รายงานผลการวิจัย
ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555

เรื่อง

ความผิดปกติทางเพศของหอยทะเลฝาเดียวที่เกิดจากสารป้องกันการเกาะติดของสิ่งมีชีวิต ระยะที่ 3: การเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศ (Imposex induction) ในห้องปฏิบัติการ

Occurrence of Imposex in marine gastropods due to antifouling chemicals, 3rd phase: Imposex induction in Laboratory

ณิชยา ประดิษฐ์ทรัพย์
สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยความผิดปกติทางเพศของหอยทะเลฝาเดียวที่เกิดจากสารป้องกันการเกาะติดของสิ่งมีชีวิต ระยะที่ 3: การเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศ (Imposex induction) ในห้องปฏิบัติการ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555 ทั้งนี้งานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงได้นั้น นักวิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา วัฒยากร เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ขอขอบพระคุณคณะกรรมการประเมินโครงการ รองศาสตราจารย์ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปราโมทย์ โศจิศุภร ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขรายงานวิจัย ขอขอบพระคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์อย่างสูงที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ขอขอบคุณ คุณปรีชา เสนสิทธิ์ และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำทุกท่าน ที่ได้ช่วยประสานงานและอำนวยความสะดวกทำให้งานดำเนินไปด้วยความเรียบร้อย

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองชักนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยกับหอยทะเลในสกุล *Nassarius* sp. (วงศ์ Nassariidae) 2 ชนิด คือ *N. livecens* และ *N. stolatus* โดยการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในตะกอนทรายและทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อดูลักษณะความผิดปกติและอัตราการเกิดความผิดปกติดังกล่าว โดยหอยทะเลชนิด *N. livecens* เมื่อนำมาเลี้ยงในตะกอนทรายที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม และเก็บตัวอย่างเมื่อเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบอัตราการเกิดความผิดปกติ (% imposex) อยู่ระหว่าง 5.9 ถึง 33.3 และ 11.8 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าเฉลี่ยของระยะการพัฒนาความผิดปกติเพศหอย (vas deferens sequence index: VDSI) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.06 ถึง 0.33 และ 0.24 ถึง 1 ตามลำดับ ชนิด *N. stolatus* ได้ทำการเลี้ยงในตะกอนทรายที่เติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม จากการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบอัตราการเกิดความผิดปกติอยู่ระหว่าง 45 ถึง 77.8 และ 46.7 ถึง 79.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าเฉลี่ยของระยะการพัฒนาความผิดปกติเพศหอย (ค่า VDSI) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.45 ถึง 0.78 และ 0.57 ถึง 0.88 ตามลำดับ ความผิดปกติเพศหอยจากการศึกษาในหอยทะเลทั้งสองชนิดนี้มีแนวโน้มเกิดเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยงและความเข้มข้นของสารที่ได้เติมลงไป นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของระยะการพัฒนาความผิดปกติทางเพศกับการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลที่ได้ทำการทดลองพบมีความสัมพันธ์กันทั้งในชุดการทดลองของหอยทะเลชนิด *N. livecens* (r^2 = 0.64) และ *N. stolatus* (r^2 = 0.898)

คำสำคัญ: ความผิดปกติเพศหอย, สารไตรบิวทิลทิน, *Nassarius livecens*, *Nassarius stolatus*

Abstract

The objective of this study was to investigate imposex induction in 2 species of mud snail *Nassarius livecens* and *N. stolatus* in the laboratory. The mud snails were exposed to varied tributyltin concentration in the sediment for 8 weeks. *N. livecens* were reared in sediment contaminated with tributyltin chloride at the concentration of 10, 25, 50, 100, 500 and 1,000 ng/g. The occurrence of imposex at 4 and 8 weeks were ranged from 5.9 to 33.3 and 11.8 to 100 percent, while the vas deferens sequence index (VDSI) were range from 0.06 to 0.33 and 0.24 to 1, respectively. *N. stolatus* were also reared in contaminated sediment at the concentration of 25, 50, 100, 500 and 1,000 ng/g. After 4 and 8 weeks of rearing, the imposex percentages were ranged from 45 to 77.8 and 46.7 to 79.3 percent while VDSI were ranged from 0.45 to 0.78 and 0.57 to 0.88, respectively. The percentage of imposex and vas deferens sequence index (VDSI) tended to be increased with higher level of contamination in both species. Moreover, tributyltin accumulation in body tissue was also analyzed and showed the high correlation with VDSI in *N. livecens* (r^2 = 0.64) and *N. stolatus* (r^2 = 0.898).

Key words: imposex, tributlytin, *Nassarius livecens*, *Nassarius stolatus*

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	
บทคัดย่อ	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การทบทวนเอกสารและงานวิจัย	3
วิธีดำเนินการวิจัย	12
ผลการศึกษา	19
อภิปรายผลการศึกษา	34
สรุปผลการศึกษา	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	44

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ระดับการเกิดความผิดปกติทางเพศหรือลักษณะการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมของหอยทะเล ชนิด *N. livecens* และ *N. stolatus* จากการศึกษาในสภาพธรรมชาติและในห้องปฏิบัติการ	19
2	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติทางเพศ (% imposex) และค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอย (vas deferens sequence index; VDSI) เมื่อทำการเลี้ยงหอยทะเล ชนิด *N. livecens* ที่ระดับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์	44
3	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติทางเพศ (% imposex) และค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอย (vas deferens sequence index; VDSI) เมื่อทำการเลี้ยงหอยทะเล ชนิด *N. livecens* ที่ระดับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์	44
4	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติทางเพศ (% imposex) และค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอย (vas deferens sequence index; VDSI) เมื่อทำการเลี้ยงหอยทะเล ชนิด *N. stolatus* ที่ระดับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์	45
5	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติทางเพศ (% imposex) และค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอย (vas deferens sequence index; VDSI) เมื่อทำการเลี้ยงหอยทะเล ชนิด *N. stolatus* ที่ระดับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์	45

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	หอยทะเลวงศ์ Nassaridae ที่นำมาใช้ในการศึกษา (ก) *Nassarius livecens* (ข) *N. stolatus*	14
2	ลักษณะการอยู่อาศัยของหอยทะเลในสกุล *Nassarius* sp.	14
3	ตู้ทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศ	15
4	แผนผังขั้นตอนการสกัดสารในกลุ่มออแกโนตินในดินตะกอนและในสิ่งมีชีวิต	18
5	ลักษณะการพัฒนาท่อนำอสุจิเทียมที่บริเวณใกล้กับท่อนำไข่ในหอยทะเลชนิด *N. livecens* เพศเมีย (PV=ท่อนำอสุจิเทียม, RT=ก้านตาด้านขวา)	20
6	ลักษณะการพัฒนาท่อนำอสุจิเทียมที่บริเวณใกล้กับท่อนำไข่ในหอยทะเลชนิด *N. stolatus* เพศเมีย (PV=ท่อนำอสุจิเทียม, RT=ก้านตาด้านขวา)	20
7	ลักษณะการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมขนาดเล็กที่บริเวณด้านล่างขวาของก้านตาในหอยทะเลเพศเมีย (PP=อวัยวะเพศผู้เทียม, RT=ก้านตาด้านขวา)	21
8	ลักษณะหอยทะเลเพศผู้ ชนิด *N. livecens* (RT=ก้านตาด้านขวา, P=อวัยวะเพศผู้, V= ท่อนำอสุจิ)	21
9	เปอร์เซ็นต์การเกิดความผิดปกติทางเพศ (% imposex) ในหอยทะเลชนิด *N. livecens* ที่ทำการเลี้ยงในบ่อที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบช่วงสัปดาห์ที่ 4 และ 8	22
10	การพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมโดยดูจากค่า vas deference sequence index (VDSI) ของหอยทะเลชนิด *N. livecens* ที่ทำการเลี้ยงในบ่อที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบช่วงสัปดาห์ที่ 4 และ 8	23
11	สัดส่วนความผิดปกติทางเพศในระยะ (stage) ต่างๆ เมื่อเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. livecens* ในชุดการทดลองที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวบิลทินคลอไรด์ในทรายที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นระยะเวลา (ก) 4 สัปดาห์ และ (ข) 8 สัปดาห์	25
12	ปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื่อของหอยทะเลชนิด *N. livecens* ที่ได้เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีปริมาณการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์แตกต่างกัน	26
13	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความรุนแรงในการเกิดความผิดปกติทางเพศ (ค่า VDSI) และปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลชนิด *N. livecens*	27

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	เปอร์เซ็นต์การเกิดความผิดปกติทางเพศ (% imposex) ในหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ที่ทำการเลี้ยงในบ่อที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบผลการศึกษาในสัปดาห์ที่ 4 และ 8	28
15	การพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมโดยดูจากค่า VDSI ของหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ที่ทำการเลี้ยงในบ่อที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบผลการศึกษาในสัปดาห์ที่ 4 และ 8	29
16	สัดส่วนความผิดปกติทางเพศในระยะ (stage) ต่างๆ เมื่อเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ในชุดการทดลองที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวบิลทินคลอไรด์ในทรายที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นระยะเวลา (ก) 4 สัปดาห์ และ (ข) 8 สัปดาห์	30
17	ปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื้อของหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ที่ได้เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีปริมาณการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่แตกต่างกัน	31
18	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความรุนแรงในการเกิดความผิดปกติทางเพศ (ค่า VDSI) และปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ในเนื้อหอยทะเลชนิด *N. stolatus*	32
19	เปรียบเทียบการเกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลฝาเดียวชนิด *N. livecens* และ *N. stolatus* เมื่อชักนำโดยการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (นาโนกรัมต่อกรัม)	33

บทนำ

สารป้องกันการเกาะติดของสิ่งมีชีวิตหรือสีกันเพรียง เป็นสารที่มนุษย์สร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการป้องกันไม่ให้เพรียงและ/หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ มาเกาะที่เรือและวัสดุต่างๆที่ติดตั้งในทะเล ป้องกันการผุกร่อนของเรือและวัสดุที่ใช้ทา สารดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มออแกโนทิน (organotin) โดยเฉพาะสารไตรบิวทิลทิน (tributyltin; TBT) เป็นส่วนผสมในสีกันเพรียงที่มีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 1960 (Mensink, 1999; Harino, *et al*., 2006) หลังจากที่มีการใช้ประโยชน์จากสารดังกล่าวไปได้ระยะเวลาหนึ่ง พบว่ามีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบทางลบต่อสัตว์น้ำกลุ่มต่างๆ อาทิ กลุ่มหอย ปลา หรือสัตว์กลุ่มครัสเตเซียน (crustacean) โดยผลกระทบหนึ่งที่มีความสำคัญและได้รับผลกระทบเป็นวงกว้าง คือ การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเพศหรือที่เรียกว่า imposex กล่าวคือ สัตว์เพศเมียจะมีการพัฒนาระบบการสืบพันธุ์ของเพศผู้ (pseudopenis/pseudo vas deference) หรือเพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหอยทะเลฝาเดียว (marine gastropods) ทั้งนี้การเกิดความผิดปกติดังกล่าวมักจะแปรผันตามแหล่งกำเนิดและการปนเปื้อนสารในกลุ่มบิวทิลทินบริเวณชายฝั่งทะเล ได้แก่ บริเวณชายฝั่งทะเลที่มีกิจการท่าเรือการขนส่งทางทะเลขนาดใหญ่ การต่อเรือและการซ่อมเรือเดินทะเลขนาดใหญ่ และบริเวณพื้นที่อุตสาหกรรมหนัก รวมถึงกิจกรรมการเลี้ยงปลาในกระชัง (marine cage culture) ปัจจุบันสารดังกล่าวได้ถูกห้ามใช้แล้ว อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่มนี้สามารถสะสมในตะกอนดินได้เป็นเวลานานและสามารถฟุ้งกระจายกลับมาปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ ทำให้ยังคงเกิดผลกระทบอยู่

ในการศึกษาระยะที่ 1 และ 2 ของโครงการความผิดปกติทางเพศของหอยทะเลฝาเดียวที่เกิดจากสารป้องกันการเกาะติดของสิ่งมีชีวิต นักวิจัยได้ทำการศึกษาการเกิดความผิดปกติทางเพศของหอยทะเลฝาเดียวบริเวณชายฝั่งทะเลด้านตะวันออกของอ่าวไทย เพื่อศึกษาถึงความรุนแรงของผลกระทบจากการใช้สารในกลุ่มไตรบิวทิลทิน (TBT) ต่อหอยทะเลฝาเดียวตั้งแต่จังหวัดชลบุรีถึงจังหวัดตราด ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการใช้ประโยชน์แตกต่างกันทั้งที่เป็นท่าเรือขนาดใหญ่ บริเวณขนถ่ายสินค้า บริเวณที่เป็นการประมงพื้นบ้านรวมถึงบริเวณที่ใกล้กับแหล่งเพาะเลี้ยงเป็นต้น นอกจากนี้ได้ศึกษาถึงระดับการปนเปื้อนของสารกลุ่มบิวทิลทิน ได้แก่ ไตรบิวทิลทิน (TBT), ไดบิวทิลทิน (DBT) และ โมโนบิวทิลทิน (MBT) ในดินตะกอน และหอยทะเลฝาเดียวที่ตรวจพบการเกิด Imposex บางชนิด ในพื้นที่ศึกษาที่ได้กล่าวมาข้างต้น จากผลการศึกษาการสำรวจความผิดปกติเพศหอย (ระยะที่ 1) พบหอยทะเลที่แสดงความผิดปกติจำนวน 13 ชนิด (จากที่ทำการศึกษา 32 ชนิด) ได้แก่ *Hemifusus ternatanus, Pugilina cochlidium, Chicoreus capucinus, Murex trapa, Morula musiva, Thais lacera*, *Thais* sp. 1, *Thais* sp. 2, *Nassarius livescens*, *N. olivaceus*, *N. pullus*, *Nassarius* sp. 1, *Nassarius* sp. 2 โดยค่าเฉลี่ยของการเกิดความผิดปกติเพศหอยจะพบมากในบริเวณที่เป็นอู่เรือและท่าเรือ ซึ่งชนิดที่พบว่ามีการเกิดความผิดปกติสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่นๆที่ได้ทำการศึกษา คือ ชนิด *C. capucinus*, *N.*

pullus และ *N. livescens* โดยเฉพาะชนิด *N. livescens* ที่พบว่ามีสัดส่วนการเกิดความผิดปกติทางเพศถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในสถานีแหลมฉบัง (ณิชยา ประดิษฐ์ทรัพย์ และ นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์, 2553) ทั้งนี้ในการศึกษาระยะที่ 2 ได้มีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มบิวทิลทินในตะกอนทรายและในหอยทะเลชนิดที่พบมีความผิดปกติสูง พบว่ามีความสัมพันธ์กันกล่าวคือบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารกลุ่มบิวทิลทินในตะกอนทรายสูงจะพบว่ามีการปนเปื้อนในเนื้อหอยทะเลสูงเช่นกัน (ณิชยา ประดิษฐ์ทรัพย์, 2555)

ในการวิจัยในระยะที่ 3 นั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอย (imposex induction) ในห้องปฏิบัติการ ของหอยทะเลในสกุล *Nassarius* sp. (วงศ์ Nasaridae) เนื่องจากหอยทะเลในสกุลดังกล่าวพบว่าเกิดความผิดปกติสูงทั้งยังมีแนวโน้มสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อนของสารกลุ่มบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อม เพื่อศึกษาถึงการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมียเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้สภาพแวดล้อม (environmental indicator) และ/หรือเป็นข้อมูลเพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจติดตามการปนเปื้อนของสารกลุ่มบิวทิลทินในน่านน้ำไทย รวมถึงอาจใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวัง/การจัดการหรือการวางแผนการปรับปรุงคุณภาพสิ่งแวดล้อมต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

ศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอย (imposex induction) ในหอยทะเลฝาเดียวสกุล *Nassarius* sp. 2 ชนิด ที่ได้รับสารไตรบิวทิลทิน (tributyltin) ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์เป็นตัวบ่งชี้สภาพแวดล้อม (environmental indicator) ของการปนเปื้อนของสารกลุ่มบิวทิลทิน

ทบทวนเอกสารงานวิจัย

การกระจายและการสะสมของสารป้องกันการเกาะติดของสิ่งมีชีวิตบริเวณชายฝั่งทะเล

สารป้องกันการเกาะติดของสิ่งมีชีวิตหรือสีกันเพรียง (antifauling chemical) เป็นสารที่มนุษย์พัฒนาขึ้นมีฤทธิ์เป็นสารชีวฆาต (biocide) มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเดินเรือและอู่เรือ คือใช้ทาบริเวณตัวเรือ ใต้ท้องเรือ นอกจากนี้ยังใช้กับวัสดุต่างๆที่ติดตั้งในทะเล เช่น กระชังปลา และระบบหล่อเย็น (water cooling tower) เพื่อไม่ให้เพรียงหรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่ไม่ต้องการ (fouling organism) เข้ามาเกาะอาศัยอยู่ ป้องกันการผุกร่อน ช่วยประหยัดค่าบำรุงรักษาเรือหรือวัสดุที่ใช้ในทะเล และช่วยประหยัดเชื้อเพลิงในการเดินเรือ สารที่ใช้ผสมในสีกันเพรียงเป็นสารที่มีดีบุกเป็นองค์ประกอบหรือเป็นสารในกลุ่มดีบุกอินทรีย์ (organotin) โดยเฉพาะสารกลุ่มบิวทิลทิน ได้แก่ สารไตรบิวทิลทิน (tributyltin; TBT), ไดบิวทิลทิน (dibutyltin; DBT) และ โมโนบิวทิลทิน (momobutyltin; MBT) ซึ่งสารไตรบิวทิลทินเป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีทำให้มีการใช้อย่างแพร่หลายตั้งแต่ในช่วงปี ค.ศ. 1960 (Mensink, 1999; Harino, *et al*., 2006) นอกจากนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการเดินเรือแล้วสารไตรบิวทิลทินยังใช้ในการรักษาเนื้อไม้ (material and wood preservation) และใช้เป็นสารฆ่าเชื้อรา (slimicides) อีกด้วย (Kannan and Tanabe, 2009)

