การตรวจสอบสารตกค้างของจุนสีในหอยเชอรี่

Detection of Copper Sulfate Residues in the Golden Apple Snails *Pomacea* sp.

วิยะดา สีหบุตร[1*]

Viyada Seehabutr[1*]

ABSTRACT

The 250 golden apple snails *Pomacea* sp. (10-15 g in weight and 3-4 cm in length) were collected from rice field in the Bangluang district, amphoe Muang, Patumthani province after treating with 1 kg per rai of copper sulfate crystal. After 24 hr, 72 hr, 7 d, 14 d, 21 d, 27 d and 36 d of treatments, the visceral mass of survived snails were determined. The amounts of copper residues were 24 ± 0.86, 18.1 ± 0.1, 13.83 ± 1.31, 12.1 ± 1.51, 8.0 ± 0.17, 8.0 ± 0.2 and 5.3 ± 1.0 ppm, respectively. Whereas the amount of copper residues in the visceral mass of dead snails 24 hr after treatment was 29.25 ± 1.25 ppm. In addition, histological examination of the stomach and the digestive gland of dead snails were made under a light microscope. The micrographs revealed that there were changes in epithelium cell height of both organs. Therefore, it was concluded that the stomach and the digestive gland of treated snails, *Pomacea* sp. were damaged by copper.

Key words: *Pomacea* sp., copper sulfate, visceral mass, stomach, digestive gland

บทคัดย่อ

ทำการเก็บหอยเชอรี่จำนวน 210 ตัวที่มีขนาดน้ำหนัก 10-15 กรัมความยาวของเปลือก 3-4 ซม. จากนาข้าวในตำบลบางหลวง อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานีหลังจากหว่านด้วยสารจุนสีในนาข้าวอัตรา 1 กก./ไร่ เมื่อนำอวัยวะภายในของหอยเชอรี่ที่ไม่ตายใน 24 ชม 72 ชม 7 วัน 14 วัน 21 วัน 27 วัน และ 36 วันในพื้นที่นาดังกล่าวมาทำการศึกษา พบคอปเปอร์ที่ตกค้างเป็นจำนวนปริมาณ 24 ± 0.86, 18.1 ± 0.1, 13.83 ± 1.31, 12.1 ± 1.51, 8.0 ± 0.17, 8.0 ± 0.2 และ 5.3 ± 1.0 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ขณะที่จำนวนของคอปเปอร์ที่ตกค้างในอวัยวะภายในของหอยเชอรี่ที่ตายใน 24 ชม มีปริมาณสูงถึง 29.25 ± 1.25 พีพีเอ็ม นอกจากนี้ได้ศึกษามิญชวิทยาของกระเพาะและต่อมสร้างน้ำย่อยของหอยที่ตายใน 24 ชม พบมีการเปลี่ยนแปลงในขนาดความสูงของเซลล์บุช่องว่างในอวัยวะทั้งสองของหอย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า กระเพาะและต่อมสร้างน้ำย่อยของหอยเชอรี่ที่ได้รับสารจุนสี ถูกทำลายโดยคอปเปอร์

คำสำคัญ: หอยเชอรี่ จุนสี อวัยวะภายใน กระเพาะ ต่อมสร้างน้ำย่อย

[1*] ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

[*]Corresponding author: Tel. 0-2562-5555 ext. 3260, Fax.0-2562-5555 ext. 3202, E-mail address: fscibpp@hotmail.com

