

การใช้ 1-Hydroxypyrene และ 2-Naphthol เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของ
การปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของหอยในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหิน
อ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง

1-HYDROXYPYRENE AND 2-NAPHTHOL AS BIOMARKERS OF
PETROLEUM HYDROCARBON CONTAMINATION IN
INTERTIDAL ROCKY SHORE MOLLUSCS, AO PRAO SAMET ISLAND,
RAYONG PROVINCE

จินดาพร่า เปรมปราโมทย์
JINDARHA PRAMPROMOTE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AG-D-064-021

การใช้ 1-Hydroxypyrene และ 2-Naphthol เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของ
การปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของหอยในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหิน
อ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง

1-HYDROXYPYRENE AND 2-NAPHTHOL AS BIOMARKERS OF
PETROLEUM HYDROCARBON CONTAMINATION IN
INTERTIDAL ROCKY SHORE MOLLUSCS, AO PRAO SAMET ISLAND,
RAYONG PROVINCE

จินดาหรา เปรมปราโมทย์
JINDARHA PRAMPROMOTE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชา เกษตรศาสตร์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL- 2019-AG-D-064-021

**1-HYDROXYPYRENE AND 2-NAPHTHOL AS BIOMARKERS OF
PETROLEUM HYDROCARBON CONTAMINATION IN
INTERTIDAL ROCKY SHORE MOLLUSCS, AO PRAO SAMET ISLAND,
RAYONG PROVINCE**

JINDARHA PREMPRAMOTE

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY PROGRAM IN AGRICULTURE
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2019

KMITL- 2019-AG-D-064-021

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้ 1-Hydroxypyrene และ 2-Naphthol เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนของหอยในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง
ชื่อนักศึกษา	นางสาว จินดาหรา เปรมปราโมทย์
รหัสประจำตัว	56604081
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร.มณฑล แก่นมณี

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลกระทบทางชีวภาพของระบบนิเวศในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินภายหลังจากอุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหล จังหวัดระยองเมื่อเดือนกรกฎาคม 2556 โดยแบ่งออกเป็น 4 หัวข้อคือ (1) การศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงความชุกชุมและโครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดิน โดยเก็บข้อมูลในเดือนตุลาคมและธันวาคม พ.ศ. 2556 และมีนาคม พ.ศ. 2557 ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหิน อ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จ.ระยอง ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากคราบน้ำมัน เปรียบเทียบกับหาดหินบริเวณหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด โดยใช้เทคนิค Photo-quadrat (2) การตรวจวัดปริมาณดัชนีทางชีวภาพ (biomarker) ของ polycyclic aromatic hydrocarbons 2 ชนิด คือ 1-Hydroxypyrene (1-HOP) และ 2-Naphthol (2-NAP) ในหอย 3 ชนิดที่มีรูปแบบการกินอาหารแตกต่างกันในระบบนิเวศหาดหินประกอบด้วยหอยครองแครง (*Planaxis sulcatus*) หอยมะระ (*Morula* sp.) และหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) ในพื้นที่หาดหินที่ได้รับผลกระทบจากคราบน้ำมัน (3) ตรวจวัดปริมาณดัชนีทางชีวภาพ 1-Hydroxypyrene (1-HOP) และ 2-Naphthol (2-NAP) ในหอย 3 ชนิดตามข้อ (2) ภายใต้ทดลองเสมือนจริงที่ให้สัตว์ทดลองสัมผัสกับน้ำมันดิบเป็นเวลา 30 วัน และ (4) การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบที่สัมผัสน้ำมันดิบ ผลการศึกษาในการศึกษาที่ (1) แสดงให้เห็นว่าความชุกชุมของสัตว์หน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินบริเวณอ่าวพร้าว ลดลงตามช่วงเวลา โดยมีค่าเท่ากับ 328.1 ตัวต่อตารางเมตร ในเดือนตุลาคม 2556 เป็น 182.2 ตัวต่อตาราง

เมตร และ 132.0 ตัวต่อตารางเมตรในเดือนธันวาคม 2556 และมกราคม 2557 ตามลำดับ แตกต่างกับ สัตว์หน้าดินหาดหินบริเวณเขาแหลมหญ้าที่ความชุกชุมในเดือนตุลาคม และธันวาคม 2556 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งอาจจะเกิดจากการฟื้นตัวของโครงสร้างชุมชนของสัตว์ทะเลหน้าดินในพื้นที่ศึกษา ผลการศึกษาที่ 2 พบ 1-HOP และ 2-NAP ในหอยทั้ง 3 ชนิดที่เก็บตัวอย่างจากอ่าวพร้าวในทุกช่วงเวลา โดยมีแนวโน้มลดลงตามเวลาในขณะที่ตรวจไม่พบ biomarker ทั้งสองชนิดในตัวอย่างหอยจากเขาแหลมหญ้า ระดับของ 1-HOP ในหอยมะระ (*Morula* sp.) ที่อ่าวพร้าวมีปริมาณสูงสุด (1.421 ± 0.227 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก) ในเดือนสิงหาคมปี 2556 ในขณะที่ในระยะเวลาเดียวกันพบว่าหอยครองแครงและหอยนางรมปากจีบมี 1-HOP ต่ำ (0.039 ± 0.009 และ 0.094 ± 0.009 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ) ผลการศึกษานี้สนับสนุนได้ว่า PAHs ได้ผ่านเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศหาดหิน โดยมีปริมาณการสะสมแตกต่างกันไปตามระดับการกินในห่วงโซ่อาหาร ส่วนผลการศึกษาการรับ PAHs จากน้ำมันดิบเข้าสู่ร่างกายของหอยทั้ง 3 ชนิดในช่วงเวลา 30 วันภายใต้ระบบทดลองเสมือนจริงพบ 1-HOP และ 2-NAP ในหอยทั้ง 3 ชนิดเช่นกัน โดยมีแนวโน้มลดลงตามช่วงเวลาในหอยมะระสูงสุด (0.58 ± 0.04 และ 0.26 ± 0.05 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ) ในวันที่ 5 หลังจากการจำลองการเกิดเหตุการณ์รั่วไหลของน้ำมัน ในขณะที่หอยนางรมปากจีบมี 1-HOP ในเนื้อเยื่อระหว่าง 0.23 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียกและหอยครองแครงมี 0.26 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ซึ่งมีค่าต่ำกว่าในเนื้อเยื่อหอยมะระประมาณ 2 เท่า ในขณะที่ 2-NAP พบสะสมหอยนางรมปากจีบ มีค่าระหว่าง 0.14 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียกและหอยครองแครงมี 0.19 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับหอยมะระพบว่าไม่แตกต่างในทางสถิติ โดยจากการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ระดับการสะสมสารประกอบ PAHs ในสิ่งมีชีวิตในทะเล ขึ้นอยู่กับอัตราการเมตาบอลิซึมในร่างกายของสิ่งมีชีวิต และจากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบที่ได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมัน พบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันในวันที่ 10, 20 และ 30 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อตัวอย่างหอยในกลุ่มที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนจากน้ำมันดิบและกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมันไม่มีความแตกต่างกัน แต่ถ้าหากได้รับน้ำมันดิบเป็นระยะเวลานานขึ้นอาจจะส่งผลให้เซลล์และเนื้อเยื่อได้รับอันตรายและเกิดความเสียหายจนทำให้เกิดการตายของเซลล์ขึ้นได้ในที่สุด

Thesis Title	1-Hydroxypyrene and 2-Naphthol as biomarkers of Petroleum hydrocarbon contamination in intertidal rocky shore molluscs, Ao Prao Samet Island, Rayong province
Student	Miss Jindarha Prempramote
Student ID.	56604081
Degree	Doctor of Philosophy
Program	Agriculture
Year	2018
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Monthon Ganmanee

Abstract

The objective of this study is to evaluate the biological effects of the intertidal rocky shore ecosystems after the crude oil spill accident in Rayong province in July 2013. There are 4 topics in this study (1) monitoring studies on species composition, abundance and community structure of macrobenthos in intertidal rocky shore in Ao Phrao , Samed Island, Rayong Province, which was affected by oil spill compared with reference sites (Khao Leam Ya rocky shore). The fieldworks were carried out in October, December, 2013 and March 2014 by using Photo-quadrat technique. (2) Measurement of biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); 1-Hydroxypyrene (1-HOP) and 2-Naphthol (2-NAP) in three species of intertidal rocky shore molluscs namely coiled snail (*Planaxis sulcatus*), whelk (*Morula* sp.) and rock oyster (*Saccostrea cucullata*). (3) mesocosm experiment on measurement of 1-HOP and 2-NAP in those three mollusc species which exposed to crude oil for 30 days (4) histological studies on rock oyster tissue contaminated with crude oil. The results of the study (1) showed that the abundance of intertidal rocky shore macrobenthos in Ao Prao was significantly different through sampling time, being decreased from 182.2 individuals/m² in October, 2013 to 132.0 individuals/m² in December, 2013 and 132.0 individuals/m², respectively whilst abundances in reference site were not significantly different (p<0.05) through time. 1-HOP and 2-NAP were

detected in all mollusc species collected from Ao Prao with mean concentrations decreased over time whereas both biomarkers were not detected from molluscs sample from reference site (Khao Laem Ya). Concentration of 1-HOP (1.421 ± 0.227 ng/g wet weight) in whelk (*Morula* sp.) which is one of rocky shore predator collected from in December 2013 was higher than grazer (coiled snail; *P. sulcatus*) and filter feeder (rock oyster; *S. cucullata*) 0.039 ± 0.009 ng/g wet weight for coiled snail and 0.094 ± 0.009 ng/g wet weight for rock oyster, respectively. Like experiment (2), concentration of biomarkers in molluscs under 30 days mesocosm experiment decreased through time. Highest concentration of 1-HOP (0.58 ± 0.04 ng/g wet weight) and 2-NAP (0.26 ± 0.05 ng/g wet weight) was detected in whelk (*Morula* sp.) ca. 2 times higher than *S. cucullata* and *P. sulcatus* after being exposed to crude oil for 5 days. This means PAHs from crude oil after the oil spill accident can enter the rocky shore food web and bioaccumulation potential by rocky shore biota might depending on their feeding types or metabolic rate. Histological results revealed that tissue of the rocky oysters observed in the day of 10, 20 and 30 day were not affected directly when exposed to crude oil. Comparative study reveals that none of notable differences was observed in gill tissues of oyster collected from crude oil spill site and reference sites. But the cell and tissues of oyster contaminated with crude oil for a longer period of time, may be harmed and eventually became death.

กิตติกรรมประกาศ

คุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล แก่นมณี อาจารย์ที่ปรึกษาคุษฎีนิพนธ์ ที่ท่านได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ วางแผน ให้คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขในการดำเนินการจัดทำเล่มคุษฎีนิพนธ์ จนเล่มคุษฎีนิพนธ์แล้วเสร็จไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งและถือเป็นพระคุณอย่างยิ่ง จึงขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณประธานกรรมการสอบ ศาสตราจารย์ ดร.เผด็จศักดิ์ ธารยะพันธุ์ คณะกรรมการตรวจคุษฎีนิพนธ์ คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญใจ สมพงษ์ชัยกุล รองศาสตราจารย์ ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร และรองศาสตราจารย์ ดร. อัมร อินทร์สังข์ ที่กรุณาตรวจสอบแก้ไขคุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

คุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จได้ด้วยความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในเรื่องของการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ของ คุณบุปผา จงพัฒน์, คุณจรรยา คงฤทธิ์ และคุณณัทชัย วิจิตโรทัย

ผู้อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง เจ้าหน้าที่อุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า – หมู่เกาะเสม็ด และโดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณจรุงโรจน์ ครอบระวะ ที่เป็นผู้ให้คำแนะนำและให้ความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์จนแล้วเสร็จ

ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ นางสาวภัทริน วิจิตรตระการและนางสาวศศิมา พักคง ที่คอยผลักดัน ช่วยเหลือทั้งร่างกาย แรงใจ และคอยอยู่เคียงข้างตลอดการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อวัชรชัย เปรมปราโมทย์ และคุณแม่อมรา เปรมปราโมทย์ ที่ให้การเลี้ยงดูอบรม และส่งเสริมการศึกษาด้วยดีตลอดมา และขอขอบพระคุณต่อครูอาจารย์ที่ได้ให้การศึกษาดังแต่ต้นมาทุกท่าน ที่กรุณาอบรม สั่งสอน และประสิทธิ์ประสาทความรู้ตลอดจนเพื่อน พี่ และน้อง ทุก ๆ ท่าน รวมทั้งท่านที่มีได้กล่าวนามมาในที่นี้ที่ช่วยเหลือ ทำให้คุษฎีนิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

จินดาหรา เปรมปราโมทย์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	IX
สารบัญภาพ	X
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ในการศึกษา.....	3
1.3 ระยะเวลาการดำเนินงาน.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 มลพิษทางทะเลและชายฝั่ง.....	5
2.2 มลพิษจากน้ำมัน.....	6
2.3 สารประกอบกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon	13
2.4 ผลกระทบของน้ำมันที่มีต่อหาดหิน.....	22
2.5 การตรวจสอบผลกระทบทางชีวภาพจากการปนเปื้อนของมลพิษน้ำมันดิบ.....	24
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	
3.1 การศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดินที่อาศัย อยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง ภายหลังอุบัติเหตุน้ำมันรั่วไหล.....	41
3.2 การตรวจวัดปริมาณดัชนีทางชีวภาพ (biomarker) ของ polycyclic aromatic hydrocarbons ในหอยที่ได้รับผลกระทบจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลบริเวณ หาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง.....	45
3.3 ตรวจวัดระดับ 1-HOP และ 2-NAP ในหอยบริเวณหาดหินในระบบนิเวศ จำลอง.....	49

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4	การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบที่สัมผัสน้ำมันดิบ.....	51
บทที่ 4	ผลการศึกษา.....	
4.1	ผลของคราบน้ำมันจากอุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหลต่อชนิด การแพร่กระจายและลักษณะโครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตหน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินอ่าวพร้าว ในการสำรวจครั้งแรก.....	54
4.2	การตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของ polycyclic aromatic hydrocarbons ในหอยที่ได้รับผลกระทบจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล บริเวณหาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง.....	65
4.3	การสะสม 1-HOP และ 2-NAP ในหอยทั้ง 3 ชนิดภายใต้ระบบทดลองเสมือนจริง.....	72
4.4	การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบที่สัมผัสกับน้ำมันดิบ.....	76
บทที่ 5	วิจารณ์ผลการทดลอง.....	
5.1	การฟื้นตัวและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนของสัตว์ทะเลหน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง ภายหลังจากอุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหล.....	81
5.2	การตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของ PAHs ในหอย เขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง.....	83
5.3	การตรวจวัดระดับ 1-HOP และ 2-NAP ในหอยทั้ง 3 ชนิดภายใต้ระบบทดลองเสมือนจริง.....	87
5.4	การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบที่สัมผัสน้ำมันดิบ.....	89
บทที่ 6	สรุปผลการทดลอง.....	92
	บรรณานุกรม.....	95
	ภาคผนวก ก.....	123
	ภาคผนวก ข.....	125

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

	หน้า
ภาคผนวก ก.....	126
ประวัติผู้เขียน.....	127

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันดิบ.....	6
2.2 การเกิดอุบัติเหตุของการขนส่งน้ำมันในทะเล.....	7
2.3 การเกิดอุบัติเหตุของการขนส่งน้ำมันในทะเลของไทย.....	8
2.4 การตอบสนองของสิ่งมีชีวิตที่สัมผัสกับน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม ไฮโดรคาร์บอน.....	13
2.5 เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลและผลกระทบจากการแพร่กระจายของน้ำมันในอดีต.....	26
2.6 การใช้ดัชนีทางชีวภาพเพื่อชี้วัดปริมาณการสะสมของไฮโดรคาร์บอนในสิ่งมีชีวิต ทางทะเล.....	31
3.1 จำนวนตัวอย่างหอยจากหาดหินอ่าวพร้าว และหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติ เขาแหลมหญ้าในแต่ละช่วงระยะเวลา.....	45
3.2 บั๊จจ้ยต่าง ๆ ในระบบนิเวศจำลองในห้องปฏิบัติการ (<i>mesocosms</i>).....	49
3.3 จำนวนตัวอย่างหอยแต่ละชนิด ที่เก็บจากระบบนิเวศจำลองในแต่ละช่วงระยะเวลา.....	50
4.1 ชนิดของสัตว์หน้าดินที่พบบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลงของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จ.ระยอง.....	55
4.2 Species Richness (d), Shannon Wiener diversity index (H') และ Equitability index (J) ในพื้นที่ศึกษาตามช่วงเวลา.....	65

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	กระบวนการการสลายตัวตามธรรมชาติ (weathering processes) ของน้ำมันเมื่อร่วงไหลลงสู่ทะเล.....9
2.2	เปรียบเทียบระยะเวลาการเกิด Weathering processes ของน้ำมัน.....10
2.3	กลไกการได้รับสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่สิ่งมีชีวิตในน้ำ.....12
2.4	ขบวนการทำงานของเอนไซม์ P - 45021
2.5	กลไกการได้รับสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารและการสะสมของสารพิษในสิ่งมีชีวิต.....22
2.6	โครงสร้างทางเคมีของ pyrene และ naphthalene.....29
2.7	กระบวนการ เมตาบอลิซึม ของ pyrene (A) และสาร naphthalene (B) ซึ่งเปลี่ยนแปลงด้วย CYP ได้ reactive metabolite.....30
2.8	ลักษณะทางกายวิภาคและส่วนประกอบของหอยนางรม.....35
2.9	โครงสร้างของเหงือกแบบจีบในหอยนางรม.....35
2.10	โครงสร้างของเนื้อเยื่อเหงือกที่ตัดตามขวางของหอยตะโกรมกรามดำ <i>C. Iredalie</i>36
2.11	โครงสร้างของซี่เหงือกย่อย Gill filament ของเหงือกหอยตะโกรมกรามดำ37
2.12	โครงสร้าง interprinciple junction ที่เชื่อมระหว่างแผ่นเหงือกของหอยตะโกรมกรามดำ.....37
2.13	ความผิดปกติของรูปร่าง และเกิดภาวะการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงบริเวณ filaments.....39
3.1	พื้นที่ศึกษา แสดงตำแหน่งของการเก็บข้อมูลภาคสนาม.....41
3.2	การตรึงหอดูดาวแต่ละเส้นสำรวจชนิด และความชุกชุมของสัตว์หน้าดิน.....42
3.3	การเก็บข้อมูลโดยเทคนิค photo quadrat.....43
3.4	การติดตั้งกล้องถ่ายภาพดิจิทัลเพื่อทำการถ่ายภาพเก็บข้อมูล.....43
3.5	ตัวอย่างหอย จากหาดหินอ่าวพร้าว และหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า.....45
3.6	ขั้นตอนการสกัด biomarker (1-HOP และ 2-NAP) ในหอย.....47
3.7	ระบบทดลองเลียนแบบธรรมชาติในห้องทดลอง (mesocosms).....50

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	สภาพหาดหินบริเวณอ่าวพร้าวในการสำรวจครั้งแรกเดือนตุลาคม 2556.....54
4.2	คราบน้ำมันปกคลุมผิวตัวของหอยน้ำพริก (<i>Monodonta</i> sp.).....56
4.3	ปลาที่ตายพบบริเวณแนวน้ำลงต่ำสุดในแนวน้ำลงปานกลาง และน้ำที่ขังอยู่ในแอ่ง ขาคู่พบหอยครองแครงตายในแอ่งหิน.....56
4.4	ความชุกชุมทั้งหมดของสัตว์หน้าดินในหาดหินในพื้นที่ศึกษา.....59
4.5	ค่าเฉลี่ยความชุกชุม \pm ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ยของหอยนางรมปากจีบ (<i>S. cucullata</i>) ระดับน้ำต่าง ๆ เทียบกับระดับน้ำทะเลปานกลาง.....60
4.6	ค่าเฉลี่ยความชุกชุม \pm ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ยของหอยครองแครง (<i>P. sulcatus</i>) ใน ระดับน้ำต่าง ๆ เทียบกับระดับน้ำทะเลปานกลาง.....61
4.7	ค่าเฉลี่ยความชุกชุม \pm ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ยของกลุ่มหอยฝาชี ในระดับน้ำต่าง ๆ เทียบกับระดับน้ำทะเลปานกลาง.....62
4.8	ค่าเฉลี่ยความชุกชุม \pm ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ยของหอยมะระ (<i>Morula</i> sp.) ในระดับ น้ำต่าง ๆ เทียบกับระดับน้ำทะเลปานกลาง.....63
4.9	Non-multidimensional Scaling (nMDS) แสดง โครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดิน ในหาดหินอ่าวพร้าว และหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะ เสม็ด.....64
4.10	ค่า Retention time สารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS.....66
4.11	Chromatogram ของสารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS จากเครื่อง GC - MS/MS67
4.12	Mass spectrum of product ของสารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS จากเครื่อง GC - MS/MS.....68
4.13	กราฟมาตรฐานของสารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS.....69
4.14	ปริมาณ 1-HOP และ 2-NAP ในเนื้อเยื่อของหอยทั้งสามชนิดที่ทำการวิเคราะห์ บริเวณหาดหินอ่าวพร้าวในแต่ละช่วงเวลา.....71
4.15	กราฟมาตรฐานของสารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS.....73

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.16 ปริมาณ 1-HOP และ 2-NAP ในเนื้อเยื่อของหอยทั้งสามชนิดที่ทำการวิเคราะห์ บริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินในระบบเลียนแบบนิเวศวิทยาแต่ละ ช่วงเวลา.....	75
4.17 สัณฐานวิทยาของหอยนางรมปากจีบ <i>Saccostrea cucullata</i> แสดงตำแหน่งที่ตัด ชิ้นเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (G = gill).....	76
4.18 เนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจีบ <i>S. cucullata</i>	77
4.19 โครงสร้างของซี่เหงือกย่อย Gill filament ของเหงือกหอยนางรมปากจีบ	78
.....	
4.20 โครงสร้าง interprinciple junction ที่เชื่อมระหว่างแผ่นเหงือกของหอยนางรมปากจีบ	79
4.21 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกหอยนางรมปากจีบ กำลังขยาย 10 เท่า.....	80
4.22 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกหอยนางรมปากจีบ กำลังขยาย 40 เท่า.....	80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

น้ำมันดิบเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbons) ที่ประกอบไปด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป (Anderson, 1977) ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เมื่อน้ำมันดิบรั่วไหลลงสู่ทะเลมักจะอยู่รวมกันบริเวณผิวน้ำและมีการสลายตัวตามธรรมชาติโดยกระบวนการต่าง ๆ สารประกอบ Polycyclic aromatic hydrocarbons หรือ PAHs ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันดิบมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (Anderson, 1977; Connell and Farrington, 1981; Barron and Ka'aihue, 2001) เนื่องจาก PAHs เป็นสารก่อมะเร็ง ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ระเหยและสลายได้ช้า สามารถกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมได้ยาก เมื่อเกิดเหตุการณ์รั่วไหลของน้ำมันดิบจึงมักจะรวมตัวกันเป็นก้อนและจมลงสู่พื้นท้องทะเล (Lee *et al.*, 2015)

การรั่วไหลของน้ำมันดิบเป็นเหตุการณ์ที่พบได้ทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยตลอดช่วงเวลาสิบปีที่ผ่านมาได้เกิดอุบัติเหตุรั่วไหลหลายครั้งซึ่งก่อให้เกิดภาวะมลพิษทางทะเลเนื่องจากประมาณร้อยละ 40 ของน้ำมันที่ใช้ในประเทศไทยเกือบทั้งหมดเป็นการนำเข้าน้ำมันดิบจากแหล่งผลิตในต่างประเทศโดยการขนส่งทางเรือ และพบว่าในปัจจุบันความต้องการพลังงานในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จำนวนเรือบรรทุกน้ำมันที่เข้ามาในประเทศไทยจึงมีจำนวนมากขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นจึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมันในขบวนการขนส่ง จากรายงานของกรมควบคุมมลพิษในระหว่างปี พ.ศ. 2559 - 2562 มีอุบัติเหตุรั่วไหล 140 ครั้งใน 22 จังหวัดชายฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกโดยเฉพาะจังหวัดชลบุรีและระยอง ซึ่งเป็นแหล่งอุตสาหกรรมปิโตรเคมีหลักมีรายงานการรั่วไหลของน้ำมันดิบมากที่สุด ส่วนใหญ่การรั่วไหลมีปริมาณน้อยโดยอยู่ในรูปของคราบน้ำมันและก้อนน้ำมัน (Tar ball) ตามชายหาด เมื่อน้ำมันดิบเข้าสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำจะก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางน้ำอย่างฉับพลันส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศทางทะเลและสิ่งมีชีวิตในหลายด้าน เช่น คราบน้ำมันที่ผิวน้ำจะลดความสามารถการสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืช สาหร่าย และพืชน้ำต่าง ๆ เมื่อคราบน้ำมันปกคลุมร่างกาย

ของสิ่งมีชีวิตหรือพื้นผิวที่สิ่งมีชีวิตอยู่อาศัย (substratum) ก็จะส่งผลกระทบต่อพฤติกรรม การดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้สารเคมีในน้ำมันดิบส่วนใหญ่เป็นสารพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตทั้งจากการกิน การหายใจและการสัมผัส จะทำให้การทำงานของระบบทางสรีระของร่างกายผิดปกติ (Agwuocha *et al.*, 2011) ความเป็นพิษอาจทำให้สิ่งมีชีวิตตายอย่างฉับพลัน (lethal effect) หรือเกิดความผิดปกติต่าง ๆ (sub-lethal effect) ทั้งที่เกิดขึ้นในตัวสิ่งมีชีวิตที่รับน้ำมันเอง หรือเกิดความผิดปกติขึ้นกับประชากรรุ่นต่อไป สารพิษจากน้ำมันที่สะสมในสิ่งมีชีวิตสามารถส่งต่อไปยังผู้บริโภคลำดับสูงขึ้นไปได้ ซึ่งหมายถึงสารเหล่านี้เข้าไปอยู่ในห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศ (Gin *et al.*, 2001; Connell, 1988) การตายของสิ่งมีชีวิตที่มีผลมาจากน้ำมันยังส่งผลกระทบต่อโครงสร้างชุมชนในระบบนิเวศนั้น อาจทำให้สิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญบางชนิด (key specie) หายไป (Pereira *et al.*, 1999) และเกิดการเข้ามาอยู่แทนที่ของสิ่งมีชีวิตอื่น (opportunistic species)

วันที่ 27 กรกฎาคม 2556 เกิดเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วออกจากท่อขนส่งน้ำมันดิบขนาด 16 นิ้วของบริษัท พีทีที โกลบอลเคมิคอล จำกัด (มหาชน) ขณะขนถ่ายน้ำมันบริเวณท่าบลมาบตาพุด จังหวัดระยอง ห่างจากชายฝั่งไปทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ 20 กิโลเมตร โดยมีน้ำมันดิบรั่วไหลออกมาประมาณ 50,000 – 70,000 ลิตร (ธีระ, 2558) จัดเป็นอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมันที่มีความรุนแรงในระดับ 3 (Tier 3) ซึ่งเป็นระดับสูงสุด หลังเกิดเหตุบริษัทฯ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้ดำเนินการกำจัดคราบน้ำมันตามหลักสากล ตั้งแต่การวางทุ่นล้อม และการฉีดสารเคมีลดแรงตึงผิว (dispersant) แต่คราบน้ำมันบางส่วนได้เคลื่อนที่ไปทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือเข้าสู่บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด ส่งความเสียหายอย่างรุนแรงต่อพื้นที่ชายหาดในเขตน้ำขึ้นน้ำลง

พื้นที่ชายหาดในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด ส่วนหนึ่งเป็นหาดหินในเขตน้ำขึ้นน้ำลง จากอุบัติเหตุการแพร่กระจายคราบน้ำมันเข้าสู่พื้นที่ครั้งนี้เป็นผลทำให้มีการสะสมของน้ำมันดิบในพื้นที่ดังกล่าว ส่งผลกระทบทำให้มีการสะสมของสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งมีชีวิต และอาจถ่ายทอดไปยังผู้บริโภคลำดับสูงขึ้นไปในห่วงโซ่อาหาร โดยสารพิษเหล่านี้อาจถูกส่งต่อมายังมนุษย์ในที่สุด จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องประเมินและติดตามผลกระทบทางชีวภาพที่เกิดจากน้ำมันดิบในพื้นที่ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งที่สำคัญในแง่ของการเป็นส่วนหนึ่งระบบนิเวศทางทะเลและแหล่งท่องเที่ยวของเกาะเสม็ด ด้วยเหตุนี้จึงมีการตรวจสอบผลกระทบทางชีวภาพของน้ำมันดิบที่มีต่อระบบนิเวศในทะเล โดยทำการประเมินความหลากหลาย การศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนของ

สิ่งมีชีวิตหน้าดิน และตรวจวัดระดับการสะสมของสารประกอบ PAHs ในตัวแทนผู้บริโภคลำดับชั้นต่าง ๆ ในระบบห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิตหน้าดิน โดยใช้ 1-HOP และ 2-NAP เป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) เพื่อบ่งบอกถึงระดับของการปนเปื้อนปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่เข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิตและการส่งผ่านความเป็นพิษไปยังผู้บริโภคลำดับของห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศ ซึ่งผลกระทบที่เกิดขึ้นจะส่งผลทั้งในระยะสั้นและระยะยาว การศึกษาข้อมูลเหล่านี้จึงมีความสำคัญที่จะได้นำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดทำมาตรการหรือกรอบแนวทางการแก้ไขปัญหาในลักษณะเดียวกันที่อาจจะเกิดขึ้นได้อีกในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดินที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากอุบัติเหตุน้ำมันรั่วไหล

2. ศึกษาตรวจสอบโอกาสในการรับสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากน้ำมันดิบเข้าสู่หอยที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยองซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากอุบัติเหตุน้ำมันรั่วไหล โดยใช้ 1-HOP และ 2-NAP เป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker)

3. ศึกษาระดับของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) จากสารประกอบปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน (1-HOP และ 2-NAP) ในหอยสามชนิดซึ่งเป็นตัวแทนของผู้บริโภคลำดับต่าง ๆ ในห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศหาดหิน ภายใต้ระบบนิเวศจำลอง (mesocosms)

4. เพื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกในหอยนางรมปากจีบที่สัมผัสกับน้ำมันดิบ

1.3 ระยะเวลาการดำเนินงาน

ระยะเวลาการดำเนินงานทั้งหมดประมาณ 4 ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 - เดือนตุลาคม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลการประเมินสถานภาพและผลการศึกษาดูตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง ซึ่งได้รับผลกระทบจากอุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหล

2. ทราบถึงระดับการสะสมสารประกอบจากน้ำมันดิบในสิ่งมีชีวิตหน้าดินที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินที่ได้รับผลกระทบจากอุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหล และความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดสารดังกล่าวไปยังผู้บริโภคลำดับต่าง ๆ ในห่วงโซ่อาหาร

ประโยชน์จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการนำข้อมูลที่ได้จากการค้นพบมาประยุกต์ใช้ในด้านจัดการ การเตรียมความพร้อม จัดหามาตรการและแนวทางการดำเนินการเกี่ยวกับอุบัติเหตุการรั่วไหลหรือการปนเปื้อนของน้ำมันทางทะเล

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มลพิษทางทะเลและชายฝั่ง

มลพิษทางทะเลและชายฝั่ง คือ การปนเปื้อนของสารมลพิษต่าง ๆ ลงสู่สิ่งแวดล้อมในทะเลและชายฝั่ง ส่งผลให้คุณภาพสิ่งแวดล้อมในทะเลและชายฝั่งเสื่อมลง ปัจจุบันทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งเสื่อมโทรมอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากทะเลและชายฝั่งเป็นบริเวณสุดท้ายที่รองรับของเสียจากแหล่งกำเนิดซึ่งถูกพัดมาโดยน้ำ นอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจากการพัฒนาทางเศรษฐกิจในพื้นที่ชายฝั่ง การนำเทคโนโลยีและสารก่อมลพิษมาใช้ในภาคเกษตรกรรม พาณิชยกรรม อุตสาหกรรม และการท่องเที่ยว จนทำให้เกิดปัญหาภาวะมลพิษทางทะเลและชายฝั่ง น้ำทะเลเสื่อมคุณภาพสร้างความเสียหายต่อสิ่งมีชีวิตที่อยู่อาศัยในทะเลและบริเวณชายฝั่ง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อมนุษย์ในที่สุด โดยการพิจารณาและศึกษาถึงชนิดของสารที่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษในทะเล ผลกระทบที่มีต่อสภาพแวดล้อม พืชและสัตว์ในทะเล มีความเกี่ยวข้องต่อแหล่งอาหาร ระบบนิเวศ สุขภาพของมนุษย์ การค้า การท่องเที่ยว และการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติในทะเล ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะถูกนำมาใช้ในการกำหนดมาตรการและแนวทางเพื่อลดปัญหามลพิษที่เกิดขึ้นในอนาคต

ปัจจุบันการรั่วไหลของน้ำมันดิบเป็นเหตุการณ์ที่พบได้ทั่วโลก และเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางน้ำอย่างฉับพลันส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศทางทะเลและสิ่งมีชีวิตโดยตรง การรั่วไหลของน้ำมันดิบอาจมีสาเหตุจากอุบัติเหตุทางเรือ เช่น เรือชนกัน การอับปางของเรือ และกิจกรรมการเดินเรือ เช่น การถ่ายน้ำมันเครื่อง การขนถ่ายน้ำมัน การขุดเจาะก๊าซธรรมชาติ เป็นต้น

2.2 มลพิษจากน้ำมัน

2.2.1 ความสำคัญของน้ำมัน

น้ำมันเป็นทรัพยากรธรรมชาติประเภทหนึ่งที่มีบทบาทและมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์จากข้อมูลในปีพ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำมันสำเร็จรูปกว่า 150 ล้านลิตรต่อวัน และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นในอนาคต

น้ำมันดิบหรือปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน 98 % (Couillard *et al.*, 2005) ซึ่งมีสารอื่น ๆ เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน กำมะถัน และโลหะบางชนิด (วานเดียมและนิกเกิล) ปะปนอยู่ในปริมาณเล็กน้อย (ตารางที่ 2.1) (Carlberg and Skarstedt, 1972; Onwurah *et al.*, 2007) เกิดจากการทับถมของซากพืชและสัตว์ ภายใต้อุณหภูมิและความดันซึ่งเกิดจากแรงกดทับจากดินตะกอนและความร้อนใต้พื้นผิวโลกทำให้ซากอินทรีย์เหล่านี้เกิดการย่อยสลายและกลายเป็นปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนแทรกตัวอยู่ตามชั้นหิน น้ำมันดิบมีความไวไฟ โดยทั่วไปจะมีสีดำหรือสีน้ำตาล ลักษณะและคุณสมบัติของน้ำมันดิบจะมีความแตกต่างกันออกไปตามแหล่งที่ขุดพบ

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันดิบ

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
คาร์บอน	85 – 90
ไฮโดรเจน	10 - 15
ออกซิเจน	5
กำมะถัน	7
ไนโตรเจน	0.5
โลหะต่างๆ	0.1

ที่มา: ดัดแปลงจาก Franck and Stadelhofer (2012)

การรั่วไหลของน้ำมันจากอุบัติเหตุของเรือบรรทุกน้ำมันในอดีต ซึ่งมีสาเหตุจากการรั่วไหลที่เกิดจากอุบัติเหตุทางเรือ เช่น อุบัติเหตุเรือชนกัน การอับปางของเรือ ได้ก่อให้เกิดผลกระทบเป็นอย่างมาก เช่น ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตมีจำนวนลดลง มีการเปลี่ยนแปลงของ

กิจกรรมเมตาบอลิซึมภายในร่างกาย อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการกินอาหารลดลง เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างการเกิดอุบัติเหตุการขนส่งน้ำมันในทะเลครั้งสำคัญในอดีตได้แสดงไว้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงการเกิดอุบัติเหตุของการขนส่งน้ำมันในทะเล

ลำดับ	ชื่อเรือ	ปี	สถานที่	ปริมาณน้ำมัน (ตัน)
1	Atlantic Empress	1979	Off Tobago, West Indies	287,000
2	Castillo de Bellver	1983	Off Saldanha Bay, South Africa	252,000
3	Sea Star Hawaiian	1972	Gulf of Oman	115,000
4	Patriot	1977	300 nautical miles off Honolulu	95,000
5	Independenta	1979	Bosphorus, Turkey	95,000
6	Braer	1993	Shetland Islands, UK	85,000
7	Khark 5	1989	120 nautical miles off Atlantic coast of Morocco	80,000
8	Prestige	2002	Off the Spanish coast	77,000
9	Sea Empress	1996	Milford Haven, UK	72,000
10	Exxon Valdez	1989	Prince William Sound, Alaska, USA	37,000

ที่มา : Anzecc (2000)

2.2.2 ปัญหาการรั่วไหลของน้ำมันในประเทศไทย

เนื่องจากประเทศไทยมีอาณาเขตติดกับทะเลทั้งสองด้าน กล่าวคือ ด้านตะวันตกติดกับทะเลอันดามันซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของมหาสมุทรอินเดียและด้านตะวันออกติดกับอ่าวไทยซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของมหาสมุทรแปซิฟิก และมีการขนส่งทางทะเลเป็นจำนวนมาก ซึ่งการขนส่งน้ำมันทางทะเลมีความเสี่ยงที่จะเกิดการรั่วไหลเข้าสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำ และก่อให้เกิดปัญหามลพิษน้ำมันเกิดขึ้นอยู่เสมอ เช่น ในปีพ.ศ. 2545 จากเหตุการณ์เรือ Eastern Fortitude ชนหินฉลามบริเวณเกาะจวง และในปีเดียวกันจากเหตุการณ์เรือบรรทุกน้ำมัน Sky Ace ชนกับเรือขนส่งสินค้า Kota Wijaya บริเวณเกาะไผ่ส่งผลให้มีการรั่วไหลของน้ำมันลงทะเล ต่อมาในปีพ.ศ. 2547 เกิดเหตุการณ์เรือบรรทุกน้ำมัน Dragon 1 อับปางบริเวณเกาะครกจังหวัดชลบุรีทำให้มีน้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเล และในปี 2548

เหตุการณ์เรือ Ryuhō Maru มีการรั่วไหลของน้ำมันระหว่างการขนถ่าย เป็นเหตุให้น้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเลห่างจากบริเวณชายฝั่งอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรีเป็นระยะทาง 4 กิโลเมตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2553) นอกจากนี้อุบัติเหตุดังกล่าวอื่น ๆ อีกมากมายดังแสดงในตารางที่ 2.3

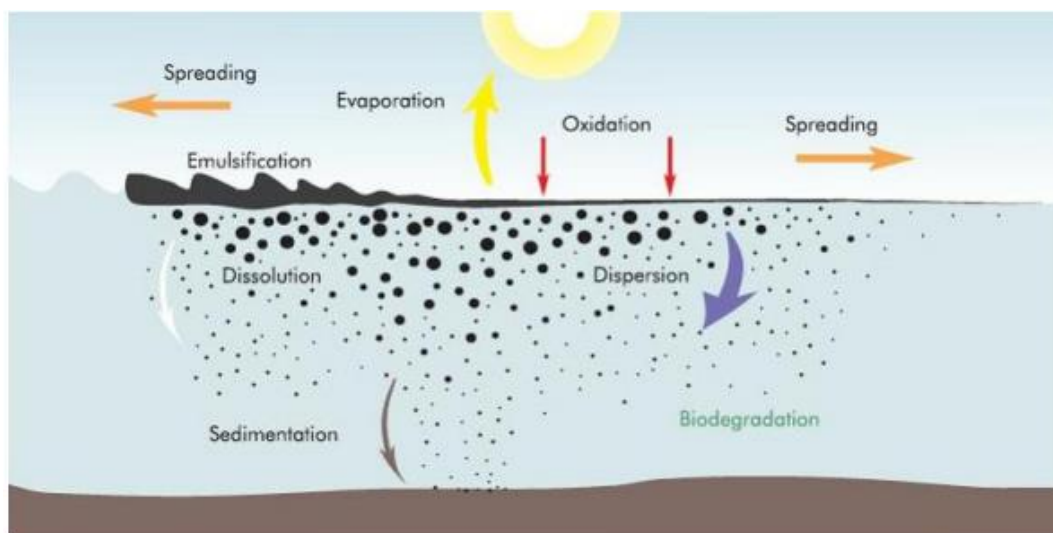
ตารางที่ 2.3 การเกิดอุบัติเหตุของการขนส่งน้ำมันในทะเลของไทย

ลำดับ	ชื่อเรือ	ปี	สถานที่	ปริมาณน้ำมัน (ตัน)
1	Sunflower	1979	เกาะสีชัง	300,000
2	วิสาหกิจ 5	1994	เกาะสีชัง อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี	400,000
3	กิงส์ครุยเซอร์	1997	เกาะพีพี จังหวัดกระบี่	7,000
4	Dragon1	2004	เกาะครก จังหวัดชลบุรี	567,300
5	CT 34	2008	ท่าเรือ จังหวัดระยอง	15,000

ที่มา : ยิงรัก (2549)

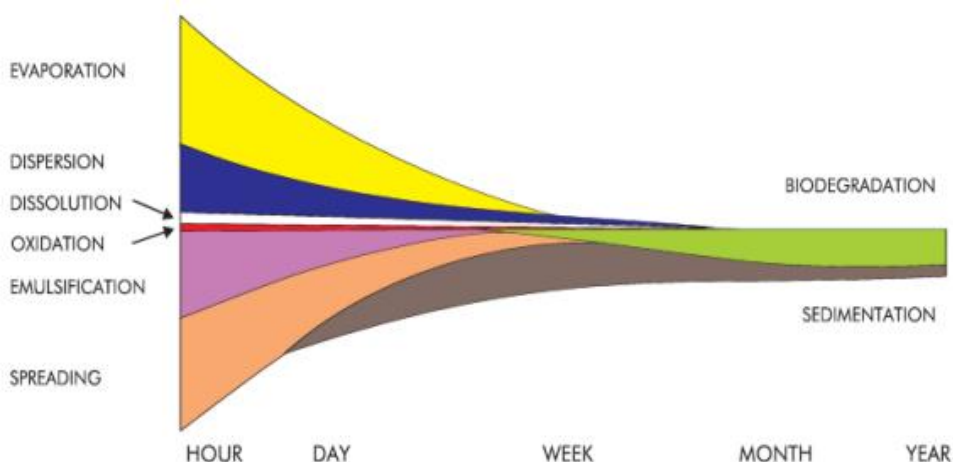
2.2.3 พฤติกรรมของน้ำมันในน้ำทะเล

เมื่อน้ำมันดิบแพร่กระจายเข้าสู่ทะเลจะเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ เช่น การละลาย (dissolution) การระเหย (evaporation) การกระจาย (dispersion) การตกตะกอน (sedimentation) และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (biodegradation) เป็นต้น (ภาพที่ 2.1) ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนรูปของน้ำมันจะมีกลไกการเปลี่ยนแปลงเริ่มตั้งแต่มีการรั่วไหลจนกระทั่งเกิดการสลายตัวหมดไป ในช่วงของการสลายตัวก็จะเกิดความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำทำลายระบบนิเวศทางทะเล กระบวนการเมตาบอลิซึม การตกตะกอน เกิดขึ้นควบคู่กันไปจนกระทั่งมีการเปลี่ยนสภาพไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตราย และสภาพแวดล้อมกลับคืนสู่ภาวะปกติ (Almeda *et al.*, 2016)



