ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุ่อต่อเชื้อ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากอาหาร

Effect of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton.) Hassk Extracts on *Bacillus cereus* Isolated from Food

ซูฮัยลา ดอละ

Suhaila Dolah

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากอาหาร
ผู้เขียน นางสาวซูฮัยลา ดอละ
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton.) Hassk) ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* จำนวน 65 isolates ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร พบว่าเมื่อทดสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธี paper disk agar diffusion สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ทุก isolates ที่ทดสอบ โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (inhibition zones) อยู่ในช่วง 10.50–17.20 mm. ทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ได้ค่า MIC อยู่ในช่วง 16–64 µg/ml ค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 32 และ 64 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration, MBC) คืออยู่ในช่วง 32–256 µg/ml ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดโดยวิธี time-kill study ต่อเซลล์และเอนโดสปอร์ในระยะงอกของ *B. cereus* ทั้งในหลอดทดลองและประยุกต์ใช้ในอาหาร พบว่าในหลอดทดลองสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 4MIC และ 2MIC ซึ่งสามารถทำให้จำนวนเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกลดลงอย่างน้อย 3log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เวลา 6–24 ชั่วโมง และ 150-270 นาที ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบไม่มีผลต่อเอนโดสปอร์ สารสกัดหยาบมีความคงตัวในการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *B. cereus* ได้ที่ pH 4-9 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกของเชื้อ *B. cereus* ในข้าวต้มสำเร็จรูป และสเต็กปลาทูน่ากระป๋องพร้อมบริโภค ทั้งที่อุณหภูมิ 37ºC และ 6ºC พบว่าที่อุณหภูมิ 37ºC สารสกัดใบกระทุมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการอยู่รอดได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 6ºC โดยที่อุณหภูมิ 37ºC สารสกัดที่ความเข้มข้น 32MIC (1024 µg/ml) และ 16MIC (512 µg/ml) สามารถยับยั้งโดยทำให้จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกลดลงอย่างน้อย 2log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ 6ºC สารสกัดที่ความเข้มข้น 32MIC สามารถทำให้จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกลดลงอย่างน้อย 2log CFU/ml ที่เวลา 5–7 วัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบกระทุสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งยับยั้งและฆ่าเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกของเชื้อ *B. cereus* ได้ดี จึงสามารถนำมาพัฒนาเพื่อเป็นสารชีวภาพในการควบคุม *B. cereus* ในอาหารได้

Thesis Title	Effect of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton.) Hassk Extracts on *Bacillus cereus* Isolated from Food
Author	Miss Suhaila Dolah
Major Programme	Microbiology
Academic Year	2008

ABSTRACT

The antibacterial activity of the ethanolic extract of leaves from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk was investigated against 65 *Bacillus cereus* isolates from contaminated food. Preliminary screening of the activities of the extract was evaluated using paper disc agar diffusion method against both food isolates and reference strains. The result demonstrated that the extract exhibited antibacterial properties against all the tested organisms. The inhibition zones ranged from 10.50–17.20 mm. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the extract ranged from 16-64 µg/ml. The MIC_{50} and MIC_{90} values were 32 and 64 µg/ml, respectively and the minimum bactericidal concentrations (MBCs) of the extracts ranged from 32–256 µg/ml. The bactericidal activity of the extract on both vegetative cells and germinated endospores of *B. cereus* in nutrient broth were assessed at MIC, 2MIC, and 4MIC by counting viable cells after time intervals. At 2MIC and 4MIC, the extract killed germinated endospores and vegetative cells effectively by at least 3 logs within 150–270 min and 6–24 h., respectively while intact endospores are resistant. The extract exhibited excellent stability to pH 4–9 treatments. The effects of *R. tomentosa* extract on both precooked rice and canned tuna steak was better at 37ºC than at 6ºC. At 37ºC, treatment with the extract at 32MIC (1024 µg/ml) and 16MIC (512 µg/ml) could inhibit the growth and survival of *B. cereus* by at least 2 log CFU/ml within 12 h. While, at 6ºC the numbers of viable vegetative cells and germinated endospores of *B. cereus* after exposure to 32MIC of the extract were reduced by at least 2 logs CFU/ml within 5–7 days. Since the extract from *R. tomentosa* produced remarkable activity against both vegetative cells and germinated endospores, it could be applied as an alternative food additive.

