

การตรวจวัดความสามารถการก่อกลายพันธุ์ของชีวสารจากเชื้อสกุลบาซิลลัส โดยการทดสอบการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียซาลโมเนลลา

จุฑารัตน์ เก้าอียน¹, ปัทมาวดี กาวร¹, มณฑล เลิศคนาวนิชกุล^{2*}

บทคัดย่อ

โปรตีนชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brevibacillus laterosporus* SA14, SA15, *Bacillus pumilus* BA16/2 และ *Bacillus megaterium* BA6 ที่เตรียมได้ด้วยการตกตะกอนใน 50% แอมโมเนียมซัลเฟต มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1.746, 1.188, 0.355 และ 0.242 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่ามีเฉพาะชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ของ *Brev. laterosporus* SA1, SA15 ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 ส่วนสารละลายชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ของบาซิลลัสชนิดอื่นไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามที่ไคเตอร์ 1:128 ของสารละลายชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14, SA15 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Salm. typhimurium* TA98, TA100 จึงได้นำไปทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอสได้เช่นเดียวกับสารละลายชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ของ *Bacillus* spp. อื่นๆ (*B. pumilus* BA16/2 และ *B. megaterium* BA6) พบว่าสารละลายชีวสารกึ่งบริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของบาซิลลัสทุกชนิดไม่แสดงฤทธิ์การก่อการกลายพันธุ์ เมื่อใช้เกณฑ์ mutagenicity index (MI) 4 อย่างไรก็ตาม ควรมีการนำไปทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์กับวิธีการอื่นๆต่อไปเพื่อความปลอดภัยในการนำไปใช้ประโยชน์

คำสำคัญ: การทดสอบด้วยวิธีเอ็มเอส, ซาลโมเนลลาไทฟิมูเรียม, บาซิลลัส สปีชีส์

บทนำ

จากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์ในยุคปัจจุบัน ทำให้มีผลงานวิจัยด้านต่างๆ ออกมามากมายที่เกี่ยวข้องกับทางด้านอาหาร การเกษตร และอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิจัยทางด้านการแพทย์ที่นับวันจะมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีอุบัติการณ์การเกิดโรคจากเชื้อสายพันธุ์ใหม่ขึ้นอย่างต่อเนื่อง เช่น โรคซาร์สและโรคไข้หวัดนก รวมไปถึงเชื้อสายพันธุ์เดิมที่พัฒนาปรับเปลี่ยนกลายเป็นเชื้อดื้อยา ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงระดับยีนบนสาย

ดีเอ็นเอหรือที่เรียกว่า การกลายพันธุ์⁽¹⁾ ทำให้ไม่สามารถรักษาด้วยยาต้านจุลชีพชนิดเดิมให้หายได้ จึงได้มีงานวิจัยและการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาตัวยานชนิดใหม่ๆ ที่สามารถออกฤทธิ์ทำลายกลุ่มเชื้อดื้อยาเพื่อประโยชน์ในด้านการรักษาหรือควบคุมการเกิดโรคออกมาอย่างต่อเนื่อง มีรายงานว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุลบาซิลลัสเป็นแนวทางเลือกทางหนึ่งที่น่าสนใจ⁽²⁾ แบคทีเรียสกุลบาซิลลัสเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ที่สามารถพบกระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและน้ำ สำหรับสปีชีส์ที่สามารถผลิต

¹ นักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์

² สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Detection of mutagenicity of biocompound from *Bacillus* spp. by the *Salmonella* mutagenicity test

Jutharat Kaoian¹, Pattamawadee Thaworn¹, Monthon Lertcanawanichakul^{2*}

Abstract

The protein concentration of partially purified biocompounds (PPBs) prepared from culture broth of *Brevibacillus laterosporus* SA14, SA15, *Bacillus pumilus* BA16/2 and *Bacillus megaterium* BA6 were 1.746, 1.188, 0.355 and 0.242 mg/ml, respectively. It was found that only PPBs prepared from culture broth of *Brev. laterosporus* SA14 and SA15 could inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. However, PPBs prepared from culture broth of SA14 and SA15 at the titer of 1:128 did not inhibit the growth of TA98 and TA100. The PPBs obtained from all tested *Bacillus* species were used to determine the mutagenic properties using Ames test. It was found that all PPBs did not show mutagenic properties by this Ames' test at the mutagenicity index (MI) 4. However, further tests using other systems should also be carried out to evaluate its useful safety.

