ความสามารถในการก่อกลายพันธุ์ของฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนในเขตเมืองกรุงเทพมหานคร

Mutagenicity of PM_{10} in Urban Area of Bangkok

โฉมศรี ชูช่วย

Chomsri Choochuay

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Environmental Management

Prince of Songkla University

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ความสามารถในการก่อกลายพันธุ์ของฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน ในเขตเมืองกรุงเทพมหานคร

ผู้เขียน นางสาวโฉมศรี ชูช่วย

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……

(ดร. อรมาศ สุทธินุ่น)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวัช พงษ์เพียจันทร์)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธันวดี สุขสาโรจน์)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นสพ. บรรจง วิทยวีรศักดิ์)

…….....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล)

…….....กรรมการ

(ดร. อรมาศ สุทธินุ่น)

…….....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวัช พงษ์เพียจันทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

……

(ศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ความสามารถในการก่อกลายพันธุ์ของฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนในเขตเมืองกรุงเทพมหานคร
ผู้เขียน	นางสาวโฉมศรี ชูช่วย
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2554

บทคัดย่อ

ตัวอย่างฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในเขตเมืองกรุงเทพมหานคร 7 เขตพื้นที่ ได้แก่ การเคหะชุมชนดินแดง สถานีไฟฟ้าย่อยธนบุรี สถานีตำรวจนครบาลโชคชัย 4 โรงเรียนสิงหราชพิทยาคม โรงเรียนนนทรีวิทยา การเคหะชุมชนคลองจั่น และโรงเรียนบดินทรเดชา ซึ่งเก็บตัวอย่าง 24 ชั่วโมงตั้งแต่เดือนมกราคม – ธันวาคม พ.ศ.2549 ถูกนำมาทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้ S9 mixture โดยวิธีทดสอบเอมส์ พบว่าตัวอย่าง PM_{10} ในพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงมีค่าดัชนีการก่อกลายพันธุ์สูงสุดทั้ง 4 ชุดการทดสอบ ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้สถิติ oneway-ANOVA วิเคราะห์ความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ พบว่าทั้ง 4 ชุดการทดสอบพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดนมีความแตกต่างกับพื้นที่เก็บตัวอย่างอีก 6 พื้นที่อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในแต่ละเดือนระหว่างมกราคม - ธันวาคม พ.ศ.2549 พบว่าช่วงเดือนธันวาคม – กุมภาพันธ์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเดือนมีนาคม – ตุลาคม ที่ระดับ $p < 0.05$ สำหรับตัวอย่าง PM_{10} จากพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงที่ทดสอบด้วยแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ทดสอบในสภาวะไม่ใช้ S9 mixture ช่วงเดือนที่มีความแตกต่างดังกล่าวคือช่วงที่อยู่ในฤดูหนาว ดังนั้นในช่วงฤดูหนาวของพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงประชาชนมีโอกาสได้รับสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์มากกว่าพื้นที่อื่น และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) แบบ Pearson correlation ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนได้แก่ Phenanthrene (Phe), Anthracene (An), Fluoranthene (Fluo) และ Pyrene (Pyr) ที่วัดด้วยเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) พบว่า Fluoranthene มีความสัมพันธ์สูงสุดกับดัชนีการก่อกลายพันธุ์ รองลงมาคือ Pyrene Phenanthrene และ Anthracene ตามลำดับ

Thesis Title	Mutagenicity of PM_{10} in Urban Area of Bangkok
Author	Miss Chomsri Choochuay
Major Program	Environmental Management
Academic Year	2011

ABSTRACT

Mutagenicity of PM_{10} in urban area of Bangkok was studied, PM_{10} samples were collected at Dindang Housing Community, Thon Buri Electricity Sub, Chok Chai 4 Police Station, Singharat Pittayakhom School, Nonsi Witthaya School, Klongchan Housing Community and Bodindecha (Sing Singhaseni) School. The samples from all monitoring sites were collected covering a period of 24 hours monthly from January - December 2006. The mutagenicity of extracts of the samples was tested in the *Salmonella typhimurium* strain TA98 and TA100 according to standard AMES test method, with and without metabolic activity (S9).The result found that Dindang Housing Community had the highest MI value among all sites. Using oneway-ANOVA analysis, it's MI value was significantly different ($p < 0.05$) from that of other areas on both strains of *Salmonella typhimurium,* with and without metabolic enzyme (S9).

Comparing between sampling time from January - December at Dindang housing Community, the result indicated that the MI value during December – February was significantly different ($p < 0.05$) from that during March – October when tested with *Salmonella typhimurium* strain TA98 without metabolic enzyme (S9). During which such difference is in the winter. In the winter of the Dindang housing Community have been exposed to a potent mutagen than other areas The Pearson correlation (r) between the MI value in PM_{10} and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), phenanthrene (Phe), anthracene (An), fluoranthene (Fluo) and pyrene (Pyr.) were highly correlated. The highest correlation was found in Fluo followed by Pyr, Phe and An, respectively.

กิ ตติ กรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจากหลายฝ่าย โดยเฉพาะผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวัช พงษ์เพียจันทร์ และ ดร.อรมาศ สุทธินุ่น อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดองค์ความรู้ แนวคิด และทักษะต่างๆด้านสิ่งแวดล้อม อันเป็นผลให้วิสัยทัศน์ของผู้วิจัยกว้างไกลสามารถประยุกต์สิ่งต่างๆให้ผสมผสานกลมกลืน ทั้งช่วยส่งเสริมให้คำแนะนำ ปรึกษาวิทยาการต่างๆเพิ่มเติม ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องปัญหาและอุปสรรคต่างๆด้วยความเอาใจใส่ห่วงใย เป็นกำลังใจตลอดมา นอกเหนือจากนั้นยังต้องขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธันวดี สุขสาโรจน์ ผู้ช่วย-ศาสตราจารย์ ดร.นสพ.บรรจง วิทยวีรศักดิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล เลิศคณาวนิชกุล ที่กรุณาช่วยแนะนำข้อบกพร่องจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคนิคต่างๆเกี่ยวกับวิธีการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์โดยวิธีทดสอบเอมส์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้ออนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการ รวมถึงช่วยสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี รวมถึงให้คำปรึกษาและช่วยชี้แนะแนวทางในงานวิจัยครั้งนี้ให้แล้วเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยซาบซึ้งใจยิ่งนักจึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนการวิจัยบางส่วนในครั้งนี้ และขอขอบคุณด้วยความจริงใจสำหรับพี่ๆและเพื่อนๆสิ่งแวดล้อมรุ่นที่ 21 ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้านมาโดยตลอด

เหนือสิ่งอื่นใดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อประเสริฐและคุณแม่หวล ชูช่วย ผู้ซึ่งให้ชีวิต จิตวิญญาณ สติปัญญา ปลูกฝังสร้างพื้นฐานเรื่องความรักในการศึกษา ความอดทน และเป็นกำลังใจอย่างหาที่สุดมิได้ รวมทั้งสนับสนุนเกื้อกูลทุกๆอย่างตลอดมา รวมถึงครอบครัวชูช่วยทุกคนโดยเฉพาะน้องชาย นคร ชูช่วย คุณปู่และคุณย่าที่ให้กำลังใจอย่างดีมาตลอด หากวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงาน หรือบุคคลที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยขอมอบคุณความดีทั้งปวงให้แก่ผู้มีพระคุณทุกๆท่าน

โฉมศรี ชูช่วย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญรูป	(10)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร	5
1.2.1 ฝุ่นละอองในบรรยากาศ	6
1.2.2 ชนิดและขนาดของฝุ่นละออง	10
1.2.3 การเกิดฝุ่นละอองในบรรยากาศ	11
1.2.4 ประเภทของฝุ่นละออง	12
1.2.5 มาตรฐานฝุ่นละอองในบรรยากาศโดยทั่วไปของประเทศไทย	13
1.3 ลักษณะทางอุตุนิยมวิทยาที่มีต่อภาวะมลพิษทางอากาศ	13
1.4 การกลายพันธุ์	15
1.5 การทดสอบการก่อกลายพันธุ์	20
1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
1.7 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	28
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	28
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	30
2.1 วัสดุ	30
2.1.1 เชื้อที่ใช้ทดสอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	30
2.1.2 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ	30
2.1.3 สารเคมี	31
2.2.อุปกรณ์	31
2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้สกัดตัวอย่างอากาศ	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.2 อุปกรณ์วิเคราะห์หาสารก่อกลายพันธุ์	31
2.3 วิธีดำเนินการ	32
2.4 การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากกระดาษกรองเก็บอากาศโดยการทดสอบเอมส์	38
2.5 การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากกระดาษกรองเก็บอากาศโดยวิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีทดสอบเอมส์	46
2.6 คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละออง PM_{10} กับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน	47
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์	48
3.1 ผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละออง PM_{10} ในพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่าง	48
3.2 ผลการเปรียบเทียบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละออง PM_{10} ในพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่าง	56
3.3 การเปลี่ยนแปลงดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละออง PM_{10} ในพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างในแต่ละเดือน	57
3.4 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละออง PM_{10} ในพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างกับสารประกอบโพลีไซคลิก-อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน	60
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	67
4.1 สรุปผลงานวิจัย	67
4.2 ข้อเสนอแนะ	68
บรรณานุกรม	69

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก วิธีเตรียมสารละลายต่างๆสำหรับการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีทดสอบเอมส์	78
ภาคผนวก ข การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร (plate count)	83
ประวัติผู้เขียน	86

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1-1 สารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 16 ชนิด ที่เป็นสารพิษอันตราย ต้องรีบกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อม	8
ตารางที่ 1-2 การแบ่งกลุ่มแหล่งกำเนิดตามความสามารถในการก่อมะเร็งโดย IARC	9
ตารางที่ 2-1 ตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน (sensitive to standard mutagens)	38
ตารางที่ 3-1 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละออง PM_{10} กับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนคำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS	61

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1-1 ฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) เฉลี่ย 24 ชั่วโมงที่วัดจากริมถนนในเขตกรุงเทพมหานครปี 2548-2549	2
รูปที่ 1-2 ฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) เฉลี่ยรายปีในเขตกรุงเทพมหานคร ปี 2538-2549	2
รูปที่ 1-3 ฝุ่นละอองรวม (TSP) เฉลี่ย 24 ชั่วโมงที่วัดจากริมถนนในเขตกรุงเทพมหานครปี 2548-2549	3
รูปที่ 1-4 แสดงปฏิกิริยาทัวโทเมอริกชิฟต์ในโมเลกุลของเบสในดีเอ็นเอ	16
รูปที่ 1-5 การจับคู่เบสของดีเอ็นเอหลังจากเกิดทัวโทเมอริกชิฟต์	17
รูปที่ 1-6 แสดงการกลายพันธุ์ในขณะที่เกิดทัวโทเมอริกชิฟต์ของกัวนีน	17
รูปที่ 1-7 แสดง 5-โบรโมยูราซิล (5-Bromodeoxyuridine, 5-Brdu) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์	19
รูปที่ 1-8 แสดง 2-อะมิโนพิวรีน (2-Aminopurine, 2-AP) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์	20
รูปที่ 1-9 แสดงขั้นตอนการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์โดยวิธีการทดสอบเอมส์	23
รูปที่ 2-1 จุดเก็บตัวอย่าง	33
รูปที่ 2-2 แผนผังแสดงวิธีสกัดสารจากกระดาษกรองอากาศ	36
รูปที่ 2-2(ก) สกัดโดยใช้แรงสั่นสะเทือนความถี่สูง	37
รูปที่ 2-2 (ข) กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42	37
รูปที่ 2-3 (ก) เครื่อง Rotary evaporator	37
รูปที่ 2-3 (ข) เป่าเบาเบาด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อระเหยตัวทำละลายที่เหลือ	37
รูปที่ 2-4 แผนผังแสดงการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากกระดาษกรองอากาศโดยวิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีทดสอบเอมส์	39
รูปที่ 2-5 ภาพแสดงการกลายพันธุ์ของสาร A ทดสอบระดับความเข้มข้น 2 ขนาด (Dose 1:2.5 mg/plate;) (Dose 2:5 mg/plate) ในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100	40
รูปที่ 3-1 แสดงผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)	49

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
รูปที่ 3-2 แสดงผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ไม่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)	51
รูปที่ 3-3 แสดงผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะที่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)	53
รูปที่ 3-4 แสดงผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะที่ไม่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)	55
รูปที่ 3-5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตามความสูง	60
รูปที่ (1ข) การทำเจือจางเป็นลำดับ	83
รูปที่ (2ข) วิธี pour plate	80
รูปที่ (3ข) วิธี spread plate	84
(รูปที่ 4ข) วิธีการ drop plate)	85

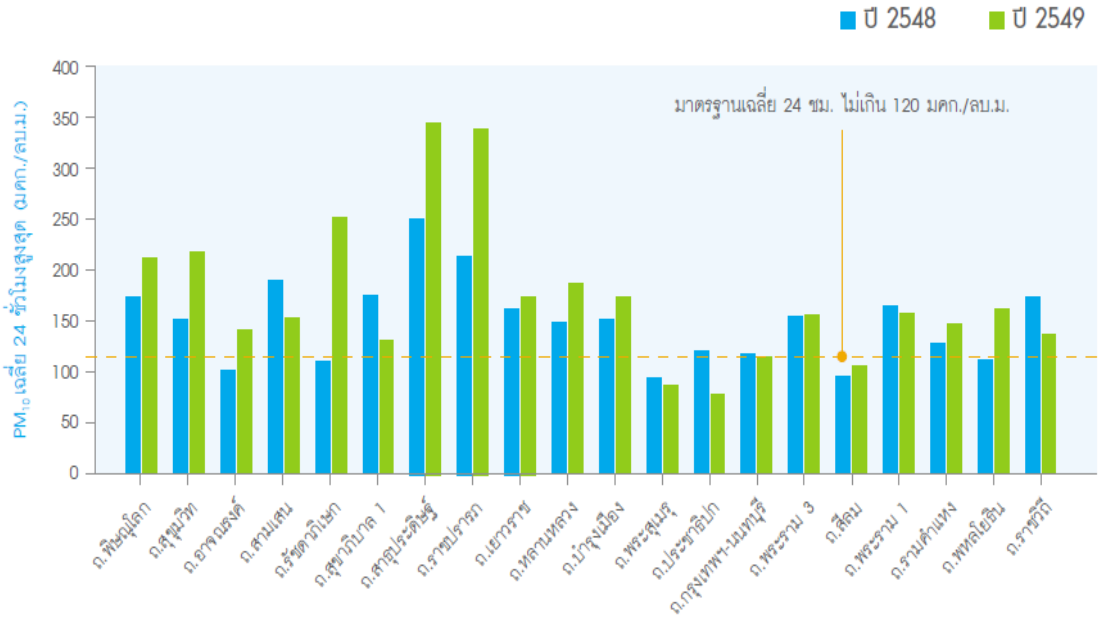
บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

มลพิษทางอากาศจัดเป็นปัญหาสำคัญ ทั่วทุกภูมิภาคของโลกกำลังประสบปัญหาในเรื่องมลภาวะเป็นพิษ เนื่องจากจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น วิถีชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้มีการใช้พลังงานในภาคส่วนต่างๆมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรม การคมนาคม การผลิตไฟฟ้า เป็นต้น (Dung, 1996; Gocht *et al*., 2001; Silva, 2005) ซึ่งล้วนแล้วแต่ส่งผลให้เกิดมลพิษทางอากาศ (Sookkai *et al.,* 2000) ปริมาณของอากาศเสียที่ถูกปล่อยออกมาก็เพิ่มขึ้น ซึ่งจะปรากฏในรูปของฝุ่นละออง โดยเฉพาะฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) หากพบค่าเกินมาตรฐานคุณภาพอากาศจะส่งผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจของประชาชน (Wheeler *et al*., 2006) โดยเฉพาะผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยง ได้แก่ เด็ก ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีโรคประจำตัวเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจอยู่แล้วจะเป็นผู้ที่ได้รับผลกระทบได้ง่าย (Jinsart *et al*., 2002)

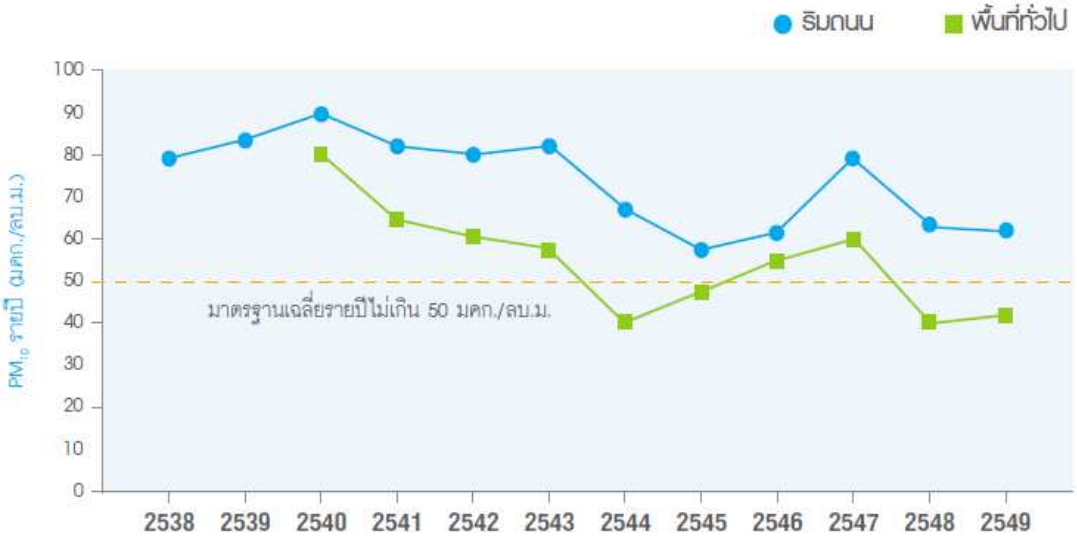
ปัจจุบันในเมืองใหญ่ที่เป็นศูนย์กลางของความเจริญทางด้านเศรษฐกิจและสังคม ดังเช่น กรุงเทพมหานครจะประสบกับภาวะความเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจและประชากรอย่างรวดเร็ว ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาแรงกดดันจากประชากรที่กำลังขยายตัว มีผลทำให้เขตกรุงเทพมหานครต้องมีการพัฒนาและขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในหลายจุดตรวจวัดของกรมควบคุมมลพิษตรวจพบระดับความเข้มข้นของฝุ่นละอองแขวนลอยรวม (Total suspended particle: TSP) และฝุ่นละอองที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในบรรยากาศเกินมาตรฐานในหลายบริเวณ ซึ่งกำหนดโดยกรมควบคุมมลพิษมีค่าไม่เกิน 330 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เมตร สำหรับฝุ่นละอองแขวนลอยรวม และ 120 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เมตร สำหรับฝุ่นละอองที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน จากรายงานสถานการณ์และการจัดการปัญหามลพิษทางอากาศและเสียงปีพุทธศักราช 2549 โดยสำนักจัดการคุณภาพอากาศและเสียงกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม พบว่าบริเวณริมถนนฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) มีปริมาณลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปีพุทธศักราช 2548 แต่ผลการตรวจวัดในปีพุทธศักราช 2549 โดยใช้สถานีตรวจวัดคุณภาพอากาศอัตโนมัติของกรมควบคุมมลพิษค่าเฉลี่ย 24 ชั่วโมงตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 25.7-343.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เมตรแสดงดังรูปที่ 1-1 และจากการตรวจวัดคุณภาพอากาศพบค่าเฉลี่ยรายปีของฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2538-2549 มี

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นบริเวณริมถนนมากกว่าพื้นที่ทั่วไปแสดงดังรูปที่ 1-2 และจากการตรวจวัดสารมลพิษทางอากาศยังพบฝุ่นละอองรวมเกินมาตรฐานอยู่หลายบริเวณแสดงดังรูปที่ 1-3



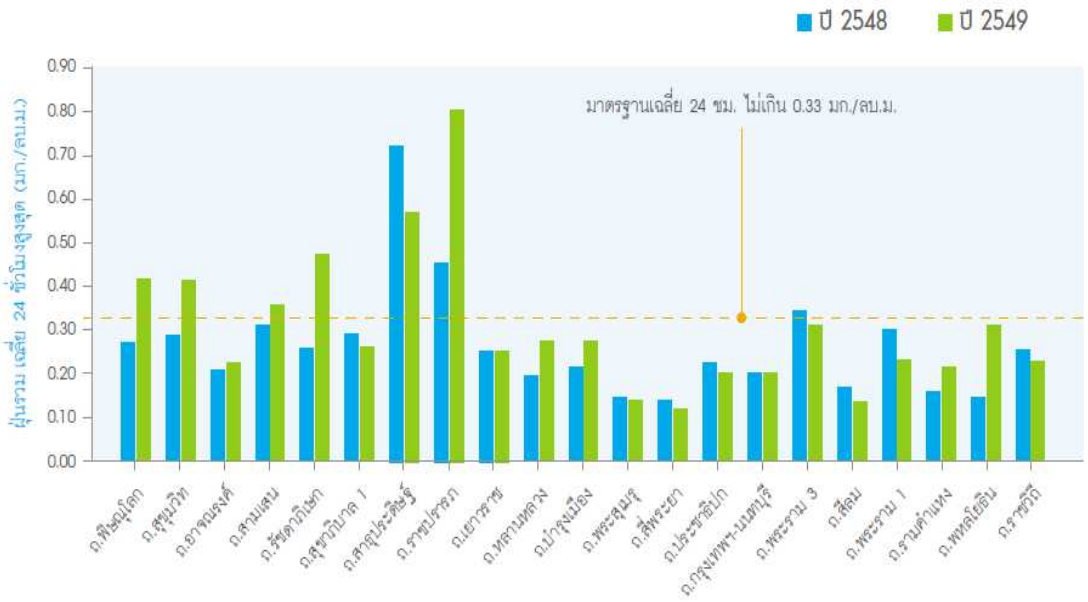
รูปที่ 1-1 ฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) เฉลี่ย 24 ชั่วโมงที่วัดจากริมถนนในเขตกรุงเทพมหานครปี 2548-2549

(ที่มา: สำนักจัดการคุณภาพอากาศและเสียง กรมควบคุมมลพิษ, 2549)



รูปที่ 1-2 ฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) เฉลี่ยรายปีในเขตกรุงเทพมหานครปี 2538-2549

(ที่มา: สำนักจัดการคุณภาพอากาศและเสียง กรมควบคุมมลพิษ, 2549)



รูปที่ 1-3 ฝุ่นละอองรวม (TSP) เฉลี่ย 24 ชั่วโมงที่วัดจากริมถนนในเขตกรุงเทพมหานครปี 2548-2549

(ที่มา: สำนักจัดการคุณภาพอากาศและเสียง กรมควบคุมมลพิษ, 2549)

ฝุ่นละอองแขวนลอยในบรรยากาศกรุงเทพมหานคร มีแหล่งกำเนิดที่สำคัญมาจากการก่อสร้างอุตสาหกรรมและการจราจรโดยเฉพาะการจราจรส่งผลให้มีการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในอัตราที่สูงขึ้นด้วย ดังนั้น ฝุ่นละอองที่เกิดจากกระบวนการสันดาปเชื้อเพลิงของเครื่องยนต์ที่ปล่อยออกมาจากท่อไอเสีย ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญจากกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิงอันประกอบด้วยสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs) มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง เป็นมุม หรือเป็นกลุ่ม (Blumer, 1976; Mcgroddy and Farrington, 1995) จัดเป็นสารมลพิษทางอากาศชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งและมีผลต่อการก่อกลายพันธุ์ (Jacob, 1996; Qiao *et al*., 1999) ซึ่งองค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) กำหนดให้มีได้ไม่เกิน 1 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร หากเกินกว่านั้นถือเป็นระดับที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง (Jone *et al*., 2001) องค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (United States Environmental Protection Agency: USEPA) กำหนด PAHs 16 ชนิดว่าเป็นมลพิษหลัก โดยเฉพาะ benzo[a]pyrene (B[a]P) เป็นชนิดที่มีความเสี่ยงในการก่อให้เกิดมะเร็งและมีผลต่อการเกิดการกลายพันธุ์ได้สูง (Moller *et al*., 1982)

ประชาชนที่อยู่ในเขตกรุงเทพมหานครจึงมีโอกาสได้รับสารประกอบ PAHs ที่อยู่ในรูปของฝุ่นละออง ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งและมีผลต่อการก่อกลายพันธุ์ เนื่องจากสารประกอบ PAHs สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ทำให้การทำงานของยีนผิดปกติและพบว่าสารก่อกลายพันธุ์ส่วนมากมีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งด้วย (Sverdrup *et al*., 2002) เมื่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมปรากฏในดีเอ็นเอของเซลล์ร่างกาย การกลายพันธุ์จะถูกจำกัดอยู่กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ แต่ในกรณีที่การกลายพันธุ์ปรากฏในดีเอ็นเอของเซลล์สืบพันธุ์หรือสารตั้งต้นของเซลล์สืบพันธุ์อาจถ่ายทอดสู่ลูกหลาน โรคมะเร็งเกิดขึ้นเมื่อเซลล์เกิดการกลายพันธุ์และเกิดการแบ่งตัวที่ผิดปกติทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิดปกตินั้นเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ถ้าเป็นเซลล์ของอวัยวะใดก็จะทำให้เกิดก้อนเนื้องอกโตขึ้นบริเวณส่วนนั้นของร่างกาย เซลล์มะเร็งจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสามารถแพร่กระจายไปทางเส้นโลหิตและท่อน้ำเหลือง เมื่อไปเกาะติดที่อวัยวะใดก็จะเติบโตเป็นก้อนเนื้อร้าย (Jacob, 1996; Grariviat, 1999) สารเคมีหลายชนิดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) และสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนปกติและทำให้เซลล์นั้นกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

เนื่องจากสารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็งส่วนมากสามารถเปลี่ยนแปลงหรือทำปฏิกิริยากับเบส (base) ของดีเอ็นเอก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ดังนั้นสารก่อกลายพันธุ์บางชนิดจึงมีโอกาสที่จะเป็นสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้มีผู้คิดค้นวิธีตรวจสอบว่าสารใดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ วิธีที่ใช้กันมากคือวิธีการทดสอบเอมส์ (Ames' test) ซึ่งเป็นการทดสอบที่พัฒนาขึ้นโดย Dr. Bruce Ames เพื่อใช้คัดกรองหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารเคมี สารสกัดสมุนไพร โดยการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (Backward or reverse mutation)[1] ในแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคไทฟอยด์ในหนูถีบจักรที่มีชื่อเรียกว่า ซัลโมเนลลาธัยฟิมิวเรียม (*Salmonella typhimurium*) สายพันธุ์พิเศษที่ไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนซื่อ-ฮิสติดีน (histidine) ขึ้นมาใช้เองได้ เพราะเกิดการกลายพันธุ์ที่หน่วยพันธุกรรมในการสร้างกรดอะมิโน กลุ่มนักวิจัยนำโดยศาสตราจารย์ Dr. Bruce Ames จากมหาวิทยาลัยแห่งรัฐแคลิฟอร์เนียเมืองเบอร์คเลย์เป็นผู้พบเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์พิเศษที่สร้างกรดอะมิโนฮิสติดีนไม่ได้โดยบังเอิญและได้พัฒนาความเหมาะสมของสายพันธุ์ต่างๆขึ้นมาด้วยกรรมวิธีทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์หรือการตัดแต่งพันธุกรรมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นว่าสารเคมีใดบ้างมีศักยภาพในการก่อให้เกิดอันตรายต่อหน่วยพันธุกรรมซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์ในแบคทีเรียดังกล่าวให้กลายพันธุ์ซ้ำจน

[1] การกลายพันธุ์ย้อนกลับ (reverse mutation) การกลายพันธุ์อีกครั้งที่ทำให้ฟีโนไทป์ที่กลายพันธุ์ หรือสายพันธุ์กลายนั้นเปลี่ยนกลับคืนสู่สภาพไวด์ไทป์อีกครั้ง

สามารถสร้างกรดอะมิโนฮิสติดีนขึ้นใช้ได้เอง การทดสอบนี้ใช้เป็นกระบวนการเพื่อช่วยในการตัดสินใจว่าควรนำสารเคมีนั้นไปทดสอบในสัตว์ทดลองต่อไปหรือไม่

หลักการทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ที่สำคัญในการพัฒนาเชื้อซัลโมเนลลาธัยฟิมิวเรียมให้ไวต่อการกลายพันธุ์นั้น ได้แก่ การกำหนดให้ยีนสร้างผนังเซลล์ของเชื้อมีความบกพร่องจนแบคทีเรียสายพันธุ์พิเศษนี้ยอมให้สารเคมีเกือบทุกชนิดผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ง่ายกว่าแบคทีเรียทั่วไป ประการที่สำคัญคือเมื่อสารพิษก่อให้เกิดความเสียหายแก่หน่วยพันธุกรรมของเซลล์ เซลล์นั้นๆมักมีระบบซ่อมแซมความเสียหายจนกลับเป็นหน่วยพันธุกรรมปกติได้แต่ Dr. Bruce Ames ก็ได้ใช้วิธีการเติมหน่วยพันธุกรรมขนาดเล็กที่เรียกว่าพลาสมิด (plasmid) ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างโปรตีนที่ไปทำลายระบบซ่อมแซมหน่วยพันธุกรรมของเชื้อซัลโมเนลลาธัยฟิมิวเรียมที่เสียหายจึงทำให้เชื้อสายพันธุ์พิเศษนี้เกิดการกลายพันธุ์ง่ายขึ้นกว่าปกติซึ่งเป็นการเพิ่มความไวในการทดสอบ

