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในระยะที่ยังไม่มีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการออกแบบการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของไมโครพลาสติกต่อระบบสืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ต่อไป

คำสำคัญ: หอยสองฝา, สารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ, มลพิษพลาสติก, polystyrene

Research Title	: Reproductive effect of polystyrene microplastic in green mussel *Perna viridis*
Student name	: Miss Surapa Chinplikanon
Advisor	: Assistant Professor Noppadon Kitana, Ph.D.
Co-Advisor	: Assistant Professor Jirarach Kitana, Ph.D. Tongchai Thitiphuree, Ph.D.
Department of	: Biology

Abstract

Plastic debris can be degraded into countless fragments smaller than 5 mm or microplastics that can be harmful to marine organisms. Previous report showed that exposing polystyrene (PS) to gut conditions of invertebrates could result in the release of endocrine-disrupting chemicals such as diethylhexyl phthalate that can affect endocrine and reproductive systems of animals. Polystyrene microplastic contamination was also reported in coastal marine invertebrates in the Gulf of Thailand. However, there is still a lack of study on reproductive effect of polystyrene microplastic in invertebrates in Thailand. In this study, green mussel *Perna viridis*, an important economic bivalve that could ingest microplastics through filter feeding, has been selected as an animal model for studying polystyrene microplastic exposure, accumulation and potential reproductive effect. Green mussels from farm in Sri Racha District, Chonburi Province were transported and acclimatized at Sichang Marine Science Research and Training Station (SMaRT), Chonburi Province. Mussels were exposed to polystyrene microplastics with diameter of 0.6 – 1.0 mm at 0, 2 and 20 mg/L concentration for 2 weeks. Microplastic accumulations in digestive tract, adductor muscle, and gill and mantle were evaluated by digesting tissue in 10% potassium hydroxide then observing for microplastics in suspension under a stereomicroscope. The results showed that there was no accumulation of polystyrene microplastics in green mussel tissue. However, other type of smaller microplastics were found, probably due to prior accumulation before the experiment. The result suggests that PS microplastics with the diameter larger than 0.6 millimeter cannot be accumulated in green mussel. Gonad tissue is processed with paraffin method and stained with hematoxylin and eosin for observation under compound light microscope. The results show that all green mussels are in resting stage. The findings from this study could be used as a guideline for designing further experiment for assessing reproductive effect of microplastics in green mussel.

Keywords: bivalve, endocrine disruptor, plastic pollution, polystyrene

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ทั้งด้านการปฏิบัติงาน การนำเสนอผลการทดลองและการอภิปรายผล รวมถึงตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลและรายงานวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ ที่ให้คำปรึกษาและชี้แนวทางในการตรวจสอบเนื้อเยื่อ รวมถึงให้คำแนะนำสำหรับการนำเสนอและอภิปรายผล และ ดร.ธงชัย ฐิติภูรี ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือตลอดการทำโครงการวิจัยนี้ รวมถึงการติดต่อขอทำวิจัยที่สถานีวิจัยทรัพยากรทางน้ำและศูนย์ฝึกนิสิต อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

ขอขอบคุณนางสาวทิพวรรณ บุญเพ็ชร และนางสาววันสิริ มีมานะ ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจตลอดการดำเนินงานที่สถานีวิจัยทรัพยากรทางน้ำและศูนย์ฝึกนิสิต อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

ขอขอบคุณ ดร.ธฤษวรรณ ไตรจิตต์ นางสาวชนิตา ศรีเกื้อกลิ่น นายธนกฤต นรสิงห์ นางสาวรุ้งลาวัลย์ ชาภักดี รวมถึงสมาชิกห้องปฏิบัติการ BioSentinel ทุกคนที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัย

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกลุ่มวิจัยสิ่งมีชีวิตเฝ้าระวัง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนทำให้การทำงานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อพื้นที่ในการทำการวิจัย และขอขอบคุณกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างหอยแมลงภู่ให้ใช้ในการทำวิจัย

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

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
ABSTRACT ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
วัตถุประสงค์ 2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 3
2.1. การปนเปื้อนไมโครพลาสติก 3
2.2. หอยแมลงภู่ 5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 7
3.1. สัตว์ทดลองและอุปกรณ์การเลี้ยง 7
3.2. น้ำทะเล 7
3.3. ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene 8
3.4. สถานที่ศึกษา 8
3.5. การทดลองให้ไมโครพลาสติกกับหอยแมลงภู่ 8
3.6. การเก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่ 9
3.7. การตรวจสอบปริมาณไมโครพลาสติกในตัวหอยแมลงภู่ 9
3.8. การทำสไลด์ถาวรด้วยวิธี paraffin method (Presnell and Schreibman, 1997) 10
3.8.1. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ (tissue processing) 10
3.8.2. การฝังชิ้นเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) 10
3.8.3. การตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (sectioning) 10
3.8.4. การย้อมสี hematoxylin และ eosin 10
3.9. การตรวจสอบการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ 11
3.10. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ 14
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา 15
4.1. ลักษณะสัณฐานของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene 15
4.2. การสะสมไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ 15

4.3. สุขภาวะและอัตราการตายของหอยแมลงภู่ที่ได้รับไมโครพลาสติก 20
4.4. ผลการตรวจสอบการเจริญของ gonad 21
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 23
5.1. สรุปผลการศึกษา 23
5.2. ข้อเสนอแนะ 23
เอกสารอ้างอิง 24
ภาษาไทย 24
ภาษาอังกฤษ 24
ภาคผนวกที่ 1 การทดลองเบื้องต้น 30

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4-1 การสะสมของไมโครพลาสติกชนิดต่าง ๆ และจำนวนไมโครพลาสติกต่อกรัม.....16
ที่พบในหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ภายหลังการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์
ในเดือนมีนาคม 2564
ตารางที่ 4-2 ค่าเฉลี่ย condition factor และค่าเฉลี่ยความยาวของหอยแมลงภู่.....20
Perna viridis ในแต่ละกลุ่มการทดลองภายหลังการทดลองให้
ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene เป็นเวลา 2 สัปดาห์ในเดือนมีนาคม 2564
ตารางที่ 4-3 จำนวนตัวอย่างหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ที่ตาย.....21
ในแต่ละกลุ่มการทดลองภายหลังการทดลองให้ไมโครพลาสติก
ชนิด polystyrene เป็นเวลา 2 สัปดาห์ในเดือนมีนาคม 2564
ตารางภาคผนวกที่ 1-1 จำนวนตัวอย่างหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ที่ตาย.....32
ในแต่ละกลุ่มการทดลองระหว่างการทดลองให้ไมโครพลาสติก
ชนิด polystyrene เป็นเวลา 1 สัปดาห์ในเดือนกุมภาพันธ์ 2564
ตารางภาคผนวกที่ 1-2 อัตราการตายของหอยแมลงภู่ *Perna viridis.*.....33
ในแต่ละกลุ่มการทดลองภายหลังการทดลองให้ไมโครพลาสติก
ชนิด polystyrene เป็นเวลา 1 สัปดาห์ในเดือนกุมภาพันธ์ 2564

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 อวัยวะภายในของหอยกลุ่ม mussel.....5
ภาพที่ 2-2 อัณฑะ (A) และรังไข่ (B) ของหอยแมลงภู่ *Perna viridis* 6
ภาพที่ 3-1 รูปแบบการเลี้ยงหอยแมลงภู่ภายในโหล ณ สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล.....7
และศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในเดือนกุมภาพันธ์ – เดือนมีนาคม
ภาพที่ 3-2 การกรองน้ำทะเลเพื่อกำจัดสารแขวนลอยผ่านถุงกรองขนาด 5 ไมครอน.....8
ภาพที่ 3-3 ระยะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ใน testis ของหอยแมลงภู่ *Perna viridis*.....12
ระยะที่ 0 – 5 (A – F), ระยะที่ 0 gonad ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง (A),
ระยะที่ 1 early developing เริ่มมี primary spermatocyte (B),
ระยะที่ 2 late developing พบ spermatocyte และ spermatozoa (C),
ระยะที่ 3 ripe พบ spermatozoa อยู่เต็มภายใน testis (D),
ระยะที่ 4 early postspawning พบช่องว่างใน follicle เนื่องจากมีการปล่อย
เซลล์สืบพันธุ์ออกไป (E), ระยะที่ 5 late postspawning follicle เริ่มหดตัว (F)
ภาพที่ 3-4 ระยะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ใน ovary ของหอยแมลงภู่ *Perna viridis*.....13
ระยะที่ 1 – 5 (A – E) , ระยะที่ 1 early developing เริ่มมี oocyte (A),
ระยะที่ 2 late developing พบ secondary oocyte (B),
ระยะที่ 3 ripe พบเซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่อยู่เต็มภายใน ovary (C),
ระยะที่ 4 early postspawning พบช่องว่างใน follicle เนื่องจากมีการปล่อย
เซลล์สืบพันธุ์ออกไป (D), ระยะที่ 5 late postspawning follicle เริ่มหดตัว (E)
ภาพที่ 4-1 รูปทรงและขนาดของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene จากโรงงานผลิตโฟมสิชล..15
อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช ที่ให้หอยแมลงภู่ในการทดลอง ณ สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์
ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี
ในเดือนกุมภาพันธ์ – เดือนมีนาคม 2564

ภาพที่ 4-2 ไมโครพลาสติก type A (เส้นใยพลาสติกไม่มีสี) ที่พบในหอยแมลงภู่.....17
Perna viridis จากแหล่งเพาะเลี้ยงของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง
อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และนำมาทำการทดลองที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล
และศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม พ.ศ.2564
ภาพที่ 4-3 ไมโครพลาสติก type B (เส้นใยพลาสติกสีน้ำเงิน) ที่พบในหอยแมลงภู่.....18
Perna viridis จากแหล่งเพาะเลี้ยงของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง
อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และนำมาทำการทดลองที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล
และศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม พ.ศ.2564
ภาพที่ 4-4 ไมโครพลาสติก type c (เส้นใยพลาสติกสีชมพู) ที่พบในหอยแมลงภู่.....18
Perna viridis จากแหล่งเพาะเลี้ยงของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง
อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และนำมาทำการทดลองที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล
และศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม พ.ศ.2564
ภาพที่ 4-5 ไมโครพลาสติก type D (เส้นใยพลาสติกสีดำ) ที่พบในหอยแมลงภู่.....19
Perna viridis จากแหล่งเพาะเลี้ยงของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง
อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และนำมาทำการทดลองที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล
และศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม พ.ศ.2564
ภาพที่ 4-6 ตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่แสดงตำแหน่งที่ cross section B, C, D และ E.....22
เพื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อ (A) ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อบริเวณ mantle
จากตำแหน่งที่แสดงใน A (B – E)

บทที่ 1
บทนำ

ความก้าวหน้าของอุตสาหกรรมพลาสติกทำให้สามารถพบพลาสติกได้ทั่วไป และมีอัตราการผลิตที่เพิ่มอย่างรวดเร็ว โดยในช่วงทศวรรษที่ 1950 มียอดรวมการผลิตพลาสติกของโลกเพียง 1.5 ล้านตัน แต่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึง 359 ล้านตันในปี ค.ศ. 2018 (Garside, 2019) นำไปสู่การเกิดขยะพลาสติก ที่ถูกทิ้งในพื้นที่ฝังกลบขยะ หรือถูกทิ้งลงสู่ธรรมชาติ (Cole and Galloway, 2015; Thompson, 2015) ในปี ค.ศ.2010 มีขยะพลาสติกถูกทิ้งลงสู่ทะเลถึง 4 – 12 ล้านตันต่อปี (Jambeck et al., 2015) ซึ่งขยะพลาสติกสามารถย่อยสลายหรือแตกตัวเป็นไมโครพลาสติกที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ (González-Pleiter et al., 2019)

