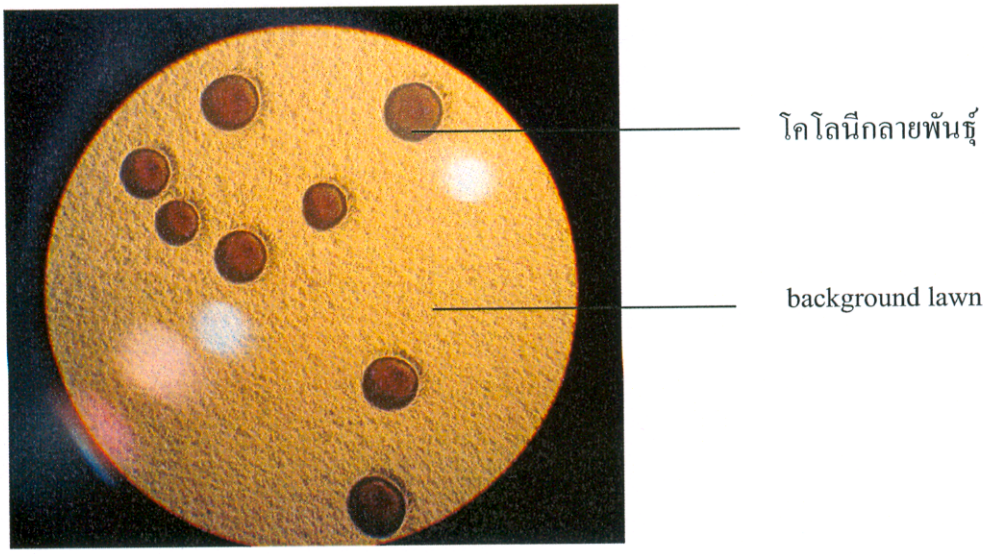
ภาคผนวก ก
ลักษณะของแหล่งน้ำที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ภาพประกอบภาคผนวก 1 ลักษณะของแหล่งน้ำที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ภาคผนวก ข

ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีการกลายพันธุ์

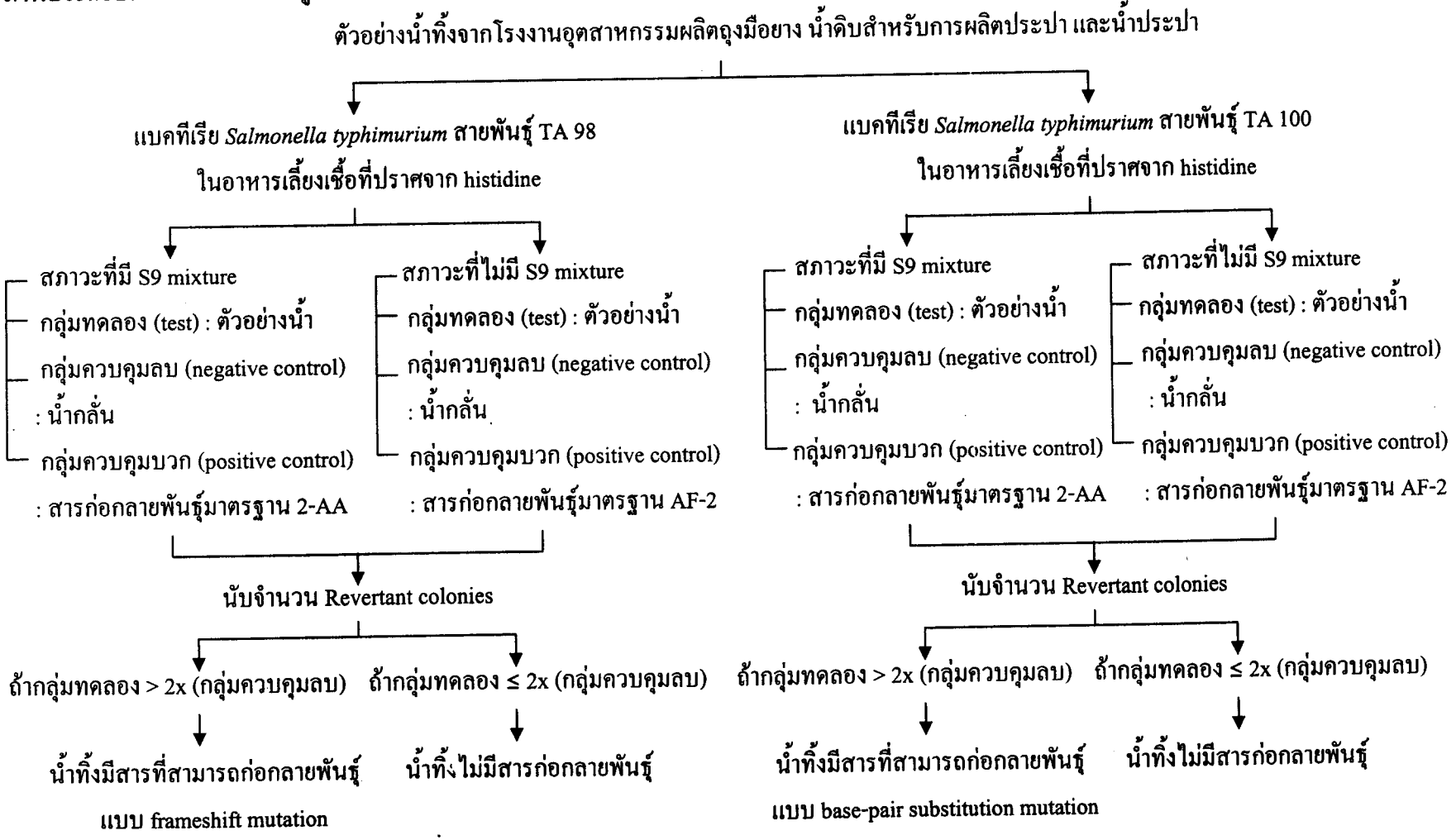
ภาพประกอบภาคผนวก 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีการกลายพันธุ์ (กำลังขยาย 40x)



