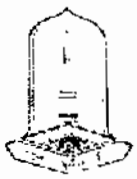

การทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ในน้ำหมักชีวภาพ

Evaluation of mutagens in fermented fluid

โดย นายณฐนนท์ ตราชู และคณะ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย
จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ. ศ. 2550
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Mahasarakham University

การทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ในน้ำหมักชีวภาพ

Evaluation of mutagens in fermented fluid

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. ณฐนนท์ ตราชู
2. นางสาว กรรณิกา หรีประย่า
3. นางสาว เกษร ไพโรจน์วรการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย

จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ. ศ. 2550

Mahasarakham University

ต้นฉบับไม่ปรากฏข้อมูล

Mahasarakham University
Mahasarakham University

การทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ในน้ำหมักชีวภาพ

Evaluation of mutagens in fermented fluid

บทคัดย่อ

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดจากน้ำหมักชีวภาพ (น้ำยาล้างผักและผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน) โดยวิธีเอมส์ ซึ่งใช้ *Salmonella typhimurium* strains TA98 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9 พบว่า ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักจากน้ำหมักชีวภาพ (ส้ม, มะนาว, อะโวกาโด้ และ มะกรูด) และผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานจากน้ำหมักชีวภาพ (ส้ม, มะนาว, อะโวกาโด้ และ มะกรูด) ไม่มีฤทธิ์ mutagenicity ต่อยีนของ *S. typhimurium* strains TA98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5, 10 mg/plate และ 0.005 , 0.05, 0.5, 0.75 mg/plate ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของน้ำยาล้างจานทั้ง 4 ชนิด สูงกว่า 0.75 mg/plate จะมีความเป็นพิษต่อเชื้อ *S. typhimurium* strains TA98 ส่วนน้ำยาล้างจานในท้องตลาด1 และ 2 พบว่า จะมีพิษต่อเชื้อ *S. typhimurium* strains TA98 เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 0.05 และ 0.5 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ตามลำดับ

Abstract

The mutagenicity of cleaning products (vegetable cleaning solution and dish washing liquid) were determined by the Ames test using *Salmonella typhimurium* strains TA98 with or without S9 mix. Vegetable cleaning solutions and dish washing liquids made of orange, lemon, avocado and kaffir lime fermented fluids were not mutagenic for *S. typhimurium* strains TA98 at doses of 0.1, 0.5, 5, 10 mg plate and 0.005 , 0.05, 0.5, 0.75 mg plate respectivety. However, they were toxic to *S. typhimurium* strains TA98 at concentration greater that 0.75 mg/plate while the commercial dish washing solutions, product 1 and 2 were toxic at lower concentrations of 0.05 and 0.5 mg/plate without S9 mix respectivety.

คำสำคัญ : สารก่อกลายพันธุ์ ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด น้ำหมักชีวภาพ

Keywords : Mutagenicity Cleaning products Fermented beverages

Mahasarakham University

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายของการวิจัย 2

สมมติฐานของการวิจัย 2

ความสำคัญของการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

สารก่อกลายพันธุ์ (Mutagens) 3

การตรวจสอบสารก่อกลายพันธุ์ 3

การทดสอบเอมส์ (Ames' test) 4

หลักการของ Ames Test 4

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

3 วิธีการดำเนินการวิจัย 8

รูปแบบการวิจัย 8

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 8

วิธีการดำเนินการวิจัย 9

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล 13

ระยะเวลาสถานที่และแผนการดำเนินงานวิจัย 13

4 ผลการดำเนินงาน 15

5 สรุป 24

บรรณานุกรม 25

ประวัติย่อนักวิจัย

สรุปรายงานการใช้จ่าย

Mahasarakham University

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 แสดงแผนการดำเนินงานวิจัย 11
2 ฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างผัก (ส้ม) และน้ำยาล้างผัก (มะนาว) ใน *Salmonella typhimurium* TA 98 15
3 ฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างผัก (อะโวกาโด้) และ น้ำยาล้างผัก (มะกรูด) ใน *Salmonella typhimurium* TA 98 17
4 ฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างจาน (อะโวกาโด้) น้ำยาล้างจาน (มะกรูด) และ น้ำยาล้างจาน (มะนาว) ใน *Salmonella typhimurium* TA 98 19
5 ฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างจาน (ส้ม) น้ำยาล้างจานท้องตลาด 1 และ น้ำยาล้างจาน ท้องตลาด 2 ใน *Salmonella typhimurium* TA 98 21

Mahasarakham University

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันนี้ประเทศไทยประสบปัญหาผลไม้ตามฤดูกาลล้นตลาด ประกอบกับมีการนำเข้าผลไม้จากต่างประเทศเพิ่มขึ้น จากสถิติการนำเข้าสินค้าของไทยปี 2545-2549 (มกราคม-กันยายน) พบว่า ในปี 2549 (มกราคม-กันยายน) มีการนำเข้าสินค้าผลไม้และของปรุงแต่งจากผลไม้ ปริมาณ 181,575 ตัน คิดเป็นมูลค่า 5,705 ล้านบาท ซึ่งมีอัตราการขยายตัวร้อยละ 12.6 (กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์) ผู้บริโภคจึงมีทางเลือกมากขึ้นและเริ่มหันไปบริโภคผลไม้จากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก จึงทำให้ปัญหาผลไม้ล้นตลาดยิ่งทวีความรุนแรง การนำผลไม้ตามฤดูกาลมาทำการแปรรูปจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่เกษตรกรผู้ปลูกผลไม้ตามฤดูกาลนิยมทำเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ตัวอย่างเช่น นำมาทำเป็นผลไม้แช่อิ่ม เชื่อม กวน ดอง แต่ก็สามารถเก็บได้เพียงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นการนำผลไม้มาหมักด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หรือที่เรียกว่าจุลินทรีย์อีเอ็ม ทำให้ได้น้ำหมักชีวภาพออกมา นอกจากจะช่วยแก้ปัญหาผลไม้ล้นตลาดแล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น น้ำยาล้างจาน น้ำยาล้างผัก แชมพู ครีมอาบน้ำ และยังนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพโปรไบโอติก ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย แต่อย่างไรก็ตาม ก็ไม่เสมอไปที่ว่าผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติจะมีความปลอดภัยทั้งนี้สารที่มีอยู่ในธรรมชาติบางชนิดมีอันตรายต่อร่างกาย ถ้าได้รับติดต่อกันเป็นเวลานานและเกิดการสะสมในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่พบบ่อยในคนไทยและมีอัตราการตายสูงคือโรคมะเร็ง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ การทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ จึงเป็นวิธีที่จะช่วยป้องกันการเกิดการสะสมของสารพิษในร่างกายซึ่งอาจจะนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ การทดสอบเอมส์เป็นการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย ซึ่งทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว ใช้เวลาสั้น เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ ที่ต้องทำก่อนเป็นขั้นแรกเพื่อจะได้ข้อมูลพื้นฐานนำไปเป็นแนวทางการทดสอบฤทธิ์การก่อมะเร็งโดยการทดสอบระยะยาว ซึ่งในการทำวิจัยในครั้งนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ น้ำยาล้างผักและน้ำยาล้างจาน เพื่อทดสอบความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเป็นแนวทางเพื่อยืนยันถึงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ต่างๆที่มาจากน้ำหมักชีวภาพเพื่อการพัฒนาให้มีความหลากหลายมากขึ้นต่อไปในอนาคต

Mahasarakham University

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานและน้ำยาล้างผักจากน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากการหมักจุลินทรีย์อีเอ็ม

สมมติฐานของการวิจัย

ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักและน้ำยาล้างจานที่ผลิตจากน้ำหมักชีวภาพไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