.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำช่วยเหลือและให้กำลังใจในเรื่องการศึกษา ค้นคว้าวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี รศ.วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำเรื่องการศึกษา ค้นคว้าวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พจนีย์ ศรีมาโนชญ์ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำให้ความรู้ และคอยให้กำลังใจแก่ศิษย์คนนี้มาโดยตลอด ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือ และการอำนวยความสะดวกในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและคอยเป็นกำลังใจในการศึกษา ขอบคุณพี่และน้องร่วมรุ่น พี่และน้องในห้องปฏิบัติการทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และคำปรึกษาที่ดีตลอดมา

ซูฮัยลา ดอละ

สารบัญ

		หน้า
สารบัญ		(6)
รายการตาราง		(7)
รายการรูป		(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ		(10)
บทที่		
1. บทนำ		
	บทนำต้นเรื่อง	1
	ตรวจเอกสาร	4
	วัตถุประสงค์	21
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ		
	วัสดุ	22
	อุปกรณ์	23
	วิธีการ	25
3. ผลการทดลอง		32
4. วิจารณ์		56
5. สรุป		62
เอกสารอ้างอิง		63
ภาคผนวก ก		80
ภาคผนวก ข		83
ภาคผนวก ค		85
ประวัติผู้เขียน		89

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สรุปลักษณะการก่อโรคอาหารเป็นพิษของเชื้อ *B. cereus*	10
2. รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากอาหาร	33
3. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากใบกระทุ่มต่อเชื้อ *Bacillus cereus*	34
4. ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของยาปฏิชีวนะและสารสกัดหยาบจากใบกระทุ่มต่อเชื้อ *Bacillus cereus*	35
5. ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดบริสุทธิ์ Rhodomyrtone ต่อเชื้อ *Bacillus cereus*	36

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	วงจรชีวิตของแบคทีเรียที่สร้างเอ็นโดสปอร์	6
2.	ต้น ใบ และดอกกระทุ่ต้น ใบ และดอกกระทุ	16
3.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงใน NB	38
4.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงใน NB	39
5.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ	40
6.	ผลของการทดสอบสารสกัดจากใบกระทุ่และอุณหภูมิร่วมกันต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ในน้ำกลั่นไร้เชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 50°C 60°C 70°C 80°C และ 90°C	42
7.	ผลของการทดสอบสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ หลังจากผ่านอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาที	43
8.	ผลของการติดสีกรัมของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* หลังจากทดสอบที่อุณหภูมิ 80ºC เป็นเวลา 15 นาที	44
9.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ระดับ pH ต่าง ๆ	46
10.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในข้าวต้มพร้อมบริโภค ที่อุณหภูมิ 37°C	48
11.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในข้าวต้มพร้อมบริโภค ที่อุณหภูมิ 37°C	49
12.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในสเต็กปลาทูน่ากระป๋อง ที่อุณหภูมิ 37°C	50
13.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในสเต็กปลาทูน่ากระป๋อง ที่อุณหภูมิ 37°C	51
14.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในข้าวต้มพร้อมบริโภค ที่อุณหภูมิ 6°C	52
15.	ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในข้าวต้มพร้อมบริโภค ที่อุณหภูมิ 6°C	53

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

16. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการอยู่รอดของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในสเต็กปลาทูน่ากระป๋อง ที่อุณหภูมิ 6°C 54
17. ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในสเต็กปลาทูน่ากระป๋อง ที่อุณหภูมิ 6°C 55