ภาพที่ 2.1 กระบวนการการสลายตัวตามธรรมชาติ (weathering processes) ของน้ำมันเมื่อรั่วไหลลงสู่ทะเล (Anzecc, 2000)

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันที่เกิดการรั่วไหลจะส่งผลกระทบต่อทางชีวภาพและทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Wang *et al.*, 1999) ความรุนแรงของผลกระทบจากการรั่วไหลของน้ำมันต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตทางทะเล นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันและคุณสมบัติของน้ำมันแล้ว (Aas *et al.*, 2000) ยังขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำมันที่รั่วไหล ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับผลกระทบและปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ บริเวณที่เกิดเหตุการณ์เช่น กระแสลม กระแสน้ำ ลักษณะพื้นที่ (Camphuysen, 1998; Zaki *et al.*, 2014) และอุณหภูมิ (Rice *et al.*, 1984) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อความเร็วในการแพร่กระจายและกระบวนการย่อยสลายแบบต่าง ๆ ในธรรมชาติ โดยกระบวนการการกระจายตัวของน้ำมัน และการระเหย จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่เกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล ต่อเนื่องด้วยการเกิดกระบวนการแพร่กระจายและการผสมของน้ำมันคิกับน้ำ ในขณะที่กระบวนการ ออกซิเดชัน และการละลาย เกิดขึ้นน้อย และกระบวนการตกตะกอน และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปช่วงระยะหนึ่ง (Young *et al.*, 2010) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 เปรียบเทียบระยะเวลาการเกิด Weathering processes ของน้ำมัน (Anzecc, 2000)

2.2.4 ผลกระทบจากน้ำมันรั่วไหล

ความรุนแรงของผลกระทบจากน้ำมันรั่วไหลลงในแหล่งน้ำส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตทางน้ำทั้งในบริเวณที่เกิดเหตุและในบริเวณใกล้เคียง ซึ่งเมื่อเกิดการรั่วไหลของน้ำมัน ผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต มีดังต่อไปนี้

2.2.4.1 ผลกระทบทางกายภาพ

คราบน้ำมันที่มีการแพร่กระจายบนผิวน้ำจะปิดกั้นกีดขวางออกซิเจนในอากาศไม่ทำให้สามารถละลายลงสู่水下ได้ ทำให้บริเวณนั้นเกิดการขาดออกซิเจน (Laughlin and Linden, 1983) คุณภาพน้ำเลวลง นอกจากนี้คราบน้ำมันที่ลอยอยู่เหนือผิวน้ำจะบดบังแสงอาทิตย์ ไม่ให้ส่องผ่านลงไปใต้น้ำ ส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืช สาหร่าย และพืชน้ำชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตอาหารขั้นพื้นฐานให้กับผู้บริโภคลำดับถัดไปในห่วงโซ่อาหาร (González *et al.*, 2009; Strachan, 1972)

2.2.4.2 ผลกระทบทางด้านชีวภาพ

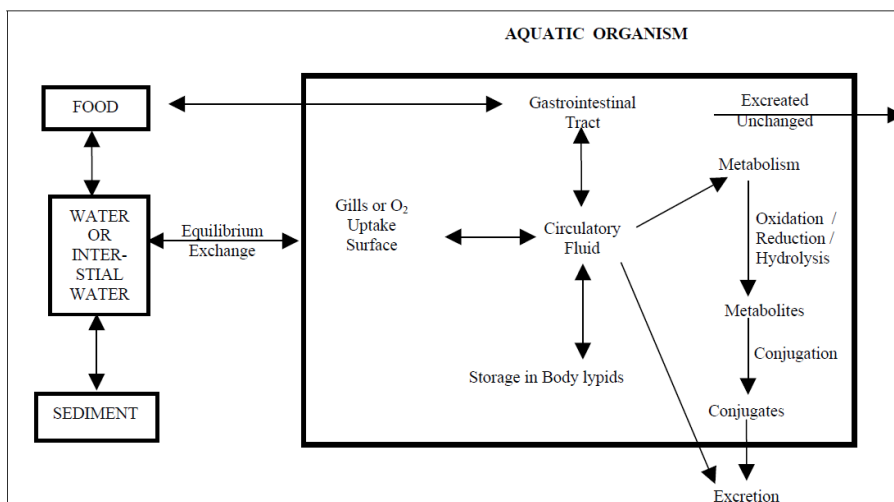
ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบจะส่งผลความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม ความเป็นพิษอาจเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (Acute Effect) คือ ตายภายในระยะเวลาอันสั้น

หรืออาจเป็นพิษแบบเรื้อรังหรือพิษสะสม (Chronic Effect) คือ เกิดพิษสะสมทีละน้อยในร่างกายของสิ่งมีชีวิตทำให้ชีวิตสั้นลง (Baussant *et al.* 2001; Klasing and Brodberg, 2010)

สารพิษในน้ำมันจะมีการละลายรวมกับน้ำ สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโดยการสัมผัสหรือการกิน ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สัตว์มีอาการผิดปกติหรืออาจถึงตายได้ ความเข้มข้นของน้ำมันตั้งแต่ 1 - 10 mg/L (Law, 1995) ส่งผลทำให้เกิดพิษเฉียบพลันและเรื้อรังต่อแพลงก์ตอนพืช โดยขัดขวางการสังเคราะห์แสงทำให้การเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนถูกยับยั้ง ส่งผลให้จำนวนประชากรมีปริมาณที่ลดน้อยลง ในขณะที่แพลงก์ตอนสัตว์สามารถรับน้ำมันได้ทั้งในรูปของหยดเล็ก ๆ หรือในส่วนที่ละลายน้ำ ความเข้มข้นของน้ำมันตั้งแต่ 0.05 - 9.4 mg/L ส่งผลกระทบให้ผลผลิตมวลชีวภาพลดน้อยลงและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของกลุ่มสิ่งมีชีวิตแพลงก์ตอนสัตว์ด้วย และพบว่าเมื่อเกิดการรั่วไหลของน้ำมันในบริเวณน้ำตื้น ปลาและสัตว์ขนาดเล็กจะได้รับอันตรายถึงตายในทันที ส่วนสัตว์ที่สามารถว่ายน้ำได้และมีขนาดใหญ่ เช่น ปลา หมึก และโลมา จะได้รับผลกระทบจากการเกิดน้ำมันรั่วไหลน้อยกว่า (Anzecc, 2000)

ผลต่อสัตว์หน้าดิน (Effect on Benthos) คราบน้ำมันที่จมลงไปบางส่วนที่เป็นก้อนเมื่อจมลงจะไปเป็นอันตรายต่อสัตว์ที่อยู่หน้าดิน (Sánchez *et al.*, 2006) ส่วนสัตว์หน้าดินที่อาศัยอยู่ตามชายหาด คราบน้ำมันจะปกคลุมร่างกายและมีพิษต่อระบบประสาท สัตว์หน้าดินบางประเภท เช่น ปลาน้ำตื้น ปู และหอยแครงอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันเข้มข้นมากกว่า 3.0 mg/L เกินกว่า 96 ชั่วโมง จะเป็นอันตรายถึงชีวิต

การรั่วไหลของน้ำมันดิบลงสู่ทะเลจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตหน้าดินที่อาศัยอยู่บริเวณหาดหินได้ เนื่องจากน้ำมันดิบมีไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่ เมื่อสิ่งมีชีวิตสัมผัสได้รับสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้เข้าไปสะสมในร่างกายแล้วจะมีการถ่ายทอดไปตามสายใยอาหารต่อไป ซึ่งการรับสารไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตอาจเกิดจากการผ่านกระบวนการดูดซึมผ่านผนังเซลล์ การกลืนกินอนุภาคแขวนลอยที่มีไฮโดรคาร์บอนถูกดูดซับอยู่ หรือโดยการกลืนกินน้ำที่มีไฮโดรคาร์บอนปนเปื้อนเข้าไปโดยตรง ผลของไฮโดรคาร์บอนที่มีต่อสิ่งมีชีวิตจะเป็นแบบไม่เฉพาะเจาะจง (nonspecific toxicity) (Ariese *et al.*, 1993; Chaisuksant *et al.*, 1999) กลไกในการรับสารไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิตแสดงดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 กลไกการได้รับสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่สิ่งมีชีวิตในน้ำ (Chaisuksant *et al.*, 1999)

ผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมัน โดยทั่วไปแบ่งได้ 2 ระดับ ระดับแรกเป็นพิษโดยครบน้ำมันมาปกคลุมสิ่งมีชีวิตนั้นทำให้หายใจไม่ออก ประสิทธิภาพการเคลื่อนไหวลดลง และหาอาหารไม่ได้ ซึ่งจะมีผลกระทบอย่างมากต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลง ระดับที่สองเป็นการรบกวนเข้าสู่ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ ความเป็นพิษต่อขบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากได้รับสารไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ร่างกายในระดับที่มากพอ สารไฮโดรคาร์บอนจะแทรกซึมเข้าไปในชั้นไขมันที่อยู่ในผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ถูกรบกวน สูญเสียการควบคุมการแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ที่เหมาะสม ถ้ารุนแรงมากเซลล์อาจแตกทำให้สารภายในไหลออกมา ซึ่งถือว่าเป็นพิษอย่างรุนแรง (Hannam *et al.*, 2010)

Capuzzo *et al.* (1988) แบ่งการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อสัมผัสกับน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนออกเป็น 4 ระดับ (ตารางที่ 2.4) คือ

ตารางที่ 2.4 การตอบสนองของสิ่งมีชีวิตที่สัมผัสกับน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

ระดับการตอบสนอง	ลักษณะการตอบสนอง
ระดับเซลล์ (biochemical - cellular)	<ol style="list-style-type: none"> 1. กระทบต่อกระบวนการ เมตาบอลิซึมของเซลล์ 2. มีการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย
ระดับสิ่งมีชีวิต (organism)	<ol style="list-style-type: none"> 1. เปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย 2. การทำงานของโครงสร้างต่าง ๆ ขาดประสิทธิภาพ อาจนำไปสู่การเกิดโรคหรือความผิดปกติ 3. สิ่งมีชีวิตมีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมดำรงชีวิต ส่งผลให้การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ลดลง
ระดับประชากร (population)	<ol style="list-style-type: none"> 1. สิ่งมีชีวิตที่มีการสัมผัสกับน้ำมันต้องมีการปรับตัว ซึ่งนำไปสู่การเกิดความเครียด 2. เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนของกลุ่มประชากร
ระดับชุมชน (community)	<ol style="list-style-type: none"> 1. การรั่วไหลของน้ำมันส่งผลให้มีการปรับตัวทางด้านระบบนิเวศ 2. ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ species เกิดขึ้น

ที่มา : ดัดแปลงจาก Capuzzo *et al.* (1988)

2.3 สารประกอบกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon

น้ำมันดิบประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายหรือ volatile organic compounds (VOCs) และสารประกอบอินทรีย์กลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) สารประกอบ VOCs เป็นสารน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสามารถระเหยเข้าสู่อากาศได้อย่างรวดเร็ว ระเหยเป็นไอกระจายตัวไปในอากาศได้ในที่อุณหภูมิและความดันปกติ ในขณะที่สารประกอบ PAHs เป็นสารน้ำหนักโมเลกุลสูง ส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ มีความดันไอต่ำและความเป็นพิษต่ำกว่า VOCs แต่สามารถตกค้างอยู่ได้นานในสิ่งแวดล้อม (Shin and Lim, 2011)

สารประกอบ PAHs เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภท persistent organic pollutants ชนิดหนึ่ง (Barakat *et al.*, 2011; Howsam *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009) จัดเป็น

สารประกอบขนาดใหญ่ (João *et al.*, 2009) ที่เกิดจากกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ในธรรมชาติ เมื่อปนเปื้อนเข้าสู่ระบบนิเวศทางน้ำจะสามารถจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์และเกิดการสะสมในสิ่งมีชีวิตได้ง่าย (Bols *et al.* 2005) สาร PAHs มีฤทธิ์ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็น prokaryote และ eukaryote (Pérez-Cadahía *et al.*, 2004; Sim *et al.*, 1987) ทำให้เกิดการผิดปกติของตัวอ่อนในสัตว์น้ำและมนุษย์ (Baršienė *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015; Seiler *et al.*, 2014) เนื่องจากสารประกอบชนิดนี้เป็นพวกไม่มีขั้ว (nonpolar) จึงมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำแต่สามารถละลายได้ดีในไขมัน ดังนั้นจึงสะสมในชั้นไขมันของร่างกายได้ในระยะเวลาที่ยาวนาน ปกติสารประกอบ PAHs ในเนื้อเยื่อไขมันจะไม่ก่อให้เกิดพิษกับร่างกายจนกว่าจะเข้าไปอยู่ในเซลล์ และสารประกอบชนิดนี้อาจสะสมได้ในชั้นเมมเบรนของเซลล์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นฟอสโฟลิปิด (phospholipid) (João *et al.*, 2009; Long *et al.*, 1995) ถึงแม้ว่าสารประกอบชนิดนี้สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น แต่ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการทางฟิสิกส์ เคมี และชีวภาพ ของสารชนิดนี้ในสภาพแวดล้อมจริง ๆ ยังมีการศึกษากันน้อยมาก (Gesteira and Dauvin, 2005) โดยการศึกษาที่กระทำอยู่ในปัจจุบันจะเน้นถึงความเป็นไปในการปนเปื้อนของสารพิษในสภาพแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตในทะเลเป็นส่วนใหญ่

2.3.1 สมบัติทางกายภาพเคมีของ PAHs

PAHs ประกอบด้วยวงเบนซีนเรียงต่อกันตั้งแต่สองวงขึ้นไป อาจจัดเรียงแบบเส้นตรง เป็นมุม หรือเป็นกลุ่มก็ได้ (Ayotamuno *et al.*, 2010; Blumer, 1976) มีอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ (Martorell *et al.*, 2010) มีจุดหลอมเหลวและจุดเดือดสูง ซึ่งสารประกอบแต่ละประเภทในกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติทางกายภาพเคมีที่แตกต่างกัน (Ma *et al.*, 2010; Neff *et al.*, 2005) เมื่อเข้าสู่สิ่งแวดล้อมมักเกาะกับอนุภาคฮิวมิคในดินหรือสะสมในสิ่งมีชีวิต โดยพบว่าสารประกอบ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ประกอบด้วย 2 หรือ 3 วงแหวน เช่น benzenes, naphthalenes และ phenanthrenes (Readman *et al.*, 1982) แสดงความเป็นพิษเฉียบพลันอย่างรุนแรงและมีผลข้างเคียงอื่น ๆ ต่อสิ่งมีชีวิตบางชนิด แต่ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง ในขณะที่ PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าซึ่งมีโครงสร้างทางเคมี 4 - 7 วงมีความเป็นพิษน้อยกว่า แต่เป็นสารก่อมะเร็งก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมถึงปลาสิ่งมีชีวิตในน้ำอื่น ๆ สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Dyrynda *et al.*, 2000; Pelallo-Martínez *et*

al., 2014; Shi *et al.*, 2005) โดยทั่วไปแล้ว PAHs มีแนวโน้มที่จะมีการแพร่กระจายเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศเพียงเล็กน้อย เนื่องจากสารประกอบชนิดนี้มีความสามารถในการละลายของไขมันสูง แต่ PAHs ส่วนใหญ่จะถูกเผาผลาญและมีการกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในหอยสองฝา (Gray, 2002; Neff and Burns, 1996; Suteau *et al.*, 1988)

2.3.2 แหล่งกำเนิดของสารประกอบ PAHs

สารประกอบ PAHs มีแหล่งกำเนิดหลัก 2 แหล่งใหญ่ ๆ คือ เกิดจากธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายสารบางชนิด เช่น steroids หรือ triterpenoids ซึ่งมีสารประกอบกลุ่ม aliphatic isophenoids เป็นสารตั้งต้นในตะกอนดินที่ทับถมกัน เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแหล่งกำเนิดน้ำมันดิบ และมีสารประกอบ PAHs เป็นองค์ประกอบ และจากกิจกรรมของมนุษย์ ซึ่งแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มตามกระบวนการเกิด คือ สารประกอบ PAHs ที่เกิดจากปิโตรเลียมและที่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิง (Anyakora *et al.*, 2005; Zakaria *et al.*, 2002)

2.3.3 การกระจายตัวของสารประกอบ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

สารประกอบ PAHs ที่มีการแพร่กระจายตัวในบรรยากาศจะมีการเกาะติดกับอนุภาคในชั้นบรรยากาศ โดย PAHs ที่เกาะติดอยู่กับอนุภาคในชั้นบรรยากาศจะมีการแพร่กระจายลงสู่พื้นดินและแหล่งน้ำโดยแรงโน้มถ่วงของโลกและการชะล้างโดยน้ำค้างหรือน้ำฝน นอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจากการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำอีกด้วย (Zakaria *et al.*, 2001) เมื่อสารประกอบ PAHs มีการกระจายตัวอยู่ในน้ำจะทำการรวมตัวกับอนุภาคแขวนลอย และตกตะกอนลงสู่พื้นดิน (Gocht *et al.*, 2001)

ในบรรยากาศและแหล่งน้ำ สารประกอบ PAHs จะดูดซับ ติดแน่นอยู่กับอนุภาคสารแขวนลอย เนื่องจากสารประเภทนี้เป็นสารที่ไม่มีขั้วแบบ hydrophobic (Verma *et al.*, 2012) มีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย มีการระเหยต่ำ และมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic Ring) ดังนั้นเมื่อสารชนิดนี้ปนเปื้อนลงไปในแหล่งน้ำก็จะยึดติดอยู่กับสารแขวนลอย และตะกอนพื้นทะเล (Bach *et al.*, 2005) ขบวนการ photochemical และ oxidation โดยสิ่งมีชีวิต จะมีผลน้อยมากต่อการสลายตัวของสารประกอบ PAHs ที่สะสมในตะกอนพื้นทะเลเมื่อเปรียบเทียบกับ

กับส่วนที่อยู่ในน้ำ ส่งผลทำให้สารประกอบ PAHs คงทนและสะสมเพิ่มสูงขึ้นในตะกอนพื้นทะเล ดังนั้นตะกอนบริเวณชายฝั่งและในทะเลจะเป็นแหล่งสะสมของสารประกอบ PAHs ที่สำคัญและส่งผลต่อเนื่องต่อการสะสมในสิ่งมีชีวิตด้วย (Franco *et al.*, 2006; Viguri *et al.*, 2002) ความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs ที่พบในสิ่งมีชีวิตในน้ำพบมีความแปรปรวนสูง จากรายงานพบมีค่าอยู่ในช่วง 0.01 ถึงมากกว่า 5000 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง/กิโลกรัม ความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs จะพบมีค่าสูงในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลบริเวณที่มีการปล่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอย่างต่อเนื่อง (Anzecc, 2000)

2.3.4 ผลกระทบของสาร PAHs ที่มีต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต

2.3.4.1 สารประกอบ PAHs ในน้ำ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าสารประกอบ PAHs ที่ลงสู่ทะเลจะดูดซับอยู่กับอนุภาคของสารแขวนลอยและตกตะกอนลงสู่พื้นทะเลเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งพบว่าประมาณ 10 – 80 % ของสารประกอบ PAHs ในมหาสมุทรมาจากแหล่งอากาศในชั้นบรรยากาศ (Manoli and Samara, 1999) ระดับความเข้มข้นในน้ำทะเลจะลดลงตามระยะทางจากแหล่งที่มีการปล่อยลงทะเล ระดับความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs ในน้ำจะมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับในสิ่งมีชีวิตและในตะกอน อย่างไรก็ตามสารละลายและคอลลอยด์บางชนิด เช่น Humic acid และ Fulvic acid ในน้ำทะเลสามารถทำให้สารประกอบ PAHs ละลายได้ การละลายได้ขึ้นอยู่กับจำนวนของวงแหวนอะโรมาติกและน้ำหนักโมเลกุล โดยกลุ่มที่มีจำนวนวงแหวนอะโรมาติกเพิ่มขึ้นจะมีความสามารถในการละลายที่ลดลง (Bellas and Thor, 2007) เช่น การละลายของ naphthalene ซึ่งมีจำนวนวงแหวนอะโรมาติก 2 วง สามารถละลายได้ 30 ppm. ในขณะที่สารประกอบ PAHs ที่มีวงแหวนอะโรมาติก 5 วง สามารถละลายได้อยู่ในช่วง 0.5 - 5.0 ppb (Anzecc, 2000)

2.3.4.2 สารประกอบ PAHs ในตะกอน ความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs ในตะกอนพื้นทะเลมีค่าสูงมากกว่าในน้ำทะเลประมาณ 1,000 เท่า และมีความคงทนต่อการสลายตัว ดังนั้นจึงสามารถนำค่าปริมาณของสารประกอบ PAHs ในตะกอนมาใช้เป็นค่าดัชนีการชี้วัดปริมาณการปล่อย PAHs ที่ถูกลงสู่ทะเล (Prakash *et al.*, 2009) สารประกอบ PAHs ที่ละลายน้ำส่วนใหญ่เป็นประเภทน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็วโดยขบวนการ photo - oxidation

ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีแสง อุณหภูมิ และออกซิเจนมีค่าสูง (Anzecc, 2000) แต่อย่างไรก็ตามหากในตะกอนมีสภาพไร้ออกซิเจน การสลายตัวโดยขบวนการข้างต้นที่จะเกิดขึ้นได้ แต่มีปริมาณน้อยมากและความเป็นพิษที่ได้จะมีค่าสูง ระดับความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs ในตะกอนจะมีความแตกต่างกันในแต่ละแห่ง ซึ่งในพื้นที่ที่ได้รับอิทธิพลจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมมักจะมีค่าเข้มข้นสูง

2.3.4.3 สารประกอบ PAHs ในสิ่งมีชีวิต สารประกอบ PAHs สามารถดูดซึมได้ง่ายจากสิ่งมีชีวิตทางทะเลผ่านทางผิวหนัง เหงือก หรือระบบทางเดินอาหาร (Komne and Edori, 2013) โดย PAHs จะสะสมในเนื้อเยื่อไขมันของสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดความผิดปกติหรือตายได้ (Chaisuksant *et al.*, 1999; Connell, 1988; Fux *et al.*, 2007; Hylland, 2006)

การปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ในสัตว์ทะเลขึ้นอยู่กับปัจจัยเบื้องต้น คือสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ ระดับความเข้มข้นที่เป็นองค์ประกอบในสิ่งมีชีวิต และความสามารถของสิ่งมีชีวิตในการเมตาบอลิซึม เนื่องจากสารประกอบ PAHs จะสะสมอยู่มากในตะกอนพื้นท้องน้ำ ดังนั้นสัตว์หน้าดินจะได้รับสารชนิดนี้ตลอดเวลาโดยเฉพาะพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารพิษชนิดนี้ (Couillard *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามปริมาณการดูดซึมสารประกอบ PAHs โดยสิ่งมีชีวิตจะขึ้นอยู่กับอนุภาคของตะกอนที่สิ่งมีชีวิตในทะเลสัมผัสด้วย

สารประกอบ PAHs เป็นส่วนประกอบสำคัญในน้ำมันดิบ เมื่อมีการปนเปื้อนจะเกิดกระบวนการย่อยสลายและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีเกิดขึ้นได้ยาก ทำให้มีการสะสมในสิ่งแวดล้อมรวมถึงตะกอนดินได้นาน ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ (Connell *et al.*, 1981; Jongeneelen, 2001; King *et al.*, 2004) โดยพบว่าโดยสาร Aromatic hydrocarbons มีความเป็นพิษสูง ซึ่งความเป็นพิษอาจเกิดจากการที่น้ำมันเข้าไปทำลายหรือขัดขวางกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต หรือเกิดจากการที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ภายในร่างกายมีการสะสมไฮโดรคาร์บอน และหากรับเข้าไปในปริมาณมากก็จะทำลายเซลล์ต่าง ๆ ภายในร่างกายได้

อย่างไรก็ตามแม้จะมีการปนเปื้อนของน้ำมันที่มีความเข้มข้นต่ำ แต่การปนเปื้อนเหล่านี้ก็มีความสามารถทำให้เกิดพิษในลักษณะที่ไม่ทำให้สัตว์น้ำตายหรือเกิดความผิดปกติได้ โดยพบว่าความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs ที่อยู่ในช่วง 0.2 - 10 ppm จะทำให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันในสิ่งมีชีวิต ในขณะที่ระดับความเข้มข้นที่ทำให้เกิดผลในลักษณะเรื้อรังจะอยู่ในช่วง

ระดับความเข้มข้น 5 - 100 ppb (Anzecc, 2000) โดยจากการศึกษาของ Ravindra *et al* (2008) รายงานว่าสารประกอบ PAHs บางชนิด เช่น สาร Benzo[a]anthracene, Benzo[a]pyrene, Benzo[b]fluoranthene และ Chrysene เป็นต้น เป็นสารก่อมะเร็งในสิ่งมีชีวิต เมื่อทำการทดสอบในสัตว์ทดลองพบว่าสิ่งมีชีวิต ที่มีการสะสมของ PAHs ภายในร่างกายจะส่งผลกระทบต่อทำให้เกิดเป็นเนื้องอกขึ้น (Hoffman *et al.*, 1984)

2.3.5 การเปลี่ยนรูปของสารประกอบ PAHs (Transformation of PAHs)

เมื่อสารประกอบ PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ โดยสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำจะรับเข้าสู่ร่างกายและมีการเปลี่ยนแปลงของสารไปเป็นรูปอื่น (biotransformation) (Wessel *et al.*, 2010) โดยกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารมลพิษที่เกิดขึ้นในร่างกายของสิ่งมีชีวิต สามารถเกิดขึ้นได้ในทั้งสัตว์ชั้นต่ำโดยเฉพาะแบคทีเรีย สัตว์น้ำที่มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์ชั้นสูงชนิดต่าง ๆ รวมทั้งมนุษย์ด้วย (Van der Oost *et al.*, 2003)

การเปลี่ยนแปลงรูปของสาร PAHs ในสัตว์น้ำมีขบวนการที่สำคัญคือ ขบวนการออกซิเดชัน ซึ่งเป็นขบวนการที่สำคัญมากของกระบวนการเมตาบอลิซึมในสิ่งมีชีวิตและในระบบเอนไซม์ของเซลล์ เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับการปนเปื้อนของน้ำมันจะมีกระบวนการการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ เกิดขึ้นภายในสิ่งมีชีวิต เช่น กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยกระบวนการเมตาบอลิซึม มีการกำจัดโมเลกุลของไฮโดรคาร์บอนที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทางกระบวนการหายใจของเซลล์หรือกระบวนการ cellular breakdown ส่วนของไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ได้ถูกกำจัดจะถูกการเก็บและสะสมไว้ในสิ่งมีชีวิต (Lee, 2011) ขบวนการที่เกิดขึ้นนี้อาจทำให้ความเป็นพิษของสารมลพิษมีการตกค้างในร่างกายหรืออาจจะขับถ่ายออกนอกร่างกายเร็วขึ้น โดยการเปลี่ยนแปงรูปของสารมลพิษที่มีการสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นรูปที่สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามสารมลพิษที่มีการปนเปื้อนอาจจะเปลี่ยนแปลงรูปไปเป็นอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษมากขึ้นก็ได้ ซึ่งขบวนการออกซิเดชัน ที่สำคัญมี 3 ประเภท คือ

1. Hepatic Microsomal Oxidation คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในไมโครโซมของตับ โดยมี Mixed Function Oxidase (MFO) เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในปฏิกิริยาดังกล่าว ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปฏิกิริยานี้ คือ การเจริญวัย เพศ อายุ อาหาร สุขภาพ และระยะการสืบพันธุ์

2. Extrahepatic metabolism คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในไมโครโซมของเนื้อเยื่อต่าง ๆ นอกเหนือจากตับ เช่น สมอง เป็นต้น การเกิดปฏิกิริยานี้มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ Cytochrome P - 450 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบโดยทั่วไปในแบคทีเรีย พืชชั้นสูง แมลง สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลา นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Stephensen *et al.*, 2003)

3. Non - microsomal Oxidation คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นนอกไมโครโซมของเซลล์ โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ NADPH หรือ NADH - Dependent Dehydrogenases (Moore *et al.*, 1987)

โดยสารประกอบ PAHs ที่มีการปนเปื้อนในสิ่งมีชีวิตจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปสารไปเป็นรูปอื่นซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ cytochrome P - 450 (P - 450 หรือ CYP) (Chevion *et al.*, 1977; Giessing *et al.*, 2003; Shimada, 2006; Snyder *et al.*, 2014; Stegeman and Lech, 1991)

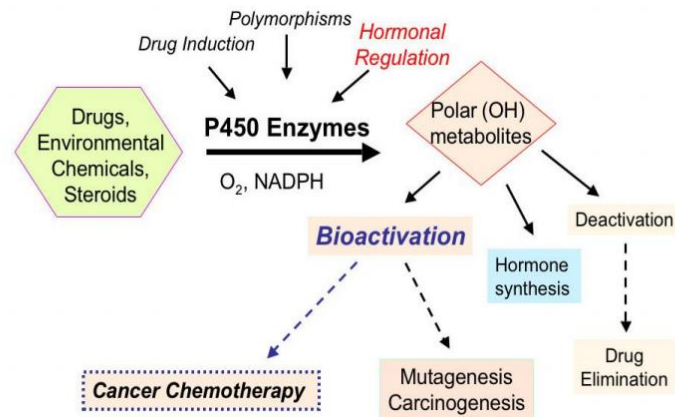
เอนไซม์ P - 450 ถูกค้นพบเมื่อประมาณ 50 กว่าปีที่แล้ว เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญหลายประการ ได้แก่ มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการสลายของสารจำเป็นภายในร่างกาย เช่น bile acids, vitamins, cholesterol, steroid hormones และ arachidonic acid (Guengerich *et al.*, 2005; Nebert *et al.*, 1991) และมีสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมทั้งสารภายในร่างกายและสารแปลกปลอม (xenobiotic) ที่เข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิต เช่น ยาต่าง ๆ สเตียรอยด์ และสารก่อมะเร็ง เป็นต้น (Almeida *et al.*, 2012; Arinç *et al.*, 2000) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ MFO (Hosnedl *et al.*, 2003; Van *et al.*, 1987) เอนไซม์ P - 450 เป็นเอนไซม์ขนาดใหญ่กลุ่มหนึ่งที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล (Zhang *et al.*, 2006) โดยส่วนใหญ่แสดงออก (expression) ภายใต้นับแต่สามารถพบภายนอกตับได้เช่นกัน ซึ่งได้แก่ บริเวณลำไส้ใหญ่ ปอด สมอง เต้านม เป็นต้น (Nebert *et al.*, 1991)

เอนไซม์ P - 450 มีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็งไปเป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็ง เช่น สารประกอบ PAHs ในน้ำมันดิบ (Boobis *et al.*, 1994) อีกทั้งยังสามารถถูกชักนำให้มี

ปริมาณเพิ่มขึ้นได้หลังจากการได้รับการปนเปื้อนสาร PAHs (Schmidt and Bradfield, 1996) เมื่อสิ่งมีชีวิตสัมผัสและมีการปนเปื้อนของ PAHs กระบวนการดูดซึมจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสารแปลกปลอมที่เข้าสู่สิ่งมีชีวิตจากที่ไม่ชอบน้ำให้เป็นสารที่คุณสมบัติชอบน้ำ (Baumard *et al.*, 1999; Cappello *et al.*, 2013) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสารต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตมีกระบวนการทำงานแบ่งได้ออกเป็น 2 phase คือ phase I (non - synthetic) และ phase II (synthetic) (Kleinow *et al.* , 1987) phase I เป็น functionalization reaction กลุ่มเอนไซม์ P - 450 มีหน้าที่เปลี่ยนแปลงสารใน phase I โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดสารใหม่ที่มีคุณสมบัติต่างไปจากเดิม (Giessing *et al.* , 2003; Jongeneelen *et al.*, 1987; Law and Hellou, 1999) โดยเกิดปฏิกิริยาผ่านกระบวนการ oxidation, reduction และ hydrolysis ระยะนี้จะมีการทำให้สิ่งแปลกปลอมมีความเป็นขั้วเพิ่มขึ้น (- OH, - COOH, NO₂ เป็นต้น) แล้วถูกกำจัดออกจากร่างกายได้ง่าย (Bach *et al.*, 2005; Jørgensen *et al.*, 2005; Nacher-Mestre *et al.*, 2010) ซึ่งโดยทั่วไปสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีการเกิดกระบวนการเผาผลาญใน phase นี้ต่ำกว่าสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Rewitz *et al.* 2004) ในขณะที่ phase II หรือ conjugation reaction เป็นการนำสารที่มีขั้วสูง เช่น glucuronides, sulfate หรือ glutathione มารวมตัวกับสิ่งแปลกปลอม ทำให้สิ่งแปลกปลอมมีขั้วสูงตามไปด้วย ส่งผลให้สิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นเข้าจับกับส่วนประกอบของเซลล์อื่น ๆ ในร่างกายได้ง่ายขึ้น เช่น DNA (Amutha *et al.*, 2009; Arinç *et al.*, 2000; Collier *et al.*, 1992; Hosnedl *et al.*, 2003)

เอนไซม์ P - 450 มีความสำคัญในการเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแต่จะไม่สามารถทำงานได้หากมีเอนไซม์ชนิดนี้เพียงชนิดเดียว เนื่องจากปฏิกิริยาดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยอื่นร่วมในการทำงานด้วย ได้แก่ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) และออกซิเจน (O₂) โดย NADPH จะเป็นสารให้อิเล็กตรอนที่ใช้ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน และ O₂ ในปฏิกิริยาทำให้เกิดสารตัวกลางเพื่อเพิ่มความมีขั้วของสารแปลกปลอม (Denisov *et al.*, 2005; Guengerich, 2002) ตัวกลางปฏิกิริยาเหล่านี้สามารถจับกับ DNA หรือ โปรตีนและอาจส่งผลให้เกิดการก่อตัวของเนื้องอกได้ (ภาพที่ 2.4) (Whyte *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2011) เนื่องจาก metabolite ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมจะเข้าไปจับกับ DNA ที่ตำแหน่งต่าง ๆ (Farmer *et al.* , 2003) การเข้าจับกับ DNA ดังกล่าว เกิดขึ้นเมื่อ DNA มีการจำลองตัวเองและมีการเติมเบสมาจับเข้ากับสารที่ผิดไป ทำให้เกิด mutation ที่ลำดับเบส ซึ่งสามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ใน endoplasmic reticulum และ mitochondria ของตับและเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

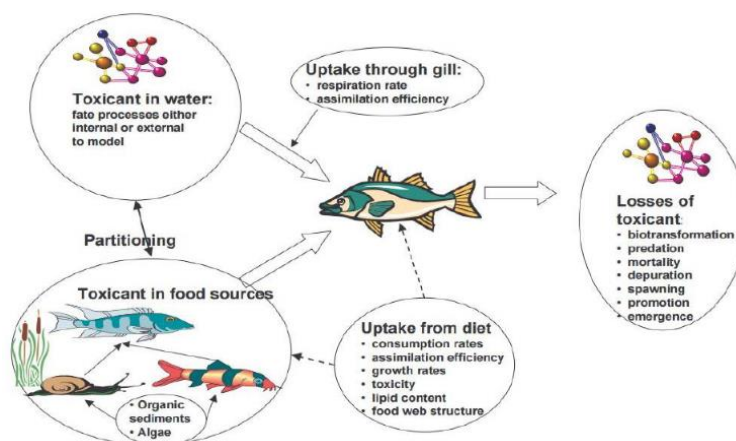
สัตว์มีกระดูกสันหลัง พืช และจุลินทรีย์ (Fahl *et al.*, 1978; Jørgensen *et al.*, 2005) ซึ่งสิ่งแปลกปลอมที่มีการปนเปื้อนในสิ่งมีชีวิตจะถูกขับออกจากร่างกายสิ่งมีชีวิตผ่านทางน้ำดี ปัสสาวะ หรือเหงื่อของสิ่งมีชีวิต (Goksøyr and Förlin, 1992; Vuontisjärvi *et al.*, 2004)



ภาพที่ 2.4 ขบวนการทำงานของเอนไซม์ P - 450 (Anzecc, 2000)

ในสัตว์ทะเลประเภทหอยสองฝาพบการสะสมสารประกอบ PAHs ที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาทะเล ทั้งนี้เนื่องจากปลาทะเลสามารถ metabolite สารประกอบ PAHs ได้อย่างรวดเร็วจึงทำให้ระดับความเข้มข้นในกล้ามเนื้อมีน้อย (Tairova *et al.*, 2012) ซึ่งอัตราการดูดซึมสารประกอบ PAHs ที่เข้าสู่สิ่งมีชีวิตจะมีปริมาณสูงเมื่ออยู่ในรูปของ oil mixture และเมื่อเข้าสู่เนื้อเยื่อและชั้นไขมันแล้วจะมีการสะสมอยู่ในชั้นไขมัน คับและไตเป็นจำนวนมาก (Jacob, 2008; Malins *et al.*, 1987; Varanasi *et al.*, 1987) ผลกระทบจากการแพร่กระจายของน้ำมันทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถเข้าสู่ระบบนิเวศได้โดยอาศัยร่างกายของสิ่งมีชีวิตเป็นสื่อกลาง ผู้ผลิตชั้นต้นเช่น สาหร่ายทะเล แพลงก์ตอนพืช และหญ้าทะเลที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน จะถ่ายทอดไปสู่ผู้บริโภคในลำดับขั้นถัดไป เช่น แพลงก์ตอนสัตว์ หอยนางรม กุ้ง และสัตว์ที่อาศัยอยู่บนน้ำดิน โดยสิ่งมีชีวิตหน้าดินจะได้รับสาร PAHs ทั้งจากการสัมผัสจากตะกอนดินผ่านทางผิวหนังและการกินโดยตรง ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในน้ำมันเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร (Anyakora *et al.*, 2005; Catalano *et al.*, 2012; Hannam *et al.*, 2010) เป็นอันตรายและส่งผลกระทบท่อผู้บริโภคในลำดับที่สูงกว่า เช่น ปลา ปู และมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคลำดับสูงสุด (Booth and Brosnan, 1995; Fleeger, *et al.*, 2003) โดยพบว่าสารบริโภคหอยที่มีปนเปื้อนสารประกอบ PAHs อาจทำให้เกิดมะเร็งปอดในมนุษย์ได้ (Gaspere *et al.*, 2009; Zaki *et al.*, 2014) จากการศึกษาของ Tolosa *et al.*

(2005) ซึ่งทำการศึกษาการกระจายตัวของสารประกอบ PAHs ที่มีการปนเปื้อนในตะกอนดินและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งของประเทศบาห์เรน กาตาร์ สหรัฐอาหรับเอมิเรตส์และโอมาน เพื่อประเมินความเสี่ยงที่มนุษย์จะได้รับปริมาณสาร PAHs จากการบริโภคสิ่งมีชีวิตที่มีการปนเปื้อนสารพิษ ผลการศึกษาเนื้อเยื่อของหอยนางรมพบการสะสมของ PAHs ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่มนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคได้ (ภาพที่ 2.5) โดยในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงที่ได้รับผลกระทบจากสารประกอบ PAHs จะพบความเป็นพิษเรื้อรัง อาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้ แต่อาการไม่รุนแรง เช่น รบกวนระบบต่อมไร้ท่อในปลา (Clemons *et al.*, 1998) มีผลกระทบต่อสเตอรอยด์ฮอร์โมนในกลุ่มอาร์โทรพอดและมีผลต่อการลอกคราบของปูหรือครัสเตเชียนหลายชนิดที่สัมผัสกับน้ำมันดิน ซึ่งพบว่าการลอกคราบที่ผิดปกติ มีความสามารถในการก่อกำเนิดในอวัยวะหลายชนิดแต่ไม่มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนและพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิต (Howsam *et al.*, 2000)



ภาพที่ 2.5 กลไกการได้รับสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารและการสะสมของสารพิษในสิ่งมีชีวิต (Anzecc, 2000)

2.4 ผลกระทบจากการรั่วไหลของน้ำมันที่มีต่อหาดหิน

หาดหิน (rocky shore) เป็นลักษณะชายหาดที่ประกอบไปด้วยหินต่าง ๆ ในบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลง เกิดจากการผุพังหรือการกัดเซาะของน้ำทะเล ทำให้เกิดซอกเล็กซอกน้อย ทำให้พบสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่จำนวนมากอาศัยอยู่ในบริเวณนี้ ดังนั้นบริเวณนี้จึงมีระบบนิเวศที่มีความสัมพันธ์ที่สลับซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตที่เข้ามาอาศัยอยู่ (Burns *et al.*, 1994) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสิ่งมีชีวิตหน้าดิน

ที่มีทั้งผู้ผลิต ผู้บริโภค จนถึงผู้ย่อยสลาย ปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ในทางกายภาพ เช่น ความรุนแรงของคลื่นที่เข้ามากระทำในพื้นที่ ระดับน้ำขึ้นน้ำลง อุณหภูมิ (Egres *et al.*, 2012) และปัจจัยทางชีวภาพ ซึ่งได้แก่ การแก่งแย่งแข่งขันเพื่อใช้พื้นที่ในการดำรงชีวิต การเป็นผู้ล่าและผู้ถูกล่า มีอิทธิพลสำคัญต่อรูปแบบและลักษณะการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตหน้าดินในหาดหิน ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้โครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตหน้าดินในหาดหินสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา (Bonsdorff, 1984; Lam, 2002) ด้วยเหตุนี้สัตว์ที่อาศัยบริเวณนี้ จึงต้องมีกทนต่อการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่าง ๆ โดยสิ่งมีชีวิตที่มาอาศัยอยู่บริเวณนี้จะมีการปรับตัว ทั้งทางด้านรูปร่างและการดำรงชีวิต มีการยึดเกาะกับพื้นหินให้แน่นเพื่อป้องกันไม่ให้ออกพัดพาไปจากการซัดของคลื่น

