

ผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) ต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบ
(*Saccostrea cucullata*)

สุภัททา เนื้อย่น้ำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม


คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม 2558

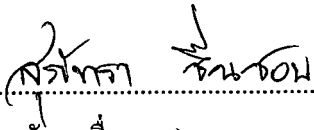
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์
ของ สุภัททา เจื้อยฉ่ำ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

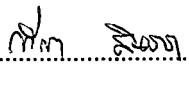
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์



.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร. สุทิน กิ่งทอง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

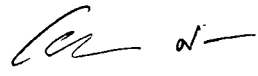

.....ประธาน
(ดร. สุภัทรา ชื่นชอบ)


.....กรรมการ
(ดร. สุทิน กิ่งทอง)


.....กรรมการ
(ดร. กวีญา สินธารา)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนวัฒน์ ตันติวรานุรักษ์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศา
ศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา


.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 14 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2558

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา
จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำภาคปลาย ปีการศึกษา 2557

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาของ ดร. สุทิน กิ่งทอง ที่ได้
สละเวลารับเป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและความรู้ต่าง ๆ ตลอดจนช่วย
ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ให้ถูกต้อง ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความ
ตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สุภัทรา ชื่นชอบ ที่ได้เสียสละเวลาเป็นประธานกรรมการ
สอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. สาลินี ขจรพิสิฐศักดิ์ อาจารย์ ดร. กวีญา ลินธารา และอาจารย์ ผู้ช่วย
ศาสตราจารย์ ดร. ชนวัฒน์ ตันติวรานุรักษ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้คำแนะนำตลอดจน
ตรวจทานข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอขอบพระคุณคุณเกษราภรณ์ จันทร์ประเสริฐ ที่คอยช่วยเหลืออำนวยความสะดวก
ความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์ สถานที่ และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ
คุณจันทนีย์ นพรัตน์อากาศกุล ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมืออัลตราไม
โคร โทมที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณอุษา พ่วงเพชร คุณปรีชา วิบูลย์พันธ์ คุณนันทน์ภัส ช่างพูด คุณชัยยศ
น่วมกลิ่น คุณชนพพล กลิ่นกลบ รวมทั้งน้อง ๆ ที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างงานวิจัยทุกท่าน
ขอบพระคุณ คุณพ่อมนตรี และคุณแม่นิภา เนื่องน้ำ ที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำสั่งสอนและ
สนับสนุนทุนการศึกษาด้วยดีมาโดยตลอด

สุภัททา เนื่องน้ำ

56910065: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ: หอยนางรม/ระบบย่อยอาหาร/แมนเทิล/น้ำมันดิบ/เซลล์สร้างเมือก

สุภัททา เนื่องจำ: ผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) ต่อเนื้อเยื่อหอย

นางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) (EFFECT OF WATER ACCOMMODATED FRACTION (WAF) OF CRUDE OIL ON TISSUE OF OYSTER (*SACCOSTREA CUCULLATA*))

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุทิน กิ่งทอง, Ph.D. 90 หน้า. ปี พ.ศ. 2558.

งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (water accommodated fraction หรือ WAF) โดยการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลันของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำ ต่ออัตราการตายและเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ นำหอยนางรมปากจีบมาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการและทดสอบผลกระทบของ WAF โดยใช้ความเข้มข้น 0, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100% ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ ผลการศึกษาพบว่าไม่พบอัตราการตายของหอยนางรมปากจีบในกลุ่มควบคุม แต่พบอัตราการตายในทุกกลุ่มทดสอบ อย่างไรก็ตามอัตราการตายในกลุ่มทดสอบค่อนข้างต่ำและไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยพบอัตราการตายสูงสุดคือร้อยละ 10 ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100% ที่เวลา 96 ชั่วโมง ผลการทดสอบในระดับเนื้อเยื่อใน 5 อวัยวะ ได้แก่ ภาวะอาหาร เนื้อเยื่อลำไส้ ต่อมย่อยอาหาร แมนเทิล และเหงือก โดยใช้เทคนิคมิชชีวิทยา แสดงให้เห็นว่า WAF ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ ทำให้เกิดลักษณะผิดปกติขึ้นในหลายระบบ โดยผลกระทบต่อเนื้อเยื่อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทดสอบและตามความเข้มข้นของ WAF ที่หอยนางรมปากจีบได้รับ แสดงให้เห็นว่า WAF ทำให้หอยนางรมปากจีบเกิดความเครียดขึ้นในกลุ่มทดสอบ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าหอยนางรมปากจีบมีการตอบสนองต่อ WAF โดยกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวในระดับเซลล์ เช่น การสร้างเมือกเพื่อป้องกันตัวเองจากน้ำมันดิบ การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการอักเสบเกิดขึ้น และยังพบความผิดปกติในต่อมย่อยอาหาร สังเกตได้จากท่อของ digestive diverticulum มีลักษณะเป็นรูกว้างขึ้น แฉกภายในต่อมย่อยอาหารเริ่มหายไป การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า WAF อาจไม่ก่อให้เกิดการตายในประชากรส่วนใหญ่ของหอยนางรมปากจีบ อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนน้ำมันดิบในปริมาณมากส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ และอาจส่งผลกระทบต่อหน้าที่และการทำงานของอวัยวะสำคัญ และในระยะยาวอาจส่งผลกระทบต่อประชากรทั้งในด้านการสืบพันธุ์และการสร้างประชากรรุ่นใหม่อีกด้วย

56910065: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M. Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: OYSTER/ DIGESTIVE GLAND/ MANTLE/ CRUDE OIL/ MUCOUS CELL
SUPATTA CHUEYCHAM: EFFECT OF WATER ACCOMMODATED FRACTION (WAF) OF CRUDE OIL ON TISSUE OF OYSTER (*SACCOSTREA CUCULLATA*) ADVISORY COMMITTEE: SUTIN KINGTONG, Ph.D. 90 P. 2015.

The present study was carried out to investigate sub-acute effect of water accommodated fraction (WAF) of crude oil by using experimental exposure. Oysters were collected, acclimated and exposed to WAF at concentrations of 0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100%, respectively. Mortality and histopathological effect were examined. Mortality rate has shown that none of mortality was found in control. Mortality rates in all WAF treatments. However mortality rates were relatively low in all treatments and were not different ($p>0.05$). The highest mortality rate was 10% which found in 100% WAF treatment at 96 hours of exposure. The histopathological results in 5 organs including stomach, intestine, digestive gland, mantle and gill has revealed that crude oil WAF had effects on oyster tissues. Besides, result has indicated that WAF caused abnormalities in many systems. Severities of the effects were increased by dose- and time-dependent manner of WAF exposure. The results also indicated that WAF induced cellular protective responses of oyster such as mucous cell production and mucous secretion, hemolytic aggregation which indicates inflammation of tissues. In addition, abnormality was found in digestive gland have been observed in the lumen is widened. The results also indicated stress response of oyster to the WAF exposure. Although the results from present study has been shown that mortalities of oyster in WAF was not high, exposure to high concentration of WAF affecting oyster tissues and could consequently affect on function of important tissues. Altogether, these results also indicated that WAF may cause long-term effect to wild population which possibly reduces fitness of the next generation.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
สถานที่ทำการศึกษา.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่	4
เกี่ยวข้อง.....	
ความรู้เกี่ยวกับน้ำมันดิบ.....	4
อุบัติการณ์การรั่วไหลของน้ำมันดิบ.....	8
น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ.....	10
ผลกระทบของน้ำมันดิบต่อสิ่งแวดล้อมทางทะเล.....	13
ชีววิทยาหอยนางรมปากจีบ (<i>Saccostrea cucullata</i>).....	17
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3	25
3	25
การศึกษาผลกระทบระดับเนื้อเยื่อและเซลล์.....	25
วิธีดำเนินการศึกษา.....	25
ตัวอย่างหอยนางรม.....	25
การเตรียมน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ.....	26
การทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ.....	27
การเก็บตัวอย่าง.....	27
การศึกษาด้วยเทคนิคมิชววิทยา.....	27
การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	31
การศึกษาเนื้อเยื่อตัวอย่าง Semi-thin.....	31
การนับจำนวนเซลล์สร้างเมือก.....	33
การทดสอบสถิติ.....	34
4	35
4	35
ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่ออัตราการตาย.....	35
ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อเนื้อเยื่อ.....	41
5	58
5	58
ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่ออัตราการตาย.....	58
ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อเนื้อเยื่อ.....	59
สรุปผลการทดลอง.....	62
ข้อเสนอแนะ.....	62
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	90

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบ.....	7
2-2 ปริมาณไฮโดรคาร์บอนรวมในน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ.....	11
2-3 สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ.....	11
2-4 ระดับการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อสัมผัสกับน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอน.....	15
3-1 คุณลักษณะของน้ำทะเลที่ใช้สำหรับเลี้ยงหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ.....	25
3-2 แสดงการเตรียม WAF ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	26
ก-1 ตารางแสดงอัตราการตายของหอยนางรมปากจیب.....	69
ข-1 ตารางวิเคราะห์สถิติอัตราการตายของหอยนางรมปากจیب.....	71
ค-1 ตารางวิเคราะห์สถิติจำนวนเซลล์สร้างเมือก.....	73

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 พาราฟินในน้ำมันดิบ.....	5
2-2 แนฟทีนในน้ำมันดิบ.....	6
2-3 เบนซีนและอนุพันธ์ของเบนซีน.....	7
2-4 โครงสร้างโมเลกุลของอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....	7
2-5 แสดงอัลคีนที่พบในน้ำมัน.....	8
2-6 กลไกการได้รับสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตในน้ำ.....	14
2-7 โครงสร้างภายในของหอยนางรม.....	18
2-8 สัณฐานวิทยาของเปลือก และกายวิภาคของอวัยวะภายในของหอยนางรมปากจیب.....	19
2-9 ภาพตัดตามขวางของเหงือกและแมนเทิลของหอยนางรม.....	21
2-10 การวัดสเกลสำหรับการนับจำนวนเซลล์สร้างเมือกในเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจیب.....	34
4-1 อัตราการตายของหอยนางรมปากจیب.....	35
4-2 ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจیب.....	38
4-3 ลักษณะเนื้อเยื่อลำไส้ของหอยนางรมปากจیب.....	39
4-4 ลักษณะเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจیب.....	39
4-5 ลักษณะเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب.....	40
4-6 ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจیب.....	40
4-7 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจیب ที่ 24 ชั่วโมง.....	44
4-8 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจیب ที่ 96 ชั่วโมง.....	45
4-9 ผล Semi-thin section ของ WAF ต่อเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจیب.....	46
4-10 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อลำไส้ของหอยนางรมปากจیب ที่ 24 ชั่วโมง.....	47
4-11 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อลำไส้ของหอยนางรมปากจیب ที่ 96 ชั่วโมง.....	48
4-12 ผลของ WAF ต่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจیب ที่ 24 ชั่วโมง.....	49
4-13 ผลของ WAF ต่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจیب ที่ 96 ชั่วโมง.....	50
4-14 ผล Semi-thin section ของ WAF ต่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจیب.....	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-15 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเมานเทิลของหอยนางรมปากจیب ที่ 24 ชั่วโมง.....	52
4-16 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเมานเทิลของหอยนางรมปากจیب ที่ 96 ชั่วโมง.....	53
4-17 ผล Semi-thin section ของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเมานเทิลของหอยนางรมปากจیب.....	54
4-18 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจیب ที่ 24 ชั่วโมง.....	55
4-19 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจیب ที่ 96 ชั่วโมง.....	56
4-20 ผล Semi-thin section ของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจیب.....	57
จ-1 การเลี้ยงหอยนางรมปากจیب เพื่อการทดสอบผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) ในห้องปฏิบัติการ.....	79
จ-2 การเตรียมน้ำมันดิบส่วนที่ละลาย (Water Accomodated Fraction หรือ WAF).....	80
จ-3 ตัวอย่างการเตรียมนเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาด้วยวิธีมิถุวิทยา (Histology).....	81

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำมันเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในการพัฒนาและการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศ ถูกนำมาใช้เพื่อตอบสนองความต้องการในการใช้พลังงานที่เพิ่มขึ้นของมนุษย์ ในการนำน้ำมันดิบขึ้นมาใช้ ตั้งแต่กระบวนการขุดเจาะน้ำมัน ขั้นตอนการกลั่นตลอดจนถึงขั้นตอนการขนส่งที่อาจก่อให้เกิดการรั่วไหลลงสู่ทะเล ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ และเนื่องจากน้ำมันดิบมีการย่อยสลายทางกายภาพเป็นไปอย่างช้า จึงส่งผลให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อมและกลายเป็นแหล่งมลพิษ อันก่อให้เกิดผลกระทบต่อโครงสร้างประชากรของสิ่งมีชีวิตทางทะเล และสามารถถ่ายทอดความเป็นพิษไปตามห่วงโซ่อาหาร (food chain) และตามวิถีการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทางทะเล โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์ที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลง และเนื่องจากน้ำมันดิบมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีความเป็นพิษสูง คุณสมบัติของน้ำมันดิบที่ไม่ละลายในน้ำและมีความหนาแน่นต่ำกว่าจึงลอยอยู่บนผิวน้ำ ทำให้สัตว์ที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นและน้ำลงมีโอกาสสัมผัสกับน้ำมันและสารที่อยู่ในน้ำมันได้ ดังนั้นหากสิ่งแวดล้อมเกิดการเปลี่ยนแปลงย่อมต้องส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น ๆ ด้วยเช่นกัน สารพิษที่อยู่ในน้ำมันอาจเกิดการระเหยอย่างรวดเร็ว ดังนั้นพืช สัตว์ และมนุษย์ที่อยู่ในพื้นที่มีน้ำมันรั่วไหลอาจมีโอกาสได้รับสารพิษเหล่านี้ คราบน้ำมันยังบดบังมิให้แสงแดดส่องลงไปในน้ำ ขัดขวางการสังเคราะห์ด้วยแสงของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น แนวปะการัง หญ้าทะเล สาหร่าย และแพลงก์ตอน เป็นต้น คราบน้ำมันที่เคลือบติดอยู่กับรากของไม้ชายเลนนั้นยังทำให้ต้นไม้ดังกล่าว เจริญเติบโตได้ช้าและตายได้ (การปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย, 2541)

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันมีคุณสมบัติในการละลายน้ำแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสมบัติความมีขั้วของโมเลกุล เมื่อเกิดเหตุการณ์รั่วไหลของน้ำมันดิบลงสู่ทะเล น้ำมันดิบจะมีพฤติกรรมแพร่กระจายในน้ำทะเล ได้หลายแบบโดยอาศัยคลื่นและลมเป็นตัวช่วยกระจาย สารประกอบไฮโดรคาร์บอนบางชนิดจะระเหยเป็นไอออกสู่บรรยากาศ บางส่วนเกิดเป็นตะกอนลงสู่ท้องน้ำ บางส่วนหากซัดเข้าสู่ฝั่งจะปนเปื้อนพื้นที่ชายฝั่ง และบางส่วนจะละลายไปกับน้ำทะเลและยังคงหมุนเวียนอยู่ในระบบนิเวศน์ เราเรียกน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำนี้ว่า water accommodated fraction หรือ WAF (Anderson et al., 1974; Nwadukwe et al., 2006) โดยจะเข้าไป

สะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตในทะเล ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อม จะเห็นได้ว่าไม่มีสิ่งมีชีวิตชนิดใดสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้โดยลำพังโดยไม่ต้องพึ่งพาระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อม

ที่ผ่านมามีการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของน้ำมันดิบต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลมีอยู่น้อยมาก การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาผลกระทบของ WAF ห้องปฏิบัติการ การศึกษาในปลาพบว่า WAF ส่งผลกระทบต่ออัตราการตายเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสัมผัส WAF อีกทั้งยังส่งผลกระทบในระดับเนื้อเยื่อ เช่น ในเนื้อเยื่อเหงือกเกิดการตายของเซลล์ พบเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้น รวมถึงพบการแทรกตัวของเม็ดเลือด (hemocyte infiltration) บริเวณเยื่อบุผิวอีกด้วย (Agamy, 2103)

ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ยึดเกาะอยู่กับที่ (sessile) จึงเหมาะสมต่อการนำมาเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพที่ดี เนื่องจากมีถิ่นอาศัยกว้างขวาง เกาะนิ่งไม่เคลื่อนที่ ทำให้เก็บตัวอย่างได้ง่าย และมีความสามารถในการสะสมสารต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อได้ดี (Goldberg, 1986) ซึ่งจะนำมาใช้ในการประเมินถึงผลกระทบที่เกิดจากการปนเปื้อนของน้ำมันดิบในแหล่งน้ำ และสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการป้องกันและแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของน้ำมันดิบต่อสิ่งมีชีวิตทางทะเลต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ ต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจیب
2. เพื่อศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ ต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیب

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้นสูง จะพบอัตราการตายของหอยนางรมปากจیبมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ
2. น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้นสูง จะส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیب มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบถึงอัตราการตายและการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจیبที่ได้รับการปนเปื้อนของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ

2. เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการติดตามและตรวจสอบมลภาวะทางทะเล อันเนื่องมาจากผลกระทบที่เกิดจากการปนเปื้อนของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ โดยใช้หอยนางรมปากจیبเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ ที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต โดยศึกษาในหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) พบว่าการศึกษาผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำในหอยนางรมปากจیبยังไม่มีรายงานไว้ ทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษา โดยสุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมตัวเต็มวัย จากพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรมจากตำบลบางทราย อำเภอมะนัง จังหวัดชลบุรี ทำการศึกษาผลกระทบของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیبที่ได้รับสัมผัสกับน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นจึงนำมาศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคพยาธิวิทยา (histological technique)

1.6 สถานที่ทำการศึกษา

1. โรงเพาะเลี้ยงวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2. ห้องปฏิบัติการ 2110 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
3. ศูนย์ปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน อาคารเวชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้เกี่ยวกับน้ำมันดิบ

น้ำมันดิบ (crude oil) คือสารประกอบของไฮโดรคาร์บอนกับสารเคมีอื่น ๆ จำนวนเล็กน้อย เช่น สารประกอบซัลเฟอร์ ไนโตรเจน และออกซิเจน โดยการที่จะนำสารต่าง ๆ เหล่านี้ไปใช้ได้ พวกมันจะต้องถูกแยกออกจากกันเสียก่อน กระบวนการแยกเรียกว่าการกลั่น (refining) น้ำมันดิบที่แตกต่างกันในแต่ละที่ของโลก หรือแม้แต่ความลึกที่แตกต่างกันของน้ำมันหลุมเดียวกันเองก็ยังคงบรรจุสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสารประกอบอื่น ๆ ที่แตกต่างกัน

ปิโตรเลียม เป็นทรัพยากรพลังงานที่สำคัญ และสร้างความเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจให้แก่โลกตลอดช่วงศตวรรษที่ผ่านมา มีการใช้ปิโตรเลียมเป็นเชื้อเพลิงพื้นฐานการผลิตในระบบอุตสาหกรรมต่าง ๆ นอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมและเคมีภัณฑ์หลายชนิด มนุษย์ใช้ก๊าซธรรมชาติ และน้ำมันเป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้า และได้รับประโยชน์ความสะดวกสบายมากมายจากไฟฟ้าที่ผลิตได้ ในกระบวนการแยกก๊าซธรรมชาติ เราจะได้ก๊าซหุงต้ม คาร์บอน ไดออกไซด์ มีเทน อีเทน และบิวเทน ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิต ผลิตภัณฑ์พลาสติกหลายประเภท ปัจจุบันพลาสติกเป็นที่นิยมใช้แพร่หลายในกิจกรรมหลายด้าน ผลจากการกลั่นน้ำมันดิบ เราจะได้ น้ำมันเบนซิน ดีเซล น้ำมันก๊าด น้ำมันเตา ก๊าซหุงต้ม ฯลฯ เราใช้เชื้อเพลิงเหล่านี้สำหรับเครื่องยนต์ เครื่องอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในชีวิตประจำวัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2544)

พบว่าในปัจจุบันนี้น้ำมันดิบถูกนำมาใช้ในปริมาณที่มาก เพื่อตอบสนองความต้องการทางด้านพลังงานที่เพิ่มขึ้นของมนุษย์ กระบวนการต่าง ๆ ในการนำน้ำมันดิบขึ้นมาใช้ ตั้งแต่ขั้นตอนการขุดเจาะไปจนถึงขั้นตอนการกลั่นไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมากโดยหลีกเลี่ยงไม่ได้ เนื่องจากน้ำมันดิบเป็นสารผสมที่สลับซับซ้อน องค์ประกอบส่วนใหญ่ ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนประเภทต่าง ๆ ตั้งแต่โมเลกุลขนาดเล็กที่สุด จนถึงโมเลกุลขนาดใหญ่ นอกจากนี้ น้ำมันดิบยังประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ที่มี กำมะถัน ออกซิเจน และไนโตรเจน เป็นองค์ประกอบ และอาจพบว่ามีก๊าซและสารประกอบของโลหะบางชนิดปะปนอยู่ด้วยในปริมาณที่น้อย ดังตารางที่ 2-1 น้ำมันดิบจะมีลักษณะและคุณสมบัติแตกต่างกันออกไปตามแหล่งที่มา ซึ่งจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งในการกำหนดคุณค่าของน้ำมันดิบ การกำหนดวิธีการและขั้นตอนการผลิตที่เหมาะสมในการกลั่นน้ำมันดิบด้วยกรรมวิธีที่ต่างกันออกไป จะสามารถแยกสารออกมาได้

ต่างกันออกไปด้วย โดยสามารถแบ่งประเภทของน้ำมันดิบอย่างหยาบได้ 3 ประเภท ดังต่อไปนี้
(เชิดวงศ์ แสงสุภวานิช, 2557)

ตารางที่ 2-1 ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบ

แร่ธาตุ (Element)	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Weight percentage)
คาร์บอน	83.0 - 87.0
ไฮโดรคาร์บอน	10.0 - 14.0
ไนโตรเจน	0.1 - 2.0
ออกซิเจน	0.05 - 1.5
ซัลเฟอร์	0.05 - 2.0

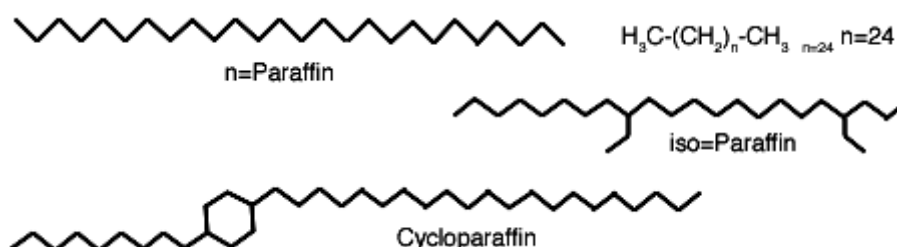
(ที่มา: Kinghorn, 1983)

2.1.1 สารประกอบไฮโดรคาร์บอน

น้ำมันดิบมีไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารประกอบระหว่างคาร์บอนกับไฮโดรเจนอยู่เป็นส่วนใหญ่ ไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันดิบทุกชนิด มีอยู่ 4 ประเภท คือ

1. พาราฟิน (paraffin)

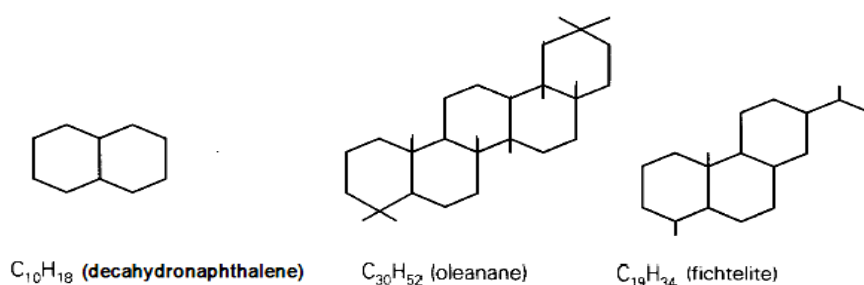
พาราฟิน เป็นสารพวกไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัวประเภทอัลเคน (alkanes) เป็นโครงสร้างของคาร์บอนที่เชื่อมต่อกันเป็นโซ่ตรง (n-alkanes) หรือโซ่กิ่ง (branched chain หรือ isoalkanes) และโครงสร้างที่ง่ายที่สุดจะเป็นโซ่ของคาร์บอนอะตอมติดกันโดยไม่มีโซ่กิ่ง สารประกอบเหล่านี้มีสูตรทั่วไป C_nH_{2n+2} ดังนี้



ภาพที่ 2-1 พาราฟินในน้ำมันดิบ (กฤตินี กาญจนานา, 2539)

2. แนฟทีน (naphthenes หรือ cycloalkanes หรือ cycloparaffins)

แนฟทีน เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว (saturated hydrocarbons) ที่ประกอบด้วยวงไซโคลอัลเคน (cycloalkane) พันระระหว่างอะตอมคาร์บอนยึดเหนี่ยวด้วยพันธะเดี่ยว มีสูตรโมเลกุลคือ C_nH_{2n} โดยประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอมขึ้นไป สารประกอบที่มีวงไซโคลอัลเคน 5-6 วง ส่วนใหญ่จะพบได้ในน้ำมันดิบ ซึ่งแนฟทีนที่พบในน้ำมันดิบส่วนใหญ่จะมีหมู่แอลคิลต่ออยู่ (alkyl side chain)



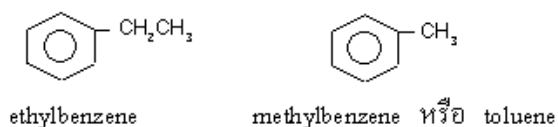
ภาพที่ 2-2 แนฟทีนในน้ำมันดิบ (กฤตินี กาญจนภา, 2539)

3. อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon)

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่คาร์บอนต่อกันเป็นวง พันระระหว่างคาร์บอนอะตอมที่ต่อกันเป็นวง มีความยาวพันธะอยู่ระหว่างพันธะเดี่ยวกับพันธะคู่และมีความยาวพันธะเท่ากัน เนื่องจากเบนซีนเป็นอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดเล็กที่สุด ดังนั้น อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ ก็จะเป็นอนุพันธ์เบนซีน อนุพันธ์ของเบนซีน (เฉพาะไฮโดรคาร์บอน) เกิดจากหมู่แอลคิล (C_nH_{2n+1}) เข้าแทนที่ไฮโดรเจนในโมเลกุลของเบนซีนหรือมีวงแหวนของคาร์บอนอีก 1 วงหรือมากกว่ามาเชื่อมติดกับเบนซีน

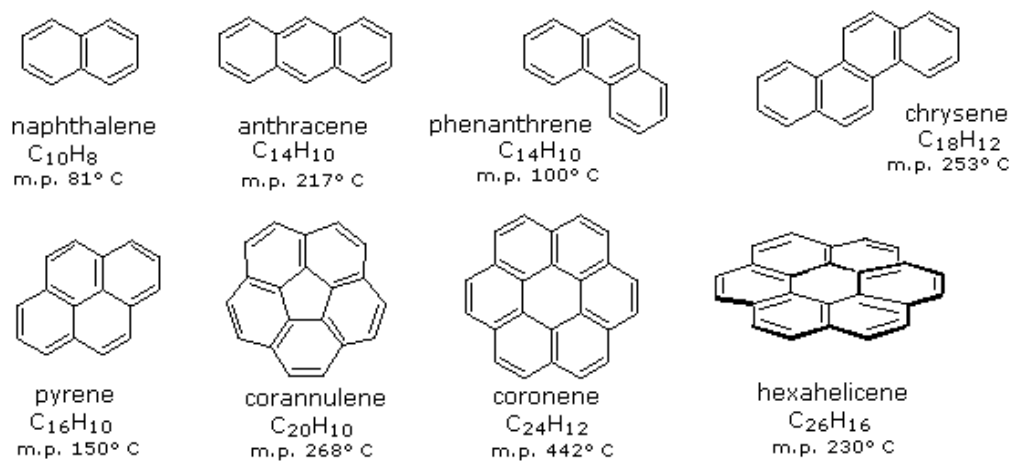
อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

3.1 เบนซีนและอนุพันธ์ของเบนซีน เบนซีนคือสารที่มีสูตร C_6H_6 และมีโครงสร้างของคาร์บอนต่อกันเป็นวง ส่วนอนุพันธ์ของเบนซีน คือ เบนซีนที่มีธาตุหรือหมู่ธาตุเข้ามาแทนที่พันธะไฮโดรเจนในวงเบนซีน



ภาพที่ 2-3 เบนซีนและอนุพันธ์ของเบนซีน (Periago & Prado, 2005)

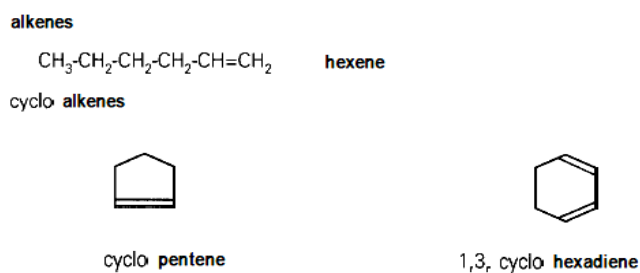
3.2 อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีวงของคาร์บอนมาเชื่อมกับวงเบนซีน ตั้งแต่ 2 วง ขึ้นไป เช่น