สารที่นำมาใช้ประโยชน์นี้สามารถละลายแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อมได้ สารดังกล่าวได้มีรายงานการปนเปื้อนทั้งในน้ำทะเล และดินตะกอน โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นอู่เรือ ท่าเรือที่มีการเดินเรือสูง (Kan-atireklap, *et al*., 1997; Sudaryanto, *et. al*., 2004) ซึ่งสารที่ว่านี้จะมีการสะสมในดินตะกอนมากกว่าในน้ำเนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย นอกจากนี้การสลายตัวของสารดังกล่าวจากตะกอนดินใช้เวลาค่อนข้างนานกว่าในน้ำ ซึ่งครึ่งชีวิต (Half-life)ของสารไตรบิวทิลทินที่สะสมในดินตะกอนมีอายุประมาณ 2.5 ปี (Kan-atireklap, *et al*., 1997 อ้างจาก de Mora, *et al*., 1995) การสะสมหรือปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทินในดินตะกอนนั้น สามารถที่จะย้อนกลับมายังน้ำทะเลได้ (resuspention) (Kan-atireklap, *et al*., 1997 อ้างจาก Page *et al*., 1996; Wattayakorn, 2008) โดยการกวนตะกอนดินขึ้นมาจากกิจกรรมการเดินเรือ และการขุดลอกร่องน้ำได้ (Dowson, *et al*., 1994; Smith, 1996; Reitsema, *et al*., 2003) นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของสัตว์ทะเลหน้าดิน (infaunal macro-organism) ก็สามารถทำให้สารไตรบิวทิลทินถูกปลดปล่อยกลับมาปนเปื้อนในน้ำทะเลได้เช่นกัน (Langston, *et al*., 2009) จากปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นเป็นผลทำให้สารกลุ่มบิวทิลทินที่ตกค้างและสะสมอยู่ในตะกอนดินสามารถย้อนกลับมาปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ถึงแม้ว่าจะมีการเลิกใช้สารนี้แล้วก็ตาม (Langston, *et al*., 2009; Wattayakorn, 2008) ทั้งนี้การสะสมสารไตรบิวทิลทินในดินตะกอนของแต่ละพื้นที่ยังขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ปริมาณการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในบริเวณนั้นๆ ขนาดหรือชนิดของตะกอนดิน ความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเค็ม

และปริมาณสารอินทรีย์ (จุรีพร ล้อมเมตตา, 2544; มนทกานต์ วิสุทธิแพทย์, 2548 อ้างจาก Langston and Pope, 1995; Hoch, *et al*., 2004)

ผลกระทบของสีกันเพรียงในกลุ่มบิวทิลทินต่อสิ่งมีชีวิต

หลังจากที่มีการใช้สารไตรบิวทิลทินอย่างแพร่หลายในช่วงปี ค.ศ. 1970 สารดังกล่าวได้มีการปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อม นอกจากสะสมในน้ำและในตะกอนดินแล้ว ยังส่งผลกระทบวงกว้างกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ นอกเหนือจากสิ่งมีชีวิตที่ต้องการกำจัด/สิ่งมีชีวิตที่ไม่พึงประสงค์ที่มาเกาะบริเวณใต้ท้องเรือหรือวัสดุอื่นๆที่ติดตั้งในทะเล ทำให้สารดังกล่าวสามารถสะสมในสิ่งมีชีวิตต่างๆตามห่วงโซ่อาหาร ตั้งแต่แพลงก์ตอนไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่างๆในสิ่งมีชีวิต

นักวิทยาศาสตร์ได้รายงานถึงผลกระทบทางลบของสารดังกล่าวต่อสัตว์ทะเลหลายชนิด อาทิเช่น หอยนางรม เมื่อได้รับสารไตรบิวทิลทินทำให้เกิดความผิดปกติของการสร้างเปลือก กล่าวคือ เปลือกถูกสร้างเป็นชั้นหนาและมีรูปร่างค่อนข้างกลม นอกจากทำให้เกิดความผิดปกติแล้วจะทำให้ตัวอ่อนตายด้วย ดังที่เกิดในหอยนางรมชนิด *Crassostrea gigas* บริเวณอ่าว Arcachon ในประเทศฝรั่งเศษ ทำให้ปริมาณผลผลิตหอยนางรมลดลงอย่างมาก ในเวลาต่อมา (ปี ค.ศ. 1982) ประเทศฝรั่งเศสได้ห้ามให้มีการใช้สารไตรบิวทิลทินกับเรือที่มีขนาดเล็กกว่า 25 เมตร (Alzieu, 1991) นอกจากความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับหอยทะเลสองฝาแล้ว สารดังกล่าวยังส่งผลทำให้หอยฝาเดียว (gastropod) เพศเมียมีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis/pseudo vas deferens) หรือที่เรียกว่าปรากฏการณ์ imposex (Bryan, *et al*., 1986; Bettin, *et al*., 1996) โดยได้มีรายงานการเกิดความผิดปกติดังกล่าวในหอยทะเลกลุ่มอันดับ Mesogastropoda และ Neogastropoda ทั่วโลกมากกว่า 140 ชนิด (Horiguchi, *et al*., 2001) ปรากฏการณ์นี้เกิดจากหอยทะเลเพศเมียเมื่อได้รับสารไตรบิวทิลทินแล้วทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างฮอร์โมนเอสโทรเจน (estrogen) (ยับยั้งปฏิกิริยาที่เปลี่ยนฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgens) ไปเป็นฮอร์โมนเอสโทรเจน (estrogen) ทำให้มีปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) เพิ่มมากขึ้นซึ่งการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน จะชักนำให้เกิดการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม (Bettin, *et al*., 1996) ลักษณะผิดปกติดังกล่าวหากเกิดขึ้นแล้วจะไม่สามารถหายได้ (irreversible) หรือระยะการเกิดความผิดปกติไม่สามารถลดน้อยลงได้ ถึงแม้ว่าจะนำไปเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทินก็ตาม (Stoben, *et. al*., 1992b; Oehlmann, et. al., 1998) ทั้งนี้หากเป็นรุนแรงจะส่งผลให้หอยทะเลเพศเมียไม่สามารถสืบพันธ์ได้ตามปกติ กล่าวคือผลจากการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมหากมีการพัฒนามากจะไปขวางทางท่อนำไข่ทำให้หอยทะเลเพศเมียไม่สามารถวางไข่ได้ นอกจากนี้หากมีการสะสมไข่ในท่อนำไข่มากขึ้นจะทำให้ท่อนำไข่แตกและทำให้หอยทะเลเพศเมียตายลงในที่สุด (Gibbs and Bryan, 1986; สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ คณะ, 2549) ทำให้ประชากรของหอยทะเลมีปริมาณลดลง ดังเช่น การศึกษาโดย Bryan และคณะ ที่ได้วิจัย

ในพื้นที่บริเวณทางตะวันตกเฉียงใต้ของอังกฤษ พบว่าหอยชนิด *Nucella lapillus* มีปริมาณลดลงอย่างมากในบริเวณที่มีการเดินเรือสูง (Bryan, *et. al*., 1986)

อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีการระงับใช้สารไตรบิวทิลทินแล้ว สิ่งมีชีวิตยังคงได้รับผลกระทบอย่างต่อเนื่องได้แม้ว่าจะมีแนวโน้มของความรุนแรงที่ลดลงเนื่องจากความสามารถในการสะสมหรือตกค้างการของสารกลุ่มนี้ในสิ่งแวดล้อมดังที่ได้กล่าวมาในตอนต้น การพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมียนั้นเกิดขึ้นได้แม้ว่ามีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในปริมาณที่น้อย (Bryan, *et al*., 1986) ความรุนแรงของการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม มีความสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินกล่าวคือบริเวณที่มีการดังกล่าวสูงจะพบสัดส่วนจำนวนประชากรที่เกิดความผิดปกติทางเพศ (% imposex) มากขึ้น และระดับความรุนแรงของการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมที่สูงมากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้มีการศึกษาเพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (bioindicator) ในหอยทะเลหลายชนิด

นอกจากความผิดปกติที่เกิดในกลุ่มหอยทะเลแล้วสัตว์ทะเลในกลุ่มอื่นๆเช่นในกลุ่มครัสเตเชียนได้มีรายงานผลกระทบจากสารไตรบิวทิลทินเช่นกัน ได้แก่ มีผลต่อ osmoregulation ในกุ้ง (Lignot, *et al*., 1998) และมีผลต่อระบบสืบพันธุ์และระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทะเลกลุ่มแอมฟิพอต (Jacobson, *et al*., 2011) นอกจากนี้ได้มีรายงานว่าสารดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้ปลาเพศเมียเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเพศผู้มากขึ้น (Shimasaki, *et al*., 2003)

การศึกษาสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินและการเกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลฝาเดียวเพื่อเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ

จากที่ได้มีการศึกษาพบว่าความผิดปกติเพศหอยเกิดจากการได้รับสารไตรบิวทิลทิน นอกจากนี้อัตราการเกิดยังมีความสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อน ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้ศึกษาตรวจวัดระดับของความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลฝาเดียวเพื่อเป็นการเปรียบเทียบผลกระทบ ดังเช่น ในการศึกษาเปรียบเทียบการเกิดและการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมก่อนและหลังการห้ามใช้สารไตรบิวทิลทิน ของ Smith (1996) ได้รายงานการลดลงของเปอร์เซ็นต์การเกิด imposex และการลดลงของค่าสัดส่วนขนาดอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมียเมื่อเปรียบเทียบกับเพศผู้ (relative penis size index; RPSI) ในหอยทะเลชนิด *Lepsiella scobina* (วงศ์ Muricidae) บริเวณ Porirua Basin ในประเทศนิวซีแลนด์ ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบกันระหว่างปี ค.ศ. 1988/1989 และ ปี ค.ศ. 1994/1995 คือช่วงก่อนและหลังการห้ามขายและห้ามใช้สารไตรบิวทิลทิน ในปี ค.ศ. 1993 อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาไม่พบการลดลงของเปอร์เซ็นต์การเกิด imposex แต่พบการลดลงของ ค่า RPSI ในบริเวณที่เป็นท่าเรือสินค้าขนาดใหญ่ (Wellington Harbor) อาจเนื่องมาจากสารไตรบิวทิลทินที่สะสมอยู่บริเวณดังกล่าวถูกกวนขึ้นมาจากกิจกรรมการเดินเรือและการขุดลอก ทั้งนี้ในประเทศนิวซีแลนด์ไม่ได้มีการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับการใช้สีกันเพรียงของเรือจากต่างชาติซึ่งเรือดังกล่าวอาจเป็นแหล่งของการปล่อยสารปนเปื้อน จาก

รายงานของ Reitsema และ คณะ (2003) ที่ได้ศึกษาการเกิด imposex ของหอยทะเลชนิด *Thais orbita* (วงศ์ Muricidae) บริเวณชายฝั่งเมือง Perth ทางฝั่งตะวันตกของประเทศออสเตเรีย จำนวน 16 สถานี ในช่วงปี ค.ศ. 1998 – 1999 เปรียบเทียบกับปี ค.ศ. 1993 พบว่ามีอัตราการเกิดลดลง 11 สถานี โดยสถานีที่ยังคงมีปริมาณ imposex สูงคือจุดที่เป็นท่าเทียบเรือพาณิชย์ขนาดใหญ่ และอู่ต่อเรือ ทั้งนี้น่าจะมีผลมาจากการระงับการใช้สารไตรบิวทิลทิน กับเรือที่มีขนาดยาวกว่า 25 เมตร ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1991

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการพัฒนาการเกิดอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมียทั้งในห้องปฏิบัติการและ/หรือในสภาพธรรมชาติเพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการปนเปื้อนและการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบความไวต่อการตอบสนอง (sensitivity) ต่อสารไตรบิวทิลทิน ดังเช่นการศึกษาโดย Barroso และคณะ (2002) ศึกษาการเกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลชนิด *Nassarius reticulatus* ที่เก็บตัวอย่างจากธรรมชาติทางบริเวณตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศโปรตุเกสซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่เคยมีรายงานการเกิดความผิดปกติทางเพศมาก่อน โดยนำมาเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน 100, 250 และ 400 นาโนกรัม-ดีบุกต่อลิตร (ng Sn l^{-1}) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 เดือน เกิดสัดส่วนความผิดปกติทางเพศ 32, 22 และ 24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้ในเดือนแรกพบความผิดปกติเฉพาะที่ความเข้มข้น 250 และ 400 ng Sn l^{-1} นอกจากนี้จากการศึกษาระดับการสะสมของสารดังกล่าวในเนื้อเยื่อหอยพบว่ามีการสะสมมากขึ้นตามปริมาณการปนเปื้อนคือ 76, 359 และ 439 TBT-Sn g^{-1} (น้ำหนักแห้ง) ในส่วนของการศึกษาผลของการปนเปื้อนของสารไดบิวทิลทินที่ความเข้มข้น 500 ng Sn l^{-1} ไม่พบว่ามีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม Duft และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการเกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลชนิด *N. reticulatus* เช่นกัน โดยเก็บหอยทะเลตัวอย่างจากธรรมชาติที่ Brittany ประเทศฝรั่งเศษ และนำมาเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน ในดินตะกอนที่นำมาเติมด้วยสารไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 75, 125, 250 and 500 ug TBT-Sn/kg ทั้งนี้ในการศึกษาดังกล่าวได้ศึกษาในกลุ่มสารตัวทำละลาย (solvent control) ด้วย ซึ่งก็คือ gracial acetic acid ที่ความเข้มข้น 5mg/kg โดยตัวอย่างจะเก็บทุก 1 เดือน จากผลการศึกษาพบว่าเกิดลักษณะความผิดปกติทางเพศได้ตั้งแต่ช่วงเดือนแรกของการศึกษาโดยมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของปริมาณไตรบิวทิลทินที่ได้เติมลงในตะกอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งผู้วิจัยได้เสนอแนะว่าหอยทะเลดังกล่าวได้รับผลกระทบจากสารไตรบิวทิลทินถึงแม้ว่าสารมีการปนเปื้อนในปริมาณน้อยและน่าจะสามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องมือหนึ่งเพื่อนำมาใช้ในการประเมิน (assessment) คุณภาพของดินตะกอนได้

อย่างไรก็ตาม Rodríguez และ คณะ (2010) ได้ทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างหอยทะเลชนิด *N. reticulatus* เพศเมียปกตินำไปขังเลี้ยง (transplanted) ยังพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินแตกต่างกันโดยเมื่อวัดค่าความเข้มข้นของสารดังกล่าวในดินตะกอนมีค่าเป็น 203, 571, และ 3,132 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในการศึกษาดังกล่าวได้ขังเลี้ยงเป็นเวลา 75 วัน จากผลการศึกษาพบว่าเริ่มพบการ

เกิดความผิดปกติทางเพศ (imposex) ในวันที่ 14 หลังจากที่นำไปปล่อยในพื้นที่ทดลอง ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน 203 และ 571 นาโนกรัมต่อกรัม นั้น พบการเกิดความผิดปกติทางเพศลักษณะเดียว คือ เกิดลักษณะอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis) ขนาดเล็กที่บริเวณด้านล่างขวาของก้านตา (right tantacle) โดยยังไม่มีการพัฒนาเป็น penis duct ส่วนในพื้นที่ๆมีการปนเปื้อน 3,132 นาโนกรัมต่อกรัม พบลักษณะความผิดปกติ 3 แบบ คือ 1) เกิดท่อนำอสุจิเทียม (pseudo vas deferens) ที่บริเวณด้านล่างขวาให้กับก้านตา 2) เกิดลักษณะอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis) และมีการพัฒนาเป็น penis duct ที่บริเวณด้านล่างของก้านตาด้านขวา และ 3) พบการเกิดท่อนำอสุจิเทียมที่บริเวณด้านล่างขวาของก้านตาและบริเวณใกล้กับท่อนำไข่ จากผลการศึกษาในแต่ละพื้นที่พบการเกิด imposex เพิ่มขึ้นแต่พบว่ามีอัตราการเกิดไม่สูงนักยกเว้นในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสูงสุด (พื้นที่ๆพบการปนเปื้อน 3,132 นาโนกรัมต่อกรัม) ซึ่งมีอัตราการเกิด imposex เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในบริเวณดังกล่าวพบมีค่า Relative Penis Length Index (RPLI) และค่า Vas Deferens Sequence Index (VDSI) สูงกว่าบริเวณอื่นด้วย โดยจากผลการศึกษาผู้วิจัยได้เสนอแนะว่าวิธีการดังกล่าวอาจเหมาะสมเฉพาะในพื้นที่ๆมีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินสูง

ผลกระทบจากสารไตรบิวทิลทินต่อการเกิดความผิดปกติเพศหอยในหอยทะเลฝาเดียวเพศเมียจะแสดงความรุนแรงของการเกิดแตกต่างกันในแต่ละชนิด (Stoben, *et. al*., 1992; Castro, *et. al*., 2012) โดยหอยฝาเดียวชนิดใดมีความไวต่อการตอบสนองสูง ก็จะมีความเหมาะสมเพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (Rodríguez, *et al*., 2010) ดังเช่นการศึกษาโดย Stoben และ คณะ (1992) ศึกษาเปรียบเทียบความไวต่อการตอบสนองต่อสารไตรบิวทิลทิน (TBT sensitivity) ในหอยทะเลชนิด *H. reticulata* (วงศ์ Nassariidae) และ *N. lapillus* (วงศ์ Muricidae) จากการเก็บตัวอย่างภาคสนามโดยนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของระยะการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม (VDS; vas deferens sequence), ค่าสัดส่วนความยาวของอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมียต่อความยาวเฉลี่ยของอวัยวะเพศผู้ (RPS; relative penis size), ค่าเฉลี่ยความยาวของอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมีย (average female penis length) และปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินและไดบิวทิลทินในเนื้อเยื้อจากนั้นนำมาหาความสัมพันธ์ ผลการศึกษาพบว่าในสภาพการปนเปื้อนต่ำชนิด *N. lapillus* แสดงความผิดปกติมากกว่าชนิด *H. reticulata* ในทุกค่าการวิเคราะห์ อย่างไรก็ดีในบริเวณที่มีการปนเปื้อนต่ำหอยทะเลเพศเมียชนิด *H. reticulata* สามารถเกิดหรือแสดงออกถึงความผิดปกติเช่นกัน ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เสนอแนะว่าหอยทะเลทั้งสองชนิดนั้นมีความเหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (bioindicator) นอกจากนี้ผู้วิจัยได้มีการศึกษาเปรียบเทียบความไวต่อการตอบสนองต่อสารไตรบิวทิลทินในหอยทะเลชนิด *H. reticulata* และ *N. lapillus* ในห้องปฏิบัติการด้วยซึ่งจากผลการศึกษาค่อนข้างเป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาเปรียบเทียบในภาคสนาม โดยผู้ศึกษาได้เลี้ยงหอยทะเลทั้งสองชนิดในน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้น 5, 50, 100 และ 500 ng TBT-Sn l^{-1} พบว่าหอยทะเลชนิด *N. lapillus* ค่อนข้างมีการตอบสนองต่อสารไตรบิวทิลทินมากกว่าหอยทะเลชนิด *H.*

reticulata เพื่อพิจารณาจากการค่า VDS กับ RPS อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มขึ้นของความยาวของอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมีย (female penis length) ไม่แตกต่างกันระหว่าง 2 ชนิดนี้

ทั้งนี้การตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยโดยสารไตรบิวทิลทินนั้น พบว่าถึงแม้จะเป็นชนิดหอยที่อยู่ในสกุลเดียวกันก็มีการตอบสนองที่แตกต่างกันดังเช่นงานวิจัยของ Castro และคณะ (2012) ที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบความผิดปกติเพศหอยในสกุล *Stramonita* sp. (วงศ์ Muricidae) คือ ชนิด *S. haemastoma* และ *S. rustica* โดยนำหอยทะเลทั้งสองชนิดมาจากแหล่งที่ไม่พบความผิดปกติทางเพศและนำมาขังเลี้ยงในกรง (transplanting) ในบริเวณท่าเรือที่มีการสัญจรของเรือสูงเป็นเวลา 120 วัน และทำการเก็บข้อมูลทุกๆ 15 วัน จากผลการศึกษาพบว่าหลังจากที่นำไปขังเลี้ยงเป็นระยะเวลา 15 วัน หอยทะเลชนิด *S. haemastoma* พบการเกิดความผิดปกติทางเพศถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชนิด *S. rustica* ยังไม่พบความผิดปกติใดๆ อย่างไรก็ตามชนิด *S. rustica* พบมีความผิดปกติเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (38.5 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ชนิด *S. haemastoma* พบการเกิดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติเพศหอยจากการศึกษาค่า RPLI, VDSI และ FPLI พบว่าชนิด *S. haemastoma* มีการเกิดการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมมากกว่า ทั้งนี้ผู้วิจัยได้สรุปว่า *S. haemastoma* มีความไวในการตอบสนอง (sensitivity) มากกว่าชนิด *S. rustica*

ความผิดปกติที่เกิดจากสารไตรบิวทิลทินนั้นนอกจากจะได้รับโดยตรงจากน้ำทะเลหรือดินตะกอนแล้วการเกิดความผิดปกติดังกล่าวสามารถเกิดจากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทินด้วย ดังข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงหอยทะเลในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของสารไตรบิวทิลทิน 5 และ 50 TBT-Sn l^{-1} และการทดลองโดยใช้น้ำทะเลที่มิได้มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินแต่มีการให้อาหารที่มีการปนเปื้อน 48.7 ± 3.4 ug TBT-Sn kg^{-1} พบว่าการทดลองที่มีการให้อาหารที่มีการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทินมีค่า VDS และปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื้อเพิ่มมากตามระยะเวลาการเลี้ยงเช่นเดียวกับกลุ่มการทดลองที่เลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นสารไตรบิวทิลทิน 50 TBT-Sn l^{-1} อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมีย (female penis) และค่า RPS พบเพียงในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นสารไตรบิวทิลทิน 50 TBT-Sn l^{-1} (Stroben, et. al., 1992) นอกจากนี้จากการศึกษาการสะสมสารไตรบิวทิลทินและเนื้อหอยทะเลโดย Axiak และคณะ (1995) นั้นพบว่าการสะสมของสารไตรบิวทิลทินส่วนใหญ่พบใน digestive gland และ gonad ซึ่งการที่มีการสะสมอยู่ที่บริเวณดังกล่าวมากอาจเนื่องมาจากการได้รับสารไตรบิวทิลทินจากอาหาร

การศึกษาการชักนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยเพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในประเทศไทย

ประเทศไทยได้มีการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยเพื่อศึกษาถึงผลกระทบทางลบของสารไตรบิวทิลทินเช่นกัน ได้แก่ การศึกษาหอยทะเลในวงศ์ Muricidae โดย Bech และ คณะ (2002) ได้ศึกษาการพัฒนาการเกิดความผิดปกติเพศหอย ในหอยทะเล ชนิด *Thais distinguenda* ที่บริเวณจังหวัดภูเก็ต โดยการ นำหอยทะเลชนิดดังกล่าวจากบริเวณเกาะไม้ทอน ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนจากสารไตรบิวทิลทิน (ไม่พบการเกิด imposex) นำมาแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ 1) กลุ่มหอยทะเลขนาดเล็กที่มีความยาวเปลือกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 มิลลิเมตร และ 2) กลุ่มหอยที่มีขนาดใหญ่กว่า 25 มิลลิเมตร หอยทะเลทั้งสองกลุ่มนำไปติด tag แล้วนำไปปล่อยยังบริเวณแหลมตะกวนซึ่งเป็นสถานที่ที่มีการปนเปื้อนของไตรบิวทิลทินสูง (บริเวณที่พบว่ามีการเกิด imposex ในหอยชนิดดังกล่าว 100 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม ในช่วงระยะเวลา 1 ปี หลังจากที่ปล่อย ผลการศึกษาพบเปอร์เซ็นต์การเกิด imposex เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง โดยช่วงเดือนสุดท้ายของการศึกษา (เดือนที่ 12) กลุ่มหอยทะเลขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 มิลลิเมตรพบอัตราการเกิดความผิดปกติร้อยละ 80 ในขณะที่หอยทะเลขนาดมากกว่า 25 มิลลิเมตร พบอัตราการเกิด 86.4 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อนปล่อยไม่พบ imposex เลย

นอกจากนี้มีการศึกษาผลกระทบของสารกลุ่มบิวทิลทินต่อหอยหวาน *Babylonia areolata* (วงศ์ Babyloniidae) โดย ธีรนาถ สุวรรณเรือง และคณะ (2553) โดยนำหอยทะเลไปเลี้ยงที่บริเวณอ่าวอุดม จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนเมษายน 2551 ถึง เดือนมีนาคม 2552 เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 12 เดือน ผลการศึกษาพบมีแนวโน้มการสะสมของสารกลุ่มบิวทิลทินในหอยทะเลชนิดดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นตามช่วงระยะเวลาในการทดลอง ซึ่งสามารถตรวจวัดสารไตรบิวทิลทิน ไดบิวทิลทิน และโมโนบิวทิลทิน อยู่ในช่วงค่า น้อยกว่า 10 ถึง 588.3 ± 23.04 นาโนกรัมต่อกรัม, น้อยกว่า 10 ถึง 577.7 ± 119.2 นาโนกรัมต่อกรัม และ น้อยกว่า 10 ถึง 550.5 ± 238.01 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสัดส่วนของความรุนแรงของการเกิด imposex มากขึ้นอีกด้วย นอกจากการศึกษาในธรรมชาติแล้วหอยหวานยังมีการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศในห้องปฏิบัติการ ซึ่งทำการศึกษาโดย กณิกนันต์ ศรีสวัสดิ์ (2549) ศึกษาการเกิดความผิดปกติทางเพศหอยและการเปลี่ยนสภาพของสารโมโนบิวทิลทิน ไดบิวทิลทิน และ ไตรบิวทิลทิน ในหอยหวาน (*B. areolata*) เพศเมียอายุ 1 ปีในตู้ทดลองเมื่อมีการเติมสารไตรบิวทิลทิน 2 ระดับความเข้มข้นคือ 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาพบว่าหอยหวานมีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลองทั้งสองระดับความเข้มข้น และเมื่อทำการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาในการศึกษา (112 วัน) พบว่าหอยหวานมีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมมากขึ้น แต่ไม่พบว่าขนาดของอวัยวะผู้เทียมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้งสองระดับความเข้มข้น นอกจากนี้ได้มีการศึกษาในหอยหวาน *B. areolata* โดย

Muenpo และ คณะ (2010) ซึ่งศึกษาการเกิดความผิดปกติทางเพศในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 6 เดือน โดยทำการเลี้ยงหอยหวานในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของสารไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 และ 500 ng as Sn/l ทั้งนี้ยังศึกษาควบคู่กับชุดควบคุมที่ไม่ได้มีการเติมสารใดๆลงในบ่อทดลอง โดยจากผลการศึกษาพบว่าสารไตรบิวทิลทินสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศในหอยหวานได้ตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1 ng as Sn/l โดยความผิดปกติมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในการทดลองที่มีปริมาณการปนเปื้อนที่สูงขึ้นและระยะเวลาการเลี้ยงที่นานขึ้น โดยเปรียบเทียบจากการศึกษาค่า vas deference sequence index (VDSI) อย่างไรก็ดีผู้วิจัยพบว่าค่า VDSI ตลอดการทดลองน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 ซึ่งแสดงว่าหอยทะเลชนิดดังกล่าวมีความไวในการตอบสนองต่อสารไตรบิวทิลทินค่อนข้างต่ำ (low TBT sensitivity) นอกจากนี้จากผลการศึกษาพบว่าหอยหวานมีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudopenis) ในเดือนที่สองและสามหลังจากเริ่มการทดลอง และไม่พบว่ามีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม ที่บ่อทดลองที่ความเข้มข้น 1 ng as Sn/l

อย่างไรก็ตามการศึกษาหอยทะเลฝาเดียวเพื่อเป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของสารกลุ่มบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อย นอกจากนี้หอยทะเลแต่ละชนิดมีลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัยต่างกัน ซึ่งการศึกษาถึงผลกระทบในพื้นที่บริเวณกว้าง (wide geographical area) จำเป็นที่จะต้องมีสิ่งมีชีวิตที่เป็นดัชนีชี้วัดมากกว่า 1 ชนิด (Bech, 2002) จากการศึกษาความผิดปกติทางเพศของหอยทะเลฝาเดียวที่เกิดจากสารป้องกันการเกาะติดของสิ่งมีชีวิตจากการสำรวจชนิดหอยทะเลและพื้นที่ๆได้รับผลกระทบบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก ได้ทำการศึกษาตัวอย่างหอยทะเล 32 ชนิด พบความผิดปกติเพศหอย 13 ชนิด ได้แก่ *Hemifusus ternatanus, Pugilina cochlidium, Chicoreus capucinus, Murex trapa, Morula musiva, Thais lacera*, *Thais* sp. 1, *Thais* sp. 2, *Nassarius livescens*, *N. olivaceus*, *N. pullus*, *Nassarius* sp. 1, *Nassarius* sp. 2 โดยค่าเฉลี่ยของการเกิดความผิดปกติจะพบมากในบริเวณที่เป็นอู่เรือและท่าเรือ ซึ่งชนิดที่พบว่ามีการเกิดสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่นๆที่ได้ทำการศึกษา คือ ชนิด *C. capucinus*, *N. pullus* และ *N. livescens* โดยเฉพาะชนิด *N. livescens* ที่ตรวจพบว่ามีสัดส่วนการเกิดความผิดปกติเพศหอยถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในสถานีแหลมฉบัง (ณิชยา ประดิษฐ์ทรัพย์ และ นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์, 2553) นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของสารกลุ่มบิวทิลทินจากหอยทะเลในวงศ์ Nassariidae (ได้แก่ *Nassarius livescens* และ *N. pullus*) และ หอยทะเลวงศ์ Muricidae (ชนิด *Chicoreus capucinus*) พบมีแนวโน้มสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การเกิดความผิดปกติเพศหอย กล่าวคือบริเวณที่พบว่าเกิดความผิดปกติเพศหอยสูงจะพบมีค่าการสะสมสารกลุ่มบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลสูงด้วยเช่นกัน (ณิชยา ประดิษฐ์ทรัพย์, 2555) จากงานวิจัยดังกล่าวนำมาซึ่งความสนใจในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คือ การศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยในหอยทะเล สกุล *Nassarius* sp. โดย หอยทะเลสกุล *Nassarius* sp. เป็นหอยทะเลที่อาศัยและฝังตัวอยู่บริเวณตะกอนดินหรือบริเวณหาดทรายตั้งแต่เขตน้ำขึ้นน้ำลงไปถึงเขตใต้น้ำ กินอินทรีย์สารและซากสิ่งมีชีวิตเป็นอาหาร หอยทะเลกลุ่มดังกล่าวได้มีการศึกษาในหลายชนิดพบว่ามีอัตราการเกิดความผิดปกติเพศหอย

สอดคล้องกับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน (Stroben, *et. al*., 1992; Barroso, *et al*., 2002; Duft, *et. al*., 2005) และสามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (bioindicator) ดังเช่นที่มีการศึกษาในชนิด *N. kraussianus* (Marshall, *et. al*., 2003) *N. nitidus* (Rodríguеza, *et. al*., 2009) *N. vibex* (Lima-Verde, *et. al*., 2010) *N. reticulatus* (Rodríguеza, *et. al*., 2010) ทั้งนี้หอยทะเลสกุล *Nassarius* sp. น่าจะเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถนำมาเป็นดัชนีชี้วัดสถานการณ์การปนเปื้อนในน่านน้ำไทยได้ ซึ่งผู้วิจัยสนใจศึกษาหอยทะเลชนิด *N. livecens* และ *N. stolatus* เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความเป็นไปได้หรือความเหมาะสมในการประเมินสถานการณ์การปนเปื้อนจากสารไตรบิวทิลทินโดยใช้ความผิดปกติทางเพศหอย เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอย

การวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาหอยทะเลสองชนิดในสกุล *Nassarius* sp. (วงศ์ Nassaridae) ได้แก่ *N. livecens* และ *N. stolatus* (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นหอยทะเลที่พบอาศัยอยู่ตามชายหาดเขตน้ำขึ้นน้ำลงไปถึงเขตใต้น้ำ มีลักษณะนิสัยมุดอาศัยในโคลนหรือทราย (รูปที่ 2) กินอินทรีย์สารและซากสิ่งมีชีวิตเป็นอาหาร (scavenger) โดยตัวอย่างหอยทะเลที่ใช้ในการศึกษาจะเลือกเก็บจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนต่ำหรือบริเวณที่พบว่ามีการเกิดความผิดปกติเพศหอยต่ำ หอยทะเลทั้งสองชนิดเมื่อนำมาจากธรรมชาติแล้ว ก่อนที่จะนำไปศึกษาได้นำมาตรวจสอบเพศโดยการทำให้สลบด้วย 7 เปอร์เซ็นต์ ของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) จากนั้นคัดแยกเพศ โดยในการศึกษาจะใช้เฉพาะหอยทะเลเพศเมียเท่านั้น นอกจากนี้ได้ทำการตรวจสอบเบื้องต้นก่อนว่าหอยทะเลเพศเมียนั้นมีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis) หรือไม่ หากไม่ปรากฏการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมก็จะทำการคัดเลือกเพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศต่อไป นอกจากนี้หอยทะเลที่ทำการคัดเลือกแล้วจะบันทึกขนาดความยาวเปลือกด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์เพื่อบันทึกเป็นข้อมูลประกอบการศึกษาด้วย

<u>1. การศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลชนิด *N. livecens*</u>

หอยทะเลชนิด *N. livecens* ถูกเก็บตัวอย่างมาจากบริเวณชายหาดมดตะนอย จังหวัดตรัง หอยทะเลที่นำมาศึกษาจะคัดเลือกเฉพาะตัวเต็มวัย ตัวอย่างหอยทะเลเมื่อคัดแยกเพศแล้วก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในตู้ทดลองนั้นจะนำมาพักเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนเพื่อปรับสภาพแวดล้อมประมาณ 1-2 สัปดาห์ จากนั้นจะนำมาแบ่งเลี้ยงในตู้ทดลองที่มีตะกอนทรายปริมาณเท่าๆกัน (รูปที่ 3) ตู้ละ 30 ตัว (2 ซ้ำ) โดยกลุ่มการทดลองแจกแจงได้ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 คือ ตู้ทดลองที่ไม่ได้มีการเติมสารไตรบิวทิวทินคลอไรด์ลงในทราย (ทรายธรรมชาติ)
- กลุ่มที่ 2 คือ ตู้ทดลองที่ไม่ได้มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์แต่มีการเติมเอทานอล (ethanol) เพื่อศึกษาถึงผลของสารที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารไตรบิวทิลทินในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งทรายที่นำมาใช้นั้นจะถูกนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดตา 500 ไมครอน ก่อน ทั้งนี้หลังจากเติมสารดังกล่าวลงในทรายแล้วจะปล่อยทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้
- กลุ่มที่ 3 คือ ตู้ทดลองที่มีการเติมสารไตรบิวทิวทินคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆลงในทรายธรรมชาติที่มาจากแหล่งเดียวกันกับทรายในกลุ่มที่ 1 และ 2 โดยทรายที่ถูกนำมาใช้จะนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดตา 500 ไมครอน ก่อนเช่นกัน และแบ่งเป็นส่วนๆเพื่อเติมด้วยสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ (Sigma-Aldrich) ที่ทำการละลายด้วยเอทานอล (Langston and Burt, 1991; Duft, *et. al*, 2005) ในความเข้มข้นที่ 10, 25, 50, 100, 500, 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม เมื่อเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ในทรายแล้วจะปล่อยทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำตะกอนทรายไปใช้ในการทดลอง

2. การศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลชนิด *N. stolatus*

ตัวอย่างหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ถูกเก็บจากบริเวณดอนหอยหลอด จังหวัดสมุทรสงคราม โดยตัวอย่างหอยทะเลที่จะนำมาศึกษาจะคัดเลือกเฉพาะตัวเต็มวัยเช่นกัน จากนั้นนำมาแยกเพศและนำไปพักเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนประมาณ 1-2 สัปดาห์เพื่อปรับสภาพแวดล้อมก่อนที่จะนำไปแบ่งเลี้ยงตู้ทดลองตู้ละ 30 ตัว ทรายที่นำมาใช้ในแต่ละตู้ทดลองจะถูกนำมาร่อนผ่านตะแกรง 500 ไมครอน ก่อนและนำมาแบ่งเป็นส่วนๆเพื่อเติมด้วยสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ (Sigma-Aldrich) ที่ทำการละลายด้วยเอททานอล (Langston and Burt, 1991; Duft, *et. al*, 2005;) ในความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 25, 50, 100, 500, 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม จากนั้นเมื่อเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์แล้วจะปล่อยทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำตะกอนทรายไปใช้ในการทดลอง

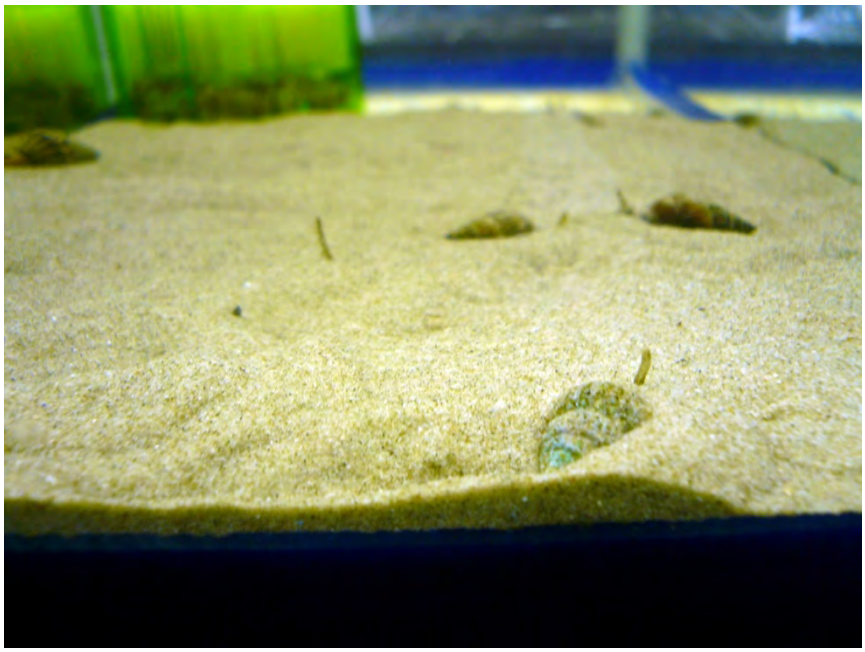
ในการทดลองเลี้ยงหอยทะเลทั้งสองชนิดนั้นจะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้อากาศตลอดเวลาและให้อาหาร (เนื้อปลาทู) แก่หอยทะเลสัปดาห์ละ 1 ครั้ง น้ำทะเลเทียมในตู้เลี้ยงหอยทะเลตลอดช่วงทำการทดลองมีค่าความเค็มเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 32 -34 และมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 8.3 – 8.5 ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยจะเก็บข้อมูลเพื่อศึกษาการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมและการสะสมสารไตรบิวทิลทินในหอยเนื้อเยื้อทะเลในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 ของการเลี้ยง

การวิเคราะห์การเกิดความผิดปกติเพศหอยและการสะสมของสารไตรบิวทิลทิน

การวิเคราะห์การเกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลฝาเดียว (imposex) นั้น จะทำการสุ่มตัวอย่างหอยทะเลในแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นนำตัวอย่างหอยทะเลมาแช่ในสารละลาย 7 เปอร์เซ็นต์ $MgCl_2$ เพื่อทำให้สลบ (Stroben, *et al*., 1992b; Swennen and Horpet, 2008) นำตัวอย่างมาแยกส่วนเนื้อออกจากเปลือกโดยใช้ค้อนกระเทาะเปลือกหอยออก จากนั้นตรวจสอบดูการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม (psudo penis, psudo vas deference) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูจากติ่งเนื้อที่เกิดขึ้นตำแหน่งเดียวกับที่ปรากฏอวัยวะเพศผู้ (penis) ซึ่งจะอยู่บริเวณเดียวกับด้านล่างของก้านตาขวา หรือมีการปรากฏท่อนำอสุจิเทียม (pseudo vas deferens) หากพบว่ามีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมดังกล่าวจะทำการบันทึกและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดความผิดปกติทางเพศของหอย (% imposex) ต่อไป นอกจากนี้จะศึกษาระดับการเกิด imposex โดยวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอยหรือค่า VDSI (vas deferens sequence index) อ้างอิงจากการศึกษาของ Stroben และ คณะ (1992)

ตัวอย่างหอยทะเลใน สัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 8 เมื่อทำการตรวจสอบการเกิดความผิดปกติภายนอกแล้วจะนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งเพื่อนำไปทดสอบหาปริมาณสารไตรบิวทิลทิน โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟ (Gas Chromatograph) อ้างอิงตามวิธีของ Harino (2003) ต่อไป

รูปที่ 1 หอยทะเลวงศ์ Nassaridae ที่นำมาใช้ในการศึกษา (ก) *Nassarius livecens* (ข) *N. stolatus*



รูปที่ 2 ลักษณะการอยู่อาศัยของหอยทะเลในสกุล *Nassarius* sp.

รูปที่ 3 ตู้ทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศ

การวิเคราะห์สารในกลุ่มบิวทิลทินจากหอยทะเลฝาเดียวและตะกอนทราย

ในการวิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่มบิวทิลทินในหอยทะเลฝาเดียวและตะกอนทรายนั้น จะนำมาสกัดและวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟ (Gas Chromatograph) อ้างอิงตามวิธีของ Harino (2003) (รูปที่ 4)

<u>การวิเคราะห์สารในกลุ่มบิวทิลทินจากหอยทะเล</u>

นำเนื้อหอยทะเลฝาเดียวที่ต้องการวิเคราะห์ มาปั่นรวมกับสาร 1 N HCl ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และสาร Acetone ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกสารสกัดโดยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) 3,000 รอบต่อนาที เมื่อแยกสารของเหลวออกมาแล้ว จะทำการสกัดด้วยขบวนการข้างต้นอีกครั้งหนึ่ง (สกัดซ้ำ 2 รอบ)

นำสารสกัดที่ได้มาผสมกับสารละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ Nacl ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร ของสาร 0.1 เปอร์เซ็นต์ tropolone-benzene ในกรวยแยกขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 5 นาที และปล่อยให้เกิดการแยกชั้นสารอินทรีย์ (organic layer) จากนั้นแยกส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ออกมา สารที่

เหลือนำมาสกัดอีกครั้งโดยการเติมสาร 25 มิลลิลิตร ของสาร 0.1 เปอร์เซ็นต์ tropolone-benzene เขย่าเป็นเวลา 5 นาทีและรอแยกสารอินทรีย์ออกมาอีกครั้ง นำไปรวมกับส่วนแรก

สารที่สกัดได้จากขั้นตอนข้างต้น (organic layer) นำมาเติมด้วย anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำออกและลดปริมาณลงเหลือประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้ง (rotary evaporator) นำสารที่ได้มาปรับปริมาตรสารให้ได้ 5 มิลลิลิตร ด้วยการเติม benzene จากนั้นเติม 3 มิลลิลิตร ของสารละลาย n-propylmagnesium chloride in diethylether (ca.2M) แล้วเขย่าเบาๆ 10 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นผสมด้วย 10 มิลลิลิตร ของสาร 1 N H_2SO_4 และ น้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในกรวยแยกปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ให้แยกชั้นแล้วนำมาแยก organic phase ออก ส่วนที่เป็น Aqueous phase นำมาสกัดต่อ ด้วย 10 มิลลิลิตร ของสาร 10 เปอร์เซ็นต์ benzene ใน hexane อีกสองรอบ

สาร organic layers ที่ได้จากการสกัดข้างต้นจะนำมารวมกันและกำจัดน้ำออกด้วยการเติมสาร anhydrous Na_2SO_4 จากนั้นนำไปลดปริมาตรโดยเครื่องกลั่นระเหยแห้ง ให้ได้ปริมาตรประมาณ 0.5 มิลลิลิตร และปรับให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วย hexane นำสารที่ได้ไปผ่าน Florisil Sep-Pak cartridge ที่ได้ล้างด้วย Hexane ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้ว หลังจากที่สารตัวอย่างผ่าน Florisil เป็นที่เรียบร้อยแล้ว เติมด้วยสาร 10 มิลลิลิตร ของสาร 10 เปอร์เซ็นต์ benzene ใน hexane ผ่าน Florisil อีกครั้งหนึ่งสารละลายทั้งหมดที่ผ่าน florisil แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่อง rotary evaporator ให้ได้ปริมาตรไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร 0.1 มล.ของสาร internal standard (TeBT, 2 mg/L), และปรับปริมาตรโดยการเติม hexane เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟีที่ต่อกับเฟรมโฟโคเมตริกดีเทคเตอร์ (GC-FPD) ต่อไป

<u>การวิเคราะห์สารในกลุ่มบิวทิลทินจากดินตะกอน</u>

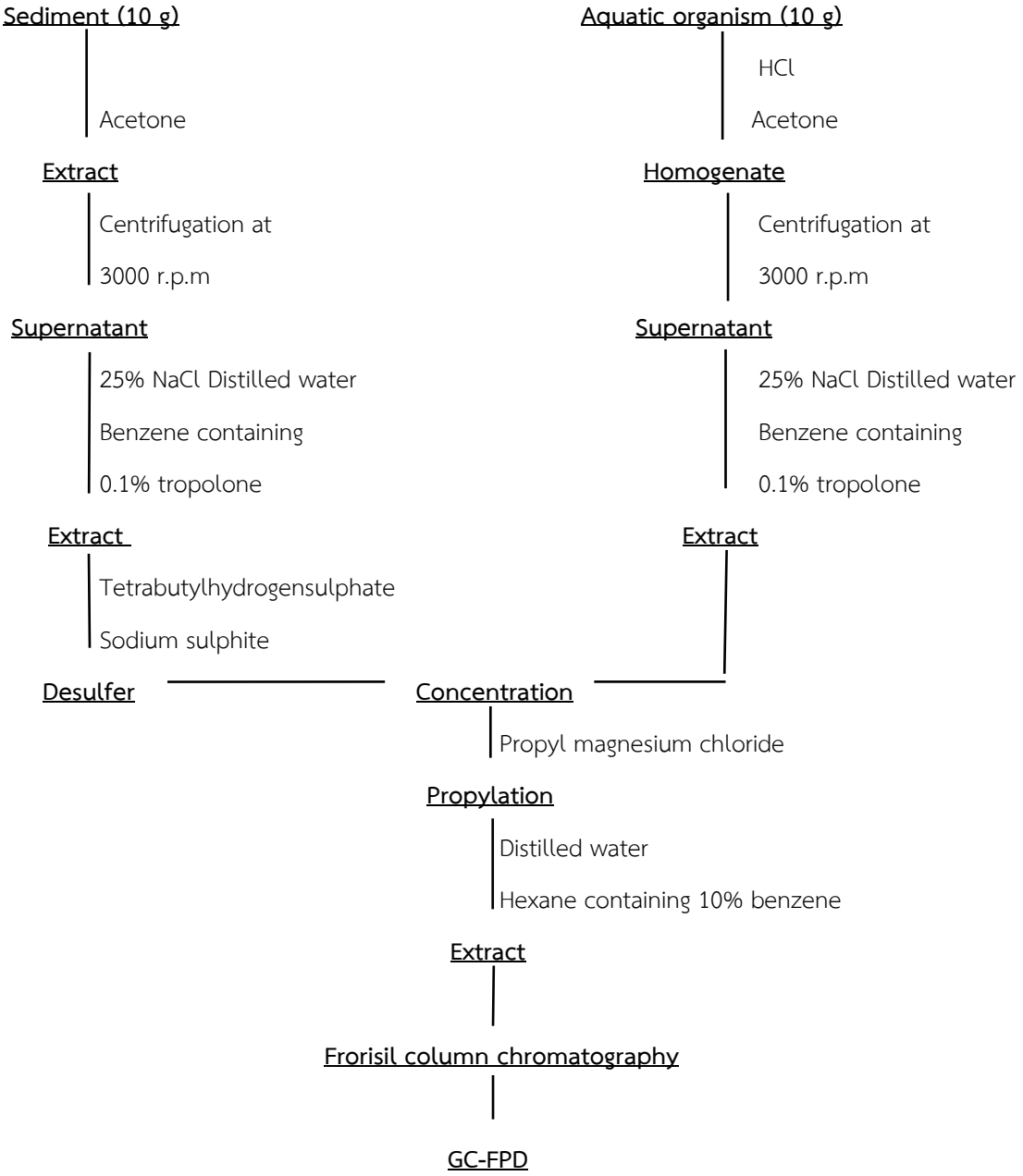
นำตะกอนทรายที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 10 กรัม มาสกัดด้วยอะซิโตน ปริมาณ 25 มิลลิลิตร โดยการเขย่าเป็นเวลา 10 นาทีจากนั้น แยกสารสกัดโดยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ตะกอนดินหลังจากที่ของเหลวออกมาแล้วนำมาสกัดด้วยอะซิโตนอีกครั้ง (สกัดซ้ำสองรอบ) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ข้างต้นมาผสมกับสารละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ Nacl และ 50 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ tropolone ใน benzene ลงในกรวยแยกขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วรอให้เกิดการแยกชั้นจากนั้นแยก organic layer ออกมาและสกัดอีกครั้งโดย 25 มิลลิลิตร ของสาร 0.1 เปอร์เซ็นต์ tropolone-benzene

นำสารที่สกัดได้จากวิธีการข้างต้น (organic layer) เติมด้วย 2 มิลลิลิตร ของสาร 3.3 เปอร์เซ็นต์ tetrabutylammonium hydrogensulphate และ 40 มิลลิลิตร ของสาร 16 เปอร์เซ็นต์ sodium sulphite เพื่อกำจัดซัลไฟด์ (Desulphur) เติม anhydrous Na_2SO_4 ลงใน Organic layer เพื่อกำจัดน้ำออกแล้วลดปริมาณลงเหลือ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้ง (rotary evaporator) นำสารที่ได้มาปรับปริมาตรสารให้ได้ 5 มิลลิลิตร ด้วยการเติมเบนซีน จากนั้นเติม 3 มิลลิลิตร ของสารละลาย n-propylmagnesium chloride in diethylether (ca.2M) แล้วเขย่าเบาๆ 10 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นผสม

ด้วย 10 มิลลิลิตร ของสาร 1 N H_2SO_4 และ น้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใน กรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันรอแยกชั้น organic phase ออก ส่วนที่เป็น Aqueous phase นำมาการสกัด ด้วย 20 มิลลิลิตร ของสาร 10 เปอร์เซ็นต์ benzene ใน hexane อีกสองรอบ

สาร organic layers ที่ได้นำมารวมกันและกำจัดน้ำออกด้วยการเติมสาร anhydrous Na_2SO_4 จากนั้นนำไปลดปริมาตรโดยเครื่องกลั่นระเหยแห้ง ให้ได้ปริมาตรประมาณ 0.5 มิลลิลิตร และปรับให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วย hexane นำสารที่ได้ไปผ่าน Florisil Sep-Pak cartridge ที่ได้ล้างด้วย Hexane ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้ว หลังจากที่สารตัวอย่างผ่าน Florisil เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ให้เติมด้วยสาร 10 มิลลิลิตร ของสาร 10 เปอร์เซ็นต benzene ใน hexane เพื่อผ่าน Florisil อีกครั้งหนึ่ง สารละลายทั้งหมดที่ผ่าน florisil แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่อง rotary evaporator ให้ได้ปริมาตรไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร 0.1 มิลลิลิตร ของสารinternal standard (TeBT, 2 mg/L), และปรับปริมาตรโดยการเติม hexane เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟีที่ต่อกับเฟรมโฟโคเมตริกดีเทคเตอร์ (GC-FPD) ต่อไป

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หรือร้อยละการกลับคืน (เปอร์เซ็นต์ recovery) โดยการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (1 ug/l) ลงไปในตัวอย่างและทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเดียวกับที่ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง (ดังวิธีการที่ได้กล่าวข้างต้น) ซึ่งประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารไตรบิวทิลทินมีค่าที่ 81.1±9.1 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4 แผนผังขั้นตอนการสกัดสารในกลุ่มออแกโนตินในดินตะกอนและในสิ่งมีชีวิต

(ปรับปรุงจาก Harino, 2003)

ผลการศึกษา

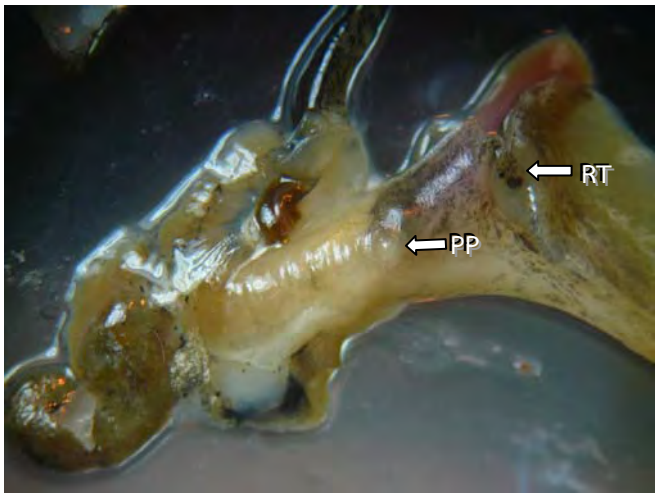
จากการศึกษาลักษณะความผิดปกติเพศหอยหรือลักษณะภายนอกของการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมของหอยทะเล ชนิด *N. livecens* และ *N. stolatus* เมื่อชักนำโดยสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ในห้องปฏิบัติการและได้ศึกษาเปรียบเทียบกับการศึกษาโดย Stroben และ คณะ (1992) ได้จัดจำแนกระดับการเกิดการพัฒนาการเกิดความผิดปกติทางเพศออกได้เป็น 4 ระดับ คือ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอยหรือลักษณะการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมของหอยทะเล ชนิด *N. livecens* และ *N. stolatus* จากการศึกษาในสภาพธรรมชาติและในห้องปฏิบัติการ

