

การศึกษาทางพยาธิวิทยาในปลาเศรษฐกิจของประเทศไทย ภายหลังได้รับสารพิษสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย

ปิยะวัฒน์ ผลสนอง^{1*} อัจฉริยา ไสละสูต² อภารัตน์ มหาขันธ์³

Abstract

Piyawat Pholsanong^{1*} Achariya Sailasuta² Aparat Mahakhant³

PATHOLOGICAL STUDIES IN THAILAND ON COMMERCIALY VALUED FISH AFTER EXPOSURE TO CRUDE CYANOTOXIN EXTRACT

Pathological changes in four species of Thai commercially valued fish (age 1-1.5 month), Gunther's walking catfish, *Clarius macrocephalus* (Gunther), Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) and common silver barb, *Barbodes gonionotus* (Bleeker), after exposure to crude cyanotoxin extract, at different concentrations, were investigated. The cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, was collected from a fish farm in Pathum Thani province and analyzed using HPLC. Skin, liver and gills were histopathologically examined. The skin showed significant, lesions of irritation and epidermal layers were thickened, by an increase of mucous cells, in the scaled species, Nile tilapia and common silver barb, while the non-scaled species, Gunther's walking catfish and striped catfish showed an increase of club cells. Severe congestion existed in the liver of the non-scaled species, as well as in the gills of all treated groups. It was believed that the fish died due to respiratory failure. The results indicated that microcystins, the endotoxin of *M. aeruginosa*, in a crude extract, caused the pathological effects seen in the four species of Thai, commercially valued, fish.

Keywords : pathology, crude cyanotoxin extract, cyanobacterium, commercially valued fish

¹Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Salaya, Nakhorn Pathom 73170

²Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330.

³Microbial Resource Center, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkhen 10900

*Corresponding author

¹คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

²ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

³ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย บางเขน กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

ปิยะวัฒน์ ผลสนอง^{1*} อัจฉริยา ไสละสูต² อาภารัตน์ มหาจันทร์³

การศึกษาทางพยาธิวิทยาในปลาเศรษฐกิจของประเทศไทยภายหลังได้รับสารพิษสกัด หยาดจากไซยาโนแบคทีเรีย

การศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในผิวหนัง ตับ และเหงือกของปลาเศรษฐกิจของประเทศไทย 4 ชนิดได้แก่ ปลา
ดุก *Clarius macrocephalus* Gunther, ปลานิล *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), ปลาสวาย *Pangasius hypophthalmus*
(Sauvage) และปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus* (Bleeker) อายุประมาณ 1-1.5 เดือน ที่สัมผัสกับสารพิษสกัดหยาดจาก
ไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* จากบ่อเพาะพันธุ์ปลาที่ จ.ปทุมธานี ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ตรวจวัดปริมาณ
สารพิษไมโครซิสตินด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) จากการศึกษาพรอยโรคที่ผิวหนัง
ของปลาทั้ง 4 ชนิด มีการหนาตัวของชั้นหนังกำพร้า พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์สร้างเมือกอย่างชัดเจนในกลุ่มปลาที่มีเกล็ดคือ
ปลานิลและปลาตะเพียนขาว ส่วนกลุ่มปลาไม่มีเกล็ดคือปลาดุกและปลาสวายพบการเพิ่มขึ้นของเซลล์คล้ายอย่างชัดเจน พบการ
คั่งเลือดอย่างรุนแรงในตับของปลาไม่มีเกล็ดและในเหงือกของปลาทั้ง 4 ชนิด สาเหตุการตายของปลาเนื่องจากระบบหายใจล้มเหลว
ผลการศึกษานี้ชี้ถึงความเป็นพิษของสารพิษสกัดหยาดจากไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* ที่มีผลต่อปลาเศรษฐกิจ ทั้ง 4 ของ
ประเทศไทย

คำสำคัญ: พยาธิวิทยา สารพิษสกัดหยาด ไซยาโนแบคทีเรีย ปลาเศรษฐกิจ

บทนำ

การเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำ
จัดเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยทั่วโลก โดยมีสาเหตุมาจากการที่
แหล่งน้ำมีสารอาหารปริมาณสูง (eutrophication) ปัญหานี้
นับวันจะทวีความรุนแรงยิ่งขึ้นและขยายวงกว้างออกไปในสิ่ง
แวดล้อม ตั้งแต่แหล่งน้ำผิวดินไปจนถึงบริเวณชายฝั่งทะเล
มีการสำรวจพบว่าร้อยละ 54 ของแหล่งน้ำในภูมิภาคเอเชีย
แปซิฟิกอยู่ในสภาวะยูโทรฟิเค ในส่วนอื่นๆ ของโลก ได้แก่ ยุโรป
แอฟริกา อเมริกาเหนือและใต้ ต่างก็มีแหล่งน้ำในลักษณะดัง
กล่าวอยู่ร้อยละ 53, 28, 48 และ 41 ตามลำดับ (ILEC, 1988-
1993) ปัญหานี้ได้ส่งผลกระทบต่อชีวิตของสัตว์น้ำ ปศุสัตว์
รวมทั้งสุขภาพของมนุษย์อย่างกว้างขวาง (Carmichael, 1992;
Falconer, 1994) สารพิษที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ สารพิษต่อ
ตับในกลุ่มไมโครซิสติน (microcystins) และโนดูลาริน
(nodularins) และสารพิษต่อระบบประสาท กลุ่มอนาโทซิน
(anatoxins) ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary
metabolites) ที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรีย (Carmichael, 1992;
Skulberg et al., 1994) สารพิษเหล่านี้จะถูกปลดปล่อยจาก
เซลล์สาหร่ายลงสู่แหล่งน้ำเมื่อมวลสาหร่าย (algal mass) เริ่ม

