

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีทดสอบสารก่อการกลายพันธุ์แบบมาตรฐานและแบบ Paper Disc Diffusion

Investigation of Mutagenicity Potential from the Standard Plate Incorporation and the Paper Disc Diffusion

ธิดารัตน์ แซ่ซื่อ (Thidarat Sasue)* ดร.วงศ์วิวัฒน์ ทศนียกุล (Dr.Wongwiwat Tassaneeyakul)**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีทดสอบสารก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีของ Ames โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ทั้งวิธีมาตรฐาน Plate incorporation และวิธี Paper disc diffusion ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ทั้งวิธี Plate incorporation และวิธี Paper disc diffusion พบว่าวิธี Plate incorporation แสดงฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ทั้งสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 โดยทดสอบกับสาร 4NPD ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และทดสอบกับสาร NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ วิธี Paper disc diffusion แสดงฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์กับสายพันธุ์ TA 98 โดยทดสอบกับสาร 4NPD ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรอง 0.5 cm แต่วิธี Paper disc diffusion ไม่แสดงฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์กับสายพันธุ์ TA 100 อย่างไรก็ตามวิธี Paper disc diffusion จะทำให้ประหยัดเวลา สารเคมี และอุปกรณ์ในการวิจัยได้ เมื่อทดลองกับตัวอย่างจำนวนมาก

ABSTRACT

In this study was aimed to investigate the direct mutagenic potential with the Ames test using the bacteria tester strain *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 through both the standard Plate incorporation and the Paper disc diffusion method. The mutagenic assay were validated for both the methods, by which the Plate incorporation using two different known mutagens the 4NPD at the concentrations of 0.005 and 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, and sodium azide at the concentrations of 0.01 and 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ on both *S. typhimurium* TA98 and TA100. The Paper disc diffusion method was validated using only the 4NPD at the concentrations of 0.05 and 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ with the diameter of the paper 0.5 cm and *S. typhimurium* TA98 only. The Paper disc diffusion method did not work satisfactory with the *S. typhimurium* TA100. However this method has some advantages in using less chemicals, and less time consuming when we need to work on several samples.

คำสำคัญ: เอ็มส์ เทสต์ การกลายพันธุ์ ซัลโมเนลลา ทัยฟิมูเรียม

Key Words: Ames tests, Mutation, *Salmonella typhimurium*

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** รองศาสตราจารย์ สาขาพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

การกลายพันธุ์ (mutation) หมายถึง การที่ดีเอ็นเอที่ผิดปกติไปจากเดิมถูกนำไปถ่ายทอดรหัสแบบผิดปกตินั้นทำให้ได้สิ่งที่ผิดปกติไปจากธรรมชาติ ดีเอ็นเอที่ผิดปกติจะมีเบสใดเบสหนึ่งในสายดีเอ็นเอถูกเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (อุษณีย์, 2534) และสามารถประเมินพิษของสารก่อการกลายพันธุ์ได้ด้วยวิธี Plate incorporation test หรือ Ames Test ซึ่งเป็นการทดสอบที่พัฒนาขึ้นโดย Dr. Bruce Ames เพื่อใช้คัดกรองหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารเคมี สารสกัดสมุนไพร เป็นการทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (backward or reverse mutation) ในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* เนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้ถูกทำให้กลายพันธุ์ไปจนไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน histidine ได้ ทำให้ไม่สามารถเจริญในตัวกลางที่ขาดกรดอะมิโนชนิดนี้ได้ เรียกว่า Histidine dependent (His-) โดยสารจะแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง ถ้าสารทดสอบมีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์จะทำให้แบคทีเรียชนิดนี้เกิดการกลายพันธุ์ย้อนกลับสามารถสร้าง histidine ได้เอง เป็น Histidine independent (His+) (Ames, 1971) ต่อมามีการพัฒนาวิธีการทดสอบเป็นระยะโดยอาศัยหลักการเดิม (Ames et al., 1973, 1975; McCann et al., 1975; Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000) นอกจากวิธีทดสอบสารก่อการกลายพันธุ์แบบมาตรฐานแล้วได้มีการประยุกต์วิธีดังกล่าวโดยให้สารแพร่ผ่านกระดาษกรอง (Paper Disc Diffusion) ที่วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถประเมินพิษของสารก่อการกลายพันธุ์ได้เช่นกัน (De Stasio & Goodson-Gregg, 2010) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเปรียบเทียบวิธีทดสอบสารก่อการกลายพันธุ์แบบมาตรฐานแบบ Plate Incorporation และแบบ Paper Disc Diffusion กับสารทดสอบมาตรฐาน เนื่องจากทั้งสองวิธีมีรายละเอียดที่แตกต่างกัน โดยวิธีแบบ Plate Incorporation เป็นวิธีดั้งเดิมที่นิยมใช้กันมากที่สุดเนื่องจากความสะดวกและไม่ยุ่งยากในการทดลอง แต่

