

การเปลี่ยนแปลงจุลกายวิภาคเหงือกและผิวหนังของลูกปลาไนที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟต

Histological Alterations in Gills and Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fry Exposed to Copper Sulfate

ขวัญประเสริฐ พันธุ์ชัย^{1*}, นฤมล แสงประดับ², ชุตินา หาญจวนิช²

Kwanprasert Panchai^{1*}, Narumon Sangpradub², Chutima Hanjavanit²

Received : 22 June 2018 ; Accepted : 21 August 2018

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อหาความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟตที่ทำให้ลูกปลาไนตายร้อยละ 50 ภายใน 96 ชั่วโมง (LC₅₀-96 hr) ด้วยวิธีระบบชีววิเคราะห์ในน้ำนิ่ง และประเมินผลความเป็นพิษของคอปเปอร์ซัลเฟตต่อเหงือกและผิวหนังของลูกปลาไน โดยแช่ลูกปลาไนในสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าค่า LC₅₀ ของคอปเปอร์ซัลเฟตที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 6.671 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะจุลพยาธิสภาพเหงือกที่พบมากในลูกปลากลุ่มทดลอง คือ เซลล์เนื้อเยื่อบุผิวบางบริเวณเพิ่มจำนวนทำให้ซี่เหงือกเชื่อมติดกัน ชั้นเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวบางบริเวณแยกตัวออกจากกัน และซี่เหงือกบางอันเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้ยังพบส่วนปลายของซี่เหงือกบางอันเกิดการม้วนตัว และยังมีพบคอลลอยด์แทรกตัวในซี่เหงือกบางอัน คอปเปอร์ซัลเฟตไม่มีผลต่อลักษณะจุลกายวิภาคของผิวหนัง ไม่ก่อให้เกิดแผลผิวหนังลำตัว และพบว่าความหนาของชั้นหนังกำพร้าของลูกปลากลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (p>0.05) ผลการศึกษาครั้งนี้อาจชี้ให้เห็นถึงความไวของลูกปลาไนที่มีต่อคอปเปอร์ซัลเฟต โดยพิจารณาจากลักษณะจุลพยาธิสภาพของเหงือกปลา ซึ่งอาจใช้เป็นเครื่องมือที่บอกถึงผลความเป็นพิษของคอปเปอร์ซัลเฟตในสภาพแวดล้อมและสัตว์น้ำ

คำสำคัญ: คอปเปอร์ซัลเฟต จุลพยาธิสภาพเหงือก จุลพยาธิสภาพผิวหนัง ปลาไน

Abstract

The objectives of this research were to determine the median lethal concentration at 96 hours (LC₅₀-96 hr) of copper sulfate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry by static bioassay test, and to evaluate the toxicity of copper sulfate in the gills and skin of Nile tilapia fry. The fish were exposed to 0, 6, 12, 18, 24 and 30 mg/L of copper sulfate, respectively. The 96 hr LC₅₀ value of copper sulfate was 6.671 mg/L. Histopathological changes of gill in the treatment groups were focal hyperplasia in gill lamellae and caused lamellar fusion. Focal epithelial lifting and disarray of some gill lamellae were also observed. Furthermore, curling at the tips of some gill lamellae and colloid droplet deposited in gill lamellae were occasionally found. Copper sulfate had no effect on skin histology of the treatment groups and no external lesions occurred. The epidermal thickness of the skin from the treatment groups showed non-significant difference from the control group (p>0.05). The results of this study may indicate the sensitivity of Nile tilapia fry to copper sulfate and the histopathology of the gills may be a tool to reveal the toxicity effect of copper sulfate in the environment and aquatic biota.

Keywords: copper sulfate, gill histopathology, skin histology, *Oreochromis niloticus*

¹ อาจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา 30000

² อาจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

¹ Lecturer, Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

² Lecturer, Division of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

* Corresponding author: Kwanprasert Panchai, Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand, e-mail: kwanprasert.p@nrnu.ac.th