ผลกระทบจากการรั่วไหลของน้ำมันที่มีต่อแนวชายฝั่งในแต่ละบริเวณนั้น จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณการรั่วไหลของน้ำมันและลักษณะของชายฝั่ง (De la Huz *et al.*, 2005) พื้นที่หาดหินซึ่งส่วนใหญ่ความลาดชันของพื้นที่ไม่สม่ำเสมอ อาจจะมีการสะสมของน้ำมันมากกว่าพื้นที่ราบเรียบ เมื่อเกิดเหตุการณ์รั่วไหลและมีการเคลื่อนตัวของน้ำมันเข้าสู่บริเวณชายฝั่ง สิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่บริเวณนั้นก็จะได้รับการสัมผัสน้ำมันอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ (Mehanna *et al.*, 2014)

เมื่อเกิดการรั่วไหลของน้ำมันในแหล่งน้ำ หยกน้ำมันอาจมีการเคลื่อนตัวลงไปถึงท้องน้ำหรือตะกอนท้องน้ำได้ ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้นได้ คราบน้ำมันที่มีการแพร่กระจายเข้าสู่บริเวณพื้นที่ชายหาดจะส่งผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพคือ น้ำมันจะปกคลุมตัวของสิ่งมีชีวิตหรือพื้นที่ที่อยู่อาศัยส่งผลกระทบต่อสภาวะทางสรีรวิทยาของการดำรงชีวิต (Jewett *et al.*, 1999) น้ำมันจะแพร่เข้าสู่เนื้อเยื่อซึ่งจะมีผลให้กระบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกายทำให้เกิดความผิดปกติ การสืบพันธุ์และพฤติกรรมกินอาหารเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม อีกทั้งยังส่งผลให้สัตว์เหล่านั้นมีอัตราการหายใจลดลง ความเป็นพิษต่าง ๆ อาจทำให้สิ่งมีชีวิตตายลงหรือเกิดความผิดปกติซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างชุมชนของสัตว์ทะเลหน้าดิน (Jung *et al.*, 2011; Zaki *et al.*, 2014)

ความเป็นพิษของน้ำมันที่เกิดการรั่วไหลบริเวณหาดหินสามารถสังเกตได้จากหอยหวมกเง็กหรือหอยฝาชี (limpet) ซึ่งเป็น common species ซึ่งหากมันสามารถดูดตะกอนน้ำมันที่แห้งติดอยู่กับผิวหินได้โดยไม่ตายนั้นแสดงว่าความเป็นพิษที่เกิดจากคราบน้ำมันยังไม่อยู่ในขั้นนำวิกฤต จาก

รายงานของ Glegg *et al.* (1999) ซึ่งได้ทำศึกษาผลของการปนเปื้อนน้ำมันใน limpets (*Patella vulgata*) จากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลจากเรือขนส่งน้ำมันในรัฐ Milford Haven ประเทศอังกฤษในปี 1997 โดยทำการศึกษาในตัวอย่างที่เกิดขึ้นในระยะเวลา 2 สัปดาห์ 4 เดือนและ 7 เดือนหลังจากเกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล จากการศึกษาไม่พบการตายของสิ่งมีชีวิตแต่พบการสะสมของสารไฮโดรคาร์บอนในเนื้อเยื่อตัวอย่างปริมาณมาก (34 - 86 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ซึ่งการสะสมมีปริมาณลดลงในเดือนที่ 9 หลังจากเกิดเหตุการณ์

นอกจากนี้ยังพบว่าเพรียงหินที่อาศัยอยู่บริเวณหาดหินจะมีความไวในการตอบสนองต่อการสัมผัสกับน้ำมันมาก จากการศึกษาของ Soares-Gomes *et al.* (2010) พบว่าเพรียงชนิด *Balanus perforatus* และ *B. trigonus* สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดความเป็นพิษซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนได้ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดมีการตอบสนองต่อระดับ PAHs ที่มีการปนเปื้อนในน้ำในระยะเวลาที่รวดเร็ว และเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณการสะสมของสารประกอบ PAHs ในสิ่งมีชีวิตที่ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของน้ำมันแล้วพบว่าเพรียงจะมีสะสมของสารประกอบ PAHs มากกว่าปลาและปู

Xu *et al.* (2011) รายงานการแพร่กระจายของน้ำมันอาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในทะเลบัวไห่ ทางตอนเหนือของประเทศจีน เช่น ปลา แพลงก์ตอน และสิ่งมีชีวิตหน้าดิน ทำให้มีอัตราการหายใจ อัตราการอยู่รอด และอัตราการวางไข่ลดลง อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการท่องเที่ยวและกิจกรรมประมงชายฝั่งอีกด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Shriadah (1998) ที่ได้ทำการศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบที่เกิดการรั่วไหลบริเวณอ่าวโอมาน ประเทศอิหร่าน พบว่าน้ำมันดิบที่เกิดการรั่วไหลก่อให้เกิดความเสียหายต่อชายฝั่งทะเล ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมประมงและการท่องเที่ยว การรั่วไหลของน้ำมันดิบในครั้งนี้ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตบริเวณหาดหิน

2.5 การตรวจสอบผลกระทบทางชีวภาพจากการสัมผัสของมลพิษน้ำมันดิบ

ผลกระทบทางชีวภาพที่เกิดจากการสัมผัสของมลพิษน้ำมัน จะแสดงในระดับที่ต่างกัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานการตรวจสอบผลกระทบจากการสัมผัสจากมลพิษโดยใช้การใช้ความรู้ทางชีวเคมีและอนุชีววิทยา (Collier *et al.*, 1995) จึงได้มีการใช้ดัชนีทางชีวภาพ

(biomarker) ในการตรวจวัดผลกระทบต่อระบบนิเวศจากเหตุการณ์การรั่วไหลของน้ำมัน (Baršienė *et al.*, 2008)

ดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพเป็นเครื่องมือชนิดหนึ่งที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้หรือตัวชี้วัด หรือเป็นสัญญาณของเหตุที่จะเกิดขึ้น หรือเกิดขึ้นแล้วในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (Bearer, 1998; Livingstone *et al.*, 1993; Ryan and Hightower, 1994) ซึ่งดัชนีทางชีวภาพจัดเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์สำหรับการตรวจสอบผลกระทบทางชีวภาพของสารมลพิษและสิ่งแวดล้อม (Beliaeff and Burgeot, 2002; Cajaraville *et al.*, 2000) เนื่องจากจะถูกนำมาใช้สำหรับการประเมินความเสี่ยงจากผลกระทบที่เกิดจากปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งมีชีวิตเพื่อแสดงให้เห็นถึงผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อม โดยดัชนีทางชีวภาพที่ใช้ในการติดตามผลของการปนเปื้อนมลพิษทางทะเลมีทั้งทางกายภาพและเคมี (Ahmad *et al.*, 2006; Celander, 2011) และมีความเฉพาะเจาะจงในการจับกับสารที่มีการปนเปื้อน (Morales-Caselles *et al.*, 2009) ซึ่งวิธีการติดตามผลกระทบโดยใช้ดัชนีทางชีวภาพจะสามารถอธิบายได้ถึงผลกระทบของสารมลพิษและกลไกของการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับน้ำมันเข้าสู่ร่างกาย (Aas *et al.*, 2000; Bakhmet *et al.*, 2009) โดยทั่วไปกลุ่มสัตว์หน้าดินหลายชนิด เช่น amphipods (Gesteira and Dauvin, 2000), cetaceans (Simboura and Zenetos, 2002) หรือ polychaetes (Ros and Cardell, 1991) มักนิยมถูกใช้เป็นดัชนีทางชีวภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อนของมลพิษทางทะเล เนื่องจากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถดูดซึมและได้รับการปนเปื้อนสารมลพิษจากตะกอนดินได้ (Di Toro *et al.*, 1991; Farrington *et al.*, 1982)

สิ่งมีชีวิตหน้าดินซึ่งมีพฤติกรรมเคลื่อนที่ช้าหรือไม่เคลื่อนที่จะมีความสามารถตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ได้อย่างรวดเร็ว (Cross and Thomson, 1987) เมื่อได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของมลพิษในตะกอนดิน เนื้อเยื่อจะมีการสัมผัสกับมลพิษโดยตรงและมีการดูดซึมสารมลพิษเหล่านั้นทันที สิ่งมีชีวิตที่มีการปนเปื้อนเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมขึ้นภายในร่างกาย (Livingstone, 1993; Poster *et al.*, 2006) และพบว่ากระบวนการเมตาบอลิซึมในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งวิธีการศึกษาผลกระทบจากการแพร่กระจายของน้ำมันในสิ่งแวดล้อมเพื่อทำการติดตามและตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs ในสิ่งมีชีวิตหน้าดินบริเวณชายฝั่ง สามารถประเมินได้จากการติดตามผลการเปลี่ยนแปลง ดังต่อไปนี้

2.5.1 ผลกระทบของการแพร่กระจายของน้ำมันดิบต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหิน

2.5.1.1 ความหลากหลายและความชุกชุมของสิ่งมีชีวิต

ผลกระทบทางชีวภาพจากการแพร่กระจายของน้ำมันในสิ่งแวดล้อมสามารถประเมินได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิต ซึ่งการรั่วไหลของน้ำมันดิบจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่บริเวณที่มีการปนเปื้อน (Belfiore and Anderson, 2001; Hartwell, 1997) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความหลากหลาย ความชุกชุม (Kocan and Landolt, 1984; Rogers *et al.*, 1979) โครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศและสภาพแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตอยู่อาศัย (Cerniglia *et al.*, 1980; Galloway *et al.*, 2002) ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานผลจากการศึกษาผลกระทบของการแพร่กระจายของน้ำมันต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตทะเลหน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลในอดีตหลายเหตุการณ์ด้วยกัน ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 แสดงเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลและผลกระทบจากการแพร่กระจายของน้ำมันในอดีต

เหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล	ผลกระทบจากการแพร่กระจายของน้ำมัน	อ้างอิง
เหตุการณ์แท่นขุดเจาะน้ำมัน Deepwater Horizon รั่วไหล (ประเทศสหรัฐอเมริกา)	ปลา นก ปะการังน้ำลึก เต่าทะเล หมู้าทะเล และสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลง	Beyer <i>et al.</i> (2016)
อุบัติเหตุเรือขนส่งน้ำมัน Prestige ล่ม (ประเทศสเปน)	สัตว์ทะเลหน้าดินที่มีพฤติกรรมกรากิน	Castege <i>et al.</i> (2014)
เหตุการณ์เรือบรรทุกน้ำมัน Braer รั่วไหล (ประเทศ Scotland)	อาหารแบบ grazer สิ่งมีชีวิตในเขตน้ำขึ้นน้ำลง	Newey and Seed (1995)
เหตุการณ์เรือบรรทุกน้ำมัน Hebei Spirit รั่วไหล (ประเทศเกาหลี)	สิ่งมีชีวิตหน้าดิน	Yu <i>et al.</i> (2013)
เหตุการณ์เรือบรรทุกน้ำมัน Exxon Valdez รั่วไหล	หอย littleneck clams และ <i>Leukoma (Protothaca) staminea</i>	Fukuyama <i>et al.</i> (2014)

2.5.1.2 การฟื้นตัวของโครงสร้างชุมชนหลังเกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล

การที่คราบน้ำมันปกคลุมพื้นที่บริเวณชายฝั่งในเขตน้ำขึ้นน้ำลงนั้นจะส่งผลกระทบยาวต่อสัตว์ทะเลหน้าดิน ส่วนหนึ่งไม่ส่งผลทำให้เกิดการตายโดยทันทีแต่จะเกิดการสะสมพิษจากน้ำมันและตายในภายหลัง การฟื้นตัวของโครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตหน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการเคลื่อนที่หรือย้ายถิ่นฐานของสัตว์ทะเลหน้าดิน ความไวต่อการปรับตัวเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ปริมาณน้ำมันที่กระจายปกคลุม พื้นที่ที่อยู่อาศัย ระยะเวลาที่ได้รับผลกระทบ และวงจรชีวิตของสัตว์หน้าดินในแต่ละชนิด ซึ่งอาจจะต้องใช้ระยะเวลาถึง 2 - 3 ปี (Nicodem *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2003)

การฟื้นตัวหมายถึงโครงสร้างชุมชนของพืชและสัตว์ในพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบให้กลับมามีลักษณะแบบเดิมเหมือนก่อนหน้าที่จะได้รับผลกระทบจากมลพิษ ซึ่งเป็นไปได้ยากที่เมื่อเกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลเข้าสู่ระบบนิเวศทางทะเลแล้วจะมีการฟื้นตัวของระบบนิเวศกลับสู่สภาพเดิมได้อย่างรวดเร็ว (Kingston, 2002) ผลของคราบน้ำมันที่เข้ามาปกคลุมพื้นที่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินจะส่งผลกระทบให้สัตว์ทะเลหน้าดินที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้นเกิดความเครียดอันเนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งในกลุ่มสัตว์หน้าดินที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ช้าจะสามารถปรับตัวให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แต่ในสัตว์หน้าดินบางชนิดที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ก็จะตายลงทำให้ความชุกชุมลดลงอีกเช่นกัน (Nagelkerken and Debrot, 1995)

2.5.2 ผลกระทบของสารประกอบ PAHs ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตหน้าดิน

สารประกอบ PAHs เป็นส่วนประกอบสำคัญของน้ำมันที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ (Anderson, 1977) หากสิ่งมีชีวิตได้รับเข้าไปในปริมาณมากอาจทำลายเซลล์ต่าง ๆ ภายในร่างกาย ซึ่งการใช้ดัชนีทางชีวภาพในการติดตามผลของการปนเปื้อนมลพิษในสิ่งแวดล้อมทางทะเลนั้นนิยมใช้วิธีการวิเคราะห์ในตัวอย่างปลาและหอยมากที่สุด (Beliaeff and Burgeot, 2002; Secombes *et al.*, 1991) ซึ่งเมื่อเกิดการแพร่กระจายของน้ำมันไปยังบริเวณชายฝั่งในเขตน้ำขึ้นน้ำลงพบการปนเปื้อนและมีปริมาณการสะสมของ PAHs ในหอยสองฝาในปริมาณมากและมักตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลานาน (Incardona *et al.*, 2005; Law and Kelly, 2004)

ถึงแม้ว่าข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ PAHs ยังไม่สามารถนำมายืนยันระดับความเป็นพิษที่ทำให้สิ่งมีชีวิตตาย หรือแสดงอาการผิดปกติเมื่อได้รับสารพิษได้ แต่การวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนของ PAHs ในสิ่งมีชีวิตนั้นสามารถนำมาใช้ดัชนีทางชีวภาพได้ โดยการตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (Astrup *et al.*, 1999; Beyer *et al.*, 2013; Fillmann *et al.*, 2004; Jönsson *et al.*, 2006) การติดตามการปนเปื้อนของมลพิษในสิ่งมีชีวิตมักนิยมหาปริมาณค่าความเข้มข้นของสารที่มีการสะสมในเนื้อเยื่อ เช่น ไขมัน ไข่ กล้ามเนื้อ เหงือก และ hepatopancreas ของเหลวภายในร่างกาย เช่น เลือด น้ำดี และของเสีย เช่น urine ที่ได้จากการจับถ่ายของสิ่งมีชีวิตที่มีการปนเปื้อน (Myers *et al.*, 1991; Orbea *et al.*, 2006) ในขณะที่การตรวจสอบหาปริมาณการสะสมของ PAHs ในหอยมักนิยมใช้เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตมาใช้ในการวิเคราะห์ (Pointet and Milliet, 2000; Watson *et al.*, 2004)

2.5.3 ดัชนีทางชีวภาพ (biomarker) ของ PAHs ในสัตว์หน้าดิน

ดัชนีทางชีวภาพเป็นเครื่องในการตรวจสอบการสัมผัสสารพิษและผลจากการสัมผัสสารพิษจากสิ่งแวดล้อมที่มีความสอดคล้องกับการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย จึงมีความถูกต้องและความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีการประเมินการสัมผัสวิธีอื่น) ซึ่งการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบ PAHs โดยใช้ดัชนีทางชีวภาพสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของสารมลพิษในกลุ่มไฮโดรคาร์บอนในสิ่งมีชีวิตได้ (Maskaoui *et al.*, 2002)

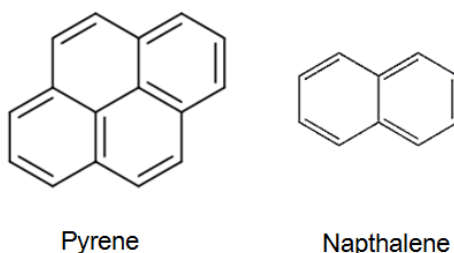
2.5.3.1 สารประกอบ pyrene และ naphthalene

Pyrene และ naphthalene เป็นองค์ประกอบหลักของสารประกอบ PAHs ซึ่งสารประกอบทั้งสองชนิดนี้เป็นสารอันตราย (Mäenpää *et al.*, 2009) และถือว่าเป็นสารมลพิษที่มีความสำคัญในระบบนิเวศทั้งทางน้ำและบนบก เนื่องจากอาจทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ (Camargo and Alonso, 2006)

Pyrene เป็นสารประกอบ PAHs ที่มีสูตรทางเคมีคือ $C_{16}H_{10}$ โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงเบนซีนเชื่อมต่อกัน 4 วง (ภาพที่ 2.6) (Al-Thukair and Malik, 2016) ในปัจจุบันพบการปนเปื้อนของ pyrene ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ระบบนิเวศบริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่ง รวม

ไปถึงในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในทะเล (Almeida *et al.*, 2012) เมื่อเกิดการปนเปื้อนของสาร pyrene ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล สิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพิษจะมีกระบวนการเมตาบอลิซึมและกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว (Jongeneelen, 2001) สารพิษที่มีการปนเปื้อนมักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและมีการสะสมในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสารประกอบชนิดนี้สามารถสะสมในสิ่งมีชีวิตเป็นระยะเวลานาน (Avio *et al.*, 2015)

naphthalene เป็นสารก่อมลพิษในสิ่งแวดล้อม มีสูตรทางเคมีคือ $C_{10}H_8$ โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงเชื่อมต่อกัน (ภาพที่ 2.6) (Talaska *et al.*, 2012) naphthalene เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และมีปริมาณมากในน้ำมันดิบ (Pampanin and Sydnes, 2013) naphthalene สามารถดูดซึมได้โดยผ่านทางอวัยวะต่าง ๆ เช่น ตับ ปอด ทางเดินอาหาร และผิวหนังของสิ่งมีชีวิตได้ (Samanta *et al.*, 2002)



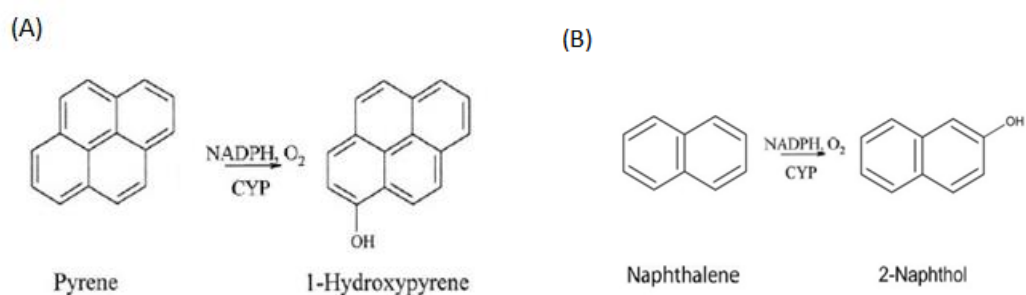
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ pyrene และ naphthalene (Ferreira, 2001)

2.5.3.2 กระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบ pyrene และ naphthalene ในสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิตในทะเลทั้งสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลา (Ariese *et al.*, 1993) หอย (Beach *et al.*, 2009) และสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม crustaceans (Ikenaka *et al.*, 2007) เมื่อได้รับสารประกอบ pyrene เข้าสู่ร่างกายแล้ว สารชนิดนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมได้เป็น 1-hydroxypyrene (1-HOP) (Fanou *et al.*, 2006; Lutier *et al.*, 2016; Shahab *et al.*, 2009; Zhong, 2011) ในขณะที่ naphthalene จะถูกเปลี่ยนแปลงเป็น 2-naphthol (2-NAP) (1) ซึ่งพบว่าความเป็นพิษของสารทั้งสองชนิดนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เช่น lipid peroxidation และ DNA damage เป็นต้น (Amat *et al.*, 2006; Bieniek, 1997)

จากการศึกษาของ Shimada and Fujii (2004) พบว่าเอนไซม์ P-450 ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตมีทั้งหมด 17 family (Ikenaka *et al.*, 2013)

แต่ละ family จะมีบทบาทและหน้าที่ที่แตกต่างกัน พบว่าชนิด CYP1, 2 และ 3 เป็นชนิดที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นและการเผาผลาญสารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งกระบวนการเมตาบอลิซึมในสัตว์น้ำที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิดมี CYP1A ทำหน้าที่สำคัญในการกระตุ้น (Lee and Anderson, 2005; Wills *et al.*, 2010) ในขณะที่เอนไซม์ NADPH ที่มีบทบาทในการกำจัดฤทธิ์สารอนุมูลอิสระและอนุมูลว่องไวปฏิกิริยาออกซิเจน (reactive oxygen species) (ภาพที่ 2.7) นอกจากนี้ในบางเอนไซม์สามารถแสดงได้ทั้ง 2 บทบาท ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสารเคมี วิธีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และเนื้อเยื่อที่ก่อปฏิกิริยา



ภาพที่ 2.7 กระบวนการ เมตาบอลิซึม ของ pyrene (A) และสาร naphthalene (B) ซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงด้วย CYP ได้ reactive metabolite (Vila *et al.*, 2001)

2.5.3.3 การใช้ 1 - HOP และ 2 - NAP เป็นดัชนีทางชีวภาพ (biomarker) ของ PAHs ในสัตว์หน้าดิน

การวัดปริมาณสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมเป็นวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสารประกอบ PAHs ในเนื้อเยื่อที่มีการสัมผัสกับมลพิษน้ำมัน (Budzinski *et al.*, 2004) ซึ่งการตรวจวัด 1 - HOP (1-Hydroxypyrene) และ 2 - NAP (2-Naphthol) ในสิ่งมีชีวิตที่มีการปนเปื้อนมลพิษได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากสารเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีทางชีวภาพได้ (Shin and Lim, 2011) ดังแสดงในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 2.6)

1 - HOP มักจะถูกใช้เป็นสารที่มีความสำคัญและนำมาเป็นดัชนีทางชีวภาพของการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมของไฮโดรคาร์บอนในสิ่งมีชีวิต (Shahtaheri *et al.*, 2007; Wilhelm *et al.*, 2008) โดยพบว่าในน้ำดีของปลาที่สัมผัสกับน้ำมันดิบจากการรั่วไหลพบ 1 - HOP ในปริมาณที่มากถึง 76 % (Blahova *et al.*, 2009) นอกจากนี้ 2 - NAP ก็นับว่าเป็นดัชนีทางชีวภาพอีกตัวหนึ่ง

นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณการสะสมของไฮโดรคาร์บอนในสัตว์ทะเล เช่น ปลาและหอยที่ได้รับสารพิษจากการปนเปื้อนน้ำมันได้เช่นกัน (Shin and Lim, 2011)

ตารางที่ 2.6 แสดงการใช้ดัชนีทางชีวภาพเพื่อชี้วัดปริมาณการสะสมของไฮโดรคาร์บอนในสิ่งมีชีวิตทางทะเล

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	Biomarker ของการหาปริมาณการสะสม PAHs	อ้างอิง
ปลาพื้นท้องน้ำและปลาหน้าดิน หอย	1 – HOP, 2 - NAP	Shin and Lim (2013)
ปู <i>Carcinus maenas</i>	1 – HOP	Readman <i>et al.</i> (2002)
ไส้เดือนทะเล (<i>Capitella sp.</i>)	1 – HOP	Giessing <i>et al.</i> (2003)
ไส้เดือนทะเล (<i>Nereis diversicolor</i>)		
ไส้เดือนทะเล (<i>Arenicola marina</i>)		
ไส้เดือนทะเล (<i>Nereis virens</i>)		
ไส้เดือนทะเล (<i>Nereis diversicolor</i>)	1 – HOP	Christensen <i>et al.</i> (2002)
ไส้เดือนทะเล (<i>Nereis diversicolor</i>)	1 – HOP	Tairova <i>et al.</i> (2009)

2.5.4 การตรวจสอบปริมาณของดัชนีทางชีวภาพ (biomarker) ของ PAHs ในสัตว์หน้าดินในระบบนิเวศจำลอง (mesocosms) ในสภาวะทดลอง

เนื่องจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (โดยเฉพาะหอยสองฝา) ไม่มีกระบวนการในการย่อยสลาย (degradation) สิ่งแปลกปลอมหรือมลพิษที่เข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Young *et al.*, 2011) ดังนั้นเมื่อเกิดเหตุการณ์รั่วไหลของน้ำมัน จึงสามารถแพร่กระจายและเกิดการปนเปื้อนเข้าสู่ระบบนิเวศหรือมีการถ่ายทอดไปยังสิ่งมีชีวิตลำดับถัดไปในห่วงโซ่อาหารได้ (Gin *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2003; Tronczyński *et al.*, 2004; Velando *et al.*, 2010)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่มียางานเกี่ยวกับการปนเปื้อนสะสม PAHs ในสิ่งมีชีวิตหลักที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินและส่งผลทำให้เกิดการสะสมหรือมีการปนเปื้อนไปยังสิ่งมีชีวิตลำดับถัดไปในระบบห่วงโซ่อาหาร แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ

สารประกอบ PCB (polychlorinated biphenyls) ซึ่งมีลักษณะ โครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสารประกอบ PAHs อีกทั้งยังเป็นสารมลพิษที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันที่ทำให้เกิดอันตรายในสัตว์น้ำและมีการปนเปื้อนไปยังสิ่งมีชีวิตในระบบห่วงโซ่อาหารได้ (Cheung *et al.*, 2001) โดย Danis *et al.* (2005) ศึกษาปริมาณความเข้มข้น PCB ในหมีก *Sepia officinalis* ที่ได้รับการปนเปื้อนจากการสัมผัสน้ำทะเล จากการศึกษาพบว่าสารมลพิษมีการปนเปื้อนไปยังผู้บริโภค โภคลำดับชั้นถัดไปในระบบห่วงโซ่อาหาร นอกจากนี้สารมลพิษเหล่านี้ยังส่งผลให้หอยสองฝามีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของระบบสืบพันธุ์ (Capuzzo *et al.*, 1988)

การจัดทำระบบในสถานะทดลองนั้นมีจุดแข็งและจุดอ่อนที่ขึ้นอยู่กับกรอบแบบของระบบ การวางระบบนิเวศจำลอง (mesocosms) ในสถานะทดลองนั้นนับว่ามีความสำคัญในการศึกษาทางระบบนิเวศวิทยาของการศึกษาทางวิทยาศาสตร์มาก (Reilly, 1999) เนื่องจากสิ่งมีชีวิตหอยบางชนิดที่อยู่ในห่วงโซ่อาหารที่เป็นทรัพยากรประมงที่มีความสำคัญ เมื่อสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีการปนเปื้อนน้ำมันอาจจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่บริโภคสัตว์เหล่านี้เป็นอาหารได้ ซึ่งการศึกษาระดับการสะสมของ 1 - HOP และ 2 - NAP เพื่อแสดงถึงระดับความเป็นพิษของน้ำมันดิบที่ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตหลักที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินในระบบนิเวศจำลองในสถานะทดลองนั้น จะเป็นการยืนยันข้อสันนิษฐานที่ว่าเมื่อเกิดการปนเปื้อนน้ำมันเข้าสู่สิ่งมีชีวิตในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินแล้ว สารมลพิษจะมีการปนเปื้อนไปยังผู้บริโภคลำดับชั้นถัดไปในห่วงโซ่อาหารหรือไม่ ทั้งนี้การจำลองระบบนิเวศแบบปิดยังมีประโยชน์ต่อการศึกษาสถานะการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs เมื่อมีการปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Yamada *et al.*, 2003) ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาผลกระทบจากสารมลพิษที่มีต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำโดยสร้างแบบจำลองของระบบนิเวศ ตัวอย่างเช่น

Carr and Linden (1984) ศึกษาประเมินผลกระทบของน้ำมันและสารกำจัดคราบน้ำมัน oil dispersants ในแบบจำลองระบบนิเวศทะเลบอลติกเพื่อศึกษาผลผลิตขั้นต้นและมวลชีวภาพ (อัตราส่วน O : N) ในหอยแมลงภู *Mytilus edulis* และ *Salmonus Gammarus* อัตราการหายใจและการขับถ่ายใน *G. salinus* การสร้าง byssal thread และอัตราการฟักไข่ของ *M. edulis* โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตได้รับจากน้ำมัน และ oil dispersants และกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตได้รับจากน้ำมัน ไซ้ถังแบบกลมพื้นที่ผิว 10.25 ตารางเมตรและมีปริมาตร 7.5 ลูกบาศก์เมตรในการทดลอง มีระบบน้ำไหลวน ($2.8 \text{ m}^{-1}/50\%$ ต่อ

ชั่วโมง) ในการเพาะเลี้ยง ตัวอย่างถูกเก็บรวบรวมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ติดตามผลในชั่วโมงที่ 1, 6, 12, 24, 63, 73, 93 และ 186 ผลจากการศึกษาพบว่าหลังจากสิ่งมีชีวิตได้รับจากน้ำมันและ oil dispersants ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตมีอัตราการสร้าง byssal thread และมีอัตราการวางไข่ลดลง กลุ่มสิ่งมีชีวิตกลุ่มที่ได้รับ oil dispersants จะมีการฟื้นตัวหลังจาก 12 วันหลังจากการทดลอง ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันเพียงอย่างเดียวมีพฤติกรรมการฟักไข่ที่ผิดปกติ ซึ่งการทดลองในครั้งนี้พบว่าน้ำมันไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการหายใจ (อัตราส่วน O : N) และการขับถ่าย แอมโมเนียใน *G. salinus* ในขณะที่ Barsien^c *et al.* (2006) ทำการศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบที่มีต่อหอย *Anodonta anatina L.* และ *Perca fluviatilis L.* จากการศึกษาพบว่าน้ำมันดิบส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่มีการเปลี่ยนแปลงของ micronuclei และ nuclear buds บริเวณเหงือกในหอย *Anodonta anatina L.* และเซลล์เม็ดเลือดในหอย *Perca fluviatilis L.* นอกจากนี้ Jeong and Cho (2007) ได้รายงานผลการศึกษาพิษสะสมของ PAHs ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของหอยนางรม ซึ่งในการศึกษาได้ทำการคัดเลือกหอยนางรมและแยกออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 25 ตัว ให้ PAHs ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (50 และ 200 $\mu\text{g}/\text{l}$) วัดค่า Clearance rate น้ำหนักแล้วนำค่าไปคำนวณหาปริมาณสารอินทรีย์ในอุจจาระ วัดอัตราการหายใจจากปริมาณการใช้ออกซิเจน และใช้ scope for growth เป็นเครื่องมือในการประเมินพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโต เพื่อประเมินผลกระทบการปนเปื้อนน้ำมันในหอยนางรม ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าหอยนางรมจะมีการสร้างไขมันและคาร์โบไฮเดรต เพื่อลดการดูดซึมของสารพิษทำให้พลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตมีค่าลดลง แต่ค่า Clearance rate จะสูงขึ้น

2.5.5 ผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมันต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกในหอยนางรมปากจืดที่ได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมัน

การศึกษาความผิดปกติของลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทางน้ำ เป็นเครื่องมือที่มีความสำคัญในการประเมินความผิดปกติของสิ่งมีชีวิตและ โครงสร้างประชากร เนื่องจากการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้ในการติดตามจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติหรือการตายในสิ่งมีชีวิตได้ (Brown *et al.*, 1977; Cajaraville *et al.*, 1990) ซึ่งการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อนับว่าเป็นดัชนีทางชีวภาพที่บ่งบอกถึงการ

ปนเปื้อนของสารพิษที่มีผลต่อความผิดปกติของเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตได้ (Khan ., 1990; Pacheco and Santos, 2002)

ผลกระทบของสารมลพิษต่าง ๆ รวมทั้งสารประกอบ PAHs ในน้ำมันที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะส่งผลทำให้เกิดความเครียด และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่ง (Ameur *et al.*, 2012; Khan, 1990) ซึ่งในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาและใช้การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อในปลาและหอยสองฝาเป็นดัชนีทางชีวภาพในการตรวจสอบมลพิษทางทะเล (Au, 2004) โดยสัตว์หน้าดินที่ไม่มีกระดูกสันหลังหรือหอยสองฝาหลายชนิดเช่น หอยแมลงภู่และหอยนางรมมักถูกนำมาใช้เป็นแบบจำลองชี้วัดการสะสมของมลพิษในระบบนิเวศวิทยา เนื่องจากสิ่งมีชีวิตชนิดนี้มีพฤติกรรมอยู่นิ่ง ไม่เคลื่อนที่ และมีพฤติกรรมการกินอาหารแบบกรองกิน เมื่อเกิดการแพร่กระจายของมลพิษเข้าสู่สิ่งแวดล้อมจึงอาจมีการปนเปื้อนของมลพิษเข้าสู่เนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตได้ในปริมาณสูง (Amutha *et al.*, 2009)

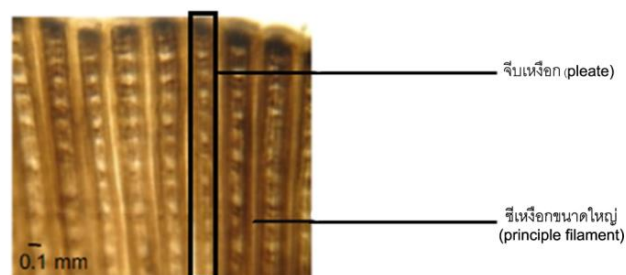
หอยนางรมปากจีบมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccostrea cucullata* จัดอยู่ในวงศ์ Ostracidae ไฟลัม Mollusca เป็นหอยที่มีขนาดเล็ก มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม อีกทั้งยังสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ซึ่งหอยนางรมปากจีบมีแหล่งที่อยู่อาศัยตั้งแต่บริเวณปากแม่น้ำตลอดไปจนถึงบริเวณชายฝั่งทะเล (นิพนธ์, 2543) หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) เป็นหอยสองฝาที่มีพฤติกรรมเกาะอยู่กับที่ เปลือกทั้งสองข้างมีขนาดไม่เท่ากัน เปลือกด้านซ้ายมีขนาดใหญ่และมีลักษณะเป็นรูปถ้วย เปลือกด้านขวาของหอยจะมีลักษณะค่อนข้างแบนราบ บางชนิดมีสีเทาหรือสีน้ำตาล ลักษณะหอยนางรมที่พบในธรรมชาติโดยทั่วไปรูปร่างไม่คงที่แน่นอน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัยและวัตถุประสงค์ที่หอยเกาะเลี้ยงตัวอยู่ ส่วนของตัวหอยประกอบด้วยส่วนที่ปกคลุมตัวหอยนางรมแบ่งเป็นสองส่วนคือ แมนเทิล (mantle) ด้านซ้ายและขวา เหนือจะมี 2 คู่ ทำหน้าที่กรองอาหารที่มีขนาดเล็กและส่งสู่ช่องปาก พร้อมทั้งทำหน้าที่หายใจและช่วยในการขับถ่ายของเสียออกจากร่างกายอีกด้วย หอยนางรมแตกต่างจากหอยชนิดอื่นคือ ไม่มีเท้า ไม่มีฟัน ไม่มีท่อน้ำ ไม่มีเส้นใย และมีกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) เพียงอันเดียว (ภาพที่ 2.8)



ภาพที่ 2.8 ลักษณะทางกายวิภาคและส่วนประกอบของหอยนางรม (นิพนธ์, 2543)

2.5.5.1 โครงสร้างลักษณะเหงือกของหอยนางรมปากจیب

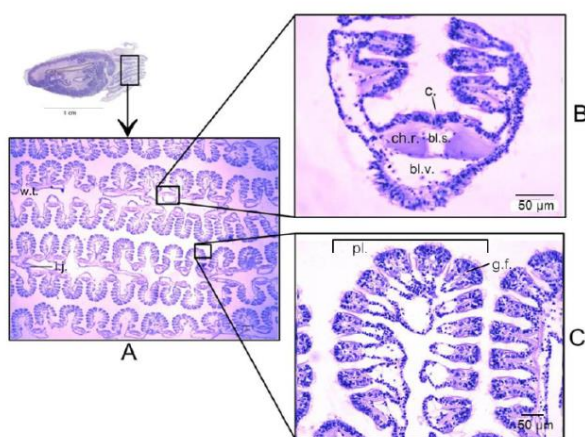
หอยนางรมปากจیبมีโครงสร้างและลักษณะเหงือกแบบ pseudolamellibranch คือ มีเหงือก 2 คู่ หรือ 4 แผ่น เรียงตัวใกล้กัน ซึ่งแต่ละคู่ยึดอยู่บนแกนเหงือกเดียวกัน วางตัวด้านข้างตามความยาวของลำตัว ตั้งแต่ส่วนของ labial palps ซึ่งอยู่ใกล้ปากไปจนถึงด้านท้ายของลำตัว แผ่นเหงือกแต่ละแผ่นประกอบด้วยซี่เหงือกที่พับทบกันเป็นจีบ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวให้แผ่นเหงือก โดยแต่ละจีบประกอบด้วยซี่เหงือกหลายซี่เกิดเป็นสันกว้าง ระหว่างจีบเหงือกที่เป็นร่องลงไปจะเป็นซี่เหงือกขนาดใหญ่ 1 ซี่ (principle filament) ทำหน้าที่ในการลำเลียงชิ้นส่วนของอาหารที่มีขนาดใหญ่ไปยังด้านท้องของแกนเหงือก เรียกลักษณะเหงือกแบบนี้ว่า เหงือกแบบจีบ (pleated ctenidia) (ภาพที่ 2.9) และมีเนื้อเยื่อเชื่อมอยู่หลายตอนระหว่างซี่เหงือกแต่ละซี่ และบริเวณด้านรอยพับของซี่เหงือกมีซิเลียที่ใช้สำหรับโบกพัดอาหารลึกลงเข้าสู่ปาก



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของเหงือกแบบจีบในหอยนางรม (อัมพิกา, 2550)

2.5.5.2 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรม

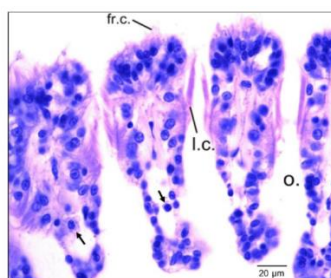
สุทิน และรัตน (2557) ศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อและโครงสร้างเหงือกของหอยนางรม (หอยตะโกรมGRAMดำ) พบว่า ซี่เหงือกหลัก (Principle filament) ของหอยมีลักษณะม้วนพับเป็นจีบมีลักษณะคล้ายใบไม้ซึ่งเรียกว่า Plica (ภาพที่ 2.10) แต่ละ Plica ประกอบด้วยซี่เหงือกย่อย (Gill filament)



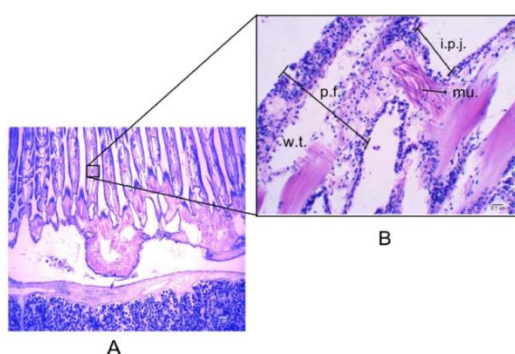
ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของเนื้อเยื่อเหงือกที่ตัดตามขวางของหอยตะโกรมGRAMดำ *C. iredalie* A: เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกหอยนางรม, B: โครงสร้างบริเวณฐานของ Plica และ C: โครงสร้างของ Plica ที่เกิดจากการพับของซี่เหงือกหลัก (Principle filament) กลายเป็นซี่เหงือกย่อย (Gill filament) รวมกันเป็นจีบคล้ายใบไม้ (bl.s. คือ blood space, bl.v. คือ blood vessel, c. คือ cilia, ch.r. คือ chitinous rods, fr.c. คือ frontal cilia, i.j. คือ interlamellar junction, l.c. คือ laterofrontal cilia, o. คือ ostium, w.t. คือ water tube)

เนื้อเยื่อที่พบในซี่เหงือกย่อย ประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชนิด Ciliated cuboidal epithelium ซึ่งมีลักษณะคล้ายเป็นเยื่อบุผิวชั้นเดียวพบเซลล์รูปทรงคล้ายลูกเต๋าตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (Basement membrane) บริเวณซี่เหงือกย่อยนี้สามารถพบซิเลียที่ผิวด้านนอกด้านที่สัมผัสกับน้ำทะเลสองแบบได้แก่ Laterofrontal cilia คือ ซิเลียที่อยู่ด้านข้างซี่เหงือกย่อย มีลักษณะค่อนข้างยาวและอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และ Frontal cilia เป็นซิเลียที่มีตำแหน่งอยู่ทางด้านหน้าของซี่เหงือกย่อย เป็นซิเลียที่กระจายไม่รวมเป็นกลุ่ม จากโครงสร้างและตำแหน่งที่พบของซิเลียเป็นการแสดงให้เห็นว่านอกจากเหงือกจะทำหน้าที่หลักในการแลกเปลี่ยนก๊าซแล้ว ยังทำหน้าที่สำคัญอื่น ๆ ได้แก่

โบกพัดและคัดกรองอาหารที่มากับน้ำ นอกจากนี้ภายในซี่เหงือกย่อยแต่ละอันยังมีลักษณะเป็นแฉ่งเลือดสำหรับให้เลือดไหลเวียนผ่านเหงือกเกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซ เซลล์เม็ดเลือดที่พบมีลักษณะเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมและมีไซโทพลาซึมล้อมรอบและพบในพื้นที่ว่างของแฉ่งเลือด (ภาพที่ 2.11) บริเวณฐานของ Plica พบ โครงสร้างแฉ่งเลือดขนาดใหญ่ (Blood space) และพบ Chitinous rod ที่มีลักษณะคล้ายกระดูกอ่อนรองรับบริเวณฐานของพลิคาเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้แก่เหงือก ภายในเยื่อเชื่อมระหว่างซี่เหงือกหลัก (Interlamellar junction) จะพบกล้ามเนื้อแทรกอยู่ (ภาพที่ 2.12) ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหดและคลายตัวของแผ่นเหงือก จากลักษณะโครงสร้างและลักษณะเนื้อเยื่อของเหงือกแสดงให้เห็นว่า ภายในเหงือกประกอบด้วยแฉ่งเลือดจำนวนมากและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบาง ทำให้เลือดที่ไหลผ่านเหงือกเกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ง่าย และนอกจากนี้เหงือกยังมีการเพิ่มพื้นที่แลกเปลี่ยนก๊าซโดยมีวนพับลักษณะคล้ายใบไม้เพื่อให้เกิดพื้นที่ผิวที่สามารถสัมผัสกับน้ำมากขึ้น