ก็มีข้อจำกัดที่ในแต่ละ plate จะใส่สารทดสอบได้เพียง 1 ชนิดเท่านั้น ดังนั้นหากต้องการทดสอบสารพิษจำนวนหลายชนิด ก็จะต้องใช้สารทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อ และอุปกรณ์ในการทดลองเป็นจำนวนทวีคูณ ขณะที่วิธี Paper Disc Diffusion สามารถใส่สารทดสอบได้หลายชนิดในแต่ละ plate ของการทดลอง ทำให้สะดวก และประหยัดปริมาณสารเคมี และอุปกรณ์ที่ต้องใช้ลงได้มาก แต่ก็มีข้อจำกัดที่จะใส่สารพิษที่ต้องการทดสอบได้ในปริมาณจำกัด และอาจมีปัญหาด้านการแพร่กระจาย และโอกาสที่เชื้อทดสอบจะสัมผัสกับสารแตกต่างกัน ผู้ทดลองจึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการทดลองของตน

การศึกษาครั้งนี้ใช้ Ames test ตามวิธีมาตรฐาน Plate Incorporation เปรียบเทียบกับวิธี paper disc diffusion โดยทดสอบทั้งสองวิธีกับสาร 4-Nitro-O-phenyldiamine (4NPD) กับเชื้อ *Salmonella* strain TA 98 สาร Sodium azide (NaN_3) กับเชื้อ *Salmonella* strain TA 100 ซึ่งทั้งสาร 4NPD และ NaN_3 เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็น positive control ในการทดลองมาตรฐานทั่วไป (OECD 471, Mortelmans & Zeiger, 2000) ผลที่ได้คือ วิธีทดลองที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพประหยัดเวลา สารเคมี และอุปกรณ์ในการวิจัย เมื่อทดลองกับตัวอย่างจำนวนมาก เช่น เพื่อนำไปประเมินพิษก่อการกลายพันธุ์จากสารเคมี ในอาหารที่นิยมบริโภคในเขตเทศบาลนครขอนแก่น

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อประเมินฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์จากสารเคมีด้วยวิธี Ames Test
2. เพื่อพัฒนาวิธีการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อประเมินพิษก่อการกลายพันธุ์

วิธีการวิจัย

1. สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี

4-Nitro-o-phenyldiamin (4NPD) (Sigma-Aldrich), Sodium azid (NaN_3) (Sigma), Agar (Hardy diagnostics), NaCl (Lobachemie), D-biotin (Sigma-Aldrich), L-histidine (Sigma-Aldrich), Nutrient broth, Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich), *Salmonella typhimurium* strain TA 98 and TA 100, Glucose (Merck), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fluka chemie), Citric acid (BDH), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Carlo erba reagenti), K_2HPO_4 (BDH), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo erba reagenti), Glycerol (Carlo erba reagenti)

เครื่องมือ

เครื่องชั่งรุ่น METTLERPJ 3000 (METTLER), เครื่องกวนสารละลาย, เครื่องผสมสารละลาย (VORTEX GEIE 2 รุ่น G-560E), เครื่อง Autoclave (STURDY รุ่น

SA-300VF), เครื่องอุ่นอาหารไมโครเวฟ (LG รุ่น MD-3444C), ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20°C (SANYO), ตู้อบ (Hot Air Oven) (SHEL LAB รุ่น 1375), อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (PRECISDIG รุ่น P SELECTA), ตะเกียงแก๊ส, ตู้อบ (Incubator) (SHEL LAB รุ่น 1535)