คำนำ

สารจุนสี (copper sulfate penta hydrate) มีลักษณะเป็นผลึกสีฟ้าละลายน้ำ มีคุณสมบัติเป็นสารควบคุมโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและรากับผลไม้และพืชไร่ นิยมใช้กำจัดสาหร่ายและวัชพืชในแหล่งน้ำชลประทาน (Riagu, 1979) นอกจากนี้ยังใช้กำจัดสัตว์ศัตรูพืช เนื่องจากจุนสีมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase ในสมอง ในหัวใจ ในกล้ามเนื้อและในไต ของสัตว์น้ำหลายชนิด (Olson and Christensen, 1980; Nemcsok *et al*.,1984) เอ็นไซม์ชนิดนี้ส่วนใหญ่พบที่บริเวณที่อยู่ระหว่างเซลล์ประสาทกับเซลล์กล้ามเนื้อ (Hasselmo, 1995) อาการที่เกิดขึ้นในสัตว์ที่ได้รับคอปเปอร์จากสารจุนสีคือ เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเป็นเวลานานตลอดทั่วร่างกาย มีผลทำให้ตายได้ (Pakaski and Kasa, 2003) การที่หอยเชอรี่ไม่ตายอาจจะได้รับคอปเปอร์ในปริมาณต่ำ ดังนั้นสัตว์เศรษฐกิจเช่นเป็ดที่นิยมเลี้ยงในนาข้าว กินหอยเชอรี่เข้าไปหลายตัวจะทำให้เกิดการสะสมคอปเปอร์ในตัวเป็ด คนที่กินเป็ดจะได้รับคอปเปอร์เช่นกัน การทดลองครั้งนี้จึงตรวจหาปริมาณของคอปเปอร์ที่ตกค้างในหอยเชอรี่ และศึกษาผลของสารจุนสีต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับเนื้อเยื่อของหอยเชอรี่ โดยเฉพาะที่กระเพาะและต่อมสร้างน้ำย่อย ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ทางวิชาการในการศึกษาผลของจุนสีต่อสัตว์น้ำชนิดอื่นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การปฏิบัติการในนาข้าว

ทำการทดลองในแปลงนาหว่านจำนวน 30 ไร่ เมื่อต้นกล้าข้าวอายุได้ 17 วัน ทำการหว่านสารจุนสีลงในพื้นที่นาตามจุดที่พบหอยเชอรี่ในอัตรา 1 กก./ไร่ โดยผสมกับทรายในอัตราส่วน 2:1 ในวันรุ่งขึ้นจะพบหอยตายเป็นจำนวนมาก การเก็บหอยเชอรี่ จะสุ่มเก็บ 30 จุด โดยเก็บหลังจากหว่านสารจุนสีแล้วเป็นเวลา 24 ชม 72 ชม 7 วัน 14 วัน 21 วัน 28 วัน และ 36 วัน เฉพาะหอยเชอรี่ที่ตายภายใน 24 ชม ที่นำมาตรวจปริมาณคอปเปอร์ นอกนั้นใช้หอยที่มีชีวิต เพราะหอยที่ตายเน่าไม่สามารถนำมาตรวจได้

การวิเคราะห์หาคอปเปอร์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณคอปเปอร์ตามวิธีของ Stahr (1991) โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (อวัยวะภายใน) 2.5 กรัม (จำนวน 6 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง) ใส่ถ้วย porcelain เติมสารละลาย magnesium acetate 2% จำนวน 2.5 มล.ลงในถ้วย นำตัวอย่างไปทำให้แห้งใน เตาอบ (oven) ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชม ต่อมานำไปเผาในเตาเผา (furnace) ที่ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-8 ชม นำตัวอย่างออกจากเตาเผา เติมกรดเกลือเข้มข้น 4.2 มล.ลงในถ้วย กรองและเจือจางให้ได้ 25 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำมาตรวจด้วยเครื่อง spectronic 20 USA

การคำนวณ

เขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ ความเข้มข้นของสารละลาย (standard concentration) อยู่ที่แกน X และค่าการดูดคลื่นแสง (absorbance) อยู่ที่ แกน Y นำค่าการดูดคลื่นแสงของตัวอย่างโยงตัดกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณคอปเปอร์ จากแกน X

การศึกษาทางมิญชวิทยา

ล้างเนื้อหอยที่เอาเปลือกออกแล้วด้วยน้ำเกลือ แยกเอาเฉพาะส่วนของกระเพาะ (stomach) และต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) เก็บเนื้อเยื่อในฟอร์มาลิน 10% เป็นเวลา 24 ชม ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ (50 %, 70 %, 80 %, 95% and 100 % ตามลำดับ) ฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม ยี่ห้อ Leica RM 2145 Germany ย้อมสีเนื้อเยื่อตัวอย่างที่มีความหนา 6 ไมโครเมตร ด้วยสีฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin) และ อีโอซิน