ไมโครพลาสติกคืออนุภาคของพลาสติกที่มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร (Arthur et al., 2009) จากทั้งที่เข้าสู่ธรรมชาติในรูปแบบไมโครพลาสติกโดยตรง (Cole et al., 2011) และจากการย่อยสลายของเศษพลาสติกชิ้นใหญ่ (Costa et al., 2010; Andrady, 2011) มีการรายงานการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกทั่วโลกตั้งแต่บริเวณขั้วโลกเหนือและขั้วโลกใต้ถึงเส้นศูนย์สูตร (Barnes et al., 2009; Browne et al., 2011; Hidalgo-Ruz et al., 2012) โดยพบไมโครพลาสติกที่ลอยในทะเลประมาณ 5 ล้านล้านอนุภาค คิดเป็น 250,000 ตัน เนื่องจากไมโครพลาสติกสามารถพบได้ทั่วไปและมีขนาดเล็ก (Eriksen et al., 2014) สัตว์ที่มีพฤติกรรมการกรองกิน (filter-feeder) ที่จะกรองน้ำปริมาณมากจะได้รับไมโครพลาสติกในปริมาณมาก (Wegner et al., 2012; Browne et al., 2013; Cole et al., 2013; Wright et al., 2013) จากการวิจัยของ Thushari และคณะ (2017) ได้ตรวจสอบการปนเปื้อนไมโครพลาสติกในตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง 3 ชนิด ได้แก่ หอยนางรม *Saccotrea forskalii* หอยขี้นก *Littoraria* sp. และ เพรียง *Balanus amphitrite* ที่พบตามชายฝั่งบางแสน แสมสารและอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี พบไมโครพลาสติก 4 ชนิด ได้แก่ polystyrene, polyethylene, polyamide และ polyvinyl chloride

Polystyrene ส่วนใหญ่ถูกใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น กล่องโฟม แก้วโฟม (วลัยพร มุขสุวรรณ, 2551) และมักพบเป็นขยะพลาสติกในทะเล เนื่องจากเป็นขยะที่สามารถพบได้ทั่วไปมีน้ำหนักเบาถูกพัดพาจากที่ฝังกลบได้ง่าย และยังมีความไวต่อรังสีอัลตราไวโอเลตและสภาพอากาศ (Barnes et al., 2009; Browne et al., 2010; Song et al., 2018) จากการทดลองของ Song และคณะ (2018) พบว่าเมื่อ polystyrene แช่อยู่ในน้ำและได้รับแสงแดดจะถูกเร่งการแตกตัวเป็นไมโครพลาสติกได้มากขึ้น

ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene หรือ ไมโครพาร์ทิเคิลของ polystyrene สามารถปลดปล่อยสารที่ออกฤทธิ์รบกวนระบบต่อมไร้ท่อ เช่น diethylhexyl phthalate (DEHP) ซึ่งมี

ผลกระทบทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (ธีร์พิพัฒน์ สานิพามะณี และคณะ, 2560) โดยสามารถขัดขวางการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อและระบบสืบพันธุ์ได้ จากการทดลอง Coffin และคณะ (2019) พบว่าเมื่อไมโครพาร์ทิเคิลของ polystyrene อยู่ในสภาพเสมือนทางเดินอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะถูกเร่งปฏิกิริยาและปลดปล่อยสาร DEHP ได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ

หอยแมลงภู่ *Perna viridis* เป็นหอยสองฝาที่กระจายตัวตามแถบชายฝั่งทะเลทั้งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน เป็นสัตว์ทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายและมีความต้องการทางการตลาดมาก (ลีลา เรืองแป้น, 2550) การที่หอยแมลงภู่มีพฤติกรรมการกินอาหารแบบกรองกิน จึงมีโอกาสที่จะได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene เข้าไปสะสมภายในร่างกาย และอาจได้รับสาร DEHP ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก polystyrene ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของหอยและส่งต่อ DEHP ไปยังผู้บริโภคลำดับถัดไปในห่วงโซ่อาหารหรือคนได้ ในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษาผลของ polystyrene ต่อระบบสืบพันธุ์ของหอยชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังผลกระทบของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ในธรรมชาติ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลต่อระบบสืบพันธุ์ของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ในหอยแมลงภู่ *Perna viridis*

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1. การปนเปื้อนไมโครพลาสติก

พลาสติกเป็นเป็นวัสดุที่มีราคาไม่สูง สามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย มีน้ำหนักเบา และมีความคงทน จึงทำให้พลาสติกถูกใช้อย่างแพร่หลาย ถึงแม้ว่าพลาสติกจะมีส่วนสำคัญในการรักษาสิ่งแวดล้อม โดยช่วยเก็บรักษาอาหารและลดปัญหาขยะจากอาหาร (Ritchie, 2018) แต่ในทางกลับกันผลิตภัณฑ์พลาสติกประเภทบรรจุภัณฑ์มีอายุการใช้งานที่สั้นกว่าผลิตภัณฑ์พลาสติกชนิดอื่น ส่งผลให้พลาสติกที่เป็นบรรจุภัณฑ์คิดเป็นร้อยละ 42 หรือ 146 ล้านตันของพลาสติกชนิดที่ไม่ใช่เส้นใยที่ถูกผลิตขึ้นมา (Geyer et al., 2017) กลายเป็นขยะที่ถูกทิ้งในพื้นที่ฝังกลบขยะ หรือถูกทิ้งลงสู่ธรรมชาติ (Cole and Galloway, 2015; Thompson, 2015) ประมาณร้อยละ 80 ของขยะในทะเลมีที่มาจากกิจกรรมบนบก (Li et al., 2016) ซึ่งขยะในทะเลเมื่อถูกแรงกระทำจากภายนอกก็จะเกิดการแตกตัวเป็นชิ้นเล็กหรือไมโครพลาสติกต่อไป (González-Pleiter et al., 2019)

ไมโครพลาสติกคือพลาสติกที่มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร (Cole et al., 2011) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามแหล่งที่มา ได้แก่ 1) primary microplastics ซึ่งถูกผลิตออกมาให้มีขนาดเล็ก เช่น เม็ดสครับในเครื่องสำอาง หรือเม็ดพลาสติกขนาดเล็กที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม (Gregory, 1996; Fendall and Sewell, 2009) และ 2) secondary microplastics เกิดจากการแตกสลายของขยะพลาสติกชิ้นใหญ่ที่เกิดจากการกระทำของสิ่งแวดล้อมภายนอก (Arthur et al., 2009) ไมโครพลาสติกส่วนมากที่อยู่ในทะเลคาดว่าเป็นชนิด secondary microplastics (Hidalgo-Ruz et al., 2012; Andrady, 2015) จากงานวิจัยของ กมลวรรณ โพธิ์แก้ว และคณะในปี 2552 ที่ตรวจสอบพื้นที่บริเวณเกาะมุกต์ จังหวัดตรัง พบว่ามีปริมาณขยะสูงสุดถึง 16 กิโลกรัมต่อ 100 ตารางเมตร ซึ่งมีขยะรีไซเคิลซึ่งเป็นขยะที่นำมารีไซเคิลได้ เช่น แก้ว กระดาษ โลหะ และพลาสติก ร้อยละ 45.58 และพบขยะทั่วไปหรือขยะย่อยสลายไม่ได้ที่ไม่คุ้มค่าต่อการรีไซเคิล เช่น ถุงพลาสติกที่เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร ฟอยล์ และโฟมที่เปื้อนอาหาร คิดเป็นร้อยละ 44.84 ซึ่งขยะพลาสติกเหล่านี้ก็สามารถแตกสลายเป็นไมโครพลาสติกได้ต่อไป

ปัจจุบันมีการรายงานเกี่ยวกับการกระจายตัวของไมโครพลาสติกทั่วโลก โดยพบได้ทั้งในทะเลชายฝั่ง ตะกอนในทะเล (Cozar et al., 2014) เนื่องจากไมโครพลาสติกมีขนาดที่เล็กและความสามารถในการย่อยสลายที่ต่ำทำให้ไมโครพลาสติกสามารถรบกวนห่วงโซ่อาหาร และสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ (Law and Thompson, 2014; Auta et al., 2017) จากงานวิจัยของ Thushari และคณะ (2017) ได้ตรวจสอบการปนเปื้อนไมโครพลาสติกในตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง 3 ชนิด ได้แก่ หอยนางรม *Saccotrea forskalii* หอยขี้นก *Littoraria* sp. และ เพรียง *Balanus amphitrite* ที่พบ

ตามชายฝั่งบางแสน แสมสารและอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี พบไมโครพลาสติก 4 ชนิด ได้แก่ polystyrene, polyethylene, polyamide และ polyvinyl chloride แสดงให้เห็นว่าไมโครพลาสติกสามารถเข้าไปสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ นอกจากนั้นไมโครพลาสติกยังถูกส่งต่อไปยังผู้บริโภคในห่วงโซ่อาหารได้อีกด้วย โดยพบว่าสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในทะเล เช่น แพลงก์ตอนสัตว์ (*Centropages typicus*, *Daphnia magna*) และกุ้ง (*Crangon crangon)* ที่มีการสะสมไมโครพลาสติกภายในตัวจะสามารถส่งต่อไมโครพลาสติกเข้าไปสะสมภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่กว่า เช่น เต่าทะเลได้เมื่อถูกกิน (Cole et al., 2013; Devriese et al., 2015) แสดงให้เห็นว่ามนุษย์ก็มีความเสี่ยงที่จะได้รับไมโครพลาสติกเข้าสู่ร่างกายและอาจได้รับผลกระทบเช่นเดียวกัน

นอกจากนั้น polystyrene หรือ Styrofoam เมื่อแตกตัวเป็นไมโครพลาสติกสามารถปล่อยสารที่ออกฤทธิ์รบกวนระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine disrupting chemical) เช่น diethylhexyl phthalate (DEHP) ซึ่งมีผลกระทบทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (ธีร์พิพัฒน์ สานิพามะณี และคณะ, 2560)

อนุภาคไมโครพลาสติกชนิด polystyrene หรือ ไมโครพาร์ทิเคิลของ polystyrene สามารถปลดปล่อยสารที่ออกฤทธิ์รบกวนระบบต่อมไร้ท่อ เช่น DEHP ซึ่งมีผลกระทบทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (ธีร์พิพัฒน์ สานิพามะณี และคณะ, 2560) โดยสามารถขัดขวางการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อและระบบสืบพันธุ์ได้ จากการทดลอง Coffin และคณะ (2019) พบว่าไมโครพลาสติกชนิด polystyrene สามารถปลดปล่อยสาร DEHP, bisphenol S และ 4-*tert*-octylphenol ที่มีฤทธิ์เลียนแบบฮอร์โมนเอสโตรเจน นอกจากนั้นหากไมโครพลาสติกชนิด polystyrene อยู่ในสภาพเสมือนทางเดินอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะถูกเร่งปฏิกิริยาและปลดปล่อยสาร DEHP ได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่าหากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene เข้าไปสะสมในร่างกาย อาจได้รับผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ นอกจากนั้นยังส่งผลโดยตรงต่อการวาณิชกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลได้

