อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการยับยั้งและกลไกการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 โดยไทมอล

Influence of Temperature on Antimicrobial Activity and Mode of Action of Thymol Against *Escherichia coli* O157:H7

วิพรพรรณ ศรีสุธรรม ศศิพิมพ์ คำสระ ปาริชาติ พุ่มขจร* และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ. อุบลราชธานี 34190
*Email : parichatphumkhachorn@yahoo.com

บทคัดย่อ

Escherichia coli O157:H7 เป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่สำคัญของประเทศไทย การใช้สารเคมีถนอมอาหารเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะหาสารจากธรรมชาติที่ปลอดภัย เช่น ไทมอล มาใช้แทน วัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้คือเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความสามารถ และกลไกของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 จากการศึกษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งที่น้อยที่สุด (MIC) เท่ากับ 0.63 มิลลิโมลาร์ และมีกลไกการยับยั้งเป็นแบบฆ่าเซลล์แบคทีเรียให้ตาย เมื่อทำการทดลองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.25 มิลลิโมลาร์ และมีกลไกการยับยั้งเป็นแบบฆ่าเซลล์แบคทีเรียให้ตาย ผลการทดลองของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยความสามารถในการยับยั้งของไทมอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจะสูงกว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิไม่มีผลต่อกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล

คำสำคัญ : ไทมอล ความสามารถในการยับยั้ง กลไกการยับยั้ง *E. coli* O157:H7

Abstract

Escherichia coli O157:H7 is one of the important foodborne pathogens in Thailand. The use of chemical food preservatives to prevent the contamination of such bacterial strain in foods can pose harm to consumers. Therefore, currently there have been attempts to find safe natural products such as thymol to use as an alternative. The main objective of this study was to examine the effect of temperature on antimicrobial activity and mode of action of thymol against *E. coli* O157:H7. The result showed that at 37°C, thymol had ability to inhibit the bacterium with the minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.63 mM and had bactericidal mode of action. It also showed that at 20°C, thymol had ability to inhibit the bacterium with the MIC of 1.25 mM and had bactericidal mode of action. The results from this study suggested that temperature had an effect on antimicrobial activity of thymol against *E. coli* O157:H7 in that the antimicrobial activity of thymol at 37°C was higher than that at 20°C. However, temperature had no effect on mode of action of thymol against *E. coli* O157:H7.

Keywords : Thymol; Antimicrobial activity; Mode of action; *E. coli* O157:H7

บทนำ

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง อยู่ใน family Enterobacteriaceae แบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถก่อโรคได้ *E. coli* ที่ก่อโรคได้แบ่งเป็นหลายกลุ่มตามลักษณะการก่อโรคและความสามารถในการสร้างสารพิษ *E. coli* O157:H7 จัดเป็น *E. coli* ก่อโรคที่มีความสำคัญที่พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า Enterohemorrhagic *E. coli* ซึ่งมีลักษณะเฉพาะคือ ก่อให้เกิดอาการท้องเสียแบบมีเลือดปน (bloody diarrhea) และสามารถสร้างสารพิษที่เรียกว่า Shiga toxin บางครั้งจึงเรียกเชื้อกลุ่มนี้ว่า Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) โดยสารพิษชนิดนี้จะยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนและทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ [1] ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงอาจพบอาการไตวาย (Haemorrhagic uremic syndrome) และเม็ดเลือดแดงแตก ซึ่งทำให้เสียชีวิตได้ การติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 โดยส่วนใหญ่มักเกิดจากการได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารหรือน้ำดื่ม ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 จึงสามารถทำได้โดยการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวในอาหาร

วิธีที่นิยมใช้ในการป้องกันการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร คือ การใช้สารเคมีซึ่งเรียกรวม ๆ ว่า สารกันบูด หรือสารถนอมอาหาร (food preservatives) ถึงแม้ว่าสารดังกล่าวมีวัตถุประสงค์หลักในการใช้เพื่อยืดอายุของอาหาร โดยการทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย แต่เนื่องจากสารดังกล่าวมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์แบบไม่จำเพาะ ดังนั้นจึงสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้ด้วย สารกันบูดที่นิยมใช้กันในปัจจุบันแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มของกรดอ่อนและเกลือของกรดอ่อน (acids and their salts) กลุ่มของไนเตรตและไนไตรท์ (nitrates and nitrites) กลุ่มของซัลไฟต์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfites and sulfur dioxide) และกลุ่มอื่น ๆ เช่น โพรพิลพาราเบน (propylparaben) เมทิลพาราเบน (methylparaben) และ เอทิลพาราเบน (ethylparaben) เป็นต้น จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าสารถนอมอาหารหลายชนิดสามารถทำให้เกิดอันตรายกับสุขภาพของผู้บริโภคได้ เช่น ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย เลือดตกใน อัมพาต จนอาจส่งผลถึงขั้นพิการได้ [2]

