ว.วิทย. มข. 44(4) 719-731 (2559) KKU Sci. J. 44(4) 719-731 (2016)

การประเมินความผิดปกติของโครโมโซมกบนาจากการรับสัมผัสสารหนูเหมืองแร่ทองคำในสภาพการทดลอง

Chromosomal Aberration Assessment of East Asian Bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*) with Arsenic Contamination from a Gold Mine *In Vivo*

อาทิตยา สุทธิไชยา [1,2] บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล [2,3] และ ลำใย ณีรัตนพันธุ์ [1,2*]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[2]กลุ่มวิจัยสารพิษปศุสัตว์และสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[3]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[*]Corresponding Author, E-mail: hlamya@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความผิดปกติของโครโมโซมกบนาจากการรับสัมผัสสารหนูในน้ำ ตะกอนดินจากเหมืองแร่ทองคำในสภาพการทดลองเปรียบเทียบกับพื้นที่อ้างอิง เก็บตัวอย่างน้ำ ตะกอนดิน จากลำน้ำห้วยเหล็กใกล้บ่อเก็บกากแร่สำหรับชุดการทดลอง โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในน้ำ ตะกอนดิน (ก่อนการทดลอง) และกบนาจากการรับสัมผัสสารหนูระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค ICP-OES รวมถึงประเมินความผิดปกติของโครโมโซมกบนาด้วยวิธีทางตรงจากเซลล์ไขกระดูกโดยการย้อมสีแบบธรรมดา ผลการศึกษาพบว่า ชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยปริมาณสารหนูในน้ำและตะกอน 0.23±0.01 mg/L และ 192.80±8.08 mg/kg ตามลำดับ ปริมาณสารหนูในน้ำและตะกอนดินมีค่าเกินมาตรฐาน กบนาระยะเวลารับสัมผัส 1, 2 และ 3 สัปดาห์ พบปริมาณสารหนูเฉลี่ยเท่ากับ 0.04±0.01, 0.11±0.05 และ 0.33±0.03 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่ามาตรฐานอาหารที่มีสารหนูปนเปื้อน และพบความผิดปกติของโครโมโซมกบนาที่ได้รับสัมผัสสารหนูระยะเวลา 1 สัปดาห์ 4 แบบ ได้แก่ single chromatid gap (SCG), single chromatid break (SCB), deletion (D) และ fragmentation (F) ระยะเวลารับสัมผัส 2 สัปดาห์ พบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา 3 แบบ ได้แก่ iso chromatid gap (ISCG), deletion (D) และ fragmentation (F) ระยะเวลารับสัมผัส 3 สัปดาห์ พบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา 5 แบบ ได้แก่ single chromatid gap (SCG), iso chromatid gap (ISCG), single chromatid break (SCB), deletion (D) และ fragmentation (F) เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญที่จำนวนความผิดปกติของโครโมโซมต่อเซลล์ และร้อยละความผิดปกติของโครโมโซมในระยะเวลารับสัมผัสที่ 3 สัปดาห์

ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate the chromosomal aberrations of the East Asian bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*) exposed to arsenic contaminated in water and sediment from gold mining in *vivo* compared to an unaffected area. The water and sediment samples were collected from Huai Lax Stream near the tailing pond where arsenic concentrations were analyzed before the experiment. Arsenic concentrations in water, sediment and *H. rugulosus* samples were measured by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) and chromosomal aberration assessment was prepared from bone marrow by direct method. The average arsenic concentrations of water and sediment samples were 0.23±0.01 mg/L and 192.80±8.08 mg/kg, respectively, which were higher than the permissible limit of the water and soil quality standards. The average arsenic concentrations of *H. rugulosus* samples exposed to arsenic in period 1, 2 and 3 weeks were 0.04±0.01, 0.11±0.05 and 0.33±0.03 mg/kg, respectively which were lower than the standard of arsenic contamination in food. Chromosomal aberrations assessment of *H. rugulosus* have been exposed to arsenic in a period of 1 week found 4 forms including chromatid gap (SCG), single chromatid break (SCB), deletion (D) and fragmentation (F). The period of 2 week found 3 forms including iso chromatid gap (ISCG), deletion (D) and fragmentation (F). The period of 3 week found 5 forms including single chromatid gap (SCG), iso chromatid gap (ISCG), single chromatid break (SCB), deletion (D) and fragmentation (F). Statistical analysis indicated that there were significant differences between the percentage of chromosomal aberration of bullfrog that have been exposed to arsenic in period of 3 week ($p<0.05$).

คำสำคัญ: ความผิดปกติของโครโมโซม สารหนู เหมืองแร่ทองคำ กบนา สภาพการทดลอง
Keywords: Chromosomal aberration, Arsenic, Gold mine, East Asian bullfrog, *In Vivo*

บทนำ

สารหนูสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งพบในรูปของสารหนูอินทรีย์ และสารหนูอนินทรีย์ สารหนูในธรรมชาติจะพบร่วมกับสายแร่ทองแดง แมงกานีส ตะกั่วดีบุก เงิน และทองคำ (กรมทรัพยากรธรณี, 2544) การแพร่กระจายของสารหนูเกิดจากกระบวนการทางธรรมชาติ ได้แก่ การกัดเซาะพังทลายโดยน้ำ และลม รวมถึงจากหินต้นกำเนิดสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้พบสารหนูได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ส่วนกิจกรรมของมนุษย์เป็นปัจจัยเสริมที่ทำให้สารหนูแพร่กระจายหรือเพิ่มปริมาณสู่สิ่งแวดล้อมมากขึ้นเช่น การทำเหมือง