บทนำ

คอปเปอร์ (copper) เป็นธาตุที่สำคัญและจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะคนและสัตว์ คอปเปอร์มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างฮีโมโกลบิน (haemoglobin) และฮีโมไซยานิน (haemocyanin) ซึ่งทำหน้าที่เป็นระบบขนส่งออกซิเจนในเลือดของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่มมีเปลือก (shellfish) เช่น หอย ปู และกุ้ง ฯลฯ อย่างไรก็ตาม การที่สัตว์จะรับคอปเปอร์เข้าสู่ร่างกายต้องได้รับในปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากคอปเปอร์เป็นธาตุอาหารเสริม (micronutrient) หากร่างกายได้รับในปริมาณมากจนเกินไปอาจก่อให้เกิดการสะสมและเป็นพิษได้ เช่น ผู้ใหญ่มีความต้องการคอปเปอร์ประมาณ 0.9 มิลลิกรัมต่อวัน ส่วนเด็กต้องการประมาณ 0.3-0.4 มิลลิกรัมต่อวัน² หากได้รับในปริมาณมากจะทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน มีอาการปวดท้องและกล้ามเนื้อ³ การปนเปื้อนของคอปเปอร์ในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไปมาจากความเจริญก้าวหน้าทางอุตสาหกรรม เนื่องจากคอปเปอร์เป็นกลุ่มโลหะที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิต เช่น การทำลวด เครื่องมือถ่ายเทความร้อน อุปกรณ์ไฟฟ้า และยังนำไปใช้ผสมกับโลหะอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ⁴ นอกจากนี้สารประกอบคอปเปอร์ยังถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรกรรมและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในรูปของคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate) หรือ จุนลีซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกษตร โดยเป็นส่วนผสมของปุ๋ยเพื่อป้องกันสปอร์ของฟังไจที่เป็นพาหะนำโรคของพืช⁵ และเป็นสารกำจัดวัชพืช (herbicide) สารกำจัดหอย (molluscicide)⁶ นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยใช้เป็นสารกำจัดสาหร่าย (algaecide)⁷ และยังเป็นสารช่วยควบคุมปรสิตภายนอกแก่ปลา โดยเฉพาะโรคจุดขาว (white spot, Ich)⁸ การใช้งานคอปเปอร์ซัลเฟตจะอยู่ในรูปของสารละลาย ดังนั้นหากใช้ในปริมาณที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ โดยเฉพาะปลา กุ้ง และปู¹ ทั้งนี้เนื่องจากคอปเปอร์เป็นโลหะหนักที่ย่อยสลายได้ยาก อาจเข้าไปสะสมในเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำและจะเพิ่มขึ้นตามลำดับชั้นของห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ที่บริโภคสัตว์น้ำที่มีโลหะหนักสะสมในเนื้อเยื่อในปริมาณที่สูงมากอีกด้วย⁹ ดังนั้นการควบคุมปริมาณและความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟตก่อนนำไปใช้งานหรือปล่อยลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติเพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งสำคัญ การศึกษาเพื่อทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อสัตว์น้ำทำได้โดยการทดลองแบบระบบชีววิเคราะห์ในน้ำนิ่ง (static bioassay) เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว สามารถทดลองในห้องปฏิบัติการ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย

เพราะเป็นปลาที่นิยมนำมาบริโภค เนื่องจากราคาไม่แพง เพาะเลี้ยงได้ง่าย ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง¹⁰ สำหรับใช้ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของคอปเปอร์ซัลเฟตและการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลพยาธิสภาพของเหงือกและผิวหนังของปลานิล

วิธีการศึกษา

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ปลานิลจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ขนาดความยาวลำตัวทั้งหมด (total length) เฉลี่ย 3.74 ± 0.53 เซนติเมตร ($n=200$) นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพก่อนการทดลองในบ่อที่บรรจุน้ำประปาปราศจากคลอรีน และให้ออกซิเจนตลอดเวลาเป็นเวลา 7 วัน พร้อมกับให้อาหารลูกปลา 2 ครั้งต่อวัน ต่อมาคัดแยกปลานิลให้มีขนาดใกล้เคียงกันจำนวนประมาณ 200 ตัว และงดให้อาหาร 1 วัน ก่อนการทดลอง

การทดสอบขั้นต้น (preliminary test)

หาความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้ปลานิลตายทั้งหมดและความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่ทำให้ปลานิลตายทั้งหมดที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยหาจากระดับความเข้มข้นช่วงกว้างของคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) ด้วยการเตรียมคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Merck KGaA, Germany) เข้มข้น 0, 10, 30, 50, 70 และ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จำนวนลูกปลาที่ใช้ในแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 10 ตัว ทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำ และให้ออกซิเจนตลอดเวลาของการทดลอง จากนั้นบันทึกจำนวนลูกปลาที่ตายทุก 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ พร้อมทั้งสังเกตพฤติกรรมของลูกปลาในระหว่างทดลอง หากพบว่าลูกปลาไม่เคลื่อนที่หรือไม่มีการตอบสนอง ให้นำลูกปลาที่ตายออกจากภาชนะทดลองทันที หลังจากให้นำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการทดลองอย่างละเอียดต่อไป