ความสำคัญของการวิจัย

สามารถนำผลิตภัณฑ์ผลไม้ที่มีในไทยมาหมักเป็นน้ำหมักชีวภาพ และนำมาประยุกต์เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด (ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน และผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก) เพื่อใช้เป็นสารฆ่าเชื้อจากธรรมชาติ ลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย และสิ่งแวดล้อม

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักและน้ำยาล้างจาน โดยวิธีเอมส์ ทดสอบใน *Salmonella typhimurium* strains TA98 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9

บทที่2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารก่อกลายพันธุ์ (Mutagens)

สารเคมีที่สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ สารเคมีเหล่านี้แบ่งย่อยออกตามรูปร่างลักษณะและกลไกการดำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดังนี้ (เตือนจิต คำพิทักษ์ ปิยะ ธุเกิดดี และธีรวรรณ์ ขันทอง, 2543)

1.Base analogues หมายถึงสารที่มีรูปร่างลักษณะคล้ายเบส จนสามารถหลอกเอนไซม์ DNA polymerase ให้เอนไซม์นำเข้าไปแทนที่ deoxyribonucleotide ปกติในระหว่างการจำลองตัวเองของ ดี เอ็น เอ ได้ เมื่อ base analogue เข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของ ดี เอ็น เอ แล้ว ในกระบวนการ DNA replication ครั้งต่อไป สาย ดี เอ็น เอ ที่มี base analogue อยู่จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์มากขึ้น เนื่อง จาก base anologe ไม่ใช่เบสปกติ จึงจับคู่เบสผิดไปจากเดิม ตัวอย่างของ base analogue คือ 5' - bromouracil ซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้าย thymine

2. Alkylating agents หมายถึงสารที่สามารถเติม alkyl group เข้าที่หมู่ amino หรือ keto ของเบสได้ การเติมหมู่ alkyl ของเบสโดย alkylating agen ส่งผลทำให้เกิดการแทนที่แบบ transition ขึ้นมาได้ ตัวอย่างของ alkylating agent ได้แก่ mustard gas (di-(2-chloroethyl)sulfide) ซึ่งเป็นกาซอันตรายใช้ในการทำสงคราม

3. สารที่ทำให้เกิด deamination ของเบส สารบางชนิดได้แก่ nitrous acid เมื่อทำปฏิกิริยากับเบสจะทำให้เบสสูญเสียหมู่อะมิโนไป (deamination) ดังเช่น adenine ซึ่งจับคู่เบสกับ thymine เมื่อเกิด deamination เป็น hypoxanthine จะจับคู่เบสกับ cytosine แทน จึงทำให้เกิดการแทนที่เบสแบบ transition ได้

4. Intercalating agent สารบางชนิดเช่นสีกลุ่ม acridine มีขนาดโมเลกุลเหมาะสม สามารถแทรกตัวเข้าไปในระหว่างคู่เบส (intercalate) ใน ดี เอ็น เอ แล้วทำให้รูปร่างของ ดี เอ็น เอ ผิดปกติเกิด frame shift mutation ได้

การตรวจสอบสารก่อกลายพันธุ์

ระยะเวลาไม่กี่ปีมานี้ ได้มีรายงานเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารก่อกลายพันธุ์หรือก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (mutgen) สารดังกล่าวส่วนใหญ่ได้ผลิตขึ้นมาจากการกระทำของมนุษย์และถูกนำมาใช้ภายในสิ่งแวดล้อมใกล้ตัว เช่น สารเคมีกลุ่มสารอินทรีย์ต่างๆ เครื่องสำอางทั้งหลายเป็นต้น จากหลักฐานได้ว่าร้ายจากสารเคมีนี้มีผลโดยตรงต่อสุขภาพและชีวิตของมนุษย์ ซึ่งมีการนำเทคนิคชนิดที่มีผลทำให้สารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป และจำแนกชนิดของสารที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้เป็น 4 ชนิด

ขึ้นกับผลที่ปรากฏบนโครโมโซมคือ Mutagen เป็นสารที่ก่อให้เกิดมิวเตชั่นขึ้นกับยีนบนโครโมโซม clastogen เป็นสารที่ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม teratogen เป็นสารที่ก่อให้เกิดการพัฒนาตัวอ่อนที่ผิดปกติ carcinogen เป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์มะเร็ง เดิมการศึกษาถึงผลของสารเคมีใดที่จะก่อให้เกิดมะเร็งได้นั้น นิยมใช้วิธีทาง epidemiology โดยทดลองกับเผ่าของสัตว์ทดลองและรอจนผลจะปรากฏเป็นเนื้อร้ายมะเร็ง แต่วิธีการเช่นนี้บางครั้งใช้ระยะเวลามากกว่า 1 ปี จึงจะบอกผลสรุปได้ รวมทั้งค่าใช้จ่ายในเรื่องการทดลองค่อนข้างสูงด้วย ซึ่งไม่ทันกับการทดสอบสารเคมีต่างๆ ซึ่งมีการเพิ่มชนิดของการผลิตมากขึ้นทุกๆ ปี จึงมีวิธีทดสอบแบบใหม่ที่ให้ผลงานในระยะเวลาสั้นรวมทั้งการสิ้นเปลืองเงินน้อยที่สุดด้วยคือวิธีการทดสอบแอมส์

การทดสอบเอมส์ (Ames' test)

เป็นการทดสอบที่พัฒนาขึ้นโดย Dr.Bruce Ames เมื่อปี พ.ศ.2514 เพื่อใช้คัดกรองหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารเคมี สารสกัดสมุนไพร โดยการทดสอบในแบคทีเรียเนื่องจากแนวคิดที่ว่าสารที่ทำให้เกิด DNA damage และเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย อาจส่งผลให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ใน mammalian cells ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งการทดสอบในแบคทีเรียนั้นสามารถทำได้ง่าย สะดวก ราคาถูก และให้ผลเร็วกว่าการทดลองในสัตว์ โดยสามารถรู้ผลอย่างคร่าวๆ ได้ใน 2-3 วัน ความแตกต่างของ mutagen และ carcinogen Mutagen (สารก่อกลายพันธุ์) คือ สารที่เป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติที่เบสสายใดสายหนึ่งใน DNA ซึ่งเมื่อมีการจำลอง DNA ส่วนที่เบสเปลี่ยนแปลงไปถ่ายทอด จะทำให้เกิดโปรตีนที่ผิดปกติ เรียกว่าการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งอาจทำให้เกิดมะเร็งหรือไม่ก็ได้ Ames Test ไม่ได้ใช้ในการคัดกรองหา carcinogen โดยตรง จะนิยมและแนะนำให้ใช้เป็นวิธีการทดสอบวิธีแรกที่ต้องทำในการศึกษาสาร ก่อกลายพันธุ์หรือสารก่อมะเร็ง เพื่อนำไปเป็นข้อมูลในการตัดสินใจศึกษาในขั้นตอนต่อไป ดังนั้น Ames Test ไม่ทดสอบความเป็นสารก่อมะเร็ง (ทดสอบ carcinogen ไม่ได้)

หลักการของ Ames Test

เป็นการทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (backward or reverse mutation) ในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* เนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้ถูกทำให้กลายพันธุ์ไปจนไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน histidine ได้ ทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดกรดอะมิโนชนิดนี้ได้ เรียกว่า "Histidine dependent" (His-) สารทดสอบที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะทำให้แบคทีเรียชนิดนี้เกิดการกลายพันธุ์ ย้อนกลับ สามารถสร้าง histidine ได้เอง เป็น "Histidine independent" (His+) นอกจาก *Salmonella typhimurium* แล้วยังมีแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการทดสอบการกลายพันธุ์ตัวอื่นอีก คือ *Escherichia coli* ซึ่งหลักการของการทดสอบในเชื้อ 2 ชนิดนี้เหมือนกัน แต่ต่างกันที่ต้องการ amino acid คนละตัวกัน กล่าวคือ *Salmonella typhimurium* ต้องการ histidine

และ Escherichia coli ต้องการ tryptophan เนื่องจากสารบางตัวเป็น pro-mutagen เมื่อเข้าไปสู่ร่างกายคน อาศัยการ metabolise โดย enzyme ที่ตับเปลี่ยนให้เป็น active metabolite ที่มีฤทธิ์เป็น mutagen เช่น สาร Benzo(a)pyrene ซึ่งไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ แต่เมื่อถูกเปลี่ยนโดย enzyme ที่ตับเป็น diolepoxides จะมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และก่อมะเร็งอย่างรุนแรง ดังนั้น ในการทดสอบ Ames Test ได้เพิ่มการกระตุ้นด้วย enzyme ที่ได้จากตับหนู (S9) คล้ายกับเป็นการจำลองการเกิด metabolism ในร่างกายเปลี่ยน pro-mutagen ให้เป็น mutagen ทำให้ Ames Test ครอบคลุมไปถึงการค้นหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในการทดสอบ pro-mutagen ได้ด้วย คุณสมบัติของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากต้องเป็นแบคทีเรียที่ถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นที่ยีนที่ควบคุมการสร้าง amino acid แล้ว แบคทีเรียที่นำมาทดสอบต้องมีคุณสมบัติอื่นๆ อีก ซึ่งจะช่วยให้แบคทีเรียมีความไวต่อการเกิดกลายพันธุ์ คือ

1. rfa mutation เป็นการเพิ่ม cell wall permeability โดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในแบคทีเรีย ทำให้ความสามารถในการสร้าง lipopolysaccharide ซึ่งเคลือบอยู่บนผนังเซลล์ลดลงหรือขาดหายไป ทำให้สารโมเลกุลใหญ่เข้าไปภายในเซลล์ได้มากขึ้น

2. uvrB mutation คือ การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียสูญเสียความสามารถในการซ่อมแซม DNA ที่ผิดปกติ (inability to repair damaged or mutated sector)

3. R-factor plasmids คือ การใส่ plasmid เช่น pKM101 หรือ pAQ1 เข้าไปในแบคทีเรีย บางสายพันธุ์ เพื่อช่วยให้แบคทีเรียมีความไวต่อสารก่อกลายพันธุ์มากขึ้น เนื่องจาก plasmid จะไปเพิ่ม error-prone repair of DNA damage ทำให้แบคทีเรียมีความไวต่อสารก่อกลายพันธุ์กว้างขึ้น (provides a sensitive test for broad spectrum of mutagens)

เนื่องจากสารแปลกปลอมที่เป็นพิษต่อร่างกายเมื่อเข้าไปในร่างกาย ต้องถูกเปลี่ยนแปลงโดยระบบเมตะบอลิสม์ของร่างกาย ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพื่อช่วยในการสลายความเป็นพิษต่อร่างกาย ขณะเดียวกันก็อาจเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เป็นการกระตุ้นความเป็นพิษต่อร่างกาย ระบบนี้อาศัยเอนซัยม์และโคแฟคเตอร์ที่อยู่ในเซลล์ โดยอาศัยความรู้นี้การทดสอบเอมส์ได้เพิ่มระบบการกระตุ้นโดยเอนซัยม์เข้าไปในการทดลองด้วย ทำให้สารก่อกลายพันธุ์ถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้โดยเอนซัยม์ที่พบในร่างกาย ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียไม่มีระบบกระตุ้นดังกล่าวนั้นได้ ว่าการทดสอบเอมส์ สามารถจำลองสภาพการณ์การทำงานของระบบเมตะบอลิสม์สารพิษของคนสามารถเปลี่ยนแปลงดีเอนเอให้ผิดปกติไปได้เช่นเดียวกับที่อาจเกิดในร่างกาย (คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2534)

Mahasarakham University

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นันทิยา รัตนเศรษ และคณะ (นันทิยา รัตนเศรษ. 2005) ได้ศึกษาความเป็นพิษในระดับจีนของสมุนไพรไทย เพื่อประเมินความสามารถในการก่อกลายพันธุ์ของสมุนไพร ได้แก่ ไพล ว่านชักมดลูก ขมิ้นชัน พริกไทยดำ สมุนไพรที่ใช้ลดความอ้วน และสมุนไพรยาอายุวัฒนะ เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติการก่อกลายพันธุ์ ในแบคทีเรียโดยวิธีเอมส์ ในการศึกษาการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซาลโมเนลา ไทฟิมูเรียม TA 98 และ TA 100 ทั้งระบบที่ต้องการและไม่ต้องการเอนไซม์จากตับหนู ด้วยสารสกัดสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด ได้ผลการทดสอบสมุนไพรดังกล่าวไม่มีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ 100 ทั้งระบบที่ต้องการและไม่ต้องการเอนไซม์จากตับหนู

ทุมณีย์ วินิจเขตคำนวณ (ทุมณีย์ วินิจเขตคำนวณ. 2545) ผลลำไยทั้งที่ใช้โปแตสเซียมคลอเรตหรือไม่ใช้ เมื่อนำมาสกัดด้วยน้ำกลั่นหรือเอทานอลหรือ 0.1 N HCl ไม่มีความเป็นพิษต่อยีน (mutagenicity) ต่อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในกรณีที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น แต่พบฤทธิ์ antimutagenicity ในสารสกัดจากลำไยที่มีการใส่สาร โปแตสเซียมคลอเรตทางใบโดยแสดง ฤทธิ์ co-mutagenicity อย่างอ่อนต่อสารก่อมะเร็งชนิด IQ ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าลำไยที่ได้จากลำไยที่ไม่ใช้โปแตสเซียมคลอเรตและนำไปวิเคราะห์มีฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเดียวกันแสดงฤทธิ์ต้านการกลายต่อ IQ ได้อย่างมีสัมพันธ์ภาพ dose dependent inhibition

Chewonarin T. และคณะ (Chewonarin T.และคณะ, 1999) ได้ศึกษาสารสกัด roselle (*Hibiscus sabdariffa Linn.*) เป็นพืชซึ่งมีคุณสมบัติทางยาในประเทศไทยด้วย 80% ethanol แสดงการต้านฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และมะเร็งลำไส้ใหญ่ สามารถลดได้ 60-90% สำหรับการต้านสารก่อกลายพันธุ์ 2-amino 1 methyl 6 phenylimidazo[4,5-b]pyri-dine (PhIP) and other heterocyclic amines 2 amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*] quinoline (MEIQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*] quinoxaline (MEIQx), 3-amino-1,4-dimethy-5*H*-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1),), 3-amino-1-methy 5*H*-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2), 2-amino-6-methydipyrido[1,2-a:3', 2'-*d*]imidazole (Glu P 1), 2-amino-6-methydipyrido[1,2-a:3', 2'-*d*]imidazole (Glu-P-2) ที่ความเข้มข้น 12.5 mg plate ในการทดสอบแสดงก่อกลายพันธุ์ โดย *Salmonella* สารสกัดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่ต้านแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้น 12.5 mg plate

Sujbert และคณะ (Sujbert and others, 2006 , 106-112) ได้ศึกษาการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของน้ำดื่มก่อนเติมโอโซน และหลังจากเติมคลอรีน โดยวิธีเอมส์ ซึ่งทดลองโดยใช้เชื้อกลายพันธุ์ *Salmonella typhimurium* TA 98 และ TA 100 ทั้งที่ไม่ใช้เอนไซม์และใช้เอนไซม์จากตับหนู พบว่า

Mahasarakham University

น้ำดื่มที่มีการกลายพันธุ์จาก the ranneywell จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 0.28 ถึง 0.83 I และ 0.83-2.51 I สำหรับน้ำดื่มที่ฆ่าเชื้อโดยการใช้สารฆ่าเชื้อ

Vinitketkumnuen U. และคณะ (Vinitketkumnuen U. และ คณะ., 2002) ได้ศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของอนุภาคของสารระดับ PM 10& PM 2.5 และอากาศในเชียงใหม่ ประเทศไทย จากมีนาคม 1998- ตุลาคม 1999 โดย *Salmonella* mutation assays พบว่าในระหว่างฤดูหนาว(ธันวาคม-มีนาคม) ระดับ PM 2.5 และ PM 10 ในชั้นบรรยากาศของเชียงใหม่สูงและมีความแตกต่างกันของสุขภาพซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่สูงขึ้นของอากาศ ในระหว่างฤดูร้อน อนุภาคบางๆ หยาบทั่วไปอยู่ในระดับเกี่ยอมรับได้ เมื่อนำ PM 2.5 หรือ PM 10 ที่เก็บไว้ในช่วงฤดูหนาวในเชียงใหม่มาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ โดย *Salmonella typhimurium* strain TA 100 จะพบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในสภาวะที่ไม่มี S9 และฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี S9

Reid K. A. และคณะ ได้ศึกษาสารสกัดจากพืชในแอฟริกาใต้ที่สกัดโดย ไดคลอโรมีเทน และ 90% เมทานอล เพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ โดยวิธี Salmonella/microsome mutagenicity assay (Ames) ใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* strain TA98 และ 100 ที่ในสภาวะที่มีและไม่มี S9 สารสกัดจากพืช *Helichrysum simillimum*, *Helichrysum herbaceum* และ *Helichrysum rugulosum* ชี้ว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และรายงานขั้นแรกว่าHelichrysum species เป็นสารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และถึก 6 สายพันธุ์ ชี้ว่าเป็นสารต้านฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ซึ่งทั้งหมดอยู่ในสภาวะที่มี S9 ของใบของ *Baukinia galpinii* ที่สกัดจากเมทานอล และสารที่สกัดโดยไดคลอโรมีเทนสำหรับใบของ *Baukinia galpinii*, *Clerodendrum myricoides*, *Datura stramonium*, *Buddleja saligna*, *Millettia sutherlandii* และ *Sutherlandia frutescens*

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

รูปแบบการวิจัย

ในการวิจัยนี้ได้วางแผนการทดลองแบบการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One – Way ANOVA) แผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) รูปแบบอิทธิพลแบบกำหนด (Fixed Effect Model) ปัจจัยที่ศึกษา คือ ชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักและผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีในการวิจัย ประกอบด้วย

1) เครื่องแก้ว

2) เครื่องชั่ง

3) Incubator

4) จานเพาะเชื้อ

5) Vortex mixer

6) เครื่อง freezdry

7) stereomicroscope

8) น้ำยาล้างผัก (มะนาว)

9) น้ำยาล้างผัก (ส้ม)

10) น้ำยาล้างผัก (มะกรูด)

11) น้ำยาล้างผัก (อะโวคาโด้)

12) น้ำยาล้างจาน (มะนาว)

13) น้ำยาล้างจาน (ส้ม)

14) น้ำยาล้างจาน (มะกรูด)

15) น้ำยาล้างจาน (อะโวคาโด้)

16) น้ำยาล้างจานตามท้องตลาด 1

17) น้ำยาล้างจานตามท้องตลาด 2

18) อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal glucose agar plate

19) ซิ ทรีดีน

20) ไบโอติน

21) อาหารเลี้ยงเชื้อ Oxoid nutrient broth No

Mahasarakham University

22) NaCl

23) crystal violet

24) สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2)

25) สารกลายพันธุ์มาตรฐาน 2- aminoanthracene (2-AA)

26) S9

27) $NH_2H_2PO_4$

28) $MgSO_4.7H_2O$

29) Citric acid monohydrate

29) K_2HPO_4 anhydrous $_4$

30) Glucose anhydrous

31) NaOH

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity)

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ น้ำยาล้างผักจากน้ำหมักผลไม้ 4 ชนิด คือ น้ำยาล้างผัก (มะนาว) น้ำยาล้างผัก (ส้ม) น้ำยาล้างผัก (มะกรูด) น้ำยาล้างผัก (อะโวกาโด้) น้ำยาล้างจานจากน้ำหมักผลไม้ 4 ชนิด คือ น้ำยาล้างจาน (มะนาว) น้ำยาล้างจาน (ส้ม) น้ำยาล้างจาน (มะกรูด) น้ำยาล้างจาน (อะโวกาโด้) และ น้ำยาล้างจานตามท้องตลาด 2 ชนิด คือ น้ำยาล้างจานตามท้องตลาด 1 ซึ่งมีส่วนประกอบของ Linear alkylbenzene sulfonate, sodium salt, Sodium lauryl ether sulphate และ Cocamido propyl betaine (CAPB) น้ำยาล้างจานตามท้องตลาด 2 ซึ่งมีส่วนประกอบของ Linear alkylbenzene sulfonate, sodium salt และ Sodium lauryl ether sulphate นำตัวอย่างมาทำให้แห้งโดยการ freezdry จากนั้นเติม 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 แล้วนำมากรองด้วย Millipore filter membrane 0.22 µm จากนั้นเตรียมน้ำยาล้างผักที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 2, 10, 100 และ 200 mg/ml และ น้ำยาล้างจานความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0.1, 1, 10 และ 15 mg/ml

ที่มาของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ คือ *Salmonella typhimurium* strain TA 98 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Bioassay Laboratory Research, ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation ของยีนที่สร้าง

Mahasarakham Uni

กรดอะมิโนฮิสทีดีน จึงต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดีนเสมอเพื่อการเจริญเป็นโคโลนี (His- , อาจเรียกว่า เป็น histidine auxotrophe)

การเตรียมแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal glucose agar plate (agar 15 g/900ml; glucose anhydrous 20 g/900ml; vogel-bonner medium E (x010) 100 ml/900ml ($MgSO_4.7H_2O$ 2g/2l, citric acid monohydrate 20 g/2l, K_2HPO_4 anhydrous 100 g/2l, $NH_4H_2PO_4$ 19.2 g/2l, NaOH 6.6 g/2l)) ที่เคลือบด้วย 0.2 มิลลิลิตร สารละลายผสมฮิสทีดีนเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และไบโอตินเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เมื่อผิววุ้นแข็งได้ที่แล้ว เคลือบผิววุ้นอีกครั้งด้วย ampicillin ในปริมาณ 750 มิลลิกรัมต่อ plate ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นใช้ wire loop แตะ frozen permanent copies ของเชื้อ *S. typhimurium* TA 98 แล้ว streak บน agar นำ plate ไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชม. เมื่อครบ 48 ชม. นำ plate ออกมา ใช้ wire loop แตะบนโคโลนีเดี่ยวที่เด่นชัดที่สุด (well-isolated colony) นำไปเพาะเลี้ยงใน Oxoid nutrient broth No. (nutrient broth 25g/l.) เป็นเวลา 14 ชม. จะได้ overnight culture จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณสมบัติที่จำเป็นทั้งหมด ได้แก่ histidine requirement, rfa mutation, R-factor, uvrB mutation, spontaneous reversion และ sensitivity ต่อสารกลายพันธุ์มาตรฐาน

การตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย

การตรวจสอบ Histidine requirement

ผสม 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายไบโอติน กับ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture of bacteria ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 2 มิลลิลิตร ของสารละลาย Top agar (agar 6 g/l., NaCl 5 g/l) (อุณหภูมิ 45°C) เขย่าโดยหมุนในอุ้งมือไปมา 4-5 วินาที เทลงบน Minimal glucose agar plate หมุนจานเลี้ยงเชื้อให้สารละลายกระจายสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วนำไปไว้ในตู้อบ ซึ่งมีอุณหภูมิ 37 °C โดยเก็บในลักษณะที่ตั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อกลับด้าน (inverted) เป็นเวลา 48 ชม. และเมื่อครบเวลาต้องไม่มีโคโลนีเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal glucose agar plate ทำการทดลองเปรียบเทียบกับที่เติม 0.1 มิลลิลิตรฮิสทีดีน ผสม 0.1 มิลลิลิตรของสารละลายไบโอติน กับ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture of bacteria ซึ่งต้องมีโคโลนีเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal glucose agar plate

การตรวจ rfa mutation

ใส่ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 2 มิลลิลิตร Top agar (45 °C) แล้วไปเขย่าในอุ้งมือ แล้วเทลงใน Minimal glucose agar plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ของวุ้นแข็ง ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ ค่อยๆ วางกระดาษกรองที่เตรียมไว้ โดยกดลง

บนผิววุ้นเล็กน้อย หยดสารละลาย crystal violet 10 ไมโครลิตร แผ่บนกระดาษกรอง นำ plate ไป วางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-24 ชม. กระดาษกรองที่หยด crystal violet จะ เห็นเป็นวงกลมลักษณะใส เรียก clear zone เนื่องจากส่วนนี้จะไม่แบคทีเรียเจริญให้วัด เส้นผ่าศูนย์กลางของวงกลมนี้ ถ้าวงกลมมีขนาดประมาณ 12-14 มิลลิลิตร จึงจะถือว่าแบคทีเรียมี rfa mutation อยู่ ถ้าเกิดวงกลมที่มีขนาดเล็กกว่านี้แสดงว่า แบคทีเรียนั้นมีความผิดปกติของคุณสมบัติ เช่น อาจสูญเสีย rfa mutation ควรพิจารณาเตรียมแบคโตรีเดี่ยวใหม่

การตรวจ uvrB mutation

เตรียม Minimal glucose agar plate คลือบด้วย 0.1 มิลลิลิตร สารละลายฮิสทีดีน 0.1 โมลาร์ และ 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลาย 1 มิลลิโมลาร์ไบโอติน ใช้ wire loop แตะ overnight culture ของ แบคทีเรียแล้ว streak 2 แถบขนานกัน ลง plate ที่เตรียมไว้ นำ plate ไปวางไว้ใต้หลอด UV ขนาด 15 วัตต์ ให้ห่างเป็นระยะทาง 30 ซม. จากนั้นใช้แผ่นแก้วปิด plate ไว้ครึ่งหนึ่ง จากนั้นเปิดไฟ จะทำ ให้แถบแบคทีเรียถูกแสง UV เพียงครึ่งเดียว เปิดแสง UV นาน 8 วินาที นำ plate ไปวางแบบกลับ ด้านในตู้อบ 37 °C เป็นเวลา 12-24 ชม. แบคทีเรียที่มี uvrB mutation จะไม่มีการเจริญด้านที่ถูกแสง UV แต่ด้านที่ไม่ถูกแสงจะเจริญเป็น โคโลนีให้เห็น

การตรวจสอบ R-factor

ใส่ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 2 มิลลิลิตร Top agar (45°C) ที่มีสารละลายผสมฮิสทีดีนและไบโอติน เขย่าในอุ้งมือแล้วเทลงใน Minimal glucose agar plate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง ใช้ปากคีมเพื่อปราศจากเชื้อ ค่อยๆ วาง ampicillin disc ลงบนผิววุ้นโดยกดเล็กน้อย นำ plate ไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-24 ชม หลังจากนั้นนำ plate ออกมาตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียให้สังเกตว่า รอบๆ ampicillin disc ไม่ควรจะเกิด clear zone (ถ้าเกิดแสดงว่ายา ampicillin ไปฆ่าแบคทีเรียรอบๆ จึงไม่มีการเจริญ แสดงว่าแบคทีเรียขาดคุณสมบัติการมี R-factor)

การตรวจการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีตามธรรมชาติ (Spontaneous reversion)

ใส่ 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 0.5 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 แล้วเติม 2 มิลลิลิตร Top agar (45°C) ที่มี สารละลายผสมไบโอตินและฮิสทีดีน เขย่าในอุ้งมือแล้วเทลงใน Minimal glucose agar plate ตั้งทิ้ง ไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง เตรียมหลอดทดลองที่มี 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรีย อีกครั้งหนึ่ง เติม 0.5 มิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์ (S9 mix) เติม 2 มิลลิลิตร Top agar (45°C) ที่มี สารละลายผสมไบโอตินและฮิสทีดีน เขย่าในอุ้งมือแล้วเทลงใน Minimal glucose agar plate ตั้งทิ้ง ไว้ 30 นาที จนผิวของวุ้นแข็ง นำ plate ทั้งหมดไปวางแบบกลับด้านในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C เป็น เวลา 48 [illegible] นับจำนวนโคโลนีที่เห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็น spontaneous mutant colony

การตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน (sensitivity to standard mutagens)

ผสม 0.05 มิลลิลิตร ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2 (2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) กับ 0.5 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เมื่อไม่ต้องการการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ หรือ 0.05 มิลลิลิตร ของสารกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-aminoanthracene (2-AA) กับ 0.5 มิลลิลิตร สารละลายผสมเอนไซม์ (S9 mix) เมื่อต้องการการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ เติม 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรียลงไป เขย่าให้เข้ากัน เติม 2 มิลลิลิตร Top agar (45°C) ซึ่งเติมสารละลายผสมไบโอตินและฮิสทีดีนลงไปแล้ว เขย่าโดยหมุนไปมาในอุ้งมือ 4-5 วินาที เทลงใน Minimal glucose agar plate รอจนผิวรุ้นแข็ง จึงนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C โดยวางแบบกลับด้าน เป็นเวลา 48 ชม เมื่อครบ 48 ชม นำไปนับจำนวน mutant colonies โดยจำนวน mutant colonies ที่เกิดจากสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานจำนวนจริง คือ จำนวนที่ต้องหักลบด้วยค่า spontaneous mutant colony ทุกครั้ง

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักและน้ำยาล้างจานโดยวิธี Ames test

เตรียมหลอดทดลองสองชุด ชุดที่ 1 สำหรับทดสอบในภาวะที่ไม่ต้องการ S9 และชุดที่ 2 สำหรับทดสอบในภาวะที่ต้องการ S9 แต่ละชุดประกอบด้วย น้ำยาล้างผักทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำยาล้างผัก (มะนาว) น้ำยาล้างผัก (ส้ม) น้ำยาล้างผัก (มะกรูด) น้ำยาล้างผัก (มะไฟเทศ) ปริมาตร 50 µl/plate ซึ่งได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1, 0.5, 5 และ 10 mg/plate และน้ำยาล้างจานทั้ง 6 ชนิด มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate (เตรียมการทดสอบเข้มข้นละ 3 หลอดทดลอง, triplicate) เตรียมสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน AF-2 0.25 µg/plate สำหรับเป็น positive control ในการทดสอบภาวะที่ไม่ต้องการ S9 ใน *S. typhimurium* TA 98 และ สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-AA 0.5 µg/plate สำหรับเป็น positive control ในการทดสอบภาวะที่ต้องการ S9 ใน *S. typhimurium* TA 98 ในกรณีที่ไม่เติมตัวอย่าง ให้เติม 50 µl ของ Dimethyl sulfoxide (DMSO) แทน ซึ่งหลอดทดลองนี้จะบอกค่า spontaneous reversion ของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

การทดสอบแบ่งทำทีละชุด ชุดแรกทดลองในภาวะที่ไม่ต้องใส่ S9 mix จะใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทน โดยใส่ 0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.4 และน้ำกลั่น (1:3) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรีย เติม 2 มิลลิลิตร Top agar (45 °C) เขย่าโดยหมุนหลอดทดลองในอุ้งมือ 4-5 วินาที เทลงใน Minimal glucose agar plate ทำจนครบทุกหลอด ทิ้ง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นทำการทดสอบชุดที่ 2 โดยใส่สารละลายผสม S9 mix หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.1 มิลลิลิตร overnight culture ของแบคทีเรีย เติม 2 มิลลิลิตร Top agar (45°C) เขย่าโดยหมุนหลอดทดลองในอุ้งมือ 4-5 วินาที เทลงใน Minimal glucose agar plate ทำจนครบทุกหลอด ทิ้ง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำ plate ทั้งหมดไปวางแบบกลับด้าน

Mahasarakham University

ในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชม. นำ plate มานับจำนวน mutant colonies นำ plate ไปดูด้วย stereomicroscope เพื่อตรวจดูการเจริญแบบปกติของแบคทีเรีย บางครั้งอาจเห็น bacteria killing effect เกิดขึ้น แสดงว่าสารเคมีนั้น toxic ต่อแบคทีเรียควรลดความเข้มข้นในการทดสอบครั้งใหม่ นับจำนวนโคโลนีใน plates ที่ไม่มี toxicity ต่อแบคทีเรียนำไปลบด้วย spontaneous reversion (background) เป็นค่า mutant colonies ที่เกิดขึ้นจากธรรมชาติ (คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย และ ชมรมพันธุพิษแห่งประเทศไทย, 2534 : 4-20)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิจัยนี้จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ SAS software ด้วยวิธี PROC GLM และ PROC ANOVA ทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี Scheffe's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ระยะเวลา สถานที่ และแผนการดำเนินงานวิจัย

1. ระยะเวลา

ดำเนินงานวิจัยระหว่างเดือน มีนาคม 2550 – มีนาคม 2551

2. สถานที่

ห้องปฏิบัติการวิจัยเชื้อโรคทางอาหารและผลิตผล ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44000

แผนการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมแบคทีเรียการตรวจสอบ และคุณสมบัติของแบคทีเรีย

2. การตรวจการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีตามธรรมชาติ และการตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน

3. การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักและ น้ำยาล้างจานโดยวิธีแอมส์

Mahasarakham University

ตารางที่ 1 แสดงแผนการดำเนินงานวิจัย

กิจกรรม	ระยะเวลา (เดือน)					
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
1.การเตรียมแบคทีเรียการตรวจสอบ และคุณสมบัติของแบคทีเรีย	←→					
2 การตรวจการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีสารธรรมชาติ และการตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน		←→				
3. การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักและน้ำยาล้างจานโดยวิธีเอมส์			←→			
4. สรุปรวมวิเคราะห์ข้อมูล				←→		
5. ตีพิมพ์และนำเสนอข้อมูล					←→	

Mahasarakham University

บทที่ 4

ผลการดำเนินงาน

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างผัก (ส้ม) และ น้ำยาล้างผัก (มะนาว) ใน *Salmonella typhimurium* TA 98 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9 โดยตัวอย่างที่ใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ 10 mg/plate มีผลการทดลองดังตาราง 2

ตาราง 2 ฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างผัก (ส้ม) และ น้ำยาล้างผัก (มะนาว) ใน *Salmonella typhimurium* TA 98

	จำนวน Revertant colonies/plate	
	TA 98	
	-S9	+S9
water (Negative control)	28±5	28±12
DMSO (Vehicle control)	31±8	33±10
AF-2 0.25µg/plate	428±59	-
2-AA 0.5µg/plate	-	273±62
น้ำยาล้างผัก (ส้ม)		
0.1 mg/plate	23±11	33±12
0.5 mg/plate	18±4	36±12
5 mg/plate	29±17	26±10
10 mg/plate	23±9	22±6
น้ำยาล้างผัก (มะนาว)		
0.1 mg/plate	23±7	23±11
0.5 mg/plate	29±6	21±10
5 mg/plate	29±6	29±12
10 mg/plate	23±8	24±14

ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจาก 6 plate±SD (2 independent experiments)

ค่าที่แสดงยังไม่ได้หักออกด้วย Vehicle control (spontaneous mutation)

AF-2 คือ Positive control ในสภาวะที่ไม่มี S9 mix

2-AA คือ Positive control ในสภาวะที่มี S9 mix

Mahasarakham University

จากตาราง2 พบว่า การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายของ water (Negative control), DMSO (Vehicle control), AF-2 0.25µg plate (Positive control ในภาวะที่ไม่มี S9 mix) ให้จำนวน Revertant colonies plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 28±5, 31±5, และ 413±59 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายของ water (Negative control), DMSO (Vehicle control), 2-AA 0.25µg plate (Positive control ในภาวะที่มี S9 mix) ให้จำนวน Revertant colonies/plate ในสภาวะที่มี S9 28±12, 33±10, และ 273±62 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (ส้ม) ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ 10 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies plate 23±11, 18±4, 29±17 และ 23±9 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้นดังกล่าว แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (ส้ม) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ส่วนในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies plate 33±12, 36±12, 26±10 และ 22±6 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (ส้ม) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ 10 mg plate ในสภาวะที่มี S9

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (มะนาว) ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 23±7, 29±6, 29±6 และ 23±8 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้นดังกล่าว แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (ส้ม) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ส่วนในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies plate 23±11, 21±10, 29±12 และ 24±14 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (ส้ม) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างผัก (อะโวกาโด้) และ น้ำยาล้างผัก (มะกรูด) ใน *Salmonella typhimurium* TA 98 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9 โดยตัวอย่างที่ใช้ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ 10 mg/plate มีผลการทดลองดังตาราง 3

ตาราง 3 ฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างผัก (อะโวกาโด้) และ น้ำยาล้างผัก (มะกรูด) ใน *Salmonella typhimurium* TA 98

	จำนวน Revertant colonies/plate	
	TA 98	
	-S9	+S9
water (Negative control)	37±12	77±30
DMSO (Vehicle control)	33±9	61±33
AF-2 0.25µg/plate	443±61	-
2-AA 0.5µg/plate	-	354±85
น้ำยาล้างผัก (อะโวกาโด้)		
0.1 mg/plate	29±11	55±16
0.5 mg/plate	29±12	42±13
5 mg/plate	45±6	49±9
10 mg/plate	40±6	49±15
น้ำยาล้างผัก (มะกรูด)		
0.1 mg/plate	26±9	58±9
0.5 mg/plate	29±7	45±12
5 mg/plate	28±7	62±9
10 mg/plate	34±14	31±12

ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจาก 6 plate±SD (2 independent experiments)

ค่าที่แสดงยังไม่ได้ลบด้วย Vehicle control (spontaneous mutation)

AF-2 คือ Positive control ในภาวะที่ไม่มี S9 mix

2-AA คือ Positive control ในภาวะที่มี S9 mix

Mahasarakham University

จากตาราง 3 พบว่า การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายของ water (Negative control), DMSO (Vehicle control), AF-2 0.25µg/plate (Positive control ในภาวะที่ไม่มี S9 mix) ให้จำนวน Revertant colonies/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 37±12, 33±9, และ 443±61 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายของ water (Negative control), DMSO (Vehicle control), 2-AA 0.25µg plate (Positive control ในภาวะที่มี S9 mix) ให้จำนวน Revertant colonies plate ในภาวะที่มี S9 77±30, 64±33, และ 354±85 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (อะโวกาโด้) ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies plate 29±11, 29±12, 48±6 และ 40±6 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้นดังกล่าว แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (อะโวกาโด้) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ส่วนในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ 10 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 55±16, 42±13, 49±9 และ 49±15 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (อะโวกาโด้) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ในสภาวะที่มี S9

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (มะกรูด) ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 26±9, 29±7, 28±7 และ 34±14 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้นดังกล่าว แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (มะกรูด) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ส่วนในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ 10 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 58±9, 45±12, 62±9 และ 31±12 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (มะกรูด) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ10 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9

Mahasarakham University

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างจาน (อะโวกาโด้) น้ำยาล้างจาน (มะกรูด) และ น้ำยาล้างจาน (มะนาว) ใน *Salmonella typhimurium* TA 98 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9 โดยตัวอย่างที่ใช้ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate มีผลการทดลองดังตาราง 4

ตาราง 4 ฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างจาน (อะโวกาโด้) น้ำยาล้างจาน (มะกรูด) และ น้ำยาล้างจาน (มะนาว) ใน *Salmonella typhimurium* TA 98

	จำนวน Revertant colonies/plate	
	TA 98	
	-S9	+S9
water (Negative control)	22±6	29±4
DMSO (Vehicle control)	27+7	27+7
AF-2 0.25µg/plate	243+92	-
2-AA 0.5µg plate	-	18..±68
น้ำยาล้างจาน (อะโวกาโด้)		
0.005 mg/plate	29±5	28±6
0.05 mg plate	23±4	22±5
0.5 mg/plate	20±7	28±10
0.75 mg/plate	18±4	19±4
น้ำยาล้างจาน (มะกรูด)		
0.005 mg/plate	28±4	34±7
0.05 mg/plate	24±5	30±9
0.5 mg/plate	17±4	28±7
0.75 mg/plate	18±5	23±9
น้ำยาล้างจาน (มะนาว)		
0.005 mg/plate	28±8	30±6
0.05 mg plate	20±8	30±8
0.5 mg plate	17±4	27±8
0.75 mg/plate	18±3	23±6

ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจาก 6 plate±SD (2 independent experiments)

ค่าที่แสดงยังไม่ได้ลบด้วย Vehicle control (spontaneous mutation)

AF-2 คือ Positive control ในการทำที่ไม่มี S9 mix 2-AA คือ Positive control ในการทำที่มี S9 mix

จากตาราง 4 พบว่า การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายของ water (Negative control), DMSO (Vehicle control), AF-2 0.25ug/plate (Positive control ในสภาวะที่ไม่มี S9 mix) ให้จำนวน Revertant colonies/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 22±6, 27±7, และ 243±92 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายของ water (Negative control), DMSO (Vehicle control), 2-AA 0.25ug/plate (Positive control ในสภาวะที่มี S9 mix) ให้จำนวน Revertant colonies/plate ในสภาวะที่มี S9 29±4, 27±7, และ 181±68 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน(ละไวกาโด้) ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 29±5, 23±4, 20±7 และ 18±4 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้นดังกล่าว แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ละไวกาโด้) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ส่วนในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 28±6, 22±5, 28 ±10 และ 19±4 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ละไวกาโด้) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ในสภาวะที่มี S9

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ละกรูด) ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 28±4, 24±5, 17±4 และ 18 ±5 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้นดังกล่าว แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ละกรูด) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ส่วนในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 37±7, 30±9, 28±7 และ 23±9 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ละกรูด) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ในสภาวะที่มี S9

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (มะนาว) ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 28±8, 20±8, 17±4 และ 18 ±3 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้นดังกล่าว แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (มะนาว) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ส่วนในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 30±6, 30±8, 27±8 และ 23±6 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน

(มะกรูด) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ในสภาวะที่มี S9

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างจาน (ส้ม) น้ำยาล้างจานท้องตลาด 1 และ น้ำยาล้างจานท้องตลาด 2 ใน *Salmonella typhimurium* TA 98 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9 โดยตัวอย่างที่ใช้ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate มีผลการทดลองดังตาราง 5

ตาราง 5 ฤทธิ์ก่อกลายของน้ำยาล้างจาน (ส้ม) น้ำยาล้างจานท้องตลาด 1 และ น้ำยาล้างจาน ท้องตลาด 2 ใน *Salmonella typhimurium* TA 98

	จำนวน Revertant colonies/plate	
	TA 98	
	- S9	+ S9
water (Negative control)	19±6	30±8
DMSO (Vehicle control)	20±6	22+8
AF-2 0.25µg/plate	144+21	-
2-AA 0.5µg/plate	-	134±20
น้ำยาล้างจาน (ส้ม)		
0.005 mg/plate	17±2	27±8
0.05 mg/plate	22±9	26±8
0.5 mg/plate	21±6	19±7
0.75 mg/plate	16±3	28±9
น้ำยาล้างจานท้องตลาด 1		
0.005 mg/plate	17+6	30±10
0.05 mg/plate	19+6	32±10
0.5 mg/plate	K	19±8
0.75 mg/plate	K	16±5
น้ำยาล้างจานท้องตลาด 2		
0.005 mg/plate	20±7	30±6
0.05 mg/plate	17±6	18±9
0.5 mg/plate	14+2	16±5
0.75 mg/plate	K	15±5

ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจาก 6 plate ± SD (2 independent experiments)

- ไม่ได้ทำการทดสอบ (Not tested), (-) control (spontaneous revertant)

AF-2 คือ Positive control ในกรณีที่ไม่มี S9 mix

2-AA คือ positive control ในกรณีที่มี S9 mix K คือ toxic, killing effect

จากตาราง 5 พบว่า การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายของ water (Negative control), DMSO (Vehicle control), AF-2 0.25µg/plate (Positive control ในภาวะที่ไม่มี S9 mix) ให้จำนวน Revertant colonies/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 19±6, 20±6, และ 144±21 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายของ water (Negative control), DMSO (Vehicle control), 2-AA 0.25µg plate (Positive control ในภาวะที่มี S9 mix) ให้จำนวน Revertant colonies/plate ในสภาวะที่มี S9 30±8, 22±8, และ 144±20 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ส้ม) ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 17±2, 22±9, 21±6 และ 16±3 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้นดังกล่าว แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ส้ม) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ส่วนในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies plate 27±8, 26±8, 19 +7และ 28+9 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ส้ม) ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ในสภาวะที่มี S9

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานท้องตลาด1 ซึ่งมีส่วนประกอบของ Linear alkylbenzene sulfonate, sodium salt, Sodium lauryl ether sulphate และ Cocamido propyl betaine (CAPB)ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.05, mg plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate17±6 และ19 ±6 เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.75 mg/plate แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานท้องตลาด 1 เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.05 mg-plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ส่วนในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ให้จำนวน Revertant colonies/plate 30±10, 32±10, 19±8 และ 16±5 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างท้องตลาด1 ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ในสภาวะที่มี S9 ทั้งนี้เนื่องจาก ในสภาวะที่มี S9 เอนไซม์จะเหนี่ยวนำให้สารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์มากขึ้น

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานท้องตลาด2 ซึ่งมีส่วนประกอบของ Linear alkylbenzene sulfonate, sodium salt และ Sodium lauryl ether sulphate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05 และ 0.5 mg plate ให้จำนวน Revertant colonies plate 20±7, 17±6 และ 14±2 เกิด bacteria killing effect ที่ความเข้มข้น 0.75 mg plate แสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานท้องตลาด 2 เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 mg/plate ในสภาวะที่ไม่มี S9 ในสภาวะที่มี S9 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg plate ให้จำนวน

Revertant colonies plate 30±6, 18±9, 16±5 และ 15±5 ตามลำดับ และไม่เกิด bacteria killing effect ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างห้องคลาด2 ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่เป็นพิษต่อ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg plate ในสภาวะที่ไม่ S9 ทั้งนี้เนื่องจาก ในสภาวะที่มี S9 เอนไซม์จะเหนี่ยวนำให้สารที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ลดลง