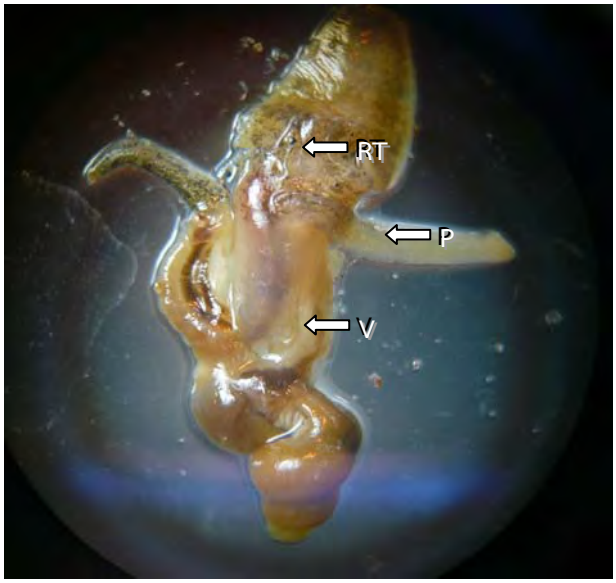
ระดับการเกิด	ลักษณะการเกิด
0	ไม่เกิดลักษณะผิดปกติ คือไม่ปรากฏลักษณะหรืออวัยวะเพศผู้ในหอยทะเลเพศเมีย
1	a) เกิดลักษณะอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis) ขนาดเล็กที่บริเวณด้านล่างขวาของก้านตา (right tantacle) ยังไม่มีการพัฒนาเป็น penis duct b) ไม่ปรากฏอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis) แต่ปรากฏท่อนำอสุจิเทียม (pseudo vas deferens) ที่บริเวณใกล้กับท่อนำไข่
2	a) ปรากฏอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis และ penis duct) ที่บริเวณด้านล่างก้านตาด้านขวาแต่ไม่ปรากฏท่อนำอสุจิเทียม (pseudo vas deferens) b) ปรากฏลักษณะอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis) ที่บริเวณด้านล่างก้านตาด้านขวาและปรากฏท่อนำอสุจิเทียม (pseudo vas deferens) ที่บริเวณใกล้กับท่อนำไข่
3	ปรากฏอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis และ penis duct) ที่บริเวณด้านล่างก้านตาด้านขวา (บริเวณเดียวกับที่ปรากฏ penis เพศผู้) และพบการพัฒนาท่อนำอสุจิเทียมระหว่างบริเวณใกล้กับท่อนำไข่
4	ปรากฏอวัยวะเพศผู้เทียม (penis และ penis duct) และท่อนำอสุจิเทียมที่ยาวเชื่อมต่อลงมาที่ ventral channel ของ capsule grand

รูปที่ 5 ลักษณะการพัฒนาท่อนำอสุจิเทียมที่บริเวณใกล้กับท่อนำไข่ (ระดับการเกิด 1b) ในหอยทะเลชนิด *N. livecens* เพศเมีย (PV=ท่อนำอสุจิเทียม, RT=ก้านตาด้านขวา)

รูปที่ 6 ลักษณะการพัฒนาท่อนำอสุจิเทียมที่บริเวณใกล้กับท่อนำไข่ (ระดับการเกิด 1b) ในหอยทะเลชนิด *N. stolatus* เพศเมีย (PV=ท่อนำอสุจิเทียม, RT=ก้านตาด้านขวา)



รูปที่ 7 ลักษณะการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมขนาดเล็กที่บริเวณด้านล่างขวาของก้านตา (ระดับการเกิด 1a) ในหอยทะเลเพศเมีย (PP=อวัยวะเพศผู้เทียม, RT=ก้านตาด้านขวา)

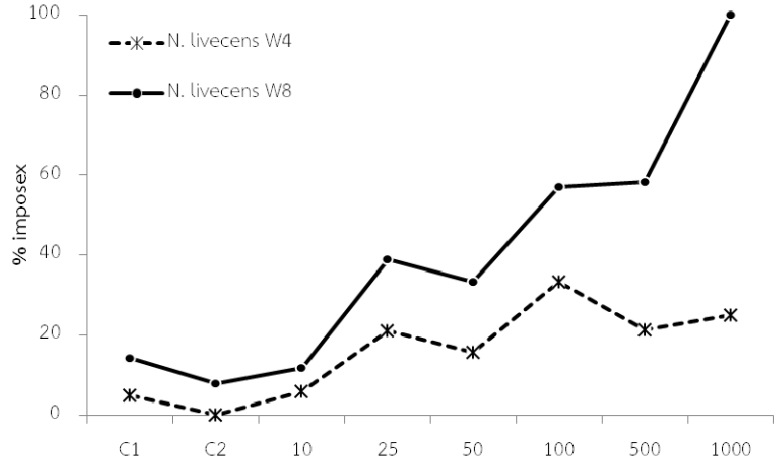


รูปที่ 8 ลักษณะหอยทะเลเพศผู้ ชนิด *N. livecens* (RT=ก้านตาด้านขวา, P=อวัยวะเพศผู้, V= ท่อนำอสุจิ)

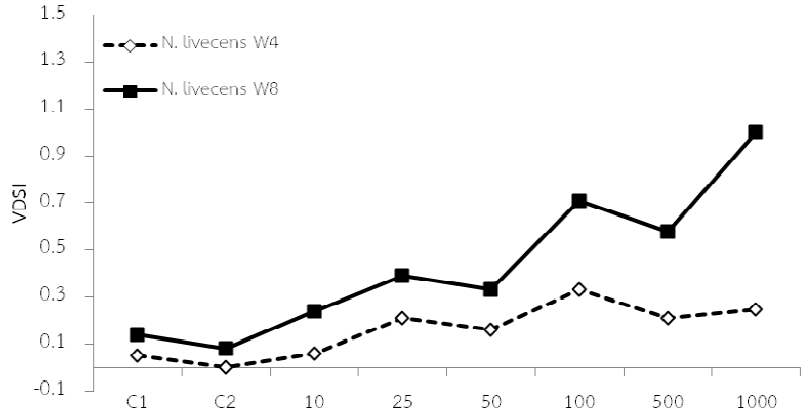
การชักนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลฝาเดียวชนิด *N. livecens*

ก่อนที่จะนำหอยทะเลมาทดสอบในห้องปฏิบัติการได้มีการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเกิดความผิดปกติเพศหอย (imposex) ในหอยทะเลชนิด *N. livecens* ที่เก็บจากบริเวณหาดมดตะนอย จังหวัดตรัง พบสัดส่วนการเกิดความผิดปกติเพศหอย 22.7 % โดยระดับเฉลี่ยการเกิดความผิดปกติทางเพศ (ค่า VDSI) มีค่าเท่ากับ 0.29 (n = 38) ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ระดับความผิดปกติในหอยทะเลชนิด *N. livecens* ในธรรมชาติไม่พบว่ามีการพัฒนามากกว่าในระยะที่ 2 (ตารางที่ 1) โดยขนาดหอยทะเลที่ทำการตรวจวัดมีขนาดอยู่ในช่วง 16.05 ถึง 26.8 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 21.5 ± 2.5 มิลลิเมตร)

ในการศึกษาได้นำหอยทะเลชนิด *N. livecens* ไปเลี้ยงในตู้ทดลองที่มีปริมาณการปนเปื้อนของสารไตรบิลทิลทินคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ และในตู้ทดลองกลุ่มควบคุม (ชุดการทดลองที่ใช้ทรายธรรมชาติ และชุดการทดลองที่เติมสารเอทานอลซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย) โดยหอยทะเลที่นำมาศึกษาในแต่ละชุดการทดลองมีค่าเฉลี่ยความยาวเปลือกอยู่ในช่วง 17.7 ถึง 19.6 มิลลิเมตร (ตารางที่ 2 และ 3 ภาคผนวก) ผลการศึกษาพบเกิดความผิดปกติเพศหอยในทุกชุดการทดลองแต่มีอัตราการเกิดที่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาในสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 8 หลังจากเริ่มการทดลองพบว่ามีสัดส่วน (เปอร์เซ็นต์) ของการเกิดความผิดปกติมากขึ้นตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ได้เติมลงในทรายที่ใช้ทำการศึกษา นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบอัตราความรุนแรงของการเกิดโดยดูจากค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติ (ค่า VDSI) พบว่าการเกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลชนิด *N. livecens* มากขึ้นตามระยะเวลาและตามปริมาณความเข้มข้นของสารไตรบิวทิลทินที่ได้เติมลงไปเช่นกัน (รูปที่ 9 และ 10) ทั้งนี้ลักษณะความผิดปกติที่เกิดส่วนใหญ่จะเป็นแบบการพัฒนาท่อนำอสุจิเทียม (pseudo vas deferens) ที่บริเวณใกล้กับท่อนำไข่ (1b; รูปที่ 5)



รูปที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเกิดความผิดปกติทางเพศ (% imposex) ในหอยทะเลชนิด *N. livecens* ที่ทำการเลี้ยงในบ่อที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบช่วงสัปดาห์ที่ 4 และ 8



รูปที่ 10 การพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมโดยดูจากค่า vas deference sequence index (VDSI) ของหอยทะเลชนิด *N. livecens* ที่ทำการเลี้ยงในบ่อที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบช่วงสัปดาห์ที่ 4 และ 8

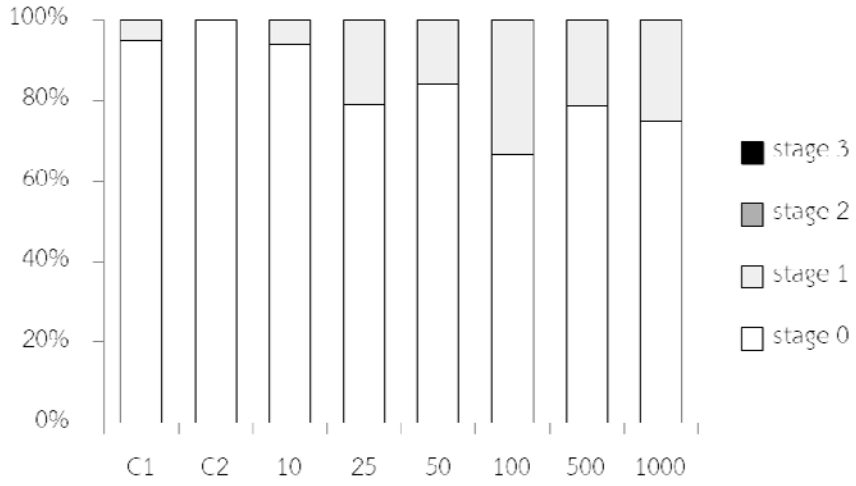
ผลการศึกษาจากชุดทดลองกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่มิได้เติมสารไตรบิวทิลทินในบ่อทดลอง หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ใช้ทรายธรรมชาติ (C1) พบการเกิดความผิดปกติเพศหอย 5.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบการเกิดความผิดปกติในชุดการทดลองที่มีการเติมสารเอทานอล (C2) อย่างไรก็ตามหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจพบการเกิดความผิดปกติเพศหอยในทั้งสองชุดการทดลองกลุ่มควบคุมคือพบเป็นสัดส่วน 14.3 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการเกิดความผิดปกติเพศหอยในธรรมชาติพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดน้อยกว่า เมื่อพิจารณาความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติเพศหอยในสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง พบว่าในชุดการทดลองที่ใช้ทรายธรรมชาติ (C1) และ ชุดการทดลองที่มีการเติมสารเอทานอล (C2) มีค่า VDSI อยู่ที่ 0.14 และ 0.08 ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาจากหอยทะเลที่เก็บจากธรรมชาติแล้วพบว่ามีความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติน้อยกว่า

ผลการศึกษาในชุดทดลองกลุ่มที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์พบการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมในทุกชุดการทดลองและมีแนวโน้มของเปอร์เซ็นต์การเกิดความผิดปกติมากขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของสารที่เติมลงในทราย ผลจากการเก็บตัวอย่างเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมียอยู่ระหว่าง 5.9 – 33.3 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการเกิดความผิดปกติทางเพศมากกว่าชุดทดลองในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 9, ตารางที่ 2 ภาคผนวก) โดยในตู้ทดลองที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม พบมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดอวัยวะเพศผู้เทียม 5.9, 21.1, 15.8, 33.3, 21.4 และ 25.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติทางเพศหลังจากการเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 โดยวัดจากค่า VDSI นั้นมีค่าอยู่ระหว่าง 0.06 – 0.33

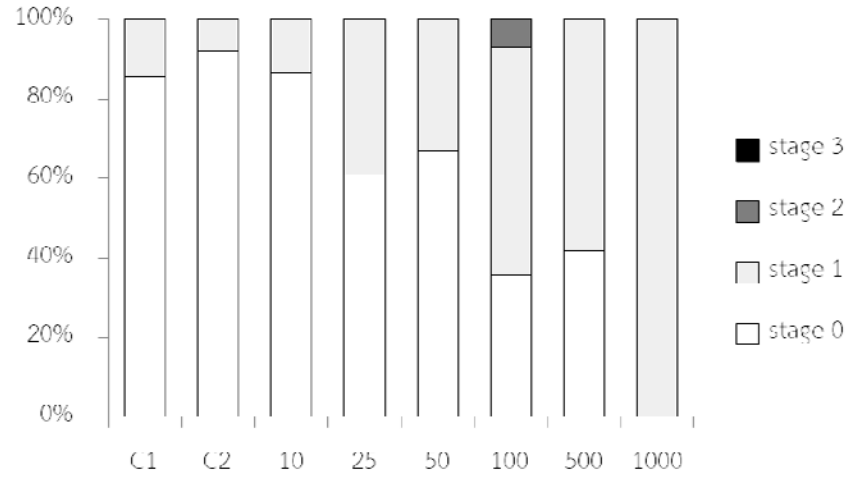
จากผลการศึกษาในสัปดาห์ที่ 8 พบการเกิดการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมียเพิ่มมากขึ้นในทุกชุดการทดลองและมีอัตราการเกิดความผิดปกติทางเพศเพิ่มมากกว่าผลการศึกษาในสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 9) คือ มีเปอร์เซ็นต์ของของการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมอยู่ระหว่าง 11.8 – 100 เปอร์เซ็นต์ โดยชุดการทดลองที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม มีสัดส่วนการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม 11.8, 38.9, 33.3, 57.1, 58.3 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3 ภาคผนวก) ซึ่งอัตราความผิดปกติที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับในธรรมชาติพบว่ามีเพียงชุดการทดลองที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในตะกอนทราย 10 นาโนกรัมต่อกรัม เท่านั้นที่มีค่าความผิดปกติน้อยกว่าในธรรมชาติ ส่วนในชุดการทดลองอื่นพบว่ามีสัดส่วนความผิดปกติที่มากกว่า

นอกจากนี้จากการศึกษาความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติเพศหอยพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีค่า VDSI มากขึ้นจากในสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 10) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.24 – 1.0 (ตารางที่ 3 ภาคผนวก) ทั้งนี้เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับการเกิดความผิดปกติในธรรมชาติพบว่าในชุดการทดลองที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในตะกอนทราย 10 นาโนกรัมต่อกรัม มีค่า VDSI น้อยกว่าการเกิดในธรรมชาติ แต่ในชุดการทดลองที่มีการปนเปื้อนเท่ากับ 25 นาโนกรัมต่อกรัม และสูงกว่านั้น พบว่ามีความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติมากกว่าหรือมีค่า VDSI สูงกว่าที่ได้ศึกษาในธรรมชาติ

ถึงแม้ว่าตลอดระยะเวลาช่วงที่ทำการศึกษาจะพบว่ามีสัดส่วน (%) ของระยะความผิดปกติเพศหอยมากขึ้น แต่พบมีการพัฒนามากที่สุดในระยะที่ 2 เท่านั้น (คือปรากฏลักษณะอวัยวะเพศผู้เทียม (pseudo penis) ที่บริเวณด้านล่างก้านตาด้านขวา และปรากฏท่อนำอสุจิเทียม (pseudo vas deferens) ที่บริเวณใกล้กับท่อนำไข่) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบในชุดการทดลองที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินลงในทรายที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/กรัม (รูปที่ 11)



(ก)



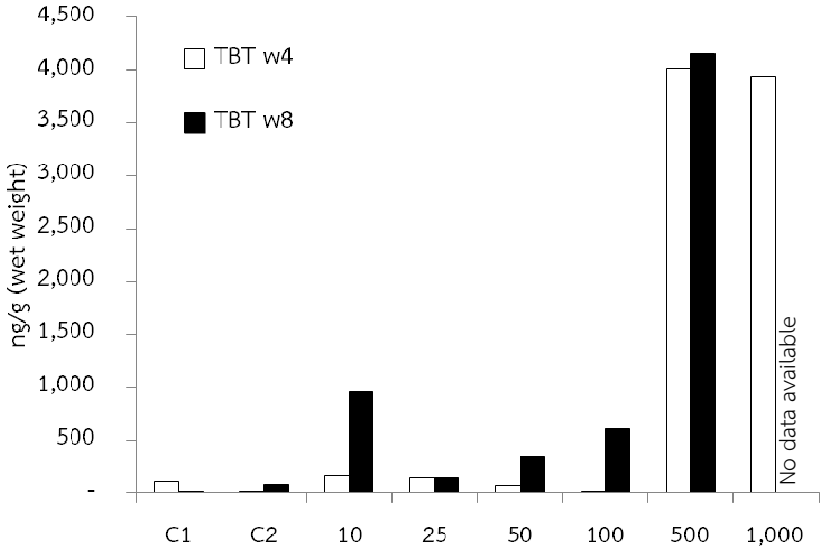
(ข)