ตัวย่อและสัญลักษณ์

cm	=	centimeter
CFU	=	colony forming unit
ºC	=	degree celcius
DMSO	=	dimethylsulfoxide
g	=	gram
h	=	hour
µg	=	microgram
µl	=	microliter
m	=	metre
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
NaCl	=	sodium chloride
%	=	percent

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

Bacillus cereus เป็นเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก มีรูปร่างแท่งตรง สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถเคลื่อนที่และสร้างเอนโดสปอร์ และเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มักตรวจพบในอาหาร แบคทีเรียชนิดนี้พบการปนเปื้อนในธรรมชาติทั่วไป เช่น ดิน แหล่งน้ำ อากาศ ฝุ่นละออง และพืช (Kotiranta *et al*., 2000; Schoeni and Wong, 2005) ทำให้เชื้อมีการปนเปื้อนในอาหารได้ง่าย มีรายงานพบการปนเปื้อนและก่อโรคอาหารเป็นพิษในข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าว ธัญพืช แป้งและผลิตภัณฑ์จากแป้ง พาสต้า ก๋วยเตี๋ยว (Rusul and Yaacob, 1995; Del Torre *et al*., 2001; Haque and Russell, 2005) พบการปนเปื้อนในพืชผัก ผักสดและผลิตภัณฑ์จากผัก (Carlin *et al*., 2000; Valero *et al*., 2002; Valero *et al*., 2007) เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Nel *et al*., 2004; Güven *et al*., 2006; Granum, 2007) นมและ ผลิตภัณฑ์จากนม (Reyes *et al*., 2007; Bartoszewicz *et al*., 2008; Zhou *et al*., 2008) *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคน ทั้งที่เกิดจากสารพิษ (toxin) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (intoxication) หรือเกิดจากเซลล์แบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายแล้วสร้างสารพิษขึ้นภายในร่างกาย (infection) (Paananen *et al*., 2002; Ehling-Schulz *et al*., 2004; Stenfors Arnesen *et al*., 2008) ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษแสดงอาการได้ 2 แบบ คือ แบบอาเจียน (emetic syndrome) และ แบบอุจจาระร่วง (diarrhoea syndrome) โดยที่อาการแบบอาเจียนเกิดจาก emetic toxin เป็นสารพิษชนิดทนความร้อน (heat stable toxin) ทำให้ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ภายในระยะเวลา 1-6 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ มักตรวจพบในอาหารพวกข้าว หรืออาหารพวกแป้ง ในขณะที่อาการแบบอุจจาระร่วงเกิดจาก diarrhoea toxin หรือ enterotoxin เป็นสารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อน (heat-labile toxin) ทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย ภายในระยะเวลา 8-16 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษหรือจากเซลล์แบคทีเรีย มักตรวจพบในอาหารพวกโปรตีน เนื้อสัตว์ ผัก ขนมหวาน ซุป นมและผลิตภัณฑ์จากนม (Granum, 2001; Todar, 2006)

ในกระบวนการผลิตอาหารในระดับอุตสาหกรรมได้มีการเติมสารเคมีสังเคราะห์ ฮอร์โมน และยาปฏิชีวนะ ต่าง ๆ ลงไปในอาหาร เพื่อกำจัด ควบคุม และลดการระบาดของแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหารตลอดจนเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อความต้องการและความปลอดภัยของผู้บริโภค ตลอดจนอาจเกิดอาการข้างเคียงจากการบริโภคอาหารได้ (Brewer and Prestat, 2002; Brewer and

Rojas, 2008) เช่นเดียวกันกับการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งในคนและในอาหารสัตว์นั้น พบว่าเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นทำให้สามารถเกิดการกระจายและถ่ายทอดการดื้อยาสู่มนุษย์ได้ง่าย (Schlegelova *et al*., 2003; Lateef *et al*., 2005) มีรายงานการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ พบว่า *B. cereus* ดื้อต่อยากลุ่ม β-lactam และ trimethoprim-sulphamethoxazole (De la rosa *et al*., 1993) ดื้อต่อยา bacitracin, erythromycin, penicillin และ streptomycin (Jensen *et al*., 2001) ดื้อต่อยา nisaplin ที่ 5000 IU คิดเป็น 60% (Banerjee and Sarkar, 2004) ดื้อต่อยา amoxicillin-clavulanic acid, cefotaxime, erythromycin, penicillin และ tetracycline (Turmbull *et al*., 2004) และดื้อต่อยา amoxicillin, ampicillin, ceftriaxone, penicillin และ oxacillin (Luna *et al*., 2007)