ดังนั้นวิธีการทดสอบเอมส์จึงมีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในห้องปฏิบัติการของหน่วยงานรัฐบาลอเมริกาและของเอกชนตั้งแต่ต้นทศวรรษ 1980 การตรวจสอบโดยวิธีนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นที่เสียค่าใช้จ่ายน้อยและทำได้รวดเร็ว หากพบว่าสารใดมีฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ก็ควรจะทดสอบสารนั้นต่อไป โดยฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลองเพื่อตรวจสอบดูว่าสารนั้นก่อให้เกิดมะเร็งได้หรือไม่ โดยแบคทีเรียซัลโมเนลลาธัยฟิมิวเรียม ที่ถูกดัดแปลงให้ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนฮิสติดีนและไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีฮิสติดีน แต่การเติมสารที่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ลงไปจะทำให้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์และสังเคราะห์ฮิสติดีนได้เอง แบคทีเรียจึงสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีฮิสติดีนและเห็นเป็นโคโลนีเรียกว่า mutant colonies ทั้งนี้จำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ ในการทดสอบแบคทีเรียพบสารก่อกลายพันธุ์ประมาณร้อยละ 90 แสดงคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งด้วย (Maron and Ames, 1983) ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนโดยใช้วิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีการทดสอบเอมส์ด้วยเช่นกัน

1.2 การตรวจเอกสาร

คำจำกัดความ

“สารก่อกลายพันธุ์” (Mutagen) หมายถึง สารที่ทำให้เบสใดเบสหนึ่งในสายดีเอ็นเอผิดปกติไปจากเดิมเมื่อมีการนำสายดีเอ็นเอส่วนที่เบสถูกเปลี่ยนแปลงไปถ่ายทอด จะทำให้เกิดโปรตีนที่ผิดปกติไป (อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, 2534)

“การกลายพันธุ์” (Mutation) หมายถึง การที่ดีเอ็นเอผิดปกติไปจากเดิม ถูกนำไปถ่ายทอดรหัสที่ผิดปกติ ทำให้ได้สิ่งที่ผิดไปจากธรรมชาติ ดีเอ็นเอที่ผิดปกติจะมีเบสใดเบสหนึ่งในสายดีเอ็นเอถูกเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, 2534)

“มะเร็ง” คือ เซลล์ของร่างกายที่เจริญเติบโตและขยายจำนวนขึ้นมากในระยะเวลาอันสั้นโดยที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ เซลล์มะเร็งเมื่อเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆจะแทรกตัวเบียดเซลล์ปกติที่อยู่รอบข้าง ทำให้เนื้อเยื่อของอวัยวะนั้นๆเสียไปไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติได้ เซลล์มะเร็งยังขยายตัวเข้าสู่หลอดเลือดและน้ำเหลืองกระจายไปสู่อวัยวะต่างๆที่อยู่ใกล้และห่างจากตัวมันได้ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ปอด ตับ และกระดูก ซึ่งมีผลทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในระยะเวลาอันสั้น (อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, 2534)

1.2.1 ฝุ่นละอองในบรรยากาศ

ฝุ่นละอองในชั้นบรรยากาศเป็นอนุภาคที่มีทั้งของแข็งและของเหลวซึ่งแพร่กระจายอยู่ในอากาศ โดยทั่วไปมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 0.0002 ไมครอน (ขนาดใกล้เคียงกับโมเลกุลของสสาร) จนถึงขนาดใหญ่กว่า 500 ไมครอน ฝุ่นละอองขนาดใหญ่สามารถแขวนลอยอยู่ในชั้นบรรยากาศ 2-3 นาที จะตกสู่พื้นโดยแรงดึงดูดของโลกและแรงลม ฝุ่นละอองที่แขวนลอยอยู่ในอากาศได้นานมักเป็นฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) เนื่องจากมีความเร็วในการตกลงสู่พื้นต่ำ หากมีแรงกระทำจากภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น การไหลเวียนของอากาศ และกระแสลม เป็นต้น

ในฝุ่น PM_{10} มีองค์ประกอบธาตุหลายชนิด นอกจากนี้ยังมี PAHs ซึ่งเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป จัดเรียงเป็นเส้นตรง เป็นมุม หรือเป็นกลุ่ม (Blumer, 1976; Netto *et al*., 2000) สารประกอบ PAHs ส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ จุดเดือดระหว่าง 150 – 325 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวระหว่าง 101 – 438 องศาเซลเซียส PAHs เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ เช่น การเผาถ่านหินและไม้ (WHO, 2000) PAHs เป็นสารที่มีความคงทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลายาวนาน หรือที่เรียกว่า persistent organic pollutants (POPs) รวมถึงมีการสะสมอยู่ในห่วงโซ่อาหารซึ่งส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับ polychlorinated biphenyls (PCBs), pyrrolobenzodiazepines (PBDs), dioxin และยาฆ่าแมลง (pesticides) (Ravindra *et al*., 2001) และเป็นสารก่อมะเร็งและเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (Costantiono *et al*., 1995; Kalina *et al*., 1998; Oanh *et al*., 1999) ความสามารถในการละลายน้ำ การระเหยเป็นไอ ของ PAHs แต่ละชนิด ขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างทางเคมี (Mackay and Callcot, 1998) โดยความดันไอและความสามารถใน

การละลายน้ำจะลดลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่ PAHs มีความดันไอต่ำเมื่ออยู่ในอากาศ และ PAHs ที่มีวงแหวนเบนซีน 3 วง (acenaphthene, fluorine, phenanthrene และ anthracene) จะอยู่ในวัฏภาคก๊าซ (Mustafa *et al.,* 1999) และ PAHs ที่มีวงแหวนเบนซีน 4 วง หรือมากกว่านั้น (indeno[1,2-c,d]pyrene, benzo[g,h,i]perylene) จะอยู่ในวัฏภาคอนุภาค (Kim *et al*., 2002) และ PAHs ที่อยู่ในวัฏภาคอนุภาคเป็นสารก่อมะเร็งได้สูงกว่า PAHs ที่อยู่ในวัฏภาคก๊าซ (Greenberg *et al*., 1985; Nielsen *et al*., 1996; Kim Oanh *et al*., 2000)

สารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) พบในเขม่าควันไฟ (Kim *et al*., 2003; Olivella *et al*., 2006) ไอเสียเครื่องยนต์ (Zwirner-Baier and Neumann, 1999) น้ำมันดิบ (Bomboi *et al*., 1990) และยังพบได้จากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ เช่น น้ำมันเชื้อเพลิง การปิ้ง ย่างของอาหาร อาหารรมควัน ควันบุหรี่ (Kamiya *et al*., 2005; Zanieri *et al*., 2007) และเตาเผาเชื้อเพลิงในโรงงานอุตสาหกรรม (Qiao *et al*., 1999; Gocht *et al*; 2001) PAHs เป็นสารกลุ่มที่มีความเป็นพิษค่อนข้างสูง ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และโรคมะเร็งในสิ่งมีชีวิต (Grimmer, 1983; Pruell and Quinn, 1985; Varanasi *et al*., 1985) หากได้รับการสัมผัสที่ผิวหนังจะก่อให้เกิดมะเร็งที่ผิวหนัง ได้รับโดยการสูดดมเข้าไปจะก่อให้เกิดมะเร็งปอด (Okona-Mensah *et al*., 2005)

องค์การอนามัยโลก (World Health Organisation: WHO) ระบุว่า Benzo[a]pyrene (B[a]P) เป็น PAHs ที่มีความเสี่ยงก่อให้เกิดมะเร็งและมีผลในการก่อกลายพันธุ์สูง ไม่ควรมีค่าระดับความเข้มข้นเกินกว่า 1 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร หากเกินกว่านี้ถือเป็นระดับที่เสี่ยงอันตรายต่อการเป็นโรคมะเร็ง (Ames *et al*., 1975; Moller *et al*., 1982; WHO, 1987 และ 2000; USEPA, 2003) องค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (United States Environmental Protection Agency: USEPA) กำหนดให้ PAHs 16 ชนิด เป็นพิษอันตรายที่ควรให้ความสำคัญในอันดับต้นๆ ได้แก่ naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, chrysene, benzo[a]anthracene, pyrene, benzo[k]fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenzo[a,h]anthracene, benzo[g,h,i]perylene และ indeno[1,2,3-cd]pyrene (Grariviat, 1999) แสดงดังตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 สารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 16 ชนิดที่เป็นสารพิษอันตรายต้องรีบกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อม

ชนิดของ PAHs	จำนวนวงเบนซีน	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล
Naphthalene	2	$C_{10}H_8$	128
Acenaphthylene	3	$C_{12}H_8$	152
Acenaphthene	3	$C_{12}H_{10}$	154
Fluorene	3	$C_{13}H_{10}$	166
Anthracene	3	$C_{14}H_{10}$	178
Phenanthrene	3	$C_{14}H_{10}$	178
Fluoranthene	4	$C_{16}H_{10}$	202
Pyrene	4	$C_{16}H_{10}$	202
Benzo[a]anthracene	4	$C_{18}H_{12}$	228
Chrysene	4	$C_{18}H_{12}$	228
Benzo[b]fluoranthene,	5	$C_{20}H_{12}$	252
Benzo[k]fluoranthene	5	$C_{20}H_{12}$	252
Benzo[a]pyrene	5	$C_{20}H_{12}$	252
Dibenzo[a,h]anthracene	5	$C_{22}H_{14}$	278
Benzo[g,h,i]perylene	6	$C_{22}H_{12}$	276
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	6	$C_{22}H_{12}$	276

(ที่มา: Witting *et al*., 2003; Eom *et al*., 2007; Harvey *et al*., 2002)

PAHs ในสิ่งแวดล้อมมีแหล่งกำเนิดมาจากหลายแหล่งและมีหลายร้อยชนิดซึ่ง International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้แบ่งกลุ่มตามความสามารถในการก่อมะเร็งต่อคนและสัตว์แสดงดังตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1-2 การแบ่งกลุ่มแหล่งกำเนิดตามความสามารถในการก่อมะเร็งโดย IARC

แหล่งกำเนิด	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2A	กลุ่ม 2B	กลุ่ม 3
ฝุ่นจากการผลิตถ่านหิน				X
น้ำมันจากถ่านหิน	X			
ยาฆ่าเชื้อและกันผุ		X		
น้ำมันดิบ				X
น้ำมันเบนซิน			X	
เชื้อเพลิงเครื่องบิน				X
ตัวทำละลายน้ำมันปิโตรเลียม				X
น้ำมันปิโตรเลียมจากแผ่นหิน	X			
เขม่าดำ,เขม่าถ่านหิน	X			
ไอเสียจากเครื่องยนต์ดีเซล		X		
ไอเสียจากเครื่องยนต์เบนซีน			X	
ควันจากการสูบบุหรี่	X			

(ที่มา: IARC 1984a, 1984b, 1985)

หมายเหตุ: กลุ่ม 1 คือ กลุ่มที่สามารถก่อมะเร็งต่อมนุษย์
กลุ่ม 2A คือ กลุ่มที่มีโอกาสเป็นไปได้มากที่จะก่อมะเร็งแก่มนุษย์
กลุ่ม 2B คือ กลุ่มที่น่าจะก่อมะเร็งต่อคน
กลุ่ม 3 คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มได้

PAHs ในวัฏภาคอนุภาคสามารถคงอยู่ในชั้นบรรยากาศได้นานกว่า PAHs ในวัฏภาคก๊าซ (Hoffman *et al*., 1987; Lee *et al*., 1976) จึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะต้องระวังความเข้มข้นของสาร PAHs ใน PM_{10} โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการสะสมของอนุภาคแขวงลอยสูง เช่น ตัวเมืองใหญ่ที่มีการจราจรคับคั่ง โรงงานอุตสาหกรรม และพื้นที่ที่มีภูมิประเทศเป็นแอ่งกระทะซึ่งทำให้การถ่ายเทของมวลอากาศเป็นไปได้ยาก (Siwatt pongpiachan, 2006) ดังนั้น PAHs จึงสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายและรวดเร็วในทุกทาง ซึ่ง PAHs ในอากาศจะรวมกับอนุภาคแขวนลอยที่มีขนาดเล็กกว่า 5 ไมโครเมตร ผ่านเข้าปอด เข้าสู่เนื้อเยื่อจนถึงชั้นไขมัน และสะสมอยู่ในตับ ไต และไขมันเป็นส่วนมาก (Grariviat, 1999; ATSDR, 1995) เนื่องจาก PAHs เป็นสารพวกไม่มีขั้ว (nonpolar) จึงละลายได้ดีในไขมันจึงสะสมในชั้นไขมันของร่างกายได้นานและ PAHs ยังสะสมได้ในชั้นเมมเบรนของเซลล์ซึ่งเป็นฟอสโฟไลบิค (phospholipids) (USEPA, 1987; Jacob, 1996) และมีบางชนิดที่

สะสมอยู่ในร่างกายได้ไม่นาน เนื่องจากถูกขับถ่ายออกมาทางปัสสาวะและอุจจาระ เช่น dibenzo[a,h] anthracene (Buening *et al*., 1979; Platt *et al*., 1990) มนุษย์ได้รับ PAHs ที่แพร่ประจายอยู่ในสภาพแวดล้อมสามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง (Schwartz, 1994)

- ผลกระทบต่อสุขภาพแบบเฉียบพลัน

ผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์จะขึ้นอยู่กับ ขอบเขตของการได้รับสัมผัส เช่น ระยะเวลาในการได้รับสัมผัส ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่รับเข้าไป ความเป็นพิษของ PAHs แต่ละชนิดและ ทางที่รับสาร เช่น การหายใจ การกิน หรือทางผิวหนัง และยังมีปัจจัยอื่นอีก เช่น เงื่อนไขทางด้านสุขภาพของแต่ละคนและอายุ เป็นต้น (LaRocca *et al*., 1996; Hoffman *et al*.,1984)

- ผลกระทบต่อสุขภาพแบบเรื้อรัง

เมื่อได้รับสาร PAHs เข้าไปเป็นระยะเวลานาน เช่น เมื่อได้รับการสัมผัสทางผิวหนังอาจจะเป็นมะเร็งที่ผิวหนัง ได้รับทางการสูดดมอาจจะเป็นมะเร็งปอดและระบบทางเดินหายใจ ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ และระบบประสาท และเมื่อรับประทานอาหารที่มี PAHs เจือปนเข้าไปอาจจะเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร (USEPA, 1987) และผลกระทบที่มีต่อสุขภาพของเด็ก ไม่ต่างจากผู้ใหญ่ แต่โอกาสที่จะได้รับอาจจะน้อยกว่าผู้ใหญ่ เพราะกิจกรรมที่ทำมีโอกาสได้รับสาร PAHs น้อย เช่น การคลานสัมผัสกับฝุ่น การกิน การเอามือเข้าปากและการดูดนิ้ว เป็นต้น (LaRocca *et al*., 1996; Hoffman *et al*.,1984)

1.2.2 ชนิดและขนาดของฝุ่นละออง

ฝุ่นละอองในอากาศมีความหลากหลายทางด้านกายภาพและองค์ประกอบ อาจมีสภาพเป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ ฝุ่นละอองในอากาศมีขนาดตั้งแต่ 0.002 - 100 ไมครอน (μm) ซึ่งฝุ่นละอองในอากาศสามารถแบ่งขนาดอนุภาคออกได้หลายขนาด (Whitby and Sverdrup, 1980) โดยทั่วไปจะแบ่งขนาดอนุภาคออกเป็น 3 ขนาด ได้แก่

1. ฝุ่นรวม (Total Suspended Particulate, TSP) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 100 ไมครอนสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าซึ่งมีแหล่งกำเนิดทางธรรมชาติ ส่วนใหญ่เกิดจากการฟุ้งกระจายของดิน ทรายที่พื้นผิวถนน และสถานที่ก่อสร้าง (Brook *et al*., 2004; USEPA, 1987)

2. ฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (Particulate Matter; PM_{10}) เป็นมลพิษทางอากาศที่มีความสำคัญ เช่น ฝุ่น ควัน เขม่า ประกอบด้วยสารหลายชนิดผสมกัน และมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน (Brook *et al*., 2004; Willeke and Baron, 1993)

3. ฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 2.5 ไมครอน (Particulate Matter; $PM_{2.5}$) มีแหล่งกำเนิดจากควันเสียของรถยนต์ โรงไฟฟ้า โรงงานอุตสาหกรรม ควันที่เกิดจากการหุงต้มอาหารโดยใช้ฟืน เป็นฝุ่นละอองที่มีระยะเวลาอยู่ในอากาศยาวนาน และสามารถเคลื่อนที่ไปได้ไกล (100 - 1000 กิโลเมตร) (Brook *et al*., 2004; USEPA, 1999)

ฝุ่นละอองจะมีเวลาในการตกช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับน้ำหนักของอนุภาค คือ ฝุ่นขนาดเล็กจะตกได้ช้ากว่าขนาดใหญ่และยิ่งเล็กมากจะคงอยู่ในอากาศได้นาน (อุรบล โชติพงศ์, 2541; นพภาพร พานิช, 2551) เนื่องจากมีความเร็วในการตกสู่พื้นดินต่ำ หากมีแรงกระทำจากภายนอกเข้ามามีส่วนเกี่ยวข้อง เช่น การไหลเวียนของอากาศ กระแสลมเป็นต้น จะทำให้แขวนลอยอยู่ในอากาศได้นานขึ้น (USEPA, 1987) และฝุ่น PM_{10} ส่งผลกระทบทั้งต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของผู้ที่ได้รับ คือ สามารถเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจและถุงลมได้ มีผลทำให้เกิดการระคายเคือง แสบจมูก ไอ จาม มีเสมหะ เยื่อหุ้มปอดถูกทำลายอาจเนื่องมาจากมีการสะสมของฝุ่นละอองในถุงลมปอด ทำให้การทำงานของปอดเสื่อมลง เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ ระบบหลอดเลือดหัวใจ และมะเร็ง (Brook *et al.,* 2004; Jinsart *et al*., 2002) และจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าฝุ่นละอองที่มีสัดส่วนมากเป็นพวกฝุ่นละอองที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนประมาณ 60 -80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพต่อคน สัตว์ และพืช ได้มากกว่าฝุ่นละอองขนาดอื่น (Wilson and Spengler, 1996)

1.2.3 การเกิดฝุ่นละอองในบรรยากาศ

สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. จากธรรมชาติ เช่น ไฟไหม้ป่า (Page *et al* ,1999; Yunker *et al*., 2002) การระเบิดของภูเขาไฟ (Biørset and Ramdahl, 1985; Simoneit, 1999)

2. กิจกรรมต่างๆของมนุษย์ เช่น กระบวนการในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ (Nadal *et al*., 2004) การคมนาคมจากการใช้ยานพาหนะ เป็นต้น (Broddin *et al*., 1980; Silva, 2005)

จากการศึกษาอัตราการเกิดของฝุ่นละอองในชั้นบรรยากาศที่เกิดจากธรรมชาติและมนุษย์ ซึ่งฟุ้งกระจายในบรรยากาศชั้นโทรโพสเฟียร์ (troposphere) เป็นชั้นบรรยากาศที่อยู่สูงจากพื้นดินขึ้นไปประมาณ 20 กิโลเมตร พบว่าการปลดปล่อยฝุ่นละอองจากโลกขึ้นสู่บรรยากาศ (aerosol emission) มีค่าประมาณ 2,400 Tg/ปี (Tg = หน่วยของมวลค่าเท่ากับ 10^{12}กรัม) ในจำนวนนี้ประมาณครึ่งหนึ่งหรือประมาณ 1,000 Tg/ปี มีแหล่งกำเนิดมาจากทะเล และประมาณ 500 Tg/ปี มี

แหล่งกำเนิดมาจากเปลือกโลก กระบวนการตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุภาคของซัลเฟต (sulphate particles) ทำให้เกิดฝุ่นละอองในบรรยากาศประมาณ 240 Tg/ปี ฝุ่นละอองที่เป็นอนุภาคซัลเฟตที่เกิดจากกิจกรรมมนุษย์ มีค่าประมาณ 220 Tg/ปี นอกจากนี้การปลดปล่อยฝุ่นละอองจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น จากยานพาหนะและกระบวนการในอุตสาหกรรมมีค่าประมาณ 130 Tg/ปี ซึ่งถือว่าน้อยเมื่อเทียบกับฝุ่นละอองที่มีอยู่ในบรรยากาศชั้นโทรโพสเฟียร์ (Warnock, 1988)

1.2.4 ประเภทของฝุ่นละออง

ฝุ่นละอองในบรรยากาศสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ตามแหล่งกำเนิดของฝุ่นละอองคือ ฝุ่นละอองที่เกิดขึ้นและแพร่กระจายสู่บรรยากาศโดยตรง และฝุ่นละอองที่เกิดขึ้นภายหลังโดยปฏิกิริยาต่างๆ ในบรรยากาศ เช่น การรวมตัวของฝุ่นละอองด้วยกันหรือรวมตัวกับก๊าซหรือรวมตัวกับของเหลวหรือรวมตัวกับของแข็ง ด้วยปฏิกิริยาทางฟิสิกส์หรือทางเคมี (Jinsart *et al.,* 2002; กมลนารี ลายคราม, 2546) และผลกระทบที่เกิดจากฝุ่นละออง ได้แก่

1. สิ่งก่อสร้างต่างๆ เช่น การสึกกร่อนของโลหะ การทำลายผิวหน้าของสิ่งก่อสร้าง การเสื่อมสภาพของผลงานทางศิลปะ ความสกปรกของวัตถุ (De Nevers, 2000)

2. สุขภาพของมนุษย์ ฝุ่นละอองขนาดใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร จะถูกกรองออกโดยระบบทางเดินหายใจ คือ จมูกและบริเวณโพรงจมูก ด้วยการไอ หรือ จาม ส่วนฝุ่นละอองที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมโครเมตร สามารถเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจของมนุษย์ได้ และเมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ จะเกาะตัวหรือตกสู่ส่วนต่างๆ ของระบบทางเดินหายใจ และสามารถเข้าไปถึงถุงลมปอดได้ (Mcclellan, 2000) ฝุ่นละอองขนาดเล็กเหล่านี้ จะก่อให้เกิดการระคายเคือง มีผลต่ออาการและโรคทางเดินหายใจ และทำลายเนื้อเยื่อของอวัยวะนั้นๆ เช่น เนื้อเยื่อปอด ซึ่งหากได้รับในปริมาณมากหรือในช่วงเวลานาน จะสะสมในเนื้อเยื่อปอด เกิดเป็นพังผืดหรือแผลขึ้นได้ทำให้การทำงานของปอดเสื่อมประสิทธิภาพลง ทำให้หลอดลมอักเสบ เกิดหอบหืด ถุงลมโป่งพอง และถ้าองค์ประกอบในฝุ่นเป็นพวกโลหะหนัก สารก่อมะเร็ง เช่น สาร PAHs อาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งปอด (กมลนารี ลายคราม, 2546; Colls, 2002)

การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับผลกระทบของฝุ่นละอองต่อสุขภาพ เช่น จากการศึกษาผลของฝุ่นละอองขนาดเล็กต่ออาการ โรคของระบบทางเดินหายใจของเด็กนักเรียนในเขตเมืองกรุงเทพมหานคร จากข้อมูลแบบสอบถามและการตรวจวัดปอดในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนสิงหาคม 2547 พบว่า เด็กนักเรียนที่อาศัยอยู่ในเขตที่มีมลพิษสูงและปานกลางมีการเกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจมากกว่าเด็กนักเรียนที่อาศัยอยู่ในเขตที่มีมลพิษต่ำ (Langkulsen *et al*., 2006) และมีการยืนยันว่าอากาศเป็นพิษบริเวณชุมชนขนาดใหญ่มีความสัมพันธ์ต่อโรคระบบทางเดิน

หายใจและระบบหลอดเลือดหัวใจ (Wheeler *et al*., 2006) และจากการศึกษาผลกระทบของฝุ่นละอองจากอาชีพตำรวจจราจรในเมือง Tianjin ประเทศจีนที่ทำงานบริเวณที่มีการจราจรคับคั่ง พบว่าตำรวจจราจรเป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ และโรคมะเร็งปอดเพิ่มมากขึ้น (Bai *et al*., 2007)

1.2.5 มาตรฐานฝุ่นละอองในบรรยากาศโดยทั่วไปของประเทศไทย

การตรวจวัดฝุ่นละอองในบรรยากาศ ตามมาตรฐานคุณภาพอากาศจำเป็นต้องทำความเข้าใจในค่ามาตรฐานฝุ่นละอองในบรรยากาศโดยทั่วไป ณ ช่วงเวลาหนึ่งเวลาใด และวิธีการตรวจวัด เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการตรวจวัด และวิเคราะห์ผลการตรวจวัด

ในประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2538) เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพอากาศในบรรยากาศโดยทั่วไป ได้กำหนดค่าเฉลี่ยของฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน ในเวลา 24 ชั่วโมงจะต้องไม่เกิน 120 ไมโครกรัมกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ($\mu g\ m^{-3}$) และค่าเฉลี่ยของฝุ่นละอองรวมหรือฝุ่นละอองขนาดไม่เกิน 100 ไมครอน ในเวลา 24 ชั่วโมงจะต้องไม่เกิน 330 ไมโครกรัมกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ($\mu g\ m^{-3}$) และ USEPA กำหนดมาตรฐานคุณภาพอากาศของฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน ในเวลา 24 ชั่วโมงจะต้องไม่เกิน 150 ไมโครกรัมกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ($\mu g\ m^{-3}$) และได้กำหนดค่าเฉลี่ยของฝุ่น $PM_{2.5}$ ในเวลา 24 ชั่วโมง ต้องไม่เกิน 35 ไมโครกรัมกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ($\mu g\ m^{-3}$)

1.3 ลักษณะทางอุตุนิยมวิทยาที่มีต่อภาวะมลพิษทางอากาศ

ภาวะมลพิษทางอากาศจะรุนแรงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ถูกปลดปล่อยสู่บรรยากาศ และยังขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของสภาพบรรยากาศ ในลักษณะที่เรียกว่าอุตุนิยมวิทยา อาทิเช่น ความเร็วลม การทรงตัวของบรรยากาศ อุณหภูมิ และความชื้นในบรรยากาศ เป็นต้น

1.3.1 อุณหภูมิ (temperature) คือ เครื่องชี้วัดความร้อนและความสามารถในการเคลื่อนย้ายความร้อนด้วยกระบวนการไหลผ่าน (conduction) ตัวกลางที่เป็นวัตถุ เช่น น้ำมัน ดิน อากาศ ฯลฯ อุณหภูมิของอากาศนั้นมีอิทธิพลจากส่วนที่เป็นความร้อนที่ใช้ในการผลาญอากาศ (sensible heat; H) และเป็นความร้อนที่เหลือจากถูกใช้ในส่วนต่างๆแล้ว กระบวนการที่ทำให้เกิด Sensible heat เกิดจากการร่วมกันของกระบวนการ คือ ขั้นแรกที่ใช้ผิวดินด้วยกระบวนการไหลผ่าน (conduction) มีส่วนอย่างมาก ส่วนที่สูงขึ้นไปนั้นกระบวนการนำพา (convection) จะมีบทบาทต่อไป ซึ่งเป็นการยากที่จะกำหนดว่าความสูงเท่าใดที่กระบวนการ Conduction จะมีอิทธิพลมาก

ดังนั้นการวัดอุณหภูมิของอากาศจึงนิยมวัดที่ความสูงจากผิวดินประมาณ 1 - 2 เมตรเพราะจะได้ผลของอุณหภูมิเป็น Sensible heat

อุณหภูมิอากาศเกิดขึ้นจากการปลดปล่อยพลังงานความร้อนของพื้นผิวดินให้กับบรรยากาศ พลังงานความร้อนดังกล่าวนี้เป็นพลังงานที่เปลี่ยนรูปจากพลังงานรังสีดวงอาทิตย์ เป็นพลังงานความร้อน โดยมีหน่วยที่ใช้ในปัจจุบันอยู่ 3 ระบบ คือ หน่วยเซนติเกรด (centigrade) หรือหน่วย Celcious; ^{0}C หน่วยฟาเรนไฮต์ (fahrenheit) หรือหน่วย ^{0}F และหน่วยเคลวิล (kelvin) หรือหน่วย K

1.3.2 กระบวนการเคลื่อนที่ของอากาศหมายถึง ลม ซึ่งเกิดจากการแทนที่ของอากาศที่มีความหนาแน่นมากสู่ความหนาแน่นน้อยกว่า กระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ได้เกิดในพื้นผิวโลกที่ได้รับความร้อนจากพลังงานแสงอาทิตย์ จะใช้ความร้อนเพื่อการระเหยน้ำ ทำให้อากาศมีความหนาแน่นน้อยลงแล้ว ลอยตัวสูงขึ้น อากาศบริเวณใกล้เคียงจะเคลื่อนที่เข้ามาแทนที่

ลม (wind) ถือว่าเป็นของไหลที่จะมีปริมาตรเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะของภาชนะ (incompressible fluid) ซึ่งสามารถจะอัดหรือขยายตามภาชนะ ลักษณะการไหลของลมสามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ ลักษณะการไหลแบบเฉื่อย (laminar flow) และลักษณะการไหลแบบปั่นป่วน (turbulent flow) ลักษณะการไหลจะขึ้นอยู่กับค่าความหนืด ความหนาแน่น อุณหภูมิ และระยะทางที่อาจจะมีผลต่อการแปรสภาพลักษณะการไหล ซึ่งลมเป็นตัวแปรหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายของสารมลพิษทางอากาศ โดยลมเป็นตัวพัดพา และเจือจางสารมลพิษเมื่อออกจากแหล่งกำเนิดไม่ว่าจะเป็นแหล่งกำเนิดอยู่ที่พื้นหรือสูงจากพื้นก็ตาม

