

การใช้จุลกายพยาธิวิทยาเป็นตัววัดทางชีวภาพเพื่อประเมินสุขภาพเบื้องต้นของ
หอยขม *Filopaludina martensi* ในลำน้ำเข็ก ช่วงไหลผ่านอำเภอวังทอง
จังหวัดพิษณุโลก

A Preliminary Study of the Histopathological Biomarker Assessed in Health of
River Snail, *Filopaludina martensi* in Khek River during Wang Thong District,
Phitsanulok Province

ศิลปชัย เสนารัตน์^{1,*} เจษฎา เกษตรระทัด¹ พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ²

เอสรดา มงคลชัยชนะ³ และ วรณีย์ จีระอังกูรสกุล⁴

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

³วิทยาลัยพัฒนามหานคร มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

⁴ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

*Email: Senarat.s@hotmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ครั้งนี้เพื่อประเมินสุขภาพของหอยขม (*Filopaludina martensi*) ที่อาศัยในลำน้ำเข็ก ช่วงไหลผ่านอำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก โดยใช้จุลกายพยาธิวิทยาเป็นตัววัดทางชีวภาพ เนื่องจากมีรายงานการใช้สารเคมีทางการเกษตรตลอดทั้งสองฝั่งของลำน้ำอย่างต่อเนื่องและอาจมีผลต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตในลำน้ำ ทำการเก็บตัวอย่างหอยขมทั้งหมด 20 ตัว ในช่วงฤดูแล้ง (มกราคมถึงมีนาคม พ.ศ. 2556) และนำตัวอย่างทั้งหมดมาผ่านกระบวนการทางพยาธิวิทยา ผลการวิจัยเบื้องต้นพบพยาธิสภาพของอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ โครงสร้างและการจัดเรียงของเหงือกผิดปกติแบบ การแยกจากกันระหว่างชั้นของเซลล์บุผิวกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ด้านล่างของหลอดอาหาร การแทรกตัวของเซลล์เมลาโนมาโครฟาส์ในต่อมย่อยอาหาร และการหดตัวและการสลายของนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatogonia ในอันทะ ทั้งนี้พบการแทรกตัวของกลุ่มเซลล์เมลาโนมาโครฟาส์เข้ามาในต่อมย่อยอาหาร อาจเป็นอาการหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของสารเคมี แต่ก็พบเพียงแค่ 5 เปอร์เซ็นต์ (1 ใน 20 ตัว) เท่านั้น ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า จุลกายพยาธิวิทยาในอวัยวะต่าง ๆ เกิดขึ้นน้อยมาก โดยที่หอยขมยังคงมีสุขภาพที่ดี เป็นไปได้ว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมนี้อาจจะยังไม่ส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของหอยขม

คำสำคัญ : จุลกายพยาธิวิทยา หอยขม การประเมินสภาวะ ตัววัดทางชีวภาพ

Abstract

The objective of this study was to assess the health of *Filopaludina martensi* living in the Khek River flowing through the Wang Thong District, Phitsanulok Province using histopathological biomarker. The increased use of pesticides is reported along this river and potentially affecting aquatic animal health. Live specimens (n = 20) were collected during dry season (January to March 2011) and then, all

specimens were processed by standard histological technique. Preliminary histopathology results of *F. martensi* showed in selected organs including of disorganization in the gills, the detachment between epithelial layer and connective tissue lining in the esophagus, infiltration of the melanomacrophage in the digestive gland, pyknotic nuclei and karyolysis in the testis were slightly observed. Although melanomacrophage infiltrate, probably as the reaction to contaminants, was also found in this study, it was rare only 5 percent (n=1). The result from this precursory study indicated that the histopathology in all organs rarely occurred. Consequently, *F. martensi* was still in good health. It was plausible that under the current situation, there was no environmental impact on this river snails' existence.