2.2. หอยแมลงภู่

การจำแนกหอยแมลงภู่ทางอนุกรมวิธาน สามารถจำแนกได้ดังนี้

Domain Eukaryota

Kingdom Animalia

Phylum Mollusca

Class Bivalvia

Order Mytilida

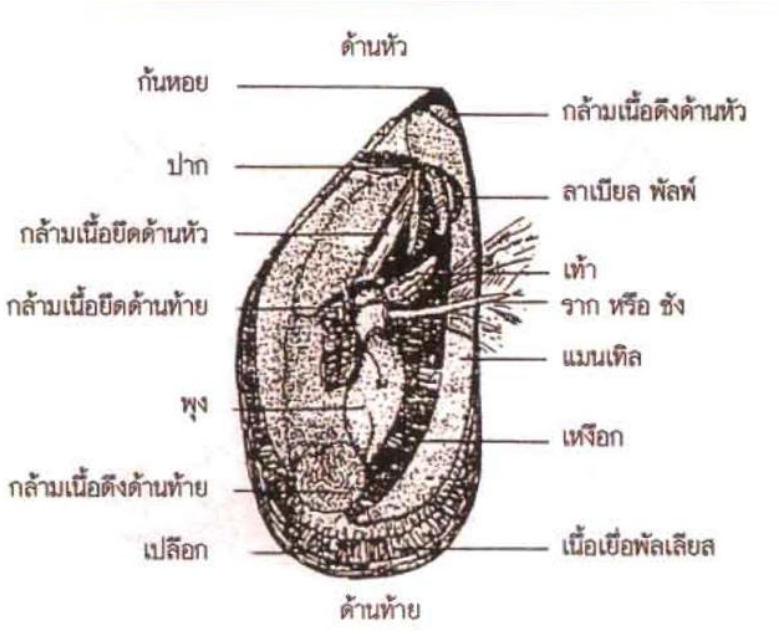
Family Mytilidae

Genus *Perna*

Species *Perna viridis* (Linnaeus, 1758)

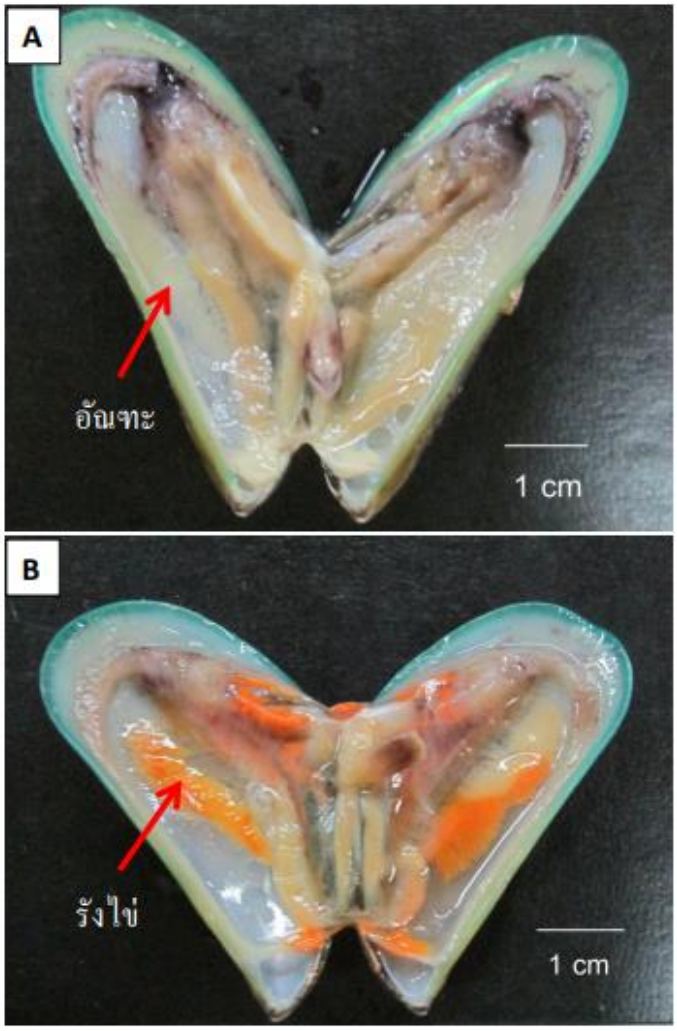
หอยแมลงภู่เป็นสัตว์ทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ มีการกระจายตัวทั่วไปในเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในประเทศไทยมีหอยแมลงภู่กระจายตัวอยู่ทั่วไปเกือบทุกจังหวัดชายฝั่งทะเลทั้งด้านอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

หอยแมลงภู่กินอาหารโดยการกรองแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ขนาดเล็ก และอินทรีย์วัตถุแขวนลอยในมวลน้ำทะเลผ่านเหงือก เมื่อเหงือกกรองอาหารแล้วจะส่งเข้าสู่ปากและทางเดินอาหารต่อไป (ภาพที่ 2-1)



ภาพที่ 2-1 อวัยวะภายในของหอยสองฝา (Field, 1911)

หอยแมลงภู่ในธรรมชาติมีอัตราส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมียใกล้เคียงกัน สามารถสังเกตได้จากสีของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) กระจายอยู่บริเวณเยื่อหุ้มลำตัว (mantle) โดยหอยแมลงภู่เพศผู้จะมีสีขาวครีม ส่วนเพศเมียจะมีสีส้มแดง ดังภาพที่ 2-2 แต่ถ้าอยู่ในระยะที่ยังไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะไม่มีความแตกต่างระหว่างสองเพศ

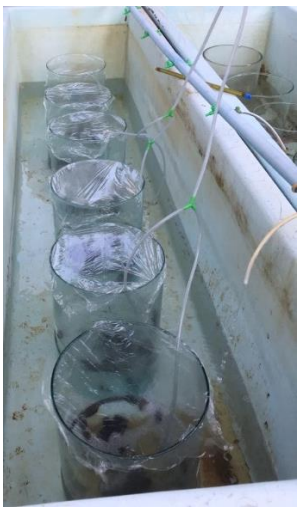


ภาพที่ 2-2 อัณฑะ (A) และรังไข่ (B) ของหอยแมลงภู่ *Perna viridis* (เสรี นิยมเดชา, 2558)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1. สัตว์ทดลองและอุปกรณ์การเลี้ยง

นำหอยแมลงภู่ขนาด 2.5 – 4.0 เซนติเมตรจากแหล่งเพาะเลี้ยงของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี มาทำความสะอาดภายนอก และแกะเพรียงหินที่เกาะบนเปลือกหอยออก นำหอยแมลงภู่ไปปรับสภาพเป็นเวลา 3 วันในโหลแก้วทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้วที่ติดตั้งอุปกรณ์ให้ออกซิเจน และมีการปล่อยน้ำทะเลให้ไหลผ่านภายนอกโหลเพื่อรักษาอุณหภูมิภายในโหล ดังภาพที่ 3-1 โดยเลี้ยงหอยแมลงภู่ 90 ตัวต่อโหล และให้ *Isocrysis* sp. และ *Tetracelmis* sp. เป็นอาหารอย่างละ 300 mL ต่อโหลต่อวัน



ภาพที่ 3-1 รูปแบบการเลี้ยงหอยแมลงภู่ภายในโหล ณ สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในเดือนกุมภาพันธ์ – เดือนมีนาคม 2564

3.2. น้ำทะเล

เตรียมน้ำทะเลผ่านถุงกรอง (ภาพที่ 3-2) และปรับความเค็มเป็น 30 ppt และเปลี่ยนน้ำครึ่งหนึ่งทุกวันตลอดการทดลอง

ภาพที่ 3-2 การกรองน้ำทะเลเพื่อกำจัดสารแขวนลอยผ่านถุงกรองขนาด 5 ไมครอน

3.3. ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene

ใช้ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตเม็ดโฟมโดยสั่งซื้อจากโรงงานผลิตโฟมสิชล อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช นำมาร่อนผ่านเครื่องเขย่าตะแกรงร่อนให้มีขนาด 0.6 – 1.0 มิลลิเมตร และชั่งน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด

3.4. สถานที่ศึกษา

ดำเนินการเลี้ยงและศึกษาโดยใช้สถานที่ของสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี

3.5. การทดลองให้ไมโครพลาสติกกับหอยแมลงภู่

แบ่งหอยแมลงภู่เป็น 3 กลุ่มการทดลอง คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำทะเลที่ไม่มีไมโครพลาสติกชนิด polystyrene

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง ได้รับน้ำทะเลที่มีไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลอง ได้รับน้ำทะเลที่มีไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยเตรียมโหลทดลอง 3 โหลต่อกลุ่มการทดลอง และเติม Tween-20 ความเข้มข้น 0.0002% ของปริมาตรสุดท้ายลงในทุกกลุ่มการทดลอง เพื่อป้องกันไม่ให้ไมโครพลาสติกติดที่ผนังโหล และทำการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ดัดแปลงจาก Sussarellu et al., 2015) โดยตรวจสอบปริมาณ

ไนไตรต์ 3 วัน ตรวจสอบความเค็มทุกวัน และตรวจสอบอุณหภูมิน้ำภายในโหลและอากาศภายนอกโหลเวลา 7:00 น. และ 19:00 น. ทุกวัน และบันทึกจำนวนตัวอย่างที่ตายในแต่ละวัน

3.6. การเก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่

เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่ ดังนี้ ตอนเริ่มการทดลอง (สัปดาห์ที่ 0) สัปดาห์ที่ 1 และตอนสิ้นสุดการทดลอง (สัปดาห์ที่ 2) ครั้งละ 30 ตัวต่อโหล นำมาบันทึกความยาว (SL) และความกว้าง (SW) ของเปลือก แกะตัวหอยออกจากเปลือก และชั่งน้ำหนักตัวหอยแมลงภู่

ตัวอย่างหอยที่เก็บในแต่ละครั้งจะนำไปศึกษาดังนี้ 1) หอยแมลงภู่จำนวน 20 ตัว นำไปรักษาสภาพ (fixation) ในสารละลาย neutral buffered formalin 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาในสารละลาย ethanol 70% ก่อนสุ่มตัวอย่างเพื่อนำไปเตรียมด้วยวิธีการ paraffin method เพื่อตรวจสอบการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และ 2) หอยแมลงภู่จำนวน 10 ตัว นำไปผ่าตัดแยกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ mantle และ gill, anterior adductor muscle และทางเดินอาหารและเนื้อเยื่ออื่น ๆ ชั่งและบันทึกน้ำหนักแต่ละส่วน บรรจุลงถุงพลาสติกและเก็บแช่แข็งที่ -30 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจสอบปริมาณไมโครพลาสติกตามขั้นตอน 3.7.