1.3.3 ทิศทางลม (wind direction) เมื่อสารมลพิษถูกปลดปล่อยออกจากแหล่งกำเนิด ทิศทางลมจะมีอิทธิพลต่อทิศทางการเคลื่อนที่ของสารมลพิษและบริเวณที่สารมลพิษกระจายออกไปซึ่งทิศทางลมเป็นตัวกำหนดว่าสารมลพิษถูกพัดไปทางไหน เนื่องจากลมมักไม่ได้พัดไปในทิศทางเดียวกันตลอดเวลาและมักไม่คงที่ทั้งในช่วงเวลาสั้นๆหรือเป็นเวลานานซึ่งค่าเฉลี่ยของทิศทางลมมีความสำคัญในการพิจารณาบริเวณที่สามารถได้รับสารมลพิษจากแหล่งกำเนิดเนื่องจากเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของ Plume หากลมถูกพัดไปยังผู้รับโดยตรงจะทำให้ความเข้มข้นของสารมลพิษที่ผู้รับลดลงเหลือประมาณร้อยละ 10 ภายใต้สภาพอากาศที่ไม่คงตัว (unstable condition) ร้อยละ 50 ภายใต้สภาพอากาศที่เป็นกลาง (neutral condition) และร้อยละ 90 ภายใต้สภาพอากาศที่คงตัว (stable condition) (Boubel *et al*., 1994)

1.3.4 ความเร็วลม (wind speed) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการประเมินการกระจายตัวของสารมลพิษที่ถูกปลดปล่อยจากแหล่งกำเนิดเช่นเดียวกับทิศทางลม เนื่องจากสารมลพิษจะถูกเจือจางโดยความเร็วลมที่พัดผ่านแหล่งกำเนิดและยังมีผลต่อเวลา ระยะเวลาในการ

เคลื่อนที่ของ Plume จากแหล่งกำเนิดไปยังผู้รับ ซึ่งการเจือจางของสารมลพิษเกิดขึ้นในทิศทางเดียวกับที่ Plume เคลื่อนที่ ผลของความเร็วลมในการเจือจางสารมลพิษจากแหล่งกำเนิด สำหรับสารมลพิษที่มีอัตราการปลดปล่อย 6 หน่วยต่อวินาที เห็นได้ว่าที่ความเร็วลม 6 เมตรต่อวินาทีสารมลพิษ 1 หน่วยจะอยู่ระหว่างช่องในแนวตั้งซึ่งขนานกับระนาบ 1 เมตร แต่เมื่อความเร็วลมลดลงเหลือ 2 เมตรต่อวินาทีจะมีสารมลพิษอยู่ 3 หน่วยระหว่างช่องในแนวตั้งซึ่งขนานกับระนาบ 1 เมตร ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าที่ความเร็วสูงความเข้มข้นของสารมลพิษมีค่าต่ำ เนื่องจากมีการกระจายและการเจือจางเกิดขึ้น ส่วนที่ความเร็วลมต่ำจะมีการสะสมตัวของสารมลพิษทำให้ความเข้มข้นของสารมลพิษมีค่าสูง ซึ่งความเข้มข้นของสารมลพิษนั้นแปรผกผันกับความเร็วลม (Harrop, 2002)

1.4 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม ที่ก่อให้เกิดลักษณะใหม่ซึ่งต่างไปจากลักษณะเดิมที่มีอยู่และลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้สิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม (Hartman *et al*., 1984)

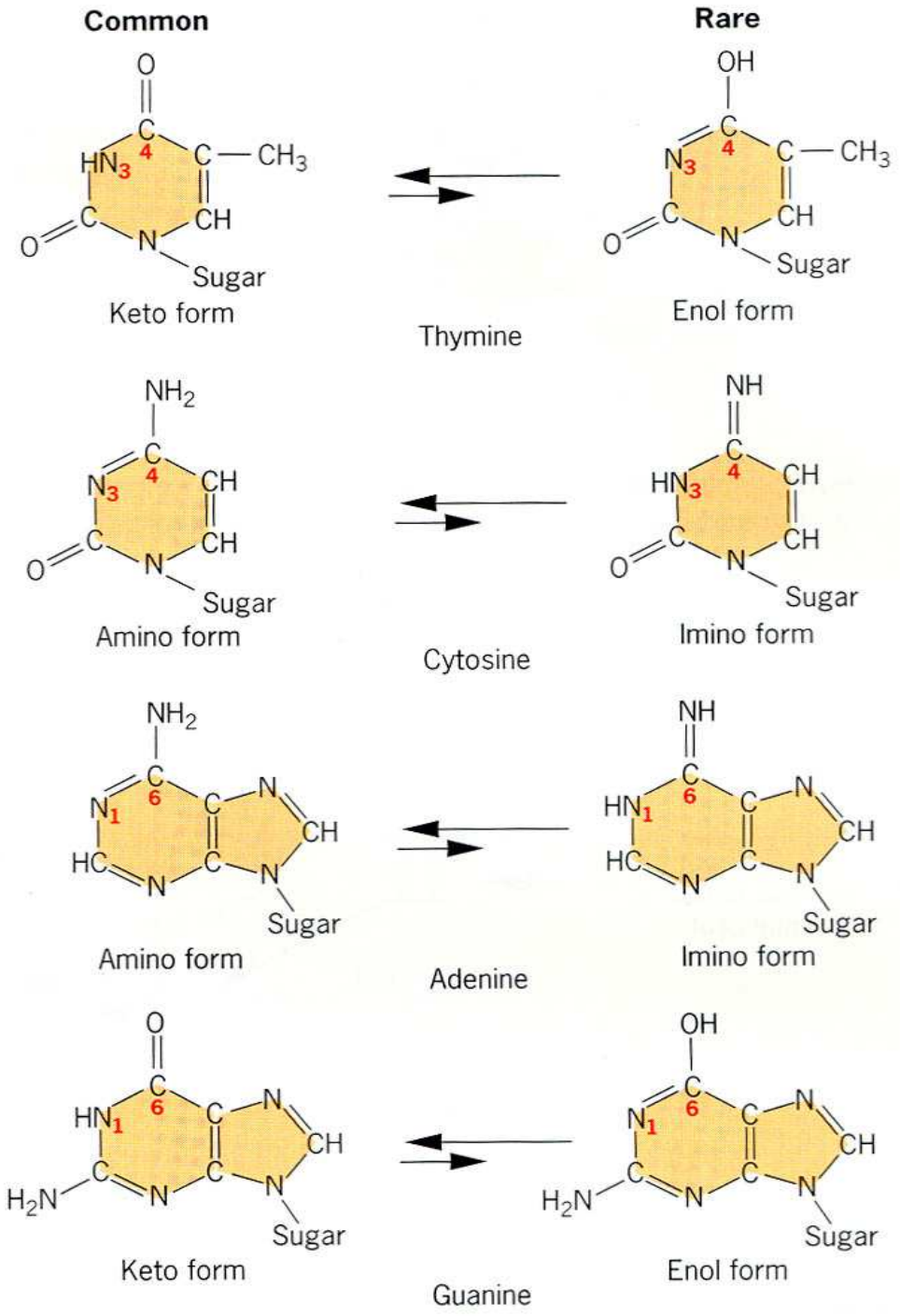
การกลายพันธุ์แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด

1. การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (Spontaneous mutation**)** หรือเกิดจากสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต โดยที่มนุษย์ไม่ได้ใช้สารเคมีหรือรังสีเหนี่ยวนำให้เกิดเกิดจากหลายสาเหตุดังนี้

1.1. กลไกการจำลองดีเอ็นเอ (DNA Replication Machinery) การกลายพันธุ์อาจเกิดจากการจำลองดีเอ็นเอผิดพลาด

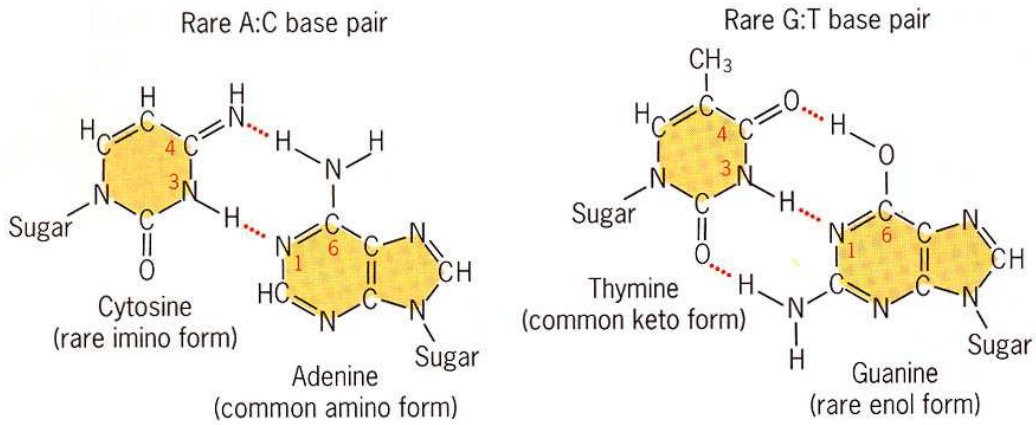
1.2. การแทนที่เบส (Basepair Substitution) เกิดจากทัวโทเมอริกชิฟต์ (tautomeric-shift) คือการเคลื่อนย้ายไฮโดรเจนอะตอมระหว่างตำแหน่งที่ 3 และ 4 ในเบสไพริมิดีนหรือไฮโดรเจนอะตอมระหว่างตำแหน่งที่ 1 และ 6 ในเบสพิวรีน ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเบสเปลี่ยนจากรูปคีโต (keto form) ไปเป็นรูปอีนอล (enol form) หรือจากรูปอะมิโน (amino form) ไปเป็นรูปอิมิโน (imino form)

ปฏิกิริยาทัวโทเมอริกชิฟต์ (tautomeric shift) คือการเคลื่อนย้ายไฮโดรเจนอะตอมระหว่างตำแหน่งที่ 3 และ 4 ในเบสไพริมิดีน หรือไฮโดรเจนอะตอมระหว่างตำแหน่งที่ 1 และ 6 ในเบสพิวรีน ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเบสเปลี่ยนจากรูปคีโต (keto form) ไปเป็นรูปอีนอล (enol form) หรือจากรูปอะมิโน (amino form) ไปเป็นรูปอิมิโน (imino form) แสดงดังรูปที่ 1-4



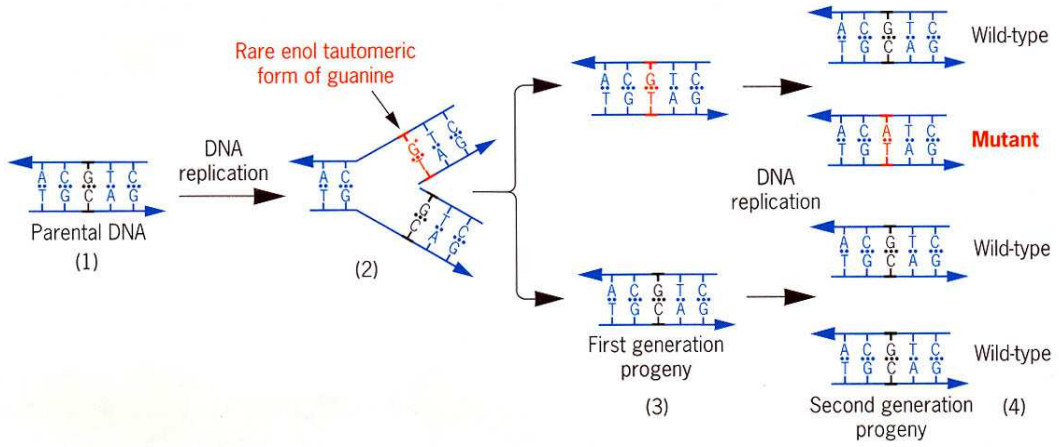
รูปที่ 1-4 แสดงปฏิกิริยาทัวโทเมอริกชิฟต์ในโมเลกุลของเบสในดีเอ็นเอ
(ที่มา: Hartman *et al*., 1984)

การเกิดทัวโทเมอริกชิฟต์จะทำให้การจับคู่ของเบสผิดปกติ (mismatched base pair) อธิบายสรุปดังรูปที่ 1-5



รูปที่ 1-5 แสดงการจับคู่เบสของดีเอ็นเอหลังจากเกิดทัวโทเมอริกชิฟต์
(ที่มา: Hartman *et al*., 1984)

ขณะที่มีการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอและเกิดทัวโทเมอริกชิฟต์ขึ้น เช่น เมื่อกัวนีนเกิดทัวโทเมอริกชิฟต์ แทนที่กัวนีนจะจับกับไซโตซีนเหมือนเดิมก็จะเปลี่ยนไปจับกับไทมีน แต่กัวนีนที่เปลี่ยนแปลงนี้ไม่เสถียร จะเปลี่ยนกลับคืนสู่สภาพเดิมได้อีก ดังนั้น เมื่อเกิดการจำลองดีเอ็นเอครั้งต่อไป กัวนีนจะจับคู่กับไซโตซีน ส่วนไทมีนก็จะจับคู่กับอะดีนีนตามปกติอีกครั้ง การจำลองตัวของดีเอ็นเอครั้งที่สองนี้ ทำให้ได้ดีเอ็นเอ 2 โมเลกุลต่างกัน คือ โมเลกุลหนึ่งเหมือนเดิม (ไวลด์ไทป์) ส่วนอีกโมเลกุลมีคู่เบสเปลี่ยนไป (กลายพันธุ์) แบบทรานสิชัน คือ GC เปลี่ยนเป็น AT แสดงดังรูปที่ 1-6



รูปที่ 1-6 แสดงการกลายพันธุ์ในขณะที่เกิดทัวโทเมอริกชิฟต์ของกัวนีน
(ที่มา: Hartman *et al*., 1984)

1.3 การกลายพันธุ์โดยการเคลื่อนของรหัสพันธุกรรม (frameshift Mutation) คือ การกลายพันธุ์โดยการเพิ่มหรือสูญหายของนิวคลีโอไทด์ 1 คู่เบสหรือมากกว่านั้น ทำให้การอ่านรหัสพันธุกรรม 3 เบสใน mRNA เปลี่ยนไปมีผลให้กรดอะมิโนผิดไปจากเดิมจึงอาจได้โปรตีนที่สั้นหรือยาวกว่าเดิมซึ่งไม่สามารถทำหน้าที่ได้ปกติ การกลายพันธุ์ของยีนอาจเป็นผลจากสารก่อมะเร็งซึ่งได้รับจากภายนอกหรือเป็นผลจากกระบวนการทางชีวเคมีในร่างกาย

ลักษณะการกลายพันธุ์แบบ Frameshift mutation ประกอบด้วยกระบวนการต่อไปนี้

1. <u>กรณีเบสหลุดหายไป</u>

ปกติ GTA – GTA – GTA – GTA - GTA

↓

(เบส T หลุดหายไป)

มิวเตชั่น GTA – GAG –TAG –TAG - TA

2. <u>กรณีเบสเพิ่มเข้ามา</u>

ปกติ GTA – GTA – GTA – GTA - GTA

↑

(เบส T เพิ่มเข้ามา)

มิวเตชั่น GTA – GTT – AGT – AGT – AGT – A

การเกิดลักษณะการกลายพันธุ์แบบการเคลื่อนของรหัสพันธุกรรม (frameshift mutation) ทั้ง 2 กรณีจะทำให้ได้โปรตีนที่ต่างไปจากเดิม โปรตีนนั้นไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิมหรือทำงานไม่ได้เลย ซึ่งการเกิดการกลายพันธุ์แบบนี้จะมีความรุนแรงมากกว่าการเกิดการกลายพันธุ์แบบการแทนที่คู่เบส (Base-pair substitution mutation)

2. การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (Induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากมนุษย์ใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ชักนำให้การกลายพันธุ์มีดังนี้

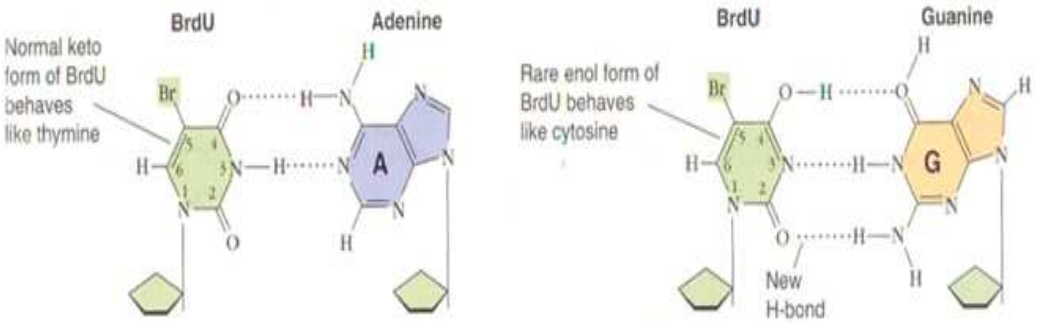
1. สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ รังสีต่างๆ รังสีสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1.1 รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้สูง ซึ่งมักจะทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมรังสีเหล่านี้ได้แก่ รังสีแอลฟา เบตา แกมมา นิวตรอนซ์ หรือรังสีเอ็กซ์

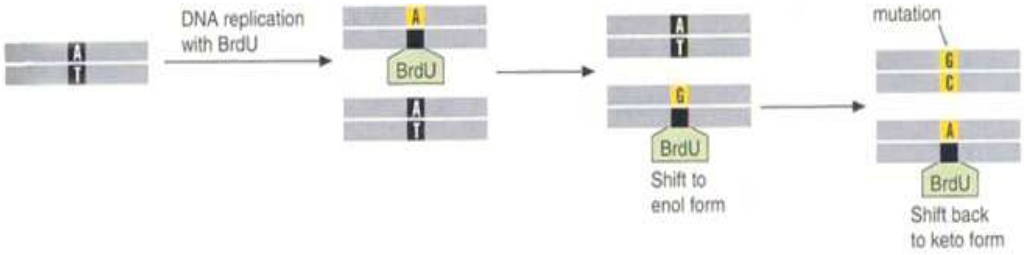
1.2 รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้ต่ำมักจะทำ ให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) หรือไซโทซีนไดเมอร์ (cytosine dymer) รังสีประเภทนี้ได้แก่รังสีอัลตราไวโอเลต (UV)

2. สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen) ได้แก่สารเคมีต่างๆซึ่งมีหลายชนิด เช่น สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสชนิดต่างๆ ของดีเอ็นเอ (base analogues) ซึ่งสามารถเข้าแทนที่เบสเหล่านั้นได้ระหว่างที่เกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสและรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปสารเคมีเหล่านี้ ได้แก่ 5-โบรโมยูราซิล (5-bromodeoxyuridine, 5-Brdu) 2-อะมิโนพิวรีน (2-aminopurine, 2-AP) แสดงดังรูปที่ 1-7 และ 1-8

(a) Base pairing of normal and rare forms of BrdU

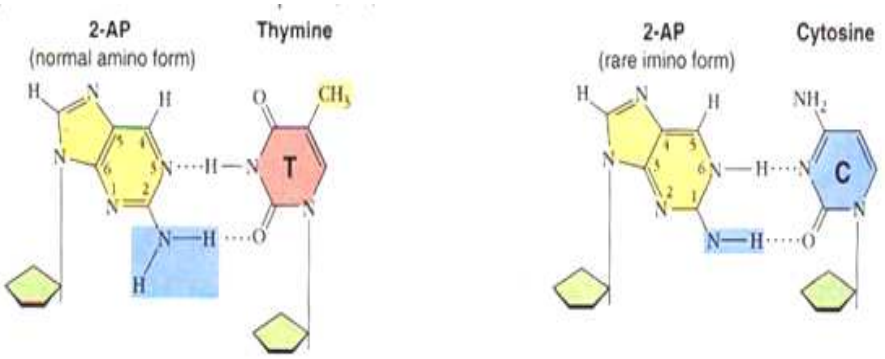


(b) A:T to G:C transition mutation

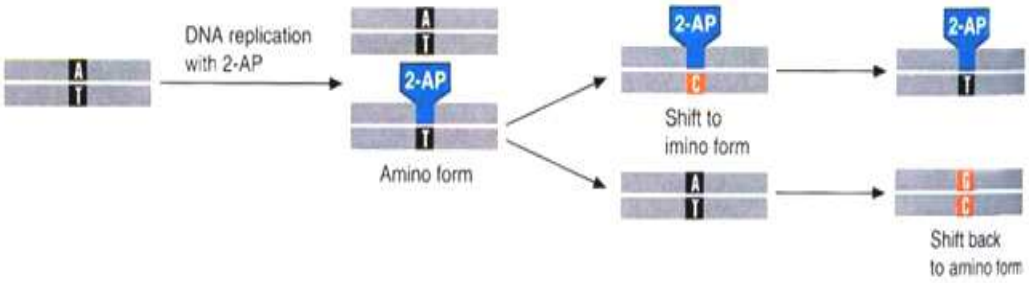


รูปที่ 1-7 แสดง 5-โบรโมยูราซิล (5-bromodeoxyuridine, 5-Brdu) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (ที่มา: Atherly *et al*., 1999)

(a) Base pairing of normal and rare atate of 2-aminopurine (2AP)



(b) A:T to G:C transition mutation



รูปที่ 1-8 แสดง 2-อะมิโนพิวรีน (2-Aminopurine, 2-AP) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์
(ที่มา: Atherly *et al*., 1999)

สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของเบส ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสเช่นเดียวกัน ทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปสารเคมีเหล่านี้ได้แก่ กรดไน-ตรัส ไฮดรอกซิลลามีน ไนโตรเจนมัสตาด เอธิลมีเทนซัลโฟเนต เป็นต้น

สารเคมีที่ทำให้เกิดการเพิ่มและการขาดของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของ ดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ได้แก่ สีย้อม เช่น อะคริดีน ออเรนจ์ โพรฟลาวีน เป็นต้น

1.5 การทดสอบการก่อกลายพันธุ์

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์มีหลายวิธี แต่ที่นิยมคือวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ในการทดสอบ เนื่องจากให้ผลทดสอบเร็ว ทำง่าย และค่าใช้จ่ายถูก แบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้ในการทดสอบคือ ซาโมเนลลาธัยฟิมิวเรียม หรือที่เรียกว่าการทดสอบของเอมส์ นอกจากการศึกษาหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากการทดสอบเอมส์แล้วยังมีวิธีการทดสอบแบบ Recombination

assay และ SOS chromotest ซึ่งเป็นการตรวจสอบสารก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีตรวจวัดระยะสั้น เช่นเดียวกับการทดสอบเอมส์แต่กระบวนการทดสอบมีความยุ่งยากกว่าการทดสอบด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากการทดสอบเอมส์ ดังนั้นจึงไม่เป็นที่นิยม (Kada *et al.,* 1974)

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ปกตินิยมทดลองในสัตว์ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง องค์กรที่เกี่ยวข้องกับการดูแลความปลอดภัยของสารเคมี ได้แก่ EPA (Environmental Protection Agency) ได้แนะนำให้ใช้การทดสอบการกลายพันธุ์โดยวิธีทดสอบเอมส์เป็นการทดสอบเบื้องต้นสำหรับทดสอบความปลอดภัยของสารเคมี ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่พัฒนาโดยใช้แบคทีเรียเป็นระบบทดสอบ (Ames, 1972) ต่อมาได้มีการพัฒนาและนำมาใช้ทดสอบความปลอดภัยของยาและสารเคมีหลายชนิดว่าไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Araki, 1984) และยังให้ผลต่อสารก่อมะเร็งสอดคล้องกับผลในสัตว์ทดลองและในคน (Montesano *et al*., 1989)

หลักการของการทดสอบการกลายพันธุ์โดยแบคทีเรียซัลโมเนลลาธัยฟิมิวเรียม

หลักการทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ที่สำคัญในการพัฒนาเชื้อซัลโมเนลลาธัยฟิมิวเรียมให้ไวต่อการกลายพันธุ์นั้นได้แก่ การกำหนดให้ยีนสร้างผนังเซลล์ของเชื้อมีความบกพร่องจนแบคทีเรียสายพันธุ์พิเศษกลุ่มเป็น naked bacteria ซึ่งยอมให้สารเคมีเกือบทุกชนิดผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ง่ายกว่าแบคทีเรียทั่วไปประการที่สำคัญคือเมื่อสารพิษก่อให้เกิดความเสียหายแก่หน่วยพันธุกรรมของเซลล์ เซลล์นั้นๆมักมีระบบซ่อมแซมความเสียหายจนกลับเป็นหน่วยพันธุกรรมปกติ ได้แต่ Dr. Bruce Ames ก็ได้ใช้วิธีการเติมหน่วยพันธุกรรมขนาดเล็กที่เรียกว่าพลาสมิด (plasmid) ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างโปรตีนที่ไปทำลายระบบซ่อมแซมหน่วยพันธุกรรมของเชื้อซัลโมเนลลาที่เสียหายจึงทำให้เชื้อสายพันธุ์พิเศษนี้เกิดการกลายพันธุ์ง่ายขึ้นกว่าปกติ ซึ่งเป็นการเพิ่มความไวในการทดสอบ

การทดสอบของเอมส์เป็นการทดสอบการก่อกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (backward or reverse mutation) ในแบคทีเรียซัลโมเนลลาธัยฟิมิวเรียม เนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาใช้ถูกทำให้กลายพันธุ์ การทดสอบนี้เป็นการทดสอบในหลอดทดลองโดยผสมแบคทีเรียกับสารที่ต้องการทดสอบและโคแฟคเตอร์ [2]แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญเป็นโคโลนีให้เห็นได้เมื่อเลี้ยงเชื้อในตัวกลางที่ขาดกรดอะมิโนฮีสทีดีน เนื่องจากเป็นแบคทีเรียชนิดที่ต้องการกรดอะมิโนฮีสทีดีนในการเจริญเติบโต (His-) ดีเอนเอของมันไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นในการ

[2] โคแฟคเตอร์ (cofactor) คือ สารประกอบที่เป็นอิออนของโลหะมีคุณสมบัติช่วยให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ เช่น Mg^{+2} Fe^{+2} Cu^{+2} K^{+} Na^{+} หรือ โมเลกุลของสารอินทรีย์ ซึ่งเรียกว่า โคเอนไซม์ เช่น NADP FAD FMN หรือ ATP โคแฟคเตอร์มักจะทนต่อความร้อนได้ ในขณะที่เอนไซม์จะหมดสภาพเมื่อได้รับความร้อน

สังเคราะห์กรดอะมิโนฮีสทีดีน เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในสารก่อกลายพันธุ์ สารดังกล่าวสามารถไปเปลี่ยนแปลงเบสในสายดีเอนเอให้เกิดความผิดปกติทำให้แบคทีเรียสามารถสร้างกรดอะมิโนฮีสทีดีนขึ้นมาใช้เองได้อีกครั้งหนึ่ง การกลายพันธุ์ที่สองนี้จึงเป็นการย้อนกลับของการกลายพันธุ์ครั้งแรก แบคทีเรียที่นำมาทดสอบนอกจากต้องอาศัยกรดอะมิโนฮิสทีดีนแล้วยังมีคุณสมบัติอื่นๆที่ทำให้แบคทีเรียมีความไวต่อการกลายพันธุ์ ได้แก่

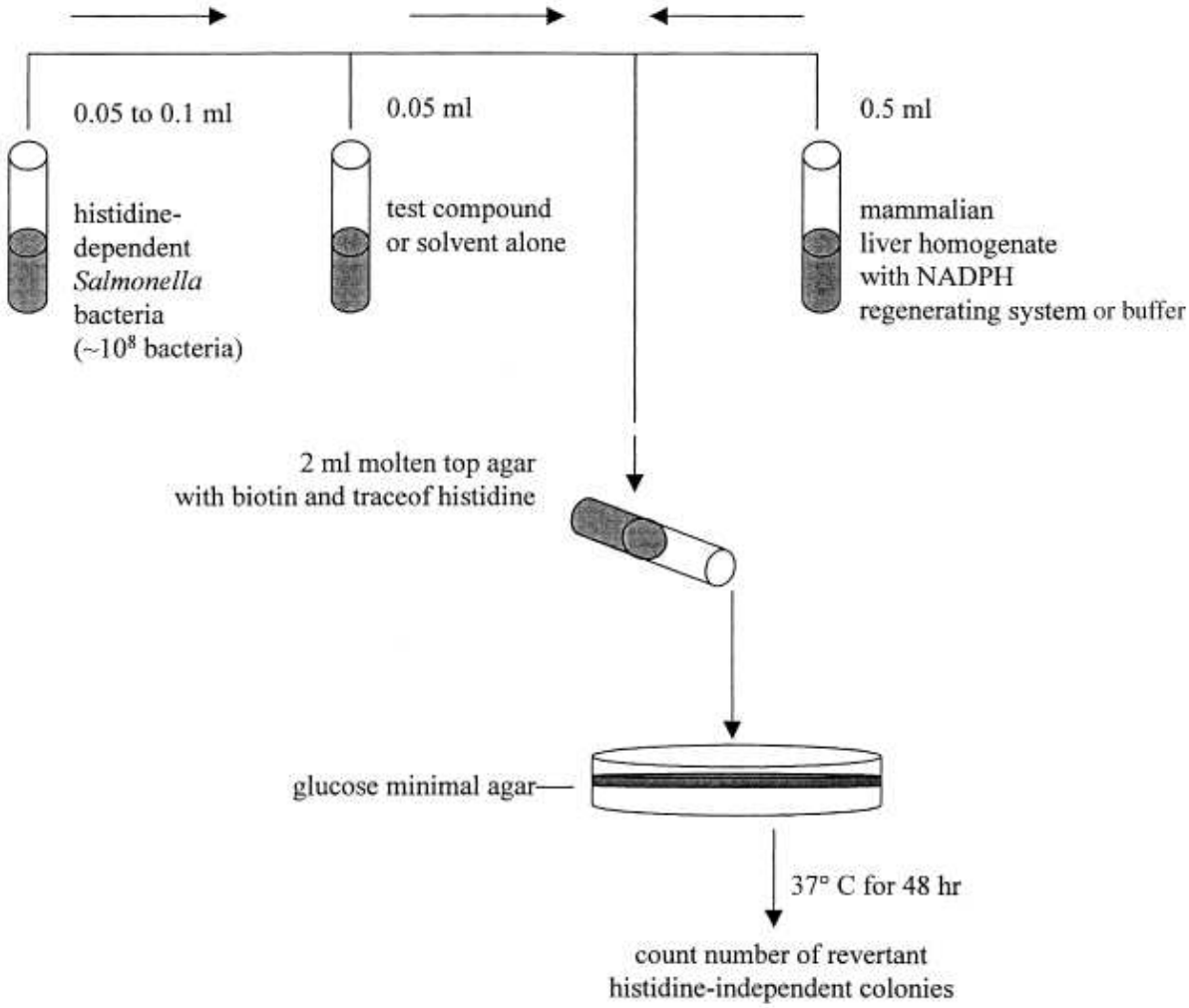
- rfa mutation คือ การทำให้แบคทีเรียขาดสารไลโปโพลี่แซคคาไรด์ที่เคลือบบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้สารกลายพันธุ์ที่มีโมเลกุลใหญ่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปในตัวแบคทีเรียได้

- uvrB mutation คือ การทำให้แบคทีเรียขาดระบบซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ผิดปกติ (loss of DNA excision repairing system) ดังนั้นเมื่อมีดีเอ็นเอกลายพันธุ์เกิดขึ้นจะไม่ถูกซ่อมแซมให้ดีเหมือนเดิมทำให้ดีเอ็นเอผิดปกตินี้ถูกนำไปถ่ายทอดได้

- R factor คือ การเติมพลาดมิด ชนิด pKM 101 หรือ pAQ1 เข้าไปในแบคทีเรียเพื่อช่วยให้แบคทีเรียมีความไวต่อการถูกเปลี่ยนแปลงโดยสารก่อกลายพันธุ์ได้มากขึ้น

นอกจากนี้วิธีการทดสอบเอมส์ยังมีการเพิ่มระบบการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ที่ได้จากตับหนู (S9 fraction) เข้าไปในการทดลองด้วย ดังแสดงในรูปที่ 1-9

เนื่องจากสารแปลกปลอมที่เป็นพิษต่อร่างกายเมื่อเข้าไปในร่างกายต้องถูกเปลี่ยนแปลงโดยระบบเมแทบอลิซึมของร่างกาย ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพื่อช่วยสลายความเป็นพิษต่อร่างกาย ขณะเดียวกันอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เป็นการกระตุ้นความเป็นพิษต่อร่างกาย ระบบนี้อาศัยเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ที่อยู่ในเซลล์ การทดสอบสารก่อกลายพันธุ์โดยเติมเอนไซม์เข้าไป ทำให้สารก่อกลายพันธุ์ถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้โดยเอนไซม์ที่พบในร่างกาย ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียไม่มีระบบการกระตุ้นดังกล่าว วิธีการทดสอบเอมส์จึงเป็นเหมือนการจำลองสถานการณ์การเกิดเมแทบอลิซึมของสารพิษที่อาจเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอให้ผิดปกติไปได้เหมือนกับที่อาจเกิดในร่างกายมนุษย์



รูปที่ 1-9 แสดงขั้นตอนการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์โดยวิธีการทดสอบเอมส์
(ที่มา: Mortelmans and Zeiger, 2000)

ในการทดสอบเอมส์นิยมใช้แบคทีเรียซาโมเนลลาธัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA98 ทดสอบการก่อกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนแปลง (เพิ่มหรือลด) จำนวนคู่เบสในดีเอ็นเอ (frameshift mutation) และสายพันธุ์ TA100 ทดสอบการก่อกลายพันธุ์ที่ทำให้คู่เบสเดิมถูกแทนที่โดยคู่เบสอื่น แต่จำนวนของคู่เบสเดิมยังคงเดิม (base-pair substitution mutation) (Mortelmans and Zeiger, 2000) การศึกษาหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองของเขตกรุงเทพมหานครในครั้งนี้ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากการทดสอบเอมส์โดยใช้แบคทีเรียซาโมเนลลาธัยฟิมิวเรียม สำหรับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการทดสอบได้แก่ สายพันธุ์ TA 98 และ สายพันธุ์ TA 100 (Le Curieux *et al.,* 1995) โดยสายพันธุ์ TA 98 ใช้ในการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (เพิ่มหรือลด)

จำนวนคู่เบสใน DNA ที่มีผลต่อการแปลรหัสของ mRNA เป็นกรดอะมิโนผิดไปจากเดิมตั้งแต่บริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสเป็นต้นไป อันส่งผลให้ได้โปรตีนที่ผิดปกติไปเรียก frameshift mutation และสายพันธุ์ TA 100 สำหรับการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ที่คู่เบสเดิมถูกแทนที่โดยคู่เบสคู่อื่นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคู่เบสใน DNA แต่จำนวนของคู่เบสยังคงเท่าเดิมเรียก base-pair substitution mutation (U.S. Food and Drug Administration, 2000) นอกจากนั้นการทดสอบเอมส์ยังสามารถใช้ทดสอบได้ทั้งกับสารเคมีที่เป็นสารก่อกลายพันธุ์โดยตรงและสารก่อกลายพันธุ์โดยอ้อมที่จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์จากตับ [3](Araki *et al*., 1984) จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีหลายงานวิจัยที่ใช้วิธีทดสอบ Ames' test ตรวจสอบสารต้องสงสัยและยืนยันฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และสรุปว่าประมาณร้อยละ 90 ของสารก่อมะเร็งแสดงคุณลักษณะเป็นสารก่อกลายพันธุ์ด้วย (McCann and Ames, 1976) ห้องปฏิบัติการชีวภาพส่วนใหญ่จึงนำเทคนิคนี้ไปใช้ตรวจสอบสารเคมีจากสิ่งแวดล้อมและสารเคมีที่สงสัยว่าจะเป็นสารก่อมะเร็งในลักษณะการทดสอบเบื้องต้น (screening test) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการตรวจสอบสารก่อมะเร็งที่มีคุณลักษณะเป็นสารก่อกลายพันธุ์โดยวิธีทดสอบ Ames's test เป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์และงานด้านสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย อย่างไรก็ตามสารที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธีนี้ควรที่จะทำการทดสอบในเซลล์หรือในอวัยวะของร่างกาย ของสัตว์หรือคนร่วมไปด้วยเพื่อพิสูจน์และสนับสนุนผลการทดลองต่อไป (อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, 2534)

1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เคนเนธ (Kenneth, 1968) แบ่งชนิดของฝุ่นละอองตามขนาด โดยฝุ่นละอองอย่างละเอียด จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 100 ไมโครเมตรและฝุ่นละอองอย่างหยาบมีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 100 ไมโครเมตร

โรเบิร์ตและเออร์วิง (Robert and Irving, 1974) ศึกษาฝุ่นละอองในชั้นบรรยากาศสามารถแบ่งประเภทได้ 3 กลุ่ม คือ ฝุ่นละอองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 0.1 ไมโครเมตร เรียกว่า " aitken- particles" ฝุ่นละอองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 0.1-1.0 ไมโครเมตรเรียกว่า "large- particles" ฝุ่นละอองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 1.0 ไมโครเมตร เรียกว่า "giant-particles"

มีรายงานถึงระดับฝุ่นขนาดเล็กที่แต่ละบุคคลได้รับมีความสัมพันธ์กับระดับฝุ่นนอกอาคาร โดยที่ผู้อยู่อาศัยบริเวณถนนที่มีการจราจรคับคั่งจะได้รับสัมผัสฝุ่นขนาดเล็กมากที่สุด

---

[3] ตับมีหน้าที่สำคัญในการขจัดสารพิษออกจากร่างกาย ดังนั้นในตับจึงมีเอนไซม์ที่จำเป็นในการกระตุ้นสารเคมีเมื่อสารเคมีต่างๆเข้าสู่ร่างกายจะต้องถูกเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism)

(Janssen, *et al.,* 1997) และระดับฝุ่นขนาดเล็กที่แต่ละคนได้รับสัมผัสในแต่ละวันจะขึ้นอยู่กับกิจกรรมของแต่ละบุคคล การอยู่ในสถานที่ที่มีคุณภาพอากาศแย่จะมีโอกาสได้รับสารมลพิษมากเช่นเดียวกัน (Nicole, *et al.,* 1998)

ภาวะมลพิษทางอากาศมีผลกระทบทางลบต่อสุขภาพของมนุษย์ มีรายงานความสัมพันธ์ของระดับมลพิษในอากาศเพิ่มขึ้น จะทำให้อัตราการตายของประชากรเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dokery, *et al.,* 1998) สารมลพิษในอากาศที่เป็นปัญหาสำคัญคือฝุ่นละอองขนาดเล็ก โดยเฉพาะฝุ่นที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 10 ไมโครเมตร (PM_{10}) และที่น้อยกว่า 2.5 ไมโครเมตร ($PM_{2.5}$) ผลกระทบต่อสุขภาพจากระดับมลพิษในอากาศมีรายงานเกี่ยวข้องตั้งแต่ระบบสืบพันธุ์ (Sram R.J, 1999) อัตราการตายของทารกในครรภ์ (Dejmek, *et al*., 1999) ความเป็นพิษต่อระบบเลือดสมอง (Gordon and Reibman, 2000)

โชว์และคณะ (Chow *et al*., 2002) ตรวจวัดฝุ่นละออง PM_{10} ,$PM_{10\text{-}2.5}$ และ $PM_{2.5}$ ในโรงเรียนประถมในหัวเมือง 4 เมืองของประเทศจีน พบว่า PM_{10} มีความเกี่ยวเนื่องกับแหล่งกำเนิดมลพิษทางอากาศในเขตเมืองเพิ่มมากขึ้น

งานวิจัยประเมินความเสี่ยงจากการได้รับสัมผัสฝุ่นละอองขนาดเล็ก (fine และ submicron particle) ภายนอกอาคารที่มาจากการปลดปล่อยของยานพาหนะบริเวณริมถนนสายหลัก โดยศึกษาเป็นระยะห่างจากริมถนน 15-375 เมตร พบว่าถ้ามีลมพัดจากถนนสู่จุดเก็บตัวอย่างระดับความเข้มข้นของฝุ่นละอองขนาดเล็กจะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่ออยู่ห่างจากถนนเป็นระยะ 100-150 เมตร ถ้ามีลมพัดขนานกับถนนระดับความเข้มข้นของฝุ่นละอองขนาดเล็กจะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่ออยู่ห่างจากถนน 50-100 เมตร (Ristovsk *et al*.,1999)

งานวิจัย PAHs ในฝุ่น PM_{10} ในเขตกรุงเทพมหานคร พบ ΣPAHs ค่าเฉลี่ย 24 ชั่วโมง ในอากาศมีค่า 25.4 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร benzo (a) pyrene (BaP) เป็น PAHs ชนิดที่ทำให้เกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวชี้ปริมาณของ PAHs โดยในระหว่างปี พ.ศ. 2536-2540 พบว่าในกรุงเทพมหานคร มีค่าอยู่ในช่วง 0.18 ถึง 2.44 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร พบ benzo (e) pyrene (BeP) ในปริมาณสูงสุด โดยพบในปริมาณมากกว่า 10.5 % ของปริมาณ PAHs นอกจากนี้ยังพบ benzo (ghi) perylene (BghiP) และPAHs พวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ คือ acenapthene (Ace) และ acenapthylene (Acy) (Panther, 1996; Garivait, 1999; Thongsanit, 2002)

การวิจัยของโครงการเคป (CAPE: Characteristics of Atmospheric Profile and its Effects on variation of air pollutant in Thailand) เป็นความร่วมมือระหว่างมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดยเริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนธันวาคม 2550 นักวิจัยร่วมสามสถาบันติดตั้งอุปกรณ์เก็บตัวอย่างฝุ่นละออง

จากอากาศ 3 เมืองใหญ่ ได้แก่ กรุงเทพมหานคร เชียงใหม่ และ หาดใหญ่ เบื้องต้นพบสารก่อมะเร็งในกรุงเทพมหานครสูงกว่ามาตรฐานสากลทุกระดับความสูง พบสารก่อมะเร็งสำคัญกระจายอยู่ในอากาศโดยเฉพาะเบนโซเอไพรีน ซึ่งมีศักยภาพก่อมะเร็งสูงสุด ไม่ว่าจะเป็นมะเร็งระบบทางเดินหายใจ มะเร็งปอด และมะเร็งผิวหนัง สารก่อมะเร็ง PAHs เป็นกลุ่มสารเคมีหลายร้อยชนิด เกิดจากการสันดาปไม่สมบูรณ์ไม่ว่าจะเป็นควันพิษจากเชื้อเพลิงรถยนต์ หรือไฟไหม้ป่า จากการวิจัยพบว่ามีสารก่อมะเร็ง 15 ชนิดที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพการเก็บข้อมูลในพื้นที่กรุงเทพมหานคร นักวิจัยติดตั้งอุปกรณ์ตรวจวัดคุณภาพฝุ่นละอองและก๊าซบนตึกใบหยก 1 สำหรับเก็บข้อมูลที่ความสูงระดับ 1 (บริเวณชั้น 4-5 ของอาคาร) และความสูงระดับ 2 คือบนยอดตึกซึ่งมีความสูงราว 154 เมตร ความสูงระดับ 3 นักวิจัยได้รับการเอื้อเฟื้อสถานที่จากอาคารใบหยก 2 โดยใช้เวลา 3 วัน เก็บข้อมูลต่อเนื่องทุก 3 ชั่วโมงผลการเก็บข้อมูลและสกัดฝุ่นในกรุงเทพมหานคร พบสารก่อมะเร็งทั้ง 15 ตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเบนโซเอไพรีนที่ความสูงระดับที่ 1 และระดับที่ 2 มีปริมาณสูงกว่ามาตรฐานสากล EPAQS ของอังกฤษ 2-3 เท่า แต่ที่ความสูงระดับ 3 ยังมีระดับต่ำกว่ามาตรฐานมาก จากผลวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยเบื้องต้น พบว่าสารก่อมะเร็งมาจากการลอยตัวขึ้นของมวลอากาศด้านล่าง คาดว่ามาจากไอเสียของยานพาหนะ เมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยลักษณะเดียวกันในเมืองเบอร์มิ่งแฮม ประเทศอังกฤษ พบว่าฝุ่นที่กรุงเทพมหานครมีสารก่อมะเร็งพีเอเอช โดยรวมมากกว่าการสำรวจในเบอร์มิ่งแฮม 2-3 เท่า (Pongpiachan *et al*., 2009)

การศึกษาในยุโรปบ่งชี้ว่าอัตราการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการทางระบบหายใจระบบหลอดเลือดสมองและหลอดลมอักเสบมีความสัมพันธ์ขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ย PM_{10} รายวันในอากาศของ 3 วันที่ผ่านมา ระดับ PM_{10} ที่เพิ่มขึ้น 10 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ทำให้อัตราการเข้ารับรักษาด้วยโรคระบบหายใจเพิ่มขึ้น 2.4% โรคหลอดเลือดสมองเพิ่ม 2.1% (Worldley *et al*.,1997)

การศึกษาในประเทศมาเลเซีย (Awang *et al*., 2000) พบว่าผลของมลภาวะเป็นพิษทางอากาศ มาจากสารพิษในอากาศต่างๆ ได้แก่ ไนโตรเจนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ [4]

[4] ผู้อยู่ใกล้บริเวณที่ได้รับก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และไนโตรเจนออกไซด์มากผิดปกติ จะมีผลทำให้ออกซิเจนไปเลี้ยงสมองน้อย ก๊าซนี้จะจับตัวกับเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าออกซิเจน ดังนั้นนอกจากออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกายได้น้อยลงแล้ว จึงทำให้อวัยวะนั้นได้รับออกซิเจนจำกัดมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะสมองเป็นอวัยวะซึ่งไวต่อการขาดออกซิเจนมากที่สุด ดังนั้นจึงเกิดผลต่อระบบประสาทรวมอย่างรวดเร็วทำให้รู้สึกปวดศีรษะเพิ่มมากขึ้น รู้สึกเปลี้ย หมดสติ ชัก และถึงตายได้หากรับมลพิษนี้มากเกินขนาด

โอโซน[5] ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ [6]และ PM_{10} ซึ่งอยู่ในระดับวิกฤตมาตั้งแต่ปี 1970 จากการศึกษาบ่งชี้ว่าในปี 2005 ระดับไนโตรเจนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และ PM_{10} อาจจะเพิ่มถึง 2.12, 2.27, 1.4 และ 1.47 เท่าของค่าที่รายงานในปี 1992 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์พบว่าระดับมลพิษทางอากาศของประเทศมาเลเซียจะเพิ่มขึ้นสูงสุดเวลาเช้าซึ่งเป็นชั่วโมงเร่งด่วน โดยมีแหล่งกำเนิดหลักมาจากรถยนต์ ส่วนระดับที่เพิ่มตอนเย็นจะมีแหล่งกำเนิดมาจากสภาพอุตุนิยมวิทยาและความเร็วของลม

การศึกษาในประเทศญี่ปุ่น (Kawanaka *et.al*., 2004, 2008) พบว่าปริมาณของ Nitro-PAHs ที่พบในอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กมาก (ultrafine paticles) ในชั้นบรรยากาศริมถนนเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์โดยตรงโดยใช้วิธีการทดลอง Ames ซึ่งใช้เชื้อซาโมเนลลาธัยฟีมิวเรียม สายพันธุ์ TA98 และ YG1024 ขนาดของอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กมาก ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์มากกว่าอนุภาคฝุ่นขนาดเล็ก และอนุภาคฝุ่นหยาบ

ผลการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อยีนปนเปื้อนและตรวจวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กในตัวอย่างอากาศของพื้นที่ตำบลดอนแก้ว อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนธันวาคม 2550 ถึงเดือน สิงหาคม 2551 ทำการเก็บอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กกว่า 10 ไมโครเมตร ด้วยกระดาษกรองโดยใช้เครื่องมือที่ใช้อัตราการดูดอากาศสูงทั้งหมด 4 จุด ได้แก่ เส้นทางจราจร พื้นที่การเกษตร เตาเผาขยะ และย่านที่พักอาศัย ทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรียซาโมเนลลาธัยฟีมิวเรียม สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในภาวะที่มีและไม่มีการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรียซาโมเนลลาธัยฟีมิวเรียม สายพันธุ์ TA98 และ TA100 พบว่ามีผลต่อการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียดังกล่าวทั้งแบบโดยตรงและโดยผ่านเอนไซม์นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์การก่อการกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนไม่มีความแตกต่างกันที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งกำเนิดในช่วงเวลาเดียวกัน (ณรงค์พันธ์ ฉุนรัมย์, 2552)

---

[5] โอโซนเป็นมลพิษที่ไวต่อปฏิกิริยา สามารถทำให้ตาระคายเคืองได้ฉับพลัน ระบบเอนไซม์อาจเกิดความผิดปกติ และผนังเม็ดเลือดแดงเปราะเมื่อเปรียบเทียบผลของโอโซนกับก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และไนโตรเจนไดออกไซด์แล้ว โอโซนมีผลต่อคนและพืชมากกว่า พืชพันธุ์ธัญญาหารจึงถูกทำลายและเกิดความเสียหายอย่างมากมาย

[6] ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เป็นก๊าซไม่มีสี ไม่ติดไฟ มีกลิ่นแสบจมูก ละลายได้ดีในน้ำโดยจะเปลี่ยนเป็นกรดซัลฟูริก ในธรรมชาติทั่วไปจะมีปริมาณน้อยในบรรยากาศคือ 0.02 - 0.1 ppm. แต่ถ้าพบในปริมาณสูงแล้วส่วนมากจะเกิดจากการเผาไหม้ โดยใช้เชื้อเพลิงหรือวัสดุที่มีกำมะถันเป็นส่วนประกอบปฏิกิริยาการเกิดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ฤทธิ์กรดจะทำอันตรายระบบหายใจได้มากยิ่งขึ้น

1.7 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ประเมินดัชนีการก่อกลายพันธุ์[7]ในอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานคร 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชน

2. เปรียบเทียบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในตัวอย่างอากาศที่มีความแตกต่างของพื้นที่และช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างของพื้นที่กรุงเทพมหานคร 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชน

3. คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานคร 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในฝุ่นละอองที่วัดด้วยเครื่อง GC/MS-Ion-Trap Varian Saturn 2200 โดยใช้เครื่องมือทางสถิติแบบ Pearson correlation

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานคร 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชน

2. เมื่อเปรียบเทียบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชนจะทำให้ทราบว่าพื้นที่ไหนประชาชนมีโอกาสได้รับสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์สูง

3. เมื่อเปรียบเทียบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชนในแต่ละเดือนจะสามารถชี้ให้เห็นว่าสภาพอากาศในแต่ละเดือนและในแต่ละฤดูกาลประชาชนมีโอกาสได้รับสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์แตกต่างกันหรือไม่อย่างไร

---

[7] ดัชนีการกลายพันธุ์ (Mutagenicity index: MI) คำนวณจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อ หารด้วยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

4. เมื่อคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนจะสามารถชี้ให้เห็นว่าดัชนีการเกิดการกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองจะมีความสัมพันธ์กับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน phenanthrene (Phe), anthracene (An), Fluoranthene (Fluo) และ pyrene (Pyr) เป็นอย่างไร เนื่องจากสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นสารกลุ่มสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง (Carcinogen) และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในมนุษย์ (Ruchirawat *et al*., 2005)

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุ

วัสดุที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย เชื้อที่ใช้ทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ มีรายละเอียดดังนี้

2.1.1. เชื้อที่ใช้ทดสอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100
- Oxoid nutrient broth NO.2 (Oxoid, England)
- Bacto agar (Difco, France)

2.1.2. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

- β-Nicotinamide adenide di-nucleotide (β-NADP) (Sigma, USA.)
- β-D-Glucose-6-phosphate sodium salt (Sigma, England)
- Citric acid, monohydrate (Sigma, Australia)
- D-Biotin (Sigma, HongKong)
- Glucose, anhydrous (Sigma, China)
- Glycerol (Sigma, USA)
- K_2HPO_4 anhydrous (Ajax, Australia)
- L-Histidine.HCl.H_2O (Sigma, USA.)
- Na_2HPO_4 (Merck, Germany)
- $Na_2HPO_4.H_2O$ (Merck, Germany)
- $NH_4H_2PO_4$ (Sigma, Japan)
- NaOH (Sigma, Sweden)
- $MgCl_2.6H_2O$ (Fluka, Germany)
- $MgSO_4.7H_2O$ (Merck, Germany)
- Ampicillin (Sigma, USA.)
- NaCl (Sigma, USA.)
- S9 fraction จากตับหนู

2.1.3. สารเคมี

- Dichloromethan (DCM) (Merck, Germany)
- Acetone (BDH, England)
- 2-(2-Furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide) (AF-2) (Wako, Japan)
- 2- Aminoanthracene (2-AA) (Sigma, USA.)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA.)

2.1.4. อื่นๆ

- Sterile distilled water
- Autoclave tape
- Aluminums foil
- 70% Ethanol

2.2. อุปกรณ์

เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วยอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างอากาศและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสารก่อกลายพันธุ์

2.2.1. อุปกรณ์ที่ใช้สกัดตัวอย่างอากาศ

- เครื่องอัลทราโซนิกส์ (ultrasonication)
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
- ขวดเก็บตัวอย่างขนาด 5 มิลลิลิตร
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง

2.2.2 อุปกรณ์วิเคราะห์หาสารก่อกลายพันธุ์

- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับบ่มเชื้อแบคทีเรียให้เจริญเติบโต
- ตู้อบความร้อน (hot air oven) สำหรับฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว
- เตาไฟฟ้าพร้อมระบบแม่เหล็ก (hot plate/magnetic stirrer)
- ตู้เย็น (refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตู้เยือกแข็ง (freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง สำหรับชั่งส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง สำหรับชั่งตัวอย่างกระดาษกรองฝุ่นละออง

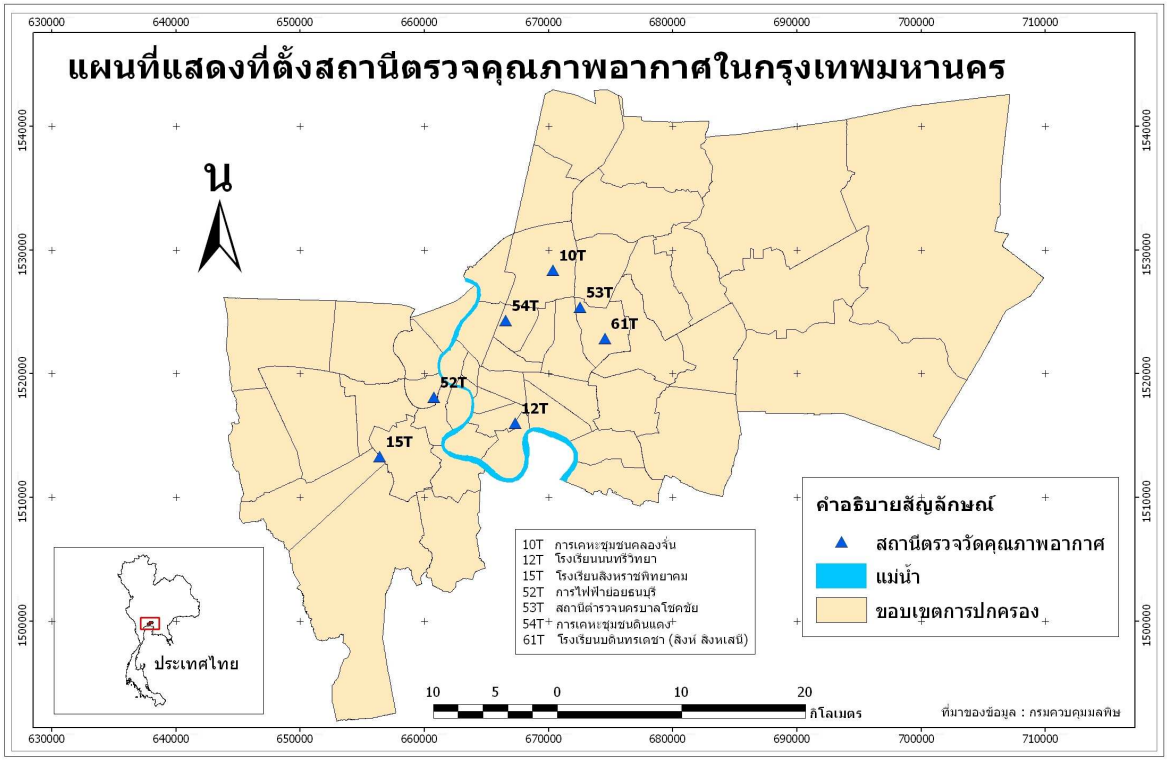
- เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (micropipette) หลอดดูดสารละลาย (tip) และกล่องใส่หลอดดูดสารละลาย (empty racks)
- ปิเปต (pipette)
- จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- ห่วงเขี่ยเชื้อ (wire loop)
- ขวดใส่สาร (reagent bottle)
- หลอดเลี้ยงเชื้อรูปตัวแอล (L-shape culture tube)
- ที่วางหลอดทดลอง (rack)
- ปากคีบ (forceps)
- หลอดพลาสติก (cryotube)
- ตะเกียงแก๊ส
- ปากกาเขียนแก้ว
- ขวดบรรจุสารละลาย (reagent bottle)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- ถุงมือ
- บีกเกอร์ (beaker)
- กระบอกตวง
- ขวดเก็บตัวอย่าง
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี
- เครื่องเขย่า (shaker) ใช้สำหรับบ่มเชื้อ

2.3 วิธีดำเนินการ

ในการศึกษาดัชนีการกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองของเขตเมืองกรุงเทพมหานคร ผู้วิจัยได้ดำเนินวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

<u>สถานที่เก็บอากาศ</u>

การวิจัยในครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนระหว่างเดือนมกราคม - ธันวาคม พ.ศ.2549 ของพื้นที่เขตเมืองกรุงเทพมหานคร โดยเก็บตัวอย่างจาก 7 จุด ได้แก่ การเคหะชุมชนดินแดง โรงเรียนสิงหราชพิทยา สถานีตำรวจนครบาลโชคชัย 4 โรงเรียนนนทรีวิทยา การไฟฟ้าย่อยธนบุรี การเคหะชุมชนคลองจั่น และโรงเรียนบดินทรเดชา ซึ่งเป็นสถานีเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษแสดงดังรูปที่ 2-1



รูปที่ 2-1 ที่ตั้งจุดเก็บตัวอย่าง

คำอธิบายสัญลักษณ์พื้นที่เก็บตัวอย่าง

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	สัญลักษณ์
10T การเคหะชุมชนคลองจั่น	KJ
12T โรงเรียนนนทรีวิทยา	NWS
15T โรงเรียนสิงหราชพิทยา	SPS
52T การไฟฟ้าย่อยธนบุรี	TSP
53T สถานีตำรวจนครบาลโชคชัย 4	CC4
54T การเคหะชุมชนดินแดง	DD
61T โรงเรียนบดินทรเดชา	BDC

การเก็บตัวอย่างฝุ่นขนาดเล็กและการตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี

<u>กำหนดจุดเก็บตัวอย่าง PM_{10} ในบรรยากาศ</u>

การกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง PM_{10} ในบรรยากาศโดยทั่วไปจะกำหนดให้ช่องทางเข้าอากาศของเครื่องเก็บตัวอย่างสูงจากพื้นดินอย่างน้อย 1.50 เมตร แต่ไม่เกิน 6 เมตร ซึ่งมากพอที่จะไม่ดูดเอาฝุ่นละอองจากพื้นเข้าไปด้วย ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงคือสถานที่เก็บตัวอย่างต้องไม่ใกล้หรือไกลจากแหล่งกำเนิดของมลสารมากเกินไปเพราะจะทำให้ค่าที่วัดได้สูงหรือต่ำเกินความเป็นจริง

หลักการทั่วไปในการเลือกจุดติดตั้งเครื่องเก็บตัวอย่าง PM_{10} มีดังนี้

1. ติดตั้งเครื่องเก็บอากาศให้ห่างอย่างน้อย 10 เมตร กรณีมีต้นไม้เป็นสิ่งกีดขวาง

2. ช่องทางเข้าอากาศของเครื่องเก็บอากาศควรอยู่ห่างจากสิ่งกีดขวาง เช่น อาคาร 2 เท่าของความสูงของสิ่งกีดขวางที่โผล่เหนือช่องทางเข้าอากาศนั้น

3. ในรัศมี 270 องศา รอบช่องทางเข้าอากาศต้องไม่มีอะไรกีดขวางการไหลของอากาศ

4. เครื่องเก็บอากาศไม่ควรอยู่ใกล้บริเวณที่ปล่องเตาเผาโลหะ เตาเผาขยะหรือแหล่งกำเนิดมลพิษอื่นๆ

5. ถ้าต้องการวัด PM_{10} จากยานพาหนะ ให้ติดตั้งเครื่องเก็บตัวอย่างใกล้ถนนที่มีรถติดมากที่สุด และในถนนที่คาดว่ามีระดับความเข้มข้นของ PM_{10} สูง

วิธีการเก็บตัวอย่าง (อ้างอิงจากคู่มือการตรวจวัดฝุ่นละอองในบรรยากาศ สำนักจัดการคุณภาพอากาศและเสียง กรมควบคุมมลพิษ)

1. ติดตั้งหัวคัดขนานฝุ่นละอองไม่เกิน 10 ไมครอนให้อยู่ในแนวระนาบและยึดขาตั้งเครื่องให้แน่น เพื่อป้องกันไม่ให้เครื่องล้ม

2. เช็ดฝุ่นภายในเครื่องเก็บตัวอย่างให้สะอาด

3. ใส่กระดาษกรอง Quartz Fiber Filter บนตะแกรงสำหรับวางกระดาษกรองโดยให้หงายด้านหยาบที่ใช้เก็บตัวอย่างขึ้น จัดวางกระดาษกรองให้สมดุลกับตะแกรง และที่จับกระดาษกรอง และตรวจเช็คจุดเชื่อมต่อระหว่างมอเตอร์กับเครื่องบันทึกอัตราไหลของอากาศ

4. ใส่กระดาษกราฟวงกลมสำหรับบันทึกอัตราการไหลของอากาศในเครื่องบันทึกอัตราการไหลของอากาศและตั้งเวลาเก็บตัวอย่างต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง

5. เปิดเครื่องเก็บตัวอย่าง บันทึกเวลาเริ่มเดินเครื่อง อุณหภูมิ ความกดของอากาศและสภาพแวดล้อมบริเวณโดยรอบ

6. เมื่อครบกำหนดเวลาเก็บตัวอย่าง ให้บันทึกเวลาเครื่องหยุดทำงานและบันทึกค่าความกดอากาศที่ผ่านชั้นวางกระดาษกรองหลังเก็บตัวอย่างลงบนกระดาษสีน้ำตาล

7. นำกระดาษกรองออกจากเครื่อง พับกระดาษกรองครึ่งหนึ่งตามแนวยาวให้ด้านที่มีฝุ่นเข้าหากันใส่กระดาษกรองในถุงซิบ เพื่อนำกลับไปวิเคราะห์ตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการต่อไป

การอบกระดาษกรองหลังเก็บตัวอย่าง (อ้างอิงจากคู่มือการตรวจวัดฝุ่นละอองในบรรยากาศ สำนักจัดการคุณภาพอากาศและเสียง กรมควบคุมมลพิษ)

<u>สภาวะแวดล้อมสำหรับการอบกระดาษกรองหลังเก็บตัวอย่าง</u>

1. ความชื้นสัมพัทธ์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โดยควบคุมไม่ให้เปลี่ยนแปลงเกิน ±5 เปอร์เซ็นต์

2. อุณหภูมิห้องระหว่าง โดยควบคุมไม่ให้เปลี่ยนแปลงเกิน ±3 องศาเซลเซียส

3. ก่อนอบกระดาษกรอง ให้ทำความสะอาดตู้ดูดความชื้นทุกครั้ง

4. นำซิลิกาเจลใส่ในตู้ดูดความชื้น

5. คลี่รอยพับครึ่งของกระดาษกรองออก และวางบนชั้นวางของตู้ดูดความชื้น โดยหงายด้านที่ใช้เก็บตัวอย่างขึ้น

6. อบกระดาษกรองอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

7. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ให้พับกระดาษกรองตามแนวเดิม เพื่อเตรียมไปชั่งน้ำหนักต่อไป

การชั่งน้ำหนักกระดาษกรองหลังเก็บตัวอย่าง

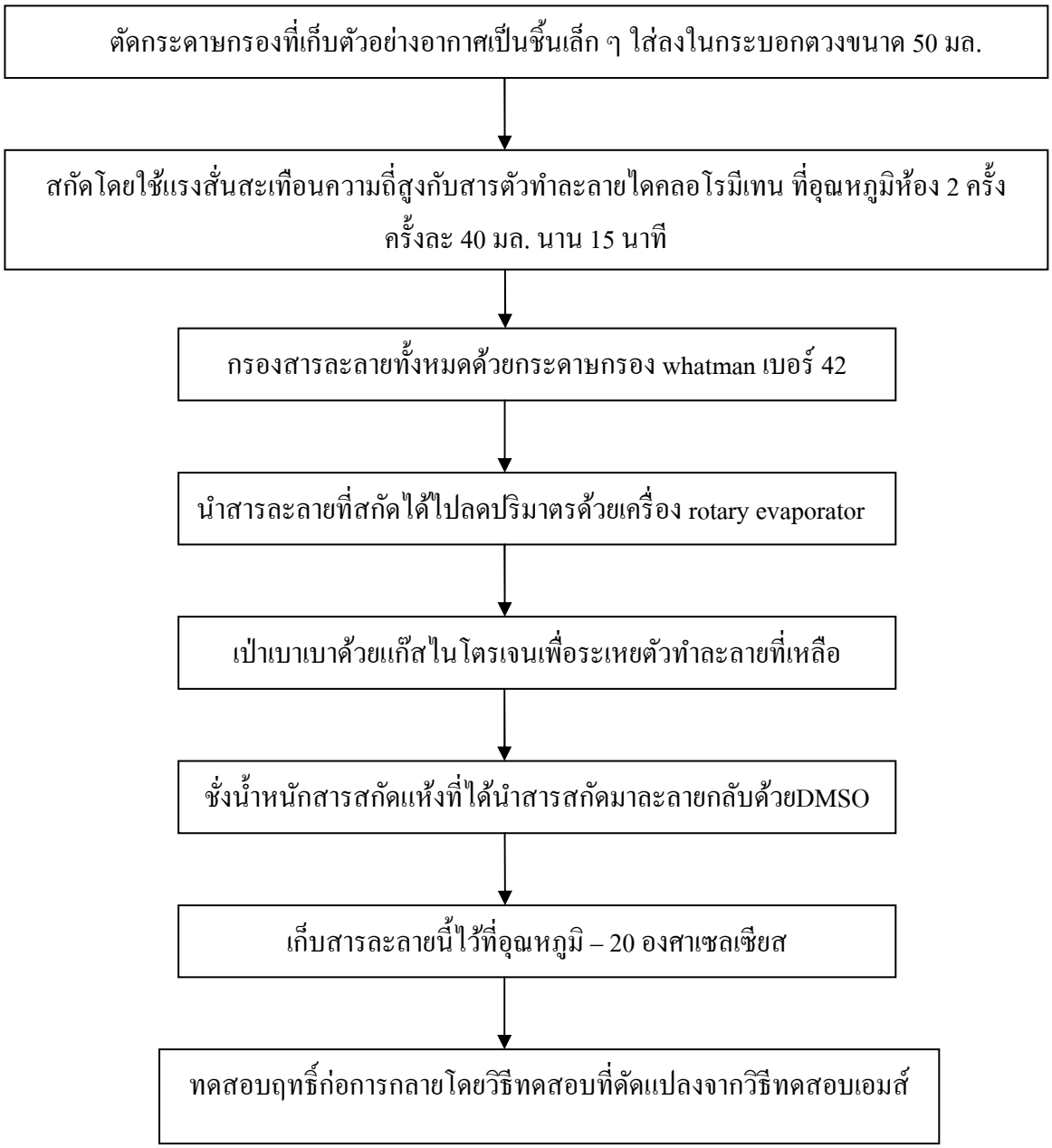
1. เปิดเครื่องชั่งทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

2. ปรับเครื่องชั่งให้เป็น 0.0000 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

3. ปรับเทียบเครื่องชั่งด้วยตุ้มน้ำหนักมาตรฐาน โดยน้ำหนักตุ้มมาตรฐานจะต้องแตกต่างจากน้ำหนักเดิมไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม หากแตกต่างจากนี้ให้ยกเลิกการชั่งน้ำหนักวันนั้น

4. นำกระดาษกรองที่ผ่านการอบแล้วมาชั่งน้ำหนัก

5. บันทึกน้ำหนักกระดาษกรองลงบนซองกระดาษสีน้ำตาล



รูปที่ 2-2 แผนผังแสดงวิธีสกัดสารจากกระดาษกรองอากาศ

วิธีการสกัดสารจากกระดาษกรองอากาศ

ตัดกระดาษกรองที่เก็บตัวอย่างอากาศเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในกระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้แรงสั่นสะเทือนความถี่สูง (ultrasonication) กับสารตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ที่อุณหภูมิห้อง สกัดทั้งหมด 2 ครั้ง; ครั้งที่ 1, 40 มิลลิลิตร นาน 15 นาที ครั้งที่ 2, 40 มิลลิลิตรนาน 15 นาที (รูปที่ 2-2ก) ผสมสารสกัดทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วกรองสาร

สกัดทั้งหมดด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 42 เนื้อกระดาษกรองเป็นแบล็กริบบอน เหมาะสมกับลักษณะของตะกอนที่เป็นผลึกละเอียด (รูปที่ 2-2ข)

(ก) (ข)

รูปที่ 2-2(ก) สกัดโดยใช้แรงสั่นสะเทือนความถี่สูง (ข) กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 42

นำสารละลายที่สกัดได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่อง rotary evaporator (รูปที่ 2-3ก)จนสารละลายมีปริมาตรเหลือประมาณ 2 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายเก็บไว้ในหลอดแก้วขนาด 15 มิลลิลิตร เป่าเบาๆด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อระเหยตัวทำละลายที่เหลือ (รูปที่ 2-3ข) จนสารละลายแห้งสนิท ชั่งน้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้ นำสารสกัดมาละลายกลับด้วยไดเม็ทธิลซัลฟ๊อกไซด์ (Dimethysulfoxide: DMSO) เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธี Ames' test

(ก) (ข)

รูปที่ 2-3 (ก) เครื่อง rotary evaporator (ข) เป่าเบาเบาด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อระเหยตัวทำละลายที่เหลือ

2.4 การทดสอบการกลายพันธุ์ของสารสกัดจากกระดาษกรองเก็บอากาศโดยการทดสอบเอมส์

ทดสอบโดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 เป็นตัวทดสอบ ใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมผลลบ 2-aminoanthracene (2-AA) [1]และ 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2)[2] เป็นตัวควบคุมผลบวก (เลือกใช้สารก่อกลายพันธุ์ตามตารางตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ตารางที่ 2-1) การตัดสินฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์กลับคืน (revertant colonies) ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยสารสกัดต้องมากกว่าสารควบคุมลบ (DMSO) 2 เท่าขึ้นไป และมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ สารสกัดแต่ละตัวอย่างจะถูกทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์กับแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ (อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, 2534; Mortelmans and Zeiger, 2000)

ตารางที่ 2-1 ตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน (sensitive to standard mutagens)

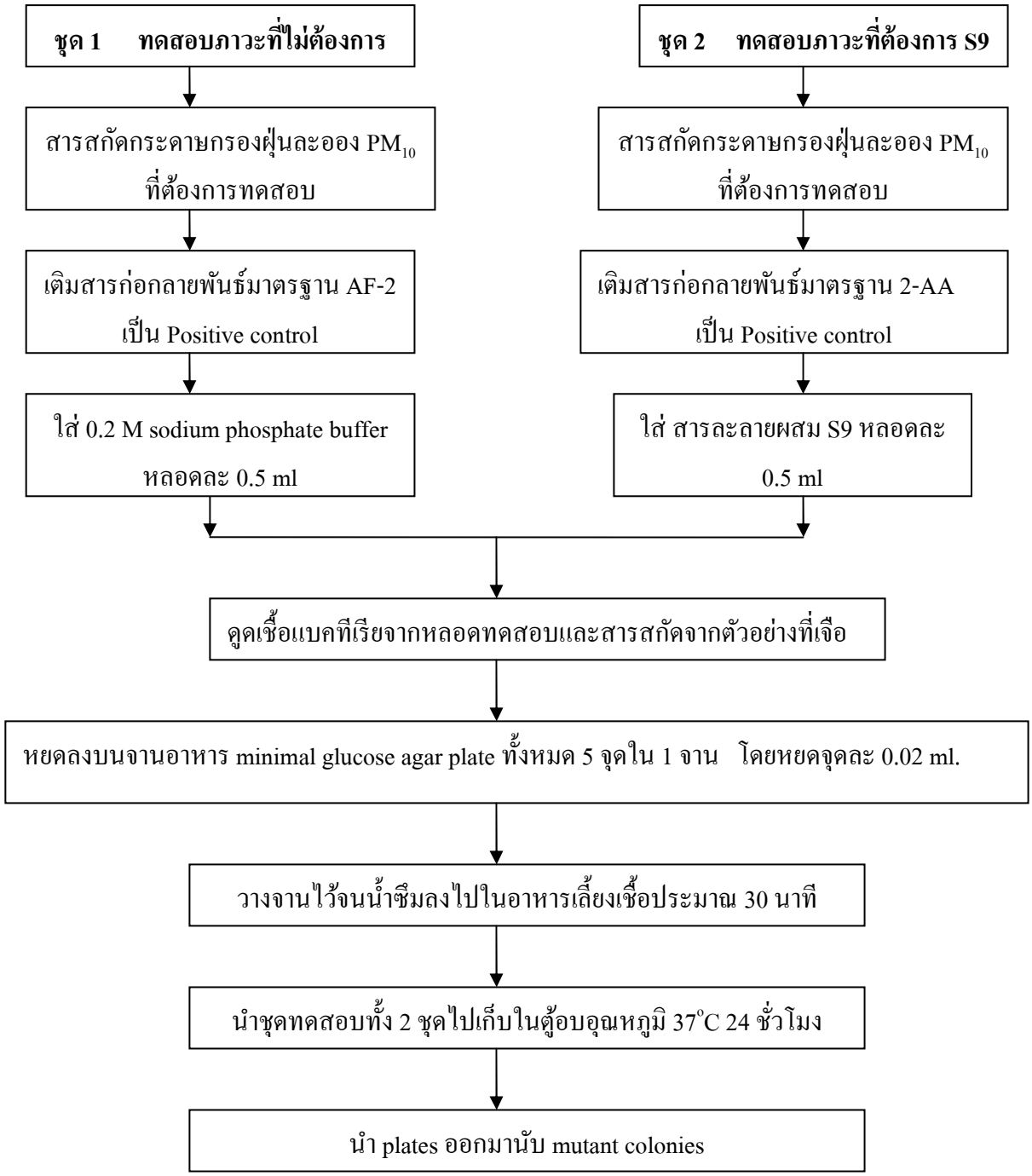
สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน	สภาวะที่ทดสอบ	ความเข้มข้นสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานต่อแบคทีเรีย	
		TA98	TA100
2-aminoanthracene	+S9	0.5	0.5
Benzo(a)pyrene	+S9	5.0	-
Aflatoxin B1	+S9	0.05	-
Sodium azide	-S9	-	0.5
2- acrylamide	-S9	0.1	0.01

[1] 2-aminoanthracene (2-AA) สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานใช้เป็น Positive control ในชุดการทดลองสภาวะที่ต้องการเอนไซม์กระตุ้นทดสอบโดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100

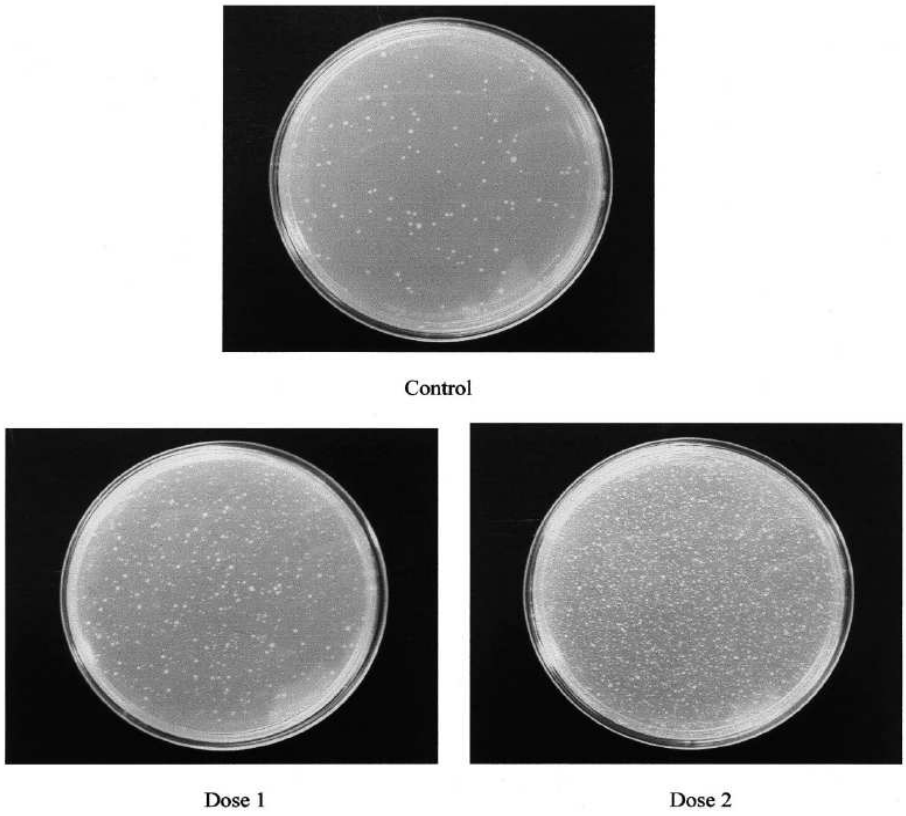
[2] 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานใช้เป็น Positive control ในชุดการทดลองสภาวะที่ไม่ต้องการเอนไซม์กระตุ้นทดสอบโดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100

วิธีทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัด PM_{10} โดยวิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีทดสอบเอมส์

เตรียมหลอดทดลอง 2 ชุด



รูปที่ 2-4 แผนผังแสดงการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัด PM_{10} โดยวิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีทดสอบเอมส์



รูปที่ 2-5 ภาพแสดงการกลายพันธุ์ของสาร A ทดสอบระดับความเข้มข้น 2 ขนาด (Dose 1:2.5 mg/plate;) (Dose 2:5 mg/plate) ในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* TA100
(ที่มา: Mortelmans and Zeiger, 2000)

การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียม overnight culture of bacteria

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

Nutrient broth

ละลายสารอาหาร oxoid nutrient broth No.2, 25 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดที่จะเลี้ยงเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนผสมกับความดัน (autoclave) ใช้ความร้อน 120 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที
หมายเหตุ: สารละลายนี้สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้

<u>วิธีทำ</u>

ใช้แบคทีเรียที่เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จำนวน 0.01 มิลลิลิตร ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การเก็บเชื้อแบคทีเรีย (Storage of bacteria)

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ จะเก็บรักษาไว้ใช้ตลอดการทดลอง (permanent copies) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

วิธีทำ

เตรียมเชื้อ overnight culture ของแบคทีเรีย เติม Dimethysulfoxide (DMSO) ลงไปในอัตราส่วน culture 1 มิลลิลิตรต่อ DMSO 0.09 มิลลิลิตร เขย่าให้ DMSO ละลายเข้ากันกับสารละลายแบคทีเรีย แบ่งสารละลายเป็นส่วนๆ (aliquot) โดยปิเปตใส่ในหลอดพลาสติก (cryotube) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ เมื่อต้องการใช้ก็นำมาใช้ทีละหลอด

การแยกแบคทีเรียใหม่ (reisolation of tester strain)

สิ่งที่ต้องเตรียม

- สารละลายฮิสทีดีน เข้มข้น 5 มิลลิโมล่าร์ และไบโอตินเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล่าร์
- สารละลายแอมพิซิลิน (ampicillin) ในปริมาณ 750 ไมโครกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ
- กลีเซอรอล (glycerol)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar plate

วิธีทำ

นำเชื้อที่เก็บไว้ใช้ตลอดการทดลองของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกโคโลนีเดี่ยวออกมา 1 หลอดจาก -80 องศาเซลเซียส เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar plate ที่เคลือบด้วย 0.2 มิลลิลิตร สารละลายฮิสทีดีน เข้มข้น 5 มิลลิโมล่าร์ และไบโอตินเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล่าร์ เมื่อผิววุ้นแข็งได้ที่แล้ว เคลือบผิววุ้นอีกครั้งด้วยการเกลี่ย (spread) สารละลาย ampicillin ในปริมาณ 750 ไมโครกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (wire loop) แตะ permanent copy ของแบคทีเรียแล้ว streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำจานเลี้ยงเชื้อออกมา ใช้ wire loop แตะบนโคโลนีเดี่ยวที่เด่นชัดที่สุด (well-isolated colony) นำไปเลี้ยงในอาหาร oxide nutrient broth No.2 เป็นเวลา 14 ชั่วโมงจะได้เชื้อ overnight culture (ควรแยกโคโลนีเดี่ยวประมาณ 4-5 โคโลนีต่อครั้ง) แบ่งเก็บเป็น aliquot ที่ -80 องศาเซลเซียส ส่วนละ 0.5 มิลลิลิตร (แบ่ง overnight culture บางส่วนมาเก็บโดยเติม glycerol 30 เปอร์เซ็นต์ ลงไปอัตราส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร ต่อ glycerol 30 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนจะเก็บเป็น aliquot) ส่วนที่เหลือของ overnight culture นำไปตรวจสอบ

คุณสมบัติที่จำเป็นทั้งหมดได้แก่ histidine requirement, rfa mutation, R-factor, spontaneous reversion และความไว (sensitive) ต่อสารก่อกลายพันธุ์ Aliquot ที่แยกจากโคโลนีเดี่ยวที่มีคุณสมบัติครบถ้วน เก็บเป็น master copies ที่ –80 องศาเซลเซียส หรือ master plate สำหรับใช้ประจำระหว่างการทดลอง ส่วน aliquot ที่มีคุณสมบัติไม่ครบถ้วนควรจะตัดทิ้งไป ไม่ควรเก็บให้ปนกัน

การเก็บในรูป master copy เตรียมเช่นเดียวกับการเก็บ permanent copy แต่ใช้ aliquot จาก โคโลนีเดี่ยวที่มีคุณสมบัติครบมาเตรียม overnight culture หลังจากนั้น เติม glycerol 30 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในอัตราส่วนเดียวกัน แล้วแบ่งใส่หลอดพลาสติก (cryotube) หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ทำเครื่องหมาย (label) ให้ถูกต้องและควรให้แตกต่างจากเครื่องหมายของ permanent copy เมื่อจะใช้ในการทดลองแต่ละครั้งก็เอามาเตรียมเป็น overnight culture สำหรับทดสอบได้เลย

การตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย

การตรวจ histidine requirement

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

- สารละลายไบโอติน 1 มิลลิโมล่าร์ ที่ปลอดเชื้อ
- สารละลายฮิสทีดีน 1 มิลลิโมล่าร์ ที่ปลอดเชื้อ
- สารละลาย top agar ที่มีส่วนผสมและอัตราส่วน ดังนี้

Bacto agar	0.6	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลายนี้จะนึ่งให้ปลอดเชื้อ

- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (minimal glucose agar plate)

<u>วิธีทำ</u>

ผสม 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายไบโอติน กับ 0.1 มิลลิลิตรของเชื้อ overnight culture of bacteria ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 2 มิลลิลิตรของสารละลาย top agar (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) เขย่าโดยหมุนในอุ้งมือไปมา 4-5 วินาที เทลงบนอาหาร minimal glucose agar plate หมุนจานเลี้ยงเชื้อให้สารละลายกระจายสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บในลักษณะที่ตั้งจานเลี้ยงกลับด้าน (invert) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เตรียมหลอดทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 อีกครั้ง เติม 0.1 มิลลิลิตร สารละลายฮิสทีดีนลงไปด้วย เขย่า เติม 2 มิลลิลิตร สารละลาย top agar (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) เขย่าแล้วเทลงในอาหาร minimal glucose agar plate หลังจากนั้นนำไปไว้ในตู้อบเช่นเดียวกัน

การตรวจ rfa mutation

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

- สารละลาย crytal violet เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- กระดาษกรองตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิลิตร ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- สารละลาย top agar ที่นึ่งปลอดเชื้อแล้ว ในการทดลองต้องให้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส และเติมสารละลายผสมของ 0.5 มิลลิโมล่าร์ฮิสทีดีนและไบโอติน ลงในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของ top agar

<u>วิธีทำ</u>

ใส่ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 2 มิลลิลิตร top agar (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) แล้วเทลงในอาหาร minimal glucose agar ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ ค่อยๆ วางกระดาษกรองที่เตรียมไว้ โดยกดลงบนผิววุ้นเล็กน้อย หยดสารละลาย crystal violet 10 ไมโครลิตรลงบนกระดาษกรอง นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำจานเลี้ยงเชื้อออกมาตรวจดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ให้สังเกตว่ารอบๆกระดาษกรองที่หยด crystal violet จะเห็นเป็นวงกลมลักษณะใส เรียกว่า clear zone เนื่องจากส่วนนี้จะไม่มีแบคทีเรียเจริญให้วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมนี้ ควรมีขนาดประมาณ 12-14 มิลลิลิตร จึงถือว่าแบคทีเรียมี rfa mutation อยู่ ถ้าเกิดวงกลมที่มีขนาดเล็กกว่านี้ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีความผิดปกติของคุณสมบัติ เช่น อาจสูญเสีย rfa mutation ควรพิจารณาเตรียมแยกโคโลนีเดี่ยวใหม่

การตรวจ R-factor

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

- สารละลาย ampicillin เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- กระดาษกรองตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

- สารละลาย top agar ที่นึ่งให้ปลอดเชื้อ ในการทดลองต้องให้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส และเติมสารละลายผสมของ 0.5 มิลลิโมล่าร์ฮิสทีดีนและไบโอติน ลงในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของ top agar

<u>วิธีทำ</u>

ใส่ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 2 มิลลิลิตร ของสารละลาย top agar (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) ที่มีส่วนผสมฮิสทีดีนและไบโอติน เขย่าโดยหมุนในอุ้งมือแล้วเทลงในอาหาร minimal glucose agar ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ ค่อยๆวางกระดาษกรองที่เตรียมไว้ โดยกดลงบนผิววุ้นเล็กน้อย หยดสารละลาย ampicillin 10 ไมโครลิตรลงบนกระดาษกรอง นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อออกมาตรวจดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ให้สังเกตว่ารอบๆกระดาษกรอง (ampicillin disc) ไม่ควรจะเกิดโซนใส (clear zone) ถ้าเกิดแสดงว่ายา ampicillin ไปฆ่าแบคทีเรียรอบๆจึงไม่มีการเจริญ แสดงว่าแบคทีเรียขาดคุณสมบัติการมี R-factor

การตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน (sensitivity to standard mutagens)

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมล่าร์, pH 7.4
- สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-aminoanthracene 2-acrylamide
- สารละลายผสมเอ็นไซม์ (S9 mixture)[3]
- แบคทีเรีย *S. typhimurium* TA 98 และ TA 100 ที่บ่มไว้ 1 คืน
- สารละลาย top agar ที่นึ่งให้ปลอดเชื้อ อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเติมสารละลายผสมของ 0.5 มิลลิโมล่าร์ฮิสทีดีนและไบโอติน ลงไปในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของ top agar
- อาหาร minimal glucose agar plate

<u>วิธีทำ</u>

ผสม 0.05 มิลลิลิตร ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานกับ 0.5 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ เมื่อไม่ต้องการกระตุ้นด้วยเอ็นไซม์ หรือ 0.5 มิลลิลิตร สารละลายผสมเอ็นไซม์ (S9 mixture) เมื่อต้องการกระตุ้นด้วยเอ็นไซม์ เติม 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลง

[3] S9 mixture คือ เอนไซม์จากตับหนูใช้เพื่อจำลองให้เกิดกระบวนการเมแทบอลึซึมในแบคทีเรีย

ไป เขย่าให้เข้ากัน เติม 2 มิลลิลิตร top agar (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) ซึ่งเติมสารละลายผสมฮิสทีดีนและไบโอตินลงไปแล้วเขย่าโดยหมุนไปมาในอุ้งมือ 4-5 วินาที เทลงในอาหาร minimal glucose agar plate รอจนผิววุ้นแข็ง จึงนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวางแบบกลับด้านเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์กลับคืน (revertant colonies)

การตรวจการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีตามธรรมชาติ

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมล่าร์, pH 7.4
- สารละลายผสมเอ็นไซม์ (S9 mixture)
- overnight culture ของแบคทีเรีย TA 98 และ TA 100
- สารละลาย top agar ที่นึ่งให้ปลอดเชื้อ อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเติมสารละลายผสมของ 0.5 มิลลิโมล่าร์ฮิสทีดีนและไบโอติน ลงไปในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของ top agar
- อาหาร minimal glucose agar plate