Keywords: Histopathology; *Filopaludina martensi*; Health assessment; Biomarker

บทนำ

การใช้สารเคมีทางการเกษตรในพื้นที่เกษตรกรรมมีหลากหลายกลุ่ม อาทิเช่น สารฆ่าวัชพืชและยาฆ่าแมลง ทุกกลุ่มล้วนมีวัตถุประสงค์และประโยชน์หลักเพื่อช่วยให้เกษตรกรมีผลผลิตและรายได้เพิ่มมากขึ้น ในทางกลับกันการใช้ในปริมาณที่สูงและติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ย่อมทำให้แหล่งน้ำที่อยู่ใกล้เคียงมีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดการปนเปื้อนของสารเคมีเหล่านี้ สอดคล้องกับการรายงานในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมาว่าตรวจพบสารกำจัดวัชพืชหลายชนิดเป็นครั้งแรก อาทิ อะทราซีน ทั้งในน้ำและดินตะกอนของแม่น้ำน่าน ช่วงไหลผ่านอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ซึ่งเป็นบริเวณใกล้กับพื้นที่เกษตรกรรมทั้งที่มีความเชื่อว่าสารชนิดนี้สามารถสลายตัวได้เร็วภายใต้ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม [1] นอกจากนี้ยังพบอีกว่า อะทราซีนยังสามารถเข้าไปสะสมในเนื้อเยื่อของปลากระมัง (*Puntius proctozyston*) ทั้งใน ตัวและอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของปลาชนิดนี้ [2], [3] ดังนั้นในปัจจุบันการประเมินสุขภาพของสิ่งมีชีวิตจึงได้รับความนิยมเนื่องจากมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะในพื้นที่ในธรรมชาติจริง ถึงแม้ว่ายากที่จะอธิบายถึงความเชื่อมโยงในแง่เหตุและผลว่ามาจากปัจจัยใด [4], [5] แต่วิธีการนี้ช่วยให้ทราบถึงสถานการณ์สิ่งแวดล้อมเบื้องต้นที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในพื้นที่เสี่ยงนั้น ๆ ได้เป็นอย่างดี วิธีการนี้เริ่มต้นจากการพิจารณาในการคัดเลือกหรือการนำเอาสัตว์ที่อาศัยใน

พื้นที่ที่มีการปนเปื้อนมาใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวัง (sentinel species) จากนั้นทำการคัดเลือกตัววัดทางชีวภาพ (biomarker) ที่เหมาะสมมาช่วยในการประเมินผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับสัตว์ดังกล่าว [4], [5]

จากการสำรวจเบื้องต้นบริเวณลำน้ำเข็ก ซึ่งเป็นลำน้ำสายหนึ่งในจังหวัดพิษณุโลก ที่รองรับน้ำจากแหล่งเกษตรกรรม เนื่องจากตลอดแนวที่ลำน้ำไหลผ่านอยู่ใกล้พื้นที่เกษตรกรรมที่มีการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจหลายชนิด มีรายงานเบื้องต้นถึงการใช้น้ำสารเคมีทางการเกษตรหมุนเวียนติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน พบหอยหลากหลายชนิด มีอยู่จำนวนมากและง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง อาทิ หอยขม (Hoi Khom) ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Filopaludina martensi* จัดเป็นหอยเศรษฐกิจและมักถูกใช้เป็นสัตว์ทดลอง [6] ดังนั้นวัตถุประสงค์ครั้งนี้จึงเลือกหอยขมที่อาศัยในลำน้ำเข็ก ช่วงที่ไหลผ่านอำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก มาเพื่อประเมินสุขภาพเบื้องต้น โดยใช้จุลกายพยาธิวิทยา (histopathology) เป็นตัววัดทางชีวภาพ