(eosin) ตรวจพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus

ผลและวิจารณ์

จากการทดสอบพิษของสารจุนสีในห้องปฏิบัติการ พบว่าสารจุนสี มีผลทำให้หอยเชอรี่ตาย แต่เป็นการทดลองในพื้นที่จำกัด ดังนั้นเพื่อหาข้อพิสูจน์ว่าทองแดงมีพิษกับหอยจริง จึงได้ทำการทดลองพิษทองแดงที่อยู่ในรูปคอปเปอร์ซัลเฟตหรือจุนสีกับหอยเชอรี่ในสภาพธรรมชาติ พบว่าภายใน 24 ชม มีหอยตายจำนวนมาก (Figure 1) แต่มีหอยบางกลุ่มไม่ตาย ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณคอปเปอร์ในอวัยวะภายในของหอยที่ตายภายหลังจากการได้รับจุนสีเป็นเวลา 24 ชม คือ 29.25 ± 1.25 พีพีเอ็ม (Table 1) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Cheng and Sullivan (1973) ที่พบว่าคอปเปอร์ในปริมาณมากสามารถทำให้หอยน้ำจืด *Biomphalaria glabrata* มีอัตราการเต้นของหัวใจลดลง และทำให้หอยตาย อาการนี้สามารถพบได้ในหอยน้ำจืด *Australorbis glabratus* หลังจากได้รับสารจุนสีในอัตราความเข้มข้น 0.05-0.1 พีพีเอ็ม (Harry and Aldrich, 1963) หอยที่ไม่ตายภายหลังจากการได้รับจุนสีเป็นเวลา 24 ชม มีปริมาณคอปเปอร์ตกค้างในอวัยวะภายในเป็น 24 ± 0.86 พีพีเอ็ม ขณะที่หอยปกติซึ่งไม่ได้รับสารจุนสี มีคอปเปอร์ในอวัยวะภายในประมาณ 4.5 ± 0.97 พีพีเอ็ม แสดงว่าการมีคอปเปอร์ในอวัยวะภายในเพิ่มขึ้นประมาณ 19.5 พีพีเอ็ม ไม่ทำให้หอยตาย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Shiff and Garnett (1961) รายงานว่า copper sulfate ที่ความเข้มข้น 20 พีพีเอ็ม ไม่ทำให้สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำตาย ทั้งนี้สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำมีเลือดสีแดงจึงไม่มีคอปเปอร์ในเลือด

เนื้อเยื่อในกระเพาะและต่อมสร้างน้ำย่อยของหอยที่ตายหลังจากการได้รับจุนสีเป็นเวลา 24 ชม เปรียบเทียบกับของหอยปกติที่ไม่ได้รับจุนสี พบความแตกต่างของเนื้อเยื่อได้ดังนี้

ในเนื้อเยื่อต่อมสร้างน้ำย่อยของหอยกลุ่มปกติที่ไม่ได้รับจุนสีพบ K corpuscles, C corpuscles
จำนวนมาก ในเซลล์ต่อมสร้างน้ำย่อยที่มีขนาดใหญ่ (Figure 2) ขณะที่เนื้อเยื่อต่อมสร้างน้ำย่อยของหอยเชอรี่กลุ่มที่ตายภายหลังจากการได้รับจุนสีเป็นเวลา 24 ชม มีขนาดและความสูงของเซลล์ลดลง นอกจากนี้ K corpuscles และ C corpusclesในเซลล์ต่อมสร้างน้ำย่อย มีจำนวนน้อยกว่าของหอยกลุ่มปกติ (Figure 3)