ภาพที่ 2.11 โครงสร้างของซี่เหงือกย่อย Gill filament ของเหงือกหอยตะเภา ไทรแองกูลัม ลูกศรแสดง เม็ดเลือดที่พบในซี่เหงือกย่อย (fr.c.คือ frontal cilia, l.c. คือ laterofrontal cilia)



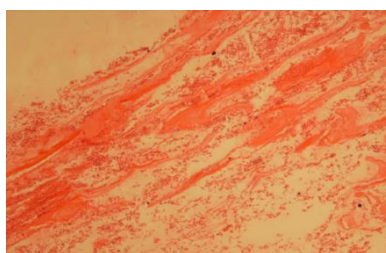
ภาพที่ 2.12 โครงสร้าง interprinciple junction ที่เชื่อมระหว่างแผ่นเหงือกของหอยตะเภา ไทรแองกูลัม
A คือ ภาพตัดจากส่วนด้านหัว – ท้าย (anterior – posterior section) กำลังขยาย 40 เท่า
B คือ ภาพขยาย interprinciple junction ที่เชื่อมแผ่นเหงือก กำลังขยาย 1000 เท่า (i.p.j. คือ interprinciple junction, mu. คือ muscle, p.f. คือ principle filament)

2.5.5.3 ผลกระทบจากมลพิษที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อของหอย

การประเมินผลกระทบทางชีวภาพของมลพิษที่มีต่อสิ่งแวดล้อมเป็นสิ่งสำคัญในที่แสดงถึงสถานการณ์และแนวโน้มของวิกฤติทางด้านทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในระดับเนื้อเยื่อวิทยาถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการระบุรอยโรคทางพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่เกิดจากการปนเปื้อนของมลพิษในสิ่งแวดล้อมซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลได้ (Moore and Simpson, 1992) และยังสามารถช่วยบ่งบอกถึงสุขภาพโดยรวมของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับเนื้อเยื่อวิทยามักถูกนำมาใช้ในการประเมินผลกระทบจากมลพิษที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมทั้งในระยะสั้นและระยะยาว (Hinton and Lauren, 1990)

หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) มีถิ่นอาศัยอยู่ในเขตน้ำจืดน้ำลง มีการแพร่กระจายพบได้ทั่วไปในบริเวณหาดหิน มีคุณสมบัติที่เหมาะสมและเอื้อต่อการศึกษาด้านพิษวิทยาสำหรับระบบนิเวศชายฝั่งหลายประการ เช่น หอยนางรมเป็นหอยสองฝาที่มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสารปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมได้ดี (Kingtong *et al.*, 2007) หอยนางรมมีพฤติกรรมเกาะนิ่งบนที่อยู่อาศัยไม่เคลื่อนที่จึงสัมผัสกับน้ำมันโดยตรงเมื่อเกิดการปนเปื้อนและเนื่องจากหอยนางรมมีพฤติกรรมไม่เคลื่อนที่จึงมีกลไกในการจัดการกับสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ดี ดังนั้นเพื่อความอยู่รอดจึงมีการปรับตัวด้านสรีรวิทยา (physiological adaptation) เพื่อตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมและสารเคมี (Antizar-Ladislao, 2008) มนุษย์ส่วนใหญ่นิยมบริโภคหอยนางรมเป็นอาหาร และหอยนางรมยังใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งหากมีการสะสมของน้ำมันดิบในเนื้อเยื่อของหอยอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคชั้นอื่น ๆ ในห่วงโซ่อาหารรวมถึงมนุษย์ได้ ดังนั้นการศึกษาผลของการปนเปื้อนน้ำมันดิบในหอยนางรมปากจีบจึงมีความสำคัญปริยาและคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาผลของการปนเปื้อนน้ำมันดิบต่อเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและลำไส้ของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) บริเวณเกาะเสม็ดจังหวัดระยอง จากการศึกษาพบว่าลักษณะของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและเนื้อเยื่อลำไส้ของหอยนางรมปากจีบบริเวณอ่าวพร้าวไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่เนื้อเยื่อแมนเทิลซึ่งเป็นอวัยวะภายนอกที่ปกคลุมโครงสร้างภายในของหอยและมีการสัมผัสกับน้ำโดยตรงเมื่อหอยเปิดเปลือกจึงสามารถสัมผัสกับน้ำมันโดยตรงได้มีการสร้างเมือกเพิ่มมากขึ้น การที่เซลล์มีการสร้างเมือกนั้นเนื่องจากเป็นกลไกการตอบสนองเมื่อสัตว์ระคาย

เคื่องหรือได้รับความเครียดจากสารเคมี หอยนางรมปากจีบจึงมีการกระตุ้นกลไกในการป้องกันตัวในระดับเซลล์เพื่อป้องกันตัวเองจากผลกระทบของการปนเปื้อนน้ำมันดิบ Al-Hashem (2017) ได้ทำการศึกษาผลกระทบจากความเป็นพิษของ PAHs ที่มีต่อลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในหอยนางรม *Pinctada radiata* บริเวณชายฝั่งประเทศคูเวต ผลจากการศึกษาพบว่า PAHs ส่งผลกระทบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอย่างรุนแรงบริเวณเหงือกของหอย พบความผิดปกติของรูปร่าง และเกิดภาวะการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง บริเวณ lamellae branchial และ gill filaments ดังแสดงในภาพที่ 2.13



ภาพที่ 2.13 ความผิดปกติของรูปร่าง และเกิดภาวะการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงบริเวณ gill filaments

ในขณะที่ Mondol *et al.* (2015) และ Hong *et al.* (2016) ได้ทำการศึกษาผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมันจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วบริเวณ Hebei Spirit ชายฝั่งตะวันตกของเกาหลีใต้ในปี 2007 ที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ระบบสืบพันธุ์และอัตราการเกิดเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) ในหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) จากการศึกษาพบว่าผลกระทบจากความเครียดของน้ำมันส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของร่างกาย อัตราการสร้างไข่และปริมาณโปรตีนในหอยนางรมมีที่ปริมาณลดลง และสิ่งมีชีวิตที่ได้รับผลกระทบจากมลพิษมีการฟื้นตัวได้ในระยะเวลา 2 ปี หลังจากเกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่ว นอกจากนี้ Domingos *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาผลของมลพิษซึ่งส่งผลกระทบต่อหอยนางรม พบว่าผลกระทบจากความเครียดของมลพิษจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกบริเวณ gill filament ของหอยนางรม ซึ่งอัมพิกา (2550) ได้ทำการอธิบายว่าเหงือกของหอยนางรมปากจีบแต่ละตัวมีขนาด รูปร่าง และสีที่แตกต่างกัน ตามคุณภาพของแหล่งน้ำ และสภาพแวดล้อม กล่าวคือเหงือกหอยนางรมปากจีบที่พบบริเวณที่มีสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรมและคุณภาพน้ำต่ำจะมีขนาดความกว้างของเหงือกน้อย และสีเหงือกส่วนใหญ่เป็นสีดำ แตกต่างกับลักษณะเหงือกของหอยนางรมปาก

จีบที่พบในบริเวณที่มีลักษณะทางกายภาพของสิ่งแวดล้อมที่ดี คุณภาพน้ำดี และไม่มีแหล่งชุมชน หรือท่าเรือที่ก่อให้เกิดมลพิษ เหมืองจะมีขนาดความกว้าง และสีเหมืองมีลักษณะใส

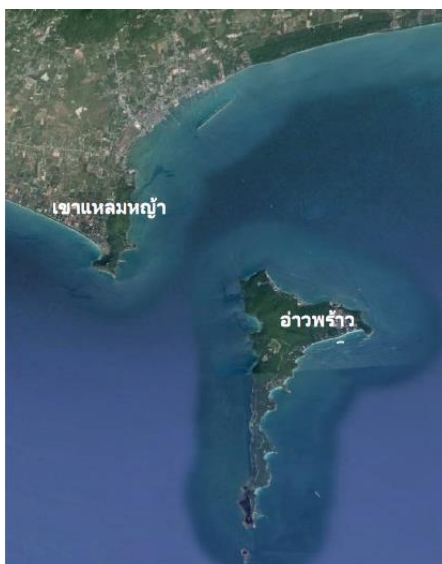
บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดินที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยองภายหลังอุบัติเหตุน้ำมันรั่วไหล

3.1.1 พื้นที่ศึกษา

พื้นที่ศึกษาประกอบด้วย (1) เขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินบริเวณทิศเหนือของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง (Latitude: 12.56926 °N, Longitude: 101.44949°E) ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบจากอุบัติเหตุการรั่วไหลเมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม 2556 (2) หาดหินบริเวณหน้าทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง (Latitude: 12.58767°N, Longitude: 101.41990°E) ซึ่งอยู่ตรงข้ามกับอ่าวพร้าวมีระยะห่างกันประมาณ 3 กิโลเมตร มีความยาวตลอดชายหาดประมาณ 300 เมตร (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 พื้นที่ศึกษา แสดงการเก็บข้อมูลภาคสนามบริเวณหาดหินและบริเวณที่ทำการหน้าอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า (<https://www.google.co.th/earth>)

3.1.3 การเก็บข้อมูลภาคสนาม

ทำการเก็บข้อมูลภาคสนาม โดยการสำรวจเบื้องต้นก่อนทำการเก็บข้อมูลจริงในเดือนสิงหาคม 2556 และทำการเก็บข้อมูลจริงในเดือนตุลาคมและธันวาคม พ.ศ. 2556 และมีนาคม พ.ศ. 2557 ออกแบบการเก็บตัวอย่างแบบ stratified random sampling โดยในแต่ละพื้นที่ศึกษากำหนดแนวระดับเพื่อเก็บข้อมูล 5 ระดับน้ำคือ 1.50, 1.75, 2.00, 2.25 และ 2.50 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง โดยใช้ข้อมูลทำนายระดับน้ำขึ้นน้ำลงของกรมอุทกศาสตร์ กองทัพเรือ ในแต่ละระดับน้ำทำการตรึงหมุดถาวรให้มีระยะห่างกันระหว่างหมุด 5 เมตรเป็นระยะทางประมาณ 100 เมตร ในแต่ละระดับน้ำจะใช้หมุดสีแตกต่างกัน (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 แสดงการเก็บข้อมูลชนิด และความซุกซมของสัตว์หน้าดิน

การบันทึกชนิด การแพร่กระจาย และความซุกซมของสัตว์หน้าดินชนิดต่าง ๆ บริเวณหาดหินในพื้นที่ศึกษา โดยใช้วิธีการ photo quadrat (ภาพที่ 3.3) โดยในแต่ละระดับน้ำทำการลากเส้นเทปวัดระยะความยาว 50 เมตร วางเส้นเทปลากให้ผ่านหมุดแต่ละหมุดที่อยู่ในระดับน้ำเดียวกันเป็นระยะทางสำรวจ 100 เมตร จากนั้นวางตารางสี่เหลี่ยมที่มีขนาด 25 × 25 เซนติเมตร และติดตั้งกล้องถ่ายภาพดิจิตอลด้านบน ความสูงจากเลนส์กล้องถึงพื้นหินประมาณ 40 เซนติเมตร ทำการถ่ายภาพในแต่ละเส้นสำรวจตามเส้นเทปจำนวน 50 ครั้ง โดยใช้ตารางสุ่ม ในกรณีที่ตารางสี่เหลี่ยมพาดผ่านก้อนหินที่มีขนาดเล็กจะพลิกก้อนหินเพื่อค้นหาสัตว์หน้าดินที่อาจหลบอยู่ใต้หิน (ภาพที่ 3.4)



ภาพที่ 3.3 แสดงการเก็บข้อมูล โดยเทคนิค photo quadrat



ภาพที่ 3.4 แสดงการติดตั้งกล้องถ่ายภาพดิจิทัลเพื่อทำการถ่ายภาพเก็บข้อมูล

3.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ภาพถ่ายที่ได้จะนำมาจำแนกชนิด และนับจำนวนสัตว์หน้าดินที่พบ โดยใช้โปรแกรม Image J ความชุกชุมของสัตว์หน้าดินคำนวณเป็นจำนวนตัวต่อตารางเมตร โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตคำนวณจากดัชนีต่าง ๆ คือ Species Richness , ดัชนีความหลากหลาย (Shannon-Wiener diversity index; H') และดัชนีความสม่ำเสมอ (Evenness; J') และทำการวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตโดยใช้วิธีการ Non-metric multidimensional scaling (nMDS) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Primer (version 5.0)

Speices Richness : d

$$d = \frac{(S - 1)}{\log N} \quad (3.1)$$

เมื่อ d คือ ค่าดัชนี Margalef

S คือ จำนวนชนิดทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในประชาคม

N คือ จำนวนตัวทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตในประชาคม

Shannon-Wiener diversity index; H

$$H' = -\sum p_i (\log p_i) \quad (3.2)$$

เมื่อ H' = ดัชนีความหลากหลาย

$p_i = n_i/N$ (สัดส่วนระหว่างความหนาแน่นหรือจำนวนตัวของสิ่งมีชีวิตชนิด i ต่อ จำนวนสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในประชาคม)

Evenness; J'

$$J' = \frac{H'}{\log S} \quad (3.3)$$

โดย J' = Evenness

H' = Shannon-Wiener diversity index

S = Species richness ของสิ่งมีชีวิตในประชาคม

3.2 การตรวจวัดปริมาณดัชนีทางชีวภาพ (biomarker) ของ polycyclic aromatic hydrocarbons ในหอยที่ได้รับผลกระทบจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลบริเวณหาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง

3.2.1 สัตว์ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหอยสามชนิดซึ่งประกอบด้วย หอยครงแครง (*Planaxis sulcatus*) หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และหอยมะระ (*Morula musiva*) (ภาพที่ 3.5) จากหาดหินบริเวณอ่าวพร้าว และหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง ตามช่วงเวลา que แสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้นนำตัวอย่างมาแช่แข็งในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสทันที



ภาพที่ 3.5 แสดงตัวอย่างหอยประกอบด้วย (A) หอยครงแครง (*P. sulcatus*) (B) หอยมะระ (*M. musiva*) และ (C) หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) จากหาดหินอ่าวพร้าว และหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า

ตารางที่ 3.1 แสดงจำนวนตัวอย่างหอยจากหาดหินอ่าวพร้าว และหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้าในแต่ละช่วงระยะเวลา

ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตหน้าดิน	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)				
	สิงหาคม	ธันวาคม	มีนาคม	กรกฎาคม	พฤษภาคม
	2556	2556	2557	2557	2558
หอยครงแครง (<i>P. sulcatus</i>)	20	20	20	20	20
หอยนางรมปากจีบ (<i>S. cucullata</i>)	20	20	20	20	20
หอยมะระ (<i>M. musiva</i>)	20	20	20	20	20

3.2.3 ขั้นตอนการดำเนินการในห้องปฏิบัติการ

3.2.3.1 การสกัด biomarker (1-HOP และ 2-NAP) ในหอยตัวอย่าง

นำตัวอย่างหอยออกมาล้างให้สะอาดที่อุณหภูมิห้อง 27 ° C แล้วนำมา homogenized ด้วย IKO T-25 Ultra-Turrax Digital Homogenizer จากนั้นทำการสกัดโดยใช้ 2 M KOH 5 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างหอย 2 กรัม (น้ำหนักเปียก) และนำไป sonicated ด้วย ultrasonic bath เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไป hydrolysis ในตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 90 ° C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปปรับสภาพให้เป็นกรด ด้วย 2 M HCl ให้มีค่า pH ประมาณ 2 - 3 แล้วทำการสกัดโดยใช้ $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (ethyl acetate) 10 ml และเติม NaCl (sodium chloride) 1.0 กรัม ลงในตัวอย่าง เขย่าด้วย Vortex Mixer 2 นาที และ centrifuged ที่ค่า 3,660 \times g RCF เป็นเวลา 5 นาที. ทำการดูดเก็บชั้นของ ethyl acetate ที่อยู่ด้านบนออกจนหมด หลังจากนั้นทำการสกัดซ้ำอีกครั้งโดยการเติม ethyl acetate ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลองแล้วทำการเขย่าด้วย Vortex Mixer 2 นาที และ centrifuged ที่ค่า 3,660 \times g RCF เป็นเวลา 5 นาที และทำการดูดเก็บชั้นของ ethyl acetate แล้วนำมาระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน นำหลอดตัวอย่างที่ผ่านการเป่าแห้งแล้วมาทำการ Derivatization โดยการ pipette bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) ปริมาตร 50 μ l และ ethyl acetate ปริมาณ 50 μ l ลงในหลอดตัวอย่าง ปิดฝาให้แน่นทันที จากนั้น vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที และนำหลอดตัวอย่างใส่ rack และนำเข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 60 ° C เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างออกจากตู้อบและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 mL. ที่มี d-SPE ชนิด PSA (Primary Secondary Amine) 10 mg และ GCB 7.5 บรรจุอยู่ เพื่อทำการ Clean up สิ่งสกปรก vortex mixer ด้วยเครื่องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที. ใช้ micropipette ดูดส่วนใสไว้ใน vial ขนาด 2 mL. ที่ภายในมี insert แบบก้นแหลมบรรจุอยู่ ปิดฝาให้แน่นและ ทำการวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณของ biomarker โดยใช้เครื่อง GC - MS/MS



ภาพที่ 3.6 แสดงขั้นตอนการสกัด biomarker (1-HOP และ 2-NAP) ในหอย

3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ 1-HOP และ 2-NAP ด้วยเครื่อง GC-MS/MS

หลังจากการสกัดแล้วนำตัวอย่างฉีดในเครื่อง GC - MS/MS ยี่ห้อ Bruker GC-MS TQ (Bruker Daltonics Inc. Chemical และ Applied Markets, West Warren Avenue Fremont, CA, USA) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ 1-HOP และ 2-NAP ดัดแปลงจากวิธีการของ Shin and Lim (2011) และ Lim and Shin (2013) ใช้โหมด splitless อุณหภูมิของ columns จะต้องถูกควบคุมให้อยู่เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 100 °C ตั้งค้างไว้ 1 นาที จากนั้นเพิ่ม 20 °C / นาที สูงสุดที่อุณหภูมิ 320 °C แหล่งไอออนถูกให้กำเนิดโดย Electron Ionization (EI) ทำให้สารเกิดการแตกตัวโดยใช้ลำอิเล็กตรอนซึ่งจะให้พลังงาน 70 อิเล็กตรอนโวลต์ (EI; 70 eV) ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส นำค่า

มวลน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบที่ต้องการศึกษาที่อ่านได้จาก GC - MS/MS มายืนยันกับข้อมูลอ้างอิงที่มีอยู่ในเครื่อง

ตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์โดยใช้ จาก GC - MS/MS ที่มี conditions ต่าง ๆ ดังนี้

- Sample: 1 μ L
- Column: HP-5MS column (cross - linked 5 % phenylmethylsilicon, 30 m \times 0.25 mm I.D. \times 0.25 μ m F.T).
- Carrier gas: Helium
- Collision gases: Argon
- MS mode: multiple reaction monitoring (MRM)

3.2.4 การประมาณค่า Detection limit และ Calibration curve

3.2.4.1 การเตรียม Sample Blank

Sample Blank หรือ Matrix Blank เป็นการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างหอยที่ไม่มี การปนเปื้อนน้ำมันดิบ จากตลาดปลาอ่างศิลาที่เก็บในช่วงเดือนมิถุนายน 2558 จากนั้นนำมา homogenized ด้วย IKO T-25 Ultra-Turrax Digital Homogenizer แล้วทำการสกัดโดยใช้ 2 M KOH 5 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างหอย 2 กรัม (น้ำหนักเปียก) และทำการสกัดตรวจหาปริมาณ biomarker (1-HOP และ 2-NAP) ในตัวอย่างหอยและทำการวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณของ biomarker โดยใช้ เครื่อง GC - MS/MS เช่นเดียวกับขั้นตอนที่แสดงดังในหัวข้อที่ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2

3.2.4.2 การหา detection limit และ Calibration curve

หา detection limit (ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้) ของ 1-hydroxypyrene และ 2-Naphthol และทำ Calibration curve โดยการเตรียม standard ให้อยู่ใน matrix ที่เหมือนกับสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ โดยกำหนด Calibration curve 3 จุดคือ 0.05, 0.5 และ 2.5 โดยใช้เนื้อเยื่อของหอยนางรม *S. cucullata* 2 กรัม (จากตลาดปลาอ่างศิลา ในช่วงเดือนมิถุนายน 2558) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้ peak ค้นหาความสัมพันธ์ สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient: r) โดยขั้นตอนการหา Limit of Detection (LOD) มีวิธีปฏิบัติ ดังต่อไปนี้

นำตัวอย่างหอยที่เก็บตัวอย่างจากอ่างศิลา และเติม internal standard (1-HOP-d 9) ในปริมาณ 0.05 mg/kg) นำตัวอย่างหอยที่ได้มา homogenized ด้วย IKO T-25 Ultra-Turrax Digital Homogenizer และทำการสกัดทำการสกัดหา biomarker (1-HOP และ 2-NAP) และทำการวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณของ biomarker โดยใช้เครื่อง GC - MS/MS เช่นเดียวกับขั้นตอนที่แสดงดังในหัวข้อที่ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2

3.3 ตรวจวัดระดับ 1-HOP และ 2-NAP ในหอยบริเวณหาดหินในระบบนิเวศจำลอง

3.3.1 สัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างหอยสามชนิดซึ่งประกอบด้วย หอยครองแครง (*Planaxis sulcatus*) หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และหอยมะระ (*Morula musiva*) ชนิดละ 50 ตัว จากหาดหินของหาดถ้ำพัง อำเภอกะสีซัง จังหวัดชลบุรี จากนั้นนำกลับมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าพระยาลาดกระบัง ในถังพลาสติกขนาด 54×80×35 ลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.3.2 ตรวจวัดการสะสม 1-HOP และ 2-NAP ของหอยในหาดหินภายใต้ระบบนิเวศจำลอง

ระบบนิเวศจำลองในห้องปฏิบัติการ (mesocosms) ประกอบด้วยหน่วยทดลองซึ่งเป็นถังพลาสติกขนาด 54×80×35 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 150 ลิตร มีการออกแบบการทดลองโดย แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือชุดควบคุม 1 ชุด และชุดที่ใส่น้ำมันดิบปริมาณ 30 ml 2 ชุด แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วยถังเลี้ยงและถังพักน้ำ ซึ่งชุดการทดลองทั้งหมดมีการจัดทำระบบจำลองน้ำขึ้นน้ำลงเลียนแบบธรรมชาติโดยใช้เครื่องปั้มน้ำ ระยะเวลาความมืดและความสว่างเป็นไปตามธรรมชาติ และมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ในระบบดังแสดงในตาราง 3.2

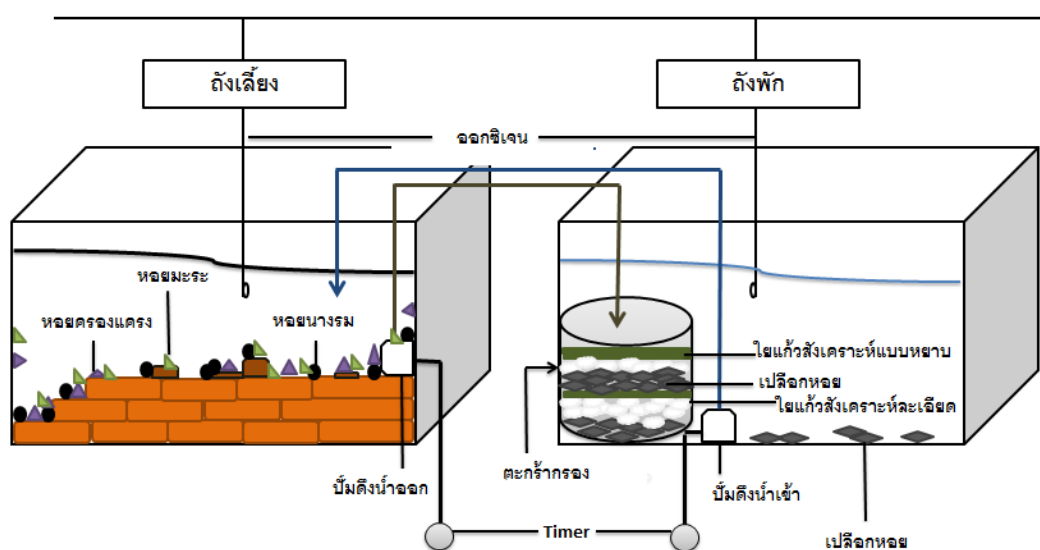
ตารางที่ 3.2 แสดงปัจจัยต่าง ๆ ในระบบนิเวศจำลองในห้องปฏิบัติการ (mesocosms)

ระบบนิเวศจำลอง	แหล่งน้ำทะเล	ความเค็ม	ระยะเวลาขึ้น-ลง
ถังเลี้ยง/ ถังพัก	ทำน้ำเค็มโดยใช้เกลือทะเล	30-32 ppt	ครั้งละ 6 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง/วัน

ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด ซึ่งการทำระบบน้ำขึ้นน้ำลงของระบบนิเวศจำลองในห้องปฏิบัติการนั้น ในช่วงระยะเวลาที่มีการจำลองตั้งระบบให้เกิดน้ำลงน้ำจากถังเลี้ยงจะถูกลำเลียงออกสู่ถังพัก ในขณะที่เดียวกันเมื่อครบ 6 ชั่วโมง น้ำจากถังพักจะถูกลำเลียงให้กลับเข้าสู่ถังเลี้ยงอีกครั้งเพื่อจำลองระบบให้เกิดน้ำขึ้น จากนั้นนำสัตว์หน้าดินทั้งหมด ประกอบด้วยหอยครงแครง (*P. sulcatus*) หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) และหอยมะระ (*M. musiva*) ชนิดละ 50 ตัว ใส่ลงหน่วยทดลองแต่ละหน่วย (ภาพที่ 3.7) ทำการเก็บตัวอย่างหอยตามช่วงระยะเวลาดังแสดงในตารางที่ 3.3 แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาแช่แข็งทันทีและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ 1-HOP และ 2-NAP โดยตามวิธีการในข้อ 3.2.3

ตารางที่ 3.3 แสดงจำนวนตัวอย่างหอยแต่ละชนิด ที่เก็บจากระบบนิเวศจำลองในแต่ละช่วงระยะเวลา

ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตหน้าดิน	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)					
	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20	วันที่ 25	วันที่ 30
หอยครงแครง (<i>P. sulcatus</i>)	5	5	5	5	5	5
หอยนางรมปากจีบ (<i>S. cucullata</i>)	5	5	5	5	5	5
หอยมะระ (<i>M. musiva</i>)	5	5	5	5	5	5



ภาพที่ 3.7 ระบบทดลองเลียนแบบธรรมชาติในห้องทดลอง (mesocosms)

3.4 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบที่สัมผัสน้ำมันดิบ

3.4.1 สัตว์ทดลอง

ระบบนิเวศจำลองในห้องปฏิบัติการประกอบด้วยหน่วยทดลองซึ่งเป็นถังพลาสติกขนาด 54×80×35 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 150 ลิตร มีการออกแบบการทดลองโดย แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือชุดควบคุม 1 ชุด และชุดที่ใส่น้ำมันดิบปริมาตร 30 ml 2 ชุด แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วยถังเลี้ยงและถังพักน้ำ ซึ่งชุดการทดลองทั้งหมดมีการจัดทำระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด จำลองน้ำขึ้นน้ำลงเลียนแบบธรรมชาติโดยใช้เครื่องปั้มน้ำ และทำการตั้งเวลาในการควบคุมการขึ้นลงของน้ำครั้งละ 6 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้งต่อหนึ่งวัน ซึ่งการทำระบบน้ำขึ้นน้ำลงของระบบนิเวศจำลองในห้องปฏิบัติการนั้น ในช่วงระยะเวลาที่มีการจำลองตั้งระบบให้เกิดน้ำลงน้ำจากถังเลี้ยงจะถูกลำเลียงออกสู่ถังพัก ในขณะที่เดียวกันเมื่อครบ 6 ชั่วโมง น้ำจากถังพักจะถูกลำเลียงให้กลับเข้าสู่ถังเลี้ยงอีกครั้งเพื่อจำลองระบบให้เกิดน้ำขึ้น จากนั้นนำตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) ความยาวเปลือก 2 - 3 เซนติเมตรจากธรรมชาติ (หาดถ้ำพัง อำเภอกะฉะชีง จังหวัดชลบุรี) จำนวน 50 ตัว นำมาทำความสะอาดเปลือกและใส่ลงในหน่วยทดลองเป็นระยะเวลา 30 วัน เก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบครั้งละ 5 ตัว ในวันที่ 10, 20 และ 30 นำตัวอย่างที่ได้มาแช่แข็งทันทีและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และในขณะที่เลี้ยงให้จุลสาหร่ายชนิด *Chaetoceros sp.* เป็นอาหาร วันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น

3.4.3 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของเหงือกหอยนางรมปากจีบ

ทำการเก็บตัวอย่างเหงือกหอยนางรมปากจีบโดยเปิดเปลือกด้านบนหรือเปลือกขวา แล้วตัดกล้ามเนื้อยึดเปลือก (Adductor muscle) จะเห็นอวัยวะหอยนางรมที่อยู่ภายในรวมทั้งเหงือก จากนั้นตัดชิ้นเหงือกออกมาแล้ว ทำการบันทึกภาพ

3.4.4 ศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیب

3.4.4.1 การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหอยนางรม ตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกหอยนางรมปากจیبที่มีการสัมผัสน้ำมันดิบจากระบบนิเวศจำลองที่มีการสัมผัสน้ำมันดิบในระบบจำลองที่สร้างขึ้นในห้องทดลอง ทำการเก็บตัวอย่าง ในวันที่ 10, 20 และ 30 ครั้งละ 5 ตัว จากนั้นทำการเปิดเปลือกหอยนางรมเพื่อเอาเนื้อเยื่อภายในมารักษาสภาพในสารละลาย 10 % neutral buffer formalin ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการ tissue processing ซึ่งเป็นกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) จากเนื้อเยื่อใน alcohol ที่มีความเข้มข้นต่ำไปยัง alcohol ที่มีความเข้มข้นสูง โดยเริ่มจาก alcohol ที่มีความเข้มข้น 70 % ครั้งที่ 1 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ครั้งที่ 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 80 %, 95 % และ 100 % ขึ้นตอนละ 2 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เนื้อเยื่อใสโดยนำไปแช่ใน xylene เป็นจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง แช่เนื้อเยื่อใน paraffin หลอมเหลว 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบกำหนด 18 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อขึ้นจากเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) แล้วเข้าเครื่องปรับความดันสุญญากาศ (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว) ประมาณ 10 นาที เพื่อช่วยให้ขั้นตอนการแทรกซึมพาราฟินเข้าสู่เนื้อเยื่อดียิ่งขึ้น แล้วฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสติก ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ ให้มีความหนา 4 - 6 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วติดลงบนแผ่นสไลด์โดยใช้เจลลาตินเป็นตัวช่วยให้เนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นสไลด์ นำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางให้แห้งบนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin

3.4.4.2 การย้อมสี ทำการย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin โดยการขจัด paraffin (Deparaffinization) ใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นย้ายสไลด์ไปไว้ในแอลกอฮอล์ เข้มข้นร้อยละ 99.9, 95, 80 และ 70 ตามลำดับ โดยใช้เวลานานละ 5 นาที แล้วแช่สไลด์ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้อมด้วยสี Hematoxylin 1 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอด ปรับเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลาง (Neutralization) โดยแช่ใน ethyl alcohol เข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 5 นาที และย้อมสีซ้ำด้วยสี Eosin (Counter stain) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทำการการขจัดน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) โดยจุ่มสไลด์ใน ethyl alcohol เข้มข้นร้อยละ 95 อย่างรวดเร็ว และจุ่มสไลด์ใน ethyl alcohol เข้มข้นร้อยละ 99.9 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการขจัด alcohol และทำให้เนื้อเยื่อใส (Clearing) โดยจุ่มสไลด์ใน ethanol 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และจุ่มสไลด์ใน xylene อีก 2 ครั้ง ๆ ละ

5 นาที ปิดกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ Permout และทำการศึกษาพยาธิสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ผลของคราบน้ำมันจากอุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหลต่อชนิด การแพร่กระจายและลักษณะโครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตหน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหิน อ่าวพร้าว ในการสำรวจครั้งแรก

4.1.1 สภาพทั่วไป

ผลการสำรวจสภาพโดยทั่วไปในเดือนสิงหาคม 2556 ซึ่งเป็นเวลาสองสัปดาห์ภายหลังจากการเกิดอุบัติเหตุน้ำมันรั่วไหลและเข้าสู่หาดหินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงทางทิศเหนือของอ่าวพร้าวพบว่า บริเวณแนวน้ำลงต่ำสุดและแนวน้ำลงปานกลางยังมีคราบน้ำมันที่ปกคลุมพื้นผิวบางบริเวณ โดยเฉพาะในบริเวณซอกหิน และพบก้อนน้ำมันดิบ (tar ball) ขนาดเล็กจับตัวอยู่ที่ผิวหินเล็กน้อย (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 สภาพหาดหินบริเวณอ่าวพร้าวในการสำรวจครั้งแรกเดือนตุลาคม 2556

จากการสำรวจพบสัตว์หน้าดิน 4 ไฟลัม คือ Arthropoda, Mollusca, Urochordata และ Vertebrata ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ชนิดของสัตว์หน้าดินที่พบบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลงของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จ.ระยอง

Phylum	Common name	Species
Arthropoda	Snapping Shrimp	<i>Alpheus</i> sp.
	Goose barnacle	<i>Chthamalus squamosa</i>
	Hermit Crab	<i>Diogenes pugilator</i>
	Goneplacid Crab	<i>Eucrate</i> sp.
	Sea slater	<i>Ligia</i> sp.
	Rock grapsid Crab	<i>Metopograpsus</i> sp.
Mollusca	Limpet	<i>Cellana toreuma</i>
	Modest Periwinkle	<i>Echinolittorina malaccana</i>
	Rock snails	<i>E. radiata</i>
	Pacific toothed oyster	<i>Isognomon nucleus</i>
	Muricid	<i>Morula</i> sp.
	-	<i>Peasiella roepstorffiana</i>
	coiled snail	<i>Planaxis sulcatus</i>
	Rock oyster	<i>Saccostrea cucullata</i>
	Striped false limpet	<i>Siphonaria</i> sp.
Urochordata	-	<i>Apidium</i> sp.
	Tunicates	<i>Polycarpa</i> sp.
Vertebrata	Brown-speckled sand-goby	<i>Istigobius</i> sp.

การแพร่กระจายของสัตว์หน้าดินในพื้นที่สำรวจมีรูปแบบที่แน่นอนตามแนวระดับน้ำ (zonation) โดยหอยครงแครง (*Planaxis sulcatus*) หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และ ปูแสมหิน (*Metopograpsus* sp.) เป็นสัตว์หน้าดินชนิดเด่นในใกล้แนวน้ำลงต่ำสุดที่ระดับ 1.5 - 1.75 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง ในขณะที่บริเวณแนวน้ำลงปานกลางที่ระดับ 1.75 - 2.0 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง สัตว์หน้าดินชนิดเด่นคือ เพรียงจีบ (*Chthamalus squamosa*) กลุ่ม

หอยฝาชี (limpets) หอยจี่ตา (*Echinolittorina malaccana*) หอยครองแครง (*P. sulcatus*) และหอยมะระ (*Morula* sp.) ส่วนใกล้แนวน้ำขึ้นสูงสุดที่ระดับน้ำ 2.0 เมตร เหนือระดับน้ำทะเลปานกลางขึ้นไป สัตว์หน้าดินที่เด่นคือหอยจี่ตา (*E. malaccana*) และแมงสาบทะเล (*Ligia* sp.) โดยสัตว์หน้าดินตั้งแต่แนวน้ำลงปานกลางถึงแนวน้ำขึ้นสูงสุดส่วนใหญ่มีคราบน้ำมันปกคลุมตัว (ภาพที่ 4.2) น้ำทะเลบริเวณแนวน้ำลงต่ำสุดมีคราบน้ำมันที่ผิวหน้า เป็นฟองสีน้ำตาล และมีปลาตาย (ภาพที่ 4.3) แอ่งหินในแนวน้ำลงปานกลางพบน้ำที่ขังอยู่ในแอ่งมีสีขาวขุ่นคล้ายสีนํ้านม สันนิษฐานว่าสีน้ำดังกล่าวเกิดจากสารที่ผสมลงไปใต้น้ำที่ใช้ฉีดพ่นเพื่อทำความสะอาดผิวหิน (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.2 คราบน้ำมันปกคลุมผิวตัวของหอยน้ำพริก (*Monodonta* sp.) (A)



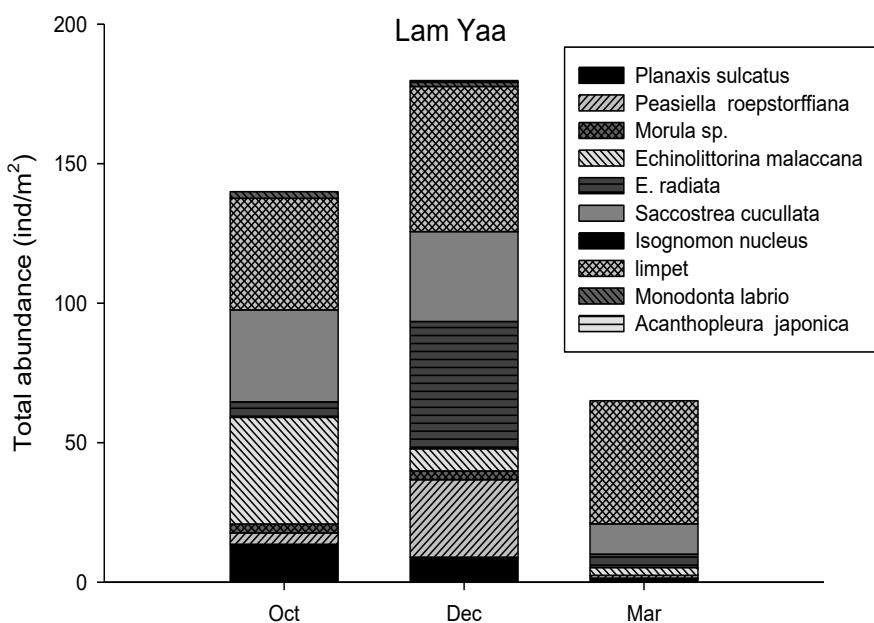
ภาพที่ 4.3 ปลาที่ตายพบบริเวณแนวน้ำลงต่ำสุดในแนวน้ำลงปานกลาง และน้ำที่ขังอยู่ในแอ่งมีสีขาวขุ่นพบหอยครองแครงตายในแอ่งหิน

4.1.2 ชนิด ความชุกชุม การแพร่กระจายและโครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดินในหาดหิน บริเวณอ่าวพร้าว และอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด

จากการศึกษาชนิด และความชุกชุมของสัตว์หน้าดินในหาดหินบริเวณอ่าวพร้าว และอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด พบสัตว์หน้าดินทั้งหมด 11 ชนิดดังแสดงในภาพที่ 4.4 สัตว์หน้าดินส่วนใหญ่เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง Phylum mollusca ในชั้น Polyplacophora (ลิ้นทะเล) Gastropoda (หอยฝาเดียว) Bivalvia (หอยสองฝา) โดยในกลุ่มหอยฝาเดียวประกอบด้วย หอยครงแครง (*P. sulcatus*) หอยมะระ (*Morula musiva*) *Peasiella repsotroffiana* และหอยจืด 2 ชนิด คือ *Echinolittorina malaccana* และ *E. radiata* หอยน้ำพริก (*Monodonta labrio*) และกลุ่มหอยฝาชี (limpet) ซึ่งอยู่ในสกุล *Cellana* กลุ่มหอยสองฝาประกอบด้วยหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) และ *Isognomon nucleus* ส่วนสัตว์ในไฟลัม Arthropoda ประกอบด้วยเพรียงจีบ (*Chthamalus squamosa*) ปูแสมหิน (*Thalamita crenata*) ปูใบ (*Eriphia sebana*) และแมลงสาบทะเล (*Ligia sp.*) (ซึ่งไม่สามารถบันทึกภาพได้) เนื่องจากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้เคลื่อนที่ได้เร็ว