<u>วิธีทำ</u>

เติม 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 จากนั้นเติม 2 มิลลิลิตร top agar (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) ที่มีส่วนผสมฮิสทีดีนและไบโอติน แล้วเทลงในอาหาร minimal glucose agar plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง เตรียมหลอดทดลองที่มี 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียอีกครั้ง เติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายเอ็นไซม์ (S9 mixture) จากนั้นเติม 2 มิลลิลิตร top agar (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) ที่มีส่วนผสมฮิสทีดีนและไบโอติน แล้วเทลงในอาหาร minimal glucose agar plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง นำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปวางในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วางแบบกลับด้านเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เห็นด้วยตาเปล่าซึ่งเป็นโคโลนีกลายพันธุ์กลับคืนตามธรรมชาติ

2.5 การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากกระดาษกรองเก็บอากาศโดยวิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีทดสอบเอมส์

เตรียมหลอดทดลอง 2 ชุด ชุดที่ 1 สำหรับทดสอบในภาวะที่ไม่ต้องการเอนไซม์ (S9 mix) [4]และชุดที่ 2 สำหรับทดสอบในภาวะที่ต้องการเอนไซม์ (S9 mix)[5] เพื่อโดยแต่ละชุดประกอบด้วย

- สารสกัดจากกระดาษกรองที่จะทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง
- สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน AF-2 สำหรับเป็นสารควบคุมบวก (positive control) ในการทดสอบภาวะที่ไม่ต้องการเอนไซม์ (S9 mix)
- สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-AA สำหรับเป็นสารควบคุมบวก (positive control) ในการทดสอบภาวะที่ต้องการเอนไซม์ (S9 mix) และที่ความเข้มข้นของสารเคมี = 0 เติม 50 ไมโครลิตร ของ DMSO แทน (หลอดทดลองนี้จะบอกค่าโคโลนีกลายพันธุ์กลับคืนตามธรรมชาติ (background หรือ spontaneous reversion ของแบคทีเรียที่ใช้ทดลอง))

<u>วิธีทำทำตามขั้นตอนดังนี้</u>

ทำการเจือจางสารสกัดจากตัวอย่างเป็น 1:10 , $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ และ $1:10^6$ ดูดเชื้อแบคทีเรียจากหลอดทดสอบและสารสกัดจากตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาทดสอบโดยหยดลงบนจานอาหาร minimal glucose agar plate ทั้งหมด 5 จุดใน 1 จาน โดยหยดจุดละ 0.02 มิลลิลิตร วางจานไว้จนน้ำซึมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 30 นาที นำชุดทดสอบทั้ง 2 ชุดไปเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเช็ดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียชนิดอื่นโดยการนำอาหาร minimal glucose agar plate ที่ปราศจากเชื้อบ่มพร้อมกับชุดการทดสอบทั้ง 2 ชุด (ถ้า อาหาร minimal glucose agar plate ที่ปราศจากเชื้อมีเชื้อเจริญแสดงว่าในขั้นตอนการทดลองมีการปนเปื้อนจะไม่นำการทดลองในครั้งนั้นมาตรวจวัดจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (mutant colonies)) เมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำจานเลี้ยงเชื้อออกมานับ mutant colonies ตรวจดู Killing effect [6]ซึ่งอาจเกิดจากสารที่นำมา

---

[4]ภาวะที่ไม่ต้องการเอนไซม์ (S9 mix) เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์ทางอ้อมโดยไม่มีกระบวนการเมแทบอลึซึมในร่างกายเข้ามาเกี่ยวข้อง

[5] ภาวะที่ต้องการเอนไซม์ (S9 mix) เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์ที่เกิดในร่างกายโดยตรงซึ่งมีกระบวนการเมแทบอลึซึมในร่างกายเข้ามาเกี่ยวข้อง

[6] killing effect คือ สารที่นำมาทดลองเกิดความเป็นพิษต่อแบคทีเรียเมื่อส่องดูด้วยกล้อง stereomicroscope จะเห็นจุดเล็กๆอยู่เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดลองเกิดความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย โดยใช้กล้อง stereomicroscope[7] (plate ที่พบ Killing effect จะไม่นำมาใช้ในการนับผลการทดลอง) นำจำนวนโคโลนีที่ได้แต่ละความเข้มข้นลบด้วยโคโลนีกลายพันธุ์กลับคืนตามธรรมชาติ ซึ่งได้จากการทดลองที่ใส่เฉพาะ DMSO แทนสารสกัด หาค่าเฉลี่ย (mean) ของโคโลนีกลายพันธุ์ (mutant colonies) โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 6 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นไปคำนวณหาค่าดัชนีการก่อกลายพันธุ์ ดังสมการต่อไปนี้

Mutagenicity index :

$$\text{Mutagenicity index} = \frac{\text{Colony counts on the test plate}}{\text{Average count on the control plates}}$$

A ratio ≥ 2 is generally considered positive, < 2 is negative

2.6 หาค่าสหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานคร 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในฝุ่นละอองที่วัดด้วยเครื่อง GC/MS-Ion-Trap Varian Saturn 2200 โดยใช้เครื่องมือทางสถิติแบบ Pearson correlation

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ซอฟท์แวร์สถิติโปรแกรม SPSS คำนวณผล โดยใช้สถิตแบบ pearson correlation (SPSS 15.0 for windows evaluation version) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$ และ $p < 0.05$

ก่อนทำการวิเคราะห์ต้องคำนวณค่าดัชนีการก่อกลายพันธุ์ทั้ง 7 พื้นที่ที่ทดสอบว่าอยู่ในช่วงเดียวกับ background (BG) หรือไม่ สามารถคำนวณได้จาก standard deviation (SD) ดังนี้

$(SD_{BG} \times 3) + MI_{BG} \leq MI_{samples}$ ไม่อยู่ช่วงเดียวกับ background นำพื้นที่นั้นมาวิเคราะห์

$(SD_{BG} \times 3) + MI_{BG} \geq MI_{samples}$ อยู่ช่วงเดียวกับ background ไม่นำพื้นที่นั้นมาวิเคราะห์

[7] stereomicroscope ใช้สำหรับตรวจดูสิ่งที่มีขนาดเล็ก

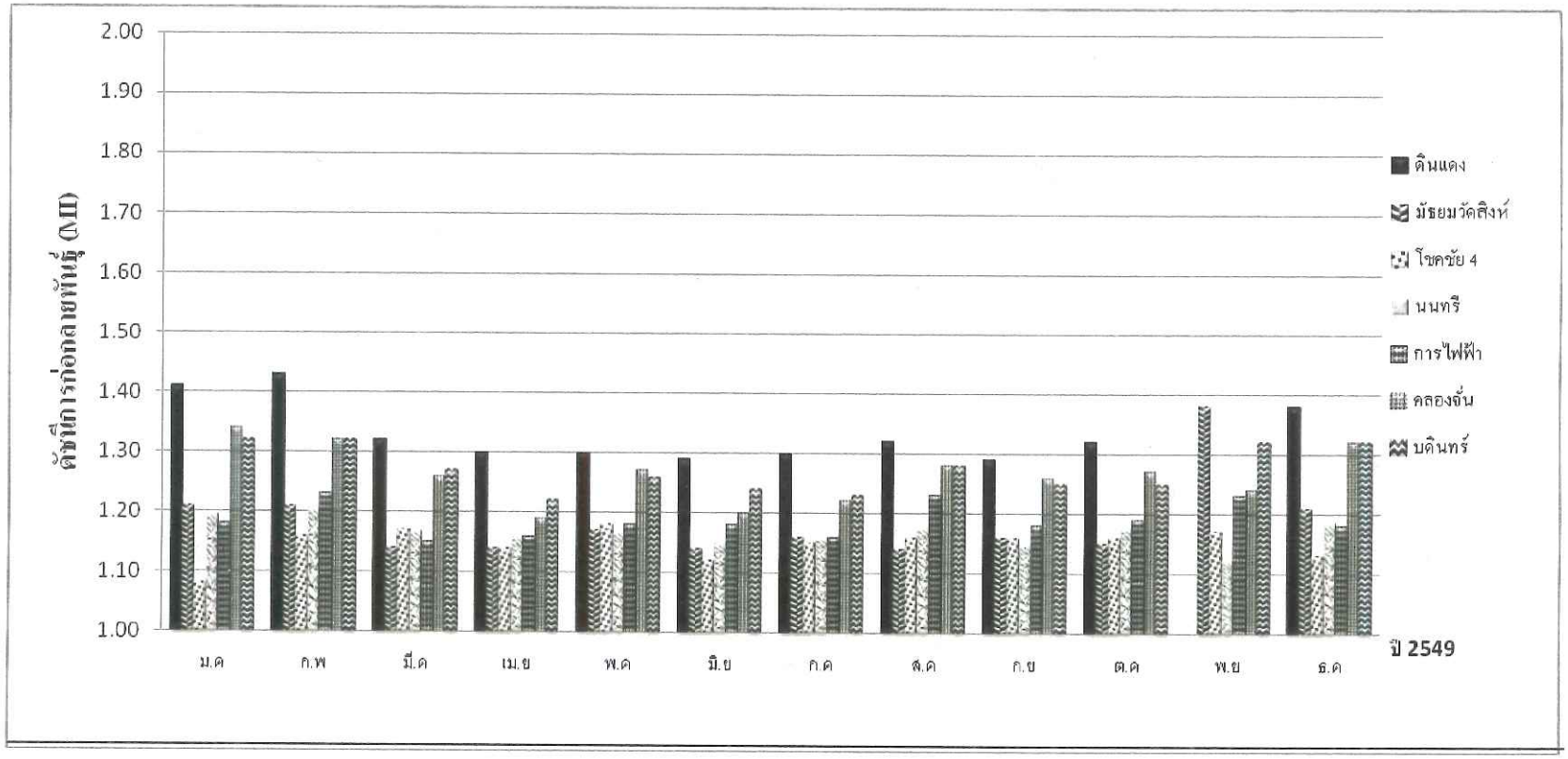
บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนของเขตกรุงเทพมหานคร ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากการทดสอบเอมส์โดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ในการทดสอบ แบ่งรูปแบบของการศึกษาตาม 4 ตัวแปรคือสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ได้แก่ สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ทั้งในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้ S9 mixture มีผลการศึกษาดังต่อไปนี้

3.1 ผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละออง PM_{10} ของกรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่าง

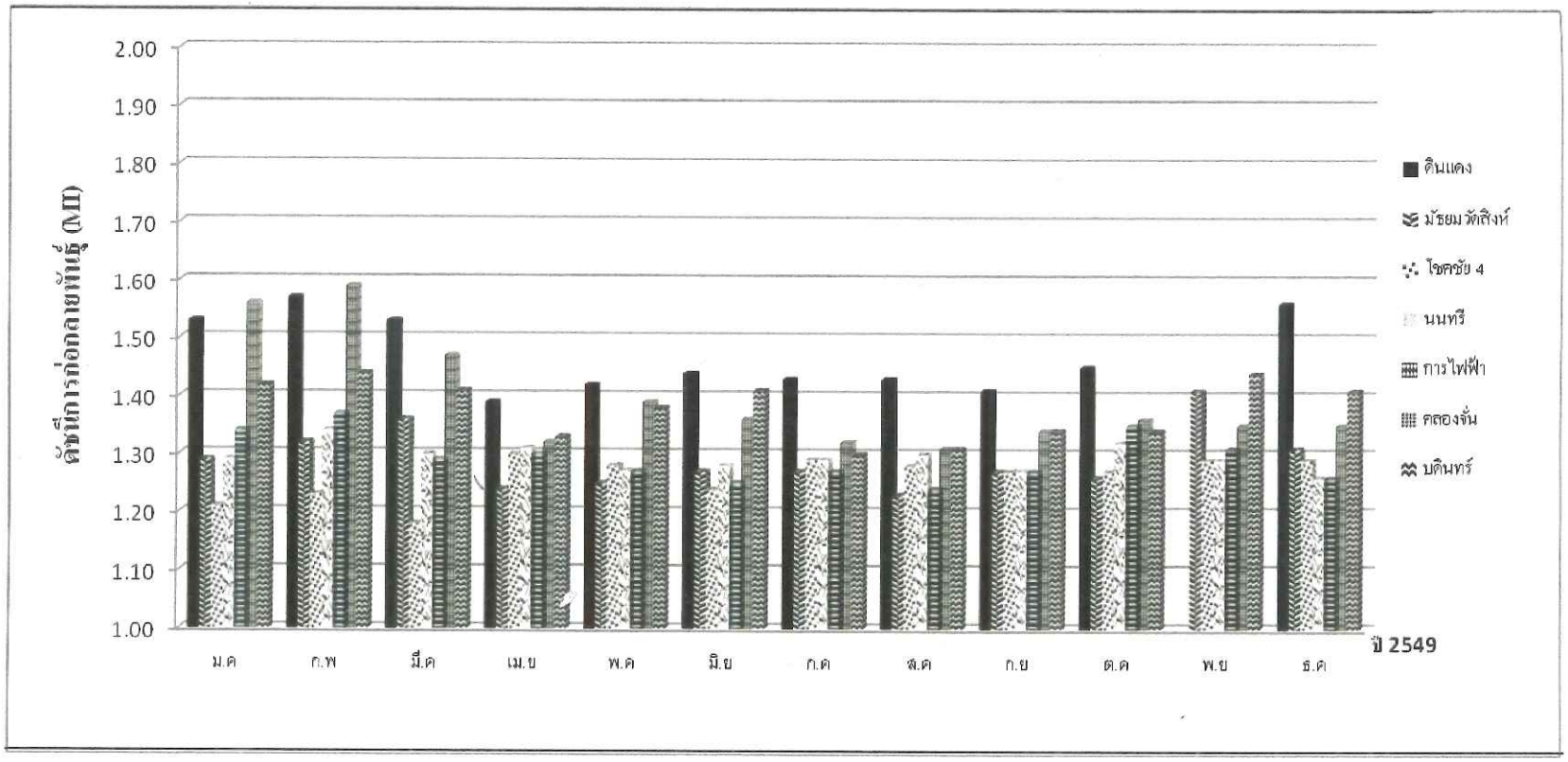
จากผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (PM_{10}) ของกรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างด้วยวิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีทดสอบเอมส์โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้ S9 mixture โดยวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดจากฝุ่นละออง PM_{10} ของกรุงเทพมหานครช่วงเดือน มกราคม - ธันวาคม พ.ศ.2549 โดยเก็บตัวอย่างอากาศจาก 7 จุดตัวอย่าง ได้แก่ การเคหะชุมชนดินแดง โรงเรียนสิงหราชพิทยา สถานีตำรวจนครบาลโชคชัย 4 โรงเรียนนนทรีวิทยา การไฟฟ้าย่อยธนบุรี การเคหะชุมชนคลองจั่น และโรงเรียนบดินทรเดชา เก็บโดยกรมควบคุมมลพิษ ผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ด้วยเชื้อที่ดัดแปลงจากวิธีทดสอบเอมส์โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture) พบว่าค่าดัชนีการก่อกลายพันธุ์มีค่าน้อยกว่า 2 เท่าของจำนวนการก่อกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติทั้งที่ทดสอบด้วยสายพันธุ์ TA98 และ TA100 แสดงผลการทดสอบดังรูปที่ 3-1, 3-2, 3-3 และ 3-4 ตามลำดับ



รูปที่ 3-1 ผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนของกรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างช่วงเดือน มกราคม - ธันวาคม พ.ศ.2549 ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)

หมายเหตุ: พื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงเดือนพฤศจิกายนไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากกระดาษกรองอากาศมีไม่สมบูรณ์

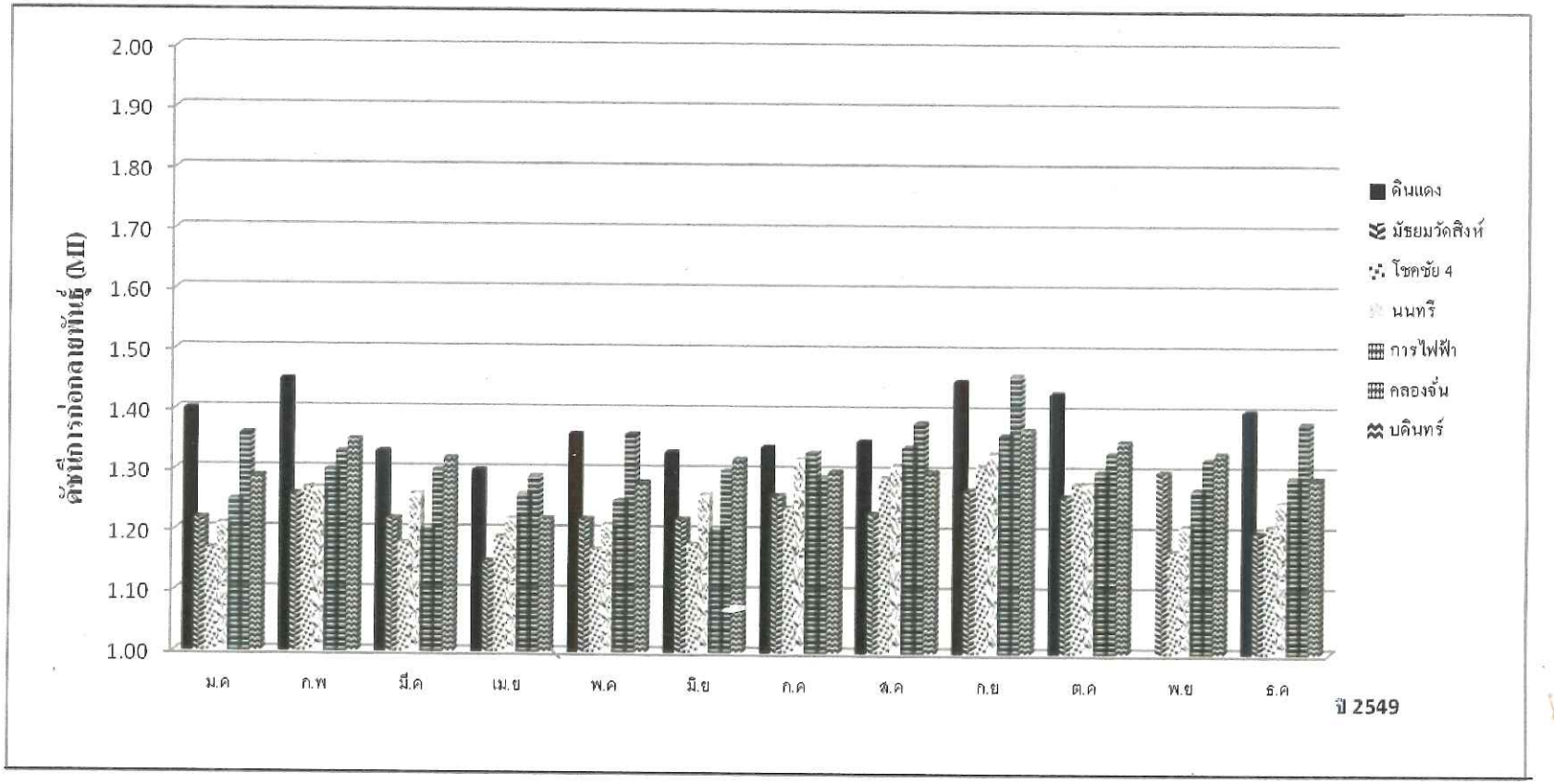
ผลการทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture) ตัวอย่างสารสกัดจากกระดาษกรองอากาศของสถานีตรวจวัดคุณภาพอากาศของกรมควบคุมมลพิษทั้ง 7 สถานีไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนแปลง (เพิ่มหรือลด) จำนวนคู่เบสในดีเอ็นเอ (frameshift mutation) และเมแทบอไลต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากตับหนูไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์



รูปที่ 3-2 ผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนของกรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างช่วงเดือน มกราคม - ธันวาคม พ.ศ.2549 ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ไม่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)

หมายเหตุ: พื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงเดือนพฤศจิกายนไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากกระดาษกรองอากาศมีไม่สมบูรณ์

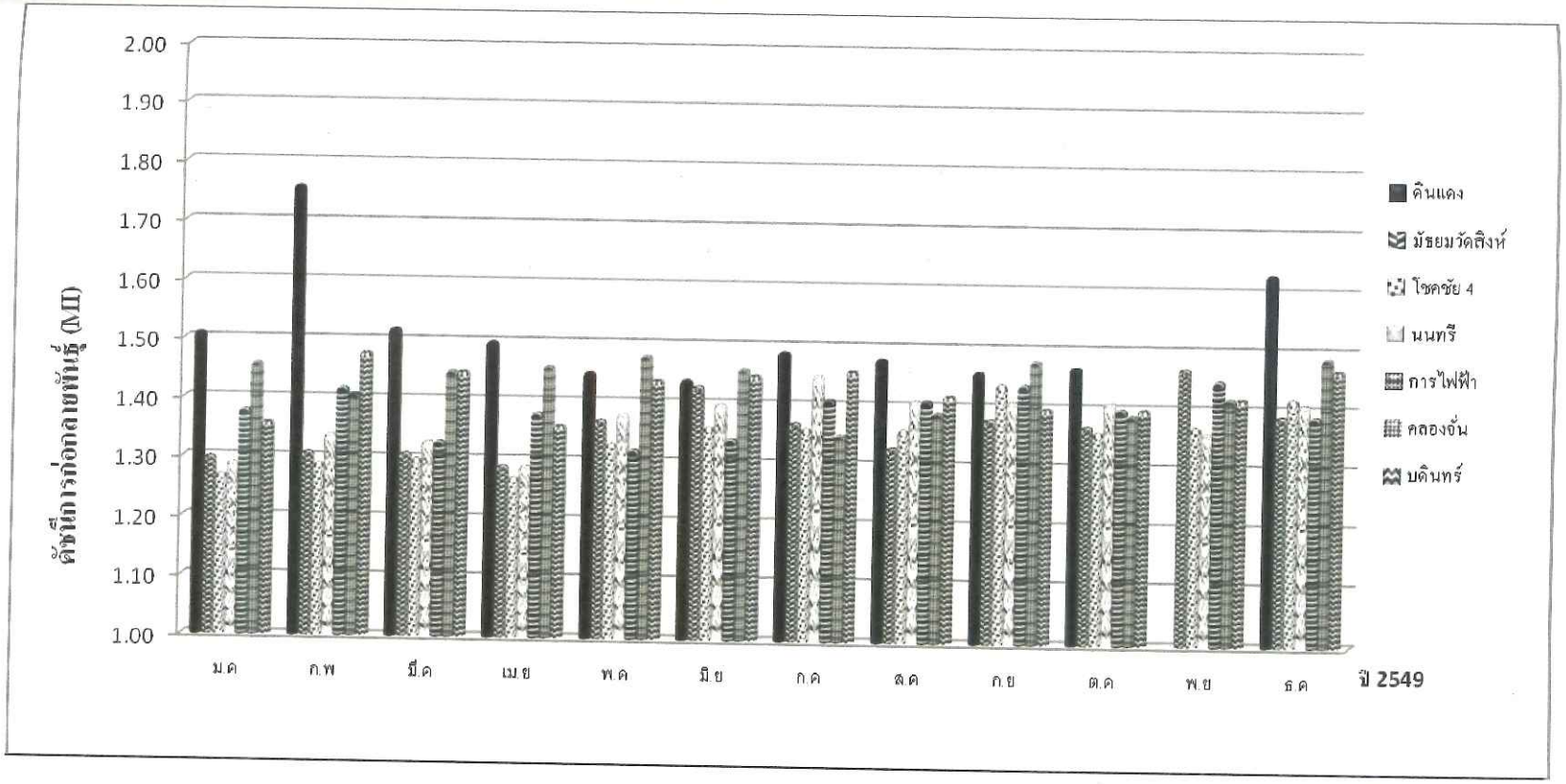
ผลการทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ไม่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture) ตัวอย่างสารสกัดจากกระดาษกรองอากาศของสถานีตรวจวัดคุณภาพอากาศของกรมควบคุมมลพิษทั้ง 7 สถานีไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนแปลง (เพิ่มหรือลด) จำนวนคู่เบสในดีเอ็นเอ (frameshift mutation)



รูปที่ 3-3 ผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนของกรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างช่วงเดือน มกราคม - ธันวาคม พ.ศ.2549 ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะที่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)

หมายเหตุ: พื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงเดือนพฤศจิกายนไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากกระดาษกรองอากาศมีไม่สมบูรณ์

ผลการทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะที่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture) ตัวอย่างสารสกัดจากกระดาษกรองอากาศของสถานีตรวจวัดคุณภาพอากาศของกรมควบคุมมลพิษทั้ง 7 สถานี ไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบที่ทำให้คู่เบสเดิมถูกแทนที่ด้วยคู่เบสอื่นแต่จำนวนของคู่เบสยังคงเท่าเดิม (base-pair substitution mutation) และเมแทบอไลต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากตับหนูไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์



รูปที่ 3-4 ผลการทดสอบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนของกรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างช่วงเดือน มกราคม - ธันวาคม พ.ศ.2549 ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ไม่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)

หมายเหตุ: พื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงเดือนพฤศจิกายนไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากกระดาษกรองอากาศมีไม่สมบูรณ์

ผลการทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะที่ไม่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture) ตัวอย่างสารสกัดจากกระดาษกรองอากาศของสถานีตรวจวัดคุณภาพอากาศของกรมควบคุมมลพิษทั้ง 7 สถานีไม่แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบที่ทำให้คู่เบสเดิมถูกแทนที่ด้วยคู่เบสอื่นแต่จำนวนของคู่เบสยังคงเท่าเดิม (base-pair substitution mutation)

เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาเปรียบเทียบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในแต่ละพื้นที่ทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่าง พบว่าเดือนมกราคม – ธันวาคม พื้นที่การเคหะชุมชนดินแดนมีดัชนีการก่อพันธุ์สูงกว่าพื้นที่การศึกษาอื่นทั้ง 4 ชุดการทดสอบที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้ S9 mixture อาจเนื่องมาจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างของการเคหะชุมชนดินแดงอยู่บริเวณริมถนน ประกอบกับข้อมูลจากการติดตามตรวจสอบโดยสถานีตรวจวัดคุณภาพอากาศแบบอัตโนมัติของกรมควบคุมมลพิษ พบว่าถนนสายดินแดงมีปัญหาฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนสูงเกินมาตรฐานมากกว่าพื้นที่เก็บตัวอย่างอีก 6 จุด (รายงานสรุปสถานการณ์มลพิษของประเทศไทยปี 2549 ของกรมควบคุมมลพิษ) ซึ่งสาเหตุเนื่องมาจากมีกิจกรรมก่อสร้างปรับปรุงถนนส่งผลให้เกิดการจารจรติดขัด จึงเกิดการสะสมของมลพิษทางอากาศที่เกิดจากยวดยานพาหนะมากกว่าบริเวณพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างบริเวณอื่นและอาจเกิดจากกิจกรรมการซ่อมบำรุง และปรับปรุงถนนที่ก่อให้เกิดฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนเพิ่มมากขึ้นกว่าบริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณอื่น ดังนั้นดัชนีการก่อกลายพันธุ์ที่ตรวจพบในเขตพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงจึงมีค่าสูงตามไปด้วย

3.2 การเปรียบเทียบดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในอนุภาคฝุ่นละออง PM_{10} ของ 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชน

จากผลการศึกษาดัชนีการเกิดกลายพันธุ์ในหัวข้อ 3.1 พบว่าพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงมีค่าดัชนีการเกิดกลายพันธุ์สูงที่สุดตลอดทั้งปี 2549 ส่วนอีก 6 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ โรงเรียนสิงหราชพิทยา สถานีตำรวจนครบาลโชคชัย 4 โรงเรียนนนทรีวิทยา การไฟฟ้าย่อยธนบุรี การเคหะชุมชนคลองจั่น และโรงเรียนบดินทรเดชา มีค่าดัชนีการเกิดกลายพันธุ์ใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมากนัก ถึงแม้ว่าการเคหะชุมชนดินแดงจะมีค่าดัชนีการกลายพันธุ์สูงกว่าที่อื่นแต่จะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่นั้นจะต้องทำการทดสอบโดยใช้เครื่องมือทางสถิติ ดังนั้นในหัวข้อนี้จะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้สถิติ oneway-ANOVA [1] มาใช้เพื่อวิเคราะห์ความ

---

[1] oneway-ANOVA คือการทดสอบของตัวอย่างที่มีมากกว่า 2 กลุ่ม เป็นการแยกความแปรปรวนออกตามสาเหตุที่ทำให้เกิดการแปรปรวน ตัวแปรที่ใช้ในการวิเคราะห์อย่างน้อยต้องมี 2 ตัวแปร คือต้องมีตัวแปรระบุกลุ่ม และตัว

แตกต่างของพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้ง 7 จุดว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$หรือไม่

ผลจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้สถิติ oneway-ANOVA ของพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ พบว่าทั้ง 4 ชุดการทดสอบที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้ S9 mixture พื้นที่การเคหะชุมชนดินแดนมีความแตกต่างกับพื้นที่เก็บตัวอย่างอีก 6 พื้นที่อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงเป็นพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์มากกว่าพื้นที่อื่นๆ

3.3 การเปลี่ยนแปลงของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละออง PM_{10} ของ 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษในแต่ละเดือน

ผลการเปลี่ยนแปลงของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคฝุ่นละออง PM_{10} ของพื้นที่กรุงเทพมหานคร 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษในแต่ละเดือน โดยใช้ oneway-ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ แสดงดังต่อไปนี้

3.3.1 ผลการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงดัชนีการก่อกลายพันธุ์ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)