แก่หรือตาย หรือถูกทำลายโดยวิธีต่างๆ (เช่น การใช้สารเคมี
กำจัดสาหร่าย) (Berg et al., 1987) รวมทั้งจากมวลสาหร่าย
ที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (algal bloom) (Sivonen et al.,
1990) สารพิษต่อตับกลุ่มไมโครซิสติน ซึ่งพบแล้วกว่า 70
รูปแบบ เป็นสารพิษที่พบได้บ่อยที่สุดในแหล่งน้ำทั่วโลก
รวมทั้งประเทศไทย (Christoffersen, 1996; Mahakhant et al.,
1998) เมื่อสารพิษชนิดนี้ผ่านเข้าสู่เซลล์จะไปยับยั้งการ
ทำงานของเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทส 1 และ 2A
(phosphatases 1 and 2A) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อ
การเจริญเติบโตและการรักษาสภาพโครงสร้างของเซลล์ของ
สิ่งมีชีวิตทั้งในกลุ่มยูคาริโอติก (eukaryotic) และโปรคาริโอติก
(prokaryotic) (Mackintosh et al., 1990; DeMott and Dhawale,
1995) สารพิษจากสาหร่ายนอกจากจะส่งผลกระทบต่อชีวิตและ
สุขภาพของมนุษย์และสัตว์แล้ว ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต
ทุกลำดับ (trophic level) ในนิเวศวิทยาแหล่งน้ำ ตั้งแต่จุลินทรีย์
แพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ สัตว์น้ำต่างๆ ผลของสาร
พิษจากสาหร่ายที่มีต่อปลาได้แก่ ทำลายเซลล์ตับ รบกวนการ
ควบคุมสมดุลแร่ธาตุ เกิดการผิดปกติของลูกปลาวัยอ่อน เกิด
การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม แสดงอาการเครียด อ่อนแอ และ

ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่น การตายของปลาเซลมอนที่เพาะเลี้ยงในกระชังทางชายฝั่งประเทศแคนาดา และสหรัฐอเมริกา โดยมีสาเหตุมาจากสาหร่ายจากสาหร่ายในกลุ่มไมโครซิสติน สร้างจากไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่ออกฤทธิ์ต่อตับ ทำให้ปลาที่เลี้ยงไว้ในกระชังตายลงเป็นจำนวนมาก ด้วยภาวะตับถูกทำลาย (Anderson, 1993)

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งซึ่งพบว่ามีกรณีเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำสำคัญทั่วประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *M. aeruginosa* ซึ่งผลิตสารพิษไมโครซิสติน และพบว่าสาหร่ายดังกล่าวแสดงอาการเป็นพิษในหนูทดลอง โดยทำให้เกิดภาวะของตับถูกทำลายเมื่อหนูได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (Mahakhant, 1998) อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาความเป็นพิษของสาหร่ายจากสาหร่ายในปลาที่มีอยู่จำนวนน้อย และส่วนใหญ่จะมีรายงานเฉพาะปลาสำคัญทางเศรษฐกิจในแถบยุโรป หรืออเมริกา ในขณะที่ผลกระทบของสาหร่ายจากสาหร่ายที่มีต่อปลาเศรษฐกิจในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาวิจัย

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อทำการศึกษาลักษณะของสารพิษไมโครซิสตินจากไซยาโนแบคทีเรียต่อปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย 4 ชนิด คือ ปลาดุก ปลาสรวย ปลานิล และปลาคะเพียน ในแง่ของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของอวัยวะต่างๆ ซึ่งมีผลต่อความอยู่รอดของปลาแต่ละชนิด เมื่อได้รับสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบ

เก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อเพาะเลี้ยงปลาดุกในพื้นที่ ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ซึ่งสำรวจพบว่ามีปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* ด้วยตาข่ายกรองแผงก่อดอน ขนาด 65 ไมครอน และนำมาตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำมวลสาหร่ายมาสกัดสารพิษไมโครซิสตินในรูปสารสกัดหยาบ โดยนำมาปั่นในน้ำกลั่นด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Ultra Turran T25 Basic) นำตัวอย่างไปแช่แข็ง 24 ชม. แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้องเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำละลายเซลล์ นำตัวอย่างที่ละลายแล้วมากรองเพื่อแยกกากเซลล์ออกด้วยกระดาษกรอง (GFC filter paper, Whatman) แล้วนำส่วนของเหลวที่กรองได้มาปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นส่วนของสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบมาวิเคราะห์รูปแบบและปริมาณสารพิษ และทดสอบความเป็นพิษในปลาเศรษฐกิจต่อไป