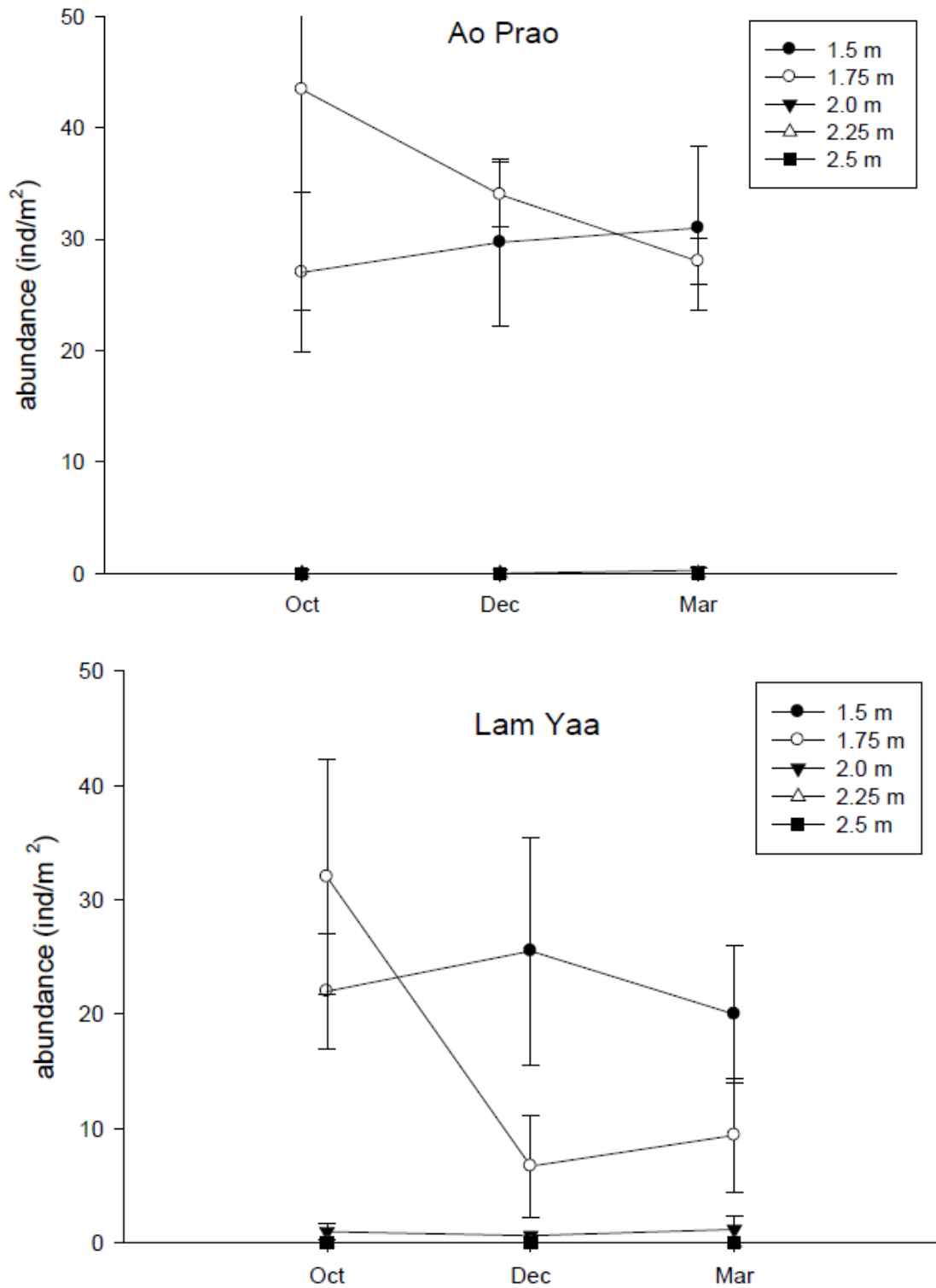
ผลการวิเคราะห์ภาพถ่ายเพื่อประเมินชนิด ความชุกชุมของสัตว์หน้าดินบริเวณอ่าวพร้าวและบริเวณหน้าอุทยานเขาแหลมหญ้า ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสัตว์หน้าดินเกาะติด (sessile organisms) และ สัตว์หน้าดินที่เคลื่อนที่ได้ช้า (mobile species) แสดงให้เห็นว่าสัตว์หน้าดินชนิดเด่น (dominant species) บริเวณอ่าวพร้าวมีความชุกชุมต่ำกว่าบริเวณหน้าอุทยานเขาแหลมหญ้า โดยเฉพาะหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) กลุ่มหอยฝาชี (limpets) และ หอยจืด (*E. malaccana*) ยกเว้นเฉพาะหอยครงแครง (*P. sulcatus*) ซึ่งบริเวณอ่าวพร้าวยังมีความชุกชุมมากกว่าบริเวณหน้าอุทยานเขาแหลมหญ้า

ความชุกชุมของสัตว์หน้าดินบริเวณอ่าวพร้าวตามช่วงเวลา แสดงให้เห็นว่าความชุกชุมมีลดลงตามระยะเวลาโดยลดลงจาก 328.10 ตัวต่อตารางเมตรในเดือนตุลาคม 2556 เป็น 182.20 และ 132.00 ตัวต่อตารางเมตรในเดือนธันวาคม 2556 และมกราคม 2557 ตามลำดับ เมื่อทดสอบความแตกต่างของความชุกชุมของสัตว์หน้าดินแต่ละครั้งในทางสถิติพบว่า ความชุกชุมของสัตว์หน้าดินในเดือนตุลาคม 2556 แตกต่างกับเดือนธันวาคม 2556 และมกราคม 2557 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยหอยครงแครงเป็นชนิดที่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญจาก 134.10 ตัวในเดือนตุลาคม 2556 เหลือเพียง 121.90 ตัวต่อตารางเมตรในเดือนมกราคม 2557 ในขณะที่ความชุกชุมที่เพิ่มขึ้นใน

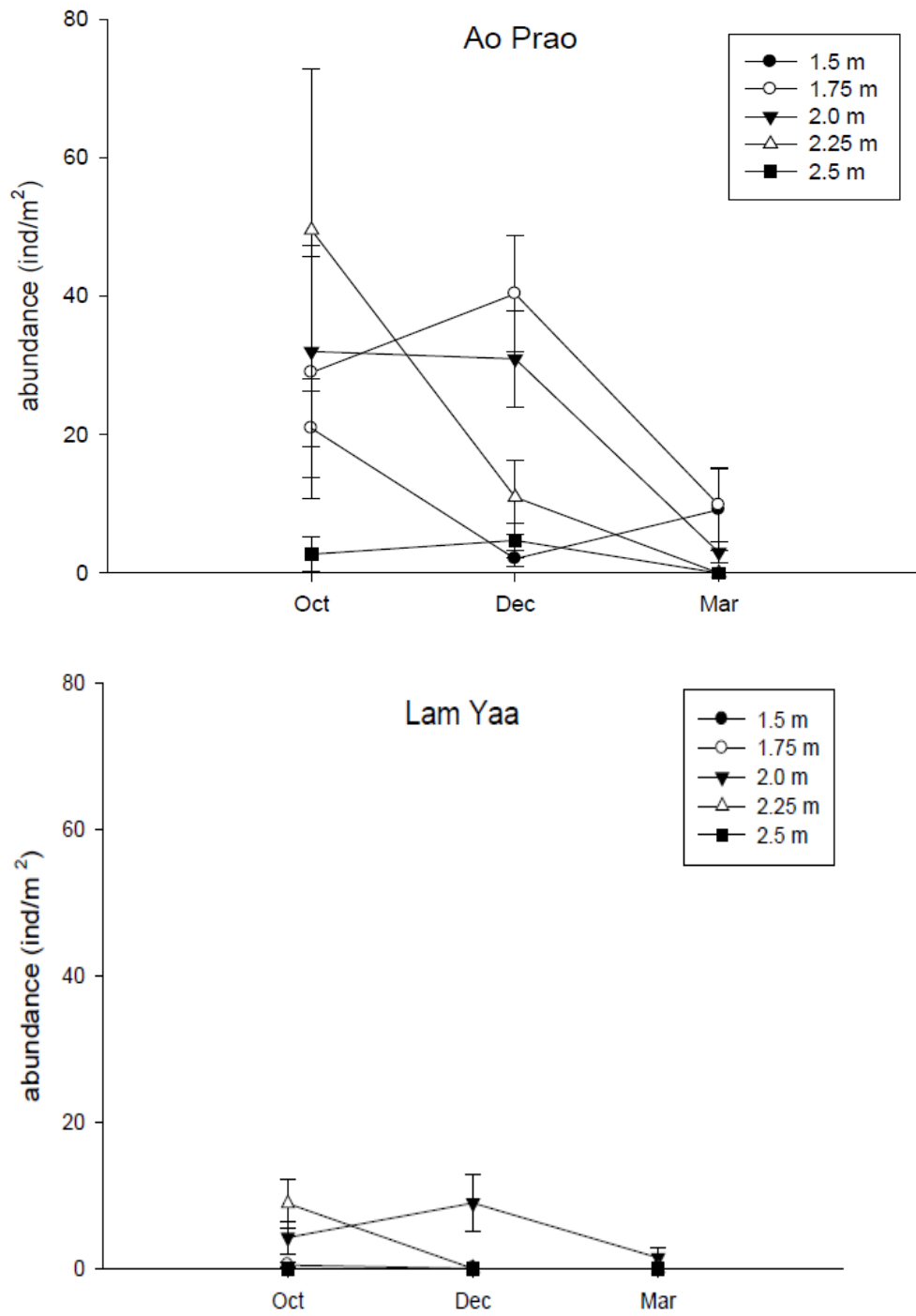


ภาพที่ 4.4 ความชุกชุมทั้งหมดของสัตว์หน้าดินในหาดหินในสองพื้นที่ศึกษา

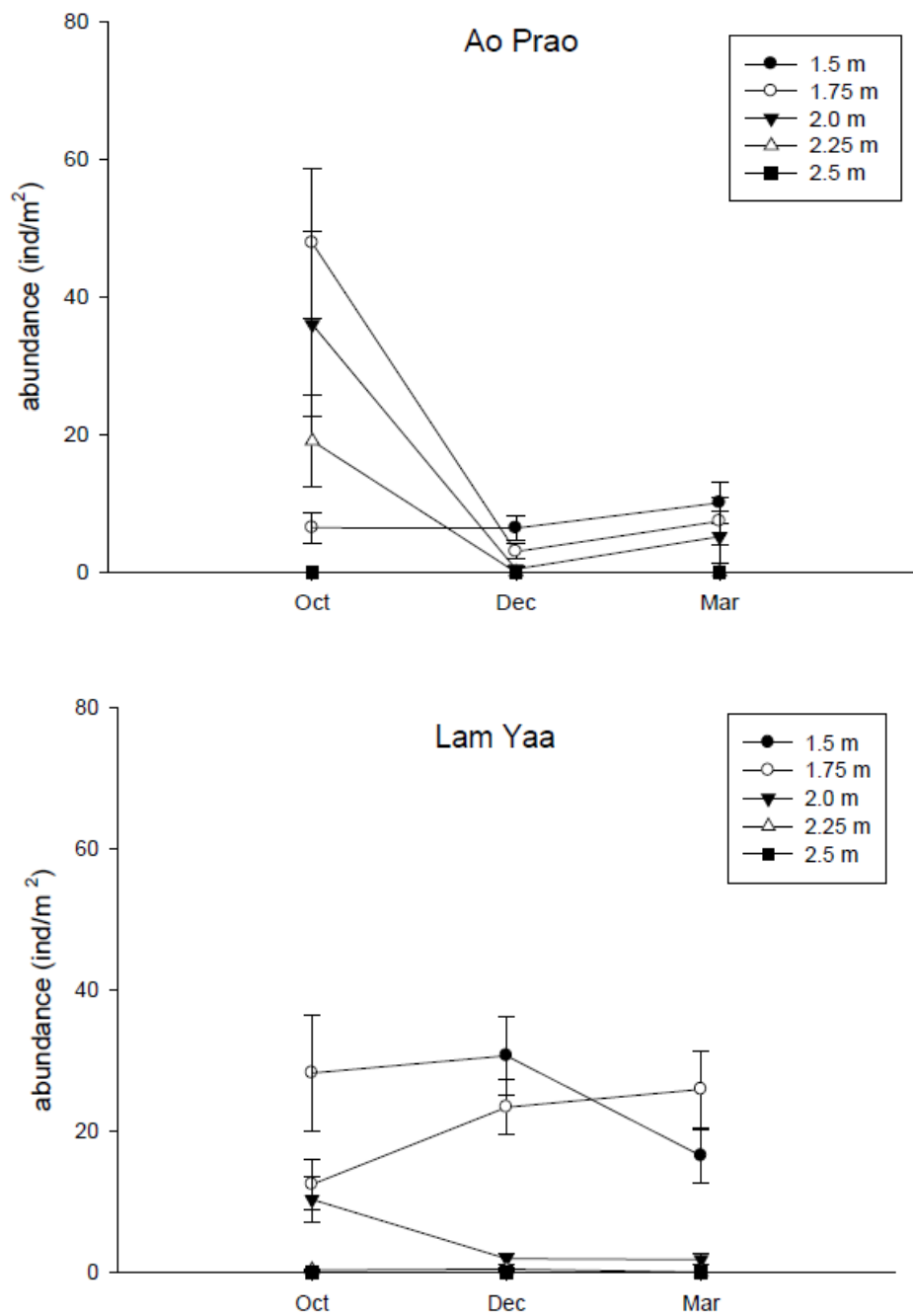
การแพร่กระจายของสัตว์หน้าดินในทั้งสองพื้นที่มีรูปแบบที่แน่นอนตามระดับน้ำในแนวตั้ง โดยเฉพาะในกลุ่มสัตว์หน้าดินชนิดเด่น หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) พบใกล้แนวน้ำลงต่ำสุดคือระหว่างระดับน้ำ 1.50 ถึง 1.75 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง (ภาพที่ 4.5) ส่วนหอยครงแครง (*P. sulcatus*) พบมากระหว่างระดับน้ำ 1.75 ถึง 2.25 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง (ภาพที่ 4.6) โดยเฉพาะในอ่าวพร้าว เช่นเดียวกับกลุ่มหอยฝาชี (ภาพที่ 4.7) และหอยมะระ (*Morula sp.*) ซึ่งเป็นผู้ล่าชนิดหนึ่งในระบบนิเวศหาดหิน (ภาพที่ 4.8) ส่วนหอยจีดา (*E. malaccana* และ *E. radiata*) เป็นสัตว์หน้าดินชนิดเด่นที่อาศัยอยู่บริเวณแนวน้ำขึ้นสูงสุด (2.50 เมตร) เหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง ข้อเท็จจริงดังกล่าวสามารถยืนยันได้เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดินทั้งสองพื้นที่โดยวิธีการ Non-Multidimensional Scaling (nMDS) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการแบ่งกลุ่มของสัตว์หน้าดินตามระดับน้ำอย่างชัดเจน โดยเฉพาะที่ระดับ 2.5 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง (ภาพที่ 4.9)



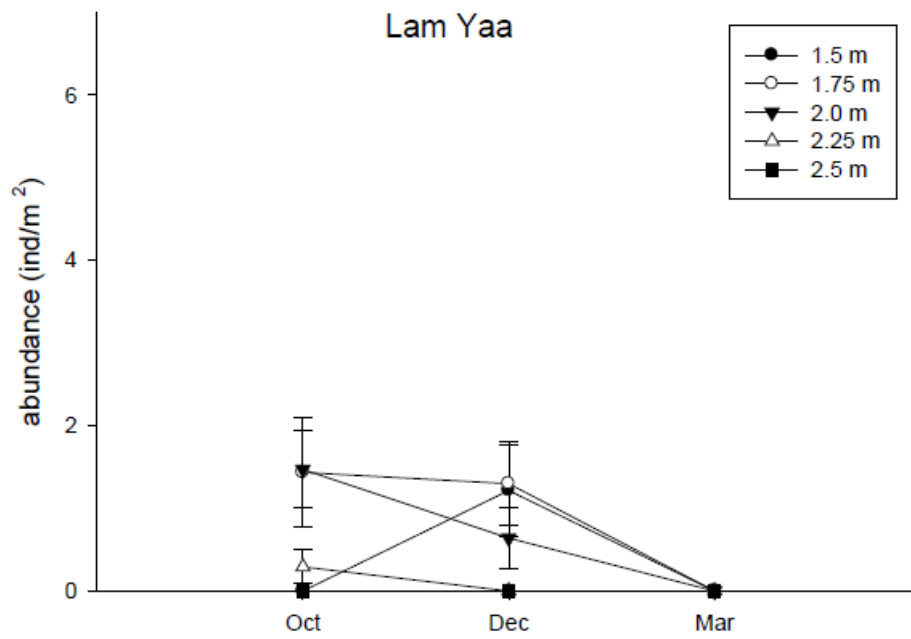
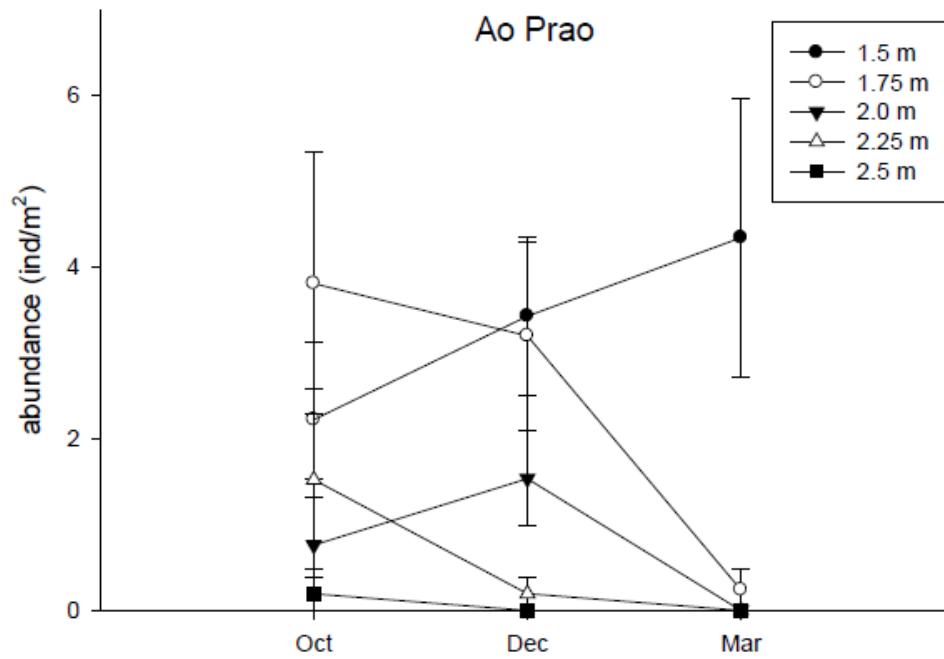
ภาพที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยความชุกชุม \pm ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ยของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ในระดับน้ำต่าง ๆ เทียบกับระดับน้ำทะเลปานกลาง



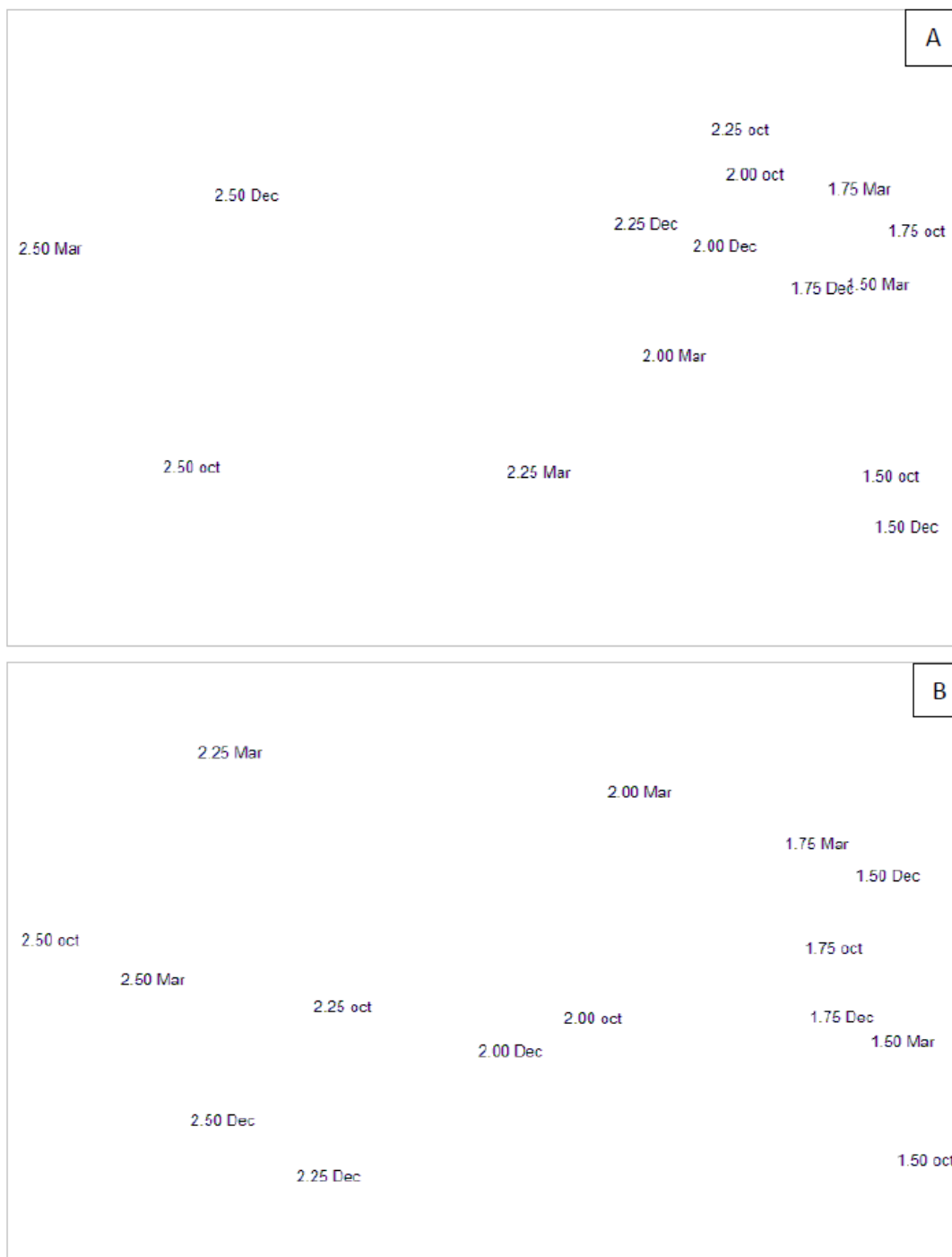
ภาพที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยความชุกชุม \pm ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ยของหอยครงแครง (*P. sulcatus*) ในระดับน้ำต่าง ๆ เทียบกับระดับน้ำทะเลปานกลาง



ภาพที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยความชุกชุม \pm ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ยของกลุ่มหอยฝาชี ในระดับน้ำต่าง ๆ เทียบกับระดับน้ำทะเลปานกลาง



ภาพที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยความชุกชุม \pm ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ยของหอยมะระ (*Morula sp.*) ในระดับน้ำต่าง ๆ เทียบกับระดับน้ำทะเลปานกลาง



ภาพที่ 4.9 Non-multidimensional Scaling (nMDS) แสดงโครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดินในหาดหินอ่าวพร้าว (A) และหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด (B)

เมื่อทำการวิเคราะห์ดัชนีความหลากหลายของสัตว์หน้าดิน ซึ่งประกอบด้วย Species Richness (d), ดัชนีความหลากหลาย (Shannon Wiener Diversity Index; H') และดัชนีความสม่ำเสมอ (Equitability Index; J) ในบริเวณทั้งสองพื้นที่ที่ศึกษาตามช่วงเวลา พบว่าในพื้นที่อ่าวพร้าวมีดัชนีความหลากหลาย (H') ของสัตว์หน้าดินในหาดหินมีค่าลดลงตามช่วงเวลา ในขณะที่ดัชนีความสม่ำเสมอ (J) มีแนวโน้มที่ลดลงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับดัชนีความหลากหลาย ส่วนในพื้นที่บริเวณหน้าทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ดพบว่า มีดัชนีความหลากหลายและดัชนีความสม่ำเสมอของสัตว์หน้าดินในหาดหินมีค่าแตกต่างกันไม่มากตามช่วงเวลาทำการเก็บข้อมูลดังแสดงดังตารางที่ 4.2

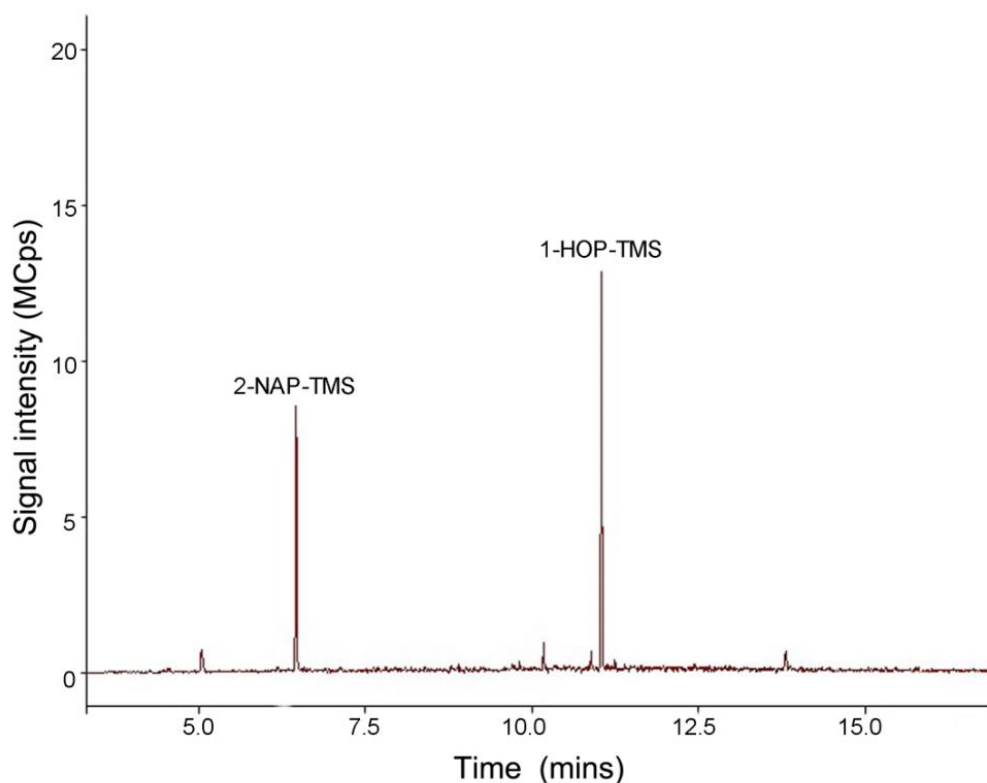
ตารางที่ 4.2 Species Richness (d), Shannon Wiener diversity index (H') และ Equitability index (J) ในพื้นที่ศึกษาตามช่วงเวลา

เดือน	อ่าวพร้าว			เขาแหลมหญ้า		
	D	H'	J'	D	H'	J'
ตุลาคม 2556	1.26	1.34	0.58	1.59	1.70	0.77
ธันวาคม 2556	1.35	0.89	0.37	1.65	1.84	0.80
มีนาคม 2557	1.13	0.55	0.25	1.09	0.85	0.44

4.2 การตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของ polycyclic aromatic hydrocarbons ในหอยที่ได้รับผลกระทบจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลบริเวณหาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง

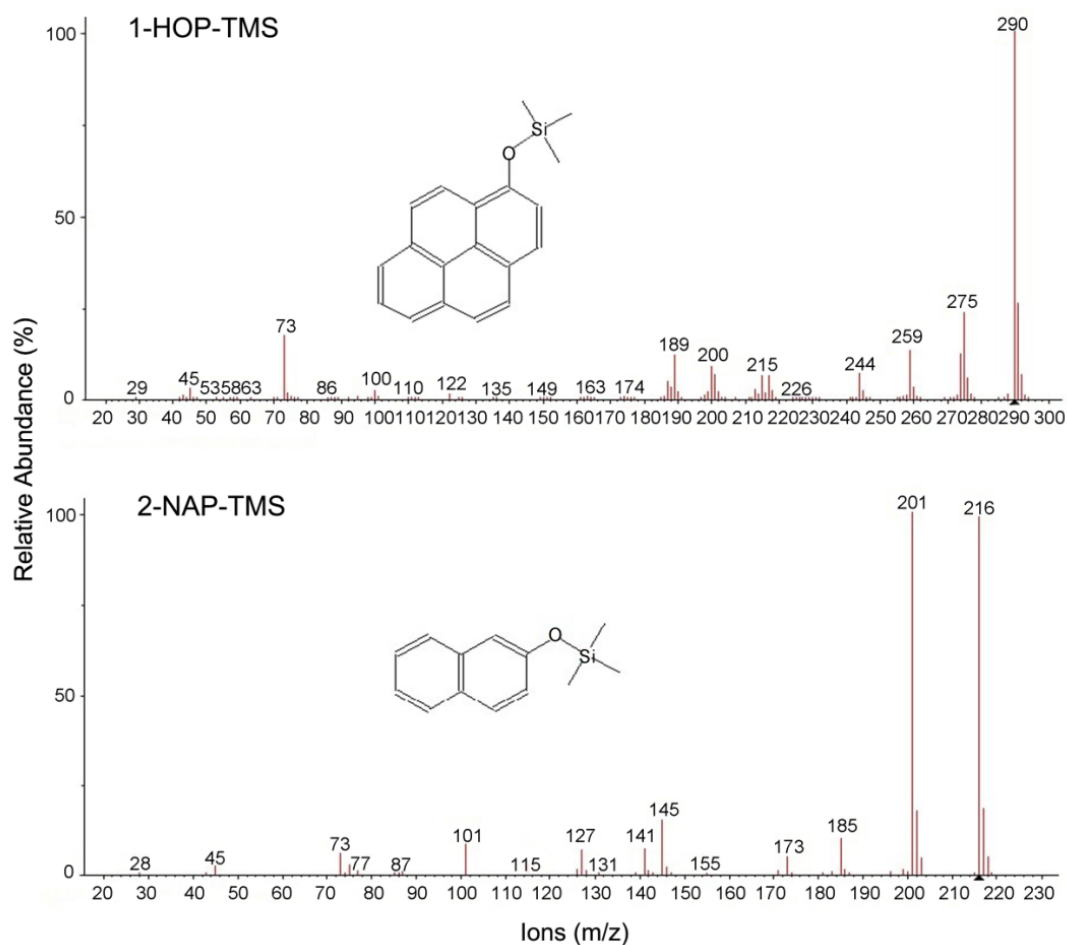
การตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ 2 ชนิดคือ 1 - Hydroxypyrene (1-HOP) และ 2 - Naphthol (2-NAP) โดยเทคนิค Gas chromatography - tandem mass spectrometry (GC - MS/MS) นั้นเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) Chromatogram ของสารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด มี peaks แยกออกจากกันอย่างชัดเจน เครื่อง GC - MS/MS แสดง Chromatogram ของสาร 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS ในลักษณะแบบสมมาตร ค่า Retention times ของสารประกอบทั้งสองชนิดที่ปรากฏใน Chromatogram แสดงค่าที่แตกต่างกัน โดยค่า Retention time สารประกอบ 1-

HOP-TMS และ 2-NAP-TMS มีค่าเท่ากับ 11.04 และ 6.50 นาทีตามลำดับ (ภาพที่ 4.10) ซึ่งช่วงเวลา
ที่ปรากฏจะเป็นลักษณะเฉพาะของสารประกอบ 1-HOP และ 2-NAP



ภาพที่ 4.10 ค่า Retention time สารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS

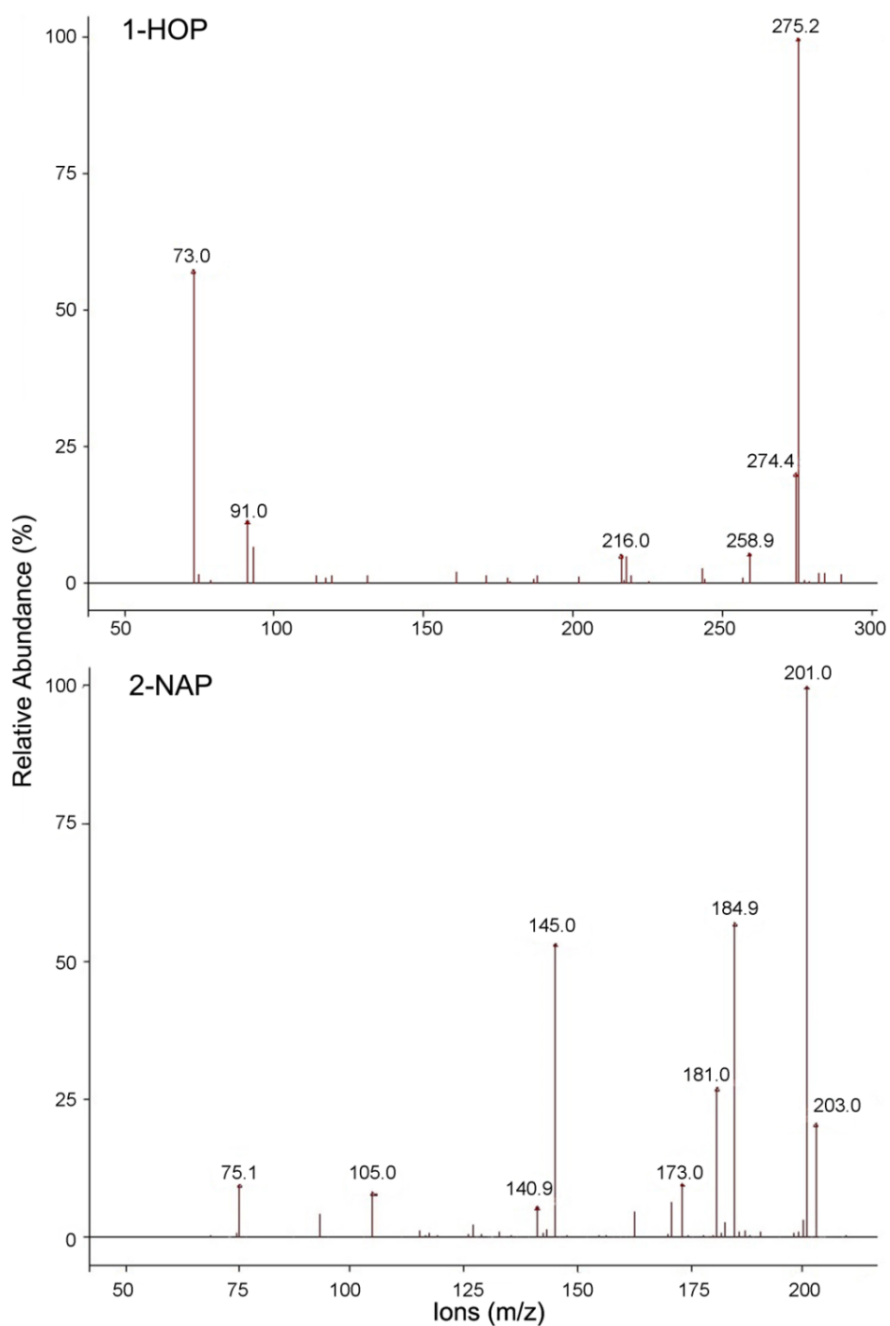
ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้โหมดตรวจสอบไอออนในโหมดตลอดช่วงมวล (Full scan) และแบบเลือกจำเพาะเจาะจง (Selected Ion Monitoring, SIM) base peak ion ของการวิเคราะห์ 1-HOP-TMS พบที่ตำแหน่ง 215, 244, 259 และ 290 ในขณะที่ 2-NAP-TMS พบที่ตำแหน่ง m/z 145, 173 และ 181 สารประกอบ 1-HOP และ 2-NAP มีส่วนประกอบของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับไซลิลได้ มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากในปฏิกิริยาการเคลื่อนที่ การเติมสารละลาย N, O - bis (trimethyl silyl) trifluoroacetamide (BSTFA) จึงเป็นการเพิ่มความไว และเพิ่มความเสถียรภาพของอนุพันธ์ได้ (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 Chromatogram ของสารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS จากเครื่อง GC - MS/MS

จากผลการวิเคราะห์พบว่า การตรวจวัดในโหมด multiple reaction monitoring (MRM) ของเครื่อง GC - MS/MS เป็นวิธีการที่สามารถบ่งชี้ถึงชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างได้แบบเฉพาะเจาะจงและให้ค่า sensitivity ที่สูง ใช้ในการพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS ได้ ชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์โดยแตกไอออนย่อย ๆ ของโมเลกุลและแสดงค่าของสเปกตรัมมวลออกมา โดยพบว่า Mass spectrum product จากการวิเคราะห์ 1-HOP-TMS พบที่ตำแหน่ง m/z 259, 274, 275 ในขณะที่ 2-NAP-TMS แสดงที่ตำแหน่ง m/z 181, 201, 203 (ภาพที่ 4.12) ไอออนโมเลกุลของ product เหล่านี้เป็น

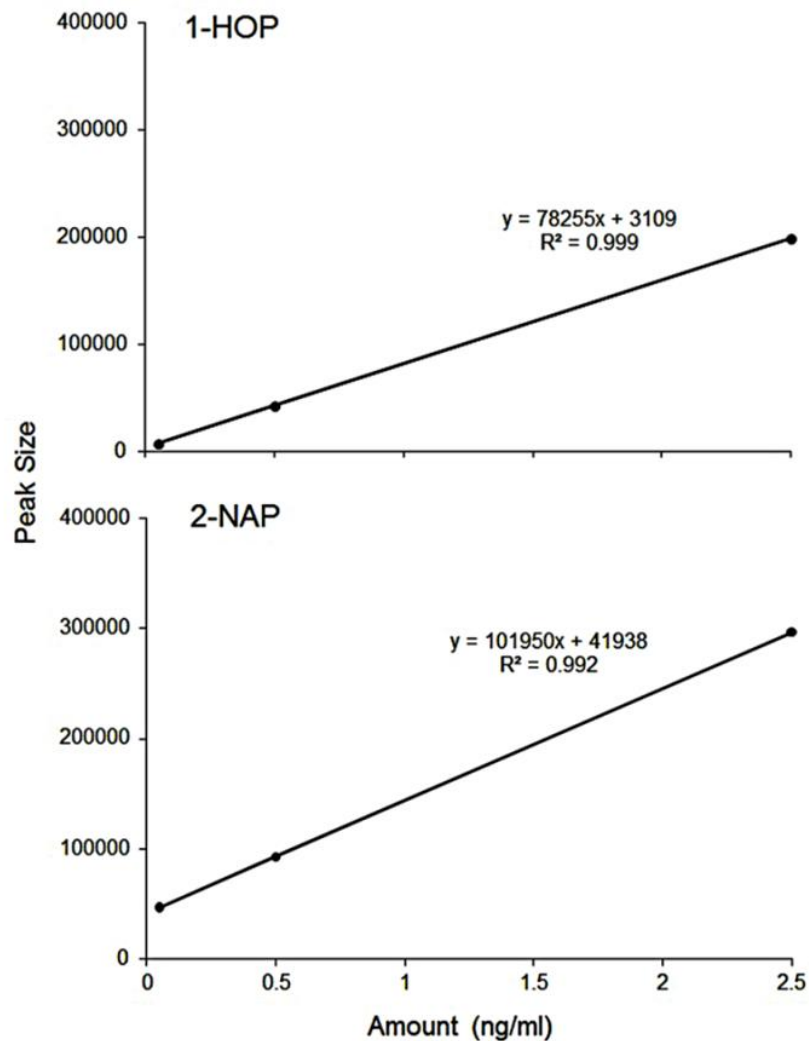
ลักษณะเฉพาะของไอออนของสารประกอบแต่ละชนิด โดย Chromatogram ของไอออนเหล่านี้จะ ถูกนำมาใช้สำหรับวิเคราะห์หาในเชิงปริมาณได้



ภาพที่ 4.12 Mass spectrum of product ของสารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS จาก เครื่อง GC - MS/MS

จากการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสารประกอบ 1-HOP และ 2-NAP ที่ ความเข้มข้น 0.05, 0.50 และ 2.50 ng/ml พบว่าสมการเชิงเส้นมีค่า $y = 78255x + 3109$ สำหรับ 1-

HOP และ $y = 101950x + 41938$ สำหรับ 2-NAP ตามลำดับและมีค่า Correlation Coefficient (r^2) หรือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.999 และ 0.992 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.13) (มีค่าเข้าใกล้ 1) แสดงให้เห็นว่าปริมาณ 1-HOP และ 2-NAP จะมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับเข้มข้นของสารมาตรฐาน อย่างเป็นสัดส่วนกัน ซึ่งการวิเคราะห์ผลนั้นจะนำ area peak ของสารแต่ละสารมาคำนวณ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งจะทำให้ทราบปริมาณสารตัวอย่าง

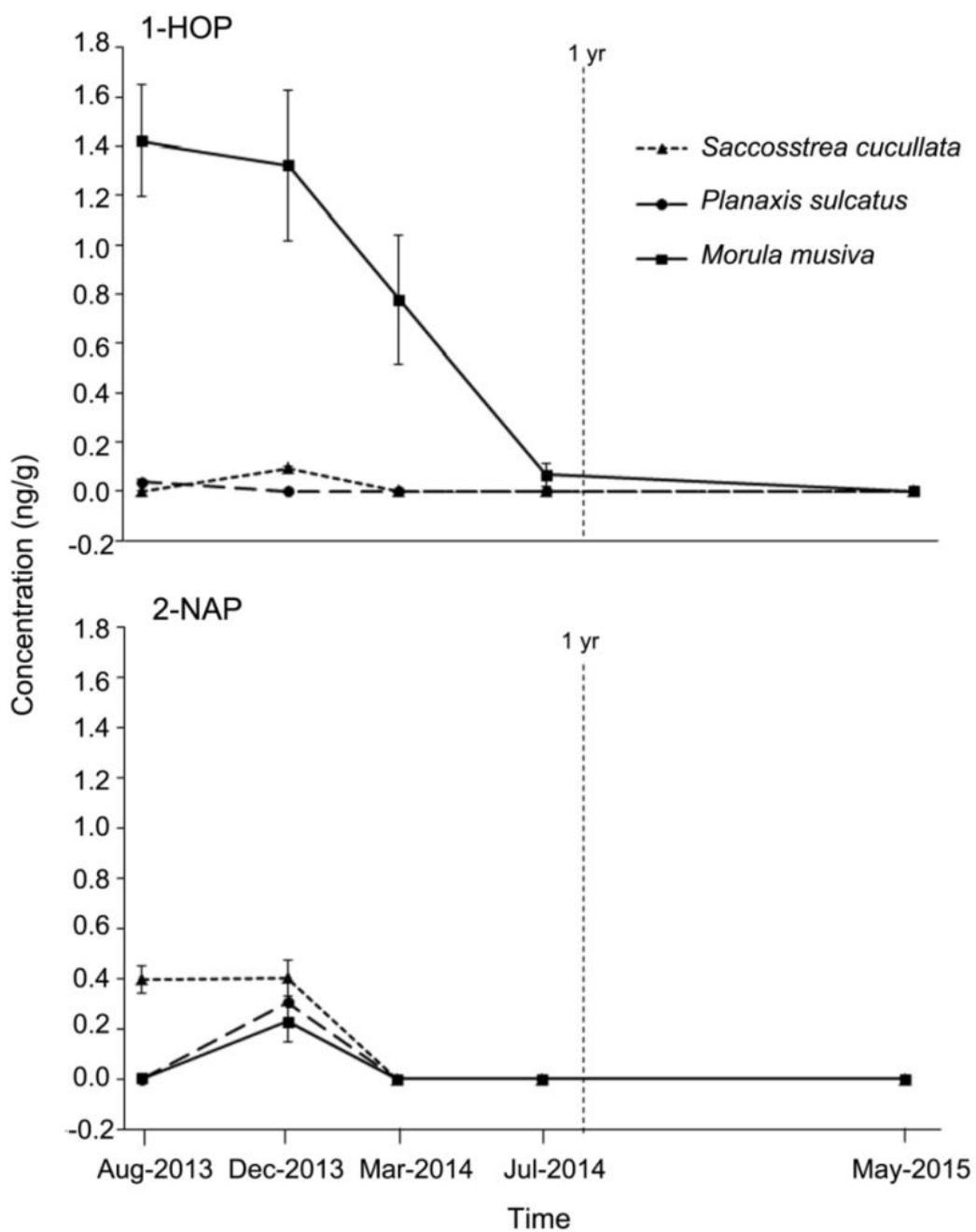


ภาพที่ 4.13 กราฟมาตรฐานของสารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS

ผลจากการวิเคราะห์ค่าดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ 2 ชนิดคือ 1-HOP และ 2-NAP ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึมของ PAHs ในหอย 3 ชนิด ซึ่งถือเป็นตัวแทนของของผู้บริโภคระดับต่าง ๆ ในระบบนิเวศหาดหินประกอบด้วย หอยครงแครง (*Planaxis sulcatus*) ซึ่งมี

พฤติกรรมการกินอาหารแบบขูดแทะ (grazer) หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) ซึ่งกินอาหารโดยการกรองกินสารแขวนลอยในมวลน้ำ (filter feeder) และ หอยมะระ (*Morula sp.*) ซึ่งเป็นผู้ล่า เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บจากหาดหินหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ดในช่วงเดือนสิงหาคม และธันวาคม ปีพ.ศ. 2556 เดือนมีนาคม และกรกฎาคม ปีพ.ศ. 2557 และเดือนพฤษภาคม ปีพ.ศ. 2558 พบ 1-HOP และ 2-NAP ในตัวอย่างหอยทุกชนิด (ภาพที่ 4.14) ซึ่งค่าความเข้มข้นของ 1-HOP และ 2-NAP ที่ตรวจพบมีค่าระหว่าง 0.039 - 1.421 และ 0.030 - 0.403 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ ระดับของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพทั้ง 2 ชนิดลดลงตามช่วงเวลาหลังเกิดเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหล ในขณะที่ตัวอย่างหอยบริเวณเขาแหลมหญ้าซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่ได้รับผลกระทบน้ำมันดิบไม่พบ 1-HOP และ 2-NAP เมื่อพิจารณาแยกตามชนิดของหอยพบว่า 1-HOP ในหอยมะระ (*Morula sp.*) ที่อ่าวพร้าวมีค่าสูงสุด (1.421 ± 0.227 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก) ในเดือนสิงหาคมปี 2556 (1 เดือนหลังจากเกิดเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหล) ในขณะที่กรองแครงและหอยนางรมปากจีบมี 1-HOP สะสมในระดับต่ำ (0.039 ± 0.009 และ 0.094 ± 0.009 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14)

ส่วน 2-NAP มีค่าสูงที่สุด (0.403 ± 0.073 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก) ในหอยนางรมปากจีบในเดือนธันวาคมปี 2556 ตามด้วยหอยกรองแครง (0.305 ± 0.076 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก) และหอยมะระ (0.227 ± 0.079 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก) ตามลำดับ โดยมีค่าลดลงตามระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งหลังจากเดือนธันวาคม 2556 ไม่พบ 2-NAP ในตัวอย่างหอยทั้งสามชนิด (ภาพที่ 4.14)



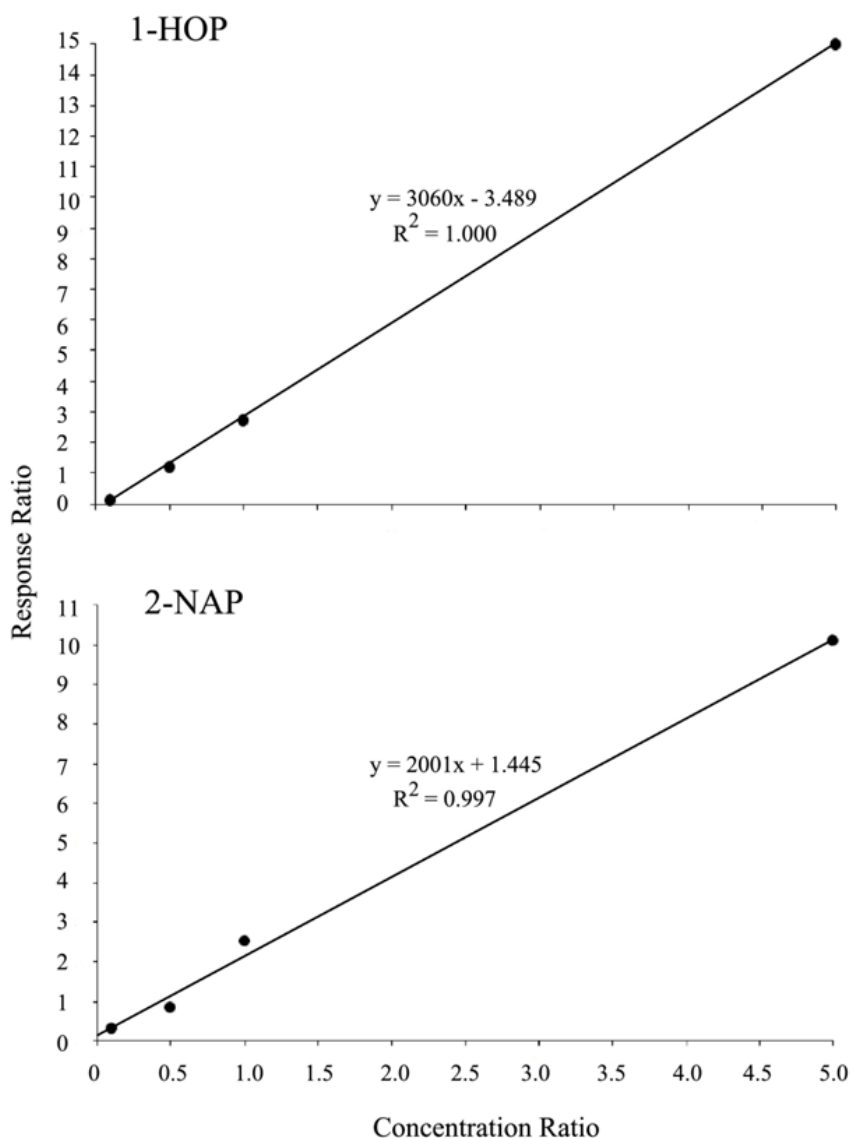
ภาพที่ 4.14 ปริมาณ 1-HOP และ 2-NAP ในเนื้อเยื่อของหอยทั้งสามชนิดที่ทำการวิเคราะห์บริเวณหาดหินอ่าวพร้าวในแต่ละช่วงเวลา

4.3 การสะสม 1-HOP และ 2-NAP ในหอยทั้ง 3 ชนิดภายใต้ระบบทดลองเสมือนจริง

การตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ 2 ชนิดคือ 1 - Hydroxypyrene (1-HOP) และ 2 - Naphthol (2-NAP) โดยเทคนิค Gas chromatography - tandem mass spectrometry (GC - MS/MS) นั้นเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) Chromatogram ของสารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด มี peaks แยกออกจากกันอย่างชัดเจน เครื่อง GC - MS/MS แสดง Chromatogram ของสาร 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS ในลักษณะแบบสมมาตร ค่า Retention times ของสารประกอบทั้งสองชนิดที่ปรากฏใน Chromatogram แสดงค่าที่แตกต่างกัน โดยค่า Retention time สารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS มีค่าเท่ากับ 11.04 และ 6.50 นาทีตามลำดับ ซึ่งช่วงเวลาที่ปรากฏจะเป็นลักษณะเฉพาะของสารประกอบ 1-HOP และ 2-NAP

ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้โหมดตรวจสอบไอออนในโหมดตลอดช่วงมวล (Full scan) และแบบเลือกจำเพาะเจาะจง (Selected Ion Monitoring, SIM) base peak ion ของการวิเคราะห์ 1-HOP-TMS พบที่ตำแหน่ง 215, 244, 259 และ 290 ในขณะที่ 2-NAP-TMS พบที่ตำแหน่ง m/z 145, 173 และ 181 สารประกอบ 1-HOP และ 2-NAP มีส่วนประกอบของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับซิลิลได้ มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากในปฏิกิริยาการเคลื่อนที่ การเติมสารละลาย N, O - bis (trimethyl silyl) trifluoroacetamide (BSTFA) จึงเป็นการเพิ่มความไวและเพิ่มเสถียรภาพของอนุพันธ์ได้ ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลที่แสดงดังในหัวข้อที่ 4.2 (ภาพที่ 4.15)

จากการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสารประกอบ 1-HOP และ 2-NAP ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.50, 1.00 และ 5.00 ng/ml พบว่าสมการเชิงเส้นคือ $y = 3060x - 3.489$ สำหรับ 1-HOP และ $y = 2001x + 1.445$ สำหรับ 2-NAP โดยมีและมีค่า Correlation Coefficient (r^2) หรือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1.000 และ 0.997 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.15)

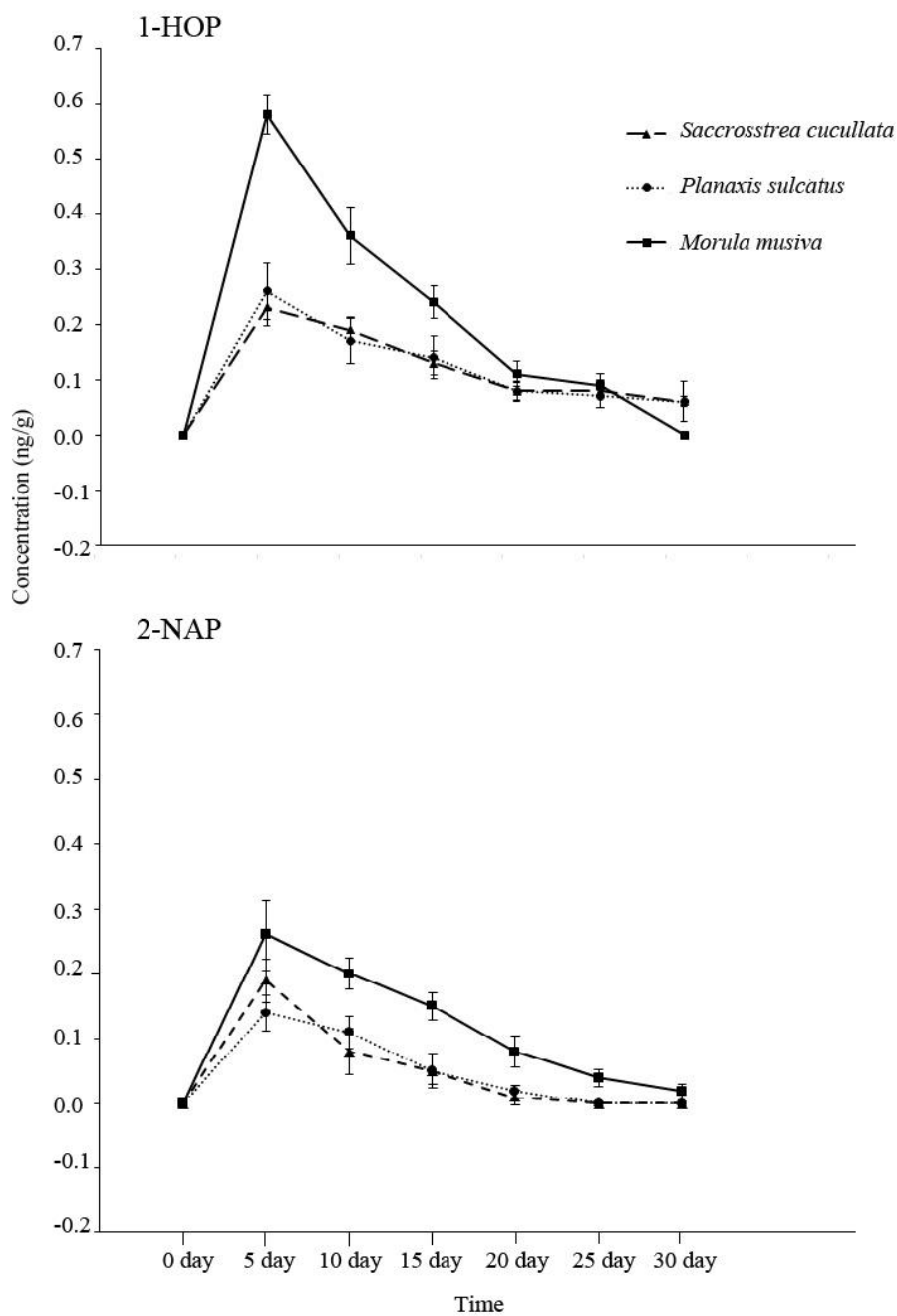


ภาพที่ 4.15 กราฟมาตรฐานของสารประกอบ 1-HOP-TMS และ 2-NAP-TMS

การตรวจวัด metabolite product ของน้ำมันดิบในสิ่งมีชีวิตซึ่งประกอบด้วย 1-HOP และ 2-NAP ในหอยที่เป็นตัวแทนผู้บริโภคลำดับต่าง ๆ ในระบบนิเวศหาดหิน ประกอบด้วย หอยครองแครง (*Planaxis sulcatus*) หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และ หอยมะระ (*Morula* sp.) เมื่อสัมผัสกับน้ำมันดิบโดยตรงเป็นเวลา 30 วัน ภายใต้ระบบทดลองเสมือนจริง ผลการตรวจวัดพบ 1-HOP และ 2-NAP ในหอย 3 ชนิด (ภาพที่ 4.16) ซึ่งปริมาณของ 1-HOP และ 2-NAP ที่ตรวจพบมีค่าระหว่าง 0.060 - 0.578 และ 0.030 - 0.258 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียกตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ที่ไม่พบ 1-HOP และ 2-NAP ในเนื้อเยื่อตัวอย่างของหอยทุกชนิดในชุดควบคุม (control) แต่ภายใต้ระบบทดลองเสมือนจริงพบ 1-HOP และ 2-NAP สะสมในหอยมะระสูงสุด (0.578 ± 0.036 และ 0.258 ± 0.054 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ) ในวันที่ 5 ของการทดลอง ในขณะที่หอยนางรมปากจีบมี 1-HOP ในเนื้อเยื่อระหว่าง 0.234 ± 0.034 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียกและหอยครงแครงมี 0.256 ± 0.051 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ซึ่งมีค่าต่ำกว่าในเนื้อเยื่อหอยมะระประมาณ 2 เท่า และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 30 พบปริมาณการสะสมของ 1-HOP ต่ำสุดในหอยมะระซึ่งมีค่าระหว่าง 0.032 ± 0.004 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ในขณะที่หอยนางรมปากจีบ มีค่าระหว่าง 0.056 ± 0.036 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียกและหอยครงแครงมี 0.056 ± 0.009 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ซึ่งพบว่าปริมาณการสะสม 1-HOP ของหอยนางรมปากจีบและหอยครงแครงในวันที่ 30 ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ (ภาพที่ 4.16)

2-NAP พบสะสมในหอยนางรมปากจีบ มีค่าระหว่าง 0.144 ± 0.034 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียกและหอยครงแครงมี 0.190 ± 0.027 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับหอยมะระพบว่าไม่แตกต่างในทางสถิติ ซึ่งหลังจากวันที่ 5 ของการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารประกอบ 1-HOP และ 2-NAP ในตัวอย่างหอยทั้งสามชนิดมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 30 (ภาพที่ 4.16)

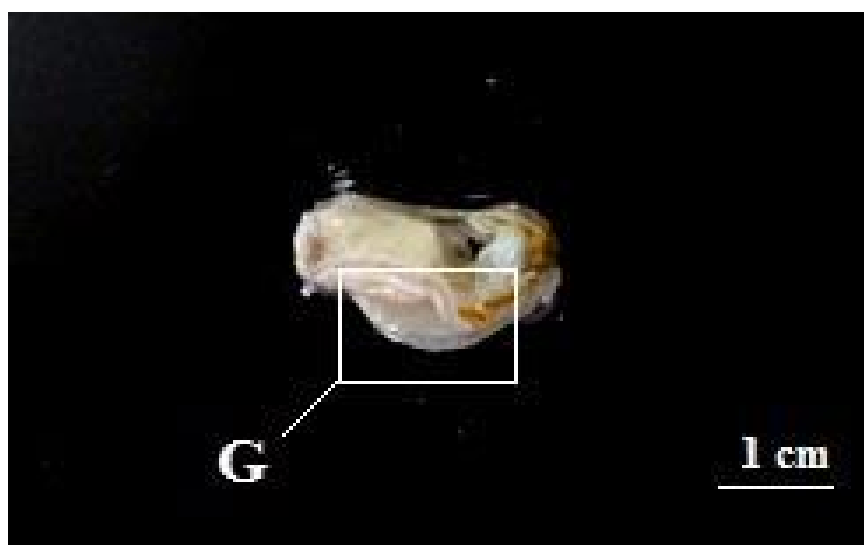


ภาพที่ 4.16 ปริมาณ 1-HOP และ 2-NAP ในเนื้อเยื่อของหอยทั้งสามชนิดภายใต้ระบบทดลองเสมือนจริงในแต่ละช่วงเวลา

4.4 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیبที่สัมพันธ์กับน้ำมันดิบ

4.4.1 โครงสร้างเหงือกของหอยนางรมปากจیب

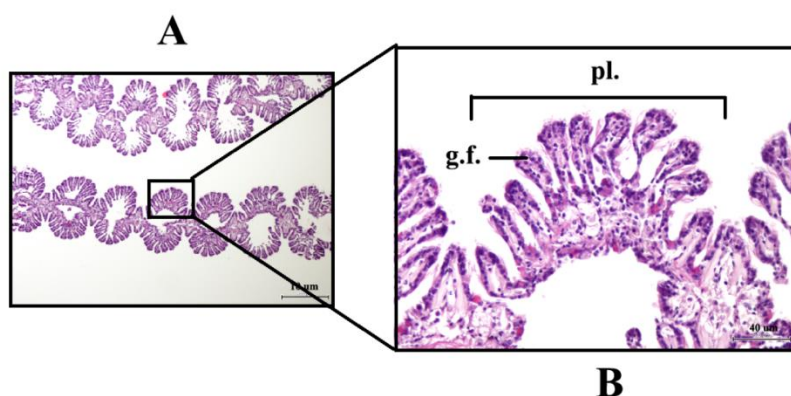
ผลการศึกษาพบว่าตำแหน่งของเหงือกจะอยู่ทางด้านท้อง (Ventral side) มีจุดเริ่มต้นตั้งแต่ ส่วนของ Labial pulps ซึ่งอยู่ใกล้ปากไปจนถึงด้านท้าย (Posterior side) ของลำตัว ซึ่งจะมีสีขาว เหลืองอ่อนตลอดทั้งแผ่นเหงือก แผ่นเหงือกแต่ละแผ่นประกอบด้วยซี่เหงือกหลายซี่ เกิดเป็นสัน กว้าง ระหว่างจیبเหงือกที่เป็นร่องลงไปกลายเป็นซี่เหงือกหลัก (Principle filament) เรียงซ้อนกัน ตามแนวตั้งเริ่มจากด้านหน้าไปยังด้านหลังลำตัวตามความยาวของเหงือก ซี่เหงือกหลักจะม้วนพับ กลายเป็นจیب เรียกลักษณะเหงือกแบบจیب (Plaited ctenidia) และมีเนื้อเยื่อเชื่อมซี่เหงือก (Interlamellar junction) อยู่หลายตอนดังแสดงในภาพที่ 4.17



ภาพที่ 4.17 สัณฐานวิทยาของหอยนางรมปากจیب *Saccostrea cucullata* แสดงตำแหน่งที่ตัดชิ้นเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (G = gill)

4.4.2 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกหอยนางรมปากจیب

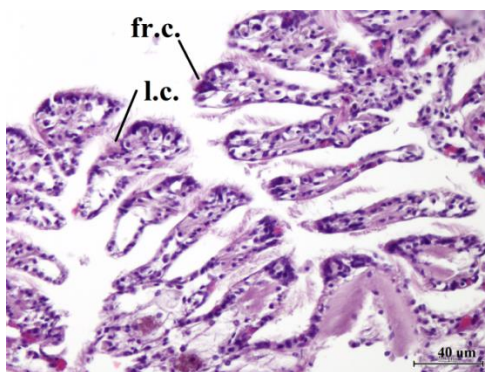
เหงือกของหอยนางรมปากจیبมีโครงสร้างแบบ Pseudolamellibranch ซึ่งประกอบด้วยแผ่นเหงือก (Lamella) 4 แผ่น หรือ 2 คู่ ด้านซ้ายและด้านขวาอย่างละคู่ โดยเหงือกแต่ละคู่มีจุดกำเนิดจากแกนเหงือกบริเวณด้านท้องทั้งทางด้านซ้ายและขวาของลำตัว 2 ตำแหน่ง แต่ละตำแหน่งจะมีแผ่นเหงือกเจริญออกมาสองแผ่นคือแผ่นเหงือกด้านนอก (Outer lamella) และแผ่นเหงือกด้านใน (Inner lamella) โครงสร้างเหงือกประกอบด้วยท่อน้ำขนาดใหญ่มีตำแหน่งทางด้านหน้าเฉียงไปทางด้านหลังของลำตัว (Anterodorsal side) เรียกท่อน้ำใหญ่นี้ว่า Promyal chamber แยกแขนงออกทางด้านข้างลำตัวทั้งซ้ายและขวา (Right epibranchial chamber และ Left epibranchial chamber) พบ Cloaca ตั้งอยู่ทางด้านท้ายของลำตัว หอยนางรมมีระบบเลือดแบบเปิด เลือดที่ออกจากหัวใจจะไหลเข้าสู่แองเกลียดเพื่อนำอาหารและก๊าซออกซิเจนไปเลี้ยงอวัยวะ โครงสร้างของแผ่นเหงือกเมื่อตัดตามขวางพบว่าซี่เหงือกหลัก ของหอยนางรมปากจیبมีการม้วนพับเป็นจีบมีลักษณะคล้ายใบไม้ ซึ่งเรียกว่า Plica ดังแสดงในภาพที่ 4.18 แต่ละ Plica ประกอบด้วยซี่เหงือกย่อย (Gill filament) ซึ่งเป็นกลุ่มของท่อน้ำขนาดเล็กที่เกิดจากการม้วนตัวของซี่เหงือกหลักจำนวน 12 - 14 ท่อ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการแลกเปลี่ยนก๊าซ



ภาพที่ 4.18 เนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจیب *S. cucullata*

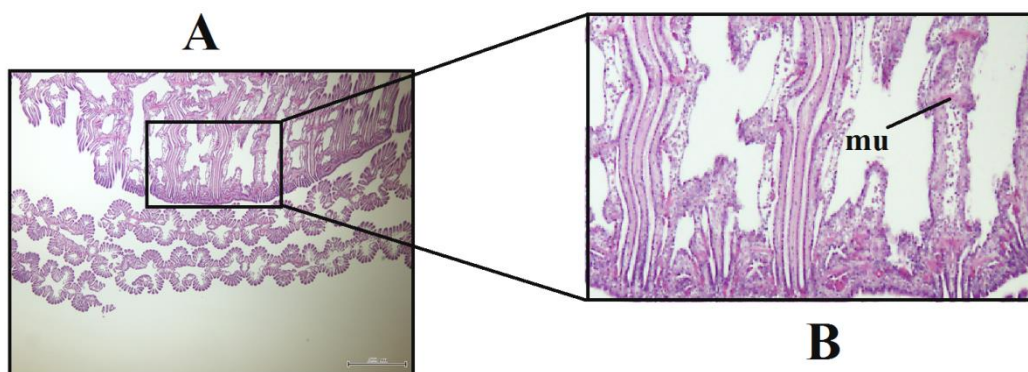
A; เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกหอยนางรม B; โครงสร้างของ Plica ที่เกิดจากการพับของซี่เหงือกหลัก (Principle filament = pl.) กลายเป็นซี่เหงือกย่อย (Gill filament = g.f.) รวมกันเป็นจีบมีลักษณะคล้ายใบไม้

เนื้อเยื่อที่พบในซี่เหงือกย่อย ประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชนิด Ciliated cuboidal epithelium ซึ่งมีลักษณะคล้ายเป็นเยื่อบุผิวชั้นเดียวพบเซลล์รูปทรงคล้ายลูกเต๋าตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (Basement membrane) บริเวณซี่เหงือกย่อยนี้สามารถพบ cilia ที่ผิวด้านนอกด้านที่สัมผัสกับน้ำทะเลสองแบบได้แก่ Laterofrontal cilia คือ cilia ที่อยู่ด้านข้างซี่เหงือกย่อย มีลักษณะค่อนข้างยาว และอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และ Frontal cilia เป็นซิเลียที่มีตำแหน่งอยู่ทางด้านหน้าของซี่เหงือกย่อย เป็นซิเลียที่กระจัดกระจายไม่รวมเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.19 โครงสร้างของซี่เหงือกย่อย Gill filament ของเหงือกหอยนางรมปากจیب (fr.c.คือ frontal cilia, l.c. คือ laterofrontal cilia)

นอกจากนี้ภายในซี่เหงือกย่อยแต่ละอันยังมีลักษณะเป็นแฉ่งเลือดสำหรับให้เลือดไหลเวียนผ่านเหงือกเกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซ เซลล์เม็ดเลือดมีลักษณะเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลม และมีไซโทพลาซึมล้อมรอบและพบในพื้นที่ว่างของแฉ่งเลือด บริเวณฐานของ Plica พบ โครงสร้างแฉ่งเลือดขนาดใหญ่ (Blood space) และพบ Chitinous rod ที่มีลักษณะคล้ายกระดูกอ่อนรองรับบริเวณฐานของ Plica เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้แก่เหงือก ภายในเชื่อมต่อระหว่างซี่เหงือกหลัก (Interlamellar junction) จะพบก้ามเนื้อแทรกอยู่ (ภาพที่ 4.20)



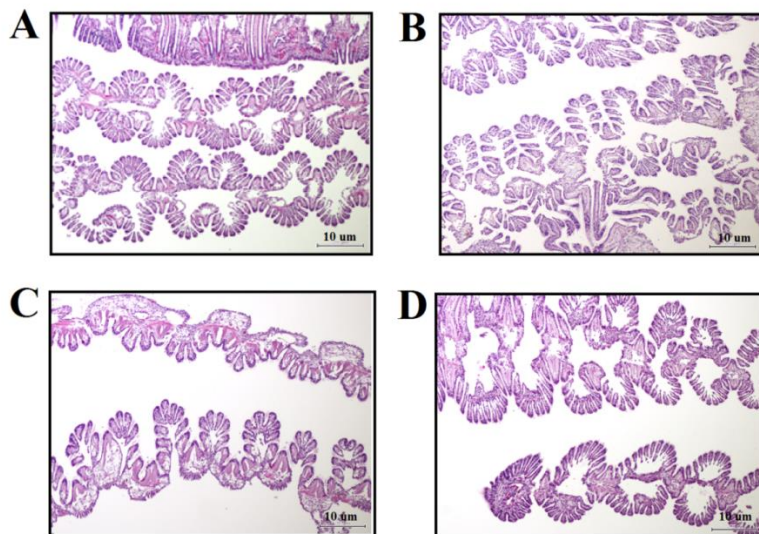
ภาพที่ 4.20 โครงสร้าง interprinciple junction ที่เชื่อมระหว่างแผ่นเหงือกของหอยนางรมปากจیب

A; ภาพตัดจากส่วนด้านหัว - ท้าย (anterior – posterior section) กำลังขยาย 4 เท่า

B; ภาพขยาย interprinciple junction ที่เชื่อมแผ่นเหงือก (mu. = muscle)

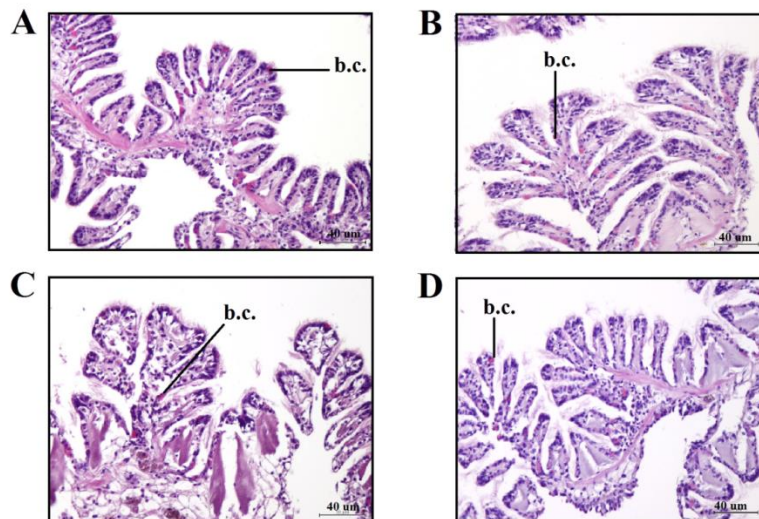
4.4.3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیبที่ได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมัน

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیبที่ได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมัน พบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیبที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันในวันที่ 10, 20 และ 30 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อตัวอย่างหอยในกลุ่มที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนจากน้ำมันดิบและกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมัน ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.21) เนื้อเยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อเหงือกเป็นแบบ Ciliated cuboidal epithelium พบ cilia ที่ผิวด้านนอกของซี่เหงือกย่อย ภายในซี่เหงือกย่อยแต่ละอันพบเซลล์เม็ดเลือดมีลักษณะเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมและมีไมโทพลาซิมล้อมรอบ (ภาพที่ 4.21) ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 4.4.2



ภาพที่ 4.21 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกหอยนางรมปากจیب กำลังขยาย 10 เท่า

- A; หอยนางรมกลุ่มที่ไม่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ (control)
 B; หอยนางรมกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ 10 วัน
 C; หอยนางรมกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ 20 วัน
 D; หอยนางรมกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ 30 วัน



ภาพที่ 4.22 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกหอยนางรมปากจیب กำลังขยาย 40 เท่า

- (b.c. = blood cells)
 A; หอยนางรมกลุ่มที่ไม่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ (control)
 B; หอยนางรมกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ 10 วัน
 C; หอยนางรมกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ 20 วัน
 D; หอยนางรมกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ 30 วัน

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การฟื้นตัวและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนของสัตว์ทะเลหน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง ภายหลังจากอุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหล

ระดับความรุนแรงจากการรั่วไหลของน้ำมันดิบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมทางทะเลขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ลักษณะทางกายภาพของพื้นที่ สภาพอากาศและฤดูกาล และประสิทธิภาพของการสารกำจัดคราบน้ำมันที่ใช้ เป็นต้น มลพิษจากน้ำมันดิบจะส่งผลกระทบต่อทั้งระยะสั้นและระยะยาวต่อชนิด ความชุกชุมและโครงสร้างชุมชนของสิ่งมีชีวิตถึงแม้ว่าปริมาณของน้ำมันที่มีการปนเปื้อนจะมีปริมาณเล็กน้อยก็ตาม (Fartoosi, 2013) ซึ่งมลพิษน้ำมันที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะส่งผลกระทบต่อปลาได้โดยตรงและทางอ้อมซึ่งผ่านทางระบบนิเวศได้ ในขณะที่สิ่งมีชีวิตหน้าดินจะได้รับผลกระทบจากการรั่วไหลของน้ำมันมากกว่าปลา เนื่องจากอาศัยอยู่บริเวณหน้าดินซึ่งเป็นแหล่งสะสมและปนเปื้อนของน้ำมันที่มีการจมตัวลงหลังจากที่มีการแพร่กระจาย (Fartoosi, 2013) โดยสิ่งมีชีวิตหน้าดินจะได้รับการปนเปื้อนน้ำมันได้จากการสัมผัสกับน้ำมันโดยตรง การปนเปื้อนผ่านอาหาร หรือทางอ้อมโดยผ่านสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ง่าย ซึ่งมีน้ำหนักเบา ลอยอยู่ผิวน้ำหน้า โดยสัตว์หน้าดินจะได้รับสารกลุ่มนี้ได้โดยการสัมผัสในช่วงระยะเวลาที่น้ำลง ทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารพิษเข้าสู่ร่างกาย (volatile components) (Bertrand and Hare, 2017)

จากการสำรวจชนิด ความชุกชุม และโครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดินบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินของอ่าวพร้าว เกาะเสม็ดในเดือนตุลาคม ธันวาคม 2556 และ มีนาคม 2557 ภายหลังจากเหตุการณ์ที่ส่งน้ำมันดิบรั่วไหลระหว่างการขนถ่ายน้ำมัน จากเรือขนถ่ายน้ำมันไปยังโรงกลั่นบริเวณทุ่นรับของ โรงกลั่นน้ำมันบริษัท พีพีที โกลบอล เคมิคอล จำกัด (มหาชน) เมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม 2556 แสดงให้เห็นว่าชนิดของสัตว์หน้าดินไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับ

บริเวณที่ไม่ได้รับผลกระทบ คือ หาดหินหน้าอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด แต่ความชุกชุมของสัตว์หน้าดินในหาดหินของอ่าวพร้าวมีแนวโน้มลดลงตามช่วงเวลา จากการศึกษาของ Samakraman *et al* (2010) ซึ่งได้ทำการสำรวจชนิด การแพร่กระจาย และโครงสร้างชุมชนของมอลลัสก์ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินบริเวณใกล้อ่าวอัญญาณ์ อำเภอกะลาสิขัง จังหวัดชลบุรี เป็นเวลา 24 เดือน พบจำนวนชนิดของสัตว์หน้าดินในไฟลัมมอลลัสกาใกล้เคียงกับในการศึกษาคั้งนี้ โดยความชุกชุมของหอยครองแครง (*Planaxis sulcatus*) ซึ่งเป็นสัตว์หน้าดินชนิดเด่น (dominant species) เพิ่มขึ้นตั้งแต่เดือนธันวาคมและมกราคม ส่วนหอยนางรมปากจีบมีความชุกชุมเพิ่มขึ้นในเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคมและธันวาคม หากเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในคั้งนี้ซึ่งความชุกชุมของหอยทั้งสองชนิดที่มีแนวโน้มลดลงตามช่วงเวลา อาจสันนิษฐานได้ว่าพื้นที่ที่หาดหินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของอ่าวพร้าวซึ่งได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบทำให้สัตว์หน้าดินที่อาศัยในพื้นที่ดังกล่าวค่อย ๆ ลดจำนวนลง Nagelkerken and Debrot (1995) รายงานว่าชนิด และความชุกชุมของมอลลัสก์ที่อาศัยอยู่ในหาดหินของเกาะ Curacao บริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของทะเลแคริบเบียน ซึ่งได้รับผลกระทบจากคราบน้ำมันจะลดลง โดยเฉพาะกลุ่มที่อาศัยในเขตน้ำลงปานกลางและใกล้เขตน้ำลงต่ำสุด เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากคราบน้ำมันที่ปกคลุมพื้นที่มากกว่า ซึ่ง Schlacher *r et al.* (2011) รายงานว่าสัตว์หน้าดินที่อาศัยใกล้แนวน้ำลงต่ำสุดของหาดหินมีโอกาสสัมผัสกับน้ำมันได้โดยตรงเมื่อน้ำมันเข้ามาในพื้นที่ ส่งผลกระทบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างการชุมชน รวมถึงความหนาแน่นและความหลากหลายลดลง ในขณะที่สัตว์หน้าดินอาศัยอยู่บริเวณแนวน้ำลงปานกลางและเหนือระดับน้ำทะเลปานกลางขึ้นไป สามารถเคลื่อนที่หรือหลบหนีจากบริเวณที่ปนเปื้อนโดยไม่ได้รับการสัมผัสกับน้ำมันได้ ส่วนหอยจีดา (วงศ์ littorinidae) ซึ่งอาศัยอยู่ใกล้แนวน้ำขึ้นสูงสุดมีความชุกชุมเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าน้ำมันดิบที่เข้ามาในพื้นที่อาจไม่ทำให้เกิดการตายโดยทันที การทดแทนที่ (recruitment) หรือการฟื้นตัว (recovery) ของสัตว์หน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงหาดหินในพื้นที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ อาจต้องใช้เวลาอย่างน้อยที่สุด 2 - 3 ปี ขึ้นอยู่กับปริมาณคราบน้ำมันที่ปกคลุมผิวหิน ระยะเวลาที่ได้รับผลกระทบ วงชีวิตของสัตว์หน้าดินแต่ละชนิด และความสามารถในการเคลื่อนที่ของสัตว์หน้าดิน (Yamamoto *et al.*, 2003) โดยพบว่าการฟื้นตัวของสัตว์หน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงหาดหินในพื้นที่ที่มีการกระทำของคลื่นจะมีการฟื้นตัวที่เร็วกว่าสัตว์หน้าดินในเขตน้ำขึ้นน้ำลงหาดหินในพื้นที่ในเขตกำบัง เนื่องจากการกระทำของคลื่นจะกำจัดคราบน้ำมันที่มีการสัมผัสกับพื้นที่และสิ่งมีชีวิต

เมื่อเปรียบเทียบความชุกชุมเฉลี่ยของสัตว์หน้าดิน โดยรวมในสองพื้นที่พบว่า พบว่าความชุกชุมของสัตว์หน้าดินในอ่าวพร้าวสูงกว่าหาดหินหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของหาดหินบริเวณอ่าวพร้าวเป็นแบบ rubble and boulder shore ซึ่งเป็นก้อนหินขนาดต่าง ๆ อยู่ร่วมกันทำให้เกิดซอก หลืบ หรือโพรงเอื้ออำนวยต่อการอยู่อาศัยของสัตว์หน้าดิน ในขณะที่หาดหินบริเวณหน้าที่ทำงานอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด ส่วนใหญ่เป็นลานหินเรียบ มีก้อนหินอยู่น้อย จึงทำให้มีสัตว์หน้าดินอาศัยอยู่น้อยกว่า

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของสัตว์หน้าดิน ซึ่งประกอบด้วย Species Richness (d), ดัชนีความหลากหลาย (Shannon Wiener Diversity Index; H) และดัชนีความสม่ำเสมอ (Equitability Index; J) ในทั้งสองพื้นที่ศึกษาตามช่วงเวลา พบว่าในพื้นที่อ่าวพร้าว มีดัชนีความหลากหลาย (H') ของสัตว์หน้าดินในหาดหินมีค่าลดลงตามช่วงเวลา ส่วนดัชนีความสม่ำเสมอ (J) มีแนวโน้มที่ลดลงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ ดัชนีความหลากหลาย (H') แสดงให้เห็นว่าการที่คราบน้ำมันปกคลุมพื้นที่บริเวณเขตนํ้าขึ้นน้ำลงนั้นจะส่งผลกระทบต่อความชุกชุมและดัชนีความหลากหลายลดลง (Samakraman *et al*, 2012) และเมื่อพิจารณาในพื้นที่หาดหินบริเวณหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ดพบว่า มีดัชนีความหลากหลาย (H') และดัชนีความสม่ำเสมอของสัตว์หน้าดินมีค่าแตกต่างกันไม่มากตามช่วงเวลาทำการเก็บข้อมูล

5.2 การตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของ PAHs ในหอย เขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง

เมื่อมีการแพร่กระจายหรือเกิดการปนเปื้อนของน้ำมันในสิ่งแวดล้อม หอยเป็นสัตว์หน้าดินที่มีสามารถรับและสะสมไฮโดรคาร์บอนในตัวได้มากและยาวนานกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจากหอยจัดเป็นสิ่งมีชีวิตในไฟลัมมอลลัสกา ซึ่งหอยบางชนิดไม่มีเอนไซม์ mixed-function oxidase ในร่างกาย ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ในการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย โดยจะทำการเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของโมเลกุลของสารพิษ (ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน) เพื่อให้

สารพิษมีสารประกอบที่มีขั้วเพิ่มขึ้น ทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีขึ้น ส่งผลให้มีการขับสารพิษออกจากร่างกายได้ง่าย

เมื่อสารประกอบ PAHs เข้าสู่สิ่งแวดล้อมทางทะเล สารประกอบกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะระเหยไปก่อน จากนั้นจะแตกออกเป็นอนุภาคขนาดเล็กและจมลงสู่พื้นทะเล (Yender *et al.*, 2002) สารประกอบบางส่วนยึดเกาะกับสารแขวนลอยแล้วตกตะกอน ในขณะที่สารประกอบที่มีการเคลื่อนเข้าสู่เขตน้ำขึ้นน้ำลงจะมีการสะสมอยู่ในบริเวณพื้นทะเลตั้งแต่เขตน้ำขึ้นน้ำลงในระยะหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาติดตามและตรวจสอบพิษของ PAHs ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตทั้งในระยะสั้นและระยะยาว มักนิยมใช้สัตว์หน้าดินโดยเฉพาะในฟิแลมมอลัสกาเป็นตัวแทน (Cardellicchio *et al.*, 2007) 1-Hydroxypyrene (1-HOP) และ 2-Naphthol (2-NAP) นิยมใช้เป็นดัชนีทางชีวภาพ (biomarker) เนื่องจาก Pyrene และ Naphthalene เป็นสารประกอบที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของ PAHs เมื่อสิ่งมีชีวิตกลุ่ม eukaryotic organism เมตาบอลิซึม PAHs ผ่านกระบวนการ biotransformation จะเปลี่ยน pyrene และ naphthalene เป็น 1-HOP และ 2-NAP ตามลำดับ และจะสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (Lim and Shin, 2013) ซึ่งสารประกอบทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นสารอันตรายเนื่องจากเมื่อมีการปนเปื้อนสามารถกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมได้ยาก (Pengchai *et al.*, 2009; Wills *et al.*, 2010) และถือว่าเป็นสารมลพิษที่มีความสำคัญในระบบนิเวศทางน้ำ อาจทำให้เกิดมะเร็งในสิ่งมีชีวิตได้ นอกจากนี้สารประกอบทั้งสองชนิดนับว่าเป็นสารประกอบที่มีปริมาณมากในน้ำมันดิบ การใช้ 1-HOP และ 2-NAP เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิตที่มีการปนเปื้อนมลพิษจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสารเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณการสะสมของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสัตว์ทะเลได้ (Jongeneelen, 2001) ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบปริมาณการสะสมของ 1-HOP มากกว่า 2-NAP ในหอยทั้ง 3 ชนิด ทั้งนี้เนื่องจาก 2-NAP ซึ่งได้จากการเมตาบอลิซึม naphthalene เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จึงมีความสามารถในการละลายน้ำและระเหยได้ดีทำให้การเสื่อมสภาพในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตลดลงอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว (Boitsov *et al.*, 2009) ในขณะเดียวกัน 1-HOP ซึ่งได้จากการเมตาบอลิซึม pyrene มีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร ละลายน้ำได้น้อยมาก จึงทำให้ทนทานต่อการย่อยสลาย (Trzesicka-Mlynarz and Ward 1996; Verschueren, 1997) เมื่อมีการปนเปื้อนของน้ำมันดิบ ทำให้สารประกอบ pyrene สะสมและมีความเสถียรอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน (Aronstein *et al.*, 1991)

