รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กัณฑ์วีร์ วิวัฒน์พาณิชย์. 2542. **แมลง.....อาหารมนุษย์ในอนาคต**. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

กิติ จินดาวิจักษณ์. 2543. **ระบาดวิทยาของมะเร็งกระเพาะอาหาร**. ใน **มะเร็งกระเพาะอาหาร**.กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร. 1-13.

แก้ว กังสดาลอำไพ. 2529. ความสัมพันธ์ระหว่างอาหารและสภาวะโภชนาการต่อการเกิดมะเร็งต่างๆ. ใน **โภชนพิษวิทยา**. กรุงเทพมหานคร: สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย. 117-194.

แก้ว กังสดาลอำไพ. 2537. **พิษวิทยา : หลักการเบื้องต้น ประยุกต์อาหารและโภชนาการ**. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.

จักรพันธุ์ ปัญจสุวรรณ. 2542. **พิษภัยในอาหาร**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร.

ชนิพรรณ บุตรยี่. 2537. การทดสอบเอมส์ตรวจวัดการก่อกลายพันธุ์(Ames test in mutagenicity assay). ใน แก้ว กังสดาลอำไพ, **พิษวิทยา : หลักการเบื้องต้น ประยุกต์อาหารและโภชนาการ**. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์. 2543. **สารพิษในอาหาร**. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

ประภาศรี ภูวเสถียร. 2534. ใยอาหาร : ชนิด คุณสมบัติของใยอาหารและแหล่งอาหาร. ใน **ก้าวไปกับโภชนาการเพื่อสุขภาพ**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์สื่ออักษร. 303-318.

ประภาศรี เลาหเวชวานิช. 2537. **ความสามารถของเส้นใยที่เตรียมจากผักและผลไม้หลายชนิดในการจับไนไตรท และยับยั้งการเกิดสารก่อกลายพันธุ์จากอะมิโนพัยรีนที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหาร ที่ศึกษาโดยใช้เอมส์เทสต์**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาโภชนศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ปรีชา สุวรรณพินิจ และนงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2537. **ชีววิทยา**. เล่มที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พงศ์ธร สังข์เผือก และประภาศรี ภูวเสถียร. 1983. คุณค่าอาหารของแหล่งอาหารโปรตีนของชาวชนบท : แมลง. **โภชนาการสาร** Journal of Nutrition Association of Thailand ปีที่ 17 ฉบับที่ 1: 5.

พรพรรณ วุฒิกรวณิชย์. 2539. **ประสิทธิภาพของโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการจับไนไตรทและยับยั้งการเกิดสารก่อกลายพันธุ์จากอะมิโนพัยรีนและไนไตรท.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมหาวิทยาลัย.

เพ็ญสุข เต่าทอง. 2526. **สรีรวิทยาของแมลง.** กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษิต พาณิชยานนท์ และ ณรงค์ ไวท์ยางกูร. 2523. มะเร็งกระเพาะอาหาร. ใน **ศัลยกรรมกระเพาะอาหาร.** กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์วังพญาไท. 119-122.

ไมตรี สุทธจิตต์. 2529. **สารพิษในสิ่งแวดล้อมและการเกิดมะเร็ง.** กรุงเทพมหานคร.

ลักษณา อินทร์กลับ. 2543. **โภชนศาสตร์เชิงชีวเคมี วิตามิน เกลือแร่ น้ำ และใยอาหาร.** กรุงเทพมหานคร: มีเดียการพิมพ์. 163-175.

วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, กระทรวง. ควบคุมมลพิษ, กรม. จัดการสารอันตรายและกากของเสีย, กอง. **ไนเตรท ไนไตรท์ และสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซ.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ฝ่ายศูนย์ข้อมูลสารอันตรายและอนุสัญญา กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย กรมควบคุมมลพิษ.

สุทธิ ภมรสมิต. 2528. **การศึกษาคุณภาพโปรตีนในแมลงที่ประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมบริโภค,** รายงานการวิจัย. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒมหาสารคาม.

สุเทพ อุสาหะ, นงนิตย์ มรกต, บรรจบ วันโน, และสิริพร ลาวัลย์. 2537. การศึกษาคุณภาพของโปรตีน ปริมาณวิตามินและแร่ธาตุจากจิ้งหรีดหางสั้นและแมลงกระชอน. **วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม.** 1-12.

สุนทรี สิงหบุตรา. 2541. **พิษรอบตัว การรักษา และการแก้พิษ.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กองเภสัชกรรมสำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร: เอ.ที.แอนด์เอ็น อินเตอร์เนชั่นแนล.

อุดมพร แพ่งนคร. 2534. การควบคุมประชากรแมลงโดยการกินเป็นอาหาร. **แก่นเกษตร** ปีที่ 19 ฉบับที่ 5: 229.

อุษา กลิ่นหอม, ชูศรี ราศรีรัตนะ และศุภรัตน์ จิตต์จำนง. 2528. **รายงานการวิจัยการศึกษาคุณค่าอาหาร ปาราสิตและส่วนประกอบที่เป็นพิษในแมลงบางชนิดที่เป็นอาหารของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒมหาสารคาม.

ภาษาอังกฤษ

American Cancer Society. 1982. **Cancer facts and figures**. New York: American Cancer Society.

Bingham, S.A., Williams, T.J., and Cumming, J.H. 1985. Dietary consumption in Britain: new estimates and their relation to large bowel cancer motality. **British Journal of Cancer** 52: 399-402.

Bjeldanes, L.F., Morris, M.M., Timourian, H., and Hatch, F.T. 1983. Effects of meat composition and cooking conditions on mutagen formation in fried ground beef. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 31: 18-21.

Bjelke, E., 1974. Epidemiologic studies of cancer of the stomach, colon, and rectum; with special emphasis on the role of diet. **Scandinavian Journal of Gastroenterology** 9: 1-235.

Burkitt, D.P. 1971. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. **Cancer** 28: 3-13.

Challis, B.C. 1985. Nutrition and nitrosamine formation. **Proceedings of The Nutrition Society** 44: 95-100.

Chamley, G., Tannenbaum, S.R., and Correa, P. 1982. Gastric cancer: An etiologic model. In Magee,P.N. ed. **Nitrosamines and human cancer**. Banbury Report 12. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 503-522.

Chen, C., Pearson, A.M., and Gray, J.I. 1990. Meat mutagens. **Advances in Food and Nutrition Research** 34: 387-449.

Correa, P., *et al.* 1976. Gastric cancer in Colombia. III. Natural history of precursor lesions. **Journal of National Cancer Institute** 57: 1027-1035.

Correa, P. 1980. The epidemiology and pathogenesis of chronic gastritis: Three etiologic entities. In: van der Reis L. ed. **Fronties of gastrointestinal research**. Vol.6. Basel: Karger. 98-108.

Correa, P., Fontham, E., Pickle, L.W. Chen, V., Lin, Y., and Haenszel, W. 1985. Dietary determinants of cancer in South Lousiana inhabitants. **Journal of National Cancer Institute** 75: 645-654.

Cuello, C., *et al.* 1976. Gastric cancer in Colombia. I. Cancer risk and suspect environmental agents. **Journal of National Cancer Institute** 57: 1015-1020.

Dale, L.G., Friedman, G.D., Ury, H.K., Grossman, S., and Williams, S.R. 1978. A case control study of relationships of diet and other traits to colorectal cancer in blacks. **American Journal of Epidemiology** 109: 132-144.

Doll, R. 1956. Environmental factors in the aetiology of cancer of the stomach. **Gastroenterologia** 86: 320-328.

Eastwood, M.A. 1973. Vegetable fiber : its physical properties. **Proceedings of The Nutrition Society** 32: 137.

Eastwood, M.A. 1979. An hypothesis for the action of die fiber along the gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition** 32: 366.

Ershoff, B.H. 1974. Antitoxic effects of plant fiber. **American Journal of Clinical Nutrition** 27: 1395-1398.

Friedman, M., Wilson, R.E., and Ziderman, I.I. 1990. Mutagen formation in heated wheat gluten, carbohydrates, and gluten/carbohydrate blends. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 38: 1019-1028.

Gonzalez.C.A. 1994. Nutritional factors and gastric cancer in Spain. **American Journal of Epidemiology** 139(5): 466-73.

Gooderham, N.J., et al. 1996. Heterocyclic amines: evaluation of their role in diet associated human cancer. **British Journal of Clinical Pharmacology** 42: 91-98.

Haenszel, W., Kurihara, M., Segi, M., and Lee, R.K. 1972. Stomach cancer among Japanese in Hawii. **Journal of National Cancer Institute** 49: 969-988.

Halliwell, B. 1993. Oxygen radicals as key mediators in human disease: fact or fiction?. In Parke, D.V., **Food Nutrition and Chemical Toxicity**, 129-138. London : Smith-Gordon.