ภาพที่ 2-4 โครงสร้างโมเลกุลของอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Silberberg, 2004)

3.3 ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated hydrocarbon)

ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่อิ่มตัว คือไฮโดรคาร์บอนหลาย ๆ ตัวมาต่อกันเป็นลำดับ ได้แก่ โอลิฟิน (olefins, C_nH_{2n}) และอัลไคน์ (C_nH_{2n-2}) โอลิฟิน พบค่อนข้างน้อยในน้ำมันดิบ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยากับพันธะที่ไม่อิ่มตัว



ภาพที่ 2-5 แสดงอัลคีนที่พบในน้ำมัน (กฤตินี กาญจนภา, 2539)

สารที่ไม่ใช่ไฮโดรคาร์บอน (non-hydrocarbons)

สารประเภทต่าง ๆ ที่ไม่ใช่กลุ่มไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบ ได้แก่

4.1 สารประกอบของซัลเฟอร์ เช่น cyclic sulfides และ thiophenes

4.2 สารประกอบของไนโตรเจน

4.3 สารประกอบของออกซิเจน โดยส่วนใหญ่คือกรดเนฟทีนิก (naphthenic acid) และฟี

นอล

4.4 สารประกอบพวกโลหะอินทรีย์ (organometallic compound) ซึ่งพบในปริมาณที่น้อยมาก ได้แก่ วานาเดียม และนิกเกิล

4.5 พอร์ไฟรินส์ (porphyrins)

4.6 สารแอสฟัลต์และเรซิน อยู่ในรูปของสารแขวนลอย ซึ่งจะไหลมารวมตัวกัน และเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุดในน้ำมันดิบ

สารประกอบ 3 ประเภทแรก ได้แก่ สารประกอบของซัลเฟอร์ สารประกอบของไนโตรเจนและสารประกอบของออกซิเจน จะมีการกระจายตัวตามช่วงของจุดเดือดของน้ำมันดิบ แต่โดยมากจะหนาแน่นในช่วงที่มีจุดเดือดสูง ส่วนสารประกอบ 3 ประเภทหลัง ได้แก่ สารประกอบพวกโลหะอินทรีย์ พอร์ไฟรินส์และสารแอสฟัลต์และเรซิน จะพบอยู่ในส่วนที่หลงเหลืออยู่ สารประกอบพวกโลหะอินทรีย์ วานาเดียมและนิกเกิล จะพบเล็กน้อยในสารช่วงจุดเดือดของน้ำมันหล่อลื่นหรือสูงกว่านั้น (กรมควบคุมมลพิษ, 2544)

2.2 อุบัติการณ์การรั่วไหลของน้ำมันดิบ

อุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมันดิบสามารถพบได้ทั่วไปตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และพบได้ในทุกภูมิภาคของโลก เหตุการณ์การรั่วไหลของน้ำมันดิบสามารถพบได้ เช่น ในปี ค.ศ. 2002 บริเวณอ่าวเม็กซิโก ได้เกิดการระเบิดของแท่นขุดเจาะน้ำมันในทะเลของบริษัทบริติชปิโตรเลียม ซึ่ง

จากเหตุการณ์นี้ทำให้มีน้ำมันรั่วไหลออกมาสู่ทะเลมากถึง 780 ล้านลิตร และกระจายออกไปเป็นบริเวณกว้างถึง 40 ไมล์จากจุดเกิดเหตุ จากเหตุการณ์ครั้งนี้ส่งผลต่อระบบนิเวศและสัตว์ทะเลโดยทำให้สัตว์ทะเลโดยเฉพาะนกมีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น ส่วนเต่าและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีอัตราการตายค่อย ๆ ลดลง (Antonio et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีผลต่อสุขภาพของหอยนางรมในบริเวณกาลิเซียด้วย (Marigomez et al., 2006) และ ในปี ค.ศ. 2007 ได้เกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วจากเรือบรรทุกน้ำมันเหอเปยสปีริต ในบริเวณชายฝั่งของเกาหลีและหลังจากน้ำมันรั่วได้มีการนำปลา rockfish (*Sebastes schlegeli*) มาทดสอบการกำจัดสารพิษของตับและระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าปลาในระบบภูมิคุ้มกันลดลง ซึ่งส่งผลให้ปลามีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายขึ้น (Kim et al., 2013)

สำหรับเหตุการณ์การรั่วไหลของน้ำมันในประเทศไทยครั้งสำคัญ เกิดขึ้นเมื่อเวลาประมาณ 6.50 นาฬิกา ของวันเสาร์ ที่ 27 กรกฎาคม พ.ศ. 2556 ขณะที่เรือบรรทุกน้ำมัน Malan Plato สัญชาติกรีซ กำลังถ่ายน้ำมันดิบผ่านทุ่น้ำมันดิบมายังโรงกลั่นน้ำมันของบริษัทพีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด (มหาชน) ได้เกิดเหตุที่รับน้ำมันดิบขนาด 16 นิ้ว รั่วที่บริเวณทุ่น้ำมันดิบ (single point mooring) ที่อยู่ห่างจากชายฝั่งท่าเรือมาบตาพุดไปทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ 20 กิโลเมตร ทำให้มีน้ำมันดิบรั่วออกมาประมาณ 50,000 ลิตร แม้จะมีความพยายามจากบริษัทพีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด (มหาชน) และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ เพื่อจำกัดและสลายน้ำมันดิบที่ปนพ่นขยายจัดคราบน้ำมัน ควบคู่กับการใช้เรือพ่นยา แต่ก็ไม่สามารถจำกัดบริเวณให้น้ำมันอยู่ในจุดที่ควบคุมได้ ในที่สุดเวลา 21.00 นาฬิกา ของวันที่ 29 กรกฎาคม ก็เกิดเหตุการณ์พบคราบน้ำมันดิบจำนวนมากถูกคลื่นลมซัดแพร่กระจายไหลลงสู่อ่าวพร้าว เกาะเสม็ด และส่งผลให้เกิดการตกค้างอยู่ในระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อม การรั่วไหลของน้ำมันดิบส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก จำเป็นต้องมีการติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำทะเล รวมถึงบริเวณชายฝั่งและผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทางทะเลอย่างต่อเนื่อง คราบน้ำมันที่อยู่ในระยะผิวน้ำ โอกาสที่จะไปตกค้างในห่วงโซ่อาหารที่เรากินอาจมีน้อย แต่หากสารพิษจากน้ำมันดิบเกิดการละลายในน้ำ (water accommodated fraction) โอกาสที่สัตว์เหล่านั้นจะสะสมความเป็นพิษในตัวเองจะมีเยอะ แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับปริมาณการสะสมของสารพิษด้วยเช่นกัน

ในสภาพแวดล้อมจริง มีแนวโน้มที่น้ำมันดิบจะส่งผลกระทบต่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต เช่น หอยนางรม ซึ่งเป็นสัตว์เกาะติดอาศัยตามซอกหินในระบบนิเวศหาดหิน (rocky shore) เป็นพื้นที่รอยต่อบนบกและในน้ำทะเล ถือเป็นแหล่งอาหารและความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศ อันเป็นแหล่งซึ่งให้พลังงาน ให้อาหาร มีการกินต่อ จึงเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารเคมีในสิ่งมีชีวิต สะสมในห่วงโซ่อาหาร เนื่องจากในธรรมชาตินั้นสิ่งมีชีวิตมีกลไกในการกำจัดสารพิษ จึง

จำเป็นต้องมีการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยจำลองสภาวะที่เกิดการปนเปื้อนของน้ำมันดิบในสิ่งแวดล้อมจริงและมีการเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีมีการปนเปื้อนของน้ำมันดิบ

การย่อยสลายของน้ำมันยังทำให้พื้นที่บริเวณนั้นเกิดภาวะเน่าเสีย เนื่องจากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการย่อยสลาย (biodegradation) คราบน้ำมันที่ปนเปื้อนบริเวณชายฝั่งยังเป็นตัวทำลายพื้นที่ที่อยู่อาศัยและขยายพันธุ์ของสัตว์ต่าง ๆ เช่น พื้นที่วางไข่ของเต่าทะเล นกทะเล เป็นต้น สัตว์ทะเลบางชนิดอาจเกิดการสะสมพิษเนื่องจากการปนเปื้อนในแหล่งที่อยู่อาศัยของมัน รวมถึงการสะสมพิษผ่านระบบสายใยอาหารด้วย คราบน้ำมันที่เปื้อนบนตัวของสัตว์ อาจทำให้ความสามารถในการดำรงชีวิตสูญเสียไป คราบน้ำมันยังส่งผลกระทบต่อการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น คราบน้ำมันที่ติดไปกับขนนกหรือคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนบริเวณชายหาดที่มีนกหรือสัตว์ชนิดอื่น ๆ มาวางไข่ คราบน้ำมันจะเคลือบรูพรุนบริเวณผิวไข่ ทำให้ไข่ไม่สามารถแลกเปลี่ยนก๊าซ (gas exchange) ได้ และส่งผลกระทบต่อการพัฒนาของตัวอ่อน (embryo development) ทำให้อัตราการฟักไข่เกิดขึ้นน้อยลง เป็นต้น (กรมควบคุมมลพิษ, 2545)

สารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เป็นสารประกอบหลักในน้ำมันดิบและผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม สามารถสะสมในเนื้อเยื่อของสัตว์ (marine organism) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่กินอาหารด้วยการกรอง (filter feeders) เช่น หอยสองฝา ครัสเตเชียน ปลา ปู ฟองน้ำ เป็นต้น (Kingston, 2002)

2.3 น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (Water accommodated fraction หรือ WAF)

เมื่อเกิดอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมันดิบลงสู่ทะเล สารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบนั้น ๆ จะมีพฤติกรรมในการปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารที่เป็นองค์ประกอบ โดยอาศัยคลื่นและลมเป็นตัวช่วย น้ำมันแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโครงสร้าง โมเลกุล และธาตุอื่น ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำมัน เมื่อน้ำมันดิบละลายไปกับน้ำทะเล สารพิษบางส่วนในน้ำมันดิบจะระเหยเป็นไอออกสู่บรรยากาศ สารพิษที่เหลือจะละลายไปกับน้ำทะเลและยังคงหมุนเวียนอยู่ในระบบนิเวศน์ เราเรียกน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำนี้ว่า water accommodated fraction หรือ WAF (Anderson et al., 1974; Nwadukwe et al., 2006)

Anderson et al. (1974) ทำการทดสอบหาองค์ประกอบของ WAF โดยนำน้ำมันดิบผสมลงในน้ำทะเลในอัตรา 1:10 กวนให้เข้ากันด้วยเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 20 ± 2 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาน้ำมันดิบจาก 4 แหล่ง ได้แก่ น้ำมันดิบ South Louisiana น้ำมันดิบ Kuwait น้ำมันดิบเตาชนิดที่ 1 และน้ำมันเตาชนิดที่ 2 เพื่อหาปริมาณไฮโดรคาร์บอนรวม (total hydrocarbon)

ได้ผลการทดลองออกมาดังแสดงในตารางที่ 2-2 จากนั้นทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารใน WAF ด้วยเทคนิค gas chromatography ได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-2 ปริมาณไฮโดรคาร์บอนรวมในน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ 4 ชนิด

ชนิดน้ำมัน	ปริมาณไฮโดรคาร์บอนรวม (ppm)
น้ำมันดิบ South Louisiana	19.8
น้ำมันเตาชนิดที่ 1	6.3
น้ำมันเตาชนิดที่ 2	8.7
น้ำมันดิบ Kuwait	10.4

(ที่มา : Anderson et al., 1974)

ตารางที่ 2-3 สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ 4 ชนิด

สารประกอบ	น้ำมันดิบ	น้ำมันดิบ	น้ำมันเตา	น้ำมันเตา
	South Louisiana (ppm)	Kuwait (ppm)	ชนิดที่ 1 (ppm)	ชนิดที่ 2 (ppm)
Alkanes				
Ethane	0.54	0.23	0.39	0.05
Propane	3.01	3.30	0.39	0.05
Butane	2.36	3.66	0.39	0.05
Isobutane	1.69	0.90	0.39	0.05
Pentane	0.49	1.31	0.39	0.05
Isopentane	0.70	0.98	0.39	0.05
Cyclopentane + 2-methylpentane	0.38	0.59	0.02	0.005
Methylcyclopentane	0.23	0.19	0.019	0.004
Hexane	0.09	0.29	0.014	0.004
Methyl cyclohexane	0.22	0.08	0.03	0.002
C ₁₆ n-paraffin	0.012	0.0006	0.008	0.0012

ตารางที่ 2-3 (ต่อ)

สารประกอบ	น้ำมันดิบ South Louisiana (ppm)	น้ำมันดิบ Kuwait (ppm)	น้ำมันเตา ชนิดที่ 1 (ppm)	น้ำมันเตา ชนิดที่ 2 (ppm)
C ₁₇ n-paraffin	0.009	0.0008	0.006	0.0019
Total C ₁₂ -C ₂₄ n-paraffins	0.089	0.004	0.047	0.012
Aromatics				
Benzene	6.75	3.36	0.55	0.04
Toluene	4.13	3.62	1.04	0.08
Ethylbenzene, p-xylene, m- xylene	1.56	1.58	0.95	0.09
o-xylene	0.40	0.67	0.32	0.03
Trimethylbenzene	0.76	0.73	0.97	0.11
Naphthalene	0.12	0.02	0.84	0.21
1-Methylnaphthalene	0.06	0.02	0.34	0.19
2-Methylnaphthalene	0.05	0.008	0.48	0.20
Dimethylnaphthalenes	0.06	0.02	0.24	0.20
Trimethylnaphthalenes	0.008	0.003	0.03	0.10
Biphenyl	0.001	0.001	0.011	0.001
Methylbiphenyls	0.001	0.001	0.014	0.001
Dimethylbiphenyls	0.001	0.001	0.003	0.001
Fluorene	0.001	0.001	0.009	0.005
Methylfluorenes	0.001	0.001	0.009	0.004
Dimethylfluorenes	0.001	0.001	0.002	0.002
Dibenzothiophene	0.001	0.001	0.004	0.001
Phenanthrene	0.001	0.001	0.010	0.009
Methylphenanthrenes	0.001	0.001	0.007	0.011

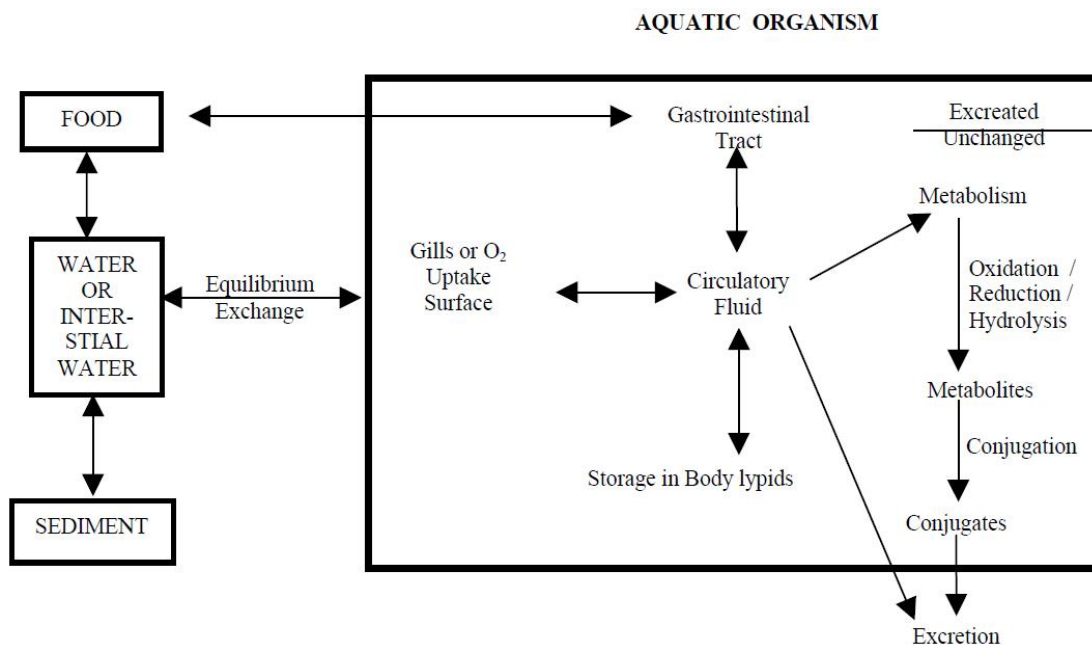
ตารางที่ 2-3 (ต่อ)

สารประกอบ	น้ำมันดิบ South Louisiana (ppm)	น้ำมันดิบ Kuwait (ppm)	น้ำมันเตา ชนิดที่ 1 (ppm)	น้ำมันเตา ชนิดที่ 2 (ppm)
Dimethylphenanthrenes	0.001	0.001	0.003	0.003
Total saturated	9.89	11.62	0.54	0.081
Total aromatics	13.90	10.03	5.74	1.28
Total dissolved hydrocarbons	23.76	21.65	5.28	1.36

(ที่มา : Anderson et al., 1974)

2.3 ผลของน้ำมันดิบต่อสิ่งแวดล้อมทางทะเล

น้ำมันดิบจะมีไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่ ซึ่งไฮโดรคาร์บอนในน้ำ อาจจะเป็นประเภทอะลิฟาติก (aliphatic) ไซโคลอะลิฟาติก (cycloaliphatic) หรืออะโรมาติก (aromatic) สิ่งมีชีวิตจะรับเอาสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้เข้าไปสะสมในตัวของมัน ซึ่งมีการถ่ายทอดไปตามสายใยอาหารต่อไป การรับเอาสารเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตนี้อาจผ่านกระบวนการดูดซึมผ่านผนังเซลล์หรือการกรองกินอนุภาคแขวนลอยที่มีไฮโดรคาร์บอนถูกดูดซับอยู่ หรือผ่านทางกรดกินหรือกินน้ำที่มีไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อนเข้าไปโดยตรง (สมควร ไช้แก้ว, 2545) กลไกในการรับสารไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิตแสดงในภาพที่ 2-6



ภาพที่ 2-6 กลไกการได้รับสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตในน้ำ

(Chaisuksant et al., 1997)

Chaisuksant et al. (1997) ได้แบ่งผลกระทบที่เกิดขึ้นออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. ผลที่เกิดจากการที่สิ่งมีชีวิตได้รับหรือสัมผัสกับน้ำมันตามลำตัว
2. ผลที่เกิดจากการที่สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นรับน้ำมันเข้าไปโดยการกิน เมื่อเกิดการสะสมถึง

ช่วงระยะเวลาหนึ่งก็จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและหน้าที่ของอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย

ผลกระทบของน้ำมันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างไม่ว่าจะเป็นชนิดและปริมาณของน้ำมันที่ปนเปื้อน พฤติกรรมของน้ำมันที่เกิดการปนเปื้อน พื้นที่ที่เกิดการปนเปื้อน สภาพอากาศ ฤดูกาล เหล่านี้เป็นต้น ซึ่งสามารถแบ่งผลกระทบของน้ำมันดิบได้ดังนี้

การตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อรับสัมผัสกับน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน แบ่งออกเป็น 4 ระดับ (Capuzzo, 1988) คือระดับเซลล์ ระดับชีวิต ระดับประชากร และระดับกลุ่มสิ่งมีชีวิต แสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 ระดับการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อสัมผัสกับน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ระดับการตอบสนอง	ลักษณะการตอบสนอง
ระดับเซลล์ (biochemical-cellular)	1. รบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ 2. มีการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย (detoxification)
ระดับชีวิต (organismal)	1. เปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึม 2. เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมในสิ่งมีชีวิต 3. การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ลดน้อยลง 4. การทำงานของโครงสร้างต่าง ๆ ขาดประสิทธิภาพ อาจนำไปสู่การเกิดโรค
ระดับประชากร (population)	1. มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพลวัตของประชากร (population dynamic) 2. ประชากรต้องมีการปรับตัว ซึ่งนำไปสู่ความเครียดในสิ่งมีชีวิต
ระดับกลุ่มสิ่งมีชีวิต (community)	1. องค์ประกอบทางด้านชนิดพันธุ์เปลี่ยนแปลง 2. การหมุนเวียนของพลังงานลดน้อยลง 3. มีการปรับตัวทางด้านระบบนิเวศน์

(ที่มา: Capuzzo, 1988)

ผลกระทบทางด้านกายภาพ

การที่คราบน้ำมันจับติดบนขนนกทะเล ทำให้หมดสภาพในการบิน การพักผ่อน การดำน้ำ และนกพยายามจะไขนขนเพื่อเอาความสกปรกออก ทำให้กลิ่นสารพิษเข้าไปส่วนหนึ่งเป็นเหตุให้ตายได้ คราบน้ำมันที่เคลือบเป็นแผ่นฟิล์มบนผิวน้ำทำให้สัตว์สำคัญตาย นอกจากนี้ยังเป็นตัวทำให้ปริมาณแสงที่ส่องผ่านลงน้ำลดลง มีผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชน้ำ เป็นเหตุให้ปริมาณออกซิเจนต่ำลงมาก ทำให้เกิดการตายในสัตว์หลายชนิด เนื่องจากเมื่อเกิดการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ จะมีผลกระทบต่อแพลงก์ตอนพืชและสาหร่าย ทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก โดยเฉพาะแพลงก์ตอนพืชมีความสำคัญในการตรึงพลังงานจากแสงอาทิตย์มาใช้ในระบบนิเวศของแหล่งน้ำนั้น ดังนั้น เมื่อ

มีคราบน้ำมันบริเวณผิวหนังของแหล่งน้ำ น้ำมันจะไปคั่งแสงอาทิตย์ไม่ให้ส่องผ่านลงไป
แหล่งน้ำ เนื่องจากน้ำมันจะดูดซับแสงอาทิตย์เอาไว้ จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยแพลงก์
ตอนพืชลดลง และความเป็นพิษของน้ำมันจะส่งผลกระทบต่อการลดลงของประชากรแพลงก์ตอน
พืชอีกด้วย

ผลกระทบทางด้านชีวภาพ

เมื่อเกิดการรั่วไหลของน้ำมันส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอย่างมาก โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่
ตามแนวชายฝั่ง ซึ่งเมื่อน้ำมันรั่วไหลออกมาเกิดการผสมกับน้ำทะเลโดยมีคลื่นกระทำส่งผลให้สาร
บางชนิดเกิดความเป็นพิษมากขึ้นจึงส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่

สิ่งมีชีวิตบริเวณชายฝั่ง

บริเวณชายฝั่งเป็นบริเวณที่ได้รับผลจากการปนเปื้อนมากกว่าบริเวณอื่น ๆ จึงส่งผลให้มี
แนวโน้มการสะสมในธรรมชาติมากตามไปด้วย แต่สิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งพืชที่ดำรงชีวิตใน
บริเวณนี้ จะมีความสามารถในการทนต่อคลื่น ลม อุณหภูมิและสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่รุนแรงได้
ดังนั้นสิ่งมีชีวิตในบริเวณนี้จึงสามารถทนต่อผลกระทบและสามารถปรับตัวต่อการปนเปื้อนน้ำมัน
ได้ด้วย แต่อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนน้ำมันยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตระยะยาว เช่นส่งผลให้จำนวนและ
ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในบริเวณนี้ลดจำนวนลง หรืออาจจะส่งผลกระทบต่ออวัยวะภายในของ
สิ่งมีชีวิต เช่น ในหอยแมลงภู่ที่ได้รับสารพอลิอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจะมีการฝ่อของ digestive
tubule และพบว่าเลือดมีการจับกลุ่มกันในต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) และอวัยวะสืบพันธุ์
(gonad) (Arab et al., 2011)

นกทะเล

นกทะเลมีความเสี่ยงมากที่สุดต่อการปนเปื้อนน้ำมัน โดยเฉพาะนกทะเลที่หากินโดยการ
ดำน้ำหรือนกทะเลที่หากินบริเวณผิวน้ำ เพราะถึงแม้ว่านกจะมีการป้องกันตัวเองโดยการไชร้งขน
หรือแต่งขนแต่การปนเปื้อนน้ำมันยังอาจส่งผลให้นกทะเลตายได้ เนื่องจากนกจมน้ำ หายอาหาร
ไม่ได้ และสูญเสียความร้อนในร่างกาย เนื่องจากขนของนกถูกปกคลุมด้วยน้ำมัน (ITOPF, 2013)

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

วาฬ โลมา และแมวน้ำ ไม่ปรากฏผลว่ามีความเสี่ยงหรือได้รับการปนเปื้อนน้ำมัน แต่
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างแมวน้ำ นกที่มีการสืบพันธุ์บริเวณชายฝั่งมีแนวโน้มที่จะได้รับความ
เสี่ยงที่น้ำมันจะปกคลุมขน ซึ่งอาจส่งผลให้สิ่งมีชีวิตเหล่านี้ตายได้ เนื่องจากมีอุณหภูมิในร่างกายสูง
เกินไป แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับช่วงฤดูกาล (ITOPF, 2013)

การศึกษาระดับความเป็นพิษของมลพิษต่าง ๆ ที่มีต่อสัตว์น้ำนั้น สามารถทำได้จากการประเมินจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาแหล่งน้ำให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม สำหรับการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษา สามารถนำมาใช้ในการประเมินและกำหนดมาตรฐานคุณภาพของแหล่งน้ำได้

การศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกทำการศึกษายหอยสองฝา คือหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) หอยนางรมจัดเป็นหอยสองฝาชนิดหนึ่ง คุณสมบัติของหอยสองฝาที่เหมาะสมต่อการศึกษานี้เนื่องจาก ประการแรก คือ หอยสองฝาเป็นดัชนีชีวภาพที่ดีสำหรับตรวจวัดปริมาณสารปนเปื้อนในทะเล เนื่องจากมีถิ่นอาศัยกว้างขวาง เกาะนิ่งไม่เคลื่อนที่ เก็บตัวอย่างได้ง่าย ทนต่อสภาพความเค็มที่เปลี่ยนแปลงได้ดี และมีความสามารถในการสะสมสารต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อได้ดี (Goldberg, 1986)

2.4 ชีววิทยาหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

อนุกรมวิธานของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

Kingdom Animalia

Phylum Mollusca

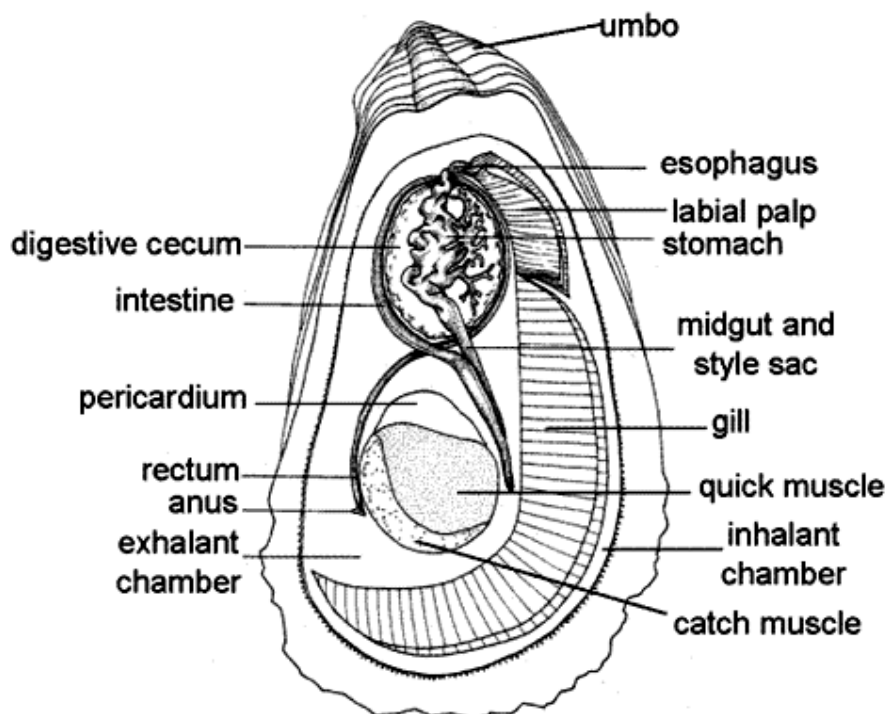
Class Bivalvia

Order Ostreoida

Family Ostreidae

Genus *Saccostrea*

Species *S. cucullata*

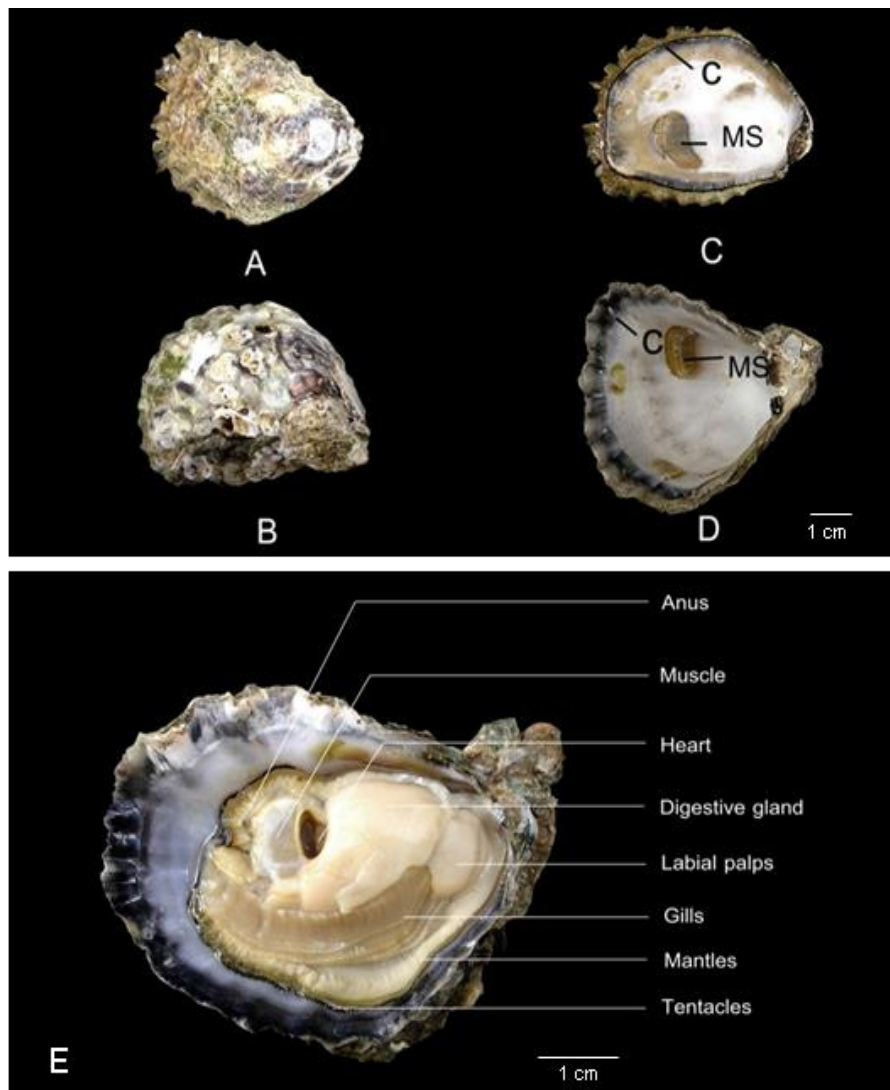


ภาพที่ 2-7 โครงสร้างภายในของหอยนางรม

(ที่มา: <http://lanwebs.lander.edu/faculty/rsfox/invertebrates/crassostrea.html>)

หอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) เป็นหอยทะเลในกลุ่มของหอยสองฝา (bivalvia) มีเปลือกค่อนข้างหนา และพบว่าเปลือกทั้งสองฟามีขนาดไม่เท่ากัน โดยเปลือกบนจะมีขนาดใหญ่และแบนกว่าเปลือกล่าง ส่วนเปลือกล่างที่มีลักษณะโค้งเว้านี้ ดังแสดงในภาพที่ 2-8 จะเป็นส่วนที่มีตัวหอยติดอยู่ ด้านที่มีเนื้อฝังอยู่จะเว้าลึกลงไปคล้ายรูปถ้วยหรือจานและยึดติดกับวัตถุแข็ง เช่น ก้อนหิน ไม้หลัก หรือเปลือกหอยที่จมอยู่ในทะเล ส่วนเปลือกอีกด้านหนึ่งจะมีลักษณะแบนและบางกว่า ขนาดความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร เปลือกของหอยนางรมปากจیب ประกอบด้วยหินปูนร้อยละ 95

หอยนางรมปากจیبดำรงชีวิตอยู่ได้โดยการดูดน้ำรอบ ๆ ตัวเข้าไปทางด้านหนึ่งและปล่อยทิ้งออกอีกด้านหนึ่ง อาหารและก๊าซออกซิเจนจะเข้าไปพร้อมกับน้ำ อาหารของหอยนางรมปากจیب ได้แก่ แพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ที่ลอยลอยอยู่ในน้ำ หอยนางรมปากจیبเป็นสัตว์ที่มีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน ในช่วงที่มีการผสมพันธุ์หอยตัวเมียจะปล่อยไข่ และหอยตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อออกปฏิสนธิกันในน้ำ เป็นการผสมพันธุ์แบบภายนอกตัว (Lane et al., 1985)



ภาพที่ 2-8 สัณฐานวิทยาของเปลือก (A-D) และกายวิภาคของอวัยวะภายใน (E) ของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

การกินอาหารและการเจริญเติบโต

หอยนางรมส่วนใหญ่จะกินอาหารโดยวิธีการกรอง เนื่องจากเป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่กับที่ อวัยวะที่ใช้ในการกรองอาหารคือเหงือก (gill) น้ำที่ไหลผ่านเข้ามาในโพรงเยื่อหุ้ม (mantle cavity) ไหลผ่านเหงือกออกไปยังท่อน้ำออก อาหารหรืออนุภาคต่าง ๆ ซึ่งถูกพัดพามากับน้ำ จะติดบนซี่เหงือก ซึ่งอาหารที่กรองได้แก่ ไดอะตอม (diatom) ซิลิโค-แฟลคเจลเลต (silico-flagellates) และแพลงตอนพืช (phytoplankton) จำพวกไดอะตอมและสปอร์ของสาหร่ายทะเลเป็นหลัก (สุวรรณี รัตนภาพไพศาล และคณะ, 2541) อาหารที่มีขนาดใหญ่เกินไปจะตกลงมาในโพรงเยื่อหุ้มตอนล่าง

และถูกขับออกทางท่อน้ำออก ส่วนที่มีขนาดเล็กจะมีเมือกมาปกคลุม และมีซิเลียคอยพัดโบกให้อุณหภูมิเหล่านั้นเข้าสู่ทางเดินอาหารต่อไปได้ อุณหภูมิที่ไม่สามารถถูกย่อยได้จะถูกขับออกมาทิ้งทางท่อน้ำออกภายหลัง กระบวนการกรองของหอยนางรมนี้จะเป็นไปได้ด้วยดีและมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อปริมาณน้ำไหลผ่านเข้าสู่โพรงเยื่อหุ้มมากพอ และตัวหอยต้องอยู่ในน้ำตลอดเวลา ดังนั้นจากการสังเกตจะพบว่า หอยนางรมที่ถูกเลี้ยงอยู่ในน้ำตลอดเวลา จะมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าหอยนางรมที่อยู่ในระดับน้ำขึ้นน้ำลง มีการสัมผัสอากาศเป็นบางเวลา

อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหาร

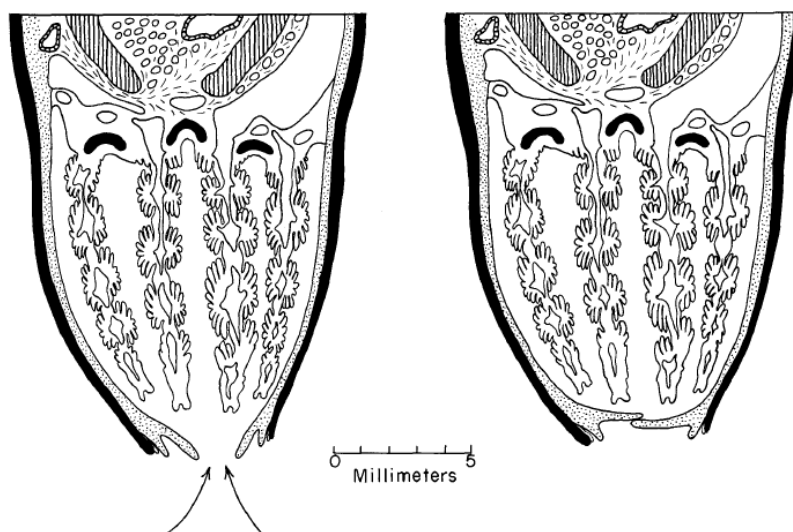
อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหารของหอยนางรม ประกอบด้วย

1. แมนเทิล (mantle)

เนื่องจากหอยนางรมเป็นหอยสองฝาที่สูญเสียส่วนหัว ซึ่งทำหน้าที่รับรู้ความรู้สึกไป ดังนั้นที่บริเวณขอบของแมนเทิลจะทำหน้าที่แทนในการรับสัมผัสต่าง ๆ รวมถึงการนำเอาน้ำผ่านเข้าไปในช่องของแมนเทิล (mantle cavity) โดยทั่วไปแล้วน้ำจะผ่านเข้าแมนเทิลทางไซฟอนเพื่อนำน้ำเข้า (inhalant siphon) เพื่อหล่อเลี้ยงช่องแมนเทิลจนทั่ว แล้วจึงผ่านทางเหงือกเพื่อทำหน้าที่กรองอาหารและออกซิเจน และจะถูกปล่อยออกมาทางไซฟอนเพื่อนำน้ำออก (exhalant siphon) ช่องทางน้ำเข้าจะมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ขนาดค่อนข้างใหญ่ มีเทนเทคิล (tentacle) และซิเลียสำหรับโบกพัดน้ำเข้ามา เทนเทคิลและซิเลียนี้ทำหน้าที่ในการรับสัมผัสและรับรู้ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม ในขณะที่เดียวกันยังเป็นส่วนที่ช่วยในการกรองอาหารขั้นต้นอีกด้วย

2. เหงือก (gill)

หอยนางรมปากจیبมีโครงสร้างและลักษณะเหงือกแบบ pseudolamellibranch คือ มีเหงือก 2 คู่ หรือ 4 แผ่น เรียงตัวกัน ซึ่งเหงือกแต่ละคู่จะยึดอยู่บนแกนเหงือกเดียวกัน วางตัวด้านข้างตามความยาวของลำตัว ตั้งแต่ส่วนของเลเบียลพัลป์ (labial palp) ซึ่งอยู่บริเวณใกล้กับปากซึ่งอยู่ใกล้ปากไปจนถึงด้านท้ายของลำตัว แผ่นเหงือกแต่ละแผ่น ประกอบไปด้วยซี่เหงือกที่พบบันเป็นจیبเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับแผ่นเหงือก โดยแต่ละจیبประกอบด้วยซี่เหงือกหลายซี่ เกิดเป็นสันกว้างระหว่างจیبเหงือกที่เป็นร่องลงไป มีลักษณะเป็นซี่ขนาดใหญ่ 1 ซี่ (principle filament) ทำหน้าที่ลำเลียงชิ้นส่วนอาหารที่มีขนาดใหญ่ ไปยังแถบอาหารที่ด้านท้องของแกนเหงือก เรียกลักษณะเหงือกแบบนี้ว่า เหงือกแบบจیب (pleated ctenidia) และมีเนื้อเยื่อเชื่อมอยู่หลายตอนระหว่างซี่เหงือกแต่ละซี่ และบริเวณด้านรอยพับของซี่เหงือก พบซิเลียที่ใช้สำหรับโบกพัดอาหารลำเลียงเข้าสู่ปาก



ภาพที่ 2-9 ภาพตัดตามขวาง (cross section) ของเหงือกและแมนเทิลของหอยนางรมพันธุ์ *Crassostrea virginica* (Galtsoff, 1964)

3. เลเบียลพัลพ์ (labial palp)

เลเบียลพัลพ์มีลักษณะเป็นแผ่นสามเหลี่ยมมีลักษณะแบน อยู่เป็นคู่ทั้งสองข้างของร่องปาก (oral groove) เป็นส่วนที่เชื่อมระหว่างเหงือกและร่องปาก ทำหน้าที่ในการคัดเลือกอาหาร บริเวณผิวด้านนอกของเลเบียลพัลพ์มีลักษณะที่เรียบและมีซิเลีย ส่วนผิวด้านในมีลักษณะเป็นช่องทำหน้าที่คัดเลือกอาหารโดยอาศัยขนาดของอาหารมาช่วยในการคัดเลือกเข้าสู่ช่องปาก ส่วนอาหารที่มีขนาดใหญ่ก็จะถูกกรองทิ้งไป

เลเบียลพัลพ์ ประกอบด้วยชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และประกอบด้วยเซลล์ผิวชนิด columnar ciliated epithelium ตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane) โดยเซลล์พวกนี้ทำด้วย vesicular cell ขนาดใหญ่ซึ่งพบในแมนเทิล ส่วนด้านในของเลเบียลพัลพ์มีหลอดเลือดและเลือดในช่องว่าง ช่องว่างเหล่านี้จะแยกหรือเรียงรายระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและมีเยื่อผนังหรือไม่มีเลย

อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์และการขยายพันธุ์

หอยนางรมมีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน ยกเว้นในบางกรณีหอยตัวเดียวอาจมีทั้งไข่และสเปิร์ม ลักษณะที่มีทั้งสองเพศอยู่ในตัวเดียวกันนี้เรียกว่ากระเทย (hermaphrodite) ซึ่งอาจพบได้ในหอยสองฝาชนิดอื่น ๆ ด้วย โดยที่มันอาจจะเปลี่ยนแปลงเพศได้ เมื่อเข้าสู่สภาวะใดสภาวะหนึ่ง แต่ส่วนใหญ่แล้วจะพบว่าแยกเพศอย่างชัดเจน การจำแนกเพศของหอยนางรมไม่สามารถดูได้จาก

ลักษณะภายนอก จำเป็นต้องเปิดเปลือกหอยออกมา สังเกตจากอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ซึ่งจะปกคลุมอยู่บริเวณรอบกระเพาะอาหาร นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จึงจะสามารถแยกได้ว่าเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย ความสมบูรณ์เพศของหอยนางรมเกิดขึ้นจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นตัวกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาผสมกันภายนอก (external fertilization) เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความเค็ม ระดับความลึกของน้ำ ความเป็นกรดต่างของน้ำหรือโคนสารเคมีบางชนิดเป็นตัวกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา เมื่อไข่กับสเปิร์มผสมกันจะมีการแบ่งตัว และพัฒนาเป็นตัวอ่อนซึ่งสามารถว่ายน้ำได้

4. สเปิร์ม (sperm)

สเปิร์มของหอยสองฝา มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับสเปิร์มของสัตว์ทั่ว ๆ ไป คือ ประกอบด้วย ส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนหาง ส่วนหัวจะมีนิวเคลียสรูปร่างค่อนข้างยาว มีอะโครโซม (acrosome) ซึ่งมีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยผนังของไข่ ส่วนกลางของสเปิร์มมีไมโทคอนเดรียประมาณ 4-5 อันล้อมรอบเซนทริโอล (centriole) ส่วนหางของสเปิร์มคือ แฟลเจลลัม (flagellum) นั้นเอง

สเปิร์มของหอยสองฝา สปีชีส์ต่าง ๆ มีโครงสร้างละเอียดพื้นฐานที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ มีแฟลเจลลัม เซนทริโอล และไมโทคอนเดรียซึ่งพบในส่วนกลางของสเปิร์ม ไมโทคอนเดรียมักจะพบใกล้กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ และมีโครงสร้างภายในเหมือนกันกับไมโทคอนเดรียในเซลล์ร่างกายทั่วไป อย่างไรก็ตาม ตำแหน่งการเรียงตัวของไมโทคอนเดรียสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้รูปแบบของการปฏิสนธิในหอยสองฝาได้ กล่าวคือหอยสองฝามีการปฏิสนธิ 2 แบบ ได้แก่ การปฏิสนธิภายนอก (external fertilization) และการปฏิสนธิภายใน (internal fertilization) สำหรับสเปิร์มของหอยสองฝาที่มีการปฏิสนธิภายนอกนั้น มีไมโทคอนเดรียรวมกันเป็นกลุ่มอยู่ส่วนปลายของหัวสเปิร์มซึ่งมีรูปร่างกลม ส่วนสเปิร์มของหอยสองฝาที่มีการปฏิสนธิภายในนั้น มีส่วนหัวที่มีรูปร่างเรียวยาว ไมโทคอนเดรียเรียงกันเป็นเยื่อหุ้มส่วนกลางของสเปิร์ม นอกจากนี้ส่วนหางยังมีไซโตพลาสซึมปริมาณมาก ลักษณะต่าง ๆ เหล่านี้ เป็นลักษณะเฉพาะของสเปิร์ม ที่จะต้องเวียนว่ายในของเหลวภายในระบบสืบพันธุ์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าน้ำทะเล

นิวเคลียสของสเปิร์มมีรูปร่างได้หลายลักษณะ แล้วแต่ชนิดของหอยสองฝา เช่น มีลักษณะเป็นรูปไข่ (ในหอย *Mytilus* Linnaeus) เป็นรูปกรวยสั้น (ในหอย *Lyrodus* Gould) เป็นรูปกลม (ในหอย *Crassostrea*) เป็นรูปแท่งคินสอ (ในหอย *Corbicula* Mühlfeld) หรือเป็นรูปโค้งยาวเรียวคล้ายเคียว (ในหอย *Tapes* Mühlfeld) รูปร่างของนิวเคลียสนี้ สามารถใช้เป็นลักษณะอย่างหนึ่งในการจำแนกหอยสองฝาได้

ออร์แกนลล์อีกหนึ่งชนิด ที่พบในไซโทพลาสซึมของสเปิร์ม คือ อะโครโซม ซึ่งถูกสร้างมาจากกอลจิบอดี การสร้างอะโครโซมในหอยสองฝาต่างชนิดกัน จะมีรูปร่าง ขนาด ส่วนประกอบ และตำแหน่งที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึมต่างกัน ซึ่งอยู่ที่ส่วนหัวของสเปิร์ม ในอะโครโซมจะมีเอนไซม์ ซึ่งใช้ในการย่อยผนังของไข่ ช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์ไข่และเยื่อหุ้มเซลล์สเปิร์มเชื่อมต่อกันในกระบวนการปฏิสนธิ

5. เซลล์ไข่ (oocyte)

เซลล์ไข่ของหอยนางรมปากจีบ จะมีรูปร่างกลม ในระยะตัวอ่อนเจริญอยู่ภายนอก มักมีไข่ขนาดเล็ก คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ส่วนหอยสองฝาที่มีระยะตัวอ่อนเจริญอยู่ภายในมักมีไขขนาดใหญ่ คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 150 ไมโครเมตร มีปริมาณไข่แดงร้อยละ 30 ของปริมาตรไข่ทั้งหมด ไข่แดงจะมีแกรนูลสองชนิดคือ ชนิดที่เป็นโปรตีนและชนิดที่เป็นไขมัน

6. ระบบทางเดินอาหาร (digestive system)

ระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมประกอบไปด้วยสามส่วน คือ (1) ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ประกอบด้วยหลอดอาหารซึ่งสั้นและแบน เปิดสู่กระเพาะอาหารส่วนต้น (2) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ประกอบด้วยส่วนของกระเพาะอาหาร และ (3) ทางเดินอาหารส่วนปลาย (hindgut) ประกอบด้วยลำไส้ตรง (rectum) และทวารหนัก (anus)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Harcourt (2001) ระดับความเข้มข้นของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) ที่ 1.6 ppm, 3.2 ppm, 6.4 ppm, 12.3 ppm และ 19.2 ppm ถูกนำมาทดสอบกับปลานิล ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 3 กรัม เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ตรวจวัดค่า LC_{50} และ LC_{100} ของ WAF ที่แสดงให้เห็นถึงการยืดขยายตัว และการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเหงือก พบค่าออกซิเจนละลายในน้ำลดลง (7.2-4.5 มิลลิกรัม / ลิตร) ซึ่งต่ำกว่าระดับปกติที่สิ่งมีชีวิตในน้ำอาศัยอยู่ ไม่พบความผิดปกติของระดับ pH จึงอาจเป็นไปได้ว่า แนวนอนที่ชี้ให้เห็นว่าการตายของปลา อาจเกี่ยวข้องกับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลง เนื่องจากการปนเปื้อนของน้ำมันดิบในน้ำ รวมถึงการแสดงผลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ทำให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเหงือก ซึ่งอาจมาจากการปรับตัวของปลานิล ที่ได้รับสัมผัสกับ WAF รวมถึงการได้รับออกซิเจนละลายในน้ำลดลงด้วย

Dezfuli et al. (2010) ทำการศึกษาโครงสร้างภายใน โดยการส้อมเก็บตัวอย่างเหงือกของ ปลากะพงแดง *Sparus aurata* L. ที่พบการติดเชื้อตามธรรมชาติจากโคพีพอด เพื่อนำมาประเมินทางพยาธิวิทยาและการตอบสนองต่อเซลล์ ปลากะพง 30 ตัว ถูกนำมาทดสอบ พบว่า 23 ตัว (74% ของปลาทั้งหมด) พบการติดเชื้อที่รุนแรง โดยเฉลี่ย 3-50 ของจำนวนปรสิตต่อปลากะพง 1 ตัว พบโคพีพอดบริเวณโดยรอบของเหงือกกับบริเวณหนวดคู่ที่ 2 ของปลากะพง โดยบริเวณนั้นจะพบการเกิดเส้นเลือดอุดตัน รวมถึงอาการอักเสบบริเวณเยื่อเมือกของเหงือก ส่งผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มของเซลล์และเกิดอาการเลือดออก ซึ่งอาจก่อให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ใกล้กับบริเวณที่ติดกับ rodlet cells (RCs), mast cells (MCs) และเซลล์สร้างเมือก จากการสังเกตพบว่าในปลาที่ติดเชื้อพบเซลล์สร้างเมือกในเหงือกที่ติดเชื้อมากกว่าในเหงือกที่ไม่พบการติดเชื้อ (t-test, $P < 0.01$) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในจำนวนของ RCs และ MCs ระหว่างเหงือกปลาที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ (t-test, $P > 0.01$) ทั้งในเหงือกที่การติดเชื้อและไม่พบการติดเชื้อ RCs ที่อยู่ภายในโครงสร้างชั้นนอกของเหงือก และยังพบใน secondary lamella อีกด้วย ในเหงือกที่แข็งแรงและเหงือกที่ติดเชื้อ MCs จะอยู่ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณด้านนอกและด้านในหลอดเลือดของเหงือกชั้นนอกและใกล้กับเซลล์เมือกของหลอดเลือด เหงือกที่พบเซลล์สร้างเมือก ทั้งในกลุ่มที่พบการติดเชื้อและไม่พบการติดเชื้อให้ผลเป็นบวกในการย้อมเนื้อเยื่อด้วย PAS ในปลากะพงทั้งหมด เหงือกที่พบเซลล์สร้างเมือกแสดงบริเวณตรงกลางหรือรอบ ๆ เหงือก และยังพบความหนาแน่นของเซลล์ที่ผิดปกติภายในแกรนูลของเซลล์เมือกอีกด้วย

Saber et al. (2010) พบว่าน้ำมันดิบส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อลำไส้ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันดิบ 50 และ 100 ppm พบเซลล์สร้างเมือกแทรกกระจายอยู่ทั่วไปในเยื่อเมือกบริเวณลำไส้ โดยสังเกตได้จากจำนวนเซลล์สร้างเมือกที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันดิบ

Agamy (2012) ทำการศึกษาผลกระทบของ WAF dispersed oil และ dispersant ต่อเนื้อเยื่อตับของตัวอ่อนปลาสิริเดสเลอีเหลืองทอง (*Siganus canaliculatus*) ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า น้ำมันดิบสามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ตับเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยพบความผิดปกติในส่วนของเซลล์ตับในเรื่องของระบบไหลเวียนเลือด การเสื่อมสภาพของเซลล์ การเจริญ และการอักเสบ เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ในเนื้อเยื่อตับปลา สรุปผลการทดลอง พบว่า WAF สามารถส่งผลกระทบต่อพยาธิสภาพในตับปลา มากกว่า dispersed oil และ dispersant

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาผลกระทบระดับเนื้อเยื่อและเซลล์

ศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) โดยวิธีมีนุษวิทยา (histological technique) มีขั้นตอนที่สำคัญหลายขั้นตอน ดังนี้

3.1.1 วิธีดำเนินการศึกษา

1. ตัวอย่างหอยนางรม

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) จากพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรมจากตำบลบางทราย อำเภอมะนัง จังหวัดชลบุรี สุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมตัวเต็มวัยที่มีขนาดประมาณ 5-7 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำมาทำความสะอาด ล้างสาหร่ายและกำจัดเพรียงหินที่เกาะมาออกให้หมด ใช้หอยนางรมทั้งหมด 540 ตัว ความเข้มข้นของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% และ 0% (กลุ่มควบคุม) ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนทำการทดลอง โดยจะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีคุณลักษณะตามที่กำหนดในตารางที่ 3-1 ให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนชนิด *Nannochloropsis* sp. 1% v/v ของแพลงก์ตอนหัวเชื้อ 2×10^7 cells/ml (Kingtong et al., 2007) ก่อนจะย้ายนำมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด $30 \times 30 \times 60$ เซนติเมตร จำนวน 18 ใบ ในแต่ละความเข้มข้น

ตารางที่ 3-1 คุณลักษณะของน้ำทะเลที่ใช้สำหรับเลี้ยงหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ

คุณลักษณะของน้ำทะเล	หน่วย
อุณหภูมิ	อุณหภูมิห้อง
ความเค็ม	30 ppt
pH	7.5-8.2
Dissolved oxygen (DO)	7.0-7.3 mg/l

2. การเตรียมน้ำมันดิบส่วนที่ละลาย (Water accomodated fraction หรือ WAF)

เตรียมสารละลายที่จะใช้ในการทดลองเป็นน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ (water accomodated fraction หรือ WAF) ดัดแปลงวิธีมาจาก Anderson et al (1978) โดยใช้ น้ำมัน 1 ส่วนผสมในน้ำทะเล 9 ส่วน กวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้แยกชั้น แล้วจึงดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวด้านล่างสำหรับใช้เป็น stock solution ของ WAF ในการทดสอบความเป็นพิษ โดยให้น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ได้นี้เป็น 100% WAF หลังจากนั้นจึงนำไปเจือจางด้วยน้ำทะเลที่เตรียมไว้ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นระดับต่างๆ

การทดสอบใช้ความเข้มข้นของ WAF ที่ระดับ 100%, 50%, 25%, 12.5% และ 6.25% และ 0% (กลุ่มควบคุม) โดยการเจือจางตามสัดส่วนดังตารางที่ 3-2 ทดสอบในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ตรวจสอบอัตราการตายและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปศึกษา ลักษณะผลกระทบต่อเนื้อเยื่อ โดยใช้เทคนิคพยาธิวิทยา

ตารางที่ 3-2 แสดงการเตรียม WAF ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ WAF ที่ใช้ในการทดสอบ (%)	ปริมาตรของ stock solution ของ WAF 100% (ลิตร)	ปริมาตรน้ำทะเล (ลิตร)	ปริมาตรรวม (ลิตร)
0	0	30	30
6.25	1.875	28.125	30
12.5	3.75	26.25	30
25	7.5	22.5	30
50	15	15	30
100	30	0	30

ในการทดลองต้องการทำ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันความคลาดเคลื่อนของข้อมูล ในการทดลอง 1 ครั้งจะใช้ ปริมาตรของ stock solution WAF 58.125 ลิตร ดังนั้นในการทดลอง 3 ซ้ำจะใช้ stock solution WAF 174.38 ลิตร เนื่องจากตามวิธีการของ Anderson et al. (1974) ใช้ น้ำมัน 1 ส่วนผสมในน้ำทะเล 9 ส่วน ซึ่งจะทำได้ stock solution WAF ประมาณ 8 ส่วน หรืออาจกล่าวได้ว่า น้ำมันดิบ 1 ลิตร สามารถเตรียม stock solution WAF ได้ 8 ลิตร ดังนั้นหากต้องการ stock solution

WAF 174.38 ลิตร ต้องใช้น้ำมันดิบเท่ากับ 21.80 ลิตร เมื่อทำการทดสอบแล้วจะเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ระดับเนื้อเยื่อ ที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

3. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ

เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ ที่ส่งผลต่ออัตราการตายและการรอดชีวิต ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยในการทดลองจะใช้ที่ความเข้มข้น 0, 6.25%, 12.5%, 25%, 50% และ 100% WAF น้ำทะเลปริมาตร 30 ลิตร ต่อความเข้มข้น และใช้หอยนางรมจำนวน 30 ตัว ต่อความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ ตรวจสอบอัตราการตายและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อทุก ๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้โปรแกรม SPSS คำนวณหาค่า LC_{50} (lethal concentrations for 50% mortality) โดยจะใช้ค่า LC_{50} ในการบ่งบอกระดับความเป็นพิษของน้ำมันดิบที่ละลายในน้ำต่อหอยนางรมปากจีบ เพื่อนำไปศึกษาลักษณะผลกระทบต่อนเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค histology ต่อไป