การวิเคราะห์รูปแบบและปริมาณสารพิษไมโครซิสติน

วิเคราะห์รูปแบบและปริมาณสารพิษโดยวิธีการของ Harada et al. (1988) นำสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบมากรองผ่าน ซี คาร์ทริดจ์ (sep pak C cartridge, Waters) เพื่อแยกสารพิษไมโครซิสตินให้บริสุทธิ์บางส่วน นำคาร์ทริดจ์ที่บรรจุสารพิษไมโครซิสตินมาล้างสารปนเปื้อนชนิดอื่นๆ ออกด้วยเมทานอลเข้มข้น 30% ปริมาตร 20 มล. สะสารพิษไมโครซิสตินออกจากคาร์ทริดจ์ ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 3 มล. แล้วนำสารพิษที่ได้ไประเหยแห้งภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิประมาณ 40°C. ละลายสารพิษไมโครซิสตินที่แห้งแล้ว ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 20% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กรองอีกครั้งด้วยแผ่นกรองเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate filter, Sartorius) ใส่หลอดขนาด 2 มล. นำไปวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC, Hewlett-Packard รุ่น HP110) ควบคุมการทำงานโดยโปรแกรม HP Chemstation Plus (Rev.A.07.01) ที่ความยาวคลื่นของแสงอัลตราไวโอเล็ต 239 นาโนเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ ODS II (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 x 150 มล.) โดยใช้ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเมทานอลอัตราส่วน 4 : 6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่พีเอช 3 อัตราการไหล 1 มล.ต่อนาที เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เปรียบเทียบระยะเวลาที่สารปรากฏ (retention time) และพื้นที่ใต้ส่วนโค้งของสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างกับสารมาตรฐานไมโครซิสติน-อาร์อาร์, วายอาร์ และแอลอาร์ (Kanto Chemical Co., Inc)

การทดสอบความเป็นพิษของสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบในปลาเศรษฐกิจของไทย

ปลาเศรษฐกิจของประเทศไทยที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้คือ ปลาดุก ปลานิล ปลาสวาย และ ปลาคะเพียน อายุประมาณหนึ่งถึงหนึ่งเดือนครึ่ง นำมาจากบ่อเพาะพันธุ์ปลาในจ.พระนครศรีอยุธยา ทำการคัดขนาดให้ใกล้เคียงกัน ปลาดุก 9.5±1.0 ปลานิล 6.5±1.0 ปลาสวาย 11.0±1.0 และปลาคะเพียน 7.0±1.0 ซม. นำมาพักในอ่างไฟเบอร์กลาสขนาด 750 ล. ที่อุณหภูมิบรรยากาศ 30±1°C. โดยเติมอากาศตลอดเวลา เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ แล้วจึงปรับสภาพแวดล้อม (acclimatization) ก่อนให้สัมผัสกับสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบ เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ โดยเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 7x14x7 นิ้ว ที่เติมน้ำ ปริมาตร 10 ล. จำนวน 20 ตัวต่อตู้ เติมอากาศตลอดเวลาให้อาหารวันละ 1 ครั้ง ในเวลา 9.00 น. ตรวจสอบสีของน้ำ

ละลายสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ขึ้นอยู่กับปลาแต่ละชนิด ตามที่ได้

ศึกษาขั้นต้นมาก่อนแล้ว คือ ปลาอุกที่ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อ ล. ปลานิล 0, 300, 400, 500, 600 และ 700 ไมโครกรัมต่อ ล. ปลาสร้อย 0, 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อ ล. และสำหรับปลาตะเพียน 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อ ล. โดยยอคอาหารปลาจนทำการศึกษาก่อนเป็นเวลา 1 วัน เริ่มการทดลองในเวลา 9.00 น. ใช้เวลาในการทดสอบความเป็นพิษ 48 ชม. นำซากปลาดองในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10% เพื่อนำไปตรวจการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในอวัยวะต่างๆ ได้แก่ เหงือก ผิวหนัง และตับ

การศึกษาทางพยาธิวิทยา

ตรวจลักษณะภายนอกของปลาที่ตายจากการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างปลา การทดลองละ 2 ตัว เพื่อทำการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงภายนอกของตัวปลา เช่น ผิวหนัง เหงือก ครีบ ตา และลักษณะความผิดปกติอื่นๆ เก็บตัวอย่างเหงือก ผิวหนัง ตับ และอวัยวะภายในต่างๆ โดยการตัดขวางลำตัวบริเวณหลังครีบอก ขนาดกว้างประมาณ 0.5 ซม. และรักษาสภาพในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10% ในอัตราส่วน 1 : 10 โดยปริมาตร เป็นเวลา 48-72 ชม. ผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ ทางฮิสโตเทคนิค ย้อมสีด้วยฮีมาทอกซาลิน-อีโอซิน (Hematoxylin-eosin; HE) และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผล

รูปแบบและปริมาณสารพิษไมโครซิสตินจากไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* ที่เก็บจากบ่อเพาะเลี้ยงปลาอุก

ผลวิเคราะห์รูปแบบและปริมาณของสารพิษไมโครซิสตินจากสารสกัดด้วย HPLC พบว่ามีปริมาณสารพิษไมโครซิสตินรวม เท่ากับ 1,795.85 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ไซยาโนแบคทีเรีย) โดยจำแนก สารพิษได้ 3 รูปแบบ คือ ไมโครซิสติน-แอลอาร์ (microcystin-LR; L: Leucine, R : Arginine) ไมโครซิสติน-วายอาร์ (microcystin-YR; Y: Tyrosine, R: Arginine) และไมโครซิสติน-อาร์อาร์ (microcystin-RR; R : Arginine, R : Arginine) ในปริมาณ 301.00, 540.50 และ 954.35 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ไซยาโนแบคทีเรีย) หรือร้อยละ 16.76, 30.10 และ 53.14 ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของปลาเศรษฐกิจแต่ละชนิดภายหลังสัมผัสกับสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบ

จากการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะของปลาเศรษฐกิจ 4 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา ภายหลังการสัมผัสสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบที่ละลายน้ำเป็นเวลา 48 ชม. ได้แก่ เหงือก ผิวหนัง และตับ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในอวัยวะต่างๆ เกิดขึ้นดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

1. ผลของสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเหงือกปลา

จากการเปรียบเทียบเหงือกของปลาที่ไม่ได้สัมผัสกับสารพิษ (กลุ่มควบคุม) ในปลาทุกชนิด ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับเหงือกของปลาที่สัมผัสกับสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบพบว่าการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน พบการคั่งเลือด บวมน้ำ การสะสมของเซลล์ต่างๆ เช่น ลิ้มโฟไซต์ ในบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือก (gill stroma) พบลักษณะสำคัญในการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเหงือกที่ตอบสนองต่อสารพิษ ได้แก่ การสะสมของเซลล์ต่างๆ เป็นจำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือก และการอักเสบแบบเฉียบพลันบริเวณเหงือกซึ่งพบการคั่งเลือด ทั้งในซี่เหงือกปฐมภูมิและทุติยภูมิ นอกจากนี้ ในปลาตะเพียนยังพบพยาธิสภาพที่ค่อนข้างรุนแรง คือพบการตายของเซลล์เยื่อเหงือก ลักษณะความรุนแรงของสารพิษที่มีผลต่อเหงือกระดับรองลงมา ได้แก่ ปลาสร้อย ปลานิล และปลาอุก ตามลำดับ (ดังรูปที่ 1) ซึ่งระดับความรุนแรงต่อเหงือกนี้มีความสัมพันธ์กับค่า LC_{50} ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ (อาภารัตน์ และคณะ, 2003)

2. ผลของสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของผิวหนังปลา

จากการศึกษาผลของสารไมโครซิสตินต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของผิวหนังปลาทั้งสี่ชนิด (ดังรูปที่ 2) สามารถแบ่งผลออกเป็นสองกลุ่ม คือ

2.1 กลุ่มปลาที่มีเกล็ด ได้แก่ ปลานิล และปลาตะเพียน พบว่าผิวหนังกำพร้า (epidermal layer) มีความหนาเพิ่มขึ้น โดยมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) ซึ่งวินิจฉัยยืนยันได้โดยการย้อมสีชนิดพิเศษ คือ Alcian blue, pH 3

2.2 กลุ่มปลาที่ไม่มีเกล็ด ได้แก่ ปลาอุก และปลาสร้อย พบว่าผิวหนังชั้นบนมีความหนาเพิ่มขึ้น โดยไม่พบการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเมือก แต่พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์คลับ (club cell)

3. ผลของสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของตับปลา

ผลทางจุลพยาธิวิทยาในตับของปลาที่ใช้ในการทดลองทั้งสี่ชนิด เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบการเปลี่ยนแปลงใน

ตารางที่ 1. การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะต่างๆ ของปลาแต่ละชนิดภายหลังจากสัมผัสกับสารพิษไมโครซิสติน สกัดหยาบจาก *M. aeruginosa* เป็นเวลา 48 ชม. (n = 20 ตัว)

ชนิดปลา	อวัยวะ		
	เหงือก	ผิวหนัง	ตับ
ปลาดุก	- มีการแทรกของเซลล์ชนิดต่างๆ เข้ามาในเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือกปฐมภูมิและทุติยภูมิ	- มีการสร้างเมือกมาก และพบเซลล์ คลับเพิ่มขึ้น - ผิวหนังชั้นบนหนาขึ้น	- พบเลือดคั่งในแอ่งเลือดฝอยในตับ (sinusoids)
ปลานิล	- มีการสะสมของเซลล์ต่างๆ เพิ่มขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือกปฐมภูมิและทุติยภูมิ - เกิดการบวมน้ำ	- มีการสร้างเมือกมากกว่าปกติ โดยพบเซลล์สร้างเมือกมากขึ้น - ผิวหนังชั้นบนหนาขึ้น	-
ปลาสร้อย	- มีการสะสมของเซลล์ต่างๆ เพิ่มขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือกปฐมภูมิและทุติยภูมิ	- มีการสร้างเมือกมาก และพบเซลล์ คลับเพิ่มขึ้น - ผิวหนังชั้นบนหนาขึ้น	- พบเลือดคั่งในแอ่งเลือดฝอยในตับ (sinusoids)
ปลาดุกเทศ	- มีการสะสมของเซลล์ต่างๆ เพิ่มขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือกปฐมภูมิและทุติยภูมิ - มีการตายของเซลล์เยื่อบุซี่เหงือก	- มีการสร้างเมือกมากกว่าปกติ โดยพบเซลล์สร้างเมือกมากขึ้น - ผิวหนังชั้นบนหนาขึ้น	-

หมายเหตุ - ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ชัดเจน

ตารางที่ 2. เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะต่างๆ ของปลาแต่ละชนิดที่สัมผัสกับสารพิษ ไมโครซิสตินสกัดหยาบในความเข้มข้นต่างๆ (n = 20 ตัว)

ชนิดปลา	ปริมาณสารพิษ		อวัยวะ		
	ไมโครซิสตินสกัดหยาบ ¹ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	เหงือก	ผิวหนัง	ตับ	
ปลาดุก	1,000	+	+++ ²	+++	
	800	+	+++	+++	
	600	+	+++	++	
	400	+	++	+	
	200	+	++	+	
	0	±	-	-	
ปลานิล	700	+++	+++	-	
	600	+++	+++	-	
	500	+++	++	-	
	400	+++	+	-	
	300	+++	+	-	
	0	±	-	-	
ปลาซวย	500	+++	++	-	
	450	+++	++	-	
	400	+++	++	++	
	350	+++	+	++	
	300	+++	+	+	
	0	±	-	-	
ปลาตะเพียน	300	+++	+++	-	
	250	+++	+++	-	
	200	+++	+++	-	
	150	+++	++	-	
	100	+++	++	-	
	0	±	-	-	