2. วิธีการทดลอง

การศึกษา Ames test ตามวิธีมาตรฐานโดยทดสอบสาร 4-Nitro-o-phenyldiamin (4NPD) กับเชื้อ *Salmonella* strain TA 98

1) การเตรียมสารละลาย 4NPD

เตรียมสารละลายให้ความเข้มข้นเป็น $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ โดยชั่งสาร 4NPD 0.01 g ละลายใน dimethyl sulfoxide 1 ml จากนั้นเจือจางสารทดสอบด้วย dimethyl sulfoxide สำหรับใช้งานที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.005 , $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

ตารางที่ 1 การเตรียมสารทดสอบสำหรับใช้งานจากสารละลายความเข้มข้น $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

ความเข้มข้นของสารทดสอบ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ปริมาตรสารละลาย $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ที่ใช้ (μl)	ปริมาตรโคเมธิลซัลฟอกไซด์ที่ใช้ (μl)
0	0	50
0.005	0.5	995.5
0.01	1	999

2) การทดสอบ Ames test

ในแต่ละการทดลองของ Ames test จะเป็นการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง เป็นการทดลองนำสาร 4NPD ที่ความเข้มข้นต่างๆ (โดยทำ 1 ความเข้มข้นต่อ 1 plate) จากข้อ 1 ปริมาตร $50 \mu\text{l}$ เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ top agar 2 ml ผสมกับ nutrient broth solution 0.5 ml เติมเชื้อ *Salmonella* strain TA 98 ที่ผ่านการ

culture มาแล้วข้ามคืน $50 \mu\text{l}$ ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดี แล้วเทราดบน Glucose minimal agar plates เอียง plate ให้ส่วนผสมกระจายทั่ว plate จากนั้นหมูนวนจนสารกระจายสม่ำเสมอ นำ plate ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 2 ซ้ำ แล้วจึงนำมานับจำนวน revertant ของเชื้อ *Salmonella* คำนวณค่าเฉลี่ยจำนวน revertant และค่าดัชนีการกลายพันธุ์

การศึกษา Ames test ตามวิธีมาตรฐานโดย
ทดสอบสาร Sodium azide (NaN_3) กับเชื้อ *Salmonella*
strain TA 100

1) การเตรียมสารละลาย NaN_3

เตรียมสารละลายให้ความเข้มข้นเป็น $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ โดยชั่ง
สาร NaN_3 0.05g ละลายในน้ำกลั่น 50 ml จากนั้นเจือ
จางสารทดสอบด้วยน้ำกลั่นสำหรับใช้งานที่ความ
เข้มข้น 0 (control), 0.01 และ $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

ตารางที่ 2 การเตรียมสารทดสอบสำหรับใช้งานจากสารละลายความเข้มข้น $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

ความเข้มข้นของสารทดสอบ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ปริมาตรสารละลาย $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ที่ใช้ (μl)	ปริมาตรน้ำกลั่นที่ใช้ (μl)
0	0	50
0.01	10	990
0.05	50	950

2) การทดสอบ Ames test

เป็นการทดลองนำสาร NaN_3 ที่ความ
เข้มข้นต่างๆ (โดยทำ 1 ความเข้มข้นต่อ 1 plate) จาก
ข้อ 1 ปริมาตร $50 \mu\text{l}$ เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ top
agar 2 ml ผสมกับ nutrient broth solution 0.5 ml เติม
เชื้อ *Salmonella* strain TA 98 ที่ผ่านการ culture
มาแล้วข้ามคืน $50 \mu\text{l}$ ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดี แล้ว
เทราดบน Glucose minimal agar plates เอียง plate ให้
ส่วนผสมกระจายทั่ว plate จากนั้นหมูนวนจนสาร
กระจายสม่ำเสมอ นำ plate ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ
 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำ 2 ซ้ำ แล้วจึงนับจำนวน
จำนวน revertant ของเชื้อ *Salmonella* คำนวณค่าเฉลี่ย
จำนวน revertant และค่าดัชนีการกลายพันธุ์