เนื้อเยื่อกระเพาะของหอยเชอรี่กลุ่มปกติที่ไม่ได้รับจุนสีจะพบ ciliated epithelial cells เป็นปกติ (Figure 4) ขณะที่เนื้อเยื่อกระเพาะของหอยเชอรี่กลุ่มที่ตายภายหลังจากการได้รับจุนสีเป็นเวลา 24 ชม มีขนาดและความสูงของเซลล์ลดลง การจัดเรียงตัวของเซลล์ผิดไปจากแบบปกติ และบางส่วนของเซลล์ถูกทำลาย (Figure 5) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gamakaranage *et al*. (2011) ที่พบว่าอาการหนึ่งของคนที่ได้รับ copper sulfate คือมีการผลิตเมือก (mucus) โดยเซลล์พิเศษของกระเพาะปริมาณไม่เพียงพอที่จะปกป้องเซลล์บุกระเพาะจากสภาพความเป็นกรดภายในกระเพาะทำให้เซลล์บุกระเพาะถูกทำลาย

หลังการใช้จุนสีในนาข้าวเป็นเวลา 72 ชม 7 วัน 14 วัน 21 วัน 27 วัน และ 36 วัน พบหอยรอดชีวิตจากการได้รับจุนสี โดยตรวจพบปริมาณคอปเปอร์ที่ตกค้างในอวัยวะภายในของหอยเชอรี่ คือ 18.1 ± 0.1, 13.83 ± 1.31, 12.1 ± 1.51, 8.0 ± 0.17, 8.0 ± 0.2 และ 5.3 ± 1.0 พีพีเอ็ม ตามลำดับ (Table 1.) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณคอปเปอร์ที่ตกค้างในอวัยวะภายในของหอยลดลงตามเวลาที่มากขึ้น สอดคล้องกับ Fretter (1953) ที่กล่าวว่าในหอยโพรโซแบรงค์ (หอยเชอรี่อยู่ในกลุ่มนี้) มีเซลล์ที่ทำหน้าที่ควบคุมอิออนในเลือด นอกจากนี้ Fretter และ Graham (1962) ยังกล่าวว่าหอยมีอวัยวะที่ขจัด

ของเสียและอิออนออกจากร่างกาย เช่นที่เซลล์ต่อมสร้างน้ำย่อย เพื่อให้ปริมาณคอปเปอร์เข้าสู่ภาวะปกติ โดยจากการวิจัยพบว่าหอยปกติมีคอปเปอร์ในอวัยวะภายในที่ 4.5 ± 0.97 พีพีเอ็ม ทั้งนี้เพราะเลือดหอยมีฮีโมไซยานิน (haemocyanin) ที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบแต่เลือดของหอยวงศ์ Planorbidae เช่น *Planorbarius comeus* มีฮีโมโกลบิน (haemoglobin) (Lieb *et. al.,* 2006) ในสัตว์ชนิดอื่นเช่นปลาที่ได้รับคอปเปอร์ จะเพิ่มการสร้าง metallothionein ซึ่งจะทำให้ความเป็นพิษของคอปเปอร์หมดไปและเป็นตัวพาคอปเปอร์ออกไปทิ้ง (Roch *et. al.*,1982) ในปลาเพิร์ช (perch) ที่ได้รับคอปเปอร์ 40 ไมโครกรัม/ลิตร สามารถทำลายพิษของคอปเปอร์ให้หมดได้ใน 20 วัน (Collvin, 1985)

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณคอปเปอร์ที่ตกค้างในอวัยวะภายในของหอยเชอรี่หลังจากได้รับสารจุนสีในอัตรา 1 กก./ไร่ เป็นเวลานาน 24 ชม ลดลงตามวันเวลาที่มากขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำงานวิจัยเรื่องนี้

เอกสารอ้างอิง

Cheng, T.C. and J. T. Sullivan. 1973. The effect of copper on the heart-rate of *Biomphalaria glabrata (*mollusca: pulmonata). Comp. and Gen. Pharm.4: 37-41.

Collvin, L.1985. The effect of copper on growth, food consumption and food convertion of *Perca fluviatilis* L. offered maximal food rations. Aquat. Toxicol. 6: 105-113.