แร่ การถลุงโลหะ การใช้ปุ๋ย และยาฆ่าแมลงในการเกษตร เป็นต้น (ปริษา, 2550)

เหมืองแร่ทองคำภูทับฟ้า อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย พบสายแร่อาร์เซโนไพไรต์ (arsenopyrite; FeAsS) ที่มีแร่ทองคำพบร่วมอยู่กับสายแร่ และมีสารหนูเป็นองค์ประกอบหลักของสายแร่ จึงทำให้สารหนูเป็นสารพิษหลักที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถลุงแร่ของเหมืองแร่ทองคำ และเกิดการแพร่กระจายออกสู่สิ่งแวดล้อม เมื่อสารหนูเกิดการออกซิเดชันกับอากาศและน้ำ จะทำให้สารหนูเกิดการแพร่กระจายลงสู่แหล่งน้ำหรือตะกอนพื้นท้องน้ำเพิ่มขึ้น จากเหตุการณ์เมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 ประชาชนบริเวณรอบเหมืองแร่ทองคำภูทับฟ้า จังหวัดเลย พบว่ามีน้ำรั่วซึมออกมาจากคันดินของบ่อกักเก็บกากแร่ และตรวจพบปริมาณสารหนูระดับสูงในพื้นที่เกษตรกรรมบริเวณโดยรอบบ่อกักเก็บกากแร่ และคาดว่าสารหนูจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ (กรมควบคุมมลพิษ, 2552) จากการแพร่กระจายของสารหนูตามกระบวนการธรรมชาติออกสู่สิ่งแวดล้อมและเกิดการส่งต่อไปตามห่วงโซ่อาหาร ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณสารหนูมากขึ้นตามลำดับขั้นการบริโภค โดยสิ่งมีชีวิตจะสะสมสารหนูไว้ในเซลล์และเนื้อเยื่อ (Ahmed et al., 2013) เมื่อเกิดการสะสมอยู่ในร่างกายจนถึงระดับหนึ่งสารหนูจะแสดงความเป็นพิษออกมา โดยความเป็นพิษของสารหนูหากได้รับโดยตรงในปริมาณมากจะทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลัน ส่งผลต่อระบบอวัยวะภายในร่างกายเกิดภาวะล้มเหลวและถึงขั้นเสียชีวิต (Ahmed et al., 2011) หากได้รับสารหนูต่อเนื่องเป็นเวลานานในปริมาณน้อยจะทำให้เกิดการสะสมจนเกิดอาการพิษเรื้อรัง การระคายเคืองผิวหนัง รอยตกกระตามร่างกาย อาจถึงขั้นกลายเป็นมะเร็งผิวหนังได้ รวมถึงมีพิษต่อระบบร่างกายของสิ่งมีชีวิตเช่น ระบบหายใจ ระบบประสาท เป็นต้น (Shi et al., 2004) องค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติได้กำหนดให้สารหนูเป็นสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 แสดงความเป็นพิษที่เป็นสารก่อมะเร็งชัดเจนซึ่งสามารถแปรผันและเกิดเป็นการกลายพันธุ์ที่แสดงออกมาในรูปของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม โดยการแสดงออกความเป็นพิษของสารหนูขึ้นอยู่กับเส้นทางการรับเข้าสู่ร่างกายจากการรับสัมผัสและเกี่ยวข้องกับปัจจัยความเข้มข้นของสารหนู ความว่องไวหรือความรุนแรงในการทำปฏิกิริยาเคมี ความสามารถในการละลายน้ำ สภาพและลักษณะความหนาบางของผิวหนังบริเวณที่ได้รับการสัมผัส รวมทั้งระยะเวลาที่สัมผัสเช่น การศึกษาของ Singha et al. (2014) พบความเป็นพิษของโซเดียมอาร์เซไนด์ในลูกอ๊อดของกบหนอง (*Rana limnocharis*) ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลารับสัมผัสที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี Comet assay พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำไม่พบความแตกต่างที่ระยะเวลาในการรับสัมผัส 48 และ 72 ชั่วโมง ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมอาร์เซไนด์ 400 ug/L นอกจากนี้ยังทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายและเกิดการแตกหักของโครโมโซม (Yadav and Trivedi, 2009)

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาระยะเวลาในการรับสัมผัส และความเข้มข้นของสารหนูที่สะสมในสิ่งแวดล้อมจากบริเวณใกล้บ่อเก็บกากแร่เหมืองแร่ทองคำ ที่อาจส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม โดยอาจแสดงออกในรูปแบบความผิดปกติของโครโมโซม ซึ่งมีสมมุติฐานว่าเหมืองแร่ทองคำปิดกิจการแล้ว สารหนูในสิ่งแวดล้อมจะส่งผลอย่างไรต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน และเลือกใช้กบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) เป็นตัวบ่งชี้สภาวะแวดล้อม เนื่องจากกบนาเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีโอกาส

ได้รับสัมผัส และเกิดการสะสมสารพิษในร่างกายได้ดี และในปัจจุบันการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในประเด็นโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตกลุ่มสัตว์ยังมีจำนวนน้อย ซึ่งคาดว่าผลการศึกษาในครั้งนี้จะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการสิ่งแวดล้อมในอนาคต และนำไปสู่การลดผลกระทบด้านสุขภาพของประชาชนต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาปริมาณสารหนูในน้ำ และตะกอนดินใกล้บ่อกักเก็บกากแร่เหมืองแร่ทองคำ อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลยและ จำลองแหล่งที่อยู่อาศัยที่มีการปนเปื้อนสารหนู รวมถึงประเมินความผิดปกติของโครโมโซมกบนาจากการรับสัมผัสสารหนูจากเหมืองแร่ทองคำในสภาพการทดลอง