การทดลองอย่างละเอียด (full scale test)

นำผลการทดลองจากการทดลองขั้นต้นมาหา LC_{50} -96 hr ของคอปเปอร์ซัลเฟต โดยกระจายความเข้มข้นออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 6, 12, 18, 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนลูกปลานิลที่ใช้ในแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 10 ตัว ทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ และให้ออกซิเจนตลอดเวลา จากนั้นบันทึกจำนวนลูกปลาที่ตายทุก 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ พร้อมทั้งสังเกตพฤติกรรมของลูกปลาในระหว่างทดลอง หากพบว่าลูกปลาไม่เคลื่อนที่หรือไม่มีการตอบสนอง ให้นำลูกปลาที่ตายออกจากภาชนะทดลองทันที

การทดสอบ LC₅₀-96 hr ของคอปเปอร์ซัลเฟตต่อ ลักษณะจุลพยาธิสภาพเหงือกและผิวหนังของลูกปลา กลุ่มทดลอง

นำผลการทดลองอย่างละเอียดมาคำนวณหาค่า LC₅₀ โดยใช้วิธี Probit analysis¹¹ จากนั้นนำค่า LC₅₀ ที่คำนวณได้ มาทดสอบกับกลุ่มทดลองที่เวลา 1, 2, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมทดสอบในช่วงเวลาเดียวกันกับกลุ่มทดลองและใช้ปลาจำนวน 10 ตัว ทดลองอย่างละ 5 ซ้ำ การทดลองนี้ได้รับการรับรองจริยธรรมในการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์จากคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เอกสารหมายเลข 0514.1.12.2/33)

การเตรียมสไลด์ถาวรตัวอย่างเหงือกและ ผิวหนังด้วยกรรมวิธีพาราฟิน

สุ่มเก็บตัวอย่างลูกปลานิลทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เวลา 1, 2, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง อย่างละ 10 ตัว นำมารักษาสภาพด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินร้อยละ 10 (10% Phosphate buffered formalin, 10% PBF) จากนั้นเปลี่ยนมาแช่ในสารละลายอีดีทีเอ (Ethylene diamine tetra-acetic acid, EDTA) แล้วนำชิ้นส่วนของเหงือกและลำตัวขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เข้าสู่กระบวนการพาราฟินโดยใช้เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (Leica รุ่น TP1020) จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อมาฝังในบล็อกพาราฟินด้วยเครื่องฝังตัวอย่าง (Leica รุ่น EG1160) และตัดให้เป็นแผ่นบางโดยใช้เครื่องตัดเนื้อเยื่อชนิดล้อหมุน (Shandon รุ่น M1R) หนา 5 ไมโครเมตร นำสไลด์ตัวอย่างเหงือกและลำตัวของลูกปลามาย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิดินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin, H&E) และผนึกเป็นสไลด์ถาวร

การวิเคราะห์ผลจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ เหงือกและผิวหนัง

นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยสุ่มตรวจความผิดปกติของเนื้อเยื่อเหงือก (n=5) ที่กำลังขยาย 10x เท่า และสุ่มวัดความหนาชั้นหนึ่งกำพวด (epidermis) ของผิวหนังที่บริเวณข้างลำตัว โดยใช้ ocular micrometer ที่กำลังขยาย 40x เท่า (n=5)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

คำนวณหาค่า LC₅₀ ที่ระยะเวลาทดสอบ 96 ชั่วโมง ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้วิธี Probit analysis และความหนาชั้นหนึ่งกำพวดของผิวหนังลูกปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Two-way ANOVA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Statistics 17.0

ผลการศึกษา

การทดลองขั้นต้น

ความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟต 30, 50, 70 และ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีผลทำให้ลูกปลานิลตายทั้งหมด 30 ตัว (ร้อยละ 100) ส่วนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบลูกปลานิลตายเพียง 6 ตัว จาก 30 ตัว (ร้อยละ 20) และไม่พบการตายของปลาในกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงนำค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่ทำให้ลูกปลาตายทั้งหมด และความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้ลูกปลาตายทั้งหมด ไปกำหนดช่วงความเข้มข้นที่นำไปใช้การทดลองอย่างละเอียด คือ 0-30 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองอย่างละเอียด

นำผลความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟตที่ระดับ 0-30 มิลลิกรัมต่อลิตร มากระจายออกเป็น 5 ความเข้มข้นย่อย ได้แก่ 6, 12, 18, 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 0, 6, 12, 18 และ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลูกปลานิลตาย 3 (ร้อยละ 10), 14 (ร้อยละ 47), 22 (ร้อยละ 73), 29 (ร้อยละ 97) และ 28 (ร้อยละ 93) ตัว จาก 30 ตัว ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ลูกปลานิลตายทั้งหมด 30 ตัว (ร้อยละ 100)