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างหอยขมถูกรวบรวมในช่วงฤดูแล้ง (มกราคมถึงมีนาคม พ.ศ. 2556) บริเวณลำน้ำเข็ก ช่วงที่ไหลผ่านอำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 2 สถานี แต่ละสถานีห่างกัน 1 กิโลเมตร (จำนวนรวม 20 ตัว ขนาดความยาวเปลือกประมาณ 2-4 เซนติเมตร) มาสลับด้วยการแช่น้ำแข็ง (rapid cooling

method) [7] ทำการแกะเนื้อเยื่อหอยออกจากเปลือก และนำมาเก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) ประมาณ 24 ชั่วโมง ภายใต้ อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำมาผ่านกระบวนการ เตรียมตัวอย่างสไลด์ถาวรด้วยวิธี paraffin method ตัดเนื้อเยื่อด้วยความหนา 5 ไมโครเมตร ทำยาสี้อมสี hematoxylin และ eosin [8], [9] แล้วนำสไลด์ เนื้อเยื่อหอยมาวิเคราะห์หาความผิดปกติของเนื้อเยื่อ หอย (histopathology) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้ แสง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จุลกายพยาธิวิทยาของเหงือก (histopathology of gills)

โครงสร้างของเหงือกหอยประกอบด้วยก้าน เหงือก (gill filaments) จำนวนมาก แต่ละก้านถูกบุ ด้วยเยื่อบุผิวแบบชั้นเดียวทรงสูงที่มีซิเลีย (simple columnar cells with cilia) แต่ละเซลล์มีนิวเคลียส รูปร่างรี ติดสีน้ำเงินเข้ม และล้อมรอบด้วยไซโต- พลาสซึมติดสีชมพูเข้ม นอกจากนี้ยังสามารถพบเซลล์ สร้างเมือก (mucus-secreting goblet cells) แทรกอยู่ ระหว่างเซลล์บุผิว สำหรับผลการศึกษาจุลกายพยาธิ วิทยาพบความผิดปกติค่อนข้างน้อย อาทิ โครงสร้าง และการจัดเรียงของเหงือกผิดรูปแบบเล็กน้อย (gill disorganization) การหดของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) และการขยายของนิวเคลียส (dilated nuclei) ของเยื่อบุผิวในบางบริเวณ (ภาพที่ 1A)

จุลกายพยาธิวิทยาของทางหลอดอาหาร

(histopathology of esophagus)

การจัดเรียงของโครงสร้างหลอดอาหารของหอย ขมประกอบด้วยเยื่อบุผิวแบบชั้นเดียวทรงสูงที่มีซิเลีย ยาว (simple columnar cells with long cilia) นิวเคลียสของเซลล์บุผิวแต่ละเซลล์รูปร่างรีหรือกลม ตั้งอยู่ในบริเวณฐานที่ติดสีน้ำเงินเข้ม และล้อมรอบด้วย ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูอ่อนจาง สำหรับผลการศึกษา จุลกายพยาธิวิทยาพบความผิดปกติค่อนข้างน้อย เช่นเดียวกับเหงือก แต่ก็ยังพบการแยกออกจากกัน ระหว่างชั้นของเซลล์บุผิวกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่

ด้านล่าง (epithelial lifting) และการหดตัวของ นิวเคลียสของเซลล์บุผิว (ภาพที่ 1B)

จุลกายพยาธิวิทยาของต่อมย่อยอาหาร

(histopathology of digestive gland)

โครงสร้างของต่อมย่อยอาหารมักแนบชิดอยู่กับ ระบบสืบพันธุ์ของหอยขม โดยมีการจัดเรียงด้วยเซลล์ บุผิวแบบชั้นเดียวทรงสูงที่มีซิเลียยาว (simple columnar digestive cells with long cilia) มีเซลล์ สร้างเมือก (mucous cells) แทรกอยู่ระหว่างเซลล์บุผิว รูปร่างคล้ายลูกแพร์ (pear shape) นิวเคลียสติดสีน้ำ เงินเข้ม และถูกล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมติดสีชมพู เข้ม พยาธิสภาพของต่อมย่อยอาหารที่พบ ประกอบด้วย การแทรกตัวของกลุ่มเซลล์มาโครฟาจ (macrophage aggregation) เข้ามาในต่อมย่อยอาหาร เป็นอาการที่เห็นได้ชัด แต่ก็พบเพียงแค่ 1 ตัว จาก ตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัว คิดได้เพียงแค่ 5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การหดตัวของนิวเคลียสของเซลล์บุผิวก็ยัง สามารถพบในต่อมย่อยอาหารได้เช่นกัน (ภาพที่ 2A-2B)