จากอันตรายของสารถนอมอาหารที่กล่าวมาทำให้ผู้บริโภคกังวลถึงการบริโภคอาหารที่มีการใส่สารถนอมอาหาร ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงมีความพยายามที่จะหาสารทดแทนสารถนอมอาหาร โดยสารดังกล่าวต้องเป็นสารที่มาจากธรรมชาติและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค สารกลุ่มหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้แทนสารถนอมอาหาร คือ สารประกอบในน้ำมันหอมระเหยของพืช (plant essential oils) เนื่องจากสารดังกล่าวเป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติ และมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ตัวอย่างของสารดังกล่าวที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน คือ ไทมอล (thymol) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไทมอลสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น *Bacillus cereus, Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* และ *Shigella sonnei* [3-10] อย่างไรก็ตามที่ผ่านมายังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการยับยั้ง และกลไกการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาประเด็นดังกล่าว โดยการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้ง และกลไกการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 โดยไทมอลที่อุณหภูมิ 37 และ 20 องศาเซลเซียส

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI medium) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาเชื้อเก็บในรูป glycerol stock culture ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราส่วนของ glycerol: culture ของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 30 : 70 (v/v)

2. ไทมอลที่ใช้ในงานวิจัย

ไทมอลที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย การเตรียม stock solution ของไทมอลทำโดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย โดยให้มีความเข้มข้นของ stock solution เท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ (mM) stock เก็บ solution ของไทมอลที่เตรียมได้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และหลีกเลี่ยงการถูกแสง

3. การศึกษาความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7

การศึกษาความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ทำโดยใช้วิธี swab paper disc [11] ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้ นำแบคทีเรียทดสอบที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar โดยใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อ (sterile swab) นำแผ่น paper disc ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อที่ป้ายเชื้อแบคทีเรียไว้แล้ว หยด stock solution ของไทมอลปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงบนแผ่น paper disc นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะสังเกตว่ามี inhibition zone เกิดขึ้นรอบแผ่น paper disc หรือไม่ การทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ และในชุดการทดลองควบคุม (control) ใช้ 95% ethanol แทน stock solution ของไทมอล

4. การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7

การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ทำโดยวิธี broth dilution assay ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้ นำ stock solution ของไทมอลมาเจือจางด้วย 95% ethanol เพื่อให้มีความเจือจางลดลงทีละ 2 เท่า (twofold dilution) โดยสารละลายไทมอลที่ได้จะมีความเข้มข้นดังนี้ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 และ 1.57 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำสารละลายไทมอลแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร พร้อมกับ culture ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่มีปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth แต่ละหลอดมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เท่ากัน แต่มีความเข้มข้นของไทมอลลดลงทีละ 2 เท่า คือ เท่ากับ 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 และ 0.08 มิลลิโมลาร์ หลังจากที่นำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เจริญของเชื้อแบคทีเรียในทุกหลอดทดลอง การทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ และในชุดการทดลองควบคุม (control) ใช้ 95% ethanol แทนสารละลายไทมอล

5. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล

การศึกษานี้เป็นการหาค่า MIC ของไมทอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยวิธีการทดลองทำเช่นเดียวกับการหาค่า MIC ของไมทอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 4 เพียงแต่ในการทดลองนี้ให้นำ culture ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่มีสารละลายไทมอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 และ 0.08 มิลลิโมลาร์) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ

6. การศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล

การศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอลทำได้โดยนำสารละลายไทมอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร พร้อมกับ culture ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่มีปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของไทมอลมีค่าเท่ากับค่า MIC หลังจากที่นำ culture ของเชื้อแบคทีเรียที่มีสารละลายไทมอลไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ culture ดังกล่าวปริมาตร 100 ไมโครลิตรมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่ไม่มีไทมอล แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสังเกตว่ามีเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar หรือไม่ หากไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

BHI agar แสดงว่า ไทมอลมีกลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบบ bactericidal แต่หากมีเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แสดงว่าไทมอลมีกลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบบ bacteriostatic การทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ

7. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล

การศึกษานี้ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดย ไทมอล ที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 5 เพียงแต่ในการศึกษานี้ให้นำ *E. coli* O157:H7 ไปบ่มร่วมกับไทมอลที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (แทนอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำเชื้อดังกล่าวมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การศึกษาความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7

จากการตรวจสอบความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยวิธี swab paper disc พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวได้ ซึ่งสังเกตได้จาก inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบแผ่น paper disc ที่มีการหยดไทมอลความเข้มข้น 100 mM บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่มี *E. coli* O157:H7 เจริญอยู่ (Figure 1) โดยค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ดังกล่าวมีค่าประมาณ 25 มิลลิเมตร ผลการทดลองนี้สนับสนุนผลงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *B. cereus, C. jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* และ *S. sonnei* [3-10]

Figure 1 inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *E.coli* O157:H7 โดยไทมอล (a) ชุดทดลองที่ใช้ไทมอลหยดลงบนแผ่น paper disc (b) ชุดควบคุมที่ใช้ 95% ethanol หยด (แทนไทมอล) หยดลงบนแผ่น paper disc

2. การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7

เมื่อนำไทมอลไปศึกษาเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยการนำไทมอลที่มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (two fold dilution) ไปเติมลงใน culture ของ *E. coli* O157:H7 โดยความเข้มข้นของไทมอลที่ใช้คือ 5.00, 2.50, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 และ 0.08 มิลลิโมลาร์ แล้วตรวจสอบการเจริญของ *E. coli* O157:H7 หลังจากที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของไทมอลเท่ากับ 5.00, 2.50, 1.25 และ 0.63 มิลลิโมลาร์ ไม่ปรากฏการเจริญของ *E. coli* O157:H7 (Figure 2 และ Table 1) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 คือ 0.63 มิลลิโมลาร์ หรือค่า MIC (minimal inhibitory concentration) ของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 เท่ากับ 0.63 มิลลิโมลาร์

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าค่า MIC ของไทมอลสำหรับแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจเหมือนหรือต่างกันก็ได้แล้วแต่ชนิดของแบคทีเรีย เช่น ค่า MIC ของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogense*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* มีค่าเท่ากับ 3.0, 1.5, 0.4, 1.5 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ [3] โดยค่าดังกล่าวจะบ่งบอกถึง

ความไว (sensitivity) ของแบคทีเรียที่มีต่อไทมอล แบคทีเรียที่ให้ค่า MIC ต่ำ แสดงว่าสามารถถูกยับยั้งการเจริญโดยไทมอลได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ให้ค่า MIC สูง ด้วยเหตุนี้ค่า MIC จึงเป็นค่าเฉพาะตัวสำหรับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ และเป็นค่าพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการกำหนดปริมาณของไทมอลที่จะใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในสถานการณ์ต่าง ๆ หรือในสภาพใช้งานจริง

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยการหาค่า MIC ของไทมอลสำหรับการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าที่ความเข้มข้นของไทมอลเท่ากับ 5.00, 2.50 และ 1.25 มิลลิโมลาร์ ไม่ปรากฏการเจริญของ *E. coli* O157:H7 (Figure 2 และ Table 1) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ค่า MIC ของไทมอลสำหรับการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 เท่ากับ 1.25 มิลลิโมลาร์

Table 1 การเจริญของแบคทีเรียที่ความเข้มข้นของไทมอลต่าง ๆ และค่า MIC ของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 37 และ 20 องศาเซลเซียส

Bacteria	Temp. (°C)	Bacterial growth at different thymol concentrations							MIC (mM)
		0.08 mM	0.16 mM	0.31 mM	0.63 mM	1.25 mM	2.50 mM	5.00 mM	
E. coli	37	+	+	+	-	-	-	-	0.63
0157:H7	20	+	+	+	+	-	-	-	1.25

+ = มีการเจริญของ *E. coli* O157:H7 (culture ของแบคทีเรียขุ่น)

- = ไม่มีการเจริญของ *E. coli* O157:H7 (culture ของแบคทีเรียใส)

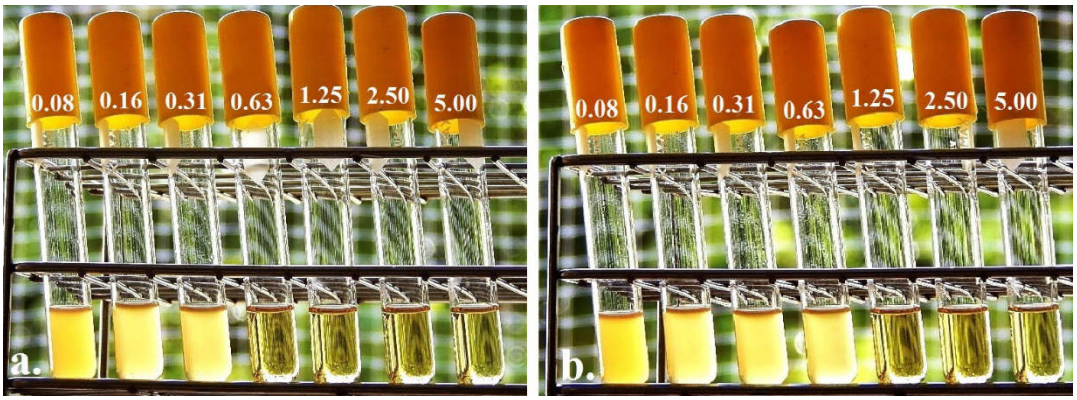

Figure 2 ผลการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไทมอลต่าง ๆ (a) การทดลองที่ 37 องศาเซลเซียส (b) การทดลองที่ 20 องศาเซลเซียส (ตัวเลขบนฝาหลอดทดลองแสดงค่าความเข้มข้นของไทมอลในหน่วยมิลลิโมลาร์)

อุณหภูมิจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อความสามารถการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด รวมทั้งไทมอล [10, 12-15] ในการทดลองนี้พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยสังเกตได้จากค่า MIC โดยค่า MIC ของไทมอลสำหรับการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีค่าสูงกว่าค่าดังกล่าวที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเช่น ไทมอลยับยั้งการเจริญของ *Shigella sonnei* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [10]

การที่ไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส อาจเนื่องมาจากว่า *E. coli* O157:H7 สามารถสร้าง receptor (ที่อยู่ที่ผนังเซลล์) ที่จำเพาะต่อ thymol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โครงสร้างของ outer membrane ของ *E. coli* O157:H7 ซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็นไขมันมีลักษณะอ่อนนุ่มคล้ายของเหลว (fluid-like property) จึงทำให้ไทมอลที่โดยปกติแล้วละลายได้ดีในไขมันสามารถเข้าไปสะสมอยู่ในชั้นของ outer membrane ได้มาก ซึ่งช่วยส่งเสริมให้ไทมอลสามารถเข้าสู่เซลล์เพื่อยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ดี ในขณะที่ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โครงสร้างของ outer membrane ของ *E. coli* O157:H7 ซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็นไขมันอาจมีความแข็ง (rigid) มากขึ้น และยอมให้ไทมอลละลายผ่านได้ยากขึ้น จึงทำให้ที่อุณหภูมินี้ไทมอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้น้อยลง (Figure 3) อย่างไรก็ตามการหาสาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้ไทมอลยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียสยังคงต้องมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป

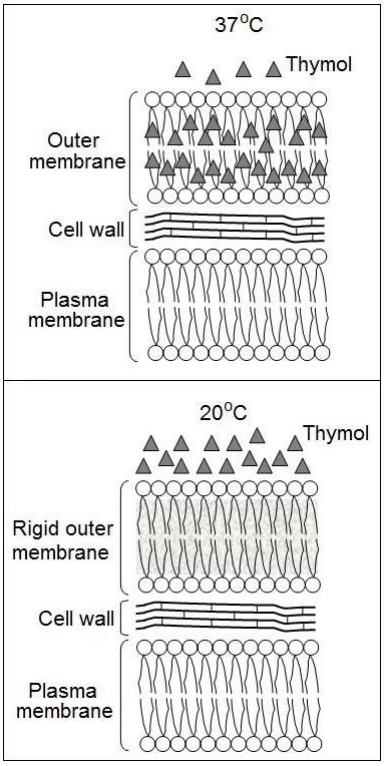

Figure 3 แผนภาพสำหรับอธิบายสาเหตุที่อุณหภูมิมีผลต่อโครงสร้างของ outer membrane ของ *E. coli* O157:H7 และความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7

4. การศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล

จากการศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล พบว่าไทมอลมีกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 เป็นแบบ bactericidal ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ *E. coli* O157:H7 ที่ถูกยับยั้งโดยไทมอล (ด้วยความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่สามารถกลับมาเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่ไม่มีไทมอลได้

5. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล พบว่าเซลล์ *E. coli* O157:H7 ที่ถูกยับยั้งโดยไทมอล (ด้วยความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่สามารถกลับมาเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่ไม่มีไทมอลได้ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไทมอลมีกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 เป็นแบบ bactericidal ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลการศึกษากลไกทำงานของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มาเปรียบเทียบกันทำให้สามารถสรุปได้ว่าอุณหภูมิไม่น่ามีผลต่อกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล เนื่องจากไทมอลมีกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 เป็นแบบ bactericidal ทั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน โดยบางชนิดอาจมีกลไกการทำงานแบบ bactericidal คือสามารถฆ่า หรือทำลายแบคทีเรียได้ ในขณะที่บางชนิดอาจมีกลไกการทำงานแบบ bacteriostatic คือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยที่ไม่ไปฆ่า หรือทำลายแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะหลายชนิด (antibiotics) มีกลไกการยับยั้งแบบ bacteriostatic โดยจะไปยับยั้งไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเจริญเติบโต เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune system) ทำหน้าที่ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียต่อไป ในการทดลองนี้พบว่า *E. coli* O157:H7 ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยไทมอล (ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC) ไม่สามารถกลับมาเจริญได้อีกบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไทมอล ซึ่งแสดงว่าไทมอลมีกลไกการทำงานแบบ bactericidal คือไปฆ่าหรือทำลาย *E. coli* O157:H7 ผลการทดลองนี้สนับสนุนผลงานวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าไทมอลมีกลไกการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus, C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes* และ *S. enterica* เป็นแบบ bactericidal [6, 8] นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังเป็นงานวิจัยแรกที่แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล การที่ไทมอลมีกลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็นแบบ bactericidal ทำให้การนำไปประยุกต์ใช้มีความหลากหลายมากขึ้น เนื่องจากไทมอลสามารถฆ่าแบคทีเรียได้เอง โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยความช่วยเหลือจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นจึงสามารถใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียภายนอกร่างกายได้ เช่น ใช้ฆ่าแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร หรือในอุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นต้น

สรุปและเสนอแนะ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้แบบ bactericidal โดยอุณหภูมิมีผลต่อความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 แต่ไม่มีผลต่อกลไกการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอล ผลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาต่อเพื่อหาคำตอบที่แท้จริงในการอธิบายว่าเพราะเหตุใดอุณหภูมิจึงมีผลต่อความสามารถของไทมอลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้แล้วผลการทดลองนี้ยังเป็นอาจเป็นประโยชน์ต่อการนำไทมอลไปประยุกต์ใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่ใช้ในการควบคุม *E. coli* O157:H7 ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] Buzby, J. C. and Roberts, T. 2009. “The economics of enteric infections: human foodborne disease costs”. **Gastroenterology**. 136 (6): 1851-1862.

[2] Sharma, S. 2015. “Food Preservatives and their harmful effects”. **International Journal of Scientific and Research Publications**. 5 (4): 1-2.

[3] Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F. 1999. “*In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of

Sardinian Thymus essential oils". **Letters in Applied Microbiology**. 29 (2): 130-135.

[4] Cowan, M. M. 1999. "Plant products as antimicrobial agents". **Clinical Microbiology Reviews**. 12 (4): 564-582.

[5] Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. and Nychas, G. J. E. 2001. "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol". **Journal of Applied Microbiology**. 91 (3): 453-462.

[6] Friedman, M., Henika, P. R. and Mandrell, R. E. (2002). "Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*". **Journal of Food Protection**. 65 (10): 1545-1560.

[7] Burt, S. 2004. "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review". **International Journal of Food Microbiology**. 94 (3): 223-253.

[8] Valero, M. and Frances, E. 2006. "Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth". **Food Microbiology**. 23 (1): 68-73.

[9] Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. and De Feo, V. 2013. "Effect of essential oils on pathogenic bacteria". **Pharmaceuticals (Basel)**. 6 (12): 1451-1474.

[10] Punyauppa-path, S., Phumkhachorn, P. and Rattanachaikunsopon, P. 2016. "Factors influencing synergistic antimicrobial activity of thymol and nisin against *Shigella* spp. in sugarcane juice". **Biologia**. 7 (8): 1003-1010.

[11] Rattanachaikunsopon P. and Phumkhachorn P. 1998. :A simple method for detecting bacteriocin production : swab-paper disc". **The Journal of Science KhonKaen University**. 26 (4): 281-288.

[12] Periago, P. M., Conesa, R., Delgado, B., Fernandez, P. S. and Palop, A. 2006. "*Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials". **Food Technology and Biotechnology**. 44 (1): 17-23.

[13] Periago, P. M. and Moezelaar, R. 2001. "Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*". **International Journal of Food Microbiology**. 68 (1-2): 141-148.

[14] Tajikarimi, M. M., Ibrahim, S. A. and Cliver, D. O. 2010. "Antimicrobial herb and spice compounds in food". **Food Control**. 21 (9): 1199-1218.

[15] Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Aparnathi, K. D. and Prajapati, J. B. 2016. "Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food". **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 5 (5): 885-901.