3.7. การตรวจสอบปริมาณไมโครพลาสติกในตัวหอยแมลงภู่

นำหอยแมลงภู่ที่เก็บแช่แข็งไว้มาใส่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% 20 mL ในบีกเกอร์ขนาด 50 mL อุ่นสารละลายและหอยแมลงภู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในตู้ฟักไข่ (Siam Incubator System) เป็นเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยกรองผ่านเครื่องกรองสุญญากาศโดยใช้กระดาษกรอง Whatman ขนาด 11 micrometers เมื่อกรองเสร็จแล้วนำแผ่นกรองใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 4.4 M ปริมาตร 15 mL แล้วทำการ sonication ด้วยเครื่อง ELMA – Transsonic T-780 เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ไมโครพลาสติกหลุดออกจากแผ่นกรองและแขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ จากนั้นนำสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ที่ผ่านการ sonication แล้วไป centrifuge ที่ความเร็ว 500 xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้อนุภาคธรรมชาติ เช่น ดิน หิน เปลือกหอย ตกลงสู่ด้านล่าง นำสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ที่ผ่านการ centrifuge แล้วไปกรองสุญญากาศโดยกระดาษกรอง Whatman 11 micrometers จากนั้นนำกระดาษกรองทั้งแผ่นเดิมและแผ่นใหม่ไปอบแห้ง (Karami et al., 2017) เมื่อกระดาษกรองทั้งสองแห้งแล้วจะนำมาตรวจนับอนุภาคของไมโครพลาสติก โดยสรุปผลเป็นจำนวนไมโครพลาสติกต่อน้ำหนักหอยแมลงภู่ (กรัม)

3.8. การทำสไลด์ถาวรด้วยวิธี paraffin method (Presnell and Schreibman, 1997)

3.8.1. <u>การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ (tissue processing)</u>

นำเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ที่รักษาในสารละลาย ethanol 70% มาดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) โดยผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไปสูง ดังนี้ ethanol 70%, ethanol 90%, ethanol 95% และ butanol ตามลำดับ จากนั้นทำให้เนื้อเยื่อใสด้วย xylene ก่อนนำไปแทรกซึมด้วยพาราฟิน (infiltration) โดยการแช่ใน paraplast เพื่อให้เนื้อเยื่อมีความแข็งสม่ำเสมอเท่ากันจนสามารถตัดเป็นแผ่นบางได้

3.8.2. <u>การฝังชิ้นเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)</u>

ฝังชิ้นเนื้อลงในพาราฟิน โดยเท paraplast เหลวอุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียสลงในแม่พิมพ์โลหะสี่เหลี่ยมจนเต็ม แล้วนำเนื้อเยื่อฝังลงใน paraplast เหลว ปล่อยให้เย็น จากนั้นตัดแต่งหน้าบล็อก (trimming) ให้เหลือพาราฟินรอบเนื้อเยื่อน้อยที่สุด

3.8.3. <u>การตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (sectioning)</u>

นำเนื้อเยื่อที่อยู่ในบล็อกพาราฟินมาตัดให้เป็นแผ่นหนา 6 ไมครอนด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome; Leica RM2165) ให้เป็นแผ่นต่อกัน (ribbon) แล้วเลือกเฉพาะแผ่นที่ตัดผ่านเนื้อเยื่อนำมาติดบนสไลด์โดยใช้สารละลาย albumin solution

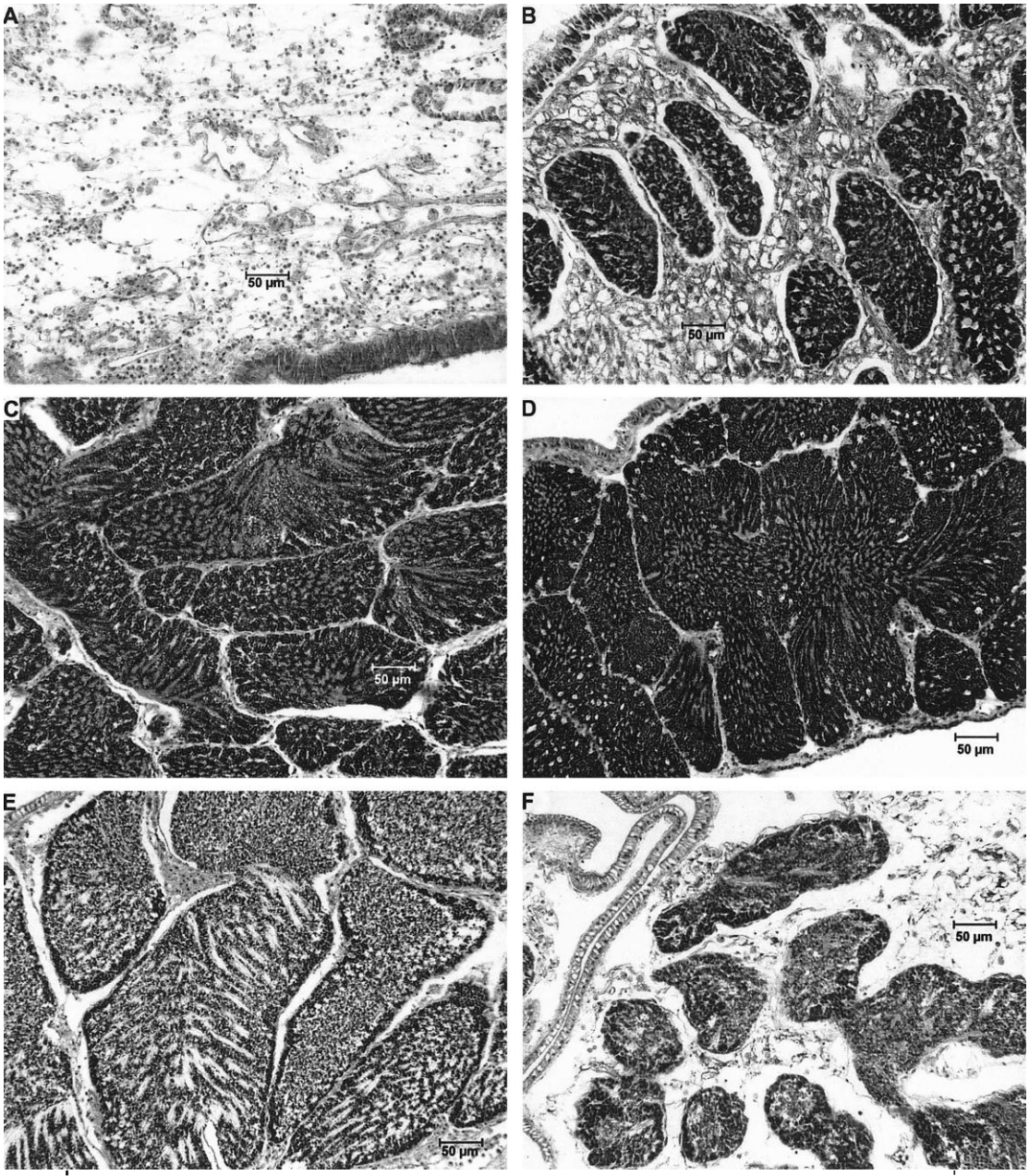
3.8.4. <u>การย้อมสี hematoxylin และ eosin</u>

นำสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อแล้วมาย้อมสี hematoxylin และ eosin ตามขั้นตอนดังนี้ แช่ใน xylene เพื่อละลาย paraplast (dewaxing) และดึงน้ำกลับเข้าเนื้อเยื่อ (rehydration) โดยผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปต่ำ ดังนี้ butanol, ethanol 95%, ethanol 90% และ ethanol 70% ตามลำดับ จากนั้นแช่ในน้ำกลั่นก่อนย้อมด้วยสี hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นและจุ่มลงในสาร differentiator (HCl 1% ใน ethanol 70%) 3 ครั้งหรือจนกว่าส่วนรอบนอกเนื้อเยื่อจะใส แล้วนำไปแช่ในน้ำประปาเป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย ethanol 70% และ ethanol 90% ตามลำดับ ก่อนนำมาย้อมด้วย eosin Y 0.5% หลังจากนั้นจึงทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไปสูง เริ่มจาก ethanol 70%, ethanol 90%, ethanol 95% และ butanol ตามลำดับ แล้วแช่ xylene เพื่อให้เนื้อเยื่อใสอีกครั้ง จากนั้นใช้ Permount หยดลงบนสไลด์ 2 – 3 หยด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

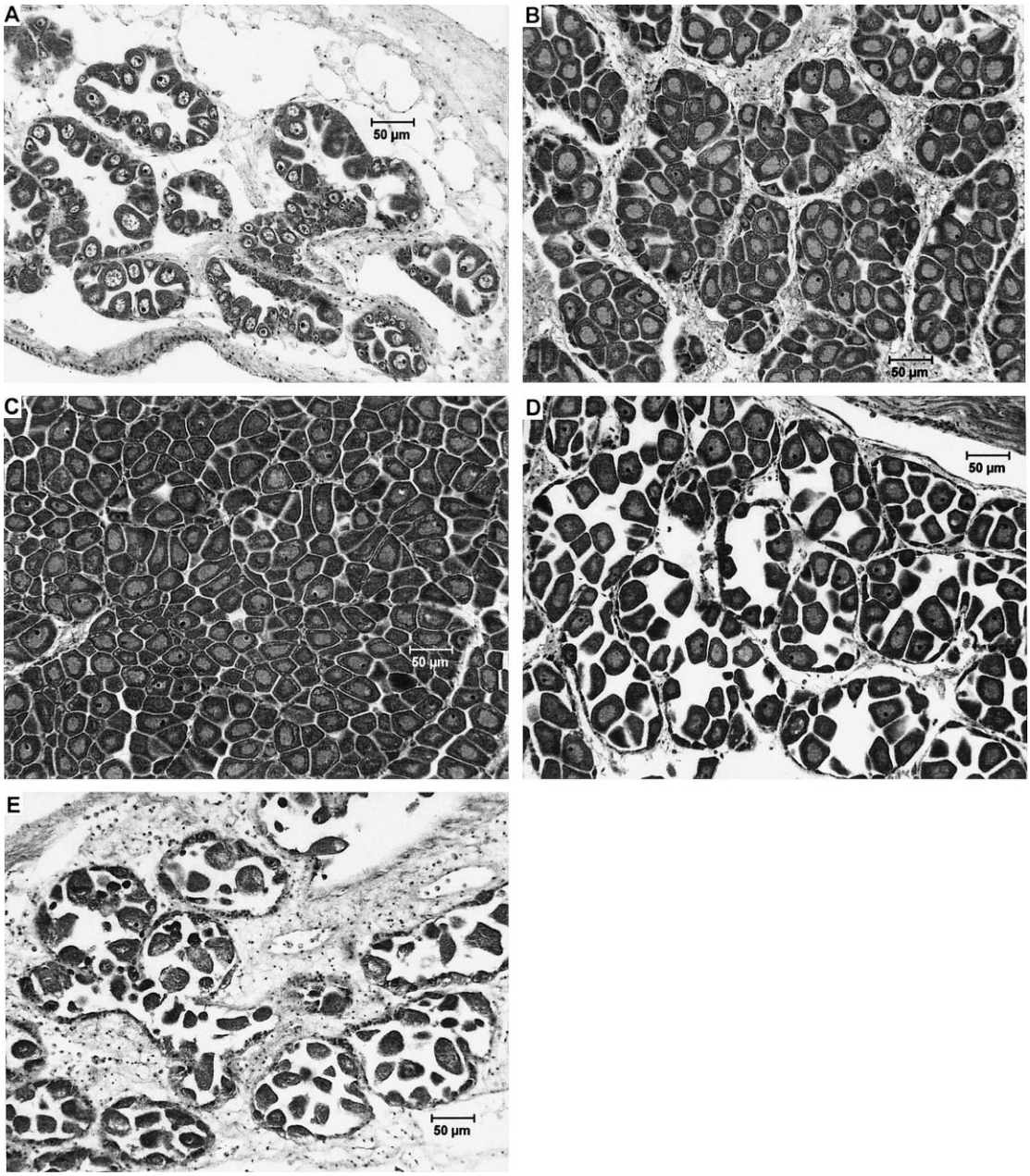
3.9. การตรวจสอบการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

ตรวจระยะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ โดยแบ่งเป็น 5 ระยะ ดังนี้ (ภาพที่ 3-3 และ 3-4; Barber et al., 2005)

- ระยะที่ 0 resting stage gonad ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันทั้งใน testis และ ovary (ภาพที่ 3-3 A)
- ระยะที่ 1 early developing: เริ่มมี follicle ขนาดเล็กภายใน connective tissue ของ gonad เซลล์ภายใน follicle อยู่ในระยะ primary spermatocyte หรือ oocyte
- ระยะที่ 2 late developing: follicle ขยายขนาดใหญ่ขึ้นและแทนที่ connective tissue ส่วนใหญ่ภายใน gonad หอยแมลงภู่เพศผู้จะพบ spermatocyte และ spermatozoa อยู่เต็มภายในของ follicle หอยแมลงภู่เพศเมียจะพบ secondary oocyte
- ระยะที่ 3 ripe: ภายใน gonad จะเต็มไปด้วย follicle ที่มี spermatozoa ในเพศผู้ หรือเซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่ในเพศเมีย
- ระยะที่ 4 early postspawning: เป็นระยะที่เริ่มมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ จะพบช่องว่างภายใน follicle และยังสามารถที่จริงปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ต่อไป ผนัง follicle บางและมีการฉีกขาด นอกจากนั้นสามารถพบการเจริญของ primary oocyte หรือ spermatocyte ได้
- ระยะที่ 5 late postspawning: follicle เริ่มหดตัว มี gamete หลงเหลืออยู่เล็กน้อย ไม่มีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ต่อ เนื่องจากไม่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้ว



ภาพที่ 3-3 ระยะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ใน testis ของหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ระยะที่ 0 – 5 (A – F), ระยะที่ 0 gonad ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง (A), ระยะที่ 1 early developing เริ่มมี primary spermatocyte (B), ระยะที่ 2 late developing พบ spermatocyte และ spermatozoa (C), ระยะที่ 3 ripe พบ spermatozoa อยู่เต็มภายใน testis (D), ระยะที่ 4 early postspawning พบช่องว่างใน follicle เนื่องจากมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกไป (E), ระยะที่ 5 late postspawning follicle เริ่มหดตัว (F) (Barber et al., 2005)



ภาพที่ 3-4 ระยะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ใน ovary ของหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ระยะที่ 1 – 5 (A – E) , ระยะที่ 1 early developing เริ่มมี oocyte (A), ระยะที่ 2 late developing พบ secondary oocyte (B), ระยะที่ 3 ripe พบเซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่อยู่เต็มภายใน ovary (C), ระยะที่ 4 early postspawning พบช่องว่างใน follicle เนื่องจากมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกไป (D), ระยะที่ 5 late postspawning follicle เริ่มหดตัว (E) (Barber et al., 2005)

3.10. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

คำนวณค่าสุขภาวะ (condition factor) โดยใช้สมการ

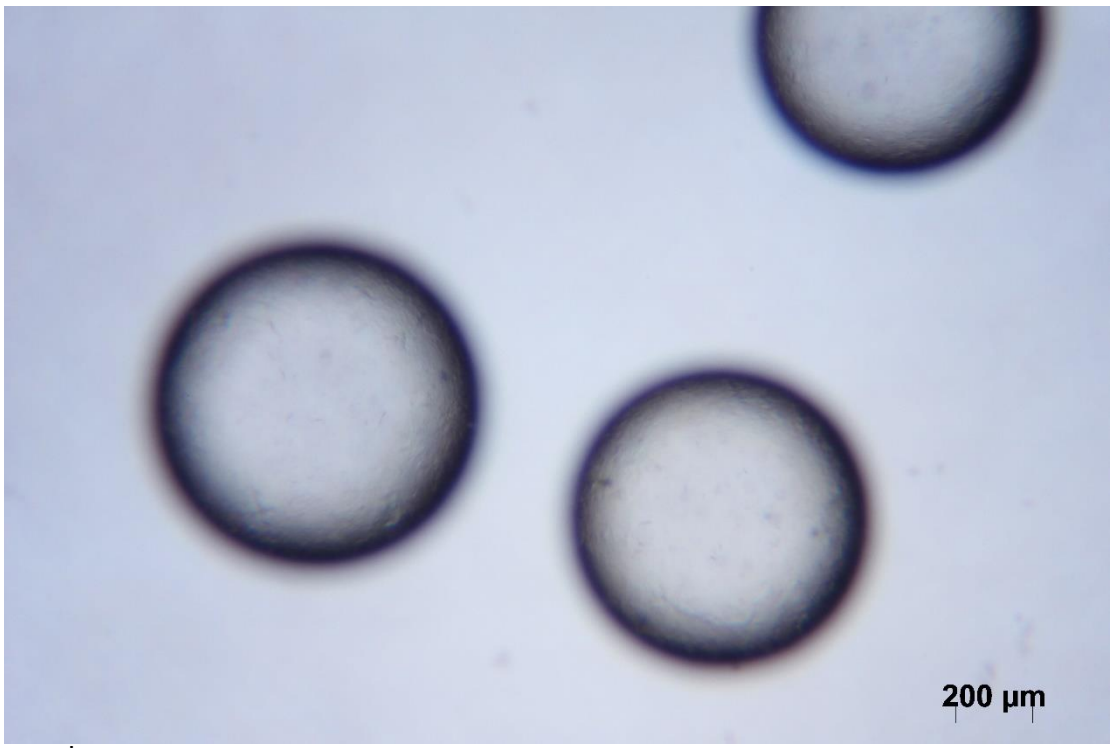
Condition factor = น้ำหนักตัว (กรัม) / ความยาว (เซนติเมตร)

เปรียบเทียบ condition factor ของหอยแมลงภู่ที่ไม่ได้รับ, ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยสถิติ One-way ANOVA ที่ความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.05$)

บทที่ 4
ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

4.1. ลักษณะสัณฐานของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene

ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ที่ถูกร่อนผ่านเครื่องเขย่าตะแกรงร่อนมีขนาด 0.6 – 1.0 มิลลิเมตรและมีรูปทรงเป็นทรงกลมผิวเรียบ (ภาพที่ 4-1) มีน้ำหนักเฉลี่ย 330 มิลลิกรัมต่อเม็ด



ภาพที่ 4-1 รูปทรงและขนาดของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene จากโรงงานผลิตโฟมสิชล อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช ที่ใช้ในการทดลองให้หอยแมลงภู่ในการทดลอง ณ สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในเดือนกุมภาพันธ์ – เดือนมีนาคม 2564

4.2. การสะสมไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่

จากการตรวจสอบไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งในตอนเริ่มการทดลอง (สัปดาห์ที่ 0) และภายหลังการทดลอง 1 และ 2 สัปดาห์ ไม่พบไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ขนาด 0.6 – 1.0 มิลลิเมตร แต่พบไมโคร

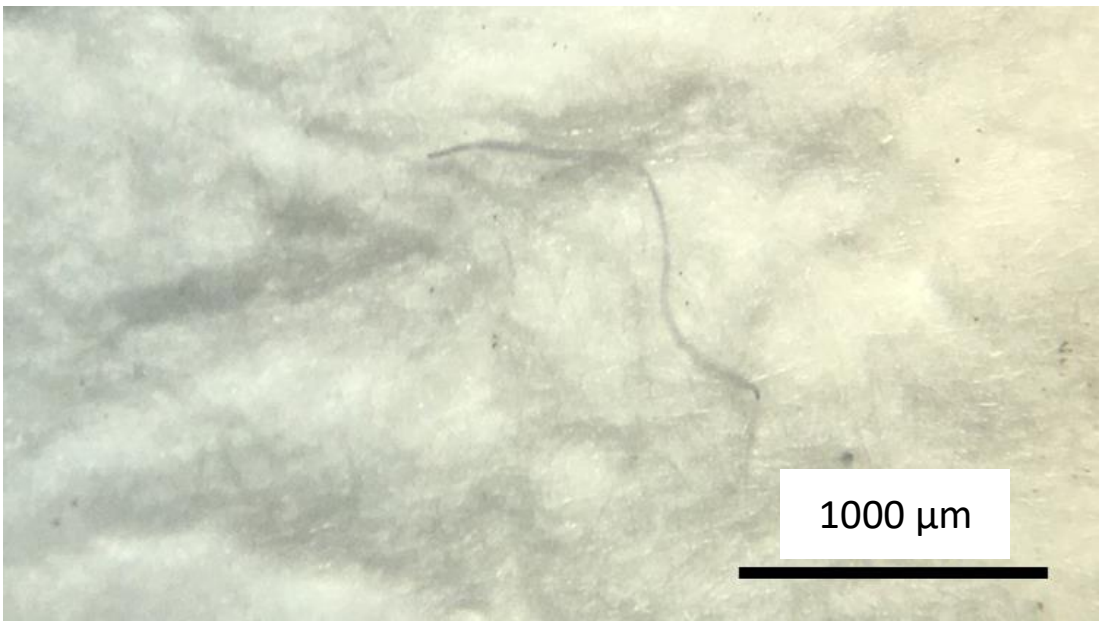
พลาสติกชนิดอื่นทั้งหมด 4 แบบปนเปื้อนในหอยแมลงภู่ (ตารางที่ 4-1) ได้แก่ เส้นใยพลาสติกไม่มีสี (type A; ภาพที่ 4-2) เส้นใยพลาสติกสีน้ำเงิน (type B; ภาพที่ 4-3) เส้นใยพลาสติกสีชมพู (type C; ภาพที่ 4-4) และเส้นใยพลาสติกสีดำ (type D; ภาพที่ 4-5) โดยพบไมโครพลาสติกทุกแบบในแต่ละกลุ่มการทดลอง คาดว่าไมโครพลาสติกแบบเส้นใยที่พบเป็น ไมโครพลาสติกที่สะสมอยู่ภายในตัวของหอยแมลงภู่ก่อนเริ่มการทดลอง เนื่องจากน้ำทะเลที่หอยแมลงภู่ทุกกลุ่มได้รับในระหว่างการทดลองเป็นน้ำทะเลที่ผ่านการกรองมาแล้ว นอกจากนั้นหอยแมลงภู่ที่นำมาทดลองเป็นหอยที่เลี้ยงด้วยวิธีแขวนแพเชือก ซึ่งไมโครพลาสติกแบบเส้นใยที่พบหรือไมโครไฟเบอร์ (microfiber) ก็ถือเป็นไมโครพลาสติกชนิดที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และสามารถพบการสะสมในหอยแมลงภู่ (Chinfak et al., 2021) ได้

ตารางที่ 4-1 การสะสมไมโครพลาสติกชนิดต่าง ๆ และจำนวนไมโครพลาสติกต่อกรัมที่พบในหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ภายหลังการทดลอง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ในเดือนมีนาคม 2564

