



การประเมินความผิดปกติของโครโมโซมปลาตุ๊กที่อยู่ในสภาพ ทดลองเลี้ยงในน้ำและตะกอนดินจากเหมืองแร่ทองคำ

อุไรวรรณ ภูนาพลอย^{1,2}, อภิษฎาภรณ์ ช่วยจันทร์^{1,2}, พัชรินทร์ ฤชวรารักษ์^{1,3}, บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล^{1,4}
และลำใย ณีรัตน์พันธุ์^{1,2*}

Chromosomal Aberration Assessment of Gunther’s Walking Catfish (*Clarias macrocephalus*) after *In Vivo* Exposure to Heavy Metals Contaminated in Water and Sediment from Gold Mine Area

Uraivan Phoonaploy^{1,2}, Apitchayaporn Chayjun^{1,2}, Patcharin Ruchuwarak^{1,3}, Bundit Tengjaroenkul^{1,4} and Lamyai Neeratanaphan^{1,2*}

¹ ศูนย์วิจัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ.ขอนแก่น 40002

² ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ.ขอนแก่น 40002

³ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ.ขอนแก่น 40002

⁴ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ.ขอนแก่น 40002

¹ Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand 40002

² Department of Environmental Science, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand 40002

³ Research and Development Institute (RDI), Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand 40002

⁴ Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand 40002

* Corresponding Author. E-mail address: hlanya@kku.ac.th

Received: 3 June 2016; Accepted: 12 October 2016

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความผิดปกติของโครโมโซมปลาตุ๊ก (*Clarias macrocephalus*) ในสภาพการทดลองเลี้ยงในน้ำและตะกอนดินจากเหมืองแร่ทองคำ ระยะเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับชุดอ้างอิง วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในน้ำ ตะกอนดิน และปลาตุ๊กด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) เตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อไตโดยวิธีทางตรง ผลการศึกษาปริมาณโลหะหนักก่อนการทดลองในน้ำพบปริมาณของสารหนู แคดเมียม โครเมียม และตะกั่ว ในชุดทดลอง มีค่าเฉลี่ย 0.229±0.009 0.007±0.003 0.007±0.000 และ 0.007±0.003 mg/l ตามลำดับ ชุดอ้างอิงตรวจพบค่าเฉลี่ยของสารหนูและตะกั่วเท่ากับ 0.010±0.000 และ 0.010±0.000 mg/l ตามลำดับ แต่ไม่พบแคดเมียมและโครเมียม ซึ่งชุดทดลองมีค่าสารหนูและแคดเมียมเกินค่ามาตรฐาน ปริมาณโลหะหนักในตะกอนดินจากชุดทดลองพบสารหนู แคดเมียม โครเมียมและตะกั่ว มีค่า 130.492±5.570 120.466±14.576 21.031±0.288 และ 36.926±3.265 mg/kg ตามลำดับ ชุดอ้างอิงพบค่าเฉลี่ยของแคดเมียม โครเมียมและตะกั่ว มีค่า 0.390±0.288 11.033±3.074 และ 4.027±1.835 mg/kg ตามลำดับ แต่ไม่พบสารหนู ชุดทดลองมีค่าสารหนูและแคดเมียมเกินค่ามาตรฐานคุณภาพดิน หลังการทดลองเลี้ยงพบว่าปริมาณสารหนู แคดเมียม โครเมียมและตะกั่วในปลาตุ๊กอยู่ในชุดทดลองมีค่า 0.586±0.404 2.314±2.369 2.090±0.305 และ 0.277±0.011 mg/kg ตามลำดับ ชุดอ้างอิงพบตะกั่วมีค่า 0.162±0.073 mg/kg ในชุดทดลองมีแคดเมียมและโครเมียมเกินค่ามาตรฐานอาหารปนเปื้อน ปลาตุ๊กอยู่ทั้ง 2 ชุดการทดลองมีโครโมโซมดิพลอยด์ 54 แท่ง (2n = 54) ในชุดทดลองตรวจสอบเซลล์ปลาตุ๊ก 3 ตัว ตัวละ 50 เซลล์ พบ 5 รูปแบบความผิดปกติของโครโมโซม คือ single chromatid gap (SCG) deletion (D) fragmentation (F) centric fragmentation (CF) และ isochromatid gap (ISCG) จำนวน 4 9 1 5 และ 2 ตำแหน่ง ตามลำดับ โดยมีจำนวนเซลล์ที่โครโมโซมผิดปกติคิดเป็นร้อยละ 9.33 เซลล์ ลักษณะความผิดปกติที่พบมากที่สุดในตัวอย่างปลาตุ๊ก คือ D

คำสำคัญ: ความผิดปกติของโครโมโซม โลหะหนัก ปลาตุ๊ก เหมืองแร่ทองคำ



Abstract

The objective of this study was to investigate chromosomal aberrations of Gunther's walking catfish (*Clarias macrocephalus*) exposed to heavy metals contaminated water and sediment from gold mine for 30 days compared to unaffected area. Heavy metal concentrations in water, sediment and *C. macrocephalus* were measured by using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). Assessment of chromosomal aberration of *C. macrocephalus* prepared from kidney tissues by direct method. Heavy metal concentrations in water and sediment were analyzed before the experiment. The results showed that the mean value concentrations of arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr) and lead (Pb) in water were 0.229 ± 0.009 , 0.007 ± 0.003 , 0.007 ± 0.000 and 0.007 ± 0.003 mg/l, respectively in the experimental group. The reference group exhibited As and Pb at 0.010 ± 0.000 and 0.010 ± 0.000 mg/l, respectively; whereas, Cd and Cr were not detected. As and Cd in the experimental group exceeded the water quality standard. The experimental group concentrations of As, Cd, Cr and Pb in sediment were 130.492 ± 5.570 , 120.466 ± 14.576 , 21.031 ± 0.288 and 36.926 ± 3.265 mg/kg, respectively. The reference group exhibited Cd, Cr and Pb at 0.390 ± 0.288 , 11.033 ± 3.074 and 4.027 ± 1.835 mg/kg, respectively, while As was not detected. As and Cd in the experimental group exceeded the soil quality standard. The experimental group concentrations of As, Cd, Cr and Pb in *C. macrocephalus* samples were 0.586 ± 0.404 , 2.314 ± 2.369 , 2.090 ± 0.305 and 0.277 ± 0.011 mg/kg, respectively. The reference group exhibited only Pb at 0.162 ± 0.073 mg/kg. Cd and Cr in the experimental group exceeded the standard contamination in food. The diploid chromosomes of *C. macrocephalus* were 54 ($2n=54$). Chromosomal aberration in 50 kidney cells of three *C. macrocephalus* raised in heavy metals contaminated water and sediment from gold mine were found in 5 types including single chromatid gap (SCG), deletion (D), fragmentation (F), centric fragmentation (CF) and isochromatid gap (ISCG), which were detected at 4, 9, 1, 5 and 2 positions, respectively. The percentage of the cell numbers of chromosomal aberration was 9.33. The most of chromosomal aberration type in *C. macrocephalus* samples was D.

Keywords: Chromosomal aberration, Heavy metals, Gunther's walking catfish, Gold mine

บทนำ

การเพิ่มขึ้นของประชากรโลก รวมถึงการพัฒนาทางเศรษฐกิจและสังคม ล้วนเป็นปัจจัยที่ทำให้ความต้องการใช้แร่เพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เพื่อตอบสนองความต้องการด้านวัตถุดิบของทั้งภาคอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และชีวิตประจำวันของประชาชนภายในประเทศอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ในสังคมปัจจุบันเครื่องอุปโภค วัสดุอุปกรณ์เกือบทั้งหมดจะต้องมีแร่เป็นวัตถุดิบเบื้องต้นในการผลิต ตลอดจนถึงสารเคมีพื้นฐานด้วย (Chonpichan, 2015) การทำเหมืองแร่ยังเป็นนโยบายทางเศรษฐกิจที่หลายประเทศที่กำลังพัฒนาในปัจจุบันนำมาใช้เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ (Jeronimo, Rapb, & Vosca, 2015) ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ทำเหมืองแร่ที่ได้ประทานบัตรกว่า 1,500 แปลง เฉพาะแปลงแร่ทองคำที่ได้รับใบอนุญาตให้ขุดแร่ได้มีทั้งหมด 33 แปลง มีมูลค่าผลผลิตประมาณ 5,845 ล้านบาท (Khunin, 2015)

เหมืองแร่ทองคำกุ่มทับฟ้า อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย เปิดทำเหมืองแร่ในปีพ.ศ. 2549 พบสายแร่อาร์เซนไนไฟไรต์ ที่มีแร่ทองคำพบรวมอยู่ และมีสารหนูเป็น

องค์ประกอบหลักของสายแร่ ซึ่งสารหนูเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูง มีรายงานว่า เหมืองแร่ทองคำก่อให้เกิดปัญหาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีการรั่วซึมของน้ำจากบ่อเก็บกากแร่ลงสู่ที่นาและแหล่งน้ำสาธารณะ ลำห้วยและแหล่งน้ำบาดาลบริเวณรอบเหมืองปนเปื้อนด้วยโลหะหนัก เช่น โซยาไนต์ สารหนู ตะกั่ว และปรอท ตั้งแต่ปีแรกของการทำเหมือง (Pollution control department, 2009) สอดคล้องกับการศึกษาของ Intarat (2007) พบว่าในเขตกุ่มทับฟ้า ภูเหล็ก และกุ่มขำป่าบอน คุณภาพน้ำในลำน้ำห้วยจัดอยู่ในแหล่งน้ำผิวดินประเภท 3-4 พบปริมาณแคดเมียม โซยาไนต์ แมงกานีส และสารหนูในบางสถานีปริมาณสูง รวมถึงการศึกษาของ Boonmee and Neeratanaphan (2014) พบปริมาณสารหนูในตะกอนดินทุกจุดเก็บตัวอย่างมีค่าเกินมาตรฐานคุณภาพดิน และจากการศึกษาของ Pholweang (2014) พบว่ามีการสะสมสารหนูในหอยฝาดเดียวเกินค่ามาตรฐาน เป็นสิ่งยืนยันว่ากิจกรรมของเหมืองแร่ทำให้บริเวณใกล้เคียงได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของโลหะหนักในปริมาณสูง ทำให้เกิดความกังวลต่อมลพิษที่อาจเกิดขึ้นแก่ชาวบ้านเป็นอย่างมาก การแพร่กระจายของโลหะหนักที่ออกสู่สิ่งแวดล้อม สามารถสะสมอยู่ใน

อวัยวะของสิ่งมีชีวิต เช่น หัวใจ ตับ สมอง กระเพาะอาหาร ไชกระดูก และบริเวณที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (Larramendy, Popescu, & Dipaolo, 1981; Tseng et al., 2006) ดังนั้นถ้าสิ่งมีชีวิตได้รับโลหะหนักในปริมาณเล็กน้อยแต่มีระยะเวลานานก็สามารถที่จะสะสมในร่างกายได้มากขึ้น จนเป็นอันตรายได้ในระยะยาว พิษของโลหะหนักสามารถทำลายระบบประสาท ทำลายเซลล์สมอง เปลี่ยนแปลงการทำงานของเอ็นไซม์ที่สำคัญหลายชนิด ทำให้กระบวนการหายใจระดับเซลล์ถูกขัดขวางทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญของเซลล์ และเกิดผลเสียกับอวัยวะเหล่านั้นของร่างกายสิ่งมีชีวิต (An et al., 2004) นอกจากนี้ยังทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลาย และเกิดการแตกหักของโครโมโซมได้ (Yadav & Trivedi, 2009) กรณีตัวอย่างการศึกษาโรคที่เกิดจากการปนเปื้อนของสารหนูในน้ำหรืออาหาร เช่น Bowen's disease พบว่าผู้ป่วยจะมีความผิดปกติของโครโมโซมมากกว่าผู้ที่ไม่ได้เป็นโรค (Ghosh et al., 2007) ยิ่งไปกว่านั้นมีการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อตรวจสอบดูความผิดปกติของโครโมโซมและการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมระหว่าง Sister chromatid เปรียบเทียบกับประชากรที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนของสารหนู พบว่าความผิดปกติของโครโมโซมในกลุ่มที่ได้รับผลกระทบมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Mahata et al., 2003) ผลที่ได้ก็สอดคล้องกันเมื่อทำการทดลองโดยใช้สาร Arsenic trioxide (As_2O_3) ฉีดเข้าช่องท้องหนูทดลองที่ความเข้มข้นต่างกัน เมื่อนำหนูทดลองมาตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมพบว่าที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะมีความผิดปกติของโครโมโซมเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ และมีการตรวจสอบ Micronucleus test พบว่ามีผลไปในทิศทางเดียวกันคือที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะมีความผิดปกติของโครโมโซมที่มากขึ้น (Patlolla & Tchounwou, 2005)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้บ่อกักเก็บกากแร่เหมืองแร่ทองคำ และผลกระทบต่อความผิดปกติของโครโมโซมสิ่งมีชีวิต โดยเลือกใช้ปลาตุ๊กตุ๊ก (*Clarias macrocephalus*) เป็นสิ่งมีชีวิตที่บ่งบอกสภาพสิ่งแวดล้อม เนื่องจากปลาตุ๊กตุ๊กมีลักษณะของการดำรงชีวิตหากินตามพื้นน้ำดินจึงมีโอกาสได้รับโลหะหนักในปริมาณมาก การศึกษาที่ผ่านมามุ่งเน้นการวิจัย

เพื่อศึกษากลไกการปลดปล่อย การเคลื่อนย้าย การปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมและการสะสมในสิ่งมีชีวิต ส่วนการศึกษาผลของโลหะหนักต่อสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับโลหะหนักโดยเฉพาะระดับเซลล์มีการศึกษาค่อนข้างน้อย ดังนั้นคณะผู้ศึกษาจึงสนใจที่จะศึกษาการประเมินความผิดปกติของโครโมโซมปลาตุ๊กตุ๊กในสภาพการทดลองเลี้ยงในน้ำและตะกอนดินจากเหมืองแร่ทองคำเปรียบเทียบกับปลาตุ๊กตุ๊กในชุดอ้างอิง ซึ่งอยู่บนสมมติฐานว่าหากเหมืองแร่ทองคำถูกปิดทำการ ดินและน้ำจากบริเวณพื้นที่ดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้น สิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศดังกล่าวจะเกิดผลกระทบอย่างไร ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การวางแผนจัดการสิ่งแวดล้อมต่อไป

วิธีการศึกษาและวัสดุอุปกรณ์

1. จุดเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน
เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินในลำน้ำห้วยเหล็กใกล้บ่อกักเก็บกากแร่ ของเหมืองแร่ทองคำทับฟ้า อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย จำนวน 3 จุด และพื้นที่อ้างอิงที่ไม่ได้รับผลกระทบจากเหมืองแร่ทองคำ โดยเก็บตะกอนดินจากหนองน้ำ บริเวณบ้านไก่อ้นา ตำบลสำราญ อำเภอเมืองจังหวัดขอนแก่น
2. การเตรียมชุดทดลอง
การทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ การทดลองที่ 1 คือ ชุดทดลอง โดยใช้น้ำและตะกอนดินที่เก็บจากบริเวณใกล้บ่อกักเก็บกากแร่เหมืองแร่ทองคำ เปรียบเทียบกับการทดลองที่ 2 คือ ชุดอ้างอิง โดยใช้ น้ำประปาและตะกอนดินที่เก็บจากพื้นที่อ้างอิงที่ไม่ได้รับผลกระทบจากเหมืองแร่ทองคำ และทำการทดลองเลี้ยงปลาตุ๊กตุ๊กทั้งสองชุดเป็นระยะเวลา 30 วัน ในตู้เลี้ยงปลาในห้องทดลอง โดยเลือกลูกปลาตุ๊กตุ๊กที่มีอายุ 1 เดือน จากกรมประมง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 2-3 g จำนวนชุดการทดลองละ 12 ตัว มีการเติมอากาศและให้อาหารปลาแบบเม็ดซึ่งน้ำหนักให้เท่ากัน ทั้ง 2 ชุดทดลอง
3. วิธีการเตรียมตัวอย่าง
3.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำ
ตัวอย่างน้ำปริมาตร 25 ml เติมกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 1.25 ml นำไปย่อยบน water bath ที่



อุณหภูมิ 90 ± 5 °C เป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง ปริมาตร 50 ml (APHA, 2005)

3.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างตะกอนดิน

ตัวอย่างตะกอนดินตากในที่ร่มจนแห้ง และนำมาบดให้ละเอียด นำตะกอนดินร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 mm ซึ่งตะกอนดินละเอียด 1 g ไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) 15 ml เดิมกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 5 ml และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 10 ml นำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยดินที่อุณหภูมิ $180-220$ °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง ปริมาตร 50 ml (APHA, 2005)

3.3 วิธีเตรียมตัวอย่างปลาตุ๋น

นำตัวอย่างเนื้อปลาตุ๋นไปบดละเอียด ซึ่งตัวอย่างเนื้อปลาตุ๋น 1 g เดิมกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 7 ml และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 1 ml นำไปย่อยบน water bath ที่อุณหภูมิ 90 ± 5 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง ปริมาตร 25 ml (APHA, 2005)

4. การตรวจวัดปริมาณโลหะหนัก

ตรวจวัดปริมาณโลหะหนักในสารละลายตัวอย่างน้ำ และตะกอนดินก่อนการทดลองทั้งสองชุดการทดลอง และปริมาณโลหะหนักที่สะสมในปลาตุ๋นหลังการทดลองเลี้ยง โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี APHA (2005) และวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES)

5. การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมปลาตุ๋น การเตรียมโครโมโซมเตรียมโดยวิธีทางตรง โดยใช้ไตเป็นอวัยวะที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีการแบ่งเซลล์ตลอดเวลา โดยเตรียมจากภายในตัวปลาในสภาพ *in vivo* ตัดแปลงจากวิธี ของ Chen and Ebeling (1968) และ Nanda et al. (1995) ดังนี้

ฉีดโคลชิซิน 0.05% ขนาด 1 ml ต่อน้ำหนักตัว 100 g เข้าไปในช่องท้องของปลาตุ๋น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลับปลาโดยใช้น้ำแข็ง จากนั้นนำปลามาผ่าช่องท้องเพื่อนำไตออกมา ตัดไตเป็นชิ้นเล็กและบดให้ละเอียดโดยเติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.075 M 6-8 ml บ่มในอุณหภูมิห้อง 30 นาที นำหลอดเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200-1,500 รอบ/นาที เป็น

เวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง และเติมน้ำยาตรึงสภาพที่มีส่วนผสมของ เมทานอล 3 ส่วนต่อกรดอะซิติก 1 ส่วน ที่เตรียมใหม่และเย็นจัด นำหลอดเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200-1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึงสภาพ 7-8 ml นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทำซ้ำเพื่อล้างตะกอนให้สะอาด 3-4 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์ในสารละลายตรึงเซลล์ที่ -20 °C

การเตรียมสไลด์โครโมโซม ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดคราบไขมันและสิ่งสกปรกออกจากสไลด์ วางไว้ให้แห้งแล้วล้างสไลด์อีกครั้งด้วยน้ำยาคงสภาพก่อนนำไปใช้การหยุดเซลล์ ทำโดยดูดน้ำยาคงสภาพออกจากหลอดจนเหลือประมาณ 0.5 ml ดูดเซลล์หยุดลงบนสไลด์ที่เตรียมไว้ 1 หยด จากนั้นหยุดน้ำยาคงสภาพที่เตรียมใหม่และเย็นจัดลงไปอีก 1-2 หยด เพื่อช่วยให้เซลล์กระจายตัวดียิ่งขึ้นแล้ววางไว้ให้แห้ง

การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาด้วยสีจิมซ่า นำสไลด์ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมและย้อมสีโครโมโซมแล้ว มาตรวจสอบดูความผิดปกติของโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 100 เท่า โดยทำการตรวจสอบโครโมโซมปลาตุ๋นจากชุดทดลอง 3 ตัว และชุดอ้างอิง 3 ตัว จำนวนตัวละ 50 เซลล์ นับจำนวนเซลล์ที่มีความผิดปกติของโครโมโซมที่พบในปลาแต่ละตัว คิดเป็นร้อยละความผิดปกติจากเซลล์ทั้งหมดที่ทำการศึกษา

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการศึกษา

1. ปริมาณโลหะหนักในน้ำ และตะกอนดิน ก่อนการทดลอง

ผลการตรวจวัดปริมาณสารหนู (As) แคดเมียม (Cd) โครเมียม (Cr) และตะกั่ว (Pb) ในน้ำ จากชุดทดลองและชุดอ้างอิงมีค่าดังตารางที่ 1 ซึ่งพบว่า As และ Cd ในชุดทดลองมีค่าเกินมาตรฐานคุณภาพแหล่งน้ำที่กำหนดไว้ที่ 0.01 และ 0.005 mg/l ตามลำดับ ส่วนในชุดอ้างอิงปริมาณโลหะหนักมีค่าไม่เกินค่ามาตรฐาน

ตารางที่ 1 ปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในน้ำจากชุดทดลองและชุดอ้างอิง ก่อนการทดลองเลี้ยง

สภาพการทดลอง	ตัวอย่าง	ปริมาณโลหะหนักในน้ำ (mg/l)			
		As	Cd	Cr	Pb
ชุดทดลอง	1	0.239	0.011	0.007	0.011
	2	0.225	0.005	0.007	0.005
	3	0.223	0.005	0.007	0.006
	ค่าเฉลี่ย	0.229±0.009	0.007±0.003	0.007±0.000	0.007±0.003
ชุดอ้างอิง	1	0.010	Not detected	Not detected	0.010
	2	0.010	Not detected	Not detected	0.010
	3	0.010	Not detected	Not detected	0.010
	ค่าเฉลี่ย	0.010±0.000	-	-	0.010±0.000
ค่ามาตรฐาน¹		0.01	0.005	0.05	0.05

¹มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินประเภทที่3 การใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม ตามพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2535 เรื่องการกำหนดคุณภาพน้ำผิวดิน

ปริมาณโลหะหนักในตะกอนดินมีค่าดังตารางที่ 2 และเกษตรกรรมกำหนดไว้ที่ 3.9 และ 37 mg/kg จากชุดทดลองพบว่า As และ Cd เกินค่ามาตรฐาน ตามลำดับ ส่วนในชุดอ้างอิงปริมาณโลหะหนักไม่เกินค่าคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์นอกเหนือจากการอยู่อาศัย มาตรฐาน

ตารางที่ 2 ปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในตะกอนดินจากชุดทดลองและชุดอ้างอิง ก่อนการทดลองเลี้ยง

สภาพการทดลอง	ตัวอย่าง	ปริมาณโลหะหนักในตะกอนดิน (mg/kg)			
		As	Cd	Cr	Pb
ชุดทดลอง	1	135.744	128.810	21.010	38.796
	2	131.082	128.953	21.329	38.826
	3	124.651	103.636	20.754	33.156
	ค่าเฉลี่ย	130.492±5.570	120.466±14.576	21.031±0.288	36.926±3.265
ชุดอ้างอิง	1	Not detected	0.720	13.810	5.860
	2	Not detected	0.260	11.560	4.030
	3	Not detected	0.190	7.730	2.190
	ค่าเฉลี่ย	-	0.390±0.288	11.033±3.074	4.027±1.835
ค่ามาตรฐาน²		≤3.9	≤37	≤300	≤400

²มาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม ตามพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2535 เรื่องการกำหนดคุณภาพดิน

2. ปริมาณโลหะหนักในปลาตุ๊กตุ๋นที่เลี้ยงในน้ำและดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก

การรับสัมผัสโลหะหนักของปลาตุ๊กตุ๋น ระยะเวลา 30 วัน ในชุดทดลอง และชุดอ้างอิง หลังการทดลองเลี้ยงในน้ำและตะกอนดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก พบปริมาณโลหะหนักมีค่าดังตารางที่ 3 ในชุดทดลองมี Cd และ Cr เกินค่ามาตรฐานอาหารปนเปื้อนกำหนดไว้ที่ 0.05 และ 2 mg/kg ตามลำดับ ส่วนในชุดอ้างอิงปริมาณโลหะหนักที่ตรวจพบไม่เกินค่ามาตรฐาน

3. การตรวจสอบโครโมโซมปลาตุ๊กตุ๋น

การศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมต้องมีการตรวจสอบลักษณะของโครโมโซมพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตก่อนโดยการเตรียมโครโมโซมปลาตุ๊กตุ๋นทางตรงจากเซลล์ไต และย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา พบว่าปลาตุ๊กตุ๋นจากชุดทดลองและชุดอ้างอิงไม่มีความแตกต่างกันของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ มีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 54 แท่ง (2n=54) เป็นโครโมโซมชนิด เมทาเซนทริก



(m) 15 คู่ ซับเมทาเซนทริก (sm) 6 คู่ อะโครเซนทริก (a) 4 คู่ และเทโลเซนทริก (t) 2 คู่ ดังรูปที่ 1

4. การประเมินความผิดปกติของโครโมโซมปลาตุกอุย

การประเมินความผิดปกติของโครโมโซมปลาตุกอุย ในชุดทดลองเลี้ยงในน้ำ และตะกอนดินจากเหมืองแร่ ทองคำเปรียบเทียบกับปลาตุกอุยในชุดอ้างอิง สภาพการทดลองละ 3 ตัว ตัวละ 50 เซลล์ พบความผิดปกติดังตารางที่ 4 รูปแบบความผิดปกติของโครโมโซมในชุด

ทดลองพบ 5 รูปแบบความผิดปกติ คือ single chromatid gap (SCG), deletion (D), fragmentation (F), centric fragmentation (CF) และ isochromatid gap (ISCG) ดังรูปที่ 2 มีจำนวนเท่ากับ 4 9 1 5 และ 2 ตำแหน่ง ตามลำดับ โดยมีจำนวนเซลล์ที่โครโมโซมผิดปกติคิดเป็นร้อยละ 9.33 เซลล์ ลักษณะความผิดปกติที่พบมากที่สุด คือ D ส่วนในชุดอ้างอิงไม่พบความผิดปกติของโครโมโซม

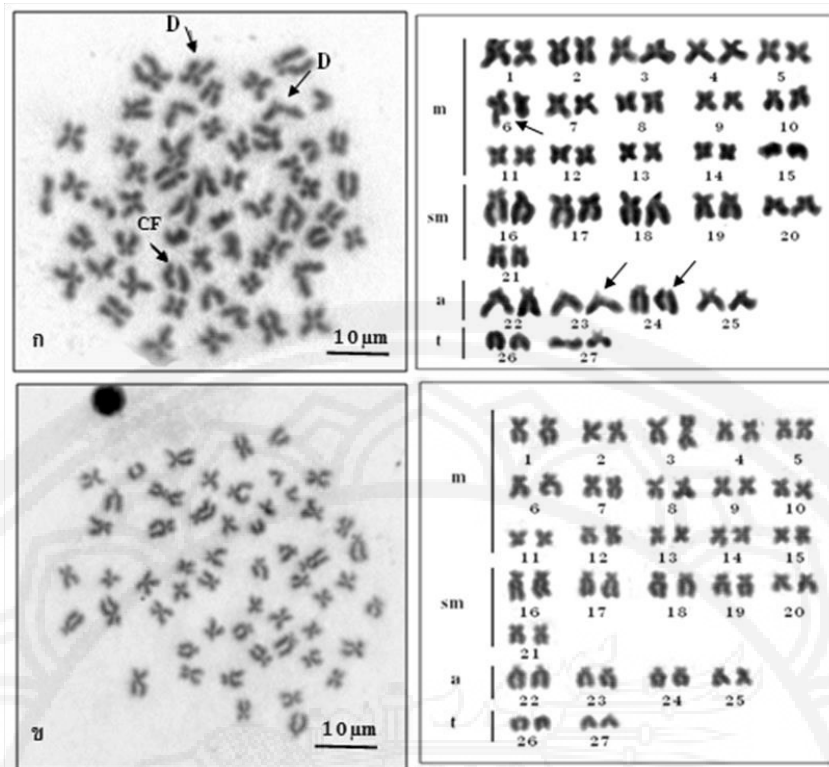
ตารางที่ 3 ปริมาณโลหะหนักที่สะสมในปลาตุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่เลี้ยงในน้ำและดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก

สภาพการทดลอง	ตัวอย่าง	ปริมาณโลหะหนักในปลาตุกอุย (mg/kg)			
		As	Cd	Cr	Pb
ชุดทดลอง	1	1.364	2.167	1.744	0.285
	2	1.162	4.753	2.322	0.282
	3	0.586	0.021	2.203	0.264
	ค่าเฉลี่ย	0.586±0.404	2.314±2.369	2.090±0.305	0.277±0.011
ชุดอ้างอิง	1	Not detected	Not detected	Not detected	0.246
	2	Not detected	Not detected	Not detected	0.113
	3	Not detected	Not detected	Not detected	0.128
	ค่าเฉลี่ย	-	-	-	0.162±0.073
ค่ามาตรฐาน ³		≤2	≤0.05	≤2	≤1

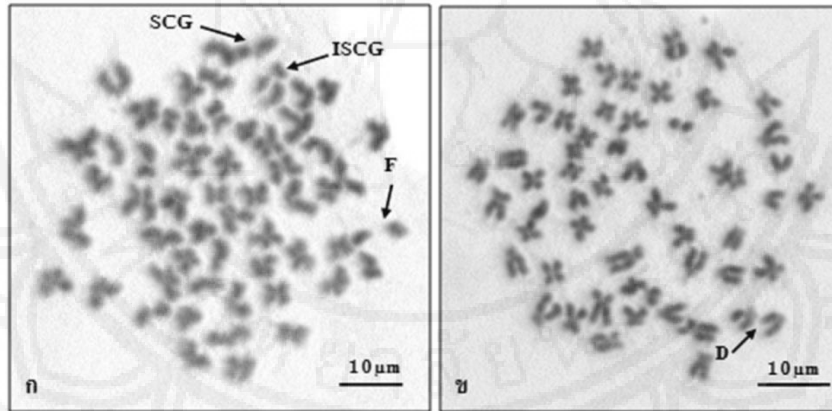
³มาตรฐานอาหารปนเปื้อน ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529

ตารางที่ 4 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมปลาตุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังการทดลองเลี้ยง

สภาพการทดลอง	ตัวอย่างปลาตุกอุย	จำนวนโครโมโซมผิดปกติ					จำนวนตำแหน่งที่ผิดปกติ	จำนวนเซลล์ที่ผิดปกติ	ร้อยละความผิดปกติของเซลล์
		SCG	D	F	CF	ISCG			
ชุดทดลอง	1	0	2	0	2	0	4	2	4
	2	3	1	1	0	2	7	5	10
	3	1	6	0	3	0	10	7	14
	รวม	4	9	1	5	2	21	14	9.33
ชุดอ้างอิง	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	รวม	0	0	0	0	0	0	0	0



รูปที่ 1 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคโรไทป์ของปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*) $2n=54$ จากชุดทดลอง และ deletion (D) (ก) และชุดอ้างอิง (ข) โดยการย้อมสีแบบธรรมดา (ลูกศรชี้จุดที่ผิดปกติ)



รูปที่ 2 รูปแบบความผิดปกติของโครโมโซมปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*, $2n=54$) single chromatid gap (SCG) isochromatid gap (ISCG) fragmentation (F) (ก) deletion (D) (ข) และ centric fragmentation (CF) (รูปที่ 1ก) จากชุดทดลอง (ลูกศรชี้จุดที่ผิดปกติ)

อภิปรายผลการศึกษา

จากผลการศึกษาพบปริมาณ As และ Cd เกินมาตรฐานทั้งในน้ำและตะกอนดิน ซึ่งสารหนูนี้สามารถพบได้ทั่วไปบนพื้นผิวโลก จะมีการปะปนอยู่ในดิน น้ำ และอากาศ แต่จากกิจกรรมของเหมืองแร่ทำให้สาร

หนูปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกมากขึ้น จากรายงานของ Pollution control department (2009) พบว่ามีการรั่วซึมของสารเคมีจากบ่อกักเก็บกากแร่ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaenchiangsa, Wongsasom, and Sriruang (2012) พบปริมาณ As ปนเปื้อนในน้ำ และตะกอนพื้นท้องน้ำ และการศึกษาของ



Boonmee and Neeratanaphan (2014) พบว่ามีการปนเปื้อนของ As ในตะกอนดินและในพรรณไม้ น้ำบริเวณรอบเหมืองแร่ทองคำ การปนเปื้อนดังกล่าวจะมีผลต่อสุขภาพของมนุษย์ ถ้าหากได้รับ As โดยตรงหรือทางอ้อม ส่วน Cd ที่พบสามารถเกิดขึ้นได้ในธรรมชาติเช่นเดียวกัน แต่ Cd ที่มีอยู่ในธรรมชาติจะไม่ออกมาหากสภาพธรรมชาติในพื้นที่ดังกล่าวมีความสมดุล คือ พื้นที่ไม่ถูกรบกวนโดยเฉพาะการทำลายหน้าดิน จากกิจกรรมการทำเหมืองมีการเปิดหน้าดินโล่ง ไม่มีพืชปกคลุม ทำให้เกิดการกัดเซาะขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็นเหตุให้การกระจายตัวของ Cd มากขึ้น มีการปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อมในปริมาณมาก จนเกิดเป็นมลพิษขึ้นได้ (Department of primary industries and mines, 2004)

ปริมาณโลหะหนักในปลาดุกอุยเมื่อเปรียบเทียบกับแล้วพบว่าในชุดทดลองมีปริมาณโลหะหนักมากกว่าในชุดอ้างอิง และมีความสอดคล้องกับปริมาณของ Cd ในน้ำและดินที่มีค่าเกินมาตรฐาน สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน ตัวอย่างเช่น ปลาดุกอุยที่มีลักษณะของการดำรงชีวิตอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติมีนิสัยหากินตามพื้นหน้าดิน โดยเฉพาะบริเวณที่พื้นเป็นโคลนกินอาหารจำพวกตัวอ่อนของแมลงน้ำ ไรน้ำ แมลง กุ้ง และลูกปลา ซึ่งทำให้เกิดการถ่ายทอดโลหะหนักในห่วงโซ่อาหารได้ โลหะหนักมีการสะสมในตะกอนดินมากกว่าในน้ำ จากลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัยและพฤติกรรมการกินอาหารของปลาดุกอุยจึงมีโอกาสได้รับโลหะหนักในปริมาณมากเช่นกัน

ผลการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมปลาดุกอุยที่พบ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yadav and Trivedi (2009) พบว่า Pb As และ Cu ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมปลาช่อนได้ โดยพบความผิดปกติแบบการแตกหักของโครโมโซม การเกิดช่องว่างของแขนโครโมโซม การเกิดโครโมโซมวงแหวน และลักษณะโครโมโซมที่มี 2 เช่นโทรเมียร์ สารหนูทำให้โครโมโซมผิดปกติมากที่สุด และการศึกษาของ Ahmed, Habibullah, Parvin, Akter, and Khan (2013) พบว่า As สามารถชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อดีเอ็นเอในทุกอวัยวะที่ศึกษาของปลานิล ลักษณะความผิดปกติที่พบมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ คือ D ซึ่งเป็นความผิดปกติที่มีการขาดหายไปบางส่วน of โครโมโซม ความผิดปกติ

ลักษณะนี้จะทำให้ชนิดของยีนและจำนวนยีนบริเวณนั้นขาดหายไปซึ่งจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตแตกต่างกัน ถ้ายีนที่ขาดหายไปมีจำนวนมากหรือมีความสำคัญมากสำหรับการดำรงชีวิต สิ่งมีชีวิตนั้นอาจตายได้ ในด้านการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมบริเวณที่มีชิ้นส่วนของยีนเด่นขาดหายไป จะทำให้ยีนด้อยแสดงลักษณะออกมาได้ (pseudodominance) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโครโมโซมนี้ เรียกว่าการกลายในระดับโครโมโซม มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม การกลายของโครโมโซมนี้ยังอยู่ในขอบเขตที่สิ่งมีชีวิตสามารถทนทานหรือปรับตัวเพื่ออยู่รอดได้ แต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงมากไปสิ่งมีชีวิตก็อาจตายได้ การเรียงตัวใหม่ของยีนที่เป็นผลมาจากการกลายของโครโมโซม บางครั้งพบว่าจะให้ผลที่ดีกว่ายีนที่มีอยู่เดิม ทำให้การเปลี่ยนแปลงนั้นสามารถที่จะถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้ แต่บางครั้งการกลายของโครโมโซมอาจมีผลเสียต่อการดำรงชีวิตแต่ไม่ถึงกับตาย ซึ่งจัดเป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดหนึ่ง (Tanomtong, 2011)

จากผลการศึกษาข้างต้นเป็นไปได้ว่าโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจากกิจกรรมของเหมืองแร่ทองคำนี้จะเข้าสะสมในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นได้ และสามารถถ่ายทอดเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารและเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นรวมถึงมนุษย์ด้วยเช่นกัน

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

ปริมาณโลหะหนักในน้ำและตะกอนดิน จากชุดทดลองและชุดอ้างอิง พบว่าในชุดทดลอง As และ Cd มีค่าเกินค่ามาตรฐานคุณภาพที่กำหนดไว้ ส่วนในชุดอ้างอิงปริมาณโลหะหนักไม่เกินค่ามาตรฐาน การรับสัมผัสโลหะหนักของปลาดุกอุย ระยะเวลา 30 วัน หลังการทดลองในชุดทดลองมี Cd และ Cr เกินค่ามาตรฐานอาหารปนเปื้อน ส่วนในชุดอ้างอิงปริมาณโลหะหนักไม่เกินค่ามาตรฐาน โครโมโซมพื้นฐานของปลาดุกอุยจากชุดทดลองและชุดอ้างอิงมีโครโมโซมผิดปกติเท่ากับ 54 แห่ง (2n=54) การประเมินความผิดปกติของโครโมโซมปลาดุกอุยพบว่าในชุดทดลอง มี 5 รูปแบบความผิดปกติ คือ SCG D F CF และ ISCG จำนวน 4 9 1 5 และ 2 ตำแหน่งตามลำดับ โดยมีจำนวนเซลล์ที่โครโมโซมผิดปกติคิดเป็น



ร้อยละ 9.33 เซลล์ ลักษณะความผิดปกติที่พบมากที่สุด คือ D ส่วนในชุดอ้างอิงไม่พบความผิดปกติของ โครโมโซม

จากผลการศึกษาทั้งหมดจะเห็นได้ว่า กิจกรรมของเหมืองแร่ทองคำทำให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมและสะสมในสิ่งมีชีวิตถึงแม้จะมีการปิดเหมืองไปแล้ว แต่โลหะหนักที่สะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมยังสามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ เช่น ปลาตกอยู่ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้โลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมสามารถที่จะเข้ามาสะสมในตัวสิ่งมีชีวิต และส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมได้ พื้นที่ที่มีการทำเหมืองนั้นจึงเป็นพื้นที่เสี่ยงที่มนุษย์ควรให้ความสำคัญระมัดระวังจากการเข้าใช้ประโยชน์จากพื้นที่นั้นเป็นอย่างมาก

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากศูนย์วิจัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ทำให้การวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Ahmed, M. K., Habibullah, A. M., Parvin, E., Akter, M. S., & Khan, M. S. (2013). Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65, 903-909.

An, Y., Gao, Z., Yang, S., Liang, J., Feng, Y., Kato, K., ...Yamanaka, K. (2004). Immunohistochemical analysis of oxidative DNA damage in arsenic-related human skin sample from arsenic contaminated area of China. *Cancer Letters*, 214(1), 11-18.

APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, American

Public Health Association (21st ed.). Washington, D.C.: USA.

Boonmee, S., & Neeratanaphan, L. (2014). Water quality and arsenic contamination in sediment and aquatic plants in gold mining area. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University, Special Issue*, 429-435.

Chen, T. R., & Ebeling, A. W. (1968). Karyological evidence of female heterogamety in the mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Copeia*, 1, 70-75.

Chonpichan, J. (2015). *The role of the mining industry on the economy*. Bangkok: Department of primary industries and mines.

Department of primary industries and mines. (2004). Cadmium contamination of the environment in Mae Sot, Tak province. Retrieved from <http://www.dpim.go.th/purchase/purchase-3.html?catid=122>

Ghosh, P., Banjaree, M., Chaudhuri, S. D., Das, J. K., Sarma, N., Basu, A., & Giri, A. K. (2007). Increased chromosome aberration frequencies in the Bowen's patients compared to non-cancerous skin lesions individuals exposed to arsenic. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 632(1), 104-110.

Intarat, R. (2007). Monitoring water quality gold mining site Wangsaphung district of Loei province. *Journal Environmental News Zone* 9, 5, 14-18.

Jeronimo, P. P., Rapb, E., & Vosca, J. (2015). The politics of land use planning: Gold mining in Cajamarca, Peru. *Land Use Policy*, 49, 104-117.



- Kaenchiangsa, C., Wongsasom, S., & Sriruang, I. (2012). *Potential of natural wetlands in treating arsenic from gold mine runoff*. Research Project, Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University.
- Khunin, B. (2015). *The mining industry of Thailand in 2557 and outlook for 2558 Department of primary industries and mines*. Bangkok: n.p.
- Larramendy, M. L., Popescu, N. C., & Dipaolo, J. A. (1981). Induction by inorganic metal salts of sisterchromatid exchanges and chromosome aberration in human and Syrian hamster cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 3, 597-606.
- Mahata, J., Basu, A., Ghoshal, S., Sarker, J. N., Roy, A. K., Poddar, G., Nandy, A. K., Banjaree, A., Ray, K., Natarajan, A. T., Nilson, R., & Giri, A. K. (2003). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1), 133-143.
- Nanda, I., Schartl, M., Feichtinger, W., Schlupp, I., Parzefall, J., & Schmid, M. (1995). Chromosomal evidence for laboratory synthesis of triploid hybrid between the gynogenetic teleost *Poecilia formosa* and its host species. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 8(2), 267-269.
- Pholweang, N. (2014). Accumulation of arsenic in surface water, sediment and macrobenthos at Huai Lek, Wang saphung district, Loei province. In *the National and International Graduate Research Conference 2014*, 28 March 2014, (pp. 770-775). Khon Kaen University, Khon Kaen.
- Patlolla, A. K., & Tchounwou, P. B. (2005). Cytogenetic evaluation of arsenic trioxide toxicity in Sprague-Dawley rats. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1), 126-133.
- Pollution control department. (2009). *Reporting examination of cyanide and heavy metals in the surface water. Use of public water and sediment of nearby villages gold mining*. PCD Bangkok: n.p.
- Tanomtong, A. (2011). *Cytogenetic*. Khon Kaen: Publisher Khon Kaen University.
- Tseng, H. P., Wang, Y. H., Wu, M. M., The, H. W., Chiou, H. Y., & Chen, C. J. (2006). Association between chronic exposure to arsenic and slow nerve conduction velocity among adolescents in Taiwan. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 24(2), 182-189.
- Yadav, K. Y., & Trivedi, S. P. (2009). Chromosomal aberrations in a fish, *Channa punctata* after in vivo exposure to three heavy metals. *Mutation Research*, 678, 7-12.