หมายเหตุ ¹ปริมาณไมโครซิสตินรวมประกอบด้วยไมโครซิสติน-แอลอาร์, วายอาร์ และอาร์อาร์ ในปริมาณร้อยละ 16.76, 30.10 และ 53.14 ตามลำดับ

²การประเมินระดับความรุนแรงของลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

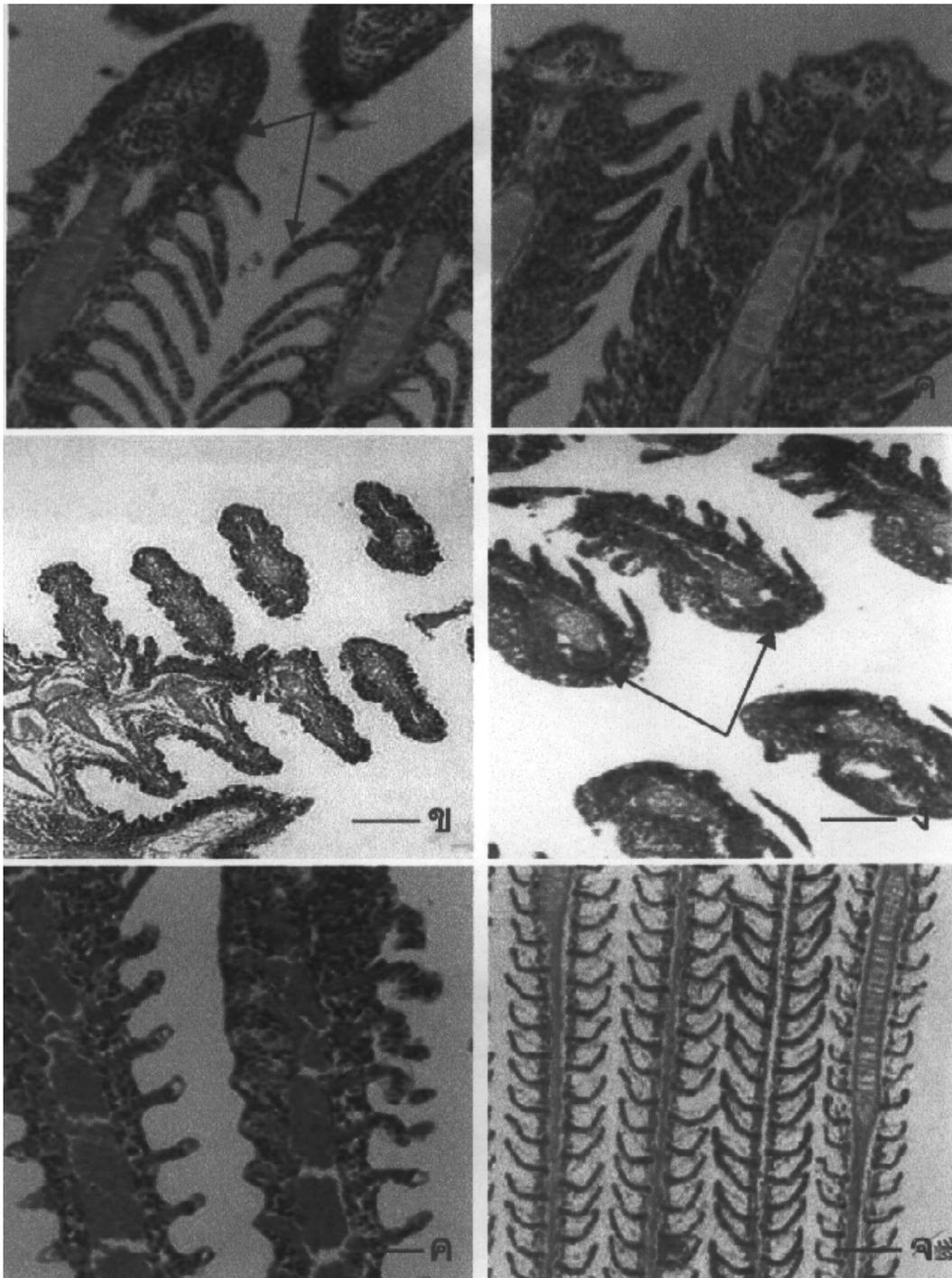
+++ = มาก

++ = ปานกลาง

+ = น้อย

± = น้อยมาก

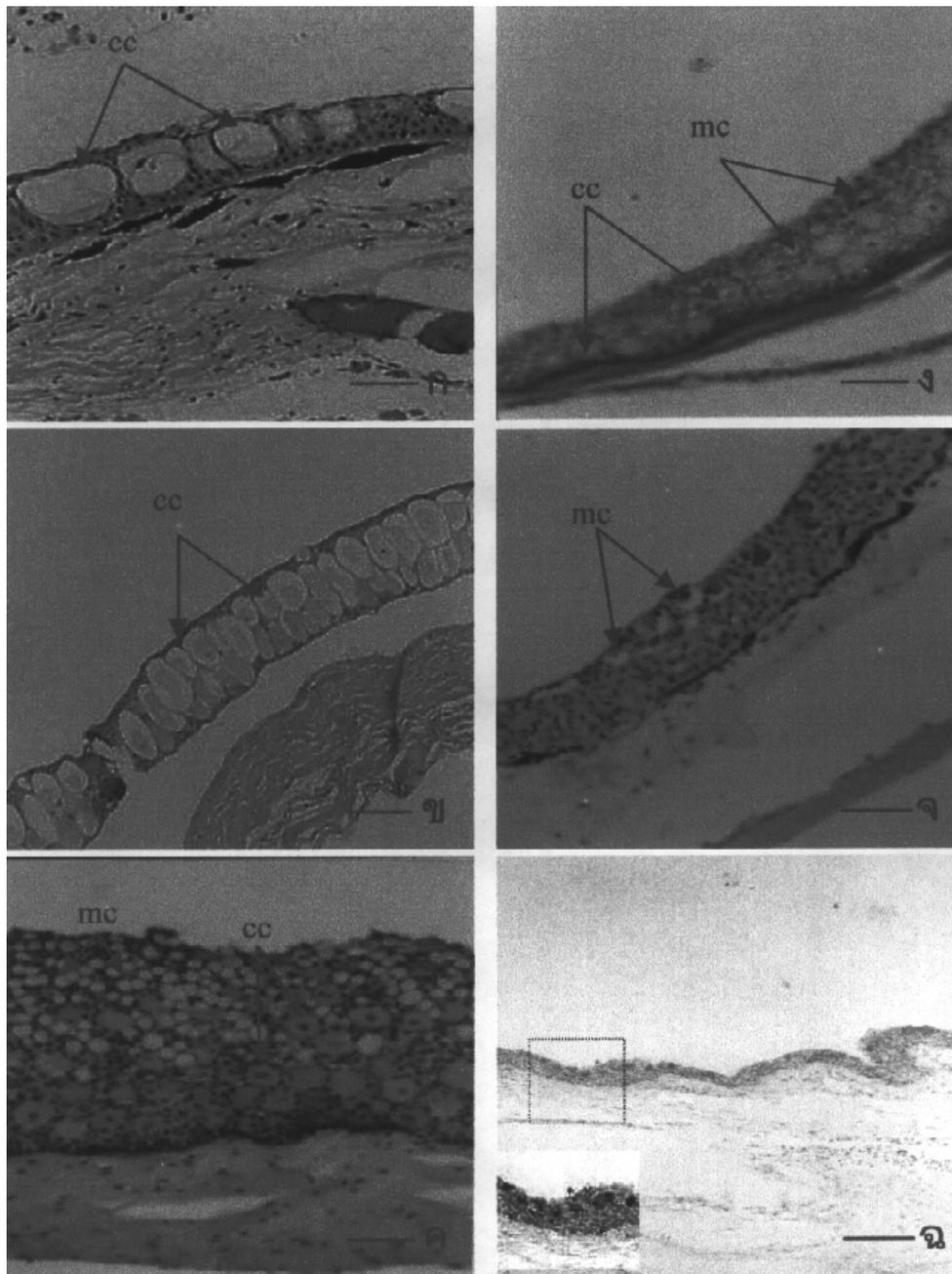
- = ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ชัดเจน



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเหงือกปลา หลังจกสัมผัสสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบ

- (ก) กลุ่มควบคุมของปลาตะเพียน พบการเปลี่ยนแปลงในระดับน้อยมากเมื่อไม่ได้รับสารพิษไมโครซิสติน (ลูกศร) H&E
- (ข) กลุ่มควบคุมของปลาดุก พบการเปลี่ยนแปลงในระดับน้อยมาก H&E
- (ค) พบการอักเสบอย่างรุนแรงตลอดซี่เหงือกปฐมภูมิและทุติยภูมิของปลาสาวย (สารพิษเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อลิตร) H&E
- (ง) พบการอักเสบอย่างรุนแรงตลอดซี่เหงือกปฐมภูมิและทุติยภูมิของปลาตะเพียน ร่วมกับภาวะการคั่งเลือด (สารพิษเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อลิตร) H&E
- (จ) พบการอักเสบอย่างรุนแรงของซี่เหงือกปลาดุก เมื่อสัมผัสกับสารไมโครซิสติน มีการสะสมของเซลล์ในบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือก ร่วมกับการคั่งเลือด บริเวณปลายซี่เหงือกปฐมภูมิ (สารพิษเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร) H&E