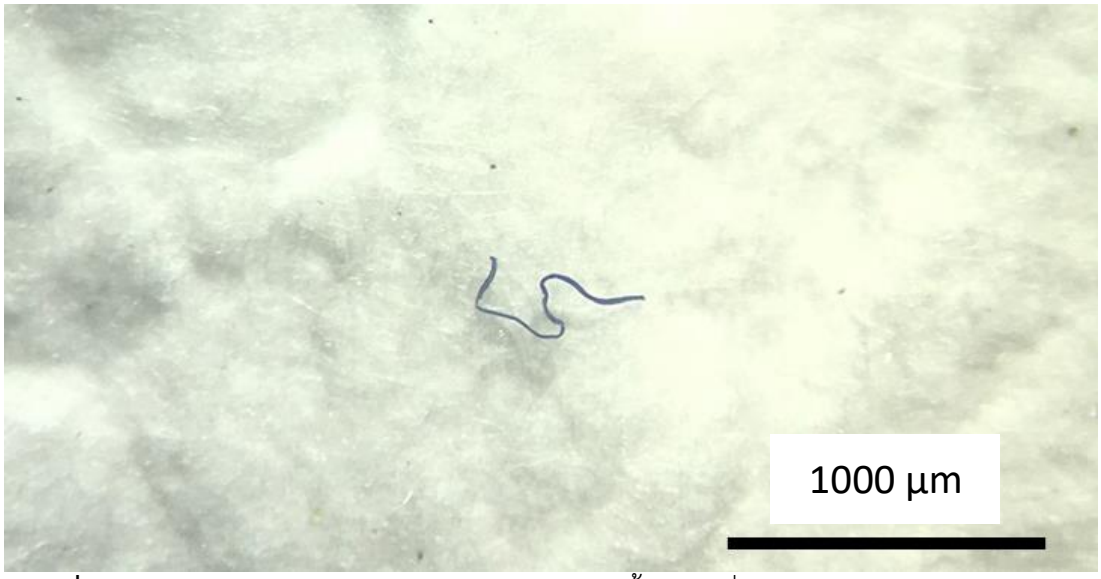
กลุ่มการทดลอง	จำนวนหอยแมลงภู่ที่พบไมโครพลาสติก	ลักษณะของไมโครพลาสติกที่พบ				จำนวนไมโครพลาสติกต่อน้ำหนักหอย 1 กรัม (ชิ้น)
		type A	type B	type C	type D	
กลุ่มควบคุม	3 ตัว จาก 3 ตัว	พบ	พบ	พบ	พบ	47.12 ± 28.10
กลุ่มทดลอง 1	3 ตัว จาก 3 ตัว	พบ	พบ	พบ	พบ	43.93 ± 16.35
กลุ่มทดลอง 2	3 ตัว จาก 3 ตัว	พบ	พบ	พบ	พบ	43.91 ± 6.05

- กลุ่มควบคุม = กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene
- กลุ่มทดลอง 1 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กลุ่มทดลอง 2 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร
- type A = เส้นใยพลาสติกไม่มีสี
- type B = เส้นใยพลาสติกสีน้ำเงิน
- type C = เส้นใยพลาสติกสีชมพู
- type D = เส้นใยพลาสติกสีดำ

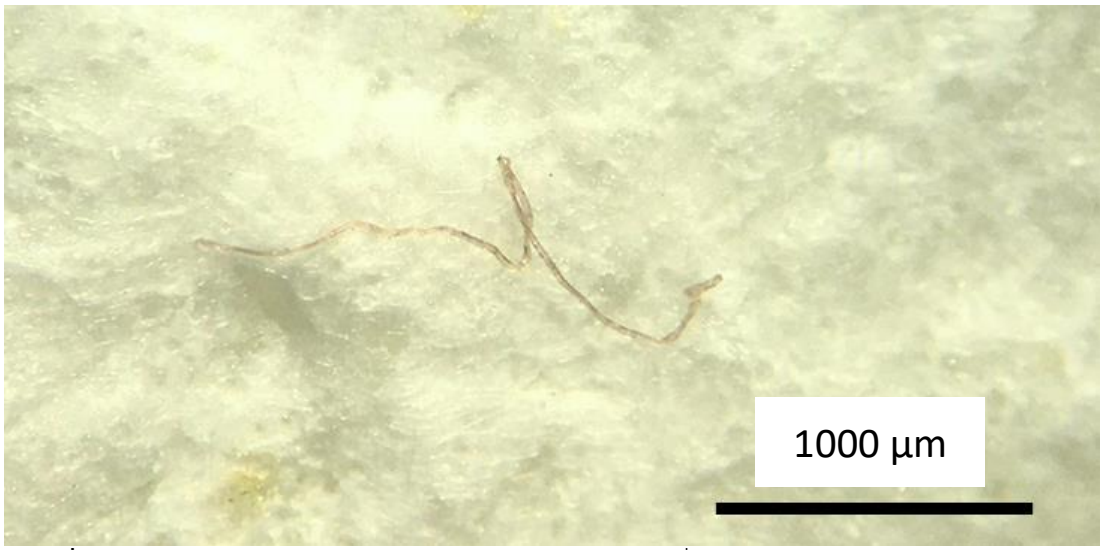
โดยเมื่อเทียบขนาดกับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ที่ใช้ในการทดลองกับไมโครพลาสติกแบบเส้นใยที่พบในหอยแมลงภู่พบว่าไมโครพลาสติกแบบเส้นใยที่พบมีขนาดเล็กกว่ามาก จึงสามารถเข้าไปสะสมในตัวหอยแมลงภู่ได้ในขณะที่ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ที่ให้ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.6 – 1.0 มิลลิเมตร ไม่สามารถเข้าไปสะสมภายในตัวหอยแมลงภู่ได้



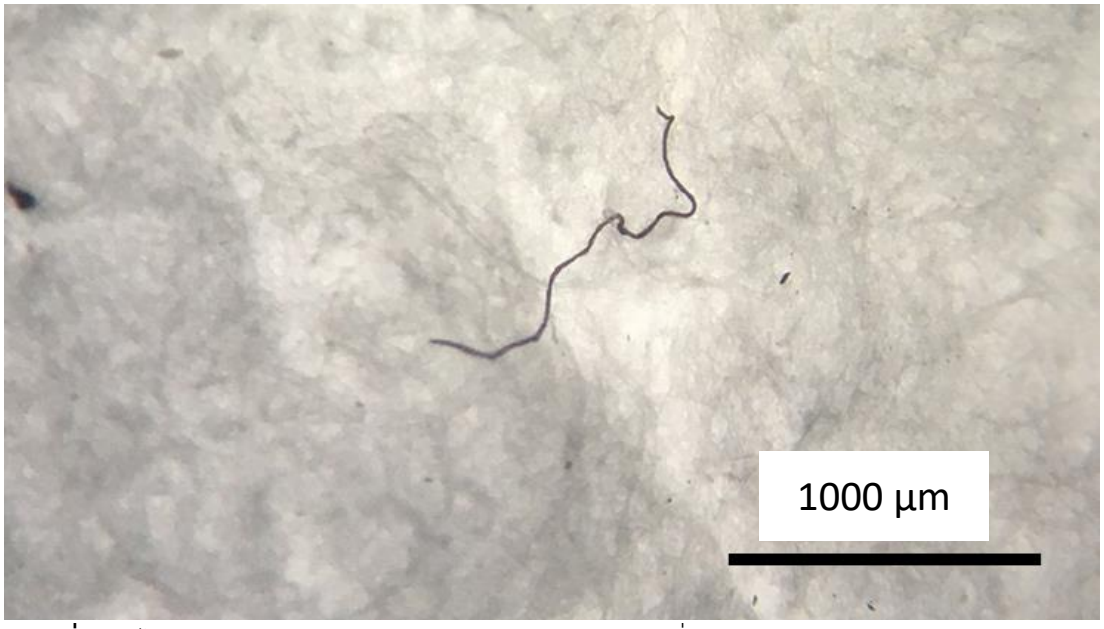
ภาพที่ 4-2 ไมโครพลาสติก type A (เส้นใยพลาสติกไม่มีสี) ที่พบในหอยแมลงภู่ *Perna viridis* จากแหล่งเพาะเลี้ยงของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และนำมาทำการทดลองที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม พ.ศ.2564



ภาพที่ 4-3 ไมโครพลาสติก type B (เส้นใยพลาสติกสีน้ำเงิน) ที่พบในหอยแมลงภู่ *Perna viridis* จากแหล่งเพาะเลี้ยงของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และนำมาทำการทดลองที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม พ.ศ.2564



ภาพที่ 4-4 ไมโครพลาสติก type c (เส้นใยพลาสติกสีชมพู) ที่พบในหอยแมลงภู่ *Perna viridis* จากแหล่งเพาะเลี้ยงของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และนำมาทำการทดลองที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม พ.ศ.2564



ภาพที่ 4-5 ไมโครพลาสติก type D (เส้นใยพลาสติกสีดำ) ที่พบในหอยแมลงภู่ *Perna viridis* จากแหล่งเพาะเลี้ยงของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และนำมาทำการทดลองที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ต.ท่าเทววงษ์ อ.เกาะสีชัง จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม พ.ศ.2564

จากการตรวจสอบจำนวนไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ขนาดความยาวเฉลี่ย 29.58 ± 3.15 มิลลิเมตรพบว่ามีจำนวนไมโครพลาสติกคิดเป็น 41.99 ± 17.42 ชิ้นต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมซึ่งมากกว่าจำนวนไมโครพลาสติกต่อกรัมในหอยแมลงภู่จากงานวิจัยของ Chinfak และคณะในปี 2021 ซึ่งพบไมโครพลาสติกปนเปื้อนในหอยแมลงภู่ขนาดความยาว 77.40 ± 0.74 และ 104.85 ± 0.67 มิลลิเมตร เท่ากับ 5.70 ± 0.19 และ 1.77 ± 0.30 ชิ้นต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับในงานวิจัยที่กล่าวว่าหอยขนาดเล็กจะมีการสะสมของไมโครพลาสติกมากกว่าหอยขนาดตัวใหญ่กว่า เนื่องจากหอยขนาดใหญ่จะมีอัตราเร็วในการกรองกินที่ต่ำกว่าหอยขนาดเล็ก (Winter, 1973; Sylverter et al., 2005) ทำให้ลดโอกาสที่จะได้รับไมโครพลาสติกเข้าไปสะสมในร่างกาย (Chinfak et al., 2021)

4.3. สุขภาวะและอัตราการตายของหอยแมลงภู่ที่ได้รับไมโครพลาสติก

เมื่อพิจารณาค่า condition factor ของระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าหอยแมลงภู่แต่ละกลุ่มมีสุขภาวะที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-2 ค่าเฉลี่ย condition factor และค่าเฉลี่ยความยาวของหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ในแต่ละกลุ่มการทดลองภายหลังการทดลองให้ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในเดือนมีนาคม 2564

กลุ่มการทดลอง	จำนวนหอยแมลงภู่ (ตัว)	condition factor	ค่าเฉลี่ยความยาว (มิลลิเมตร)
กลุ่มควบคุม	72	0.10 ± 0.03	30.54 ± 2.50
กลุ่มทดลอง 1	64	0.10 ± 0.11	30.23 ± 2.74
กลุ่มทดลอง 2	66	0.11 ± 0.03	30.84 ± 2.63