3.1 การเก็บตัวอย่าง

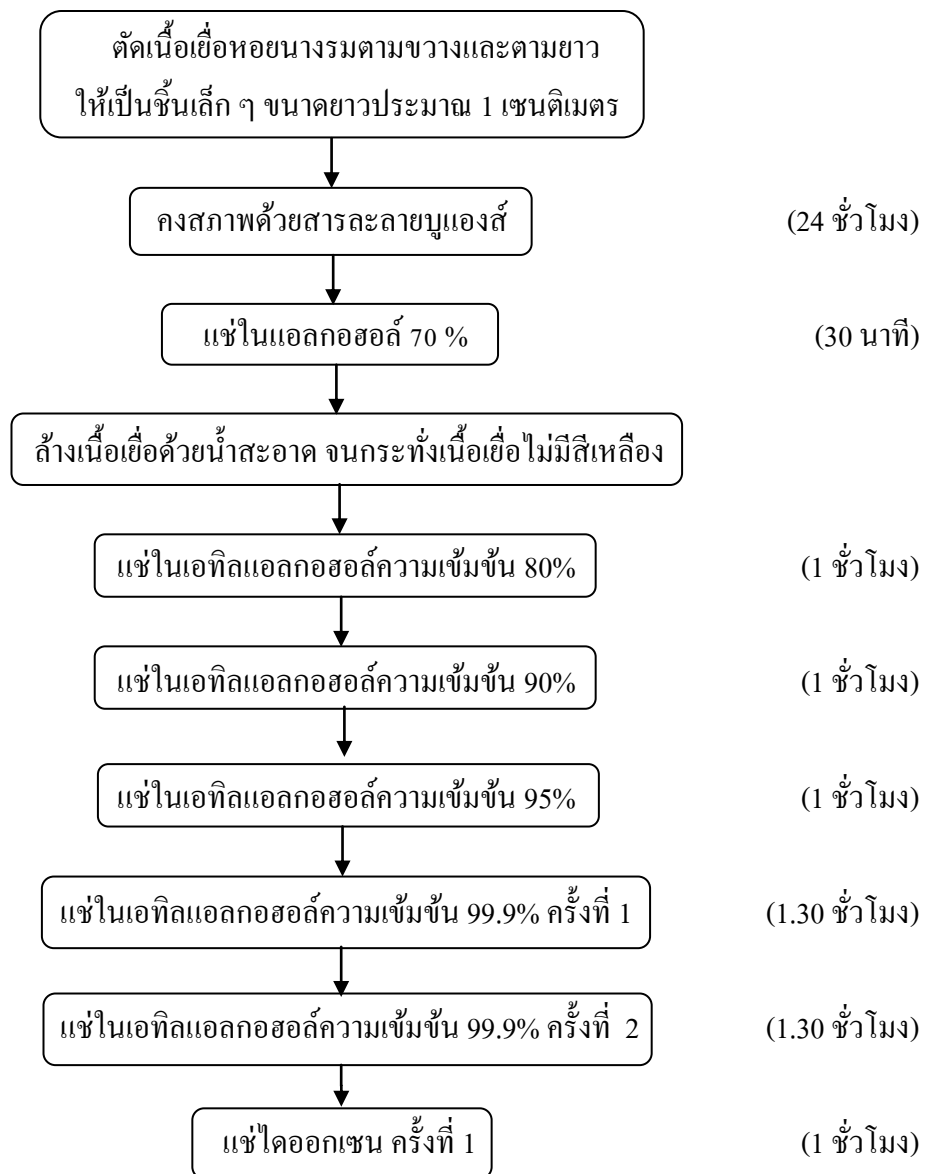
การศึกษาผลกระทบของการปนเปื้อนน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ ต่อหอยนางรมปากจีบในระดับเซลล์และเนื้อเยื่อในครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย ที่มีขนาดประมาณ 5-7 เซนติเมตร จากพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรมจากตำบลบางทราย อำเภอมือง จังหวัดชลบุรี เพื่อศึกษาผลกระทบระดับเซลล์และเนื้อเยื่อ ทำการศึกษาผลกระทบของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสัมผัสกับน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ สุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ ความเข้มข้นละ 3 ตัว ทำการเปิดเปลือกและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยจะตัดตามขวาง (cross section) ให้ได้ครบทุกอวัยวะ แล้วจึงนำเนื้อเยื่อที่ได้มาแช่ในสารละลายบูแอนด์ (Bouin's fixative) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาศึกษาด้วยวิธีมิชวิทยา (histological technique)

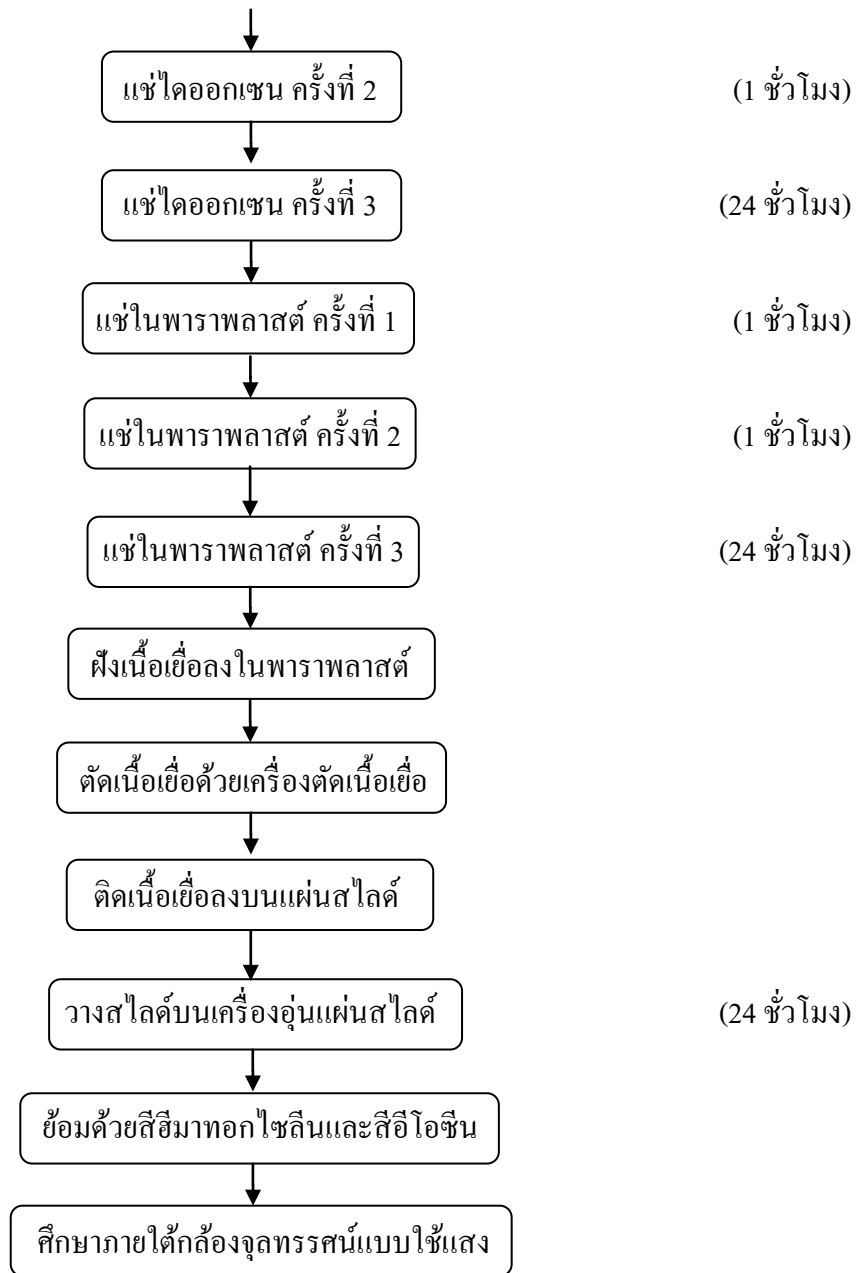
3.2 การศึกษาด้วยเทคนิคมิชวิทยา (histological technique)

การศึกษาด้วยเทคนิคมิชวิทยาจะใช้วิธีฝังเนื้อเยื่อตัวอย่างในพาราพลาสติก โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่แช่สารละลายบูแอนด์จากข้างต้นมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วจึงนำมาล้างด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้น 70% จนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) ในเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่ำไปยังเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง โดยเริ่มจากเอทานอลที่มีความเข้มข้น 80% 90% และ 95% ตามลำดับ ขึ้นตอนละหนึ่งครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาแช่ในเอทานอล 100% จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อมาแช่ใน

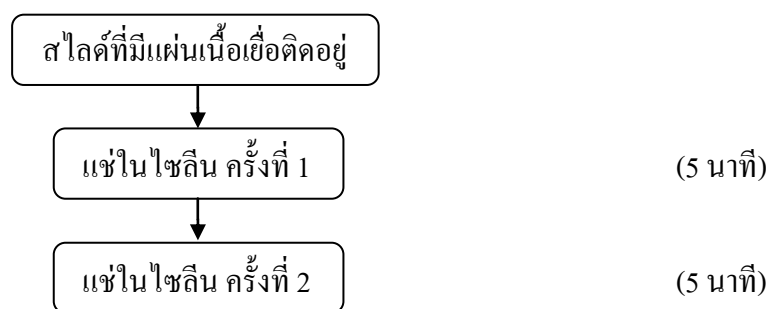
พาราพลาสติก 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสติก ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome รุ่น HESTION ERM 3000, Hestion, Australia) ความหนา 6 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วมาติดลงบนแผ่นสไลด์โดยใช้เจลลาตินเป็นตัวช่วยให้เนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นสไลด์ นำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางให้แห้งบนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาย้อมด้วยสีอีมาทอกไซลินและอีโอซิน (haematoxylin and eosin) และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

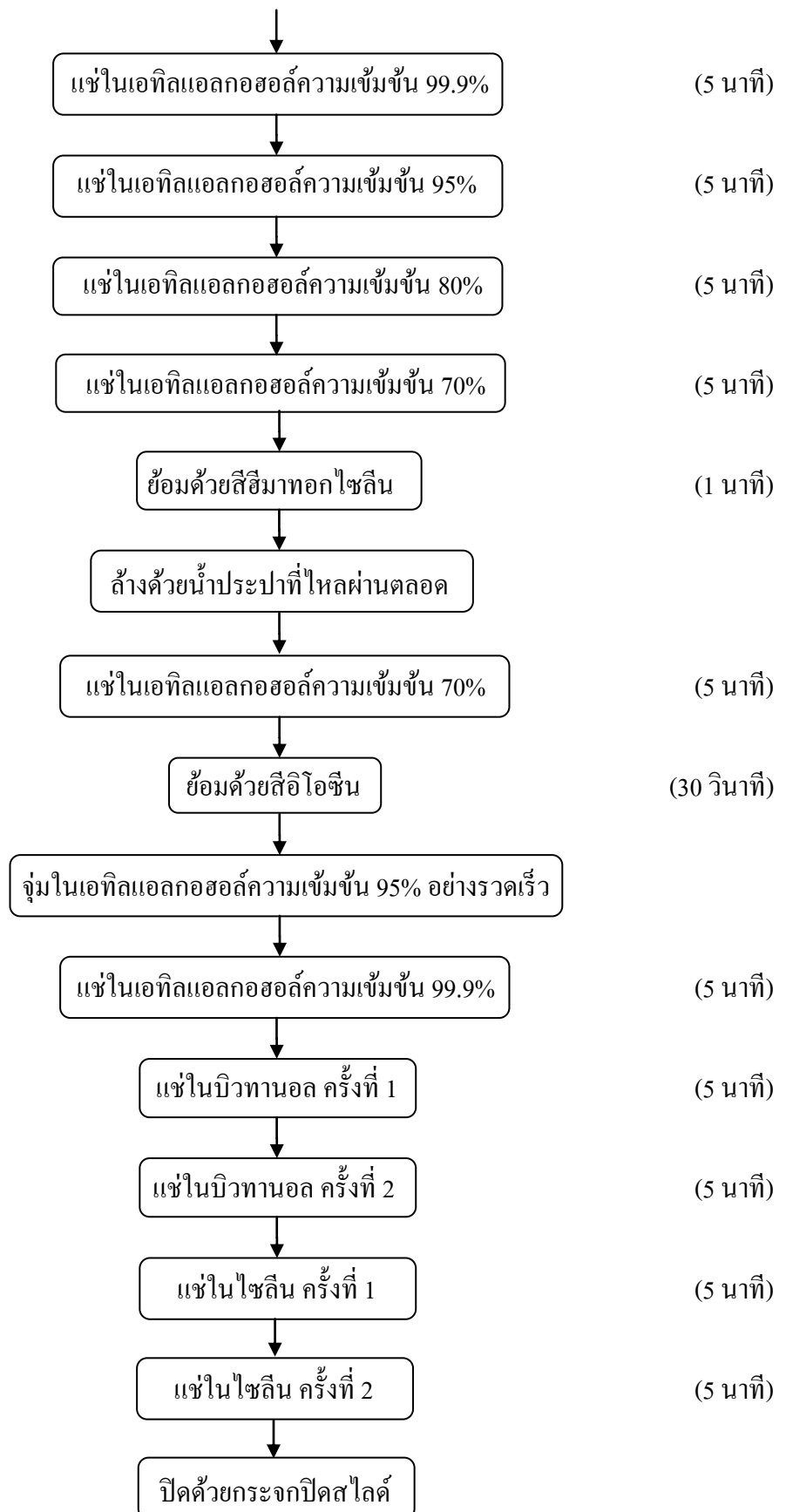
แผนภาพการเตรียมเนื้อเยื่อ





แผนภาพขั้นตอนการข้อมลิ





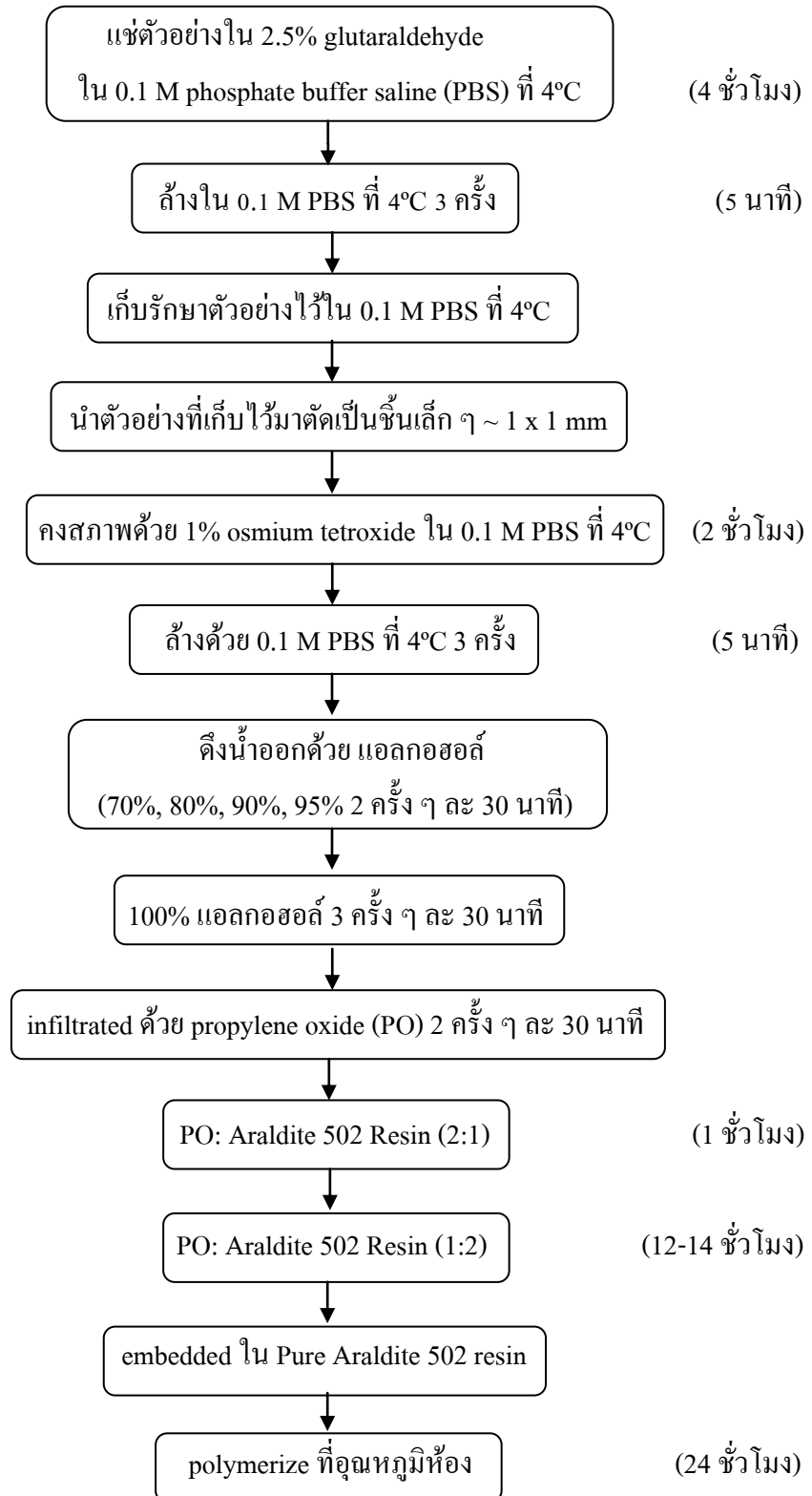
3.2.1 การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscopes)

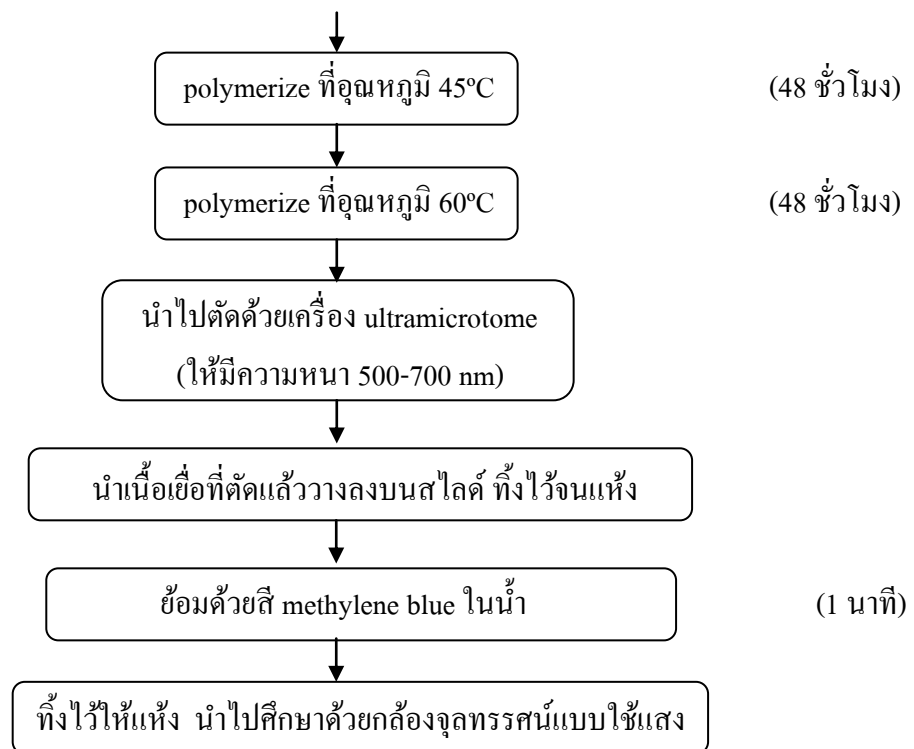
ศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30 โดยใช้โปรแกรม Optikam B1, B3, B5, B9 Ver. 1.9 ดูเนื้อเยื่อที่กำลังขยาย 40 เท่า 100 เท่า 400 เท่า 1000 เท่า พร้อมกับถ่ายรูป เพื่อคุณลักษณะเนื้อเยื่อวัยวะของหอยนางรมปากจิบ (*Saccostrea cucullata*)

3.2.2 การศึกษาเนื้อเยื่อตัวอย่าง semi-thin ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การศึกษานเนื้อเยื่อตัวอย่าง semi-thin ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยนำเนื้อเยื่อมาแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างใน 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใน 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 มิลลิเมตร คงสภาพด้วย 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ดึงน้ำออกด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 %, 80%, 90%, 95% ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง และ 100 % 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ตามลำดับ นำ propylene oxide (PO) เข้าสู่เซลล์ 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาทีตามด้วย PO : Araldite 502 resin (2:1) นาน 1 ชั่วโมงและ (1:2) นาน 12-14 ชั่วโมง ผึ่งเนื้อเยื่อใน Pure Araldite 502 resin ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง ที่ 45 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อให้เกิดกระบวนการ polymerization ที่สมบูรณ์ จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome ให้มีความหนาประมาณ 500-700 นาโนเมตร ย้อมด้วยสี methylene blue ในน้ำ (1% methylene blue, 1% sodium tetraborate) ที่จางหนึ่งแห่ง นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

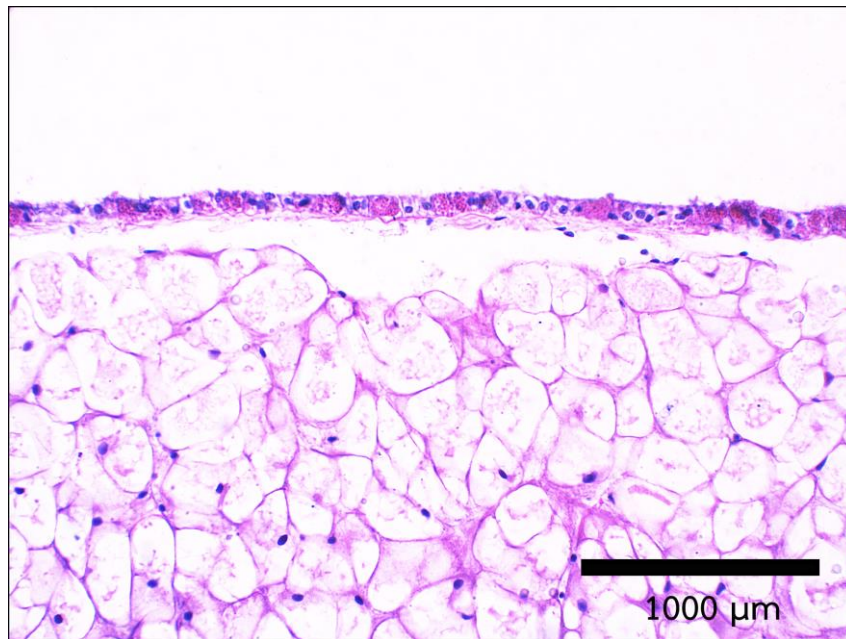
แผนภาพขั้นตอนการศึกษาเนื้อเยื่อตัวอย่าง semi-thin ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง





3.2.3 การนับจำนวนเซลล์สร้างเมือก

นับจำนวนเซลล์สร้างเมือกจากเนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อมสีฮีมาทอกไซลีนและอีโอซิน โดยนับจากภาพที่ถ่ายด้วยโปรแกรม Optika B1, B3, B5, B9 Ver. 1.9 จากกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์สร้างเมือกจากรูปภาพ ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยสุ่มนับจากภาพทั้งหมด 3 ภาพ ของแต่ละความเข้มข้นและเนื้อเยื่อวัยวะหอยนางรม แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ย



ภาพที่ 3-1 ตัวอย่างการวัดสเกลสำหรับการนับจำนวนเซลล์สร้างเมือกในเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ

3.2.4 การทดสอบสถิติ

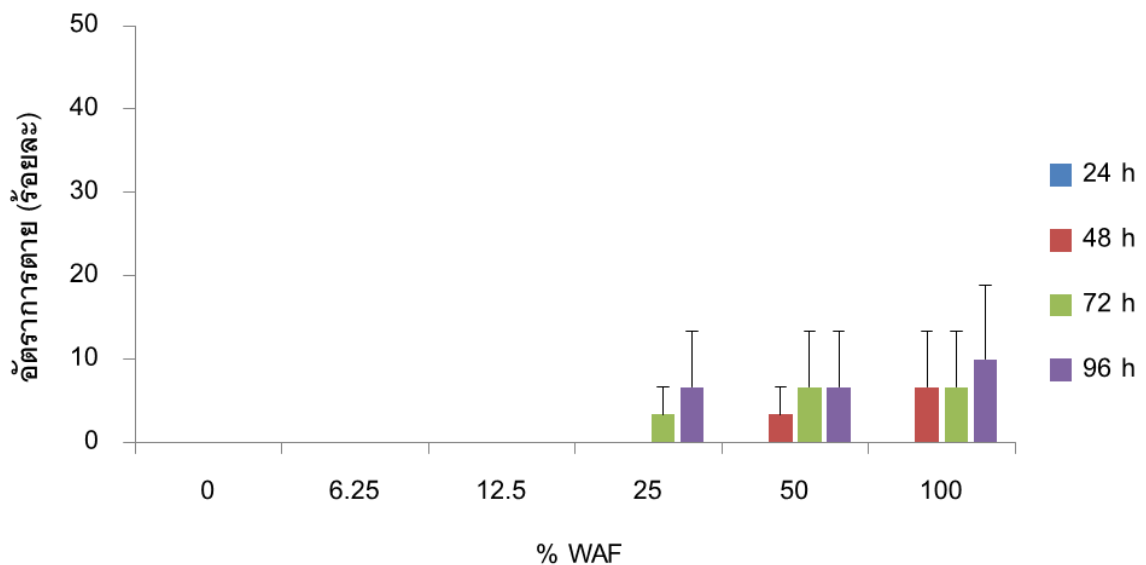
ทดสอบสถิติจากจำนวนเซลล์สร้างเมือกที่พบในแต่ละเนื้อเยื่อวัยระของหอยนางรมในทุกความเข้มข้นของ WAF ใช้สถิติ Two way ANOVA จากโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17 ในการทดสอบ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ

การทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำ (WAF) ต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ โดยใช้ความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 0, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ตามลำดับ ทำการทดสอบระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบอัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ ดังแสดงในภาคผนวก ก และในภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 อัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ

จากผลการทดสอบพบว่า WAF มีความเป็นพิษต่อหอยนางรมและส่งผลกระทบท่ออัตราการตาย โดยอัตราการตายของหอยนางรมปากจีบจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ WAF และระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 6.25 และ 12.5 ไม่พบอัตราการตาย หลังการทดสอบเป็นเวลา 96 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามอัตราการตายในกลุ่มทดสอบค่อนข้างต่ำและไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) (ภาคผนวก ข) โดยพบอัตราการตายสูงสุดคือร้อยละ 10 ใน

กลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 100% ที่เวลา 96 ชั่วโมง

ที่ระดับความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 25 พบอัตราการตายร้อยละ 3.33 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และอัตราการเพิ่มเป็นร้อยละ 6.67 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ที่ระดับความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 50 พบว่าหอยนางรมปากจิบตายเร็วขึ้น โดยพบอัตราการตายร้อยละ 3.33 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และอัตราการเพิ่มเป็นร้อยละ 6.67 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง

ที่ระดับความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 100 พบว่าแนวโน้มของอัตราการตายของหอยนางรมปากจิบเพิ่มสูงขึ้น โดยพบอัตราการตายร้อยละ 6.67 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง และอัตราการเพิ่มเป็นร้อยละ 10 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง

อย่างไรก็ดีภายหลังจากทดสอบพิษแบบกึ่งจับปล้นของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำต่อหอยนางรมปากจิบภายใน 96 ชั่วโมง พบว่าอัตราการตายของทุกกลุ่มทดสอบทุกกลุ่มทดสอบต่ำกว่าร้อยละ 50 ทำให้ไม่สามารถคำนวณค่า LC_{50} (50% lethal concentration) หรือ ค่าความเข้มข้นของสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่งภายในระยะเวลาที่กำหนด

4.2 ลักษณะเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจิบ

4.2.1 ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร (stomach tissue)

เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจิบประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชนิด pseudostratified ciliated columnar epithelium ดังแสดงในภาพที่ 4-2 เป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิดที่ประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกสูง ตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane) เซลล์เรียงตัวชั้นเดียว แต่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์มีหลายชั้นเนื่องจากเซลล์อยู่ชิดกันมากและเซลล์มีความยาวมากทำให้เบียดกันจนดูเหมือนมีหลายชั้น ตำแหน่งของเซลล์บริเวณฐานจะยึดติดกับเยื่อฐานซึ่งกั้นระหว่างตัวเซลล์กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ส่วนปลายของเซลล์อยู่ติดกับท่อ (lumen) ด้านปลายของเซลล์ที่ติดกับท่อพบซิเลียทำหน้าที่ช่วยโบกพัดอาหารที่เข้าสู่กระเพาะอาหาร นอกจากนี้ยังพบเซลล์สร้างเมือกแทรกกระจายอยู่ทั่วไปในเยื่อบุผิวบริเวณกระเพาะอาหาร ความยาวของเซลล์จะยาวมากเมื่อเทียบกับเซลล์เยื่อบุผิวบริเวณลำไส้ นอกจากนี้ยังพบลักษณะรอยหยักและโค้งเว้าในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารซึ่งคล้ายกับลักษณะของ rugae ที่พบในสัตว์อื่น ๆ เพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ของกระเพาะอาหารเมื่อมีการกินอาหาร

4.2.2 ลักษณะเนื้อเยื่อลำไส้ (intestine tissue)

เนื้อเยื่อลำไส้มีลักษณะเนื้อเยื่อบุผิวชนิด psuedostratified ciliated columnar epithelium มีลักษณะเป็นทรงกระบอกสูงอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane) ดังแสดงในภาพที่ 4-3 ที่เชื่อมติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน บริเวณปลายของเนื้อเยื่อบุผิวด้านติดกับลูเมนจะพบซิเลีย ภายในมีเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเมือกแทรกตัวอยู่ ลักษณะเนื้อเยื่อที่พบในลำไส้จะคล้ายกับที่พบในกระเพาะอาหาร แต่ตำแหน่งของลำไส้กับกระเพาะอาหารจะแตกต่างกัน และความยาวของเซลล์จะน้อยกว่า ทำให้เห็นชั้นเนื้อเยื่อบุผิวบางกว่า