Harington, J.S. 1981. Advances in cancer epidemiology in South Africa. South Africa **Cancer Bulletin** 25: 9-18.

Harris, N.M., Stavraky, K.M., and Fowler, J.L., 1979. Cancer motality in oil refinery workers. **Journal of Occupational Medicine** 21: 167-174.

Harris, P.J., Roberton, A.M., Watson, M.E., Triggs, C.M., and Ferguson, L.R. 1993. The effect of soluble-fiber polysaccharide on the adsorption of a hydrophobic carcinogen to an insoluble dietary fiber. **Nutrition and Cancer** 19(1): 43-54.

Harris, P.J., Roberton, A.M., Hollands, H.J., and Ferguson, L.R. 1991. Adsorption of hydrophobic mutagen to dietary fiber from the skin and Flesh potato tubers. **Mutation Research** 260: 203-213.

Hass, J.F. and Schottenfeld, D. 1978. Epidemiology of gastric cancer. In: Lipkin, M., Good, R.A. (eds.) **Gastrointestinal tract cancer**. New York, London: Plenum. 173-206.

Higginson, J. 1966. Etiological factors in gastrointestinal cancer in man. **Journal of National Cancer Institute** 37: 527-545.

Hill, M.J., Hawksworth, G., and Tattersall, G. 1973. Bacteria, nitrosamine and cancer of the stomach. **British Journal of Cancer** 28: 562-567.

Hirayama, T. 1971. Epidemiology of stomach cancer. **Gann Monograph** 11: 3-19.

IARC 1979. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans, Supplement 1, **Chemicals and industrials processes associates with cancer in human**. pp. 1-20. Lyon International Agency for Research on Cancer: IARC Sci. Publ.

Jackson, L.S., and Hargraves, W.A. 1995. Effect of time and temperature on the formation of MeIQx and DiMeIQx in a model system containing threonine, glucose and creatinine. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 43: 1678-1684.

Jacob, L.R. 1986. Relationship between dietary fiber and cancer: metabolic, physiologic and cellular mechanisms. **Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine** 183: 299-310.

Jagerstad, M., Layser-Reutersward, A., Oste, A., Dahlqvist, A., Grivas, S., Olsson, K., and Nyhammer, T. 1983a. Creatine and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds formed in fried beef. In Waller, G.R. and Feather, M.S. editors, **The Maillard reaction in Foods and Nutrition ACS Symposium**. Serie 215. Washington DC: American Chemical Society. Serie 215: 507-519.

Jansson, B. Seibert, G. and Speer, J.F . 1975. Gastrointestinal cancer: Its geographic distribution and correlation to breast cancer. **Cancer** 36: 2373-2384.

Johansson, M.A.E., Fredholm, L., Bjerne, I., and Jagerstad,M. 1995. Influence of frying fat on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers and pan residues. **Food and Chemical Toxicology** 33: 993-1004.

Johansson, M. and Jagerstad, M. 1993. Influence of oxidized deep-frying fat and iron on the formation of food mutagens in a model system. **Food and Chemical Toxicology** 31: 971-979.

Johansson, M., Skog, K., and Jagerstad, M. 1993. Effects of edible oils and fatty acids on the formation of mutagenic heterocyclic amines in a model system. **Carcinogenesis** 14(1): 89-94.

Kangsadalampai, K., Butryee, C., and Manconphol, K. 1996. Direct mutagenicity of the polycyclic aromatic hydrocarbon containing fraction of smoked and charcoal broiled food treated with nitrite in acid solution. **Food and Chemical Toxicology** 35: 213-218.

Khuhaprema, T., Chindavijak, K., and Martin, N. 1994. Stomach. In Deerasamee, S. *et al.* (ed.) **Cancer in Thailand Vol. II**, pp. 37-40.

Kikugawa, K., and Kato, T. 1991. Prevention of nitrosamine formation. In Hayatsu H. (ed.) **Mutagen in food: detection and prevention**, pp.67-85. USA: CRC Press.

Kinlen, L.J., Herman, C., and Smith, P.G. 1983. A proportionate study of cancer motality among members of a vegetarian society. **British Journal of Cancer** 48: 355-361.

Knize, M.G., *et al.* 1985. Effects of temperature, patty thickness and fat content on the production of mutagens in fried ground beef. **Food and Chemical Toxicology** 23: 1035-1040.

Knize, M.G., Cunningham, P.L., Griffin,Jr, E.A., Jones, A.L., and Felton, J.S. 1994. Characterization of mutagenic activity in cooked-grain-food products. **Food and Chemical Toxicology** 32: 15-21.

Kudo, M., and Kondo, T. 1957. Studies on hydrophilic properties of lignin. **TAPPI.** 54: 2046.

Larsen, J.C., and Poulson, E. 1987. Mutagens and Carcinogens in heat-processed food. In Miller, K. (ed) **Toxicological aspects of foods.** England: Elsevier. pp.205-241.

Layser-Reutersward, A., Skog, K., and Jagerstad, M. 1987. Mutagenicity of pan-fried bovine tissue in relation to their content of creatine, creatinine, monosaccharides and free amino acids. **Food and Chemical Toxicology** 25: 755-762.

Layton, D.W., et al. 1995. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. **Carcinogenesis** 16(1): 39-52.

Lijinsky, W. 1977. Nitrosamines and nitrosamides in the etiology of gastrointestinal cancer. **Cancer** 40: 2446-2449.

Lin, J.K., Cheng, J.T., and Lin-Shiau, S.Y. 1992. Enhancement of the mutagenicity of IQ and MeIQ by nitrite in the Salmonella system. **Mutation Research** 278(4): 277-287.

Lin, J.Y., Wang, H.I., and Yeh, Y.C. 1979. The mutagenicity of soy bean sauce. **Food And Cosmetics Toxicology** 17(4): 329-331.

Lopez-Carrillo, L., Lopez-Cervantes, M., Ward, M.H., Bravo-Alvarado, J., and Ramirez-Espitia, A. 1999. Nutrient intake and gastric cancer in Mexico. **International Journal of Cancer** Nov 26; 83(5): 601-605.

Mc Pherson-Kay, R. 1982. Dietary fiber. **Journal of Lipid Research** 23: 221-242.

Magee, P.N., Montesano, R., and Preussmann, R. 1976. N-Nitroso compounds and related carcinogens. In Searle, C.E. (ed.), **American Chemical Society Monograph** 173: 491-625.

Mariko, M., Mikiko, K., and Shosuke, K. 1999. Mechanism of oxidative DNA damage Induced by a heterocyclic amine, 2 – amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline. **Japanese Journal of Cancer Research** 90: 268-275.

Maron, D.M., and Ames, B.N. 1983. Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research** 113: 173-215.

Marquardt, H., Rufino, F., and Weisburger, J.H. 1977. Mutagenic activity of nitrite-treated foods: Human stomach cancer may be related dietary factors. **Science** 196: 1000-1001.

Masami, M. and Masahiko, M. 1986. In vitro binding of potent mutagenic pyrolyzates to intestinal bacteria. **Journal of National Cancer Institute** 77(1): 195-201.

Mirvish, S.S. 1975. Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, kinetic and in vivo occurrence. **Toxicology and Applied Pharmacology** 31: 325-351.

Mirvish, S.S. 1983. The etiology of gastric cancer : intragastric nitrosamide formation and other theories. **Journal of National Cancer Institute** 7: 629-647.

Modan, B., Barell, V., Lubin, F., Modan, M., Greenberg, R.A., and Graham, S. 1975. Low-fiber intake as an etiologic factor in cancer of the colon. **Journal of National Cancer Institute** 55: 15-18.

Moller, M.E., Dalh, R., and Bockman, O.C. 1988. A possible role of the dietary fiber product, wheat bran, as a nitrite scavenger. **Food Chemistry** 26: 841-845.

Munoz, N., and Connelly, R. 1971. Time trends of intestinal and diffuse types of gastric cancer in the United States. **International Journal of Cancer** 8: 158-164.

Namiki, M., Osawa, T., Ishibashi, H., Namiki, K. and Tsuji, K. 1981. Chemical aspects of mutagen formation by sorbic acid-sodium nitrite reaction. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 29: 407-411.

Namiki, M., Yamanaka, M., Osawa, T., and Namiki, M. 1984. Mutagen formation by nitrite-spice reaction. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 32: 948-952.

National Academy of Science. 1981. The health effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds. Part I. Washington, D.C.: **National Academy of Science.**

Ogiu, T, Nakadate, M., and Odashima, S. 1975. Induction of leukemias and digestive tract tumors in Donryn rats by 1-propyl-1-nitrosourea. **Journal of National Cancer Institute** 54: 887-893.