วิธีดำเนินการวิจัย

จุดเก็บตัวอย่างน้ำ และตะกอนดิน

เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินในลำน้ำห้วยเหล็กใกล้บ่อกักเก็บกากแร่ระยะทาง 50 เมตรบริเวณเหมืองแร่ทองคำ อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย และพื้นที่อ้างอิงที่ไม่ได้รับผลกระทบจากเหมืองแร่ทองคำ บ้านสำราญ ตำบลสำราญ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

การทดลอง

การทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ การทดลองที่ 1 คือ ชุดทดลอง จำลองแหล่งที่อยู่อาศัยกบนาโดยใช้น้ำและตะกอนดินที่เก็บตัวอย่างจากจุดเก็บตัวอย่างบริเวณใกล้บ่อเก็บกากแร่เหมืองแร่ทองคำ เปรียบเทียบกับการทดลองที่ 2 คือ ชุดอ้างอิง จำลองแหล่งที่อยู่อาศัยของกบนาโดยใช้น้ำและตะกอนดินที่เก็บจากจุดเก็บตัวอย่างพื้นที่ที่ไม่ได้รับผลกระทบจากเหมืองแร่ทองคำ และทำการทดลองเลี้ยงกบนาทั้งสองชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ตามลำดับ โดยแต่ละชุดการทดลองเลี้ยงกบนาจำนวน 12 ตัวที่มีขนาดตัวและอายุใกล้เคียงกัน

วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดปริมาณสารหนู

วิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำ

นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 25 mL เติมกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 1.25 mL ย่อยบน water bath ที่อุณหภูมิ 90±5 °C เป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง ปรับปริมาตร 50 mL (APHA, 2005)

วิธีการเตรียมตัวอย่างตะกอนดิน

นำตัวอย่างตะกอนดินมาตากในที่ร่มจนแห้งบดให้ละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 mm ชั่งตะกอนดินละเอียด 2 g เติมกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 5 mL ไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) 15 mL และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 10 mL แล้วนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยดินที่อุหภูมิ 180-220 °C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง ปรับปริมาตร 50 mL (APHA, 2005)

วิธีเตรียมตัวอย่างกบนา

นำตัวอย่างเนื้อกบนาไปบดละเอียด ชั่งตัวอย่างเนื้อกบนา 1 g เติมกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 7 mL และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 1 mL และนำไปย่อยบน water bath ที่อุณหภูมิ 90±5 °C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง ปรับปริมาตร 25 mL (APHA, 2005)

การตรวจวัดปริมาณสารหนู

ตรวจวัดปริมาณสารหนูในตัวอย่างน้ำ ตะกอนดินก่อนการทดลองทั้งสองชุดการทดลอง และกบนาหลังการทดลองทุกสัปดาห์ โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี APHA (2005) และวิเคราะห์สารหนูด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma-Optical

Emission Spectrometry (ICP-OES) (Chand and Prasad, 2013)

การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา

ฉีดโคลชีซิน 0.05% ขนาด 1 mL ต่อน้ำหนักตัว 100 g เข้าไปในช่องท้องของกบนา ระยะเวลา 6-8 ชั่วโมง นำมาตัดแยกส่วนของไขกระดูกและบดตัดให้ละเอียดในจานเพาะเชื้อ เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 6-8 mL บ่มในอุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที นำตะกอนเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000-2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งและเติมน้ำยาตรึงสภาพที่เตรียมใหม่และเย็นจัดทีละหยด พร้อมกับเขย่าหลอดไปด้วย เติมจนครบ 6-8 mL นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000-2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึงสภาพ 6-8 mL ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทำซ้ำเพื่อล้างตะกอนเซลล์ให้สะอาด 3-4 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์ในสารละลายตรึงสภาพไว้ที่ -20 °C (Chen and Ebeling, 1968; Nanda et al., 1995)

การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาด้วยสีจิมซ่าและย้อมแถบสีแบบนอร์ด้วยซิลเวอร์ไนเตรท นำสไลด์ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมและย้อมสีโครโมโซมแล้วมาตรวจสอบดูความผิดปกติของโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 100 เท่า โดยทำการตรวจสอบโครโมโซมกบนาจำนวน 100 เซลล์/ตัว ทำการประเมินความผิดปกติของโครโมโซมกบนาชุดทดลองเปรียบเทียบกับชุดอ้างอิง โดยความผิดปกติของโครโมโซมอาจจะเกิดการเพิ่ม-ลดของจำนวนโครโมโซมและความผิดปกติด้านลักษณะโครงสร้าง หรือกลไกที่ทำให้จำนวนโครโมโซมเบี่ยงเบนไปจากภาวะปกติ (2*n*)

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สถิติเชิงอนุมานใช้ Mann-Whitney U test

ผลการวิจัย และอภิปรายผล

ปริมาณสารหนูในน้ำ และตะกอนดิน ก่อนการทดลอง

การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในน้ำ และตะกอนดินจากชุดทดลองและชุดอ้างอิง มีค่าดังตารางที่ 1 พบว่าปริมาณสารหนูในน้ำ และตะกอนดินจากชุดทดลอง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.23±0.01 mg/L และ 192.80±8.08 mg/kg ตามลำดับ ส่วนชุดอ้างอิงมีค่าเฉลี่ยตรวจไม่พบ (non-detected) และ 0.70±0.19 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งชุดทดลองมีค่าสารหนูเกินค่ามาตรฐานคุณภาพแหล่งน้ำกำหนดไว้ (0.001 mg/L) และมาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์นอกเหนือจากการอยู่อาศัย และเกษตรกรรมกำหนดไว้ (3.9 mg/kg) ทั้งก่อนและหลังสภาพการทดลอง ส่วนในชุดอ้างอิงไม่เกินค่ามาตรฐาน ปริมาณสารหนูในน้ำและตะกอนดินในชุดการทดลองที่เกินค่ามาตรฐานเนื่องจากกิจกรรมของเหมืองแร่ทองคำจะมีการรองรับของน้ำเสียจากการถลุงแร่ส่งมากักเก็บไว้ที่บ่อกักเก็บกากแร่ ที่มีการปนเปื้อนสารหนูที่เป็นองค์ประกอบในชั้นดิน และเกิดการรั่วไหลของสารหนูจากบ่อกักเก็บกากแร่ ทำให้สารหนูเกิดการแพร่กระจายออกสู่สิ่งแวดล้อม เกิดการปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำใกล้เคียง สารหนูที่สะสมในแหล่งน้ำจะเกิดการตกตะกอนสู่พื้นท้องน้ำและสะสมอยู่ในตะกอนดิน สอดคล้องกับรายงานกรมควบคุมมลพิษ (2552) พบว่ามีน้ำรั่วซึมออกมาจากคันดินของบ่อกักเก็บกากแร่ และเกิดการพังทลายคันดินของบ่อกักเก็บกากแร่บางจุด ซึ่งภายในบ่อมีทั้งน้ำเสีย กากแร่ และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแร่ ทำให้เกิดการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม และสอดคล้องกับการศึกษาของดุษฎี

(2556) รายงานผลการวิเคราะห์ตะกอนดิน และน้ำที่เก็บบริเวณรอบเหมืองทองคำภูทับฟ้า พบว่าตัวอย่างน้ำมีสีส้มเข้ม เมื่อโดนมือจะรู้สึกคัน ส่วนตัวอย่างดินมีลักษณะเป็นดินโคลนสีดำอมส้ม ซึ่งพบปริมาณสารหนูในตะกอนดินอยู่ในช่วง 23.06-52.70 mg/kg และน้ำ 0.093-0.374 mg/L แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารหนูสูงและมีค่าเกินมาตรฐาน สอดคล้องกับการศึกษาของณัฏฐ์วัจน์ (2557) พบว่าตัวอย่างตะกอนดินมีค่าสารหนูสะสมอยู่ระหว่าง 169.23-717.79 mg/kg ซึ่งเกินค่ามาตรฐานคุณภาพดินที่สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในพื้นที่นั้นได้ (คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2547)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารหนูในน้ำและตะกอนดินในชุดการทดลองและชุดอ้างอิงก่อนการทดลอง

สภาพการทดลอง	ตัวอย่าง	น้ำ (mg/L)	ตะกอนดิน (mg/kg)
ชุดทดลอง	1	0.22	199.84
	2	0.22	194.59
	3	0.24	183.98
	ค่าเฉลี่ย	0.23±0.01	192.80±8.08
ชุดอ้างอิง	1	Not detected	0.59
	2	Not detected	0.93
	3	Not detected	0.59
	ค่าเฉลี่ย	-	0.70±0.19
ค่ามาตรฐาน		0.01*	3.9**
P-value		-	<0.05

* ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2537) เรื่องมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งผิวดิน

** มาตรฐานคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอื่นนอกเหนือจากการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม (คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2547)

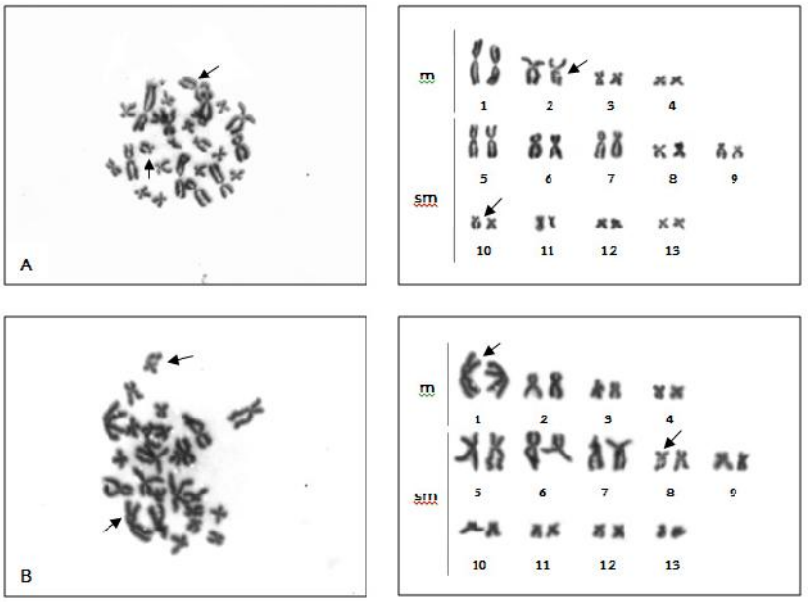
ปริมาณสารหนูในกบนาจากสภาพการทดลอง

การรับสัมผัสสารหนูของกบนาในระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์จากสภาพการทดลอง มีค่าดังตารางที่ 2 พบว่ากบนาจากชุดทดลองที่รับสัมผัสสารหนูในสิ่งแวดล้อมใกล้เหมืองแร่ทองคำ 1, 2 และ 3 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ยปริมาณสารหนูที่ตรวจพบเท่ากับ 0.04±0.01, 0.11±0.05 และ 0.33±0.03 mg/kg ตามลำดับ ส่วนกบนาจากชุดอ้างอิงมีค่าเฉลี่ย 0.03±0.06, 0.03±0.06 และ 0.03±0.01 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองสภาพการทดลองพบปริมาณสารหนูไม่เกินค่ามาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อนกำหนดไว้ (ไม่เกิน 2 mg/kg) โดยการรับสัมผัสสารหนูของกบนาที่เกิดจากการดำรงชีวิตที่มีการอาศัยอยู่ได้ทั้งบนบกและในน้ำ ทำให้เกิดการรับสัมผัสผ่านทางผิวหนังและผ่านทางปากจากกระบวนการกินที่ถูกส่งต่อสารพิษมาทางห่วงโซ่อาหาร (ปิยมาภรณ์, 2545) ส่งผลให้กบนารับสัมผัสสารหนูและเกิดการสะสมอยู่ภายในร่างกาย โดยปกติสิ่งมีชีวิตมีความสามารถในการควบคุมความเข้มข้นของโลหะภายในร่างกาย ไม่ให้มากหรือน้อยเกินไป เพื่อรักษาสมดุลของร่างกาย หากสิ่งมีชีวิตได้รับโลหะที่ไม่จำเป็นร่างกาย กลไกนั้นจะทำหน้าที่ลดปริมาณสารพิษหรือขับสารโลหะออกจากร่างกาย ดังนั้นการปนเปื้อนของโลหะในอาหารเพียงเล็กน้อยจึงไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค เมื่อกบนาได้รับสาร

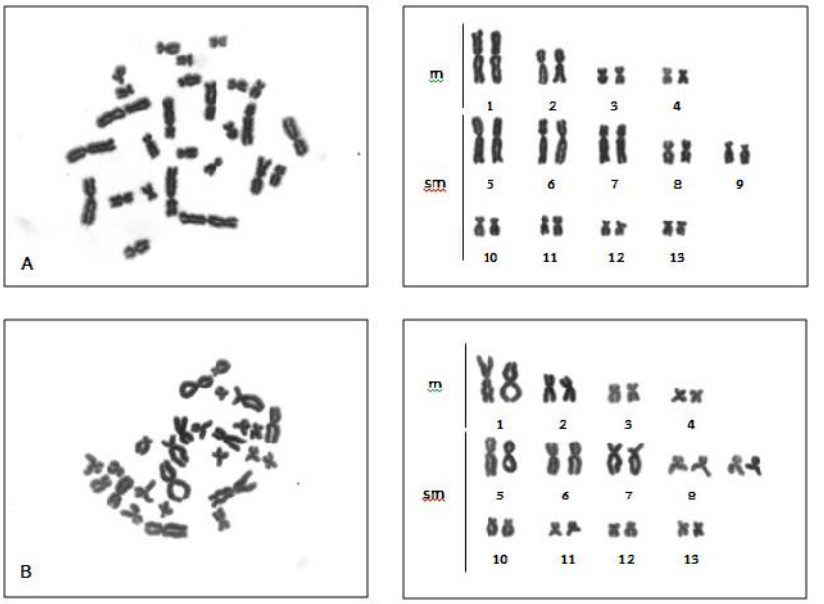
หนูที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำและตะกอนดินในปริมาณที่สูง ร่างกายของกบนาจะไม่สามารถสะสมสารพิษที่ได้รับทั้งหมดไว้ แต่จะดูดซับไว้เพียงบางส่วนและขับออกจากร่างกาย (เมธา, 2554) ทำให้ปริมาณสารหนูที่สะสมในกบนามีปริมาณต่ำ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารหนูจากชุดทดลองและชุดอ้างอิง พบว่าไม่แตกต่างกันในระยะเวลารับสัมผัส 1, 2 และ 3 สัปดาห์

การตรวจสอบโครโมโซมกบนา

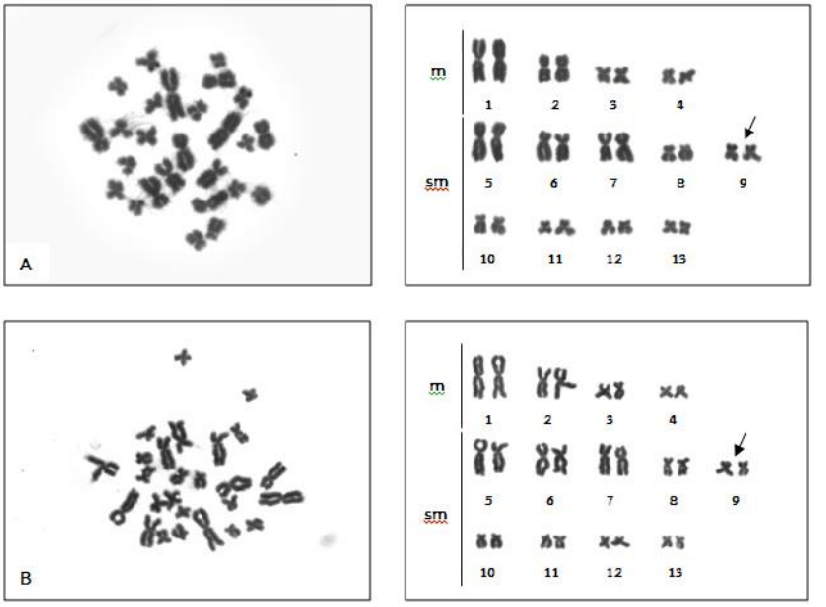
การจากศึกษาปริมาณสารหนูในกบนา พบว่ากบนาสามารถสะสมสารหนูได้ในปริมาณที่น้อย แต่จะเกิดการสะสมอยู่เป็นเวลานาน เมื่อถึงระดับหนึ่งร่างกายแสดงอาการความเป็นพิษออกมา สารหนูเป็นสารก่อมะเร็ง และส่งผลต่อกลไกในระดับเซลล์หรืออาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งแสดงออกมาในรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือโครโมโซม ดังนั้นในการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมกบนาต้องมีการตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นของโครโมโซมโดยเตรียมโครโมโซมด้วยวิธีทางตรงจากเซลล์ไขกระดูก พบว่ากบนาจากทั้งสองสภาพการทดลองมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 (*2n*=26) ประกอบด้วย โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก จำนวน 8 แท่ง และชนิดซับเมทาเซนทริก จำนวน 18 แท่ง ดังรูปที่ 1 และ 2 ผลการศึกษาพบโครโมโซมเครื่องหมายอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมชนิดซับเมทา เซนทริกคู่ที่ 9 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Patawang et al. (2014) และ Suttichaiya et al. (2016) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 1 เซลล์ระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ (A, B) ของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus, 2n=26*) จากชุดทดลองโดยการย้อมสีแบบธรรมดา (บริเวณลูกศรชี้ คือโครโมโซมที่เกิดความผิดปกติ)



รูปที่ 2 เซลล์ระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ (A, B) ของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus, 2n*=26) จากชุดควบคุม โดยการย้อมสีแบบธรรมดา



รูปที่ 3 เซลล์ระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ (A) ของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus, 2n*=26) จากชุดทดลอง และเซลล์ระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ (B) ของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus, 2n*=26) จากชุดควบคุม โดยการย้อมแถบสีนอร์ (บริเวณลูกศรชี้ คือตำแหน่งโครโมโซมเครื่องหมาย)

การประเมินความผิดปกติของโครโมโซมกบนา

การประเมินความผิดปกติของโครโมโซมกบนาจากการรับสัมผัสสารหนูในระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ พบรูปแบบความผิดปกติของโครโมโซม กบนา 5 แบบ ได้แก่ single chromatid gap (SCG), iso chromatid gap (ISCG), single chromatid break (SCB), deletion (D) และ fragmentation (F) ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 4 ชุดทดลองกบนาที่รับสัมผัสสารหนูระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา 4 แบบ ได้แก่ SCG, ISCG, D และ F ระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา 3 แบบ ได้แก่ ISCG, D และ F และระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา 5 แบบ ได้แก่ SCG, ISCG, SCB, D และ F ส่วนชุดอ้างอิงพบว่ากบนาที่รับสัมผัสสารหนูระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา 3 แบบ ได้แก่ SCG, SCB และ D ระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา 2 แบบ ได้แก่ D และ F และระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา 4 แบบ ได้แก่ SCG, ISCG, SCB และ D ผลการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมจากการรับสัมผัสสารหนูของชุดทดลอง พบว่าน้ำและตะกอนดินบริเวณใกล้บ่อเก็บกากแร่เหมืองแร่ทองคำมีปริมาณสารหนูเกินค่ามาตรฐาน ส่งผลให้กบนาในการทดลองสามารถรับสัมผัส และเกิดการสะสมสารหนูไว้ในเนื้อเยื่อ แต่จากความสามารถในการปรับตัวต่อการดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสารหนู ทำให้กบนาสามารถสะสมสารหนูได้ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Suttichaiya et al. (2016) พบความผิดปกติของโครโมโซมกบนาในพื้นที่เหมืองแร่ทองคำ ส่วนความผิดปกติของโครโมโซมกบนาจากชุดอ้างอิงอาจเกิดจากสารโคลซิซินที่ใช้ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ แต่จะเกิดในปริมาณที่น้อยหรืออาจไม่เกิดความผิดปกติ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบทั้งสองชุดการทดลอง พบว่าความผิดปกติของโครโมโซมในระยะเวลารับสัมผัสที่ 1 และ 2 สัปดาห์ไม่แตกต่างกัน แต่ความผิดปกติของโครโมโซมต่อเซลล์ และร้อยละความผิดปกติของโครโมโซมในระยะเวลารับสัมผัสที่ 3 สัปดาห์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารหนูในกบนาจากสภาพการทดลองในชุดการทดลองและชุดอ้างอิง

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ตัวอย่าง	ปริมาณสารหนู (mg/kg)		P-value
		ชุดทดลอง	ชุดอ้างอิง	
1	1	0.05	0.03	>0.05
	2	0.03	0.03	
	3	0.03	0.02	
ค่าเฉลี่ย		0.04±0.01	0.03±0.06	
2	1	0.14	0.03	>0.05
	2	0.15.	0.03	
	3	0.07	0.04	
ค่าเฉลี่ย		0.11±0.05	0.03±0.06	

ตารางที่ 2 ปริมาณสารหนูในกบนาจากสภาพการทดลองในชุดการทดลองและชุดอ้างอิง (ต่อ)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ตัวอย่าง	ปริมาณสารหนู (mg/kg)		P-value
		ชุดทดลอง	ชุดอ้างอิง	
3	1	0.35	0.04	>0.05
	2	0.29	0.02	
	3	0.34	0.03	
ค่าเฉลี่ย		0.33±0.03	0.03±0.01	
ค่ามาตรฐาน		2*		