KeyWords: Ames'test *Salmonella typhimurium* *Bacillus* species

สารปฏิชีวนะได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* และ *Brevibacillus laterosporus* ซึ่งเดิมเรียกว่า *Bacillus laterosporus*⁽³⁾ โดยพบมีรายงานว่า *Brev. laterosporus* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เช่น spergualin⁽⁴⁾ และ bacithrocin A, B และ C⁽⁵⁾ รวมถึง peptide antibiotic ที่ออกฤทธิ์ cyanolytic activity⁽⁶⁾ นอกจากนี้สายพันธุ์ SA14 ของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย

ก่อโรคในกลุ่ม methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ดีกว่า oxacillin⁽⁷⁾ "ละมีความทนทานต่ออุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 15 นาที รวมถึงทนทานต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ⁽⁸⁾ ดังนั้นจึงมีความสนใจนำมาศึกษาต่อถึงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์นอกเป้าหมาย ดังเช่นฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ที่มักนิยมศึกษากันโดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 ที่มีความบกพร่องทางการสังเคราะห์ histidine ให้กลับมาเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีส่วนผสมของ histidine ซึ่งเรียกวีธี

¹Medical Technology students, School of Allied Health Sciences and Public Health

²Division of Medical Technology, School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80161

* Corresponding author (e-mail: lmonthon@wu.ac.th)

การดังกล่าวว่าการทดสอบแบบแอมส์ (Ames test) หรือการทดสอบการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียซาลโมเนลลา⁽⁹⁻¹¹⁾ ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ทำได้ง่ายและราคาถูก มีรายงานที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับวิธีดังกล่าวในการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารเคมีต่างๆ ทั้งที่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติและสารเคมีสังเคราะห์⁽¹²⁻¹⁶⁾ งานวิจัยนี้จึงได้นำวิธีการทดสอบแบบแอมส์มาศึกษาฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ที่อาจมีอยู่ในสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Bacillus* species (*Brev. laterosporus* SA14, SA15, *B. megaterium* BA6 และ *B. pumilus* BA16/2)^(7,8,17,18) เพื่อให้ได้ข้อมูลความเป็นพิษเบื้องต้นเกี่ยวกับสารปฏิชีวนะที่นำมาศึกษา ในการนำไปพัฒนาเป็นสารต้นแบบของการผลิตยาต้านจุลชีพต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Brevibacillus laterosporus* SA14, SA15⁽¹⁷⁾, *Bacillus megaterium* BA6 และ *Bacillus pumilus* BA16/2⁽¹⁸⁾ ที่เก็บรักษาไว้ใน 15% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวโดยขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) จากนั้นนำไปปั่นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแบ่งเก็บเชื้อทดสอบทั้งหมดลงใน 15% กลีเซอรอล เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

นำแบคทีเรียดัชนี ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA100 (คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล) ที่เก็บรักษาไว้ใน 15% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว โดยวิธีการขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient (NA) และ nutrient broth No.2 (NB No.2) ตามลำดับ จากนั้นนำไปปั่นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแยกแบ่งเก็บลงใน 15% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และการทดสอบแบบแอมส์

Salm. typhimurium สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ถูกชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน

histidine (*his*-) แบบ frameshift mutation และ base pair substitution ตามลำดับ ทำให้ไม่สามารถเจริญได้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี histidine

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* species ให้ผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ Luria- Bertani (LB) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดัชนี ได้แก่ Mueller Hinton (M-H) Agar/Broth ส่วนชนิดที่ใช้เพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ได้แก่ Nutrient Broth (NB) No.2 (Oxoid), minimal agar, Vogel Bonner medium E (VB salt) และ Top agar

3. สารเคมีและสารก่อกลายพันธุ์

สารเคมีสำคัญที่ใช้ได้แก่ sodium phosphate buffer (pH 7.4), sodium dodecyl sulfate (SDS), histidine และ biotin ส่วนสารก่อกลายพันธุ์ คือ 4-Nitroquinoline-N-Oxide (4-NQO: Sigma, USA)

4. การเตรียมชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ (partially purified biocompounds: PPBs)

4.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ

เชื้อโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียทดสอบ (*Bacillus* species) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วทรงสูงฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปปั่นเพาะเชื้อในตู้ปั่นเลี้ยงแบบเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเอาสารแขวนลอยแบคทีเรียทดสอบมาปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วนำสารแขวนลอยเชื้อแต่ละหลอดปริมาตร 2% ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตรที่อยู่ในขวด Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปปั่นเพาะเชื้อที่สภาวะเดิม จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเก็บส่วนใสที่เรียกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth)

4.2 การเตรียมชีวสารกึ่งบริสุทธิ์

เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ ความเข้มข้น 50% ของน้ำเลี้ยงเชื้อในข้อ 4.1 โดยเติมลงไปครั้งละเล็กน้อยและกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ นาน 24 ชั่วโมง โดย

กวนปั่นเบาตลอดเวลาเป็นเวลา 1 คืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เก็บตะกอนและละลายตะกอนด้วยสารละลาย phosphate buffer (pH 7.2) โดยค่อยๆ เติมครั้งละ 1 มิลลิลิตร จนตะกอนละลายหมดพอดี จากนั้นให้นำไปทำ dialysis ในถุงขนาดรูผ่าน 3.5 กิโลดาลตัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเอาส่วนที่ไม่ละลายทิ้งไป จากนั้นแยกเก็บสารละลายชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ (PPBs) ที่อยู่ในถุงเพื่อนำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford(19) และทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและทดสอบแบบเอนต์ต่อไป^(10,11)

5. วิธีทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลาย PPBs ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

ใช้วิธี paper disc diffusion และ agar well diffusion ที่ได้ดัดแปลงมาจาก Bauer และคณะ⁽²⁰⁾ ดังนี้ แยกเพาะเชื้อแบคทีเรียดัชนีทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว M-H บ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว M-H สำหรับ *S. aureus* TISTR 517 ส่วน TA 98, TA 100 เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB No. 2 และปรับ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นใช้ไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อจุ่มสารแขวนลอยเชื้อที่เตรียมได้ นำไปป้ายให้ทั่วลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M-H

5.1 Paper disk diffusion

จุ่มกระดาษกลมเปล่า (blank disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงในสารละลาย PPBs ที่ได้ทำการเจือจางไว้แบบ two-fold dilution จากนั้นนำ disc ที่จุ่มลงในสารละลาย PPBs วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M-H โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ และตัวทำละลายคือ phosphate buffer pH 7.2 เป็นตัวควบคุม วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งดังกล่าวด้วย จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. หลังการบ่มเพาะเชื้อให้ดูวงใสรอบ disc ให้ถือว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และเลือกใช้ระดับความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อดัชนี *Salmonella* ทั้ง 2 สายพันธุ์ (ไม่เกิดวงใสรอบ

disc) ไปทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอนต์

5.2 Agar well diffusion

เจาะรูผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M-H หรือ NB No. 2 ด้วยทิปปราศจากเชื้อขนาด 1,000 ไมโครลิตร ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และใช้หัวฉวยเชื้อปราศจากเชื้อเจาะรูที่ค้างอยู่ในหลุมออก จากนั้นหยดสารละลาย PPBs ที่ได้ทำการเจือจางไว้แบบ two-fold dilution ลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร โดยหยดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว M-H และ NB No. 2 และ phosphate buffer pH 7.2 เป็น negative control จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารซึมเข้าเนื้อวุ้นจนหมด นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมทดสอบให้ถือว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และให้เลือกใช้ระดับความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อดัชนี *Salmonella* ทั้ง 2 สายพันธุ์ (ไม่เกิดวงใสรอบหลุมทดสอบ) ไปทำการทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอนต์

6. การทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอนต์

ใช้วิธี preincubation ของการทดสอบด้วยวิธีเอนต์ ชนิดไม่มี metabolic activation ตามที่ Yahagi และคณะ²¹ แนะนำไว้ โดยนำเชื้อ *Salm. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ที่เก็บไว้ใน 15% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาแยกเป็นโคลนีเดี่ยวโดยขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ซึ่งเป็นส่วนผสมของ 16% NB No.2 กับ 1.5% Agar จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เชียโคลนีเดี่ยวของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ๆ ละ 5 โคลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB No.2 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดแก้วฝาเกลียวทรงสูงขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร นำไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Biosystem BTS-330) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.30 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^6 - 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

นำตัวอย่างสารละลาย PPBs ที่ความเข้มข้นที่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอด จากนั้นเติม phosphate buffer (pH

7.4) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไป แล้วใส่เชื้อที่เพาะไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ แบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาเติม top-agar ที่มีส่วนผสมของสารละลาย 0.5 mM histidine/biotin (histidine/biotin : top agar เท่ากับ 1:10) ปริมาตร 2 มิลลิตร ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน โดยเขย่าเบาๆ แล้วเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal agar ซึ่งมีส่วนผสมของ agar, VB salt และ 40% Glucose ให้กระจายอย่างสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวน revertant colonies (สามารถเจริญได้ในจานเพาะเชื้อที่ไม่มี histidine) ในจานทดสอบ ตัวอย่างสารละลายมีมากกว่า 4 เท่า ของ spontaneous colonies เทียบกับ negative control แสดงว่า PPBs น่าจะมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

สำหรับ positive control ที่มีเฉพาะสารก่อกลายพันธุ์ประกอบด้วย 4NQO ความเข้มข้น 20, 2.0 และ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร, phosphate buffer pH 7.4 จำนวน 500 ไมโครลิตร และเชื้อ 100 ไมโครลิตร ส่วน negative control เตรียมเช่นเดียวกันโดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 100 ไมโครลิตร แต่ไม่มี 4-NQO

ผลการศึกษา

สารละลาย PPBs ที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14 และ SA15 อายุ 4 วัน *B. megaterium* BA6 อายุ 7 วัน และ *B. pumilus* BA16/2 อายุ 17 วัน มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.746, 1.188, 0.242 และ 0.355 มิลลิกรัม/มิลลิตร ตามลำดับ และพบว่าไม่สามารถทดสอบหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์จากสารละลาย PPBs ด้วยวิธีเอ็มส์ เนื่องจากสารละลาย PPBs ของ *Bacillus species* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียตัวนี้ *Salmonella* จึงต้องมีการทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลาย PPBs ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียตัวนี้ดังกล่าว กล่าวคือไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อตัวนี้ พบว่าสารละลาย PPBs จากเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14, SA15 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Salm. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งต้องมีการเจือจางต่อไปแบบ 2 เท่า จนพบว่าที่ไตเตอร์ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อตัวนี้เท่ากับ 1:128 ส่วนสารละลาย PPBs จากเชื้อ *B. megaterium* BA6 และ *B. pumilus* BA16/2 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Salm. typhimurium* ทั้งสองสายพันธุ์ ดังแสดงใน ตารางที่ 1 จากนั้นได้นำสารละลาย PPBs ที่ไตเตอร์ที่เหมาะสมดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มส์ต่อไป

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ของสารละลายชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ (PPBs) จากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Brevibacillus laterosporus* SA14 และ SA15

เชื้อ	ไตเตอร์*															
	TA98								TA100							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
SA14	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
SA15	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

+: เกิดวงใส มีฤทธิ์ยับยั้ง, -: ไม่เกิดวงใส ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

* ความเข้มข้นของโปรตีนตั้งต้นใน SA14 และ SA15 มีค่าเท่ากับ 1.746 และ 1.188 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ

สารละลาย PPBs ที่เตรียมได้จาก *Brev. laterosporus* SA14, SA15 ที่ไต่เตอร์ 1:128 *B. megaterium* BA6 และ *B. pumilus* BA16/2 ที่ไต่เตอร์ที่ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ TA98 และ TA100 เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิด revertant colonies ของแบคทีเรีย *Salm.*

typhimurium (TA98 และ TA100) ด้วยวิธีเอ็มส์ ปรากฏว่าไม่พบชีวสารกึ่งบริสุทธิ์จากเชื้อทดสอบชนิดใดเลยที่สามารถเหนี่ยวนำให้ *Salm. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 เกิดการกลายพันธุ์กลับได้ ดังแสดงใน ตารางที่ 2 และ ตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารละลายชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ (PPBs) จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brevibacillus laterosporus* SA14, SA15 และ *Bacillus pumilus* BA16/2 เมื่อทดสอบด้วยวิธีเอ็มส์