Fretter, V. 1953. Experiment with radioactive strontium (90Sr) certair molluscs and polychaetes. J. Mar. Biol. Assoc. U.K.32: 367-384.

Fretter, V. and A. Graham. 1962. British Prosobranch Molluscs. Roy Soc. London.110-145 pp.

Gamakaranage, C S.S.K., C. Rodrigo, S. Weerasinghe, A. Gnanathasan, V. Puvanaraj and H. Fernando. 2011. Complications and management of acute copper sulphate poisoning; a case discussion**.** J. Occupat. Med. and Toxicol. 6:1-5.

Harry, H. W. and D. V. Aldrich. 1963. The distress syndrome in *Australorbis glabratus* (Say) as a reaction to toxic concentrations of inorganic ions. Malacologia 1: 283–289.

Hasselmo, M .E. 1995. Neuromodulation and cortical function: Modeling the physiological basis of behavior. Behavioral Brain Res. 67:1-27.

Lieb, B., K. Dimitrova and H.S. Kang. 2006. Red blood with blue-blood ancestry: intriguing structure of a snail hemoglobin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103: 12011–12016.

Nemcsok, J., A.Nemeth, Z.S. Buzas and L. Boross. 1984. Effects of copper, Zinc and paraquat on Acetylcholinesterase

activity in carp (*Cyprinus carpio* L.) Aqua. Toxico. 5 : 23-31.

Olson, D.L. and G. M. Christensen. 1980. Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase in vitro.Environ. Res. 21: 327-335.

Pakaski, M. and P. Kasa. 2003. Role of acetylcholinesterase inhibitors in the metabolism of amyloid precursor protein. Current drug targets. CNS and neurological disorders 2: 163–71.

Riagu, J.O. 1979. Copper in the environment.Part2: health effects.New York: John Wiley, 489 pp.

Received 5 May 2013

Accepted 22 October 2013

Roch, M., J. A. McCarter, A. T. Matheson, M. J. R. Clark and R.W. Olafson. 1982. Hepatic Metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution In the Campbell River System. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39: 1596-1601.

Shiff, C.J. and B. Garnett. 1961. The short-term effects of three molluscicides on Microflora and Microfauna of small biologically stable ponds in Southern Rhodesia. Bull. Wld. Hlth. Org. 25: 543-547.

Stahr, H. M. 1991. Analytical methods in toxicology.John Wiley & Sons, Inc.New York, 328 pp.

Figure 1 Photograph showing the dead snails (⇩) after treating with copper sulfate.

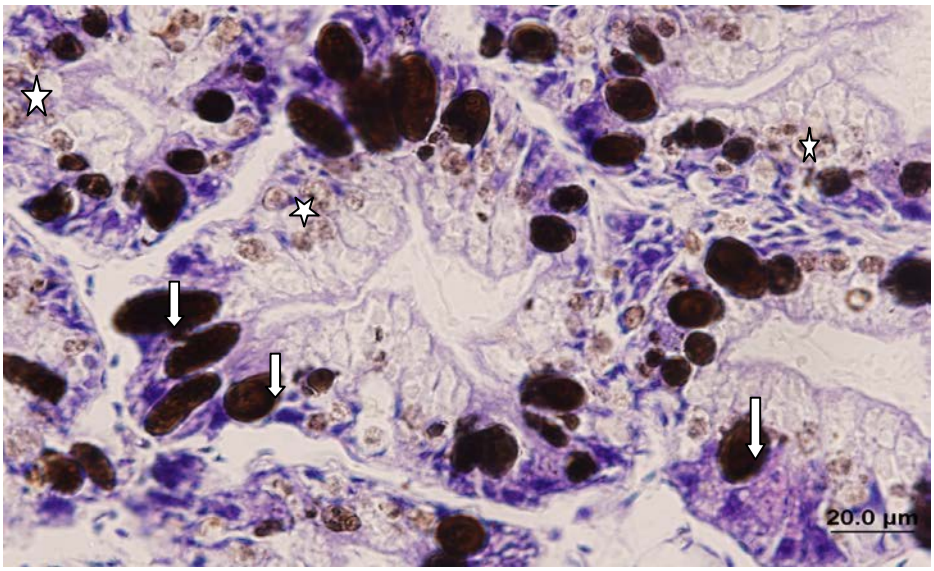

Figure 2 Light micrograph of the digestive gland from the untreated snail showing K corpuscle (⇩); C corpuscle (☆) in digestive cells.

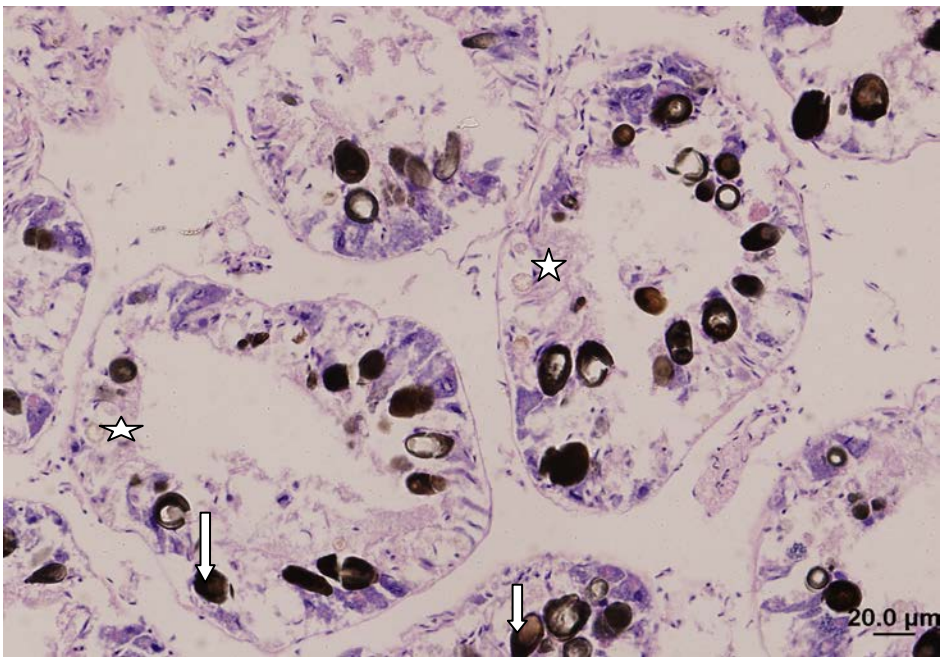

Figure 3 Light micrograph of the digestive gland from the dead snail treated with copper sulfate for 24 hr showing K corpuscle (⇩) C corpuscle (☆) in digestive cells.

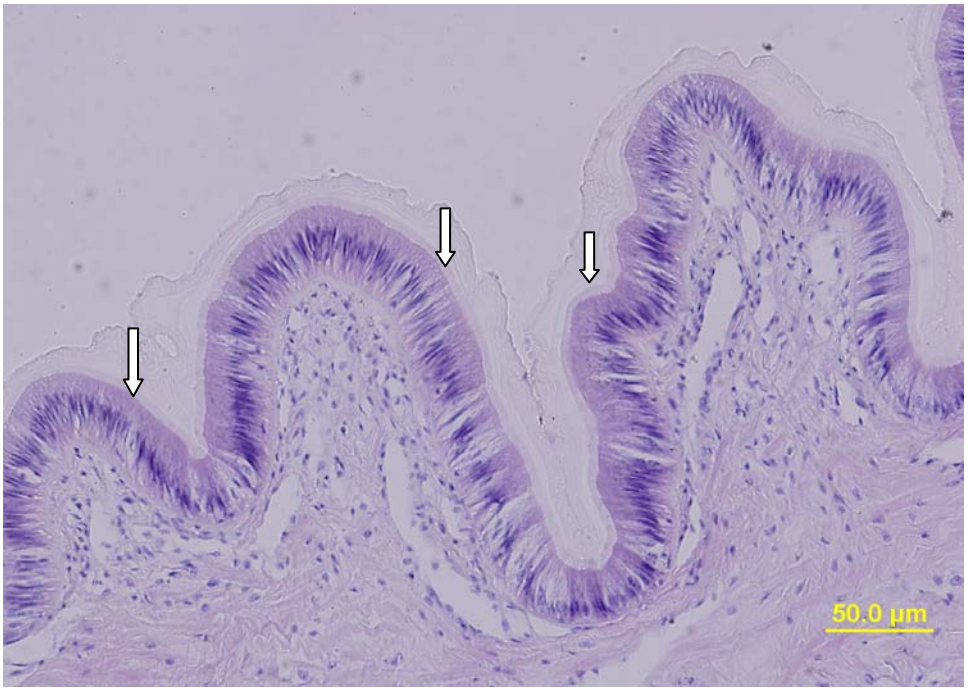

Figure 4 Light micrograph of the stomach tissue from the untreated snail showing normal ciliated epithelial layer (⇩).

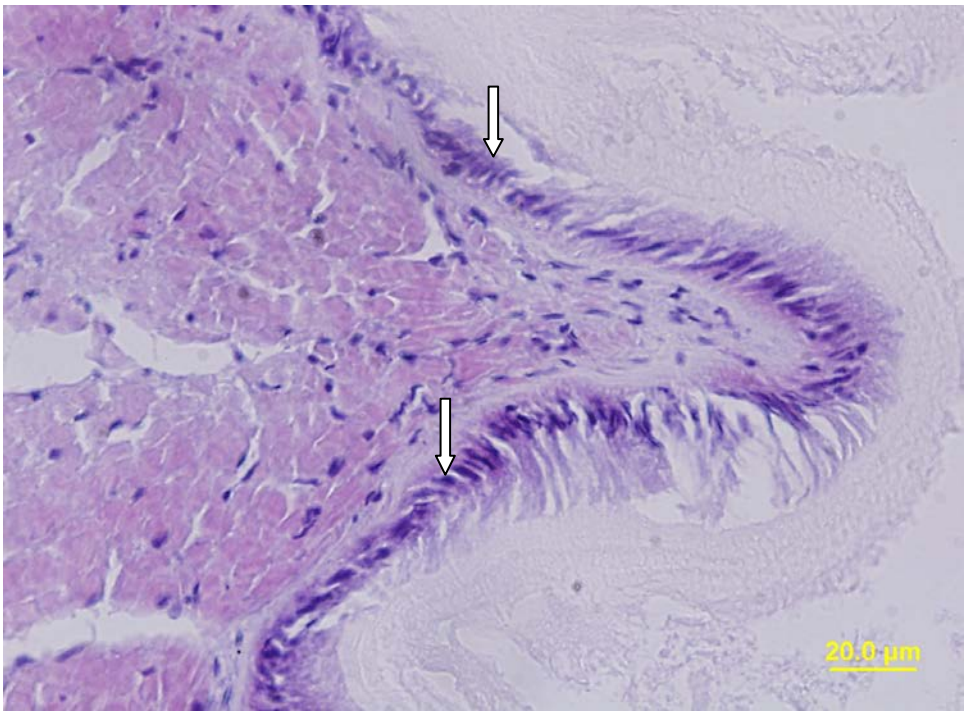

Figure 5 Light micrograph of the stomach tissue from the dead snail treated with copper sulfate for 24 hr showing the damaged ciliated epithelial layer (⇩).

Table 1 The copper residues in visceral mass of dead and survived snails after treating with copper sulfate in the rice field.

	The copper (ppm) residues in visceral mass						
	24hr	72 hr	7 d	14 d	21 d	27 d	36 d
survived snails	24 ± 0.86	18.1 ± 0.1	13.83 ± 1.31	12.1 ± 1.51	8.0 ± 0.17	8.0 ± 0.2	5.3 ± 1.0
dead snail	29.25±1.25	-	-	-	-	-	-