4.2.3 ลักษณะเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหาร (digestive gland)

ต่อมย่อยอาหารเป็นอวัยวะที่อยู่ล้อมรอบกระเพาะอาหาร ทำหน้าที่สร้างน้ำย่อยเพื่อย่อยอาหารที่เข้าสู่กระเพาะอาหาร การย่อยจัดเป็นการย่อยภายในเซลล์ (intracellular digestion) โครงสร้างของต่อมย่อยอาหารจะประกอบด้วย ท่อแขนงขนาดเล็กที่แตกแขนงออกไปเรื่อย ๆ และปลายท่อตันมีลักษณะเป็นกระเปาะ เรียกว่า digestive diverticulum ต่อมย่อยอาหารจะแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อที่พบบริเวณต่อมย่อยอาหาร มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียวมีเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบ 2 แบบ ได้แก่ (1) digestive cell มีลักษณะเซลล์รูปทรงกระบอกสูง และ (2) basophilic cell เป็นเซลล์ทรงเตี้ยที่พบนิวเคลียสย้อมติดสีเบสหรือสีฮีมาท็อกไซลินเข้มมาก กลุ่มเซลล์กระจกรวมกันอยู่บนเยื่อฐาน หรือ basement membrane ดังแสดงในภาพที่ 4-4

เนื่องจากเซลล์ที่พบในท่อทั้งสองกลุ่มมีความสูงไม่เท่ากัน การเรียงตัวของเซลล์ทั้งสองกลุ่มภายในท่อทำให้เกิดรูปร่างเป็นแฉกขึ้น เนื่องจากกลุ่มของ basophilic cell เป็นเซลล์รูปร่างคล้ายปิรามิด (pyramidal shape) มีลักษณะฐานของเซลล์ใหญ่ส่วนปลายเซลล์เล็กและพบซิเลียด้านที่ติดกับท่อ เซลล์ปิรามิดนี้จะล้อมติดสีฮีมาท็อกไซลินซึ่งเป็นสีที่มีคุณสมบัติเป็นเบสเห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม (basophilic cell) ซึ่ง basophilic cell จะมีลักษณะเด่นคือติดสีน้ำเงินเข้มมากอยู่ติดกันเป็นกลุ่มที่ฐานของท่อ นิวเคลียสค่อนข้างแบนไปทางฐานของเซลล์ ส่วน digestive cell จะเป็นเซลล์ทรงกระบอกสูง เมื่อเซลล์กลุ่มนี้อยู่รวมกันทำให้ชั้นเยื่อบุผิวหนาขึ้น digestive cell มีหน้าที่สำคัญคือย่อยอาหารที่เข้าสู่ต่อมย่อยอาหาร ส่วน basophilic cell ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน คาดว่าอาจจะแบ่งตัวเพื่อสร้าง digestive cell หรืออาจตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน

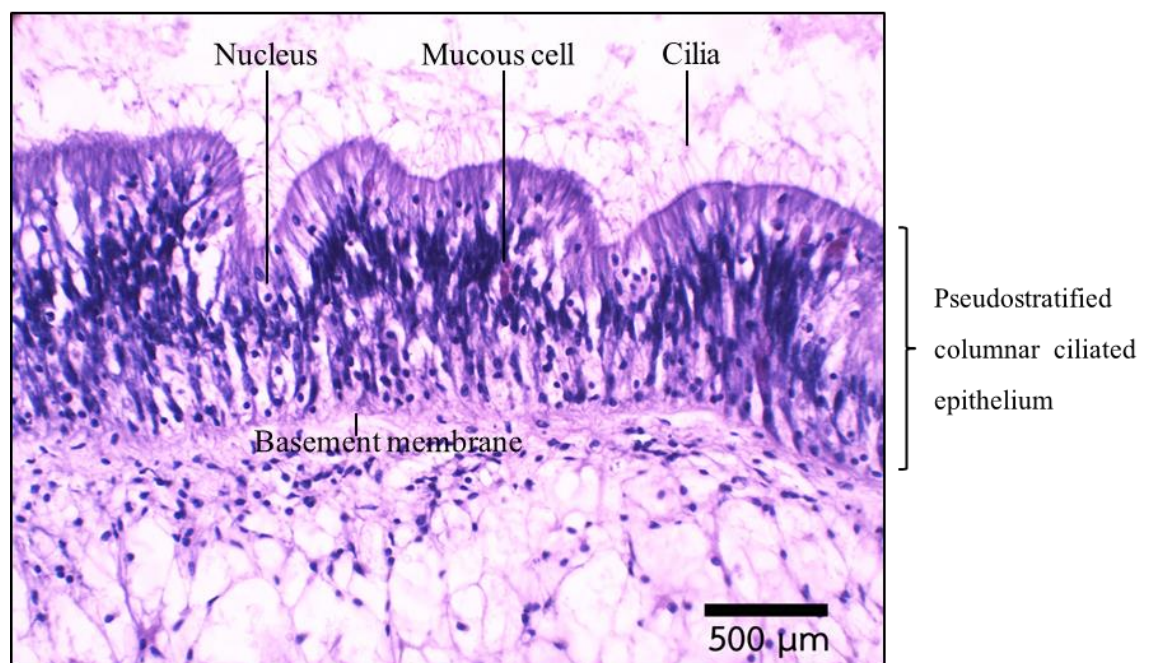
4.2.4 ลักษณะเนื้อเยื่อแมนเทิล (mantle)

เมื่อเปิดเปลือกหอยเข้าไปด้านในจะพบส่วนของแมนเทิลซึ่งเป็นโครงสร้างที่ปกคลุมตัวหอยทั้งหมด แมนเทิลมีหน้าที่หลักในการสร้างเปลือก การหายใจ และการสร้างเมือกคลุมตัว จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคมิวทิวทยาพบว่าแมนเทิลประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียวตั้งอยู่บนเยื่อฐานใต้เยื่อฐานพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ซึ่งมีช่องว่างเป็นแองเกล็ดขนาดเล็ก (blood

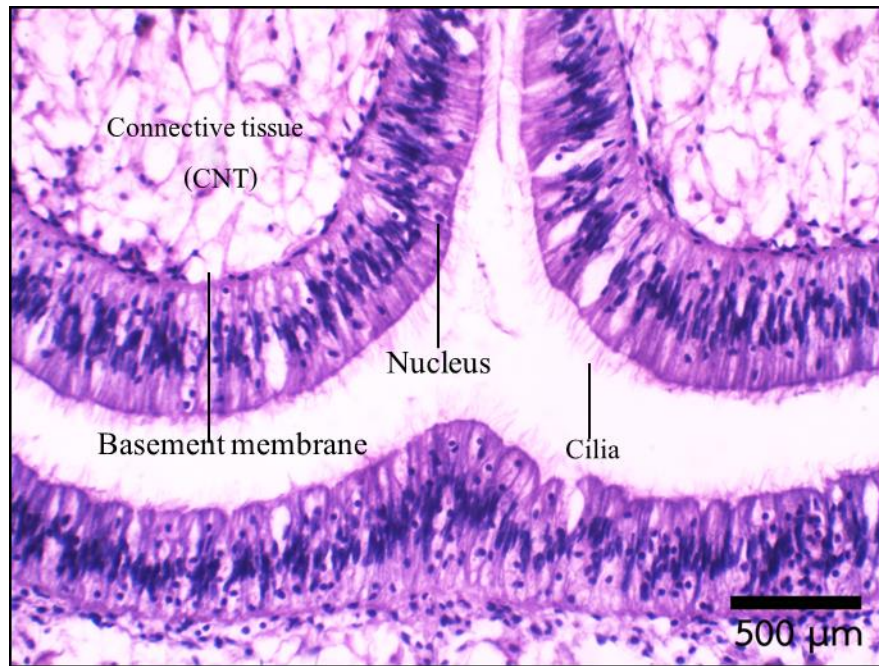
sinus) กระจายอยู่ทั่วไป สามารถพบเม็ดเลือดได้ทั่วไปในแอ่งเลือด ลักษณะของเยื่อผิวที่พบเป็นแบบ simple cuboidal epithelium เป็นเซลล์ทรงลูกบาศก์ไม่พบซิเลียที่ผิวด้านที่ผิวด้านนอก พบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) แทรกกระจายอยู่ทั่วไป ดังแสดงในภาพที่ 4-5

4.2.5 ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือก (gill tissue)

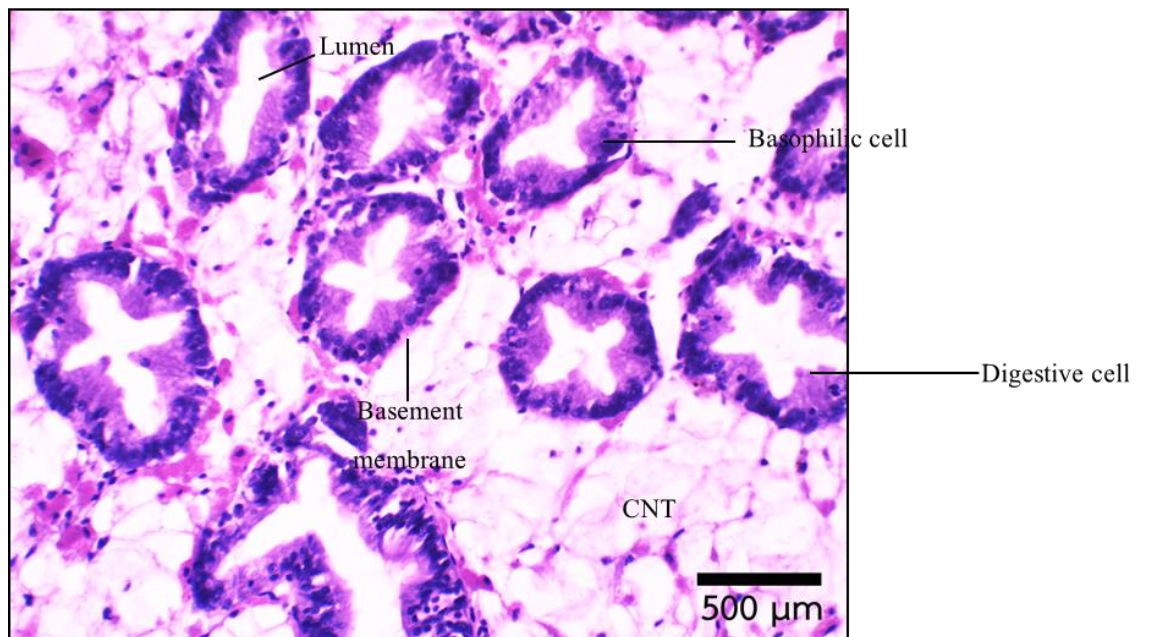
เหงือกของหอยนางรมปากจิบ ทำหน้าที่กรองอาหารที่มีขนาดเล็กและส่งเข้าสู่ช่องปาก ส่วนของเหงือกจะพบ plica ซึ่งเป็นส่วนของ principle filament ที่มีการพับตัวเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับแลกเปลี่ยนก๊าซ เซลล์เยื่อผิวที่พบในเหงือกมีการเรียงตัวเพียงชั้นเดียวและชั้นของเซลล์ไม่หนา ลักษณะดังกล่าวเอื้อต่อการทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างเลือดที่ไหลเวียนเข้าสู่เหงือกกับน้ำทะเลที่ไหลผ่านเหงือก ปลายของเซลล์เยื่อผิวด้านนอกจะพบซิเลียเรียงตัวอยู่ล้อมรอบ ในชั้นเยื่อผิวยังพบเซลล์สร้างเมือกแทรกอยู่เป็นระยะ ดังแสดงในภาพที่ 4-6



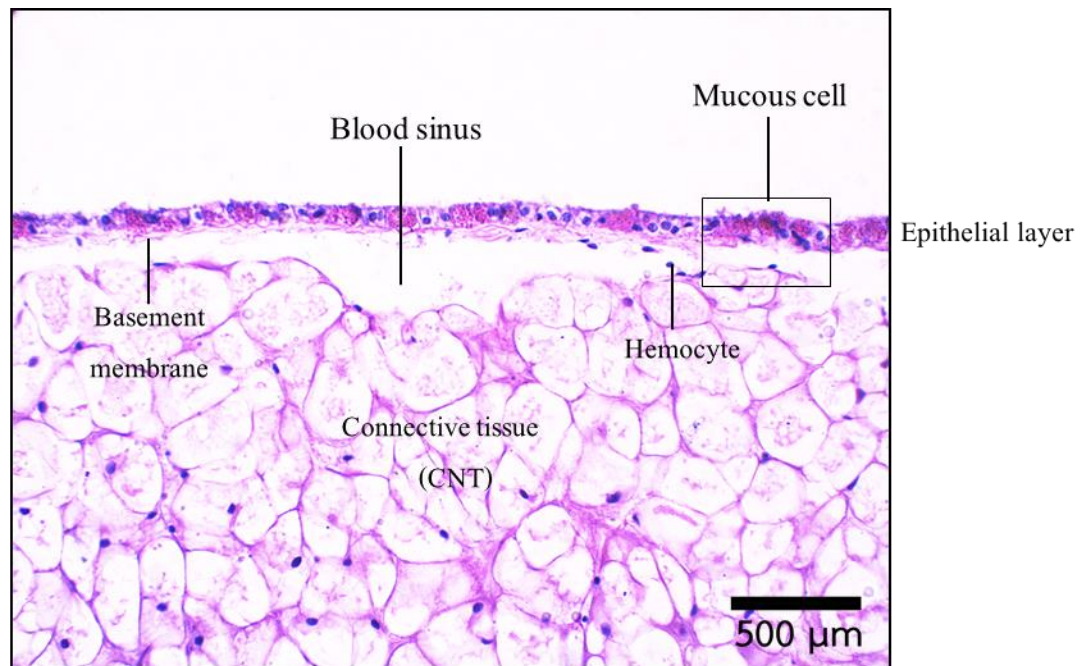
ภาพที่ 4-2 ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจิบ (กำลังขยาย 400 เท่า)



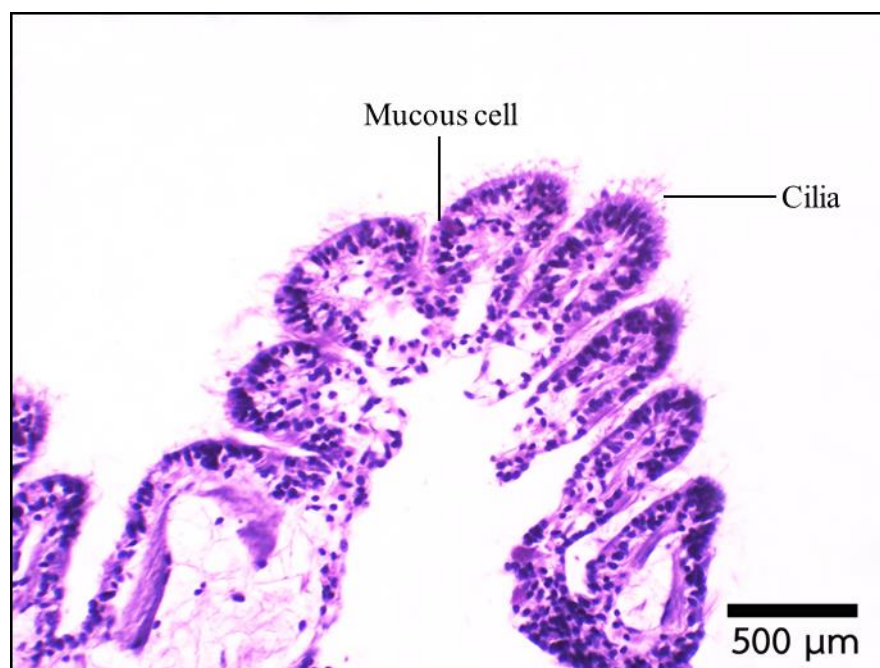
ภาพที่ 4-3 ลักษณะเนื้อเยื่อลำไส้ของหอยนางรมปากจืบ (กำลังขยาย 400 เท่า)



ภาพที่ 4-4 ลักษณะเนื้อเยื่อเชื่อมต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจืบ (กำลังขยาย 400 เท่า)



ภาพที่ 4-5 ลักษณะเนื้อเยื่อเมทิลของหอยนางรมปากจیب (กำลังขยาย 400 เท่า)



ภาพที่ 4-6 ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจیب (กำลังขยาย 400 เท่า)

4.3 ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจیب

การศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจیب ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลกระทบในเนื้อเยื่อ 5 อยัวะะ ได้แก่ ภาวะอาหาร เนื้อเยื่อลำไส้ ต่อมย่อยอาหาร แมนเทิล และเหงือก โดยใช้เทคนิคมิวชันวิทยา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรม ทำให้เกิดลักษณะผิดปกติขึ้นในหลายระบบ โดยผลกระทบต่อเนื้อเยื่อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาทดสอบ และตามความเข้มข้นที่หอยได้รับ สัมผัสกับน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ

การศึกษารั้งนี้ผู้วิจัยแสดงผลการศึกษาเนื้อเยื่อในชั่วโมงที่ 24 และ 96 เนื่องจากภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบอัตราการตายของหอยนางรมในทุกกลุ่มทดสอบ แม้ว่าหอยนางรมจะได้รับสัมผัสน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 100 % จึงเป็นที่น่าสนใจว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่พบอัตราการตายเลย จะมีผลกระทบต่อระบบเนื้อเยื่อหรือไม่ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจอีกว่าเมื่อทำการทดสอบเป็นระยะเวลานาน 96 ชั่วโมง พบอัตราการตายเพิ่มขึ้นแต่ประชากรส่วนใหญ่ยังสามารถรอดชีวิตอยู่ จึงอยากทราบว่าน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่ออย่างไร

4.3.1 ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ (WAF) ต่อเนื้อเยื่อภาวะอาหาร

ภายหลังการทดสอบเลี้ยงหอยนางรมในสภาวะปนเปื้อน WAF พบว่า WAF กระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์สร้างเมือกในภาวะอาหารเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสัมผัสน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4-7 โดยพบจำนวนของเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่หอยนางรมสัมผัสกับ WAF

ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบเซลล์สร้างเมือกมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สังเกตได้จากเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อผิวหนังดังแสดงในภาพที่ 4-8 การสร้างเซลล์สร้างเมือกเพื่อหุ้มเมือกออกมาคลุมผิวภาวะอาหารซึ่งเป็นกลไกการแสดงออก ระดับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นเพื่อเป็นการป้องกันอันตรายจากสารพิษในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การศึกษาด้วยเทคนิค semi-thin section และย้อมด้วยสี methylene blue ยังแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่อยู่บนผิวเซลล์ด้านที่ติดกับ lumen ล้นลง ดังแสดงในภาพที่ 4-8 ลักษณะดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อหน้าที่ของภาวะอาหารโดยตรง

4.3.2 ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ (WAF) ต่อเนื้อเยื่อลำไส้

ผลการศึกษาในเนื้อเยื่อลำไส้พบว่าน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างเนื้อเยื่อภายในลำไส้มากนัก พบลักษณะของเนื้อเยื่อในกลุ่มทดสอบคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อในกลุ่ม

ควบคุมที่ได้รับ WAF เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-9 ยกเว้นในกลุ่มที่ได้รับสัมผัส น้ำมันที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 100 % ที่สามารถสังเกตว่าเซลล์ที่พบบริเวณ lumen สั้นลง ดังแสดงในภาพที่ 4-9 D

ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า WAF กระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถสังเกตได้ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสน้ำมันที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 % ดังแสดงในภาพที่ 4-10 D และ E

4.3.3 ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ (WAF) ต่อเนื้อเยื่อของต่อมย่อยอาหาร

จากการศึกษาเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสัมผัสกับ WAF เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า WAF ส่งผลต่อโครงสร้างของเซลล์เยื่อบุผิวที่พบใน digestive diverticulum ของต่อมย่อยอาหาร ทำให้ความสูงของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อบุผิวลดลง ลักษณะดังกล่าวทำให้สังเกตเห็นชั้นของเยื่อบุผิวบางลง สังเกตได้จากท่อของ digestive diverticulum มีลักษณะเป็นรูกว้างขึ้น แฉกภายในต่อมย่อยอาหารเริ่มหายไป ความรุนแรงของอาการเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ WAF ดังแสดงในภาพที่ 4-11

ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสัมผัส WAF เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะพบความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ WAF ที่ใช้ในการทดสอบ โดยสามารถสังเกตเห็นลักษณะเยื่อบุผิวบางลงได้อย่างชัดเจน จนไม่เห็นลักษณะแฉกกลางท่อ และทำให้เห็นท่อมีขนาดกว้างขึ้นอย่างมาก ดังแสดงในภาพที่ 4-12 D (ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซูลินและอีโอซิน) และ ภาพที่ 4-1 D (ย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู) เป็นตัวอย่างในกลุ่มที่ได้รับการสัมผัส WAF 100 % เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวภายในท่อ digestive diverticulum บางลงมากจนนิวเคลียสชิดขอบของท่อ เกิดเป็นพื้นที่ว่างขนาดใหญ่กลางท่อ ลักษณะดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบสร้างเอนไซม์ย่อยอาหารของหอยนางรม ที่ได้รับสัมผัส WAF นอกจากนี้แล้วยังพบว่า basophilic cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมาก สังเกตได้จากเซลล์ที่ติดสีม่วงบริเวณท่อมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และจำนวน digestive cell ลดลง

4.3.4 ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ (WAF) ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิล

ผลการทดสอบพบว่าน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้นอย่างมีความสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-10) จำนวนของเซลล์สร้างเมือกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 % สามารถพบลักษณะผิดปกติได้เพิ่มขึ้น คือ พบลักษณะช่องว่างขนาดใหญ่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์ในเนื้อเยื่อบุผิว ลักษณะ

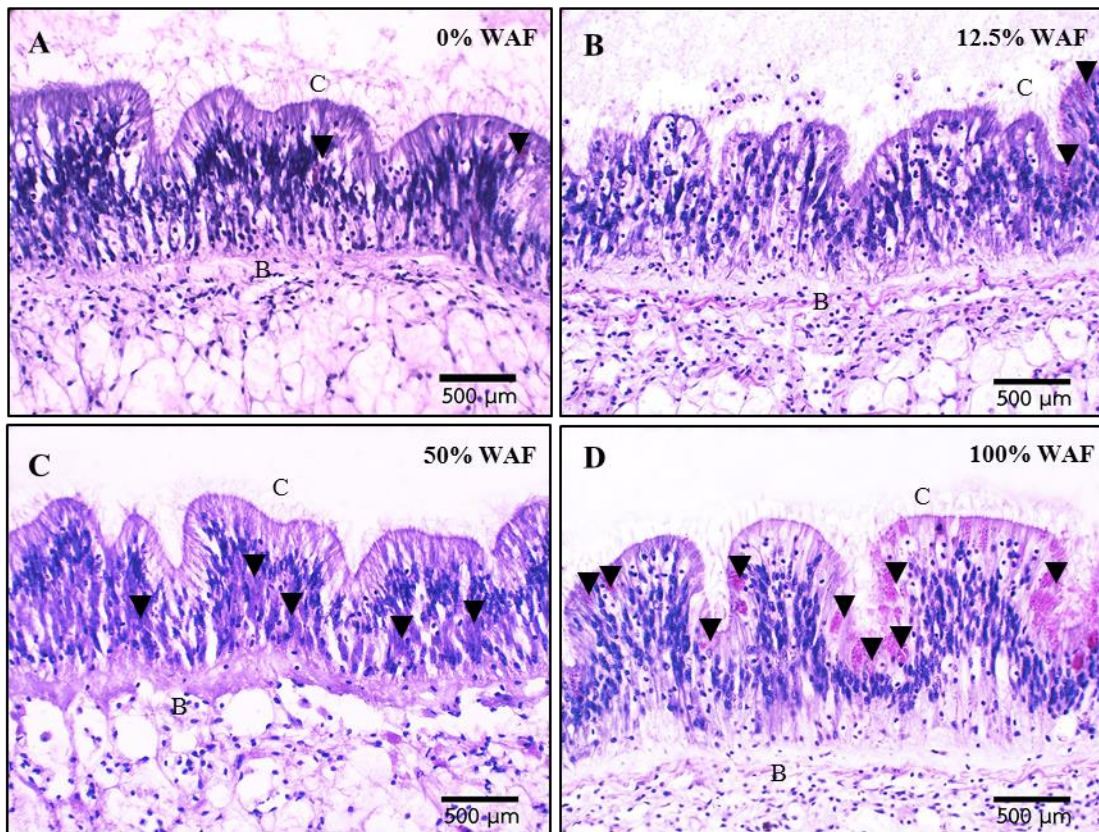
ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเกิดการแทรกตัวของเม็ดเลือด (hemocyte infiltration) เข้าไปในชั้นเยื่อบุผิว อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อมีขนาดเล็กลง

ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบความผิดปกติในกลุ่มทดสอบมากขึ้น โดยความรุนแรงจะเพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพที่ 4-11 และ ภาพที่ 4-12) เนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیبที่ได้รับสัมผัสกับน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้น 50% และ 100% สามารถพบจำนวนเซลล์สร้างเมือกที่บริเวณเยื่อบุผิวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4-11 D และ E) อีกทั้งยังพบการแทรกตัวของเม็ดเลือด ในเนื้อเยื่อบุผิวของแมนเทิลเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบอาการผิดปกติในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นในกลุ่มทดสอบ โดยพบว่าช่อง blood sinus มีขนาดกว้างขึ้น และสามารถพบเม็ดเลือดจำนวนมากภายในช่อง blood sinus อีกด้วย (ภาพที่ 4-11 C-E) ซึ่งความรุนแรงของอาการเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ใช้ในการทดสอบ

4.3.5 ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ (WAF) ต่อเนื้อเยื่อของเหงือก

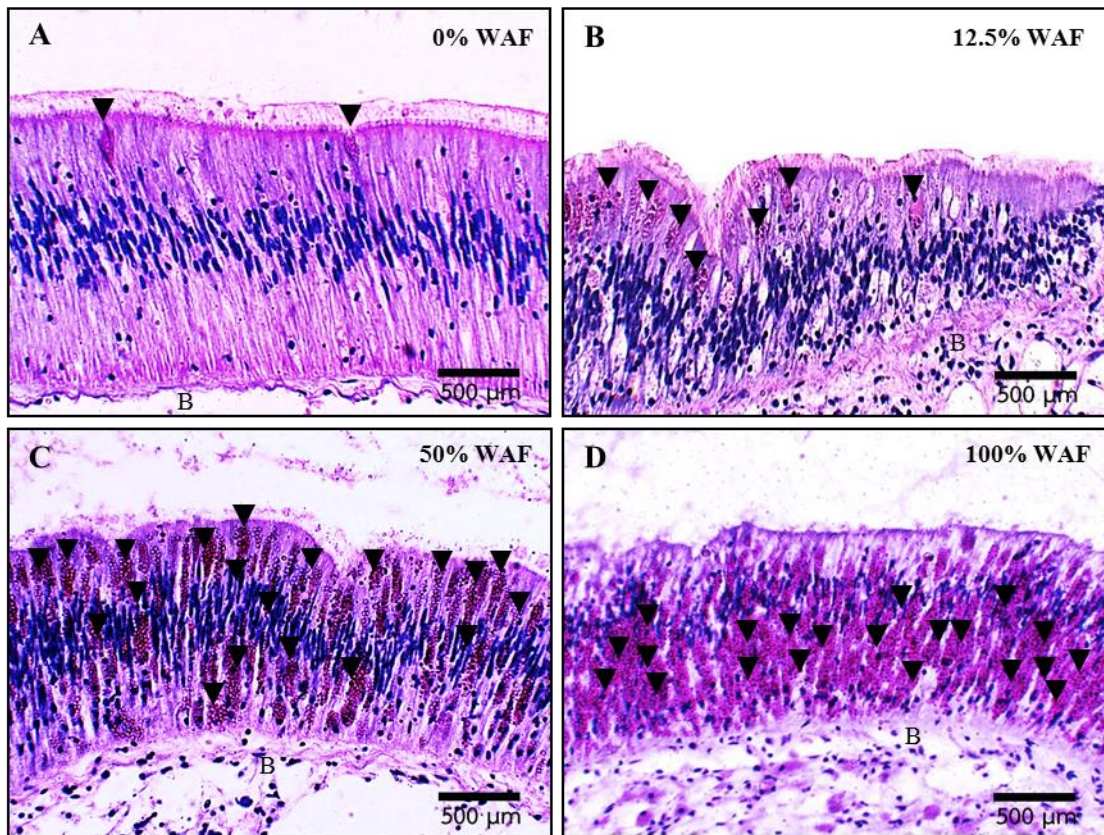
ผลการทดสอบพบว่าน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำกระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างเมือกในเหงือกของหอยนางรมปากจیب โดยพบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-13) พบเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสัมผัสน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 %

ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-14 และ ภาพที่ 14-15) พบลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสัมผัสน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 % (ภาพที่ 4-14 D และ E) โดยนอกจากจะพบว่าการสร้างเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้นอย่างมากแล้ว ยังพบการแทรกตัวของเม็ดเลือด (hemocyte infiltration) เข้าไปในชั้นเยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อบุผิวของเหงือกอีกด้วย โดยสังเกตได้จากเกิดช่องว่างขนาดใหญ่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์เยื่อบุผิว และสามารถพบเซลล์เม็ดเลือดได้ภายในช่องว่างนี้