การศึกษา Ames test ตามวิธี paper disc
diffusion โดยทดสอบสาร 4-Nitro-o-phenyldiamin
(4NPD) กับเชื้อ *Salmonella* strain TA 98

1) เจือจางสารทดสอบ 4NPD ด้วย dimethyl
sulfoxide สำหรับใช้งานที่ความเข้มข้น 0 (control),
0.05, และ $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

2) ตัดกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง
0.5, 1 และ 1.5 cm จากนั้นนำไป autoclave เพื่อป้องกันการ
ปนเปื้อนก่อนนำไปทดสอบ

3) ศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของสาร
ทดสอบ ปริมาณที่เหมาะสมของเชื้อ *Salmonella*
strain TA 98 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษ
กรอง โดยทำการทดสอบตามตารางดังนี้

ตารางที่ 3 การทดสอบ Ames test ตามวิธี paper disc diffusion กับสาร 4NPD

สิ่งที่เติม	Plate1	Plate2	Plate3
4NPD ที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.05, และ 0.1 µg/µl (µl)	5	20	40
เชื้อ <i>Salmonella</i> strain TA 98 (µl)	50	50	50
ขนาด ø ของกระดาษกรอง (cm)	0.5	1	1.5

4) การทดสอบ Ames test

ทำการทดลอง plate ที่ 1 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ top agar 2 ml ผสมกับ nutrient broth solution 0.5 ml เติมเชื้อ *Salmonella* strain TA 98 ที่ผ่านการ culture มาแล้วเข้มข้น 5 µl ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดี แล้วเทราดบน Glucose minimal agar plates เอียง plate ให้ส่วนผสมกระจายทั่ว plate จากนั้นหมูนวนจนสารกระจายสม่ำเสมอใช้ปากคีบคีบกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm วางบน plate ทั้ง 3 จุด บีบกระดาษ 4NPD ที่ความเข้มข้นต่างๆ (โดยทำ 3 ความเข้มข้นต่อ 1 plate) จากข้อ 3 ปริมาตร 5 µl ปล่อยลงบนกระดาษกรองนำ plate ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมานับจำนวน revertant ของเชื้อ *Salmonella* ทำการทดลอง plate ที่ 2 และ 3 เช่นเดียวกับ plate ที่ 1 แต่เปลี่ยนปริมาตรของสารทดสอบ ปริมาตรของเชื้อ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรองตามตารางที่ 3 โดยทุก plate ทำอย่างละ 2 ซ้ำ แล้วจึงนำมา

นับจำนวน revertant ของเชื้อ *Salmonella* คำนวณค่าเฉลี่ยจำนวน revertant และค่าดัชนีการกลายพันธุ์

การศึกษา Ames test ตามวิธี paper disc diffusion โดยทดสอบสาร Sodium azid (NaN_3) กับเชื้อ *Salmonella* strain TA 100

1) เจือจางสารทดสอบ NaN_3 ด้วยด้วยน้ำกลั่นสำหรับใช้งานที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.01 และ 0.05 µg/µl

2) ตัดกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5, 1 และ 1.5 cm จากนั้นนำไป autoclave เพื่อป้องกันการปนเปื้อนก่อนนำไปทดสอบ

3) ศึกษาหาปริมาตรที่เหมาะสมของสารทดสอบ ปริมาตรที่เหมาะสมของเชื้อ *Salmonella* strain TA 100 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรอง โดยทำการทดสอบตามตารางดังนี้

ตารางที่ 4 การทดสอบ Ames test ตามวิธี paper disc diffusion กับสาร NaN_3

สิ่งที่เติม	Plate1	Plate2	Plate3
NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.01, และ 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (μl)	5	20	40
เชื้อ <i>Salmonella</i> strain TA 100 (μl)	50	50	50
ขนาด ϕ ของกระดาษกรอง (cm)	0.5	1	1.5