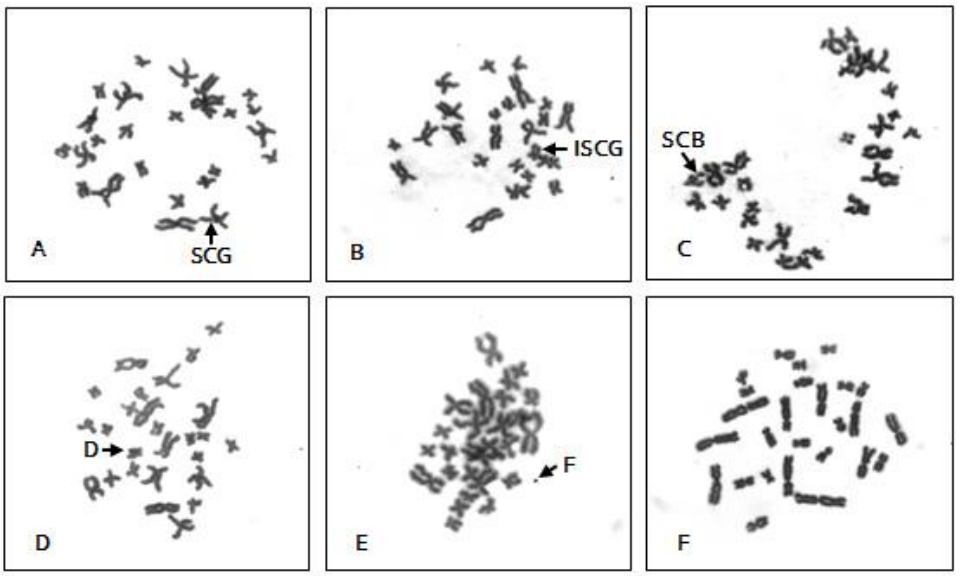
หมายเหตุ: *มาตรฐานอาหาร ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 (กระทรวงสาธารณสุข, 2529)

ตารางที่ 3 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมจากสภาพการทดลองรับสัมผัสสารหนู ระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ และชุดอ้างอิง

รับสัมผัส	สภาพการทดลอง	ตัวอย่าง	ปริมาณสารหนู (mg/kg)	จำนวนโครโมโซมผิดปกติ					จำนวนโครโมโซมผิดปกติ (จุดแตกหัก)	จำนวนเซลล์ผิดปกติ (เซลล์)	ร้อยละความผิดปกติ
				SCG	ISCG	SCB	D	F			
1 สัปดาห์	ชุดทดลอง	1	0.05	0	0	0	1	1	2	2	2
		2	0.03	0	0	1	0	0	1	1	1
		3	0.03	1	0	0	1	0	2	1	1
		ค่าเฉลี่ย/ผลรวม	0.04±0.01	1	0	1	2	1	4	3	1.33
	ชุดอ้างอิง	1	0.03	0	0	0	1	0	1	1	1
		2	0.03	1	0	1	0	0	2	1	1
		3	0.02	1	0	0	0	0	1	1	1
		ค่าเฉลี่ย/ผลรวม	0.03±0.06	2	0	1	1	0	4	3	1.00
	P-value		-	-	-	-	-	-	-	>0.05	>0.05
2 สัปดาห์	ชุดทดลอง	1	0.14	0	1	0	0	0	1	1	1
		2	0.15	0	0	0	1	1	2	2	2
		3	0.07	0	0	0	1	0	1	1	1
		ค่าเฉลี่ย/ผลรวม	0.11±0.05	0	1	0	2	1	4	4	1.33
	ชุดอ้างอิง	1	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0.03	0	0	0	1	1	2	2	2
		3	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0
		ค่าเฉลี่ย/ผลรวม	0.03±0.06	0	0	0	1	1	2	2	0.67
	P-value		-	-	-	-	-	-	-	>0.05	>0.05

ตารางที่ 3 ลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมจากสภาพการทดลองรับสัมผัสสารหนู ระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ และชุดอ้างอิง (ต่อ)

ระยะเวลารับสัมผัส	สภาพการทดลอง	ตัวอย่าง	ปริมาณสารหนู (mg/kg)	จำนวนโครโมโซมผิดปกติ					จำนวนโครโมโซมผิดปกติ (จุดแตกหัก)	จำนวนเซลล์ผิดปกติ (เซลล์)	ร้อยละความผิดปกติ
				SCG	ISCG	SCB	D	F			
3 สัปดาห์	ชุดทดลอง	1	0.35	0	2	0	1	1	4	3	3
		2	0.29	0	1	1	0	0	2	2	2
		3	0.34	1	0	0	1	1	3	2	2
		ค่าเฉลี่ย/ผลรวม	0.33±0.03	1	3	1	2	2	9	7	2.33
	ชุดอ้างอิง	1	0.04	0	0	0	1	0	1	1	1
		2	0.02	0	1	1	0	0	2	1	1
		3	0.03	1	0	0	0	0	1	1	1
		ค่าเฉลี่ย/ผลรวม	0.03±0.01	1	1	1	1	0	4	3	1.00
	P-value		-	-	-	-	-	-	-	<0.05	<0.05



รูปที่ 4 รูปแบบความผิดปกติของโครโมโซมกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus,* 2*n*=26) ได้แก่ single chromatid gap (SCG), iso chromatid gap (ISCG), single chromatid break (SCB), deletion (D) และ fragmentation (F), (A-E จากชุดทดลอง และ F จากชุดควบคุม)

สรุปผลการวิจัย

ปริมาณสารหนูในน้ำ และตะกอนดิน

ปริมาณสารหนูในน้ำ และตะกอนดินใกล้บริเวณบ่อกักเก็บกากแร่เหมืองแร่ทองคำ มีค่าเกินมาตรฐานคุณภาพแหล่งน้ำและมาตรฐานคุณภาพดิน (0.001 mg/L และ 3.9 mg/kg ตามลำดับ) ส่วนชุดอ้างอิงมีปริมาณสารหนูในน้ำและตะกอน มีค่าไม่เกินค่ามาตรฐานคุณภาพแหล่งน้ำและคุณภาพดิน

