

ผลของชนิดและขนาดของไมโครพลาสติกต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงทาง  
มิถุนวิทยาของหอยแมลงภู่ *Perna viridis*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF TYPES AND SIZES OF MICROPLASTICS ON OXIDATIVE STRESS AND  
HISTOLOGICAL CHANGES IN GREEN MUSSEL *Perna viridis*



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Marine Science  
Department of Marine Science  
FACULTY OF SCIENCE  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2020  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของชนิดและขนาดของไมโครพลาสติกต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงทางมิถุนวิทยาของหอยแมลงภู่ <i>Perna viridis</i>
โดย	น.ส.จุฑามาศ โปธางวัณประชา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.ศุภณัฐ ไพโรหกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ศาสตราจารย์ ดร.วรรณพ วิทยาญจน์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ศุภณัฐ ไพโรหกุล)	
.....	กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุธาพร บุญญเจตน์พงษ์)	
.....	กรรมการ
(ดร.สุรเชษฐ์ บุรุษอาชาไนย)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภกิจ สุทธิเรืองวงศ์)	

จุฬามาศ โปธาขวัญประชา : ผลของชนิดและขนาดของไมโครพลาสติกต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงทางมิถุนวิทยาของหอยแมลงภู่ *Perna viridis* . ( EFFECTS OF TYPES AND SIZES OF MICROPLASTICS ON OXIDATIVE STRESS AND HISTOLOGICAL CHANGES IN GREEN MUSSEL *Perna viridis* ) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร. ศุภณัฐ ไพโรหกุล

ไมโครพลาสติก (MPs) คือพลาสติกที่มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตรพบการสะสมและการถ่ายทอดของไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเป็นจำนวนมาก โดยผ่านห่วงโซ่อาหาร การศึกษาในประเทศไทยพบการศึกษาศึกษาการสะสมของไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมและในสิ่งมีชีวิตเท่านั้น ยังไม่มีการศึกษาถึงผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อสัตว์น้ำภายใต้ห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ที่มีพฤติกรรมการกรองกิน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลกระทบของประเภท ขนาดและความเข้มข้นของไมโครพลาสติกจำลองที่มีต่ออัตราการตายและการสะสมภายในเนื้อเยื่อที่จะส่งผลกระทบต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงทางมิถุนวิทยาในหอยแมลงภู่ *P. viridis* ในการทดลอง ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อหอยแมลงภู่ ที่ระดับความเข้มข้น 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร จำนวน 3 ขนาดได้แก่ ขนาดเล็ก (<30 ไมโครเมตร), ขนาดกลาง (30-300 ไมโครเมตร) และขนาดใหญ่ (300-1000 ไมโครเมตร) ของไมโครพลาสติก 3 ประเภทคือ พอลิสไตรีน (Polystyrene; PS), พอลิโพรพิลีน (Polypropylene; PP) และพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate; PBS) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าไมโครพลาสติกขนาดกลางและขนาดใหญ่ส่งผลต่ออัตราการตายครั้งหนึ่งของหอยแมลงภู่มากที่สุดในไมโครพลาสติกประเภท PS, PP และ PBS ตามลำดับ ในขณะที่การสะสมไมโครพลาสติกขนาดใหญ่พบภายใน soft tissue ของหอยแมลงภู่ *P. viridis* มากกว่าขนาดกลางและขนาดเล็ก ที่เวลา 96 ชั่วโมงในส่วนของ การตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อบริเวณต่อมย่อยอาหารและมีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ Catalase, Peroxidase และสารต้านอนุมูลอิสระ Glutathione content บริเวณต่อมย่อยอาหาร พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระตามการเพิ่มขึ้นของไมโครพลาสติกเมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้การศึกษาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางมิถุนวิทยาในบริเวณต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ *P. viridis* พบลักษณะเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเซลล์ย่อยอาหารในต่อมย่อยอาหารมีความเสียหาย สังเกตความผิดปกติได้ชัดเจนมากขึ้นตามความเข้มข้นของไมโครพลาสติกที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าประเภทและขนาดของไมโครพลาสติกเป็นปัจจัยสำคัญต่อการตอบสนองความเป็นพิษในหอยแมลงภู่ ซึ่งอาจส่งผลให้เพิ่มความเสี่ยงในการส่งผ่านห่วงโซ่อาหารในลำดับขั้นที่สูงขึ้น การตรวจสอบผล กระทบของไมโครพลาสติกจึงเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการคาดการณ์ระดับความเข้มข้นที่เป็นอันตรายต่อหอยแมลงภู่ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำเพื่อนำไปประกอบการประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมและจัดการผลกระทบจากการปนเปื้อนไมโครพลาสติกในหอยต่อสุขภาพของผู้บริโภค

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6171928923 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEYWORD: Accumulation, Biological magnification, Histology, Lethal concentration,  
Microplastics, Oxidative stress, *Perna viridis*

Jutamas Phothakwanpracha : EFFECTS OF TYPES AND SIZES OF MICROPLASTICS ON  
OXIDATIVE STRESS AND HISTOLOGICAL CHANGES IN GREEN MUSSEL *Perna viridis* . Advisor:  
Assoc. Prof. Thaithaworn Lirdwitayaprasit, Ph.D. Co-advisor: Supanut Pairohakul, Ph.D.

Microplastics (MPs) can be defined as small pieces of plastics that are less than five millimetres in diameter. MPs can be consumed and may be accumulated in animal and moves through the food chain. Although, the accumulation of plastic debris and MPs in marine ecosystems of Thai waters have been reported in numerous organisms. However, the study on eco-toxicological effect of MPs on tissue morphology and oxidative stress in filter-feeding organisms such as mussels *Perna viridis* under laboratory conditions has not been conducted yet. Therefore, this study aimed to determine the effects of different types, sizes, and concentrations of artificial MPs on the mortality rate, accumulation in the soft tissue, oxidative stress, and histological changes in the green mussel *Perna viridis*. The samples were exposed to 66, 333, 666, and 1333 items/L of small MPs (<30 µm), medium MPs (30-300 µm), and large MPs (300- 1000 µm) polystyrene (PS), polypropylene (PP), and polybutylene succinate (PBS) for 96 hours. MPs accumulation in the soft tissue of mussels and mortality effects from MPs ingestion were assessed. Medium and large PS caused a higher mortality percentage than the identical size particles of PP and PBS. MPs largely accumulated in the soft tissues rather than in gill tissues following the 96-hour exposure period. Modulations of the antioxidant activity were detected in the digestive gland after the mussel exposure to the MPs. Catalase, Peroxidase, and Glutathione content in the digestive gland tended to increase with an increase of the MPs. Also, the histopathological changes in digestive gland were observed. Cell necrosis occurred when the exposure dosages were high. The study highlights how particle size and type are key factors in MPs toxicity. The accumulation of MPs in mussel may increase the potential risk for higher trophic levels. The effects of MPs to the mussels will provide the essential data that may be applied for developing the water quality criteria for MPs and for the risk assessment of MPs in coastal marine environment including the impacts of contaminated mussel to human health.

Field of Study: Marine Science

Academic Year: 2020

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้คงจะสำเร็จลุล่วงไม่ได้หากปราศความกรุณาจากอาจารย์หลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วรมน พุทธิกาญจน์ รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์ อาจารย์ ดร.ศุภณัฐ ไพโรหกุล อาจารย์ ดร.สุธาพร บุญญเจตน์พงษ์ ดร.สุรเชษฐ์ บุรุษอาชาไนย และ รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภกิจ สุทธิเรืองวงศ์ สำหรับความกรุณาในการเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ อาจารย์ ดร.ศุภณัฐ ไพโรหกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา คอยชี้แนะแนวทางและให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างมาก ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้าจนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภกิจ สุทธิเรืองวงศ์ อาจารย์คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับความช่วยเหลือในการจัดหาไมโครพลาสติกในการทดลองครั้งนี้และให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางในการทดลอง

ขอขอบคุณ ดร.สุรเชษฐ์ บุรุษอาชาไนย นักวิจัยศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำในการวัดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยประมงศรีราชา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กมลวี เยี่ยมสมบูรณ์ นายหรินทร์ แดงหน้าย สำหรับการอำนวยความสะดวกในการใช้พื้นที่ สถาบันวิจัยสัตว์ทะเลอ่อนศิลา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดชลบุรี

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ microtome คุณทัตพร กาญจนเรขา คุณนัชชา สุขชี สำหรับการช่วยเหลือในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ที่ได้รับผลกระทบจากไมโครพลาสติก

ขอขอบคุณ คุณอิงอร ทองคำดี คุณปฎิภาณ พุ่มพวง คุณกมลพร พัฒนศิริ คุณนันทกัศ โปธิสาร และสมาชิกห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือที่ดีเสมอมา

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	11
สารบัญภาพ.....	11
บทที่ 1.....	18
บทนำ.....	18
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	18
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	20
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	20
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	21
บทที่ 2.....	22
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
2.1 พลาสติก.....	22
2.2 กระบวนการเสื่อมสภาพของพลาสติก.....	22
2.3 ไมโครพลาสติก.....	23
2.4 การปนเปื้อนไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อม.....	24
2.5 การสะสมไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิต.....	25
2.6 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อสัตว์ทะเล.....	25
2.7 สถานการณ์ไมโครพลาสติกในประเทศไทย.....	26

2.8	ชีววิทยาของหอยแมลงภู่ <i>Perna viridis</i> (Linnaeus, 1758).....	31
2.8.1	การจำแนกอนุกรมวิธาน.....	31
2.8.2	ถิ่นที่อยู่อาศัยและการกระจาย .....	31
2.8.3	ลักษณะโดยทั่วไป.....	32
2.8.4	ลักษณะภายนอกและภายในของหอยแมลงภู่ <i>Perna viridis</i> .....	32
2.8.5	ลักษณะการกรองกิน .....	33
2.8.6	โครงสร้างภายในของเหงือก .....	34
2.8.7	โครงสร้างภายในของต่อมย่อย.....	35
2.9	ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ในสิ่งมีชีวิตทางน้ำ.....	36
2.9.1	Free radicals และ reactive oxygen species (ROS).....	36
2.9.2	Antioxidant defenses ในสัตว์น้ำ.....	39
บทที่ 3	.....	41
วิธีการดำเนินงานวิจัย	.....	41
3.1	การเตรียมไมโครพลาสติก.....	41
3.2	การเตรียมแพลงก์ตอนพืชชนิด <i>Isochrysis galbana</i> เพื่อเป็นอาหารของ หอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ).....	43
3.3	การเก็บตัวอย่างและการปรับสภาพสัตว์ทดลองหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ).....	43
3.4	การศึกษาอัตราการกรองกินในหอยแมลงภู่และการตรวจนับความคงเหลือของไมโคร พลาสติกในมวลน้ำ.....	46
3.5	ศึกษาอัตราการตายเฉื่อยครั้งหนึ่งของประชากร (Lethal Concentration <sub>50</sub> ; LC <sub>50</sub> ) .....	46
3.6	การควบคุมคุณภาพของการทดลองการสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ) .....	48
3.7	การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่.....	49



3.7.1 การสะสมของไมโครพลาสติกในเนื้อเยื่อ (soft tissue) ของหอยแมลงภู่	49
.....	49
( <i>Perna viridis</i> ).....	49
3.7.2 ปริมาณไมโครพลาสติกใน biodeposits (feces และ pseudofeces)	
ของหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ).....	50
3.8 การศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการแสดงออกภาวะเครียดจาก	
ออกซิเดชัน (Oxidative stress) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ ( <i>Perna</i>	
<i>viridis</i> ).....	51
3.8.1 การวัดปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Bradford Protein assay .....	52
3.8.2 การตรวจวัดกิจกรรม Antioxidant enzyme ในต่อมย่อยอาหารของ	
หอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ) .....	54
3.8.3 การตรวจวัดกิจกรรม Glutathione (GSH) ในต่อมย่อยอาหารของ	
หอยแมลงภู่( <i>Perna viridis</i> ).....	54
3.8.4 การตรวจวัดกิจกรรม Catalase (CAT) ในต่อมย่อยอาหารของ	
หอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ) .....	55
3.8.5 การตรวจวัดกิจกรรม Peroxidase (POD) ในต่อมย่อยอาหารของ	
หอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ) .....	55
3.9 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในหอยแมลงภู่	
( <i>Perna viridis</i> ).....	56
3.9.1 การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection) และการคงสภาพเนื้อเยื่อ	
(fixation) .....	56
3.9.2 การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydration) และการขจัด	
เอทิลแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (Clearing or	
Dealcoholization).....	56
3.9.3 การแทรกซึมของพาราฟิน (Infiltration).....	56
3.6.4 การฝังเนื้อเยื่อในพาราพลาสติก (Embedding).....	57
3.6.5 ตัดแต่งหน้าบล็อก (Trimming).....	58

3.6.6 การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง (Sectioning) และติดเนื้อเยื่อแผ่นบางบนสไลด์ (Affix).....	58
3.6.7 การย้อมสี (Staining).....	58
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	60
บทที่ 4 .....	61
ผลการศึกษา .....	61
4.1 ความเป็นพิษของไมโครพลาสติกต่ออัตราการตายของหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ) .....	61
4.2 การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ) .....	66
4.2.1 การสะสมไมโครพลาสติกที่ภายนอก soft tissue ของหอยแมลงภู่.....	66
4.2.2 การสะสมไมโครพลาสติกที่ภายใน soft tissue ของหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ) .....	70
4.2.3 รูปร่างและขนาดของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> )..	78
4.2.4 ไมโครพลาสติกใน feces ของหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ).....	79
4.3 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการแสดงออกภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ).....	89
4.3.1 กิจกรรมของ Antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่.....	89
4.3.2 กิจกรรมของ Catalase (CAT) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่....	93
4.3.3 กิจกรรมของ Peroxidase (POD) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่97	
4.3.4 ความเข้มข้นของ total Glutathione (GSH) content ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่.....	101
ความเข้มข้นของ total GSH.....	101
4.4 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ) .....	106
บทที่ 5 .....	111

อภิปรายผลการศึกษา.....	111
5.1 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่ออัตราการตายของหอยแมลงภู่ .....	111
5.2 การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ <i>Perna viridis</i> .....	113
5.3 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการแสดงออกภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> )... ..	116
5.4 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของ หอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ).....	119
บทที่ 6 .....	120
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	120
6.1. ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่ออัตราการตายของหอยแมลงภู่ .....	120
6.2 การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ <i>Perna viridis</i> .....	120
6.3 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการแสดงออกภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) ใน ต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ).. ..	121
6.4 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของ หอยแมลงภู่ ( <i>Perna viridis</i> ).....	121
6.5 ข้อเสนอแนะ.....	122
ภาคผนวก.....	123
บรรณานุกรม.....	2
ประวัติผู้เขียน.....	21

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	การสะสมของไมโครพลาสติกในแหล่งน้ำจากทั่วโลก .....	28
ตารางที่ 2	การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยสองฝาทั่วโลก .....	30
ตารางที่ 3	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตราฐาน .....	53
ตารางที่ 4	ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ การใส่สารแทนที่ตัวดึงน้ำ และการแทรกซึมเนื้อเยื่อด้วยพาราฟอสต์เหลว.....	57
ตารางที่ 5	ขั้นตอนการย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม Hematoxylin และ Eosin .....	59
ตารางที่ 6	อัตราการตายครั้งหนึ่งของประชากรในไมโครพลาสติกทั้งสามประเภท .....	62
ตารางที่ 7	การสะสมไมโครพลาสติกประเภท PS ในหอยแมลงภู่และใน feces.....	83
ตารางที่ 8	การสะสมไมโครพลาสติกประเภท PP ในหอยแมลงภู่และใน feces.....	85
ตารางที่ 9	การสะสมไมโครพลาสติกประเภท PBS ในหอยแมลงภู่และใน feces .....	87

## สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1	รูปทรงของไมโครพลาสติกประเภททุติยภูมิ (secondary microplastics) ที่พบในทะเลสาบ Qinghai ในประเทศจีน (A) แผ่น (B) ฟิล์ม (C) เส้นใย (D) ชิ้นส่วน (E) เม็ดกลม (F) โฟม (Wu et al., 2018).....	24
รูปที่ 2	ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำที่ส่งผลให้เกิดการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (ดัดแปลงจาก Avio et al., 2015 ;Van Cauwenberghe et al., 2015).....	26
รูปที่ 3	ลักษณะเปลือกของหอยแมลงภู่ <i>Perna viridis</i> (Linnaeus, 1758) ( ดัดแปลงจาก de Messano et al., 2019).....	32
รูปที่ 4	ลักษณะภายนอกของหอยแมลงภู่ <i>P. viridis</i> (AquaBio Consultants Ltd).....	33
รูปที่ 5	ลักษณะของเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ในภาวะปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E โดย digestive tubules (dt) จะประกอบด้วยเซลล์ย่อยอาหารชั้นเดียว (single layer of digestive	

cell) (ลูกระสสีขา) และ basophilic cell (ลูกระสแถบสีเทา) การเรียงตัวที่ไม่เท่ากันของ 2 เซลล์นี้ทำให้เกิด tubular lumen (tl) และส่วนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มี granulocytes ล้อมรอบ (ลูกระสแถบสีขา) (Cuevas et al., 2015).....	36
<b>รูปที่ 6</b> Enzymatic pathway สำหรับกระบวนการกำจัดของ ROS ในเซลล์สิ่งมีชีวิต.....	40
<b>รูปที่ 7</b> รูปร่างของไมโครพลาสต์ขนาดกลาง (30-300 $\mu\text{m}$ ) ทั้ง 3 ประเภท (A) ไมโครพลาสต์ประเภท PS (B) ไมโครพลาสต์ประเภท PP และ (C) ไมโครพลาสต์ประเภท PBS Scale Bar เท่ากับ 50 $\mu\text{m}$ .....	42
<b>รูปที่ 8</b> การนำหัวเชื้อ <i>Isochrysis galbana</i> ปริมาตร 100 มิลลิลิตรมาขยายเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนสูตร T1 ที่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที.....	43
<b>รูปที่ 9</b> (A, B) การเก็บตัวอย่างหอยแมลงภู (P. viridis) จากฟาร์มหอยแมลงภูในที่ชุมชนตากวน ตำบลมาตาพุด อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง (C) ตัวอย่างจะทำความสะอาดภายนอกของหอยแมลงภูก่อน (D) นำไปปรับสภาพในระบบเลี้ยงแบบปิดเป็นเวลา 7 วัน (E) ระบบตู้เลี้ยงแบบปิดที่ใช้ในการทดลอง .....	45
<b>รูปที่ 10</b> การทดลองความเข้มข้นไมโครพลาสต์ที่แตกต่างกัน 5 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร และ 3 ขนาดที่แตกต่างกันของไมโครพลาสต์ (ขนาดเล็ก; <30 $\mu\text{m}$ , ขนาดกลาง; 30-300 $\mu\text{m}$ และขนาดใหญ่; 300-1000 $\mu\text{m}$ ) ในการทดลองใช้ตัวอย่างทั้งหมดสามซ้ำ (n = 3) ต่อการทดลอง การออกแบบการทดลองนี้ถูกนำมาใช้สำหรับ ไมโครพลาสต์แต่ละประเภท (PS, PP และ PBS).....	48
<b>รูปที่ 11</b> วิธีการศึกษาการสะสมของไมโครพลาสต์ใน soft tissue และเหงือกของหอยแมลงภู.....	50
<b>รูปที่ 12</b> A) ตัวอย่างที่แช่ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ภาชนะที่ใช้ในการย่อยจะใช้เป็นขวดแก้วที่ปิดด้วยฟอยล์อลูมิเนียม (B) ตัวอย่างอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน (C) ตัวอย่างอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน.....	51
<b>รูปที่ 13</b> แผนภาพแสดงตัวอย่างการเตรียมและวิธีการวิเคราะห์สำหรับตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู (P. viridis) .....	52
<b>รูปที่ 14</b> สมการเคมีของ GSH ที่นำมาปรับใช้ในชุดตรวจวัดกิจกรรม GSH ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างทดลอง (Tipple & Rogers, 2012).....	55
<b>รูปที่ 15</b> กระบวนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ.....	60

- รูปที่ 16** อัตราการตายของ *P. viridis* ที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร ของ PS เมื่อเวลาครบ 96 ชั่วโมง (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 63
- รูปที่ 17** อัตราการตายของ *P. viridis* ที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร ของ PP เมื่อเวลาครบ 96 ชั่วโมง (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 64
- รูปที่ 18** อัตราการตายของ *P. viridis* ที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร ของ PBS เมื่อเวลาครบ 96 ชั่วโมง (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 65
- รูปที่ 19** การสะสมของ PS ภายนอก soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 67
- รูปที่ 20** การสะสมของ PP ภายนอก soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 68
- รูปที่ 21** การสะสมของ PBS ภายนอก soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 69
- รูปที่ 22** การสะสมของ PS ภายใน soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 72
- รูปที่ 23** การสะสมของ PS ภายในเหงือกของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 73

- รูปที่ 24** การสะสมของ PP ภายใน soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 74
- รูปที่ 25** การสะสมของ PP ภายในเหงือกของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 75
- รูปที่ 26** การสะสมของ PBS ภายใน soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 76
- รูปที่ 27** การสะสมของ PBS ภายในเหงือกของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 77
- รูปที่ 28** ร้อยละของรูปร่างไมโครพลาสติกที่สะสมในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ..... 78
- รูปที่ 29** รูปร่างของไมโครพลาสติกที่สะสมในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) (A) fragment (B) film (scale bar=50  $\mu\text{m}$ ) ..... 78
- รูปที่ 30** ร้อยละของแต่ละขนาดของไมโครพลาสติกที่สะสมในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) (a) ไมโครพลาสติกประเภท PS (b) ไมโครพลาสติกประเภท PP (c) ไมโครพลาสติกประเภท PBS ..... 79
- รูปที่ 31** การสะสมของ PS ใน feces ของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 80

- รูปที่ 32** การสะสมของ PP ใน feces ของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 81
- รูปที่ 33** การสะสมของ PBS ใน feces ของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 82
- รูปที่ 34** ผลกระทบของ PS ต่อกิจกรรม antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 90
- รูปที่ 35** ผลกระทบของ PP ต่อกิจกรรม antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 91
- รูปที่ 36** ผลกระทบของ PBS ต่อกิจกรรม antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 92
- รูปที่ 37** ผลกระทบของ PS ต่อกิจกรรม CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PS ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 94
- รูปที่ 38** ผลกระทบของ PP ต่อกิจกรรม CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PP ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 95
- รูปที่ 39** ผลกระทบของ PBS ต่อกิจกรรม CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PBS ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3



- ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 96
- รูปที่ 40** ผลกระทบของ PS ต่อกิจกรรม POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PS ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 98
- รูปที่ 41** ผลกระทบของ PP ต่อกิจกรรม POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PP ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 99
- รูปที่ 42** ผลกระทบของ PBS ต่อกิจกรรม POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PBS ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 100
- รูปที่ 43** ผลกระทบของ PS ต่อ total GSH content ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 103
- รูปที่ 44** ผลกระทบของ PP ต่อ total GSH content ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 104
- รูปที่ 45** ผลกระทบของ PBS ต่อ total GSH content ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ ..... 105
- รูปที่ 46** ผลกระทบของ PS ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PS ความเข้มข้น 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (scale

bar=50  $\mu$ m, H-E) (A) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (B) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (C) ขนาดกลางเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (D) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (E) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 96 (F) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (G) ขนาดกลางเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (H) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง dt คือ digestive tubules, tl คือ tubules lumen, dg คือ digestive cell, bc คือ basophilic cell, gc คือ granulocytes และ ct คือ connective tissue..... 108

**รูปที่ 47** ผลกระทบของ PP ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PP ความเข้มข้น 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (scale bar=50  $\mu$ m, H-E) (A) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (B) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (C) ขนาดกลางเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (D) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (E) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (F) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (G) ขนาดกลางเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (H) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (scale bar=50  $\mu$ m, H-E) dt คือ digestive tubules, tl คือ tubules lumen, dg คือ digestive cell, bc คือ basophilic cell, gc คือ granulocytes และ ct คือ connective tissue..... 109

**รูปที่ 48** ผลกระทบของ PBS ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PBS ความเข้มข้น 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (scale bar=50  $\mu$ m, H-E) (A) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (B) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (C) ขนาดกลางเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (D) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (E) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (F) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (G) ขนาดกลางเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (H) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง dt คือ digestive tubules, tl คือ tubules lumen, dg คือ digestive cell, bc คือ basophilic cell, gc คือ granulocytes และ ct คือ connective tissue ..... 110

**รูปที่ 49** แผนผังสรุปความเชื่อมโยงของผลการศึกษา..... 121

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ตั้งแต่มีการผลิตพลาสติกในต้นปี ค.ศ 1900 จนถึงปัจจุบันมีรายงานปัญหาการเพิ่มขึ้นของขยะพลาสติกในระบบนิเวศทางทะเลอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดความกังวลอย่างมากต่อนักวิทยาศาสตร์และผู้คนทั่วโลก การเสื่อมสภาพของขยะพลาสติกขนาดใหญ่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปและการลดขนาดกลายเป็นพลาสติกที่มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร ซึ่งเรียกว่าเป็นไมโครพลาสติกและพบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ในปัจจุบันพบไมโครพลาสติกปนเปื้อนทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ไมโครพลาสติกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มด้วยกัน คือ ไมโครพลาสติกปฐมภูมิ (primary microplastics) ซึ่งเป็นเม็ดพลาสติกที่ถูกผลิตให้มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตรตั้งแต่เริ่มต้นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด (Cole et al., 2011; Fendall & Sewell, 2009) และกลุ่มที่สองไมโครพลาสติกทุติยภูมิ (secondary microplastics) ซึ่งเกิดจากพลาสติกขนาดใหญ่ (macroplastic) ที่ลดขนาดจนมีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตรจากกระบวนการทางกายภาพ ชีวภาพ และเคมี (Fotopoulou & Karapanagioti, 2017; Leja & Lewandowicz, 2010) ไมโครพลาสติกมีคุณสมบัติต่าง ๆ ของพลาสติกแต่ละชนิดอย่างครบถ้วนไม่แตกต่างจากพลาสติกขนาดใหญ่ แต่การลดขนาดลงของพลาสติกนั้นทำให้มีน้ำหนักเบาและลอยน้ำได้ดี รวมถึงแรงลม กระแสน้ำ และคลื่นที่ส่งผลให้เกิดการกระจายและปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นวงกว้าง (GESAMP, 2015) โดยพบไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมประเภท พอลิเอทิลีน (PE; ร้อยละ 28) และพอลิโพรพิลีน (PP; ร้อยละ 19) ตามด้วยประเภทพอลิไวนิลคลอไรด์ (PVC; ร้อยละ 10) และ พอลิสไตรีน (PS; ร้อยละ 7) (de Sa et al., 2018) โดยการสะสมและการกระจายของไมโครพลาสติกส่วนใหญ่ถูกกำหนดด้วยปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม (Imhof et al., 2017; Kim et al., 2015; Veerasingam et al., 2016) และปัจจัยจากกิจกรรมของมนุษย์ (Sarafraz et al., 2016) ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา Gallagher และคณะ (2016) ได้ทำตรวจพบไมโครพลาสติกในน้ำชายฝั่งที่เมืองเซาแทมป์ตันของสหราชอาณาจักรอยู่ที่ 93 ชิ้น/ลิตร ในขณะที่ Kunz และคณะ (2016) รายงานว่าพบการสะสมของไมโครพลาสติกที่หาด Waimushan ในประเทศไต้หวัน อยู่ที่ 40.62 ชิ้น/ลิตร และการสะสมไมโครพลาสติกในประเทศไทยพบการสะสมในแม่น้ำเจ้าพระยา ตั้งแต่ 0.103 - 786 ชิ้น/ลิตร (Ericsson, 2018; Ounjai et al., 2020; Ta & Babel, 2020) และตรวจพบไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กตั้งแต่แพลงก์ตอนสัตว์ หอยสองฝาและปลา โดยพบทั้งในสัตว์น้ำวัยอ่อนและโตเต็มวัย ซึ่งส่วนมากเป็นพลาสติกประเภทพอลิโพรพิลีน (PP), พอลิสไตรีน (PS) นอกจากนี้ยังพบพลาสติกและไมโครพลาสติกสามารถที่จะดูดซับสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อ

สิ่งมีชีวิตที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น สารกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) พอลิคลอริเนตไบฟีนิล (PCBs) ดีดีที (DDT) และไดออกซิน เป็นต้น (Mato et al., 2001; Rochman et al., 2013)

เนื่องจากขนาดที่เล็กของไมโครพลาสติกจึงทำให้สัตว์สามารถกินเข้าไปได้โดยตรงและมีการถ่ายทอดผ่านห่วงโซ่อาหาร จนอาจนำไปสู่การสะสมไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิตในทะเล (Cole et al., 2020; Costa et al., 2020; Nadal et al., 2016; Neves et al., 2015; Setala et al., 2014; Tanaka & Takada, 2016) ไมโครพลาสติกเมื่อเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารอาจส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำทางกายภาพเช่น การอุดตันระบบทางเดินอาหาร การบริโภคอาหารที่น้อยลง ทำให้อัตราการเติบโตไม่เต็มประสิทธิภาพ รวมถึงการยับยั้งการผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้การรายงานว่ามีไมโครพลาสติกที่สะสมในร่างกายอาจส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ โดยพบว่าไมโครพลาสติกสามารถเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดของหอยแมลงภู่มะพร้าวและเหนียวทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นในระดับโมเลกุล การเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การผิดปกติทางพันธุกรรม การผิดปกติของระบบประสาท และเป็นสาเหตุการตายได้ในที่สุด (Cole et al., 2019; Cole et al., 2015; Coppock et al., 2019)

หอยแมลงภู่มะพร้าว *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) เป็นหอยสองฝาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการนำหอยแมลงภู่มะพร้าวมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการประเมินความเสี่ยงที่เกิดจากมลพิษจากสิ่งแวดล้อม (Beyer et al., 2017; Farrington et al., 2016; Li et al., 2019; Song et al., 2016) หอยแมลงภู่มะพร้าวมีลักษณะการกินอาหารแบบกรองกินมีรายงานพบว่ามีความสามารถในการสะสมไมโครพลาสติกด้วยเช่นกัน (Ward et al., 2019) โดยไมโครพลาสติกอาจถูกดักจับโดยเหงือกและ labial palps และบางส่วนอาจถูกกำจัดออกทางมูลเทียม (Porter et al., 2018; Rosa et al., 2018; Zhao et al., 2018) ในขณะที่อาจมีการสะสมในต่อมย่อยอาหารและเหงือก (Avio et al., 2015; Browne, 2008; Paul-Pont et al., 2016; Pittura et al., 2018; Revel et al., 2019; Ribeiro et al., 2017; von Moos et al., 2012) โดยพบไมโครพลาสติกรูปร่างที่แตกต่างกันในหอยแมลงภู่มะพร้าวที่ตรวจพบในธรรมชาติ จากการศึกษาค้นคว้าโดย de Sa และคณะ (2018) พบไมโครพลาสติกรูปร่างเส้นใยอยู่ที่ร้อยละ 23 และชิ้นส่วนอยู่ที่ร้อยละ 21 ตามด้วยทรงกลมร้อยละ 11 ฟิล์มร้อยละ 8 และเม็ดกลมร้อยละ 4 ขนาดของไมโครพลาสติกที่พบมีความแตกต่างกันตั้งแต่ 8 ไมโครเมตร ถึง 4.7 มิลลิเมตร โดยขนาดที่เล็กที่สุดตั้งแต่ 5 ถึง 250 ไมโครเมตร ตามด้วยช่วงขนาดถัดไปที่ 250 ถึง 500 ไมโครเมตร (Li et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่แสดงว่าไมโครพลาสติกขนาดเล็กกว่า 20 ไมโครเมตร สามารถย้ายเข้าสู่เลือดของหอยแมลงภู่มะพร้าวได้ (Browne, 2008; von Moos et al., 2012)

สำหรับการศึกษาไมโครพลาสติกในประเทศไทยปัจจุบันพบการสะสมของไมโครพลาสติกในแหล่งน้ำเจ้าพระยา, ตัวอย่างตะกอนดินและในสิ่งมีชีวิตแต่เนื่องจากการศึกษาในประเทศไทยยังมีเพียงแค่การศึกษาการสะสมของไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมและในสิ่งมีชีวิตเท่านั้น (Chinfak et al., 2021) ยังไม่มีการศึกษาถึงผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อสัตว์น้ำในห้องปฏิบัติการ และโดยเฉพาะหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ที่เป็นสัตว์ทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในประเทศไทยและมีความเป็นไปได้ที่จะสะสมและส่งผ่านไมโครพลาสติกไปยังสิ่งมีชีวิตในทะเลในระดับที่สูงขึ้น ดังนั้นการใช้หอยแมลงภู่เป็นสายพันธุ์เป้าหมายในการศึกษาการสะสมและถ่ายทอดไมโครพลาสติกจึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบระดับความเข้มข้นที่เป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลอง และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำเพื่อนำไปประกอบการประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนไมโครพลาสติก

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลกระทบของประเภท ขนาดและความเข้มข้นของไมโครพลาสติกที่มีต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงทางมิถุนวิทยาในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการศึกษาโดยใช้ไมโครพลาสติกจำลองจากคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยผู้วิจัยเลือกใช้ไมโครพลาสติก 3 ประเภท คือ พอลิสไตรีน (Polystyrene :PS), พอลิโพรไพลีน (Polypropylene: PP) และพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate: PBS) จำนวน 3 ขนาดได้แก่ ขนาดเล็ก (<30  $\mu\text{m}$ ), ขนาดกลาง (30-300  $\mu\text{m}$ ) และขนาดใหญ่ (300-1000  $\mu\text{m}$ ) ที่ระดับความเข้มข้นของไมโครพลาสติก ดังนี้ 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร

ทำการทดลองในสัตว์ทดลองหอยแมลงภู (Perna viridis) จากฟาร์มหอยแมลงภูในที่ชุมชน ตากวน ตำบลมาบตาพุด อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง การทดลองครั้งนี้เลือกใช้ตัวอย่างหอยแมลงภูขนาดความยาวเปลือก 4-6 เซนติเมตร โดยทำการทดลองเลี้ยงในตู้กระจก จำนวน 13 ตู้ จำนวนหอย 20 ตัว/ตู้ ที่ระดับน้ำ 15 ลิตร ในตู้ที่มีระบบน้ำไหลเวียนแบบปิด แบ่งเป็นการศึกษาอัตราการตายครึ่งหนึ่งของประชากร การสะสมไมโครพลาสติกภายใน soft tissue การศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงทางมิถุนวิทยาในหอยแมลงภู *P. viridis* ทำการทดลองที่สถานีวิจัยสัตว์ทะเลอ่างศิลา ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลกระทบของไมโครพลาสติกทั้งสามประเภทที่มีขนาดและความเข้มข้นแตกต่างกันต่อหอยแมลงภูจะทำให้ทราบผลกระทบที่เกิดขึ้น เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างเกณฑ์คุณภาพน้ำที่ปนเปื้อนไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมและประเมินความเสี่ยงของไมโครพลาสติกในบริเวณชายฝั่ง

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 พลาสติก

พลาสติก (plastic) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (non-biodegradable plastic) และพลาสติกที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (biodegradable plastic)

2.1.1 พลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (non-biodegradable plastic) เกิดจากการสังเคราะห์ธาตุพื้นฐาน 2 ชนิด คือ คาร์บอนและไฮโดรเจน นอกจากนี้ในการผลิตพลาสติกประเภทต่าง ๆ อาจมีการเติมแต่งสารอินทรีย์อื่น เช่น phthalates, tetrabromobisphenol-A (TBBPA) เป็นต้น (Kwon et al., 2017) เพื่อช่วยเสริมแรง (reinforcing agents) หรือช่วยในกระบวนการผลิต ปัจจุบันมีการแบ่งประเภทของพลาสติก 7 ชนิดจะอยู่ในสัญลักษณ์รูปสามเหลี่ยมเพื่อให้สามารถนำกลับมารีไซเคิล ได้แก่ โพลีเอทิลีนเทเรฟทาเลต (Polyethylene terephthalate; PET), โพลีเอทิลีนความหนาแน่นสูง (High-density polyethylene; HDPE), โพลีไวนิลคลอไรด์ (Polyvinyl chloride; PVC), โพลีเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (Low density polyethylene; LDPE), โพลีโพรพิลีน (Polypropylene; PP), โพลิสไตรีน (Polystyrene; PS), และพลาสติกชนิดอื่น ๆ

2.1.2 พลาสติกที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (biodegradable plastic) เป็นพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบจากธรรมชาติ (biobase) พลาสติกพอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid; PLA), โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates; PHA), โพลีบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate; PBS)

#### 2.2 กระบวนการเสื่อมสภาพของพลาสติก

พลาสติกทั่วไปในสิ่งแวดล้อมมีความทนทานต่อการเสื่อมสภาพ แม้ว่าจะมีอัตราการสลายตัวช้า แต่สภาพแวดล้อมก็มีผลต่อการเร่งการสลายตัวของพลาสติก (Plastics Europe, 2019) โดยสามารถแบ่งกลไกการย่อยสลายออกเป็น 2 ประเภทหลัก

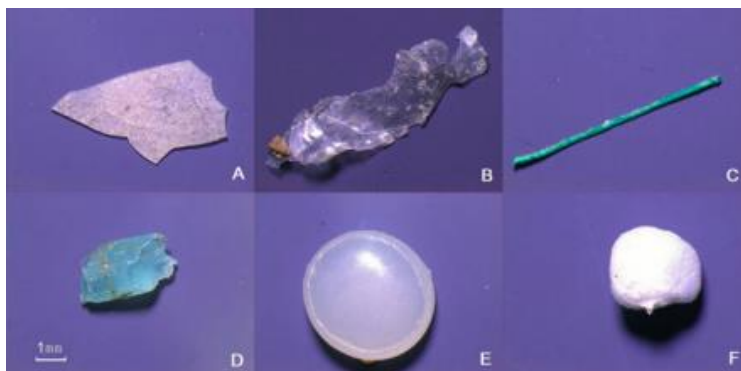
2.2.1 การเสื่อมสภาพของพลาสติกแบบทางกายภาพและทางเคมีที่ไม่มีสิ่งมีชีวิตเกี่ยวข้อง (Abiotic degradation of plastics) โดยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีของพลาสติก เช่น แสง อุณหภูมิ อากาศ น้ำ และแรงทางกล

2.2.2 การเสื่อมสภาพของพลาสติกแบบมีสิ่งมีชีวิตเกี่ยวข้อง (Biotic degradation of plastics) สิ่งมีชีวิตสามารถย่อยสลายพลาสติกได้ โดยการกัด เคี้ยว หรือการกระจายตัวของทางเดินอาหาร (Dawson et al., 2018; Jang et al., 2018; Mateos-Cardenas et al., 2020) หรือกระบวนการทางชีวเคมี (Danso et al., 2019) ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์โดยการปลดปล่อยเอนไซม์แตกตัวพันธะภายในของสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดพอลิเมอร์สายสั้นและโมเลกุลขนาดเล็ก (เช่น โอลิโกเมอร์ ไดเมอร์ และมอนอเมอร์) ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย (ultimate biodegradation) คือ พลังงาน และสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ (mineralization) เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สมีเทน น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่าง ๆ และมวลชีวภาพ (biomass) (Zhang et al., 2021)

### 2.3 ไมโครพลาสติก

ไมโครพลาสติก คือ พลาสติกที่มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร ซึ่งในปัจจุบันพบไมโครพลาสติกกระจายและปนเปื้อนทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ไมโครพลาสติก สามารถแบ่ง ออกเป็น 2 กลุ่มด้วยกัน คือ ไมโครพลาสติกปฐมภูมิ (primary microplastics) ซึ่งเป็นเม็ดพลาสติกที่ถูกผลิตให้มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตรตั้งแต่เริ่มต้นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์ดูแลผิว และผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทำความสะอาดร่างกาย เช่น ครีมขัดผิว สบู่เหลวสำหรับอาบน้ำ ยาสีฟันและครีมล้างหน้า โดยมีชื่อทางการค้าว่า ไมโครบีดส์ (microbead) ไมโครสเฟียร์ (microsphere) หรือเม็ดสครับ (scrub) (Cole et al., 2011; Fendall & Sewell, 2009) นอกจากนี้ในภาคอุตสาหกรรมยังมีการใช้เม็ดพลาสติกขนาดเล็ก (plastic grit) สำหรับการขัดสนิมและขัดสีออกจากพื้นผิวโลหะ ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของโลหะในไมโครพลาสติกก่อนที่เข้าสู่สิ่งแวดล้อม (Cole et al., 2011; Derraik, 2002) และกลุ่มที่สองไมโครพลาสติกทุติยภูมิ (secondary microplastics) โดยเกิดจากพลาสติกขนาดใหญ่ (macroplastic) ที่ลดขนาดจนมีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตรจากกระบวนการทางกายภาพ ชีวภาพ และเคมี เช่น การขัดถู คลื่น การเสียดสีของลม ความร้อน แสงยูวี เอนไซม์ หรือปฏิกิริยาออกซิเดชันจนเกิดเป็นพลาสติกรูปร่างต่าง ๆ (รูปที่ 1) (Fotopoulou & Karapanagioti, 2017; Wu et al., 2018) หรือจากการฉีกขาดของเส้นใยพลาสติกที่ใช้ในกระบวนการผลิตสิ่งทอ จากกระบวนการซักเสื้อผ้า รวมไปถึงการฉีกขาดของเส้นใยจากเครื่องมือประมง เช่น แห อวน ตาข่าย และเอ็นสำหรับตกปลา (Napper et al., 2015) การลดขนาดลงของพลาสติกนั้นทำให้มีน้ำหนักเบาและลอยน้ำได้ดีส่งผลให้เกิดการกระจายและปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นวงกว้างซึ่งมีการตรวจพบไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมและในสิ่งมีชีวิตอีกด้วย (Hidalgo-Ruz & Thiel, 2013)





**รูปที่ 1** รูปทรงของไมโครพลาสติกประเภททุติยภูมิ (secondary microplastics) ที่พบในทะเลสาบ Qinghai ในประเทศจีน (A) แผ่น (B) ฟิล์ม (C) เส้นใย (D) ชิ้นส่วน (E) เม็ดกลม (F) โฟม (Wu et al., 2018)

## 2.4 การปนเปื้อนไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อม

การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมของไมโครพลาสติกสามารถแบ่งเป็น 2 วิธี ตามแหล่งกำเนิดของไมโครพลาสติกคือ การปนเปื้อนจากไมโครพลาสติกปฐมภูมิและการปนเปื้อนไมโครพลาสติกทุติยภูมิ ซึ่งการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกปฐมภูมิมาจากผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหรือผลิตภัณฑ์ขัดถูทำความสะอาดพื้นผิวซึ่งมักเป็นการใช้แล้วทิ้งและอาจจะหลุดรอดจากการบำบัดน้ำเสียส่งสู่สิ่งแวดล้อม ในขณะที่การปนเปื้อนของไมโครพลาสติกทุติยภูมิจะเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ ชีวภาพและเคมีทำให้ลดขนาดของพลาสติกจนได้เป็นไมโครพลาสติก แม้ว่าวิธีการปนเปื้อนในธรรมชาติของไมโครพลาสติกทั้งสองชนิดจะมีความแตกต่างกันแต่สุดท้ายไมโครพลาสติกทั้งสองกลุ่มก็จะมาอยู่รวมกันในสิ่งแวดล้อม

ความเป็นพิษของไมโครพลาสติกจะแตกต่างกันไปตามพื้นที่การสะสมและการแพร่กระจาย ส่วนใหญ่มักถูกกำหนดโดยสิ่งแวดล้อม (Imhof et al., 2017; Kim et al., 2015; Veerasingam et al., 2016) และปัจจัยด้านกิจกรรมของมนุษย์ (Sarafraz et al., 2016) อย่างไรก็ตามปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมอาจส่งผลกระทบต่อแพร่กระจายมากกว่าปัจจัยด้านกิจกรรมของมนุษย์ (Herrera et al., 2018; Zhang et al., 2017) ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ กระแสคลื่น (Kim et al., 2015), กระแสน้ำ, พายุไซโคลน, ทิศทางลม (Browne et al., 2010; Kukulka et al., 2012; Liubartseva et al., 2018) และอุทกพลศาสตร์ของแม่น้ำ (Besseling et al., 2017) ที่กำหนดการแพร่กระจายของไมโครพลาสติก ปริมาณการสะสมของไมโครพลาสติกจะสูงขึ้นเมื่อปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเหล่านี้รุนแรงขึ้น (Brach et al., 2018; Desforjes et al., 2014) มีการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับการแพร่กระจายและปริมาณของไมโครพลาสติกในแหล่งน้ำจากทั่วโลก (ตารางที่ 1) เช่น ทะเลจีนใต้,

ทะเลจีนตะวันออก (Zhao et al., 2014) และแม่น้ำทางตอนใต้ของประเทศเกาหลี (Kang et al., 2015) โดยไมโครพลาสติกส่วนใหญ่ที่พบคือ พอลิไทรีน (ร้อยละ 22) และพลาสติกประเภทพอลิโพรไพลีน (ร้อยละ 12) โดยส่วนมากจะมีขนาดเล็กกว่า 20 – 1900 ไมโครเมตร

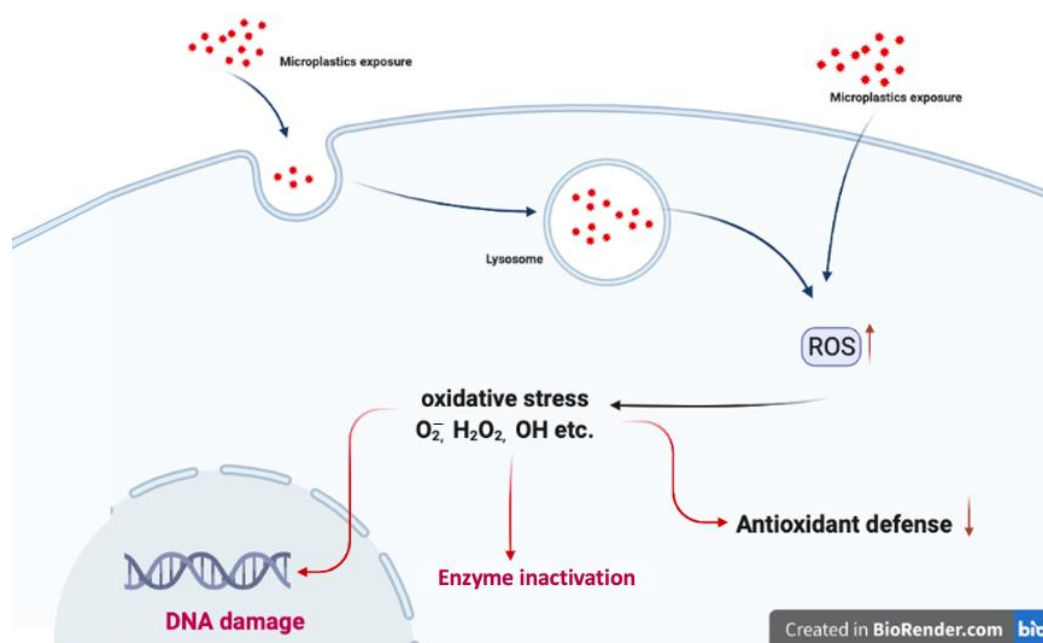
## 2.5 การสะสมไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิต

เนื่องจากไมโครพลาสติกมีขนาดเล็กทำให้พบการแพร่กระจายทั้งในมวลน้ำและตะกอนดิน จึงส่งผลให้สิ่งมีชีวิตในทะเลมีโอกาสในการกินไมโครพลาสติกแล้วเกิดการสะสมและสามารถถ่ายทอดเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้ จากข้อมูลในหลายการศึกษาพบว่า แพลงก์ตอนพืช ปลิงทะเล หอยสองฝา และไส้เดือนทะเล มีการกินไมโครพลาสติกเข้าไปโดยที่พวกมันไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นอาหารหรือไมโครพลาสติก (Bhattacharya et al., 2010; Browne, 2008; Murray & Cowie, 2011; Teuten et al., 2009) โดยเฉพาะหอยสองฝาที่มีลักษณะการกินอาหารแบบกรองกินทำให้พวกมันสัมผัสกับไมโครพลาสติกที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยตรง เนื่องจากขนาดที่เล็กทำให้ไมโครพลาสติกมีแนวโน้มสะสมอยู่ในห่วงโซ่อาหาร จากการตรวจสอบพบว่า สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทางทะเลก็ได้รับผลกระทบจากอนุภาคของไมโครพลาสติก ที่ถ่ายทอดผ่านทางห่วงโซ่อาหารนั้นด้วย โดยผ่านการกินปลาที่มีการปนเปื้อนไมโครพลาสติก (Eriksson & Burton, 2003) ปัจจุบันมีการรายงานการสะสมไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิตในทะเลทั่วโลกโดยเฉพาะในกลุ่มหอยสองฝา (ตารางที่ 2) จากการรายงานของ (de Sa et al., 2018) พบว่าประเภทไมโครพลาสติกที่พบส่วนมาก ได้แก่ PE (ร้อยละ 23), PS (ร้อยละ 22) ตามด้วย PP (ร้อยละ 12)