- กลุ่มควบคุม = กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene
- กลุ่มทดลอง 1 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กลุ่มทดลอง 2 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

อย่างไรก็ดีระหว่างการทดลองพบว่ามีตัวอย่างที่ตายในทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง และยังพบว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene มีตัวอย่างที่ตายรวมตลอดการทดลองถึง 18 ตัวจาก 90 ตัว หรือคิดเป็น 20% ของการทดลอง (ตารางที่ 4-3) แสดงถึงสภาวะการเลี้ยงที่ยังไม่เหมาะสมนักทำให้มีตัวอย่างในกลุ่มควบคุมตายมากเกินไป จึงไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับไมโคร พลาสติก ชนิด polystyrene กับการตายของตัวอย่างได้

ตารางที่ 4-3 จำนวนตัวอย่างหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ที่ตายในแต่ละกลุ่มการทดลองภายหลังการทดลองให้ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene เป็นเวลา 2 สัปดาห์ในเดือนมีนาคม 2564

กลุ่มการทดลอง	จำนวนหอยแมลงภู่ตอนเริ่มต้นการทดลอง (ตัว)	จำนวนหอยแมลงภู่ที่ตาย (ตัว)	อัตราการตายของหอยแมลงภู่
กลุ่มควบคุม	90	18	20%
กลุ่มทดลอง 1	90	26	28.89%
กลุ่มทดลอง 2	90	24	26.67%

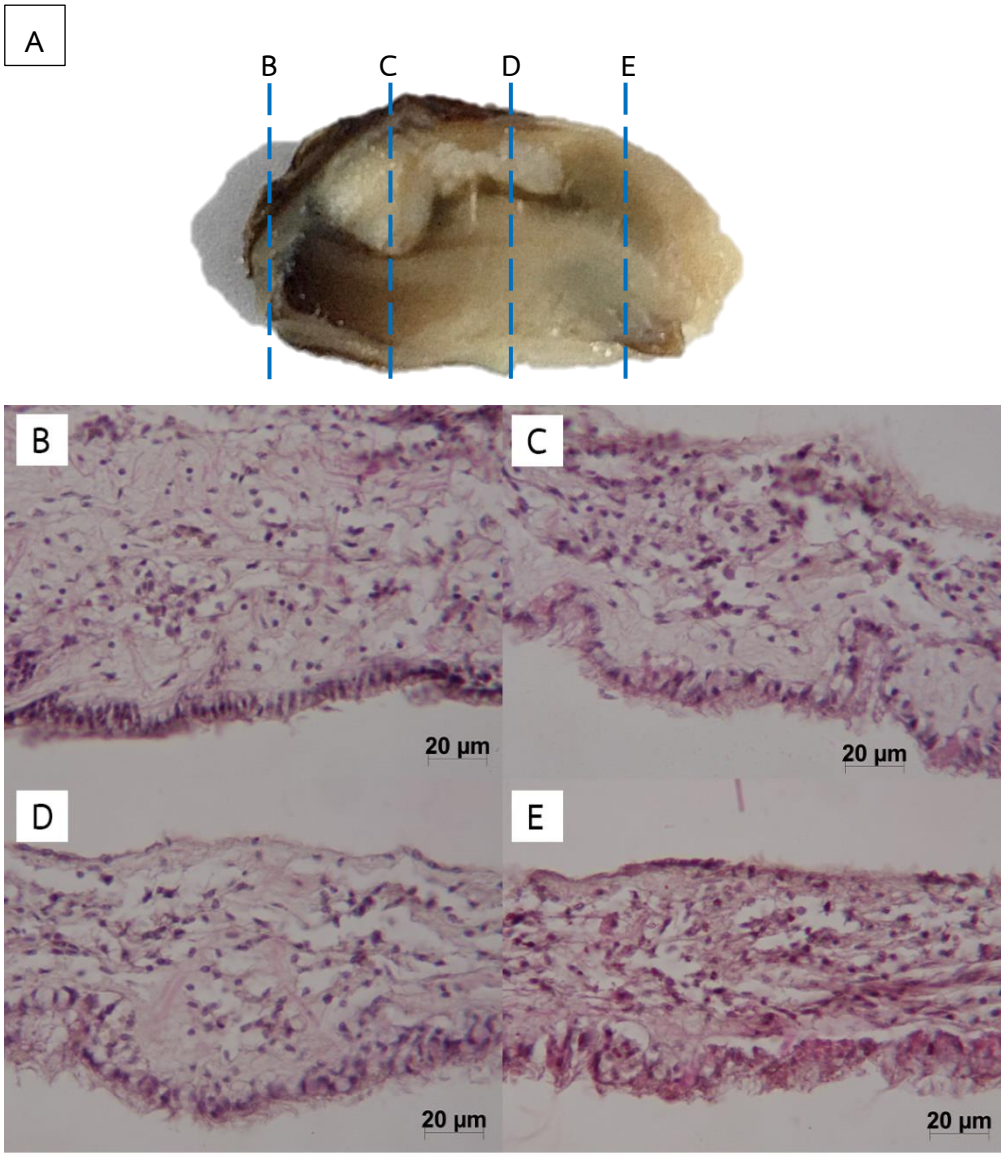
- กลุ่มควบคุม = กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene
- กลุ่มทดลอง 1 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กลุ่มทดลอง 2 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการตรวจสอบปัจจัยต่าง ๆ พบว่าอุณหภูมิน้ำภายในโหลอยู่ระหว่าง 26 – 29.5 องศาเซลเซียส อากาศภายนอกโหลอยู่ระหว่าง 25 – 33 องศาเซลเซียส น้ำทะเลภายในโหลมีความเค็มเท่ากับ 30 ppt คงที่ตลอดการทดลอง และมีปริมาณไนไตรต์ 0.0 – 1.0 mg/L โดยปัจจัยที่ได้ทำการวัดทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของหอยแมลงภู่ จึงอาจไม่ใช่สาเหตุหลักที่ทำให้หอยแมลงภู่ตาย จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำมาปรับเปลี่ยนรูปแบบการเลี้ยงให้เหมาะสมมากขึ้น และมีการตรวจสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงเพิ่มขึ้น

4.4. ผลการตรวจสอบการเจริญของ gonad

เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ตัดในแนว cross section ในตำแหน่งต่าง ๆ ดังแสดงบริเวณที่ตัดในภาพ 4-5 บริเวณ mantle พบเพียง connective tissue ยังไม่มีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสามกลุ่มการทดลอง แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในระยะที่ 0 หรือ resting stage ที่ gonad ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การตรวจสอบผลที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์เป็นการตรวจสอบที่จำเป็นจะต้องใช้ระยะเวลาในการทดลอง เนื่องจากระยะเวลาในการทดลองที่สั้นเกินไป จึงทำให้ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์



ภาพที่ 4-6 ตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่แสดงตำแหน่งที่ cross section B, C, D และ E เพื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อ (A) ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อบริเวณ mantle จากตำแหน่งที่แสดงใน A (B – E)

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1. สรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองให้ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ขนาด 0.6 – 1.0 มิลลิเมตรแก่หอยแมลงภู่เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ที่นำมาใช้ในการทดลองมีขนาดใหญ่เกินไป จึงไม่สามารถเข้าไปสะสมอยู่ภายในตัวของหอยแมลงภู่ได้ แต่จากการตรวจสอบพบไมโครพลาสติกชนิดไมโครไฟเบอร์สะสมภายในตัวซึ่งคาดว่าได้รับไมโครไฟเบอร์จากในธรรมชาติและสะสมอยู่ก่อนเริ่มการทดลอง และเมื่อตรวจสอบการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบว่าหอยแมลงภู่ทั้ง 3 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังอยู่ในระยะที่เซลล์สืบพันธุ์ยังไม่เจริญ จึงยังไม่สามารถสรุปผลต่อระบบของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ในหอยแมลงภู่ *Perna viridis* โดยผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการออกแบบการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของไมโครพลาสติกต่อระบบสืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ต่อไป

5.2. ข้อเสนอแนะ

- ขนาดของไมโครพลาสติก

  เนื่องจากไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ที่ใช้ในการทดลองมีขนาดใหญ่เกินไป จึงเข้าไปสะสมภายในตัวหอยแมลงภู่ได้ยาก ควรจะเปลี่ยนให้มีขนาดเล็กลง นอกจากนั้นเมื่อขนาดของไมโครพลาสติกชนิด polystyrene เล็กลง จะมีพื้นที่ผิวมากกว่าไมโครพลาสติกที่มีขนาดใหญ่กว่า เมื่ออยู่ภายในทางเดินอาหารของหอยจะสามารถปล่อยสาร DEHP ได้มากกว่า

- ระยะเวลาในการทดลอง

  ควรเพิ่มระยะเวลาในการทดลองเพื่อให้หอยแมลงภู่ได้รับไมโครพลาสติกในระหว่างที่กำลังสร้างเซลล์สืบพันธุ์ จนสามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับไมโครพลาสติก

- การเลี้ยงหอยแมลงภู่

  ขนาดของหอยแมลงภู่ที่ใช้มีความเหมาะสมในการตรวจสอบแล้ว แต่ต้องปรับเปลี่ยนวิธีการเลี้ยง โดยอาจต้องเปลี่ยนเป็นภาชนะที่ใหญ่ขึ้น และตรวจสอบปัจจัยในการเลี้ยงเพิ่มเติม หรือตรวจสอบเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างขนาด, condition factor และการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จากหอยขนาดอื่น ๆ

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กมลวรรณ โพธิ์แก้วม นุชนาฏ นิลออ และ วรพจน์ รัตนพันธุ์. 2552. การศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของขยะในพื้นที่เกาะมุกต์ จังหวัดตรัง. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 1: 46–53.

ธีร์พิพัฒน์ สานิพามะณี, ประมุข โอศิริ, สมพร กันทรดุษฎี เตรียมชัยศรี, เฉลิมชัย ชัยกิตติภรณ์ และนพกร จงวิศาล. การสัมผัสสารไดทูเอทิลเฮซิลพทาเลท (ดีอีเอชพี) ทางการหายใจและระดับสารเมแทบอไลต์ในปัสสาวะของพนักงาน อุตสาหกรรมพลาสติกโพลีไวนิลคลอไรด์. วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ. 36: 20–33.

ลีลา เรืองแป้น, สุรจิตต์ อินทรชิต, ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์, อดุลย์ แมเร๊าะ, สุนิตย์ โรจนพิทยากุล, ทวี จินดามัยกุล, สุพิศ ทองรอด, ลือชัย ดรุณชู, ก่อเกียรติ กูลแก้ว, จินตนา นักระนาด, ธวัช ศรีวีระชัย, สิทธิศักดิ์ สมศรี, นฤชยา ทศฤทธิ์ และ นทีชา วิชัยดิษฐ. 2550. การเลี้ยงหอยแมลงภู่. กรุงเทพ: ฝ่ายเผยแพร่ ส่วนเผยแพร่การประมง สำนักงานพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง.

วลัยพร มุขสุวรรณ. 2551. พลาสติกในชีวิตประจำวัน: ตอนที่ 1 โพลีสไตรีน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.chemtrack.org/news-detail.asp?tid=4&id=11 [9 มีนาคม 2563]

เสรี นิยมเดชา. 2558. การเปรียบเทียบวงจรการสืบพันธุ์และขนาดแรกสืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ระหว่างชายฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาสัตววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ภาษาอังกฤษ

Andrady, L.A. 2011. Microplastics in the marine environment. Marine Pollution Bulletin. 62: 1596–1605.