Ohshima, H., Friesen, M., Malaveille, C., Brouet, I., Hautefeuille, A., and Bartsch, H. 1989. Formation of direct-acting genotoxic substance in nitrosated smoked fish and meat products: identification of simple phenolic precursors and phenyldiazodium ions as reactive products. **Food and Chemical Toxicology** 27: 193-203.

Overvik, E., *et al.* 1987. Mutagenicity of pan residues and gravy from fried meat.**Mutation Research** 187: 47-53.

Palli, D., *et al.* 2001. Red meat, family history, and increased risk of gastric cancer with microsatellite instability. **Cancer Research** 61(14): 5415-5419.

Pelroy, R.A. and Stewart, D.L. 1981. Effects of nitrous acid on the mutagenicity of coal liquids and their genetically active chemical fractions. **Mutation Research** 90: 297-308.

Puwastien, P., *et al.* 1989. **Nutritional studies of strict vegetarian: I.Dietary intake by duplicate meal analysis**. Presented at 14th International congress of Nutrition, Soul, Korea.

Risch, H.A. *et al.* 1985. Dietary factors and the incidence of cancer of the stomach. **American Journal of Epidemiology** 122: 947-957.

Robbana-Barnat, S., Rabache, M., Rialland, E., and Fradin, J. 1996. Heterocyclic amines: occurrence and prevention in cooked food. **Environmental Health Perspectives** 104: 280-288.

Ruddell, W.S., Bone, E.S., Hill, M.J., Walter, C.L. 1978. Pathogenesis of gastric cancer in pernicious anemia. **Lancet** 1: 521-523.

Rushton, L., and Alderson, M.R. 1981. An epidemiological survey of eight oil refineries in Britain. **British Journal of Industrial Medicine** 38: 225-234.

Rydning, A., Berstad, A., Aadland, E., and Odegard, B. 1982. prophylactic effect of dietary fiber in duodenal ulcer disease. **Lancet II** : 736.

Sasagawa, C., Muramatsu, M., and Matsushima, T. 1988. Formation of direct mutagen from amino-imidazoazaarenes by nitrite treatment . (Selected Abstracts of the 16th Annual Meeting Environmental Mutagen Society of Japan. 27-28 October 1987, Kyoto, Japan). **Mutation Research** 203: 386.

Schweizer, T.F., and Edwards, C.A. 1992. **Dietary fiber – a component of food : Nutritional function in health and diseases.** London: Springer-Verlag. 21-39.

Skog, K. 1993. Cooking procedures and food mutagens : A Literature Review. **Food and Chemical Toxicology** 31(9): 655-675.

Skog, K.I., and Jagerstad, M.I. 1990. Effect of monosaccharides and disaccharides on the formation of food mutagens in model system. **Mutation Research** 230: 263-272.

Souhami, R., and Tobias, J. 1995. Cancer and its management. In Souhami, R., and Tobias, (eds.). **Oesophagus and stomach**, pp. 279-281. London: Blackwell Science.

Spingarn, N.E., Slocan, L.A. and Weisburger, J.H. 1980. Formation of mutagens in cooked foods. II. Foods with high starch content. **Cancer Letters** 9: 7-12.

Swann, P.F. 1977. Carcinogenic risk for nitrite, nitrate and N-nitrosamine in food. **Proceedings of The Royal Society of Medicine** 70: 113-115.

Tannenbaum, S.R., Sinskey, A.J., Weisman, M., and Bishop, W. 1974. Nitrite in human saliva: Its possible relationship to nitrosamine formation. **Journal of National Cancer Institute** 53: 79-84.

Thomas, T.L., Waxweiler, R.J., Moure-Eraso, R., Itaya, S., and Fraumeni, J.F., Jr. 1982. Mortality patterns among workers in three Texas oil refineries. **Journal of Occupational Medicine** 24: 135-141.

Tsuda M., *et al.* 1985. Use of nitrite and hypochlorite treatments in the determination of The contributions of IQ-type and non-IQ-type heterocyclic amines to mutagenicities in crude pyrolyzed materials. **Mutation Research** 147: 335-341.

Viadana, E., Bross, I.D., and Houten, L. 1976. Cancer experience of men exposed to inhalation of chemicals or to combustion products. **Journal of Occupational Medicine** 18 : 787-792.

Wakabayashi, K., *et al.* 1983. Presence of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-carboxylic acid, a precursor of a mutagenic nitroso compound, in soy sauce. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America** 80: 2912-2916.

Wakabayashi, K., et al. 1984. Appearance of direct acting mutagenicity of various food stuff produced in Japan and South East Asia on nitrite treatment. **Mutation Research** 158: 119-24.

Wakabayashi, K., Nagao, M., Ochiai, M., Tahira, T., Yamaizumi, Z., and Sugimura, T. 1985. A mutagen precursor in Chinese cabbage, indole-3-acetonitrile, which becomes mutagenic on nitrite treatment. **Mutation Research** 143: 17-24.

Weisburger, J.H., Wynder, E.L., and Horn, C.L. 1982. Nutritional facters and etiologic mechanisms in the causation of gastrointestinal cancers. **Cancer** 50: 2541-2549.

Weisburger, J.H., et al. 1986. Genotoxicity, carcinogenicity, and mode of action of the fried food mutagen 2-amino-3methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ). **Environmental Health Perspectives** 67: 121-127.

Willett, W.C., Stampfer,M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A., and Speizer, F.E. 1990. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. **The New England Journal of Medicine** 323: 1664-1672.

Winkelstein, W., Sacks, S.T., Ernster, V.L., and Selvin, S. 1977. Correlations of incidence rates for selected cancers in the nine areas of the Third National Cancer Survey. **American Journal of Epidemiology** 105: 407-419.

Wynder, E.I., Kmet, J., Dungal,N., and Segi, M. 1963. An epidemiological investigation of gastric cancer. **Cancer** 16: 1461-1496.

Yahagi, T., *et al.* 1975. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. **Cancer Letters** 1: 91-96.

Yang, D., Tannenbaum, S., Buchi, C., and Lee, G. 1984. 4-chloro-6-methoxyindole is the precursor of a potent mutagen (4-chloro-6-methoxy-2-hydroxyl-1-nitroso-indolin-3-oneoxine) that form during the nitrosation of the fava bean (Vicia fava). **Carcinogenesis** 5(10): 1212-1224.

Yano, M., Wakabayashi, K., Tahira, T., Arakawa, N., Ngao, M., and Sugimura, T. 1988. **Mutation Research** 202: 119-123.

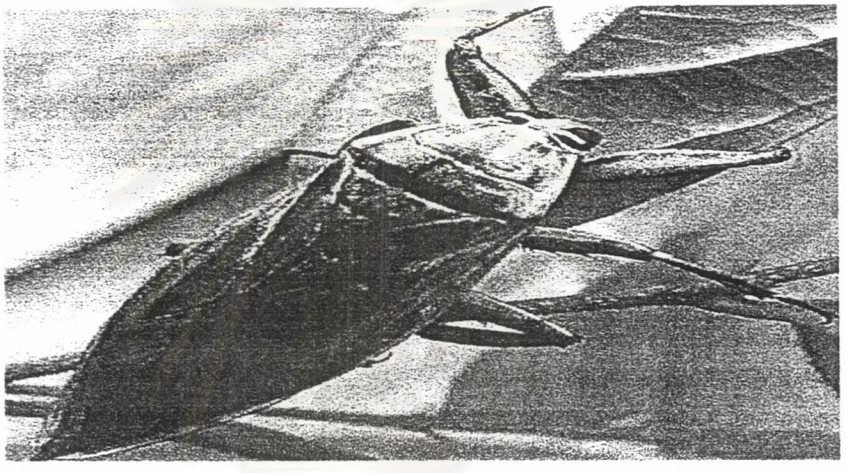
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

แมลงที่นำมาศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ 10 ชนิด (กัณฑ์วีร์ วิวัฒน์พาณิชย์, 2542) ดังนี้

1) <u>แมลงดานา</u>

ชื่อภาษาไทย	แมลงดานา
ชื่อภาษาอังกฤษ	Giant water bug
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Lethocerus indicus* Lep.-Serv.
Order	Hemiptera
Family	Belostomatidae