## 2.6 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อสัตว์ทะเล

ไมโครพลาสติกเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสัตว์น้ำอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์น้ำทั้งทางกายภาพและทางชีวภาพ โดยทางกายภาพ เช่น การอุดตันระบบทางเดินอาหาร การบริโภคอาหารที่น้อยลง ทำให้อัตราการเติบโตไม่เต็มประสิทธิภาพ รวมถึงการยับยั้งการผลิตฮอร์โมนของระบบสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต จากการรายงานของ Cole และคณะ (2013) ไมโครพลาสติกชนิด PS ส่งผลต่อแพลงก์ตอนสัตว์ชนิด *Centropages typicus* และ *Calanus helgolandicus* พบว่ามีการสะสมไมโครพลาสติกภายใน soft tissue ซึ่งอาจส่งผลต่อการถ่ายทอดในห่วงโซ่อาหารและพบว่าแพลงก์ตอนสองชนิดนี้มีอัตราการสืบพันธุ์ลดลง ในขณะที่ Browne (2008) รายงานพบการอักเสบและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในหอยแมลงภู *Mytilus dulis* ที่ได้ไมโครพลาสติกชนิด PS สอดคล้องกับการรายงานของ Rist และคณะ (2016) ที่พบว่าไมโครพลาสติกประเภท PVC ขนาด 1-50 ไมโครเมตร ส่งผลกระทบต่ออาการหายใจ การกรองอาหาร การสร้างสารเมือกและเพิ่มอัตราการตายของ

หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ในขณะที่ทางชีวภาพพบว่าไมโครพลาสติกส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ โดยไมโครพลาสติกสามารถเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดของหอยแมลงภู่ และเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นในระดับโมเลกุล (Gonçalves et al., 2018) มีผลต่อการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (รูปที่ 2) การผิดปกติทางพันธุกรรม การผิดปกติของระบบประสาท และเป็นสาเหตุการตายได้ในที่สุด (Avio et al., 2015; Van Cauwenberghe et al., 2015)



รูปที่ 2 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำที่ส่งผลให้เกิดการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (ดัดแปลงจาก Avio et al., 2015 ;Van Cauwenberghe et al., 2015)

## 2.7 สถานการณ์ไมโครพลาสติกในประเทศไทย

สำหรับการศึกษาไมโครพลาสติกในประเทศไทยปัจจุบันพบการสะสมของไมโครพลาสติกในแหล่งน้ำเจ้าพระยาจำนวน 786 ชิ้น และ 143 ชิ้นจากน้ำตัวอย่าง 1,650 ลูกบาศก์เมตร ส่วนปริมาณไมโครพลาสติกในตัวอย่างตะกอนดินอยู่ที่ 262 ชิ้นและ 430 ชิ้นจากน้ำหนักดินแห้ง 1,250 กรัม (Ericsson & Johansson, 2018) ในขณะที่การศึกษการสะสมไมโครพลาสติกในตะกอนดินชายหาดทะเลอันดามันจำนวน 6 หาด พบไมโครพลาสติก 3 ขนาดได้แก่ ขนาดใหญ่ (5,000 - 1,000  $\mu\text{m}$ ) ขนาดกลาง (1,000 - 300  $\mu\text{m}$ ) และขนาดเล็ก (300 - 20  $\mu\text{m}$ ) จำนวน 14 ชิ้น, 178 ชิ้น และ 197 ชิ้น/ตารางเมตร ตามลำดับ ส่วนมากเป็นพลาสติกประเภท PS เป็นหลัก (Chetsukchai et al., 2019) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kreekrinuch (2019) พบไมโครพลาสติกประเภท PS มีขนาดในช่วง 300

- 1,000 ไมโครเมตรในตะกอนดินบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง 5 สถานี ได้แก่ หาดบางดี จังหวัดนครศรีธรรมราช, หาดแหลมสนอ่อน จังหวัดสงขลา, หาดสมิหลา จังหวัดสงขลา, หาดตะโละกาโปร์ จังหวัดปัตตานี และหาดพระตำหนักทักษิณราชินีเวศน์ จังหวัดนราธิวาส ในขณะที่การศึกษาการสะสมไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิตโดย ปิติพงษ์และคณะ (2559) ตรวจสอบไมโครพลาสติกในหอยเสียบและหอยกระปุกในลักษณะที่เป็นเส้นใยมากที่สุด คาดว่ามาจากอุปกรณ์การทำประมง เช่น อวน ตาข่าย เอ็น และ เชือก เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Thushari และคณะ (2017) พบว่าการสะสมไมโครพลาสติกมีอัตราการสะสมสูงมากในสิ่งมีชีวิตที่กรองกินอาหาร พบจำนวน 0.2–0.6 ชิ้นต่อกรัม นับว่าเป็นปริมาณที่สูงมาก แต่เนื่องจากการศึกษาในประเทศไทยยังมีเพียงแค่การศึกษาการสะสมของไมโครพลาสติกในสิ่งแวดล้อมและในสิ่งมีชีวิตเท่านั้นแต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อสัตว์น้ำในท้องปฏิบัติการ และโดยเฉพาะหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ที่มีพฤติกรรมการกรองกินและเป็นสัตว์ทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดชนิดหนึ่งในประเทศไทยและมีความเป็นไปได้ที่จะสะสมและส่งผ่านไมโครพลาสติกไปยังสิ่งมีชีวิตในทะเลในระดับที่สูงขึ้น ดังนั้นการใช้หอยแมลงภู่เป็นสายพันธุ์เป้าหมายในการตรวจสอบไมโครพลาสติกจึงเป็นการเข้าใจข้อมูลเบื้องต้นทำให้สามารถคาดการณ์ระดับความเข้มข้นที่จะเป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลอง และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำเพื่อนำไปประกอบการประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนไมโครพลาสติก

ตารางที่ 1 การสะสมของไมโครพลาสติกในแหล่งน้ำจากทั่วโลก

สถานที่	ประเทศ	วิธีการ	ปริมาณการสะสม (ชิ้น/ลิตร)	อ้างอิง
<b>แม่น้ำ</b>				
Danube River	Austria	Net	0.32 ± 4.66	(Lechner et al., 2014)
Yangtze Estuary	China	Net	4.14 ± 2.46	(Zhao et al., 2014)
Sein River	France	Net	0.003 – 0.11	(Dris et al., 2015))
Nakdong Estuary	South Korea	Net	0.21-15.56	(Kang et al., 2015)
Oujiang Estuary	China	Bulk, 1 L	0.68 ± 0.85	(Zhao et al., 2015)
Hudson River	USA	Bulk, 1 L	0.98	(Miller et al., 2017)
Dutch River and Amsterdam Canals	Netherlands &Germany	Bulk, 2 L	48–187	(Leslie et al., 2017)
Yangtze River Basin	China	Bulk, 5 L	0.3 – 3.1	(Su et al., 2016)
Teltow Canal	Germany	Bulk, 2.2 L	0.01 – 95.8	(Schmidt et al., 2018)
Wei River	China	Bulk, 5 L	3.67 – 10.7	(Di & Wang, 2018)
Ciwalengke River	Indonesia	Bulk, 1 L	5.85 ± 3.28	(Alam et al., 2019)
Mississippi River system	USA	Bulk, 1L	14–83	(Scircle et al., 2020)
Tapi-Phumduang River	Thailand	Bulk, 5 L	0.68 – 2.81	(Chinfak et al., 2021)
<b>ทะเล</b>				
Sea of Japan	Japan	Net	0.004	(Isobe et al., 2015)
Rostock coast	Germany	Bulk, 5-10 L	3.3	(Stolte et al., 2015)
South eastern coastline	South Africa	Net	0.26	(Nel & Froneman, 2015)
Cilacap coast	Indonesia	Net	0.02-0.005	(Syakti et al., 2017)
Coastal waters of Tuscany	Italy	Net	0.0026 ± 0.000	(Baini et al., 2018)
Coastal waters	China	Bulk, 5 L	0.6 - 6.44	(Qu et al., 2018)

**ตารางที่ 1** การสะสมของไมโครพลาสติกในแหล่งน้ำจากทั่วโลก (ต่อ)

สถานที่	ประเทศ	วิธีการ	ปริมาณการสะสม (ชิ้น/ลิตร)	อ้างอิง
<b>ทะเล</b>				
Maowei Sea Western portion	China	Bulk, 5 L	1.2 - 10.1	(Zhu et al., 2019)
Guanabara Bay	Brazil	Net	0.01 - 0.02	(Olivatto et al., 2019)
Jiaozhou Bay	China	Pump, 50 L	0.04	(Zheng et al., 2019)
South Yellow Sea Tuticorin coast of Gulf of	China	Pump, 10 L	0.96 - 11.7	(Jiang et al., 2020)
Mannar	India	Bulk, 5 L	10.0-30.0	(Sathish et al., 2020)
Bandon Bay	Thailand	Bulk, 5 L	0 - 0.63	(Chinfak et al., 2021)

ตารางที่ 2 การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยสองฝาทั่วโลก

ชนิดพันธุ์	ประเทศ	ปริมาณ การสะสม (ชิ้น/ตัว)	ขนาด MPs ( $\mu\text{m}$ )	อ้างอิง
<b>Clam</b>				
<i>Venerupis philippinarum</i>	Canada	8.4±8.5	NA	(Davidson & Dudas, 2016)
<i>Venerupis philippinarum</i>	Canada	NA	<20	(Murphy, 2018)
<i>Corbicula fluminea</i>	China	0.3–4.9	NA	(Su et al., (2018)
<i>Tapes philippinarum</i>	South Korea	1.15±0.7	100-200	(Cho et al., 2019)
<i>Siliqua patula</i>	Poland	0.16±0.2	NA	(Baechler et al., 2020)
<i>Donax cuneatus</i>	India	0.6–1.3	NA	(Sathish et al., 2020)
<i>Meretrix lyrata</i>	Thailand	0.67±0.1	≤1-5000	(Chinfak et al., 2021)
<b>Oyster</b>				
<i>Crassostrea gigas</i>	USA	0.6±0.9	2270- 15840	(Rochman et al., 2015)
<i>Saccostrea forskali</i>	Thailand	NA	NA	(Thushari et al., 2017)
<i>Crassostrea gigas</i>	France	0.60±0.5	50-100	(Phuong et al., 2018)
<i>Crassostrea gigas</i>	South Korea	0.77±0.7	100-200	(Cho et al., 2019)
<b>Mussel</b>				
<i>Mytilus edulis</i>	Canada	178	NA	(Mathalon & Hill, 2014)
<i>Mytilus edulis</i>	China	1.5-7.6	5-250	(Li et al., 2016)
<i>Mytilus edulis</i>	UK	12.6	NA	(Catarino et al., 2017)
<i>Mytilus spp.</i>	Norway	1.84±2.06	<1000	(Lusher et al., 2017)
<i>Modiolus modiolus</i>	UK	3.5±1.29	NA	(Catarino et al., 2018)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Greece	0.9±0.2	100-500	(Digka et al., 2018)

ตารางที่ 2 การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยสองฝาทั่วโลก (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	ประเทศ	ปริมาณ การสะสม (ชิ้น/ตัว)	ขนาด MPs ( $\mu\text{m}$ )	อ้างอิง
<b>Mussel</b>				
<i>Perna viridis</i>	Indonesia	4–20	NA	(Khoironi & Anggoro, 2018)
<i>Mytilus edulis</i>	UK	1.1-6.4	5-250	(Li et al., 2018)
<i>Mytilus edulis</i>	France	2.1 $\pm$ 1.7	50-100	(Phuong et al., 2018)
<i>Mytilus edulis</i>	China	0.77-8.2	250-1000	(Qu et al., 2018)
<i>Perna viridis</i>	China	0.77-8.2	250-1000	(Qu et al., 2018)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Italy	3.6-12.4	1700-1900	(Renzi et al., 2018)
<i>Mytilus edulis</i>	South Korea	0.6 $\pm$ 0.6	100-200	(Cho et al., 2019)
<i>Perna canaliculus</i>	New Zealand	0–0.48	NA	(Webb et al., 2019)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	South Africa	0–20	NA	(Sparks, 2020)
<i>Choromytilus meridionalis</i>	South Africa	0–21	NA	(Sparks, 2020))
<i>Aulacomya ater</i>	South Africa	0–22	NA	(Sparks, 2020)
<i>Perna viridis</i>	Thailand	5.7 $\pm$ 0.5	$\leq$ 1-5000	(Chinfak et al., 2021)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2.8 ชีววิทยาของหอยแมลงภู่ *Perna viridis* (Linnaeus, 1758)

### 2.8.1 การจำแนกอนุกรมวิธาน

หอยแมลงภู่ *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) หรือ green mussel เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งจัดอยู่ในไฟลัม Mollusca ชั้น Bivalvia อันดับ Mytiloidea วงศ์ Mytilidae

### 2.8.2 ถิ่นที่อยู่อาศัยและการกระจาย

หอยแมลงภู่มีถิ่นอาศัยและกระจายอยู่ทั่วไปตามชายฝั่งระหว่างน้ำขึ้น-น้ำลงของอินเดียมีการกระจายอย่างกว้างขวางในภูมิภาคอินโดแปซิฟิกตั้งแต่ประเทศญี่ปุ่นไป จนถึงนิวินีและทางตะวันตกของอ่าวเปอร์เซียไปจนถึงหมู่เกาะแปซิฟิกทางใต้ (Siddall, 1980; Tan และ Ransangan, 2016) พบในบริเวณที่มีความเค็มตั้งแต่ 18 – 33 ppt และอุณหภูมิ 11 – 32 องศา เซลเซียส (Segnini de Bravo et al., 1998) สามารถอาศัยอยู่ได้ลึกถึง 10 เมตร และอยู่ในความหนาแน่นได้มาก สุด 3,500



ตัวต่อตารางเมตร ในประเทศไทย มีหอยแมลงภู่มากแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลด้านอ่าวไทย และทะเลอันดามัน และเป็นที่ยอมรับเพาะเลี้ยงอย่างมาก

### 2.8.3 ลักษณะโดยทั่วไป

*P. viridis* จัดเป็นกลุ่มหอยสองฝา ลักษณะของเปลือกเป็นรูปยาวรีด้านหน้า (anterior) เรียวยาวแหลม ด้านท้าย (posterior) มีลักษณะป้าน (รูปที่ 3) เปลือกด้านนอกมีสีเขียวอมน้ำตาลมีวงเป็นชั้นแสดงถึงการเจริญเติบโตของหอยแต่ละปี (growth line) เปลือกทั้งซ้ายและขวาเชื่อมติดกัน โดยทางด้านหลังของเปลือกคล้ายกับบานพับประตู (hinge) ซึ่งบริเวณบานพับของเปลือกจะมีเอ็นยึด (hinge ligament) บริเวณขอบด้านล่างของเปลือกมีช่องสำหรับให้ byssus ซึ่งเป็นเส้นขนยาว ๆ ยื่นออกมาจากเปลือกเพื่อใช้ในการเกาะติดกับไม้หลักหรือหิน เปลือกด้านในมีสีขาวขุ่นมันวาว (de Messano et al., 2019)

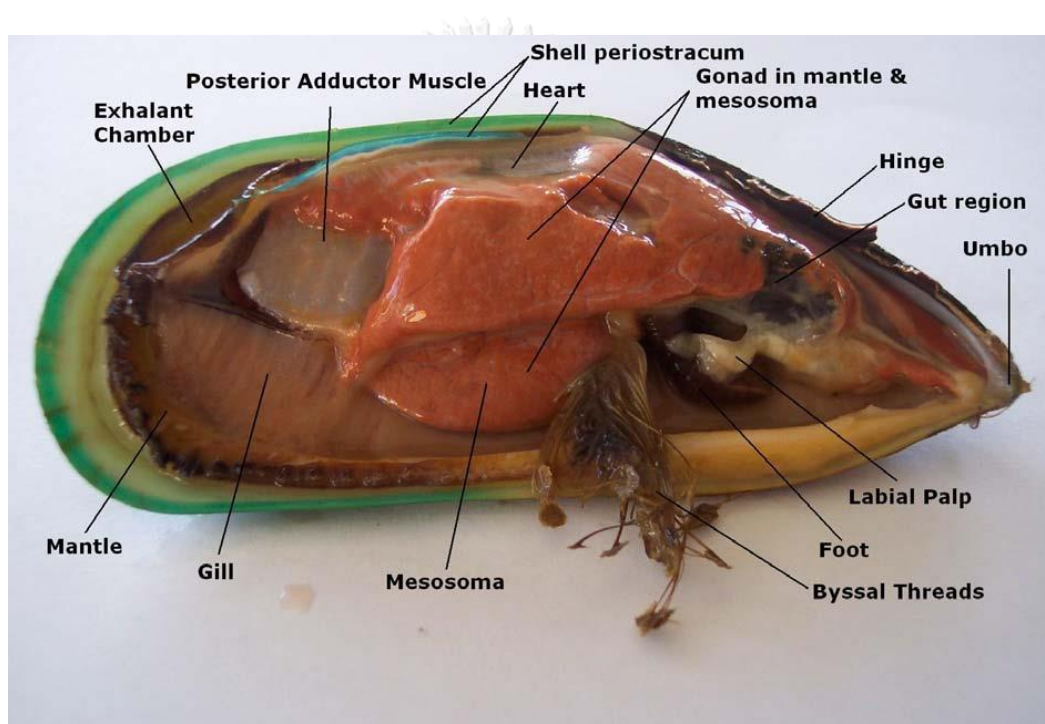


รูปที่ 3 ลักษณะเปลือกของหอยแมลงภู่มาก *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) ( ดัดแปลงจาก de Messano et al., 2019)

### 2.8.4 ลักษณะภายนอกและภายในของหอยแมลงภู่มาก *Perna viridis*

ลำตัวของหอยแมลงภู่มากเป็นส่วนที่อ่อนนุ่มอยู่ในเปลือกประกอบด้วยกล้ามเนื้อหลัก 3 ชุดคือ anterior adductor muscle, foot retractor muscle และ posterior adductor muscle ซึ่งจะเกิดรอยบนเปลือกด้านในตรงบริเวณที่มีกล้ามเนื้อยึดไว้ เรียกว่า Scar ซึ่งพบที่ posterior adductor muscle เป็นรูปไตขนาดใหญ่ แต่จะพบ Scar ได้ทั้ง 2 ที่ในบริเวณ anterior adductor muscle และ posterior adductor muscle (Quayle, 1989) มีเยื่อหุ้มลำตัว (mantle) คลุมอวัยวะภายในทั้งสอง

ด้านซึ่งอยู่ติดกับฝาทั้งสองข้าง พื้นในของ mantle มี cilia ซึ่งจะคอยโบกพัดอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้กระแสน้ำไหลผ่านเข้าออกอยู่เสมอ สำหรับส่วนของโพรงแมนเทิล (mantle cavity) จะเป็นช่องระหว่างแมนเทิลซ้ายและขวาจะมีเท้า (foot), visceral mass และเหงือก (gill) โดย เหงือก (gill) จะมีจำนวน 2 แผ่นอยู่ทั้งสองข้างของเท้าโดยแผ่นนอกจะน้อยกว่าแผ่นใน ส่วนเลเปียลพัลพ์ (labial pals) จะอยู่ข้าง ๆ ฐานของเท้า ทำหน้าที่ในการสร้างเมือกสำหรับดักจับอาหารที่แขวนลอยในมวลน้ำ นอกจากนี้ยังมีช่องเปิดลักษณะคล้ายรอยผ่าลงมา เพื่อให้น้ำไหลเข้าเรียกว่า incurrent siphon และส่วนของ excurrent siphon ที่มีขนาดเล็กกว่าสำหรับให้น้ำออกจากร่างกาย (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ลักษณะภายนอกของหอยแมลงภู่ *P. viridis* (AquaBio Consultants Ltd)

### 2.8.5 ลักษณะการกรองกิน

หอยแมลงภู่ *P. viridis* เป็นสัตว์ที่กรองกินอาหารแบบใช้ cilia (ciliary-mucus suspension feeder) โดยใช้เหงือกและ cilia ในการโบกพัดและจับอาหารรวมทั้งขนส่งอาหารเข้าสู่ร่างกาย (Morton, 1983) โดยน้ำทะเลจะไหลเข้ามาทาง inhalant siphon ก่อนจะผ่านเหงือกซึ่งที่เหงือกของหอยแมลงภู่มีก Gill filaments หรือซี่กรองไว้กรองและจับแพลงก์ตอนพืชและสัตว์หรืออนุภาคขนาดเล็ก รวมถึงสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่อยู่ในมวลน้ำ ซึ่งจากการรายงานของ Vakily (1989) พบว่าหอยแมลงภู่

สามารถกรองอนุภาคตะกอนขนาด 0.46 ไมโครเมตรได้ หลังจากที่ยกรองมวลน้ำเข้ามาแล้วหอยแมลงภู่จะปล่อยเมือกออกมาเพื่อช่วยในการจับอาหารที่ติดอยู่บนซี่กรอง cilia จะช่วยโบกพัดก้อนอาหารและตะกอนให้เคลื่อนที่เข้าไปด้านใน ในขณะที่ก้อนอาหารถูกพัดมาที่บริเวณ labial palps อาหารจะถูกคัดแยกหากมีอนุภาคที่ใหญ่หรือมีสิ่งแปลกปลอมจะถูกขับออกทาง exhalant Siphon พร้อมกับมวลน้ำที่ขับออกจากร่างกาย (Rajagopal et al., 2006) อาหารที่ผ่านเข้าสู่ปากจะถูกลำเลียงไปตามส่วนต่าง ๆ ของระบบย่อยอาหารผ่านในหอยแมลงภู่ได้แก่ กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้ (intestine) ซึ่งเป็นท่อยาวขดไปมามีส่วนของไส้ตรง (rectum) ทวารหนัก (anus) ส่วนที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารคือ ตับ (liver) และต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) นอกจากนี้มีรายงานพบว่าหอยแมลงภู่มีความสามารถในการกรองกินไมโครพลาสติกในมวลน้ำได้ (Ward et al., 2019) และอาจถูกดักจับโดยเหงือกและ labial palps ก้อนบางส่วนถูกกำจัดออกเป็น pseudofeces (Porter et al., 2018; Rosa et al., 2018; Zhao et al., 2018) ซึ่งการที่หอยแมลงภู่ดักจับไมโครพลาสติกได้นั้นทำให้เกิดการสะสมบริเวณเหงือกและภายในระบบย่อยอาหารได้เช่นกัน (Avio et al., 2015; Browne, 2008; Paul-Pont et al., 2016; Pittura et al., 2018; Revel et al., 2019; Ribeiro et al., 2017; von Moos et al., 2012) จากการศึกษาของ Wong และ Cheung (1999) พบว่า *P. viridis* มีอัตราการดูดซึมสารอินทรีย์สูงสุด 5.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอัตราการดูดซึม ได้รับอิทธิพลจากความเข้มข้นและคุณค่าของสารอาหารรวมทั้งชนิดและสายพันธุ์ของแพลงก์ตอน (Ren et al., 2000; Riisgård et al., 2011) โดยที่ประสิทธิภาพในการกรองกินอาหารของหอยแมลงภู่ขึ้นกับลักษณะเชิงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเหงือกซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนแก๊สและกรองกินอาหาร

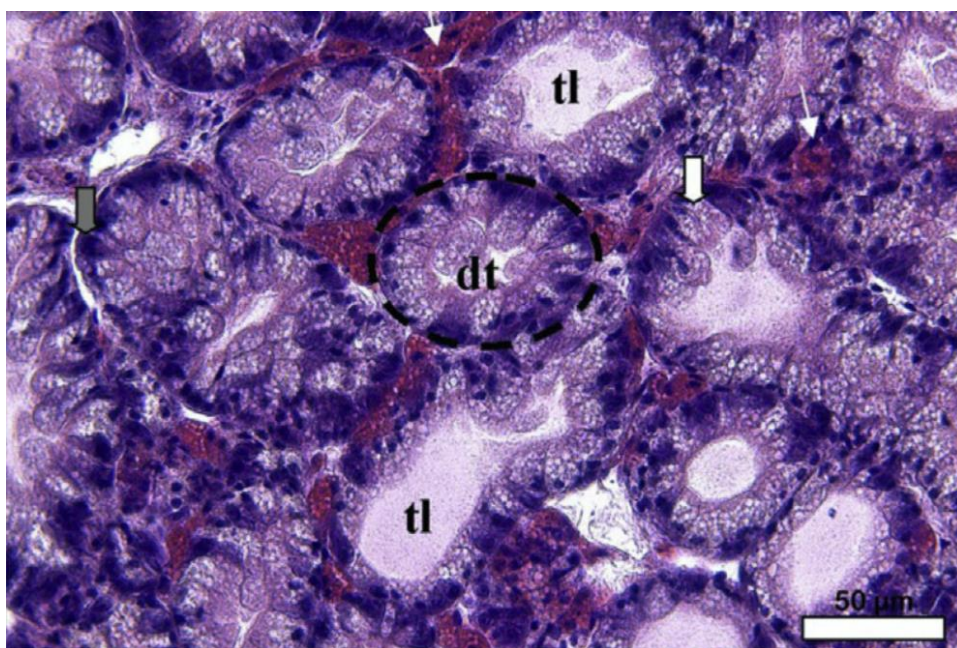
### 2.8.6 โครงสร้างภายในของเหงือก

เซลล์เหงือกของหอยแมลงภู่เป็นบริเวณที่มีความน่าสนใจอย่างมากในการศึกษาความเป็นพิษในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเหงือกของหอยแมลงภู่เป็นบริเวณแรกที่มีการดูดซึมสารพิษในมวลน้ำ เหงือกจึงเป็นบริเวณที่มักได้รับผลกระทบจากการสัมผัสกับมลพิษในมวลน้ำ (Gomez-Mendikute et al., 2005) และมีความสำคัญอย่างมากในการเป็นตัวกลางระหว่างสิ่งแวดล้อมกับอวัยวะภายใน (Cannuel & McCombie, 2009) เหงือกจะพบได้ครั้งแรกในระยะตัวอ่อน (pediveliger) และความซับซ้อนของโครงสร้างและการทำงานของเหงือกจะเพิ่มขึ้นจนชัดเจนในระยะ Juvenile เหงือกของหอยแมลงภู่มีลักษณะเป็นเหงือกโบราณ (ctenidia) คล้ายกับเหงือกหอยที่มีวิวัฒนาการต่ำ โดยประกอบด้วยมีเส้นใย (gill filament) หลายแถวยาวในแต่ละด้านของแกนกลางและพับกลับเข้าหาแกนกลางเป็นรูปดัดเบิลยู (W) เส้นใยจะ วางเรียงตัวอยู่ข้างกันและก่อตัวเป็นแผ่น lamellae ที่มีท่อ

น้ำแวนตั้งจำนวนมากอยู่ภายใน ทำหน้าที่เป็น ตะแกรงขนาดเล็กของรูน้ำเข้า (ostia) ป้องกันอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ผ่าน lamellae และเข้าไปยัง epibranchial บริเวณ gill filament แบ่งเป็น 3 โซน ดังนี้ frontal, intermediate และ abfrontal Sunila (1986) โดยบริเวณ frontal จะมีความสำคัญเนื่องจากมีเซลล์ ciliated และ non-ciliated โดย cilia จะทำหน้าที่ขนส่งอนุภาคไปที่ palps และจะดักจับอนุภาค รวมถึงการมีส่วนร่วมในการขับน้ำระหว่าง filament (Owen, 1974) ดังนั้นการขนส่งและการดูดซึมสารอาหารรวมถึงสารปนเปื้อนจะเกิดขึ้นที่บริเวณ frontal ของเส้นใยเหงือก ในขณะที่ non-cilia ในบริเวณ intermediate หรือที่เรียกว่า endothelial จะมีความสำคัญในการแลกเปลี่ยนก๊าซและการทำงานระหว่างเม็ดเลือด ดังนั้นเซลล์เหงือกอาจเป็นแบบจำลองที่เป็นประโยชน์สำหรับการประเมินในผลกระทบของสารปนเปื้อนต่อระบบนิเวศชายฝั่งและบริเวณปากแม่น้ำ

### 2.8.7 โครงสร้างภายในของต่อมย่อย

ลักษณะของเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารพบว่าต่อมย่อยอาหารเป็นอวัยวะที่อยู่ล้อมรอบกระเพาะอาหารถูกปกคลุมไปด้วยเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิล ทำหน้าที่สร้างน้ำย่อยเพื่อย่อยอาหารที่เข้าสู่กระเพาะอาหาร การย่อยของหอยแมลงภู่มักจะจัดเป็นการย่อยภายในเซลล์ (intracellular digestion) เมื่ออาหารเคลื่อนที่ผ่านเหงือกและถูกกลืนเข้าสู่ต่อมย่อยอาหาร จะมีเอนไซม์ที่อยู่ในถุงไลโซโซม (lysosome) ช่วยในการย่อยอาหาร และการดูดซึมโดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ในการขนส่ง ซึ่งต่อมย่อยอาหารจะแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยโครงสร้างของต่อมย่อยอาหารจะประกอบด้วย ท่อแขนงขนาดเล็กที่แตกแขนงออกไป และบริเวณปลายท่อจะมีลักษณะกลมตันคล้ายกระเปาะหรือถุง เรียกว่า digestive diverticulum ซึ่งจะมีถุงนี้เป็นจำนวนมากแทรกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ภายในถุงมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียวมีเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบ 2 แบบ ได้แก่ เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) มีลักษณะเซลล์รูปทรงกระบอกสูงมักพบนิวเคลียสที่บริเวณฐานของเซลล์ และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) หรือเซลล์คริปท์ (crypt cell) เป็นเซลล์ทรงเตี้ยลักษณะคล้ายพีระมิด (รูปที่ 5) โดยพบว่านิวเคลียสและไซโทพลาซึมย้อมติดสีเบสหรือสีฮีมาทอกซาลินสามารถเห็นเป็นสีที่เข้มกว่าเนื้อเยื่อบริเวณอื่น ๆ กลุ่มเซลล์จะกระจุกรวมกันอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane) จากเซลล์ที่พบในท่อทั้งสองกลุ่มมีความสูงไม่เท่ากัน ส่งผลให้การเรียงตัวของเซลล์ทั้งสองกลุ่มภายในท่อทำให้เกิดรูปร่างเป็นแฉกขึ้น (lumen) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะปกติที่พบได้ทั่วไปในหอยแมลงภู่มักมีลักษณะปกติ (Bignell et al., 2011; Cuevas et al., 2015; Usheva et al., 2006)



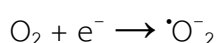
รูปที่ 5 ลักษณะของเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ในภาวะปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E โดย digestive tubules (dt) จะประกอบด้วยเซลล์ย่อยอาหารชั้นเดียว (single layer of digestive cell) (ลูกศรสีขาว) และ basophilic cell (ลูกศรแถบสีเทา) การเรียงตัวที่ไม่เท่ากันของ 2 เซลล์นี้ทำให้เกิด tubular lumen (tl) และส่วนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มี granulocytes ล้อมรอบ (ลูกศรแถบสีขาว) (Cuevas et al., 2015)

## 2.9 ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ในสิ่งมีชีวิตทางน้ำ

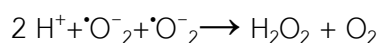
### 2.9.1 Free radicals และ reactive oxygen species (ROS)

สิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงและสิ่งมีชีวิตที่หายใจรวมถึงมีกระบวนการกรองกินอาหารในมวลน้ำจะผลิต reactive oxygen species (ROS) เป็นสารที่เกิดจากออกซิเจน ประกอบด้วย Free radicals ตัวอย่างของ ROS ได้แก่ peroxides, superoxide ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hydroxyl radical, singlet oxygen และ alpha-oxygen (Hayyan et al., 2016)

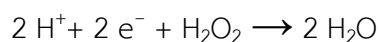
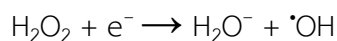
โดยการลดลงของโมเลกุลออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ทำให้เกิด superoxide ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ reactive oxygen species ชนิดอื่น ๆ (Turrens, 2003):



และการเปลี่ยนรูปของ superoxide ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) ทำให้เกิด hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Turrens, 2003):



ในทางกลับกัน hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) บางส่วนจะลดลง ทำให้เกิด hydroxide ions และ hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) หรือลดลงจนหมดกลายเป็นน้ำ (Turrens, 2003):



ในทางชีวภาพการผลิต ROS เกี่ยวข้องโดยตรงและมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเข้มข้นของ  $\text{O}_2$  (Jamieson et al., 1986) ROS โดยทั่วไปประมาณร้อยละ 5 - 10 ของ ROS สามารถผลิตได้โดยตรงผ่านการหายใจแบบใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรียของเซลล์ ROS มีบทบาทในการส่งสัญญาณของเซลล์และ homeostasis (Edreva, 2005) ROS เกิดขึ้นจากการทำงานของเซลล์ และมีอยู่ในระดับต่ำและคงที่ในเซลล์ปกติ หากในเซลล์มีการผลิตและการสะสมของ ROS มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดภาวะความเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำให้เกิดการทำลายไขมัน, โปรตีนและสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA อย่างไม่สามารถย้อนกลับได้ เนื่องจากพวกมันออกซิไดซ์และปรับเปลี่ยนส่วนประกอบของเซลล์บางอย่าง และป้องกันไม่ให้ทำหน้าที่เดิม (Halliwell, 1996) แต่ ROS ก็ยังสามารถทำหน้าที่ในการเป็น signal transduction นี้แสดงให้เห็นว่า ROS มีบทบาทสองประการ ไม่ว่าจะป็นปัจจัยที่เป็นอันตราย, ป้องกันหรือส่งสัญญาณขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างการผลิต ROS และการกำจัดในช่วงเวลาที่เหมาะสม (Edreva, 2005) กล่าวอีกนัยหนึ่งความเป็นพิษของออกซิเจนสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งจากการผลิตที่ไม่สามารถควบคุมได้และจากการกำจัด ROS ที่ไม่มีประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) นอกจากนี้มีการรายงานพบว่าภาวะเครียดจากออกซิเดชันในสัตว์ที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของ ROS อาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่ของสิ่งมีชีวิต เช่น สารเคมีที่ปนเปื้อนในแหล่งที่อยู่อาศัย ความเค็ม อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อโครงสร้างเซลล์ (Freire et al., 2011; Lushchak, 2011)

แหล่งที่มาของการผลิต reactive oxygen species (ROS) แบ่งออกเป็นสองแหล่งใหญ่ ๆ คือ Endogenous sources และ Exogenous sources ใน Endogenous sources การผลิต ROS จะเกิดจากปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหายใจและการสังเคราะห์แสงในออร์แกเนลล์ เช่น ไมโทคอนเดรียเพอรอกซิโซม และคลอโรพลาสต์ (Dietz, 2016; Edreva, 2005; Muller, 2000) ในระหว่างกระบวนการหายใจไมโทคอนเดรียจะเปลี่ยนพลังงานสำหรับเซลล์ให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้งานได้ คือ adenosine triphosphate (ATP) ในกระบวนการผลิต ATP ในเซลล์ไมโทคอนเดรียที่เรียกว่า oxidative phosphorylation เกี่ยวข้องกับการขนส่งโปรตอน (hydrogen ions) ผ่านเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นในโดยใช้ electron transport chain อิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านชุดโปรตีนผ่านปฏิกิริยา oxidation-reduction โดยโปรตีนตัวรับแต่ละตัวศักยภาพในการทำงานจะ

ลดลง ปลายทางสุดท้ายของอิเล็กตรอนในสายโซ่นี้คือโมเลกุลออกซิเจน oxygen molecule ในสภาวะปกติออกซิเจนจะ reduced เพื่อผลิตน้ำประมาณ 0.1-2% ของอิเล็กตรอนที่ผ่านสายโซ่ออกซิเจนจะถูกแทนที่ก่อนเพื่อให้ superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) ใน Complex I และ Complex III (Li et al., 2013)

อีกแหล่งหนึ่งของการผลิต ROS ในเซลล์สัตว์คือ ปฏิกิริยา electron transfer reactions catalyzed โดยระบบ P450 ในไมโทคอนเดรีย (Hanukoglu & Sklan, 1993) ระบบ P450 เหล่านี้ขึ้นอยู่กับการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก NADPH ไปยัง P450 ในระหว่างกระบวนการนี้ อิเล็กตรอนบางตัวจะหลุดออกมาและทำปฏิกิริยากับ  $\text{O}_2$  ซึ่งทำให้เกิด superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) ดังนั้นเพื่อรับมือกับแหล่ง ROS ตามธรรมชาตินี้ เนื้อเยื่อ steroidogenic, รังไข่ และอวัยวะ จึงมีสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความเข้มข้นสูง เช่น วิตามินซี (ascorbate),  $\beta$ -carotene และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) (Hanukoglu, 2006) หากมีความเสียหายมากเกินไปในเซลล์ไมโทคอนเดรีย เซลล์จะเกิดการตายแบบ apoptosis หรือแบบแผนการตายของเซลล์ (programmed cell death) พบว่าปริมาณของอนุมูลอิสระมีผลต่อกระบวนการ apoptosis แตกต่างกัน กล่าวคือ ระดับปานกลางสามารถกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ได้โดยผ่านทางการทำงานของโปรตีน p53 (Curtin & Donovan, 2002) นอกจากนี้ ROS ยังถูกผลิตขึ้นในการส่งสัญญาณของเซลล์ภูมิคุ้มกันผ่านทาง NOX (NADPH oxidase) (Bruce et al., 2015) และเมื่อโดนกระตุ้นเซลล์ Phagocytic ได้แก่ neutrophils, eosinophils และ mononuclear phagocytes จะสามารถผลิต ROS ได้อีกด้วย

ใน Exogenous sources การก่อตัวของ ROS จะสามารถถูกกระตุ้นโดยสารต่าง ๆ เช่น มลพิษ ออณหภูมิ ปฏิสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ สามารถมีอิทธิพลต่อการผลิต ROS ในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ Ionizing radiation สามารถสร้างตัวกลางที่ก่อให้เกิดความเสียหายได้ผ่านการปฏิกิริยากับน้ำ ซึ่งเป็นกระบวนการที่เรียกว่า radiolysis เนื่องจากในเซลล์สิ่งมีชีวิตน้ำถือเป็นประกอบสำคัญประมาณร้อยละ 55-60 ความน่าจะเป็นของการสลายตัวด้วย radiolysis จึงค่อนข้างสูงเมื่อมี ionizing radiation ในกระบวนการนี้ น้ำจะสูญเสียอิเล็กตรอน จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่สามขั้นตอน น้ำจะกลายเป็น hydroxyl radical ( $\text{OH}^\bullet$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxide radical ( $\text{O}_2^-$ ) ตามลำดับและได้ออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย hydroxyl radical ( $\text{OH}^\bullet$ ) มีการทำปฏิกิริยาที่รุนแรงเนื่องจากมันจะกำจัดอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลใด ๆ ในเส้นทางของมันทันที ทำให้โมเลกุลนั้นกลายเป็นอนุมูลอิสระและทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ อย่างไรก็ตาม hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ก็ยังถือว่าสร้างความเสียหายต่อ DNA มากกว่า อนุมูลอิสระ hydroxyl radical ( $\text{OH}^\bullet$ ) เนื่องจากปฏิกิริยาที่ต่ำกว่าของ hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ทำให้มีเวลาเพียงพอสำหรับโมเลกุลที่จะเดินทางเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ และทำปฏิกิริยากับโมเลกุลขนาดใหญ่เช่น DNA ในเวลาต่อมา

## 2.9.2 Antioxidant defenses ในสัตว์น้ำ

สารต้านออกซิเดชัน คือ สารที่สามารถป้องกัน ยับยั้งหรือทำลายอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่โดย การเก็บกิน (scavenging) และการรีดิวซ์โมเลกุล สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

### Enzymatic Antioxidants

การมี ROS มากเกินไปและการผลิต ROS สูงทำให้เกิด oxidative stress ในสัตว์น้ำต่าง ๆ ส่งผลต่อความเสียหายของ DNA และโมเลกุลทางชีววิทยาในเซลล์ ดังนั้นระบบต้านอนุมูลอิสระจึงเป็น หนึ่งใน การตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในการจัดการกับการผลิต ROS ที่มากเกินไป (Lesser, 2006) ROS ที่เกิดขึ้นนั้นจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำโดยผ่านเอนไซม์ภายในร่างกาย เอนไซม์ที่ใช้เพื่อ การกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นเรียกรวมว่า antioxidant enzymes ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลักที่สำคัญ ได้แก่ superoxide dismutases (SOD), catalases (CAT) และ glutathione peroxidases (GPx) ซึ่งแต่ละเอนไซม์มีโมเลกุลเป้าหมายที่ต่างกันไป (Halliwell, 1996; Lesser, 2006)

Superoxide dismutases (SOD) เป็นเอนไซม์ประเภทหนึ่งที่กระตุ้นปฏิกิริยาการสลายตัวของ superoxide ให้เปลี่ยนเป็น  $O_2$  และ  $H_2O_2$  ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะพบในเซลล์ทุกเซลล์ SOD นั้นจะมี cofactor เป็นโลหะหนักซึ่งได้แก่ Cu, Zn และ Mn จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ของ SOD ยังคงเป็น ROS ซึ่งในสภาวะปกติจะมี เอนไซม์ catalases และ peroxidases เข้ามาเปลี่ยนโมเลกุลของ  $H_2O_2$  ให้กลายเป็นน้ำและ  $O_2$  ต่อไป อย่างไรก็ตามหากร่างกายเกิดภาวะขาดเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดข้างต้นจะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และ เสี่ยงต่อการเกิด Fenton reaction ซึ่งจะเปลี่ยน  $H_2O_2$  ให้กลายเป็น hydroxyl radical ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่รุนแรงได้

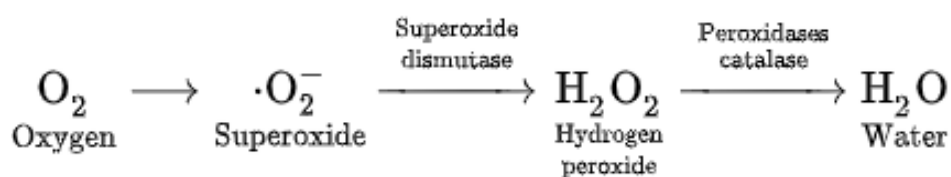
Catalases (CAT) เป็นเอนไซม์ที่มี heme-containing ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ  $H_2O_2$  ให้กลายเป็น  $H_2O$  และ  $O_2$  โดยใช้ substrate เป็น  $H_2O_2$  จำนวน 2 โมเลกุล เอนไซม์ชนิดนี้มี Mn หรือ Fe เป็น cofactor ซึ่งจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ใน eukaryotic cell ทั่วไป ลักษณะที่ไม่ธรรมดาของ catalase คือความไวต่อแสงและการหมุนเวียนที่รวดเร็วซึ่งอาจเป็นผลมาจากการ ดูดกลืนแสงโดยกลุ่ม heme group ภาวะที่ลดอัตราการหมุนเวียนโปรตีน เช่น osmotic ความร้อน หรือความเย็นสามารถลดกิจกรรม catalase

Peroxidases เป็นเอนไซม์ที่คล้ายกับ catalases คือ เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ  $H_2O_2$  ให้กลายเป็น  $H_2O$  และ  $O_2$  แต่พวกมันต้องการแหล่งของอิเล็กตรอนที่จะถูก oxidized ต่างจาก catalases

Glutathione peroxidases (GPx) ซึ่งจะช่วยเร่งปฏิกิริยา reduction ของ hydrogen peroxide ซึ่งจะเปลี่ยน  $H_2O_2$  ให้กลายเป็นน้ำ



กระบวนการกำจัด ROS นั้นเป็นผลมาจากเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกันโดยเอนไซม์ SOD จะเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่เข้ามาเปลี่ยนรูปของ superoxide ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) ทำให้เกิด hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) จากนั้นเอนไซม์ CAT และ POD จะเข้ามากำจัด hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ให้กลายเป็นน้ำในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยา (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 Enzymatic pathway สำหรับกระบวนการกำจัดของ ROS ในเซลล์สิ่งมีชีวิต

### Nonenzymatic Antioxidants

กลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ (nonenzymatic antioxidants) เช่น vitamin C, vitamin E, plant polyphenol, carotenoids และ glutathione

glutathione (GSH) เป็นไตรเปปไทด์ (Glu-Cys-Gly) ที่พบในสัตว์และพืช ในรูป thiyl radical ซึ่งทำปฏิกิริยากับ GSH ออกซิไดซ์ตัวที่สอง และอยู่ในรูปพันธะ disulphide (GSSG) เมื่อออกซิไดซ์ อัตราส่วนของ GSH/GSSG มักใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเครียดออกซิเดชันในเซลล์และการทำงานของ GSH เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในหลาย ๆ ด้าน โดยทำปฏิกิริยากับ  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  และ  $\text{HO}^\cdot$  นอกจากนี้ GSH ยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวทำลายปฏิกิริยาอนุมูลอิสระและเป็นสารตั้งต้นที่จำเป็นสำหรับ glutathione peroxidase (GPx) ดังนั้นการรักษาระดับ GSH ของเซลล์เป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันความเสียหายต่อเซลล์ที่สัมผัสกับมลพิษที่ก่อให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินงานวิจัย

##### 3.1 การเตรียมไมโครพลาสติก

ในการศึกษาผลกระทบและการสะสมไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์ไมโครพลาสติกจำลองจากคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยเลือกใช้ไมโครพลาสติก 3 ประเภท คือ พอลิสไตรีน (Polystyrene :PS), พอลิโพรไพลีน (Polypropylene: PP) และพอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate: PBS) (รูปที่ 7) เนื่องจาก PBS เป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้เมื่อเทียบกับพลาสติกประเภท PS และ PP ตรวจสอบประเภทโดยใช้การวิเคราะห์ FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy) ทำการบดให้มีขนาดเล็กและคัดแยกขนาดไมโครพลาสติกด้วยตะแกรงร่อน (sieves) ให้ได้ 3 ขนาดได้แก่ ขนาดเล็ก (<30  $\mu\text{m}$ ), ขนาดกลาง (30-300  $\mu\text{m}$ ) และขนาดใหญ่ (300-1000  $\mu\text{m}$ )

โดยความเข้มข้นไมโครพลาสติกในการทดลองครั้งนี้จะกำหนดจากจำนวนการสะสมไมโครพลาสติกในธรรมชาติและการสะสมไมโครพลาสติกในหอยสองฝา (Chinfak et al., 2021; Khoironi & Anggoro, 2018; Mathalon & Hill, 2014) ซึ่งพบว่าไมโครพลาสติกสะสมตั้งแต่ปริมาณน้อยถึง 178 ชิ้น/ตัวหอย จึงได้กำหนดปริมาณไมโครพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง 4 ระดับ ดังนี้ 50, 250, 500 และ 1,000 ชิ้น/ตัวหอย เพื่อให้ครอบคลุมช่วงระดับที่พบการสะสมในตัวหอยในธรรมชาติและระดับที่สูงมากขึ้นเพื่อเป็นตัวแทนสภาพการเกิดมลพิษอย่างรุนแรงจากไมโครพลาสติก

ในการเตรียมไมโครพลาสติกเข้มข้น (Stock Solution) โดยชั่งแต่ละขนาดอย่างละ 10 mg ใส่ในน้ำทะเลความเค็ม 30 psu ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Cellulose Nitrate Membrane Filters, 0.45  $\mu\text{m}$  47 mm ปริมาตร 100 ml ในขวดแก้วที่หุ้มด้วยฟอยล์อลูมิเนียม ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เพื่อให้ ไมโครพลาสติกดูดซับน้ำและป้องกันการฟุ้งกระจาย จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่าง ละเอียด 1 มิลลิลิตร ตรวจสอบนับด้วย Sedgewick Rafter Counting Chamber โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 และ 40 เท่า

เมื่อทราบจำนวนชิ้นของไมโครพลาสติกแต่ละประเภทและขนาดในปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้ว ในการปิเปตความเข้มข้นไมโครพลาสติกจากไมโครพลาสติกเข้มข้น (Stock Solution) เพื่อทดลอง โดยในตู้ทดลองจะมีตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง/ซ้ำ ดังนั้นการคำนวณความเข้มข้นไมโครพลาสติกต่อลิตร ดังนี้

ปริมาตรไมโครพลาสติกเข้มข้นที่เติมในตู้ทดลอง (มิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{จำนวนชิ้นของของไมโครพลาสติกที่ต้องการให้หอย 1 ตัว} \times \text{จำนวนตัวอย่างหอยแมลงภู่ในตู้ทดลอง}}{\text{ค่าเฉลี่ยไมโครพลาสติกที่นับได้จาก stock solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร}}$$