รูปที่ 11 สัดส่วนความผิดปกติทางเพศในระยะ (stage) ต่างๆ เมื่อเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. livecens* ในชุดการทดลองที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวบิลทินคลอไรด์ในทรายที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นระยะเวลา (ก) 4 สัปดาห์ และ (ข) 8 สัปดาห์

การสะสมของสารไตรบิวทิลทินในหอยทะเลฝาเดียวชนิด *N. livecens*

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์การสะสมปริมาณสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลชนิด *N. livecens* ควบคู่กับการศึกษาลักษณะความผิดปกติภายนอกด้วย ทั้งนี้หอยทะเลจากหาดมดตะนอยและทรายธรรมชาติที่นำมาใช้ในการเลี้ยง ได้นำมาวิเคราะห์เช่นกัน พบมีค่าสะสม 14.4±15.2 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) และน้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ

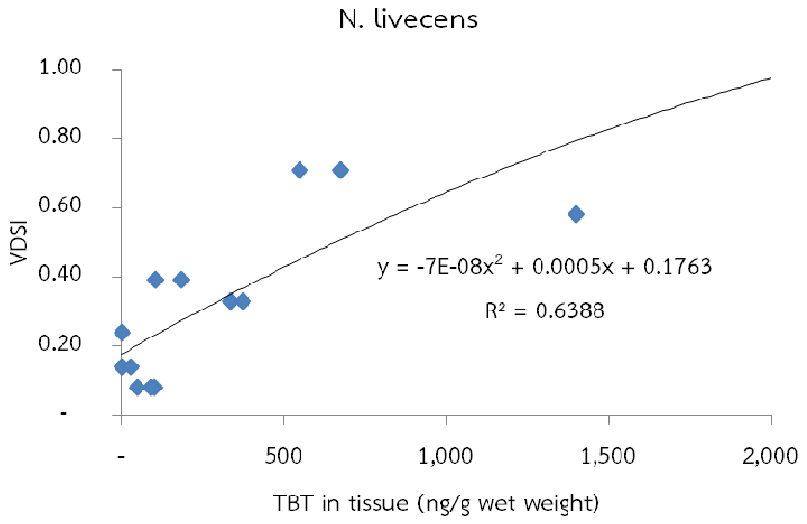
จากการวิเคราะห์ปริมาณสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลชนิด *N. livecens* หลังจากที่ได้เลี้ยงในระบบทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์ หอยทะเลกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยทรายธรรมชาติพบมีปริมาณสารไตรบิวทิลทิน 108.8 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) หอยทะเลในชุดการทดลองที่เติมด้วยเอทานอล พบมีค่าการสะสมน้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) ในชุดการทดลองที่ได้เติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม แนวโน้มของการสะสมสารในเนื้อหอยต่อปริมาณสารไตรบิวทิลทินที่ได้เติมลงไปมีผลไม่ชัดเจน (รูปที่ 12) คือมีปริมาณการสะสมในเนื้อหอยทะเลที่ 164.4, 144.4, 66.7 และ น้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) ตามลำดับ ในส่วนของตู้เลี้ยงที่ได้เติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม นั้น พบว่ามีค่าการสะสมในเนื้อหอยทะเลค่อนข้างสูง คือ 4,011.3 และ 3,940.2 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) ตามลำดับ



รูปที่ 12 ปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื้อของหอยทะเลชนิด *N. livecens* ที่ได้เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีปริมาณการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์แตกต่างกัน

จากผลการศึกษาเมื่อได้ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบมีแนวโน้มการสะสมของสารไตรบิวทิลทินเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 4 อย่างไรก็ดีไม่พบการเพิ่มขึ้นในตู้ทดลองที่เลี้ยงกับทรายธรรมชาติ (รูปที่ 12) ปริมาณสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื้อหอยที่เลี้ยงในตู้ทดลองกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในทรายธรรมชาติและชุดการทดลองที่เติมด้วยเอทานอล พบมีค่า 9.1 และ 94.4 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ได้เติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100, 500 นาโนกรัมต่อกรัม นั้นพบมีค่าการสะสมอยู่ในเนื้อเยื้อหอยทะเลเป็นปริมาณ 958.5, 142.5, 354.0, 610.8, และ 4,159.2 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์การสะสมในแต่ละชุดการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยที่วิเคราะห์ในธรรมชาติพบว่ามีค่าการปนเปื้อนมากกว่าทุกชุดการทดลองยกเว้นในชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมสารใดๆ (ชุดที่เลี้ยงด้วยทรายธรรมชาติ) เท่านั้นที่มีการปนเปื้อนในเนื้อหอยทะเลน้อยกว่า

เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติเพศหอยชนิด *N. livecens* ต่อปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื้อหอยทะเลพบว่ามีความสัมพันธ์กัน (r^2 = 0.64) กล่าวคือ เมื่อมีการสะสมสารดังกล่าวในเนื้อหอยเพิ่มขึ้นมีแนวโน้มที่จะแสดงลักษณะความผิดปกติที่มากขึ้นโดยดูจากค่าเฉลี่ยของระยะการเกิดความผิดปกติ (ค่า VDSI) ที่สูงเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (รูปที่ 13)

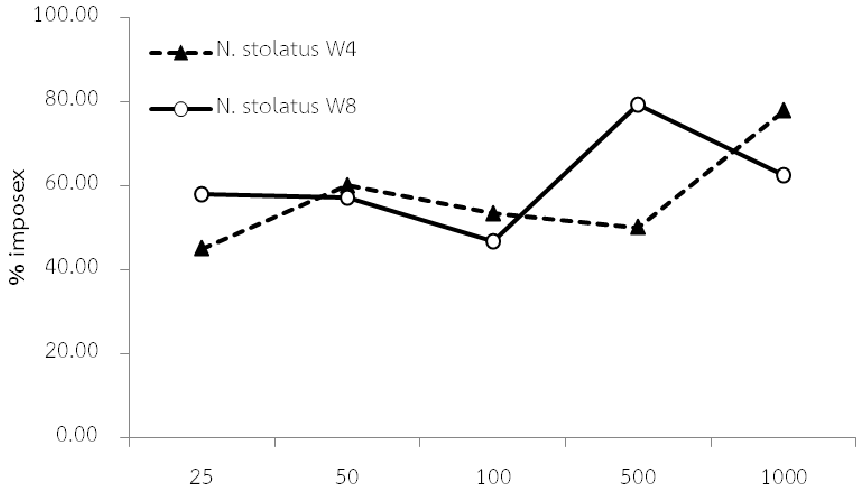


รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความรุนแรงในการเกิดความผิดปกติทางเพศ (ค่า VDSI) และปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลชนิด *N. livecens*

การชักนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลฝาเดียวชนิด *N. stolatus*

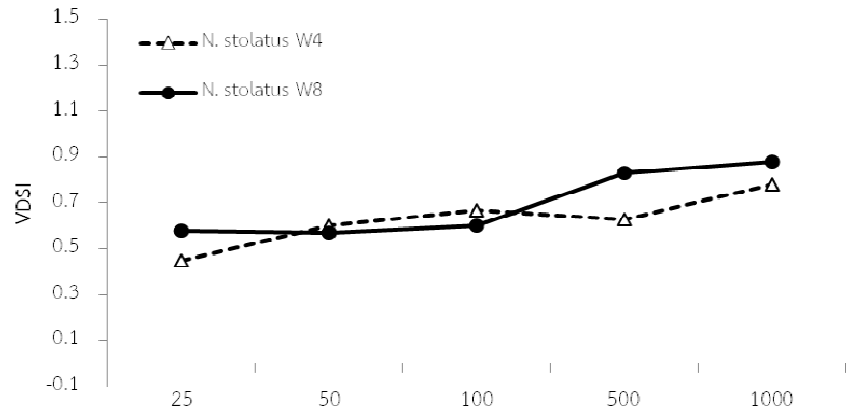
หอยทะเลชนิด *N. stolatus* ที่ใช้ในการศึกษาได้ถูกนำตัวอย่างมาจากดอนหอยหลอด จังหวัดสมุทรสงคราม ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลองได้มีการศึกษาอัตราการเกิดความผิดปกติเพศหอย (% imposex) โดยหอยทะเลที่นำมาศึกษามีขนาดความยาวเปลือกอยู่ระหว่าง 15.04 ถึง 20.9 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 18.5 ± 1.13 มิลลิเมตร) พบมีสัดส่วนความผิดปกติเพศหอย 19.23 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าเฉลี่ยระดับการเกิดความผิดปกติทางเพศ (ค่า VDSI) มีค่าเท่ากับ 0.31 ทั้งนี้จากการศึกษาในสภาพธรรมชาติพบความรุนแรงของการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมไม่เกินระยะที่ 2 (ตารางที่ 1)

ผลการศึกษาการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมหลังจากการเลี้ยงหอยทะเลในตู้เลี้ยงที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ลงในทรายธรรมชาติที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบความผิดปกติในทุกชุดการทดลอง และพบมีเปอร์เซ็นต์ของการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมียอยู่ระหว่าง 45.0 – 77.8 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 14) โดยแต่ละชุดการทดลองพบการเกิด 45.0, 60.0, 53.3, 50.0 และ 77.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติทางเพศหลังจากเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 โดยวัดจากค่า VDSI นั้น มีค่าอยู่ระหว่าง 0.45 – 0.78 (รูปที่ 15 และตารางที่ 4 ภาคผนวก) ทั้งนี้ส่วนใหญ่ลักษณะความผิดปกติที่เกิดจะเป็นแบบการพัฒนาท่อนำอสุจิเทียม (pseudo vas deferens) ที่บริเวณใกล้กับท่อนำไข่ (1b; รูปที่ 6)



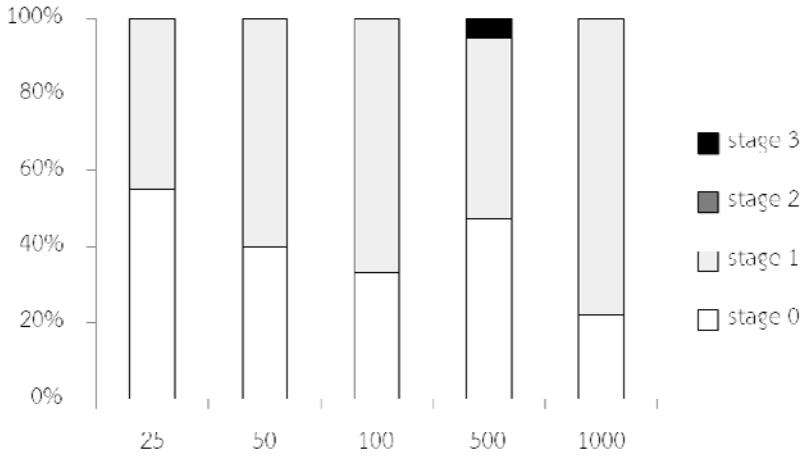
รูปที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเกิดความผิดปกติทางเพศ (% imposex) ในหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ที่ทำการเลี้ยงในบ่อที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบผลการศึกษาในสัปดาห์ที่ 4 และ 8

จากการเก็บข้อมูลในสัปดาห์ที่ 8 พบมีเปอร์เซ็นต์ของการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมอยู่ระหว่าง 46.7 – 79.3 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละชุดการทดลองที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม มีสัดส่วนการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม 57.9, 57.1, 46.7, 79.3, และ 62.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5 ภาคผนวก) ในส่วนของความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติเพศหอยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แต่ละชุดการทดลองมีค่า VDSI เท่ากับ 0.58±0.5, 0.57±0.5, 0.60±0.8, 0.83±0.5 และ 0.88±0.99 ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่ามีค่า VDSI เพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของสารที่ได้เติมลงไปแต่แนวโน้มไม่ชัดเจนนัก สัดส่วนการเกิดอวัยวะเพศผู้เทียมในหอยทะเลเพศเมียในสัปดาห์ที่ 8 เพิ่มมากขึ้นจากสัปดาห์ที่ 4 ในชุดการทดลองที่มีการเติมสารความเข้มข้น 25 และ 500 นาโนกรัมต่อกรัม เท่านั้น (รูปที่ 14) อย่างไรก็ดี ค่า VDSI พบมากขึ้นในการทดลองที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ 25, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม (รูปที่ 15) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาจากหอยทะเลที่เก็บจากธรรมชาติแล้วพบว่ามีสัดส่วน (เปอรเซ็นต์) และความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติ (ค่า VDSI) สูงกว่าในทุกชุดการทดลอง

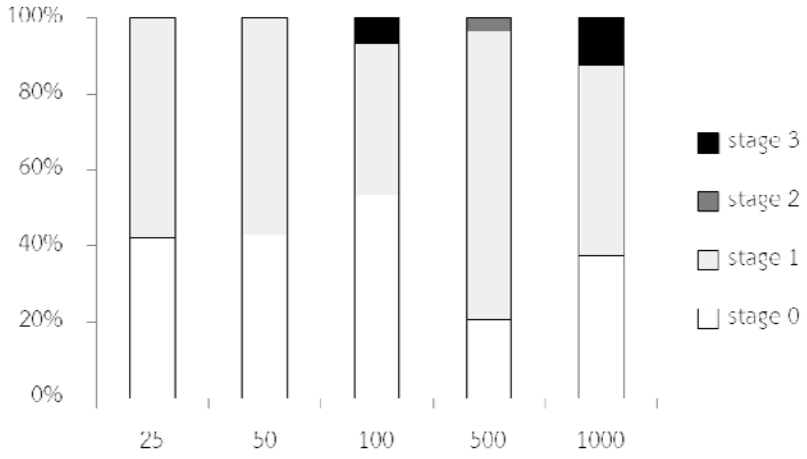


รูปที่ 15 การพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมโดยดูจากค่า VDSI ของหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ที่ทำการเลี้ยงในบ่อที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบผลการศึกษาในสัปดาห์ที่ 4 และ 8

ในการศึกษาความผิดปกติเพศหอยในชนิด *N. stolatus* พบมีการพัฒนาความผิดปกติถึงระยะที่ 3 คือ ปรากฏอวัยวะเพศผู้เทียมที่บริเวณด้านล่างก้านตาด้านขวาและพบการพัฒนาท่อนำอสุจิเทียมระหว่างบริเวณใกล้กับท่อนำไข่ ซึ่งพบในตู้ทดลองเลี้ยงที่เติมสารไตรบิวทิลทินลงในทรายที่ความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อกรัม เมื่อเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ ในตู้ทดลองที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม เมื่อเลี้ยงหอยทะเลเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (รูปที่ 16)



(ก)



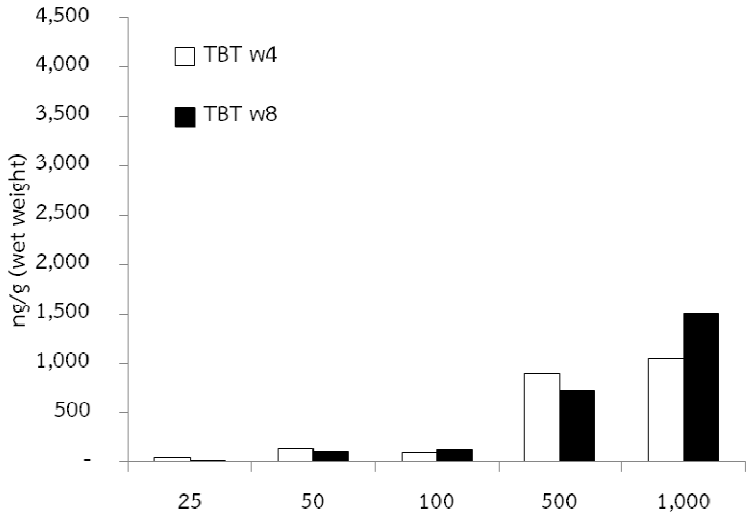
(ข)

รูปที่ 16 สัดส่วนความผิดปกติทางเพศในระยะ (stage) ต่างๆ เมื่อเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ในชุดการทดลองที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวบิลทินคลอไรด์ในทรายที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นระยะเวลา (ก) 4 สัปดาห์ และ (ข) 8 สัปดาห์

การสะสมของสารไตรบิวทิลทินในหอยทะเลฝาเดียวชนิด *N. stolatus*

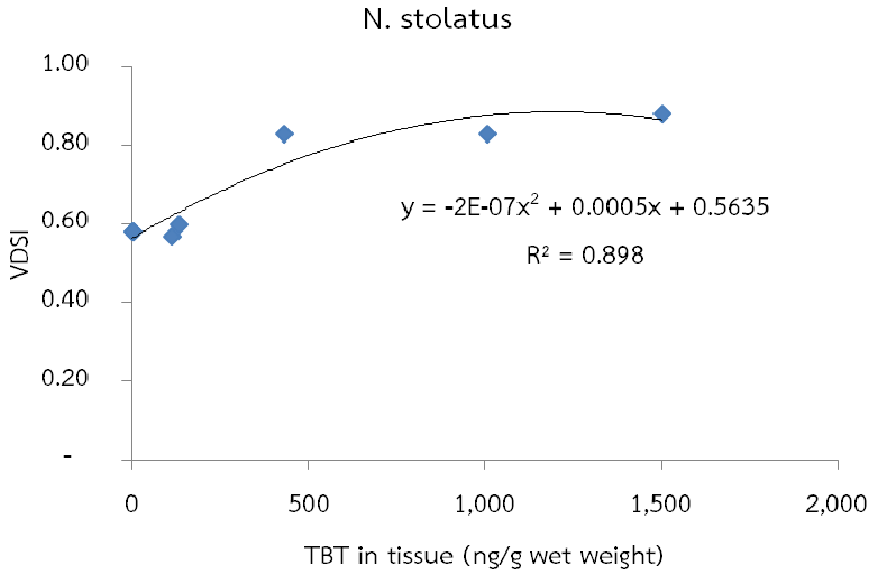
หอยทะเลชนิด *N. stolatus* ในธรรมชาตินั้น ได้ทำการตรวจวัดการสะสมสารไตรบิวทิลทินพบว่ามีค่าน้อยกว่า 1 นาโนกรัม/กรัม (น้ำหนักเปียก) ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเล หลังจากที่ได้เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในชุดการทดลองที่ได้เติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม พบมีแนวโน้มของการสะสมในเนื้อหอยทะเลเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่ได้เติมลงไป (รูปที่ 17) คือมีปริมาณการสะสมในเนื้อหอยทะเลที่ 44.9, 137.9, 97.2, 896.3 และ 1,049.5 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบมีแนวโน้มการสะสมของปริมาณสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื่อเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่ได้เติมลงในบ่อทดลองและเพิ่มมากขึ้นจากการศึกษาในสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 17) ทั้งนี้ชุดการทดลองที่มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม สามารถตรวจพบปริมาณสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื่อ น้อยกว่า 1, 112.2, 131.7, 719.2 และ 1,501.7 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินจากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่ามีค่าการปนเปื้อนสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติในทุกชุดการทดลอง



รูปที่ 17 ปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื่อของหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ที่ได้เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีปริมาณการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่แตกต่างกัน

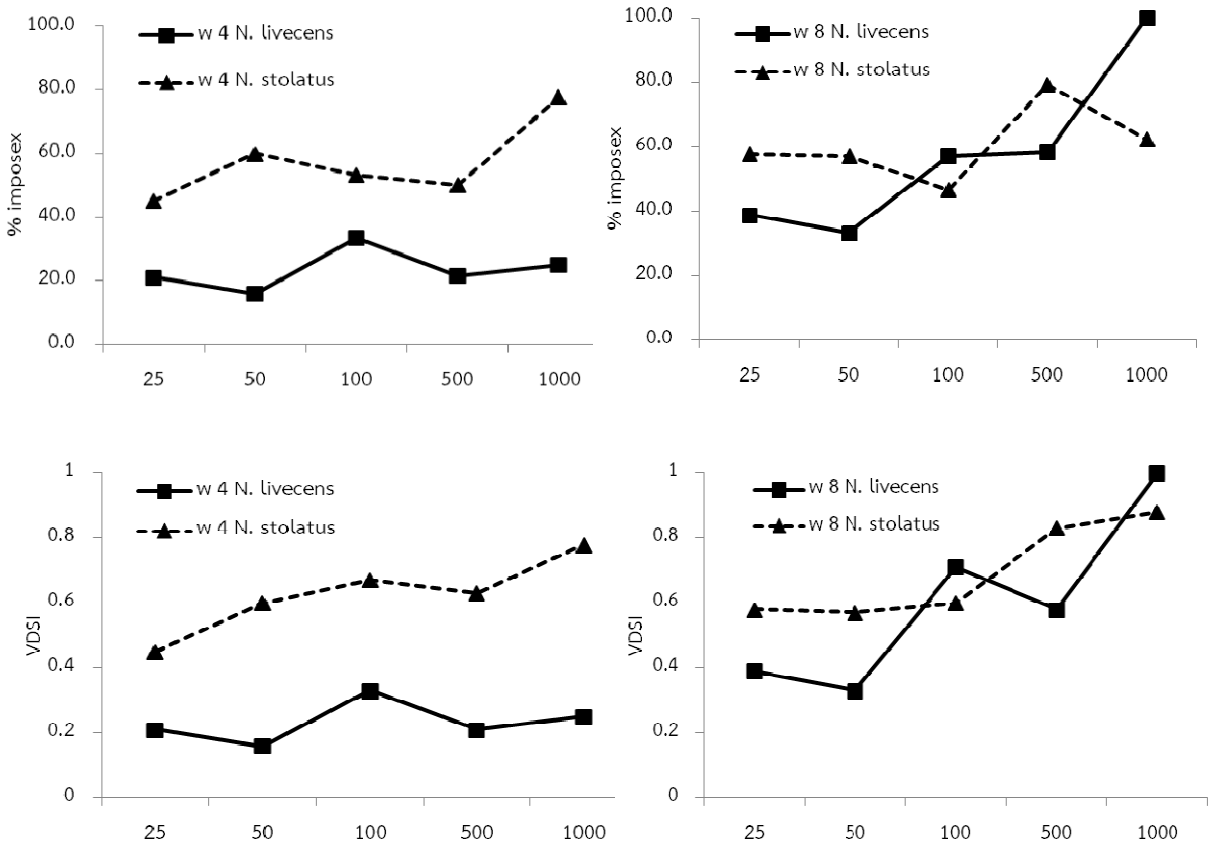
เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของการเกิดความผิดปกติเพศในหอยชนิด *N. stolatus* ต่อปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื่อพบว่ามีความสัมพันธ์กัน (r^2 = 0.898) กล่าวคือ เมื่อมีการสะสมสารดังกล่าวในเนื้อหอยเพิ่มขึ้นมีแนวโน้มที่จะแสดงลักษณะความผิดปกติที่มากขึ้นโดยดูจากค่าเฉลี่ยของระยะการเกิดความผิดปกติ (ค่า VDSI) ที่สูงเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงในการเกิดความผิดปกติเพศหอย (ค่า VDSI) และปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ในเนื้อหอยทะเลชนิด *N. stolatus*

ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลของการชักนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยโดยการเติมสารบิวทิลทินคลอไรด์ลงในทรายที่ใช้เลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. livecens* และ *N. stolatus* พบว่าหลังจากเลี้ยงหอยทะเลเป็นเวลา 4 สัปดาห์ หอยทะเลชนิด *N. stolatus* พบมีการเกิดความผิดปกติ มากกว่าชนิด *N. livecens* กล่าวคือ หอยทะเลชนิด *N. stolatus* พบมีสัดส่วนความผิดปกติ (% imposex) ในแต่ละชุดการทดลองอยู่ระหว่าง 45.0 ถึง 77.8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ชนิด *N. livecens* พบ 15.8 ถึง 33.3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยของระยะการพัฒนาความผิดปกติเพศหอย (ค่า VDSI) ในหอยทะเลชนิด *N. stolatus* มีค่าอยู่ในช่วง 0.45 ถึง 0.78 ซึ่งมีค่าสูงกว่า ชนิด *N. livecens* ที่ตรวจวัดมีค่าอยู่ในช่วง 0.16 ถึง 0.33 (รูปที่ 19) เมื่อทำการวิเคราะห์การพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมในสัปดาห์ที่ 8 ชนิด *N. livecens* พบสัดส่วนความผิดปกติ อยู่ระหว่าง 33.3 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า VDSI อยู่ระหว่าง 0.33 ถึง 1 ส่วนชนิด *N. stolatus* พบมีสัดส่วนความผิดปกติและค่า VDSI อยู่ระหว่าง 46.7 ถึง 79.3 เปอร์เซ็นต์ และ 0.57 ถึง 0.88 ตามลำดับ ซึ่งชนิด *N. stolatus*

พบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดความผิดปกติและค่า VDSI มากกว่า *N. livecens* ในชุดการทดลองที่มีการปนเปื้อน 25, 50 และ 500 นาโนกรัมต่อกรัม (รูปที่ 19) อย่างไรก็ตามระยะความผิดปกติที่พบในระยะการเลี้ยง 8 สัปดาห์ของชนิด *N. stolatus* พบถึงระยะที่ 3 ในขณะที่ชนิด *N. livecens* พบเพียง ระยะที่ 2



รูปที่ 19 เปรียบเทียบการเกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลฝาเดียวชนิด *N. livecens* และ *N. stolatus* เมื่อชักนำโดยการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (นาโนกรัมต่อกรัม)

อภิปรายผลการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบการเกิดความผิดปกติเพศหอยระหว่าง สกุล *Nassarius* sp. ได้แก่ ชนิด *N. stolatus* และ *N. livecen* โดยการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ลงในทรายที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำมาใช้เลี้ยงหอยทะเลพบว่าสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมได้ โดยหอยทะเลที่นำมาเลี้ยงได้แสดงสัดส่วนความผิดปกติมากขึ้นตามลำดับความเข้มข้นที่ได้เติมลงไป (รูปที่ 19) นอกจากนี้ยังพบมีแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมปริมาณไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลต่อปริมาณการปนเปื้อนที่เพิ่มมากขึ้นของสาร (รูปที่ 12 และ 17) หอยทะเลชนิด *N. stolatus* และ *N. livecen* เมื่อทำการเลี้ยงในตู้ทดลองที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเท่ากันพบว่าในสัปดาห์ที่ 4 ชนิด *N. stolatus* มีอัตราการเกิดความผิดปกติทางเพศ (imposex) มากกว่า *N. livecen* และมีความรุนแรงของการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม (ค่า VDSI) สูงกว่า สำหรับผลการศึกษาในสัปดาห์ที่ 8 นั้นมีความแตกต่างไม่ค่อยชัดเจนนัก แต่ทั้งนี้ในตู้ทดลองที่มีการปนเปื้อนต่ำ (25 และ 50 นาโนกรัมต่อกรัม) ชนิด *N. stolatus* จะแสดงความผิดปกติมากกว่า ทั้งนี้หอยทะเลในสกุลเดียวกันอาจมีความไวต่อการตอบสนองต่อสารไตรบิวทิลทินที่แตกต่างกัน ดังเช่นในการศึกษาในสกุล *Stramonita* sp. คือ ชนิด *S. haemastoma* และ *S. rustica* โดย Castro และคณะ (2014) พบว่าชนิด *S. haemastoma* มีความไวในการตอบสนองต่อเร็วกว่า กล่าวคือ ใช้ระยะเวลาในการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมสั้นกว่า และมีความรุนแรงของการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมมากกว่าเมื่ออยู่ในสภาวะเดียวกัน ทั้งนี้ในการตอบสนองที่ไม่เท่ากันนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางสรีระวิทยา (physiological responses) ความสามารถในการสะสมสารที่ได้รับเข้าไป (bioaccumulation factors) ความสามารถในการกำจัดสารแปลกปลอมออกจากร่างกาย (excretion rate for xenobiotic) หรือลักษณะนิสัยการกินอาหารที่เฉพาะเจาะจงของแต่ละชนิด (specific feeding habits) (Castro, *et. al*., 2012 อ้างจาก Gibbs, *et. al*., 1997) อย่างไรก็ดีในการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยในห้องปฏิบัติการครั้งนี้แม้ว่าจะมีการเลี้ยงทดลองในสภาวะใกล้เคียงกัน แต่หอยทะเลทั้งสองชนิดนำมาจากคนละแหล่งซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบได้อย่างชัดเจนนัก

ในการศึกษาครั้งนี้นอกจากจะศึกษาการชักนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยโดยการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆแล้ว ได้มีการศึกษากลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ไม่ได้มีการเติมสารดังกล่าวในหอยทะเลชนิด *N. livecens* ด้วย คือเลี้ยงโดยใช้ทรายจากธรรมชาติ จากผลในการศึกษาพบว่าหอยทะเลชนิด *N. livecens* มีการพัฒนาความผิดปกติเพศหอยได้ โดยในสัปดาห์ที่ 4 พบมีความผิดปกติ 5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงไปจนกระทั่ง 8 สัปดาห์พบมีความผิดปกติทางเพศ 14.3 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ความผิดปกติที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมากจากความเครียดเมื่อนำหอยทะเลมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ดังที่ได้มีการเสนอแนะโดย Nias และคณะ (1993) ซึ่งได้ศึกษาการชักนำให้เกิดความผิดปกติทางเพศในหอยทะเลชนิด *Lepsiella vinosa* ในห้องปฏิบัติการ พบว่าหอยทะเลชนิดดังกล่าวเกิดความผิดปกติเมื่อเลี้ยงในน้ำทะเลที่ไม่ได้มีการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทินเช่นกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยได้รายงานว่าการที่หอยทะเลถูกทำให้สลบด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์หลายครั้งก็อาจชักนำให้เกิดพัฒนาความ

ผิดปกติ (imposex) ได้เนื่องจากสารดังกล่าวทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนชั่วคราวซึ่งฮอร์โมนนี้ชักนำให้เกิดอวัยวะเพศผู้เทียมได้ (Spooner, *et.al*., 1991 อ้างโดย Nias, *et. al*., 1993) อย่างไรก็ตามผลการศึกษากลุ่มที่เลี้ยงในทรายธรรมชาติในห้องปฏิบัติการของการวิจัยครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบอัตราความผิดปกติกับการวิเคราะห์ตัวอย่างในธรรมชาติพบว่าเกิดในสัดส่วนที่น้อยกว่า

ขบวนการที่หอยทะเลได้รับสารปนเปื้อนนั้นนอกจากการได้รับสารโดยตรงแล้ว อาจได้รับจากการกินอาหารได้ (Maran, *et.al*., 2006) จากการศึกษาโดย Stoben และคณะ (1992a) เมื่อเลี้ยง *Hinia reticulata* ในสภาวะที่ไม่ได้มีการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทินแต่มีการให้อาหารคือเนื้อหัวใจวัวที่เติมสารไตรบิวทิลทินลงไป พบว่าหอยทะเลชนิดดังกล่าวมีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมเช่นเดียวกับเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะที่มีการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทินในน้ำทะเลถึงแม้ว่าไม่ได้ให้อาหารที่มีการปนเปื้อนก็ตาม อีกหนึ่งการทดลองการชักนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยในห้องปฏิบัติการ โดย Oehlmann และ คณะ (1998) พบว่าหอยทะเลที่เลี้ยงในชุดทดลองกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการเติมสารไตรบิวทิลทิน มีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยระยะความผิดปกตทางเพศ (ค่า VDSI) อาจเนื่องมาจากระหว่างการทดลองได้ให้หอยแมลงภู่เป็นอาหารซึ่งอาจมีการปนเปื้อน อย่างไรก็ตามพบการเพิ่มขึ้นของค่า VDSI ในตัวเต็มวัย (adult) ค่อยข้างน้อย แต่กับการทดลองกลุ่มควบคุมในหอยทะเลระยะวัยอ่อนที่ได้ให้อาหารอย่างเดียวกันนั้นมีการเพิ่มขึ้นของค่า VDSI ชัดเจนกว่า (Oehlmann, *et. al*., 1998) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ให้เนื้อปลาทูเป็นอาหารแก่หอยทะเลสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตลอดระยะเวลาในการศึกษาซึ่งอาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้หอยทะเลได้รับสารไตรบิวทิลทินและทำให้เกิดการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียมถึงแม้ว่าจะไม่ได้เลี้ยงในทรายที่เติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ก็ตาม ทั้งนี้เนื้อปลาที่ให้เป็นอาหารมีปริมาณการปนเปื้อนน้อยเนื่องจากมีค่าเฉลี่ยของระยะการพัฒนาความผิดปกติทางเพศค่อนข้างต่ำ

อย่างไรก็ดีจากการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในหอยทะเลกลุ่มที่เลี้ยงในทรายธรรมชาติพบว่าเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีปริมาณสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื้อน้อยกว่าตัวอย่างที่วิเคราะห์ในสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 11) จากผลการศึกษานี้ค่อนข้างสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Stroben และคณะ (1992a) ได้ทำการเลี้ยงหอยทะเลชนิด *Hinia reticulata* ที่เก็บมาจากธรรมชาติในสภาวะที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินเป็นระยะเวลา 18 เดือน พบว่าปริมาณของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื้อลดลงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรดีแม้ว่าจะทำการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทินแล้วก็ตาม ความรุนแรงของความผิดปกติที่เกิดขึ้นไม่พบว่ามีแนวโน้มลดลง

การศึกษาความผิดปกติเพศหอยในชุดการทดลองกลุ่มควบคุมที่เติมแต่เพียงเอทานอลนั้นเพื่อศึกษาถึงผลของตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จากผลการศึกษาพบมีการพัฒนาความผิดปกติใน *N. livecen* เช่นกัน โดยหลังจากที่เลี้ยงหอยทะเลเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ามีการพัฒนาอวัยวะเพศผู้เทียม 8 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จากการศึกษาโดย Stroben และ คณะ (1992a) พบว่าเอทานอลสามารถทำให้ความยาวเฉลี่ยของอวัยวะเพศผู้

เทียม (average female penis length) และค่าสัดส่วนขนาดอวัยวะเพศผู้เทียมของหอยทะเลเพศเมียต่ออวัยวะสืบพันธ์ในเพศผู้ (relative penis size) ของหอยทะเลชนิด *Hinia reticulate* เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเอทานอลสามารถเข้าไปมีผลต่อขบวนการเมแทบอลิซึมของฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen metabolism) ได้ (Stroben, *et al*., 1992a อ้างจาก Murono and Fischer-Simpson, 1985) อย่างไรก็ดี Nias และคณะ (1993) ได้รายงานว่าในการทดลองที่เติมกรดอะซิติก (acetic acid) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาให้ละลายในน้ำทะเลก็พบว่าทำให้เกิดความผิดปกติทางเพศได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษาผลของทำตัวละลายชุดการทดลองนี้ได้มีการให้อาหาร (เนื้อปลา) แก่หอยทะเลเช่นเดียวกับการทดลองที่เลี้ยงโดยไม่ได้มีการเติมสารใดๆ ซึ่งการเกิดความผิดปกติเพศหอยมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดจากการได้รับสารกลุ่มบิวทิลทินผ่านทางอาหารที่กินด้วยอีกทางหนึ่ง

ในการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ซึ่งการปรับใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพน่าจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยในสภาพธรรมชาติ หรือนำไปทดลองเลี้ยง (transplant) ในพื้นที่ๆมีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินที่แตกต่างกัน รวมถึงน่าจะมีการศึกษาผลกระทบจากการได้รับสารไตรบิวทิลทินเมื่อหอยทะเลอยู่ในช่วงอายุต่างกันหรือมีขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งผลของขนาดหรือช่วงอายุนั้นก็สามารถส่งผลถึงการตอบสนองต่อสารพิษได้เช่นกัน เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับใช้เป็นดัชนีชี้วัดต่อไป