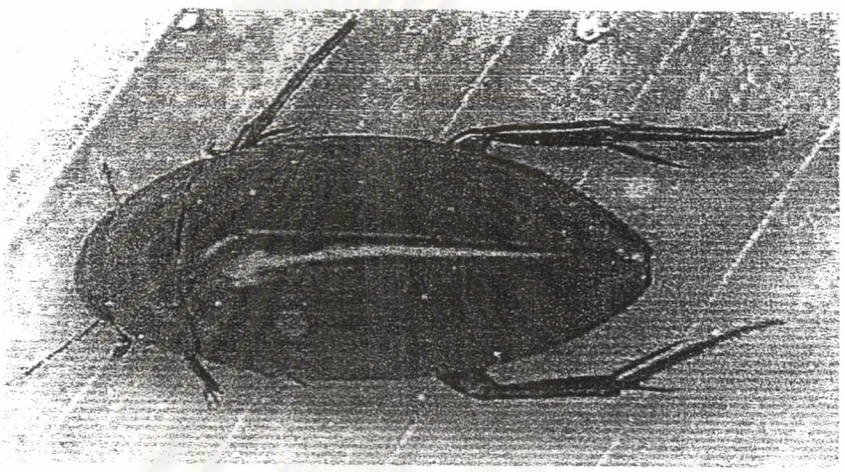
รูปที่ 7 แมลงดานา

<u>ลักษณะทางกายภาพ</u>

แมลงดานาเป็นพวกมวนที่มีขนาดใหญ่ที่สุด และนิยมบริโภคกันทุกภาคของประเทศไทย ตัวโตเต็มที่มีขนาดประมาณ 3 นิ้ว ตัวผู้มีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย ขนาดลำตัวของตัวผู้ยาวประมาณ 70-75 มิลลิเมตร ตัวเมียขนาดประมาณ 80-85 มิลลิเมตร มีลำตัวยาวเป็นรูปไข่ ด้านท้องและทางด้านหลังมีลักษณะแบน หัวสีน้ำตาลแก่ปนเขียว ตาสีดำ ปีกสีเกือบดำยกเว้นบริเวณขอบบางส่วนของปีกมีสีน้ำตาลอ่อน ขาคู่หน้าเป็นแบบขาว่ายน้ำ และมีขนอ่อนสีน้ำตาลคลุมตลอดทั้งขา ปากเป็นแบบเจาะดูด ลักษณะเป็นท่อยาวออกมาจากด้านหน้าของส่วนหัว และเก็บซ่อนไว้ตรงด้านล่างของศีรษะ ปลายปากมีลักษณะคล้ายหนามแหลมเรียวใช้แทงเข้าไปในร่างกายเหยื่อแล้วดูดกินน้ำเหลวๆ ในตัวเหยื่อ อาหารของแมลงดานา ได้แก่ ลูกกบ ลูกอ๊อด ลูกอึ่งอ่าง ปู ปลา กุ้ง ส่วนท้ายของท้องมีปลายโผล่ออกมาเรียกระยางค์ ลักษณะเป็นเส้นเรียวยาว 2 เส้นคู่กัน ประกอบด้วยขนที่ละเอียดและไม่เปียกน้ำทำหน้าที่ในการหายใจ โดยใช้ระยางค์นี้โผล่ขึ้นมาจากผิวน้ำเพื่อดูดก๊าซออกซิเจน แล้วนำไปเก็บในลำตัวทางปลายท่อ

2) <u>แมลงตับเต่า</u>

ชื่อภาษาไทย	ด้วงดิ่ง แมลงตับเต่า
ชื่อภาษาอังกฤษ	True water beetle
	Predaceous diving beetle
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Cybister limbatus* Fabricius
Order	Coleoptera
Family	Dytistidae



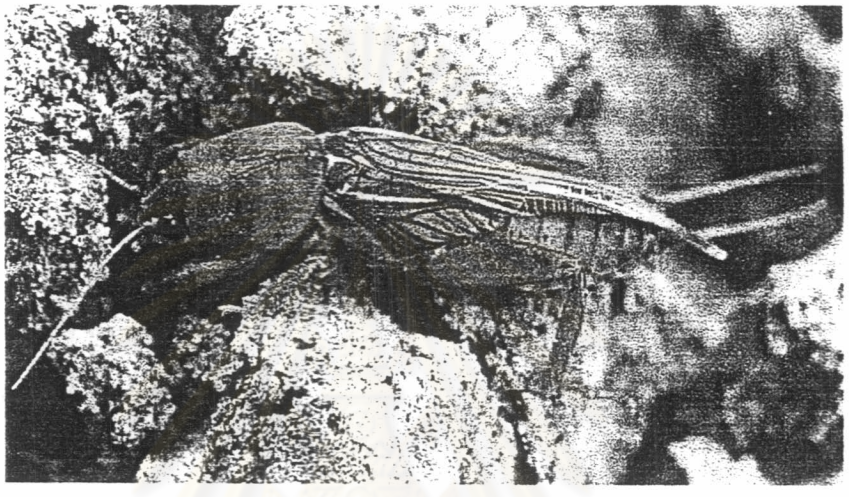
รูปที่ 8 แมลงตับเต่า

<u>ลักษณะทางกายภาพ</u>

แมลงตับเต่า หรือด้วงดิ่ง เป็นแมลงปีกแข็งขนาดใหญ่ ลำตัวยาวเป็นวงรีคล้ายรูปไข่ ส่วนท้องและปีกใหญ่ มีผิวเรียบ มีผนังลื่นเป็นมัน ลำตัวสีดำปนน้ำตาล บางชนิดมีลายสีเหลืองหม่นหรือค่อนไปทางเขียวแกมน้ำตาลอ่อน บริเวณปีกและลำตัวมีแถบสีเหลืองหม่นพาดผ่าน หนวดยาวเป็นเส้นด้าย ขาคู่หลังยาวและแบนกว่าขาคู่อื่นๆ มีขนเป็นแผงเหมาะสำหรับการว่ายน้ำ วิธีการว่ายน้ำของแมลงตับเต่าจะใช้ขาหลังเคลื่อนที่ไปพร้อมๆ กัน เมื่ออยู่นิ่งมักเอาหัวดิ่งลงไปใต้ผิวน้ำ ตัวเต็มวัยสามารถเก็บฟองอากาศไว้ใต้ปีกได้มาก ทำให้สามารถดำน้ำได้เป็นเวลานาน สามารถอยู่บนบกได้ดี และสามารถบินได้ไกล ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยกินสัตว์น้ำประเภทอื่นๆ เป็นอาหาร รวมทั้งปลาขนาดเล็ก แมลงตับเต่าถือว่าเป็นแมลงที่มีประโยชน์เพราะช่วยทำลายแมลงประเภทอื่นๆ

3) แมลงกระซอน

ชื่อภาษาไทย	แมลงกระซอน
ชื่อภาษาอังกฤษ	Mole cricket
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Gryllotalpa africana* Beauvois
Order	Orthoptera
Family	Gryllotalpidae



รูปที่ 9 แมลงกระซอน

ลักษณะทางกายภาพ

ลักษณะลำตัวของแมลงกระซอนมีสีน้ำตาล ส่วนหัวมีสีดำกว่าส่วนอื่นๆ หนวดสั้นเป็นแบบเส้นด้าย ปากเป็นแบบปากกัด แผ่นสันหลังแรกงอกมีลักษณะเป็นแผ่นกลมแข็ง ร่างกายมีขนปกคลุม ขาหน้าค่อนข้างแข็งแรง ลักษณะแผ่กว้างและมีหนามแหลม เหมาะสำหรับการขุดดิน ปีกมีสีน้ำตาลยาวกว่าความยาวของลำตัว ไม่สามารถมองเห็นอวัยวะวางไข่จากภายนอก แมลงกระซอนตัวผู้สามารถทำเสียงได้โดยใช้ปีกคู่หน้าสีกันแต่เสียงไม่ค่อยกังวาน แมลงชนิดจะนี้ไม่กระโดด ออกหากินในเวลากลางคืน ขนาดของลำตัวยาวประมาร 25 – 35 มิลลิเมตร

4) จิโปม

ชื่อภาษาไทย	จิโปม จิ้งโก่ง จิ้งหรีดโก่ง จิ้งหรีดหัวโต
ชื่อภาษาอังกฤษ	Short tailed cricket
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Brachytrupes portentosus* Licht
Order	Orthoptera
Family	Gryllidae