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นไมโครพลาสติกในชุดทดลองที่ต้องการให้ 50 ชิ้น/ตัวหอย

กำหนด ความเข้มข้นไมโครพลาสติกที่ต้องการให้หอย 50 ชิ้น/ตัวหอย

จำนวนหอยแมลงภู่ 20 ตัว/ซ้ำ

ค่าเฉลี่ยไมโครพลาสติกที่นับได้จาก Stock solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ได้ 657 ชิ้น

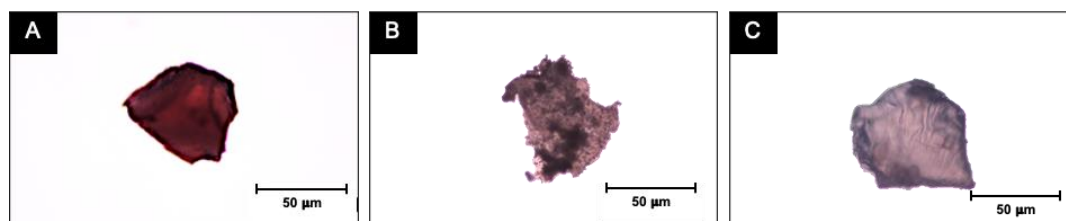
แทนค่า

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรไมโครพลาสติกเข้มข้นที่เติมในตู้ทดลอง} &= \frac{50 \times 20}{657} \\ &= 1.5 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้นในการทดลองที่ระดับความเข้มข้นไมโครพลาสติก 50 ชิ้น/ตัวหอย จะปิเปตไมโครพลาสติกจาก Stock Solution ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมลงในตู้ทดลองที่มีปริมาตร 15 ลิตร

เมื่อกำหนดกลับเป็นความเข้มข้นของไมโครพลาสติกในตู้ทดลองจะได้ความเข้มข้นของไมโครพลาสติกในตู้ทดลอง เท่ากับ  $1000/15 = 66.6$  ชิ้น/ลิตร

ในการทดลองกำหนดให้ไมโครพลาสติกต่อตัวหอยมี 4 ระดับ คือ 50, 250, 500 และ 1,000 ชิ้น/ตัวหอย เมื่อกำหนดความเข้มข้นไมโครพลาสติกในตู้ทดลองจากจำนวนไมโครพลาสติกต่อหอยทั้งหมด 20 ตัวต่อสัดส่วนระดับน้ำที่ทดลอง 15 ลิตรจะได้ระดับความเข้มข้นเป็น 66, 333, 666 และ 1,333 ชิ้น/ลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 7 รูปร่างของไมโครพลาสติกขนาดกลาง (30-300 µm) ทั้ง 3 ประเภท (A) ไมโครพลาสติกประเภท PS (B) ไมโครพลาสติกประเภท PP และ (C) ไมโครพลาสติกประเภท PBS Scale Bar เท่ากับ 50 µm

### 3.2 การเตรียมแพลงก์ตอนพืชชนิด *Isochrysis galbana* เพื่อเป็นอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

การเตรียมน้ำสำหรับเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช ใช้น้ำทะเลความเค็ม 30 psu ปริมาตร 1.6 ลิตรกรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว GF/C ขนาด 47 mm (Whatman) เติมหอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนสูตร T<sub>1</sub> นำเข้าเครื่องสำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำหัวเชื้อ *Isochrysis galbana* ที่ได้จากห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืชทะเล 730 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (รูปที่ 8) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันก่อนนำไปเป็นอาหารของหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) (Kaplan, 1986)

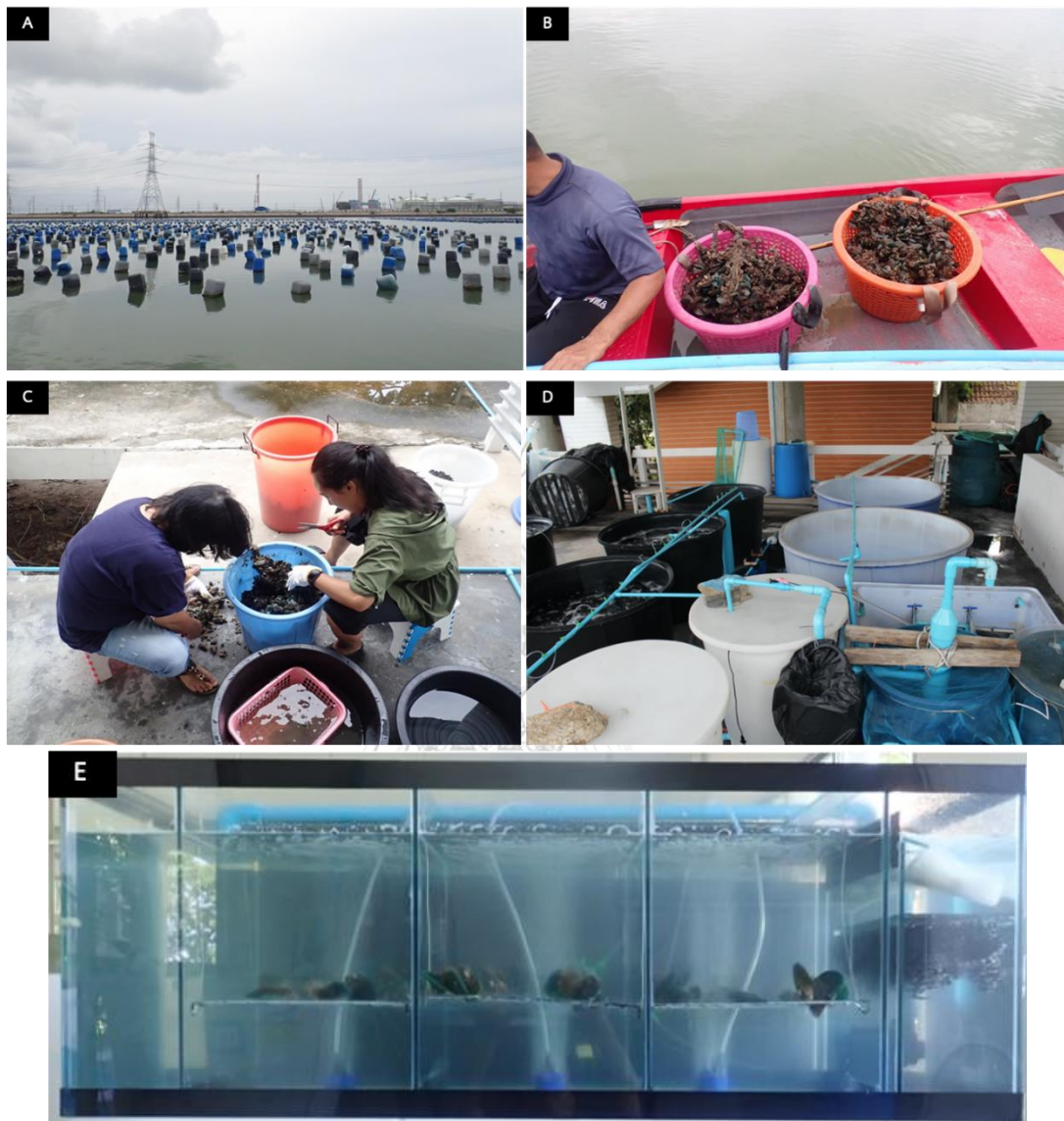


รูปที่ 8 การนำหัวเชื้อ *Isochrysis galbana* ปริมาตร 100 มิลลิลิตรมาขยายเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนสูตร T<sub>1</sub> ที่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

### 3.3 การเก็บตัวอย่างและการปรับสภาพสัตว์ทดลองหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

หอยแมลงภู่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มหอยแมลงภู่ในที่ชุมชน ตากวน ตำบลมาตาพุด อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง (รูปที่ 9A, 9B) การทดลองครั้งนี้เลือกใช้ตัวอย่างหอยแมลงภู่นี้นี้มีความยาวเปลือก 4-6 เซนติเมตร โดยทำความสะอาดหอยแมลงภู่อบริเวณภายนอกของเปลือกหอย (รูปที่ 9C) ก่อนนำมาปรับสภาพในระบบเลี้ยงแบบปิดตามวิธีการของ Marissa (2016) ณ สถานีวิจัยสัตว์ทะเลอันดามัน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งระหว่างการเลี้ยงปรับสภาพหอยแมลงภู่จะใช้น้ำทะเลกรองที่กรองด้วยถุง

กรองความละเอียด 20 ไมโครเมตร, 5 ไมโครเมตร และ 1 ไมโครเมตร ตามลำดับ กรองสารอินทรีย์ และสารพิษบางชนิดในน้ำด้วยไส้กรองคาร์บอน ใช้น้ำทะเลกรองความเค็มที่ 30 psu ( $\pm 0.2$ ), pH 8.00 ( $\pm 0.05$ ) และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ( $\pm 0.2$ ) ตลอดการปรับสภาพในระบบแบบปิด (รูปที่ 9D) จะให้แพลงก์ตอนพืชชนิด *Isochrysis galbana* ที่ความหนาแน่น  $5 \times 10^7$  เซลล์ /ตัวหอย วันละครั้ง เป็นเวลา 7 วัน โดยปิดระบบทุกครั้งเมื่อให้อาหารนาน 3-4 ชั่วโมงเมื่อทำการเลี้ยงปรับสภาพครบตามที่ต้องการแล้ว จึงย้ายหอยแมลงภูใส่ในตะแกรงอะลูมิเนียมแขวนในตู้กระจก ปรับสภาพอีกครั้งเป็นเวลา 2 วัน ในตู้ทดลองกระจกที่เป็นระบบเลี้ยงแบบปิดขนาด  $30 \times 107 \times 38$  เซนติเมตร ให้แพลงก์ตอนพืชชนิด *I. galbana* ที่ความหนาแน่น  $5 \times 10^7$  เซลล์ /ตัวหอย วันละครั้ง โดยปิดระบบทุกครั้งเมื่อให้อาหารนาน 3-4 ชั่วโมงและไม่ลดระดับน้ำ เมื่อปรับสภาพครบกำหนดแล้วจะนำตัวอย่างหอยแมลงภูไปทดลองซึ่งจะทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ แอมโมเนียและไนไตรต์ โดยต้องมีค่าน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ทุกวันด้วยชุดตรวจ AQUA-VBC test Kit ก่อนการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ขออนุญาตใช้สัตว์ทดลอง โดยได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการการใช้สัตว์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (หมายเลขโครงการ 2123013)



รูปที่ 9 (A, B) การเก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่น้ำจืด (*P. viridis*) จากฟาร์มหอยแมลงภู่น้ำจืดที่ชุมชนตากวน ตำบลมาบตาพุด อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง (C) ตัวอย่างจะทำความสะอาดภายนอกของหอยแมลงภู่น้ำจืดก่อน (D) นำไปปรับสภาพในระบบเลี้ยงแบบปิดเป็นเวลา 7 วัน (E) ระบบตู้เลี้ยงแบบปิดที่ใช้ในการทดลอง

### 3.4 การศึกษาอัตราการกรอกกินในหอยแมลงภู่และการตรวจนับความคงเหลือของไมโครพลาสติกในมวลน้ำ

ในการทดลองอัตราการกรอกกินและการตรวจนับความคงเหลือของไมโครพลาสติกในมวลน้ำ ในระหว่างการทดลองจะทำการปิดระบบน้ำ และลดระดับน้ำในแต่ละซ้ำให้เหลือ 15 ลิตร การทดลอง แบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมจะให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนพืชชนิด *Isochrysis galbana* ความหนาแน่น  $5 \times 10^7$  เซลล์ / ตัวหอย โดยไม่ผสมไมโครพลาสติก (ปฏิภาณ พุ่มพวง, 2561)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลองทั้งหมด 12 ชุดจะให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนพืชชนิด *I. galbana* ความหนาแน่น  $5 \times 10^7$  เซลล์ / ตัวหอยผสมไมโครพลาสติก 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่

ชุดที่ 1 ให้หอยแมลงภู่กรอกกินไมโครพลาสติกที่ความเข้มข้น 66 ชิ้น/ลิตร หรือคิดเป็น 50 ชิ้น/ตัว

ชุดที่ 2 ให้หอยแมลงภู่กรอกกินไมโครพลาสติกที่ความเข้มข้น 333 ชิ้น/ลิตร หรือคิดเป็น 250 ชิ้น/ตัว

ชุดที่ 3 ให้หอยแมลงภู่กรอกกินไมโครพลาสติกที่ความเข้มข้น 666 ชิ้น/ลิตร หรือคิดเป็น 500 ชิ้น/ตัว

ชุดที่ 4 ให้หอยแมลงภู่กรอกกินไมโครพลาสติกที่ความเข้มข้น 1333 ชิ้น/ลิตร หรือคิดเป็น 1000 ชิ้น/ตัว

โดยความเข้มข้นที่เลือกเหล่านี้อ้างอิงตามความเข้มข้นที่บันทึกโดย Ta และ Babel ในปี 2020 และ Ericsson และ Johansson ปี 2018 และสามขนาด ได้แก่ ขนาดเล็ก ( $<30 \mu\text{m}$ ), ขนาดกลาง ( $30-300 \mu\text{m}$ ) และขนาดใหญ่ ( $300-1000 \mu\text{m}$ ) จำนวน 3 ซ้ำ ใช้หอยแมลงภู่จำนวน 20 ตัว ในแต่ละซ้ำ ทำการสูดตัวอย่างน้ำแต่ละชุดการทดลองปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นช่วงเวลา 4 ชั่วโมง แบ่งเป็นทุก ๆ 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 นาที โดยตรวจนับความคงเหลือของแพลงก์ตอนพืชชนิด *I. galbana* ด้วย Hemocytometer และไมโครพลาสติกด้วย Sedgewick Rafter Counting Chambers

### 3.5 ศึกษาอัตราการตายเฉลี่ยครึ่งหนึ่งของประชากร (Lethal Concentration<sub>50</sub>; LC<sub>50</sub>)

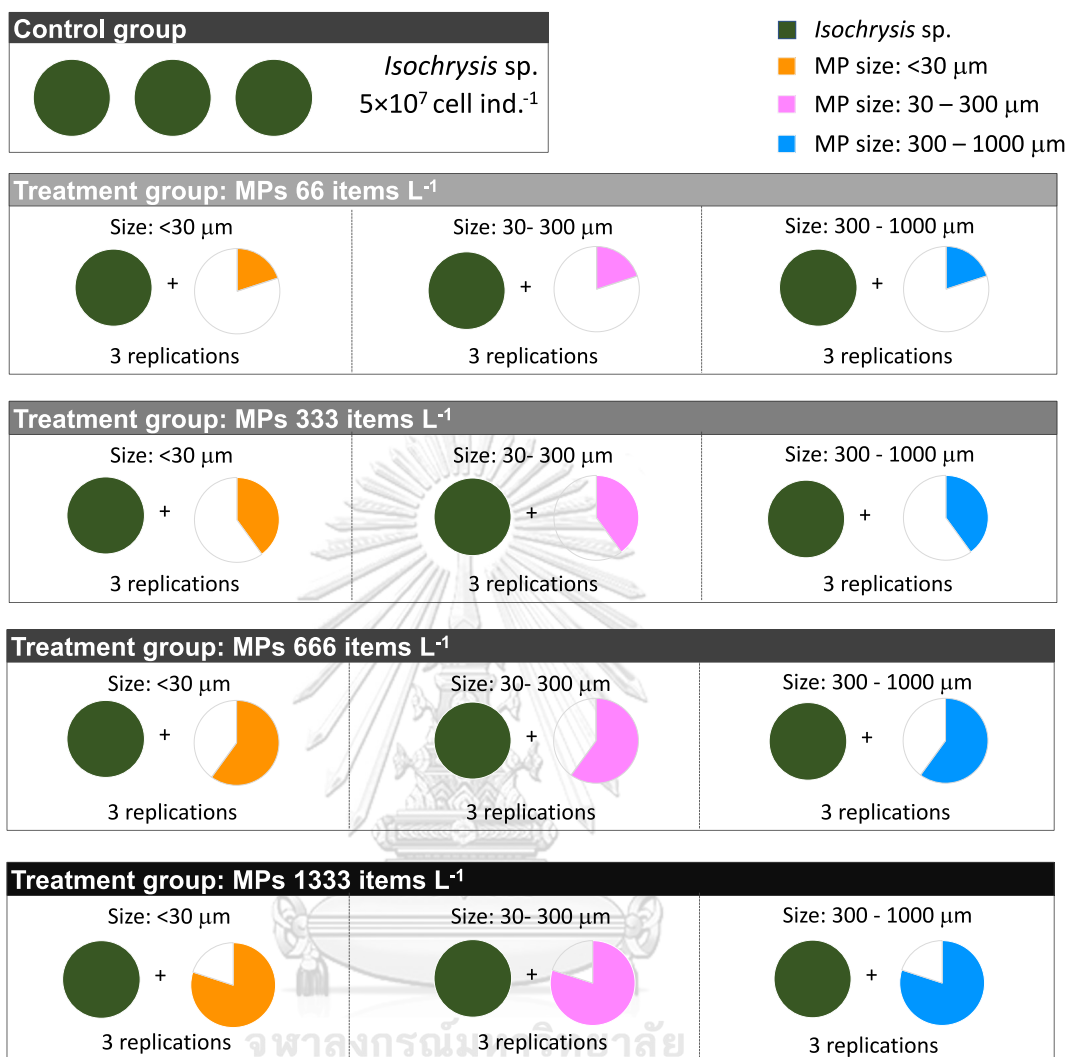
หลังจากปรับสภาพหอยแมลงภู่ในตู้กระจกซึ่งเป็นระบบเลี้ยงแบบปิดส่วนย่อย โดยให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนพืชชนิด *Isochrysis galbana* ที่ความหนาแน่น  $5 \times 10^7$  เซลล์ / ตัวหอย (ปฏิภาณ พุ่มพวง, 2561) โดยไม่ผสมไมโครพลาสติกเป็นเวลา 2 วัน หลังจากทำการปรับสภาพหอยแมลงภู่

แล้ว ในการทดลอง  $LC_{50}$  จะใช้ตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง/ซ้ำ ทั้งหมดจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์อัตราการตายครั้งหนึ่งของประชากรที่กรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS, PP, และ PBS จำนวน 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 66, 333, 666 และ 1,333 ชิ้น/ลิตร โดยความเข้มข้นที่เลือกเหล่านี้อ้างอิงตามความเข้มข้นที่บันทึกโดย Ta และ Babel ในปี 2020 และ Ericsson และ Johansson ปี 2018 และ 3 ขนาด ได้แก่ ขนาดเล็ก ( $<30 \mu\text{m}$ ), ขนาดกลาง ( $30-300 \mu\text{m}$ ) และขนาดใหญ่ ( $300-1000 \mu\text{m}$ ) ซึ่งในระหว่างการทดลองจะทำการปิดระบบน้ำนานเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ตามการทดลองในข้อ 3.3) และลดระดับน้ำในแต่ละซ้ำให้เหลือ 15 ลิตร โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมจะให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนพืชชนิด *I. galbana* ความหนาแน่น  $5 \times 10^7$  เซลล์ /ตัวหอย โดยไม่ผสมไมโครพลาสติก

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลองจะให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนพืชชนิด *I. galbana* ความหนาแน่น  $5 \times 10^7$  เซลล์ /ตัวหอย ผสมไมโครพลาสติกตามความเข้มข้นที่ต้องการจากการคำนวณในข้อที่ 3.1 (66, 333, 666 และ 1,333 ชิ้น/ลิตร) ก่อนการให้อาหารทำการตรวจวัดคุณภาพของน้ำโดยใช้ชุดทดสอบ AQUA-VBC test Kit เมื่อครบ 4 ชั่วโมงหลังจากให้อาหารทำการเก็บตัวอย่าง feces และ pseudofeces หลังจากนั้นทำการกรองน้ำผ่านชุดกรอง 5 ไมโครเมตร, 1 ไมโครเมตรและไส้กรองคาร์บอนตามลำดับ เปิดระบบน้ำให้หมุนเวียนอีกครั้ง และสังเกตพฤติกรรมทุก ๆ 2 ชั่วโมง เมื่อครบชั่วโมงทุก 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ทำการจดบันทึกตัวตายเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแบบ Probit (Shaala et al., 2015) และเมื่อครบชั่วโมงที่ 12, 24, 48, และ 96 ชั่วโมงทำการเก็บตัวอย่างตัวที่มีชีวิตเพื่อนำไปวิเคราะห์การสะสมและผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อหอยแมลงภู่ ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ด้วยวิธีทางภูมิพยาธิวิทยาจะเก็บตัวอย่างเป็นในชั่วโมงที่ 12 และ 96 และหากมีตัวอย่างที่ตายในแต่ละชั่วโมงจะทำการเก็บตัวอย่างไปทำการศึกษาการสะสมไมโครพลาสติกอีกด้วย (รูปที่ 10)





รูปที่ 10 การทดลองความเข้มข้นไมโครพลาสติกที่แตกต่างกัน 5 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร และ 3 ขนาดที่แตกต่างกันของไมโครพลาสติก (ขนาดเล็ก; <30 μm, ขนาดกลาง; 30-300 μm และขนาดใหญ่; 300-1000 μm) ในการทดลองใช้ตัวอย่างทั้งหมดสามซ้ำ (n = 3) ต่อการทดลอง การออกแบบการทดลองนี้ถูกนำมาใช้สำหรับ ไมโครพลาสติกแต่ละประเภท (PS, PP และ PBS)

### 3.6 การควบคุมคุณภาพของการทดลองการสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

เพื่อให้แน่ใจว่าตัวอย่างและสารละลายไม่ถูกปนเปื้อนด้วยไมโครพลาสติกจากแหล่งอื่น สารละลายและน้ำ Deionized (DI) ทั้งหมดจะผ่านการกรองตาม Chinfak และคณะ (2020) น้ำ

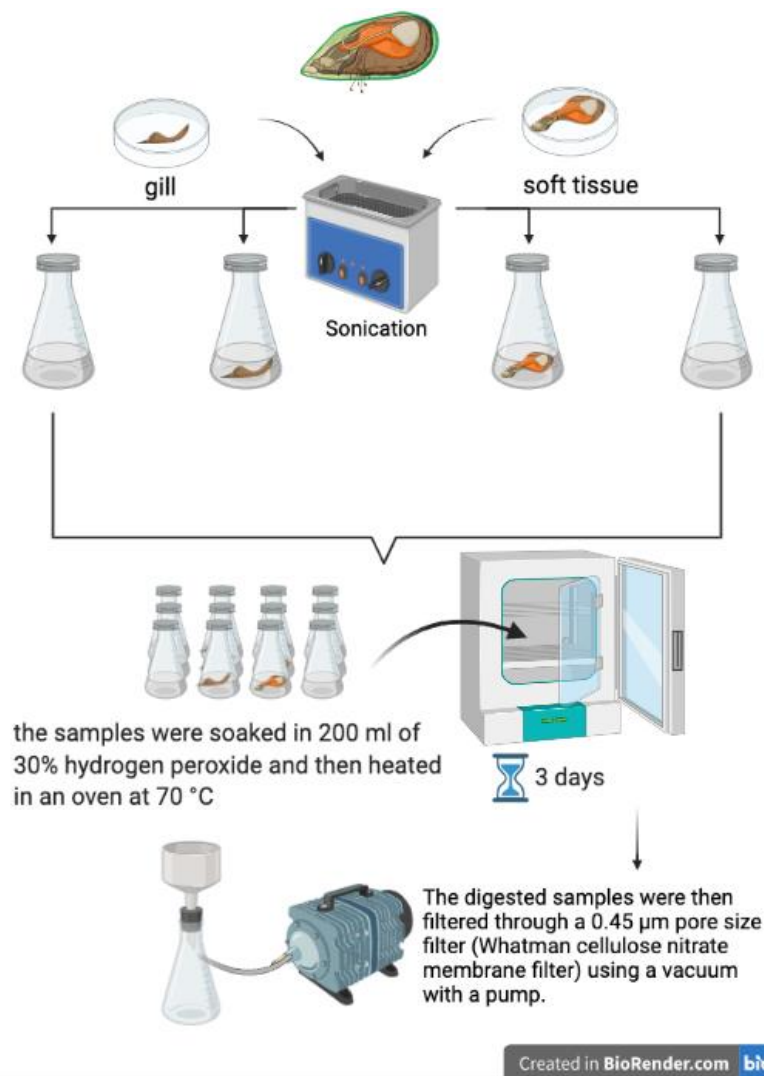
Deionized (DI), สารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (30% v/v) และ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่อิมัตวจะกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman cellulose nitrate membrane filter) จากนั้นจึงเก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนไมโครพลาสติกในอากาศที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการขนส่ง

### 3.7 การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่

#### 3.7.1 การสะสมของไมโครพลาสติกในเนื้อเยื่อ (soft tissue) ของหอยแมลงภู่

##### (*Perna viridis*)

ทำการเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมง 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมงในแต่ละความเข้มข้นและขนาดของไมโครพลาสติก การย่อยตัวอย่างเพื่อศึกษาการสะสมไมโครพลาสติกในเนื้อเยื่อจะตัดแปลงตามวิธีการของ Li และคณะ (2018) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เช็ดเปลือกด้านนอกของหอยแมลงภู่ด้วยกระดาษทิชชู ใช้ปลายมีดแซะเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่ออกจากเปลือกอย่างระมัดระวังและนำชิ้นน้ำหนัก จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนเหงือกไป sonicate ซะล้างด้วยน้ำ DI (Deionized water) ที่ผ่านการกรองแล้ว นำเหงือกและน้ำที่ได้จากการชะล้างไปย่อยด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ภาชนะที่ใช้ในการย่อยจะใช้เป็นขวดแก้วที่ปิดด้วยฟอยล์อลูมิเนียม ส่วนตัวของหอยทำวิธีการคล้ายกันกับส่วนเหงือก (รูปที่ 11) ดังนั้นจะได้ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการสะสมไมโครพลาสติก 4 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่เป็นเหงือก น้ำที่ผ่านการชะล้างเหงือก ตัวหอย และน้ำที่ผ่านการชะล้างตัวหอย จากนั้นเมื่อครบเวลา นำสารละลายออกมาพักให้เย็นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่อิมัตวและผ่านการกรองแล้ว ปริมาตรเป็น 1:4 ส่วน โดยแบ่งเป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 1 ส่วน และโซเดียมคลอไรด์ 4 ส่วน ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไมโครพลาสติกลอยตัวขึ้น จากนั้นตัวอย่างที่ย่อยแล้วจะกรองผ่านกระดาษกรอง Cellulose Nitrate Membrane Filters, 0.45  $\mu\text{m}$  47 mm นับไมโครพลาสติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) (รูปที่ 12)



รูปที่ 11 วิธีการศึกษาการสะสมของไมโครพลาสติกใน soft tissue และเหงือกของหอยแมลงภู่

### 3.7.2 ปริมาณไมโครพลาสติกใน biodeposits (feces และ pseudofeces) ของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

ในการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่าง feces และ pseudofeces โดยหลังจากให้อาหารผ่านไป 4 ชั่วโมงเพื่อศึกษาการสะสมไมโครพลาสติกใน feces และ pseudofeces ดัดแปลงวิธีการจาก Fernández และ Albentosa (2019) โดยวัดปริมาณด้วยกระบอกตวงซึ่งแต่ละชั่วโมงของการทดลองจะแยกตัวอย่าง biodeposits ออกจากกัน การย่อยโดยใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 30% ในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน ตัวอย่างจะกรองผ่านกระดาษกรอง Cellulose

Nitrate Membrane Filters, 0.45 $\mu$ m 47 mm น้บไมโครพลาสติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)



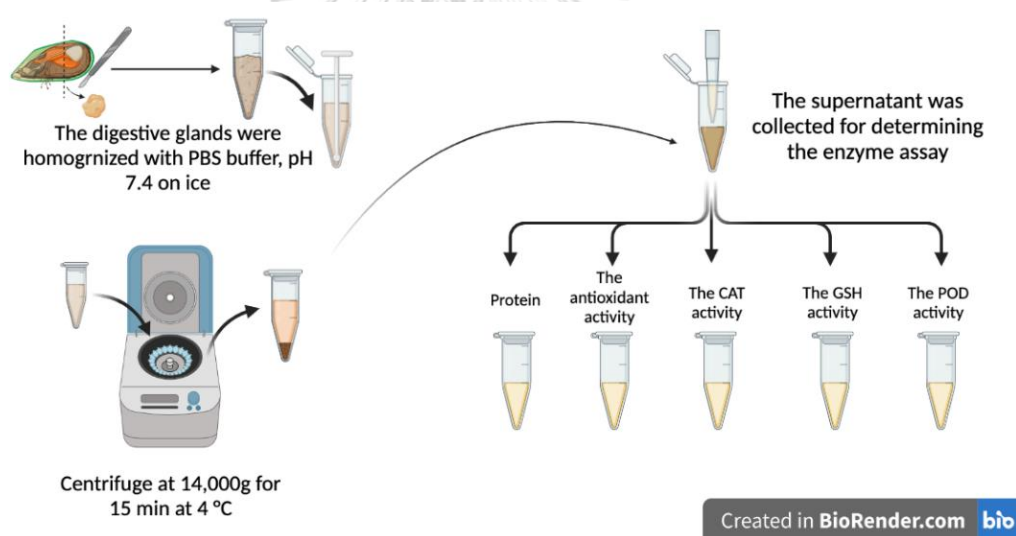
รูปที่ 12 A) ตัวอย่างที่แช่ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ภาชนะที่ใช้ในการย่อยจะใช้เป็นขวดแก้วที่ปิดด้วยฟอยล์อลูมิเนียม (B) ตัวอย่างอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน (C) ตัวอย่างอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน

### 3.8 การศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการแสดงออกภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

การศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการแสดงออกภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) สุ่มเก็บตัวอย่างที่ยังมีชีวิตแต่ละกลุ่มการทดลองจำนวน 3 ตัว/ความเข้มข้น/ขนาด จากการทดลองในช่วงเวลาที่ 12, 24, 48 และ 96 โดยเลือกเนื้อเยื่อบริเวณต่อมสร้างน้ำย่อยอาหารในหอยแมลงภู่ เก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียสทำการทดสอบด้วย Oxidative Stress Assay Kits โดยวัดเอนไซม์ Antioxidant, Peroxidase, Catalase และ total Glutathione content ในหอยแมลงภู่ตามวิธีการ Webb และคณะ (2020) เนื่องจาก Catalase, Peroxidase และ total

Glutathione เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน ROS (Reactive oxygen species) ที่เกิดขึ้นให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำ โดยวิธีการนี้เป็นการตรวจวัดค่า ROS ทางอ้อมเพื่อใช้บ่งชี้การทำงานของกระบวนการภายในเซลล์ที่เกิดความผิดปกติ

โดยตัวอย่างต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันบนน้ำแข็งด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) ที่ pH 7.4 นำตัวอย่างบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) นำมาปั่นเหวี่ยง 14000g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขั้นตอนต่อไปให้เปิดส่วนที่เป็นส่วนเหนือตะกอนแยกใส่ microcentrifuge tube ใหม่ สำหรับการวัดปริมาณโปรตีนและวิเคราะห์แอนติออกซิแดนท์, Catalase, Peroxidase และ total Glutathione ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (ชุดทดสอบ Antioxidant, Catalase, Peroxidase และ total Glutathione, Sigma-aldrich®) (รูปที่ 12)



รูปที่ 13 แผนภาพแสดงตัวอย่างการเตรียมและวิธีการวิเคราะห์สำหรับตรวจวัดกิจกรรมของแอนติออกซิแดนท์ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*P. viridis*)

### 3.8.1 การวัดปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Bradford Protein assay

วิธีการวิเคราะห์หาโปรตีนโดยอาศัยหลักการความสัมพันธ์ระหว่าง Coomassie Brilliant Blue G-250 และการรวมตัวกันของ Coomassie Brilliant Blue G-250 กับโปรตีนแบบเฉพาะเจาะจง โดย Coomassie Brilliant Blue G-250 เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะกรดเข้มข้นจะให้สีน้ำตาลแดงอ่อนออกมา และเมื่อมีการทำปฏิกิริยากับโปรตีนจะให้สีน้ำเงิน ซึ่งในการทดสอบหากยังมีปริมาณของกรดอะมิโน

มากเท่าใด การเกิดสีจะเข้มมากขึ้นเท่านั้น และจากนั้นจะเป็นการนำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ต่อไป

#### การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน

นำ Stock solution ของ Bovine serum albumin (BSA) (ThermoFisher Scientific) มาเจือจางใส่ในหลอดทดลองเพื่อหาค่าสมการของโปรตีนมาตรฐานเทียบกับโปรตีนตัวอย่างโดยเจือจางจาก Stock solution ตามตารางที่ 3 ปีเปิดโปรตีนมาตรฐานที่เจือจางตามตาราง 5 ไมโครลิตรลงใน 96 well plate จากนั้นใส่ Bradford reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาทีแต่ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm จากนั้นนำผลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟ

#### ตารางที่ 3 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

Vial	Volume and source of BSA (µl)	Volume of ultrapure water (µl)	Final BSA concentration (µg/mL)
1	300 µl of stock	0	2000
2	375 µl of stock	125	1500
3	325 µl of stock	325	1000
4	175 µl of vial 2 dilution	175	750
5	325 µl of vial 3 dilution	325	500
6	325 µl of vial 5 dilution	325	250
7	325 µl of vial 6 dilution	325	125
8	100 µl of vial 7 dilution	400	25
9	0	400	Blank

### การหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง

การหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างจากต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่สกัดได้โดยการเทียบกับสมการที่หาได้จากโปรตีนสมการมาตรฐาน (Lowry et al., 1951) โดยหลักการคล้ายกันทำการเจือจางตัวอย่างโปรตีน 2 เท่า ปิเปตตัวอย่างโปรตีน 5 ไมโครลิตรลง 96 well plate จากนั้นใส่ Bradford reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm จากนั้นนำผลที่ได้มาแทนในสมการกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโปรตีน (BSA) เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟโดยให้ค่าอยู่ในช่วงของสมการหากค่ายังเกินมาตรฐานให้ทำการเจือจางอีกครั้ง

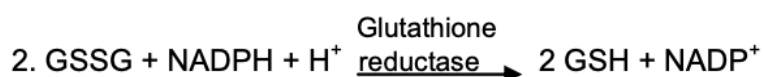
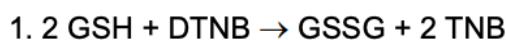
### **3.8.2 การตรวจวัดกิจกรรม Antioxidant enzyme ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)**

ตรวจวัดกิจกรรม antioxidant enzyme ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) โดยใช้ชุดทดสอบ Antioxidant (CS0790 Sigma-aldrich®) ดัดแปลงวิธีการจาก Borkovic และคณะ (2005) หลักการของการตรวจวัด antioxidant enzyme คือการก่อตัวของ ferry myoglobin radical จาก metmyoglobin และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ซึ่งออกซิไดซ์ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) ทำให้ได้ ABTS ที่มีประจุบวกและสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว โดยจะปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และปิเปตสารละลาย Myoglobin from horse heart 20 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์เป็นเวลา 5 นาทีแต่ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมงและเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสีปฏิกิริยาจะปิเปตสาร stop solution และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm

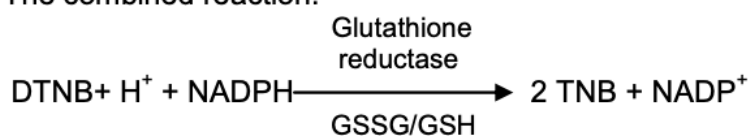
### **3.8.3 การตรวจวัดกิจกรรม Glutathione (GSH) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)**

ตรวจวัดกิจกรรม GSH ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) โดยใช้ชุดทดสอบ Glutathione (CS0260 Sigma-aldrich®) (Tipple & Rogers, 2012) โดยวิธีการทดสอบนี้ใช้การวัดค่าของระดับของ Glutathione ทั้งหมด (glutathione disulfide; GSSG + Glutathione; GSH) โดยหลักการคือ GSH ถูกออกซิไดซ์โดย 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ทำให้เกิด GSSG และ 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) จากนั้น GSSG จะลดลงเป็น GSH โดย glutathione reductase (GR) โดยใช้การรีดิวซ์ที่เท่ากับ NADPH (รูปที่ 13) โดยจะปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 10

ไมโครลิตร และปิเปตสารละลาย 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ จะเริ่มทำงานเมื่อปิเปตสาร NADPH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm



The combined reaction:



รูปที่ 14 สมการเคมีของ GSH ที่นำมาปรับใช้ในชุดตรวจวัดกิจกรรม GSH ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างทดลอง (Tipple & Rogers, 2012)

### 3.8.4 การตรวจวัดกิจกรรม Catalase (CAT) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

ตรวจวัดกิจกรรม CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) โดยใช้ชุดทดสอบ Catalase (CAT100 Sigma-aldrich®) ดัดแปลงวิธีการจาก Regoli และคณะ (2012) โดยวิธีการทดสอบนี้ใช้การวัดค่าของสารตั้งต้นของ hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ที่เหลืออยู่หลังจากปฏิกิริยาของกิจกรรม CAT โดยจะปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และปิเปตสารละลาย color reagent 1000 ไมโครลิตร (150 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.25 mM 4-aminoantipyrine and 2 mM 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid) ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาทีแต่ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง จากนั้นปฏิกิริยาของเอนไซม์จะหยุดด้วย sodium azide และนำไปนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 502 nm

### 3.8.5 การตรวจวัดกิจกรรม Peroxidase (POD) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

ตรวจวัดกิจกรรม POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) โดยใช้ชุดทดสอบ Peroxidase (Sigma-aldrich®) การวัดกิจกรรม POD ในรูปแบบต่าง ๆ ของตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยา



สลาย hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) โดยจะปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 12.5 mM  $H_2O_2$  Substrate จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm

### 3.9 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

หลังจากศึกษาอัตราการตายครั้งหนึ่งของประชากร จะเก็บตัวอย่างที่ยังมีชีวิตจากการทดลอง ในช่วงเวลาที่ 12 และ 96 ชั่วโมง ซึ่งมีกระบวนการในการเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน ของ Bell และ Lightner (1988) ดังแสดงในรูปที่ 15 ดังนี้คือ

#### 3.9.1 การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection) และการคงสภาพเนื้อเยื่อ (fixation)

โดยเลือกเก็บตัวอย่างบริเวณเหงือกและต่อมสร้างน้ำย่อยแต่ละกลุ่มการทดลองจำนวน 3 ตัว/ความเข้มข้น/ขนาด แช่เนื้อเยื่อในน้ำยาคงสภาพเดวิดสัน (Davidson's fixative) โดยให้น้ำยามี ปริมาตร 20 เท่าของปริมาตรตัวอย่างเนื้อเยื่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งใน ขั้นตอนนี้การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจะต้องทำด้วยความรวดเร็ว เพื่อให้เซลล์คงสภาพใกล้เคียงกับเมื่อยังมีชีวิตอยู่มากที่สุด เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดต้องนำเนื้อเยื่อมาล้างในน้ำยาคงสภาพออก ล้างออก ด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 นาทีหรือจนกว่าสารคงสภาพจะออกหมดหรือ จะจางไป

#### 3.9.2 การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydration) และการขจัดเอทิลแอลกอฮอล์และ ทำให้เนื้อเยื่อใส (Clearing or Dealcoholization)

ในขั้นตอนนี้จะใช้เอทานอลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 80, 90, 95 และ 99.9 (absolute ethanol) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที หลังจากนั้น นำเนื้อเยื่อไปแช่ในไดออกเซน (Dioxane) เพื่อให้เนื้อเยื่อใส

#### 3.9.3 การแทรกซึมของพาราฟิน (Infiltration)

นำพาราพลาสติกใส่ขวดแก้วสำหรับการแทรกซึมของพาราพลาสติก แล้วนำมาหลอมเหลว ในตุ๋น โดยตั้งอุณหภูมิของตุ๋นไว้ที่ 60 องศาเซลเซียสจากนั้นแช่เนื้อเยื่อในพาราพลาสติกที่ หลอมเหลว โดยมีขั้นตอนดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ การใส่สารแทนที่ตัวดึงน้ำ และการแทรกซึมเนื้อเยื่อ ด้วยพาราพลาสต์เหลว

ขั้นตอน	ระยะเวลา	รายละเอียด
Dehydration	60 นาที	เติม 70% Ethanol ลงไป (ทำ 2 ซ้ำ ครั้งละ 30 นาที)
Dehydration	60 นาที	เทสารเก่าออก แล้วเติม 80% Ethanol ลงไป (ทำ 2 ซ้ำ ครั้งละ 30 นาที)
Dehydration	60 นาที	เทสารเก่าออก แล้วเติม 90% Ethanol ลงไป (ทำ 2 ซ้ำ ครั้งละ 30 นาที)
Dehydration	60 นาที	เทสารเก่าออก แล้วเติม 95% Ethanol ลงไป (ทำ 2 ซ้ำ ครั้งละ 30 นาที)
Dehydration	60 นาที	เทสารเก่าออก แล้วเติม 100% Ethanol ลงไป (ทำ 2 ซ้ำ ครั้งละ 30 นาที)
Clearing	60 นาที	เทสารเก่าออก แล้วเติม Dioxane ลงไป (ทำ 2 ซ้ำ ครั้งละ 30 นาที)
Clearing	24 ชั่วโมง	เทสารเก่าออก แล้วเติม Dioxane ลงไป
Infiltration	30 นาที	กตพาราพลาสต์เหลวจากหม้อต้ม (Dispenser) ลงในขวดตัวอย่างขวดใหม่แล้วตั้งให้เย็น เพื่อให้พาราพลาสต์แข็งตัว จากนั้นจึงเท Dioxane ในขวดเก่าออกให้เหลือพอท่วมตัวอย่าง และเทลงในขวดยี่ห้อที่มีพาราพลาสต์แข็งตัวแล้ว (โดยให้ Dioxane ยังคงท่วมตัวอย่างอยู่) ปิดฝาขวดและนำไปใส่ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
Infiltration	30 นาที	เปิดฝาขวดตัวอย่างออกและใส่กลับเข้าตู้อบเพื่อให้ Dioxane ระเหย
Infiltration	30 นาที	เทพาราพลาสต์ออก กตพาราพลาสต์เหลวใหม่ลงในขวด ใส่กลับเข้าตู้
Infiltration	30 นาที	เทพาราพลาสต์ออก กตพาราพลาสต์เหลวใหม่ลงในขวด ใส่กลับเข้าตู้

### 3.6.4 การฝังเนื้อเยื่อในพาราพลาสต์ (Embedding)

นำพาราฟิน (Leica Biosystems - Surgipath Paraplast Regular) มาหลอมในตู้อบเพื่อใช้สำหรับการฝังเนื้อเยื่อในพาราพลาสต์และนำกระทง (boat) วางบนเครื่องอุ่นสไลด์ร้อน (hot plate) แล้วเทพาราพลาสต์ที่หลอมเหลวลงในกระทงประมาณ 1 ใน 4 ส่วนของกระทง นำปากคิบบนเนื้อเยื่อวางลงบนกระทงกระดาษ ซึ่งต้องทำด้วยความรวดเร็วแล้วเทพาราพลาสต์ที่หลอมเหลวลงในกระทงให้ท่วมเนื้อเยื่อ ใช้ปากคิบบนไล่ฟองอากาศในกระทงแล้วเริ่มทำให้กระทงเย็นลงโดยนำกระทงไปแช่ในอ่างใส่น้ำเย็น พาราพลาสต์จะเริ่มแข็งตัวจากด้านล่างของกระทงขึ้นมาเรื่อย ๆ เมื่อพาราพลาสต์แข็งตัวทั่วกระทงจึงจะสามารถแกะกระทงออกจากพาราฟินได้

### 3.6.5 ตัดแต่งหน้าบล็อก (Trimming)

บล็อกที่แกะมาจากกระแทงที่ได้จากการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) นั้นจะนำมาตัดแต่งหน้าบล็อกเสียก่อนการตัดแต่งจะใช้มีดโกนหรือมีดตัดเตอร์บาง ๆ ปาดพาราฟินที่ผิวหน้าของบล็อกออกจนเริ่มถึงเนื้อเยื่อ ผิวหน้าอาจจะไม่เรียบเพราะตัดแต่งด้วยมือ จากนั้นตัดผิวด้านช่องทั้งสองของบล็อก โดยตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู ต้องระวังให้คู่ขนานของสี่เหลี่ยมขนานกัน เวลาตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางแต่ละแผ่นของเนื้อเยื่อจะติดกัน ตรงส่วนที่ขนานนี้เป็นแถบยาว (ribbon) ส่วนที่เป็นด้านเอียงของคางหมูก็นำไปให้แถบเนื้อเยื่อแผ่นบางมีรอยหยักจะได้ทราบขอบเขตของแต่ละเนื้อเยื่อว่าอยู่ระหว่างแต่ละรอยหยัก ถ้าไม่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูเวลาได้แถบเนื้อเยื่อแผ่นบางจะเป็นแผ่นยาวเสมอกันหมด

### 3.6.6 การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง (Sectioning) และติดเนื้อเยื่อแผ่นบางบนสไลด์ (Affix)

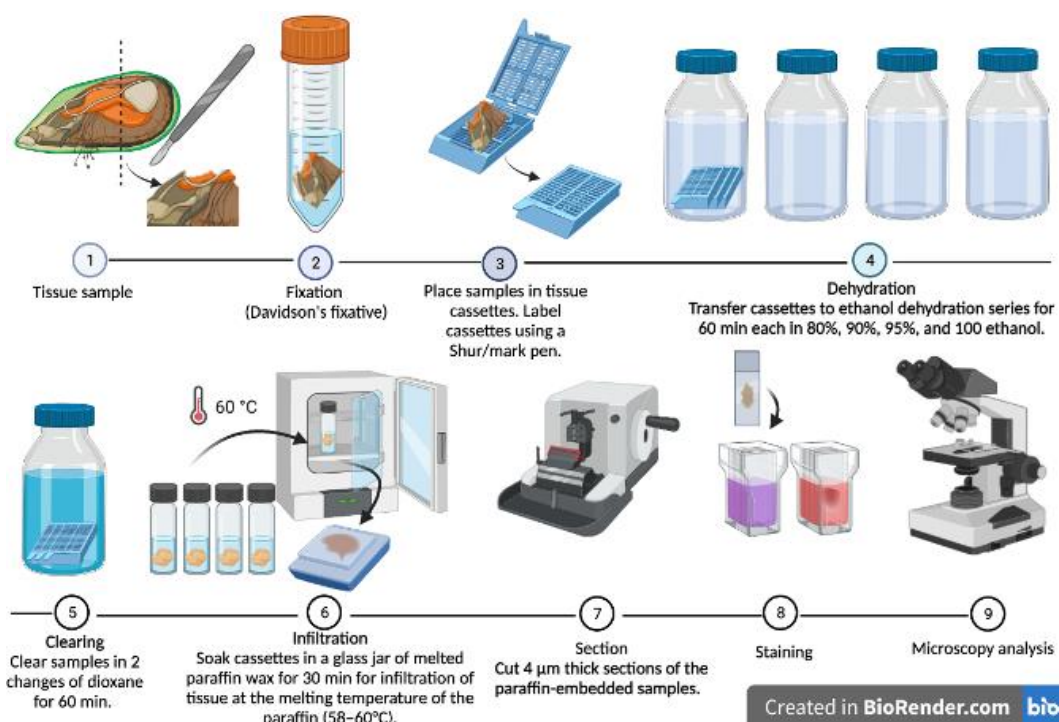
จากทำการฝังเนื้อเยื่อแล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome) ให้มีความหนา 4-5  $\mu\text{m}$  นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วติดลงบนแผ่นสไลด์โดยใช้ สารละลายเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 1 นำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางให้แห้งบนเครื่องอบสไลด์ จากนั้นนำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางบนเครื่องอุ่นสไลด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.6.7 การย้อมสี (Staining)

หลังจากได้เนื้อเยื่อแล้วย้อมสีด้วยวิธี Hematoxylin และ Eosin ซึ่งเป็นสีสำเร็จรูป (Leica Biosystems) ตามตารางที่ 5 และตรวจสอบลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงตามวิธีการของ Ika และคณะ (2016) สำหรับตัวอย่างจะมีการสังเกตตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) รุ่น Binocular Microscope DM500 (Leica )

ตารางที่ 5 ขั้นตอนการย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม Hematoxylin และ Eosin