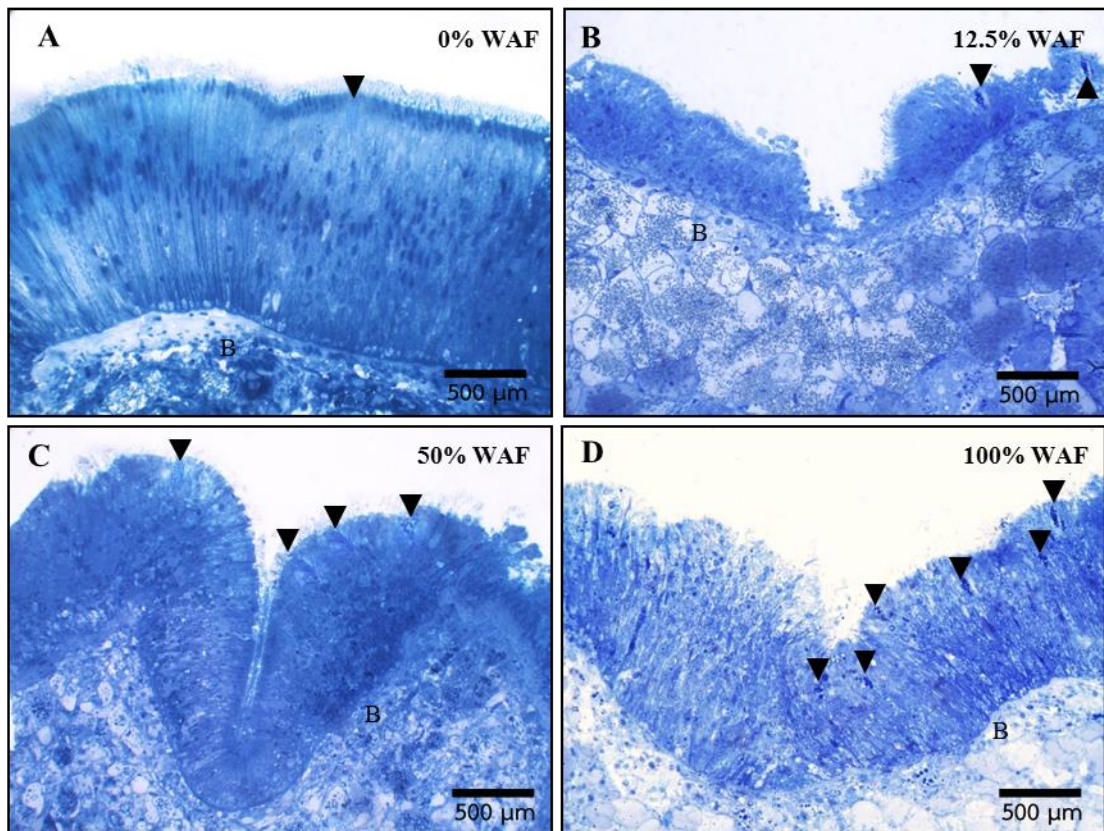
ภาพที่ 4-7 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 24 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก B = เยื่อฐาน (basement membrane) C = ซิลเลีย (cilia) (กำลังขยาย 400 เท่า)

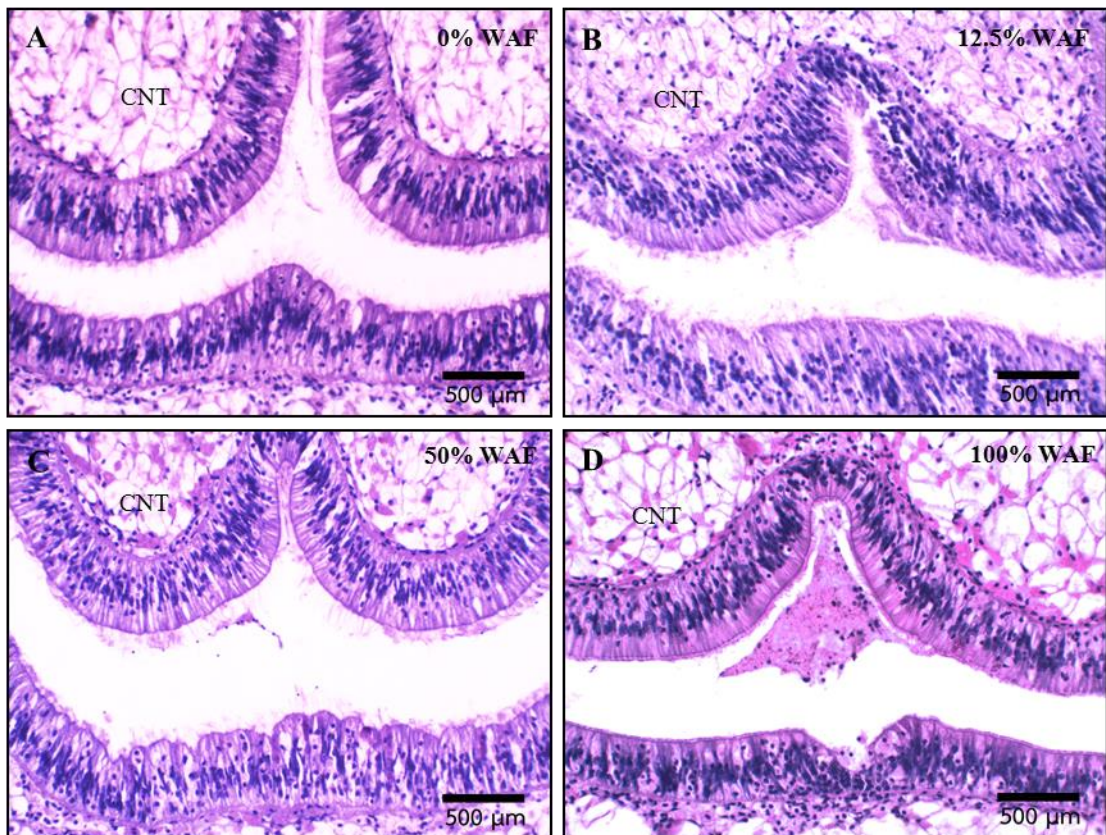


ภาพที่ 4-8 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก B = เยื่อฐาน (basement membrane) (กำลังขยาย 400 เท่า)

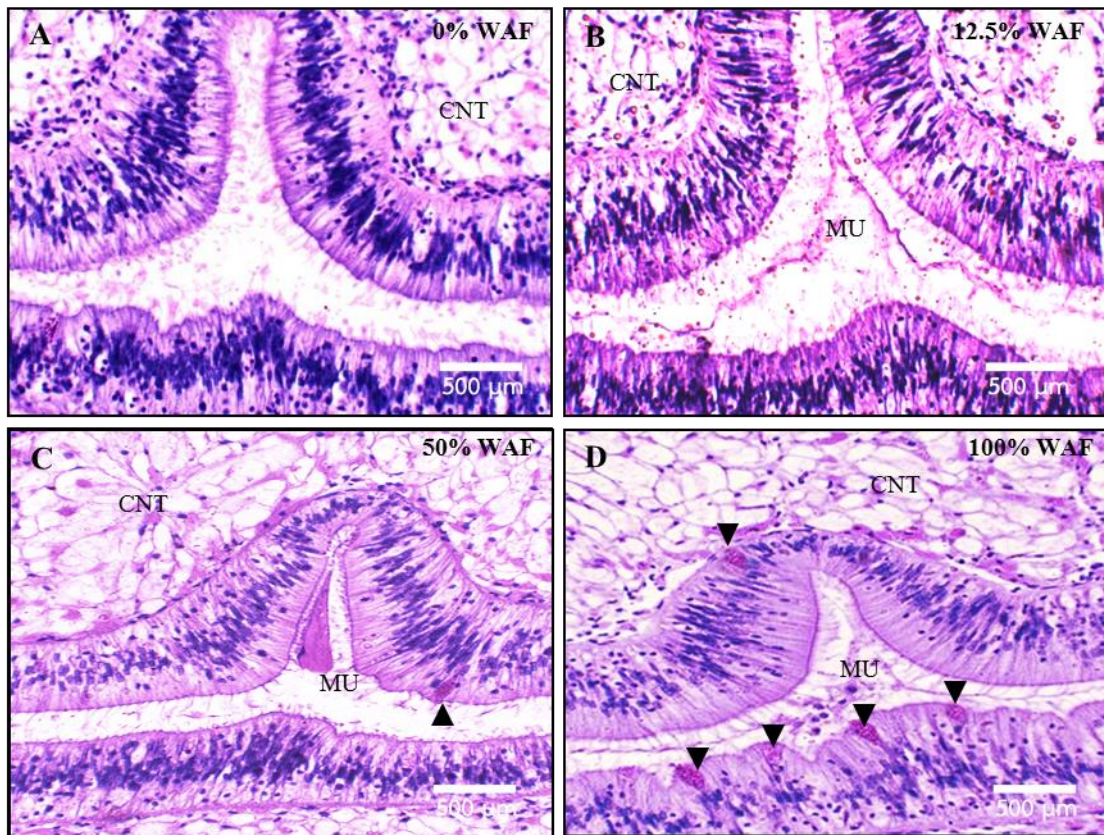


ภาพที่ 4-9 ผล Semi-thin section ของ WAF ต่อเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบ
 กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100
 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก
 B = เยื่อฐาน (basement membrane) (กำลังขยาย 400 เท่า)



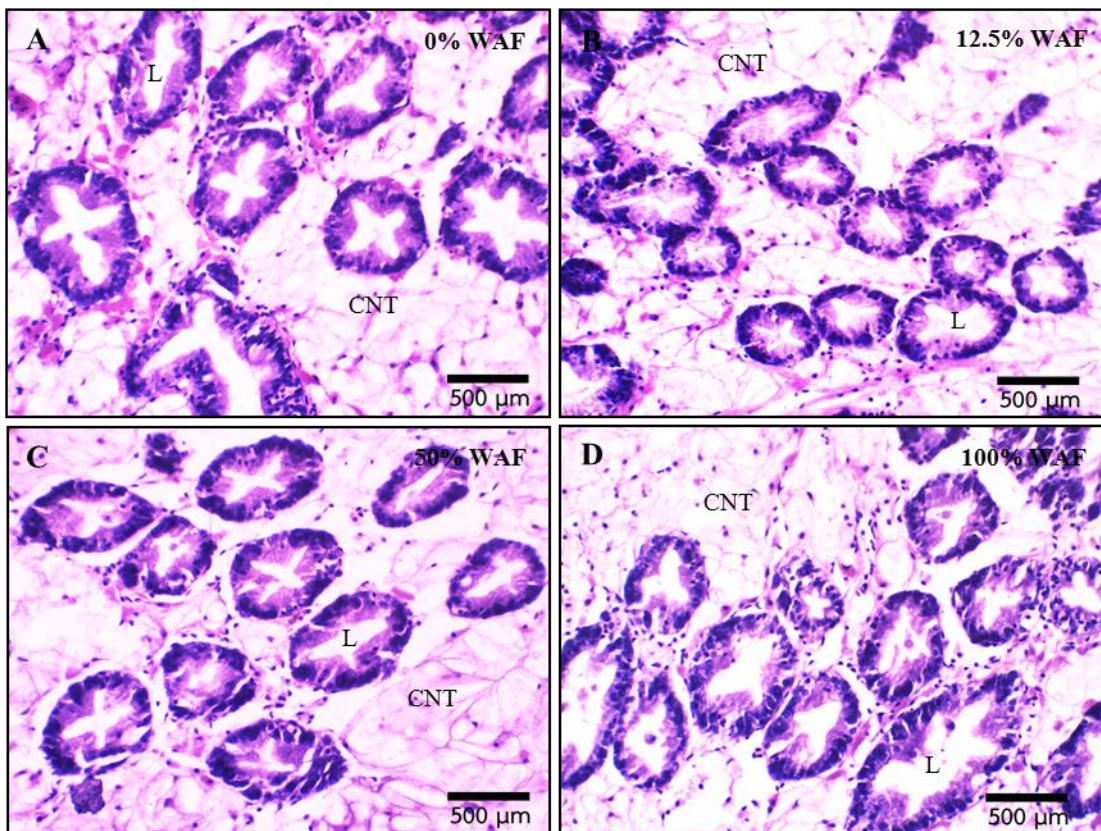
ภาพที่ 4-10 ผลของ WAF ต่อลำไส้ของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 24 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก
CNT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) (กำลังขยาย 400 เท่า)



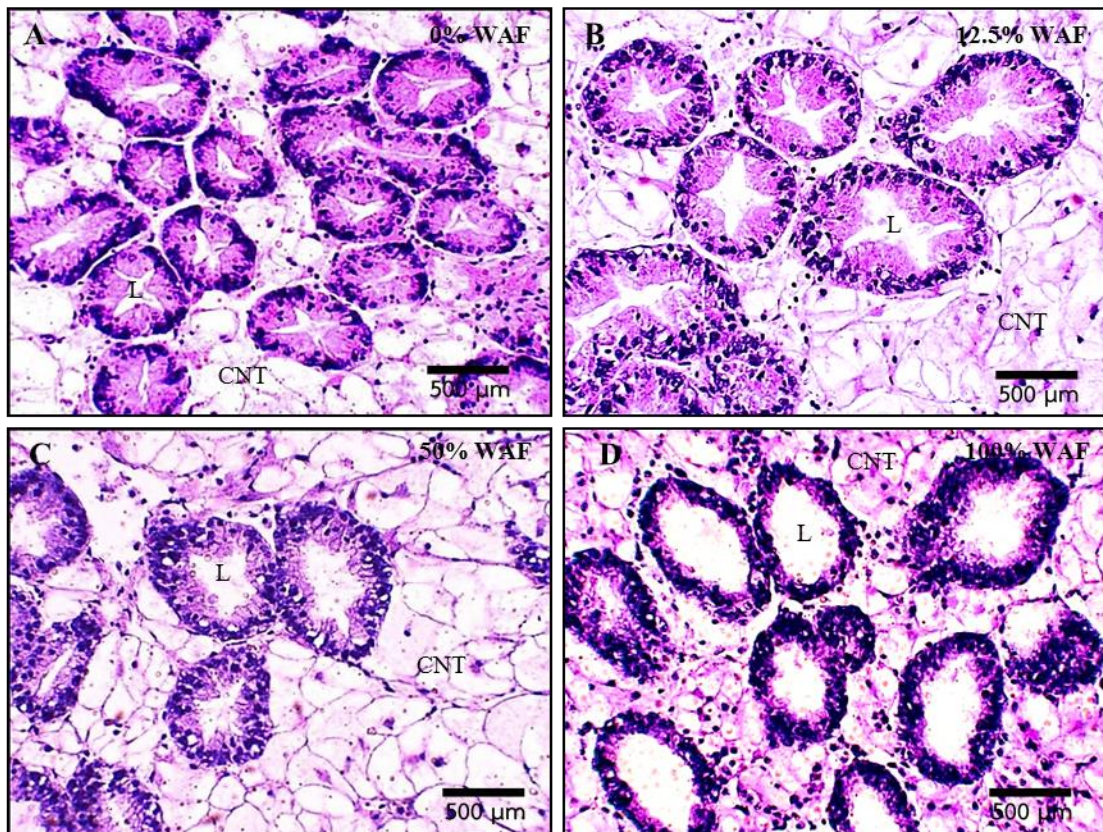
ภาพที่ 4-11 ผลของ WAF ต่อลำไส้ของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก
 CNT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) MU = เซลล์สร้างเมือก (กำลังขยาย 400 เท่า)



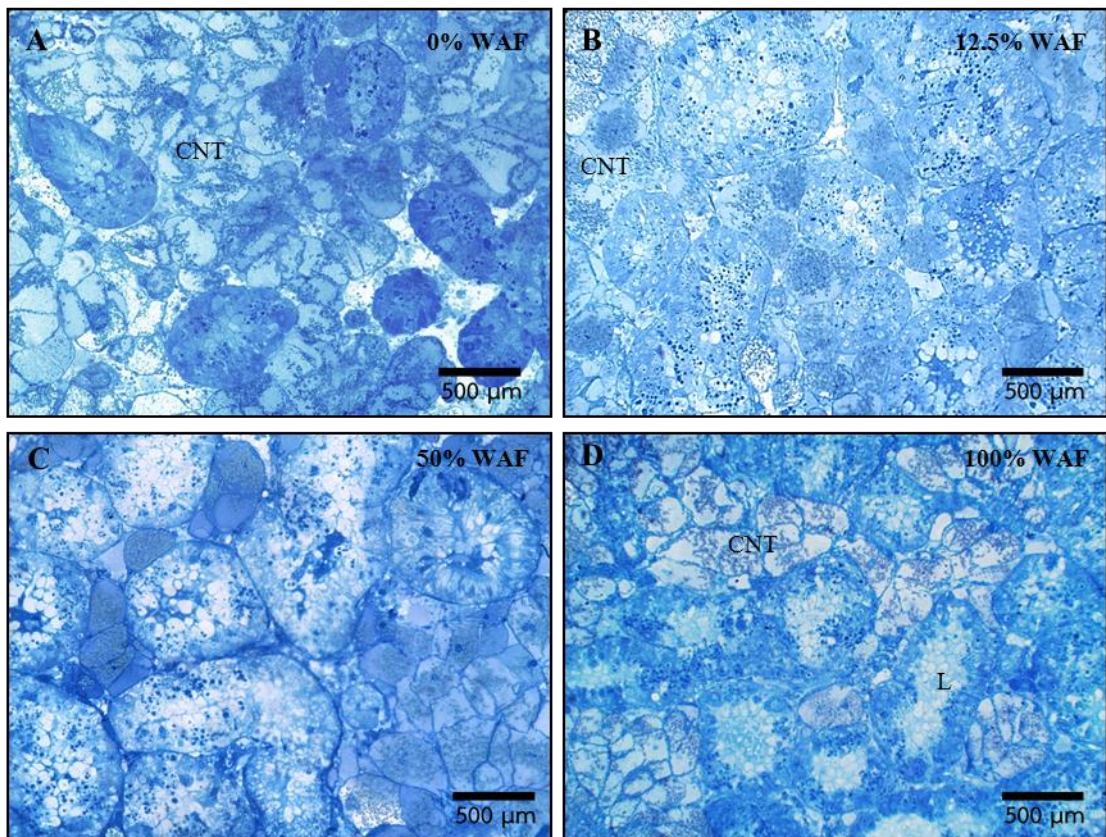
ภาพที่ 4-12 ผลของ WAF ต่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 24 ชั่วโมง CNT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) L = ลูเมน (lumen) (กำลังขยาย 400 เท่า)

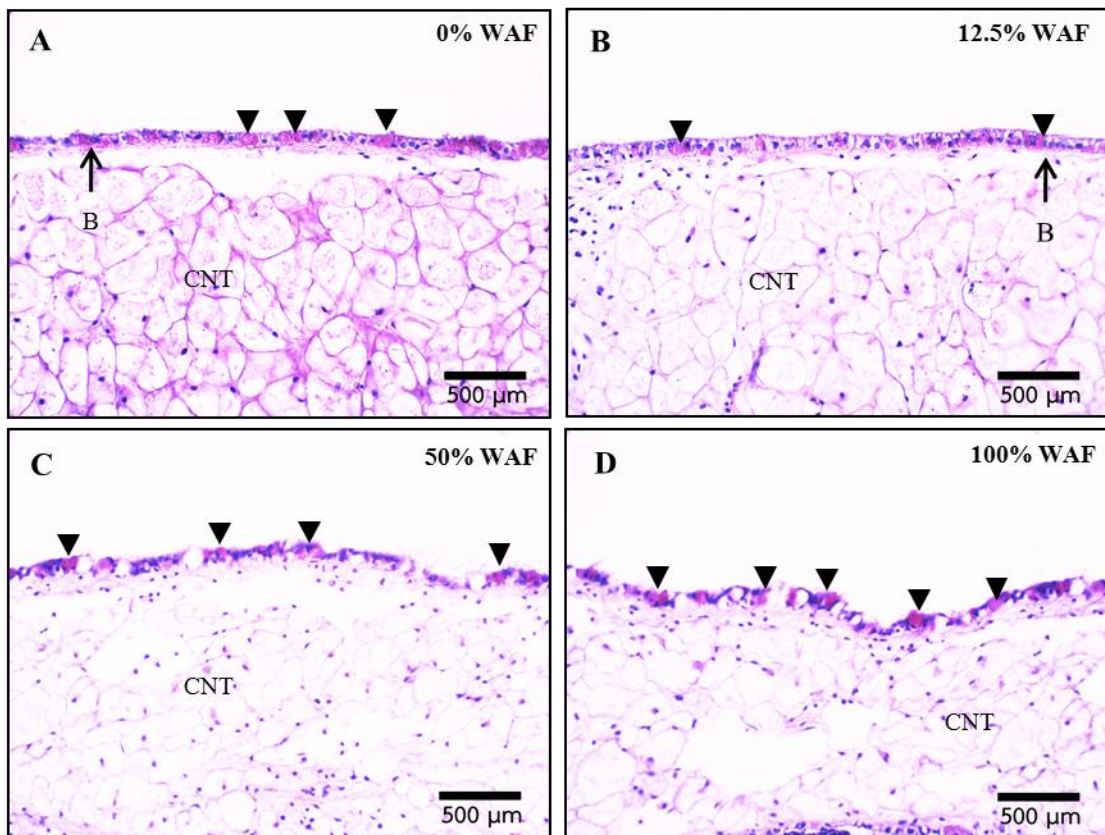


ภาพที่ 4-13 ผลของ WAF ต่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง CNT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) L = ลูเมน (lumen) (กำลังขยาย 400 เท่า)

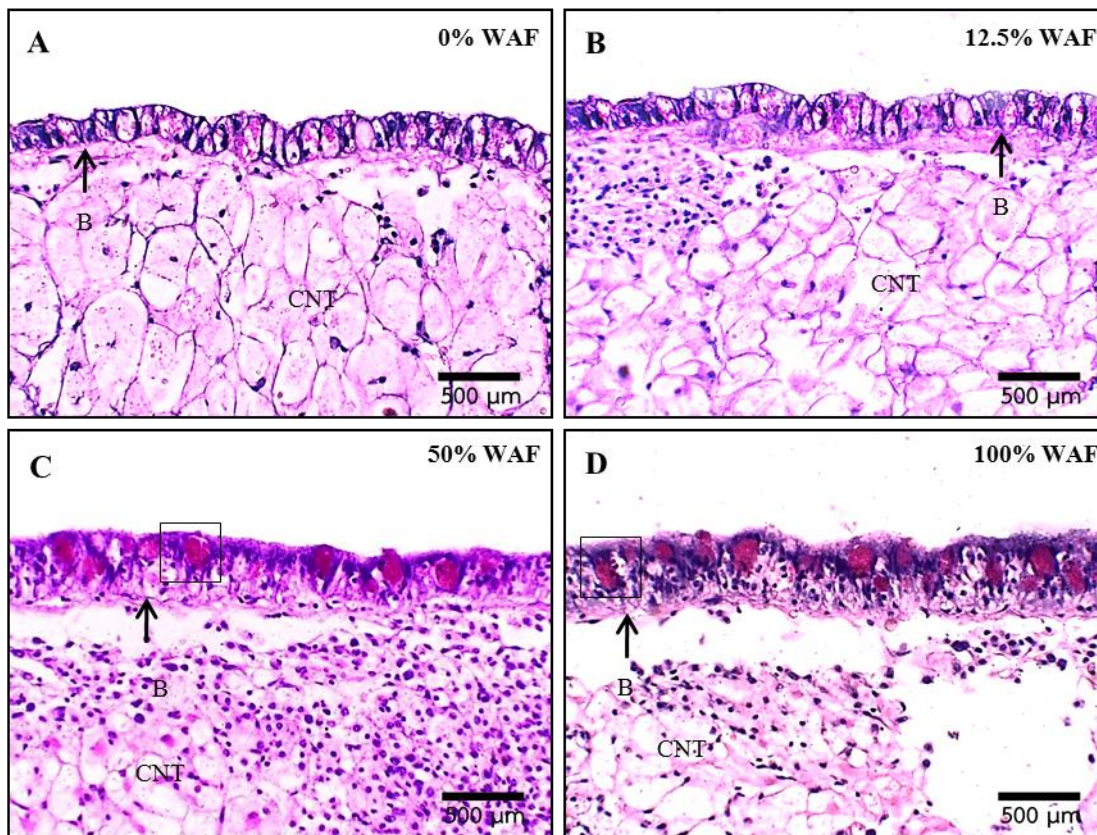


ภาพที่ 4-14 ผล semi-thin section ของ WAF ต่อเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบ
 A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ
 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง CNT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน
 (connective tissue) L = ลูเมน (lumen) (กำลังขยาย 400 เท่า)



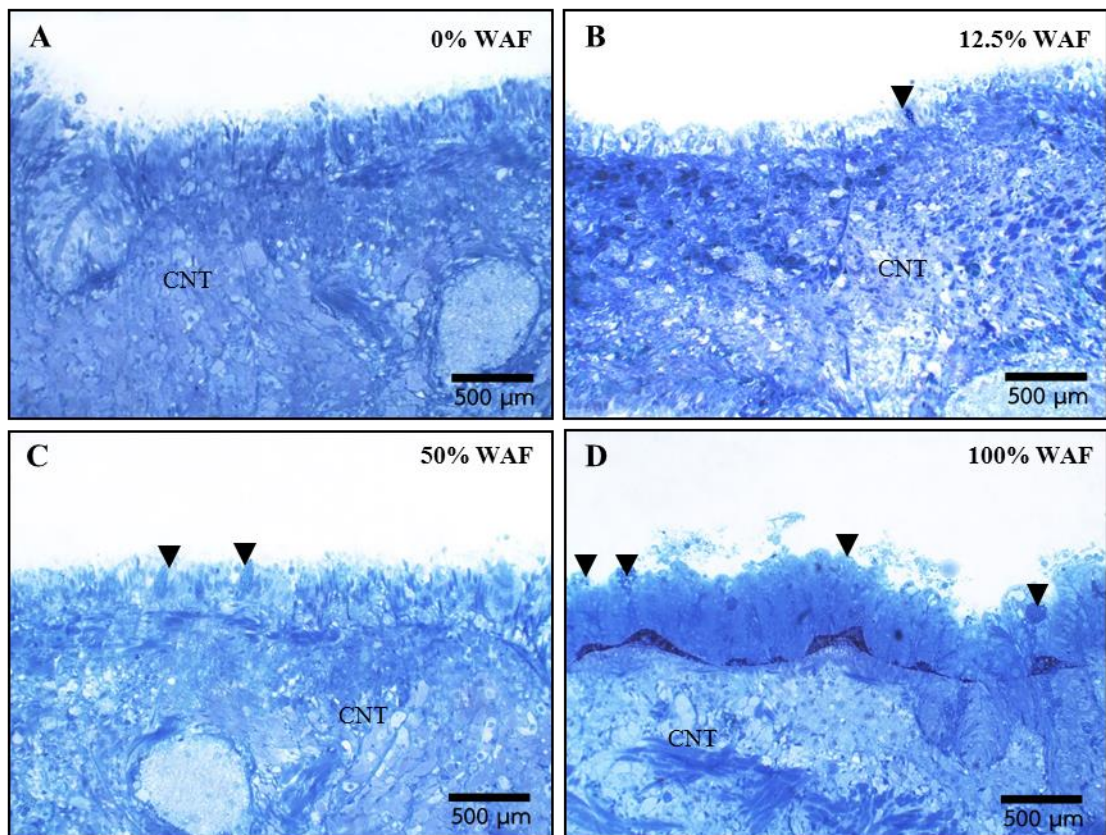
ภาพที่ 4-15 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเมานเทิลของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 24 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก
 CNT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) B = เยื่อฐาน (basement membrane)
 (กำลังขยาย 400 เท่า)



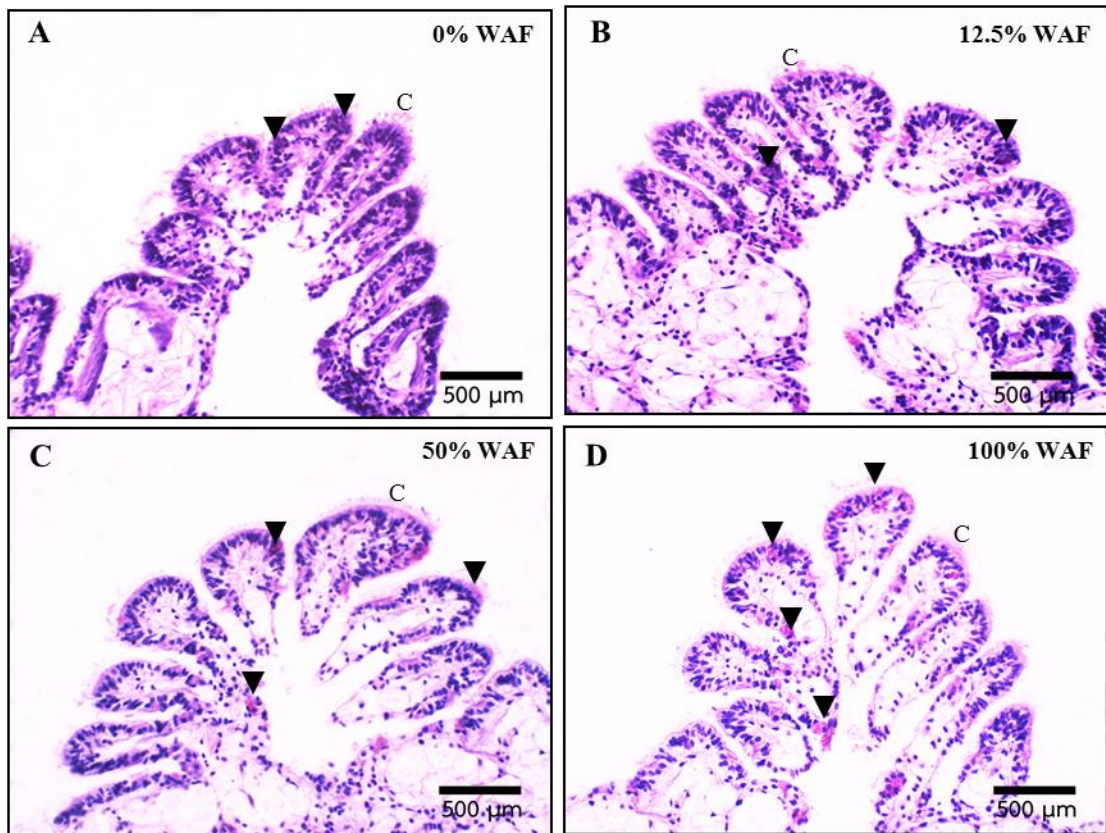
ภาพที่ 4-16 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเมานเทิลของหอยนางรมปากจیب

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง ลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก
 CNT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) B = เยื่อฐาน (basement membrane)
 (กำลังขยาย 400 เท่า)



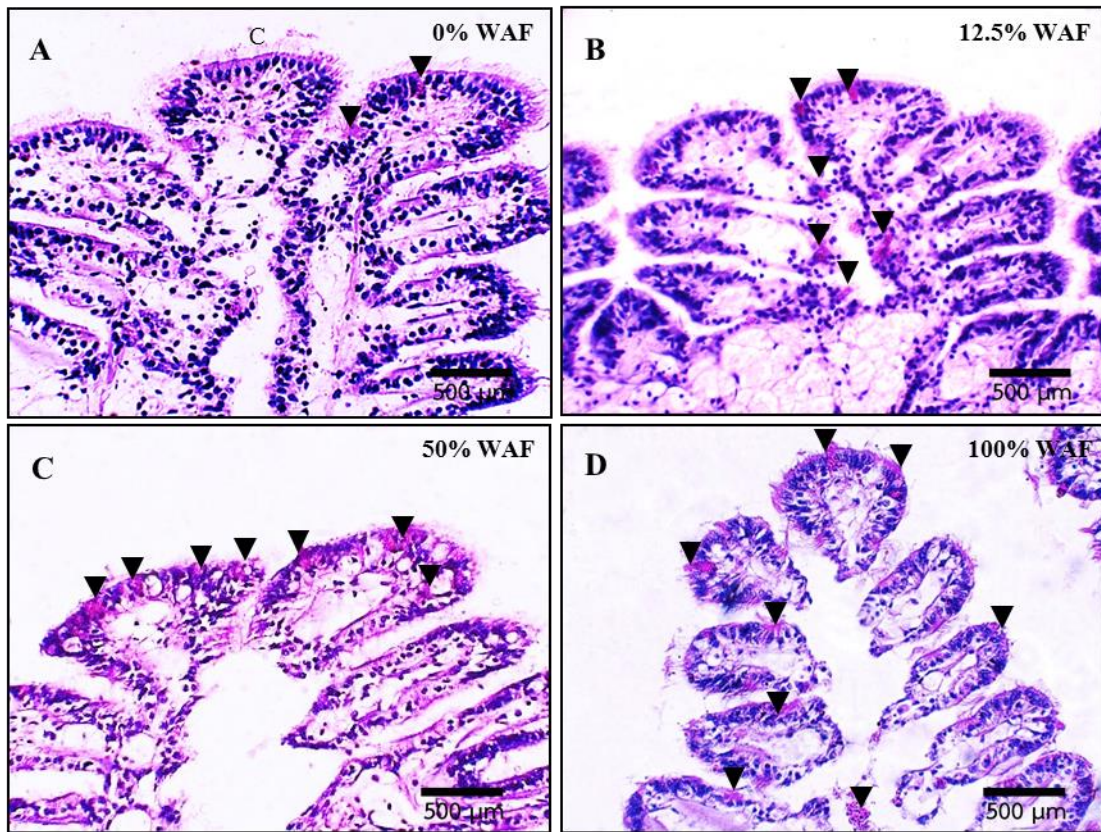
ภาพที่ 4-17 ผล semi-thin section ของ WAF ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก
 CNT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) (กำลังขยาย 400 เท่า)



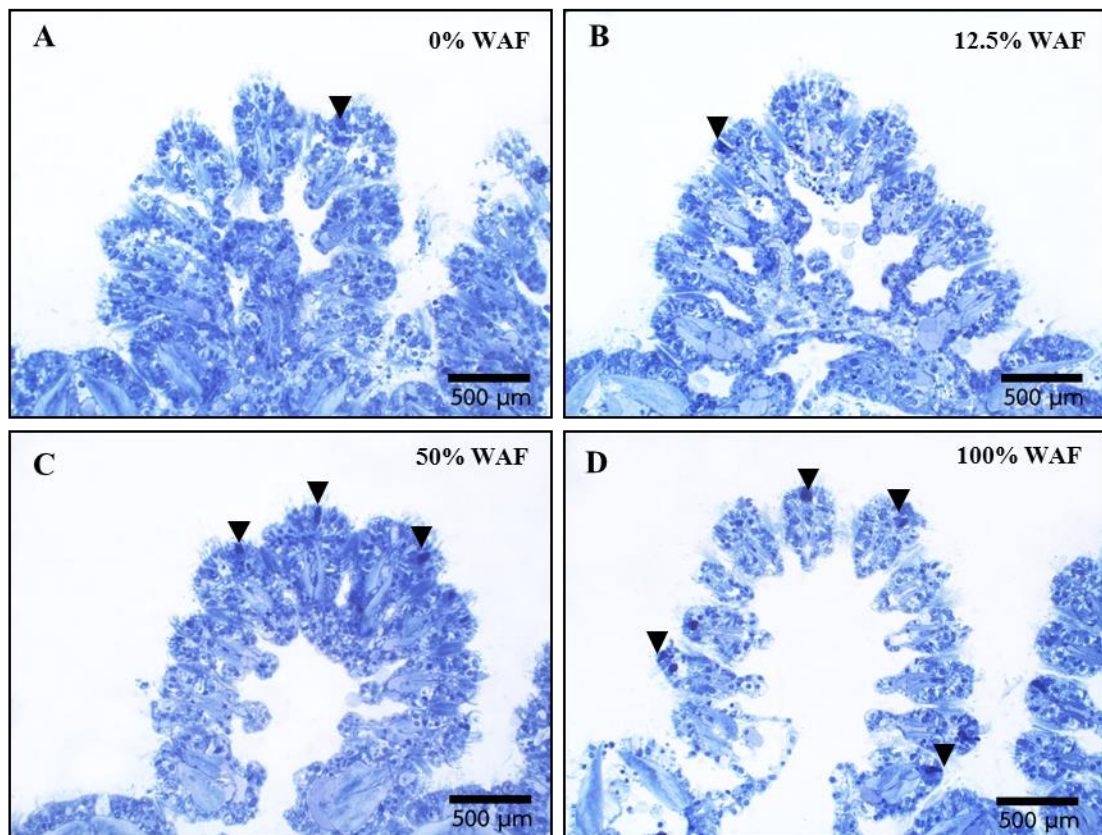
ภาพที่ 4-18 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเยื่อหุ้มของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 24 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก C = ซิเลีย (cilia) (กำลังขยาย 400 เท่า)



ภาพที่ 4-19 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเยื่อหุ้มของหอยนางรมปากจیب

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง หัวดูกสรแสดงเซลล์สร้างเมือก C = ซิเลีย (cilia) (กำลังขยาย 400 เท่า)



ภาพที่ 4-20 ผล semi-thin section ของ WAF ต่อเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจีบ

A กลุ่มควบคุม B C และ D กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง หัวลูกศรแสดงเซลล์สร้างเมือก (กำลังขยาย 400 เท่า)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการศึกษา

5.1.1 ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจیب

การทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำ (WAF) ต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจیب โดยใช้ความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 0, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ใช้เวลาทดสอบ 96 ชั่วโมง พบอัตราการตายของหอยนางรมปากจیبจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ WAF และระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ในการศึกษากครั้งนี้พบว่าอัตราการตายของหอยนางรมต่ำไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} ได้ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ WAF ตั้งแต่ร้อยละ 12.5 ลงมา ไม่พบอัตราการตาย แม้จะใช้ระยะเวลาการทดสอบ 96 ชั่วโมง และเริ่มพบอัตราการตายที่ระดับความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 25 พบอัตราการตายร้อยละ 3.33 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และอัตราการเพิ่มเป็นร้อยละ 6.67 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Agamy (2013a) ที่ได้ศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำของน้ำมันดิบอะเรเบียนชนิดเบา ในปลาสลิคทะเล (*Siganus canaliculatus*) ตัวเต็มวัย บริเวณอ่าวอะเรเบียน โดยใช้ความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 0, 6, 10 และ 20 ในระยะเวลา 21 ชั่วโมง พบว่าน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำส่งผลกระทบต่ออัตราการตายในปลาสลิคทะเล โดยอัตราการตายเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ WAF และเวลาที่ใช้ในการทดสอบ เริ่มพบอัตราการตายที่ระดับความเข้มข้น 6% WAF ภายในระยะเวลา 9 ชั่วโมงหลังการทดสอบ ก็สามารถทำให้ปลาตายได้

เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการตายในหอยนางรมปากจیبจากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำเกิดผลกระทบในปลารุนแรงกว่าในหอยนางรม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในธรรมชาติหอยนางรมเป็นสัตว์ที่ไม่เคลื่อนที่ (sessile) หากมีการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อมจะไม่สามารถเคลื่อนหนีไปได้ ดังนั้นจึงทำให้มีการปรับตัวด้านสรีรวิทยา (physiological adaptation) ที่ดีมากเพื่อความอยู่รอด มีกลไกในการป้องกันตัวเองสูง (defensive organism) และยังพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนกลุ่ม oxydative enzyme ที่เกี่ยวข้องกับกำจัดการพิษมาก และมีกลไกการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม (Kingtong et al., 2007) อีกทั้งการศึกษากครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าหอยนางรมมีกลไกการตอบสนองต่อน้ำมันดิบ

ส่วนที่ละลายน้ำโดยการสร้างเซลล์สร้างเมือกเพื่อปกคลุมลำตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งกลไกดังกล่าวทั้งหมดนี้อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้หอยนางรมทนต่อความเป็นพิษของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำได้มากกว่าพลาสติกทะเลดังที่พบในรายงานดังกล่าว

5.1.2 ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจیب

จากการศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง โดยใช้ตัวอย่างจากกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 % เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาโดยวิธีมิวชิวิทยาแสดงให้เห็นว่าน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำแม้จะไม่ส่งผลต่ออัตราการตายของหอยนางรมมากนัก แต่ส่งผลกระทบในระดับเนื้อเยื่อทำให้เกิดอาการผิดปกติหลายประการ โดยความรุนแรงของผลกระทบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาทดสอบ และระดับความเข้มข้น ของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำ โดยกลุ่มอาการผิดปกติของเนื้อเยื่อที่สามารถสังเกตเห็นในตัวอย่างกลุ่มทดสอบได้ชัดเจน ได้แก่ (1) การสร้างเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้น (2) การขยายขนาดของแองเดิลอภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (3) การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด (hemocyte aggregation) (4) การแทรกตัวของเม็ดเลือดเข้าไปภายในเยื่อบุผิว (hemocyte infiltration) (5) การหดตัวของซิเลียที่เยื่อบุผิวด้านที่สัมผัสกับ lumen และ (6) ความผิดปกติของ digestive cell ของต่อมย่อยอาหาร

สำหรับการสร้างและหลั่งสารเมือกของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรม ในสภาวะปกติ นั้นมีการสร้างและหลั่งเมือกอยู่แล้ว โดยอาศัยการทำงานของ cytoskeleton ลำเลียงแกรนูลเพื่อหลั่งออกนอกเซลล์ แต่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นจากการสัมผัสกับน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำจะเกิดการสร้างแกรนูลเพิ่มมากขึ้น ลักษณะดังกล่าวเป็นการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตในระดับสรีรวิทยา เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากการปนเปื้อนของสารเคมีจากสิ่งแวดล้อม การศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรังของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำในปลาเก๋า (*Epinephelus chlorostigma*) ตัวเต็มวัย ด้วยเทคนิคจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ในระยะเวลาและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะเนื้อเยื่อระหว่างกลุ่มที่ได้รับและกลุ่มอ้างอิง พบว่าน้ำมันดิบส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อของปลาเก๋า โดยส่งผลกระทบต่อระบบหมุนเวียนเลือด พบอาการเนื้อเยื่อโป่งพอง หลอดเลือดมีการขยายตัวและมีภาวะเลือดออก พบมีการบวมบริเวณ lamellae ของเซลล์บุผิวยกตัวและมีการตายของเซลล์บุผิว เกิดการเพิ่มจำนวนและการขยายขนาดของเซลล์บุผิว เซลล์สร้างเมือกและ chloride cell ซึ่งทำหน้าที่ขับเกลือออกจากร่างกายผ่านทางเหงือก ทั้งยังพบการรวมตัวกันของเนื้อเยื่อที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกัน และพบการแทรกตัวของเม็ดเลือด (hemocyte infiltration) บริเวณเยื่อบุผิว (Agamy, 2013b) ผลการศึกษาในปลาเก๋าและผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า

น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำมีผลกระทบต่อเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำ และสัตว์น้ำจะตอบสนองโดยการกระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างเมือก เพื่อสร้างและให้หลังเมือกออกมาคลุมตัวสัตว์มากขึ้น เพื่อป้องกันและลดอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับสัตว์

จากการศึกษาของ Giari et al. (2012) ศึกษาผลการปนเปื้อนของน้ำมันดิบต่อปลา เมื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสดงผลให้เห็นถึงความผิดปกติในกลุ่มปลาที่ได้รับการปนเปื้อน โดยเฉพาะในส่วนของแมนเทิลและเหงือก พบแมนเทิลของปลากลุ่มที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนส่วนของเยื่อบุผิวพบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) กระจายเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังพบกลุ่มของ mast cell ในแมนเทิลอีกด้วย ส่วนในกลุ่มที่ได้รับการปนเปื้อนของน้ำมันดิบ พบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกันแต่มีจำนวนของเซลล์สร้างเมือกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการศึกษาทั้งกลุ่มที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนและกลุ่มที่ได้รับการปนเปื้อนของน้ำมันดิบ พบว่าทั้ง 2 กลุ่ม มีจำนวนเซลล์สร้างเมือกและส่วนประกอบของเซลล์สร้างเมือกมีความแตกต่างกัน จากการศึกษาด้วยเทคนิค histochemistry ซึ่งแสดงให้เห็นถึงคาร์โบไฮเดรตที่มีความซับซ้อน (glycoconjugate) ซึ่งมีค่าเป็นกลางของเซลล์สร้างเมือกในแมนเทิลของกลุ่มที่ไม่ได้รับการปนเปื้อน แต่ในกลุ่มที่ได้รับการปนเปื้อนพบว่า glycoconjugate มีสภาพเป็นกรด แต่ขนาดของเซลล์สร้างเมือกไม่แตกต่างกัน ในส่วนของซี่เหงือกพบการจัดเรียงตัวตามปกติเหมือนการจัดเรียงตัวของซี่เหงือกในปลาไซพรีนิต เซลล์บุผิวในส่วนของ primary lamellae และ secondary lamellae มีจำนวนเซลล์สร้างเมือกจำนวนมากและพบ rodlet cell เล็กน้อย ในขณะที่พบ chloride cell และ Mast cell ใน primary lamellae และไม่มีหลักฐานความเสียหายของเซลล์ในตัวอย่างปลาที่ไม่ได้รับการปนเปื้อน แต่ตัวอย่างปลาที่ได้รับการปนเปื้อนแสดงให้เห็นถึงการโป่งพองของเหงือกปลาและเส้นเลือด ประมาณ 5-25 % ของ secondary lamellae เหงือกปลาส่วนใหญ่ในส่วนของ primary lamellae แสดงให้เห็นถึงการขยายตัวที่หนาขึ้นของเยื่อบุผิวและมีการรวมตัวกันของเซลล์ที่อยู่ใกล้กันสองเซลล์หรือมากกว่า ในส่วนของ secondary lamellae พบเยื่อบุผิวมีลักษณะอ่อนและบวมส่งผลทำให้แยกออกจากเยื่อฐาน (basement membrane) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปลาที่ได้รับการปนเปื้อนพบว่าเซลล์สร้างเมือกเป็นจำนวนมาก ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มปลาที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนอย่างไม่มีนัยสำคัญ

สำหรับการศึกษาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด (hemocyte aggregation) และ ความผิดปกติของ digestive cell ของต่อมย่อยอาหาร เคยมีรายงานการศึกษาของ Aarab et al. (2008) ซึ่งทำการศึกษาผลของการปนเปื้อนของน้ำมันกลุ่ม Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) ในระดับเซลล์และเนื้อเยื่อ ของหอยแมลงภู่ (*Mytilus edulis*) ซึ่งหอยชนิดนี้นิยมใช้ในการประเมินผลกระทบของสารปนเปื้อนที่เกิดขึ้นบริเวณชายฝั่ง เนื่องจากมีความสามารถในการอยู่รอดภายใต้สภาวะการปนเปื้อนและการสะสมสารพิษทั้งสารอินทรีย์และพวกโลหะหนัก หอยมีความทนทาน

ต่อสารพิษ และพบการตอบสนองในรูปแบบต่าง ๆ เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นพารามิเตอร์ทางชีววิทยา มีการกระจายตัวอยู่ในบริเวณน้ำขึ้นน้ำลง ทำให้ง่ายต่อการสัมผัสตัวอย่าง โดยจะสัมผัสหอยแมลงภู่ บริเวณภาคใต้ของนอร์เวย์ ทั้งพื้นที่อ้างอิง Forlandsfjorden และพื้นที่ได้รับการปนเปื้อน Hogevarde ซึ่งอยู่ทางตอนเหนือของโรงงานหลอมอลูมิเนียมในเมือง Karlsund มีการผลิตอลูมิเนียมประมาณ 200,000 ตันต่อปี และมีการปล่อย PAH ประมาณ 450 กิโลกรัมต่อปี ทำการศึกษาในระดับเนื้อเยื่อบริเวณต่อมย่อยอาหาร จากการศึกษาพบว่าหอยที่เก็บจากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน ได้รับผลกระทบระดับเนื้อเยื่อมากกว่าหอยที่เก็บจากพื้นที่อ้างอิง โดยสามารถพบ การเกาะกลุ่มกันของ melanomacrophage ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูโลส สภาพดังกล่าวแสดงถึงการอักเสบของต่อมสร้างน้ำย่อย และพบการเสื่อมสภาพของต่อมสร้างน้ำย่อย โดยพบเป็นช่องขนาดใหญ่กว่าปกติเกิดขึ้นภายใน lumen ของ digestive diverticulum ในหอยที่เก็บจากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน ซึ่งผลการศึกษาในหอยแมลงภู่ดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่ามีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด (hemocyte aggregation) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการอักเสบเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อหอยกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำมันดิบ และยังพบความชองขนาดใหญ่กว่าปกติเกิดขึ้นภายใน lumen ของ digestive diverticulum ของต่อมย่อยอาหารเช่นเดียวกัน

จากการศึกษาเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจيبในครั้งนี้ พบว่า WAF ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์เยื่อบุผิวที่พบใน digestive diverticulum ของต่อมย่อยอาหาร ทำให้ความสูงของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อบุผิวลดลง ลักษณะดังกล่าวทำให้สังเกตเห็นชั้นของเยื่อบุผิวบางลง สังเกตได้จากท่อของ digestive diverticulum มีลักษณะเป็นรูกว้างขึ้น แฉกเริ่มหายไป ความรุนแรงของอาการเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ WAF พบว่า basophilic cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมาก สังเกตได้จากเซลล์ที่ติดสีม่วงบริเวณท่อมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และจำนวน digestive cell ลดลง อาจเป็นไปได้ว่าจะเกิดการตายของเซลล์ขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับรายงานของ Cajaraville et al. (1990) ซึ่งทดสอบผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำโดยทำการทดสอบแบบระยะยาว (long-term exposure) ในหอยแมลงภู่ และพบว่า WAF กระตุ้นการสร้าง basophilic cell และลดจำนวน digestive cell ลง ลักษณะดังกล่าวนี้ย่อมส่งผลกระทบต่ออาหารและการสร้างพลังงานในหอยที่ได้รับการปนเปื้อน โดยตรง ในระยะยาวอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพและอาจทำให้เกิดการตายในที่สุด

การศึกษาในเหงือก พบว่ามีลักษณะอาการอักเสบเกิดขึ้นในหอยนางรมกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้นสูง เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยสังเกตได้จากลักษณะ hemocyte infiltration ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาในเหงือกปลาที่พบว่า น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ มีผลกระทบต่อโครงสร้างของเหงือกปลา โดยทำให้เหงือกผิดปกติ

และน่าจะมีผลต่อหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซของเหงือกด้วย (Brand et al., 2001) ลักษณะดังกล่าวเป็นการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตในระดับสรีรวิทยา เพื่อตอบสนองต่อสถานะเครียดจากสารพิษจากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการประเมินผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อกรกิน การย่อยอาหาร รวมถึงระบบการแลกเปลี่ยนก๊าซ (gas exchange) ของหอยนางรมปากจีบ มีผลกระทบต่อสุขภาพของหอยนางรมเนื่องจากพบการอักเสบ เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด (hemocyte aggregation) และ ความผิดปกติของ Digestive cell ของต่อมย่อยอาหาร

5.1.3 สรุปผลการทดลอง

1. น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำส่งผลกระทบต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ WAF ตั้งแต่ร้อยละ 12.5 ลงมา ไม่พบอัตราการตาย แม้จะใช้ระยะเวลาการทดสอบ 96 ชั่วโมง และเริ่มพบอัตราการตายที่ระดับความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 25 พบอัตราการตายร้อยละ 3.33 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และอัตราการเพิ่มเป็นร้อยละ 6.67 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง และเนื่องจากพบอัตราการตายของหอยนางรมต่ำ จึงไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} ได้

2. น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ ส่งผลกระทบในระดับเนื้อเยื่อทำให้เกิดอาการผิดปกติหลายประการ ได้แก่ การสร้างเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้นในเหงือกที่ได้รับสัมผัสกับ WAF เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เกิดอาการอักเสบ โดยสังเกตได้จากลักษณะของการเกิด hemocyte infiltration ในหอยนางรมกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ ที่ระดับความเข้มข้นสูง เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยโดยความรุนแรงของผลกระทบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาทดสอบ และระดับความเข้มข้น ของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายในน้ำ

5.1.4 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการประเมินผลและศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำในระยะยาว (chronic effect) เพื่อศึกษาผลกระทบต่อสุขภาพของประชากร และการสืบพันธุ์ของประชากร เพื่อประเมินผลกระทบของการปนเปื้อนต่อประชากรในระยะยาวต่อไป

บรรณานุกรม

- กรมควบคุมมลพิษ. (2544). การศึกษาองค์ประกอบคาร์บอนของน้ำมัน ในโครงการจัดหาข้อมูลการแปรสภาพของน้ำมันเพื่อการตรวจสอบการลักลอบทิ้งน้ำมัน. กรุงเทพฯ: กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.
- กรมควบคุมมลพิษ. (2554). แนวทางป้องกันและแก้ไขปัญหาน้ำมันรั่วไหลในทะเล. เข้าถึงได้จาก <http://wqm.pcd.go.th/water/images/stories/marine/report/oilspill54.pdf>.
- กฤตินี กาญจนภา. (2539). ไบโอดีเอชันของดินปนเปื้อนน้ำมันดิบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม, คณะพลังงานและวัสดุ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- การปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย. (2541). ความรู้เรื่องปิโตรเลียม. กรุงเทพฯ: ศิริวัฒนาอินเตอร์พริ้นต์,
- ชรัตน์ รุ่งเรืองศิลป์. (2533). น้ำมัน. กรุงเทพฯ: กองวิเคราะห์ผลกระทบบสิ่งแวดล้อม. สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ
- เชิดวงศ์ แสงศุภวานิช. (2557). มลพิษทางทะเล น้ำมันรั่ว การกำจัดคราบน้ำมัน และการตอบโต้. เข้าถึงได้จาก http://www.imc.src.ku.ac.th/personnel/file_subject/2012191139231.doc
- ศุกฤตินี นิยมแสง. (2546). พิษเฉียบพลันของน้ำมันดิบ สารเคมีกำจัดคราบน้ำมัน และสารละลายผสมร่วมต่อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) วัยอ่อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมควร ไขแก้ว. (2545). ผลกระทบของน้ำมันและสารเคมีกำจัดคราบน้ำมันต่อกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม (การจัดการสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุวัฒน์ ชนานุภาพไพศาล, สอริฐ มากบุญ และรัชฎา ขาวหนูนา. (2541). เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของหอยตะไกร (Crassostrea belcheri) ด้วยการเลี้ยงแบบต่าง ๆ. สุราษฎร์ธานี: ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสุราษฎร์ธานี.
- Aarab, N., Godal, F. B., & Bechmann, K. R. (2011). Seasonal variation of histopathological and histochemical markers of PAH exposure in blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Marine Environmental Research*, 71, 213–217.

- Agamy, E. (2012). Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75(1), 171–179.
- Agamy, E. (2013a). Sub chronic exposure to crude oil, dispersed oil and dispersant induces histopathological alterations in the gills of the juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 180–190.
- Agamy, E. (2013b). Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): a histopathological study. *Marine Environmental Research*, 86, 46–55.
- Anderson, J. W., Neff, J. M., Cox, B. A., Tatem, H. E., & Hightower, G. M. (1974). Characteristic of dispersions and water soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine Biology*, 27, 75–88.
- Antonio, F.J., Mendesa, R.S., & Thomaz, S.M. (2011). Identifying and modeling patterns of tetrapod vertebrate mortality rates in the Gulf of Mexico oil spill. *Aquatic Toxicology*, 105, 177–179.
- Bancroft, J.D., & Gamble, M. (2008). *Theory and practice of histological techniques* (6th ed.). Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, PA.
- Brand, D.G., Fink, R., Bengueyfield, W., Birtwell, I.K., & McAllister, C.D. (2001). Salt water-acclimated Pink Salmon Fry (*Oncorhynchus gorbuscha*) develop stress-related visceral lesions after 10-day exposure to sublethal concentrations of the water-soluble fraction of North Slope Crude Oil. *Pathology and Toxicology*, 29, 574–584.
- Cajaraville, P. M., Diez, G., Marigomez, A. I., & Angulo, E. (1990). Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 9, 221–228.
- Capuzzo, J.M., Moore, M.N., & Widdows, J. (1988). Effects of toxic chemicals in the marine environment; predictions of impacts from laboratory studies. *Aquatic Toxicology*, 11, 303–311.
- Chaisuksant, Y., Yu, Q., & Connell, D. (1997). Internal lethal concentrations of halobenzenes with fish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicology Environment Safety*, 37, 66–75.