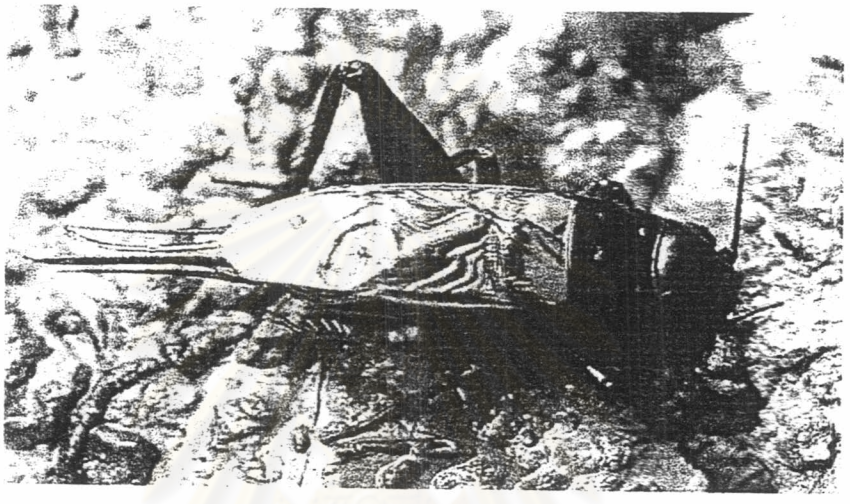
รูปที่ 10 จิโปม

ลักษณะทางกายภาพ

จิโปมเป็นแมลงที่จัดอยู่ในกลุ่มของจิ้งหรีด เป็นแมลงที่มีรูปร่างอ้วน หนวดยาวเป็นแบบเส้นด้าย หัวมีลักษณะกลม และแบนใหญ่ ปากเป็นแบบปากกัด ปีกมีลายเส้นเล็กน้อย ลำตัวมีสีน้ำตาลอมเหลือง ตัวเมียมีอวัยวะในการวางไข่สั้นมาก หากเปรียบเทียบกับจิ้งหรีดประเภทอื่นๆ ตัวผู้สามารถทำเสียงได้โดยใช้ขอบของปีกคู่หน้าสีกัน มีอวัยวะรับฟังเสียงอยู่บริเวณขาคู่หน้า จิโปมเป็นจิ้งหรีดขุดดินที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ขนาดของลำตัวยาวประมาณ 37 – 44 มิลลิเมตร

5) จิ้งหรีด

ชื่อภาษาไทย	จิ้งหรีด
ชื่อภาษาอังกฤษ	House cricket
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Acheta testacea* Walker
Order	Orthoptera
Family	Gryllidae



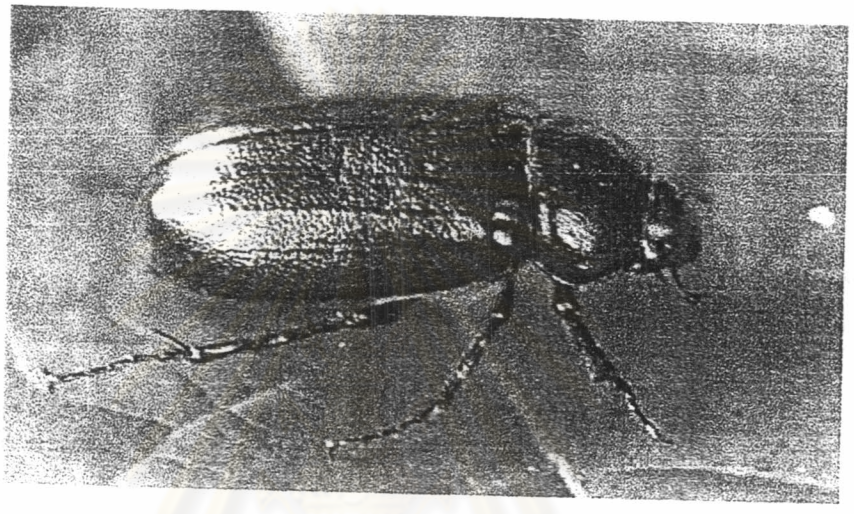
รูปที่ 11 จิ้งหรีด

ลักษณะทางกายภาพ

จิ้งหรีดมีรูปร่างสั้น หัวกลม หนวดยาวเป็นรูปเส้นด้าย ลำตัวสีน้ำตาลค่อนข้างแดง ปากเป็นแบบปากกัด ปีกมีความยาวเท่ากับส่วนท้อง จิ้งหรีดเป็นแมลงที่มีขาหลังใหญ่แข็งแรง และสามารถกระโดดได้เก่ง ตัวเมียมีอวัยวะวางไข่ยาวเท่ากับความยาวของลำตัว บริเวณปลายเปิดจะเล็กแหลม ตัวผู้สามารถทำเสียงได้โดยใช้ขอบของปีกคู่หน้าสีกัน จนเกิดเสียงดังกังวาน จิ้งหรีดมีอวัยวะฟังเสียงอยู่บริเวณขาคู่หน้า ขนาดของลำตัวยาวประมาณ 21 – 26 มิลลิเมตร

6) <u>แมลงกินูน</u>

ชื่อภาษาไทย	แมลงกินูน
ชื่อภาษาอังกฤษ	Scarab beetle
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Holotrichia sp.*
Order	Coleoptera
Family	Scarabaeidae



รูปที่ 12 แมลงกินูน

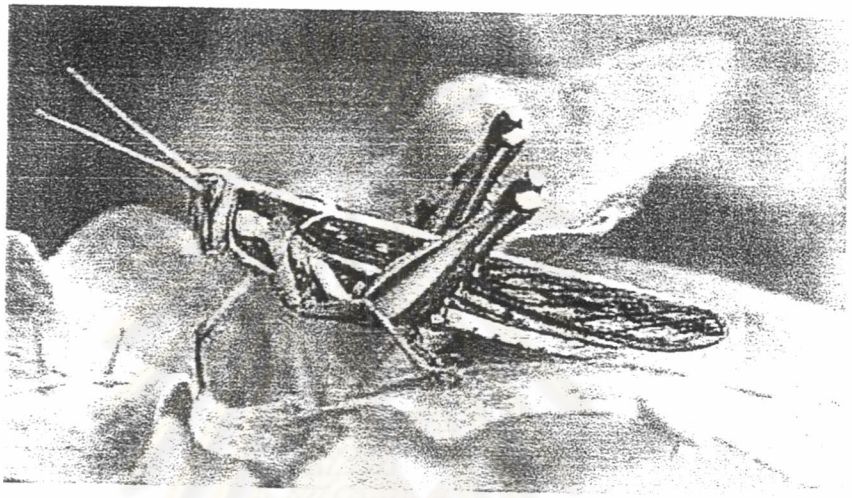
<u>ลักษณะทางกายภาพ</u>

แมลงกินูนมีด้วยกันหลายประเภท ซึ่งแตกต่างกันไปตามสีของลำตัว เป็นแมลงปีกแข็ง ขนาดกลาง รูปร่างป้อม หนวดเป็นรูปใบไม้ มีขนปกคลุมเล็กน้อย ส่วนหัว อก ขา มีสีน้ำตาลเข้ม คล้ายสีช็อกโกแลต ส่วนปีกมีสีน้ำตาลอ่อนกว่าและไม่ค่อยเป็นมัน ปีกคลุมส่วนท้องแต่ไม่คลุมไปถึงท้องปล้องสุดท้าย อกปล้องที่ 2 มีขนยาวปกคลุมเห็นได้ชัดเจน ขนาดลำตัวยาวประมาณ 22 – 25 มิลลิเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7) ตั๊กแตนอีสาน

ชื่อภาษาไทย	ตั๊กแตนปาทังก้า
ชื่อภาษาอังกฤษ	Bombay locust
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Patanga succincta* L.
Order	Orthoptera
Family	Acrididae



รูปที่ 13 ตั๊กแตนอีสาน

ลักษณะทางกายภาพ

ตั๊กแตนอีสานมีลักษณะลำตัวเรียว หัวกลม ปากเป็นแบบปากกัด บริเวณส่วนบนของหัวมีแถบสีเหลืองและแถบสีน้ำตาลสลับกัน แถบสีเหลืองกลางหลังพาดยาวไปจนถึงปลายปีกคู่หน้า ที่ลำตัวมีแถบสีน้ำตาลพาดตามยาวเช่นกัน หนวดสั้นเป็นแบบเส้นด้าย บริเวณแก้มมีแถบสีดำพาดจากขอบตาด้านล่างยาวไปสุดส่วนล่างของแก้ม ปีกคู่หน้ามีจุดสีเหลืองอ่อนขนาดไม่เท่ากันกระจายอยู่ทั่วไป ขาหลังมีลักษณะเป็นหนาม ไม่มีอวัยวะสำหรับทำเสียง เป็นตั๊กแตนที่มีขนาดใหญ่ โดยมีความยาวประมาณ 64 – 78 มิลลิเมตร

8) <u>แมลงมัน</u>

ชื่อภาษาไทย	ตั๊กแตนหนวดยาว
ชื่อภาษาอังกฤษ	Long-horned grasshopper,
	Cone-headed grasshopper
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Euconocephalus sp.*
Order	Orthoptera
Family	Tettigoniidae

รูปที่ 14 แมลงมัน

<u>ลักษณะทางกายภาพ</u>

ตั๊กแตนหนวดยาวมีลำตัวยาว หัวเป็นรูปกรวย หนวดเป็นแบบเส้นด้าย มีความยาวมากกว่าความยาวของลำตัว ปากเป็นแบบปากกัด แผ่นสันหลังของอกปล้องแรกยาวคลุมส่วนท้อง ปีกที่สมบูรณ์มีสีเขียว ขาคู่หน้ามีอวัยวะสำหรับฟังเสียง ตัวผู้มักใช้ขอบของปีกคู่หน้าสีกันทำให้เกิดเสียงได้ ขนาดของลำตัวยาวประมาณ 40 – 60 มิลลิเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9) <u>แม่เป้ง</u>