4) การทดสอบ Ames test

ทำการทดลอง plate ที่ 1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ top agar 2 ml ผสมกับ nutrient broth solution 0.5 ml เติมเชื้อ *Salmonella* strain TA 100 ที่ผ่านการ culture มาแล้วข้ามคืน 5 μl ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีแล้วเทราดบน Glucose minimal agar plates เอียง plate ให้ส่วนผสมกระจายทั่ว plate จากนั้นหมุนวนจนสารกระจายสม่ำเสมอใช้ปากคีบคีบกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm วางบน plate ทั้ง 3 จุด ปิเปตสาร NaN_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (โดยทำ 3 ความเข้มข้นต่อ 1 plate) จากข้อ 3 ปริมาตร 5 μl ปล่อยลงบนกระดาษกรอง นำ plate ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง plate ที่ 2 และ 3 เช่นเดียวกับ plate ที่ 1 แต่เปลี่ยนปริมาตรของสารทดสอบ ปริมาตรของเชื้อ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรองตามตารางที่ 4 โดยทุก plate ทำอย่างละ 2 ซ้ำ แล้วจึงนับจำนวน revertant ของเชื้อ *Salmonella* คำนวณค่าเฉลี่ยจำนวน revertant และค่าดัชนีการกลายพันธุ์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ สถิติที่ใช้ประกอบด้วย

สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ การเปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้ค่าเฉลี่ยหรือการแสดงผลต่างของข้อมูลโดยใช้ตาราง ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากอาหารแสดงโดยค่าเฉลี่ยของจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้งๆ ละ 2 จาน ถ้าพบความสัมพันธ์ระหว่าง

ความเข้มข้นของสารทดสอบกับจำนวน colony กลายพันธุ์คือ เมื่อความเข้มข้นของสารทดสอบเพิ่มขึ้น จำนวน colony กลายพันธุ์ก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อของสารทดสอบสูงเกิน 2 เท่าของจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติแสดงว่าสารสกัดจากอาหารชนิดนั้นมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และแสดงค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (Mutagenicity index หรือ MI) ซึ่งคำนวณได้จากจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากสารสกัดจากอาหารหารด้วยจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษา Ames test ตามวิธีมาตรฐาน (Standard Plate Incorporation) โดยทดสอบสาร 4-Nitro-O-phenyldiamin (4NPD) กับเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 98

จากการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสาร 4NPD ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* strain TA98 ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ทำให้จำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อของสารทดสอบสูงเกิน 2 เท่าของจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 1

ตารางที่ 5 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 plate) และค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (MI) ของเชื้อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ได้จากการทดสอบกับสาร 4NPD ที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

สาร 4NPD ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	เชื้อ <i>S. typhimurium</i> TA 98	
	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI
0	29	-
0.005	428	14.76
0.010	616	21.24



ภาพที่ 1 โคโลนีของ *S. typhimurium* TA 98 ที่กลายพันธุ์เมื่อสัมผัสกับสาร 4NPD ที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.010 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ เปรียบเทียบกับจำนวน colony กลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

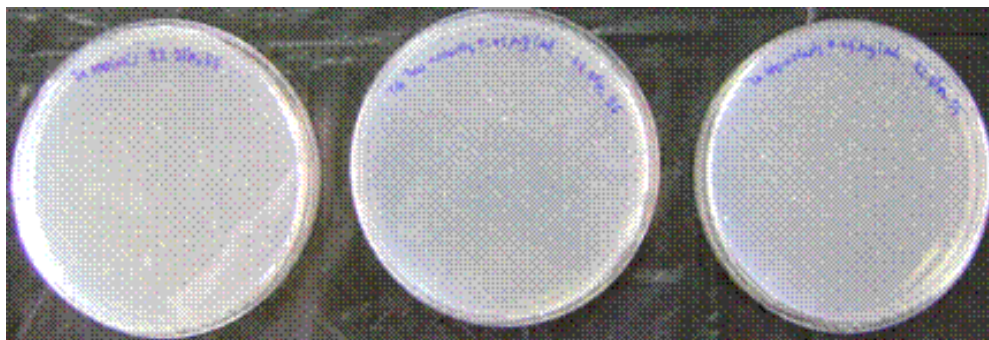
2. ผลการศึกษา Ames test ตามวิธีมาตรฐาน (Standard Plate Incorporation) โดยทดสอบสาร Sodium azid (NaN_3) กับเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 100

จากการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของ
 สาร NaN_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อแบคทีเรีย *Salmonella*
typhimurium TA100 ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น

NaN_3 0.01 และ 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ทำให้จำนวน colony กลาย
 พันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อของสารทดสอบสูง
 เกิน 2 เท่าของจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรีย
 ต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติดังแสดงในตารางที่ 6
 และภาพที่ 2

ตารางที่ 6 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 plate) และค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (MI) ของเชื้อ *S. typhimurium* TA 100 ที่ได้จากการทดสอบกับสาร NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

สาร NaN_3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	เชื้อ <i>S. typhimurium</i> TA 100	
	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI
0	177	-
0.01	576	3.25
0.05	995	5.62



ภาพที่ 2 โคโลนีของ *S. typhimurium* TA 100 ที่กลายพันธุ์เมื่อสัมผัสกับสาร NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ เปรียบเทียบกับจำนวน colony กลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

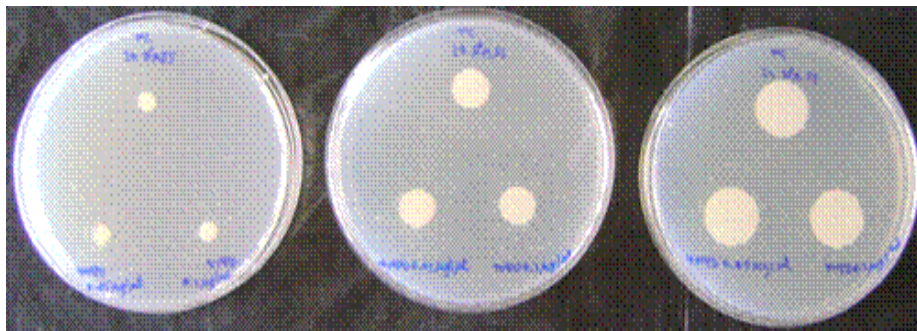
3. ผลการศึกษา Ames test ตามวิธี Paper Disc Diffusion โดยทดสอบสาร 4-Nitro-o-phenylenediamin (4NPD) กับเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 98

จากการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสาร 4NPD ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อแพร่ผ่านกระดวยกรองต่อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* TA98 ผลการทดลองพบว่าปริมาณที่เหมาะสมของสารทดสอบคือที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ทำให้จำนวน colony

กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อของสารทดสอบสูงเกิน 2 เท่าของจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดวยกรองที่เหมาะสมคือที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm สามารถนับจำนวน colony ได้ชัดเจนดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 3

ตารางที่ 7 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ และค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (MI) ของเชื้อ *S. typhimurium* TA 98 ที่สัมผัสกับสาร 4NPD ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ เมื่อแพร่ผ่านกระดาษกรองขนาดต่าง ๆ

เชื้อ <i>S. typhimurium</i> TA 98		
สาร 4NPD ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI
เมื่อใช้กระดาษกรองขนาด ϕ 0.5 cm		
0	20	-
0.05	77	3.85
0.1	136	6.80
เมื่อใช้กระดาษกรองขนาด ϕ 1 cm		
0 (control)	18	-
0.05	136	7.56
0.1	182	10.11
เมื่อใช้กระดาษกรองขนาด ϕ 1.5 cm		
0 (control)	11	-
0.05	185	16.82
0.1	262	23.82



ภาพที่ 3 โคโลนีกลายพันธุ์ของเชื้อ *S. typhimurium* TA 98 เมื่อสัมผัสกับสาร 4NPD ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ เปรียบเทียบกับ colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ เมื่อแพร่ผ่านกระดาษกรองขนาดต่าง ๆ

4. การศึกษา Ames test ตามวิธี paper disc diffusion โดยทดสอบสาร Sodium azid (NaN_3) กับเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 100

จากการทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสาร NaN_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อแพร่ผ่าน

กระดาษกรองต่อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* strain TA100 ผลการทดลองไม่พบปริมาณที่เหมาะสมของสารทดสอบ คือทั้งที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ไม่ทำให้จำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อของสารทดสอบสูงเกิน 2

เท่าของจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เรียดื้องาน
เลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ และขนาดเส้นผ่าน
ศูนย์กลางของกระดวยกรองที่เหมาะสมคือที่ขนาดเส้น

ผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm สามารถนับจำนวน colony ได้
ชัดเจนดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 4

ตารางที่ 8 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ และค่าดัชนีการกลายพันธุ์ (MI) ของเชื้อ *S. typhimurium* TA 100
ที่สัมผัสกับสาร NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ เมื่อแพร่ผ่านกระดวยกรองขนาดต่างๆ

เชื้อ <i>S. typhimurium</i> TA 100		
ความเข้มข้นสาร NaN_3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		
ต่อกระดวยกรองขนาด ϕ 0.5 cm	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI
0 (control)	141	-
0.01	89	0.63
0.05	157	1.11
ความเข้มข้นสาร NaN_3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		
ต่อกระดวยกรองขนาด ϕ 1 cm	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI
0 (control)	199	-
0.01	149	0.75
0.05	249	1.25
ความเข้มข้นสาร NaN_3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		
ต่อกระดวยกรองขนาด ϕ 1.5 cm	จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ต่อจานเลี้ยงเชื้อ	MI
0 (control)	232	-
0.01	161	0.69
0.05	248	1.07



ภาพที่ 4 โคโลนีกลายพันธุ์ของเชื้อ *S. typhimurium* TA 100 เมื่อสัมผัสกับสาร NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
เปรียบเทียบกับ colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เรียดื้องานที่เกิดตามธรรมชาติ เมื่อแพร่ผ่านกระดวยกรองขนาดต่างๆ

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

วิธีทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์แบบมาตรฐาน แสดงฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์กับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 โดยทดสอบกับสาร 4NPD ที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และ TA 100 ทดสอบกับสาร NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับทำให้จำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อของสารทดสอบสูงเกิน 2 เท่าของจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ จากผลการทดลองพบว่าวิธีทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์แบบประยุกต์ผ่านกระดาศกรอง แสดงฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์กับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 โดยทดสอบกับสาร 4NPD ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาศกรองที่เหมาะสมคือ ที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm ทำให้จำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อของสารทดสอบสูงเกิน 2 เท่าของจำนวน colony กลายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อจานเลี้ยงเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ และทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์แบบประยุกต์ผ่านกระดาศกรองกับ TA 100 ไม่แสดงฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ โดยทดสอบกับสาร NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาศกรอง 0.5 , 1.0, 1.5 cm ประเมินได้ว่าวิธีนี้อาจไม่ได้ผลเมื่อทดสอบกับ TA 100 อาจเนื่องจากคุณสมบัติของตัวทำละลายของสารทดสอบ เช่น ขนาดโมเลกุล มวลโมเลกุล มีความแตกต่างกัน ส่งผลให้การเคลื่อนที่แพร่ผ่านกระดาศกรองได้ไม่เท่ากันจึงเป็นประเด็นที่ควรศึกษาวิจัยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ และคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนสารเคมีและเครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- อุษณีย์ วัณิจเขตคำนวน. 2534. การทดสอบการกลายพันธุ์โดย แบคทีเรียซัลโมเนลลา. เอกสารการประชุมเชิงปฏิบัติการการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์สารก่อมะเร็งและสารก่อวิรูปด้วยวิธีตรวจระยะสั้น; 3-4 พฤศจิกายน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Ames B.N. 1971. The detection of chemical mutagens With enteric bacteria. In Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection. 267-282.
- Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E. 1973. An Improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proceedings of the national Academy of Sciences of USA. 70: 782-786.
- Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research. 31: 347-364.
- De Stasio, Elizabeth A., Goodson-Gregg Nathan. 2010. Reinventing the Ames Test as a Quantitative Lab That Connects Classical and Molecular Genetics. Genetics. 181: 23-31.
- McCann J., Springarn N.E., Kabori J., et al. 1975. Detection of carcinogens and mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. Proceedings of the national Academy of Sciences of USA. 72: 979-983.
- Maron D.M., Ames B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research. 113: 173-215.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research. 455: 29-60