ปัจจุบันกระแสการบริโภคของโลกกำลังเปลี่ยนไปหาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและมีแนวโน้มการกลับมาให้ความสำคัญกับสารที่ได้จากธรรมชาติ ทั้งมีการต่อต้านการใช้สารสังเคราะห์ต่าง ๆ และยังมีรายงานความเป็นพิษและการแพ้สารต่าง ๆ ที่เติมลงไป (Burt 2004; Konning *et al*., 2004) มีรายงานการศึกษาสารต้านจุลินทรีย์ธรรมชาติจากพืชสมุนไพร พบว่า เป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีในการออกฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย มีรายงานการศึกษาจาก Alzoreky และ Nakahara (2003) พบว่า มีพืช 6 ชนิด จากพืชที่รับประทานได้ (edible plants) ทั้งหมด 26 ชนิด ที่พบในประเทศจีน ญี่ปุ่น ไทย และเยเมน ยับยั้งเชื้อ *B.cereus* คือ สะเดา (*Azadirachta indica*), อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia)*, ผักกาดส้ม (*Rumex nervosus*), อีหรุด (*Ruta graveolens*), *Thymus serpyllum* และขิง (*Zingiber officinale*) พบว่าพืชสมุนไพรดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *B.cereus* ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) อยู่ในช่วง 165-660 mg/l การศึกษาผลของสารสกัดจากเครื่องเทศ 2 ชนิดคือ Iranian sumac และ avishan-e shirazi (*Zataria multixora*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในประเทศอิหร่านที่ใช้เป็น natural food preservative โดยใช้ 80% แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดจาก sumac มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียกรัมลบ คือแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25-0.32% (w/v) (Nasar and Halkman 2004) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Fazali และคณะ (2006) สารสกัดด้วย 80% แอลกอฮอล์ จากเครื่องเทศ 2 ชนิด คือ sumac และ avishan-e shirazi ที่ใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติ พบว่า sumac มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีกว่า avishan-e shirazi ที่ค่า MIC 0.05% (w/v) และจากรายงานการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากอบเชยไทยต่อเชื้อ *B. cereus* พบว่า สารสกัดหยาบจากอบเชยไทยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B.cereus* ค่า MIC และ MBC 625 และ 2500 µg/ml ตามลำดับ (Shan *et al*., 2007) และพบว่าในปัจจุบันสารต้านจุลินทรีย์ธรรมชาตินี้เป็นสารที่นิยมและสามารถใช้เป็นสารกันเสีย สารปรุงแต่งชีวภาพ เพื่อทดแทนสารเคมี หรือยาปฏิชีวนะในอาหารได้ (Devlieghere *et al*., 2004)

เนื่องจากประเทศไทยมีการใช้พืชสมุนไพร (medicinal plant) มาตั้งแต่สมัยโบราณ เพื่อรักษาโรคติดเชื้อต่าง ๆ และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ซึ่งส่วนใหญ่จะอ้างอิงความรู้จากตำรายาแผนโบราณ และเป็นการนำสมุนไพรที่มีอยู่ทั่วไป ตลอดจนมีการสนับสนุนภูมิปัญญาไทยมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้น ทำให้มีนักวิทยาศาสตร์สนใจศึกษาพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อ นอกจากนี้พืชสมุนไพรมีราคาถูกกว่าสารเคมีสังเคราะห์ มีความปลอดภัยสูง และโอกาสที่เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อสมุนไพรมีน้อยมาก (Voravuthikunchai and Kitpipit, 2005)

ต้นกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa* Ait. Hassk) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae มีใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามรูปไข่ปลายมน มีดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อกระจุกซ้อนที่ง่ามใบหรือปลายกิ่ง และมีผลเป็นรูปกลมถึงเกือบกลม ผิวมีขนคล้ายกำมะหยี่หนาแน่น ผลอ่อนมีสีเขียวแล้วจะค่อย ๆ สุกกลายเป็นสีแดง จนสุกจัดกลายเป็นสีม่วงอมดำ เนื้อผลสีชมพูแดง ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดรูปไต สีน้ำตาลอ่อน ผลรับประทานได้ รสหวาน (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2548) พบได้ตามท้องถิ่นทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย (Winotai *et al.*, 2005) มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อจุลินทรีย์ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Escherichai coli* และ *Staphylococcus aureus* (Salni *et al.*, 2002; Saising *et al.*, 2008) และจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *Enterococcus faecalis, Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes, Streptococcus mutans* และ *S. aureus* (Voravuthikunchai *et al.*, 2007; Limsuwan and Voravuthikunchai, 2008) จึงน่าจะมีความเป็นได้ในการนำสมุนไพรดังกล่าว มาใช้ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหารทั้งในหลอดทดลอง และประยุกต์ใช้ในอาหาร ดังนั้นผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรดังกล่าว เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตยารักษาโรค ตลอดจนสามารถนำมาพัฒนาเพื่อเป็นสารชีวภาพในการควบคุม *B. cereus* ในอาหารได้

การตรวจเอกสาร

1. *Bacillus cereus*

B. cereus เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Family Bacillaceae ก่อให้เกิดโรคในคน โรคที่พบบ่อย ได้แก่ โรคอาหารเป็นพิษ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อที่ตา การติดเชื้อในกระแสเลือดและปอดอักเสบ แต่พบน้อยมาก (Claus and Berkeley, 1986; Drobniewski, 1993; Kotiranta *et al*., 2000)

1.1 ลักษณะทั่วไป

B. cereus เป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปแท่งตรง มีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 1.0 – 1.2 μm ความยาว 3.0 – 5.0 μm สร้างเอนโดสปอร์ ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา ไม่มีแคปซูล โคโลนีมีขนาดใหญ่ค่อนข้างแบน ผิวหยาบไม่สม่ำเสมอ สีเทา สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) และเจริญเติบโตที่อุณหภูมิในช่วง 4 – 50ºC และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ 25–37ºC มีรายงานการศึกษา พบว่า *B.cereus* บางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 4–5ºC ซึ่งมีผลทำให้อาหารเน่าเสียระหว่างการเก็บได้ เช่น ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์แช่เย็น (Choma *et al*., 2000; Lake and Hudson, 2004) pH อยู่ในช่วง 4.3–9.3 ค่า A_w ที่เหมาะสมกับการเติบโตคือ 0.99 เชื้อสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเลือด (blood agar) รอบ ๆ โคโลนีจะพบลักษณะเป็นวงใสแบบ β-hemolysis นอกจากนี้เชื้อ *B. cereus* สามารถใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตได้ เช่น น้ำตาล glucose, fructose, sucrose, maltose, mannose, lactose และ glycerol แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลและสร้างกรดจาก mannitol นอกจากนี้สามารถย่อยสลายแป้ง เคซีน และเจลาตีน การทดสอบผลทางชีวเคมีคือ catalase, citrate, nitrate reduction, tyrosine decomposition, lecithinase และ motility ให้ผลบวก (Claus and Berkeley, 1986)

1.2 เอนโดสปอร์ (endospore)

B. cereus เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) หรือสปอร์ (spore) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบภายในเซลล์แบคทีเรีย โดยจะสร้างเอนโดสปอร์ในระยะที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เช่น ภาวะขาดแคลนสารอาหารและน้ำ หรือสัมผัสกับปัจจัยทางกายภาพที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เช่น ความร้อน ความชื้น ความแห้ง รังสี และสารเคมี ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถปรับตัวเพื่อการอยู่รอดโดยการสร้างภายในเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ปฏิกิริยาชีวเคมี ให้มีความทนทานต่อปัจจัยทางกายภาพและสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้สูง และสามารถทนทานอยู่ในสภาพแวดล้อมได้เป็นเวลานานหลายปี โดยจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในบรรยากาศที่มีแก๊สออกซิเจนเท่านั้นหรือ

เรียกว่า aerobic endospore เอนโดสปอร์ของ *B. cereus* มีลักษณะรีเป็นรูปไข่ อยู่กลางเซลล์ และไม่บวม เซลล์เจริญ 1 เซลล์ จะสร้างเอนโดสปอร์ 1 สปอร์ การสร้างเอนโดสปอร์ไม่ใช่เพื่อการสืบพันธุ์ แต่เป็นช่วงระยะหนึ่งของการดำรงชีวิต (Prajapati and Cutting, 2002)

1.2.1 โครงสร้างของเอนโดสปอร์ประกอบด้วย

1.2.1.1. ชั้นในสุด sporebody หรือ core หรือ spore cytoplasm เป็นบริเวณที่มี cytoplasm, DNA, RNA และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ล้อมรอบด้วย membrane unit มีเอนไซม์จะแตกต่างไปจากเซลล์ปกติเนื่องจากมีขนาดเล็กกว่า เช่น alanine racemase ใช้ในการงอกของเอนโดสปอร์และ dipicolinic acid synthetase ทำหน้าที่สร้าง dipicolinic acid เป็นต้น ในแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์กลุ่มที่เจริญในที่มีออกซิเจนพบว่า cytoplasm และเอนไซม์ของระบบขนส่งอิเล็กตรอนจะลดลงมากกว่า 95% นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนและการสร้างพลังงานของเอนโดสปอร์อีกด้วย

1.2.1.2. spore wall เป็นส่วนที่จะเจริญไปเป็นผนังเซลล์ใหม่ของแบคทีเรีย โครงสร้างของผนังสปอร์เป็นพวก meurien เป็นส่วนใหญ่

1.2.1.3. spore cortex เป็นชั้นที่มีปริมาตรมากที่สุด เป็นครึ่งหนึ่งของเอ็นโดสปอร์ทั้งหมด มีความหนาและแข็งแรงมาก ประกอบด้วย peptidoglycan ชั้นนี้ถูกย่อยด้วย lysozyme ได้ (Setlow, 2003) การย้อมสีพิเศษจะเห็นชั้น cortex ประกอบด้วยชั้นบาง ๆ ที่มีอยู่ นอกจากนี้ประกอบด้วย Ca^{2+} ของกรด dipicolinic acid ปริมาณกรดนี้พบตั้งแต่ 3-15% ของน้ำหนักแห้งของสปอร์ สารนี้ช่วยให้เอนโดสปอร์ทนทานต่อความร้อนได้ดี