การสะสมของ PAHs ในหอยสามชนิดซึ่งประกอบด้วย หอยครงแครง (*Planaxis sulcatus*) หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และ หอยมะระ (*Morula musiva*) พบการสะสมของสารประกอบ 1-HOP และ 2-NAP ในหอยมะระมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับหอยอีกทั้งสองชนิดในช่วงเวลาเดียวกัน จากงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าระดับการสะสมของ PAHs ในสิ่งมีชีวิตทางทะเล ขึ้นอยู่กับอัตราการเมตาบอลิซึมในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (Jørgensen *et al.*, 2005) โดย Beach (2015) รายงานว่าหอยมะระ (*M. musiva*) สามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบของสาร 1-HOP ที่มีการปนเปื้อนในสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่ากระบวนการ Biotransformation ได้ดี โดยในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารใน phase II (synthetic) ซึ่งเป็นระยะ conjugation reaction พบว่า 1-HOP ที่ปนเปื้อนในหอยมะระจะจับกับส่วนประกอบของเซลล์อื่น ๆ ในร่างกายได้ถึง 81 % ดังนั้นจึงพบปริมาณการสะสมของสาร 1-HOP ในเนื้อเยื่อของหอยมะระ (*M. musiva*) ในปริมาณสูง ในขณะที่จากการศึกษาของ Bustamante *et al* (2012) รายงานว่าหอยนางรมที่มีการปนเปื้อนน้ำมันดิบจะมีการสะสม 1-HOP ปริมาณสูงในระยะแรกและลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากหอยนางรมมีพฤติกรรมการกินอาหารแบบกรองกิน จึงได้รับการปนเปื้อนของน้ำมันเข้าสู่ร่างกายผ่านเหงือก แต่ในขณะเดียวกันหอยนางรมมีกระบวนการกำจัดสารพิษหรือสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายโดย เอนไซม์ cytochrome P - 450 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการสลาย (biosynthesis and catalysis pathways) ของสารแปลกปลอม (xenobiotic) ที่เข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิต เมื่อมีปนเปื้อนของ PAHs สารพิษส่วนใหญ่จะถูกเผาผลาญและมีการกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว (Gray, 2002; Neff and Burns, 1996; Suteau *et al.*, 1988)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบการสะสมของปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในหอยฝาเดียวสองชนิดคือ หอยครงแครง (*P. sulcatus*) และ หอยมะระ (*M. musiva*) พบการสะสมของ 1-HOP และ 2-NAP ในเนื้อเยื่อหอยมะระมีปริมาณมากกว่าหอยครงแครง โดยจากการศึกษาของ Lam (2002) และ Taylor (1990) พบว่าหอยมะระ (*M. musiva*) เป็นหอยสายพันธุ์ที่มีพฤติกรรมเป็นผู้ล่าในระบบห่วงโซ่อาหาร กินสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีขนาดเล็กกว่า เช่น *Cellana toreuma*, *Lunella coronate* และ *P. sulcatus* และ *S. cucullata* ทั้งนี้จากผลการทดลองครั้งนี้บอกได้ว่าน้ำมันดิบได้ผ่านเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศหาดหิน โดยหอยมะระ (*M. musiva*) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่เป็นผู้ล่าชนิดหนึ่งในระบบนิเวศหาดหิน มีการสะสมของสาร PAHs จากการกินสิ่งมีชีวิตอื่น หรือหอยครงแครง (*P. sulcatus*) ต่อมาอีกทอดหนึ่ง ในขณะที่หอย

ครองแครง (*P. sulcatus*) มีพฤติกรรมการกินอาหารแบบแทะเล็ม การสะสมของสารประกอบจึงเกิดจากการกินอาหารที่มีน้ำมันปกคลุมอยู่บนผิวหินและเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารหรือจากการสัมผัสกับน้ำมันโดยตรง ซึ่งระดับการสะสมทางชีวภาพของสารประกอบปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งมีชีวิตทางทะเลมีความเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการกินอาหารของสิ่งมีชีวิต (Jackson *et al.*, 1989; Nacher-Mestre *et al.*, 2010; Peterson, 2001) จากการศึกษาของ Gray (2002) รายงานว่าการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs มักพบปริมาณมากในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงสุดซึ่งอาจจะเนื่องมาจากผลของการปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าระดับการปนเปื้อนของสารพิษมีความเกี่ยวข้องกับระบบห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิต มีการศึกษาหลายการศึกษาระบุให้เห็นว่าเหตุการณ์การรั่วไหลของน้ำมันดิบส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทางทะเลเช่น แพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ และปลาในระบบห่วงโซ่อาหาร (Gin *et al.*, 2001) ปริมาณของการสะสมของสารประกอบ PAHs ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจะถูกส่งผ่านไปยังสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่เป็นผู้ล่า สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในทะเล ปลาหรือสิ่งมีชีวิตระดับสูงที่กินสัตว์ที่ปนเปื้อนสาร PAHs เป็นอาหาร (Takeuchi *et al.*, 2009)

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณการสะสมของ PAHs ในหอยทั้งสามชนิดมีแนวโน้มลดลงตามช่วงระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง และไม่พบการสะสมของ PAHs ในเนื้อเยื่อภายหลังจาก 1 ปีนับจากเกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อน้ำมันดิบแพร่กระจายเข้าสู่ทะเลจะเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ บางส่วนจะเลือนหายไปกับผิวน้ำด้วยกระบวนการแปรเปลี่ยนสภาพต่าง ๆ ตามธรรมชาติ เช่น การละลาย การระเหย และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เป็นต้น ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนรูปของน้ำมันจะมีกลไกการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งมีการสลายตัวหมดไป มีการเปลี่ยนสภาพไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตราย และสภาพแวดล้อมกลับคืนสู่สภาวะปกติ ปริมาณการสะสมของปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจะลดลงตามระยะเวลา ทำให้สิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นผู้บริโภคในลำดับต่าง ๆ ของระบบห่วงโซ่อาหารที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่ได้รับผลกระทบมีการสะสมสารพิษในเนื้อเยื่อลดลงตามไปด้วย

5.3 การตรวจวัดระดับ 1-HOP และ 2-NAP ในหอยทั้ง 3 ชนิดภายใต้ระบบทดลองเสมือนจริง

เนื่องจากระบบนิเวศทางทะเลในธรรมชาติมีความสลับซับซ้อน และมีความเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบย่อยของระบบหลายส่วน เช่น น้ำทะเล ดินตะกอน สิ่งมีชีวิตที่เป็นเหยื่อและผู้ล่า การทดลองเพื่ออธิบายผลกระทบของมลพิษในระบบนิเวศทางธรรมชาติจึงอธิบายข้อมูลและผลการทดลองได้ยาก ดังนั้นการสร้างระบบนิเวศจำลองในห้องทดลอง โดยมีการจำลองระบบนิเวศแบบปิดในระดับความเป็นพิษของน้ำมันดิบที่ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตหลักที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินนั้น จะเป็นการยืนยันข้อสันนิษฐานที่ว่าเมื่อเกิดการปนเปื้อนน้ำมันเข้าสู่สิ่งมีชีวิตในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินแล้ว สารมลพิษจะมีการปนเปื้อนไปยังผู้บริโภคลำดับชั้นถัดไปในห่วงโซ่อาหารหรือไม่ โดยระบบนิเวศจำลอง ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการสร้างสภาพแวดล้อมให้คล้ายคลึงกับเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินในธรรมชาติและให้สัตว์ทดลองสัมผัสกับน้ำมันดิบอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วันเพื่อศึกษาติดตามและตรวจวัดระดับ 1-HOP และ 2-NAP ในหอยที่อาศัยในหาดหินชนิดเดียวกับที่พบในธรรมชาติ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์พบ 1-HOP มากกว่า 2-NAP ในหอยทั้ง 3 ชนิด โดยหอยมะระมี 1-HOP และ 2-NAP มากที่สุดในช่วงเวลาเดียวกันและมีปริมาณการสะสมลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป สอดคล้องกับการศึกษาการตรวจวัดปริมาณของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ของ PAHs ในหอยเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินบริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยองในข้อ 5.2 โดยผลกระทบจากการแพร่กระจายของน้ำมันทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศหาดหิน ได้โดยอาศัยร่างกายของสิ่งมีชีวิตเป็นสื่อกลาง ผู้ผลิตขั้นต้น เช่น สาหร่าย และพืชที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน หอยกรองแครงซึ่งมีพฤติกรรมการกินอาหารแบบตะเล็มในระบบนิเวศสามารถรับสารพิษเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารได้โดยกินอาหารที่มีน้ำมันปกคลุมอยู่บนผิวหิน หรือจากการสัมผัสผ่านทางผิวหนังได้โดยตรง จากนั้นการสะสมของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจะถ่ายทอดผ่านทางกรกินไปสู่หอยมะระซึ่งมีพฤติกรรมเป็นผู้ล่าในระบบนิเวศหาดหินและเป็นผู้บริโภคในลำดับชั้นถัดไป ในขณะที่หอยนางรมปากจีบซึ่งกินอาหารแบบการกรองกินสารแขวนลอยในมวลน้ำ อาจนำสารแขวนลอยที่มีน้ำมันปะปนอยู่เข้าสู่ทางเดินอาหารได้เช่นกัน แต่มีกลไกในการจัดการกับสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ดี สามารถกำจัดสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มีการปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกายได้ในระยะเวลาที่รวดเร็ว จึงพบว่าการสะสมของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในเนื้อเยื่อในปริมาณน้อย ดังนั้นเมื่อเกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล

สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่ได้รับผลกระทบจะมีการปนเปื้อนโดยเฉพาะพืช สิ่งมีชีวิตหน้าดิน และสิ่งมีชีวิตในเขตน้ำขึ้นน้ำลงภายในระยะเวลาไม่กี่สัปดาห์หรือหลายเดือนหลังจากการเกิดเหตุการณ์ น้ำมันจะมีการแพร่กระจายไปยังบริเวณที่ไม่ได้รับผลกระทบทันที และต่อจากนั้นน้ำมันที่มีการแพร่กระจายเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหาร (Anyakora *et al.*, 2005; Catalano *et al.*, 2012; Hannam *et al.*, 2010) เป็นอันตรายและส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคในลำดับสูงในห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศได้ (Blumer and Sass, 1976)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การสะสมของ 1-HOP และ 2-NAP ในเนื้อเยื่อของหอยทั้งสามชนิดมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตามช่วงระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง ซึ่งพบว่าในวันที่ 30 ของการทดลองปริมาณการปนเปื้อนปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนมีค่าน้อยมาก เข้าใกล้ระดับที่ตรวจพบในหอยกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบ โดย Shin and Lim (2013) ได้ศึกษาผลของการเกิดอุบัติเหตุรั่วน้ำมันบริเวณ Hebei Spirit ซึ่งทำการวิเคราะห์สารตกค้างของน้ำมันดิบในตัวอย่างหอย จากผลการศึกษาพบการการสะสม 1-HOP และ 2-NAP ในช่วงระยะเวลา 2 เดือนแรก หลังจากเกิดเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล ซึ่งระดับความเข้มข้นน้ำมันจะลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องจนมีค่าเข้าใกล้ระดับที่ตรวจพบในพื้นที่ควบคุม โดยระดับการปนเปื้อนของน้ำมันในน้ำอาจเปลี่ยนแปลงได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ และความเร็วของลม เนื่องจากเมื่อมีการปนเปื้อนหรือแพร่กระจายของน้ำมันในแหล่งน้ำ น้ำมันจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพองค์ประกอบ จากของเหลวให้กลายเป็นไอ อุณหภูมิที่สูงทำให้คราบน้ำมันที่มีการแพร่กระจาย ระเหยออกไปจากผิวน้ำได้อย่างรวดเร็ว โดยกระบวนการระเหยจะเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่เกิดการรั่วไหลของน้ำมันออกจากแหล่งที่มา และจะมีอัตราการระเหยเร็วในช่วงแรก และจะมีกระบวนการแตกออกเป็นอนุภาคขนาดเล็กและจมลงสู่ท้องน้ำ นอกจากนี้ยังมีกระบวนการอื่น ๆ เกี่ยวข้อง เช่น การย่อยสลายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ จากการกระทำของจุลินทรีย์ หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในน้ำ (Dos *et al.*, 2011) การเกิดปฏิกิริยาโฟโตออกซิเดชันโดยคราบน้ำมันบนผิวน้ำทะเลและใต้ผิวน้ำทะเลจะเปลี่ยนแปลง (degrade) ไปเมื่อได้รับแสงอาทิตย์ เป็นต้น

5.4 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیبที่สัมผัสน้ำมันดิบ

การประเมินผลกระทบทางชีวภาพของน้ำมันที่มีต่อมอลลัสก์ในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินได้เลือกใช้หอยนางรมเป็นตัวแทนในการศึกษา เนื่องจากในกรณีที่สิ่งมีชีวิตได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนน้ำมันเป็นเวลานาน พบว่าหอยฝาเดียวจะแสดงค่าความเข้มข้นของสารพิษน้อยกว่าหอยสองฝา เพราะลักษณะสรีระของร่างกายและพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิต ในขณะที่หอยนางรมปากจیبเป็นหอยสองฝาชนิดหนึ่งซึ่งมีพฤติกรรมการกินอาหาร โดยการกรองกินผ่านน้ำ การปนเปื้อนของน้ำมันส่วนใหญ่จะผ่านทางเหงือกทำให้สามารถพบการสะสมของ PAH ได้สูง (Yuewen and Adzigbli, 2018) ดังนั้นหอยนางรมปากจیبจึงสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดมลพิษที่การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ หอยชนิดนี้จะทำการดูดซับสารมลพิษที่มีการปนเปื้อนอยู่เข้าสู่ร่างกายโดยตรงทั้งทางผิวหนัง เหงือกและการกินอาหาร หอยนางรมปากจیبมีพฤติกรรมเกาะนิ่งบนที่อยู่อาศัยไม่เคลื่อนที่จึงสัมผัสกับน้ำมันโดยตรงเมื่อเกิดการปนเปื้อนและหอยนางรมมีกลไกในการจัดการกับสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ดี มนุษย์ส่วนใหญ่นิยมบริโภคหอยนางรมเป็นอาหาร และหอยนางรมยังใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งหากมีการสะสมของน้ำมันดิบในเนื้อเยื่อของหอยอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคอื่น ๆ ในห่วงโซ่อาหารรวมถึงมนุษย์ได้

จากการศึกษาของ Bustamante *et al.* (2012) พบว่าในเนื้อเยื่อของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) ที่มีการสัมผัสกับไฮโดรคาร์บอน พบสารประกอบ pyrene ถูกเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมได้เป็น 1 - hydroxypyrene (1-HOP) 4 - 14% ของปริมาณ pyrene ทั้งหมด ในขณะที่บริเวณเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมพบ 1-HOP ปริมาณมากถึง 47% ดังนั้นการศึกษาผลของการปนเปื้อนน้ำมันดิบในครั้งนี้ ทางผู้ศึกษาจึงเลือกทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกในหอยนางรมปากจیبที่ได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมัน

ผลจากการศึกษาพบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกหอยนางรมปากจیبประกอบด้วยซี่เหงือกย่อย (Gill filament) ซึ่งเป็นกลุ่มของท่อขนาดเล็กที่เกิดจากการม้วนตัวของซี่เหงือกหลักจำนวน 12 - 14 ท่อ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการแลกเปลี่ยนก๊าซ ซึ่งจะมีจำนวนใกล้เคียงกับที่พบในหอยนางรม *C. virginica* ที่มีจำนวนซี่เหงือกย่อยอยู่ระหว่าง 10 - 16 หน่วยต่อพลิกา (Galtsoff, 1964) จากโครงสร้างและตำแหน่งที่พบของ cilia บริเวณเหงือกของหอยนางรม

ปากจิบเป็นการสนับสนุนว่านอกจากเหงือกจะทำหน้าที่หลักในการแลกเปลี่ยนก๊าซแล้ว ยังทำหน้าที่สำคัญอื่น ๆ เช่น การโบกพัดและคัดกรองอาหารที่มากับน้ำ และน่าจะเกี่ยวข้องกับการกระจายตัวของเซลล์สืบพันธุ์อีกด้วย ในขณะที่ Interlamellar junction ที่พบบริเวณเหงือกของหอยนางรมปากจิบทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหดและคลายตัวของแผ่นเหงือก จากลักษณะ โครงสร้างและลักษณะเนื้อเยื่อของเหงือกแสดงให้เห็นว่า ภายในเหงือกประกอบด้วยแองเจลิอดจำนวนมากและเนื้อเยื่อบาง ทำให้เลือดที่ไหลผ่านเหงือกเกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ง่าย และนอกจากนี้เหงือกยังมีการเพิ่มพื้นที่แลกเปลี่ยนก๊าซโดยมีวนพับลักษณะคล้ายใบไม้เพื่อให้เกิดพื้นที่ผิวที่สามารถสัมผัสกับน้ำมากขึ้น

จากงานวิจัยในก่อนหน้านี้พบว่ากลุ่มสิ่งมีชีวิตหอยที่ได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือก เช่น งานวิจัยของ Baršienė *et al.* (2006) และ Baršienė *et al.* (2008) ซึ่งทำการศึกษาผลกระทบของมลพิษน้ำมันที่มีต่อ micronuclei, nuclear buds และ fragmented cells บริเวณเซลล์เหงือกของหอย *Anodonta anatina L.* หอย *Macoma balthica* และ *Mytilus edulis* ที่สัมผัสน้ำมันดิบ ผลจากการศึกษาพบว่าสารประกอบในน้ำมันส่งผลกระทบต่อปริมาณของ micronuclei ในหอย และส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายของ nuclear buds บริเวณเหงือกในหอย และจากการศึกษาของ Al-Hashem (2017) พบว่าความเป็นพิษของ PAHs ในน้ำมันดิบจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลบริเวณชายฝั่งประเทศคูเวต ส่งผลกระทบต่อลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในหอยนางรม *Pinctada radiata* ผลจากการศึกษาพบว่า PAHs ส่งผลกระทบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอย่างรุนแรงบริเวณเหงือกของหอย พบความผิดปกติของรูปร่าง และพบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงบริเวณ lamellae branchial และ gill filaments ในขณะที่จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจิบที่ได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของน้ำมันของกลุ่มตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณหาดหินในระบบนิเวศจำลองในครั้งนี้ ไม่พบอาการผิดปกติในบริเวณเหงือก สาเหตุอาจเนื่องมาจาก (1) หอยนางรมปากจิบซึ่งเป็นสัตว์หน้าดินที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของน้ำมันดิบในปริมาณน้อยจึงไม่ก่อให้เกิดอันตรายรุนแรง หรือ (2) อวัยวะเหงือกของสิ่งมีชีวิตถึงแม้ว่าจะมีการสัมผัสกับน้ำทะเลโดยตรง แต่หอยนางรมจะมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากสารพิษหรือสิ่งที่เป็นอันตรายกับตัวเองโดยการปิดฝาเข้าหากันจึงทำให้หอยนางรมสัมผัสกับน้ำมันได้น้อยลง หรือ (3) แม้วาน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนระบบเลียนแบบนิเวศวิทยาในครั้งนี้จะมีปริมาณที่มากเมื่อเทียบกับพื้นที่

แต่ด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ เช่น กระบวนการระเหย กระบวนการละลาย เป็นต้น สามารถขจัดน้ำมันได้เร็วทำให้ระยะเวลาที่หอยได้รับสัมผัสน้ำมันไม่นานพอจนถึงขั้นอันตราย โดย Balouet *et al.* (1986) ได้รายงานผลการประเมินผลกระทบจากมลพิษต่อหอยบริเวณประเทศฝรั่งเศสในระหว่างปี 1975 และ 1981 ซึ่งครอบคลุมทั้งช่วงระยะก่อนและหลังเกิดเหตุการณ์รั่วไหลของน้ำมัน Amoco Cadiz จากผลการศึกษาพบว่าหอยนางรม *Ostrea edulis* จำนวนกว่า 45,000 ตัวที่ได้รับการตรวจสอบทางพยาธิวิทยา มีการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในปริมาณต่ำ โดยรวมไม่มีความสัมพันธ์กับมลพิษทางน้ำที่เกิดขึ้นถึงแม้ว่าจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลครั้งนี้จะทำให้เกิดความชุกชุมของการแพร่ระบาดก็ตาม

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากอุบัติเหตุน้ำมันดิบรั่วไหลเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2556 จากการสำรวจภาคสนามพบการแพร่กระจายของสัตว์หน้าดินในทั้งสองพื้นที่คือ หาดหินอ่าวพร้าวและหาดหินบริเวณหน้าที่ทำการอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง มีการแพร่กระจายในรูปแบบที่แน่นอนตามระดับน้ำที่ชัดเจน กลุ่มของสัตว์ทะเลหน้าดินที่พบมีทั้งหมด 4 ไฟลัม 11 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่พบอยู่ใน ไฟลัมมอลลัสกาซึ่งประกอบด้วย กลุ่มหอยฝาเดียว คือ หอยครองแครง (*Planaxis sulcatus*) หอยฝาเดียวชนิด *Peasiella repsotroffiana* หอยมะระ (*Morula musiva*) หอยจีตา 2 ชนิด คือ *Echinolittorina malaccana* และ *E. radiata* หอยน้ำพริก (*Monodonta labrio*) กลุ่มหอยฝาชี (*limpet*) กลุ่มลิ้นทะเล (*Acanthopleura japonica*) และกลุ่มหอยสองฝา ประกอบด้วยหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) *Isognomon nucleus* และ

โดยการศึกษา ชนิด ความชุกชุม การแพร่กระจายและ โครงสร้างชุมชนของสัตว์หน้าดินที่อาศัยอยู่ในอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง ซึ่งเป็นบริเวณที่ได้รับผลกระทบ แสดงให้เห็นว่า ชนิดของสัตว์หน้าดินในบริเวณนี้ไม่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่ไม่ได้รับผลกระทบ ในขณะที่ความชุกชุมของสัตว์หน้าดินเช่น หอยนางรมปากจีบและหอยครองแครง บริเวณหาดหินของอ่าวพร้าวมีแนวโน้มลดลงตามช่วงเวลา ในขณะที่หอยจีตา (วงศ์ littorinidae) ซึ่งอาศัยอยู่ใกล้แนวน้ำขึ้นสูงสุดมีความชุกชุมเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการที่จะสรุปว่าพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากคราบน้ำมันดิบ มีชนิดและความชุกชุมของสัตว์หน้าดินในหาดหินลดลงเป็นได้ยาก เนื่องจากจะต้องมีข้อมูลพื้นฐาน (baseline data) ของสัตว์หน้าดินในหาดหินของอ่าวพร้าว ก่อนเกิดอุบัติเหตุการรั่วไหลของน้ำมันดิบมาเป็นตัวเปรียบเทียบ (Before and after accident)

เมื่อเปรียบเทียบความชุกชุมโดยรวมของสัตว์หน้าดินที่อาศัยในเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินทั้งสองพื้นที่ในการศึกษาครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าในพื้นที่อ่าวพร้าวมีความชุกชุมมากกว่าในทุกช่วงเวลาของการเก็บข้อมูล ถึงแม้ว่าพื้นที่บริเวณอ่าวพร้าวได้รับผลกระทบจากการรั่วไหลของน้ำมันดิบ แต่ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของหาดหินบริเวณอ่าวพร้าว ซึ่งเป็นก้อนหินขนาดต่าง ๆ ที่มี

ลักษณะเป็นชอก หรือ โพรงเอื้ออำนวยต่อการอยู่อาศัยของสัตว์หน้าดิน ในขณะที่หาดหินบริเวณหน้าท่าทางานอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด ส่วนใหญ่เป็นลานหินเรียบ มีก้อนหินอยู่น้อย จึงทำให้มีสัตว์หน้าดินอาศัยอยู่น้อยกว่า

จากการตรวจวัดปริมาณดัชนีทางชีวภาพของปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในหอยที่ได้รับผลกระทบจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหลบริเวณหาดหิน พบว่าระดับการสะสมทางชีวภาพของสารประกอบปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสิ่งมีชีวิตทางทะเลมีความเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการกินอาหาร อัตราการเมตาบอลิซึมในร่างกายของสิ่งมีชีวิต และสามารถปนเปื้อนเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารได้ โดยอาศัยร่างกายของสิ่งมีชีวิตเป็นสื่อกลาง ผ่านผู้ผลิตขั้นต้น และถ่ายทอดผ่านทางกรกินไปสู่สิ่งมีชีวิตซึ่งมีพฤติกรรมเป็นผู้ล่าที่เป็นผู้บริโภคในลำดับขั้นถัดไป ซึ่งกลไกในการจัดการหรือความสามารถในการกำจัดสารปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่มีการปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตหน้าดินแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้มีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ cytochrome P-450 ในกระบวนการ Biotransformation ของกระบวนการเมตาบอลิซึมในสิ่งมีชีวิต ซึ่งระบบนิเวศจำลองในการวิจัยครั้งนี้เป็นการสร้างสภาพแวดล้อมให้คล้ายคลึงกับเขตน้ำขึ้นน้ำลงของหาดหินในธรรมชาติและให้สัตว์ทดลอง โดยนับว่ามีความสำคัญในการศึกษาทางระบบนิเวศวิทยาของการศึกษาทางวิทยาศาสตร์มาก เนื่องจากจะเป็นการยืนยันว่าเมื่อเกิดการปนเปื้อนน้ำมันเข้าสู่สิ่งมีชีวิตในเขตน้ำขึ้นน้ำลงบริเวณหาดหินแล้ว สารปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจะมีการปนเปื้อนไปยังผู้บริโภคลำดับขั้นถัดไปในระบบห่วงโซ่อาหาร

นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจวัดความปนเปื้อนของสารปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนสามารถใช้ 1 - HOP (1-Hydroxypyrene) และ 2 - NAP (2-Naphthol) ในสิ่งมีชีวิตที่มีการปนเปื้อนมลพิษสารเหล่านี้เป็นดัชนีทางชีวภาพได้ โดย 1 - HOP เป็นสารที่มีความสำคัญและมีเหมาะสมในการนำมาเป็นดัชนีทางชีวภาพของการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมของไฮโดรคาร์บอนในสิ่งมีชีวิตเนื่องจากปริมาณการสะสมของ 1-HOP ที่พบในสิ่งมีชีวิตมีปริมาณมากกว่า 2-NAP เนื่องจาก 2-NAP เป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำและระเหยได้ดีกว่า จึงมีการสลายหายไปอย่างรวดเร็วเมื่อมีการปนเปื้อนในธรรมชาติ

การศึกษาความผิดปกติของลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิตทางน้ำนับว่าเป็นเครื่องมือที่มีความสำคัญ สามารถใช้ในการติดตามความผิดปกติหรือการตายในสิ่งมีชีวิตได้ โดยการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อนับว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่บ่งบอก

ถึงการปนเปื้อนของสารพิษที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตได้ จากการศึกษาในครั้งนี้ถึงแม้จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจีบที่มีการปนเปื้อนของสารพิษก็ตาม อาจเนื่องมาจากการที่หอยนางรมมีการปรับกลไกด้านสรีระวิทยา เพื่อกำจัดหรือหลีกเลี่ยงความเป็นพิษของน้ำมันดิบที่มีต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น การสร้างเมือกมาเคลือบบริเวณเนื้อเยื่อ หรือการปิดฝาเข้าหากันจึงทำให้มีการสัมผัสกับน้ำมันที่น้อยลง เป็นต้น ทั้งนี้ปริมาณน้ำมันที่ใช้ในการทดลองมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อเหงือกในหอยนางรมปากจีบ ซึ่งหากได้รับน้ำมันดิบเป็นระยะเวลาที่นานขึ้นอาจจะส่งผลให้เซลล์และเนื้อเยื่อได้รับอันตรายและเกิดความเสียหายจนทำให้เกิดการตายของเซลล์ขึ้นได้ในที่สุด

บรรณานุกรม

- กรมควบคุมมลพิษ. 2553. รายงานสถานการณ์มลพิษของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : กองแผนงาน และประเมินผล.
- ธีระ วรรณรัตน์. 2558. การรับรู้ผลกระทบและการจัดการวิกฤติน้ำมันรั่วลงทะเล บริเวณอ่าวพร้าว เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง. สำนักงานวิจัยและพัฒนาเพื่อการปรังงานวิจัยสุขภาพสู่การปฏิบัติ. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิพนธ์ ศิริพันธ์. 2543. คู่มือการเลี้ยงหอยทะเลเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ : ฝ่ายเผยแพร่ กองส่งเสริมการประมง.
- ปรีชา วิบูลย์พันธ์, นันทน์ภัส ช่างพุด และ สุทิน กิ่งทอง. 2553. ผลของการปนเปื้อนน้ำมันดิบต่อเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและลำไส้ของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*): กรณีศึกษาบริเวณเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 6 วันที่ 20 - 21 มีนาคม 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ยิ่งรัก พึ่งเสมา. 2549. อนุสัญญาระหว่างประเทศว่าด้วยความรับผิดชอบเพื่อความเสียหายจากมลพิษน้ำมันเชื้อเพลิง ค.ศ. 2001. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- สุทิน กิ่งทอง และรัตนา สมัญญา. 2557. กายวิภาคและมิอูชีววิทยาของเหงือกหอยตะไกรกรมการค้า *Crassostrea iredalie*. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 19(3): 422-433.
- อัมพิกา ดิบบาง. 2550. การศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างเหงือกของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea commercialis*) บริเวณเกาะสีชัง และเกาะขามใหญ่ อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี. ถ้าพูน: โรงเรียนน้ำคิบบิตยาคม.
- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., and Andersen, O. K. 2000. “PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod” **Aquatic Toxicology**. 51(2): 241-258.
- Agwuocha, S., Kulkarni, B., and Pandey, A. 2011. “Histopathological alterations in hepatopancreas of *Gafrarium divaricatum* exposed to xylene, benzene and gear oil-WSF” **Journal of Environmental Biology**. 32(1): 35-8.
- Ahmad, I., Pacheco, M., and Santos, M. A. 2006. “*Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal).” **Chemosphere**. 65(6): 952-962.

- Al-Thukair, A. A., and Malik, K. 2016. "Pyrene metabolism by the novel bacterial strains *Burkholderia fungorum* (T3A13001) and *Caulobacter sp* (T2A12002) isolated from an oil-polluted site in the Arabian Gulf" **International Biodeterioration & Biodegradation**. 110: 32-37.
- Al-Hashem, M. A. 2017. "Gill Histopathological Effects of PAHs on Adult Pearl Oyster, *Pinctada radiata* at Al-Khiran Coast in Kuwait" **Journal of Environmental Protection**. 8: 109-119.
- Almeda, R., Connelly, T. L., and Buskey, E. J. 2016. "How much crude oil can zooplankton ingest? Estimating the quantity of dispersed crude oil defecated by planktonic copepods" **Environmental Pollution**. 208: 645-654.
- Almeida, J. R., Gravato, C. and Guilhermino, L. 2012. "Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: a case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax L.*)" **Chemosphere**. 86(9): 926-937.
- Amat, A., Burgeot, T., Castegnaro, M., and Pfohl-Leszkowicz, A. 2006. "DNA adducts in fish following an oil spill exposure" **Environmental Chemistry Letters**." 4(2), 93-99.
- Ameur, W. B., de Lapuente, J., El Megdiche, Y., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Camps, L., Driss, M. R. 2012. "Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia)" **Marine Pollution Bulletin**. 64(2): 241-251.
- Amutha, C., Bupesh, G., Ramesh, R., Kavitha, P. and Subramanian, P. 2009. "Cytochrome P450-dependent mixed function oxidases (MFO) system dynamics during the poly aromatic hydrocarbon (PAH) metabolism in green mussel *Perna Viridis* (Linnaeus, 1758)" **Environmental Bioindicators**. 4(1): 97-116.
- Antizar-Ladislao, B. 2008. "Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment" A review. **Environment International**. 34(2): 292-308.
- Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P. and Coker, H. 2005. "Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement" **Journal of Chromatography A**. 1073(1): 323-330.

- Ariese, F., Kok, S. J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N. H. and Hofstraat, J. W. 1993. "Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: a rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure" **Aquatic Toxicology**. 26(3-4): 273-286.
- Ariņç, E., Sen, A., and Bozcaarmutlu, A. 2000. "Cytochrome P4501A and associated mixed-function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment" **Pure and Applied Chemistry**. 72(6): 985-994.
- Aronstein, B. N., Yolanda, M. and Calvillo, M. A. 1991. "Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil" **Environmental Science & Technology**. 25(10): 1728-1731.
- Au, D. 2004. "The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review" **Marine Pollution Bulletin**. 48(9): 817-834.
- Autrup, H., Daneshvar, B., Dragsted, L. O., Gamborg, M., Hansen, M., Loft, S. and Raffn, E. 1999. "Biomarkers for exposure to ambient air pollution-comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress" **Environmental Health Perspectives**. 107(3): 233.
- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G. and Regoli, F. 2015. "Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels" **Environmental Pollution**. 198: 211-222.
- Ayotamuno, J. M., Okparanma, R. N., Davis, D. D. and Allagoa, M. 2010. "PAH removal from Nigerian oil-based drill-cuttings with spent oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) substrate" **Journal of Food, Agriculture & Environment**. 8(3&4): 914-919.
- Bach, L., Palmqvist, A., Rasmussen, L. J. and Forbes, V. E. 2005. "Differences in PAH tolerance between *Capitella* species: underlying biochemical mechanisms" **Aquatic Toxicology**. 74(4): 307-319.
- Bakhmet, I. N., Fokina, N. N., Nefedova, Z. A. and Nemova, N. N. 2009. "Physiological-biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination" **Environmental Monitoring and Assessment**. 155(1): 581-591.
- Bakke, T., Klungsøyr, J. and Sanni, S. (2012). "Long-term effects of discharges to sea from petroleum-related activities-The results of ten years' research" **Oceans and Coastal Areas (Havkyst) programme Research Council of Norway**, Stavanger, 1-49.

- Balouet, G., Poder, M., Cahour, A. and Auffret, M. 1986. "Proliferative hemocytic condition in European flat oysters (*Ostrea edulis*) from Breton coasts: a 6-year survey" **Journal of Invertebrate Pathology**. 48(2): 208-215.
- Barakat, A. O., Mostafa, A., Wade, T. L., Sweet, S. T. and El Sayed, N. B. 2011. "Distribution and characteristics of PAHs in sediments from the Mediterranean coastal environment of Egypt" **Marine Pollution Bulletin**, 62(9), 1969-1978.
- Barron, M. G. and Ka'aihue, L. 2001. "Potential for photoenhanced toxicity of spilled oil in Prince William Sound and Gulf of Alaska waters" **Marine Pollution Bulletin**. 43(1): 86-92.
- Baršienė, J., Andreikenaite, L., Garnaga, G. and Rybakovas, A. 2008. "Genotoxic and cytotoxic effects in bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea" **Ekologija**. 54(1): 44-50.
- Baršienė, J., Andreikėnaitė, L. and Rybakovas, A. 2006. "Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and duck mussel (*Anodonta anatina* L.) exposed to crude oil" **Ekologija**. 1: 25-31.
- Baršienė, J., Lehtonen, K. K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P. J., Lang, T. and Rybakovas, A. 2006. "Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipėda-Butinge area (Baltic Sea)" **Marine Pollution Bulletin**. 53(8): 422-436.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J., Burgeot, T., Michel, X. and Bellocq, J. 1999. "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability" **Marine Environmental Research**. 47(5): 415-439.
- Baussant, T., Sanni, S., Jonsson, G., Skadsheim, A. and Børseth, J. F. 2001. "Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 20(6): 1175-1184. .
- Beach, D. G., Quilliam, M. A. and Hellou, J. 2009. "Analysis of pyrene metabolites in marine snails by liquid chromatography using fluorescence and mass spectrometry detection" **Journal of Chromatography B**. 877(22): 2142-2152.

- Beach, D. G., Quilliam, M. A., Rouleau, C., Croll, R. P. and Hellou, J. 2015. "Bioaccumulation and biotransformation of pyrene and 1-hydroxypyrene by the marine whelk *Buccinum undatum*" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 29(4): 779-788.
- Bearer, C. F. 1998. "Biomarkers in pediatric environmental health: a cross-cutting issue" **Environmental Health Perspectives**. 106(3): 813.
- Belfiore, N. M. and Anderson, S. L. 2001. "Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review" **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. 489(2): 97-122.
- Beliaeff, B. and Burgeot, T. 2002. "Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 21(6): 1316-1322.
- Bellas, J. and Thor, P. 2007. "Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*" **Ecotoxicology**. 16(6): 465-474.
- Bertrand, K. and Hare, L. 2017. "Evaluating Benthic Recovery Decades after a Major Oil Spill in the Laurentian Great Lakes" **Environmental Science & Technology**. 51(17): 9561-9568.
- Beyer, J., Aarab, N., Tandberg, A. H., Ingvarsdottir, A., Bamber, S., Børseth, J. F. and Velvin, R. 2013. "Environmental harm assessment of a wastewater discharge from Hammerfest LNG: A study with biomarkers in mussels (*Mytilus sp.*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)" **Marine Pollution Bulletin**. 69(1): 28-37.
- Beyer, J., Jonsson, G., Porte, C., Krahn, M. M. and Ariese, F. 2010. "Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: a review" **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 30(3): 224-244.
- Beyer, J., Trannum, H. C., Bakke, T., Hodson, P. V. and Collier, T. K. 2016. "Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: a review" **Marine Pollution Bulletin**. 110(1): 28-51.
- Bieniek, G. 1997. "Urinary naphthols as an indicator of exposure to naphthalene" **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**. 414-420.
- Blahova, J., Kruzikova, K., Kasiková, B., Stierand, P., Jurcikova, J., Ocelka, T. and Svobodova, Z. 2009. "1-Hydroxypyrene-A Biochemical Marker for PAH Pollution Assessment of Aquatic Ecosystem" **Sensors**. 10(1): 203-217.

- Blumer, M. 1976. "Polycyclic aromatic compounds in nature" **Scientific American;(United States)**. 234(3).
- Boitsov, S., Jensen, H. and Klungsøyr, J. 2009. "Geographical variations in hydrocarbon levels insediments from Western Barents Sea" **Norwegian Journal of Geology (In press)**.
- Bols, N., Dayeh, V., Lee, L. and Schirmer, K. 2005. "Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish" Piscine cell lines in environmental toxicology. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. 6: 43-84.
- Bonsdorff, E. 1984. "Effects of experimental oil spills in intertidal rock pools" **Ecological Bulletins**. 159-164.
- Boobis, A. R., Lynch, A. M., Murray, S., de la Torre, R., Solans, A., Farré, M. and Davies, D. S. 1994. "CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans" **Cancer Research**. 54(1): 89-94.
- Booth, D. J. and Brosnan, D. M. 1995. "The role of recruitment dynamics in rocky shore and coral reef fish communities" **Advances in Ecological Research**. 26: 309-385.
- Brown, R. S., Wolke, R. E., Saila, S. B. and Brown, C. W. 1977. "Prevalence of neoplasia in 10 new England populations of the soft-shell clam (*mya arenaria*)" **Annals of The New York Academy of Sciences**. 298(1): 522-534.
- Budzinski, H., Mazéas, O., Tronczynski, J., Désaunay, Y., Bocquené, G. and Claireaux, G. 2004. "Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: Application to the "Erika" oil spill" **Aquatic Living Resources**. 17(3): 329-334.
- Burns, K., Garrity, S., Jorissen, D., MacPherson, J., Stoelting, M., Tierney, J. and Yelle-Simmons, L. 1994. "The Galeta oil spill. II. Unexpected persistence of oil trapped in mangrove sediments" **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 38(4): 349-364.
- Bustamante P., Luna-Acosta A., Clemens S., Cassi R., Thomas-Guyon H. and Warnau M. 2012. "Bioaccumulation and metabolisation of 14C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater" **Chemosphere**. 87(8): 944-950.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A. 2000. "The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach" **Science of The Total Environment**. 247(2): 295-311.

- Cajaraville, M. P., Marigómez, J. and Angulo, E. 1990. "Short-term toxic effects of 1-naphthol on the digestive gland-gonad complex of the marine prosobranch *Littorina littorea* (L): A light microscopic study" **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 19(1): 17-24.
- Camargo, J. A. and Alonso, Á. 2006. "Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment" **Environment International**, 32(6): 831-849.
- Camphuysen, K. C. 1998. "Beached bird surveys indicate decline in chronic oil pollution in the North Sea" **Marine Pollution Bulletin**. 36(7): 519-526.
- Cappello, T., Maisano, M., D'Agata, A., Natalotto, A., Mauceri, A. and Fasulo, S. 2013. "Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*)" **Marine Environmental Research**. 91: 52-60.
- Capuzzo, J. M., Moore, M. N. and Widdows, J. 1988. "Effects of toxic chemicals in the marine environment: predictions of impacts from laboratory studies" **Aquatic Toxicology**. 11(3): 303-311.
- Cardellicchio, N., Buccolieri, A., Giandomenico, S., Lopez, L., Pizzulli, F. and Spada, L. 2007. "Organic pollutants (PAHs, PCBs) in sediments from the Mar Piccolo in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy)" **Marine Pollution Bulletin**. 55(10): 451-458.
- Carlberg, S. R. and Skarstedt, C. B. 1972. "Determination of small amounts of non-polar hydrocarbons (oil) in sea water" **ICES Journal of Marine Science**. 34(3): 506-515.
- Carr, R. S. and Linden, O. 1984. "Bioenergetic responses of *Gammarus salinus* and *Mytilus edulis* to oil and oil dispersants in a model ecosystem" **Marine Ecology Progress Series**. **Oldendorf**. 19(3): 285-291.
- Carro, N., Cobas, J. and Maneiro, J. 2006. "Distribution of aliphatic compounds in bivalve mollusks from Galicia after the Prestige oil spill: Spatial and temporal trends" **Environmental Research**. 100(3): 339-348.
- Castège, I., Milon, E. and Pautrizel, F. 2014. "Response of benthic macrofauna to an oil pollution: Lessons from the "Prestige" oil spill on the rocky shore of Guéthary (south of the Bay of Biscay, France)" **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**. 106: 192-197.

- Catalano, B., Moltedo, G., Martuccio, G., Gastaldi, L., Virno-Lamberti, C., Lauria, A. and Ausili, A. 2012. "Can *Hediste diversicolor* (Nereidae, Polychaete) be considered a good candidate in evaluating PAH contamination? A multimarker approach" **Chemosphere**. 86(9): 875-882.
- Celander, M. C. 2011. "Cocktail effects on biomarker responses in fish" **Aquatic Toxicology**. 105(3): 72-77.
- Cerniglia, C. E., Gibson, D. T. and Van Baalen, C. 1980. "Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae" **Microbiology**. 116(2): 495-500.
- Chaisuksant, Y., Yu, Q. and Connell, D. W. 1999. "The internal critical level concept of nonspecific toxicity Reviews of environmental contamination and toxicology" **Springer**. pp. 1-41:
- Cheung, C., Zheng, G., Li, A., Richardson, B. and Lam, P. 2001. "Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*" **Aquatic Toxicology**. 52(3): 189-203.
- Chevion, M., Stegeman, J. J., Peisach, J. and Blumberg, W. 1977. "Electron paramagnetic resonance studies on hepatic microsomal cytochrome P-450 from a marine teleost fish" **Life Sciences**. 20(5): 895-899.
- Christensen, M., Andersen, O. and Banta, G. T. 2002. "Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*" **Aquatic Toxicology**. 58(1): 15-25.
- Clemons, J., Allan, L., Marvin, C., Wu, Z., McCarry, B., Bryant, D. and Zacharewski, T. 1998. "Evidence of estrogen-and TCDD-like activities in crude and fractionated extracts of PM10 air particulate material using in vitro gene expression assays" **Environmental Science & Technology**. 32(12): 1853-1860.
- Collier, T. K., Singh, S. V., Awasthi, Y. C. and Varanasi, U. 1992. "Hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in two species of benthic fish showing different prevalences of contaminant-associated liver neoplasms" **Toxicology and Applied Pharmacology**. 113(2): 319-324.
- Collier, T. K., Stein, J. E., Goksøyr, A., Myers, M. S., Gooch, J. W., Huggett, R. J. and Varanasi, U. 1995. "Biomarkers of PAH exposure in oyster toadfish (*Opsanus tau*) from the Elizabeth River, Virginia" **Marine Environmental Research**. 39(1-4): 348-349.

- Connell, D., Miller, G. and Farrington, J. 1981. "Petroleum hydrocarbons in aquatic ecosystems-behavior and effects of sublethal concentrations: Part 2" **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. 11(2): 105-162.
- Connell, D. W. 1988. "Bioaccumulation behavior of persistent organic chemicals with aquatic organisms" **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews**. 117-154. doi:10.1007/978-1-4612-3810-2_3
- Couillard, C. M., Laplatte, B. and Pelletier, É. 2009. "A fish bioassay to evaluate the toxicity associated with the ingestion of benzo [a] pyrene-contaminated benthic prey" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 28(4): 772-781.
- Couillard, C. M., Lee, K., Légaré, B. and King, T. L. 2005. "Effect of dispersant on the composition of the water-accommodated fraction of crude oil and its toxicity to larval marine fish" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 24(6): 1496-1504.
- Cross, W. E. and Thomson, D. H. 1987. "Effects of experimental releases of oil and dispersed oil on arctic nearshore macrobenthos. I. Infauna" **Arctic**. 184-200.
- Danis, B., Bustamante, P., Cotret, O., Teyssié, J.-L., Fowler, S. W. and Warnau, M. 2005. "Bioaccumulation of PCBs in the cuttlefish *Sepia officinalis* from seawater, sediment and food pathways" **Environmental Pollution**. 134(1): 113-122.
- De la Huz, R., Lastra, M., Junoy, J., Castellanos, C. and Vieitez, J. 2005. "Biological impacts of oil pollution and cleaning in the intertidal zone of exposed sandy beaches: preliminary study of the "Prestige" oil spill" **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 65(1): 19-29.
- Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G. and Schlichting, I. 2005. "Structure and chemistry of cytochrome P450" **Chemical Reviews**. 105(6): 2253-2278.
- Di Toro, D. M., Zarba, C. S., Hansen, D. J., Berry, W. J., Swartz, R. C., Cowan, C. E. and Paquin, P. R. 1991. "Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 10(12): 1541-1583.
- Domingos, F. V., Azevedo, M., Silva, M., Randi, M., Freire, C., de Assis, H. S. and Ribeiro, C. O. 2007. "Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators" **Environmental Research**. 105(3): 350-363.
- Dyrynda, E. A., Law, R. J., Dyrynda, P. E., Kelly, C. A., Pipe, R. K. and Ratcliffe, N. A. 2000. "Changes in immune parameters of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a

- major oil spill ('Sea Empress', Wales, UK)" **Marine Ecology Progress Series**. 206: 155-170.
- Egres, A. G., Martins, C. C., de Oliveira, V. M. and da Cunha Lana, P. 2012. "Effects of an experimental in situ diesel oil spill on the benthic community of unvegetated tidal flats in a subtropical estuary (Paranaguá Bay, Brazil)" **Marine Pollution Bulletin**. 64(12): 2681-2691.
- Fahl, W. E., Jefcoate, C. R. and Kasper, C. B. 1978. "Characteristics of benzo (a) pyrene metabolism and cytochrome P-450 heterogeneity in rat liver nuclear envelope and comparison to microsomal membrane" **Journal of Biological Chemistry**. 253(9): 3106-3113.
- Fanou, L. A., Mobio, T. A., Creppy, E. E., Fayomi, B., Fustoni, S., Møller, P. and Sanni, A. 2006. "Survey of air pollution in Cotonou, Benin-air monitoring and biomarkers" **Science of the Total Environment**. 358(1): 85-96.
- Farmer, P. B., Singh, R., Kaur, B., Sram, R. J., Binkova, B., Kalina, I. and Gabelova, A. 2003. "Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants: effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage" **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. 544(2): 397-402.
- Farrington, J., Tripp, B., Teal, J., Mille, G., Tjessem, K., Davis, A. and Frew, N. 1982. "Biogeochemistry of aromatic hydrocarbons in the benthos of microcosms" **Toxicological & Environmental Chemistry**. 5(3-4): 331-346.
- Fartoosi, F. M. A., 2013. "The impact of maritime oil pollution in the marine environment: case study of maritime oil pollution in the navigational channel of Shatt Al-Arab" World Maritime University. The Maritime Commons: Digital Repository of the World Maritime University. 99 pp.
- Ferraro, M., Fossi, M., Casini, S., Marsili, L., Mori, G., Stefanini, G. and Maltese, S. 2006. "Barnacles (*Balanus trigonus* and *Balanus perforatus*) as new bioindicators for ecotoxicological assessment of Mediterranean off-shore extraction" **Paper presented at the Marine Environmental Research**.
- Ferreira, M. M. 2001. "Polycyclic aromatic hydrocarbons: a QSPR study" **Chemosphere**. 44(2): 125-146.

- Fillmann, G., Watson, G. M., Howsam, M., Francioni, E., Depledge, M. H. and Readman, J. W. 2004. "Urinary PAH metabolites as biomarkers of exposure in aquatic environments" **Environmental Science & Technology**. 38(9): 2649-2656.
- Fleeger, J. W., Carman, K. R. and Nisbet, R. M. 2003. "Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems" **Science of The Total Environment**, 317(1): 207-233.
- Franck, H.-G. and Stadelhofer, J. W. 2012. "Industrial aromatic chemistry: raw materials processes products" **Springer Science & Business Media**.
- Franco, M., Viñas, L., Soriano, J., De Armas, D., González, J., Beiras, R. and Albaigés, J. 2006. "Spatial distribution and ecotoxicity of petroleum hydrocarbons in sediments from the Galicia continental shelf (NW Spain) after the Prestige oil spill" **Marine Pollution Bulletin**. 53(5): 260-271.
- Fukuyama, A. K., Shigenaka, G. and Coats, D. A. 2014. "Status of intertidal infaunal communities following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska" **Marine Pollution Bulletin**. 84(1): 56-69.
- Fux, E., McMillan, D., Bire, R. and Hess, P. 2007. "Development of an ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins" **Journal of Chromatography A**. 1157(1): 273-280.
- Galloway, T. S., Sanger, R. C., Smith, K. L., Fillmann, G., Readman, J. W., Ford, T. E. and Depledge, M. H. 2002. "Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays" **Environmental Science & Technology**. 36(10): 2219-2226.
- Galtsoff, P. S. 1964. "The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. US Fish. Wild" **Fishery Bulletin**. 64: 1-480.
- Gaspare, L., Machiwa, J. F., Mdachi, S. J., Streck, G. and Brack, W. 2009. "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination of surface sediments and oysters from the inter-tidal areas of Dares Salaam, Tanzania" **Environmental Pollution**. 157(1): 24-34.
- Gesteira, J. G. and Dauvin, J.-C. 2000. "Amphipods are good bioindicators of the impact of oil spills on soft-bottom macrobenthic communities" **Marine Pollution Bulletin**. 40(11): 1017-1027.

- Gesteira, J. G. and Dauvin, J.-C. 2005. "Impact of the Aegean Sea oil spill on the subtidal fine sand macrobenthic community of the Ares-Betanzos Ria (Northwest Spain)" **Marine Environmental Research**. 60(3): 289-316.
- Ghasemzadeh-Mohammadi, V., Mohammadi, A., Hashemi, M., Khaksar, R. and Haratian, P. 2012. "Microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish" **Journal of Chromatography A**. 1237: 30-36.
- Giessing, A., Mayer, L. M. and Forbes, T. L. 2003. "1-hydroxypyrene glucuronide as the major aqueous pyrene metabolite in tissue and gut fluid from the marine deposit-feeding polychaete *Nereis diversicolor*" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 22(5): 1107-1114.
- Gin, K. Y. H., Huda, M. K., Lim, W. K. and Tkalic, P. 2001. "An oil spill-food chain interaction model for coastal waters" **Marine Pollution Bulletin**. 42(7): 590-597.
- Glegg, G., Hickman, L. and Rowland, S. 1999. "Contamination of limpets (*Patella vulgata*) following the Sea Empress oil spill" **Marine Pollution Bulletin**. 38(2): 119-125.
- Gocht, T., Moldenhauer, K.-M. and Püttmann, W. 2001. "Historical record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and heavy metals in floodplain sediments from the Rhine River (Hessisches Ried, Germany)" **Applied Geochemistry**. 16(15): 1707-1721.
- Goksøyr, A. and Förlin, L. 1992. "The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring" **Aquatic Toxicology**. 22(4): 287-311.
- González, J., Figueiras, F., Aranguren-Gassis, M., Crespo, B., Fernández, E., Morán, X. and Nieto-Cid, M. 2009. "Effect of a simulated oil spill on natural assemblages of marine phytoplankton enclosed in microcosms" **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 83(3): 265-276.
- Gray, J. S. 2002. "Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist" **Marine Pollution Bulletin**. 45(1): 46-52.
- Guengerich, F. P. 2002. "Cytochrome P450 enzymes in the generation of commercial products. Nature reviews" **Drug Discovery**. 1(5): 359.

- Guengerich, F. P., Wu, Z.-L. and Bartleson, C. J. 2005. "Function of human cytochrome P450s: characterization of the orphans" **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 338(1): 465-469.
- Hannam, M. L., Bamber, S. D., Moody, A. J., Galloway, T. S. and Jones, M. B. 2010. "Immunotoxicity and oxidative stress in the Arctic scallop *Chlamys islandica*: Effects of acute oil exposure" **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 73(6): 1440-1448.
- Hinton, D. E. and Lauren, D. J. 1990. "Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes" Paper presented at the American Fisheries Society Symposium.
- Hoffman, E. J., Mills, G. L., Latimer, J. S. and Quinn, J. G. 1984. "Urban runoff as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons to coastal waters" **Environmental Science & Technology**. 18(8): 580-587.
- Hong, H.-K., Donaghy, L., Kang, C.-K., Kang, H.-S., Lee, H.-J., Park, H.-S. and Choi, K.-S. 2016. "Substantial changes in hemocyte parameters of Manila clam *Ruditapes philippinarum* two years after the Hebei Spirit oil spill off the west coast of Korea" **Marine Pollution Bulletin**. 108(1), 171-179.
- Hosnedl, T., Hajšlová, J., Kocourek, V., Tomaniová, M. and Volka, K. 2003. "1-hydroxypyrene as a biomarker for fish exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons" **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 71(3): 0465-0472.
- Howsam, M., Jones, K. C. and Ineson, P. 2000. "PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. I—concentrations and profiles" **Environmental Pollution**. 108(3): 413-424.
- Hylland, K. 2006. "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems" **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. 69(1-2): 109-123.
- Ikenaka, Y., Ishizaka, M., Eun, H. and Miyabara, Y. 2007. "Glucose-sulfate conjugates as a new phase II metabolite formed by aquatic crustaceans" **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 360(2): 490-495.
- Ikenaka, Y., Oguri, M., Saengtienchai, A., Nakayama, S. M., Ijiri, S. and Ishizuka, M. 2013. "Characterization of phase-II conjugation reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish species: Unique pyrene metabolism and species specificity observed in fish species" **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 36(2): 567-578.

- Incardona, J. P., Carls, M. G., Teraoka, H., Sloan, C. A., Collier, T. K. and Scholz, N. L. 2005. "Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development" **Environmental Health Perspectives**. 113(12): 1755.
- Jackson, J. B., Cubit, J. D., Keller, B. D., Batista, V., Burns, K., Caffey, H. M. and Gonzalez, C. 1989. "Ecological effects of a major oil spill on Panamanian coastal marine communities" **Science**. 243(4887): 37-44.
- Jacob, J. 2008. "The significance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. 35 years research on PAH-a retrospective" **Polycyclic Aromatic Compounds**. 28(4-5): 242-272.
- Jeong, W.-G. and Cho, S.-M. 2007. "Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*" **Aquaculture**. 265(1): 343-350.
- Jewett, S. C., Dean, T. A., Smith, R. O. and Blanchard, A. 1999. "Exxon Valdez'oil spill: impacts and recovery in the soft-bottom benthic community in and adjacent to eelgrass beds" **Marine Ecology Progress Series**. 59-83.
- João, R. M., Paíga, P., Morais, S., Delerue-Matos, C. and Prior Pinto Oliveira, M. B. 2009. "Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method" **Journal of Separation Science**. 32(20): 3529-3538.
- Johnson, Y. S. 2012. "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Seafood by QuEChERS-Based Extraction and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry" **Journal of Food Science**. 77(7).
- Jongeneelen, F. J. 2001. "Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons" **Annals of Occupational Hygiene**. 45(1): 3-13.
- Jørgensen, A., Giessing, A., Rasmussen, L. J. and Andersen, O. 2005. "Biotransformation of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene in the marine polychaete *Nereis virens*" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 24(11): 2796-2805.
- Jönsson, E. M., Abrahamson, A., Brunström, B. and Brandt, I. 2006. "Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo [a] pyrene and 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl" **Aquatic Toxicology**. 79(3): 226-232.

- Jørgensen, A., Giessing, A., Rasmussen, L. J. and Andersen, O. 2005. "Biotransformation of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene in the marine polychaete *Nereis virens*" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 24(11): 2796-2805.
- Jung, J.-H., Kim, M., Yim, U. H., Ha, S. Y., An, J. G., Won, J. H. and Shim, W. J. 2011. "Biomarker responses in pelagic and benthic fish over 1 year following the Hebei Spirit oil spill (Taean, Korea)" **Marine Pollution Bulletin**. 62(8): 1859-1866.
- Khan, R. 1990. "Parasitism in marine fish after chronic exposure to petroleum hydrocarbons in the laboratory and to the Exxon Valdez oil spill" **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 44(5): 759-763.
- Kim, M., Kennicutt, M. C. and Qian, Y. 2006. "Molecular and stable carbon isotopic characterization of PAH contaminants at McMurdo Station, Antarctica" **Marine Pollution Bulletin**. 52(12): 1585-1590.
- King, A., Readman, J. and Zhou, J. 2004. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry" **Analytica Chimica Acta**. 523(2): 259-267.
- Kingston, P. F. 2002. "Long-term environmental impact of oil spills" **Spill Science & Technology Bulletin**. 7(1): 53-61.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y. and 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(2): 124-132.
- Klasing, S. and Brodberg, R. 2010. "Report on the Safety of Consuming Fish and Shellfish from Areas Impacted by the T/V Dubai Star Oil Spill in San Francisco Bay, California" CEP Agency. Sacramento.
- Kleinow, K. M., Melancon, M. J. and Lech, J. J. 1987. "Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish" **Environmental Health Perspectives**. 71: 105.
- Klerks, P. L., Nyman, J. A. and Bhattacharyya, S. 2004. "Relationship between hydrocarbon measurements and toxicity to a chironomid, fish larva and daphnid for oils and oil spill chemical treatments in laboratory freshwater marsh microcosms" **Environmental Pollution**. 129(3): 345-353.

- Kocan, R. and Landolt, M. 1984. "Alterations in patterns of excretion and other metabolic functions in developing fish embryos exposed to benzo (a) pyrene" **Helgolander Meeresuntersuchungen**. 37(1): 493.
- Konne, J. L. and Edori, O. S. 2013. "Crude oil mediated electrolytes changes in bay scallops after short term exposure" **Journal of Natural Science Research**. 3(15): 21-25.
- Kvitvang, H. F., Andreassen, T., Adam, T., Villas-Bôas, S. G. and Bruheim, P. 2011. "Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids" **Analytical Chemistry**. 83(7): 2705-2711.
- Lam, K. K. 2002. "Escape responses of intertidal gastropods on a subtropical rocky shore in Hong Kong" **Journal of Molluscan Studies**. 68(4): 297-306.
- Laughlin, R. and Linden, O. 1983. "Oil pollution and Baltic mysids: acute and chronic effects of the water soluble fractions of light fuel oil on the mysid shrimp *Neomysis integer*" **Marine ecology progress series**. 29-41.
- Law, A. 1995. "Toxicity study of the oil dispersant Corexit 9527 on *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) egg hatchability by using a flow-through bioassay technique" **Environmental Pollution**. 88(3): 341-343.
- Law, R. J. and Hellou, J. 1999. "Contamination of fish and shellfish following oil spill incidents" **Environmental Geosciences**. 6(2): 90-98.
- Law, R. J. and Kelly, C. 2004. "The impact of the "Sea Empress" oil spill" **Aquatic Living Resources**. 17(3): 389-394.
- Lee, K., Boufadel, M., Chen, B., Foght, J., Hodson, P., Swanson, S. and Venosa, A. 2015. "The Behaviour and Environmental Impacts of Crude Oil Released into Aqueous Environments" The Royal Society of Canada, Ottawa.
- Lee, R. F. and Anderson, J. W. 2005. "Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills" **Marine Pollution Bulletin**. 50(7): 705-723.
- Librando, V., Hutzinger, O., Tringali, G. and Aresta, M. 2004. "Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments and soil samples" **Chemosphere**. 54(8): 1189-1197.

- Lim, H.-H. and Shin, H.-S. 2013. "Simultaneous determination of 2-naphthol and 1-hydroxypyrene in fish and shellfish contaminated with crude oil by gas chromatography–mass spectrometry" **Food Chemistry**. 138(2): 791-796.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. and Fernie, A. R. 2006. "Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants" **Nature protocols**. 1(1): 387.
- Livingstone, D. R. 1993. "Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment" **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 57(3): 195-211.
- Long, E. R., Macdonald, D. D., Smith, S. L. and Calder, F. D. 1995. "Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments" **Environmental Management**. 19(1): 81-97.
- Lutier, S., Maître, A., Bonneterre, V., Bicout, D. J., Marques, M., Persoons, R. and Barbeau, D. 2016. "Urinary elimination kinetics of 3-hydroxybenzo (a) pyrene and 1-hydroxypyrene of workers in a prebake aluminum electrode production plant: Evaluation of diuresis correction methods for routine biological monitoring" **Environmental Research**. 147: 469-479.
- Ma, J., Xiao, R., Li, J., Yu, J., Zhang, Y. and Chen, L. 2010. "Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry" **Journal of Chromatography A**. 1217(34): 5462-5469.
- Mäenpää, K., Leppänen, M. and Kukkonen, J. 2009. "Sublethal toxicity and biotransformation of pyrene in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta)" **Science of The Total Environment**. 407(8): 2666-2672.
- Malins, D. C., McCain, B. B., Myers, M., Brown, D. W., Krahn, M. M., Roubal, W. and Chan, S. L. 1987. "Field and laboratory studies of the etiology of liver neoplasms in marine fish from Puget Sound" **Environmental Health Perspectives**. 71: 5.
- Manoli, E. and Samara, C. 1999. "Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis" **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. 18(6): 417-428.
- Martorell, I., Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J. M. and Domingo, J. L. 2010. "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the

- population of Catalonia, Spain: temporal trend” **Environment International**. 36(5): 424-432.
- Maskaoui, K., Zhou, J., Hong, H. and Zhang, Z. 2002. “Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Jiulong River estuary and Western Xiamen Sea, China” **Environmental Pollution**. 118(1): 109-122. .
- McKenna, A. M., Nelson, R. K., Reddy, C. M., Savory, J. J., Kaiser, N. K., Fitzsimmons, J. E. and Rodgers, R. P. 2013. “Expansion of the analytical window for oil spill characterization by ultrahigh resolution mass spectrometry: Beyond gas chromatography” **Environmental Science & Technology**. 47(13): 7530-7539.
- Mehanna, S.F.; Al-Kharusi, L. and Al-habs, S. (2014). “Population dynamics of the pharaoh cuttlefish *Sepia pharaonis* (Mollusca: Cephalopoda) in the Arabian Sea coast of Oman” **Indian Journal Fish**. 61(1):7-11.
- Mondol, M. R., Keshavmurthy, S., Lee, H.-J., Hong, H.-K., Park, H.-S., Park, S.-R. and Choi, K.-S. 2015. “Recovery of wild Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in terms of reproduction and gametogenesis two-years after the Hebei Spirit Oil Spill Accident off the West Coast of Korea” **Continental Shelf Research**. 111: 333-341.
- Moore, M., Livingstone, D., Widdows, J., Lowe, D., Pipe, R. and Jones, R. 1987. “Molecular, cellular and physiological effects of oil-derived hydrocarbons on molluscs and their use in impact assessment” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 603-623.
- Moore, M. N. and Simpson, M. G. 1992. “Molecular and cellular pathology in environmental impact assessment” **Aquatic Toxicology**. 22(4): 313-322.
- Morales-Caselles, C., Riba, I. and DelValls, T. Á. 2009. “A weight of evidence approach for quality assessment of sediments impacted by an oil spill: the role of a set of biomarkers as a line of evidence” **Marine Environmental Research**. 67(1): 31-37.
- Myers, M. S., Landahl, J. T., Krahn, M. M. and McCain, B. B. 1991. “Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the US West Coast” **Environmental Health Perspectives**. 90: 7.
- Nácher-Mestre, J., Serrano, R., Benedito-Palos, L., Navarro, J. C., López, F. J., Kaushik, S. and Pérez-Sánchez, J. 2010. “Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) exposed to long term feeding trials with different

- experimental diets” **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 59(1): 137-146.
- Nagelkerken, I. A. and Debrot, A. O. 1995. “Mollusc communities of tropical rubble shores of Curaçao: long-term (7+ years) impacts of oil pollution” **Marine Pollution Bulletin**. 30(9): 592-598.
- Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y. and Johnson, E. F. 1991. “The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature” **DNA and Cell Biology**. 10(1): 1-14.
- Neff, J. M. and Burns, W. A. 1996. “Estimation of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in the water column based on tissue residues in mussels and salmon: An equilibrium partitioning approach” **Environmental Toxicology and Chemistry**. 15(12): 2240-2253.
- Neff, J. M., Stout, S. A. and Gunster, D. G. 2005. “Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: identifying sources and ecological hazard” **Integrated Environmental Assessment and Management**. 1(1): 22-33.
- Newey, S. and Seed, R. 1995. “The effects of the Braer oil spill on rocky intertidal communities in South Shetland, Scotland” **Marine Pollution Bulletin**. 30(4): 274-280.
- Nicodem, D. E., Guedes, C. L., Correa, R. J. and Fernandes, M. C. Z. 1997. “Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills” **Biogeochemistry**. 39(2): 121-138.
- Onwurah, I., Ogugua, V., Onyike, N., Ochonogor, A. and Otitoju, O. 2007. “Crude oil spills in the environment, effects and some innovative clean-up biotechnologies” **International Journal of Environmental Research**. 1(4): 307-320.
- Orbea, A., Garmendia, L., Marigómez, I. and Cajaraville, M. P. 2006. “Effects of the ‘Prestige’ oil spill on cellular biomarkers in intertidal mussels: results of the first year of studies” **Marine Ecology Progress Series**. 306: 177-189.
- Pacheco, M. and Santos, M. A. 2002. “Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.)” **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 53(3): 331-347.

- Pampanin, D. M. and Sydnes, M. O. 2013. "Polycyclic aromatic hydrocarbons a constituent of petroleum: presence and influence in the aquatic environment" **Hydrocarbon. Rijeka: InTech Prepress**. 83-118.
- Pelallo-Martínez, N. A., Batres-Esquivel, L., Carrizales-Yáñez, L. and Díaz-Barriga, F. M. 2014. "Genotoxic and hematological effects in children exposed to a chemical mixture in a petrochemical area in Mexico" **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 67(1): 1-8.
- Pengchai, P., Chantara, S., Sopajaree, K., Wangkarn, S., Tengcharoenkul, U. and Rayanakorn, M. 2009. "Seasonal variation, risk assessment and source estimation of PM 10 and PM10-bound PAHs in the ambient air of Chiang Mai and Lamphun, Thailand" **Environmental Monitoring and Assessment**. 154(1): 197-218.
- Pereira, W. E., Hostettler, F. D., Luoma, S. N., van Geen, A., Fuller, C. C. and Anima, R. J. 1999. "Sedimentary record of anthropogenic and biogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Bay, California" **Marine Chemistry**. 64(1): 99-113.
- Pérez-Cadahía, B., Laffon, B., Pásaro, E. and Méndez, J. 2004. "Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil" **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 138(4): 453-460.
- Peterson, C. H. 2001. "The "Exxon Valdez" oil spill in Alaska: Acute, indirect and chronic effects on the ecosystem *Advances in Marine Biology*" Vol. 39, pp. 1-103: Academic Press.
- Peterson, C. H., Rice, S. D., Short, J. W., Esler, D., Bodkin, J. L., Ballachey, B. E. and Irons, D. B. 2003. "Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill" **Science**. 302(5653): 2082-2086.
- Pointet, K. and Milliet, A. 2000. "PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camargue by GC/MS" **Chemosphere**. 40(3): 293-299.
- Poster, D. L., Schantz, M. M., Sander, L. C. and Wise, S. A. 2006. "Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods" **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 386(4): 859-881.
- Prakash, D. and Gupta, K.R. 2009. "Antioxidant phytochemicals of nutraceutical importance" **The Open Nutraceuticals Journal**. 2: 22-36.

- Readman, J., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve, J.-P., Catinni, C. and Mee, L. 2002. "Petroleum and PAH contamination of the Black Sea" **Marine Pollution Bulletin**. 44(1): 48-62.
- Readman, J., Mantoura, R., Rhead, M. and Brown, L. 1982. "Aquatic distribution and heterotrophic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the Tamar Estuary" **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 14(4): 369-389.
- Reddy, C. M. and Quinn, J. G. 1999. "GC-MS analysis of total petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater samples after the North Cape oil spill" **Marine Pollution Bulletin**. 38(2): 126-135.
- Reilly, T. J. 1999. "The use of mesocosms in marine oil spill ecological research and development" **Pure and Applied Chemistry**. 71(1): 153-160.
- Rewitz, K., Kjellerup, C., Jørgensen, A., Petersen, C. and Andersen, O. 2004. "Identification of two *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) cytochromes P450 and induction by xenobiotics" **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 138(1): 89-96.
- Rice, S. D., Moles, A., Karinen, J. F., Korn, S., Carls, M., Brodersen, C. C. and Babcock, M. M. 1984. "Effects of petroleum hydrocarbons on Alaskan aquatic organisms: a comprehensive review of all oil-effects research on Alaskan fish and invertebrates conducted by the Auke Bay Laboratory, 1970-1981" NOAA. Technical Memorandum NMFS F/NWC-67.
- Rogers, D. E., Wangerin, M. E., Rogers, B. J., Garrison, K. J. and Rabin, D. J. 1979. "Seasonal composition and food web relationships of marine organisms in the nearshore zone of Kodiak Island--including ichthyoplankton, meroplankton (shellfish), zooplankton, and fish"
- Ros, J. D. and Cardell, M. J. 1991. "Effect on benthic communities of a major input of organic matter and other pollutants (coast off Barcelona, western Mediterranean)" **Toxicological & Environmental Chemistry**. 31(1): 441-450.
- Ryan, J. A. and Hightower, L. E. 1994. "Evaluation of heavy-metal ion toxicity in fish cells using a combined stress protein and cytotoxicity assay" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 13(8): 1231-1240.

- Samakraman, S., Williams, G. A. and Ganmanee, M. (2010). "Spatial and temporal variability of intertidal rocky shore bivalves and gastropods in Sichang Island, East Coast of Thailand" **the Seto Marine Biological Laboratory**, Special Publication Series 10, 35-46
- Samanta, S. K., Singh, O. V. and Jain, R. K. 2002. "Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation" **TRENDS in Biotechnology**. 20(6): 243-248.
- Sánchez-Brunete, C., Miguel, E. and Tadeo, J. L. 2007. "Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid" **Journal of Chromatography A**. 1148(2): 219-227.
- Sánchez, F., Velasco, F., Cartes, J., Olaso, I., Preciado, I., Fanelli, E. and Gutierrez-Zabala, J. 2006. "Monitoring the Prestige oil spill impacts on some key species of the Northern Iberian shelf" **Marine Pollution Bulletin**. 53(5): 332-349.
- Schlacher, T. A., Holzheimer, A., Stevens, T. and Rissik, D. 2011. "Impacts of the 'Pacific Adventurer' oil spill on the macrobenthos of subtropical sandy beaches" **Estuaries and Coasts**. 34(5): 937-949.
- Schmidt, J. V. and Bradfield, C. A. 1996. "Ah receptor signaling pathways" **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. 12(1): 55-89.
- Secombes, C., Fletcher, T., O'flynn, J., Costello, M., Stagg, R. and Houlihan, D. 1991. "Immunocompetence as a measure of the biological effects of sewage sludge pollution in fish" **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**. 100(1-2): 133-136.
- Seiler, T.-B., Best, N., Fernqvist, M. M., Hercht, H., Smith, K. E., Braunbeck, T. and Hollert, H. 2014. "PAH toxicity at aqueous solubility in the fish embryo test with *Danio rerio* using passive dosing" **Chemosphere**. 112: 77-84.
- Shahab, L., West, R. and McNeill, A. 2009. "Clinical Study: A comparison of exposure to carcinogens among roll-your-own and factory-made cigarette smokers" **Addiction Biology**. 14(3): 315-320.
- Shahtaheri, S. J., Ibrahimi, L., Golbabaee, F., Hosseini, M. and Fouladi Dehghi, B. 2007. "Solid phase extraction for 1-hydroxypyrene as a biomarker of occupational exposure to PAHs

- prior to high performance liquid chromatography.” **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)**. 26(4): 75-81.
- Shi, Z., Tao, S., Pan, B., Fan, W., He, X., Zuo, Q. and Liu, W. 2005. “Contamination of rivers in Tianjin, China by polycyclic aromatic hydrocarbons” **Environmental Pollution**. 134(1): 97-111.
- Shimada, T. 2006. “Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons” **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. 21(4): 257-276.
- Shimada, T. and Fujii-Kuriyama, Y. 2004. “Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1” **Cancer Science**. 95(1): 1-6.
- Shin, H.-S. and Lim, H.-H. 2011. “Simultaneous determination of 2-naphthol and 1-hydroxypyrene in fish and shellfish contaminated with crude oil by gas chromatography-mass spectrometry” **Food Chemistry**. 197-197.
- Shriadah, M. M. 1998. “Impacts of an oil spill on the marine environment of the United Arab Emirates along the Gulf of Oman” **Marine Pollution Bulletin**. 36(11): 876-879.
- Sim, P., Boyd, R., Gershey, R., Guevremont, R., Jamieson, W., Quilliam, M. and Gergely, R. 1987. “A comparison of chromatographic and chromatographic/mass spectrometric techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments” **Biological Mass Spectrometry**. 14(8): 375-381.
- Simboura, N. and Zenetos, A. 2002. “Benthic indicators to use in ecological quality classification of Mediterranean soft bottom marine ecosystems, including a new biotic index” **Mediterranean Marine Science**. 3(2): 77-112.
- Snyder, R. A., Vestal, A., Welch, C., Barnes, G., Pelot, R., Ederington-Hagy, M. and Hileman, F. 2014. “PAH concentrations in *Coquina (Donax spp.)* on a sandy beach shoreline impacted by a marine oil spill” **Marine Pollution Bulletin**. 83(1): 87-91.
- Song, X., Li, J., Xu, S., Ying, R., Ma, J., Liao, C. and Chen, L. 2012. “Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater using molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry” **Talanta**. 99: 75-82.

- Stegeman, J. J. and Lech, J. J. 1991. "Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure" **Environmental Health Perspectives**. 90: 101.
- Stephensen, E., Adolfsson-Erici, M., Celander, M., Hulander, M., Parkkonen, J., Hegelund, T. and Förlin, L. 2003. "Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of polycyclic aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber" **Environmental Toxicology and Chemistry**. 22(12): 2926-2931.
- Strachan, A. 1972. "Santa Barbara Oil Spill-Intertidal and Subtidal Surveys Calif" **Cooperative Oceanic Fish**. 16, 122.
- Suteau, P., Daubeze, M., Migaud, M. and Narbonne, J. 1988. "PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring" **Marine Ecology Progress Series**. 46(1): 45-49.
- Tairova, Z. M., Giessing, A. M., Hansen, R. and Andersen, O. 2009. "1-Hydroxypyrene as a biomarker of PAH exposure in the marine polychaete *Nereis diversicolor*" **Marine Environmental Research**. 67(1): 38-46.
- Tairova, Z. M., Strand, J., Chevalier, J. and Andersen, O. 2012. "PAH biomarkers in common eelpout (*Zoarces viviparus*) from Danish waters" **Marine Environmental Research**. 75: 45-53.
- Takeuchi, I., Miyoshi, N., Mizukawa, K., Takada, H., Ikemoto, T., Omori, K. and Tsuchiya, K. 2009. "Biomagnification profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols and polychlorinated biphenyls in Tokyo Bay elucidated by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotope ratios as guides to trophic web structure" **Marine Pollution Bulletin**. 58(5): 663-671.
- Talaska, G., Gaultney, B., Peters, S., Succop, P. and Vermeulen, R. 2012. "2-Naphthol levels and genotoxicity in rubber workers" **Toxicology Letters**. 213(1): 45-48.
- Taylor, J. 1990. "Field observations of prey selection by the muricid gastropods *Thais clavigera* and *Morula musiva* feeding on the intertidal oyster *Saccostrea cucullata*" Paper presented at the Proceedings of the Second International Marine Biological Workshop: the Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China, Hong Kong. (Ed. B. Morton.)
- Tolosa, I., De Mora, S. J., Fowler, S. W., Villeneuve, J.-P., Bartocci, J. and Cattini, C. 2005. "Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman" **Marine Pollution Bulletin**. 50(12): 1619-1633.

- Tronczyński, J., Munsch, C., Héas-Moisan, K., Guiot, N., Truquet, I., Olivier, N. and Furaut, A. 2004. "Contamination of the Bay of Biscay by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) following the T/V "Erika" oil spill" **Aquatic Living Resources**. 17(3): 243-259.
- Trzesicka-Mlynarz, D. and Ward, P. 1996. "Degradation of fluoranthene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria" **Biotechnology Letters**. 18(2): 181-186.
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. P. 2003. "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review" **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 13(2): 57-149.
- Van Veld, P., Vetter, R., Lee, R. and Patton, J. 1987. "Dietary fat inhibits the intestinal metabolism of the carcinogen benzo [a] pyrene in fish" **Journal of Lipid Research**. 28(7): 810-817.
- Varanasi, U., Stein, J. E., Nishimoto, M., Reichert, W. L. and Collier, T. K. 1987. "Chemical carcinogenesis in feral fish: uptake, activation, and detoxication of organic xenobiotics" **Environmental Health Perspectives**. 71: 155.
- Velando, A., Munilla, I., Lopez-Alonso, M., Freire, J. and Perez, C. 2010. "EROD activity and stable isotopes in seabirds to disentangle marine food web contamination after the Prestige oil spill" **Environmental Pollution**. 158(5): 1275-1280.
- Verma, N., Pink, M., Rettenmeier, A. W. and Schmitz-Spanke, S. 2012. "Review on proteomic analyses of benzo [a] pyrene toxicity" **Proteomics**. 12(11): 1731-1755.
- Viguri, J., Verde, J. and Irabien, A. 2002. "Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain" **Chemosphere**. 48(2): 157-165.
- Vila, J., Zaira L., Jordi S., Cristina M., Anna M. S. and Magdalena, G. 2001. "Identification of a Novel Metabolite in the Degradation of Pyrene by Mycobacterium sp. Strain AP1: Actions of the Isolate on Two- and Three-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons" **Applied and Environmental Microbiology**. 67(12): 5497-5505.
- Vuontisjärvi, H., Keinänen, M., Vuorinen, P. J. and Peltonen, K. 2004. "A comparison of HPLC with fluorescence detection and fixed wavelength fluorescence methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile" **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 62(12): 2685-2691.

- Wang, L., Yang, Z., Niu, J. and Wang, J. 2009. "Characterization, ecological risk assessment and source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons in water column of the Yellow River Delta, one of the most plenty biodiversity zones in the world" **Journal of Hazardous Materials**. 169(1): 460-465.
- Wang, Z., Fingas, M. and Page, D. S. 1999. "Oil spill identification" **Journal of Chromatography A**. 843(1): 369-411.
- Watson, G. M., Andersen, O.-K., Galloway, T. S. and Depledge, M. H. 2004. "Rapid assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in decapod crustaceans by fluorimetric analysis of urine and haemolymph" **Aquatic Toxicology**. 67(2): 127-142.
- Wessel, N., Menard, D., Pichavant-Rafini, K., Ollivier, H., Le Goff, J., Burgeot, T. and Akchal, F. 2010. "The toxicity of benzo [a] pyrene on sole (*Solea solea*) hepatocytes: assessment of genotoxic and enzymatic effects" **Polycyclic Aromatic Compounds**. 30(5): 346-354.
- Whyte, J. J., Jung, R., Schmitt, C. and Tillitt, D. 2000. "Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure" **Critical Reviews in Toxicology**. 30(4): 347-570.
- Wilhelm, M., Hardt, J., Schulz, C., Angerer, J. and Agency, H. B. 2008. "New reference value and the background exposure for the PAH metabolites 1-hydroxypyrene and 1-and 2-naphthol in urine of the general population in Germany: basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine" **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 211(3): 447-453.
- Wills, L. P., Jung, D., Koehn, K., Zhu, S., Willett, K. L., Hinton, D. E. and Di Giulio, R. T. 2010. "Comparative chronic liver toxicity of benzo [a] pyrene in two populations of the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different exposure histories" **Environmental Health Perspectives**. 118(10): 1376.
- Xu, S., Song, J., Yuan, H., Li, X., Li, N., Duan, L. and Yu, Y. 2011. "Petroleum hydrocarbons and their effects on fishery species in the Bohai Sea, North China" **Journal of Environmental Sciences**. 23(4): 553-559.
- Yamada, M., Takada, H., Toyoda, K., Yoshida, A., Shibata, A., Nomura, H. and Ohwada, K. 2003. "Study on the fate of petroleum-derived polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the effect of chemical dispersant using an enclosed ecosystem, mesocosm" **Marine Pollution Bulletin**. 47(1): 105-113.

- Yamamoto, T., Nakaoka, M., Komatsu, T., Kawai, H., Ohwada, K. and Takeno, M. L. R. G. o. 2003. "Impacts by heavy-oil spill from the Russian tanker Nakhodka on intertidal ecosystems: recovery of animal community" **Marine Pollution Bulletin**. 47(1): 91-98.
- Yender, R., Michel, J. M. and Lord, C. 2002. Managing seafood safety after an oil spill: US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, Office of Response and Restoration.
- Young, J. W., Lansdell, M. J., Campbell, R. A., Cooper, S. P., Juanes, F. and Guest, M. A. 2010. "Feeding ecology and niche segregation in oceanic top predators off eastern Australia" **Marine Biology**. 157(11): 2347-2368.
- Young, J. W., Skewes, T., Lyne, V., Hook, S., Revill, A., Condie, S. and Molony, B. 2011. A review of the fisheries potentially affected by the Montara oil spill off Northwest Australia and potential toxicological effects. Hobart: CSIRO Marine and Atmospheric Research.
- Yu, O. H., Lee, H.-G., Shim, W. J., Kim, M. and Park, H. S. 2013. "Initial impacts of the Hebei Spirit oil spill on the sandy beach macrobenthic community west coast of Korea" **Marine Pollution Bulletin**. 70(1): 189-196.
- Yuewen, D. and Adzibli L. 2018. "Assessing the Impact of Oil Spills on Marine Organisms" **Journal of Oceanography and Marine Research**. 6:1.
- Zakaria, M. P., Okuda, T. and Takada, H. 2001. "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and hopanes in stranded tar-balls on the coasts of Peninsular Malaysia: applications of biomarkers for identifying sources of oil pollution" **Marine Pollution Bulletin**. 42(12): 1357-1366.
- Zakaria, M. P., Takada, H., Tsutsumi, S., Ohno, K., Yamada, J., Kouno, E. and Kumata, H. 2002. "Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rivers and estuaries in Malaysia: a widespread input of petrogenic PAHs" **Environmental Science & Technology**. 36(9): 1907-1918.
- Zaki, M. S., Authman, M. M., Ata, N. S., Abdelzaher, M. and Hammam, A. 2014. "Effects of environmental oil spills on commercial fish and shellfish in Suez Canal and Suez Gulf regions" **Life Science Journal**. 11(2): 269-274.

Zhang, W., Song, Y., Gong, P., Sun, T., Zhou, Q. and Liu, M. 2006. "Earthworm cytochrome P450 determination and application as a biomarker for diagnosing PAH exposure" **Journal of Environmental Monitoring**. 8(9): 963-967.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. ชนิดของสัตว์ทะเลหน้าดินที่พบในพื้นที่ศึกษาของหาดหิน อ่าวพร้าวและอุทยานแห่งชาติเขาแหลมหญ้า หมู่เกาะเสม็ด



หอยน้ำพริก (*Monodonta labrio*)



หอยจี่ตา (*Echinolittorina malaccana*)



หอยแฉลบ (*Isognomon nucleus*)



หอยจี่ตา (*Echinolittorina radiata*)



หอยครองแครง (*Planaxis sulcatus*)



หอยฝาเดียว (*Peasiella roepsotroffiana*)

ภาพภาคผนวกที่ 1 แสดงชนิดของสัตว์ทะเลหน้าดินที่พบในพื้นที่ศึกษา

ที่มา: www.marinespecies.org



กลุ่มหอยยาชี (limpet)



หอยมะระ (*Morula musiva*)



หอยนารมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)



ลีนทะเล (*Acanthopleura japonica*)

ภาพภาคผนวกที่ 2 แสดงชนิดของสัตว์ทะเลหน้าดินที่พบในพื้นที่ศึกษา

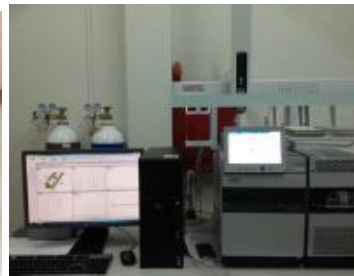
ที่มา: www.marinespecies.org

ภาคผนวก ข. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐาน การวิเคราะห์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของ polycyclic aromatic hydrocarbons ในมลลัสก์ที่ได้รับผลกระทบจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วไหล

สารเคมี



ขั้นตอนการวิเคราะห์



ภาคผนวก ค. การจัดทำระบบทดลองเลียนแบบธรรมชาติ