ขั้นตอน	สารเคมี	ระยะเวลา	รายละเอียด
Deparplast	Xylene I	5 นาที	เอาพาราพลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ โดยแช่สไลด์ไว้ใน Xylene I
	Xylene II	5 นาที	ย้ายสไลด์แช่ไว้ใน Xylene II
	Xylene:100% EtOH	5 นาที	ย้ายสไลด์แช่ไว้ใน Xylene:100% EtOH
Rehydration	100% EtOH	3 นาที	เป็นขั้นตอนค่อย ๆ เอนน้ำเข้าสู่สไลด์ โดยย้ายสไลด์แช่ไว้ใน 100% EtOH
	95% EtOH	3 นาที	ย้ายสไลด์แช่ไว้ใน 95% EtOH
Rehydration	90% EtOH	3 นาที	ย้ายสไลด์แช่ไว้ใน 90% EtOH
	80% EtOH	3 นาที	ย้ายสไลด์แช่ไว้ใน 80% EtOH
	70% EtOH	3 นาที	ย้ายสไลด์แช่ไว้ใน 70% EtOH
Staining I	น้ำกลั่น	10 นาที	ย้ายสไลด์แช่ไว้ใน น้ำกลั่น
	Hematoxylin	1-3 นาที	ย้ายสไลด์แช่ไว้ในสีย้อม ซึ่งในขั้นตอนนี้ระยะเวลาสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมและอายุการใช้งานของสีย้อมและก่อนใช้สีย้อมควรกรองตะกอนก่อนเสมอ
Running water	น้ำปะปา	2 นาที	วางแผ่นสไลด์ลงในโถย้อมที่เติมน้ำปะปาจนเต็ม เปิดน้ำปะปาไหลผ่านอย่างช้า ๆ โดยต้องระวังไม่ให้น้ำ
	Xylene I	5 นาที	ปะปาโดนที่ตัวสไลด์โดยตรง ขั้นตอนนี้จะทำให้สี
	Xylene II	5 นาที	Hematoxylin ติดดียิ่งขึ้น



รูปที่ 15 กระบวนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ

### 3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การสะสมไมโครพลาสติกใน soft tissue ของหอยแมลงภูในแต่ละประเภทและความเข้มข้นต่าง ๆ จะดำเนินการโดยใช้ one-way ANOVA, ตามด้วย multiple comparison test (SPSS version 22) เลือกใช้ Tukey's HSD จะยอมรับความแตกต่างที่มีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  หากข้อมูลไม่ normality จะทำการ transformation การวิเคราะห์ค่า  $LC_{50}$  จะทำโดยใช้การวิเคราะห์โพรบิต (Probit analysis) และการวิเคราะห์ความเครียดจากออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อด้วยวิธีมิถุวิทยาในแต่ละขนาดและความเข้มข้นของไมโครพลาสติกจะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การทดสอบ multiple comparison เลือกใช้ Tukey's HSD จะยอมรับความแตกต่างที่มีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$

## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

#### 4.1 ความเป็นพิษของไมโครพลาสติกต่ออัตราการตายของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

อัตราการตายของหอยแมลงภู่ *P. viridis* ที่กรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS ที่ความเข้มข้นและขนาดต่างกัน ผลการศึกษาพบว่าอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นและเวลาในการกรองกินเพิ่มขึ้น โดยอัตราการตายในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับร้อยละ 0 ผลการศึกษาผลกระทบไมโครพลาสติกประเภท PS ขนาดเล็กพบว่า อัตราการตายครึ่งหนึ่งของประชากรที่ความเข้มข้น 66 ชิ้น/ลิตร อยู่ที่ร้อยละ 60 ในขณะที่ความเข้มข้น 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร อยู่ที่ร้อยละ 90, 93 และ 100 ตามลำดับ หลังจากหอยแมลงภู่กรองกินเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) แต่ไม่พบอัตราการตายร้อยละ 100 ในความเข้มข้นใด ๆ หลังจากหอยแมลงภู่กรองกินไมโครพลาสติกภายในเวลา 12 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 16A) หลังจากกรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS ขนาดกลาง ที่ความเข้มข้น 66 ชิ้น/ลิตร พบว่าอัตราการตายครึ่งหนึ่งของประชากรอยู่ที่ร้อยละ 53 เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นและเวลาในการกรองกินเพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 16B) เช่นเดียวกับ PS ขนาดใหญ่ ที่ความเข้มข้น 66 ชิ้น/ลิตร พบว่าอัตราการตายครึ่งหนึ่งของประชากรอยู่ที่ร้อยละ 63 เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงและพบการตายร้อยละ 100 ในทุกความเข้มข้นเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 16C)

กรณีของไมโครพลาสติกประเภท PP มีอัตราการตายที่ตอบสนองเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับขนาดความเข้มข้นและระยะเวลาในการกรองกินที่เพิ่มขึ้น จากการศึกษาพบว่าไม่มีการตายในกลุ่มควบคุมในระหว่างการทดลองความเป็นพิษของไมโครพลาสติกประเภท PP ในขนาดเล็กพบว่าอัตราการตายครึ่งหนึ่งของประชากรที่ความเข้มข้น 66 ชิ้น/ลิตรอยู่ที่ร้อยละ 67 ในขณะที่ความเข้มข้น 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร อยู่ที่ร้อยละ 77, 77 และ 87 ตามลำดับหลังจากหอยแมลงภู่กรองกินเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) และพบอัตราการตายร้อยละ 100 ในทุกความเข้มข้นหลังจากหอยแมลงภู่กรองกินไมโครพลาสติกเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 17A) สำหรับ PP ขนาดกลาง อัตราการตายครึ่งหนึ่งของประชากรอยู่ที่ร้อยละ 63 และเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นหลังจากกรองกินผ่านไป 72 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 17B) ในกลุ่มทดลองที่กรองกินไมโครพลาสติกประเภท PP ขนาดใหญ่ พบว่าอัตราการตายของหอยแมลงภู่อยู่ที่ร้อยละ 70 หลังจากกรองกินผ่านไป 72 ชั่วโมง และพบการตาย 100% ของทุกขนาดความเข้มข้นเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมงของการกรองกิน ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 17C)

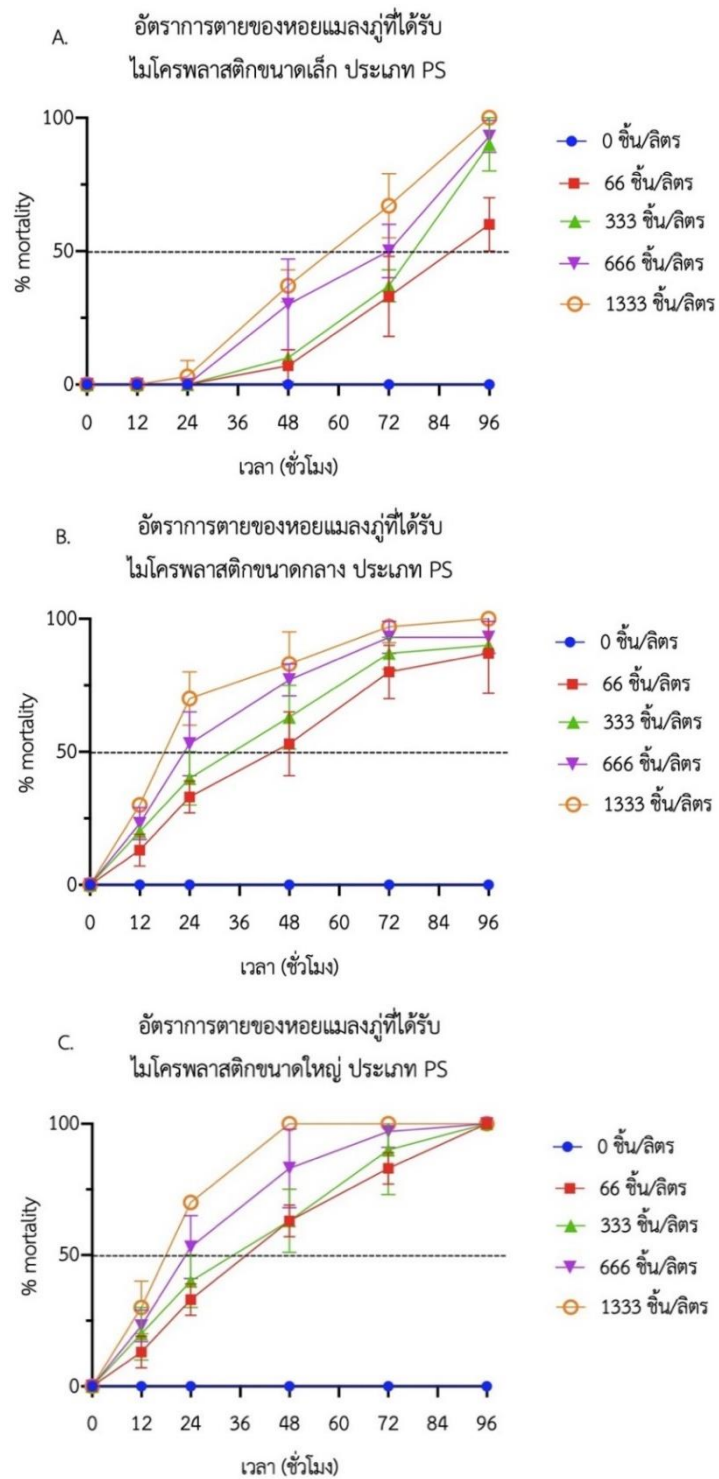
สำหรับการทดลองอัตราการตายของไมโครพลาสติกประเภท PBS ไม่พบอัตราการในกลุ่มควบคุมระหว่างการทดสอบความเป็นพิษ สำหรับ PBS ขนาดเล็ก อัตราการตายครึ่งหนึ่งของประชากรที่ความเข้มข้น 66 ขึ้น/ลิตร อยู่ที่ร้อยละ 80 ในขณะที่ความเข้มข้น 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร อยู่ที่ร้อยละ 87, 90 และ 93 ตามลำดับ หลังจากที่ย่อยแมลงภู่งรอกกินเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) แต่ไม่พบอัตราการตายร้อยละ 100 ในความเข้มข้นใด ๆ หลังจากที่ย่อยแมลงภู่งรอกกิน ไมโครพลาสติกภายในเวลา 24 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 18A)

สำหรับ PBS ขนาดกลางและขนาดใหญ่ อัตราการเสียชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 90 หลังจากสัมผัส 96 ชั่วโมง ( $p < 0.05$ ) อัตราการตายทั้งหมดสำหรับทุกขนาดความเข้มข้นพบภายในเวลา 96 ชั่วโมงของการทดลอง ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 18B และ 18C)

อัตราการตายของ PS, PP และ PBS ใน *P. viridis* ขึ้นอยู่กับขนาดของไมโครพลาสติกด้วยเช่นกัน โดยพบว่าไมโครพลาสติกประเภท PP ขนาดเล็กสามารถนำไปสู่การอัตราการตายมากกว่า PS และ PBS ขนาดเล็กเหมือนกัน ในทางตรงกันข้าม PS ทั้งขนาดกลางและขนาดใหญ่มีอัตราการตายสูงกว่า PP และ PBS ในช่วงเดียวกัน และไมโครพลาสติกขนาดใหญ่ทั้งสามประเภทพบอัตราการตายมากกว่าขนาดอื่น ๆ (ตารางที่ 6)

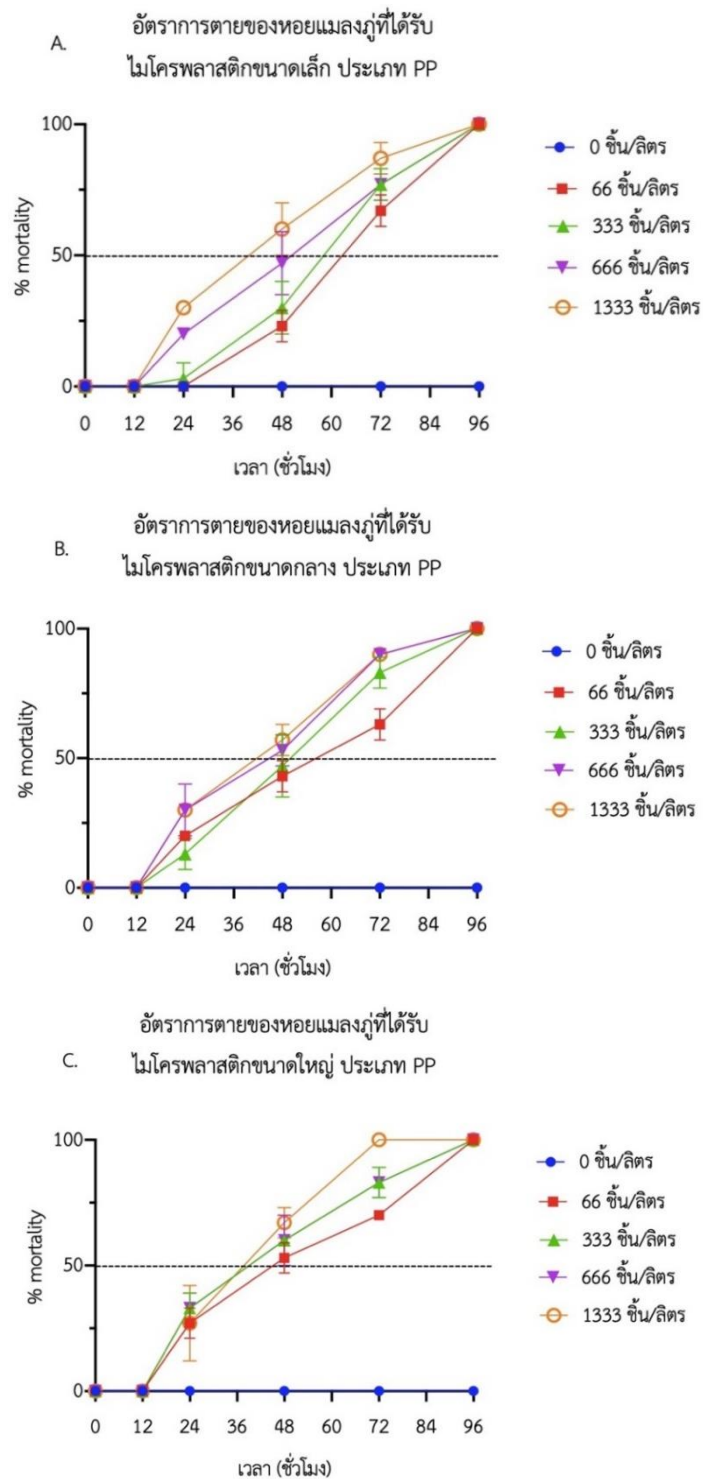
**ตารางที่ 6** อัตราการตายครึ่งหนึ่งของประชากรในไมโครพลาสติกทั้งสามประเภท

ประเภทของ ไมโครพลาสติก	ขนาดของไมโครพลาสติก		
	< 30 $\mu\text{m}$	30-300 $\mu\text{m}$	300-1000 $\mu\text{m}$
PS	96 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
PP	72 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
PBS	96 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง

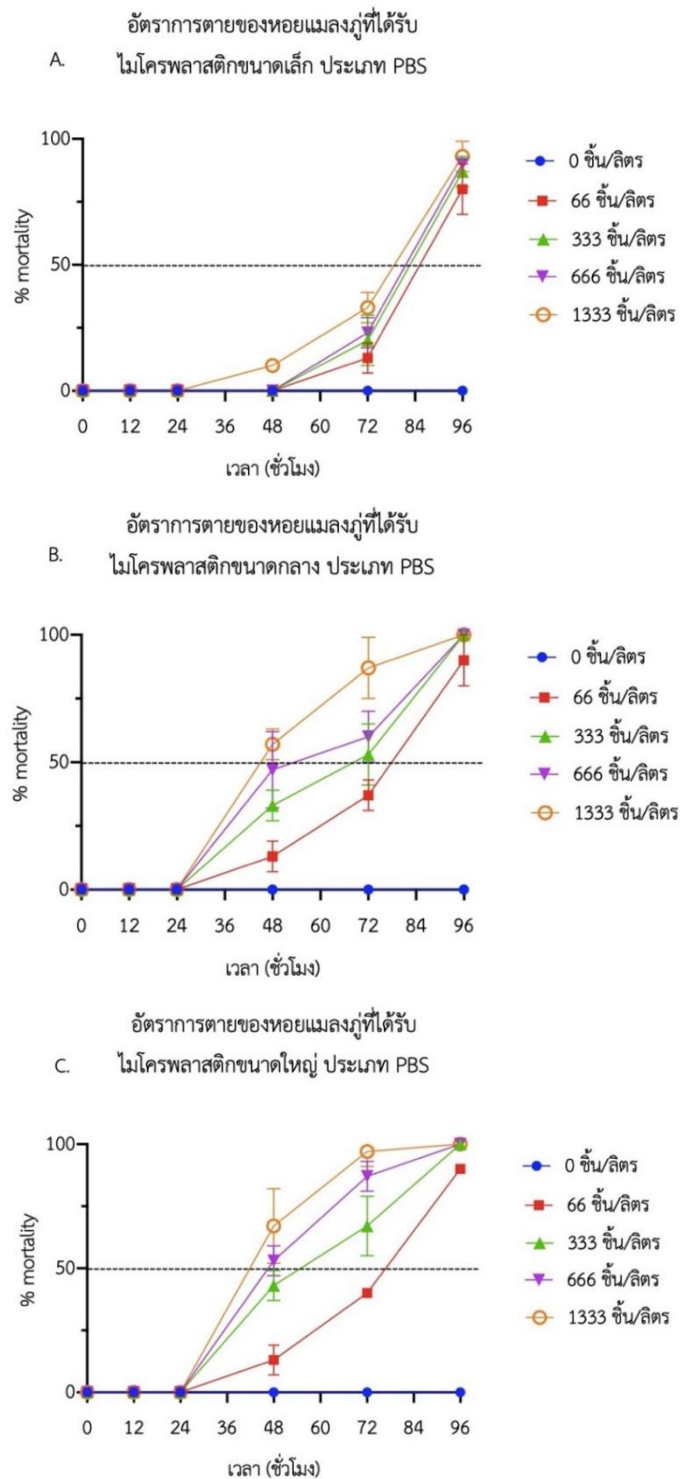


รูปที่ 16 อัตราการตายของ *P. viridis* ที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร ของ PS เมื่อเวลาครบ 96 ชั่วโมง (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่





รูปที่ 17 อัตราการตายของ *P. viridis* ที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร ของ PP เมื่อเวลาครบ 96 ชั่วโมง (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



รูปที่ 18 อัตราการตายของ *P. viridis* ที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร ของ PBS เมื่อเวลาครบ 96 ชั่วโมง (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่

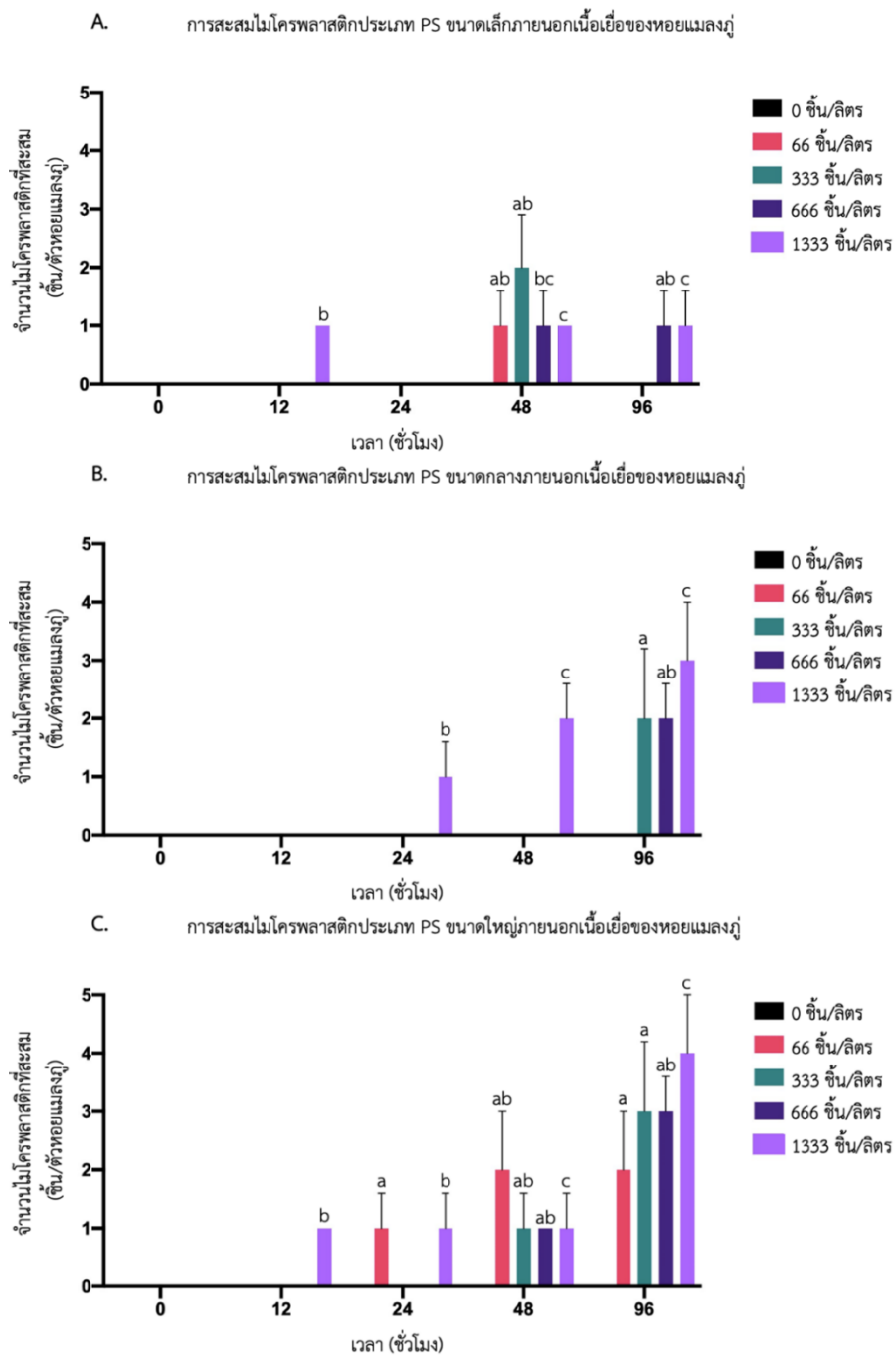
## 4.2 การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

### 4.2.1 การสะสมไมโครพลาสติกที่ภายนอก soft tissue ของหอยแมลงภู่

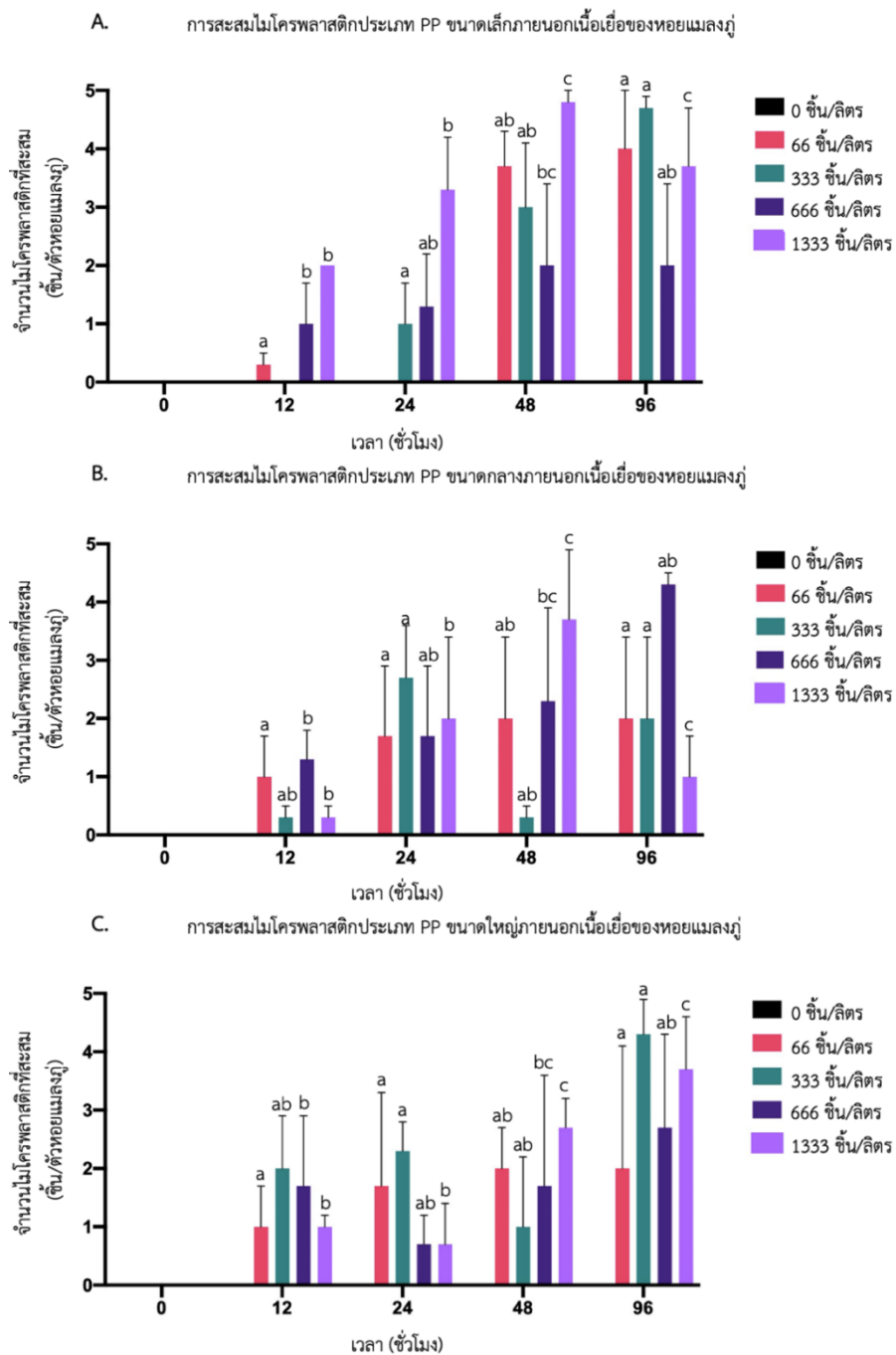
จากการชะล้างภายนอก soft tissue ของหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) ก่อนนำไปย่อยด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% เพื่อแยกการสะสมของไมโครพลาสติกที่สะสมภายในและภายนอก soft tissue พบการสะสมไมโครพลาสติกทุกประเภทที่บริเวณภายนอก soft tissue สำหรับการศึกษามิโครพลาสติกประเภท PS ที่สะสมภายนอก soft tissue ของหอยแมลงภู่เมื่อกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง ไม่พบไมโครพลาสติกสะสมภายนอก soft tissue ของหอยแมลงภู่ในกลุ่มควบคุม ในขณะที่เดียวกันพบปริมาณการสะสมที่ความเข้มข้นสูงสุดในไมโครพลาสติกขนาดเล็ก (รูปที่ 19A) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อหอยแมลงภู่กรองกินไมโครพลาสติกขนาดกลางและขนาดใหญ่ โดยในขนาดใหญ่เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมงพบว่ามี การสะสมมากที่สุด  $4 \pm 1$  ชิ้น/ตัว ทำให้ปริมาณการสะสมของไมโครพลาสติกในหอยกลุ่มควบคุมแตกต่างกับกลุ่มทดลองที่กรองกินไมโครพลาสติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tukey,  $p < 0.05$ ) (รูปที่ 19B, รูปที่ 19C) ดังแสดงตารางที่ 7

การสะสม PP ภายนอก soft tissue เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไมโครพลาสติกที่เพิ่มขึ้น (Tukey,  $p < 0.05$ ) ที่ความเข้มข้นสูงปริมาณ PP ที่สะสมภายนอก soft tissue สูงสุดของหอยแมลงภู่จะเกิดขึ้นระหว่าง 48 ถึง 96 ชั่วโมงของกรองกินสำหรับทุกขนาด ซึ่งความเข้มข้นสูงสุดพบว่ามีปริมาณการสะสมมากกว่าความเข้มข้นต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบไมโครพลาสติกสะสมภายนอก soft tissue ตัวหอยแมลงภู่ในกลุ่มควบคุม ทำให้ปริมาณการสะสมของไมโครพลาสติกในหอยกลุ่มควบคุมแตกต่างกับกลุ่มทดลองที่กรองกินไมโครพลาสติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tukey,  $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 20 ดังแสดงตารางที่ 8

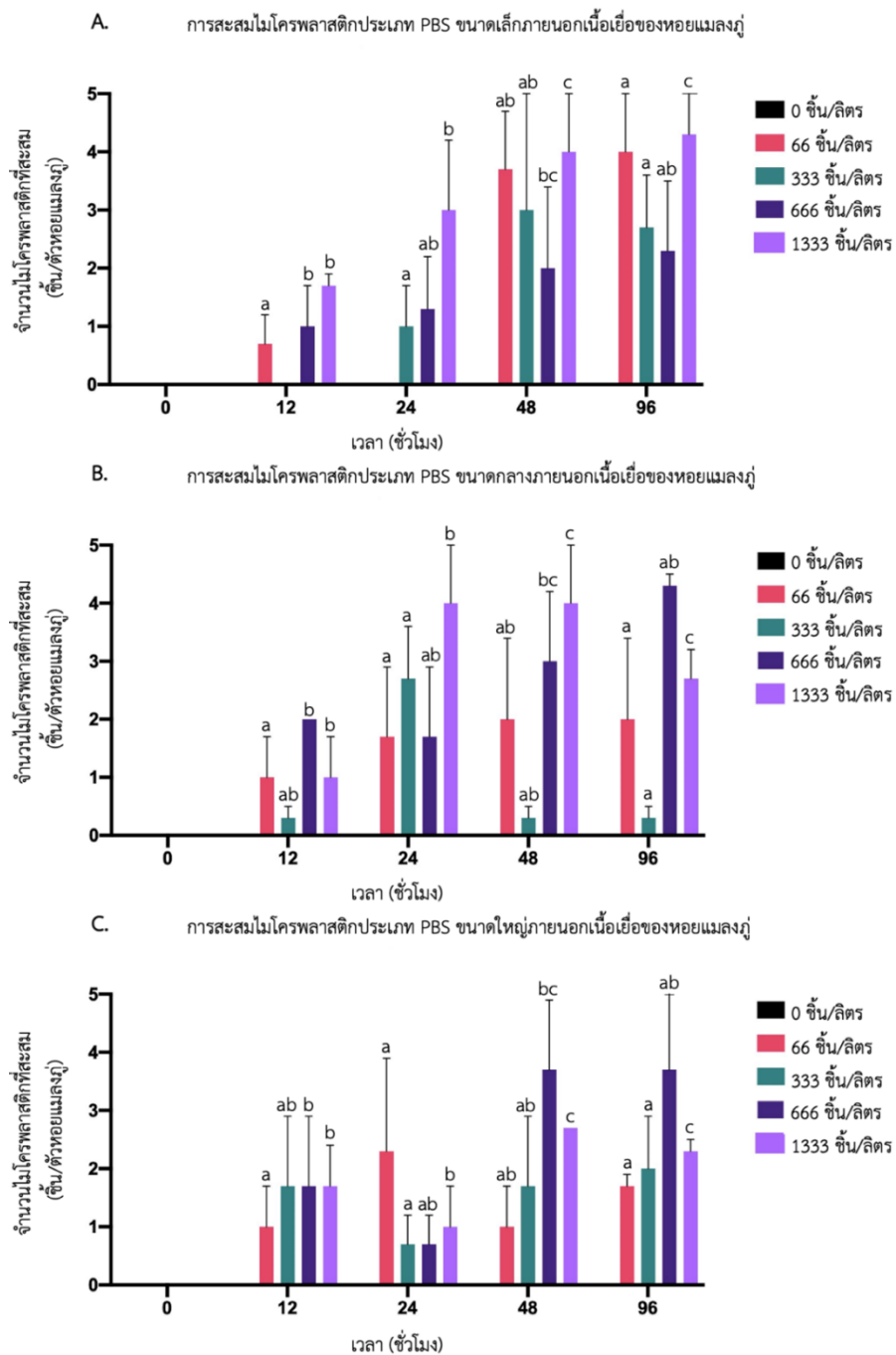
กลุ่มทดลองที่กรองกินไมโครพลาสติกประเภท PBS เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง พบว่าการสะสม PBS ที่ภายนอก soft tissue เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น (Tukey,  $p < 0.05$ ) ในขนาดเล็กที่ความเข้มข้น 1333 ชิ้น/ลิตร มีการสะสม  $4 \pm 1$  ชิ้น/ตัว ซึ่งมากกว่าความเข้มข้น 66 ชิ้น/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญเมื่อกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมงและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น (Tukey,  $p < 0.05$ ) (รูปที่ 21A) ในขณะที่ขนาดกลางความเข้มข้น 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร มีการสะสมมากสุดในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง (รูปที่ 21B) และขนาดใหญ่ความเข้มข้น 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร มีการสะสมมากสุดในช่วงเวลา 48-96 ชั่วโมง (รูปที่ 21C) และไม่พบไมโครพลาสติกสะสมภายนอก soft tissue ของหอยแมลงภู่ในกลุ่มควบคุม ทำให้ปริมาณการสะสมของ ไมโครพลาสติกในหอยกลุ่มควบคุมแตกต่างกับกลุ่มทดลองที่กรองกินไมโครพลาสติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tukey,  $p < 0.05$ ) ดังแสดงตารางที่ 9



รูปที่ 19 การสะสมของ PS ภายนอก soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



รูปที่ 20 การสะสมของ PP ภายนอก soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



รูปที่ 21 การสะสมของ PBS ภายนอก soft tissue เมื่อกรอกกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่

#### 4.2.2 การสะสมไมโครพลาสติกที่ภายใน soft tissue ของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

สามารถตรวจพบไมโครพลาสติกทุกประเภทในเหงือกและต่อมย่อยอาหาร โดยสำหรับกลุ่มที่กรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS พบว่า ไมโครพลาสติกมีการสะสมภายใน soft tissue ของหอยแมลงภู่เมื่อกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง และพบไมโครพลาสติกเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไมโครพลาสติก กลุ่มทดลองที่กรองกิน PS ขนาดเล็กที่ความเข้มข้นสูงสุด (1333 ชิ้น/ลิตร) พบการสะสมมากที่สุดที่  $24 \pm 1$  ชิ้น/ตัว ซึ่งมีการสะสมแตกต่างมากกว่าความเข้มข้นต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญ (66 ชิ้น/ลิตร) (Tukey,  $p < 0.05$ ) (รูปที่ 22A) ในทำนองเดียวกัน หอยแมลงภู่ที่กรองกิน PS ขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นสูงพบการสะสมมากกว่าหอยที่กรองกิน PS ความเข้มข้นต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญ (Tukey,  $p < 0.05$ ) (รูปที่ 22B, รูปที่ 22C) ในขณะที่การสะสม PS ที่บริเวณเหงือกของหอยหลังจากกรองกิน PS ทุกขนาดพบว่ามีการสะสมมากที่สุดอยู่ที่  $1 \pm 0.6$  ชิ้น/ตัว โดยขนาดเล็กพบการสะสมมากสุดในความเข้มข้นต่ำสุด (รูปที่ 23A) ซึ่งแตกต่างจากขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่พบการสะสม PS ในเหงือกของหอยแมลงภู่ที่กรองกินความเข้มข้น 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร มากสุด (รูปที่ 23B, รูปที่ 23C) และไม่พบการสะสม PS ที่เหงือกของกลุ่มควบคุม การแบ่งสัดส่วนของการสะสม PS ภายใน soft tissue และเหงือกของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PS ทุกขนาดพบว่า PS ที่กรองกินเข้าไปมากกว่าครึ่งหนึ่งของการสะสมพบภายใน soft tissue ในขณะที่ในเหงือกพบน้อยกว่าร้อยละ 10 ดังแสดงตารางที่ 7

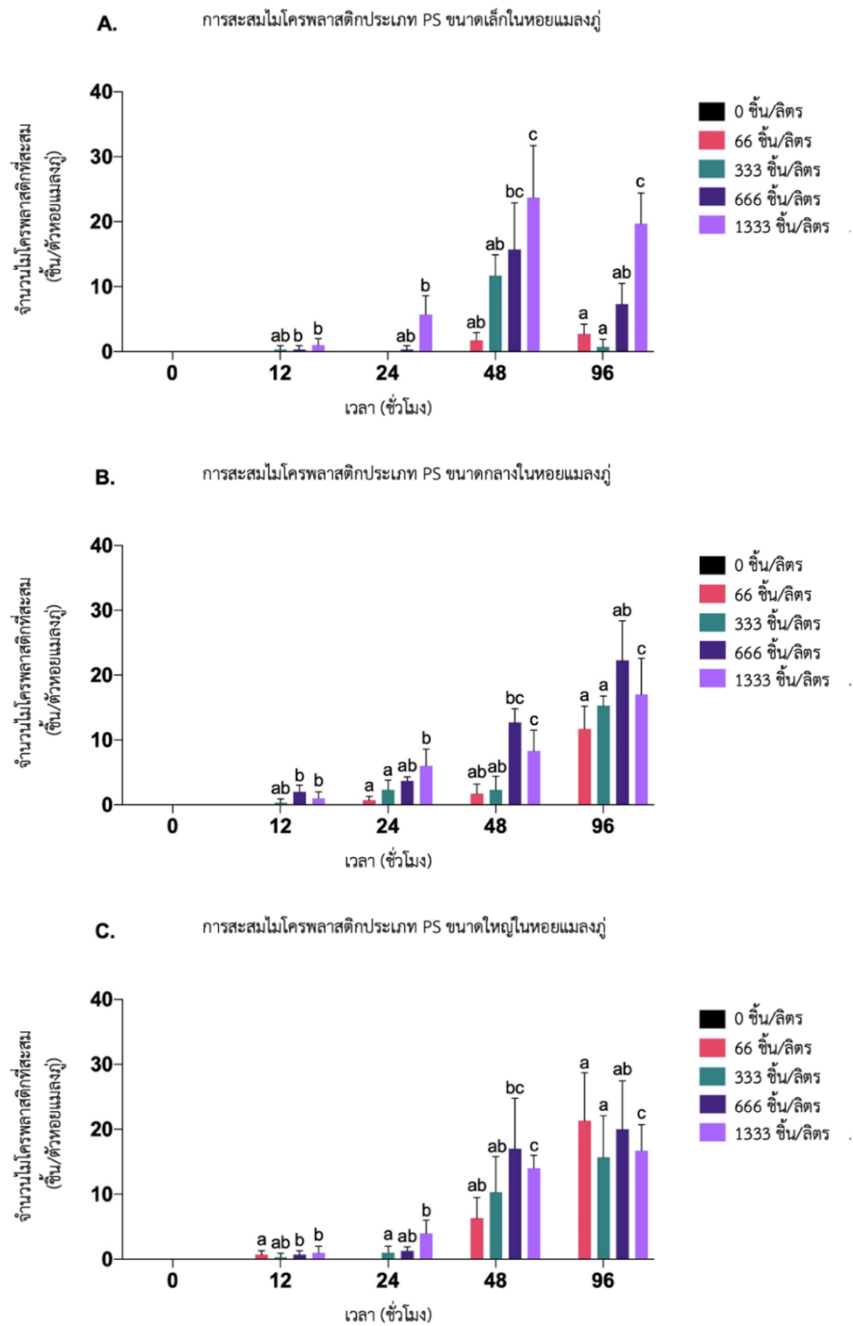
การสะสม PP ภายใน soft tissue ของหอยแมลงภู่มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไมโครพลาสติกประเภท PP ที่เพิ่มขึ้น (Tukey,  $p < 0.05$ ) ที่ความเข้มข้นสูงสุด ปริมาณ PP ที่สะสมภายใน soft tissue สูงสุดจะเกิดขึ้นระหว่าง 48 ถึง 96 ชั่วโมงของการกรองกิน สำหรับทุกขนาดความเข้มข้นสูงจะมีการสะสม PP ได้มากกว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญหลังจากกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง (Tukey,  $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 24 ในขณะที่การสะสม PP ที่บริเวณเหงือกของหอยหลังจากกรองกินทุกขนาดพบการสะสมมากที่สุดอยู่ที่  $1 \pm 0.6$  ชิ้น/ตัว โดยที่ในขนาดเล็กพบการสะสมการกรองกินตั้งแต่ 12- 96 ชั่วโมง แตกต่างจากขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่พบการสะสมบางช่วงเวลาของการกรองกินและไม่พบการสะสม PP ที่เหงือกของกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 25 การแบ่งสัดส่วนของการสะสม PP ภายใน soft tissue และเหงือกของหอยแมลงภู่มีความแตกต่างกันอย่างมาก สำหรับ PP ทุกขนาดที่หอยแมลงภู่กรองกินเข้าไปมากกว่าร้อยละ 90 จะสะสมภายใน soft tissue ในขณะที่ในเหงือกพบน้อยกว่าร้อยละ 5 ดังแสดงตารางที่ 8

ในกลุ่มที่กรองกิน PBS หลังจากผ่านไป 96 ชั่วโมง การสะสม PBS ทั้งหมดในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (Tukey,  $p < 0.05$ ) มีการสะสมที่คล้ายกับในการทดลอง PS และ PP สำหรับทุกขนาด ความเข้มข้นสูงจะสะสมไว้มากกว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

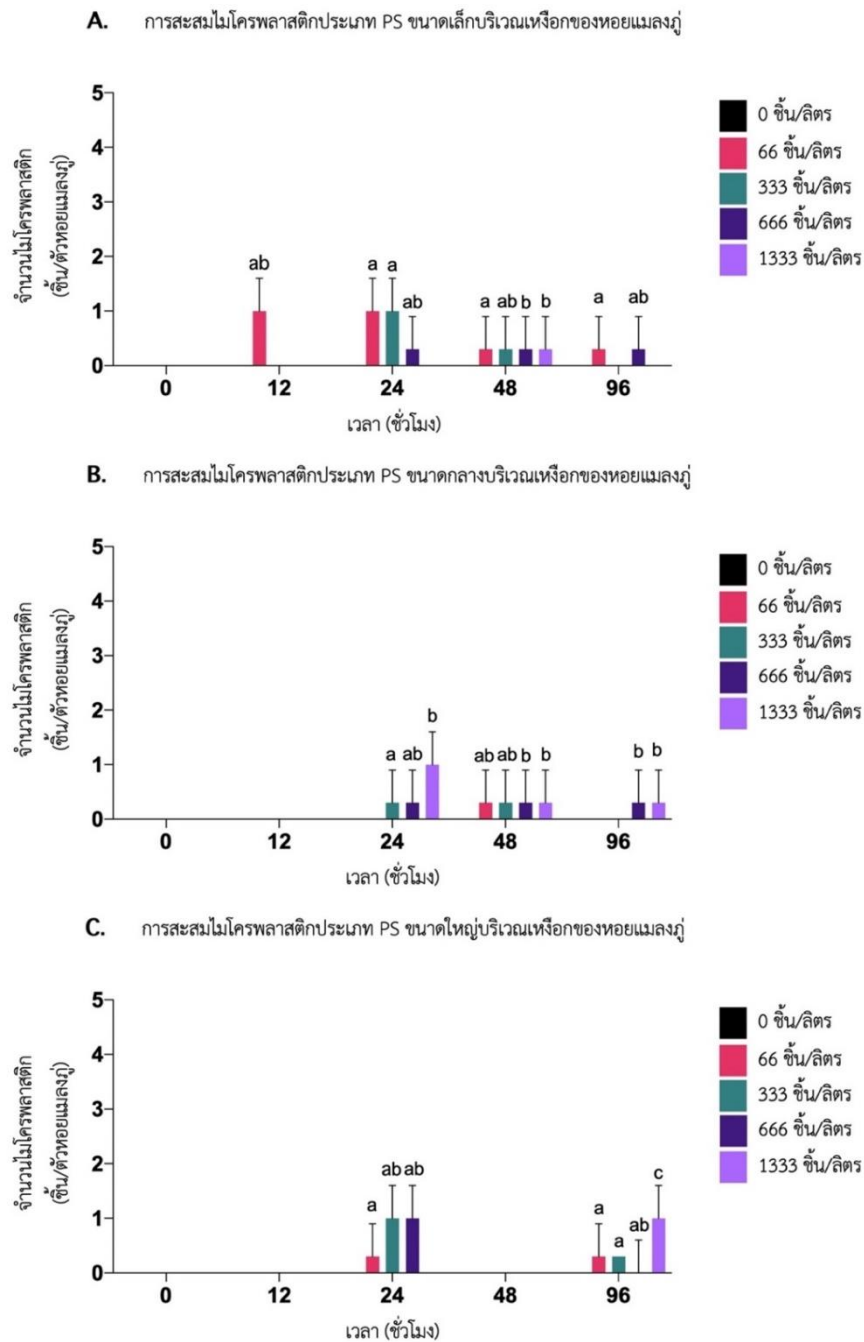
หลังจากการกรองกินครบ 96 ชั่วโมง (Tukey,  $p < 0.05$ ) (รูปที่ 26) ในขณะที่การสะสม PBS ที่บริเวณ  
เหงือกของหอยหลังจากกรองกินทุกขนาดพบการสะสมมากที่สุดอยู่ที่  $1 \pm 0.6$  ชิ้น/ตัว ซึ่งพบการสะสม  
บางช่วงเวลาของการกรองกินและไม่พบการสะสม PBS ที่เหงือกของกลุ่มควบคุม (รูปที่ 27) การแบ่ง  
สัดส่วนของการสะสม PBS ภายใน soft tissue และเหงือกของหอยแมลงภู่มี่มีความแตกต่างกันอย่าง  
มาก สำหรับ PBS ทุกขนาดที่หอยแมลงภู่มี่กรองกินเข้าไปมากกว่าร้อยละ 90 จะสะสมภายใน soft  
tissue ในขณะที่ในเหงือกพบน้อยกว่าร้อยละ 5 ดังแสดงตารางที่ 9