- (ฉ) ลักษณะซี่เหงือกของปลานิล พบการอักเสบในซี่เหงือกทุติยภูมิ (สารพิษเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร)

(Bar = 10 ไมโครเมตร (ก), (ข), (ง), (จ), (ฉ) และ 20 ไมโครเมตร (ค))



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของผิวหนังปลา หลังสัมผัสกับสารไมโครคริสตินสกัดหยาบ

- (ก) กลุ่มควบคุมของปลาสาวย แสดงเซลล์คลับ (cc) ในชั้นบนสุด H&E
- (ข) ผิวหนังชั้นบนสุดของปลาสาวยหนาขึ้น ด้วยการเพิ่มจำนวนของเซลล์คลับ (cc) (ลูกศร) (สารพิษเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร) H&E
- (ค) การหนาตัวของผิวหนังชั้นบนสุดของปลาตุ๊ก โดยมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์คลับ (cc) เป็นจำนวนมาก (ลูกศร) (สารพิษเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร) H&E
- (ง) การเพิ่มจำนวนของเซลล์คลับ (cc) และเซลล์สร้างเมือก (mc) บริเวณผิวหนังชั้นบนสุดของปลาตะเพียน (สารพิษเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร) H&E
- (จ) ลักษณะของเซลล์สร้างเมือก (mc) ที่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากบนผิวหนังชั้นบนสุดของปลานิล (สารพิษเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร) H&E
- (ฉ) แสดงการติดสีฟ้าของเซลล์สร้างเมือก เพิ่มขึ้นบริเวณผิวหนังชั้นบนสุดของปลาตะเพียนหลังสัมผัสสารพิษ (สารพิษเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อลิตร) Alcian Blue pH 3
(Bar = 10 ไมโครเมตร (ก), (ข), (ง), (จ) และ 5 ไมโครเมตร (ง), (Alcian Blue pH3, Bar = 10 ไมโครเมตร (ฉ))

ค้ำของปลาที่ไม่มีเกล็ดได้แก่ ปลาตุ๊ก และปลาสาวย พบว่า มีเลือดคั่งในตับมากกว่าปกติ

วิจารณ์

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นสาเหตุการตายของปลาเนื่องจากการล้มน้ำของระบบหายใจซึ่งส่งผลต่อความล้มน้ำของระบบหมุนเวียนโลหิต เนื่องจากซีเหงือกเป็นอวัยวะสำคัญในการหายใจ และการแลกเปลี่ยนออกซิเจนในระบบหมุนเวียนเลือดของปลา ภาวะระบบหายใจล้มน้ำจึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ปลาตาย เช่นเดียวกับที่มีรายงานการศึกษาการตายของปลาในแหล่งน้ำที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* ในสหราชอาณาจักร (Rodger et al., 1994) และการศึกษาในปลานิลและปลาเทราท์ (Garcia, 1989; Gaete et al., 1994; Bury et al., 1996) ในกรณีของปลาตุ๊กเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของซีเหงือกทั้งที่สัมผัสและไม่สัมผัสกับสารพิษของปลาตุ๊ก (กลุ่มควมคุม) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันมากนัก อาจเนื่องมาจากนอกเหนือจากซีเหงือกแล้ว ปลาตุ๊กมีอวัยวะพิเศษที่ช่วยในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (labyrinth) ซึ่งช่วยให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้หากเกิดปัญหาเกี่ยวกับซีเหงือก ลักษณะนี้จึงเป็นเหตุผลที่อธิบายถึงความทนทานของปลาตุ๊กต่อสารพิษไมโครซิสตินได้

จากการศึกษาแม้จะพบว่าสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบมีผลต่อซีเหงือกปลาตุ๊กน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับปลาชนิดอื่น แต่พบว่าปลาตุ๊กเป็นปลาชนิดที่แสดงอาการระคายเคืองต่อการสัมผัสสารพิษทางผิวหนังมากที่สุด ซึ่งนอกจากจะพบว่าผิวหนังกำพืด มีความหนาเพิ่มขึ้น จากการเพิ่มจำนวนเซลล์คลีบแล้ว ยังพบการหลุดลอกของผิวหนังชั้นนี้ด้วย ความหนาของชั้นผิวหนังที่เพิ่มขึ้น จากการเพิ่มจำนวนของทั้งเซลล์สร้างเมือกและเซลล์คลีบ ซึ่งมีหน้าที่โดยตรงต่อการหลั่งเมือกหรือสารเคลือบผิวหนังปลา เพื่อปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตทั้งสภาพทางกายภาพ ชีวภาพ และเคมีของแหล่งน้ำ ทั้งนี้อาจเป็นการลดโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้ออวัยวะจากสภาวะที่อ่อนแอ หลังจากการสัมผัสกับสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบ ซึ่งในเมือกที่ปลาผลิตขึ้นนี้มีสารหลายชนิด เช่น อิมมูโนโกลบูลิน ไลโซไซม์ ฮีโมไลซิน และเลคติน เป็นต้น สารเหล่านี้มีผลทำลายและยับยั้งการเกิดโรคต่างๆ อันเนื่องมาจากการแทรกซ้อนจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (Ellis, 1981) ลักษณะของผิวหนังชั้นบนที่มีความหนาเพิ่มขึ้นกว่าปกติขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ตอบสนองต่อการสัมผัสกับสารพิษ เช่นเดียวกับที่เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับผิวหนังของคนที่สัมผัสกับสารพิษไมโครซิสติน เช่น อาการระคายเคือง และเป็นแผลตามอวัยวะที่สัมผัส ได้แก่ ริมฝีปาก ผิวหนัง เป็นต้น (Turner et al., 1990; Cohen and Rief, 1993; Pilotto, 1997)

จากการตรวจสอบอวัยวะภายในของปลานิลและปลาคะเทียนไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างชัดเจนในตับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการล้มน้ำของระบบหายใจและการไหลเวียนเลือด ทำให้ปลาตายอย่างเฉียบพลันก่อนที่สารพิษไมโครซิสตินจะมีผลต่อตับ อย่างไรก็ตามการแสดงลักษณะการอักเสบของตับซึ่งพบเฉพาะปลาตุ๊กและปลาสาวยนั้น อาจเป็นไปได้ว่า สารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบสามารถซึมผ่านทางผิวหนังที่ไม่มีเกล็ดของปลาตุ๊กและปลาสาวยได้ง่าย อาการอักเสบดังกล่าวนับเป็นพยาธิสภาพเบื้องต้นของตับ ซึ่งยังไม่แสดงลักษณะอาการอย่างชัดเจน เนื่องมาจากการทดลองมีระยะเวลาสั้น คือ 48 ชม. ลักษณะของการเกิดพิษจะรุนแรงยิ่งขึ้นหากมีการศึกษาในระยะเวลาที่นานขึ้น เช่นเดียวกับที่เกิด Net Pen Liver Disease (NPLD) (Anderson, 1993) และจากการรายงานผลจากการฉีดสารไมโครซิสตินเข้าช่องท้องของหนูทดลอง (Falconer, 1994; Falconer and Humpage, 1996)

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้น แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารพิษไมโครซิสตินสกัดหยาบมีความเป็นพิษต่อปลาทั้งในแง่ทำให้เกิดการตาย การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายใน ซึ่งนำมาซึ่งความอ่อนแอของปลาและอาจเป็นสาเหตุของการตายในที่สุด อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า ปลาแต่ละชนิดจะมีผลตอบสนองหรือมีความไวต่อสารพิษไม่เท่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะทางสรีรวิทยาของปลาด้วย เช่น การมีเกล็ดในปลาคะเทียน และปลานิล ซึ่งช่วยปกป้องอันตรายที่จะเกิดแก่ผิวหนังเมื่อได้รับสารพิษ หรือการมีอวัยวะช่วยหายใจพิเศษของปลาตุ๊ก ทำให้มีความทนทานต่อสารพิษความเข้มข้นสูงแม้ผิวหนังจะได้รับอันตรายเนื่องจากเป็นปลาไม่มีเกล็ด แต่ก็มีกลไกป้องกันอันตรายของร่างกายได้ในระดับหนึ่งโดยการสร้างเซลล์คลีบ

เอกสารอ้างอิง

- อาภารัตน์ มหาจันทร์ ปิยะวัฒน์ ผลสนอง อัจฉริยา ไสละสุต กฤติยา ทิสยกร และวัลลภา อรุณไพโรจน์. 2003 (2546). ผลของสารพิษไมโครซิสตินต่อปลาเศรษฐกิจของไทย. โครงการวิจัยที่ ภ. 43-10 การศึกษาความเป็นพิษของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำจืดและแนวทางแก้ไข, รายงานฉบับที่ 12, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. จำนวน 34 หน้า.
- Anderson, R.J., Luu, H.A., Chen, D.Z.X., Holmes, C.F.B., Kent, M., LeBlanc, M., Taylor, F.J.R. and Williams, D.E. 1993. Chemical and biological: Evidence links microcystins to salmon "Net Pen Disease". *Toxicol.* 31: 1315-1323.

- Berg, K., Skulberg, O.M. and Skulberg, R. 1987. Effects of decaying toxic blue-green algae on water quality - a laboratory study. *Arch for Hydrobiologie*. 108: 549-563.
- Bury, N.R., Flik, G., Eddy, F.B., Codd, G.A. 1996. The effect of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{2+} transport and Na^+/K^+ ATPase in Tilapia gills. *J. Exp. Biol*. 199: 1319.
- Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites - the cytotoxins. *J. App. Bact.* 72: 445-459.
- Christoffersen, K. 1996. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia*. 35 (Suppl): 42-50.
- Cohen, S.G. and Rief, C.B. 1953. Cutaneous sensitization to blue-green algae. *J. Allergy*. 24: 452-457.
- DeMott, W.R. & Dhawale, S. 1995. Inhibition of in vitro protein phosphatase activity in three zooplankton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria. *Arch for Hydrobiologie* 134: 417-424.
- Ellis, A.E. 1981. Nonspecific defense mechanism in fish and their role in process. *Dev Biol Stand.* 49: 337-352.
- Falconer, I.R. 1994. Health problem from exposure to cyanobacteria and proposed to guidelines for drinking and recreational water. In: *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. G.A.Codd, T.M. Jefferies, C.W. Keewil, and E. Potter(eds.) Royal Society of Chemistry, Cambridge, 3-10.
- Falconer, I.R. and Humpage, A.R. 1996. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. 35(6 suppl): 74-79.
- Gaete, V., Canelo, E., Lagos, N. and Zambrano, F. 1994. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon*. 82: 121-127.
- Garcia, G.O. 1989. Toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain 7820 to trout and tilapia: clinical and histopathology study. MSc Thesis, University of Stirling U.K.114.
- Harada, K.I., Suzuki, M., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W. and Rinehart, K.L., Jr. 1988. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria, *Toxicon*. 26:433.
- ILEC/Lake Biwa Research Institute (eds). 1988-1993. Survey of the State of the World's Lake. Volume I-IV. International Lake Environment Committee, Otsu and United Nations Environment Programme, Nairobi.
- Mackintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P. and Codd, G.A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2a from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264: 187-192.
- Mahakhant, A., Klungsunya, P., Arunpairojna, V., Sano, T., Watanabe, M.M., Kaya, K. and Atthasampunna, P. 1998. Toxicity of Cyanobacterial Blooms in Thailand. Grant (E) Research Project No. 39-02, Subproject No. 7, Report No. 1, Thailand Institute of Scientific and Technology Research. 18 pp.
- Pilotto, L.S., Douglas, R.M., Burch, M.D., Cameron, S., Beers, M., Rouch, G.R., Robinson, P., Kirk, M., Cowie, C.T., Hardiman, S., Moore, C. and Attewell, R.G. 1997. Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust. N. Zealand J. Public Health*. 21: 562-566.
- Rodger, H.D., Turnbull, T., Edwards, C. and Codd, B.A. 1994. Cyanobacterial bloom associated with pathology in brown trout *Salmo trutta* L. in Loch Leven, Scotland. *J. Fish Dis.* 17: 177-181.
- Sivonen, K., Kononen, K., Carmichael, W.W., Dahlem, A.M., Reinhart, K.L. Kirivanta, J. and Neimella, S.I. 1989. Occurrence of the hepatotoxic bacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic sea and the structure of the toxin. *App. Env. Microbiol.* 55: 1990.
- Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Codd, G.A. and Skulberg, R. 1994. Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria). In: *Algal Toxin in Seafood and Drinking Water*. I. Falconer (ed.) Cambridge, Academic Press 177-187.
- Turner, P.C., Gammie, A.J., Hollinrake, K. and Codd, G.A. 1990. Pneumonia associated with cyanobacteria. *Br. Med. J.* 300: 1440-1441.