- Dezfuli, B. S., Squerzanti, S., Fabbri, S., Castaldelli, G., & Giari, L. (2010). Cellular response in semi-intensively cultured sea bream gills to *Ergasilus sieboldi* (Copepoda) with emphasis on the distribution, histochemistry and fine structure of mucous cells. *Veterinary Parasitology*, *174* (3–4), 359–365.
- Galtsoff, P.S. (1964). *The American Oyster Crassostrea virginica Gmelin*. Washington, D.C.: United States Government Printing Office.
- Giari, L., Dezfuli, B. S., Lanzoni, M., & Castaldelli, G. (2012). The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *77*, 18–27.
- Goldberg, E. D. (1986). TBT: an environmental dilemma. *Environment*, *28*, 17–44.
- Harcourt, P. (2001). Aqua-toxicological effects of water soluble fractions (WSF) of diesel fuel on *O. Niloticus* Fingerlings. *Applied Sciences and Environmental Management*, *5*(1), 93–96
- Harper, J.D. (1969). Oil soaked straw harvestion techniques. *In proceeding joint conference on prevention and control of oil spill: (PP. 249–251)*
- ITOPF. (2013). *Oil tanker spill statistics 2012*. Retrieved from: <http://www.itopf.com/news-and-events/documents/StatsPack.pdf>
- Kim, H., Park, C., Chaea, Y.C., Shim, W.J., Kim, M., & Addison, R.F. (2013). Acute toxic responses of the rockfish (*Sebastes schlegeli*) to Iranian heavy crude oil: Feeding disrupts the biotransformation and innate immune systems. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*, 357–365.
- Kinghorn, R. R. F. (1983). Chichester: *An introduction to the physics and chemistry of petroleum*. John Wiley & Sons.
- Kington, P. F. (2002). Long-term environmental impact of oil spills. *Spill Science & Technology Bulletin*, *7*, 53–61.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., & Janvilisri, T. (2007). ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquatic Toxicology*, *85*, 124–132.
- Lane, D.J. W., Beaumont, A.R., & Hunter, J.R. (1985). Byssus drifting and the drifting threads of the young post-larval mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, *84*, 301–308.
- Marigomez, I., Soto, M., Cancio, I., Orbea, A., Garmendia, L., & Cajaraville, M. (2006). Cell and tissue biomarkers in mussel and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay

- after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). *Marine Pollution Bulletin*, 53, 287–304.
- Nwadukwe, F.O., Ayaobu-Cookey, I.K., & Matanmi, M. (2006). Performance of three age groups of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and F1 hybrid (*Clarias gariepinus*) *Heterobranchus longifilis* fry in ponds. *Environmental Biology*, 8, 140–149.
- Orlu, E. E., & Ogbalu, O. K. (2013). Evaluation of the effect of water soluble fraction (WSF) of bonny light crude oil and sublethal concentrations of *Lepidagathis alopecuroides* (Vahl) on reproduction in *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Animal and Veterinary*, 5(6), 240–244.
- Periago, J. F., & Prado, C. (2005). Evolution of occupational exposure to environmental levels of aromatic hydrocarbons in service stations. *The Annals of Occupational Hygiene*, 49(3), 233–240.
- Robert, R., & Gérard, A. (1999). Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resource*, 12, 121–130.
- Saber, A., Sakr-Hamed, M. A., Mutwally & Adnan, M. (2010). *Effect of crude petroleum oil on the intestinal tissue of the fish*. Thesis, Umm Al-Qura University. Department of Biology, Faculty of Applied Sciences.
- Silberberg, M. (2004). *Chemistry: The molecular nature of matter and change*. New York: McGraw-Hill.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แสดงอัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

ตาราง ก-1 ตารางแสดงอัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) กับระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

%	24 h			48 h			72 h			96 h		
	Rep			Rep			Rep			Rep		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
WAF												
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	0	4
50	0	0	0	1	0	2	2	4	0	4	0	2
100	0	0	0	4	2	0	2	0	4	4	5	0

ภาคผนวก ข

ผลการทดสอบอัตราตายของหอยนางรมปากจีบทางสถิติ

ด้วย Two-way ANOVA โดยโปรแกรม SPSS

เวอร์ชัน 17

ตาราง ข-1 ตารางวิเคราะห์สถิติอัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) 0% (กลุ่มควบคุม), 6.25%, 12.5%, 25%, 50% และ 100%

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:mortality

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	64.875 ^a	23	2.821	2.334	.007
Intercept	28.125	1	28.125	23.276	.000
time	13.375	3	4.458	3.690	.018
conc	34.125	5	6.825	5.648	.000
time * conc	17.375	15	1.158	.959	.510
Error	58.000	48	1.208		
Total	151.000	72			
Corrected Total	122.875	71			

a. R Squared = .528 (Adjusted R Squared = .302)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:mortality

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	64.875 ^a	23	2.821	2.334	.007
Intercept	28.125	1	28.125	23.276	.000
treatment	64.875	23	2.821	2.334	.007
Error	58.000	48	1.208		
Total	151.000	72			
Corrected Total	122.875	71			

a. R Squared = .528 (Adjusted R Squared = .302)

ภาคผนวก ค

ผลของจำนวนเซลล์สร้างเมือกในอวัยวะของหอยนางรมปากจีบ

ทางสถิติด้วย Two-way ANOVA โดยโปรแกรม SPSS

เวอร์ชัน 17

ตาราง ก-1 ตารางวิเคราะห์สถิติจำนวนเซลล์สร้างเมือก ในอวัยวะของหอยนางรมปากจีบ ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) 0% (กลุ่มควบคุม), 6.25%, 12.5%, 25%, 50% และ 100%

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:mucous

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1553.750 ^a	47	33.059	18.239	.000
Intercept	2652.250	1	2652.250	1463.310	.000
time	462.250	1	462.250	255.034	.000
organ	26.750	3	8.917	4.920	.003
conc	809.000	5	161.800	89.269	.000
time * organ	60.750	3	20.250	11.172	.000
time * conc	119.000	5	23.800	13.131	.000
organ * conc	34.000	15	2.267	1.251	.249
time * organ * conc	42.000	15	2.800	1.545	.105
Error	174.000	96	1.813		
Total	4380.000	144			
Corrected Total	1727.750	143			

a. R Squared = .899 (Adjusted R Squared = .850)

ตาราง ก-1 (ต่อ)

Mucous

Duncan^{a,b}

con c	N	Subset				
		1	2	3	4	5
1.00	24	1.3750				
2.00	24		2.5000			
3.00	24		3.1250			
4.00	24			4.0000		
5.00	24				6.5000	
6.00	24					8.2500
Sig.		1.000	.111	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 1.813.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

ภาคผนวก ง
การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารเพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อ

Bouin's fluid

- สารละลายอิมมัตวของกรดพิคริกในน้ำ 75 ml
- ฟอรัมาลิน 25 ml
- กรดแอซีติกกลั่น 5 ml

วิธีการ

1. ชั่งกรดพิคริก จำนวน 1.2 g ละลายในน้ำ 100 ml
2. คนให้ละลาย ตวงมาใช้เพียง 75 ml
3. เติมฟอรัมาลิน จำนวน 25 ml และกรดแอซีติกกลั่น จำนวน 5 ml ลงไปตามลำดับ

การเตรียมสีย้อม

Harris Haematoxylin (Apply for 50 ml)

Stock I

- Potassium or ammoniu (alum) 5 g
- Distilled water 50 ml
- Mixture, heat 90 °C stir 550

Stock II

- Absolute alcohol 5 ml
- Haematoxylin 0.5 g
- Mix heat 100°C stir 550 until deep purple ~ 10 min
- Mix stockI and stockII
- Add (prepare for 50-100 ml, Use stockIII 1.5 ml) ต้มต่อจนเป็นสีม่วง ~ 2-3 min

StockIII (1% Sodium Iodate)

- Sodium Iodate 0.1 g
- Distilled water 10 ml
- Boiling until deep purple
- Cooling under Ice or water bath
- Add glacial acid 1 ml
- Filter Before in use

Eosin

Counterstain Eosin (stock 100 ml)

Eosin 0.5 % in 70 % ethanol

Preparation 50 ml/time

Eosin Yellowish 0.25 g

70 ethanol alcohol 50 ml

ภาคผนวก จ

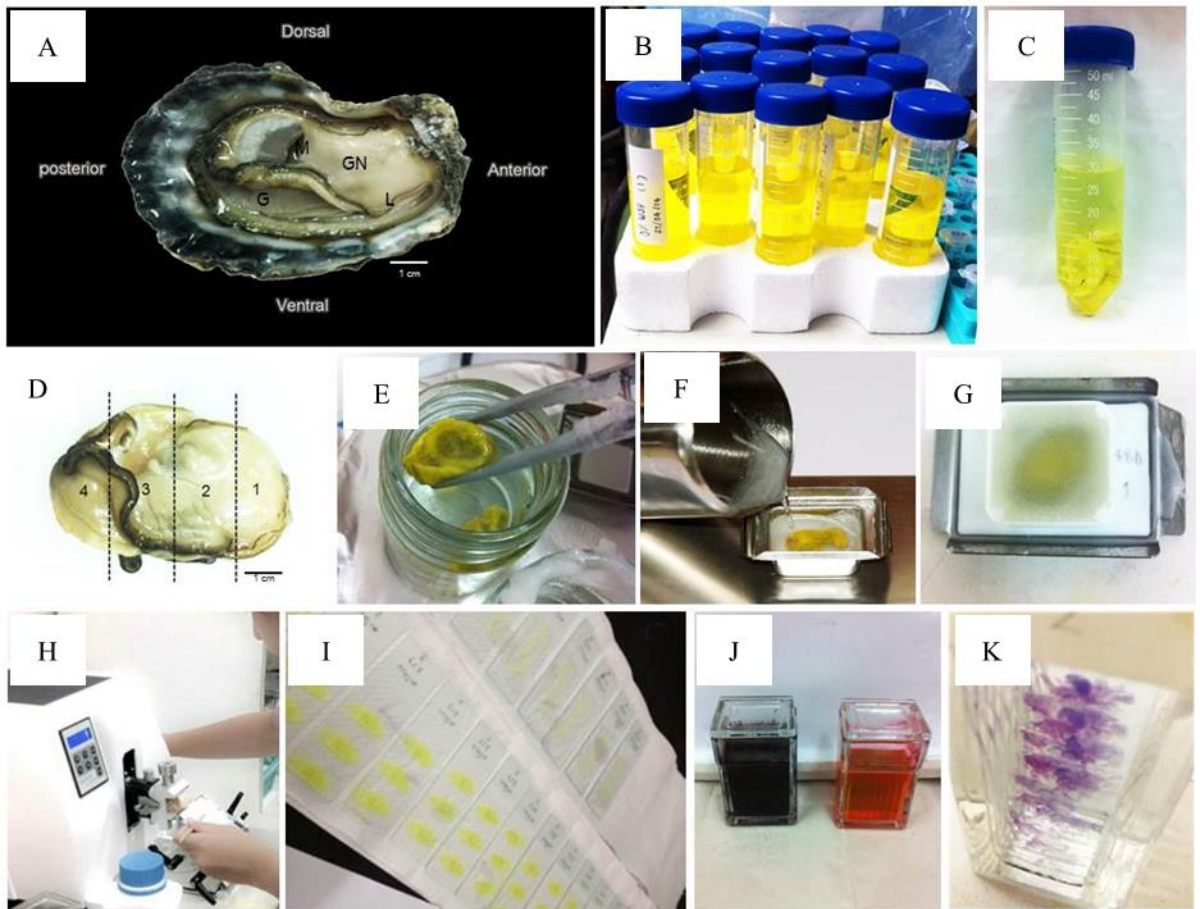
ภาพการทดลองและเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ



ภาพที่ จ-1 การเลี้ยงหอยนางรมปากจีบ เพื่อการทดสอบผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) ในห้องปฏิบัติการ A สถานที่ทำการศึกษาคือโรงเรียนเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชา วาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา B อาหารสำหรับเลี้ยงหอยนางรม เป็นแพลงก์ตอนชนิด *Nannochloropsis* sp. C การทดสอบผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (WAF) ต่อหอยนางรมปากจีบ



ภาพที่ จ-2 การเตรียมน้ำมันดิบส่วนที่ละลาย (water accommodated fraction หรือ WAF)
A ขั้นตอนการเตรียมน้ำมันดิบส่วนที่ละลาย (WAF) B และ C stock solution ของ WAF
ที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ (ที่มา: ดัดแปลงวิธีมาจาก Anderson et al., 1978)



ภาพที่ จ-3 ตัวอย่างการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาด้วยวิธีมิถุวิทยา (histology)

A การเปิดเปลือกหอยนางรมเพื่อเตรียมเนื้อเยื่อมาศึกษา B และ C รักษาสภาพในสารละลายคงสภาพ (fixative solution) D แสดงแนวการตัดเนื้อเยื่อตัดตามขวาง (cross section) สำหรับนำมาฝังในพาราพลาสติก E F และ G แสดงขั้นตอนการฝังเนื้อเยื่อในพาราพลาสติก H ตัดชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัด (microtome) ให้ได้เนื้อเยื่อขนาด 6 μ m I การติดเนื้อเยื่อบนสไลด์ J และ K การย้อมสีฮีมาทอกไซลีนและอีโอซิน

ภาคผนวก จ

เอกสารประกอบการเผยแพร่วิทยานิพนธ์

ผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อเนื้อเยื่อแมนเทิลในหอยนางรมปากจีบ Effect of water accommodated fraction of crude oil on mantle of Rock oyster

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (water accommodated fraction หรือ WAF) ต่อเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) โดยทำการทดสอบกับหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง แบ่งกลุ่มทดสอบออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับ WAF 12.5% 50% และ 100% และกลุ่มควบคุม กลุ่มละ 20 ตัว ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เมื่อครบ 96 ชั่วโมง ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมาศึกษาด้วยเทคนิคมิชิววิทยา ผลการศึกษาระดับเนื้อเยื่อพบว่า WAF กระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างเมือกในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมในกลุ่มทดสอบอย่างชัดเจน นอกจากนี้ WAF ยังส่งผลกระทบต่อระบบไหลเวียนเลือด โดยพบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสัมผัสน้ำมัน จะพบการขยายตัวของแองเจโอคภายในแมนเทิล และพบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า WAF ส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยาของหอยนางรม และอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชากรหอยนางรมหากเกิดการรั่วไหลของน้ำมันดิบลงสู่ระบบนิเวศทางทะเล

คำสำคัญ : หอยนางรม, แมนเทิล, เซลล์สร้างเมือก, น้ำมันดิบ, น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ

Abstract

The main objective of this work was to investigate the effect of water accommodated fraction (WAF) of crude oil on mantle tissue of Rock oyster, *Saccostrea cucullata*. Experimental exposure of crude oil WAF was conducted under laboratory condition for 96 hours. Oysters were exposure to 0 (control), 12.5%, 50% and 100% WAF, separately. Twenty oysters were used for each treatment. All exposures were done in three replicates. At 96 hour of exposure, oysters were randomly collected for tissue examination by using histological technique. Results revealed that WAF apparently induced mucous cell production in mantle of all oyster exposed to crude oil WAF. Crude oil WAF also affected circulatory system by expanding blood sinus in the mantle. Moreover, hemocyte aggregations were observed in the blood sinus of exposed oysters. The results from this study indicate that crude oil WAF effects on physiology of exposed oyster and would eventually impact on the health of oyster population in case of crude oil contamination in marine ecosystem.

Keyword: oyster, mantle, mucous cell, crude oil, water accommodated fraction

บทนำ

น้ำมันเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในการพัฒนาและการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศ และถูกนำมาใช้เพื่อตอบสนองความต้องการในการใช้พลังงานที่เพิ่มขึ้นของมนุษย์ ในการนำน้ำมันดิบ ขึ้นมาใช้ ตั้งแต่กระบวนการขุดเจาะน้ำมัน ขั้นตอนการกลั่นตลอดจนถึงขั้นตอนการขนส่งที่อาจก่อให้เกิด การรั่วไหลลงสู่ทะเล ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ และเนื่องจากน้ำมันดิบมีการ ย่อยสลายทางกายภาพเป็นไปอย่างช้า จึงส่งผลให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อมและกลายเป็นแหล่งมลพิษ อันก่อให้เกิดผลกระทบต่อโครงสร้างประชากรของสิ่งมีชีวิตทางทะเล และสามารถถ่ายทอดความเป็นพิษ ไปตามห่วงโซ่อาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่กินอาหารด้วยการกรอง (filter feeder) เช่น หอยสองฝา ครัสเตเชียน ปลา ปู ฟองน้ำ เป็นต้น (Kingston, 2002) เมื่อเกิดการรั่วไหลของน้ำมันดิบลงสู่ทะเล องค์ประกอบบางส่วนจะระเหยสู่บรรยากาศ บางส่วนจะไม่ละลายน้ำรวมตัวเป็นไข และบางส่วนสามารถ ละลายน้ำได้ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันดิบ เราเรียกน้ำมันดิบส่วนที่ ละลายน้ำนี้ว่า water accommodated fraction หรือ WAF (Orlu & Ogbalu, 2013) น้ำมันดิบส่วนที่ละลาย ในน้ำมีโอกาสสัมผัสกับสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำและอาจเกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นได้

เพื่อประเมินผลกระทบของ WAF ต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศทางทะเล ผู้วิจัยได้ศึกษาผล ของ WAF ในหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ยึดเกาะอยู่กับที่ (sessile life) จึงมีโอกาสได้รับสัมผัสกับ WAF ได้มาก หากเกิดเหตุการณ์ปนเปื้อนน้ำมันดิบ อีกทั้งหอยนางรมปากจیبมี ถิ่นอาศัยทั่วไปตามชายฝั่งของประเทศไทย จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นแบบการศึกษาผลกระทบ ของการปนเปื้อนของน้ำมันดิบและสารเคมีอื่น ๆ ในระบบนิเวศทางทะเล การศึกษาครั้งนี้ทำในระดับ เนื้อเยื่อ โดยเลือกอวัยวะแมนเทิลในการศึกษา เนื่องจากเป็นส่วนที่สัมผัสกับน้ำทะเลตลอดเวลาจึงมีโอกาส สัมผัสกับสารเคมีที่ปนเปื้อนมากับน้ำทะเลโดยตรง ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการประเมินถึง ผลกระทบที่เกิดจากการปนเปื้อนของน้ำมันดิบในแหล่งน้ำ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิลหอยนางรมปากจیب

วิธีการวิจัย

สารเคมี

น้ำมันดิบได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท พีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด (มหาชน) พาราฟ ลาสต์ (Sigma) Absolute ethanol (RCI Labscan) ไโซลิ้น (Sigma) สารละลายยูแองส์ (Sigma) ไดออกเซน (Fisher Scientific) ซีมาทอก ไโซลิ้น (Merck, Germany) และ อีโอซิน (Panreac)

ตัวอย่างหอยนางรม

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) จากพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรม ตำบลบางทราย อำเภอมือง จังหวัดชลบุรี สุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมตัวเต็มวัยที่มีขนาดประมาณ 5-7 เซนติเมตร นำมาทำความสะอาดบริเวณเปลือกเพื่อกำจัดเพรียงหิน และสาหร่ายที่เกาะมาออกให้หมด ใช้หอยนางรมทั้งหมด 240 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง ให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนชนิด *Nannochloropsis* sp. 1% v/v ของแพลงก์ตอนหัวเชื้อ 2×10^7 cells/ml (Kingtong *et al.*, 2007) การให้อาหารจะให้วันละ 1 ครั้ง ตลอดระยะเวลาการทดลอง

การเตรียมน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (Water accommodated fraction หรือ WAF)

เตรียมสารละลายที่จะใช้ในการทดลองเป็นน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ (water accommodated fraction หรือ WAF) ดัดแปลงวิธีมาจาก Anderson *et al* (1974) โดยใช้ไขมัน 1 ส่วนผสมในน้ำทะเล 9 ส่วน นำไปปั่นให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนสาร เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้แยกชั้น แล้วจึงดูดเอาของเหลวด้านล่างซึ่งเป็นส่วนของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ สำหรับใช้เป็นสารละลายมาตรฐานของ WAF 100% เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อหอยนางรม

การทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย WAF และการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

การทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย WAF ทำได้โดยนำหอยนางรมที่ปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้ว ลงเลี้ยงในตู้ปลาที่มีความเข้มข้นของสารละลาย WAF ที่ระดับความเข้มข้น 0%, 12.5%, 50% และ 100% ตามลำดับ โดยในแต่ละความเข้มข้นให้มีปริมาตร 20 ลิตร การทดสอบใช้หอยนางรมจำนวน 20 ตัว/ตู้ ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ ใช้เวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาด้วยเทคนิคจุลชีววิทยา ทำได้โดยการสุ่มเก็บหอยนางรมจากกลุ่มทดสอบทุกกลุ่มและกลุ่มควบคุม กลุ่มละ 3 ตัว นำมาทำการเปิดเปลือกและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อส่วนแมนเทิลแช่ในสารละลายบูแอนด์ (Bouin's fixative) เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาผลกระทบของสารละลาย WAF ในระดับเนื้อเยื่อต่อไป การเก็บเนื้อเยื่อจะเก็บที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายหลังการทดสอบ

การศึกษาระดับเนื้อเยื่อ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อส่วนแมนเทิลที่แช่ในสารละลายบูแอนด์ ครบ 24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% จนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือ จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) ในเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่ำ ไปยังเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง โดยเริ่มจากเอทานอลที่มีความเข้มข้น 80% 90% และ 95% ตามลำดับ ขึ้นตอนละหนึ่งครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาแช่ใน Absolute ethanol 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อมาแช่ในพาราพลาสติกเหลว 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส แล้วจึงฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสติก ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome รุ่น HESTION ERM 3000, Hestion, Australia) ความหนา 6 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วติดลงบนแผ่นสไลด์โดยใช้สารละลายเจ

ลาติน 1% เป็นตัวช่วยให้เนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นสไลด์ นำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางให้แห้งบนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาย้อมด้วยสีฮีมาทอกซึนและอีโอสิน (Haematoxylin and Eosin) และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ลักษณะทั่วไปของเนื้อเยื่อแมนเทิล

ลักษณะทั่วไปของเนื้อเยื่อ เมื่อเปิดเปลือกหอยเข้าไปด้านในจะพบส่วนของแมนเทิลซึ่งเป็นโครงสร้างที่ปกคลุมตัวหอย แมนเทิลมีหน้าที่หลักในการสร้างเปลือก การหายใจ และการสร้างเมือกคลุมตัว จากการศึกษาค้นคว้าโดยใช้เทคนิคมิวทิวาพบว่าแมนเทิล (ภาพที่ 1A) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียวแบบ Simple cuboidal epithelium เป็นเซลล์ทรงลูกบาศก์ไม่พบซิเลียที่ผิวด้านที่ผิวด้านนอก พบเซลล์สร้างเมือกแทรกกระจายอยู่ทั่วไป ใต้เนื้อเยื่อบุผิวพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่เรียงตัวแบบหลวม พบแองเกลียด (blood sinus) กระจายอยู่ทั่วไป สามารถพบเม็ดเลือดภายในแองเกลียด

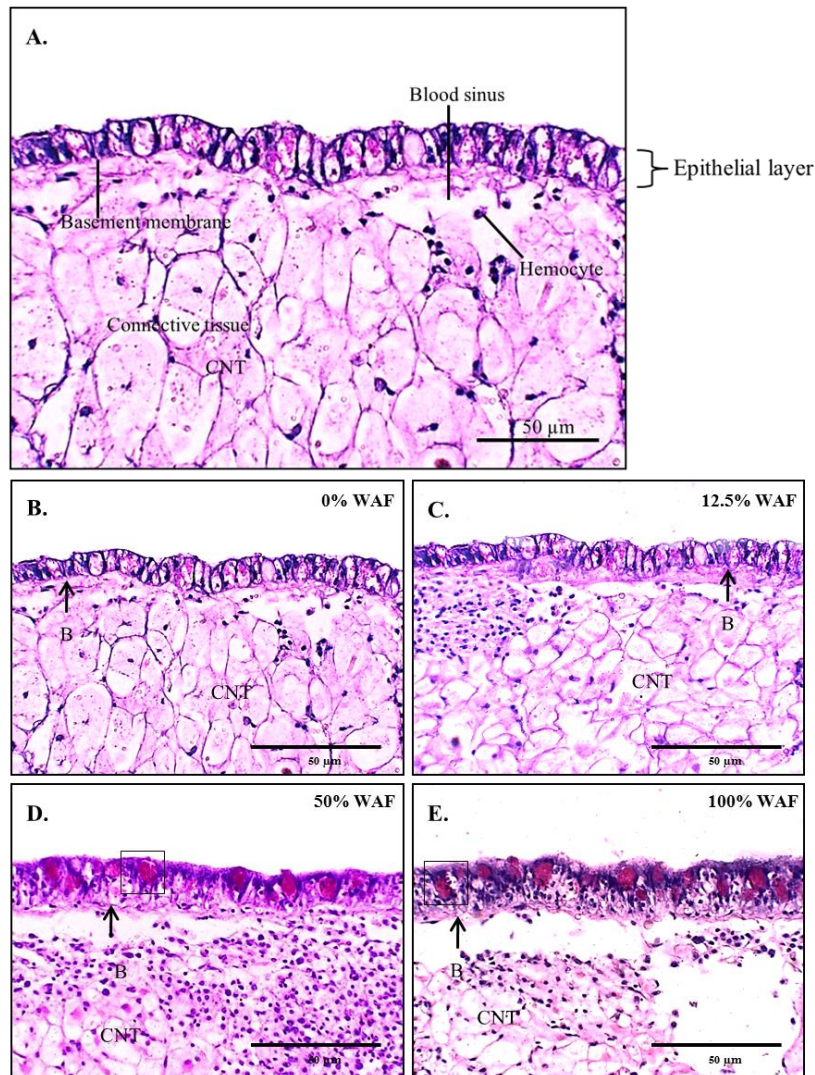
ผลกระทบของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำต่อเนื้อเยื่อแมนเทิล

ผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ (WAF) ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิลภายหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า WAF ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อในอวัยวะแมนเทิลแบ่งเป็น 2 ลักษณะเด่น ได้แก่ (1) กระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวที่สัมผัสกับน้ำทะเล โดยสังเกตได้จากจำนวนและขนาดของเซลล์สร้างเมือกที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมกลุ่มทดสอบ ตามความเข้มข้นของ WAF (ภาพที่ 1C-E) ซึ่งแตกต่างจากลักษณะเนื้อเยื่อแมนเทิลในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 1B) อย่างชัดเจน โดยสามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสัมผัสกับ WAF ที่ระดับความเข้มข้น 50% และ 100% (ภาพที่ 1D-E) ตามลำดับ และ (2) ส่งผลกระทบต่อระบบไหลเวียนเลือด โดยพบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสัมผัสน้ำมันจะพบการขยายตัวของแองเกลียดภายในแมนเทิลโดยสามารถพบแองเกลียดขนาดใหญ่เกิดขึ้นภายในแมนเทิล (ภาพที่ 1D-E) และยังสามารถพบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด (ภาพที่ 1C-E)

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า WAF ส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยาของหอยนางรม โดยกระตุ้นกลไกการหลังเมือกออกมาเพื่อป้องกันตัว การศึกษาผลของ WAF ในปลาแสดงให้เห็นว่า WAF กระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์สร้างเมือกและการหลังเมือกเพิ่มขึ้น (Giari et al., 2012; Agamy, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งหอยนางรมในครั้งนี้ ดังนั้นการสร้างเซลล์เมือกและการหลังเมือกออกมาคลุมตัวจึงอาจเป็นกลไกสำคัญที่สัตว์น้ำตอบสนองต่อความเครียดจากการสัมผัสน้ำมันดิบและอาจเป็นกลไกพื้นฐานในการตอบสนองต่อภาวะเครียดที่เกิดจากสารเคมีอื่นๆ อีกด้วย

การศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบในปลายังแสดงให้เห็นว่า WAF ส่งผลกระทบต่อระบบหมุนเวียนเลือด พบอาการหลอดเลือดมีการขยายตัวและมีภาวะเลือดออก (Agamy, 2013) สอดคล้องกับผล

การศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งพบลักษณะแอ่งเลือดขยายตัวและมีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด จากผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า WAF ส่งผลกระทบต่อสัตว์ทดลอง และหากเกิดการปนเปื้อนน้ำมันดิบขึ้นในระบบนิเวศ ทางทะเลมีแนวโน้มที่จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของหอยนางรมรวมถึงสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้อีกด้วย



ภาพที่ 1 ผลของ WAF ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ

A. ลักษณะเนื้อเยื่อของแมนเทิล B. กลุ่มควบคุม C. D. และ E. กลุ่มทดลองความเข้มข้นของ WAF ร้อยละ 12.5, 50 และ 100 ตามลำดับ ระยะเวลาในการทดสอบ 96 ชั่วโมง CNT = connective tissue (กำลังขยาย 400 เท่า)

สรุปผลการวิจัย

การทดสอบผลของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำได้ (WAF) ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิลเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า WAF ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อในอวัยวะแมนเทิล โดยกระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างเมือก บริเวณเนื้อเยื่อผิวที่สัมผัสกับน้ำทะเล และส่งผลกระทบต่อระบบไหลเวียนเลือด จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า WAF ส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยาและสุขภาพของหอยนางรมในที่สุด

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการประเมินผลและศึกษาผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมในระยะยาว เพื่อศึกษาเกี่ยวกับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม หลังได้รับการปนเปื้อนของน้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท พีทีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด (มหาชน) และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รายการอ้างอิง

- Anderson, J. W., Neff, J. M., Cox, B. A., Tatem, H. E., & Hightower, G. M. (1974). "Characteristics of dispersions and water soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish". **Marine Biology** 27, 75-88.
- Kington, P. F. (2002). "Long-term environmental impact of oil spills." **Spill Science & Technology Bulletin** 7, 53-61.
- Orlu, E. E., & Ogbalu, O. K. (2013). "Evaluation of the effect of water soluble fraction (WSF) of Bonny light crude oil and sublethal concentrations of *Lepidagathis alopecuroides* (Vahl) on reproduction in *Clarias gariepinus* (Burchell 1822)". **Animal and Veterinary**, 240-244.
- Agamy, E. (2003). "Sub chronic exposure to crude oil, dispersed oil and dispersant induces histopathological alterations in the gills of the juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*)". **Ecotoxicology and Environmental Safety** 92, 180-190.
- Giari, L., Dezfuli, B.S., Lanzoni, M., & Castaldelli, G. (2012). "The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River" **Ecotoxicology and Environmental Safety** 77, 18-27.

ภาคผนวก

น.ส. สุภัททา เนื้อยี่ง่า¹, ดร. สุทิน กิ่งทอง^{2*}

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เบอร์โทรศัพท์ 083-2472527 e-mail: benz_biot@hotmail.com, 081-8638377 email:

sutin@buu.ac.th