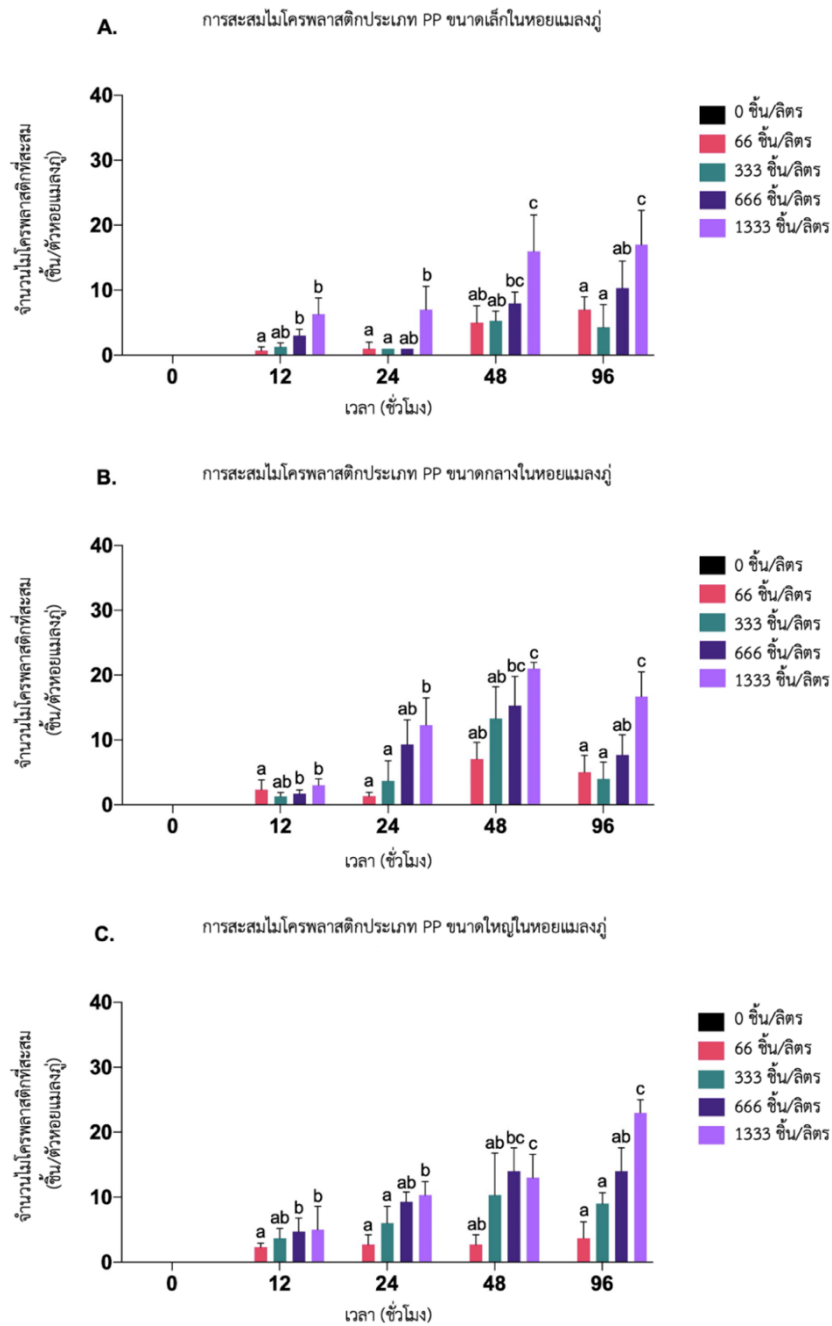




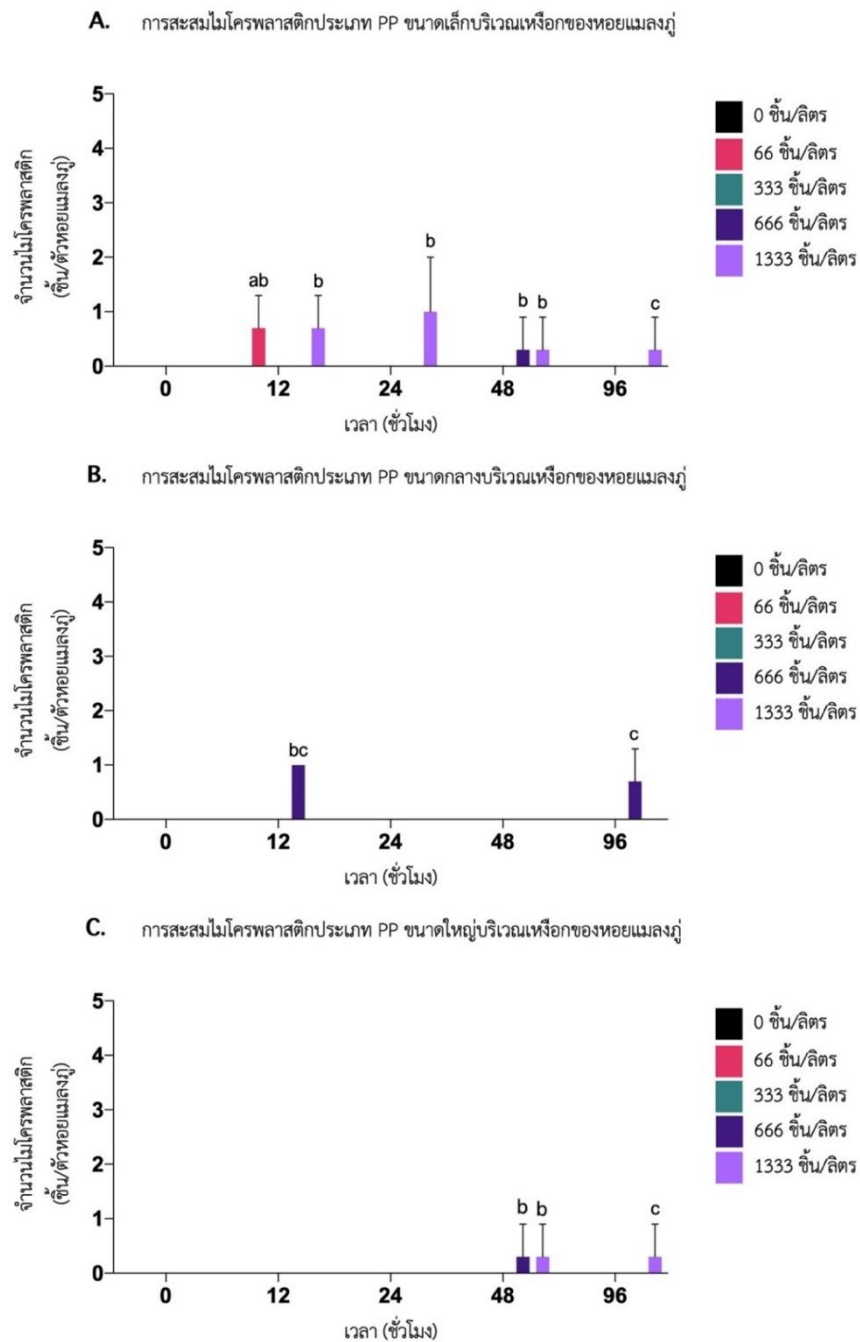
รูปที่ 22 การสะสมของ PS ภายใน soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



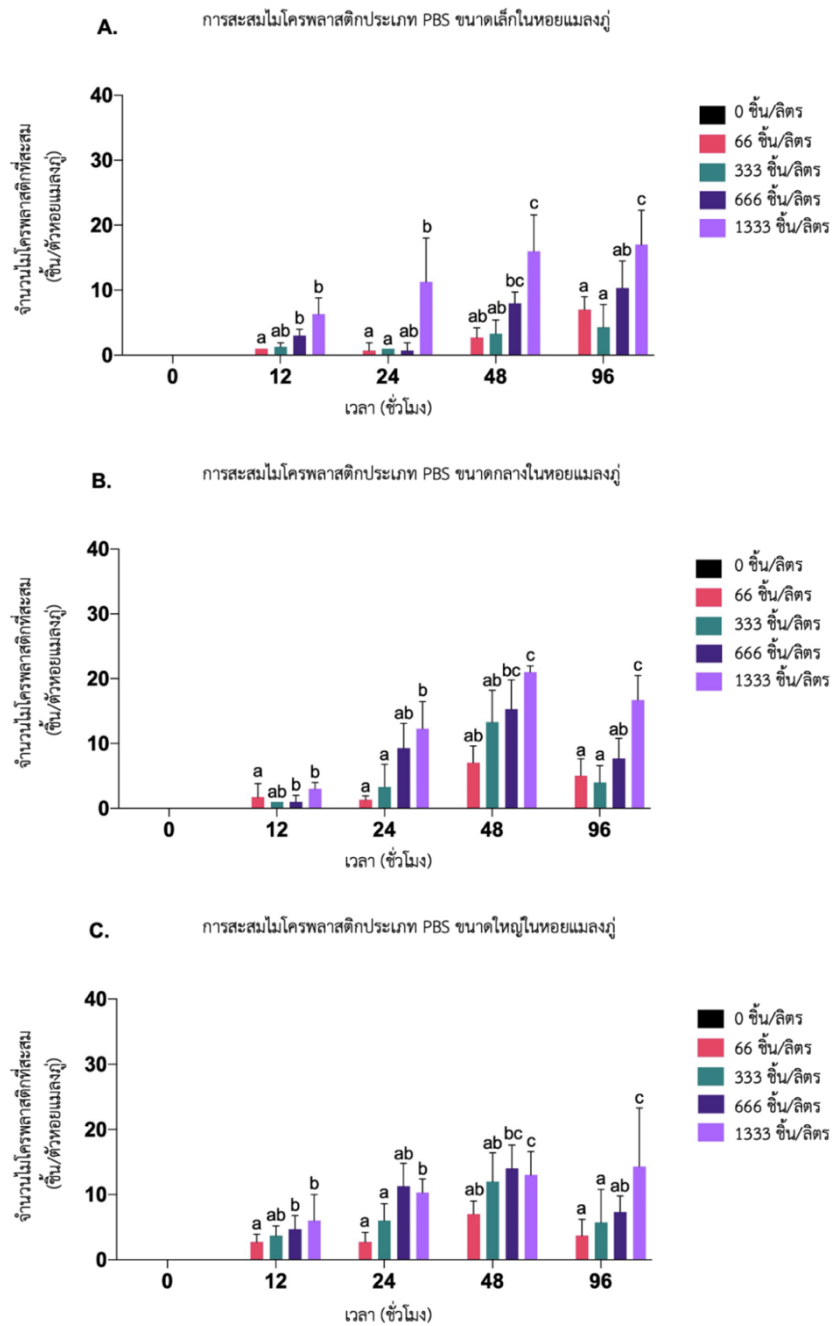
รูปที่ 23 การสะสมของ PS ภายในเหงือกของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



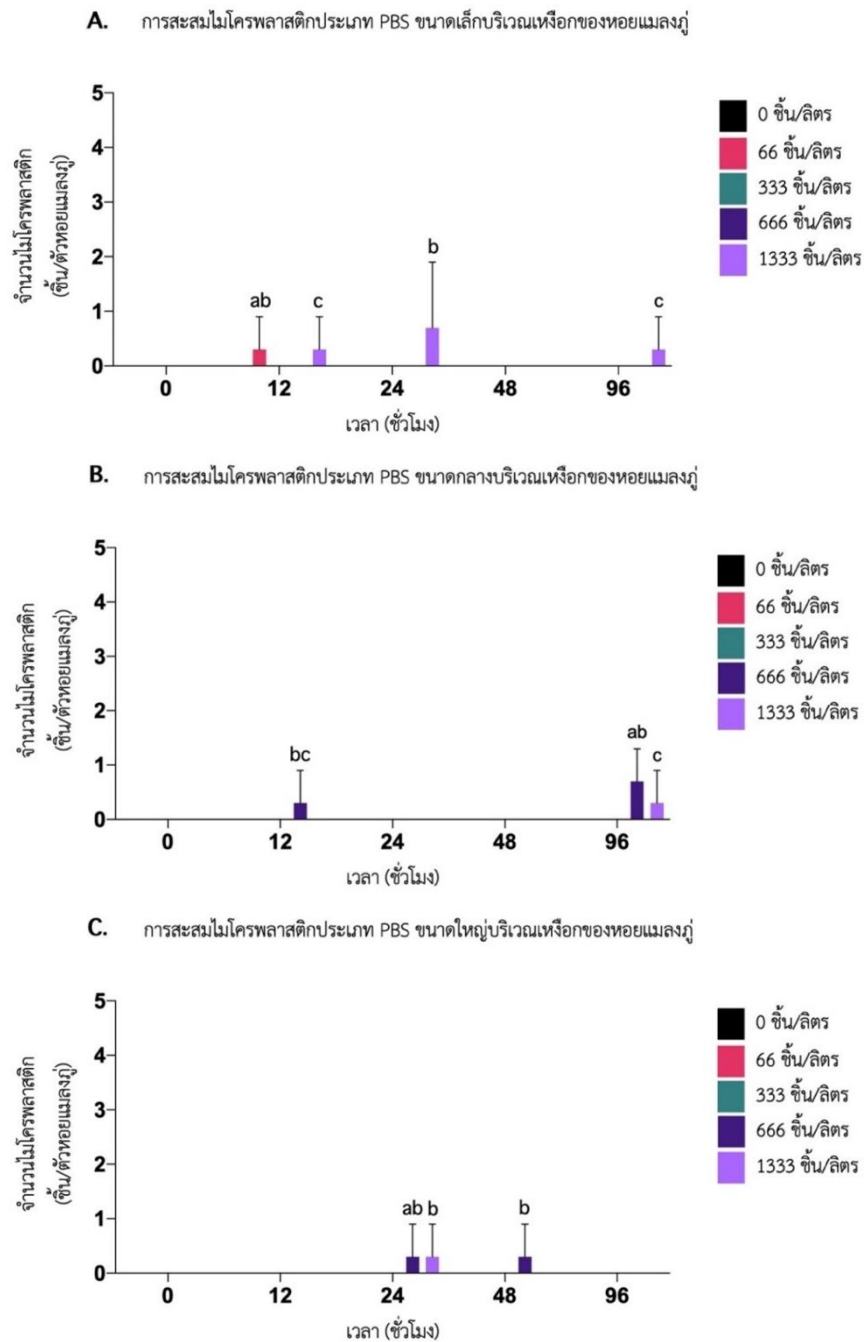
รูปที่ 24 การสะสมของ PP ภายใน soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



รูปที่ 25 การสะสมของ PP ภายในเหงือกของหอยเมื่อกรงกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



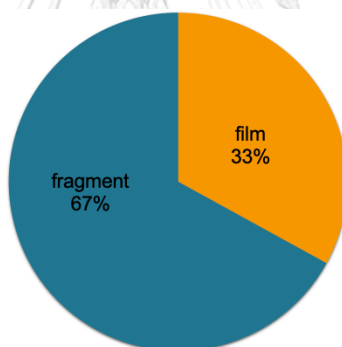
รูปที่ 26 การสะสมของ PBS ภายใน soft tissue เมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



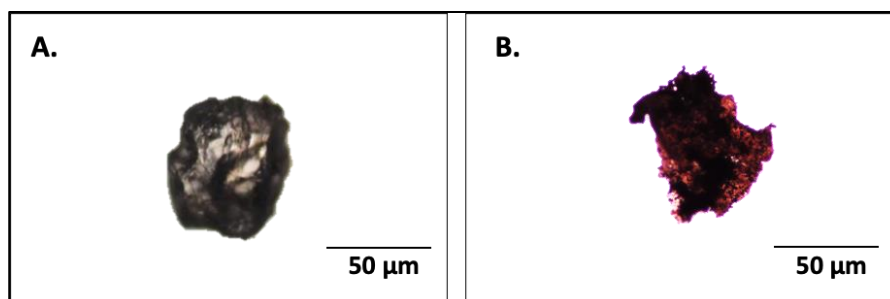
รูปที่ 27 การสะสมของ PBS ภายในเหงือกของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่

#### 4.2.3 รูปร่างและขนาดของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

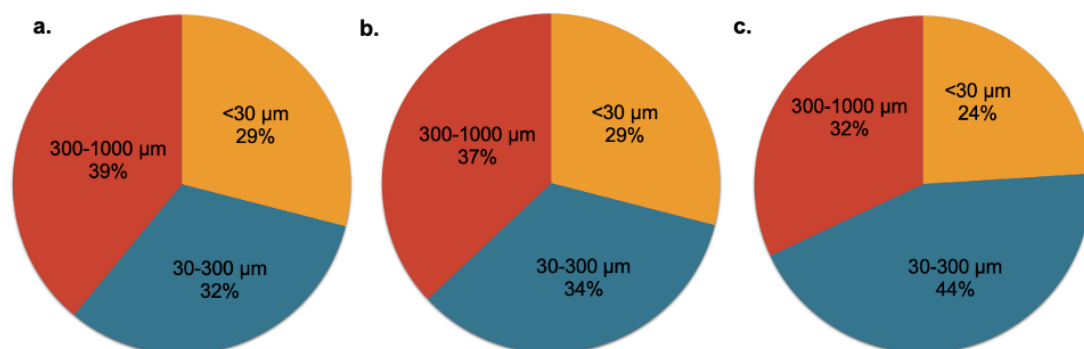
ในการศึกษาครั้งนี้รูปร่างของไมโครพลาสติกจำลองที่ได้มีรูปร่างอยู่ 2 แบบคือแบบ fragment ซึ่งจะพบในไมโครพลาสติกประเภท PS และ PBS ในขณะที่รูปร่างแบบ film จะพบในไมโครพลาสติกประเภท PP (รูปที่ 28) โดยจากผลข้อ 4.2.2 จะพบว่าในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่สามารถสะสมไมโครพลาสติกได้ทั้ง 2 รูปร่าง โดยรูปร่างของไมโครพลาสติกมีผลต่อการรอกินของหอยแมลงภู่โดยพบว่าพลาสติกส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบ fragment (รูปที่ 29A) คิดเป็นร้อยละ 67 ของเนื้อเยื่ออ่อน (แบ่งเป็นประเภท PS ร้อยละ 31 และประเภท PBS ร้อยละ 36) ในขณะที่รูปร่างแบบ film (รูปที่ 29B) มีการสะสมที่ร้อยละ 33 ในขณะที่ขนาดของไมโครพลาสติกที่สะสมในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่พบว่าขนาดใหญ่ของประเภท PS และ PP (รูปที่ 30A, รูปที่ 30B) มีการสะสมมากที่สุดแตกต่างจากไมโครพลาสติกประเภท PBS ที่พบว่าขนาดกลางมีการสะสมมากที่สุดถึงร้อยละ 44 (รูปที่ 30C)



รูปที่ 28 ร้อยละของรูปร่างไมโครพลาสติกที่สะสมในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)



รูปที่ 29 รูปร่างของไมโครพลาสติกที่สะสมในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) (A) fragment (B) film (scale bar=50 µm)

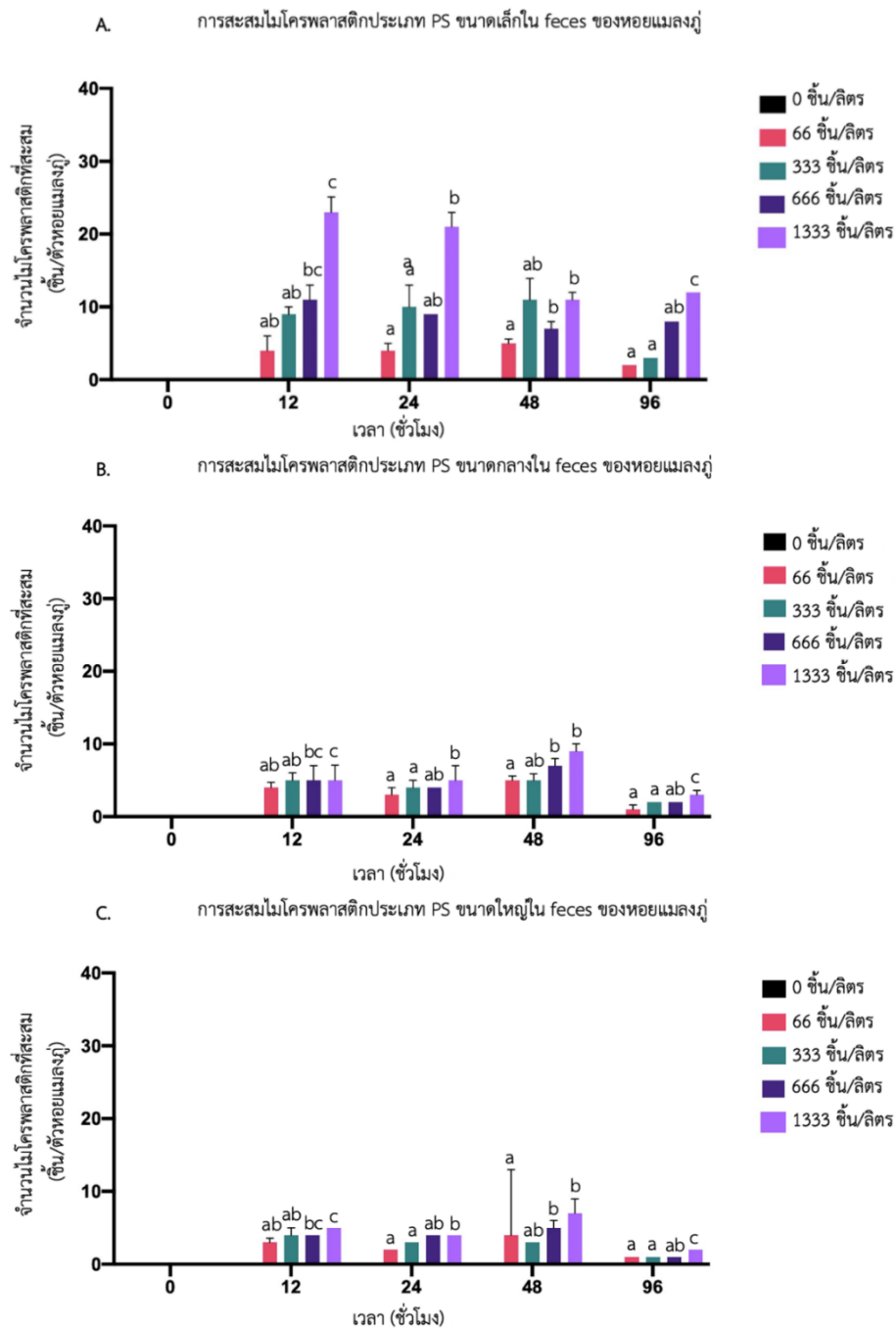


รูปที่ 30 ร้อยละของแต่ละขนาดของไมโครพลาสติกที่สะสมในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) (a) ไมโครพลาสติกประเภท PS (b) ไมโครพลาสติกประเภท PP (c) ไมโครพลาสติกประเภท PBS

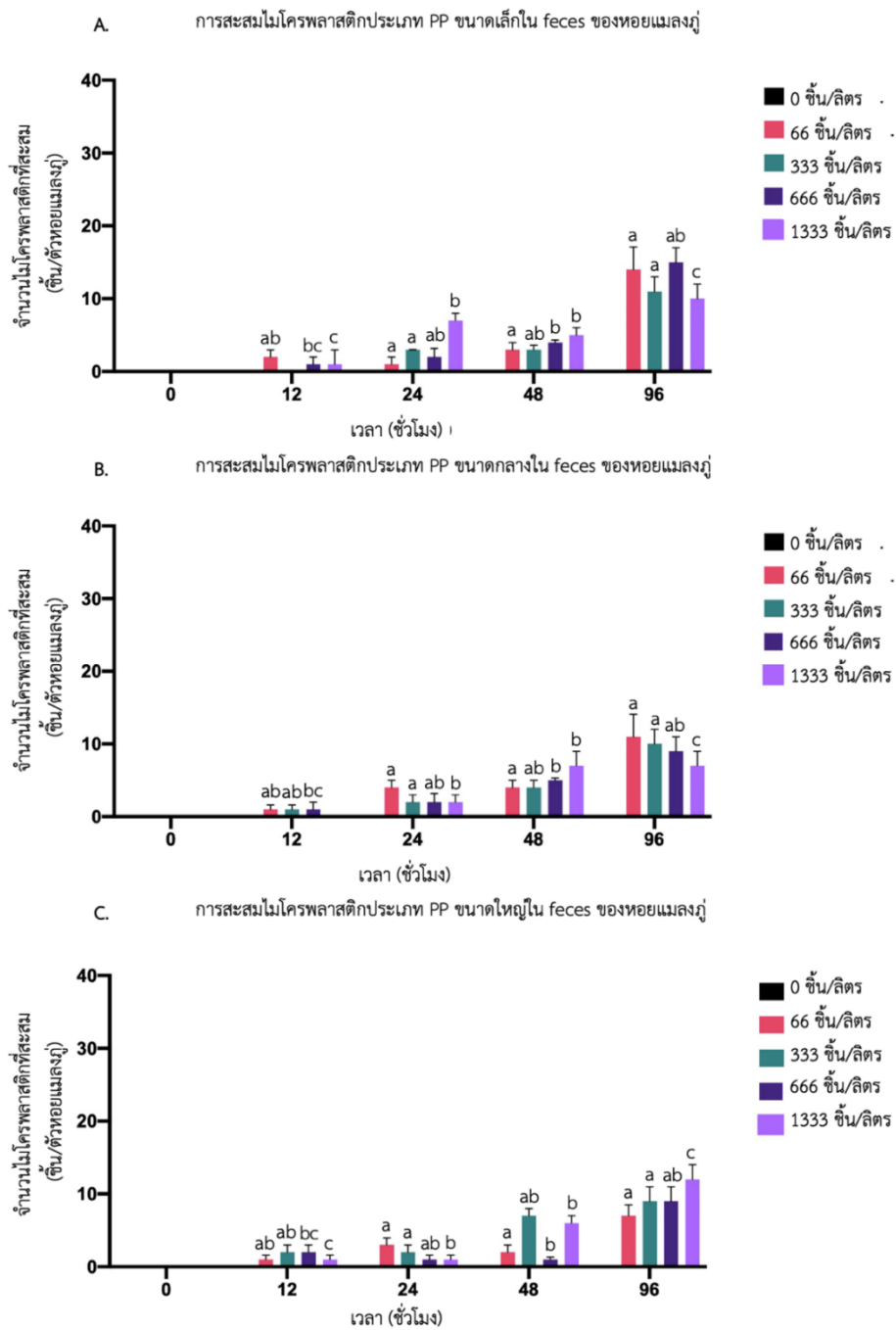
#### 4.2.4 ไมโครพลาสติกใน feces ของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

พบไมโครพลาสติกขนาดเล็กทั้ง 3 ประเภท ใน feces มากกว่าขนาดกลางและขนาดใหญ่ โดยเฉพาะในช่วงเวลา 12-24 ชั่วโมงแรกของการกรองกิน ซึ่งพบว่าหอยแมลงภู่ที่กรองกินไมโครพลาสติกความเข้มข้นสูงสุดมีการสะสมไมโครพลาสติกใน feces มากกว่าความเข้มข้นต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญ (Tukey,  $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูป 31, 32 และ 33

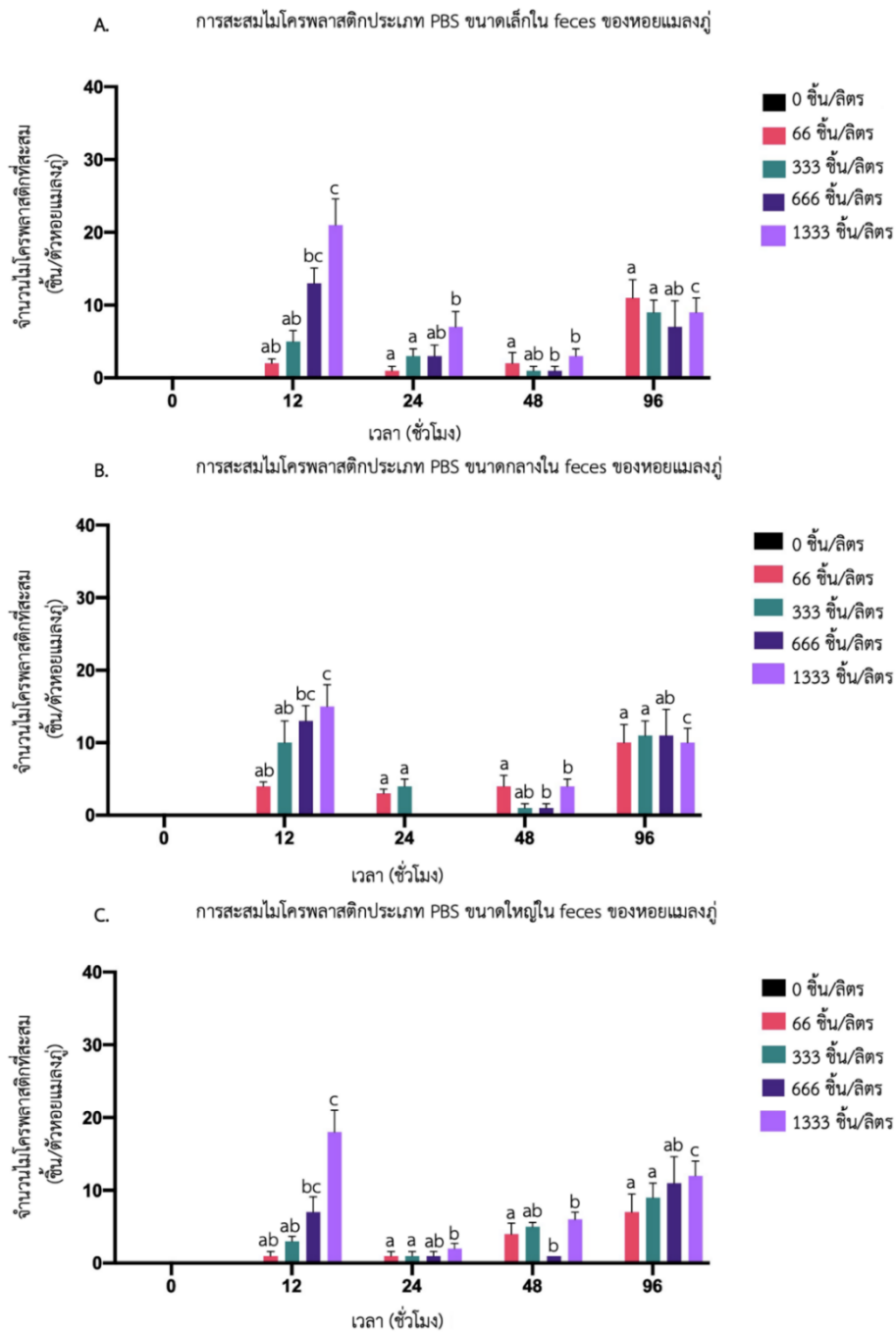




รูปที่ 31 การสะสมของ PS ใน feces ของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



รูปที่ 32 การสะสมของ PP ใน feces ของหอยเมื่อรอกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



รูปที่ 33 การสะสมของ PBS ใน feces ของหอยเมื่อกรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , Tukey (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่

ตารางที่ 7 การสะสมไมโครพลาสติกประเภท PS ในหอยแมลงภู่และใน feces

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	ภายนอก เหงือก	ภายใน เหงือก	ภายนอก ST	ภายใน ST	feces	
12		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	
	<30	66	N.D.	0.3±0.5	N.D.	N.D.	N.D.	4
		333	N.D.	N.D.	N.D.	0.3±0.5	N.D.	9
		666	N.D.	N.D.	N.D.	0.3±0.5	N.D.	11
		1333	N.D.	N.D.	1±0.5	1±1	N.D.	23
		66	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4
	30-300	333	N.D.	N.D.	N.D.	0.3±0.5	N.D.	5
		666	N.D.	N.D.	N.D.	2±1	N.D.	5
		1333	N.D.	N.D.	N.D.	1±1	N.D.	5
		66	N.D.	N.D.	N.D.	1±0.5	N.D.	3
	300-1000	333	N.D.	N.D.	N.D.	0.3±0.5	N.D.	4
		666	N.D.	N.D.	N.D.	1±0.5	N.D.	4
		1333	0.3±0.5	N.D.	1±0.5	1±1	N.D.	5
		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0
	24		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0
		<30	66	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
333			0.3±0.5	0.3±0.5	N.D.	N.D.	N.D.	10
666			N.D.	1±0.5	N.D.	0.3±0.5	N.D.	9
1333			N.D.	0.3±0.5	0.3±0.5	6±2.9	N.D.	21
30-300		66	N.D.	N.D.	N.D.	1±0.5	N.D.	3
		333	N.D.	N.D.	N.D.	2±1.5	N.D.	4
		666	N.D.	0.3±0.5	0.3±0.5	4±0.5	N.D.	4
		1333	N.D.	0.3±0.5	1±0.5	6±2.6	N.D.	5
300-1000		66	1±0.5	1±0.5	N.D.	N.D.	N.D.	2
		333	N.D.	0.3±0.5	N.D.	1±1	N.D.	3
		666	0.3±0.5	1±0.5	N.D.	1±0.5	N.D.	4
		1333	1±0.5	1±0.5	0.3±0.5	4±2	N.D.	4

ตารางที่ 7 การสะสมไมโครพลาสติกประเภท PS ในทอยแมลงภูและใน feces (ต่อ)

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	ภายนอก เหงือก	ภายใน เหงือก	ภายนอก ST	ภายใน ST	Feces/ tank	
48		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	
	<30	66	1±1	0.3±0.5	N.D.	2±1.5	5	
		333	1±0	0.3±0.5	1±0.5	12±3.2	11	
		666	1±0	0.3±0.5	N.D.	16±7.2	7	
		1333	1±0.5	0.3±0.5	N.D.	24±8	11	
	30-300	66	N.D.	0.3±0.5	N.D.	2±1.5	5	
		333	0.3±0.5	0.3±0.5	N.D.	2±2	5	
		666	N.D.	0.3±0.5	N.D.	13±2	7	
		1333	N.D.	0.3±0.5	1±1	8±3.2	9	
	300-1000	66	0.3±0.5	0.3±0.5	1±1.5	6±3.2	4	
		333	0.3±0.5	N.D.	1±0.5	10±5.5	3	
		666	1±0.5	N.D.	0.3±0.5	17±7.8	5	
		1333	1±0.5	N.D.	0.3±0.5	14±2	7	
	96		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0
		<30	66	0.3±0.5	N.D.	N.D.	3±1.5	2
			333	N.D.	0.3±0.5	0±0	1±1.2	3
666			N.D.	N.D.	1±1.1	7±3	8	
1333			0.3±0.5	0.3±0.5	1±1	20±4.7	12	
30-300		66	N.D.	N.D.	N.D.	12±3.5	1	
		333	1±0.5	N.D.	N.D.	15±1.5	2	
		666	1±0.5	N.D.	1±1	22±6.1	2	
		1333	1±0.5	0.3±0.5	2±2	17±5.6	3	
300-1000		66	1±0	0.3±0.5	1±0.5	21±7.4	1	
		333	2±0.7	0.3±0.5	2±1.5	16±6.4	1	
		666	1±0	N.D.	2±1.5	20±7.5	1	
		1333	1±0.5	0.3±0.5	5±3	17±4.04	2	

ตารางที่ 8 การสะสมไมโครพลาสติกประเภท PP ในหอยแมลงภู่และใน feces

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	ภายนอก เหงือก	ภายใน เหงือก	ภายนอก ST	ภายใน ST	Feces/ tank	
12		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	
	<30	66	0.3±0.5	0.7±0.6	N.D.	0.7±0.6	2	
		333	N.D.	N.D.	N.D.	1.3±0.6	0	
		666	N.D.	N.D.	1±0	3±1	0	
		1333	1±1	0.7±0.6	1±0	6±2.5	1	
		66	N.D.	N.D.	1±0	2.3±1.5	1	
	30-300	333	N.D.	N.D.	0±0	1.3±0.6	1	
		666	0.3±0.5	1±0	1±1	2±0.6	1	
		1333	N.D.	N.D.	N.D.	3±1	0	
		66	N.D.	N.D.	1±0	2±0.6	1	
	300-1000	333	0.3±0.5	N.D.	2±1	3.7±1.5	2	
		666	0±0	N.D.	2±1	5±2.1	2	
		1333	0.3±0.5	N.D.	1±1	5±3.6	1	
		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	
	24	<30	66	N.D.	N.D.	N.D.	1±1	1
			333	N.D.	N.D.	1±1	1±0	3
666			N.D.	N.D.	1±1	1±0	3	
1333			1±1.7	1±1	2.3±1	7±3.6	7	
30-300		66	N.D.	N.D.	1.7±2	1±0.6	4	
		333	0.7±1.2	N.D.	2±1	4±3.1	2	
		666	N.D.	N.D.	1.7±1	9±3.8	2	
		1333	N.D.	N.D.	2±1	12±4.2	2	
300-1000		66	N.D.	N.D.	2±2	2.7±1.5	3	
		333	N.D.	N.D.	1±1	6±2.6	2	
		666	N.D.	N.D.	1±1	9±1.5	1	
		1333	N.D.	N.D.	1±1	10±2.1	1	

ตารางที่ 8 การสะสมไมโครพลาสติกประเภท PP ในทอยแมลงภู่งูและใน feces (ต่อ)

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	ภายนอก เหงือก	ภายใน เหงือก	ภายนอก ST	ภายใน ST	Feces/tank	
48		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	
	<30	66	N.D.	N.D.	4±1	5±2.6	3	
		333	N.D.	N.D.	3±1	5±1.5	3	
		666	N.D.	N.D.	2±3	8±1.7	4	
		1333	1±1.7	0.3±0.6	4±1	16±5.6	5	
		66	N.D.	N.D.	2±1	7±2.6	4	
	30-300	333	N.D.	N.D.	0±0	13±4.9	4	
		666	N.D.	N.D.	2±3	15±4.5	5	
		1333	0.7±1.2	N.D.	3±4	21±1.0	7	
		66	N.D.	0±0	1±1	3±1.5	2	
	300-1000	333	N.D.	0±0	2±1	10±6.5	7	
		666	N.D.	0.3±0.6	2.7±2	14±3.6	1	
		1333	1±1.7	0.3±0.6	1.3±1	13±3.6	6	
		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0
	96	<30	66	N.D.	N.D.	4±1	7±2	14
			333	0.7±1.2	N.D.	5±4	4±3.5	11
666			N.D.	N.D.	2±3	10±4.2	15	
1333			0.7±1.2	0.3±0.6	3±1	17±5.3	10	
30-300		66	N.D.	N.D.	2±1	5±2.6	11	
		333	N.D.	N.D.	2±1	4±2.6	10	
		666	2±1.7	0.7±0.6	2±3	8±3.1	9	
		1333	N.D.	N.D.	1±1	17±3.8	7	
300-1000		66	1±0.5	N.D.	4±2	4±2.5	7	
		333	N.D.	N.D.	2±1	9±1.7	9	
		666	N.D.	N.D.	4±2	14±3.6	9	
		1333	1±1.7	N.D.	2±1	23±2	12	

ตารางที่ 9 การสะสมไมโครพลาสติกประเภท PBS ในหอยแมลงภู่มะพร้าวและใน feces

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	ภายนอก เหงือก	ภายใน เหงือก	ภายนอก ST	ภายใน ST	Feces/tank	
12		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	
	<30	66	N.D.	0.3±0.6	1±1	1±0	2	
		333	N.D.	N.D.	N.D.	1.3±0.6	0	
		666	N.D.	N.D.	1±0	3±1	13	
		1333	0.6±1.1	0.3±0.6	1±0	6±2.5	21	
	30-300	66	N.D.	N.D.	1±0	1.7±2.1	4	
		333	N.D.	N.D.	N.D.	1±0	10	
		666	1±1	0.3±0.6	1±1	1±1	13	
		1333	N.D.	N.D.	1±1	3±1	15	
	300-1000	66	N.D.	N.D.	1±0	3±1.2	1	
		333	N.D.	N.D.	2±1	3.7±1.5	3	
		666	N.D.	N.D.	2±1	5±2.1	7	
		1333	0.3±0.5	N.D.	1±1	6±4	18	
	24		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0
		<30	66	N.D.	N.D.	N.D.	0.6±1.2	1
			333	N.D.	N.D.	1±1	1±0	3
666			N.D.	N.D.	1±1	0.7±1.2	3	
1333			0.7±1.1	0.7±1.2	2.3±1	11±6.7	7	
30-300		66	N.D.	N.D.	1.7±2	1±0.6	3	
		333	0.7±1.1	N.D.	2±1	3±3.5	4	
		666	N.D.	N.D.	1.7±1	9±3.8	0	
		1333	1±1.7	N.D.	3±1	12±4.2	0	
300-1000		66	N.D.	N.D.	2±2	2.7±1.5	1	
		333	N.D.	N.D.	1±1	6±2.6	1	
		666	N.D.	N.D.	1±1	11±3.5	1	
		1333	N.D.	N.D.	1±1	10±2.1	2	



ตารางที่ 9 การสะสมไมโครพลาสติกประเภท PBS ในทอยแมลงภู่มะพร้าวและใน feces (ต่อ)

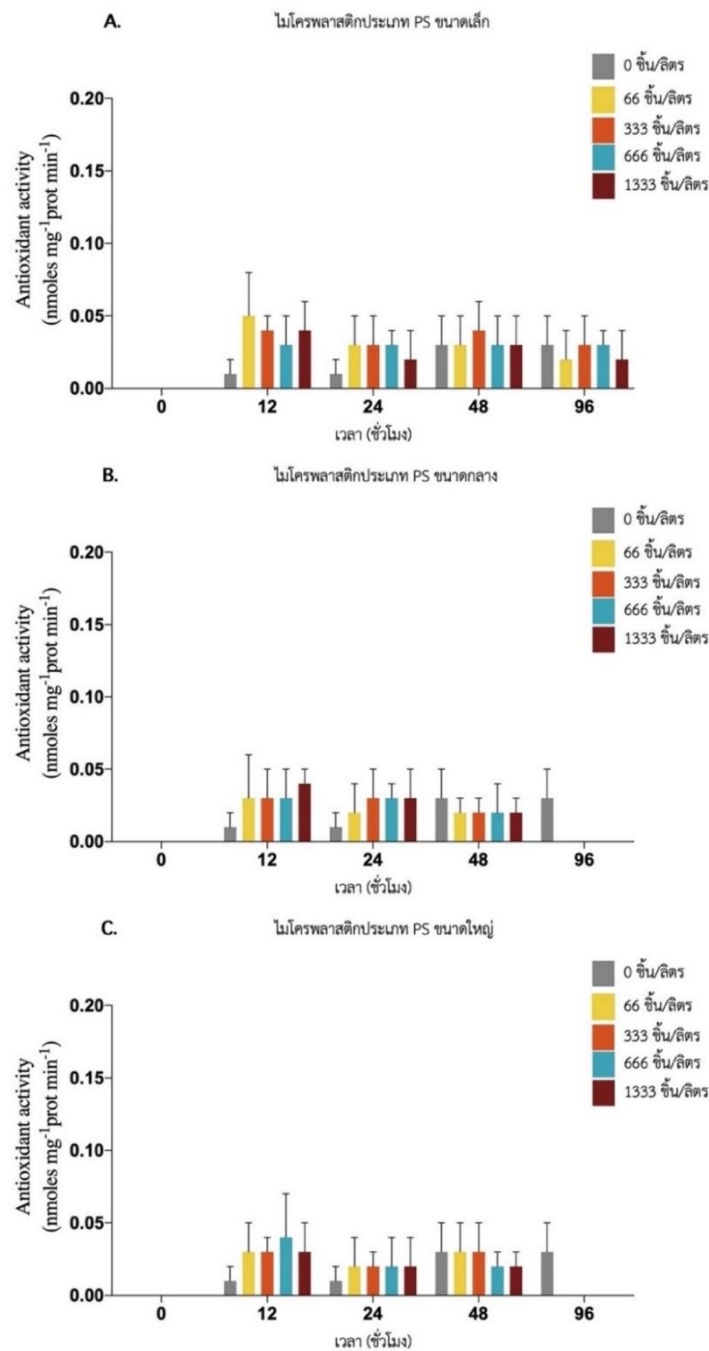
ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	ภายนอก เหงือก	ภายใน เหงือก	ภายนอก ST	ภายใน ST	Feces/tank	
48		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	
	<30	66	N.D.	N.D.	4±1	3±1.5	2	
		333	N.D.	N.D.	3±1	3±2.1	1	
		666	N.D.	N.D.	2±3	8±1.7	1	
		1333	1±1.7	N.D.	4±1	16±5.6	3	
		66	N.D.	N.D.	2±1	7±2.6	4	
	30-300	333	N.D.	N.D.	N.D.	13±4.9	1	
		666	0.7±1.1	N.D.	2±3	15±4.5	1	
		1333	1±1.7	N.D.	3±4	21±1	4	
		66	N.D.	N.D.	1±1	7±2	4	
	300-1000	333	N.D.	N.D.	2±1	12±4.4	5	
		666	1±1.7	0.3±0.6	2.7±2	14±3.6	1	
		1333	1±1.1	N.D.	1.3±1	13±3.6	6	
		0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	
	96	<30	66	N.D.	N.D.	4±1	7±2	11
			333	0.7±1.1	N.D.	2±2	4±3.5	9
666			0.3±0.5	N.D.	2±3	10±4.2	7	
1333			1.3±2.3	N.D.	3±1	17±5.3	9	
30-300		66	0±0	N.D.	2±1	5±2.6	10	
		333	0±0	N.D.	N.D.	4±2.6	11	
		666	2±1.7	N.D.	2±3	8±3.1	11	
		1333	2±2.8	N.D.	1±1	17±3.8	10	
300-1000		66	1±0.5	N.D.	1±1	4±2.5	7	
		333	0±0.5	N.D.	2±1	6±5.1	9	
		666	1±1.1	0.3±0.6	3±3	7±2.5	11	
		1333	1±1.7	N.D.	1±1	14±9	12	

#### 4.3 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการแสดงออกภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

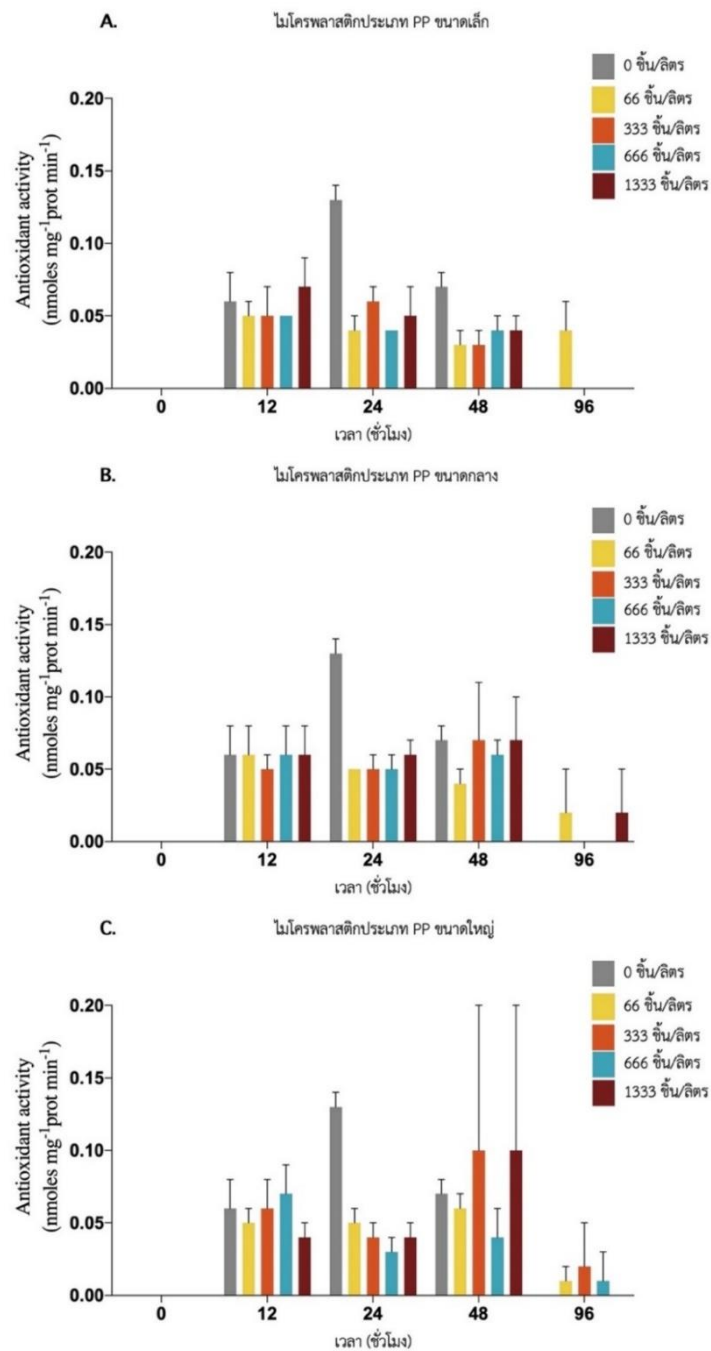
ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (total protein concentration) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ในแต่ละประเภทของไมโครพลาสติก (PS, PP และ PBS) จากฟาร์มหอยแมลงภู่ในที่ชุมชนตากวน ตำบลมาบตาพุด อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนในหอยแมลงภู่จากทั้งสามประเภทของไมโครพลาสติก (ตารางที่ ข1, ข2, ข3)

##### 4.3.1 กิจกรรมของ Antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่

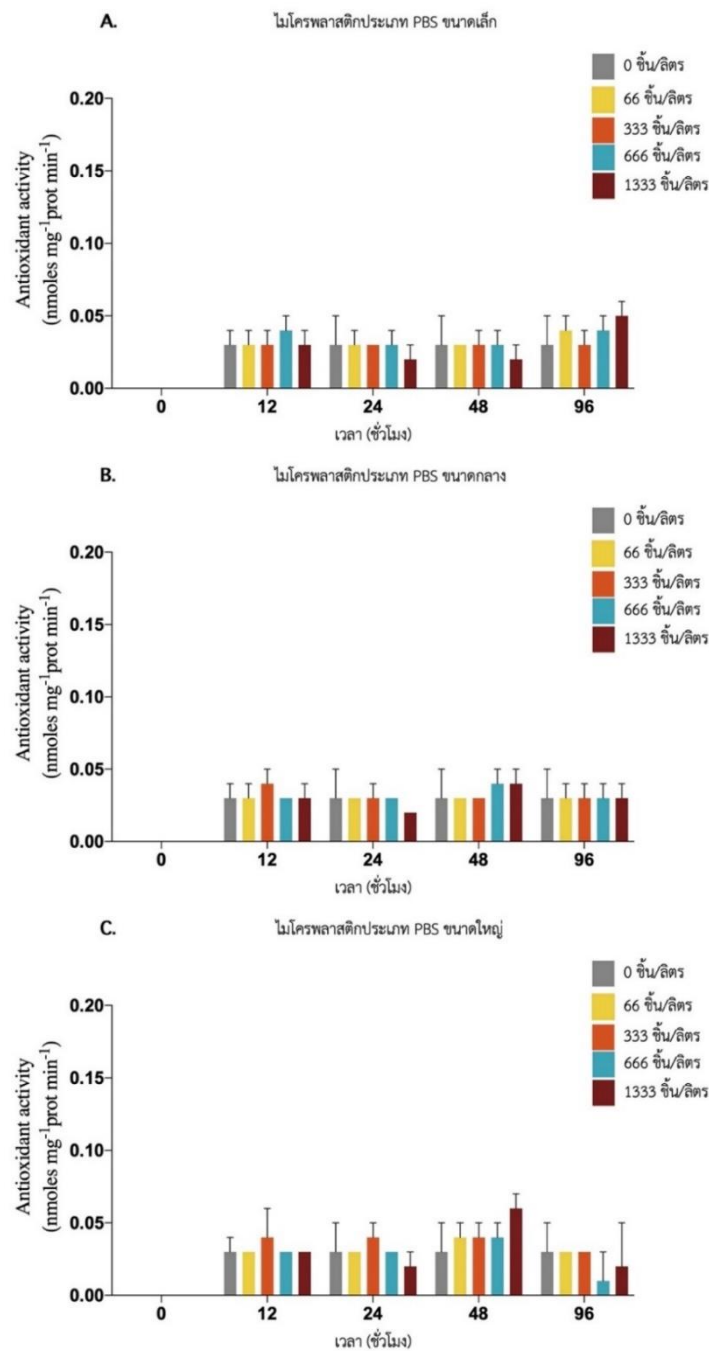
สำหรับผลศึกษาผลกระทบไมโครพลาสติกที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมของ Antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) สำหรับ PS ไม่พบความแตกต่างของกิจกรรมของ Antioxidant ในต่อมย่อยอาหาร ทั้ง 3 ขนาดและระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 34) เช่นเดียวกับกิจกรรมของ Antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกินไมโครพลาสติกประเภท PP และ PBS ที่ไม่พบความแตกต่างทั้งขนาดและความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 35, รูปที่ 36)



**รูปที่ 34** ผลกระทบของ PS ต่อกิจกรรม antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่งูที่กรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



รูปที่ 35 ผลกระทบของ PP ต่อกิจกรรม antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่งูที่กรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



**รูปที่ 36** ผลกระทบของ PBS ต่อกิจกรรม antioxidant ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่งูที่กรองกินที่ความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่

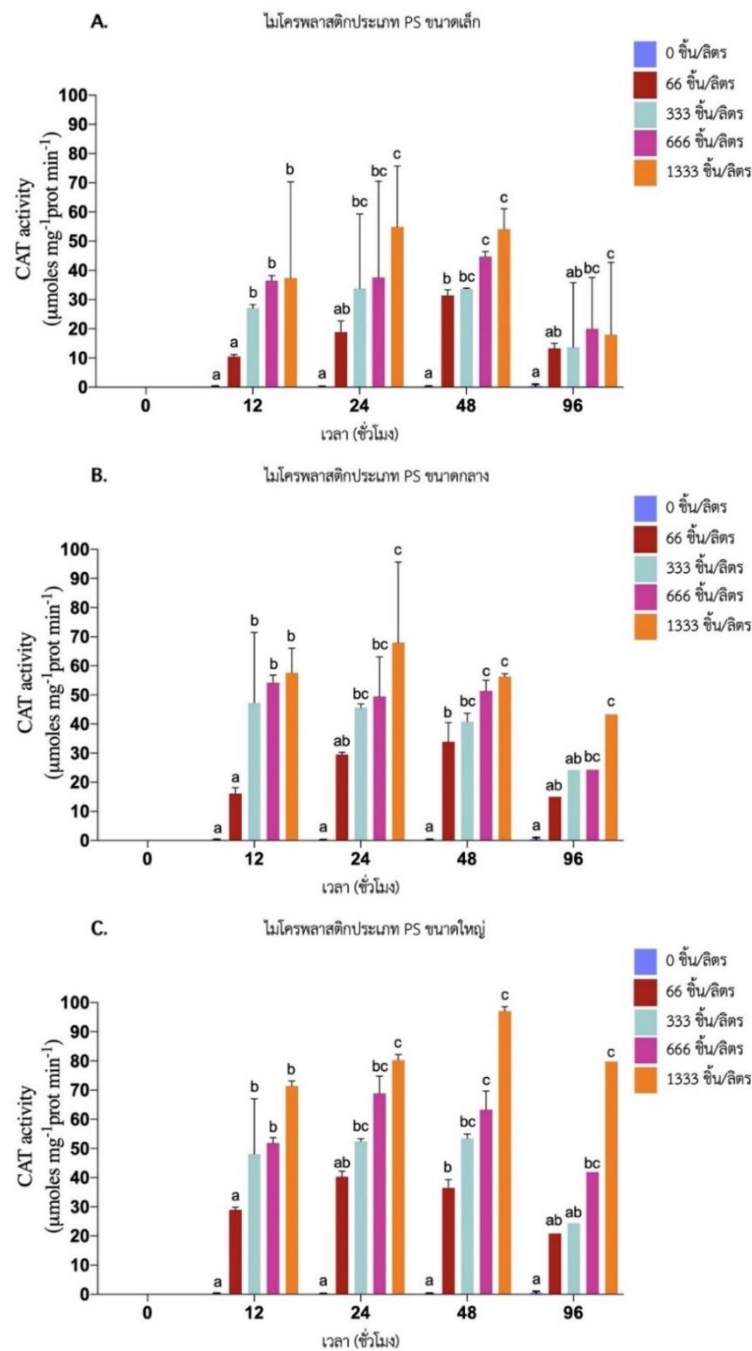
#### 4.3.2 กิจกรรมของ Catalase (CAT) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่

หลังจากการกรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS ขนาดเล็ก เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าไมโครพลาสติกมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของ CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกินความเข้มข้นสูงสุดของ PS (1333 ชิ้น/ลิตร) มีกิจกรรม CAT แตกต่างกับความเข้มข้นต่ำสุดของ PS (66 ชิ้น/ลิตร) และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อหอยแมลงภู่กรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 37A) สอดคล้องกับขนาดกลางที่พบว่าความเข้มข้นสูงสุดมีปริมาณ CAT แตกต่างกับความเข้มข้นต่ำสุดและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (รูปที่ 37B) เช่นเดียวกับขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นสูงสุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นต่ำสุดและชุดควบคุม ( $p < 0.05$ , Tukey) ซึ่งมีกิจกรรม CAT สูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 37C)

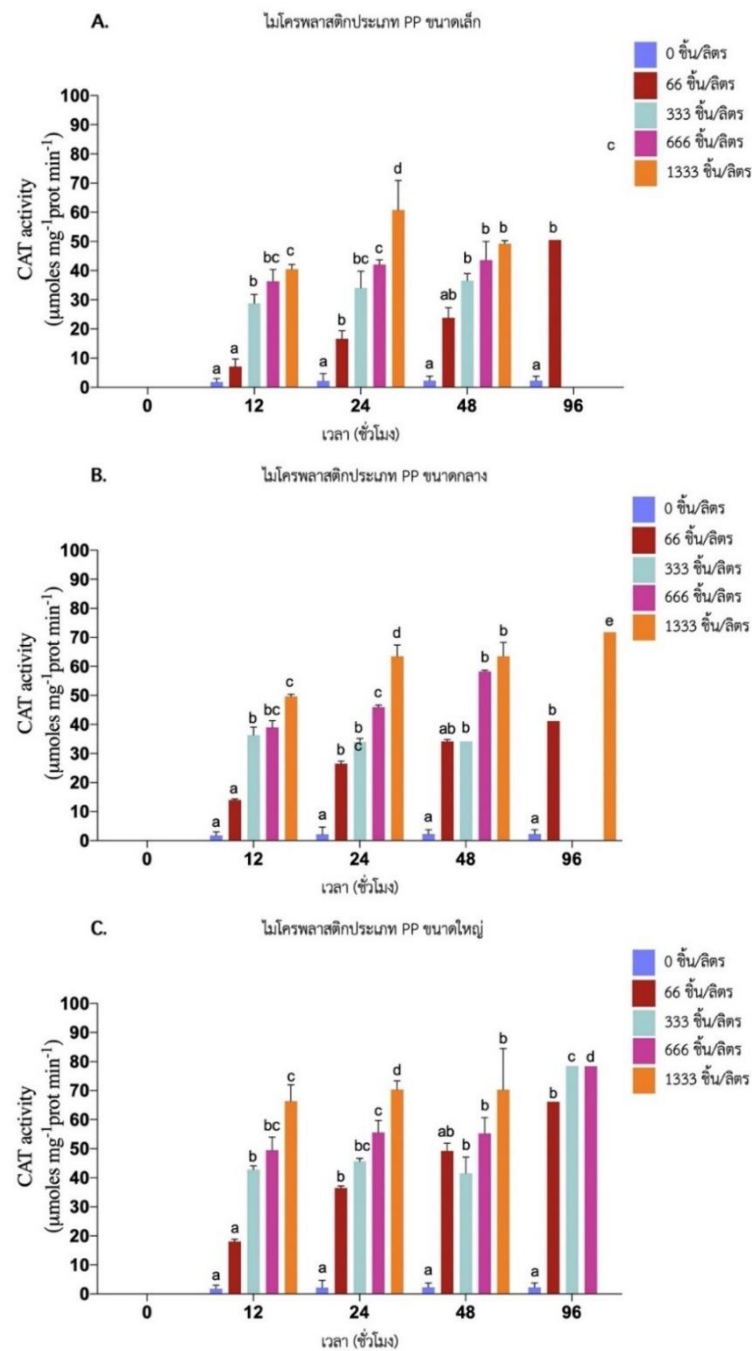
ผลกระทบของไมโครพลาสติกประเภท PP ขนาดเล็กต่อ CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ PP (1333 ชิ้น/ลิตร) มีปริมาณ CAT แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อกรองกินผ่านไป 24 ชั่วโมง (รูปที่ 38A) ในขณะที่ขนาดกลางพบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ PP มีปริมาณ CAT แตกต่างกับความเข้มข้นต่ำสุดของ PP (66 ชิ้น/ลิตร) และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 38B) สอดคล้องกับขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นสูงสุดมีความแตกต่างกับชุดควบคุมและความเข้มข้นต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) และมีแนวโน้มว่าปริมาณ CAT เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง (รูปที่ 38C)

ผลกระทบของไมโครพลาสติกประเภท PBS ขนาดเล็กต่อ CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นสูงสุดของ PBS (1333 ชิ้น/ลิตร) กับชุดควบคุมและความเข้มข้นต่ำสุดของ PBS (66 ชิ้น/ลิตร) ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเวลาที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 39A) เช่นเดียวกับขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นสูงสุดของ PBS และชุดควบคุม ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 39B, รูปที่ 39C)

ผลกระทบของขนาดของไมโครพลาสติกทั้ง 3 ในประเภททั้ง 3 ประเภท พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของขนาดใหญ่ที่ส่งผลต่อปริมาณกิจกรรมของ CAT มากกว่าขนาดเล็ก (ANOVA,  $p < 0.05$ ) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ 12 ชั่วโมงแรกของการกรองกินไมโครพลาสติก สิ่งเหล่านี้บ่งชี้ว่าหอยแมลงภู่มีระดับการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรม CAT เมื่อกรองกินไมโครพลาสติกขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดเล็ก นี่อาจบ่งบอกถึงขนาดที่มีผลต่อการตอบสนองของ CAT ในสายพันธุ์นี้เมื่อกรองกินไมโครพลาสติกขนาดแตกต่างกัน

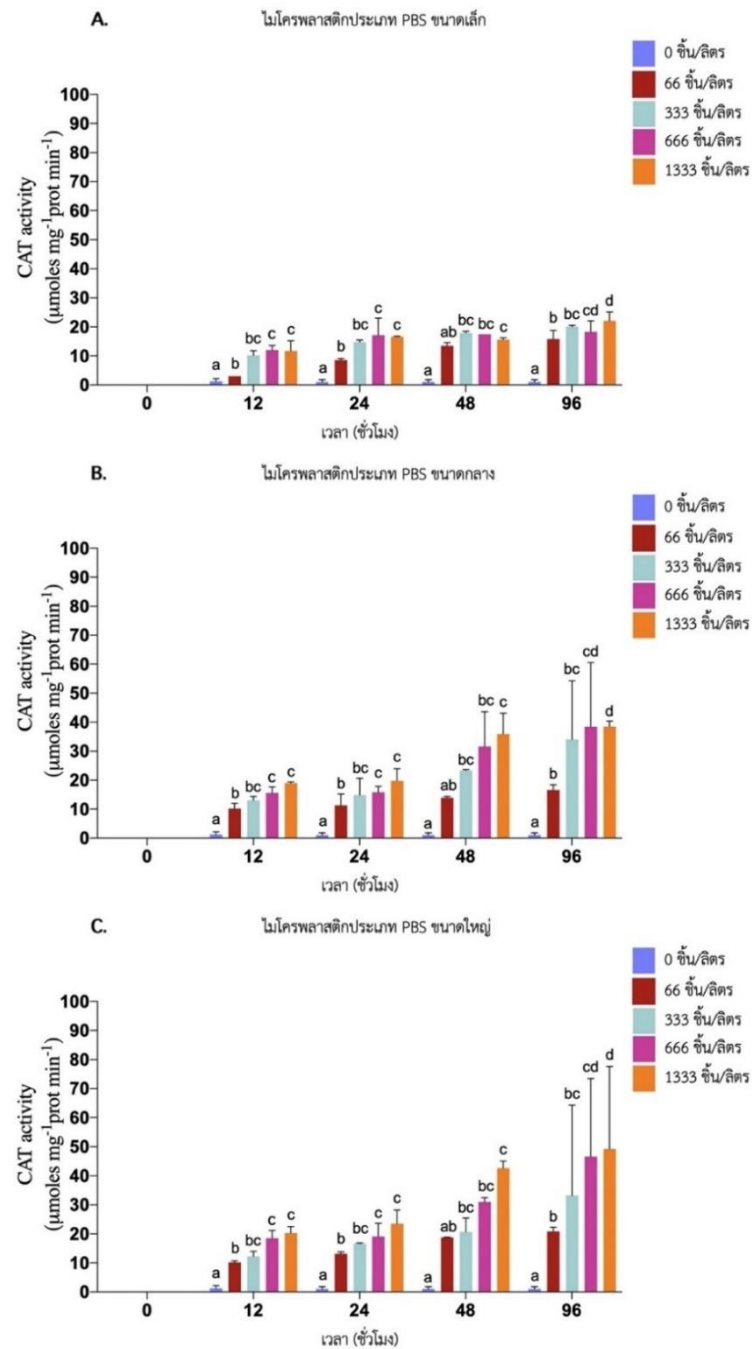


**รูปที่ 37** ผลกระทบของ PS ต่อกิจกรรม CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่งที่กรองกิน PS ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



**รูปที่ 38** ผลกระทบของ PP ต่อกิจกรรม CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่งที่กรงกิน PP ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่





**รูปที่ 39** ผลกระทบของ PBS ต่อกิจกรรม CAT ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่งูที่กรองกิน PBS ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่

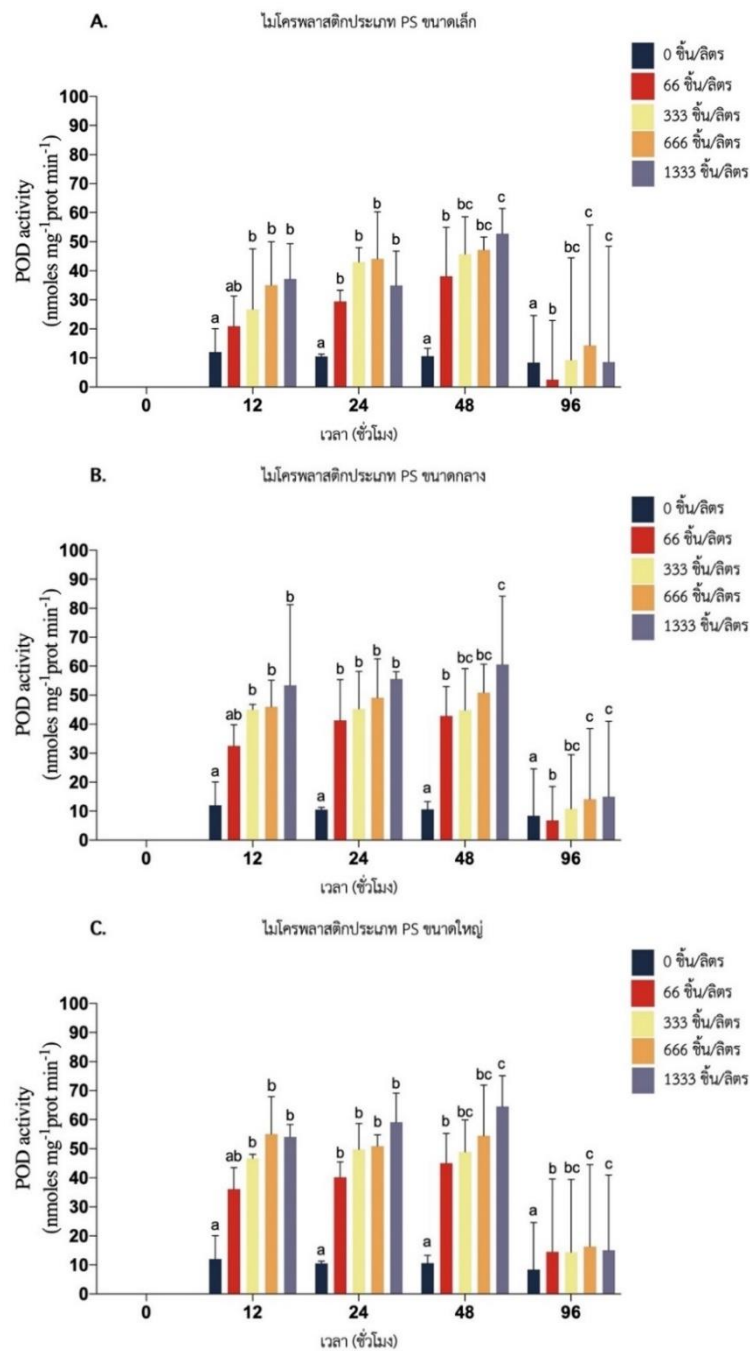
### 4.3.3 กิจกรรมของ Peroxidase (POD) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่

หลังจากการกรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS ขนาดเล็ก เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าไมโครพลาสติกมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของ POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกินความเข้มข้นสูงสุดของ PS (1333 ชิ้น/ลิตร) มีปริมาณ POD แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อหอยแมลงภู่กรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 40A) สอดคล้องกับขนาดกลางที่พบว่าความเข้มข้นสูงสุดมีปริมาณ POD แตกต่างกับความเข้มข้นต่ำสุด PS (66 ชิ้น/ลิตร) และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อหอยแมลงภู่กรองกินผ่านไป 48 ชั่วโมง (รูปที่ 40B) เช่นเดียวกับขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นสูงสุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นต่ำสุด PS (66 ชิ้น/ลิตร) และชุดควบคุม ( $p < 0.05$ , Tukey) ซึ่งมีปริมาณ CAT สูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 40C)

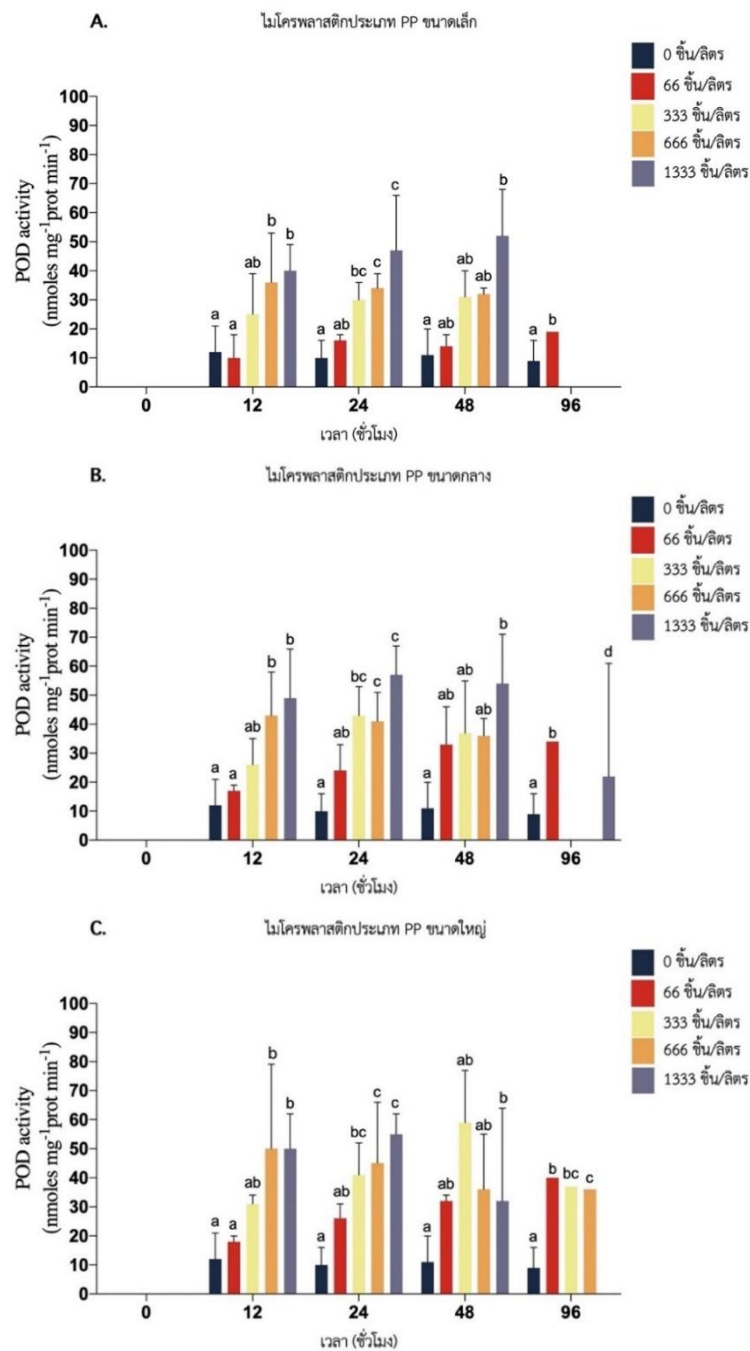
ผลกระทบของไมโครพลาสติกประเภท PP ขนาดเล็กต่อ POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ PP (1333 ชิ้น/ลิตร) มีปริมาณ POD แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 41A) ในขณะที่ขนาดกลางพบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ PP มีปริมาณ POD แตกต่างกับเข้มข้นต่ำสุดของ PP (66 ชิ้น/ลิตร) และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 41B) สอดคล้องกับขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นสูงสุดมีความแตกต่างกับชุดควบคุมและความเข้มข้นต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 41C)

ผลกระทบของไมโครพลาสติกประเภท PBS ขนาดเล็กต่อ POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นสูงสุดของ PBS (1333 ชิ้น/ลิตร) กับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 42A) เช่นเดียวกับขนาดกลางและขนาดใหญ่ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 42B, รูปที่ 42C)

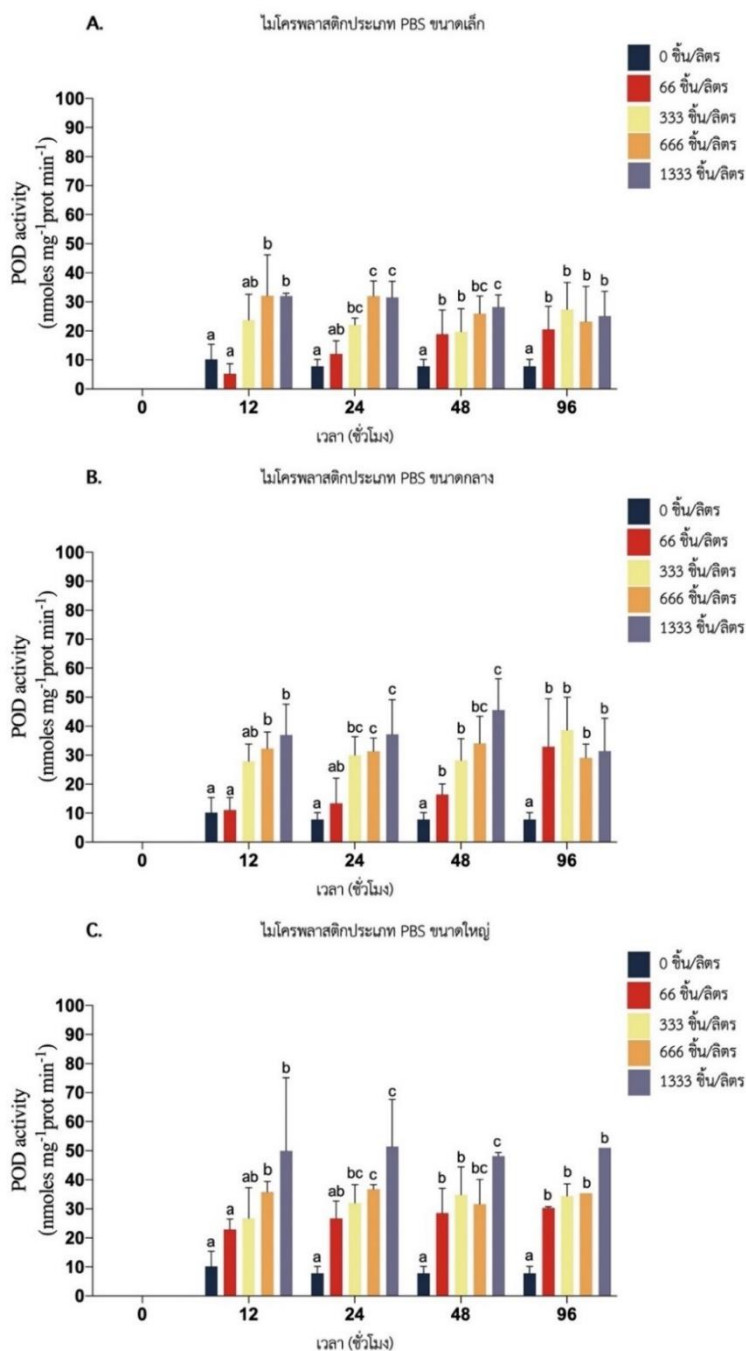
ผลกระทบของขนาดของไมโครพลาสติกทั้ง 3 ในประเภททั้ง 3 ประเภท พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของขนาดใหญ่ที่ส่งผลต่อปริมาณกิจกรรมของ POD มากกว่าขนาดเล็ก (ANOVA,  $p < 0.05$ ) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ 12 ชั่วโมงแรกของการกรองกินไมโครพลาสติก สิ่งเหล่านี้บ่งชี้ว่าหอยแมลงภู่มีระดับการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรม POD เมื่อกรองกินไมโครพลาสติกขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดเล็ก นี่อาจบ่งบอกถึงขนาดที่มีผลต่อการตอบสนองของ POD ในสายพันธุ์นี้เมื่อกรองกินไมโครพลาสติกขนาดแตกต่างกัน



**รูปที่ 40** ผลกระทบของ PS ต่อกิจกรรม POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PS ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



**รูปที่ 41** ผลกระทบของ PP ต่อกิจกรรม POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่งูที่กรองกิน PP ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



**รูปที่ 42** ผลกระทบของ PBS ต่อกิจกรรม POD ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่งูที่กรองกิน PBS ความเข้มข้น 5 ระดับ (0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่

#### 4.3.4 ความเข้มข้นของ total Glutathione (GSH) content ในต่อมย่อยอาหารของ หอยแมลงภู่

ความเข้มข้นของ total GSH ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ หลังจากกรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS ขนาดเล็ก พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ PS (1333 ชิ้น/ลิตร) มีความเข้มข้นของ total GSH แตกต่างกับความเข้มข้นต่ำสุดของ PS (66 ชิ้น/ลิตร) และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อหอยแมลงภู่กรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 43A) ในขณะที่ขนาดกลางพบว่าความเข้มข้นสูงสุดมีความเข้มข้นของ total GSH แตกต่างกับความเข้มข้นต่ำสุดและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) มีกิจกรรม GSH สูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (รูปที่ 43B) เช่นเดียวกับขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นสูงสุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นต่ำสุดและชุดควบคุม ( $p < 0.05$ , Tukey) ซึ่งมีกิจกรรม GSH สูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 43C)

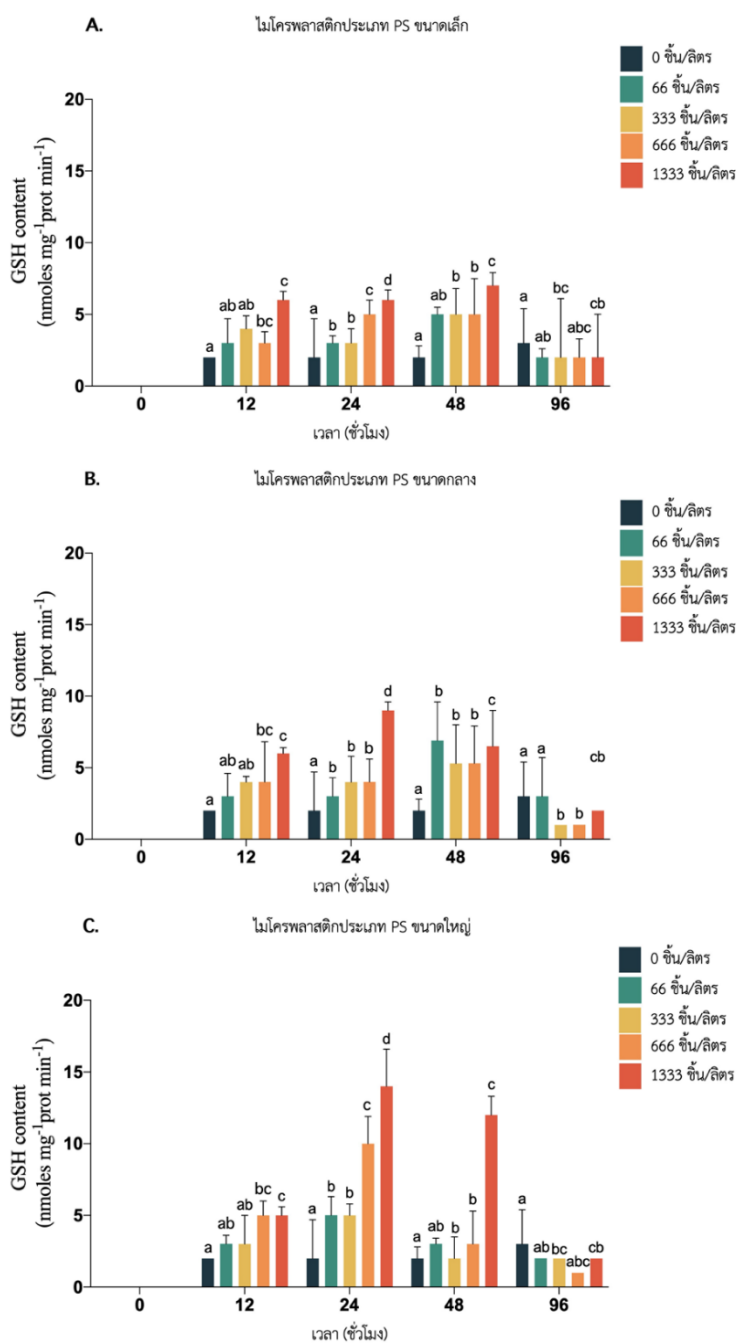
ผลกระทบของไมโครพลาสติกประเภท PP ขนาดเล็กต่อ GSH ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ PP (1333 ชิ้น/ลิตร) มีความเข้มข้นของ total GSH แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) เมื่อกรองกินผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 44A) เช่นเดียวกับขนาดกลางพบว่าความเข้มข้นสูงสุด มีความเข้มข้นของ total GSH แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) และมีแนวโน้มความเข้มข้นของ total GSH เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 44B) ในขณะที่ขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นสูงสุดมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) และมีความเข้มข้นของ total GSH เพิ่มสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงและค่อย ๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (รูปที่ 44C)

ผลกระทบของไมโครพลาสติกประเภท PBS ขนาดเล็กต่อ GSH ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นสูงสุดของ PBS (1333 ชิ้น/ลิตร) และชุดควบคุม ( $p > 0.05$ , Tukey) เมื่อกรองกินผ่านไป 48 ชั่วโมง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมงพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นสูงสุดของ PBS และชุดควบคุม ( $p < 0.05$ , Tukey) (รูปที่ 45A) เช่นเดียวกับขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นสูงสุดของ PBS และชุดควบคุม ( $p > 0.05$ , Tukey) เมื่อกรองกินผ่านไป 48 ชั่วโมง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมงมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของ total GSH และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความเข้มข้นสูงสุดของ PBS และชุดควบคุม ( $p < 0.05$ , Tukey) (รูปที่ 45B, รูปที่ 45C)

ผลกระทบของขนาดของไมโครพลาสติกทั้ง 3 ประเภท ในประเภท PP ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของขนาดใหญ่ที่ส่งผลต่อปริมาณความเข้มข้นของ total GSH มากกว่าขนาด

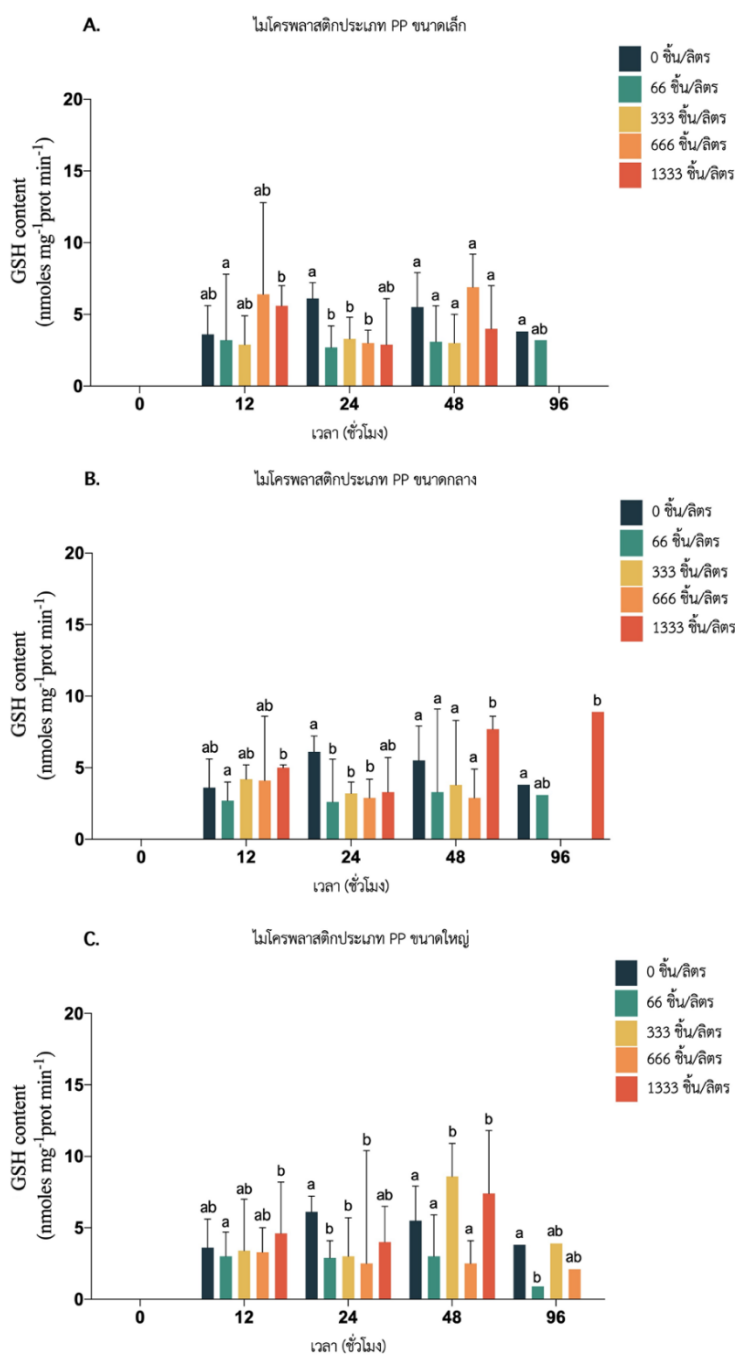
อื่น ๆ ในขณะที่ไมโครพลาสติกประเภท PS พบว่าขนาดใหญ่ส่งผลต่อปริมาณความเข้มข้นของ total GSH มากกว่าขนาดเล็กอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA,  $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกับขนาดใหญ่ของไมโครพลาสติกประเภท PBS โดยทั้ง 3 ขนาดพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ 12 ชั่วโมงแรกของการกรงกินไมโครพลาสติก สิ่งเหล่านี้บ่งชี้ว่าหอยแมลงภู่มิ่ระดับการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของ total GSH เมื่อกรงกินไมโครพลาสติกขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดเล็กนี้อาจบ่งบอกถึงขนาดที่มีผลต่อการตอบสนองของ GSH ในสายพันธุ์นี้เมื่อกรงกินไมโครพลาสติกขนาดแตกต่างกัน



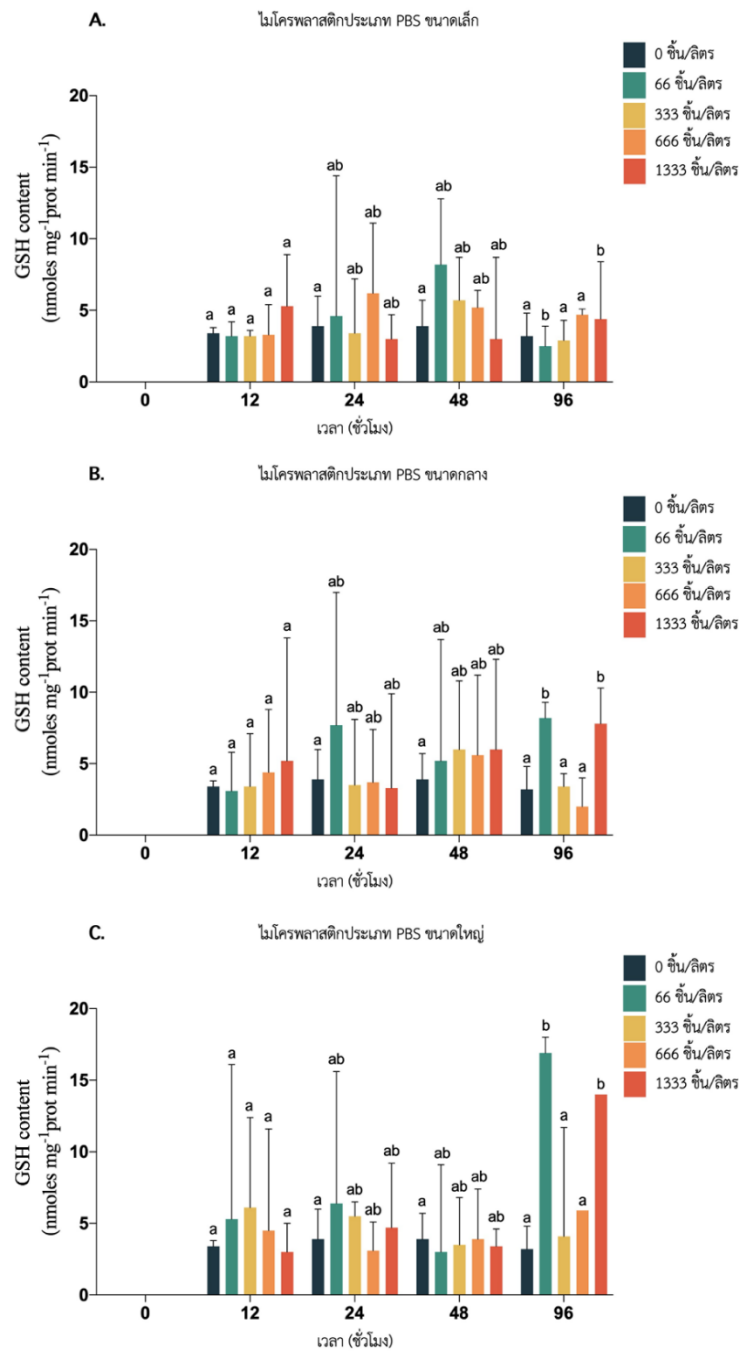


**รูปที่ 43** ผลกระทบของ PS ต่อ total GSH content ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่งูที่กรองกินความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่





**รูปที่ 44** ผลกระทบของ PP ต่อ total GSH content ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกินความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333  $\mu\text{g/L}$  เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่



**รูปที่ 45** ผลกระทบของ PBS ต่อ total GSH content ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกินความเข้มข้น 0, 66, 333, 666 และ 1333  $\mu\text{g/L}$  เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , Tukey) (A) ขนาดเล็ก (B) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่

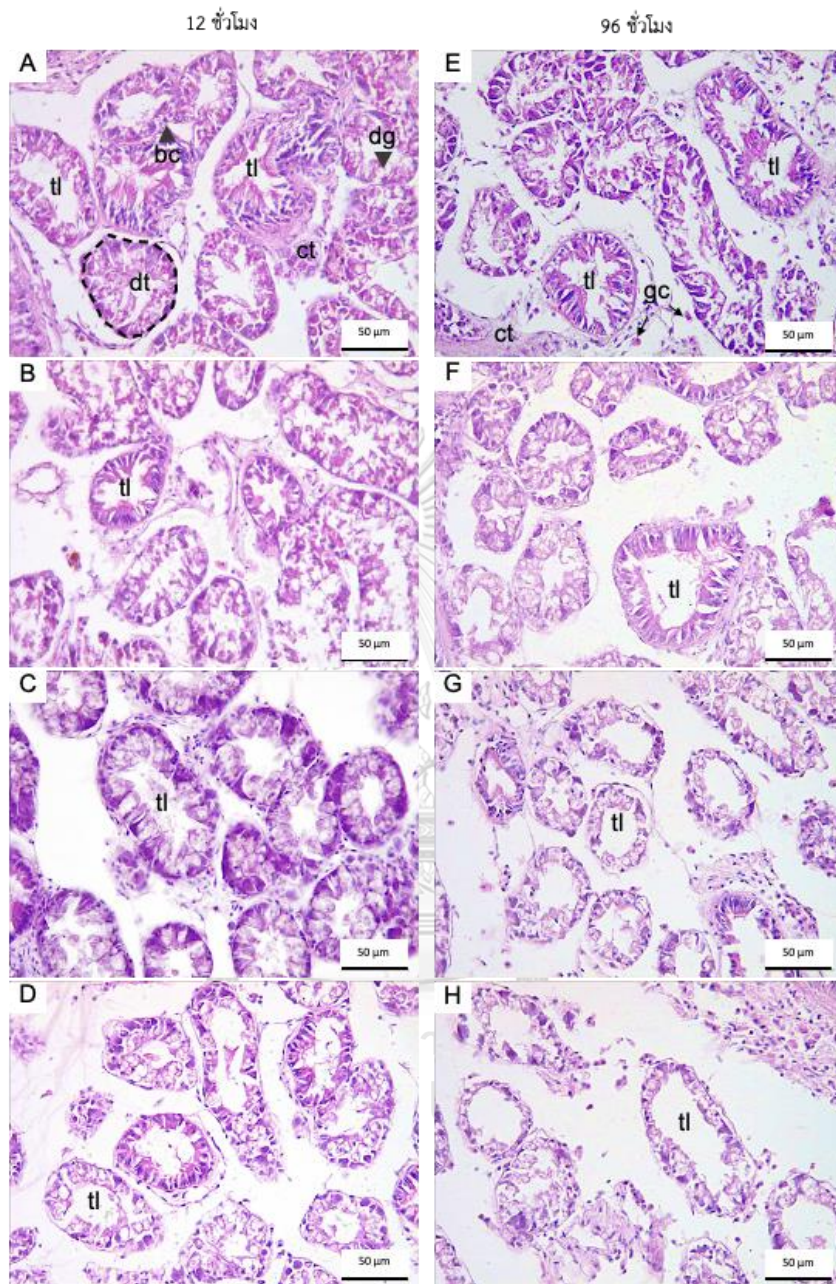
#### 4.4 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

ลักษณะเนื้อเยื่อของต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ในกลุ่มควบคุม พบเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) มีลักษณะเซลล์รูปทรงกระบอกสูง และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) เป็นเซลล์คล้ายพีระมิด โดยพบว่านิวเคลียสและไซโทพลาซึมย้อมติดสีฮีมาทอกไซลิน จากเซลล์ที่พบในท่อทั้งสองกลุ่มมีความสูงไม่เท่ากัน ส่งผลให้การเรียงตัวของเซลล์ทั้งสองกลุ่มภายในท่อทำให้เกิดรูปร่างเป็นแฉกขึ้น (tubules lumen) (รูปที่ 46A, 46E, 47A, 47E, 48A และ 48E) ในขณะที่หอยแมลงภู่ที่กรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS ความเข้มข้นสูงสุด (1333 ชิ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง พบว่าขนาดเล็กไม่มีความแตกต่างของเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 46B) เช่นเดียวกับ PS ขนาดกลาง (รูปที่ 46C) ในขณะที่หอยแมลงภู่ที่กรองกินไมโครพลาสติกขนาดใหญ่ ต่อมย่อยอาหารมีความแตกต่างของเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมส่งผลให้การเรียงตัวของเซลล์ทั้งสองกลุ่มภายในท่อทำให้เกิดรูปร่างเป็นแฉกลดลง (tubules lumen) (รูปที่ 46D) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง พบว่าขนาดเล็กไม่มีความแตกต่างของเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 46F) ในขณะที่ PS ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ต่อมย่อยอาหารมีความแตกต่างของเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมส่งผลให้การเรียงตัวของเซลล์ทั้งสองกลุ่มภายในท่อทำให้เกิดรูปร่างเป็นแฉกลดลง (tubules lumen) และพบความเสียหายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ของต่อมย่อยอาหารมีความเสียหายเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 46G, 46H)

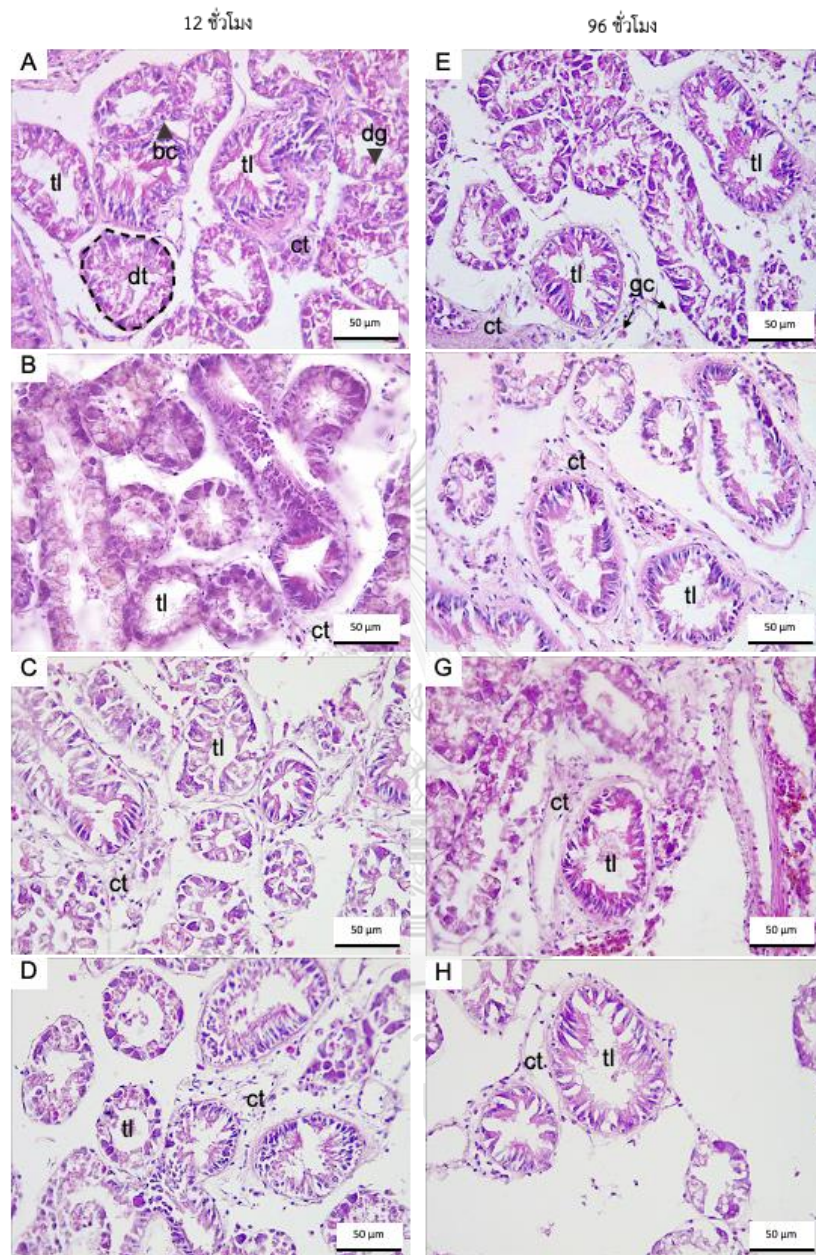
หอยแมลงภู่ที่กรองกินไมโครพลาสติกประเภท PP ความเข้มข้นสูงสุด (1333 ชิ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง พบว่าขนาดเล็กไม่มีความแตกต่างของเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 47B) เช่นเดียวกับ PP ขนาดกลาง (รูปที่ 47C) และ PP ขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 47D) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง พบว่าขนาดเล็กไม่มีความแตกต่างของเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) และเซลล์แบโซฟิลิก

(basophilic cell) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 47F) เช่นเดียวกับ PP ขนาดกลาง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 47G) ในขณะที่ขนาดใหญ่มีผลต่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ของต่อมย่อยอาหารมีความเสียหายเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 47G, 47H)

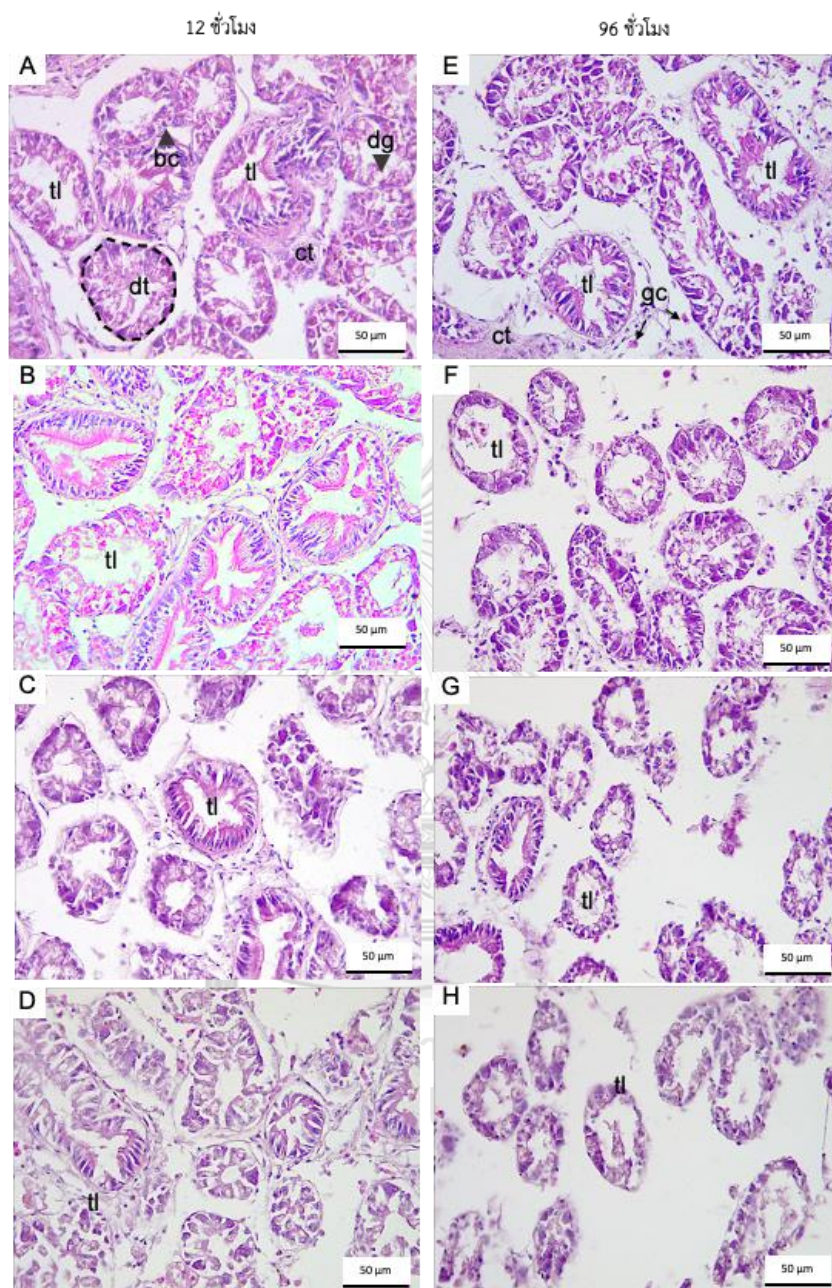
หอยแมลงภูที่กรองกินไมโครพลาสติกประเภท PBS ความเข้มข้นสูงสุด (1333 ชิ้น/ลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง พบว่าขนาดเล็กไม่มีความแตกต่างของเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 48B) เช่นเดียวกับ PBS ขนาดกลาง (รูปที่ 48C) และ PBS ขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 48D) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง พบว่าขนาดเล็กไม่มีความแตกต่างของเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 48F) เช่นเดียวกับขนาดกลางของ PBS เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 48G) และขนาดใหญ่ แต่พบเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ของต่อมย่อยอาหารในขนาดกลางและขนาดใหญ่มีความเสียหายเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 48H)



**รูปที่ 46** ผลกระทบของ PS ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PS ความเข้มข้น 1333 ซีซี/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (scale bar=50  $\mu$ m, H-E) (A) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (B) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (C) ขนาดกลางเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (D) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (E) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 96 (F) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (G) ขนาดกลางเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (H) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง dt คือ digestive tubules, tl คือ tubules lumen, dg คือ digestive cell, bc คือ basophilic cell, gc คือ granulocytes และ ct คือ connective tissue



**รูปที่ 47** ผลกระทบของ PP ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PP ความเข้มข้น 1333 ชิ้น/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (scale bar=50  $\mu$ m, H-E) (A) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (B) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (C) ขนาดกลางเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (D) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (E) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (F) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (G) ขนาดกลางเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (H) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (scale bar=50  $\mu$ m, H-E) dt คือ digestive tubules, tl คือ tubules lumen, dg คือ digestive cell, bc คือ basophilic cell, gc คือ granulocytes และ ct คือ connective tissue



**รูปที่ 48** ผลกระทบของ PBS ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ที่กรองกิน PBS ความเข้มข้น 1333 ขึ้น/ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 96 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ (scale bar=50 µm, H-E) (A) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (B) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (C) ขนาดกลางเมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (D) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง (E) ชุดควบคุมเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (F) ขนาดเล็กเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (G) ขนาดกลางเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง (H) ขนาดใหญ่เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง dt คือ digestive tubules, tl คือ tubules lumen, dg คือ digestive cell, bc คือ basophilic cell, gc คือ granulocytes และ ct คือ connective tissue

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการศึกษา

#### 5.1 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่ออัตราการตายของหอยแมลงภู

อัตราการตายของหอยแมลงภูในการศึกษานี้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไมโครพลาสติกประเภท PS จากการศึกษาทั้งขนาดเล็กโดย Cole และคณะ (2015), Lee และคณะ (2013) และ Lin และคณะ (2011) พบอัตราการตายเพิ่มขึ้นของโคพีพอด *Calanus helgolandicus* ( $6.5-7.5 \times 10^4$  ชิ้น/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) *Tigriopus japonicus* (0.125–25 มิลลิกรัม/ลิตร) และไรน้ำ *Daphnia magna* (5.24 มิลลิกรัม/ลิตร) เมื่อสัมผัสกับ PS นอกจากนี้ nauplii (*Acartia Tonsa*) ยังมีอัตราการรอดชีวิตลดลงร้อยละ 28.6 เมื่อสัมผัสกับ PS เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนพืชเพียงอย่างเดียว (Shore et al., 2021) ในทางตรงกันข้ามไม่พบอัตราการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหอยแมลงภู *Mytilus* spp. (500 นาโนกรัม /มิลลิลิตร) (Cole et al., 2020) และตัวอ่อนของ *Amphibalanus amphitrite* (1, 10, 100 หรือ 1000 ชิ้น/มิลลิลิตร) (Yu & Chan, 2020) เมื่อกินไมโครพลาสติก PS สอดคล้องกับการรายงาน Redondo-Hasselerharm และคณะ (2018) กล่าวว่าไม่พบอัตราการตายในหนอนตัวกลม *Lumbriculus variegatus* และ *Tubifex* spp. และ *Sphaerium corneum* ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าหอยแมลงภูมีการใช้พลังงานอย่างมากและพลังงานเหล่านั้นอาจจะเพียงพอต่อการรักษาสมดุลเมื่อกรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS จึงทำให้ไม่ส่งผลกระทบรุนแรงถึงขั้นตาย (Opitz et al., 2021) อย่างไรก็ตาม หากมีการกรองกิน PS เป็นเวลานาน หอยแมลงภูจึงต้องการใช้พลังงานเพิ่มขึ้นเพื่อรักษาสมดุลในขณะที่พลังงานที่ได้รับไม่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจส่งผลให้ energy budget ลดลง ดังนั้น PS สามารถส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการดักจับ การกรองกิน การขับถ่าย การผลิตเมือก และการทำงานเชิงกลของหอยแมลงภู (Li et al., 2019; Pinheiro et al., 2020) ในทำนองเดียวกันมีรายงานกล่าวถึงการสะสม PS โดยพบว่าขนาดและความเข้มข้นมีผลต่อการสะสมในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู (Wrad et al., 2019) จากการรายงานของ Wegner และคณะ (2012) พบว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ PS ส่งผลต่อการลดอัตราการกรองกินและเพิ่มการผลิต pseudofaeces ในหอยแมลงภู อย่างไรก็ตามการสะสมของ PS และการกำจัดทั้งหมดหรือบางส่วนของอนุภาค PS อาจลดความสามารถในการกรองกินและนำไปสู่ความบกพร่องทางสรีรวิทยา (Bergami et al., 2017) จากการรายงานของ Canesi และคณะ (2015), Capolupo และคณะ (2021), และ Fabbri และคณะ (2020) ตรวจพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อ lysosomal หลังจากหอยแมลงภูกรองกิน PS ซึ่งความผิดปกตินี้อาจส่งผลต่ออัตราการรอดของหอย



อัตราการตายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่กรองกิน PP มีรายงานที่คล้ายกันในกลุ่มแอมฟิพอด *Hyaella Azteca* (Au et al., 2015), กุ้งก้ามกรามตัวเต็มวัย *Palaemonetes pugio* (Gray และ Weinstein, 2017) และ *Caenorhabditis elegans* (Lei et al., 2018) ซึ่งทั้งหมดมีอัตราการรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการรายงานของ Murray และ Cowie (2011) แสดงให้เห็นว่ากุ้งก้ามกราม *Nephrops norvegicus* ไม่สามารถกำจัด PP ได้ อย่างสมบูรณ์ นำไปสู่การกักเก็บ PP ภายใน chitinous foregut ซึ่งอาจส่งผลให้การเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตลดลง สอดคล้องกับการรายงานของ Capolupo และคณะ (2021) แสดงให้เห็นหอยแมลงภู่มดิเตอร์เรเนียน (*Mytilus galloprovincialis*) ที่สัมผัสกับไมโครพลาสติกที่ leachate ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ส่งผลต่ออัตราการตายโดยส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในหน้าที่ของ lysosomal, lipid peroxidation, pro-oxidant conditions และความผิดปกติทางระบบประสาทหลังจากสัมผัสผ่านไป 7 วัน

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายแทนพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้แบบดั้งเดิม ตัวอย่างที่พบในปัจจุบันคือ พลาสติกประเภท Polybutylene succinate (PBS) ซึ่งเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเมื่อย่อยสลายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์โดยจุลินทรีย์ในตะกอนดินบางชนิด การสะสมของไมโครพลาสติกที่ย่อยสลายได้นั้นใกล้เคียงหรือสูงกว่าของไมโครพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ (Torres et al., 2021) จากผลการศึกษาการกรองกินไมโครพลาสติกประเภท PBS ของหอยแมลงภู่มพบว่าอัตราการตายระหว่างกลุ่มที่กรองกินไมโครพลาสติกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจากการรายงานพบว่า *P. viridis* เมื่อกรองกินไมโครพลาสติกจะไม่สามารถย่อยได้เนื่องจากขาดเอนไซม์ในการย่อยสลายพลาสติก (Wright et al., 2013) และเนื่องจากไมโครพลาสติกไม่สามารถดูดซับหรือนำไปใช้เป็นพลังงานในร่างกายของสัตว์ได้ ปัจจัยเหล่านี้จึงนำไปสู่การสะสมในเนื้อเยื่อและอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น

ในปัจจุบันการศึกษาถึงผลกระทบของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพยังมีไม่มากนักที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับการย่อยสลายทางชีวภาพและความเป็นพิษของ PBS ในสิ่งแวดล้อม เป็นผลให้ผลกระทบของ PBS ต่อสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ยังขาดข้อมูลอยู่มาก จากการรายงานปัจจุบัน Khalid และคณะ (2021) ไม่พบผลกระทบของไมโครพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพต่ออัตราการตายของหอยแมลงภู่ม (*Mytilus edulis*) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังการกรองกินเป็นเวลา 8 วัน และไม่มีรายงานความเป็นพิษต่อระบบประสาท ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือความเป็นพิษต่อภูมิคุ้มกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาในปัจจุบันอัตราการตายสูงชี้ให้เห็นว่าหอยแมลงภู่มอาจมีขีดความสามารถที่จำกัดในการรับมือกับความเครียดเนื่องจากการปนเปื้อนของไมโครพลาสติกซึ่งมักผลิตจากปิโตรเลียม

ความเข้มข้นสูงสุดของไมโครพลาสติกอาจส่งผลให้เกิดความเสี่ยงสูงต่อการอุดตันทางกายภาพในทางเดินอาหารของสัตว์ (Wright et al., 2013; Canesi et al., 2015) การอุดตันคือการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่ไม่ขึ้นอยู่กับสารเคมีในพลาสติก ดังนั้นจึงอาจนำไปสู่ความตายโดยตรงของสิ่งมีชีวิตจากการรายงานของ Bouwmeester และคณะ (2015) พบว่าไมโครพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียมและเชื้อเพลิงฟอสซิลไม่สามารถย่อยและกำจัดได้จึงนำไปสู่การสะสมในเนื้อเยื่อ (lipophiles) ของสิ่งมีชีวิต ทำให้เนื้อเยื่อเปลี่ยนแปลงหรือเสียหาย (Avio et al., 2015; von Moos et al., 2012) นอกจากนี้ Kolandhasamy และคณะ (2018) รายงานว่าไมโครพลาสติกสามารถสะสมได้ที่บริเวณเหงือก ต่อมย่อยอาหาร และตับอ่อน ซึ่งอวัยวะเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยอาหาร เช่นการย่อยและการดูดซึม (Au 2004) ดังนั้นหากเหงือก ต่อมย่อยอาหาร และตับอ่อนเหล่านี้ได้รับความเสียหายและไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจส่งผลให้เสียชีวิตได้

ไมโครพลาสติกขนาดใหญ่ (300-1000  $\mu\text{m}$ ) ทำให้มีอัตราการเสียชีวิตของหอยแมลงภู่มากกว่าไมโครพลาสติกขนาดเล็ก (<30  $\mu\text{m}$ ) ( $p < 0.05$ ) จากการศึกษาของ Provenza และคณะ (2020) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่า (0.5–3.0 มิลลิเมตร) มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในหอยแมลงภู (*Mytilus galloprovincialis*) (Trestrail et al., 2021) Li และคณะ (2019) กล่าวว่าหอยแมลงภูสามารถแยกอนุภาคที่ไม่สามารถรองกินได้และจะกำจัดพวกมันในรูปของ pseudofaeces ตัวอย่างเช่นการศึกษาในหอยเชลล์ (Brillant และ MacDonald, 2000) และหอยแมลงภูเมดิเตอร์เรเนียน (*M. galloprovincialis*) (Kinjo et al., 2019) แสดงให้เห็นว่าไมโครพลาสติกขนาดเล็ก (<10  $\mu\text{m}$ ) จะถูกสะสมไว้เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ในลำไส้มากกว่าไมโครพลาสติกขนาดใหญ่ (90  $\mu\text{m}$ ) โดยขนาดใหญ่มีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดปัญหาเฉียบพลันมากกว่าขนาดเล็กเนื่องจากไมโครพลาสติกเหล่านี้ส่วนใหญ่ถูกขับออกจากทางเดินอาหารของหอยแมลงภูอย่างรวดเร็ว (Bour et al., 2018)

## 5.2 การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู *Perna viridis*

จากการทดลองกำหนดความเข้มข้นของไมโครพลาสติกจากการรายงานพบการสะสมไมโครพลาสติกในมหาสมุทรทั่วโลกที่แตกต่างกัน (De Lucia et al., 2014; Kunz et al., 2016; Zhang et al., 2017; Cho et al., 2019; Castillo et al., 2020; Opitz et al., 2021) และการสะสมไมโครพลาสติกในแม่น้ำเจ้าพระยาของประเทศไทย (Ericsson and Johansson, 2018; Sanya et al., 2018) การรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS, PP และ PBS ของหอยแมลงภูแสดงให้เห็นความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเข้มข้นของไมโครพลาสติกที่เพิ่มขึ้น ไมโครพลาสติกส่วนใหญ่จะสะสม

ในเนื้อเยื่อมากกว่าที่เหงือกตามระยะเวลาของการกรองกิน 96 ชั่วโมง หอยแมลงภู่สามารถกรองกินอนุภาคของไมโครพลาสติกและส่งต่อไปยัง cilia ซึ่งมีอัตราการกรองน้ำ 50 มิลลิลิตรต่อนาที (Famme et al., 1986) ไมโครพลาสติกเหล่านี้อาจถูกดักจับและติดอยู่ในเมือกของพื้นผิวเหงือก หลังจากนั้นจะถูกขนส่งเข้าสู่ระบบย่อยอาหาร (Beyer et al., 2017; Bråte et al., 2018; Kolandhasamy et al., 2018) อย่างไรก็ตามไม่ใช่ไมโครพลาสติกทั้งหมดที่จะถูกดักจับโดยเหงือกของหอยแมลงภู่ระหว่างที่กรองกินเข้าไป (Santana et al., 2016) เนื่องจากหอยแมลงภู่สามารถเลือกและคัดแยกอนุภาคที่ไม่ให้สารอาหาร เพื่อปกป้องตัวเองจากอนุภาคแขวนลอยในมวลน้ำที่มีความเข้มข้นสูง (Ward และ Shumway, 2004) ไมโครพลาสติกประเภท PS สะสมในต่อมย่อยอาหารมากกว่าในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก (Khun และ Prezant, 2018; Gonçalves et al., 2019; Franzellitti et al., 2019; Fabbri et al., 2020) ในทำนองเดียวกันจากการรายงานของ Van Cauwenberghe และคณะ (2015), Porter และคณะ (2018), และ Qu และคณะ (2018) แสดงให้เห็นว่าหอยแมลงภู่สามารถกรองกินและสะสม PS ในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ได้ทั้งหมด (*Mytilus edulis*) ในทำนองเดียวกัน ในการสะสม PP จากการรายงานของ Porter และคณะ (2018) แสดงให้เห็นถึงความสามารถของหอยแมลงภู่ (*M. edulis*) ในการกรองกิน PP และสะสมไปยังเนื้อเยื่อทั้งหมดมากกว่าในเหงือก นอกจากนี้ Revel และคณะ (2019) รายงานว่าหอยแมลงภู่ (*M. edulis*) สะสม PP ในต่อมย่อยอาหารและเพิ่มกิจกรรมของกรด phosphatase ในเม็ดเลือดของหอยแมลงภู่ และในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับการสะสมของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพในหอยแมลงภู่ แต่จากการรายงานของ Kolandhasamy และคณะ (2018) รายงานว่าไมโครพลาสติกสามารถสะสมได้ที่บริเวณเหงือก ต่อมย่อยอาหาร และตับอ่อน ซึ่งอวัยวะเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยอาหาร

นอกจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ การศึกษาการสะสมไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติมีการรายงานความเข้มข้นของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ (*M. edulis*) ในสหราชอาณาจักรอยู่ที่ 0.7-2.9 ชิ้น/กรัมของน้ำหนักเปียกของหอยแมลงภู่ (Li et al., 2018) รูปแบบนี้คล้ายกับที่รายงานในหอยแมลงภู่ (*M. edulis*) จากนอร์เวย์ (Brate et al., 2018) และหอยแมลงภู่ (*Perna canaliculus*) ในนิวซีแลนด์ (Webb et al., 2019) จากการรายงานของ Cho และคณะ (2018) พบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของไมโครพลาสติกในหอยสองฝาสี่สายพันธุ์ที่เป็นที่นิยม ได้แก่ หอยนางรม (*Crassostrea gigas*), หอยแมลงภู่ (*M. edulis*), หอยแครง (*Tapes philippinarum*) และหอยเชลล์ (*Patinopecten yessoensis*) ในประเทศเกาหลีพบจำนวน  $0.15 \pm 0.20$  ชิ้น/กรัม และ  $0.97 \pm 0.74$  ชิ้น/ตัวหอย สำหรับการศึกษากการสะสมไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) ในประเทศไทยพบ

จำนวน 1-13 ชิ้น/ตัวหอยแมลงภู (Chinfak et al., 2021) นอกจากนี้ Thushari และคณะ (2017) รายงานการสะสมของไมโครพลาสติกในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ Striped barnacle (*Balanus amphitrite*), หอยนางรม (*Saccostrea forskalii*) และ Periwinkle (*Littoraria* sp.) ในประเทศไทยพบปริมาณการสะสม 0.2–0.6 ชิ้น/กรัมน้ำหนักเปียกของตัวอย่าง จากข้อมูลเหล่านี้เป็นการบ่งชี้ระดับมลพิษที่สูงขึ้นตลอดชายฝั่งทะเล โดยประเภทพอลิเมอร์ที่พบ ได้แก่ PE-polyethylene (ร้อยละ 23) PS-polystyrene (ร้อยละ 22) PP-polypropylene (ร้อยละ 12) และ PE-polyester (ร้อยละ 9) (Cho et al., 2018; De Sá et al., 2018) ในขณะที่การรายงานพบ PS ในสัตว์ส่วนที่สูงในหอยแมลงภูชั้นบนของเสาเกาะที่เลี้ยงในฟาร์ม (Cho et al., 2018) ระดับการสะสมของไมโครพลาสติกในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ได้จากการศึกษาในภาคสนามสะท้อนให้เห็นถึงสถานะสุขภาพของสิ่งแวดล้อมทางทะเล นอกจากนี้ปริมาณการแพร่กระจายของหอยแมลงภูมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับกิจกรรมของมนุษย์ (Li et al., 2019) ดังนั้นการศึกษาในภาคสนามของไมโครพลาสติกเหล่านี้จึงช่วยให้เราเข้าใจถึงการสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภูที่อาจนำมาสู่ผลกระทบทางพิษวิทยาที่เกี่ยวข้องการส่งผ่านทางห่วงโซ่อาหารแก่ผู้บริโภคชั้นที่สูงขึ้น

ในระหว่างการกรอกกินไมโครพลาสติกทั้ง 3 ประเภทแบบเฉียบพลัน การกรอกกินของ ไมโครพลาสติกมีความสัมพันธ์กับรูปร่างของไมโครพลาสติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยรูปร่างแบบ fragment และแบบ film ที่มีขนาดมากกว่า 1,000  $\mu\text{m}$  พบอัตราการตายตั้งแต่ร้อยละ 40-100 ในขณะที่ Gray และคณะ (2017) พบว่าไมโครพลาสติกที่ถูกกรอกกินขนาดมากกว่า 50  $\mu\text{m}$  มีอัตราการตายตั้งแต่ร้อยละ 5-40 โดยรูปร่างของไมโครพลาสติกในสิ่งมีชีวิตที่เก็บรวบรวมระหว่างการสำรวจภาคสนามมีความหลากหลาย โดยรูปร่างส่วนมากที่พบในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภูเป็นรูปร่างแบบ fragment (ร้อยละ 23) ซึ่งมากกว่ารูปร่างแบบ film ที่พบการสะสมเพียงร้อยละ 8 (De Sá et al., 2018) จากการรายงานโดย Vroom และคณะ (2017) พบว่าโคพีพอด (*Calanus finmarchicus*) ช่วงวัยรุ่นและตัวเต็มวัยมีการสะสมไมโครพลาสติกรูปร่าง fragment ขนาดเล็กกว่า 30  $\mu\text{m}$  ความเป็นพิษที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการกรอกกินไมโครพลาสติกที่มีความแตกต่างของรูปร่าง เนื่องจากมีการรายงานว่ารูปร่างของไมโครพลาสติกอาจมีอิทธิพลอย่างมากต่อการขนส่งของไมโครพลาสติก นอกจากนี้รูปร่างแบบ fragment มีลักษณะแข็งและขรุขระ ในขณะที่รูปร่างแบบ film มีความโปร่งใส นุ่ม และบาง ดังนั้นรูปร่างของไมโครพลาสติกอาจส่งผลต่อการดูดซึมและความรุนแรงของผลกระทบทางชีวภาพที่เกิดขึ้นเนื่องจากความแตกต่างของระยะเวลาในการเดินทางของไมโครพลาสติกในระบบย่อยอาหาร (Botterell et al., 2019)

ขนาดของไมโครพลาสติกก็อิทธิพลต่อการดูดซึมของหอยแมลงภู่มิโครพลาสติกขนาดใหญ่ ส่วนใหญ่พบในเนื้อเยื่อมากกว่าขนาดอื่น จากการรายงานของ Moore (2008) พบว่าขนาดที่เหมาะสมที่สุดของไมโครพลาสติกสำหรับการกรองกินนั้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร สอดคล้องกับการรายงานของ Van Cauwenberghe และคณะ (2015) ที่ตรวจพบไมโครพลาสติก ขนาดกลาง (90  $\mu\text{m}$ ) สะสมในเนื้อเยื่อและตรวจพบไมโครพลาสติกขนาดใหญ่ (15-500  $\mu\text{m}$ ) ในมูลตะกอนของหอยแมลงภู่มิโครพลาสติกขนาดเล็กถูกกำจัดออกมาในปริมาณมากทันที แม้ว่า จะตรวจพบจำนวนเล็กน้อยหลังจากนั้นก็ตาม อย่างไรก็ตาม ขนาดใหญ่จะถูกขับออกมาเป็นกลุ่มอย่าง ช้า ๆ จากการรายงานของ Gray และคณะ (2017) และ Murray และ Cowie, 2011 พบไมโคร พลาสติกความยาวน้อยกว่า 50  $\mu\text{m}$  ในกุ้งก้ามกราม (*Palaemonetes pugio*) และกุ้ง (*Nephrops norvegicus*) ซึ่งการมีอยู่ของไมโครพลาสติกอาจเกี่ยวข้องกับการไม่สามารถแยกอนุภาคจึงนำไปสู่ การสะสมในบริเวณส่วนหน้าของสัตว์ทดลอง จากการศึกษาของ Lu และคณะ (2016) รายงานว่าพบ PS ขนาดกลาง (70  $\mu\text{m}$ ) ในปลา zebrafish (*Danio rerio*) หลังการกรองกินผ่านไป 7 วัน ซึ่งการมี อยู่ของ PS ส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของ superoxide dismutase และ catalase

### 5.3 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการแสดงออกภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) ในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่มิ (*Perna viridis*)

มีรายงานการตรวจพบไมโครพลาสติกในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นจำนวนมาก (Trestrail et al. 2020) จึงมีความเป็นไปได้ที่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะกลืนกินไมโครพลาสติกเข้าไป (Setala et al. 2014) ซึ่งการกลืนกินไมโครพลาสติกนำไปสู่การลดอัตราการเติบโต (Murphy และ Quinn 2018, Lo และ Chan 2018), ลดอัตราการสืบพันธุ์ (Sussarellu et al. 2016) และอาจนำไปสู่การตายได้ (Galloway & Lewis, 2016) อย่างไรก็ตาม กลไกของปฏิกิริยาที่เป็นพิษเหล่านี้ยังคงไม่แน่นอน ใน การศึกษาครั้งนี้ พบว่าไมโครพลาสติกสามประเภท คือ PS, PP และ PBS ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งเมื่อเกิดการ oxidized จะกลายเป็น reactive oxygen species (ROS) นำไปสู่การเกิด ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การขนส่งสัญญาณภายในเซลล์ จนไปถึงการเกิด apoptosis ทำให้มีผล ทางชีวภาพต่อหอยแมลงภู่มิ (Avio et al., 2015; Bhabra et al., 2009; Détrée & Gallardo-Escárate, 2017; Magni et al., 2018) เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นในการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูล อิสระ (CAT, POD) และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ (GSH) โดยหอยแมลงภู่มิแสดงระดับ การตอบสนองที่แตกต่างกันตามประเภทของไมโครพลาสติก แม้ว่าอนุมูลอิสระเป็นเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นใน ร่างกายเป็นปกติ และร่างกายจะมีการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ออกไปผ่านทางเอนไซม์ต้านอนุมูล อิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ แต่หากเกิดการไม่สมดุลกันระหว่างการเกิดและการต้านอนุมูลอิสระ

นั้นจะส่งผลเสียต่อสุขภาพของหอยแมลงภู่นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า ROS ที่เกิดขึ้นจากการสะสมไมโครพลาสติกมีผลต่อการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ทำให้มีผลต่อการทำงานของ MAPK (Mitogen-activated protein kinase) pathways และ Nrf2 (Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2) จากการตรวจวัดระบบ antioxidant defense (Jeong et al., 2017) โดย MAPK จะประกอบไปด้วย ERK, JNK และ p38 ซึ่งเป็นสายโซ่ของโปรตีนในเซลล์ที่ส่งสัญญาณจากตัวรับบนพื้นผิวของเซลล์ไปยัง DNA ในนิวเคลียสของเซลล์ ส่งผลให้เกิดผลกระทบต่อสรีรวิทยาของเซลล์ (Sato et al., 2014; Son et al., 2011; Wang et al., 2011) ERK signaling pathways ทำงานเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์และการเพิ่มจำนวนในการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ในขณะที่ JNK และ P38 มักเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ (Matsuzawa & Ichijo, 2008) นอกจาก MAPK แล้ว Nrf2 ยังถือเป็นปัจจัยสำคัญในการ transcription สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

สำหรับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) เป็นสารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (Free Radical) ได้แก่ SOD, CAT และ POD ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจวัด antioxidant enzymes ไม่พบความแตกต่างระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับ Wang และคณะ (2020) รายงานว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide dismutase (SOD) ในหอยแมลงภู่นิวเคลียส (*Mytilus coruscus*) หลังจากกรอกกินไมโครพลาสติกประเภท PS ขนาด 2  $\mu\text{m}$  ที่ความเข้มข้น  $10^4$  ชิ้น/ลิตร และ  $10^6$  ชิ้น/ลิตรเมื่อเทียบกับชุดควบคุมหลังจากกรอกกินผ่านไป 7 วัน สอดคล้องกับการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในปลาหมอสี (*Danio rerio*) ที่กลืนกินไมโครพลาสติกประเภท PS ขนาด 70 nm และ 5  $\mu\text{m}$  ที่ความเข้มข้น 20, 200, และ 2000  $\mu\text{g}$ /ลิตร พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide dismutase (SOD) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำ กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียดต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งบ่งชี้ว่าเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการล้างพิษจากความเครียดออกซิเดชัน

ความเครียดจากออกซิเดชันสามารถคาดการณ์ได้จากกิจกรรม CAT ที่กำจัด  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่เกิดขึ้น (Soldatov et al., 2013; Vasanthi et al., 2021) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้กิจกรรม CAT เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นไมโครพลาสติกที่สูงขึ้นและเวลาที่ใช้ในการกรอกกินมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Vasanthi และคณะ (2021) ที่พบปริมาณกิจกรรมของ CAT เพิ่มขึ้นในต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่นิวเคลียส (*Perna viridis*) ที่กรอกกินไมโครพลาสติกความเข้มข้น 50–250

มิลลิกรัม/ลิตร เช่นเดียวกับการรายงานของ Wang และคณะ (2020) ตรวจพบปริมาณกิจกรรม CAT เพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสกับไมโครพลาสติกที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งบ่งชี้ว่ากิจกรรม CAT ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจาก CAT ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ป้องกันไมโครพลาสติก

สำหรับการศึกษากิจกรรม POD ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ  $H_2O_2$  ให้เป็นน้ำ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นไมโครพลาสติกที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้ามการศึกษา Scopetani และคณะ (2020) พบ POD ในเพรียงทะเล (*Tubifex tubifex*) ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่กรองกินไมโครพลาสติกเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ดังนั้นกระบวนการกำจัด ROS นั้นเป็นผลมาจากเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกันโดยเอนไซม์ SOD จะเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่เข้ามาเปลี่ยนรูปของ superoxide ( $O_2^-$ ) ทำให้เกิด hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) จากนั้นเอนไซม์ CAT และ POD จะเข้ามากำจัด hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ให้กลายเป็นน้ำในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยา

สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ (GSH) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการ modulator ในเฟส II ของกระบวนการ detoxification หลังเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเป็นหนึ่งในกลไกการขนส่ง amino acids ระหว่างเซลล์ (Jeong et al., 2017) หอยแมลงภู่ในการศึกษาครั้งนี้พบระดับการเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไมโครพลาสติกเพิ่มขึ้นจึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม สอดคล้องกับการรายงานของ Wang และคณะ (2020) ที่พบระดับกิจกรรมของ GSH ที่เพิ่มขึ้นในหอยแมลงภู่ (*Mytilus coruscus*) หลังจากกรองกินไมโครพลาสติกประเภท PS ขนาด  $2 \mu m$  ที่ความเข้มข้น  $10^4$  ชิ้น/ลิตร และ  $10^6$  ชิ้น/ลิตร หลังจากกรองกินเป็นเวลา 7 วัน แตกต่างกับการศึกษาระดับกิจกรรมของ GSH ที่เพิ่มขึ้นในปู (*Eriocheir sinensis*) ที่กลืนกินไมโครพลาสติกประเภท PS ที่มีความเข้มข้นต่ำ (40 และ 400 ไมโครกรัม/ลิตร) และเมื่อความเข้มข้นไมโครพลาสติกเพิ่มขึ้นกิจกรรมของ GSH ก็ลดลงตามผลของความเข้มข้นไมโครพลาสติกที่สูงขึ้น (4000 และ 40000 ไมโครกรัม/ลิตร) หลังจากกลืนกินเป็นเวลา 7 วัน (Yu et al., 2018) ในทำนองเดียวกันจากการรายงานของ Lu และคณะ (2016) พบว่าไมโครพลาสติกประเภท PS ขนาด  $70 \text{ nm}$  และ  $5 \mu m$  ที่ความเข้มข้น 20, 200, และ 2000  $\mu g$ /ลิตร ยับยั้งการทำงานของ GSH ในปลาม้าลาย (*Danio rerio*)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงบทบาทหน้าที่ของ GSH ในกระบวนการทางชีววิทยาต่าง ๆ เช่น การสังเคราะห์ DNA, กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ microtubular และการทำงานของภูมิคุ้มกัน GSH content อาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต (Meister & Anderson, 1983)

#### 5.4 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

จากการศึกษาการรุกรานของไมโครพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ จะพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงที่บริเวณ Digestive tubules ทำให้ tubules lumen มีลักษณะกว้างขึ้น เนื่องจากในภาวะปกติต่อมย่อยอาหารในกลุ่มชุดควบคุม จะมีลักษณะแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยโครงสร้างของต่อมย่อยอาหารจะประกอบด้วย ท่อแขนงขนาดเล็กที่แตกแขนงออกไป และบริเวณปลายท่อจะมีลักษณะกลมตันคล้ายกระเปาะหรือถุง เรียกว่า digestive diverticulum ซึ่งจะมีถุงนี้เป็นจำนวนมากแทรกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ภายในถุงมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียวมีเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบ 2 แบบ ได้แก่ เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) มีลักษณะเซลล์รูปทรงกระบอกสูงมักพบนิวเคลียสที่บริเวณฐานของเซลล์ และเซลล์แบซิฟิลิก (basophilic cell) หรือเซลล์คริปท์ (crypt cell) เป็นเซลล์ทรงเตี้ยลักษณะคล้ายพีระมิด โดยพบนิวเคลียสและไซโทพลาซึมย้อมติดสีเบสหรือสีฮีมาทอกซิลินสามารถเห็นเป็นสีที่เข้มกว่าเนื้อเยื่อบริเวณอื่น ๆ กลุ่มเซลล์กระจุกรวมกันอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane) จากเซลล์ที่พบในท่อทั้งสองกลุ่มมีความสูงไม่เท่ากันส่งผลให้การเรียงตัวของเซลล์ทั้งสองกลุ่มภายในท่อเกิดรูปร่างเป็นแฉกขึ้น (tubules lumen) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะปกติที่พบได้ทั่วไปในหอยแมลงภู่ที่อยู่สภาวะปกติ (Bignell et al., 2011; Cuevas et al., 2015) ในขณะที่หอยแมลงภู่ที่รุกรานไมโครพลาสติกพบความผิดปกติของ ความแตกต่างของเซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) และเซลล์แบซิฟิลิก (basophilic cell) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมส่งผลให้การเรียงตัวของเซลล์ทั้งสองกลุ่มภายในท่อทำให้เกิดรูปร่างเป็นแฉกลดลง (tubules lumen) และพบความเสียหายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ซึ่งจากความผิดปกติของเซลล์ย่อยอาหารและเซลล์แบซิฟิลิกของกลุ่มที่รุกรานไมโครพลาสติกซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของการพัฒนาของ mitotic stage (Usheva et al., 2006)



## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลกระทบของไมโครพลาสติก 3 ประเภทคือ พอลิสไตรีน (Polystyrene; PS), โพลีโพรพิลีน (Polypropylene; PP) และพอลิบิวทีลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate; PBS) ที่ระดับความเข้มข้น 66, 333, 666 และ 1333 ชิ้น/ลิตร จำนวน 3 ขนาดได้แก่ ขนาดเล็ก (<30 ไมโครเมตร), ขนาดกลาง (30-300 ไมโครเมตร) และขนาดใหญ่ (300-1000 ไมโครเมตร) ที่ส่งผลต่ออัตราการตายครั้งหนึ่งของประชากร, การสะสมไมโครพลาสติกในเนื้อเยื่อ, ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงทางมิถุนวิทยาในหอยแมลงภู่ *P. viridis* ดังแสดงในรูป 49

#### 6.1. ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่ออัตราการตายของหอยแมลงภู่

ผลการศึกษาอัตราการตายครั้งหนึ่งของประชากรพบว่าไมโครพลาสติกขนาดกลางและขนาดใหญ่ส่งผลต่ออัตราการตายครั้งหนึ่งของหอยแมลงภู่มากที่สุดในไมโครพลาสติกประเภท PS, PP และ PBS ตามลำดับ ซึ่งหอยแมลงภู่สามารถแยก อนุภาคที่ไม่สามารถรองกินได้และจะกำจัดพวกมันในรูปของ pseudofaeces แสดงให้เห็นว่าไมโครพลาสติกขนาดเล็กจะถูกสะสมไว้เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ในลำไส้มากกว่าไมโครพลาสติกขนาดใหญ่ โดยขนาดใหญ่มีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดปัญหาเฉียบพลันมากกว่าขนาดเล็กเนื่องจากไมโครพลาสติกเหล่านี้ส่วนใหญ่ถูกขับออกจากทางเดินอาหารของหอยแมลงภู่ออย่างรวดเร็ว

#### 6.2 การสะสมของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู่ *Perna viridis*

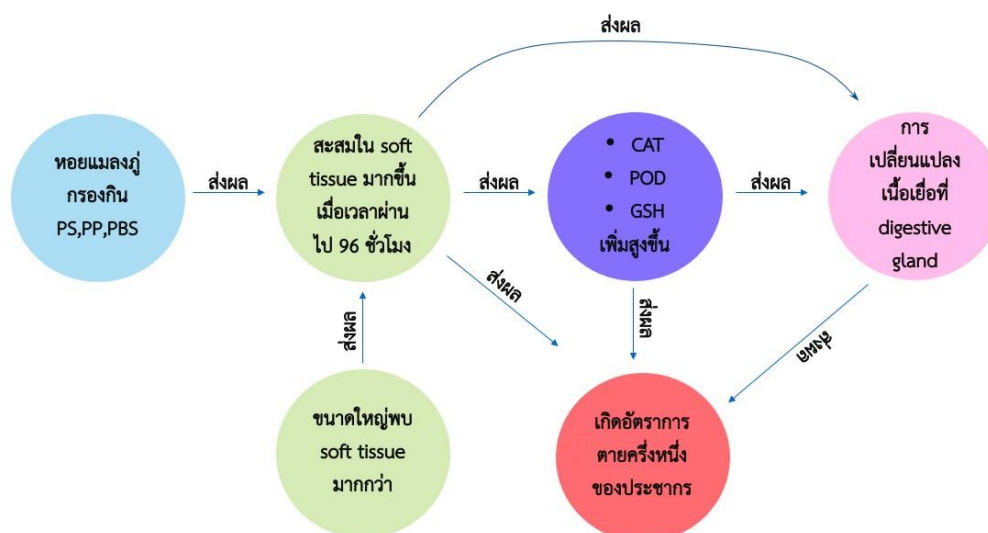
ในขณะที่การสะสมไมโครพลาสติกขนาดใหญ่พบในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ *P. viridis* มากกว่าขนาดกลางและขนาดเล็ก ไมโครพลาสติกสะสมในต่อมย่อยอาหารมากกว่าในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก หอยแมลงภู่ที่สะสมไมโครพลาสติกในต่อมย่อยอาหารจะเพิ่มกิจกรรมของกรด phosphatase ในเม็ดเลือดของหอยแมลงภู่ และในปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยที่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับการสะสมของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพในหอยแมลงภู่ แต่จากการรายงานว่ามีไมโครพลาสติกสามารถสะสมได้ที่บริเวณเหงือก ต่อมย่อยอาหาร และตับอ่อน ซึ่งอวัยวะเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยอาหาร

### 6.3 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการแสดงออกภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) ใน ต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

ในส่วนของการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อบริเวณต่อมย่อยอาหารและมีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ CAT, POD และ สารต้านอนุมูลอิสระ GSH บริเวณต่อมย่อยอาหารสอดคล้องกับอัตราการตายและการสะสมไมโครพลาสติก พบมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระตามการเพิ่มขึ้นของไมโครพลาสติกเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งการเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ หากมีมากจะส่งผลต่อการเกิด apoptosis ภายในเซลล์

### 6.4 ผลกระทบของไมโครพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

นอกจากนี้ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางมิถุวิทยาในบริเวณต่อมย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ *P. viridis* มีลักษณะเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเสียหายและพบว่าเซลล์ย่อยอาหารในต่อมย่อยอาหารมีความเสียหาย สังเกตความผิดปกติได้ชัดเจนมากขึ้นตามความเข้มข้นของไมโครพลาสติกที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 49 แผนผังสรุปความเชื่อมโยงของผลการศึกษา

## 6.5 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาถึงผลกระทบของไมโครพลาสติกแบบเฉียบพลันในหอยแมลงภู่นั้น ดังนั้นหากมีผู้ที่สนใจในการนำไปศึกษาเพิ่มเติมการศึกษผลกระทบในระยะยาว และศึกษาอัตราการคายของไมโครพลาสติกในหอยแมลงภู์และในกลุ่มหอยสองฝาที่มีความจำเป็นสำหรับข้อมูลในการต่อยอดเพื่อใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการควบคุมคุณภาพน้ำในแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยสองฝา

2. การศึกษาการสะสมไมโครพลาสติกใน soft tissue และในมูลตะกอนเมื่อย่อยด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% ไมโครพลาสติกที่นำมาส่องใต้กล้องสเตอริโออาจนำมาส่องผ่าน FTIR เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างพลาสติกหลังถูกกรองกินด้วยหอยแมลงภู์

3. ในอนาคตควรมีการศึกษาระดับโมเลกุลที่ปลดปล่อยจากไมโครพลาสติกที่อาจส่งผลกระทบต่อหอยแมลงภู์ และหอยสองฝาชนิดอื่น เพื่อให้ทราบแนวโน้มความเป็นพิษและเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังและประเมินความเสี่ยงของการเกิดพิษในการบริโภคหอยสองฝา

ภาคผนวก

ตารางที่ ก 1 อาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชสูตร T1

ลำดับ	องค์ประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร (มล./ลิตร)
1.	<b>NaNO<sub>3</sub></b> ชั่งสาร 8.499 กรัม/น้ำกลั่น 100 มล.	1.0 M	0.5
2.	<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> ชั่งสาร 1.5601 กรัม/น้ำกลั่น 100 มล.	0.1 M	0.5
3.	<b>Fe-EDTA</b> ทำเป็น stock 50 mM โดยจะต้องชั่งสาร 1.8351 กรัม/น้ำกลั่น 100 มล. เวลาใช้เปิดจาก stock มา 10 มล. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล. ด้วย volumetric flask	0.5 M	0.5
4.	<b>H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub></b> ทำเป็น stock 100 mM โดยจะต้องชั่งสาร 1.2898 กรัม/น้ำกลั่น 100 มล. เวลาใช้เปิดจาก stock มา 0.01 มล. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล. ด้วย volumetric flask	0.01 M	0.5
5.	<b>Na<sub>2</sub>-EDTA</b> ชั่งสาร 3.7224 กรัม/น้ำกรัม 100 มล.	100 mM	1.0
6.	<b>Tris-HCl buffer</b> ชั่งสาร 19.7 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เดิมกรด HCl conc. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล. วัด pH ให้ได้	2.5 M	4.0
7.	<b>Trace metal solution</b> ประกอบไปด้วย CoCl <sub>2</sub> 20.0 mM ปริมาตร 1.0 มล., CuSO <sub>4</sub> 10.0 mM ปริมาตร 0.1 มล., ZnSO <sub>4</sub> 1.0 mM ปริมาตร 1.0 มล., MnCl <sub>2</sub> 10.0 mM ปริมาตร 1.0 มล., NaMoO <sub>4</sub> 50.0 mM ปริมาตร 1.0 มล., Na <sub>2</sub> EDTA 48.0 mM ปริมาตร 50 มล. นำมารวมกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มล. วัด pH ให้ได้ 10 แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง GF/C	-	0.5
8.	<b>Vitamin mixed</b> ประกอบไปด้วย Biotin 1 มล./ลิตร ปริมาตร 1.0 มล., Vitamin B12 1 มล./ลิตร ปริมาตร 1.0 มล., Vitamin B1 200 ไมโครกรัม/ลิตร ปริมาตร 0.2 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มล. วัด pH ให้ได้ 4 ด้วย HCl แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง GF/C	-	0.5

## ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข1 ปริมาณความเข้มข้นโปรตีนและสารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระในหอยแมลงภู่หลังจากที่ได้รับไมโครพลาสติกประเภท PS

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	Protein CONC. (mg/ml)	Antioxidant activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	CAT activity (µmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	POD activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	Total GSH (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	
12	<30	0	31.8±2.6	0.02±0.0	0.2±0.0	11.6±0.2	2.0±1.7	
		66	10.24±3.2	0.06±0.02	11.6±0.2	18.7±0.0	3.1±0.9	
		333	11.65±5.6	0.06±0.03	27.1±0.0	29.5±0.0	3.0±0.8	
		666	11.44±3.5	0.05±0.02	36.5±0.0	32.4±0.1	3.1±0.6	
		1333	13.46±3.7	0.04±0.01	37.4±0.7	35.1±0.0	6.1±1.6	
	30-300	66	12.09±0.3	0.05±0	16.1±0.3	41.5±0.0	3.2±0.4	
		333	12.3±0.3	0.04±0	38.3±0.6	45.0±0.0	3.6±2.8	
		666	15.1±2.9	0.04±0.01	39.5±0.5	44.8±0.0	4.1±0.4	
		1333	13.14±5.4	0.05±0.03	53±0.3	45.9±0.0	5.1±0.6	
	300-1000	66	15.47±2.3	0.04±0.01	29±0.0	35.4±0.0	2.8±2	
		333	17.3±0.9	0.04±0.01	48.1±0.5	43.4±0.1	2.6±1	
		666	13.8±5.5	0.05±0.01	51.9±0.0	53.1±0.2	4.5±0.6	
		1333	14.32±0.9	0.04±0.01	71.4±0.0	53.9±0.0	4.9±2.7	
	24	<30	0	31.8±2.6	0.02±0	0.2±0.0	10.5±0.2	1.5±0.5
			66	14.37±1.7	0.04±0	18.9±0.1	23.5±0.0	3.3±1
			333	15.88±2.7	0.04±0.01	33.8±0.6	31.0±0.0	3.4±1
666			15.16±6.2	0.04±0.01	37.6±0.7	27.2±0.0	4.6±0.7	
1333			17.62±1.2	0.03±0	51.1±0.6	34.6±0.2	6.2±1.3	
30-300		66	20.24±1.0	0.03±0	29.5±0.0	41.5±0.3	3.4±1.8	
		333	18.16±4.9	0.03±0.01	34±0.0	46.7±0.3	4.1±1.6	
		666	17.15±4.9	0.04±0.01	49.5±0.3	40.0±0.0	6.4±0.6	
		1333	14.1±0.5	0.04±0.01	68±0.6	55.6±0.0	8.6±1.3	
300-1000		66	15.73±1.0	0.04±0	40.3±0.0	40.0±0.0	5.3±0.8	
		333	20.49±2.9	0.03±0	52.4±0.0	38.8±0.0	5.0±1.9	
		666	19.81±0.2	0.03±0	68.9±0.2	42.6±0.0	10.4±2.6	
		1333	15.83±0.6	0.04±0	80.3±0.0	59.0±0.1	14.1±0.8	

ตารางที่ ข1 ปริมาณความเข้มข้นโปรตีนและสารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระในหอยแมลงภู่หลังจากที่ได้รับไมโครพลาสติกประเภท PS (ต่อ)

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	Protein CONC. (mg/ml)	Antioxidant activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	CAT activity (µmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	POD activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	Total GSH (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	
48	<30	0	22.24±4.2	0.03±0.01	0.3±0.0	10.3±0.0	2.2±0.5	
		66	14.27±3.7	0.04±0.01	31±0.0	18.8±0.1	5.0±1.8	
		333	13.72±5.1	0.05±0.01	41±0.7	29.3±0.1	4.7±2.5	
		666	14.5±1.1	0.04±0	39±0.2	36.2±0.1	5.0±0.9	
		1333	15.38±1.9	0.04±0.01	81±0.9	29.8±0.0	6.8±2.7	
	30-300	66	19.44±5.3	0.03±0	33.9±0.2	33.4±0.0	5.1±2.7	
		333	23.41±3.5	0.02±0	33.3±0.1	30.0±0.1	5.6±2.6	
		666	18.24±1.6	0.03±0	51.5±0.1	33.0±0.1	6.5±2.5	
		1333	18.37±3.5	0.03±0.01	49.0±0.1	43.3±0.0	7.6±0.4	
	300-1000	66	18.74±1.6	0.03±0	36.5±0.1	37.2±0.0	3.0±1.5	
		333	19.29±3.5	0.03±0.01	53.4±0.0	40.2±0.0	1.9±2.3	
		666	18.85±1.6	0.03±0	63.3±0.2	40.0±0.0	2.9±1.3	
		1333	22.33±2.8	0.02±0	67.3±0.1	43.0±0.0	12.1±2.4	
	96	<30	0	19.53±5.5	0.04±0.01	2±0.0	14.9±0.1	2.8±0.6
			66	17.47±1.0	0.03±0.01	13.3±0.0	20.3±0.0	2.4±4.1
			333	15.85±2.9	0.04±0.01	13.7±0.5	34.0±0.0	1.6±1.3
666			20.81±8.7	0.03±0	20±0.5	37.6±0.0	2.0±3.0	
1333			16.94±1.5	0.03±0.01	26.9±0.6	39.6±0.1	2.1±2.7	
30-300		66	26.76±0	0.01±0.01	15±0.0	20.3±0.0	2.6±0.2	
		333	25.68±0	0.01±0.01	24±0.0	32.4±0.0	1.4±0.1	
		666	18.18±0	0.01±0	24±0.0	42.3±0.0	2.9±0.2	
		1333	17.55±0	0.01±0	47±0.0	45.0±0.0	2.0±0.3	
300-1000		66	16.71±0	0.01±0	20.9±0.0	43.4±0.0	2.3±0.1	
		333	20.43±0	0.01±0	24.4±0.0	43.3±0.0	1.6±0.1	
		666	20.55±0	0.01±0.02	28.9±0.0	48.8±0.0	1.1±0.1	
		1333	11.01±0	0.02±0.03	43.5±0.0	44.9±0.0	1.9±0.1	

ตารางที่ ข2 ปริมาณความเข้มข้นโปรตีนและสารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระในหอยแมลงภู่หลังจากที่ได้รับไมโครพลาสติกประเภท PP

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	Protein CONC. (mg/ml)	Antioxidant activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	CAT activity (µmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	POD activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	Total GSH (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	
12	<30	0	10.92±4.0	0.06±0.02	1.8±0.0	9.8±0.1	6.4±3.2	
		66	11.62±1.3	0.05±0.01	13.9±0.1	10.6±0.1	6.1±3.2	
		333	10.8±3.7	0.05±0.02	28.9±0.0	24.9±0.1	7.2±2.9	
		666	10.31±0.3	0.05±0	38.6±0.0	36.5±0.2	8.6±6.4	
		1333	10.97±2.4	0.07±0.02	54.7±0.0	38.7±0.0	7.4±5.6	
	30-300	66	10.79±2.4	0.06±0.02	16.1±0.0	16.9±0.0	4.8±2.7	
		333	10.88±1.4	0.05±0.01	36.4±0.1	25.2±0.1	6.3±4.2	
		666	10.01±2.9	0.06±0.02	39.0±0.0	39.7±0.0	6.8±4.1	
		1333	10.26±3.6	0.06±0.02	49.7±0.0	45.8±0.0	6.6±5.0	
	300-1000	66	12.09±1.3	0.05±0.01	18.1±0.0	17.7±0.0	6.2±3.0	
		333	10.28±4.4	0.06±0.02	42.8±0.0	29.9±0.1	5.8±3.4	
		666	8.5±2.9	0.07±0.02	49.5±0.1	43.6±0.1	4.6±3.3	
		1333	14.31±2.4	0.04±0.01	66.4±0.1	48.7±0.1	9.3±4.6	
	24	<30	0	6.45±3.9	0.13±0.1	2.2±0.0	11.2±0.1	4.6±3.3
			66	14.75±2.7	0.04±0.01	19.8±0.1	16.4±0.0	7.0±2.7
			333	9.59±2.3	0.06±0.01	34.1±0.1	28.6±0.0	5.9±3.3
666			12.57±1.2	0.04±0	42.1±0.0	33.3±0.0	5.9±3	
1333			11.34±3.1	0.05±0	62.8±0.1	43.6±0.0	7.5±2.9	
30-300		66	11.61±0.6	0.05±0.01	26.6±0.0	24.3±0.1	6.0±2.6	
		333	11.67±3.3	0.05±0.01	34.0±0.0	41.4±0.0	5.7±3.2	
		666	10.45±1.3	0.05±0.01	46.0±0.0	40.4±0.0	5.1±2.9	
		1333	9.32±1.8	0.06±0.01	63.5±0.1	55.5±0.0	5.2±3.3	
300-1000		66	12.06±1.7	0.05±0.01	36.5±0.0	25.4±0.0	6.7±2.9	
		333	12.82±3.2	0.04±0.01	45.7±0.0	39.6±0.0	5.4±3.0	
		666	18.85±7.2	0.03±0.01	55.6±0.1	39.7±0.0	15.4±2.5	
		1333	14.79±2.2	0.04±0.01	70.4±0.1	54.3±0.0	8.4±4.0	

ตารางที่ ข2 ปริมาณความเข้มข้นโปรตีนและสารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระในหอยแมลงภู่หลังจากที่ได้รับไมโครพลาสติกประเภท PP (ต่อ)

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	Protein CONC. (mg/ml)	Antioxidant activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	CAT activity (µmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	POD activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	Total GSH (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	
48	<30	0	8.58±1.1	0.07±0.01	2.3±0.0	9.9±0.1	7.9±5.5	
		66	16.48±3.1	0.03±0.01	33.8±0.2	13.9±0.0	23.1±3.1	
		333	17.69±4.4	0.03±0.01	36.6±0.1	29.3±0.1	7.0±3	
		666	13.12±2.0	0.04±0.01	40.5±0.1	32.2±0.1	10.6±6.9	
		1333	14.94±4.3	0.04±0.01	94.0±0.0	48.9±0.1	12.0±4	
	30-300	66	14.07±4.1	0.04±0.01	34.2±0.0	30.8±0.0	13.0±3.3	
		333	9.64±4.1	0.07±0.03	31.9±0.1	31.7±0.0	5.0±3.8	
		666	10.37±1.3	0.06±0.01	46.3±0.0	36.4±0.1	6.9±2.9	
		1333	8.93±2.9	0.07±0.03	66.2±0.1	50.6±0.0	7.8±7.7	
	300-1000	66	10.23±1.3	0.06±0.01	49.2±0.0	31.5±0.0	4.8±3	
		333	7.45±5.0	0.13±0.1	50.4±0.0	34.0±0.0	5.9±8.6	
		666	16.44±10.3	0.04±0.02	61.2±0.0	28.9±0.0	5.8±2.5	
		1333	12.05±12.5	0.02±0	43.7±0.7	42.6±0.0	9.4±7.4	
	96	<30	0	6.58±1.1	0	2.3±0.0	9.9±0.1	4±3.8
			66	2.65±4.6	0.02	50.5±0.0	18.5±0.0	3±3.2
			333	ไม่มีตัวอย่าง	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น
666			ไม่มีตัวอย่าง	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น
1333			ไม่มีตัวอย่าง	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น
30-300		66	3.74±6.5	0.02±0	41.2±0.0	34.1±0.0	3±3.2	
		333	ไม่มีตัวอย่าง	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น
		666	ไม่มีตัวอย่าง	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น
		1333	3.9±0.3	0.02±0	70±0.0	30±0.0	9±8.9	
300-1000		66	11.6±0	0.01±0	66.2±0.0	39.7±0.0	1±0.9	
		333	3.72±0.4	0.01±0	78.5±0.0	37.3±0.0	4±3.9	
		666	5.03±0.7	0	78.4±0.0	36.1±0.0	2±2.1	
		1333	ไม่มีตัวอย่าง	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น	ไม่มีตัวอย่างเป็น



ตารางที่ ข3 ปริมาณความเข้มข้นโปรตีนและสารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระในหอยแมลงภู่หลังจากที่ได้รับไมโครพลาสติกประเภท PBS

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	Protein CONC. (mg/ml)	Antioxidant activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	CAT activity (µmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	POD activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	Total GSH (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	
12	<30	0	17.96±6.8	0.03±0.01	1.3±0.0	9.4±0.1	3±0.1	
		66	18.76±3.2	0.03±0.01	3.0±0.0	5.6±0.1	3±0.1	
		333	18.98±2.9	0.03±0.01	10.2±0.0	22.9±0.1	3±0.1	
		666	16.29±3.9	0.04±0.01	12.0±0.0	30.9±0.2	3±0.1	
		1333	18.69±1.1	0.03±0.01	12±0.1	32.0±0.0	5±0.1	
	30-300	66	20.44±5.4	0.03±0.01	10.15±0.1	10.4±0.0	3±0.1	
		333	16.57±3.0	0.04±0.01	13.01±0.0	28.6±0.2	3±0	
		666	20.7±3.3	0.03±0.01	15.59±0.1	31.7±0.0	4±0.1	
		1333	21.42±6.4	0.03±0.01	19±0.0	34.9±0.0	5±0.1	
	300-1000	66	19.95±1.1	0.03±0.01	10.24±0.0	22.8±0.1	5±0.3	
		333	17.5±8.7	0.04±0.01	12.22±0.1	23.3±0.0	6±0.3	
		666	20.8±2.9	0.03±0.01	18.55±0.1	35.5±0.0	5±0.1	
		1333	23.99±3.0	0.03±0	20±0.1	47.9±0.4	3±1	
	24	<30	0	21.69±9.5	0.03±0.01	1.1±0.0	7.9±0.1	4±0.1
			66	20.76±2.3	0.03±0.01	8.6±0.0	11.8±0.1	5±0.4
			333	21.64±3.0	0.03±0.01	14.8±0.0	22.0±0.1	3±2.1
666			18.08±3.0	0.03±0.01	17.1±0.2	31.5±0.0	6±1.4	
1333			27.67±3.1	0.02±0.01	17±0.0	31.5±0.2	3±1.5	
30-300		66	23.28±3.5	0.03±0.01	11.27±0.1	12.5±0.2	8±1	
		333	20.6±4.5	0.03±0.01	14.87±0.2	29.2±0.0	4±1.2	
		666	22.91±3.2	0.03±0.01	15.76±0.1	30.8±0.0	4±1.2	
		1333	28.77±3.4	0.02±0.01	20±0.2	36.3±0.2	3±1	
300-1000		66	22.2±3.6	0.03±0.01	13.23±0.0	26.1±0.0	6±2.4	
		333	18.25±3.4	0.04±0.01	16.59±0.0	31.3±0.0	6±2.3	
		666	20.44±0.7	0.03±0.01	19.13±0.1	36.8±0.0	3±1.3	
		1333	24.77±4.7	0.02±0.01	24±0.2	49.3±0.1	5±2.2	

ตารางที่ ข3 ปริมาณความเข้มข้นโปรตีนและสารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระในหอยแมลงภู่หลังจากที่ได้รับไมโครพลาสติกประเภท PBS (ต่อ)

ชั่วโมง	ขนาด (µm)	ความเข้มข้น MPs (ชิ้น/ลิตร)	Protein CONC. (mg/ml)	Antioxidant activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	CAT activity (µmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	POD activity (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	Total GSH (nmoles mg <sup>-1</sup> Prot min <sup>-1</sup> )	
48	<30	0	21.69±9.5	0.03±0.02	1.1±0.0	7.9±0.1	4±1	
		66	17.71±2.2	0.03±0	13.5±0.0	18.3±0.1	8±4	
		333	21.03±5.9	0.03±0.01	14.7±0.1	18.2±0.0	6±2	
		666	20.06±3.4	0.03±0.01	17.4±0.0	25.3±0.1	5±1	
		1333	23.58±3.7	0.02±0	16±0.0	27.7±0.0	3±1	
	30-300	66	20.98±1.8	0.03±0	13.88±0.0	16.6±0.1	5±2	
		333	19.21±2.9	0.03±0	23.3±0.0	27.5±0.0	6±1	
		666	14.45±4.1	0.04±0.01	31.56±0.9	32.3±0.0	6±3	
		1333	16.22±3.5	0.04±0.01	36±0.2	44.1±0.0	6±1	
	300-1000	66	16.57±4.1	0.04±0.01	18.84±0.0	27.1±0.0	3±1	
		333	15.98±2.3	0.04±0.01	20.58±0.1	33.9±0.1	3±1	
		666	14.75±2.2	0.04±0.01	31.04±0.0	31.9±0.2	4±1	
		1333	10.78±1.3	0.06±0.01	43±0.0	48.0±0.0	3±1	
	96	<30	0	21.69±9.5	0.03±0.02	1.1±0.0	7.9±0.1	3±2
			66	15.4±3.0	0.04±0.01	15.8±0.1	19.6±0.0	3±0
			333	19.25±5.6	0.03±0.01	16.6±0.0	25.8±0.0	3±1
666			15.94±4.3	0.04±0.01	18.3±0.1	21.5±0.0	5±1	
1333			12.25±3.3	0.05±0.01	22±0.1	23.9±0.0	4±2	
30-300		66	24.47±9.9	0.03±0.01	16.63±0.0	28.8±0.0	8±6	
		333	14.69±14.2	0.02±0.02	34.12±0.0	32.6±0.0	3±1	
		666	15.51±13.8	0.02±0.02	38.35±0.0	29.9±0.0	2±0	
		1333	13.83±3.3	0.02±0.02	39±0.0	32.7±0.0	8±3	
300-1000		66	13.48±0.7	0.02±0.02	20.79±0.0	30.7±0.0	17±1	
		333	15±3.2	0.02±0.01	33.20±0.0	34.9±0.0	4±2	
		666	7.94±9.4	0.02±0.01	46.61±0.0	35.4±0.0	6±0	
		1333	5.37±9.3	0.03±0.02	49±0.0	51.0±0.0	14±0	



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บรรณานุกรม

- Alam, F. C., Sembiring, E., Muntalif, B. S., & Suendo, V. (2019). Microplastic distribution in surface water and sediment river around slum and industrial area (case study: Ciwalengke River, Majalaya district, Indonesia). *Chemosphere*, 224, 637-645.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.188>
- Au, S. Y., Bruce, T. F., Bridges, W. C., & Klaine, S. J. (2015). Responses of *Hyalella azteca* to acute and chronic microplastic exposures. *Environ Toxicol Chem*, 34(11), 2564-2572.  
<https://doi.org/10.1002/etc.3093>
- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., & Regoli, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environ Pollut*, 198, 211-222.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>
- Baini, M., Fossi, M. C., Galli, M., Caliani, I., Campani, T., Finoia, M. G., & Panti, C. (2018). Abundance and characterization of microplastics in the coastal waters of Tuscany (Italy): The application of the MSFD monitoring protocol in the Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull*, 133, 543-552.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.016>
- Bergami, E., Pugnalini, S., Vannuccini, M. L., Manfra, L., Faleri, C., Savorelli, F., Dawson, K. A., & Corsi, I. (2017). Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. *Aquat Toxicol*, 189, 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.008>
- Besseling, E., Quik, J. T. K., Sun, M., & Koelmans, A. A. (2017). Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study. *Environ Pollut*, 220(Pt A), 540-548. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.001>
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Brate, I. L. N., & Schoyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Mar Environ Res*, 130, 338-365.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024>

- Bhabra, G., Sood, A., Fisher, B., Cartwright, L., Saunders, M., Evans, W. H., Surprenant, A., Lopez-Castejon, G., Mann, S., Davis, S. A., Hails, L. A., Ingham, E., Verkade, P., Lane, J., Heesom, K., Newson, R., & Case, C. P. (2009). Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nat Nanotechnol*, 4(12), 876-883.  
<https://doi.org/10.1038/nnano.2009.313>
- Bhattacharya, P., Lin, S., & Ke, P. C. (2010). Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *Journal of Physical Chemistry*, 114(39), 16556-16561.
- Bignell, J. P., Stentiford, G. D., Taylor, N. G., & Lyons, B. P. (2011). Histopathology of mussels (*Mytilus* sp.) from the Tamar estuary, UK. *Mar Environ Res*, 72(1-2), 25-32.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.05.004>
- Botterell, Z. L. R., Beaumont, N., Dorrington, T., Steinke, M., Thompson, R. C., & Lindeque, P. K. (2019). Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. *Environ Pollut*, 245, 98-110.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.065>
- Bour, A., Avio, C. G., Gorbi, S., Regoli, F., & Hylland, K. (2018). Presence of microplastics in benthic and epibenthic organisms: Influence of habitat, feeding mode and trophic level. *Environ Pollut*, 243(Pt B), 1217-1225.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.115>
- Brach, L., Deixonne, P., Bernard, M. F., Durand, E., Desjean, M. C., Perez, E., van Sebille, E., & Ter Halle, A. (2018). Anticyclonic eddies increase accumulation of microplastic in the North Atlantic subtropical gyre. *Mar Pollut Bull*, 126, 191-196.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.077>
- Browne, M. A., Dissanayake, A, Galloway, T.S, Lowe, D.M, Thompson, R.C. (2008). Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026 - 5031.  
<https://doi.org/10.1021/es800249a>
- Browne, M. A., Galloway, T. S., & Thompson, R. C. (2010). Spatial patterns of plastic debris along Estuarine shorelines. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3404-3409.  
<https://doi.org/doi:10.1021/es903784e>

- Bruce, A., Alexander, J., Julian, L., David, M., Martin, R., Keith, R., & Peter, W. (2015). Molecular Biology of The Cell 6th Edition. 1465.
- Cannuel, R., Beninger, P. G., & McCombie, H. B., P. . (2009). Gill Development and Its Functional and Evolutionary Implications in the Blue Mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *The Biological Bulletin*, 217(2), 173–188.  
<https://doi.org/doi:10.1086/bblv217n2p173>
- Catarino, A. I., Macchia, V., Sanderson, W. G., Thompson, R. C., & Henry, T. B. (2018). Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibres fallout during a meal. *Environ Pollut*, 237, 675-684. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.069>
- Catarino, A. I., Thompson, R., Sanderson, W., & Henry, T. B. (2017). Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environ Toxicol Chem*, 36(4), 947-951.  
<https://doi.org/10.1002/etc.3608>
- Chinfak, N., Sompongchaiyakul, P., Charoenpong, C., Shi, H., Yeemin, T., & Zhang, J. (2021). Abundance, composition, and fate of microplastics in water, sediment, and shellfish in the Tapi-Phumduang River system and Bandon Bay, Thailand. *Sci Total Environ*, 781, 146700. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146700>
- Cho, Y., Shim, W. J., Jang, M., Han, G. M., & Hong, S. H. (2019). Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea. *Environ Pollut*, 245, 1107-1116. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.091>
- Cole, M., Coppock, R., Lindeque, P. K., Altin, D., Reed, S., Pond, D. W., Sorensen, L., Galloway, T. S., & Booth, A. M. (2019). Effects of Nylon Microplastic on Feeding, Lipid Accumulation, and Moulting in a Coldwater Copepod. *Environ Sci Technol*, 53(12), 7075-7082. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01853>
- Cole, M., Liddle, C., Consolandi, G., Drago, C., Hird, C., Lindeque, P. K., & Galloway, T. S. (2020). Microplastics, microfibrils and nanoplastics cause variable sub-lethal responses in mussels (*Mytilus* spp.). *Mar Pollut Bull*, 160, 111552.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111552>
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2015). The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine



- copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ Sci Technol*, 49(2), 1130-1137.  
<https://doi.org/10.1021/es504525U>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar Pollut Bull*, 62(12), 2588-2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- Coppock, R. L., Galloway, T. S., Cole, M., Fileman, E. S., Queiros, A. M., & Lindeque, P. K. (2019). Microplastics alter feeding selectivity and faecal density in the copepod, *Calanus helgolandicus*. *Sci Total Environ*, 687, 780-789.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.009>
- Costa, L. J., Iacobelli, S., Pasquini, M. C., Modi, R., Giaccone, L., Blade, J., Schonland, S., Evangelista, A., Perez-Simon, J. A., Hari, P., Brown, E. E., Giralto, S. A., Patriarca, F., Stadtmauer, E. A., Rosinol, L., Krishnan, A. Y., Gahrton, G., & Bruno, B. (2020). Long-term survival of 1338 MM patients treated with tandem autologous vs. autologous-allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 55(9), 1810-1816.  
<https://doi.org/10.1038/s41409-020-0887-4>
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J., & Larreta, J. (2015). Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquat Toxicol*, 162, 152-164. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.011>
- Curtin, J. F., & Donovan, M. C., T. G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis *Journal of Immunological Methods*, 265(1-2), 49-72.  
[https://doi.org/doi:10.1016/S0022-1759\(02\)00070-4](https://doi.org/doi:10.1016/S0022-1759(02)00070-4)
- Danso, D., Chow, J., & Streit, W. R. (2019). Plastics: Environmental and Biotechnological Perspectives on Microbial Degradation. *Appl Environ Microbiol*, 85(19).  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19>
- Dawson, A. L., Kawaguchi, S., King, C. K., Townsend, K. A., King, R., Huston, W. M., & Bengtson Nash, S. M. (2018). Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. *Nat Commun*, 9(1), 1001.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03465-9>
- de Messano, L. V. R., Gonçalves, J. E. A., Messano, H. F., Campos, S. H. C., & Coutinho, R. (2019). First report of the Asian green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) in Rio de

- Janeiro, Brazil: a new record for the southern Atlantic Ocean. *BioInvasions Records*, 8(3), 653-660. <https://doi.org/10.3391/bir.2019.8.3.22>
- de Sa, L. C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T. L., & Fetter, M. N. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Sci Total Environ*, 645, 1029-1039. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>
- Derraik, J. G. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44 (9), 842-852. [https://doi.org/doi:10.1016/S0025-326X\(02\)00220-5](https://doi.org/doi:10.1016/S0025-326X(02)00220-5)
- Desforges, J. P., Galbraith, M., Dangerfield, N., & Ross, P. S. (2014). Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Mar Pollut Bull*, 79(1-2), 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.035>
- Détrée, C., & Gallardo-Escárate, C. (2017). Polyethylene microbeads induce transcriptional responses with tissue-dependent patterns in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Molluscan Studies*, 83(2), 220-225. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyx005>
- Di, M., & Wang, J. (2018). Microplastics in surface waters and sediments of the Three Gorges Reservoir, China. *Sci Total Environ*, 616-617, 1620-1627. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.150>
- Dietz, K. J. (2016). Thiol-Based Peroxidases and Ascorbate Peroxidases: Why Plants Rely on Multiple Peroxidase Systems in the Photosynthesizing Chloroplast? *Mol Cells*, 39(1), 20-25. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2324>
- Digka, N., Tsangaris, C., Kaberi, H., Adamopoulou, A., & Zeri, C. (2018). Microplastic Abundance and Polymer Types in a Mediterranean Environment. In *Proceedings of the International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea* (pp. 17-24). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71279-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71279-6_3)
- Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Saad, M., Renault, N., & Tassin, B. (2015). Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environmental Chemistry*, 12(5). <https://doi.org/10.1071/en14167>

- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106(2-3), 119-133.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.10.022>
- Ericsson, E. H. J., E. (2018). Quantification for the Flow of Microplastic Particles in Urban Environment: A Case of the Chao Phraya River, Bangkok Thailand. *DEGREE PROJECT IN TECHNOLOGY*.
- Eriksson, C., & Burton, H. (2003). Origins and biological accumulation of small plastic particles in fur seals from Macquarie Island. *Ambio*, 32(6), 380-384.  
<https://doi.org/10.1579/0044-7447-32.6.380>
- Farrington, J. W., Tripp, B. W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J. L., Wade, T. L., & Knap, A. H. (2016). Edward D. Goldberg's proposal of "the Mussel Watch": Reflections after 40years. *Mar Pollut Bull*, 110(1), 501-510.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.074>
- Fendall, L. S., & Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers. *Mar Pollut Bull*, 58(8), 1225-1228.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.025>
- Fotopoulou, K. N., & Karapanagioti, H. K. (2017). Degradation of Various Plastics in the Environment. *Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment*, 71-92.
- Freire, P. C. C., Bassa, C. G., Wex, N., Stairs, I. H., Champion, D. J., Ransom, S. M., Lazarus, P., Kaspi, V. M., Hessels, J. W. T., Kramer, M., Cordes, J. M., Verbiest, J. P. W., Podsiadlowski, P., Nice, D. J., Deneva, J. S., Lorimer, D. R., Stappers, B. W., McLaughlin, M. A., & Camilo, F. (2011). On the nature and evolution of the unique binary pulsar J1903+0327. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 412(4), 2763-2780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2010.18109.x>
- Galloway, T. S., & Lewis, C. N. (2016). Marine microplastics spell big problems for future generations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(9), 2331-2333.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1600715113>
- GESAMP. (2015). Report of the 42nd Session of GESAMP. *Journal Series GESAMP Reports and Studies*. (UNESCO-IOC)

- Gomez-Mendikute, A., Elizondo, M., Venier, P., & Cajaraville, M. P. (2005). Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro. *Cell Tissue Res*, 321(1), 131-140.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-005-1093-9>
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them. In (pp. 3-20). [https://doi.org/10.1016/s1054-3589\(08\)60976-x](https://doi.org/10.1016/s1054-3589(08)60976-x)
- Hanukoglu, I. (2006). Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab Rev*, 38(1-2), 171-196. <https://doi.org/10.1080/03602530600570040>
- Hanukoglu, I. R., R. Weiner, L., & Sklan, D. (1993). Electron Leakage from the Mitochondrial NADPH-Adrenodoxin Reductase-Adrenodoxin-P450<sub>scc</sub> (Cholesterol Side Chain Cleavage) System. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305(2), 489-498.  
<https://doi.org/doi:10.1006/abbi.1993.1452>
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev*, 116(5), 3029-3085.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- Herrera, A., Asensio, M., Martinez, I., Santana, A., Packard, T., & Gomez, M. (2018). Microplastic and tar pollution on three Canary Islands beaches: An annual study. *Mar Pollut Bull*, 129(2), 494-502. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.020>
- Hidalgo-Ruz, V., & Thiel, M. (2013). Distribution and abundance of small plastic debris on beaches in the SE Pacific (Chile): a study supported by a citizen science project. *Mar Environ Res*, 87-88, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.02.015>
- Imhof, H. K., Sigl, R., Brauer, E., Feyl, S., Giesemann, P., Klink, S., Leupolz, K., Löder, M. G. J., Löschel, L. A., Missun, J., Muszynski, S., Ramsperger, A. F. R. M., Schrank, I., Speck, S., Steibl, S., Trotter, B., Winter, I., & Laforsch, C. (2017). Spatial and temporal variation of macro-, meso- and microplastic abundance on a remote coral island of the Maldives, Indian Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 116(1-2), 340-347. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.010>
- Isobe, A., Uchida, K., Tokai, T., & Iwasaki, S. (2015). East Asian seas: A hot spot of pelagic microplastics. *Mar Pollut Bull*, 101(2), 618-623.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.042>

- Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E., & Boveris, A. (1986). The Relation of Free Radical Production to Hyperoxia. *Annual Review of Physiology*, 48(1), 703-719.  
<https://doi.org/doi:10.1146/annurev.ph.48.030186.003415>
- Jang, M., Shim, W. J., Han, G. M., Song, Y. K., & Hong, S. H. (2018). Formation of microplastics by polychaetes (*Marphysa sanguinea*) inhabiting expanded polystyrene marine debris. *Mar Pollut Bull*, 131(Pt A), 365-369.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.017>
- Jeong, C. B., Kang, H. M., Lee, M. C., Kim, D. H., Han, J., Hwang, D. S., Souissi, S., Lee, S. J., Shin, K. H., Park, H. G., & Lee, J. S. (2017). Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Sci Rep*, 7, 41323.  
<https://doi.org/10.1038/srep41323>
- Jiang, Y., Zhao, Y., Wang, X., Yang, F., Chen, M., & Wang, J. (2020). Characterization of microplastics in the surface seawater of the South Yellow Sea as affected by season. *Sci Total Environ*, 724, 138375. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138375>
- Kang, J. H., Kwon, O. Y., Lee, K. W., Song, Y. K., & Shim, W. J. (2015). Marine neustonic microplastics around the southeastern coast of Korea. *Mar Pollut Bull*, 96(1-2), 304-312. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.054>
- Kaplan, D., Cohen, Z., Abeliovich, A. (1986). Optimal Growth Conditions for *Isochrysis galbana* Biomass, 9(1), 37-48. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0144-4565\(86\)90011-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0144-4565(86)90011-9)
- Kim, I. S., Chae, D. H., Kim, S. K., Choi, S. B., & Woo, S. B. (2015). Factors Influencing the Spatial Variation of Microplastics on High-Tidal Coastal Beaches in Korea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(3), 299-309.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-015-0155-6>
- Kinjo, A., Mizukawa, K., Takada, H., & Inoue, K. (2019). Size-dependent elimination of ingested microplastics in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Pollut Bull*, 149, 110512. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110512>
- Kukulka, T., Proskurowski, G., Morét-Ferguson, S., Meyer, D. W., & Law, K. L. (2012). The effect of wind mixing on the vertical distribution of buoyant plastic debris. *Geophysical Research Letters*, 39(7), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2012gl051116>

- Kwon, J. H., Chang, S., Hong, S. H., & Shim, W. J. (2017). Microplastics as a vector of hydrophobic contaminants: Importance of hydrophobic additives. *Integr Environ Assess Manag*, 13(3), 494-499. <https://doi.org/10.1002/ieam.1906>
- Lechner, A., Keckeis, H., Lumesberger-Loisl, F., Zens, B., Krusch, R., Tritthart, M., Glas, M., & Schludermann, E. (2014). The Danube so colourful: a potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environ Pollut*, 188, 177-181. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.006>
- Leja, K., & Lewandowicz, G. (2010). Polymer biodegradation and biodegradable polymers - a review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19, 255-266.
- Leslie, H. A., Brandsma, S. H., van Velzen, M. J., & Vethaak, A. D. (2017). Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environ Int*, 101, 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.01.018>
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol*, 68, 253-278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Li, J., Green, C., Reynolds, A., Shi, H., & Rotchell, J. M. (2018). Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom. *Environ Pollut*, 241, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.038>
- Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Brate, I. L. N., Sun, C., Shahadat Hossain, M., Li, Q., Kolandhasamy, P., & Shi, H. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environ Pollut*, 244, 522-533. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.032>
- Li, J., Qu, X., Su, L., Zhang, W., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., & Shi, H. (2016). Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environ Pollut*, 214, 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.012>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 19. <https://doi.org/doi:10.1186/1756-8722-6-19>

- Liubartseva, S., Coppini, G., Lecci, R., & Clementi, E. (2018). Tracking plastics in the Mediterranean: 2D Lagrangian model. *Mar Pollut Bull*, 129(1), 151-162.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.019>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 153(2), 175-190.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.004>
- Lusher, A. L., Welden, N. A., Sobral, P., & Cole, M. (2017). Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods*, 9(9), 1346-1360. <https://doi.org/10.1039/C6AY02415G>
- Magni, S., Gagne, F., Andre, C., Della Torre, C., Auclair, J., Hanana, H., Parenti, C. C., Bonasoro, F., & Binelli, A. (2018). Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia). *Sci Total Environ*, 631-632, 778-788.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.075>
- Mateos-Cardenas, A., O'Halloran, J., van Pelt, F., & Jansen, M. A. K. (2020). Rapid fragmentation of microplastics by the freshwater amphipod *Gammarus duebeni* (Lillj.). *Sci Rep*, 10(1), 12799. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69635-2>
- Mathalon, A., & Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Mar Pollut Bull*, 81(1), 69-79.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.02.018>
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., & Kaminuma, T. (2001). Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. *Environmental Science & Technology*, 35, 318-324.
- Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2008). Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1780(11), 1325-1336. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.011>
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). GLUTATHIONE *Annual Reviews Inc.*, 57.

- Miller, R. Z., Watts, A. J. R., Winslow, B. O., Galloway, T. S., & Barrows, A. P. W. (2017). Mountains to the sea: River study of plastic and non-plastic microfiber pollution in the northeast USA. *Mar Pollut Bull*, 124(1), 245-251.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.028>
- Muller, F. (2000). The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging. *J Am Aging Assoc*, 23(4), 227-253.  
<https://doi.org/10.1007/s11357-000-0022-9>
- Murray, F., & Cowie, P. R. (2011). Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Mar Pollut Bull*, 62(6), 1207-1217.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.032>
- Nadal, M. A., Alomar, C., & Deudero, S. (2016). High levels of microplastic ingestion by the semipelagic fish bogue *Boops boops* (L.) around the Balearic Islands. *Environ Pollut*, 214, 517-523. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.054>
- Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Mar Pollut Bull*, 99(1-2), 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.029>
- Nel, H. A., & Froneman, P. W. (2015). A quantitative analysis of microplastic pollution along the south-eastern coastline of South Africa. *Mar Pollut Bull*, 101(1), 274-279.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.043>
- Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J. L., & Pereira, T. (2015). Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Mar Pollut Bull*, 101(1), 119-126.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.008>
- Olivatto, G. P., Martins, M. C. T., Montagner, C. C., Henry, T. B., & Carreira, R. S. (2019). Microplastic contamination in surface waters in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar Pollut Bull*, 139, 157-162. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.12.042>
- Opitz, T., Benitez, S., Fernandez, C., Osorio, S., Navarro, J. M., Rodriguez-Romero, A., Lohrmann, K. B., & Lardies, M. A. (2021). Minimal impact at current environmental concentrations of microplastics on energy balance and physiological rates of the giant mussel *Choromytilus chorus*. *Mar Pollut Bull*, 162, 111834.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111834>



- Ounjai, K., Suppaso, L., Hohwy, J., & Lauwereyns, J. (2020). Tracking the Influence of Predictive Cues on the Evaluation of Food Images: Volatility Enables Nudging. *Front Psychol*, 11, 569078. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.569078>
- Owen, G. (1974). Studies on the gill of *Mytilus edulis*: the eu-latero-frontal cirri. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.*, 187, 83-91.
- Paul-Pont, I., Lacroix, C., Gonzalez Fernandez, C., Hegaret, H., Lambert, C., Le Goic, N., Frere, L., Cassone, A. L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., & Soudant, P. (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environ Pollut*, 216, 724-737. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.039>
- Phuong, N. N., Poirier, L., Pham, Q. T., Lagarde, F., & Zalouk-Vergnoux, A. (2018). Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life? *Mar Pollut Bull*, 129(2), 664-674. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.054>
- Pinheiro, L. M., Ivar do Sul, J. A., & Costa, M. F. (2020). Uptake and ingestion are the main pathways for microplastics to enter marine benthos: A review. *Food Webs*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2020.e00150>
- Pittura, L., Avio, C. G., Giuliani, M. E., d'Errico, G., Keiter, S. H., Cormier, B., Gorbi, S., & Regoli, F. (2018). Microplastics as Vehicles of Environmental PAHs to Marine Organisms: Combined Chemical and Physical Hazards to the Mediterranean Mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Frontiers in Marine Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00103>
- Porter, A., Lyons, B. P., Galloway, T. S., & Lewis, C. (2018). Role of Marine Snows in Microplastic Fate and Bioavailability. *Environ Sci Technol*, 52(12), 7111-7119. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01000>
- Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M., & Shi, H. (2018). Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels. *Sci Total Environ*, 621, 679-686. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.284>

- Quayle, D. B. (1989). Farming Bivalve Molluscs: Methods for Study and Development. *Advances in World Aquaculture*, 1.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T. L., Wilson, C. J., Bell, S. P., & Young, R. A. (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, 290(5500), 2306-2309. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2306>
- Renzi, M., Guerranti, C., & Blaskovic, A. (2018). Microplastic contents from maricultured and natural mussels. *Mar Pollut Bull*, 131(Pt A), 248-251. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.035>
- Revel, M., Lagarde, F., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Châtel, A., & Mouneyrac, C. (2019). Tissue-Specific Biomarker Responses in the Blue Mussel *Mytilus* spp. Exposed to a Mixture of Microplastics at Environmentally Relevant Concentrations. *Frontiers in Environmental Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00033>
- Ribeiro, F., Garcia, A. R., Pereira, B. P., Fonseca, M., Mestre, N. C., Fonseca, T. G., Ilharco, L. M., & Bebianno, M. J. (2017). Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Mar Pollut Bull*, 122(1-2), 379-391. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.078>
- Riisgård, H. U., Egede, P. P., & Barreiro Saavedra, I. (2011). Feeding Behaviour of the Mussel, *Mytilus edulis*: New Observations, with a Minireview of Current Knowledge. *Journal of Marine Biology*, 2011, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2011/312459>
- Rochman, C. M., Hoh, E., Hentschel, B. T., & Kaye, S. (2013). Long-Term Field Measurement of Sorption of Organic Contaminants to Five Types of Plastic Pellets: Implications for Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/es303700s>
- Rochman, C. M., Tahir, A., Williams, S. L., Baxa, D. V., Lam, R., Miller, J. T., Teh, F. C., Werorilangi, S., & Teh, S. J. (2015). Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Sci Rep*, 5, 14340. <https://doi.org/10.1038/srep14340>
- Rosa, M., Ward, J. E., & Shumway, S. E. (2018). Selective Capture and Ingestion of Particles by Suspension-Feeding Bivalve Molluscs: A Review. *Journal of Shellfish Research*, 37(4), 727-746. <https://doi.org/10.2983/035.037.0405>

- Santana, M. F., Ascer, L. G., Custodio, M. R., Moreira, F. T., & Turra, A. (2016). Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: Rapid evaluation through bioassessment. *Mar Pollut Bull*, 106(1-2), 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.074>
- Sarafraz, J., Rajabizadeh, M., & Kamrani, E. (2016). The preliminary assessment of abundance and composition of marine beach debris in the northern Persian Gulf, Bandar Abbas City, Iran. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), 131-135. <https://doi.org/10.1017/S0025315415002076>
- Sathish, M. N., Jeyasanta, I., & Patterson, J. (2020). Occurrence of microplastics in epipelagic and mesopelagic fishes from Tuticorin, Southeast coast of India. *Sci Total Environ*, 720, 137614. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137614>
- Sato, A., Okada, M., Shibuya, K., Watanabe, E., Seino, S., Narita, Y., Shibui, S., Kayama, T., & Kitanaka, C. (2014). Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem Cell Res*, 12(1), 119-131. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.012>
- Schmidt, N., Thibault, D., Galgani, F., Paluselli, A., & Semp  r  , R. (2018). Occurrence of microplastics in surface waters of the Gulf of Lion (NW Mediterranean Sea). *Progress in Oceanography*, 163, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.11.010>
- Scircle, A., Cizdziel, J. V., Missling, K., Li, L., & Vianello, A. (2020). Single-Pot Method for the Collection and Preparation of Natural Water for Microplastic Analyses: Microplastics in the Mississippi River System during and after Historic Flooding. *Environ Toxicol Chem*, 39(5), 986-995. <https://doi.org/10.1002/etc.4698>
- Setala, O., Fleming-Lehtinen, V., & Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ Pollut*, 185, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.013>
- Shaala, N. M. A., Zulkifli, S. Z., Ismail, A., Azmai, M. N. A., & Mohamat-Yusuff, F. (2015). Lethal Concentration 50 (LC50) and Effects of Diuron on Morphology of Brine Shrimp *Artemia Salina* (Branchiopoda: Anostraca) Nauplii. *Procedia Environmental Sciences*, 30, 279-284. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.10.050>
- Soldatov, A. A., Gostyukhina, O. L., Borodina, A. V., & Golovina, I. V. (2013). Qualitative composition of carotenoids, catalase and superoxide dismutase activities in

- tissues of the bivalve mollusc *Anadara inaequalis* (Bruguiere, 1789). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 49(4), 389-398.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093013040026>
- Son, Y., Cheong, Y. K., Kim, N. H., Chung, H. T., Kang, D. G., & Pae, H. O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct*, 2011, 792639. <https://doi.org/10.1155/2011/792639>
- Song, Q., Chen, H., Li, Y., Zhou, H., Han, Q., & Diao, X. (2016). Toxicological effects of benzo(a)pyrene, DDT and their mixture on the green mussel *Perna viridis* revealed by proteomic and metabolomic approaches. *Chemosphere*, 144, 214-224.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.029>
- Sparks, C. (2020). Microplastics in Mussels Along the Coast of Cape Town, South Africa. *Bull Environ Contam Toxicol*, 104(4), 423-431. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02809-w>
- Stolte, A., Forster, S., Gerdt, G., & Schubert, H. (2015). Microplastic concentrations in beach sediments along the German Baltic coast. *Mar Pollut Bull*, 99(1-2), 216-229.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.022>
- Su, L., Xue, Y., Li, L., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., & Shi, H. (2016). Microplastics in Taihu Lake, China. *Environ Pollut*, 216, 711-719.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.036>
- Syakti, A. D., Bouhroum, R., Hidayati, N. V., Koenawan, C. J., Boulkamh, A., Sulistyono, I., Lebarillier, S., Akhlus, S., Doumenq, P., & Wong-Wah-Chung, P. (2017). Beach macro-litter monitoring and floating microplastic in a coastal area of Indonesia. *Mar Pollut Bull*, 122(1-2), 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.046>
- Ta, A. T., & Babel, S. (2020). Microplastic contamination on the lower Chao Phraya: Abundance, characteristic and interaction with heavy metals. *Chemosphere*, 257, 127234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127234>
- Tanaka, K., & Takada, H. (2016). Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Sci Rep*, 6, 34351.  
<https://doi.org/10.1038/srep34351>
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Bjorn, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Galloway, T. S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P. H., Tana, T. S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.

- P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., & Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1526), 2027-2045. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0284>
- Thushari, G. G. N., Senevirathna, J. D. M., Yakupitiyage, A., & Chavanich, S. (2017). Effects of microplastics on sessile invertebrates in the eastern coast of Thailand: An approach to coastal zone conservation. *Mar Pollut Bull*, 124(1), 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.010>
- Tipple, T. E., & Rogers, L. K. (2012). Methods for the determination of plasma or tissue glutathione levels. *Methods Mol Biol*, 889, 315-324. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-867-2\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-867-2_20)
- Torres, F. G., Dioses-Salinas, D. C., Pizarro-Ortega, C. I., & De-la-Torre, G. E. (2021). Sorption of chemical contaminants on degradable and non-degradable microplastics: Recent progress and research trends. *Sci Total Environ*, 757, 143875. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143875>
- Trestrail, C., Walpitagama, M., Miranda, A., Nugegoda, D., & Shimeta, J. (2021). Microplastics alter digestive enzyme activities in the marine bivalve, *Mytilus galloprovincialis*. *Sci Total Environ*, 779, 146418. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146418>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552(Pt 2), 335-344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Usheva, L. N., Vaschenko, M. A., & Durkina, V. B. (2006). Histopathology of the digestive gland of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(3), 166-172. <https://doi.org/10.1134/S1063074006030047>
- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environ Pollut*, 199, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.008>
- Vasanthi, R. L., Arulvasu, C., Kumar, P., & Srinivasan, P. (2021). Ingestion of microplastics and its potential for causing structural alterations and oxidative stress in Indian

- green mussel *Perna viridis*- A multiple biomarker approach. *Chemosphere*, 283, 130979. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130979>
- Veerasingam, S., Saha, M., Suneel, V., Vethamony, P., Rodrigues, A. C., Bhattacharyya, S., & Naik, B. G. (2016). Characteristics, seasonal distribution and surface degradation features of microplastic pellets along the Goa coast, India. *Chemosphere*, 159, 496-505. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.056>
- von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Kohler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ Sci Technol*, 46(20), 11327-11335. <https://doi.org/10.1021/es302332w>
- Wang, X., Liu, J. Z., Hu, J. X., Wu, H., Li, Y. L., Chen, H. L., Bai, H., & Hai, C. X. (2011). ROS-activated p38 MAPK/ERK-Akt cascade plays a central role in palmitic acid-stimulated hepatocyte proliferation. *Free Radic Biol Med*, 51(2), 539-551. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.019>
- Ward, J. E., Zhao, S., Holohan, B. A., Mladinich, K. M., Griffin, T. W., Wozniak, J., & Shumway, S. E. (2019). Selective Ingestion and Egestion of Plastic Particles by the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) and Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Implications for Using Bivalves as Bioindicators of Microplastic Pollution. *Environ Sci Technol*, 53(15), 8776-8784. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02073>
- Webb, J. R., Leavitt, P. R., Simpson, G. L., Baulch, H. M., Haig, H. A., Hodder, K. R., & Finlay, K. (2019). Regulation of carbon dioxide and methane in small agricultural reservoirs: optimizing potential for greenhouse gas uptake. *Biogeosciences*, 16(21), 4211-4227. <https://doi.org/10.5194/bg-16-4211-2019>
- Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environ Pollut*, 178, 483-492. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>
- Wu, C., Zhang, K., & Xiong, X. (2018). Microplastic Pollution in Inland Waters Focusing on Asia. In *Freshwater Microplastics* (pp. 85-99). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5_5)
- Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W., & Zhao, Y. (2018). Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. *Aquat Toxicol*, 200, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.015>

- Yu, S. P., & Chan, B. K. K. (2020). Effects of polystyrene microplastics on larval development, settlement, and metamorphosis of the intertidal barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 194, 110362. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110362>
- Zhang, K., Hamidian, A. H., Tubic, A., Zhang, Y., Fang, J. K. H., Wu, C., & Lam, P. K. S. (2021). Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. *Environ Pollut*, 274, 116554. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116554>
- Zhang, W., Zhang, S., Wang, J., Wang, Y., Mu, J., Wang, P., Lin, X., & Ma, D. (2017). Microplastic pollution in the surface waters of the Bohai Sea, China. *Environ Pollut*, 231(Pt 1), 541-548. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.058>
- Zhao, S., Ward, J. E., Danley, M., & Mincer, T. J. (2018). Field-Based Evidence for Microplastic in Marine Aggregates and Mussels: Implications for Trophic Transfer. *Environ Sci Technol*, 52(19), 11038-11048. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03467>
- Zhao, S., Zhu, L., & Li, D. (2015). Microplastic in three urban estuaries, China. *Environ Pollut*, 206, 597-604. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.027>
- Zhao, S., Zhu, L., Wang, T., & Li, D. (2014). Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution. *Mar Pollut Bull*, 86(1-2), 562-568. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.032>
- Zheng, Y., Li, J., Cao, W., Liu, X., Jiang, F., Ding, J., Yin, X., & Sun, C. (2019). Distribution characteristics of microplastics in the seawater and sediment: A case study in Jiaozhou Bay, China. *Sci Total Environ*, 674, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.008>
- Zhu, J., Zhang, Q., Li, Y., Tan, S., Kang, Z., Yu, X., Lan, W., Cai, L., Wang, J., & Shi, H. (2019). Microplastic pollution in the Maowei Sea, a typical mariculture bay of China. *Sci Total Environ*, 658, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.192>



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	จุฑามาศ โปธาขวัญประชา
วัน เดือน ปี เกิด	31 มีนาคม 2539
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	จบชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนชัยภูมิภักดีชุมพล จังหวัดชัยภูมิ เมื่อปี พ.ศ. 2556 จบวิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและธรรมชาติ) จาก มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2561
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 266 หมู่ที่ 7 ตำบลโนนสำราญ อำเภอเมืองชัยภูมิ จังหวัดชัยภูมิ
ผลงานตีพิมพ์	ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ - ผลงานที่เข้าร่วมการประชุมวิชาการ - ผลกระทบของการปนเปื้อนสาร Chlordane ต่อการแสดงออก ระดับโปรตีนของหอยนางรมตะไกรมกรามดำ ( <i>Crassostrea iredalei</i> ) Effect of the Chlordane residues on protein expression of <i>Crassostrea iredalei</i> เสนอผลงานแบบ Oral Presentation ในงาน MU Science & Management Project Exhibition 2018 มหาวิทยาลัยมหิดล - ผลกระทบของการปนเปื้อนสาร Chlordane ต่อการแสดงออก ระดับโปรตีนของหอยนางรมตะไกรมกรามดำ ( <i>Crassostrea iredalei</i> ) Effect of the Chlordane residues on protein expression of <i>Crassostrea iredalei</i> เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในงาน The 19th Science Project Exhibition ณ ตึกกลม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  - Effects of the Chlordane residues on mortality, histology and proteome profile of <i>Crassostrea iredalei</i> เสนอผลงานแบบ Oral Presentation ในงาน The 5th EnvironmentAsia International Conference 2019