ค่า LC₅₀-96 hr

นำค่าความเข้มข้นระดับต่างๆ และจำนวนการตายสะสมของลูกปลานิลจากผลการทดลองอย่างละเอียดมาคำนวณหาค่า LC₅₀-96hr โดยใช้วิธี Probit analysis มีค่าเท่ากับ 6.671 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลของคอปเปอร์ซัลเฟตต่อจุลพยาธิสภาพของ เหงือกและผิวหนังลูกปลานิล

ผลของค่าความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟตที่ LC₅₀ ต่อเนื้อเยื่อลูกปลานิลที่ 1, 2, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อเหงือกมีลักษณะปกติซึ่งประกอบด้วยซี่เหงือก (secondary lamellae) หลายอันเรียงตัวด้านข้างของก้านเหงือก (primary lamellae) ปกคลุมด้วยเนื้อเยื่อบุผิวรูปร่างแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว (simple squamous epithelium) ภายในซี่เหงือกประกอบด้วยเซลล์พิลลาร์ (pillar cells) และหลอดเลือด (capillary) (Figure 1A) กลุ่มทดลองมีลักษณะผิดปกติของซี่เหงือก คือเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวเพิ่มจำนวนทำให้ซี่เหงือกเชื่อมติดกัน (fusion) ชั้นเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวบางบริเวณแยกตัวออกจากกัน (lifting) และซี่เหงือกเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (disarray) นอกจากนี้ยังพบส่วนปลายของซี่เหงือกบางอันเกิดการม้วนตัว (curling) และยังพบคอลลอยด์ (colloid droplet) แทรกตัวในซี่เหงือก (Table 1, Figure 1B-F) ส่วนลักษณะจุลกายวิภาคผิวหนังปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ที่ได้รับ LC₅₀ ของคอปเปอร์ซัลเฟตที่ช่วงเวลาต่างๆ มีลักษณะปกติ โดยผิวหนังประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ได้แก่ ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) และผิวหนังใต้ชั้นหนังแท้ (hypodermis) ซึ่งตั้งอยู่บนชั้นกล้ามเนื้อ

และพบว่าความหนาชั้นหนังกำพร้าลูกปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟตไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ดัง Table 2

Table 1 Gill histopathology of Nile tilapia fry after treated with CuSO₄ at LC₅₀ concentration for 1, 2, 6, 24, 48, 72 and 96 hours (n=10).

Histopathology	No. of abnormal fish / No. of fish examined (hour)						
	(n=10)						
	1	2	6	24	48	72	96
1. Fusion of gill lamellae	9/10 (90)	6/10 (60)	6/10 (60)	-	1/10 (10)	2/10 (20)	5/10 (50)
2. Disarray of gill lamellae	1/10 (10)	4/10 (40)	2/10 (20)	6/10 (60)	4/10 (40)	1/10 (10)	3/10 (30)
3. Lifting of gill lamellae	3/10 (30)	2/10 (20)	4/10 (40)	3/10 (30)	-	-	-
4. Colloid in gill lamellae	-	2/10 (20)	-	-	1/10 (10)	3/10 (30)	2/10 (20)
5. Curling in gill lamellae	-	2/10 (20)	-	-	1/10 (10)	-	-