ทดสอบในสภาวะที่ใช้ S9 mixture พบว่าการเปลี่ยนแปลงดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในแต่ละเดือนของพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.05$

ทดสอบในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture พบว่าการเปลี่ยนแปลงดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในแต่ละเดือนของพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงช่วงเดือนมกราคม, กุมภาพันธุ์และธันวาคมมีความแตกต่างกับช่วงเดือนมีนาคม – ตุลาคมที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ในขณะที่อีก 6 จุดเก็บตัวอย่างไม่มีความแตกต่าง

3.3.2 ผลการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงดัชนีการก่อกลายพันธุ์ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้เอนไซม์จากตับหนู (S9 mixture)

แปรที่ต้องการวิเคราะห์ ลักษณะของข้อมูลจะเป็นลักษณะเดียวกับที่ใช้ในการวิเคราะห์ Independent samples T-test

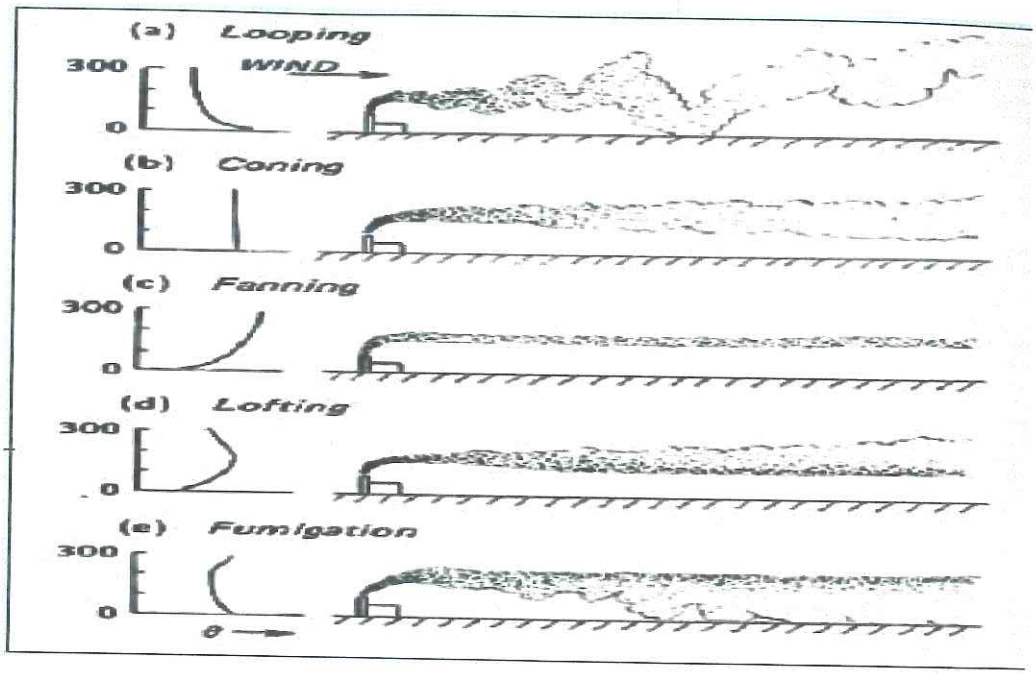
ทดสอบในสภาวะที่ใช้ S9 mixture พบว่าการเปลี่ยนแปลงดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในแต่ละเดือนของพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

ทดสอบในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture พบว่าการเปลี่ยนแปลงดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในแต่ละเดือนของพื้นที่กรุงเทพมหานครทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.05$

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงดัชนีการเกิดกลายพันธุ์ในแต่ละเดือนของตัวอย่างอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้สถิติ oneway-ANOVA ของพื้นที่เขตเมืองกรุงเทพมหานครเก็บตัวอย่างอากาศระหว่างเดือน มกราคม - ธันวาคม พ.ศ.2549 โดยเก็บตัวอย่างอากาศจาก 7 จุด ได้แก่ การเคหะชุมชนดินแดง (ริมถนน) โรงเรียนสิงหราชพิทยา (ชุมชน) สถานีตำรวจนครบาลโชคชัย 4 (ริมถนน) โรงเรียนนนทรีวิทยา (ชุมชน) การไฟฟ้าย่อยธนบุรี (ริมถนน) การเคหะชุมชนคลองจั่น (ชุมชน) และโรงเรียนบดินทรเดชา (ชุมชน) พบว่าสถานีตรวจวัดการเคหะชุมชนดินแดง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.05$ ที่ทดสอบด้วยแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ทดสอบในสภาวะไม่ใช้ S9 mixture ช่วงเดือนที่มีความแตกต่างของจุดตรวจวัดการเคหะชุมชนดินแดงจะอยู่ในช่วงเดือนธันวาคม, มกราคม และกุมภาพันธ์ ช่วงเดือนที่มีความแตกต่างดังกล่าวคือช่วงที่อยู่ในฤดูหนาว ดังนั้นในช่วงฤดูหนาวของพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงประชาชนจะมีโอกาสได้รับสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์มากกว่าพื้นที่อื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.05$

เนื่องจากกรุงเทพมหานครตั้งอยู่ในเขตอิทธิพลของลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้และอิทธิพลของลมทะเล อุณหภูมิสูงสุดในเดือนเมษายนเฉลี่ยแล้วสูงถึง 43 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิต่ำสุดอยู่ที่เดือนธันวาคมเฉลี่ย 20.8 องศาเซลเซียส ฤดูร้อนมีความชื้นในอากาศสูง เนื่องจากอิทธิพลจากชายทะเลและลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้มีปริมาณฝนตกมากช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดปี 2549 เท่ากับ 1,445.01 มิลลิเมตร เฉลี่ยฝนตกต่อปี 98 วัน เดือนกันยายนเป็นเดือนซึ่งมีน้ำฝนมากที่สุด และเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์เป็นช่วงเดือนที่มีปริมาณฝนน้อยที่สุดลักษณะทางภูมิอากาศเป็นแบบมรสุมมี 3 ฤดู คือ ฤดูร้อน ฤดูฝนและฤดูหนาว โดยช่วงเดือนพฤศจิกายน – กุมภาพันธ์ มีสภาพอากาศเป็นฤดูหนาว (อุณหภูมิเฉลี่ย 20 องศาเซลเซียส) ในขณะที่ช่วงเดือนมีนาคม – พฤษภาคม เป็นช่วงฤดูร้อน (อุณหภูมิเฉลี่ย 34 องศาเซลเซียส) และในช่วงเดือนมิถุนายน – ตุลาคมจัดว่าเป็นช่วงของฤดูฝน (อุณหภูมิเฉลี่ย 25 องศาเซลเซียส) จากผลการทดลองที่ได้คือในช่วงฤดูหนาวดัชนีการก่อกลายพันธุ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.05$ กับฤดูฝนและฤดูร้อน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา PM_{10} จากผู้ที่มารับการรักษาโรคหอบ

หืดของประชากร Anchorage เมือง Alaska ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำการตรวจวัด PM_{10} ด้วยเครื่อง Anderson air sampler พบว่าจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นตามปริมาณ PM_{10} ที่เพิ่มขึ้นและตรวจพบปริมาณ PM_{10} มากที่สุดในช่วงฤดูหนาว (Choudhury *et al.*, 1997) ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้สามารถอธิบายผลการทดลองได้ดังนี้ คือ ในฤดูหนาวมลพิษต่างๆที่ปลดปล่อยออกมาจากแหล่งกำเนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านไปยังชั้นบรรยากาศที่สูงขึ้นได้ เนื่องจากความหนาแน่นของมวลอากาศจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิของอากาศลดต่ำลงส่งผลให้ความหนาแน่นของชั้นบรรยากาศใกล้พื้นโลกหรือ Atmospheric Boundary Layer มีขนาดเล็กลงตามสัดส่วนทำให้สามารถตรวจพบสารมลพิษในปริมาณที่สูงขึ้น นอกจากนี้อากาศเย็นในช่วงฤดูหนาวยังไปทำให้เกิดการชะลอปฏิกิริยาทางเคมีของสารมลพิษในชั้นบรรยากาศทำให้ปริมาณการตกค้างในอากาศสูงกว่าในฤดูอื่นๆ และในทางกลับกันอุณหภูมิที่สูงขึ้นในฤดูร้อนซึ่งในช่วงเดือนมีนาคม – พฤษภาคม ที่ทำการเก็บตัวอย่างอุณภูมิเฉลี่ยสูงสุดคือ 43 องศาเซลเซียสทำให้ความหนาแน่นของมวลอากาศลดลงส่งผลให้มวลอากาศลอยตัวสูงขึ้น และความหนาของชั้นบรรยากาศใกล้พื้นโลกก็มีขนาดเพิ่มขึ้นด้วย ทำให้สารมลพิษเจือจางลง และนอกจากนี้เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นและปริมาณรังสี UV ที่มีมากในช่วงฤดูร้อนมีส่วนช่วยย่อยปฏิกิริยาย่อยสลายทางเคมีและแสง (Photochemical Decomposition) ส่งผลให้สารมลพิษในช่วงฤดูร้อนมีค่าต่ำสุด ส่วนในฤดูฝนน้ำฝนสามารถชะล้างสารมลพิษและฝุ่นละอองต่างๆให้ตกลงมากับน้ำฝน (Wet Deposition) ทำให้สารมลพิษที่ตรวจวัดในอากาศนั้นลดลงด้วยจึงทำให้สารมลพิษทางอากาศที่ตรวจพบลดน้อยลง จากข้อมูลการประเมินการแพร่กระจายของมลพิษทางอากาศเพื่อดูผลกระทบของมลพิษและทิศทางสู่ผู้รับและสิ่งแวดล้อมการแพร่กระจายของมลพิษทางอากาศในพื้นที่กรุงเทพมหานครมีตัวกำหนดสำคัญคือปัจจัยที่เรียกว่า 'เสถียรภาพของบรรยากาศ' (Atmospheric stability) ความหมายคือการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตามความสูงซึ่งโดยปกติอากาศเย็นลงเมื่อห่างพื้นดินสูงขึ้นไป เว้นแต่เมื่อได้รับความร้อนจากกระบวนการแผ่รังสีโดยสภาพภูมิประเทศที่ดูดกลืนรังสีแสงอาทิตย์ แล้วคายความร้อนออกมาด้วยอัตราต่างๆ กัน หรือเกิดจากอิทธิพลของความกดอากาศตัวอย่างของอิทธิพลของเสถียรภาพของบรรยากาศต่อการแพร่กระจายมลพิษจากปากปล่อง อธิบายดังรูปที่ 3-5 ด้านขวาสังเกตรูปทรงของพวยอากาศสัมพันธ์กับความสูงของปล่องกับการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิตามความสูงที่ระดับต่างๆ กันตามเส้นกราฟที่แสดง



รูปที่ 3-5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตามความสูงตามกราฟ (ซ้าย) แกนนอนคืออุณหภูมิ แกนตั้งคือความสูง เสถียรภาพของบรรยากาศกำหนดรูปร่างของมลพิษที่ออกจากปากปล่อง (ขวา) ซึ่งบ่งบอกการแพร่กระจายมลพิษ กรณีที่มักเป็นปัญหาคือ ข้อ (e) ฟูมิเกชั่น (Fumigation)
(ที่มา: Oke T.K, 1987)

3.4 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละออง PM_{10} ในตัวอย่างอากาศ 7 จุดเก็บตัวอย่างกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในฝุ่นละออง

จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละออง PM_{10} ในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานคร 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในฝุ่นละอองที่วัดด้วยเครื่อง GC/MS-Ion-Trap Varian Saturn 2200 โดยใช้เครื่องมือทางสถิติแบบ Pearson correlation พบว่าจากรายงานสถานการณ์มลพิษทางอากาศปี 2549 พบว่าตั้งแต่ปี 2538-2549 มลพิษทางอากาศบริเวณริมถนนจะมีค่าความเข้มข้นสูงกว่าบริเวณชุมชนเสมอ เนื่องจากบริเวณริมถนนมีสารมลพิษที่เกิดจากการเผาไหม้ของสารประกอบที่ไม่สมบูรณ์ของสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลจากท่อไอเสียของยานพาหนะและสารมลพิษสำคัญที่เกิดจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของเครื่องยนต์คือสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติก

ไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นสารกลุ่มสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง (Carcinogen) และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในมนุษย์ (Ruchirawat *et al.*, 2005)

ตาราง 3-1 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนคำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS

สถานี	PAHs	(r) TA98(-S9)	(r) TA98(+S9)	(r) TA100(-S9)	(r) TA100(+S9)
DD	Phe	.411	.417	.641*	.158
	An	.396	.408	.176	.110
	Fluo	.368	.290	.786**	.117
	Pyr	.116	.015	.731*	-.018
	Total PAHs	.328	.273	.755*	.090
SPS	Phe	NA	NA	.374	.671*
	An	NA	NA	.417	.437
	Fluo	NA	NA	.242	.723**
	Pyr	NA	NA	.260	.698*
	Total PAHs	NA	NA	.249	-.257
CC4	Phe	NA	NA	-.112	.463
	An	NA	NA	.083	.499
	Fluo	NA	NA	-.129	.413
	Pyr	NA	NA	-.086	.334
	Total PAHs	NA	NA	.485	-.312
NWS	Phe	NA	.376	.627*	-.468
	An	NA	.362	-.325	-.415
	Fluo	NA	-.051	-.454	-.043
	Pyr	NA	-.123	-.481	-.096
	Total PAHs	NA	.638*	.444	.546

ตาราง 3-1 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนคำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS (ต่อ)

สถานี	PAHs	(r) TA98(-S9)	(r) TA98(+S9)	(r) TA100(-S9)	(r) TA100(+S9)
TSP	Phe	0.534	0.305	0.522	.607*
	An	0.302	0.317	.621*	0.533
	Fluo	0.264	-0.055	0.094	0.014
	Pyr	0.203	0.026	0.456	0.335
	Total PAHs	-0.095	-0.029	0.548	-0.251
KJ	Phe	0.429	0.47	-0.085	0.07
	An	0.163	0.111	-0.081	-0.138
	Fluo	0.252	-0.2	0.233	0.181
	Pyr	0.118	-0.232	0.143	0.143
	Total PAHs	.694*	.710*	0.394	0.293
BDC	Phe	0.386	0.368	-0.091	-0.288
	An	0.349	0.281	0.429	-0.305
	Fluo	.633*	0.481	0.04	0.173
	Pyr	0.462	0.306	-0.034	0.078
	Total PAHs	0.448	0.257	.788*	0.254

*มีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.05$

**มีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.01$

หมายเหตุ : NA = Not Analyzed เนื่องจากพื้นที่เก็บตัวอย่างมีค่าดัชนีการก่อกลายพันธุ์อยู่ในช่วงเดียวกับ background

ผลสหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานคร 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่วัดด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS) โดยใช้เครื่องมือทางสถิติวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์

สหสัมพันธ์ (r) แบบ Pearson correlation พบว่าความสัมพันธ์ของพื้นที่เก็บตัวอย่างระหว่างการเคหะชุมชนดินแดง โรงเรียนสิงหราชพิทยา สถานีตำรวจนครบาลโชคชัย 4 โรงเรียนนนทรีวิทยา การไฟฟ้าย่อยธนบุรี การเคหะชุมชนคลองจั่น และโรงเรียนบดินทรเดชา กับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ได้แก่ Phenanthrene (Phe), Anthracene (An), Fluoranthene (Fluo) และPyrene (Pyr)

- ทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในชุดการทดสอบที่ไม่ใช้ S9 mixture พบความสัมพันธ์ในทิศทางเชิงบวกระหว่างสถานีตรวจวัดกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นดังนี้

สถานีตรวจวัดโรงเรียนบดินทรเดชามีความสัมพันธ์กับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Fluoranthene มีค่า $r = .633$ ที่ระดับ นัยสำคัญ $p < 0.05$

- ทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ในชุดการทดสอบที่ใช้ S9 mixture พบความสัมพันธ์ในทิศทางเชิงบวกระหว่างสถานีตรวจวัดกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นดังนี้

โรงเรียนนนทรีวิทยาการเคหะชุมชนคลองจั่นมีความสัมพันธ์กับ Total PAHs มีค่า $r = .638$ และ $r = .710$ ตามลำดับที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

- ทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ในชุดการทดสอบที่ไม่ใช้ S9 mixture พบความสัมพันธ์ระหว่างสถานีตรวจวัดกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นดังนี้

1. สถานีตรวจวัดการเคหะชุมชนดินแดงมีความสัมพันธ์ในทิศทางเชิงบวกกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Phenanthrene มีค่า $r = .641$, Pyrene มีค่า $r = .731$ และ Total PAHs มีค่า $r = .755$ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ Fluoranthene มีค่า $r = .786$ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$

2. สถานีตรวจวัดโรงเรียนนทรีวิทยามีความสัมพันธ์ในทิศทางเชิงบวกกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Phenanthrene มีค่า $r = .627$ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

3. สถานีตรวจวัดการไฟฟ้าย่อยธนบุรีมีความสัมพันธ์ในทิศทางเชิงบวกกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Anthracene มีค่า $r = .621$ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

4. โรงเรียนบดินทรเดชามีความสัมพันธ์ในทิศทางเชิงบวกกับ Total PAHs มีค่า r = .788 ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

- ทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ในชุดการทดสอบที่ใช้ S9 mixture พบความสัมพันธ์ในทิศทางเชิงบวกระหว่างสถานีตรวจวัดกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเป็นดังนี้

1. สถานีตรวจวัดโรงเรียนสิงหราชพิทยามีความสัมพันธ์กับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Phenanthrene มีค่า r = .671 และ Pyrene มีค่า r = .698 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ Fluoranthene มีค่า r = .723 ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$

2. สถานีตรวจวัดการไฟฟ้าย่อยธนบุรีมีความสัมพันธ์ในทิศทางเชิงบวกกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Phenanthrene มีค่า r = .607 ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

จากผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน ในตัวอย่างอากาศของพื้นที่กรุงเทพมหานคร 7 จุดเก็บตัวอย่างของกรมควบคุมมลพิษที่อยู่บริเวณริมถนนและบริเวณชุมชนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนแสดงให้เห็นว่า

พื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงประชาชนมีโอกาสได้รับสัมผัสสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Phenanthrene, Pyrene , Fluoranthene และ Total PAHs เมื่อดัชนีการก่อกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นโอกาสได้รับสัมผัสสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดจะเพิ่มขึ้นด้วยโดยเฉพาะ Fluoranthene จะมีความสัมพันธ์สูงสุดกับดัชนีการก่อกลายพันธุ์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแหล่งกำเนิดการเผาขยะ การเผาไหม้ไม้และการเผาไหม้ของน้ำมันเชื้อเพลิง (IARC, 1985)

พื้นที่โรงเรียนสิงหราชประชาชนมีโอกาสได้รับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Anthracene, Fluoranthene, Phenanthrene และ Pyrene เมื่อดัชนีการก่อกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นโอกาสได้รับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดจะเพิ่มขึ้นด้วยโดยเฉพาะ Fluoranthene จะมีความสัมพันธ์สูงสุดกับดัชนีการก่อกลายพันธุ์เช่นเดียวกับเขตพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแหล่งกำเนิดการเผาขยะ การเผาไหม้ไม้และการเผาไหม้ของน้ำมันเชื้อเพลิง (IARC, 1985)

พื้นที่โรงเรียนบดินทรเดชาประชาชนมีโอกาสได้รับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนFluoranthene เพิ่มขึ้นเมื่อดัชนีการก่อกลายพันธุ์เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Fluoranthene มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแหล่งกำเนิดการเผาไหม้ของน้ำมันเชื้อเพลิง (IARC, 1985)

พื้นที่สถานีตรวจวัดการไฟฟ้าย่อยธนบุรีประชาชนมีโอกาสได้รับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Anthracene และ Phenanthrene เพิ่มขึ้นเมื่อดัชนีการก่อกลายพันธุ์เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Anthracene และ Phenanthrene มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแหล่งกำเนิดการเผาขยะ (IARC, 1985)

พื้นที่โรงเรียนนทรีวิทยาประชาชนมีโอกาสได้รับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Phenanthrene เพิ่มขึ้นเมื่อดัชนีการก่อกลายพันธุ์เพิ่มสูงขึ้นซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน Phenanthrene มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแหล่งกำเนิดการเผาขยะ (IARC, 1985)

ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ได้แก่ Phenanthrene (Phe), Anthracene (An), Fluoranthene (Fluo) และ Pyrene (Pyr) พบว่า Fluoranthene มีความสัมพันธ์สูงสุดกับดัชนีการก่อกลายพันธุ์ รองลงมาคือ Pyrene, Phenanthrene และ Anthracene ตามลำดับ (ดูจากค่าความสัมพันธ์ (r) จากตารางที่ 3-1) แสดงให้เห็นว่าสารมลพิษที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์มีความสัมพันธ์กับกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิงมากที่สุด (Witting *et al*., 2003; Eom *et al*., 2007; Harvey *et al*., 2002) จากค่าความสัมพันธ์ (r) ตารางที่ 3-1 จะเห็นว่าสารชนิดเดียวกันมีความสัมพันธ์กับการก่อกลายพันธุ์ในต่างพื้นที่แตกต่างกันนั้น เนื่องมาจากสารก่อกลายพันธุ์แต่ละพื้นที่ไม่ได้มีเพียงสารชนิดนั้นชนิดเดียวแต่มีสารก่อกลายพันธุ์อีกหลายชนิดปะปนอยู่ในอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนที่ทดสอบด้วย ดังนั้นดัชนีการก่อกลายพันธุ์แต่ละพื้นที่ที่นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดเดียวกันจึงมีค่า (r) แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ด้วยเช่นกัน

จากการศึกษาในหนูที่ได้รับ Benzo (a) pyrene ร่วมกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งอย่างอ่อนหรือไม่มีฤทธิ์เลย ได้แก่ Fluoranthene และ Pyrene พบว่าสาร 2 ตัวนี้ทำให้ฤทธิ์การก่อมะเร็งของ Benzo (a) pyrene เพิ่มมากขึ้น (Van Duuren *et al*.,1967) ความสามารถในการละลายน้ำ การระเหยเป็นไอ ของ PAHs แต่ละชนิดจะขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างทางเคมี (Mackay and Callcot, 1998) โดยความดันไอและความสามารถในการละลายน้ำจะลดลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่ PAHs มีความดันไอต่ำเมื่ออยู่ในอากาศ

และสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีวงแหวนเบนซีน 3 วง phenanthrene และ anthracene จะอยู่ในวัฏภาคก๊าซ (Mustafa *et al.*, 1999) และ PAHs ที่มีวงแหวนเบนซีน 4 วง หรือมากกว่านั้น Fluoranthene และ Pyrene จะอยู่ในวัฏภาคอนุภาค (Kim *et al.*, 2002) และสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในวัฏภาคอนุภาคเป็นสารก่อมะเร็งได้สูงกว่าสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในวัฏภาคก๊าซ (Greenberg *et al.*, 1985; Nielsen *et al.*, 1996; Kim Oanh *et al.*, 2000) ดังนั้นความสัมพันธ์ของดัชนีการก่อเกิดกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดในครั้งจึงมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับพื้นที่ทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างของพื้นที่เขตเมืองกรุงเทพมหานคร ถ้าหากพบโพลีไซคลิกโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในพื้นที่เก็บตัวอย่างเพิ่มสูงขึ้นจะทำให้ดัชนีการก่อกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

บทที่ 4
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลงานวิจัย

ความสามารถการก่อกลายพันธุ์ของแบคทีเรียในอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนของ 7 เขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ได้แก่ การเคหะชุมชนดินแดง สถานีไฟฟ้าย่อยธนบุรี สถานีตำรวจนครบาลโชคชัย 4 โรงเรียนสิงหราชพิทยาคม โรงเรียนนนทรีวิทยา การเคหะชุมชนคลองจั่น และโรงเรียนบดินทรเดชา แสดงดังนี้

- การวิเคราะห์ความสามารถการก่อกลายพันธุ์ด้วยดัชนีการก่อกลายพันธุ์ พบว่าพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงมีค่าดัชนีการก่อกลายพันธุ์สูงกว่า โรงเรียนสิงหราชพิทยา สถานีตำรวจนครบาลโชคชัย 4 โรงเรียนนนทรีวิทยา การไฟฟ้าย่อยธนบุรี การเคหะชุมชนคลองจั่น และโรงเรียนบดินทรเดชา ทั้ง 4 ชุดการทดสอบที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้ S9 mixture

- การเปรียบเทียบค่าดัชนีการก่อกลายพันธุ์โดยใช้สถิติ oneway-ANOVA ของพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้ง 7 จุดเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าทั้ง 4 ชุดการทดสอบที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้ S9 mixture พื้นที่การเคหะชุมชนดินแดนมีความแตกต่างกับพื้นที่เก็บตัวอย่างอีก 6 พื้นที่อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ แสดงให้เห็นว่าพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงเป็นพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์มากกว่าพื้นที่อื่นๆ

- การวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในแต่ละเดือนของตัวอย่างอนุภาคฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนวิเคราะห์โดยใช้สถิติ oneway-ANOVA ของพื้นที่เขตเมืองกรุงเทพมหานครเก็บตัวอย่างอากาศระหว่างเดือน มกราคม - ธันวาคม พ.ศ.2549 พบว่าช่วงเดือนธันวาคม – กุมภาพันธ์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.05$ กับเดือนมีนาคม – ตุลาคม ในพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงที่ทดสอบด้วยแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ทดสอบในสภาวะไม่ใช้ S9 mixture ช่วงเดือนที่มีความแตกต่างดังกล่าวคือช่วงที่อยู่ในฤดูหนาว ดังนั้นในช่วงฤดูหนาวของพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดงประชาชนมีโอกาสได้รับสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์มากกว่าพื้นที่อื่น ดังนั้นในช่วงฤดูหนาวของพื้นที

การเคหะชุมชนดินแดงประชาชนจะมีโอกาสได้รับสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์มากกว่าพื้นที่อื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.05$

- สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของดัชนีการก่อกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ได้แก่ Phenanthrene (Phe) Anthracene (An) Fluoranthene (Fluo) และ Pyrene (Pyr) พบว่า Fluoranthene มีความสัมพันธ์สูงสุดกับดัชนีการก่อกลายพันธุ์ รองลงมาคือ Pyrene, Phenanthrene และ Anthracene ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารมลพิษที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์มีความสัมพันธ์กับกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันเชื้อเพลิงมากที่สุด (IARC, 1985) และพื้นที่ที่พบ Fluoranthene มีความสัมพันธ์สูงสุดกับดัชนีการก่อกลายพันธุ์คือพื้นที่การเคหะชุมชนดินแดง

4.2 ข้อเสนอแนะ

4.2.1 ควรเก็บตัวอย่างฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนแหล่งกำเนิดอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้ครอบคลุมแหล่งกำเนิดที่มีการปลดปล่อยสารมลพิษที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมะเร็งในมนุษย์

4.2.2 ควรมีการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของของสารสกัดตัวอย่างที่ทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์อื่นเพิ่มเติมเช่น YG1041 YG1042 เป็นต้น เนื่องจากสายพันธุ์ YG1041 จะแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของตัวอย่างสารสกัดที่ทดสอบแบบ framshift mutation เหมือนกับทดสอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ TA98 และ YG1042 จะแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของตัวอย่างสารสกัดที่ทดสอบแบบ base-pair substitution mutation เหมือนกับทดสอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ TA100 เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ต่อสารแขวนลอยในโรงงานยางที่โปแลนด์โดยใช้สายพันธุ์ YG1041 YG1042 ซึ่งเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้พัฒนามาจากสายพันธุ์ TA98 และ TA100 โดยมีเอนไซม์ nitroreductase และ O-acetyltransferase บนพลาสมิดในปริมาณสูง ทำให้มีความไวต่อสารทดสอบกลุ่ม PAHs, nitro-, amino- และ hydroxylamino มากขึ้น (Piekarska and Karpinska-Smulikowska, 2007)

บรรณานุกรม

กมลนารี ลายคราม. 2546. การพัฒนาแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างสารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโรคาร์บอนและฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน บริเวณริมถนนในเขตกรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กรมควบคุมมลพิษ. 2549. รายงานสถานการณ์และการจัดการปัญหามลพิษทางอากาศและเสียงปี พุทธศักราช 2549, สำนักจัดการคุณภาพอากาศและเสียง กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

ณรงค์พันธ์ ฉุนรัมย์. 2552. ความเป็นพิษและองค์ประกอบทางเคมีของอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กในอากาศพื้นที่ตำบลดอนแก้วอำเภอแม่ริมจังหวัดเชียงใหม่. รายงานการวิจัยสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2548. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์จุฬาลงกร์มหาวิทยาลัย. หน้า 74-96.

อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ. 2534. การทดสอบการกลายพันธุ์โดยแบคทีเรียซัลโมเนลลา การประชุมเชิงปฏิบัติการ การทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ สารก่อมะเร็ง และสารก่อวิรูปด้วยวิธีตรวจระยะสั้น หน้า 1-30.

อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ. 2543. ระดับฝุ่นขนาดเล็ก 2.5 และ 10 ไมครอนในอากาศจังหวัดเชียงใหม่ เชียงใหม่เวชสาร 39: 95-100.

Al-Lihaibi, S.S. and L. Al.-Omran. 1996. Petroleum Hydrocarbons in Offshore Sediment from the Gulf. *Mar. Pollut. Bull*. 32: 65-69.

Alsberg, T.U., Stenberg, R., Westerholm, M., Strandell, U.R., Annug, A., Sundvall, L., Romert, V., Burnson, B., Pettersson, R., Toftgard, B., Franzen, M., Jansson, J.A., Gustafsson, K.E., Egeback. and Tejle, G. 1985.Chemical and Biological Characterization of organic material from gasoline exhaust particles. *Environ. Sci Technol*. 19: 43-50.