ชื่อภาษาไทย	มดเป้ง มดแดง
ชื่อภาษาอังกฤษ	Red or yellow Ant
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Oecophylla smaragdina* Fabricius
Order	Hymenoptera
Family	Formicidae

รูปที่ 15 แม่เป้ง

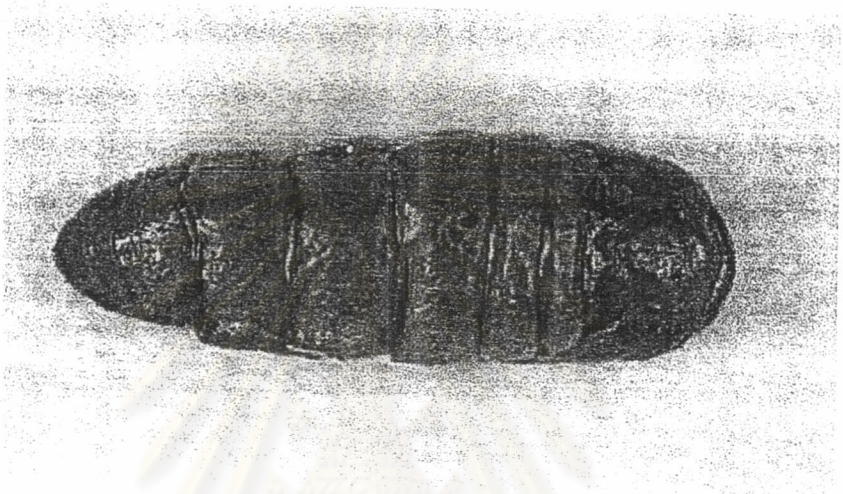
<u>ลักษณะทางกายภาพ</u>

มดเป้ง หรือแม่เป้ง หมายถึง ตัวอ่อนระยะตัวหนอนและดักแด้ของมดแดงที่จะเจริญเป็นราชินีมด มีขนาดใหญ่มาก ตัวมีสีชมพูอ่อน ตัวอ่อนไม่มีขา มีลักษณะคล้ายแคปซูลโผล่หัวขึ้นมาเล็กน้อย ส่วนท้องอ้วนกว่าส่วนหัว ระยะดักแด้มีขาและปีกไม่ติดกับลำตัว สามารถเคลื่อนไหวได้เป็นอิสระ ส่วนหัวเจริญดี ขนาดลำตัวยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10) ดักแด้ไหม

ชื่อภาษาไทย	ดักแด้ไหม
ชื่อภาษาอังกฤษ	Silk worm pupae
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Bombyx mori* L.
Order	Lepidoptera
Family	Bombycidae



รูปที่ 16 ดักแด้ไหม

ลักษณะทางกายภาพ

ดักแด้ไหม คือระยะดักแด้ของผีเสื้อไหม มีขาและปีก เคลื่อนที่ไม่ได้ จะติดเป็นเนื้อเดียวกับลำตัว มีช่องให้อากาศเข้าออกอยู่ที่ช่วงอกและช่วงท้อง ลำตัวอ้วนมีสีเหลือง ดักแด้ไหมจะสร้างปลอกหุ้มซึ่งมีเส้นใยพันอยู่โดยรอบ ขนาดของลำตัวยาวประมาณ 20 – 25 มิลลิเมตร เมื่อสาวไหมออกแล้ว ชาวบ้านจึงนำดักแด้มาบริโภค (กัณฑ์วีร์ วิวัฒน์พาณิชย์, 2542)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของตั๊กแตนปาทังก้าด้วยวิธีเอมส์ ด้วยเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และสายพันธุ์ TA100 ซึ่งเป็นการศึกษาปฐมภูมิเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ระหว่างตั๊กแตน ปาทังก้าที่ซื้อจากสะพานพระพุทธยอดฟ้าจุฬาโลกมหาราช และตลาดคลองเตย แสดงในตารางที่ 13 และ 14

ตารางที่ 13 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อและค่าดัชนีการกลายพันธุ์ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดจากตั๊กแตนปาทังก้าที่ซื้อจากสะพานพระพุทธยอดฟ้าจุฬาโลกมหาราช และตลาดคลองเตย ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 3 – 3.5) และไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ

น้ำหนักแมลง (มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ)	ตั๊กแตนปาทังก้าที่ซื้อจากสะพานพระพุทธยอดฟ้าจุฬาโลกมหาราช		ตั๊กแตนปาทังก้าที่ซื้อจากตลาดคลองเตย	
	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI*	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI*
0**	26 ± 3	1.0	23 ± 1	1.0
105.26	25 ± 4	0.96	18 ± 4	0.78
26.32 N	81 ± 6	3.12	91 ± 8	3.96
52.63 N	202 ± 9	7.77	188 ± 5	8.17
105.26 N	297 ± 11	11.42	256 ± 6	11.13

* MI หรือ Mutagenicity index หาได้จากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อหารด้วยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

**จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

N หมายถึง สารสกัดจากตั๊กแตนทอดทำปฏิกิริยากับสารละลายไนไตรท 50 มิลลิโมล่าร์

ตารางที่ 14 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อและค่าดัชนีการกลายพันธุ์ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA100 ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดจากตั๊กแตนปาทังก้าที่ซื้อจากสะพานพระพุทธยอดฟ้าจุฬาโลกมหาราช และตลาดคลองเตย ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 3 – 3.5) และไม่มีระบบเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ

น้ำหนักแมลง (มิลลิกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ)	ตั๊กแตนปาทังก้าที่ซื้อจากสะพานพระพุทธยอดฟ้าจุฬาโลกมหาราช		ตั๊กแตนปาทังก้าที่ซื้อจากตลาดคลองเตย	
	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI*	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI*
0**	170 ± 11	1.0	191 ± 7	1.0
105.26	127 ± 8	0.75	44 ± 8	0.23
26.32 N	159 ± 9	0.94	157 ± 6	0.82
52.63 N	215 ± 10	1.26	161 ± 8	0.84
105.26 N	273 ± 13	1.61	238 ± 15	1.25

* MI หรือ Mutagenicity index หาได้จากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อหารด้วยจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

**จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

N หมายถึง สารสกัดจากตั๊กแตนทอดทำปฏิกิริยากับสารละลายไนไตรท 50 มิลลิโมล่าร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

วิธีเตรียมสารละลายสำหรับการปฏิบัติการ

1) เกลือวีบี (VB salts หรือ Vogel-Bonner medium E stock salt solution)

นำไปใช้ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Minimal agar)

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 500 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส)	336 มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate, $MgSO_4.7H_2O$)	5 กรัม
กรดซิตริกโมโนไฮเดรต (citric acid monohydrate)	50 กรัม
โพแทสเซียมฟอสเฟตไดเบสิกแอนไฮดรัส (potassium phosphate dibasic anhydrous, K_2HPO_4)	250 กรัม
โซเดียมแอมโมเนียมฟอสเฟตเตตระไฮเดรต (sodium ammonium phosphate tetrahydrate, $NaNH_3HPO_4.4H_2O$)	87.5 กรัม

วิธีเตรียม

ละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ในน้ำกลั่นประมาณ 336 มิลลิลิตร จนละลายหมด เติมกรดซิตริกโมโนไฮเดรตลงไปอีก จนละลายหมด จึงเติมโพแทสเซียมฟอสเฟตแอนไฮดรัส ฯลฯ ค่อยๆ เติมจนละลายหมดไปทีละตัวตามลำดับ จนครบ ปรับปริมาตรแล้วกรอง สารละลายที่ได้นำไปแบ่งใส่ขวดแก้วฝาเกลียว ขวดละ 6 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ในที่เย็น

2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด Minimal glucose agar plate

นำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (Mutagenicity assay)

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 300 มิลลิลิตร
แบคโตอะการ์ (Bacto agar)	4.5 กรัม
น้ำกลั่น	279 มิลลิลิตร
เกลือวีบี (VB salts)	6 มิลลิลิตร
สารละลายกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 40 (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)	15 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม (ใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ)

1. ละลายอะการ์ ด้วยน้ำกลั่น 279 มิลลิลิตร ในขวดเลี้ยงเชื้อ (flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร

2. นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์เป็นเวลา 15 นาที

3. เติมเกลือวีบีลงไป แกว่งให้ละลายจนหมด

4. เติมสารละลายกลูโคสลงไป แกว่งให้ละลายจนหมด

5. เมื่ออุณหภูมิของสารละลายลดลงพอเหมาะแล้ว (ลดการเกิดละอองน้ำบนฝาของจานเลี้ยงเชื้อ) จึงนำไปเทลงจานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว จานละ 30 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จึงนำไปวางแบบพลิกกลับด้านในที่แห้ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 วัน จึงนำไปใช้

3) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวออกซอยด์นัมเบอร์ 2 (Oxoid No.2)

นำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Overnight culture bacteria)

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 50 มิลลิลิตร
ออกซอยด์นัมเบอร์ 2 (Oxoid nutrient broth No.2)	1.25 กรัม
น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อออกซอยด์นัมเบอร์ 2 ในน้ำกลั่น จากนั้นแบ่งใส่ขวดเลี้ยงเชื้อมีฝาจุก ขวดละ 12 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ

การเตรียมแบคทีเรีย โดยนำเชื้อจากเชื้อตั้งต้น 10 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวออกซอยด์นัมเบอร์ 2_ 12 มิลลิลิตร (1 ขวด)

4) สารละลายฮิสทีดีนไฮโดรคลอไรด์ 0.1 โมล่าร์

นำไปเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Top agar)

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 10 มิลลิลิตร
ฮิสทีดีนไฮโดรคลอไรด์ (L-histidine HCl)	0.20963 กรัม
น้ำกลั่น	10 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายฮิสทีดีน (น้ำหนักโมเลกุล 209.63) ในน้ำกลั่นจนกระทั่งละลายหมด จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายฮิสทีดีนไฮโดรคลอไรด์ 1 มิลลิโมล่าร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5) สารละลายไบโอติน 1 มิลลิโมล่าร์

นำไปเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Top agar)

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 100 มิลลิลิตร
ไบโอติน (Biotin)	24.43 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม : ละลายไบโอติน (น้ำหนักโมเลกุล 244.3) ในน้ำกลั่น และให้ความร้อนจนกระทั่งละลายหมด

6) สารละลายฮิสทีดีนไฮโดรคลอไรด์และไบโอติน 0.5 มิลลิโมล่าร์

นำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยใช้ สารละลาย 10 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Top agar) 100 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 200 มิลลิลิตร
ฮิสทีดีนไฮโดรคลอไรด์ 1 มิลลิโมล่าร์ (1mM L-histidine HCl)	100 มิลลิลิตร
ไบโอติน 1 มิลลิโมล่าร์ (1mM biotin)	100 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมสารละลายทั้ง 2 ให้เข้ากัน นำไปกรอง จากนั้นแบ่งใส่ขวดแก้วฝาเกลียว ขวดละ 5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

7) อาหารเลี้ยงเชื้อท็อปอะการ์ (Top agar)

นำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (Mutagenicity assay)

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 50 มิลลิลิตร
แบคโตอะการ์	0.3 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	0.25 กรัม
น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมต่างๆ ในน้ำกลั่นแล้วบรรจุขวดแก้วฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที จากนั้นเติม 5 มิลลิลิตร ของส่วนผสมสารละลายฮิสทีดีนไฮโดรคลอไรด์และไบโอติน 0.5 มิลลิโมล่าร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8) สารละลายโซเดียมไนไตรท 2 โมล่าร์

นำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาไนโตรเซชัน (Nitrosation)

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 20 มิลลิลิตร
โซเดียมไนไตรท (sodium nitrite)	2.76 กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ	20 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายโซเดียมไนไตรทในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองมีจุกปิด เตรียมตามจำนวนครั้งของการใช้ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

9) สารละลายแอมโมเนียมซัลฟาเมต 2 โมล่าร์

นำไปใช้ในการทำปฏิกิริยากับโซเดียมไนไตรทที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาไนโตรเซชัน

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 20 มิลลิลิตร
แอมโมเนียมซัลฟาเมต(ammonium sulphamate)	4.56 กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ	20 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายแอมเนียมซัลฟาเมตในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดลองมีจุกปิด เตรียมตามจำนวนครั้งของการใช้ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

10) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล

นำไปใช้ในปฏิกิริยา เพื่อให้ระบบที่ศึกษามีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ในช่วง 3 – 3.5

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 1000 มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. Hydrochloric acid)	15.36 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	984.64 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายกรดเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เก็บในขวดแก้วปราศจากเชื้อ เตรียมโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อเนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกไม่สามารถฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำได้

11) สารละลายอะมิโนพัยรีน 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำไปใช้เป็นสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน สำหรับการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (Mutagenicity assay)

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 1 มิลลิลิตร
อะมิโนพัยรีน(aminopyrene)	3 มิลลิกรัม
อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile)	1 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม : ละลายอะมิโนพัยรีนในอะซิโตไนไตรล์เก็บในขวดแก้วฝาเกลียวสีชา แช่ในช่องแช่แข็ง เตรียมโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 1 มิลลิลิตร
สารละลายอะมิโนพัยรีน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.1 มิลลิลิตร
อะซิโตไนไตรล์	0.9 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

เจือจางสารละลายอะมิโนพัยรีน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอะซิโตไนไตรล์เก็บในขวดแก้วฝาเกลียวสีชา แช่ในช่องแช่แข็ง เตรียมโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ

การเตรียมสารละลายอะมิโนพัยรีน 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมจากสารละลายอะมิโนพัยรีน 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 250 ไมโครลิตร และอะซิโตไนไตรล์ 750 ไมโครลิตร

12) สารละลายแอมพิซิลลิน 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำไปใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียใหม่ (subculture)

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 10 มิลลิลิตร
แอมพิซิลลินโซเดียม (ampicillin sodium)	80 มิลลิกรัม
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	10 มิลลิลิตร

13) สารละลายคริสตัลไวโอเลต 0.1 เปอร์เซ็นต์

นำไปใช้ ในการแยกเชื้อแบคทีเรียใหม่

สารเคมีที่ใช้	เตรียม 10 มิลลิลิตร
คริสตัลไวโอเลต (crystal violet)	10 มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ	10 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมแบคทีเรีย

<u>วิธีเตรียม</u>

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวออกซอยด์นัมเบอร์ 2 (ตามวิธีในภาคผนวก ข.)

2. ก่อนทำการทดลอง 1 วัน นำแบคทีเรียที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวออกซอยด์ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปเขย่าในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้เชื้อแบคทีเรีย (overnight culture) ซึ่งเมื่อเจือจางลง 8 เท่า ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ จะต้องวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.3 – 0.4

การแยกแบคทีเรียใหม่

เมื่อต้องการเตรียมแบคทีเรียขึ้นมาใช้ใหม่ เพราะแบคทีเรียที่เตรียมใช้ตลอดการทดลองหมด หรือเมื่อพบว่าคุณสมบัติของแบคทีเรียผิดปกติไปจากเดิมเช่น ค่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติสูงกว่าปกติ จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์ลดต่ำลงไปจากเดิมเมื่อนำไปทดสอบกับสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน ควรจะเตรียมแบคทีเรียใหม่จากโคโลนีเดี่ยว ดังนี้

<u>วิธีเตรียม</u>

1. นำแบคทีเรียซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวออกซอยด์นัมเบอร์ 2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3. เคลือบผิววุ้น (minimal glucose agar plate) ที่เตรียมไว้ล่วงหน้า ด้วยสารละลายแอมพิซิลิน 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.1 มิลลิลิตร สารละลายฮิสทีดีนไฮโดรคลอไรด์ 0.1 โมล่าร์ จำนวน 0.3 มิลลิลิตร และสารละลายไบโอติน 1 มิลลิโมล่าร์ จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง

3. ใช้ปลายลวดแตะเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ แล้วลากเป็นรอยไปมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อเจือจางลงเรื่อยๆ เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

4. นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางแบบกลับด้านในตู้เลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ใช้ปลายลวดแตะบนโคโลนีเดี่ยวที่เด่นชัดที่สุด นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวออกซอยด์นัมเบอร์ 2 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร เขย่าในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จะได้เชื้อแบคทีเรีย (overnight culture) ทั้งนี้ควรแยกโคโลนีเดี่ยวประมาณ 4 – 5 โคโลนีต่อครั้ง

6. แบ่งเก็บเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ในหลอดพลาสติกทนความเย็น หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส และเติมไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 0.09 มิลลิลิตรต่อเชื้อแบคทีเรีย 1

มิลลิลิตร โดยแบ่งบางส่วนเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine requirement) การทดสอบความสามารถในการสร้างสารคลุมผิว (rfa mutation) การทดสอบว่าแบคทีเรียมีพลาสมิดหรือไม่ (R-factor) การตรวจดูความไวต่อรังสีอัลตร้าไวโอเลต (uvrB mutation) การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutant colony) และทดสอบความไวต่อสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน

7. โคโลนีเดี่ยวที่มีคุณสมบัติครบถ้วนจะนำมาเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง ส่วนโคโลนีเดี่ยวที่มีคุณสมบัติไม่ครบให้ทิ้งไป

การตรวจความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine requirement)

<u>สิ่งที่ต้องเตรียม</u>

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (minimal glucose agar plate)
2. เคลือบผิววุ้นด้วย ฮิสทีดีนและไบโอติน ดังนี้

   จานที่ 1 ไม่ใส่ทั้งฮิสทีดีนและไบโอติน

   จานที่ 2 ไบโอติน 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

   จานที่ 3 ใส่ฮิสทีดีน 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร

   จานที่ 4 ใส่ทั้งฮิสทีดีน 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และไบโอติน 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

3. นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ 1 คืนมาขีดเป็นรอยไปมาบนวุ้นทั้ง 4 จาน โดยใน 1 จานสามารถจัดแบ่งเป็นช่องสำหรับทดสอบได้ 4 ช่อง สำหรับ 4 โคโลนี

4. นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางแบบกลับด้านในตู้เลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. แบคทีเรียที่สามารถเจริญเฉพาะในจานที่ 4 คือมีทั้งฮิสทีและไบโอติน สามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ได้

การตรวจความสามารถในการสร้างสารคลุมผิว (rfa mutation)

การทดสอบคุณสมบัติที่ไม่สามารถสร้างสารคลุมผิว (lipopolysaccharide barrier) ของแบคทีเรีย *salmonella typhimurium* จึงอำนวยให้สารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ซึมผ่านเข้าไปในตัวแบคทีเรียได้ ซึ่งปกติสารเหล่านี้ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์แบคทีเรีย

การตรวจว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติข้อนี้ ทดสอบโดยใช้คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ซึ่งเมื่อซึมเข้าไปในแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียตาย

สิ่งที่ต้องเตรียม

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (minimal glucose agar plate)

2. สารละลายคริสตัลไวโอเลต เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. กระดาษกรองตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 – 8 มิลลิเมตร ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. สารละลายท็อปอะการ์ที่นึ่งให้ปลอดเชื้อ ในการทดลองต้องให้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียสและเติมสารละลายผสมของ 0.5 มิลลิโมล่าร์ฮิสทีดีนและไบโอติน ลงไปในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ(Top agar) 100 มิลลิลิตร

วิธีทำ

1. ใส่ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ

2. เติมท็อปอะการ์ 2 มิลลิลิตร (45 องศาเซลเซียส) ลงไปเขย่า แล้วเทลงใน minimal glucose agar plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง

3. ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อจับกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลม จุ่มลงในสารละลายคริสตัลไวโอเลต

4. ค่อยๆ วางกระดาษกรองลงบนจานเลี้ยงเชื้อ โดยกดลงบนผิววุ้นเล็กน้อย

5. นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. หลังจากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อออกมาตรวจดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ให้สังเกตว่ารอบๆ กระดาษกรองที่จุ่มสารละลายคริสตัลไวโอเลต จะเห็นเป็นวงกลมลักษณะใส (clear zone) เนื่องจากส่วนนี้จะไม่มีแบคทีเรียเจริญ ให้วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมนี้ ควรจะมีขนาดประมาณ 12 – 14 มิลลิเมตร จึงจะถือว่าแบคทีเรียมี rfa mutation ถ้าเกิดวงกลมที่มีขนาดเล็กกว่านี้ แสดงว่า แบคทีเรียนั้นมีความผิดปกติของคุณสมบัติ เช่นอาจสูญเสีย rfa mutation ควรพิจารณาเตรียมแยกโคโลนีเดี่ยวใหม่

การตรวจว่าแบคทีเรียมีพลาสมิดหรือไม่ (R-factor)

เป็นการทดสอบเพื่อดูว่าแบคทีเรียมีพลาสมิดอยู่หรือไม่ โดยการทดสอบความไวต่อยาแอมพิซิลลิน (ampicillin) แบคทีเรียที่มีพลาสมิดจะทนทานต่อยานี้

วิธีทำ

1. ใส่ 0.1 มิลลิลิตร ของแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 คืนลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ

2. เติม 2 มิลลิลิตรท็อปอะการ์ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่มีสารละลายผสมฮิสทีดีนและไบโอตีน เขย่า แล้วเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ (minimal glucose agar plate) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

จนกระทั่งผิวของวุ้นแข็ง

3. เตรียมสารละลายแอมพิซิลิน 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตามภาคผนวก ข.)

4. ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อจับกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 – 8 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในสารละลายแอมพิซิลินที่เตรียมไว้

5. ค่อยๆ วางแผ่นแอมพิซิลินลงบนผิววุ้นโดยกดเล็กน้อย

6. นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางแบบกลับด้านในตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. นำจานเลี้ยงเชื้อออกมาตรวจดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ให้สังเกตว่ารอบๆ แผ่นแอมพิซิลินมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แสดงว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติการมีพลาสมิด

วิธีทดสอบสามารถทำควบคู่ไปกับการตรวจความสามารถในการสร้างสารคลุมผิว คือ ทดสอบในจานเดียวกัน โดยแบ่งอีกส่วนเพื่อวางกระดาษกรองจุ่มแอมพิซิลินลงไปบนวุ้นที่เคลือบด้วยส่วนผสมของฮิสทีดีน และไบโอตินของท็อปอะการ์ กับแบคทีเรีย

การตรวจการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีตามธรรมชาติ

เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ อาจเกิดกลายพันธุ์ได้เองโดยไม่มีการเหนี่ยวนำจากสารเคมีใดๆ ทำให้สามารถเห็นเป็นโคโลนีได้ เรียกว่า จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutant colony) ซึ่งค่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ตามธรรมชาติที่ยอมรับของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ และตัวเลขนั้นควรจะคงที่ในแต่ละการทดลองที่ทำในห้องปฏิบัติการเดียวกัน ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ค่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติในระดับปกติของ *Salmonella typhimurium* แต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบเอมส์ สำหรับระบบที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้นสารพิษ

แบคทีเรีย	จำนวนการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ
TA98	30 – 50
TA97	90 – 180
TA100	100 – 200
TA102	240 – 320

วิธีทำ

1. เติมแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 คืน 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ7.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2. เติม 2 มิลลิลิตรท็อปอะการ์ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่มีสารละลายผสมฮิสทีดีนและไบโอติน เขย่า แล้วเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ (minimal glucose agar plate) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง

3. นำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. นับจำนวนโคโลนีที่เห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็นจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

การตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน

การทดสอบดูความไวต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานจะต้องทดสอบควบคู่ไปกับการทดสอบสารตัวอย่างในแต่ละการทดสอบ โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้จะต้องเลือกใช้ความเข้มข้น ปริมาณ และชนิดของสารให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียและสภาวะทดสอบว่ามีเอนไซม์ร่วมในปฏิกิริยาที่ศึกษาหรือไม่ การเลือกใช้สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ชนิดและปริมาณสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานสำหรับ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100

สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน	ภาวะที่ทดสอบ	ความเข้มข้นสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน	
		TA98	TA100
2-AA	+S9 mix	0.5	0.5
B(a)P	+S9 mix	5.0	-
AFB_1	+S9 mix	0.05	-
4-NQO	-S9 mix	0.2	0.05
NaN_3	-S9 mix	-	0.5
AF-2	-S9 mix	0.1	0.01

หมายเหตุ : 2-AA = 2-aminoanthracene, B(a)P = Benzo(a)pyrene, AFB_1 = Aflatoxin B_1

AF-2 = 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide,

4-NQO = 4-nitroquinoline-1-oxide, NaN_3 = sodium azide

วิธีทำ

1. ผสม 0.05 มิลลิลิตร ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานกับ 0.5 มิลลิลิตร สารละลาย

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. เติม 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงไป เขย่าให้เข้ากัน

3. เติมท็อปอะการ์ 2 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) ซึ่งเติมสารละลายผสมไบโอติน และฮิสทีดีนลงไปแล้ว เขย่า 4 – 5 วินาที

4. เทลงใน minimal glucose agar plate รอจนผิววุ้นแข็ง จึงนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวางแบบกลับด้านเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์

6. จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่เกิดจากสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานจำนวนจริง คือ จำนวนที่ต้องหักลบด้วยค่าจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ตามธรรมชาติทุกครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	นางสาวรุจิเรข ชนาวิรัตน์
วัน เดือน ปีเกิด	23 กุมภาพันธ์ 2518
สถานที่เกิด	จังหวัดอุดรธานี ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี เภสัชศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปีที่สำเร็จการศึกษา	พ.ศ. 2540
ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน	ปี พ.ศ. 2540 - 2541 เภสัชกร กลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลหนองบัวลำภู จังหวัดหนองบัวลำภู ปี พ.ศ. 2541 - ปัจจุบัน เภสัชกร ภาควิชาเภสัชกรรม วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดขอนแก่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย