บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. วัสดุ

วัสดุที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วย เชื้อที่ใช้ทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม มีรายละเอียดดังนี้

1.1 เชื้อที่ใช้ทดสอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- *Salmonella typhimurium* strain TA 98 และ TA 100
- Oxoid nutrient broth No.2 (Sigma, England)
- Bacto agar (Merck, Germany)

1.2 สารเคมี

- β-D-Glucose 6-phosphate sodium salt (Sigma, England)
- β-Nicotinamide adenine di-nucleotide : β-NADP (Sigma, USA.)
- Citric acid, monohydrate (Sigma, Australia)
- D-Biotin (Sigma, Hong kong)
- Glucose, anhydrous (Sigma, China)
- Glyceral (Sigma, USA.)
- K_2HPO_4 anhydrous (Sigma, USA.)
- L-Histidine.HCl.H_2O (Sigma, USA.)
- Na_2HPO_4 (Merck, Germany)
- $NaH_2PO_4.H_2O$ (Merck, Germany)
- $NH_4H_2PO_4$ (Sigma, Japan)
- NaOH (Sigma, Sweden)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA.)
- $MgCl_2.6H_2O$ (Fluka, Germany)
- Ampicillin (Sigma, USA.)
- NaCl (Sigma, USA.)

- 2-(2-Furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide) (AF-2) (Sigma, USA.)
- 2-Aminoanthracene (2-AA) (Sigma, USA.)
- S9 fraction (ส่วนของ supernatant ที่ได้จากการปั่นตับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี) (ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- Crystal violet
- 70% Ethanol
- 95% Ethanol

1.3 อื่น ๆ

- Sterile distilled water
- Autoclave tape
- Aluminium foil

2. อุปกรณ์

เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วยอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำ อุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ และอุปกรณ์ในการวิเคราะห์หาสารก่อกลายพันธุ์

2.1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำ

- ขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทีลีน
- กล่องโฟมมีน้ำแข็งสำหรับรักษาอุณหภูมิตัวอย่างน้ำ
- ขวดน้ำกลั่น
- ทิชชู
- ปากกาเคมี

2.2 อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องวัดค่าความขุ่น (turbidity meter)
- เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity meter)
- เทอร์โมมิเตอร์ สำหรับวัดอุณหภูมิน้ำ

2.3 อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 37°C
- ตู้อบความร้อน (hot air oven)
- เครื่องอังไอน้ำ (water bath) อุณหภูมิ 45°C
- เครื่องอังไอน้ำ (water bath) แบบเขย่า อุณหภูมิ 37°C
- เตาไฟฟ้าพร้อมระบบแม่เหล็ก (hot plate / magnetic stirrer)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)
- ตู้เย็น (refrigerator) อุณหภูมิ 4°C, ตู้เยือกแข็ง (freezer) อุณหภูมิ -20°C และ อุณหภูมิ -70°C
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความยาวคลื่นของแสง (spectrophotometer)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (superspeed centrifuge)
- หัวเหวี่ยงชนิด SLA-1000
- หลอดปั่น
- Micropipette พร้อม tip
- Pipette
- Dispenser
- จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- ห่วงเขี่ยเชื้อ (wire loop)
- หลอดทดลอง ขนาด 16x100 mm พร้อมฝาปิด
- L-shaped culture tube
- ที่วางหลอดทดลอง (rack)
- Spreader
- Forceps
- Filter set
- Filter membrane
- Microfuge tube ขนาด 1.5 ml

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

- Cryotube ขนาด 2.0 ml
- ตะเกียงแก๊ส
- ปากกาเขียนฉลากบนเครื่องแก้ว
- Reagent bottle
- Volumetric flask
- Glove
- บีกเกอร์ (beaker)
- กระบอกตวง
- เตาอบไมโครเวฟ
- หลอดหยด
- จุกยาง
- Ultrasonic cleaner
- Shaker ใช้สำหรับ incubate เชื้อ
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี

3. วิธีดำเนินการ

3.1 การคัดเลือกสถานที่เก็บตัวอย่างและการกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ โรงงานอุตสาหกรรมผลิตถุงมือยางที่ระบายน้ำทิ้งลงสู่คลองอู่ตะเภาในเขตจังหวัดสงขลา ซึ่งมีทั้งสิ้น 5 โรงงาน (สำนักงานอุตสาหกรรมจังหวัดสงขลา, 2545) กำหนดกลุ่มตัวอย่างโดยใช้หลักเกณฑ์การสุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง ซึ่งกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมดจำนวน 5 โรงงาน

3.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตถุงมือยาง ณ จุดที่ปล่อยน้ำทิ้งลงสู่คลองอู่ตะเภา โดยใช้วิธีเก็บแบบรองรับน้ำจากท่อน้ำทิ้งโดยตรง นอกจากนี้เพื่อเป็นการตรวจสอบคุณภาพของแหล่งน้ำธรรมชาติจึงได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำดิบสำหรับการผลิตน้ำประปาในคลองอู่ตะเภา และตัวอย่างน้ำประปาจากโรงกรองประปา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ซึ่งใช้วิธีเก็บตัวอย่างโดยรองรับน้ำจากก๊อกที่เปิดทิ้งไว้ไม่ต่ำกว่า 2 นาที เก็บตัวอย่างน้ำจุดละ 1 ตัวอย่าง ด้วยขวดพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีนปริมาตร 1 ลิตร ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทางด้านกายภาพและเคมี ณ จุดเก็บตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างไว้ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษา

อุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 4°C จากนั้นนำตัวอย่างมาเก็บไว้ที่ตู้เยือกแข็ง (freezer) อุณหภูมิประมาณ –20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ การเก็บตัวอย่างน้ำจะทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ ในช่วงฤดูฝน (เดือนธันวาคม พ.ศ.2548-มกราคม พ.ศ.2549) และในช่วงฤดูร้อน (เดือนมีนาคม-เมษายน พ.ศ.2549)

3.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

3.3.1 วิเคราะห์คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมี (APHA, AWWA and WEF., 1998)

3.3.1.1 วัดอุณหภูมิน้ำ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

3.3.1.2 หาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยวิธี electrometric เครื่องมือที่ใช้ในการวัดเป็น pH meter ชนิด glass electrode หัวเดียว ก่อนใช้ปรับเครื่องมือ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 4.0, 7.0 และ 10.0 เพื่อปรับเครื่องมือให้ได้ค่ามาตรฐานก่อนที่จะทำการวัดตัวอย่างน้ำ

3.3.1.3 วัดค่าความขุ่น (turbidity) ด้วย turbidity meter ก่อนใช้ปรับเครื่องมือ โดยใช้สารละลายความขุ่นมาตรฐานฟอร์มาซิน (standard formazin solution)

3.3.1.4 วัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) ด้วย conductivity meter ก่อนใช้ปรับเครื่องมือด้วยสารละลายมาตรฐาน KCl

3.3.2 วิเคราะห์ความสามารถก่อกลายพันธุ์แบคทีเรียของตัวอย่างน้ำ

3.3.2.1 เตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ โดยนำตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตถุงมือยาง ตัวอย่างน้ำดิบสำหรับผลิตประปา และตัวอย่างน้ำประปาจากโรงกรองประปา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา มาปั่นเหวี่ยงโดยใช้หัวเหวี่ยงชนิด SLA-1000 ที่ 15,000 g (10,270 rpm) ให้ตกตะกอน เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสมากรองด้วย filter set ผ่าน Millipore® membrane ขนาด 0.45 μm

3.3.2.2 นำตัวอย่างที่กรองแล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกเป็นตัวอย่างที่ความเข้มข้นปกติ และตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งนำมาระเหยจนแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50°C แล้วละลายกลับด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 50-200 เท่าของความเข้มข้นปกติ แบ่งตัวอย่างปริมาณพอเหมาะ ใส่ microfuge tube ขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิประมาณ –20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

3.3.2.3 เตรียม S9 mixture ซึ่งประกอบด้วย S9 fraction, 1.65 M KCl-0.4 M $MgCl_2$, 1 M glucose-6-phosphate, 0.1 M NADP, 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7 และน้ำกลั่น

3.3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคของ Ames และคณะ (1975) และเทคนิคปรับปรุงโดย Dorothy และ Ames (1983) ดังนี้ คือ เตรียมตัวอย่างน้ำที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ใช้ตัวอย่าง 50 µl (test) หรือน้ำกลั่น 50 µl (negative control) ผสมกับ overnight broth culture ของแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 หรือ TA 100 ปริมาตร 100 µl และเติมสารละลาย S9 (S9 mixture) ปริมาตร 0.5 ml อุ่นและเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 นาที จากนั้นจึงเติม molten top agar (ประกอบด้วย 0.6% agar, 0.5% NaCl และ 0.5 mM histidine-biotin) ปริมาตร 2 ml ซึ่งแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C ผสมให้เข้ากันดี แล้วเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี minimal glucose agar (ประกอบด้วย 10% Vogel-Bonner medium E, 2% glucose และ 1.5% agar) ที่เตรียมไว้ก่อนแล้ว ทิ้งไว้จน top agar แข็งตัวจึงนำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวน colony ที่เกิดขึ้น

3.3.2.5 ทำการทดลองซ้ำ แต่เป็นการทดสอบตัวอย่างในสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ (สภาวะที่ไม่มี S9 mixture) ทำได้โดยการใส่ 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 ปริมาตร 0.5 ml แทน S9 mixture

ส่วนการทดสอบตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) ในสภาวะที่มี S9 mixture ใช้สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-aminoanthracene (2-AA) ที่ความเข้มข้น 0.3 µg/plate สำหรับสายพันธุ์ TA 98 และ 0.5 µg/plate สำหรับสายพันธุ์ TA 100 ส่วนสภาวะที่ไม่มี S9 mixture ใช้สาร 2-(2-Furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide) (AF-2) ที่ความเข้มข้น 0.05 µg/plate สำหรับสายพันธุ์ TA 98 และ 0.01 µg/plate สำหรับสายพันธุ์ TA 100 ซึ่งเชื้อมาตรฐาน 2 สายพันธุ์นี้ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความไวต่อสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน (บังอร ศรีพานิชกุลชัย และคณะ, 2545)

การทดลองตัวอย่างต่าง ๆ ทำซ้ำ 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ (triplicate) อ่านผลการทดลองโดยการนับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่ปรากฏในแต่ละ plate (revertant colonies (His^+)/plate) และนำค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแต่ละความเข้มข้นที่หักค่า spontaneous revertants (SR) โดยอ่านผลจาก negative control plate แล้วมาแสดงในลักษณะ dose-response relationship การแปลผลที่แสดงว่า ตัวอย่างมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (mutagenic activity) คือมีค่า mutagenic activity ratio (MAR) หรืออัตราส่วนของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของตัวอย่างที่ทดสอบต่อจำนวนโคโลนี กลายพันธุ์โดยตัวเอง (spontaneous revertant, SR) มากกว่า 2

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC (Statistical Package for the Social Science/Personal Computer) version 11.5

4.2 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงวิเคราะห์ (analytical statistics) ได้แก่

4.2.1 Paired t-test เปรียบเทียบคุณลักษณะทางด้านกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำระหว่างฤดูร้อนและฤดูฝน

4.2.2 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของส่วนสกัดจากตัวอย่างน้ำและจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์

4.2.3 Simple linear regression analysis โดยวิธี least square method เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ที่เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของส่วนสกัดจากตัวอย่างน้ำ