ทั้งนี้การที่ผลิตภัณฑ์ เกิด bacteria killing effect มีพิษต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* TA 98 แต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าไม่พิษต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งต้องทำการทดลองต่อไป

บทที่ 5
สรุป

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักและผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน โดยวิธีเอมส์ ซึ่งใช้ *S. typhimurium* TA 98 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9 พบว่า ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก ได้แก่ ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (ส้ม) ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (มะนาว) ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (อะโวกาโด้) ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผัก (มะกรูด) ไม่มีฤทธิ์ mutagenicity ต่อยีนของ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 5 และ 10 mg/plate ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9 แสดงว่า ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักทั้ง 4 ชนิด มีความปลอดภัยไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 0.1 , 0.5, 5 และ 10 mg/plate

ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน ได้แก่ ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ส้ม) ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (มะนาว) ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (อะโวกาโด้) ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (มะกรูด) ไม่มีฤทธิ์ mutagenicity ต่อยีนของ *S. typhimurium* TA 98 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9 และเมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานทั้ง 4 ชนิด สูงกว่า 0.75 mg/plate จะมีพิษต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA 98 แสดงว่า ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักทั้ง 4 ชนิด ดังกล่าว มีความปลอดภัยไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate

ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานในห้องตลาด 1 และ ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานในห้องตลาด 2 เมื่อความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 0.75 mg/plate ไม่มีฤทธิ์ mutagenicity ต่อยีนของ *S. typhimurium* TA98 ในสภาวะที่มี S9 ส่วนในสภาวะที่ไม่มี S9 ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานในห้องตลาด 1 และ 2 จะมีพิษต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA 98 เมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 0.05 และ 0.5 mg/plate ตามลำดับ แสดงว่า ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานในห้องตลาด 1 มีความปลอดภัยไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น ไม่เกิน 0.05 mg/plate ส่วน ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานในห้องตลาด 2 มีความปลอดภัยไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 0.5 mg/plate

เมื่อเปรียบเทียบผลการเป็นพิษต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA 98 ของผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (ส้ม) ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (มะนาว) ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (อะโวกาโด้) ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจาน (มะกรูด) มีความเป็นพิษน้อยกว่า ผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานในห้องตลาด 1 และผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างจานในห้องตลาด 2

Mahasarakham University

บรรณานุกรม

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และ ชมรมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย **การประชุมเชิงปฏิบัติการ การทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ สารก่อมะเร็ง และสารก่อรูปด้วยวิธีตรวจระยะสั้น** คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2534

เดือนจิง คำพิทักษ์ ปิติ รุจจิงห์ และธีรวรรณ์ ขันทอง. **พันธุศาสตร์ทางการแพทย์** ขอนแก่นภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2543.

นันทิยา รัตนเคช และคณะ. **การศึกษาความเป็นพิษในระดับจีนของสมุนไพรไทย**. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology. 18-20 october 2005.

อุษณีย์ ทินิจเขตคำนวณ. **การประเมินความปลอดภัยของสาไยหลังจากการใช้โปแตสเซียมคลอเรต**. ภาควิชาเชื่อเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2545.

Chewonarin T. and others. 1998. Effects of Roselle (*Hibiscus sabdariffa Linn.*): a Thai Medicinal Plant, on the Mutagenicity of Various Known Mutagens in Salmonella typhimurium and on Formation of Aberrant Crypt Foci Induced by the Colon Carcinogens Azoxymethane and 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in F344 Rats. **Food and Chemical Toxicology.**, 37 : 591-601.

Reid K. A. and others. 2006. Evaluatetion of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. . **Journal of Ethnopharmacology.**, 106 : 44-50.

Sujbert I. and others. 2006. Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: Survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test. **Journal Toxicology.**,219 : 106–112.

Vinitketkumnuen U. and others. 2002. Particulate matter, PM10 & PM2.5 levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. **Mutation Research.**, 519 : 121-131.

Mahasarakham University

ต้นฉบับไม่ปรากฏข้อมูล

ประวัติย่อนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายณฐนนท์ ตราชู

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Nathanon Trachoo

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน --

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ 8

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตลาด อ เมือง จ มหาสารคาม 44000 โทร 034-742-823 ต่อ 1527 โทรสาร 043-743-135

5.ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2536	ปริญญาตรี	วท.บ.	เทคโนโลยีการอาหารและโภชนาศาสตร์	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	ไทย
2539	ปริญญาโท	M.Sc.	Dairy Science	South Dakota State University	U.S.A.
2544	ปริญญาเอก	Ph.D.	Food Science and Technology	The University of Georgia	U.S.A.

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Food Safety and Microbiology (Microaerophillic microorganisms)

7. ผลงานวิจัยล่าสุดที่ได้รับการตีพิมพ์

1. N. Trachoo, C. Boudreaux, A. Moongngarm, S. Samappito and R. Gaensakoo 2006 Effect of geminated rough rice media on growth of selected probiotic bacteria. Pakistan Journal of Biological Sciences. 9(14): 2657-2661.
2. N. Trachoo and S. Kunyaboon 2006 Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms after chlorine treatment. Songklanakarin Journal of Science Technology. 28(5): 991-998.
3. N. Trachoo 2006 Food Safety in Buddhism. Food and Health Vol. 14(89): 42-45. March-April 2549. (Thai)
4. N. Trachoo and C. Boudreaux 2006 Therapeutic Properties of Probiotic Bacteria. Journal of Biological Sciences. 6(1): 202-208.

ผู้ช่วยวิจัยคนที่ 1

นางสาวกรรณิกา ศรีประย่า

บ้านเลขที่ 78 หมู่ 5 ตำบลนาดูน อำเภอนาดูน จังหวัดมหาสารคาม 44180

การศึกษา

พ.ศ. 2541 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนนาดูนประชาสรรพ์ อำเภอนาดูน จังหวัดมหาสารคาม

พ.ศ. 2544 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนาดูนประชาสรรพ์ อำเภอนาดูน จังหวัดมหาสารคาม

พ.ศ. 2548 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ) สาขาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ผู้ช่วยวิจัยคนที่ 2

นางสาวเกษร ไพโรจน์การ

ที่อยู่ 194 หมู่ 10 ตำบลกระเบื้องใหญ่ อำเภอชุมพลบุรี จังหวัดสุรินทร์ 32190

การศึกษา

มัธยมศึกษา โรงเรียนโยธินบูรณะ กรุงเทพมหานคร

ปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาสารคาม

ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาสารคาม (กำลังศึกษา)

มมส-วร 2

รายงานการใช้จ่ายเงิน

โครงการวิจัย งบประมาณรายได้

ชื่อโครงการ การทดสอบสารก่อกลายพันธุ์ในน้ำหมักชีวภาพ

หัวหน้าโครงการ นายณฐนนท์ ตราชู หน่วยงานที่สังกัด คณะเทคโนโลยี

ที่อยู่ 306 ต. หนองกุง อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น 44000

ได้รับเงินเพื่อดำเนินโครงการเป็นจำนวน 40,000 บาท (สี่หมื่นบาทถ้วน)

ได้ใช้จ่ายเงินไปแล้วทั้งสิ้นเป็นจำนวน 40,000 บาท (สี่หมื่นบาทถ้วน)

ดังรายละเอียดต่อไปนี้

รายการ	จำนวนเงิน	
	บาท	สตางค์
1. หมวดค่าจ้างชั่วคราว	-	-
2. หมวดค่าใช้สอย	7,000	-
3. หมวดค่าตอบแทน	4,000	
4. หมวดค่าวัสดุ	29,000	-
5. หมวดค่าครุภัณฑ์	-	-
6. อื่น ๆ		-
รวม (สี่หมื่นบาทถ้วน)	40,000	

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าข้อความดังกล่าวเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อ .....

(... นายณฐนนท์ ตราชู ...)

หัวหน้าโครงการ

Mahasarakham U