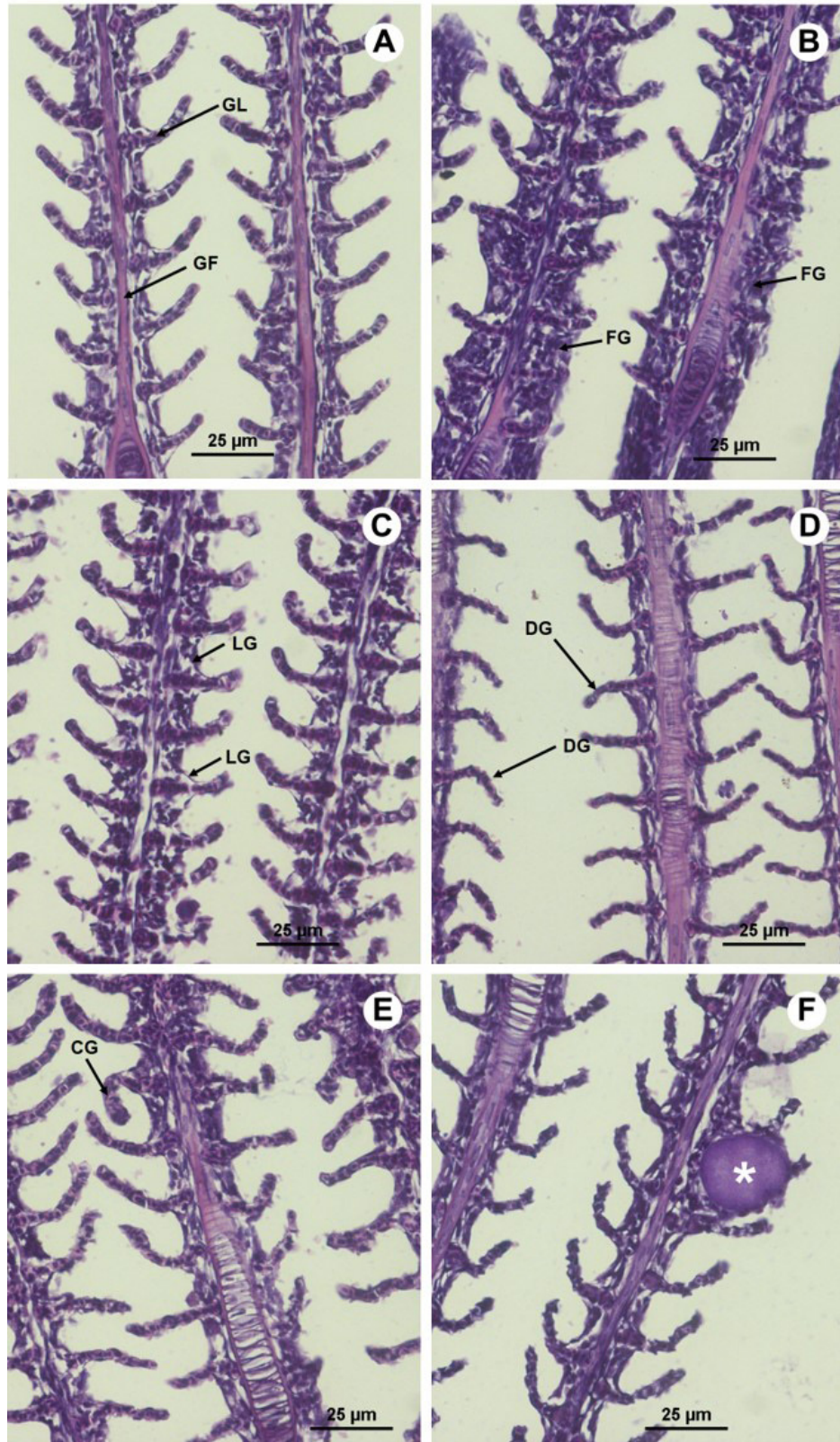


Figure 1 Histopathological changes in gills of Nile Tilapia fry after treated with CuSO_4 (H&E). A. Control group showing normal gill filament (GF) and gill lamellae (GL). B-F. Treatment groups for 1, 2, 24, 48 and 96 hours showing fusion (FG), lifting (LG), disarray (DG), curling (CG) of gill lamellae and colloid (*) in gill lamella.

Table 2 Mean±standard deviation (SD) of epidermal thickness of Nile tilapia fry (n=10) of both control and treatment groups after treatment with LC₅₀ concentration of copper sulfate at 1, 2, 6, 24, 48, 72 and 96 hours. (n=10).

Durations (hour)	Epidermal thickness (Mean±SD) (µm)	
	Control group	Treatment group
1	39.20±5.30	37.20±2.83
2	47.20±6.27	40.40±3.40
6	33.60±10.22	40.00±6.83
24	39.20±4.34	44.40±7.71
48	45.60±10.63	33.60±2.37
72	40.80±8.18	42.80±8.45
96	36.80±7.61	36.40±3.60

พฤติกรรมกรวยน้ำของลูกปลา

ลูกปลากลุ่มทดลองในการทดลองขั้นต้นและขั้นละเอียดที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟตทุกระดับความเข้มข้น แสดงพฤติกรรมกรวยน้ำที่ผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยลูกปลาน้ำกรวยน้ำแบบสะเปะสะปะ บางตัวว่ายน้ำขึ้นมาสู้อากาศที่ผิวน้ำ ปิด-เปิดแผ่นปิดเหงือกถี่ขึ้น เสียการทรงตัว เมื่อเวลาผ่านไปลูกปลาว่ายน้ำช้า และหยุดเคลื่อนไหว มีสีลำตัวและแถบลดตายซีดจาง และตายในที่สุด

วิจารณ์และสรุปผล

จากผลการศึกษานี้พบว่าค่า LC₅₀-96 hr ของ คอปเปอร์ซัลเฟตต่อลูกปลานิลเท่ากับ 6.671 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการศึกษาผลของคอปเปอร์ซัลเฟตต่อปลานิลระยะรุ่น (fingerling) และระยะโตเต็มวัย (adult) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 31.20¹² และ 58.83¹³ มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากระยะการเจริญของสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นระยะลูกปลา จากการทดลองทำให้พบว่าระยะการเจริญของปลาอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ปลาระยะวัยอ่อน (juvenile) มีความไวต่อคอปเปอร์ซัลเฟตได้เร็วกว่าปลาระยะโตเต็มวัย¹ รวมทั้งความเป็นพิษของ คอปเปอร์ซัลเฟตอาจมีความผันแปรอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชนิดของปลาและปัจจัยอื่น เช่น ขนาดของปลา กลไกทางเมแทบอลิซึมของคอปเปอร์ไอออนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของปลา¹⁴ และสภาพทางสรีระของปลา¹⁵ นอกจากนี้การที่ LC₅₀ ของคอปเปอร์มีค่าแตกต่างกันนั้น อาจเนื่องจากลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำที่ใช้

ทดสอบ ชนิดและอายุของปลาที่ใช้ทดลองและอัตราความไวของปลาต่อคอปเปอร์เป็นผลทำให้ความเป็นพิษมีค่าแตกต่างกัน¹⁶ ปลาแต่ละชนิดจะมีวิถี เมแทบอลิซึม (metabolic pathway) แตกต่างกันอาจเนื่องจากรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (bio-transformation) มีความแตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดเมแทบอลิต์ (metabolite) ที่เป็นพิษมากหรือน้อย ในการศึกษาครั้งนี้ค่า LC₅₀-96 hr ที่ได้มีค่าน้อย เมื่อเทียบกับค่า LC₅₀-96 hr ที่ปลาแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) ได้รับ (70.135 มิลลิกรัมต่อลิตร)¹³ ดังนั้นชนิดของปลาที่ใช้ทดลองจะส่งผลต่อการตอบสนองต่อความเป็นพิษของคอปเปอร์ซัลเฟตด้วย¹⁷

ในการศึกษานี้ คอปเปอร์ซัลเฟตมีผลอย่างรุนแรงต่อเหงือกของลูกปลานิลทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับสารนาน 1, 2, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ลักษณะจุลพยาธิสภาพที่พบมากที่สุด คือเนื้อเยื่อบุผิวของซี่เหงือกเพิ่มจำนวน จึงทำให้ซี่เหงือกเชื่อมติดกัน ชั้นเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวบางบริเวณแยกตัวออกจากกัน บางบริเวณเกิดการบวมหน้าและแยกตัวออก ซึ่งสอดคล้องกับความผิดปกติที่พบในปลานิลระยะโตเต็มวัย (น้ำหนักเฉลี่ย 35.30±5.9 กรัม) ที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 21 วัน¹⁸ รวมทั้งความผิดปกติของเหงือกปลาไน (*Cyprinus carpio*) ที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร¹⁹ เช่นเดียวกับการพบลักษณะการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวและการเชื่อมติดกันของซี่เหงือกในปลาลิ้นหมา (*Solea senegalensis*) วัยอ่อนที่ได้รับ LC₅₀-96 hr คอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 0.32 มิลลิกรัมต่อลิตร²⁰ การเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวและการเชื่อมติดกันของซี่เหงือกเป็นกลไกที่ปลาใช้ป้องกันตัวเอง เนื่องจากการแยกตัวของชั้นเซลล์ในซี่เหงือกเป็นการเพิ่มระยะทางของการแพร่ผ่านของมลพิษในน้ำที่จะเข้าถึงกระแสเลือดให้มากขึ้น ซึ่งส่งผลให้การแลกเปลี่ยนก๊าซของเหงือกเสียไป^{18, 19}

ในลูกปลานิลบางตัวพบการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ การงอ และม้วนตัวของซี่เหงือก ซึ่งได้ผลคล้ายกับลักษณะที่ผิดปกติของซี่เหงือกที่พบในปลาไน¹⁹ ซึ่งอาจเป็นผลโดยตรงจากโลหะหนัก นอกจากนี้ยังพบหยดคอลลอยด์ (colloid) มีลักษณะมันวาวเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน (glassy homogeneous material) แทรกตัวในซี่เหงือกบางอันของลูกปลานิลกลุ่มทดลองภายหลังได้รับคอปเปอร์ซัลเฟตนาน 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ เหงือกเป็นอวัยวะสำคัญที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ และมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับควบคุมไอออน ออสโมซิส และรักษาสมดุลกรด-ด่าง²¹ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลพยาธิสภาพของเหงือกส่งผลให้การหายใจของปลาผิดปกติ

และไปขัดขวางสมดุลของอิเล็กโทรไลต์ (electrolytes) เมื่อปลาได้รับคอปเปอร์แล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลกายวิภาคของเหงือกดังกล่าว ซึ่งถือว่าเป็นการป้องกันจากการอักเสบ (inflammatory response) และการชดเชยในร่างกาย (compensatory response) โดยมีการเพิ่มจำนวนเซลล์และมีการหลั่งเมือก^{22, 23} การตอบสนองทั้ง 2 อย่างนี้เป็นการช่วยให้การแพร่ผ่านของสารพิษหรือมลพิษช้าลง ยับยั้งไม่ให้สารพิษหรือมลพิษเข้าไปใกล้กระแสเลือดและช่วยป้องกันการทำลายที่เกิดจากคอปเปอร์โดยตรง เช่น มีการตายและการหลุดลอกของเนื้อเยื่อเหงือก²⁴ และการที่เหงือกปลามีการเปลี่ยนแปลงนั้นสามารถก่อให้เกิดผลเสียอย่างรุนแรงต่อสุขภาพปลา อาจไปเพิ่มความไวต่อการติดเชื้อของปลา ในที่สุดทำให้ปลาตาย²⁵ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าคอปเปอร์ซัลเฟตไม่มีผลต่อผิวหนังลูกปลานิลทุกกลุ่มทดลอง คือไม่พบความผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกับการได้รับคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรของปลา Khazar white (*Rutilus kutum*)²⁶

นอกจากนี้ คอปเปอร์ซัลเฟตยังมีผลต่อพฤติกรรมการว่ายน้ำที่ผิดปกติของลูกปลานิลทุกกลุ่มทดลอง ซึ่งได้ผลคล้ายกับการศึกษาในปลานิลระยะโตเต็มวัยโดยพบว่า 3 วันแรกที่ปลาได้รับคอปเปอร์ ซัลเฟตจะมีการปิด-เปิดแผ่นปิดเหงือกถี่ขึ้น ตามด้วยสีลำตัวเข้มขึ้น สูญเสียสมดุลในการว่ายน้ำและจมอยู่ที่ก้นภาชนะที่ใช้ทดสอบจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง²⁷ รวมทั้งยังพบพฤติกรรมที่ผิดปกติในปลาชนิดอื่น เช่น ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) ที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 1.17 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลาแสดงพฤติกรรมการว่ายน้ำผิดปกติ สูญเสียความสมดุล และมีอัตราการตายสูง¹⁷ เช่นเดียวกับปลาตู้แอฟริกาที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟตมีแบบแผนการว่ายน้ำไม่คงที่ โดยมีการกระตุกส่วนลำตัว ส่วนหางแข็งตัวและยืดออก ปลาสูญเสียความสมดุลและหมดแรงภายหลังจากที่ปลาพยายามหลีกเลี่ยงจากความเครียด (stress avoidance) ที่เกิดจากคอปเปอร์ซัลเฟต ปลายังคงลอยตัวอยู่ในแนวตั้งโดยมีปากตั้งขึ้นใกล้กับผิวน้ำ และมีส่วนหางชี้ลงด้านล่าง แล้วปลาจะจมอยู่ที่ก้นภาชนะและไม่เคลื่อนที่¹³

การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงจุลกายวิภาคของเหงือกเป็นผลมาจากปลาได้รับคอปเปอร์ซัลเฟต แต่ไม่มีผลต่อจุลกายวิภาคของผิวหนัง ซึ่งสอดคล้องกับพฤติกรรมการว่ายน้ำของลูกปลานิลกลุ่มทดลองที่ว่ายน้ำผิดปกติ สูญเสียความสมดุล แผ่นปิดเหงือกปิด-เปิดอย่างรวดเร็ว และสีลำตัวซีด ดังนั้นอาจใช้เหงือกเป็นเครื่องมือที่บอกความไวต่อความเป็นพิษของโลหะหนักและสิ่งก่อมลพิษอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณทัศนพร กาญจนเรखा สำหรับการเตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตในการทดสอบทุกระดับความเข้มข้นตลอดการทดลอง และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดขอนแก่นที่อนุเคราะห์พันธุ์ปลาที่ใช้ในการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

- Okocha RO, Adedeji OB. Overview of copper toxicity to aquatic life, Rep Opinion 2012; 4(8): 57-67.
- Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc, J Am Diet Assoc 2001; 101(3): 294-301.
- CDA. Copper in human health. Copper Development Association 2015. Available from: http://www.copper.org/consumers/health/cu_health_uk.html. Accessed January 29, 2016.
- สุนิสา ชายเกลี้ยง. พิษวิทยาสาธารณสุข. พิมพ์ครั้งที่ 1 ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2557.
- CDA. Uses of copper compounds: copper sulphate's role in agriculture. Copper Development Association 2014. Available from: http://www.copper.org/resources/properties/compounds/copper_sulfate02.html. September 15, 2014.
- U.S. EPA. Copper facts. Office of pesticides programs. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 2008.
- Bartley TR. Investigations of copper sulfate for aquatic weed control. Water Resources Technical Publication Environmental Science Section Engineering and Research Center. Colorado: 1976.
- Watson C, Yanong RP. Use of copper in freshwater aquaculture and farm ponds. In Fact Sheet of Food and Agricultural Science FA-13, Department of Fisheries and Aquatic Science, Florida; 2006: 1-2.
- ศิริพร บุญดาว, นิตานาถ ละอองพันธ์, อุไร เฟงพิศ, อัมพร คล้ายแก้ว. การประเมินผลตกค้างของสารควบคุมสาหร่ายชั้นต่ำโดยใช้สัตว์พื้นท้องน้ำในอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี. รายงานผลการวิจัยของสำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์;

- 2552.
10. สันต์ นาทะสุวรรณ. คู่มือปลาหน้าจืด. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์เทพพิทักษ์; 2548.
 11. Finney DJ. Probit Analysis. 3rd Edition Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
 12. Alkobaby AI, El-Wahed R KA. The acute toxicity of copper to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings and its effects on gill and liver histology. J Aquac Res Development 2017; 8: 1(1-6).
 13. Ezeonyejiaku CD, Obiakor MO, Ezenwelu CO. Toxicity of copper sulphate and behavioral locomotor response of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and catfish (*Clarias gariepinus*) species. J Anim Feed Res 2011; 1(4): 130-134.
 14. De Boeck G, Meeus W, De Coen W, Blust R. Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*). Aquat Toxicol 2004; 70: 179-188.
 15. Tavares-Dias M, Ferreira J, Affonso E, Ono E, Martins M. Toxicity and effects of copper sulphate on parasitic control and haematological response of Tambaqui *Colossoma macropomum*. Boletim do Instituto de Pesca 2011; 37: 355-365.
 16. Johnson CM, Toledo MF. Acute toxicity of endosulfan to the fish *Hyphessobrycon bifasciatus* and *Brachydanio rerio*. Arch Environ Contam 1993; 24: 151-155.
 17. Park K, Heo GJ. Acute and subacute toxicity of copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in the guppy (*Poecilia reticulata*). J Vet Med Sci 2008; 71(3): 333-336.
 18. Figueiredo-Fernandes A, Ferreira-Cardoso JV, Garcia-Santos S, Monteiro SM, Corrola J, Matos P, Fontainhas-Fernandes A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinaria Brasileira 2007; 27(3): 103-109.
 19. Karan V, Vitorovic S, Tutundzic V, Poleksic V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery, Ecotoxicol Environ Saf 1998; 40: 49-55.
 20. Oliva M, Garrido MC, Sales Márquez D, González de Canales M.L. Sublethal and lethal toxicity in juvenile Senegal sole (*Solea senegalensis*) exposed to copper: a preliminary toxicity range-finding test, Exp Toxicol Pathol 2009; 61(2): 113-21.
 21. Evans DH. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants, Environ Health Perspect 1987; 71: 47-58.
 22. Mallatt J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review, Can J Fish Aquat Sci 1985; 42: 48-630.
 23. Takashima F, Hibiya T. An atlas of fish histology. 2nd Edition Tokyo: Kodansha. 1995.
 24. Cerqueira C, Fernández M. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*, Ecotoxicol Environ Saf 2002; 52: 83-91.
 25. Hawkins WE, Overstreet RM, Provancha JM. Effects of space shuttle exhaust plumes on gills of some estuarine fishes: a light and electron microscopic study, Gulf Res Rep 1984; 7: 297-309.
 26. Farokhrooz M, Zamini A, Mozafari E. Effects of formalin and copper sulfate on skin tissues of Khazar white fish (*Rutilus kutum*). Quart J Anim Phys Dev, 2014; 7(24): 49-58.
 27. Nouh WG, Selim AG. Toxopathological studies on the effect of formalin and copper sulphate in tilapia as a commonly used disinfectant in aquaculture, JAEBS 2013; 3(6): 7-20.