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติเพศหอยด้วยสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์กับหอยทะเลชนิด *N. livecen* และ *N. stolatus* โดยการเติมสารดังกล่าวลงในทรายที่เลี้ยงด้วยความเข้มข้นต่างๆ พบว่าหอยทะเลทั้งสองชนิดมีแนวโน้มแสดงความผิดปกติมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่ได้เติมลงไป ผลการทดลองเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. livecen* ในตู้ทดลองที่มีการเติมไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดอวัยวะเพศผู้เทียม 5.9, 21.1, 15.8, 33.3, 21.4 และ 25.0 เปอร์เซ็นต์ และในสัปดาห์ที่ 8 พบมีอัตราการเกิดความผิดปกติเพศหอยมากขึ้นซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดเท่ากับ 11.8, 38.9, 33.3, 57.1, 58.3 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้พบมีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยของระดับการพัฒนาความผิดปกติเพศหอย (ค่า VDSI) ด้วย (รูปที่ 10) อย่างไรก็ดีในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ได้มีการเติมสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ด้วยซึ่งพบว่าแม้เลี้ยงในทรายธรรมชาติก็สามารถพบเกิดความผิดปกติได้ (5 ถึง 14%) ซึ่งอาจเกิดจากความเครียดเมื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการหรืออาจได้รับสารปนเปื้อนจากอาหาร จากการศึกษาการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลควบคู่กับการตรวจสอบความผิดปกตินั้นพบมีแนวโน้มมีค่าการสะสมมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่ได้เติมลงไปหลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยที่ตรวจพบได้อยู่ระหว่าง 142.5 ถึง 4,159.2 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของระยะการเกิดความผิดปกติ (ค่า VDSI) กับปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลด้วย (r^2 = 0.64)

จากการทดลองเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ในตู้ทดลองที่มีการเติมไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบเกิดความผิดปกติ 45.0, 60.0, 53.3, 50.0 และ 77.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการตรวจวัดในสัปดาห์ที่ 8 นั้น มีแนวโน้มการเกิดเพิ่มขึ้นแต่ไม่ชัดเจนนักซึ่งมีค่าการเกิดความผิดปกติเพศหอย 57.9, 57.1, 46.7, 79.3, และ 62.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ดีการสะสมของปริมาณสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลมีแนวโน้มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่ได้เติมลงไปหลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยที่ตรวจพบได้อยู่ระหว่างน้อยกว่า 1 ถึง 1,501.7 นาโนกรัมต่อกรัม (น้ำหนักเปียก) และพบความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของระยะการเกิดความผิดปกติ (ค่า VDSI) กับปริมาณการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อหอยทะเลด้วย (r^2 = 0.898)

เมื่อทำการเปรียบเทียบความไวของการเกิดความผิดปกติในสภาวะที่มีการปนเปื้อนเท่ากันระหว่างชนิดที่ทำการศึกษาพบว่า ชนิด *N. stolatus* มีค่าความผิดปกติมากกว่าเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ผลความแตกต่างไม่ชัดเจนนักโดย *N. stolatus* มีค่าความผิดปกติมากว่าเมื่อทำการเลี้ยงในตู้ทดลองที่มีการปนเปื้อน 25, 50 และ 500 นาโนกรัมต่อกรัม

เอกสารอ้างอิง

กณิกนันต์ ศรีสวัสดิ์. 2549. การเกิด imposex และการเปลี่ยนสภาพของสารโมโนบิวทิลทิน ไดบิวทิลทิน และ ไตรบิวทิลทิน ในหอยหวาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา. 188 หน้า.

จุรีพร ล้อมเมตตา. 2544. การปนเปื้อนของสารประกอบบิวทิลทินบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา. 76 หน้า.

มนทกานต์ วิสุทธิแพทย์. 2548. การเปลี่ยนแปลงสภาพของไตรบิวทิลทิน ไดบิวทิลทิน โมโนบิวทิลทิน ในน้ำและดินตะกอน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา. 186 หน้า.

ณิชยา ประดิษฐ์ทรัพย์ และ นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์. 2553. ความผิดปกติทางเพศของหอยทะเลฝาเดียวที่เกิดจากสารป้องกันการเกาะติดของสิ่งมีชีวิตในบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออกของอ่าวไทย: ระยะที่ 1 การสำรวจชนิดของหอยและพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบ. รายงานผลการวิจัยทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2553. 85 หน้า.

ณิชยา ประดิษฐ์ทรัพย์. 2555. ความผิดปกติทางเพศของหอยทะเลฝาเดียวที่เกิดจากสารป้องกันการเกาะติดของสิ่งมีชีวิตในบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออกของอ่าวไทย: ระยะที่ 2: ศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของสารบิวทิลทินในดินตะกอน และในหอยทะเลฝาเดียว. รายงานผลการวิจัยทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2554. 75 หน้า.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กณิกนันต์ ศรีสวัสดิ์ พงษ์รัตน์ ดำรงโรจน์วัฒนา และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2549. สถานการณ์การใช้สารไตรบิวทิลทินและการเกิด Imposex ของหอยกลุ่ม Gastropod ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 11(1): 97-104.

ธีรนาถ สุวรรณเรือง วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย นิตยา ไชยเนตร และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2553. พิษของสารโมโนบิวทิลทิน ไดบิวทิลทิน และไตรบิวทิลทิน ต่อการเกิด Imposex ของหอยหวานในบริเวณอ่าวอุดม จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย. วราสารสาธารณสุขมหาวิทยาลัยบูรพา. ปีที่ 5 ฉบับที่ 1 หน้า 39-49.

Alizeu, C. 1991. Evironmental Problems Caused by TBT in France: Assessment, Regulations, Prospects. Marine Environmental Research. 32: 7-17.

Axiak, V., Vella, A.J., Micallef, D., Chircop, R. and Mintoff, B. 1995. Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. Marine Biology. 121: 685-691.

Barroso, C.M., Reis-Henriques, M.A., Ferreira, M.S. and Moreira, M.H. 2002. The effectiveness of some compounds derived from antifouling paints in promoting imposex in *Nassarius reticulatus*. Journal of the Marine Biological Association of the UK. 82: 249-255.

Bech, M. 2002. Imposex and Tributyltin Contamination as a Consequence of the Establishment of a Marina, and Increasing Yachting Activities at Phuket Island, Thailand. Environmental Pollution. 117: 421–429.

Bech, M., Strand J., and Jacobsen J. A. 2002. Development of imposex and accumulation of butyltin in the tropical muricid *Thais distinguenda* transplanted to a TBT contaminated site. Environmental Pollution. 119: 253-260.

Bettin, C., Oehlmann, J., and Stroben, E. 1996. TBT-induced Imposex in Marine Neogastropods is Mediated by an Increasing Androgen Level. Helgolander Meeresunters. 50: 299-317.

Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G. and Burt, G. R. 1986. The Decline of the Gastropod *Nucella lapillus* Around South-west England: Evidence for the Effect of Tributyltin from Antifouling Paints. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 66: 611-640.

Castro, I. B., Rocha-Barreirab, C., Fernandezc, M. A. and Bigattid G. 2012. Transplant bioassay induces different imposex responses in two species of the genus *Stramonita*. Marine Biology Research. 8: 397-404.

de Mora, S. J., Stewart, C. and Phillips, D. 1995. Sources and rate of degradation of tri(n-butyl)tin in marine sediments near Auckland, New Zealand. Marine Pollution Bulletin. 30: 50-57.

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Weltje, L., and Oehlmann, J. 2005. Biological impact of organotin compounds on mollusks in marine and freshwater ecosystems. Coastal marine science. 29(2): 95-110.

Gibbs, P.E. and Bryan, G.W. 1986. Reproductive Failure in Populations of the Dog-whelk, *Nucella lapillus*, Caused by Imposex Induced by Tributyltin from Antifouling Paints. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 66: 767-777.

Gibbs, P.E., Bebianno, M.J. and Coelho, M.R. 1997. Evidence of the differential sensitivity of neogastropods to tributyltin (TBT) pollution, with notes on a species (*Columbella rutica*) lacking the imposex response. Environmental Technology. 18: 1219-1224.

Harino, H. 2003. Determination of butyltin and phenyltin compounds in water, sediment and biological samples by liquid-liquid extraction and gas chromatography with flame photometric detector. In JSPS International Workshop for Inter-calibration of Hazardous Chemicals. Nobuyuki Miyazaki and Gullaya Wattayakorn editor. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. 10-14 March, 2003. 200 p.

Harino,. H., Ohji, M., Wattayakorn, G., Arai, T., Rungsupa, S., and Miyazaki, N. 2006. Occurrence of Antifouling Biocides in Sediment and Green Mussels from Thailand. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51: 400-407.

Hoch M. and D. Schwesig. 2004. Parameters controlling the partitioning of tributyltin (TBT) in aquatic systems. Applied Geochemistry. 19: 323-334.

Horiguchi, T, Cho, H., Shiraishi, H., Kojima, M., Kaya, M., Morita, M. and Shimizu, M. 2001. Contamination by Organotin (tributyltin and triphenyltin) Compounds from Antifouling Paints and Endocrine Disruption in Marine Gastropods. RIKEN Review. 33: 9-11.

Jacobsona, T., Sundelina, B., Yangb, G. and Fordb, A. T. 2011. Low dose TBT Exposure Decreases Amphipod Immunocompetence and Reproductive Fitness. Aquatic Toxicology. 101(1): 72-77.

Kan-atireklap, S., S. Tanabe and J. Sanguansin. 1997**.** Contamination by Butyltin Compounds in sediments from Thailand. Marine Pollution Bulletin. 34 (11): 894-899.

Kannan, K. and Tanabe, S. 2009. Global Contamination by Organotin Compounds. In Ecotoxicology of Antifouling Biocides: Arai, et al, editor. Springer. Japan. 437 p.

Langston, W.J. and Pope, N.D. 1995. Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. Marine Pollution Bulletin. 31 (1-3). 32-43.

Langston W.J. and Burt, G.R.. 1991. Bioavailability and Effects of Sediment-Bound TBT in Deposit-Feeding Clams, *Scrobicularia Plana*. Marine Environmental Research 32: 61-77.

Lignota, J. H., Pannierb, F., Trillesa, J. P. and Charmantiera, G. 1998. Effects of Tributyltin Oxide on Survival and Osmoregulation of the Shrimp *Penaeus japonicus* (crustacea, decapoda). Aquatic Toxicology. Vol. 41(4): 277-299.

Lima-Verde, F., Castro, I.B. and Rocha-Barreira, C.A. 2010. Imposex occurrence in *Nassarius vibex* from South America: a potential bioindicator in estuarine environments. Marine Biodiversity Records. Vol 3. 1-4.

Maran, C., Centanni, E., Pellizzato, F. and Pavoni, B. 2006. Organochlorine compounds (polychlorinated biphenyls and pesticides) and polycyclic aromatic hydrocarbons in populations of *Hexaplex trunculus* affected by imposex in the Lagoon of Venice, Italy. Environmental Toxicology and Chemistry. 25: 486–495.

Marshall, D.J. and Rajkumar, A. 2003. Imposex in the indigenous *Nassarius kraussianus* (Mollusca: Neogastropoda) from South African harbours. Marine Pollution Bulletin 46: 1150–1155.

Mensink, B. P. 1999. Imposex in the Common Whelk, *Buccinum undatum*. Ponsen & Looijen B.V., Wageningen. 125 p.

Muenpo, C. Suwanjarat, J. and Klepal, W. 2010. Ultrastructure of oogenesis in imposex females of *Babylonia areolata* (Caenogastropod: Buccinidae). Helgol. Mar. Res.

Murono, E.P., Fisher-Simpson, V. 1985. Ethanol directly increases dihydrotestosterone conversion primarily to 5α-androstan-3β, 17β-diol in rat Leydig cells. Life Sciences 36: 1381 -1387.

Nias, D.J., McKillup, S.C. and Edyvane, K.S. 1993. Imposex in *Lepsiella vinosa* from Southern Australia. *Marine Pollution Bulletin.* Vol 26(7). 380-384.

Oehlmann, J., Bauer, B., Minchin, D., Schulte-Oehlmann, U., Fioroni, P. and Markert, B. 1998. Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. Hydrobiologia. 378: 199–213.

Reitsema, T. J., Field, S., and Spickett, J. T. 2003. Surveying Imposex in the Coastal Waters of Perth, Western Australia, to monitor Trends in TBT Contamination. Australasian Journal of Ecotoxicology. Vol. 9: 87-92.

Rodríguezа, J.G., Borjaa, A., Francoa, J., Alonsob, J.I.G., Garmendia, J.M., Muxika, I., Sariegoc, C. and Valencia, V. 2009. Imposex and butyltin body burden in *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867), in coastal waters within the Basque Country (northern Spain). Science of The Total Environment. 407(14): 4333–4339.

Rodríguez J. G., P. Rouget, J. Franco, J. M. Garmendia, I. Muxika, V. Valencia and Á. Borja. 2010. Evaluation of the use of transplanted *Nassarius reticulates* (Linnaeus, 1758), in monitoring TBT pollution, within the European Water Framework Directive. Ecological Indicator. 10: 891-895.

Shimasaki, Y., Kitano, T., Oshima, Y., Inoue, S., Imada, N., Honjo, T. 2003. Tributyltin Causes Masculinization in Fish. Environmental Toxicology and Chemistry. 22(1): 141-144.

Smith, P.J. 1996. Selective Decline in Imposex Levels in the Dogwhelk *Lepsiella scobina* Following a Ban on the Use of TBT Antifoulants in New Zealand. Marine Pollution Bulletin. Vol. 32 (4): 362-365.

Sudaryantoa, A., Takahashia, S., Iwataa, H., Tanabe, S. and Ismail, A. 2004. Contamination of Butyltin Compounds in Malaysian marine environments. Environmental Pollution. 130: 347 – 358.

Swennen, C. and Horpet, P. 2008. Pseudo-imposex; Male Features in Female Volutes not TBT-Induced (Gastropoda: Volutidae). Contributions to Zoology. 77(1): 17-24.

Swennen C., Sampantarak, U and Ruttanadakul N. 2009. TBT-pollution in the Gulf of Thailand: A re-inspection of imposex incidence after 10 years. Marine Pollution Bulletin. 58: 526 – 532.

Stebbing, A. R. D. 1985. Organotins and water quality-some lessons to be learned. Marine Pollution Bulletin. 16 (10): 363-389.

Stoben, E. Oehlmann and Fioroni, P. 1992a. *Hinia reticulate* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropod tributyltin bioindicators. Marine Biology. 114: 289-296.

Stoben, E. Oehlmann and Fioroni, P. 1992b. The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. Marine Biology. 113: 625-636.

Wattayakorn, G. 2008. Status of Butyltin Contamination in Thailand Coastal Waters. Coastal Marine Science. 32(1): 82-87.

ภาคผนวก

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติทางเพศ (% imposex) และค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอย (vas deferens sequence index; VDSI) เมื่อทำการเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. livecens* ที่ระดับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์

treatment	จำนวน (ตัว)	ความยาวเปลือกเฉลี่ย (มม.)	% imposex	VDSI
C1	20	19.0 ± 2.3	5.0	0.05 ± 0.2
C2	19	19.1 ± 2.1	0.0	0 ± 0.0
10	17	19.3 ± 2.8	5.9	0.06 ± 0.2
25	19	18.9 ± 1.9	21.1	0.21 ± 0.4
50	19	18.3 ± 1.9	15.8	0.16 ± 0.4
100	18	18.4 ± 2.1	33.3	0.33 ± 0.5
500	14	19.6 ± 1.2	21.4	0.21 ± 0.4
1,000	12	17.8 ± 1.2	25.0	0.25 ± 0.5

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติทางเพศ (% imposex) และค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอย (vas deferens sequence index; VDSI) เมื่อทำการเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. livecens* ที่ระดับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

treatment	จำนวน (ตัว)	ความยาวเปลือกเฉลี่ย (มม.)	% imposex	VDSI
C1	14	18.5 ± 2.1	14.3	0.14 ± 0.4
C2	25	18.2 ± 2.1	8.0	0.08 ± 0.3
10	17	18.1 ± 1.6	11.8	0.24 ± 0.4
25	18	19.2 ± 2.1	38.9	0.39 ± 0.5
50	15	18.7 ± 2.7	33.3	0.33 ± 0.5
100	14	17.7 ± 2.0	57.1	0.71 ± 0.6
500	12	19.4 ± 1.8	58.3	0.58 ± 0.5
1,000	3	17.5 ± 1.9	100.0	1 ± 0.0

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติทางเพศ (% imposex) และค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอย (vas deferens sequence index; VDSI) เมื่อทำการเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ที่ระดับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์

treatment	**จำนวน (ตัว)**	**ความยาวเปลือกเฉลี่ย (มม.)**	**% imposex**	**VDSI**
25	20	18.41 ± 2.6	45.0	0.45 ± 0.5
50	15	18.17 ± 0.9	60.0	0.60 ± 0.5
100	15	17.81 ± 1.5	53.3	0.67 ± 0.5
500	18	17.87 ± 0.8	50.0	0.63 ± 0.8
1,000	18	17.96 ± 1.1	77.8	0.78 ± 0.4

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติทางเพศ (% imposex) และค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดความผิดปกติเพศหอย (vas deferens sequence index; VDSI) เมื่อทำการเลี้ยงหอยทะเลชนิด *N. stolatus* ที่ระดับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินคลอไรด์ที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

treatment	**จำนวน (ตัว)**	**ความยาวเปลือกเฉลี่ย (มม.)**	**% imposex**	**VDSI**
25	19	18.6 ± 0.9	57.9	0.58 ± 0.5
50	14	18.1 ± 1.3	57.1	0.57 ± 0.5
100	15	17.6 ± 0.9	46.7	0.6 ± 0.8
500	29	18.1 ± 1.1	79.3	0.83 ± 0.5
1,000	8	17.7 ± 1.4	62.5	0.88 ± 0.99