ปริมาณสารหนูสะสมในกบนา

ปริมาณสารหนูในกบนาจากสภาพการทดลองรับสัมผัสสารหนู 1, 2 และ 3 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.04±0.01, 0.11±0.05 และ 0.33±0.03 mg/kg ตามลำดับ ส่วนกบนาจากชุดอ้างอิงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.03±0.06, 0.03±0.06 และ 0.03±0.01 mg/kg ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองมีปริมาณสารหนูไม่เกินค่ามาตรฐาน (2 mg/kg) แต่หากประชาชนบริโภคกบนาที่ปนเปื้อนสารหนู จะก่อให้เกิดการถ่ายทอดสารพิษมาตามห่วงโซ่อาหาร และเกิดการสะสมในร่างกายของมนุษย์เป็นเวลานานจนแสดงความเป็นพิษเรื้อรัง

การตรวจสอบลักษณะโครโมโซม

การตรวจสอบลักษณะโครโมโซมกบนาพบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 แท่ง ($2n=26$) ชนิดของโครโมโซมกบนาที่พบมี 2 ชนิดได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริก ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง และขนาดเล็ก 2 แท่ง โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 3 แท่ง และขนาดเล็ก 6 แท่ง มีโครโมโซมเครื่องหมายที่มีรอยคอดที่สอง หรือบริเวณของ Nucleolar Organizer Regions (NORs) บนแขนข้างสั้นใกล้กับเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 9

ความผิดปกติของโครโมโซมกบนา

ความผิดปกติของโครโมโซมกบนาจากการรับสัมผัสสารหนูในระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองและชุดอ้างอิงในแต่ละสัปดาห์ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อจำนวนเซลล์และร้อยละความผิดปกติของโครโมโซมในระยะเวลารับสัมผัสที่ 3 สัปดาห์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากกลุ่มวิจัยสารพิษปศุสัตว์และสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. (2552). รายงานผลการตรวจสอบปริมาณไซยาไนด์ และโลหะหนักในแหล่งน้ำผิวดิน บ่อน้ำใช้ของประชาชน และตะกอนดิน บริเวณหมู่บ้านใกล้เคียงเหมืองแร่ทองคำของ บริษัททุ่งคำ จำกัด. ใน: รายงานการวิจัย กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ.

กรมทรัพยากรธรณี. (2544). แหล่งแร่ทองคำ “ภูทับฟ้า” ตำบลเขาหลวง อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย. กรมทรัพยากรธรณี. กรุงเทพฯ.

กระทรวงสาธารณสุข. (2529). มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. แหล่งข้อมูล: http://iodinethailand.fda.moph.go.th/food_54/law/data/announ_moph/P98.pdf. ค้นหาเมื่อวันที่ 22 ตุลาคม 2558.

คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. (2547). พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน ฉบับที่ 25 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 121 ตอนพิเศษ 119ง ลงวันที่ 20 ตุลาคม 2547.

ณัฏฐ์วัจน์ พลเวียง. (2557). ปริมาณของสารหนูในตะกอนดินและหอยฝาเดียวในห้วยเหล็ก อ.วังสะพุง จ.เลย. ใน:

การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 770-775.

ดุษฎี หมื่นห่อ. (2556). รายงานการวิเคราะห์ดินและน้ำที่เก็บบริเวณรอบเหมืองทองคำ ภูทับฟ้า บ้านนาหนองบง ต.เขาหลวง อ.วังสะพุง จ.เลย. สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อมมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปิยมาภรณ์ ดวงมนตรี. (2545). การสะสมโลหะหนักใน สิ่งมีชีวิตผ่านลำดับขั้นการบริ โภคในแหล่งน้ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาสาธารณสุขมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

เมธา มีแต้ม. (2554). กลไกระดับเซลล์ในการลดพิษจากโลหะ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M., Hossan, A.M., Aif, E.P., Parvin, E. and Akter, M.S. (2011). Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia *(Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. Chemosphere 84(1): 143-149.

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

APHA. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater., 21 st edition, Washington, D.C.: American Public Health Association.

Chand, V. and Prasad, S. (2013). ICP-OES assessment of heavy metal contamination in tropical marine sediments: A comparative study of two digestion techniques. Microchemical Journal 111: 53-56.

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

Nanda, I., Schsrtl, M., Feichtinger, W., Schlupp, I., Parzefall, J. and Schmid, M. (1995). Chromosomal evidence for laboratory synthesis of triploid hybrid between the gynogenetic teleost *Poecilia formosa* and its host species. Journal of Fish Biology 47: 619-623.

Patawang, I., Tanomtong, A., Phimphan, S., Chuaynkern, Y., Chuaynkern, C., Phaengphairee, P., Khrueanet, W. and Nithikulworawong, N. (2014). The identification of sex-chromosomes and karyological analysis of rice frog, *Fejervarya limnocharis* (Anura, Ranidae) from Northeast Thailand. Cytologia 79: 141-150.

Shi, H., Shi, X. and Liu, K.J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. Molecular and Cellular Biochemistry 255: 67-78.

Suttichaiya, A., Khammanichanh, A., Patawang, I., Tanamtong, A., Sriuttha, M. and Neeratanaphan, L. (2016) Chromosome aberrations of East Asian Bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*) around a gold mine area with arsenic contamination. Environment Asia 9(1): 67-76.

Singha, U., Pandeyb, N., Boroa, F., Girib, S., Giria, A. and Biswas, S. (2014). Sodium arsenite induced changes in survival, growth, metamorphosisand genotoxicity in the Indian cricket frog (*Rana limnocharis*). Chemosphere 112: 333-339.

Yadav, K.Y. and Trivedi, S.P. (2009). Chromosomal aberrations in a fish, *Channa punctata* after *in vivo* exposure to three heavy metals. Mutation Research 678: 7-12.

❑❑❑❑❑