Andrady A.L. 2015. Persistence of plastic litter in the oceans. In: M. Bergmann L. Gutow and M. Klages (Eds.), Marine Anthropogenic Litter, pp 5772. Berlin: Springer.

Arthur, C., Baker, J., and Bamford, H. (eds). 2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris. National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NOS-OR&R-30: 530.

Auta, H.S., Emenike, C.U. and Fauziah, S.H. 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. Environmental International. 102: 165–176.

Barber, B.J., FaJans, J.S., Baker, S.M., and Baker, P. Gametogenesis in the non-native green mussel, *Perna viridis*, and the native scorched mussel, *Brachidontes exustus,* in Tampa bay, Florida. Journal of Shellfish Research. 24: 1087–1095.

Barnes, D.K., Galgani, F., Thompson, R.C., and Barlaz, M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philosophical Transaction of the Royal Society. 364: 1985–1998.

Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T.S., and Thompson, R. 2011. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: Sources and sinks. Environmental Science & Technology. 45: 9175–9179.

Browne, M.A., Galloway, T.S., and Thompson, R.C. 2010. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. Environmental Science & Technology. 44: 3404–3409.

Browne, M.A., Niven, S.J., Galloway, T.S., Rowland, S.J., and Thompson, R.C. 2013. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. Current Biology. 23: 2388–2392.

Chinfak, N., Sompongchaiyakul, P., Charoenpong, C., Shi, H., Yeemin, T. and Zhang, J. 2021. Abundance, composition, and fate of microplastics in water, sediment, and shellfish in the Tapi-Phumduang River system and Bandon Bay, Thailand. Science of The Total Environment. 781: 146700.

Coffin, S., Lee, I., Gan, J., and Schlenk, D., 2019. Simulated digestion of polystyrene foam enhances desorption of diethylhexyl phthalate (DEHP) and *in vitro* estrogenic activity in a size-dependent manner. Environmental Pollution. 246: 452–462.

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., and Galloway, S.T. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. Marine Pollution Bulletin. 62: 2588–2597.

Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., and Halsband, C. 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. Environment Science & Technology. 47: 6646–6655.

Cole, M. and Galloway, T.S. 2015. Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. Environmental Science & Technology. 24: 14625–14632.

Costa, F.M., Sul, J., Da Silva, J., Araújo, M., Spengler, A., and Tourinho, P. 2010. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: A snapshot of a Brazilian beach. Environmental Monitoring and Assessment. 168: 299–304.

Cozar, A., Echevarria, F., Gonzalez-Gordillo, J.I., Irigoien, X., Ubeda, B., Hernandez-Leon, S., Palma, A.T., Navarro, S., Garcia-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernandez-de-Puellesand M.L. and Duarte, C.M. 2014. Plastic debris in the open ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 111: 10239–10244.

Devriese, L.I., van der Meulen, M.D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., Frère, L., Robbens, J. and Vethaak, A.D. 2015. Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. Marine Pollution Bulletin. 98: 179–187.

Eriksen, M., Lebreton, L.C.M., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borerro, J.C., Galgani, F., Ryan, P.G., and Reisser, J. 2014. Plastic pollution in the world's oceans: More than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. PLOS ONE. 9: e111913.

Fendall, L.S. and Sewell, M.A. 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. Marine Pollution Bulletin. 58: 1225–1228.

Field, I.A. 1911. The food value of sea mussels. Bulletin of the United States Bureau of Fisheries. 29:85–128.

Garside, M. 2019. Plastics Industry - Statistics & Facts [Online]. Available from: https://www.statista.com/topics/5266/plastics-industry/ [7 March 2020]

Geyer, R., Jambeck, J. R., and Law, K. L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. Science Advances, 3: 1–5.

Gregory, M.R. 1996. Plastic 'scrubbers' in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified. Marine Pollution Bulletin. 32: 867–871.

González-Pleiter, M., Tamayo-Belda, M., Pulido-Reyes, G., Amariei, G., Leganés, F., Rosal, R. and Fernández-Piñas, F. 2019. Secondary nanoplastics released from

a biodegradable microplastic severely impact freshwater environments. Environmental Science: Nano. 6: 1382–1392.

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., and Thiel, M. 2012. Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. Environmental Science & Technology. 46: 3060–3075.

Jambeck, R.J., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., and Law, K.L. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science. 347: 768–771.

Karami, A., Choo, C.K., Golieskardi, A., Ho, Y.B., Romano, N., and Salamatinia, B. 2017. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. Science of the Total Environment. 578: 485–494.

Law K.L. and Thompson, R.C. 2014. Microplastics in the seas. Science. 345: 144–145.

Li, W. C., Tse, H. F., and Fok, L. 2016. Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. Science of the Total Environment, 566: 333–349.

Presnell, J.K. and Schreibman, M.P. 1997. Humanson's Animal Tissue Techniques. 5th ed. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press.

Ritchie, H. 2018. FAQs on Plastics. Our World in Data [Online]. Available from: http://ourworldindata.org/faq-on-plastics#licence [30 July 2021]

Song, Y.K., Eo, S., Hong, S.H., and Shim, W.J. 2018. Micro- and nano-fragmentation of expanded polystyrene exposed to sunlight. Proceedings of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia-Pacific 2018 Conference, pp. 265–267. Republic of Korea.

Sussarellua, R., Suqueta, M., Thomasa, Y., Lamberta, C., Fabiouxa, C., Perneta, M.E.J., Goïca, N.L., Quilliena, V., Minganta, C., Epelboina, Y., Corporeaua, C., Guyomarchb, J., Robbensc, J., Paul-Ponta, I., Soudanta, P., and Huveta, A. 2015. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 113: 201519019.

Sylverter, F., Dorado, J., Boltovskoy, D., Angela, J. and Daniel, C. 2005. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. Hydrobiologia. 534: 71–80.

Thushari, G.G.N., Senevirathna, J.D.M., Yakupitiyage, A. and Chavanich, S. 2017. Effects of microplastics on sessile invertebrates in the eastern coast of Thailand: An approach to coastal zone conservation. Marine Pollution Bulletin. 124: 349–355.

Thompson, R.C. 2015. Microplastics in the marine environment: Sources, consequences and solutions. In: M. Bergmann L. Gutow and M. Klages (Eds.), Marine Anthropogenic Litter, pp 185–200. Berlin: Springer.

Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E.M., Kamermans, P. and Koelmans, A.A. 2012. Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). Environmental Toxicology & Chemistry. 31: 2490–2497.

Winter, J.E. 1973. The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measured by a continuous automatic recording apparatus. Marine Biology. 22: 317–328.

Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., and Galloway, T.S. 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. Current Biology. 23: R1031–R1033.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

การทดลองเบื้องต้น

ในการทดลองเบื้องต้นได้ทดลองเลี้ยงหอยแมลงภู่ความยาว 30 – 40 มิลลิเมตรจำนวน 60 ตัวภายในโหลที่บรรจุน้ำทะเลกรอง 8 ลิตรที่ติดตั้งอุปกรณ์ให้ออกซิเจน และมีการปล่อยน้ำทะเลให้ไหลผ่านภายนอกโหลเพื่อรักษาอุณหภูมิภายในโหล และให้ *Isocrysis* sp. และ *Tetracelmis* sp. เป็นอาหารอย่างละ 300 mL ต่อโหลต่อวัน เปลี่ยนน้ำ 1 ใน 4 น้ำทั้งหมด โดยแบ่ง 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene 20 mg/L

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลอง ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene 200 mg/L

ผลที่ได้พบว่าในระหว่างการเลี้ยงมีตัวอย่างตายเป็นจำนวนมาก โดยในวันที่ 7 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง พบว่ากลุ่มควบคุมมีตัวอย่างที่ตายทั้งหมด 172 ตัวจาก 240 ตัว คิดเป็น 71.67% กลุ่มที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene 20 mg/L มีตัวอย่างที่ตาย 202 ตัวจาก 240 ตัว คิดเป็น 84.16% และกลุ่มที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene 200 mg/L มีตัวอย่างที่ตาย 236 ตัวจาก 240 ตัว คิดเป็น 98.33% ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1-1 และ 1-2 ซึ่งตัวอย่างในทั้ง 3 กลุ่มการทดลองมีอัตราการตายที่สูงมาก คาดว่าเกิดจากความเครียดของตัวอย่างที่ มีหนาแน่นซึ่งไม่สัมพันธ์กับปริมาณน้ำที่ใช้เลี้ยง และการเปลี่ยนน้ำปริมาตรน้อยต่อวัน นอกจากนั้นตัวอย่างยังเกิดความเครียดจากการได้รับไนไตรต์ในน้ำทะเลที่เกิดจากการย่อยสลายของโปรตีนในตัวอย่างที่ตายก่อนหน้า จึงทำให้การตายของตัวอย่างเพิ่มขึ้นมากเรื่อย ๆ ตลอดการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1-1 จำนวนตัวอย่างหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ที่ตายในแต่ละกลุ่มการทดลองระหว่างการทดลองให้ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene เป็นเวลา 1 สัปดาห์ในเดือนกุมภาพันธ์ 2564

วันที่	จำนวนตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่ตาย					
	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง 1		กลุ่มทดลอง 2	
	จำนวน (ตัว)	จำนวนสะสม (ตัว)	จำนวน (ตัว)	จำนวนสะสม (ตัว)	จำนวน (ตัว)	จำนวนสะสม (ตัว)
1	0	0	0	0	0	0
2	4	4	0	0	1	1
3	11	15	37	37	41	42
4	23	38	40	77	112	154
5	44	82	15	92	35	189
6	20	102	31	123	10	199
7	70	172	79	202	37	236

- กลุ่มควบคุม = กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene
- กลุ่มทดลอง 1 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กลุ่มทดลอง 2 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1-2 อัตราการตายของหอยแมลงภู่ *Perna viridis* ในแต่ละกลุ่มการทดลองภายหลังการทดลองให้ไมโครพลาสติกชนิด polystyrene เป็นเวลา 1 สัปดาห์ในเดือนกุมภาพันธ์ 2564

กลุ่มการทดลอง	จำนวนหอยแมลงภู่ตอนเริ่มต้นการทดลอง (ตัว)	จำนวนหอยแมลงภู่ที่ตาย (ตัว)	อัตราการตายของหอยแมลงภู่
กลุ่มควบคุม	240	172	71.67%
กลุ่มทดลอง 1	240	202	84.16%
กลุ่มทดลอง 2	240	236	98.33%

- กลุ่มควบคุม = กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene
- กลุ่มทดลอง 1 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กลุ่มทดลอง 2 = กลุ่มทดลองที่ได้รับไมโครพลาสติกชนิด polystyrene ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองชุดนี้ จึงต้องปรับเปลี่ยนปริมาตรน้ำที่ใช้เลี้ยงหอยแมลงภู่จาก 8 ลิตรเป็น 10 ลิตร และปริมาตรน้ำที่เปลี่ยนต่อวันจาก 1 ใน 4 ของปริมาตรน้ำทั้งหมดเป็นเปลี่ยนน้ำ 1 ใน 2 ของปริมาตรน้ำทั้งหมดทุกวัน