ภาคผนวก ค

แผนภูมิแสดงวิธีการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames' test

ภาพประกอบภาคผนวก 3 แผนภูมิแสดงวิธีการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames' test



ภาคผนวก ง

ผลจำนวนโคโลนี (revertant colonies) ของเชื้อ *Salmonella typhimurium*

ตารางภาคผนวก 1 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูฝนที่ความเข้มข้นปกติ

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	15	17	15	18	16	17	16.33	1.21
AF-2, 0.05 µg/plate	219	223	231	212	225	240	225.00	9.70
โรงงานที่ 1	22	19	19	15	16	18	18.17	2.48
โรงงานที่ 2	20	17	19	16	18	16	17.67	1.63
โรงงานที่ 3	20	16	14	15	18	19	17.00	2.37
โรงงานที่ 4	19	17	19	18	20	16	18.17	1.47
โรงงานที่ 5	19	13	16	15	18	20	16.83	2.64
น้ำดิบ	17	17	20	16	18	12	16.67	2.66
น้ำประปา	17	15	20	17	16	19	17.33	1.86

ตารางภาคผนวก 2 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูฝนที่ความเข้มข้น 100 เท่า

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	17	16	20	15	12	16	16.00	2.61
AF-2, 0.05 µg/plate	230	220	227	214	207	219	219.50	8.41
โรงงานที่ 1	19	18	22	18	17	20	19.00	1.79
โรงงานที่ 2	26	28	24	18	19	20	22.50	4.09
โรงงานที่ 3	19	17	20	15	21	17	18.17	2.23
โรงงานที่ 4	22	23	18	15	18	17	18.83	3.06
โรงงานที่ 5	26	23	17	23	17	15	20.17	4.40
น้ำดิบ	20	21	19	21	21	18	20.00	1.26
น้ำประปา	18	20	19	17	15	19	18.00	1.79

ตารางภาคผนวก 3 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูร้อนที่ความเข้มข้นปกติ

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	17	17	15	18	14	16	16.17	1.47
AF-2, 0.05 µg/plate	260	255	267	239	246	250	252.83	10.03
โรงงานที่ 1	18	21	23	25	19	20	21.00	2.61
โรงงานที่ 2	20	15	17	18	20	17	17.83	1.94
โรงงานที่ 3	16	20	19	18	15	17	17.50	1.87
โรงงานที่ 4	21	19	16	20	17	19	18.67	1.86
โรงงานที่ 5	16	18	15	15	18	20	17.00	2.00
น้ำดิบ	20	21	21	20	15	18	19.17	2.32
น้ำประปา	19	16	17	19	15	18	17.33	1.63

ตารางภาคผนวก 4 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูร้อนที่ความเข้มข้น 100 เท่า

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	21	17	14	18	19	15	17.33	2.58
AF-2, 0.05 µg/plate	260	267	263	263	268	289	268.33	10.54
โรงงานที่ 1	46	50	48	56	46	54	50.00	4.20
โรงงานที่ 2	34	39	35	38	37	41	37.33	2.58
โรงงานที่ 3	21	23	25	22	17	20	21.33	2.73
โรงงานที่ 4	39	37	37	36	31	38	36.33	2.80
โรงงานที่ 5	25	22	20	24	19	24	22.33	2.42
น้ำดิบ	18	25	23	22	22	15	20.83	3.66
น้ำประปา	22	18	17	16	18	23	19.00	2.83

ตารางภาคผนวก 5 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูฝนที่ความเข้มข้นปกติ

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	37	40	39	32	34	38	36.67	3.08
2-AA 0.3 µg/plate	544	552	540	531	549	537	542.17	7.78
โรงงานที่ 1	47	49	51	43	38	45	45.50	4.64
โรงงานที่ 2	45	49	47	41	37	38	42.83	4.92
โรงงานที่ 3	47	47	39	38	36	40	41.17	4.71
โรงงานที่ 4	44	40	48	37	35	38	40.33	4.84
โรงงานที่ 5	43	43	45	35	40	35	40.17	4.31
น้ำดิบ	44	40	48	37	35	38	40.33	4.84
น้ำประปา	41	40	41	31	35	32	36.67	4.59

ตารางภาคผนวก 6 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูฝนที่ความเข้มข้น 100 เท่า

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	48	53	47	44	48	40	46.67	4.37
2-AA, 0.3 µg/plate	548	535	540	520	527	534	534.00	9.78
โรงงานที่ 1	52	50	54	53	42	46	49.50	4.64
โรงงานที่ 2	49	51	55	42	52	51	50.00	4.38
โรงงานที่ 3	57	51	52	52	47	47	51.00	3.74
โรงงานที่ 4	60	51	58	49	55	48	53.50	4.93
โรงงานที่ 5	50	53	53	51	45	50	50.33	2.94
น้ำดิบ	54	55	50	52	54	49	52.33	2.42
น้ำประปา	57	55	53	50	47	45	51.17	4.67

ตารางภาคผนวก 7 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูร้อนที่ความเข้มข้นปกติ

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	51	53	55	47	45	43	49.00	4.73
2-AA, 0.3 μg/plate	499	509	487	493	501	489	496.33	8.26
โรงงานที่ 1	56	55	54	49	51	45	51.67	4.18
โรงงานที่ 2	55	52	52	51	44	53	51.17	3.76
โรงงานที่ 3	54	55	59	57	61	50	56.00	3.90
โรงงานที่ 4	53	48	58	57	46	53	52.50	4.76
โรงงานที่ 5	52	57	52	53	49	45	51.33	4.03
น้ำดิบ	48	57	50	49	43	52	49.83	4.62
น้ำประปา	54	52	49	50	48	45	49.67	3.14

ตารางภาคผนวก 8 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูร้อนที่ความเข้มข้น 100 เท่า

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	64	60	57	55	50	61	57.83	4.96
2-AA, 0.3 µg/plate	545	549	552	569	551	563	554.83	9.17
โรงงานที่ 1	69	62	59	70	65	61	64.33	4.46
โรงงานที่ 2	71	75	79	69	71	65	71.67	4.84
โรงงานที่ 3	57	62	67	70	61	63	63.33	4.59
โรงงานที่ 4	65	71	61	69	65	62	65.50	3.89
โรงงานที่ 5	64	71	67	63	64	59	64.67	4.03
น้ำดิบ	73	65	60	68	64	71	66.83	4.79
น้ำประปา	74	69	62	66	62	71	67.33	4.89

ตารางภาคผนวก 9 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูฝนที่ความเข้มข้นปกติ

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	154	169	160	157	153	159	158.67	5.75
AF-2, 0.01 µg/plate	630	627	632	636	650	645	636.67	9.03
โรงงานที่ 1	187	181	190	177	184	175	182.33	5.79
โรงงานที่ 2	197	189	194	200	190	181	191.83	6.74
โรงงานที่ 3	175	180	171	164	165	170	170.83	6.05
โรงงานที่ 4	172	180	179	166	175	167	173.17	5.91
โรงงานที่ 5	183	191	184	185	172	181	182.67	6.22
น้ำดิบ	174	181	164	169	163	168	169.83	6.74
น้ำประปา	166	152	151	165	160	158	158.67	6.31

ตารางภาคผนวก 10 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูฝนที่ความเข้มข้น 100 เท่า

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	192	187	195	190	185	189	189.67	3.56
AF-2, 0.01 µg/plate	690	699	675	673	682	675	682.33	10.31
โรงงานที่ 1	201	193	197	195	207	190	197.17	6.08
โรงงานที่ 2	210	207	195	211	200	206	204.83	6.18
โรงงานที่ 3	212	209	201	200	206	214	207.00	5.73
โรงงานที่ 4	191	196	200	195	201	209	198.67	6.22
โรงงานที่ 5	199	207	200	200	214	210	205.00	6.26
น้ำดิบ	197	193	189	200	189	190	193.00	4.60
น้ำประปา	206	212	208	204	197	200	204.50	5.43

ตารางภาคผนวก 11 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูร้อนที่ความเข้มข้นปกติ

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	166	175	169	160	159	163	165.33	6.02
AF-2, 0.01 µg/plate	652	637	643	660	658	651	650.17	8.80
โรงงานที่ 1	189	193	180	179	175	182	183.00	6.72
โรงงานที่ 2	210	200	199	193	192	198	198.67	6.44
โรงงานที่ 3	186	173	180	169	169	172	174.83	6.79
โรงงานที่ 4	202	190	197	199	193	185	194.33	6.25
โรงงานที่ 5	199	194	204	193	185	200	195.83	6.68
น้ำดิบ	181	174	171	179	168	163	172.67	6.77
น้ำประปา	196	189	200	190	185	183	190.50	6.47

ตารางภาคผนวก 12 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูร้อนที่ความเข้มข้น 100 เท่า

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	199	187	190	193	187	195	191.83	4.75
AF-2, 0.01 µg/plate	623	614	616	636	607	629	620.83	10.61
โรงงานที่ 1	220	219	208	217	224	207	215.83	6.85
โรงงานที่ 2	220	216	229	213	218	214	218.33	5.82
โรงงานที่ 3	206	208	209	220	218	212	212.17	5.67
โรงงานที่ 4	201	196	193	199	195	210	199.00	6.10
โรงงานที่ 5	210	214	205	210	221	203	210.50	6.47
น้ำดิบ	217	219	209	210	208	220	213.83	5.42
น้ำประปา	211	214	217	221	218	227	218.00	5.59

ตารางภาคผนวก 13 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูฝนที่ความเข้มข้นปกติ

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	217	213	218	219	220	231	219.67	6.06
2-AA, 0.5 μg/plate	572	567	591	583	574	585	578.67	9.09
โรงงานที่ 1	284	289	283	295	290	297	289.67	5.65
โรงงานที่ 2	249	252	263	264	263	261	258.67	6.47
โรงงานที่ 3	260	267	265	279	273	269	268.83	6.59
โรงงานที่ 4	240	251	249	256	254	248	249.67	5.61
โรงงานที่ 5	300	297	295	294	299	291	296.00	3.35
น้ำดิบ	287	293	300	281	290	286	289.50	6.53
น้ำประปา	250	247	246	262	260	257	253.67	6.89

ตารางภาคผนวก 14 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูฝนที่ความเข้มข้น 100 เท่า

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	301	291	295	297	284	289	292.83	6.08
2-AA, 0.5 µg/plate	663	665	654	681	674	662	666.50	9.57
โรงงานที่ 1	324	309	315	313	315	320	316.00	5.29
โรงงานที่ 2	311	307	319	309	299	315	310.00	6.90
โรงงานที่ 3	310	301	316	320	314	311	312.00	6.48
โรงงานที่ 4	292	307	298	303	293	297	298.33	5.79
โรงงานที่ 5	330	321	324	317	319	325	322.67	4.68
น้ำดิบ	315	310	308	310	319	320	313.67	5.09
น้ำประปา	308	310	301	299	295	306	303.17	5.78

ตารางภาคผนวก 15 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูร้อนที่ความเข้มข้นปกติ

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	272	281	279	290	287	278	281.17	6.49
2-AA, 0.5 µg/plate	590	581	579	569	573	584	579.33	7.55
โรงงานที่ 1	297	301	294	299	303	300	299.00	3.16
โรงงานที่ 2	301	297	294	307	303	299	300.17	4.58
โรงงานที่ 3	274	291	288	279	288	284	284.00	6.42
โรงงานที่ 4	298	300	301	294	287	296	296.00	5.10
โรงงานที่ 5	317	310	306	299	308	313	308.83	6.18
น้ำดิบ	286	299	290	290	289	281	289.17	5.91
น้ำประปา	295	287	299	290	287	293	291.83	4.75

ตารางภาคผนวก 16 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูร้อนที่ความเข้มข้น 100 เท่า

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	308	299	293	290	297	300	297.83	6.24
2-AA, 0.5 µg/plate	639	647	640	659	661	653	649.83	9.39
โรงงานที่ 1	319	309	314	322	315	319	316.33	4.63
โรงงานที่ 2	310	317	306	320	316	313	313.67	5.09
โรงงานที่ 3	320	315	324	332	321	319	321.83	5.78
โรงงานที่ 4	311	320	318	307	315	322	315.50	5.68
โรงงานที่ 5	326	326	324	340	345	333	332.33	8.59
น้ำดิบ	317	323	330	320	315	311	319.33	6.65
น้ำประปา	330	324	319	323	327	331	325.67	4.55

ตารางภาคผนวก 17 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 ที่กลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่ใช้ S9 mixture หลังจากการเติมตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานที่ 1, 2 และ 4 ที่เก็บในช่วงฤดูร้อนที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 เท่า

ตัวอย่างน้ำ	Revertant colonies (His+/plate)							
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Mean	SD.
	plate 1	plate 2	plate 3	plate 1	plate 2	plate 3		
SR	18	22	15	15	15	16	16.83	2.79
AF-2, 0.05 µg/plate	327	331	340	331	323	320	328.67	7.06
1. โรงงานที่ 1								
ความเข้มข้น 50 เท่า	34	29	40	37	45	40	37.50	5.54
ความเข้มข้น 100 เท่า	55	54	50	55	65	61	56.67	5.39
ความเข้มข้น 200 เท่า	89	94	106	90	92	90	93.50	6.38
2. โรงงานที่ 2								
ความเข้มข้น 50 เท่า	30	20	23	25	21	24	23.83	3.54
ความเข้มข้น 100 เท่า	43	52	45	44	42	38	44.00	4.60
ความเข้มข้น 200 เท่า	73	70	81	65	68	66	70.50	5.89
3. โรงงานที่ 4								
ความเข้มข้น 50 เท่า	22	23	28	25	20	21	23.17	2.93
ความเข้มข้น 100 เท่า	35	33	30	38	34	36	34.33	2.73
ความเข้มข้น 200 เท่า	64	68	58	62	55	58	60.83	4.75

ภาคผนวก จ

วิธีเตรียมสารละลายสำหรับการปฏิบัติการ

วิธีเตรียมสารละลายสำหรับการปฏิบัติการ

1. Minimal glucose agar plate

ส่วนผสม

1. Agar	15	กรัม
2. Glucose, anhydrous	20	กรัม
3. Volgel-Borner medium E (x10)	100	มิลลิลิตร
4. น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

วิธีทำ

1. ละลาย agar ด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใน reagent bottle ขนาด 2 ลิตร
2. ละลาย glucose ด้วยน้ำกลั่น 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 120^{0}C ความดัน 15 ปอนด์, 20 นาที
5. เอาออกมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนอุณหภูมิของสารละลาย agar ประมาณ 65^{0}C เทสารละลายกลูโคสลงไป ตามด้วยสารละลาย volgel-Borner medium E เขย่าให้เข้ากันดี
6. นำไป pour plate ซึ่ง sterile ไว้แล้ว plate ละ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจน agar แข็ง จึงนำไปวางแบบพลิกกลับด้านในที่แห้ง 3-4 วัน จึงจะนำมาใช้ได้

2. Volgel-Borner medium E (x10)

ส่วนผสม

1. $MgSO_4.7H_2O$	2	กรัม
2. Citric acid, monohydrate	20	กรัม
3. K_2HPO_4 (anhydrous)	100	กรัม
4. $NH_4H_2PO_4$	19.2	กรัม
5. NaOH	6.6	กรัม
6. น้ำกลั่น	2	ลิตร

วิธีทำ

ละลายสารตัวที่ 1 ในน้ำประมาณ 1000 มิลลิลิตร จนสารละลายหมด เติมสารตัวที่ 2 ลงไปอีกจนสารละลายหมด จึงเติมสารตัวที่ 3 ค่อย ๆ เติมจนสารละลายหมดไปทีละตัวตามลำดับ จนครบ ปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตร และ pH 7 นำไป autoclave เก็บไว้ในที่เย็น

3. Top agar

ส่วนผสม

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

วิธีทำ

Autoclave 120°C ความดัน 15 ปอนด์ 20 นาที sterile ก่อนใช้ทุกครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 55°C เติมสารละลายฮิสทีดีนและไบโอติน (0.5 มิลลิโมล่าร์) ลงไปในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตร ต่อ top agar 100 มิลลิลิตร

4. 0.5 mM Histidine-Biotin

สารเคมี

1. D-Biotin	124	มิลลิกรัม
2. L-Histidine	105	มิลลิกรัม
3. น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีทำ

Sterile โดยกรองผ่าน Millipore filter membrane (0.45 ไมครอน)

5. Nutrient Broth สำหรับเลี้ยงเชื้อ

ส่วนผสม

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

วิธีทำ

แบ่งเป็นหลอด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร หรือ 5 มิลลิลิตร autoclave

6. 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4

ส่วนผสม

1. Na_2HPO	5.6784	กรัม
2. $NaH_2PO_4.H_2O$	5.5196	กรัม
3. น้ำกลั่น		
4. NaOH (1 M)		

วิธีทำ

1. ละลายสารตัวที่ 1 ในน้ำประมาณ 180 มิลลิลิตร จนสารละลายหมด
2. เติมสารตัวที่ 2 ลงไป จนสารละลายหมด
3. ปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร และ pH 7.4 ด้วย 1 M NaOH (เตรียม 4 กรัม NaOH ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)
4. นำไป autoclave และเก็บไว้ในที่เย็น

7. วิธีเตรียม S9 mixture

ส่วนผสมของ S9 mixture 1 มิลลิลิตร

1. 1.65 M KCl-0.4 M $MgCl_2$	0.02	มิลลิลิตร
2. 1.0 M Glucose-6-phosphate	0.005	มิลลิลิตร
3. 0.1 M NADP	0.04	มิลลิลิตร
4. 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7.4	0.5	มิลลิลิตร
5. S9 fraction	0.04	มิลลิลิตร
6. sterile H_2O	0.395	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ส่วนผสมนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้ และควรแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา ส่วนผสม S9 mixture ที่เหลือจากการใช้และ S9 fraction ที่เหลือก็ควรทิ้งไป

ปริมาณของ S9 mixture แต่ละครั้งคำนวณจากปริมาณหลอดทดลองที่ต้องใส่ S9 mixture เทียบจาก 1 หลอดทดลองเติม S9 mixture 0.5 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ฉ

การตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย

การตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย

1. การตรวจ Histidine requirement

สิ่งที่ต้องเตรียม

1. สารละลายไบโอติน 1 มิลลิโมล่าร์ ที่ปลอดเชื้อ
2. สารละลายฮิสทีดีน 1 มิลลิโมล่าร์ ที่ปลอดเชื้อ
3. สารละลาย top agar ที่มีส่วนผสมและอัตราส่วน ดังนี้

Bacto agar	0.6	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลายผสมนี้จะนึ่งให้ปลอดเชื้อ

4. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (minimal glucose agar plates)

วิธีทำ

1. ผสม 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายไบโอติน กับ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture of bacteria ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ
2. เติม 2 มิลลิลิตร ของสารละลาย top agar (อุณหภูมิ 45^{0}C) เขย่าโดยหมุนในอุ้งมือไปมา 4-5 วินาที
3. เทลงบน minimal glucose agar plate
4. หมุนจานเลี้ยงเชื้อให้สารละลายกระจายสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วนำไปไว้ในตู้อบซึ่งมีอุณหภูมิ 37^{0}C โดยเก็บในลักษณะที่ตั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อกลับด้าน (inverted) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. เตรียมหลอดทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 อีกครั้ง
6. เติม 0.1 มิลลิลิตร สารละลายฮิสทีดีนลงไปด้วย เขย่า
7. เติม 2 มิลลิลิตร สารละลาย top agar (อุณหภูมิ 45^{0}C) เขย่าแล้วเทลงใน minimal glucose agar plate หลังจากนั้นนำไปไว้ในตู้อบเช่นเดียวกัน
8. ต้องไม่มีโคโลนีให้เห็นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 4 แต่จะเห็นโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 7

2. การตรวจ rfa mutation

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

1. สารละลาย crystal violet เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. กระดาษกรองตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
3. สารละลาย top agar ที่นึ่งให้ปลอดเชื้อ ในการทดลองต้องให้อุณหภูมิประมาณ 45^{0}C และเติมสารละลายผสมของ 0.5 มิลลิโมล่าร์ฮิสทีดีนและไบโอติน ลงไปในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของ top agar

<u>วิธีทำ</u>

1. ใส่ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ
2. เติม 2 มิลลิลิตร top agar (อุณหภูมิ 45^{0}C) ลงไปเขย่าในอุ้งมือ แล้วเทลงใน minimal glucose agar plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง
3. ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ ค่อย ๆ วางกระดาษกรองที่เตรียมไว้ โดยกดลงบนผิววุ้นเล็กน้อย
4. หยดสารละลาย crystal violet 10 ไมโครลิตรลงบนกระดาษกรอง
5. นำ plate ไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37^{0}C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง
6. หลังจากนั้นนำ plate ออกมาตรวจดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ให้สังเกตว่ารอบ ๆ กระดาษกรองที่หยด crystal violet จะเห็นเป็นวงกลมลักษณะใส เรียก clear zone เนื่องจากส่วนนี้จะไม่มีแบคทีเรียเจริญ ให้วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมนี้ ควรจะมีขนาดประมาณ 12-14 มิลลิเมตร จึงจะถือว่าแบคทีเรียมี rfa mutation อยู่ ถ้าเกิดวงกลมที่มีขนาดเล็กกว่านี้ แสดงว่า แบคทีเรียนั้นมีความผิดปกติของคุณสมบัติ เช่น อาจสูญเสีย rfa mutation ควรพิจารณาเตรียมแยก single colony ใหม่

3. การตรวจ R-factor

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

1. สารละลาย ampicillin เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. กระดาษกรองตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
3. สารละลาย top agar ที่นึ่งให้ปลอดเชื้อ ในการทดลองต้องให้อุณหภูมิประมาณ 45^{0}C และเติมสารละลายผสมของ 0.5 มิลลิโมล่าร์ฮิสทีดีนและไบโอติน ลงไปในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของ top agar

วิธีทำ

1. ใส่ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ
2. เติม 2 มิลลิลิตร top agar (อุณหภูมิ 45^{0}C) ที่มีส่วนผสมฮิสทีดีนและไบโอติน, เขย่าในอุ้งมือ แล้วเทลงใน minimal glucose agar plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง
3. ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ ค่อย ๆ วางกระดาษกรองที่เตรียมไว้ โดยกดลงบนผิววุ้นเล็กน้อย
4. หยดสารละลาย ampicillin 10 ไมโครลิตรลงบนกระดาษกรอง
5. นำ plate ไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37^{0}C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง
6. หลังจากนั้นนำ plate ออกมาตรวจดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ให้สังเกตว่ารอบ ๆ ampicillin disc ไม่ควรจะเกิด clear zone (ถ้าเกิดแสดงว่ายา ampicillin ไปฆ่าแบคทีเรียรอบ ๆ จึงไม่มีการเจริญ แสดงว่า แบคทีเรียขาดคุณสมบัติการมี R-factor)

4. การตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน (sensitivity to standard mutagens)

สิ่งที่ต้องเตรียม

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมล่าร์, pH 7.4
2. สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน
3. สารละลายผสมเอนไซม์ (S9 mixture)
4. Overnight culture ของแบคทีเรีย TA 98 และ TA 100
5. สารละลาย top agar ที่นึ่งให้ปลอดเชื้อ อุณหภูมิประมาณ 45^{0}C ซึ่งเติมสารละลายผสมของ 0.5 มิลลิโมล่าร์ฮิสทีดีนและไบโอติน ลงไปในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของ top agar
6. Minimal glucose agar plate

วิธีทำ

1. ผสม 0.05 มิลลิลิตร ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานกับ 0.5 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เมื่อไม่ต้องการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ หรือ 0.5 มิลลิลิตร สารละลายผสมเอนไซม์ (S9 mixture) เมื่อต้องการการกระตุ้นด้วยเอนไซม์
2. เติม 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงไป เขย่าให้เข้ากัน
3. เติม 2 มิลลิลิตร top agar (อุณหภูมิ 45^{0}C) ซึ่งเติมสารละลายผสมฮิสทีดีนและไบโอตินลงไปแล้ว, เขย่าโดยหมุนไปมาในอุ้งมือ 4-5 วินาที
4. เทลงใน minimal glucose agar plate รอจนผิววุ้นแข็ง จึงนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37^{0}C โดยวางแบบกลับด้าน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวน revertant colonies

6. จำนวน revertant colonies ที่เกิดจากสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานจำนวนจริง คือจำนวนที่ต้องหักลบด้วยค่า spontaneous revertant colony ทุกครั้ง

5. การตรวจการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีตามธรรมชาติ

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมล่าร์, pH 7.4
2. สารละลายผสมเอนไซม์ (S9 mixture)
3. Overnight culture ของแบคทีเรีย TA 98 และ TA 100
4. สารละลาย top agar ที่นึ่งให้ปลอดเชื้อ อุณหภูมิประมาณ 45^{0}C ซึ่งเติมสารละลายผสมของ 0.5 มิลลิโมล่าร์ฮิสทีดีนและไบโอติน ลงไปในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของ top agar
5. Minimal glucose agar plate

<u>วิธีทำ</u>

1. ใส่ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อเติม 0.5 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4
2. เติม 2 มิลลิลิตร top agar (อุณหภูมิ 45^{0}C) ที่มีส่วนผสมฮิสทีดีนและไบโอติน, เขย่าในอุ้งมือแล้วเทลงใน minimal glucose agar plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง
3. เตรียมหลอดทดลองที่มี 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียอีกครั้ง
4. เติม 0.5 มิลลิลิตรสารละลายเอนไซม์ (S9 mixture)
5. เติม 2 มิลลิลิตร top agar (อุณหภูมิ 45^{0}C) ที่มีส่วนผสมฮิสทีดีนและไบโอติน, เขย่าในอุ้งมือแล้วเทลงใน minimal glucose agar plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง
6. นำ plate ทั้งหมดไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
7. นับจำนวนโคโลนีที่เห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็น spontaneous revertant colony
8. Spontaneous revertant colony ที่นับได้จาก plate ข้อ 2 เป็นค่าที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ (-S9 mixture) ส่วนค่าของ plate ข้อ 5 เป็นค่า spontaneous revertant colony เมื่อมี S9 mixture

ภาคผนวก ช

การแยกแบคทีเรียใหม่ (Reisolation of tester strain)

การแยกแบคทีเรียใหม่ (Reisolation of tester strain)

สิ่งที่ต้องเตรียม

1. สารละลายฮิสทีดีน เข้มข้น 5 มิลลิโมล่าร์ และไบโอตินเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล่าร์
2. สารละลาย ampicillin ในปริมาณ 750 ไมโครกรัมต่อ plate
3. Glyceral
4. Minimal glucose agar plate

วิธีทำ

1. นำ frozen permanent copy ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่จะแยกโคโลนีเดี่ยวออกมา 1 หลอดจาก -80^{0}C
2. เตรียม minimal glucose agar plate ที่เคลือบด้วย 0.2 มิลลิลิตร สารละลายฮิสทีดีน เข้มข้น 5 มิลลิโมล่าร์ และไบโอตินเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล่าร์
3. เมื่อผิววุ้นแข็งได้ที่แล้ว เคลือบผิววุ้นอีกครั้งด้วยการ spread สารละลาย ampicillin ในปริมาณ 750 ไมโครกรัมต่อ plate ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที
4. หลังจากนั้นใช้ wire loop แตะ frozen permanent copy ของแบคทีเรีย แล้ว streak ไปมาบน agar เพื่อให้ได้ single colony
5. นำ plate ไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6. เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำ plate ออกมา ใช้ wire loop แตะบนโคโลนีเดี่ยวที่เด่นชัดสุด (well-isolated colony) นำไปเลี้ยงใน oxoid nutrient broth No.2 เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จะได้ overnight culture (ควรแยกโคโลนีเดี่ยวประมาณ 4-5 โคโลนีต่อครั้ง)
7. แบ่งเก็บเป็น aliquot ที่ -80^{0}C ส่วนละ 0.5 มิลลิลิตร (แบ่ง overnight culture บางส่วนมาเก็บโดยเติม glyceral 30% ลงไปอัตราส่วน culture 0.5 มิลลิลิตร ต่อ glyceral 30% 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนจะเก็บเป็น aliquot) ส่วนที่เหลือของ overnight culture นำไปตรวจสอบคุณสมบัติที่จำเป็นทั้งหมด ได้แก่ ; histidine requirement, rfa mutation, R-factor, spontaneous reversion และ sensitive ต่อสารก่อกลายพันธุ์
8. Aliquot ที่แยกจาก single colony แต่ละโคโลนีที่มีคุณสบบัติครบถ้วน เก็บเป็น master copies ที่ -80^{0}C หรือ master plate สำหรับใช้ประจำระหว่างทดลอง ส่วน aliquot ใด ๆ ที่ได้จาก single colony ที่มีคุณสมบัติไม่ครบ ควรจะทิ้งไป ไม่ควรเก็บให้ปนกัน
9. การเก็บในรูป master copy เตรียมเช่นเดียวกับการเก็บ permanent copy แต่ใช้ aliquot จาก single colony ที่มีคุณสมบัติครบมาเตรียม overnight culture หลังจากนั้นเติม glyceral 30% ลงไปในอัตราส่วนเดียวกัน แล้วแบ่งใส่หลอดพลาสติก cryotube หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร จึงนำไปเก็บที่

อุณหภูมิ -80^{0}C ทำเครื่องหมาย (label) ให้ถูกและควรให้แตกต่างจากเครื่องหมายของ permanent copy เมื่อจะใช้ในการทดลองแต่ละครั้งก็เอาออกมาและเตรียมเป็น overnight culture สำหรับทดสอบได้เลย