สารเคมี/ชีวสาร (ไต่เตอร์)	จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร ¹ (CFU/ml)				ฤทธิ์	
	TA98		TA100		ก่อกลายพันธุ์ ²	
	Spontaneous	Revertant	Spontaneous	Revertant	TA98	TA100
Negative control	107		3,200			
4-NQO 20.0 µg/ml		2,760		4,350	+	-
4-NQO 2.0 µg/ml		530		2,680	+	-
4-NQO 0.2 µg/ml		273		2,590	-	-
SA14 (1:128)		60		2,760	-	-
(1: 256)		51		2,268	-	-
(1:512)		49		1,700	-	-
(1:1024)		43		1,320	-	-
SA15 (1:128)		67		3,220	-	-
(1:256)		41		2,980	-	-
(1:512)		37		2,490	-	-
(1:1024)		30		2,300	-	-
BA16/2 (undiluted)		52		3,800	-	-
(1:2)		60		3,090	-	-
(1:4)		49		2,600	-	-
(1:8)		45		1,750	-	-

¹ค่าเฉลี่ยของ revertant colonies จาก 2 จานเพาะเชื้อของแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่มีปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ 10^6 - 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($OD_{600} \sim 0.3$)

²ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ พิจารณาโดยใช้เกณฑ์จำนวน revertant colonies เป็น 4 เท่าของ spontaneous colonies จาก negative control

+ : มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ - : ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การทดสอบ antimicrobial activity โดยวิธี agar well diffusion

แบคทีเรีย *Bacillus species* สามารถผลิตและปล่อยสารปฏิชีวนะออกมานอกเซลล์⁽²¹⁾ ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกอย่างใดก็ตามพบว่าองค์ประกอบที่เป็นโครงสร้างปกคลุมเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียอาจทำให้สารปฏิชีวนะไม่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ ดังเช่นโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีความซับซ้อนมากกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก⁽²²⁾ ทำให้ตรวจพบสารที่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (เช่น exoenzyme/exotoxin) น้อยกว่าที่ตรวจพบในแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้การมีแคปซูลเข้ามาห่อหุ้มตัวเซลล์ก็อาจทำให้การปล่อยสารออกนอกเซลล์เป็นไปได้ไม่สมบูรณ์ โดยสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีแคปซูลจะมีความเป็นมูกเยิ้มมันวาว⁽²³⁾ ซึ่งพบลักษณะดังกล่าวใน *B. megaterium* BA6 และ *B. pumilus* BA16/2 อาจเป็นสาเหตุทำให้ไม่ตรวจพบฤทธิ์ต้านดัชนีจากแบคทีเรียทั้งสองชนิด เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อหรือสารละลาย PPBs จากน้ำเลี้ยงเชื้ออายุ 4 วันไปทดสอบ ซึ่งแตกต่างจาก *Brev. laterosporus* SA 14 และ SA15 ที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญอย่างชัดเจน (โคโลนีหายและไม่มีแคปซูล) จึงได้เพิ่มระยะเวลาของการบ่มเลี้ยง *Bacillus* (BA6, BA16/2) ออกไปอีกเป็น 7 และ 17 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตชีวสารที่สนใจออกมานอกเซลล์ แต่ก็ยังไม่สามารถตรวจพบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดัชนีจากสารละลาย PPBs ที่เตรียมจากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียทั้งสองชนิด ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณสารปฏิชีวนะมีอยู่ในปริมาณน้อยหรือความไม่เสถียรของสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรียผลิตออกมา ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไปและอาจต้องมีการเพิ่มความเข้มข้นของชีวสารด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การทำระเหิดแห้ง รวมไปถึงใช้สารสกัดอื่นๆ นอกเหนือจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต⁽²⁴⁾ นอกจากนี้สารละลาย PPBs ที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงแบคทีเรียด้วยการตกตะกอนด้วย 50% แอมโมเนียมซัลเฟต ยังคงแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดัชนีได้เช่นเดียวกับน้ำเลี้ยงเชื้อ จึงคาดว่าชีวสารที่ออกฤทธิ์ปฏิชีวนะน่าจะเป็นโปรตีนและสามารถหาความเข้มข้นของโปรตีนได้เท่ากับ 1.746, 1.188, 0.242 และ 0.355 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากสารละลาย PPBs ที่

เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA 14, SA15, *B. megaterium* BA6 และ *B. pumilus* BA16/2 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนของสารละลาย PPBs จากเชื้อ BA6 และ BA16/2 มีปริมาณน้อยมาก อันอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่ตรวจพบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดัชนีในการทดลองนี้

การทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์

เนื่องจากสารละลาย PPBs จากน้ำเลี้ยงเชื้อ SA14 และ SA15 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียดัชนี *Salm. typhimurium* TA98 และ TA100 ซึ่งทำให้ไม่สามารถหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอสได้ จึงจำเป็นต้องหาค่าไคเตอร์ที่ไม่ให้ฤทธิ์ดังกล่าวพบว่าที่ไคเตอร์ 1:128 ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียดัชนี *Salmonella* จึงเลือกค่าไคเตอร์ดังกล่าวและไคเตอร์ที่สูงขึ้นไปอีก 3 ค่า (1:256, 1:512 และ 1:1,024) มาทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอส ส่วนสารละลาย PPBs จากน้ำเลี้ยงเชื้อ BA6 และ BA 16/2 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียดัชนี *Salmonella* จึงนำไปทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอสได้โดยไม่ต้องหาค่าไคเตอร์

เมื่อเตรียมสารละลาย PPBs จากน้ำเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบสกุลบาซิลลัสทั้ง 4 ชนิด คือ *Brev. laterosporus* SA14, SA15, *B. megaterium* BA6 และ *B. pumilus* BA16/2 ให้ได้ไคเตอร์ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรีย *Salm. typhimurium* TA98 และ TA100 แล้วนำมาศึกษาหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็มเอสโดยดูเกณฑ์ mutagenicity index (MI) มากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่าของ spontaneous colonies ของ negative control^(14, 25) พบว่าสารละลาย PPBs ที่นำมาศึกษาทั้งหมดไม่แสดงฤทธิ์ในการก่อการกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามสังเกตเห็นว่าปริมาณของ revertant colonies ที่ลดลงของ *Salm. typhimurium* ทั้งสองสายพันธุ์เมื่อนำไปผสมรวมกับ สารละลาย PPBs ตามวิธีทดสอบการก่อการกลายพันธุ์แบบเอ็มเอส (ตารางที่ 2) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไคเตอร์ของสารละลาย PPBs ที่นำมาศึกษายังคงแสดงฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียที่นำมาศึกษาด้วยวิธีเอ็มเอสและสามารถสังเกตเห็นได้ว่า *Salm. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 มีการกลายพันธุ์กลับ ได้ดีกว่า TA100 (ตารางที่ 2 และ 3) อันอาจเนื่องจาก TA98 มีกลไกการกลายพันธุ์แบบ frameshift ทำให้สามารถแสดงออกทาง phenotype ได้

อย่างเด่นชัด เมื่อมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ซึ่งต่างจาก TA100 ที่มีกลไกการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution ที่มักไม่ปรากฏการแสดงออกของ phenotype อย่างเด่นชัดเมื่อเกิดการกลายพันธุ์กลับ เช่นเดียวกับที่ได้เคยมีรายงานไว้ใน การวิจัยของ Ismene และคณะ⁽¹⁶⁾ ที่พบว่าสีย้อมที่นำไป ศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอดส์ สามารถชักนำ TA98 ให้เกิดการกลายพันธุ์กลับมากกว่า TA100 นอกจากนี้ยังมี รายงานที่นิยมใช้สายพันธุ์ต่างๆ ของ Salmonella มาใช้ศึกษา ฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอดส์ (TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA535, TA7001-TA7006) ซึ่งแต่ละ สายพันธุ์จะมีความไวต่อสารก่อกลายพันธุ์แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป⁽²⁶⁻²⁸⁾ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 เหมาะแก่การนำมาทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสาร ประกอบกลุ่ม heterocyclic amines⁽²⁹⁾ ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาสายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Salm. typhimurium* ให้มีความไวและความจำเพาะต่อการทดสอบมากยิ่งขึ้น เพื่อ ประโยชน์ในการศึกษาต่อไป

สารละลาย PPBs ที่นำมาทดสอบทั้งหมดจะไม่มีฤทธิ์ ในการก่อกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยวิธีเอดส์ที่ไม่มีระบบ เอนไซม์กระตุ้นสารพิษ (S9 mix) จากตับหนู แต่ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าจะไม่เกิดการชักนำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ เมื่อนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น มนุษย์หรือสัตว์ เพราะมี รายงานว่าสารบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้นโดยระบบเอนไซม์ S9 อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติก่อกลายพันธุ์ได้⁽³⁰⁻³³⁾ ในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรมีการนำสารละลาย PPBs ไป ผสมกับเอนไซม์ S9 ก่อนนำไปทดสอบการก่อกลายพันธุ์ ด้วยวิธีเอดส์ รวมถึงการนำไปทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ ใกล้เคียงกับเซลล์มนุษย์^(15,16) เพื่อให้ได้ข้อมูลฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2551 (WU51109) จากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช ขอขอบคุณสำนักวิชา สหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และ วัสดุอุปกรณ์บางอย่างในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. ไพศาล เหล่าสุวรรณ. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, 2542.
2. Drablos F, Nicholson D, Ronning M. EXAFS study of zinc coordination in Bacitracin A. Biochim Biophys Acta 1999; 1431: 433-42.
3. Katz E, Demain A. The peptides antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriol Rev 1977; 41: 449-74.
4. Favret ME, Yousten A. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. J Invertebr Pathol 1985; 45: 195-203.
5. Kamiyama T, Umino T, Nakamura Y, Itezono Y, Sawairi S, Satoh T, et al. Bacithrocin A, B and C, novel thrombin inhibitors. J Antibiot 1994; 47: 959-68.
6. Krachkovskii SA, Sobol AG, Ovchinnikova TV, Taqae AA, Takimento ZA, Azizbekian RR, et al. Isolation, biological properties, and spatial structure of antibiotic Loloatin A. Russian J Bioorg Chem 2002; 28: 269-73.
7. Chawawisit K, Lertcanawanichakul M. Minimum inhibitory concentration (MIC) of crude preparations of *Brevibacillus laterosporus* SA14 bioactive material compared to vancomycin and oxacillin, against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. World J Microbiol Biotechnol 2008; 24: 2199-204.
8. ธีรณิตย์ ตั้งศิริ, ดวงพร คันทโชติ. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus* spp. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ 2537.
9. อมรา คัมภีรานนท์. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2546.
10. Ames BN, Durston WE, Yamaaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and

- bacteria for detection. Proc Nat Acad Sci USA 1973; 70: 2281-5.
11. Yahagi T, Degawa M, Seino Y, Matsushima T, Nagao M, Sugimura T, Hashimoto Y. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. Cancer Lett 1975; 1: 91-6.
 12. อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน.ฤทธิ์ก่อการกลายและฤทธิ์ต้านการกลายของสารสกัดสมุนไพรสมุนไพรและหญ้าหวานในการทดสอบเอมส์. เชียงใหม่วารสาร 2544; 40: 147-53.
 13. รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์, ชีราภา แสนเสนา, นกตล กิตติวราฤทธิ์, มาลิน จุลศิริ. ฤทธิ์ต้านเชื้อและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของพืชตระกูลส้ม. วารสารเภสัชศาสตร์ มหิดล 2537; 21: 7-15.
 14. มณฑล เลิศคณาวณิชกุล, สุภาวดี ศิลปนประสาธน์, สุภาภรณ์ คงสวัสดิ์, ปณิตดา พิบูลย์. การตรวจหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ โลหะหนักและกลุ่มจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์สุขภาพชุมชน. รายงานการวิจัยโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน สนับสนุนโดยสำนักงานการอุดมศึกษา 2548.
 15. Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EP. Mutagenic activity in waste from an aluminium products factory in *Salmonella typhimurium*/microsome assay. Toxicol in vitro 2004; 18: 895-900.
 16. Ismene J, Christoph H, Klaus S. Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. Mutation Research/Genetic Toxicol Environ Mutagen 2004; 561: 35-44.
 17. มณฑล เลิศคณาวณิชกุล, กฤษณวัฒน์ นาคบุตร, กิ่งดาววีระกุล, อภิญา ชูพันธ์. การศึกษาคุณสมบัติของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียหมายเลข SA14, SA15, SA16 ที่มีฤทธิ์ต้านสแตปไฟโลคัสออเรียสที่ดื้อยาเมทิซิลลิน. ภาคนิพนธ์สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, 2550.
 18. Santong K, Naorungrote S, Bangrak P, Chunglok W, Lertcanawanichakul M. Screening, identification and antibacterial activities of effective thermotolerant *Bacillus* spp. strains isolated from raw milk. WU J Sci Technol 2008; 5: 39-46.
 19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
 20. Bauer AW, Kirby WLM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1986; 45: 493-6.
 21. Huang X, Tian B, Niu QH, Yang J, Zhang L, Zhang K. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. Res Microbiol 2005; 156: 719-27.
 22. Medtechzone. Bacteria Morphology, Structure and Function [serial online] Available from: URL: <http://www.medtechzone.com/data/bac/bacteria.php> [cited 2008 November 25].
 23. Technoinhome. แบคทีเรียแสดง capsule. [serial online] Available from: URL: <http://www.technoinhome.com/front/webboard/show.php?tbl=tblwb03&id=516> [cited 2008 November 25].
 24. ชรินทร์ เตชะพันธุ์. การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์. [serial online] Available from: URL: http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/ames_test.html [cited 2008 October 24].
 25. สุภาพร คงสวัสดิ์. Teratogenicity test. เอกสารประกอบการเรียนวิชาพิษวิทยาสิ่งแวดล้อมและอาชีวอนามัย. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ 2547. (เอกสารอัดสำเนา)

26. Schuitmaker JJ, Vogel EW, Nagelkerke JF, Bos RP. Mutagenicity and dark toxicity of the second-generation photosensitizer bacteriochlorin a. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1998; 47: 211-5.
27. Marques RCP, Medeiros SRBD, Dias CDS, Filho JMB, Lima LFA. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Res* 2003; 536: 117-20.
28. Kumar S, Kole PL, Sikka HC. Mutagenicity of dibenza[a, c]-anthracene and its derivatives in *Salmonella typhimurium* TA100. *Mutation Res* 1990, 242: 337-43.
29. Weisburger JH, Barnes WS, Lovellete CA, Tong C, Tanaka T, Williams GM. Genotoxicity, carcinogenicity, and mode of action of the fried food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Environ Health Perspect* 1986, 67: 121-7.
30. Lakshmi B, Ajitu TA, Jose N, Janardhanan KK. Antimutagenic activity of methanolic extract of *Ganoderma lucidum* and its effect on hepatic damage caused by benzo[a]pyrene. *J Ethnopharmacol* 2006; 107: 297-303.
31. Huang WJ, Lai CH, Cheng YL. Evaluation of extracellular products and mutagenicities in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *Sci Total Environ* 2007; 337: 214-23.
32. บังอร ศรีพานิชกุลชัย, อัญชลี ตัตตะวะศาสตร์, พิสมัย เหล่าภัทรเกษม, อารมณ ตัตตะวะศาสตร์, กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย.ฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสมุนไพรท้องถิ่น 8 ชนิด. วารสารวิจัย มข. 2544; 6: 23-33.
33. ลินนา ทองยงค์, แก้ว กังสดาลอำไพ, รุจิเรข ชนาวิรัตน์. ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากแมลงทอดที่รับประทานได้บางชนิดหลังทำปฏิกิริยากับไนเตรทโดยใช้การทดสอบเอมส์. ไทยเภสัชสาร 2546, 27: 109-22.