Ames, B.N. and Whitfield H.J. 1966. Frameshift mutagenesis in Salmonella, Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol*. 23: 221–225.

Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 70: 2281–2285.

Ames, B.N., Lee, F.D. and Durston, W.E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 782–786.

Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347–364.

Angstrom, A., 1929. On the atmospheric transmission of sun radiation and dust in the air. *Geographic Annal.* 2: 156-166.

Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. 1994. Improved method for mutagenicity testing of gaseous compounds by using a gas sampling bag. *Mutat. Res.* 307: 335–344.

Auletta, A.E., Dearfield, K.L. and Cimino, M.C. 1993. Mutagenicity test schemes and guidelines: U.S. EPA Office of Pollution Prevention and Toxics and Office of Pesticide Programs. Environ. *Mol. Mutagen.* 21: 38–45.

Ayrton, A., Neville, S. and Ioannides, C. 1992. Cytosolic activation of 2-aminoanthracene: implications in its use as a diagnostic mutagen in the Ames test. *Mutat. Res.* 265: 1–8.

Awang M.B., Jaafar A.B., Abdullah A.M., Ismail M.B., Hassan M.N., Abdullah R., Johan S. and Noor H., 2000. Air quality in Malaysia: impacts, management issues and future challenges. *Respiro*. 5: 183-86.

Back, S.O., Field, R.A., Goldstone, M.E., Kirk, P.W., Lester J.N. and Perry, R. 1991. Review of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons : Sources, Fats and Behavior. *Water Air and Soil Pollu*. 60: 279-300.

Baumard, P. 1998. Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in Various Marine Organisms in Relation to those in Sediments and to Trophic Level *Mar. Pollut. Bull*. 36: 951-960.

Bernard, D. and H. Pascaline. 1996. Districution and Origin of Hydrocarbons in Sediments from Lagoons with Fringing Mangrove Communities. *Mar. Pollut. Bull*. 32: 734-739.

Blanton, R.H., Myers, M.J. and Bick, P.H. 1988. Modulation of Immunocompetent Cell Populations by Benzo (a) pyrene. *Tosicol. Appl. Pharmacol* 93: 267-274.

Boehm, P.D, and Quinn J.G. 1976. The Effect of Dissolved Organic Matter in Sea Water on the Uptake of Mixed Individual Hydrocarbons and No. 2 Fuel Oil by a Marine Filter-Feeding Bivalve *(Mercenaria mercenaria*). *Estuarine Coastal Mar Sci*. 4: 93-105.

Brunstrom, B., Hakansson, H. and Lundberg, K. 1991. Effect of a Technical PCB Preparation and Fractions there of on Ethoxyresorufin O-Deethylase Activity, Vitamin A Levels and Thymic Development in the Mink. *Mustela vison*. *Pharmacol Toxicol* 69: 421-426.

Budzinski, H., Jones., J., Bellocq, J., Pierard., C. and Garriques. P. 1997. Evaluation of Dediment Contamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Gironde Rstuary. *Marine Chem*. 58: 851.

Cocchieri, R.A., A-Arness, and Minicucei, A.M. 1990. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Organisms from Italian Central Mediterranean Coasts. *Mar. Pollut. Bull*. 21: 469-473.

Dejmek J., Selevan S.G., Benes I., Solansky I. and Sram R.J. 1999. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 107: 475-80.

Dockery, D.W., Schwartz J. and Spengler, J.D. 1992. Air pollution and daily mortality: Associations with particulates and acid aerosols. *Environ. Res*. 59: 362-73.

Dung, N.T. 1996. Determination of some Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Particulates Emitted from the Thermal Power plant of Bai Bang paper Company, Vietnam. Master's Thesis. Division of Environmental Engineering. Asian Institute of Technology.

Escartin, E. and Porte, C. 1999. Hydroxylated PAHs in Bile of Deep-Sea Fish Relationship with Xenobiotic Metabolizing Enzymes. *Environ Sci Techno*. 33: 2710-2714.

Fairall, W.C., Davidson, L.K. and Schacher, E.G. 1983. An analysis of the surface produce of

seasalt aerosol. *Tellus*. 16: 31-39.

Fernandes, M.B., Readman, J.W., Ovegioni, B.J., Orgeioni, J.P. and Mckay, K. 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Distributions in the Seine River and its Estuary. *Mar. Pollut. Bull*. 34: 857-867.

Fowler, S.W. 1993. Petroleum Hydrocarbons and Trace Metals in Nearshore Gulf Sediments Biota Before and After the 1991 War : An Assessment of Temporal and Spatial Trends. *Mar. Pollut. Bull*. 27: 171-182.

Gocht, T., Moldenhauer, K.M. and Pittmann, W. 2001. Historical record of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and heavy metals in floodplain sediments from the Rhine River (Hessisches Ried, Germany). *Appl Geochem*. 16: 1707-1721.

Gordon T. and Reibman J. 2000. Cardiovascular Toxicity of inhaled ambient particulate matter. *Toxicol Sci*. 56: 2-4.

Grariviat, H. 1999. A Study on air Pollution by Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Bangkok Urban Atmosphere. Doctoral dissertation. School of Environment. Resource and Development. Asian Institute of Technology.

Guzzella, L. and Paolis, A.D. 1994. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments of the Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull*. 28: 159-165.

Haller, C. J. and Schrap, S.M. 1997. Influence of Storage on Sediment Characteristics and of Drying Sediment on Sorption Coefficients of Organic Contaminant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58:961-968.

Handa, T., Kato, Y., Yamamura, T. and Ishii. T. 1980. Correlation between the Concentrations of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons and those of Particulates in an Urban Atmosphere. *Environ. Sci. Technol*. 9:416-422.

Hartman, Z., Hartman, P.E., Barnes, W.M. and Tuley, E. 1984. Spontaneous mutation frequencies in Salmonella: enhancement of G/C to A/T transitions and depression of deletion and frameshift mutation frequencies afforded by anoxic incubation. *Environ. Mol. Mutagen*. 6: 633–650.

Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W. and Zeiger, E. 1983. Salmonella mutagenicity results for 250 chemicals. *Environ. Mutagen*. 5: 3–142.

Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, L.G. and Claxton, L.D. 1987. Vaporization technique to measure mutagenic activity of volatile organic chemicals in the Ames/*Salmonella* assay, *Environ. Mutagen*. 9: 421–441.

IARC. 1983. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Human : Polynuclear Aromatic Compound, Part 1 Chemical, Environmental and Environmental Data. IARC, Lyon.

Isono, K. and Yourno, J. 1974. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: *Salmonella* DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 1612–1617.

Jacob, J. 1996. The significance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. *Pure. Appl. Chem*. 68: 301-308.

Janssen, N.A.H., Van Manson D.F.M. and vander Jagt, K. 1997. Exposure to carbon monoxide, respirable suspended particulates and volatile organic compounds while commuting by bicycle. *Environ. Sci. Technol*. 25: 788-91.

Jenkins, P.L., Phillips, T.J., Mulberg, J.M. and Hui, S.P. 1992. Activity patterns of Californians: use of and proximity to indoor pollutant sources. *Atmos. Res*. 26A: 2141–2148.

Kawanaka, Y., Mutsumoto E., Sakamoto K., Wang, N. and Yun, S. 2004. Size distributions of mutagenic compounds and mutagenicity in atmospheric particulate matter collected with a low-pressure cascade impactor. *Atmos. Environ*. 38: 2125-2132.

Kawanaka, Y., Mutsumoto E., Sakamoto K., Wang, N. and Yun, S. 2008. Contribution of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons to the mutagenicity of ultrafine particles in the roadside atmosphere. *Atmos. Environ*. 42: 7423-7428.

Kim, G.B., Maruya, K.A., Lee, R.F., Lee, J., KOH, C. and Tanabe, S. 1999. Distribution and Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments from Kyeonggi Bay, Korea. *Mar. Pollut. Bull*. 33: 7-15.

Kochevar, I.E., Armstrong, R.B., Einbinder, J., Walther, R.R. and CoHarber, L. 1982. Coal tar phototoxicity : Active Compounds and Action Spectra. *Photochem. Photobiol*. 36: 65-69.

Lehto, K.M., Lemmetyinen, H. and Puhakka, J. 2000. Biodegradation of Photoirradiated Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Constituents of Creosote Oil. *Environ. Technol.* 24: 901-907.

Margolin, B.H., Kaplan, N. And Zeiger, E. 1981. Statistical analysis of the Ames *Salmonella*/microsome test. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 78: 3779–3783.

Masmoudi, M., Chaabane, M., Medhioub, K. and Elleuch, F. 2003. Variability of aerosol optical thickness and atmospheric turbidity in Tunisia. *Atmos. Res*. 66: 175-188.

Margolin, B.H., Risko, K.J., Shelby, M.D. and Zeiger, E. 1984. Sources of variability in Ames' *Salmonella typhimurium* tester strains: analysis of the International Collaborative Study on "Genetic Drift". *Mutat. Res*. 130: 11–25.

Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. 1981. Compatibility of organic solvents with the *Salmonella*/microsome test. *Mutat. Res*. 88: 343–350.

Maron, D. And Ames, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173–215.

McGroddy, S.E. and Ferrington, J.W. 1995. Sediment porewater partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in three cores from Boston Harbor, Massachusetts. *Environ. Sci. Technol*. 29: 1542-1550.

Moller, M., Altheim, I., Larssen, s. and Mikalsen, A. 1982. Mutagenicity of airborne particles in relation to traffic and air pollution parameters. . *Environ. Sci. Technol*. 16: 221-225.

Mortelmans, K. and Stocker, B.A.D. 1979. Segregation of the mutator property of plasmid R46 from its ultraviolet-protection properties, *Mol. Gen. Genet*. 167: 317–327.

Mortelmans, K., Haworth, S., Lawlor, T., Speck, W., Tainer, B. and Zeiger, E. 1986. Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ. Mutagen.* 8: 1–119.

Neuhauser, E.F., Loehr, R.C., Malecki, M.R., Milliand, D.L. and Durkin, P.R. 1985. The Toxicity of Delected Organic Chemicals to the Earthworm *Eisenia fetida*. *J. Environ Qual.* 14: 383-388.

Nicole A.H., Janssen G.H., Brunekreef B., Harssema H., Mensink I. and Zuidhof A. 1998. Personal sampling of particles in adults: Relation among personal, indoor, and outdoor air concentrations. *Amer. J. Epidemiol*. 147: 537-46.

Page, D.S., Boehm, P.D., Douglas, G.S., Bence, A.E., Burn, W.A. and Mankiewicz, P.J. 1999. Pyrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments Record Past Human Activity : A case Study in Prince William Sound, Alaska. *Mar. Pollut. Bull*. 4: 247-260.

Pendoky, K. 1992. Hydrocarbons in Rowley Shelf (Western Australia) Oyster and Sediments. *Mar. Pollut. Bull*. 24: 210-215.

Qiao, M., Wang, C., Huang, s., Wang, D. and Wang, Z. 1999. Composition, source and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediment of the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Eviron. Int*. 32: 28-33.

Robin, J.L. and Jose, L.B. 1994. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) – Problems and Progress in Sampling, Analysis and Interpretation. *Mar. Pollut. Bull*. 29: 235.114

Shchekaturina, T.L. Knesina, A.L. Mironov, O.G. and Krivosheeva, L.G. 1995. Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mussels from the Black Sea. *Mar. Pollut. Bull*. 30: 38-39.

Shore, R.F., Julian, W., Janice, A.H. and Timothy, H.S. 1999. Polycyclic Agromatic Hydrocarbon (PAH) Residues in the Eggs of Coastal-Nesting Bird from Britain. *Mar. Pollut. Bull*. 38: 509-513.

Silva, M.A.B. 2005. Sistema de classificacao Fuzzy para areas contaminadas PhD thesis, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. 11-13.

Sookkai, S., Itthipoonthanakorn, T. and Rodpass, J. 2000. Indoor radon in Chiang Rai Province, Thailand. *Health Science*. 9: 520-523.

Spehar, R.L., Foucher, S.L., Brooke, T., Hansen, D.J., Champlin, D. and Cox, D.A. 1999. Comparative Toxicity of Fluoranthene to Freshwater and Sattwater Species under Fluorescent and Ultraviolet Light. *Arch. Environ. Centam. Toxicol*. 37: 496-502.

Sram R.J. 1999. Impact of Air Pollution on Reproductive Health. *Environ Health Perspect*. 107: 538-539

Sverdrup, E., Nielsen, T. and Krogh, P.H. 2002. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity and water solubility. *Environ. Sci. Technol.* 36: 24-35.

Topping D.C., Pal, B.C., Martin D.H., Nelson, F.R. and Nettesheim, P. 1978. Pathologic Changes Induced in Respiratory Tract Mucosa by Polycyclic Hydrocarbons Differing Carcinogenic Activity. *Am J Pathol* 93: 311-324.

U.S. DHHS. 1995. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. US. Department of Health and Human Service.

U.S.EPA. 2005. Risk-Based Concentration Table, April, 2005. U.S.EPA, Region 3, Philadelphia, PA. เข้าถึงได้จาก URL: http://www.epa.gov./reg3hwmd/risk/human/index.htm สืบค้นเมื่อ 11 มิถุนายน 2554.

Van Duuren, B.L., Langseth, L. and Goldschmidt, B.M. 1967. Carcinogenicity of epoxides, Lactones and Peroxy Compounds : VI. Structure and carcinogenic activity. *J Natl Cancer Inst*. 39: 1217-1227.

Vinitketkumnuen, U., Kalayanamitra, K., Chewonarin, T. and Kamens, R.M. 2002. Particulate matter, PM10 & PM2.5 levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutat. Res*. 519: 121-131.

Wild, S.R. and Jones, K. 1995. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the United Kingdom Environment : A Preliminary Source Inventory and Budget. *Environ Pol.* 88: 91-108.

Wordley J., Walters, S. and Ayres J.G. 1997. Short term variations in hospital admissions and mortality and particulate air pollution. *Occup Environ Med*. 54: 108-16.

Xin, J., Wang, S., Wang, Y., Yuan, J., Zhang, W. and Sun, Y. 2005. Optical properties and size distribution of aerosols over the Tengger Desert in Northern China. *Atmos. Environ.* 39: 5971-5978.

Zakey, A.S., Abdelwahab, M.M. and Makar, P.A. 2004. Atmospheric turbidity over Egypt. *Atmos. Environ*. 38: 1579-1591.

Zhao, Z.H., Quan, W.Y. and Tian, D. 1990. Urinary 1-Hydroxypyrene as an Indicator of Human Exposure to Ambient Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Coal-Burning Environment. *Sci Total Environ*. 92: 145-154.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีเตรียมสารละลายต่างๆสำหรับการทดสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธีทดสอบเอมส์

วิธีเตรียมสารละลายสำหรับวิธีทดสอบเอมส์

1. Minimal glucose agar plate

ส่วนผสม

1. Agar	15	กรัม
2. Glucose, anhydrous	20	กรัม
3. Volgel-Borner medium E (10X)	100	มิลลิลิตร
4. น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

วิธีทำ

1. ละลาย agar ด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใน reagent bottle ขนาด 2 ลิตร
2. ละลาย glucose ด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน reagent bottle ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. ใส่ volgel-Borner medium E 100 มิลลิลิตร ใน reagent bottle ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. นำสารละลายทั้งสามไป autoclave ที่อุณหภูมิ 120oC ความดัน 15 ปอนด์, 15 นาที
5. เอาออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุณหภูมิของสารละลาย agar ประมาณ 55oC เทสารละลาย glucose ลงไป ตามด้วยสารละลาย volgel3Borner medium E ผสมให้เข้ากัน
6. นำไปเทลงใน plate ซึ่ง sterile ไว้แล้วปริมาณ plate ละ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจน agar แข็งตัวจึงนำไปวางแบบพลิกกลับด้านในที่แห้ง 2-3 วัน จึงนำมาใช้ได้

2. Volgel-Borner medium E (10X)

ส่วนผสม

1. MgSO4.7H2O	2	กรัม
2. Citric acid, monohydrate	20	กรัม
3. K2HPO4 (anhydrous)	100	กรัม

4. $NH_4H_2PO_4$	19.2	กรัม
5. NaOH	6.6	กรัม
6. น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีทำ

ละลายสารตัวที่ 1 ในน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตรจนสารละลายหมด เติมสารตัวที่ 2 ลงไปจนสารละลายหมด จึงเติมสารตัวที่ 3 ค่อยๆเติมจนสารละลายหมดไปทีละตัวตามลำดับจนครบทุกตัว ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไป autoclave 15 นาที เก็บไว้ในตู้เย็น

3. Top agar

ส่วนผสม

1. Bacto agar	0.6	กรัม
2. NaCl	0.5	กรัม
3. น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ผสมสารละลายเข้าด้วยกันแล้วนำไป autoclave 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 50-55oC เติมสารละลายฮิสทีดีนและไบโอติน (0.5 มิลลิโมล่าร์) ลงไปในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อTop agar 100 มิลลิลิตร

4. 0.5 mM Histidine-Biotin

ส่วนผสม

1. D-Biotin	122	มิลลิลิตร
2. L-Histidine-HCl.H_2O	105	มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ผสมสารเข้าด้วยกัน อุ่นให้ร้อนจนละลายหมด Sterile โดยกรองผ่าน Millipore filter membrane (0.5 ไมครอน)

5. Nutrient Broth สำหรับเลี้ยงเชื้อ

ส่วนผสม

1. Oxoid nutrient broth No.2	4	กรัม
2. น้ำกลั่น	160	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ละลายสารจนหมด แบ่งใส่หลอดๆละ 10 มิลลิลิตร autoclave 15 นาที

6. 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4

ส่วนผสม

1. Na2HPO4	5.6784	กรัม
2. NaH2PO4.H2O	5.5196	กรัม

3. น้ำกลั่น

4. NaOH (1M)

วิธีทำ

1. ละลายสารตัวที่ 1 ในน้ำประมาณ 180 มิลลิลิตร จนสารละลายหมด
2. เติมสารละลายตัวที่ 2 ลงไป จนสารละลายหมด
3. ปรับ pH 7.4 ด้วย 1 M NaOH (เตรียม 4 กรัม NaOH ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) และปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร
4. นำไป autoclave และเก็บไว้ในตู้เย็น

7. เตรียม S9 mixture

ส่วนผสมของ S9 mixture 1 มิลลิลิตร

1. 1.65 M KCl-0.4 M MgCl2	0.02	มิลลิลิตร
2. 1.0 M Glucose-6-phophate	0.005	มิลลิลิตร
3. 0.1 M NADP	0.004	มิลลิลิตร

4. 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7.4	0.5	มิลลิลิตร
5. S9 fraction	0.04	มิลลิลิตร
6. Sterile H2O	0.395	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ส่วนผสมนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องใช้ และควรแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา ส่วนผสม S9 mixture ที่เหลือจากการใช้และ S9 fraction ที่เหลือก็ควรทิ้งไป ปริมาตรของ S9 fraction แต่ละครั้งคำนวณจากปริมาตรหลอดทดลองที่ต้องใช้ใส่ S9 mixture เทียบจาก 1 หลอดทดลองเติม S9 mixture 0.5 มิลลิลิตร

8. การเตรียม S9 fraction

วิธีทำ

เตรียมหนูขาวเพศผู้ (Sprague-Dawley หรือ Wistar rat) น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม ควรนำมาเลี้ยงล่วงหน้าประมาณ 1 อาทิตย์ก่อนทดลอง

วันที่ 1 ฉีดสารละลาย phenobarnital ในน้ำเข้มข้น 30 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าชิองท้อง (intraperitoneal) ควรทำตอนเช้า

วันที่ 2 ฉีดสารละลาย phenobarnital ในน้ำเข้มข้น 60 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าชิองท้อง (intraperitoneal) ควรทำตอนเช้าเช่นเดียวกัน

วันที่ 3 (ตอนเช้า) ฉีดสารละลาย phenobarnital ในน้ำเข้มข้น 60 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าชิองท้อง (intraperitoneal)

(ตอนบ่าย) ฉีดสารละลาย 5,6-naphthoflavone ละลายใน corn oil เข้มข้น 80 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าชิองท้อง (intraperitoneal)

วันที่ 4 (ตอนเช้า) ฉีดสารละลาย phenobarnital ในน้ำเข้มข้น 60 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าชิองท้อง (intraperitoneal)

(ตอนกลางคืน) จำกัดอาหารที่ใช้เลี้ยงหนูอาจให้เพียง 1 เม็ดแต่ให้น้ำตามปกติ

วันที่ 5 ทำการฆ่าหนูทั้งหมดโดย cervical dislocation แล้วแยกตับหนูทุกตัวออกมาโดย sterile technique แล้วชั่งน้ำหนักตับทั้งหมด

วิธีเตรียม S9 enzyme (ทุกขั้นตอนต้องทำที่อุณหภูมิ 0-4°C สารละลายและเครื่องมือที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อ)

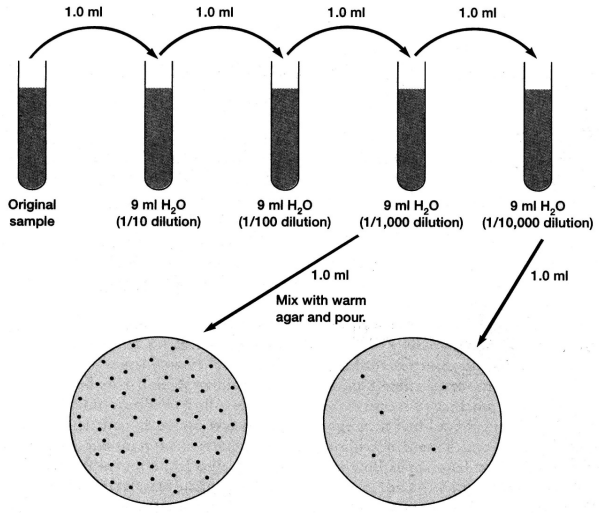
1. ล้างตับหนูในบีกเกอร์ที่เติม 0.15 โมล่าร์ KCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร/น้ำหนักตับ 1 กรัม ควรล้างหลายๆครั้งด้วย fresh, chilled KCl เพื่อการ sterile ที่มั่นใจและเพื่อกำจัดฮีโมโกลบิน ซึ่งสามารถยับยั้งฤทธิ์ของ cytochrome P450 enzymes
2. นำตับหนูใส่บีกเกอร์ที่มี 0.15 โมล่าร์ KCl ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักตับ
3. Minced ด้วยกรรไกรที่สะอาดแล้วนำไป homogenize
4. นำ homogenate ไปปั่นที่ 9000 รอบเป็นเวลา 10 นาที
5. Supernatant ที่ได้คือ S9 fraction ที่มีเอ็นไซม์ของระบบแมแทบอลิซึม
6. แบ่งเป็น aliquot 1-2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกที่มีฝาปิด (cyrotube) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C เมื่อต้องการใช้ให้นำออกมาใช้ตามจำนวนปริมาตรที่ต้องการ
7. แบ่งบางส่วนไปหาปริมาตรโปรตีน ซึ่งควรจะมีความเข้มข้นของโปรตีนไม่น้อยกว่า 35-40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
8. ทดสอบ sterlity ของ S9 fraction โดย spread 0.1 มิลลิลิตรของ supernatant ลงบน minimal glucose agar plate ที่มีฮีสทีดีนและไบโอติน
9. สามารถเตรียม S9 fraction จากเนื้อเยื่ออื่นๆได้เช่นเดียวกัน เช่น จากไต ลำไส้เล็ก และปอด นอกจากนี้สามารถเตรียมจากสัตว์ทดลองอื่นๆได้เช่น hamster, guinea pig

ภาคผนวก ข
การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร (plate count)

<u>การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร (plate count)</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมวุ้น (agar media) ถูกนำมาใช้ตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 1800 ทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนโคโลนี วิธีการดังกล่าวมีพื้นฐานจากข้อสมมติ 3 อย่างคือ

1. เซลล์จุลินทรีย์หนึ่งเซลล์เจริญและแบ่งตัวเพื่อสร้างโคโลนีเดี่ยว
2. เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (original inoculum) มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน(homogeneous)
3. ไม่มีเซลล์ใดๆที่อยู่รวมกัน (no aggregate) วิธีนี้ทำง่ายนับจำนวนได้ดีแม้ว่าจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำ (sensitive) และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งจากตัวอย่างอาหาร น้ำ และดิน ในการนับเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารมีความสำคัญ คือ ต้องมีจำนวนไม่มากหรือน้อยเกินไป โดยทั่วไปจะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์เท่านั้น ดังนั้นเพื่อให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารอยู่ในช่วงดังกล่าว ควรทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นหลายๆครั้ง โดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆละ 10 เท่า (serial dilution) (รูปที่ 1ข) แล้วทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่แต่ละระดับการเจือจางลงบนจานอาหาร เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนจานอาหารแล้วนับจำนวนทำการคำนวณหาจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่างได้



รูปที่ (1ข) การทำเจือจางเป็นลำดับ

การรายงานผลมักรายงานเป็น colony forming unit (CFU) มากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ เนื่องจากไม่สามารถบอกได้อย่างแน่นอน ชัดเจนว่า 1 โคโลนีมาจาก 1 เซลล์ การนับจำนวนด้วยวิธี plate count จึงเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) ซึ่งวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่

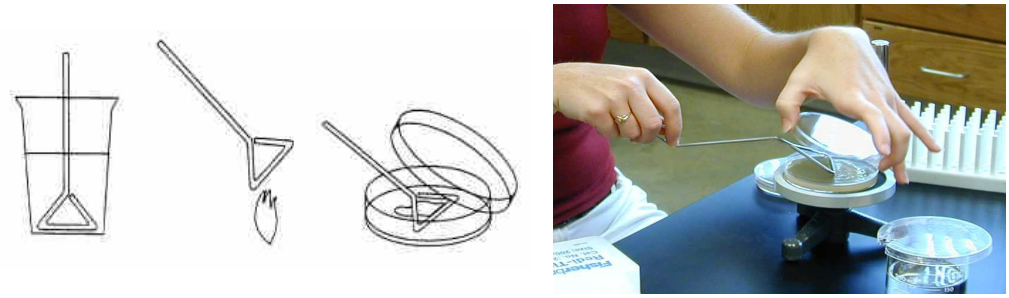
1. Pour plate

เมื่อตัวอย่างถูกเจือจางลงระดับละ 10 เท่า ทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่มีระดับการเจือจางเหมาะสม โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร หรือ 0.1 มิลลิลิตร หยดไปบนจานอาหารแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44 – 46 °ซ ลงไป ผสมเชื้อจุลินทรีย์ให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อโดยแกว่งจานอาหารไป-มาเบาๆ (รูปที่ 2ข) ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ภายหลังบ่มแล้วโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ 25-250 เซลล์ ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัมตัวอย่างได้ วิธีนี้หากใช้วุ้นที่ร้อนไปอาจทำให้ sensitive cell ตายหรือบาดเจ็บไม่สามารถสร้างโคโลนีได้

รูปที่ (2ข) วิธี pour plate

2. Spread plate

เป็นวิธีการนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแข็งตัวแล้ว (solidified agar medium) เชื้อจุลินทรีย์จะถูกแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วพิเศษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (spreader) (รูปที่ 3ข) วิธีนี้ผู้วิเคราะห์จะสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ง่าย



(รูปที่ 3ข) วิธีการ spread plate

3. Drop plate

วิธีนี้มีหลักการเหมือนกันกับ spread plate โดยจะหยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมลงบนจานอาหารหนึ่งจานต่อ 5 จุด โดยแต่ละจุดใช้ปริมาณ 0.02 มิลลิลิตร ตัวอย่างจะถูกปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหาร (รูปที่ 4ข) ซึ่งโดยปกติจะมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 1.5 ถึง 3 ซม. การนับและคำนวณจำนวนโคโลนีขึ้นอยู่กับจำนวนหยดต่อจานอาหาร จำนวนหยดต่อมิลลิลิตร และค่าการเจือจาง (dilution factor) โดยทั่วไปเมื่อบ่มจนเชื้อเจริญแล้ว ให้เลือกจานอาหารที่มีระดับการเจือจางเหมาะสมคือ มีเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารแต่ละจุดไม่เกิน 10 โคโลนี เมื่อนับจำนวนโคโลนีทั้ง 5 จุดรวมกันในแต่ละระดับการเจือจาง ก็จะสามารถคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัมตัวอย่าง

(รูปที่ 4ข) วิธีการ drop plate)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวโฉมศรี ชูช่วย

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210920006

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2551

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

โฉมศรี ชูช่วย, ศิวัช พงษ์เพียจันทร์, ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, ชญากรณ์ ศรัณพฤฒิ, อุษณีย์ วินิจเขต คำนวณ และ อาคม ปาโส. 2553. ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความไวในการวิเคราะห์ดัชนีชี้วัดการกลายพันธุ์ในผลิตภัณฑ์น้ำมันหล่อลื่น. ในเอกสารประกอบ *งานประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 9* จัดโดยสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทยระหว่างวันที่ 24-27 มีนาคม 2553 ณ จังหวัดอุบลราชธานี.

โฉมศรี ชูช่วย, ศิวัช พงษ์เพียจันทร์, อรมาศ สุทธินุ่น และ ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์. 2554. การศึกษาดัชนีการกลายพันธุ์ในฝุ่นละอองของเขตเมืองกรุงเทพมหานคร. ในเอกสารประกอบ *งานประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 10* จัดโดยสมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทยระหว่างวันที่ 24-26 มีนาคม 2554 ณ จังหวัดสงขลา.

โฉมศรี ชูช่วย, ศิวัช พงษ์เพียจันทร์ และ อรมาศ สุทธินุ่น. 2554. การศึกษาเบื้องต้นของดัชนีการกลายพันธุ์แบคทีเรียในฝุ่นละอองเขตเมืองกรุงเทพมหานคร.ในเอกสารประกอบ *งานประชุมวิชาการประจำปี 2554 ของสถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์* วันที่ 17 ธันวาคม 2554.