จุลกายพยาธิวิทยาของอวัยวะ (histopathology of testis)

ภายในอวัยวะประกอบด้วยท่อสร้างอสุจิ (seminiferous tubules) จำนวนมาก แต่ละท่อถูกยึด ติดกันด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ภายในหลอดสร้างอสุจิแต่ละท่อจะประกอบด้วยกลุ่ม ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เจริญอยู่ในระยะที่แตกต่างกัน (spermatogonia, primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatid และ spermatozoa) เมื่อ ทำการศึกษาจุลกายพยาธิวิทยาหรือความผิดปกติ ก็พบได้น้อย แต่ก็ยังสามารถพบการหดตัวและการสลาย ของนิวเคลียสในระยะ spermatogonia อย่างชัดเจน (ภาพที่ 2C-2D)

ถึงแม้ว่าการศึกษารังนี้สามารถพบจุลกาย พยาธิวิทยาอวัยวะต่าง ๆ (เหงือก หลอดอาหาร ต่อม ย่อยอาหารและอวัยวะ) ของหอยขมที่อาศัยอยู่ลำน้ำ เข็ก ซึ่งอยู่ในใกล้พื้นที่เกษตรกรรมได้น้อยมาก แต่ อย่างไรก็ตามการพบโครงสร้างและการจัดเรียงของ เหงือกผิดรูปแบบ ตลอดจนเซลล์บุผิวบางเซลล์เกิด

ความเสียหาย คล้ายคลึงกับการตอบสนองของหอยฝาเดียวหลังจากได้รับสารพิษหลายชนิด อาทิ Triebkorn and Kunast [10] ได้ศึกษาผลของสารพิษกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate molluscicide) ต่อหอย *Deroceras reticulatum* ในระดับความเข้มข้นที่ไม่ทำให้สัตว์ตาย (sublethal concentration) และ Supanopas et al. [11] พบว่าอาการนี้ในหอยหวาน (*Babylonia areolata*) หลังจากได้รับตะกั่วไนเตรท (lead nitrate) 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง สำหรับการพบเซลล์เมลาโนมาโครฟาส์แทรกตัวอยู่ระหว่างต่อมย่อยอาหาร มักเป็นอาการที่บ่งชี้หรือเชื่อมโยงกับการตอบสนองของสารเคมีหรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม [12], [13] แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีหลักฐานเพียงพอที่สามารถบ่งบอกได้ว่าการพบเซลล์มาโครฟาส์เกิดจากสาเหตุใด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอาการนี้ถือว่าการหยุดการทำงานของสิ่งแปลกปลอมในบริเวณที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บ จึงเป็นการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน (immune response) ของสิ่งมีชีวิตที่มักเชื่อมโยงกับการตอบสนองกับสารพิษ (toxicant contamination) [12] นอกจากนี้ยังพบการหดตัวและการสลายของนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatogonia ในอวัยวะของหอยขม จัดเป็นกระบวนการตายของเซลล์ (cell necrosis) และท้ายสุดเซลล์เหล่านี้ถูกย่อยสลายกลายเป็นของเหลว ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าอาการนี้อาจเป็นส่วนหนึ่งของการลดลงของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะอื่นๆ ของอวัยวะของหอยขมบริเวณลำน้ำเข็กในอนาคตต่อไป

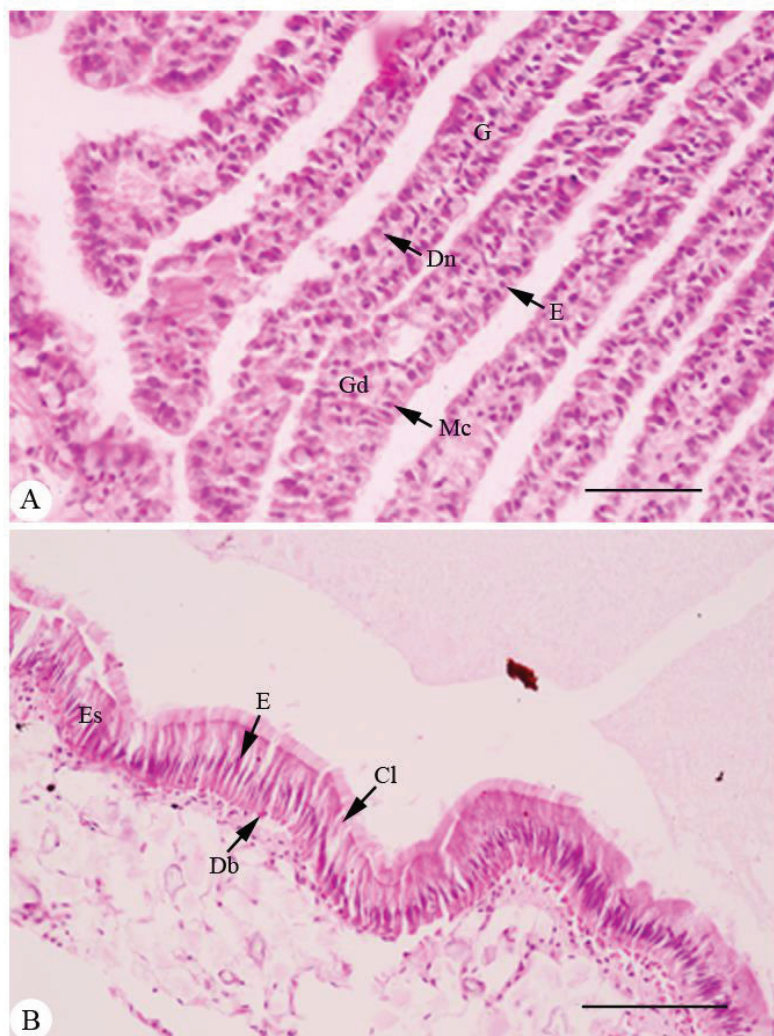
จากข้อมูลดังกล่าวมาทั้งหมดถึงแม้ว่าจุลกายพยาธิวิทยาของอวัยวะต่างๆ มีอาการที่พบอาจไม่รุนแรง จึงเป็นหลักฐานที่ดีและช่วยยืนยันเบื้องต้นว่าหอยขมในขณะนี้ยังมีสุขภาพที่ดีและอยู่ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ยังเหมาะสมต่อการดำรงชีวิต ท้ายสุดยังพิสูจน์ได้อีกว่าหอยขมสามารถใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวังและการใช้จุลกายพยาธิวิทยา (histopathology) เหมาะสมในการประเมินสุขภาพเบื้องต้นของสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี

สรุปและเสนอแนะ

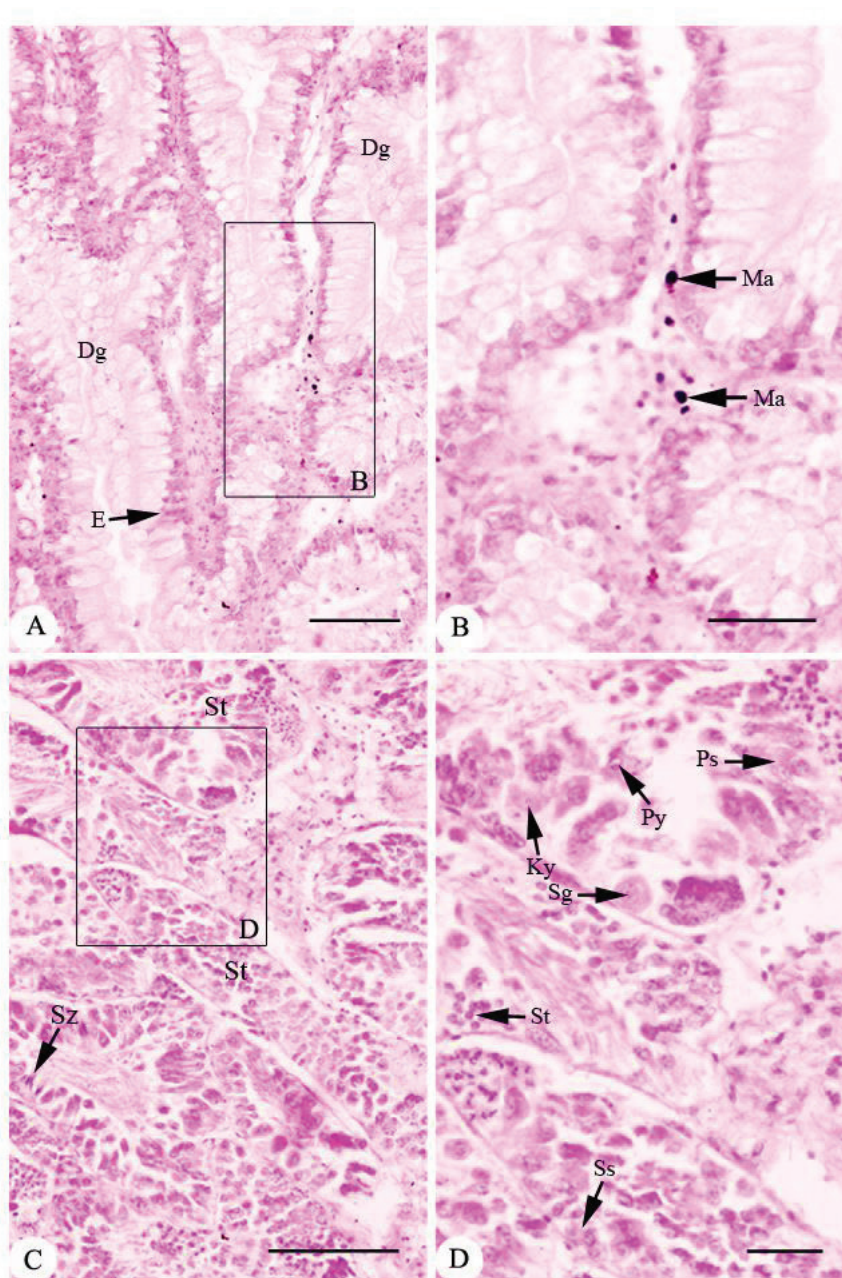
การศึกษาค้นคว้านี้ทำให้ทราบและตอบคำถามถึงสุขภาพของหอยขมในลำน้ำเข็ก โดยใช้จุลกายพยาธิวิทยาเป็นตัววัดทางชีวภาพ สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าหอยขมยังมีสุขภาพที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต เนื่องจากพบจุลกายพยาธิวิทยาในอวัยวะต่างๆ น้อยมาก ดังนั้นหอยขมจึงสามารถใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวัง และการใช้จุลกายพยาธิวิทยา (histopathology) ก็ยังเป็นตัววัดทางชีวภาพที่เหมาะสม เพื่อประเมินผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมเบื้องต้นได้เป็นอย่างดี แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจะทำการเก็บตัวอย่างหอยขมเพิ่มเติมพร้อมทั้งตัวอย่างน้ำ ดินตะกอน และเนื้อเยื่อหอยขมมาวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณการสะสมของสารเคมีทางการเกษตร ซึ่งเป็นส่วนที่จะต้องกระทำเพื่อติดตามและเฝ้าระวังในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นางสาวศุภลักษณ์ ชุ่มแสง และนางสาวณภัทร โสมาลา ตลอดจนไปจนถึงสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ช่วยอนุเคราะห์อุปกรณ์สำหรับการเตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่าง และหน่วยวิจัยสัตว์น้ำภาคชีวภาพพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ช่วยอนุเคราะห์ในการถ่ายรูปสไลด์ตัวอย่าง



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างภาพตัดตามยาวของท่อในระดับมัธยมศึกษาและจุลกายพยาธิวิทยาของเหงือก (A) หลอดอาหาร (B) และต่อมย่อยอาหารของหอยขม (Cl = cilia, Db = detachment of basal, Dn = dilated nucleus, E = epithelium, Es = esophagus, G = gill, Gd = gill disorganization, Mc = mucous cell) (Scale bar: A, B = 200 μ m)



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างภาพตัดตามยาวในระดับมัธยมศึกษาและจุลกายพยาธิวิทยาของต่อมย่อยอาหาร (A-B) และอวัยวะ (C-D) ของหอยขม (Dg = digestive gland, E = epithelium, Ky = karyolysis, Ma = macrophage aggregate, Ps = Primary spermatocytes, Py = pyknosis, Sg = spermatogonia, Ss = Secondary spermatocyte, St = seminiferous tubule, Sz = spermatozoa) (Scale bar: A, C = 100 μ m, B, D = 50 μ m)

เอกสารอ้างอิง

- [1] Radosevich, M., Traina, S.J., and Tuovinen, O.H. 1996. "Biodegradation of atrazine in surface soils and subsurface sediments collected from an agricultural research farm". **Biodegradation**. 7: 137-49.
- [2] Achayapunwanich, O., Senarat, S., Kitana, N., Varanusupakul, P. and Kitana, J. 2013. **Health assessment based on liver of a cyprinid fish *Puntioplites proctozysron* living in a river with atrazine contamination in northern part of Thailand**. Proceedings, the 8th Conference on Science and Technology for Youth (March 21-23, 2013), Bangkok, Thailand. 41-51.
- [3] Senarat, S. 2011. **Correlation between herbicide contamination and effects on reproductive system of cyprinid fish *Puntioplites proctozysron* in Nan River, Wiangsa District, Nan Province**. M.Sc. Thesis, Graduate School Chulalongkorn University, Thailand.
- [4] Frame, L., and Dickerson, R.L. 2006. **Fish and wildlife as sentinels of environment contamination**. New York: Oxford University Press.
- [5] National Research Council (NRC). 1991. **Animals as sentinel of environmental health hazards**. Washington D.C.: National Academy Press.
- [6] Jantataeme, S., Kruatrachue, M., Kaewsawangsap, S., Chitramvong, Y., Sretarugsa, P. and Upatham, S. 1996. "Acute toxicity and bioaccumulation of lead in the snail, *Filopaludina (Siamopaludina) martensi martensi* (Frauenfeldt)". **Science Asia** **Journal of Science Society of Thailand**. 22: 237-47.
- [7] Wilson, J.M., Bunte, R.M., and Carty, A.J. 2009. "Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*)". **American Association for Laboratory Animal Science**. 48: 785-9.
- [8] Bancroft, J.D. and Gamble, M. 2002. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 5th ed. Churchill Livingstone: London.
- [9] Humason, G.L. 1979. **Animal Tissue Techniques**. 4th ed. San Francisco: Freeman.
- [10] Triebkorn, R. and Kunast, C. 1990. "Ultrastructural changes in the digestivesystem of *Deroceras reticulatum* (Muller) induced by lethal and sublethal concentrations of the carbamate molluscicide cloethocrab". **Malacologia** 32: 89-106.
- [11] Supanopas, P., Sretarugsa, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P. and Upatham, E.S. 2005. "Acute and subchronic toxicity of lead to the Spotted Babylon, *Babylonia areolata* (Neogastropoda, Buccinidae)". **Journal of Shellfish Research**. 24: 91-98.
- [12] Boorman, G.A., Botts, S., Bunton, T.E., Fournie, J.W., Harshbarger, J.C., Hawkins, W.E., Hinton, D.E., Jokinen, M.P., Okihiro, M.S., and Wolfe, M.J. 1997. "Diagnostic criteria for degenerative, inflammatory, proliferative nonneoplastic and neoplastic liver lesions in medaka (*Oryzias latipes*): consensus of a National Toxicology Program Pathology Working

Group". **Toxicologic Pathology**. 25: 202–

10.

[13] Roberts, J. R. 2000. **Fish Pathology**. 4th ed.

London: Bailliere Tindall.