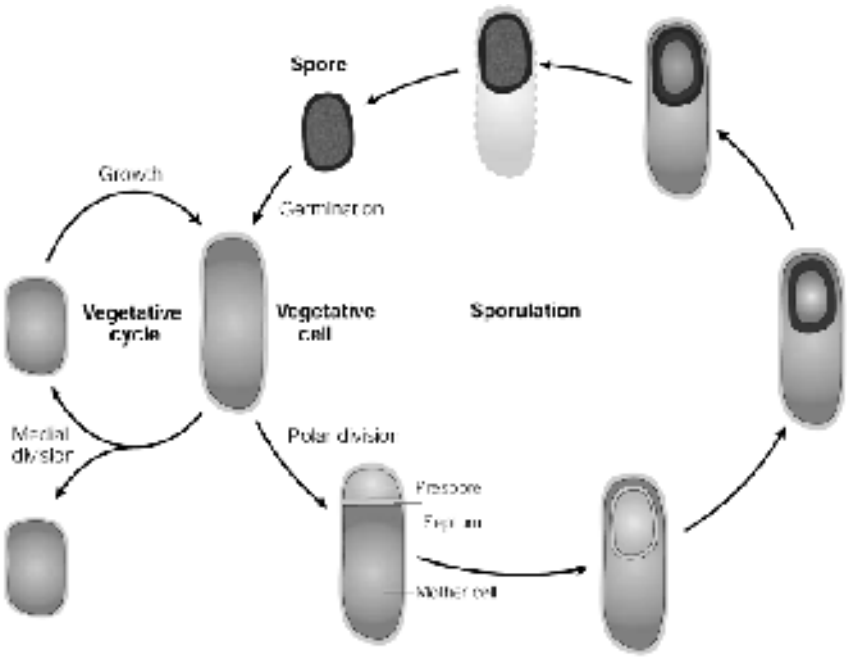
1.2.1.4. spore coat ประกอบด้วยโปรตีน 80-90% เป็นชั้นที่มีความหนาและเหนียว อาจมีชั้นเดียวหรือหลายชั้น มีลักษณะเรียบหรือเป็นร่องนูนขึ้นมา ชั้นนี้มีน้ำหนักประมาณ 30-60% ของน้ำหนักแห้งของเอนโดสปอร์ โปรตีนส่วนใหญ่เป็นพวก keratin และ phospholipoprotein ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญได้แก่ cystein และ hydrophobic amino acid เป็นจำนวนมาก จึงทำให้เอนโดสปอร์ทนต่อรังสี และการซึมผ่านของสารต่าง ๆ ได้ดี

1.2.1.5. exosporium เป็นชั้นนอกสุดของเอนโดสปอร์ มีลักษณะเมือก (slime) ที่ประกอบด้วย polysaccharide โปรตีน และ lipid เล็กน้อย สารเหล่านี้จะมายึดเกาะกันบาง ๆ หลวม ๆ จึงลอกหลุดง่าย

1.2.2 การสร้างเอนโดสปอร์

เอนโดสปอร์สร้างขึ้นในช่วง stationary phase คือ แทนที่เซลล์จะแบ่งตัวกลับสร้างเอนโดสปอร์ขึ้นภายในเซลล์แทน โดยเซลล์มีการจำลอง nucleic acid ได้ DNA 2 ส่วน cell membrane เว้าเข้าไปกลายเป็นผนังกั้นแยกออก 2 ส่วน ที่ประกอบด้วย cytoplasm และ DNA ส่วนหนึ่งใหญ่กว่า และอีกส่วนหนึ่งเล็กกว่า membrane ของส่วนที่ใหญ่กว่าจะเติบโตอย่างรวดเร็วและล้อมรอบส่วนที่เล็กกว่า ทำให้เซลล์ส่วนที่เล็กกว่าเข้าไปอยู่ในเซลล์ส่วนที่ใหญ่

กว่าโดยสมบูรณ์ โดยสร้าง membrane 2 ชั้น ล้อมรอบ cytoplasm เรียกส่วนนี้ว่า forespore หลังจากนั้นมีการสร้างผนังชั้น cortex ขึ้นมาหุ้มระหว่างเยื่อหุ้ม forespore ชั้นนอกและชั้นใน มีการสร้างผนังหุ้มเอนโดสปอร์ และมีการสร้างชั้น exosporium ล้อมรอบผนังเอนโดสปอร์ ขั้นตอนการสร้างเอนโดสปอร์ใช้เวลาประมาณ 6-8 ชั่วโมง เมื่อการสร้างเอนโดสปอร์เสร็จสมบูรณ์ เซลล์แม่จะสลายตัวและปล่อยเอนโดสปอร์ออกไปเป็นเอนโดสปอร์อิสระสู่ภายนอก (Prajapati and Cutting, 2002)



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของแบคทีเรียที่สร้างเอ็นโดสปอร์ (Errington, 2003)

1.2.3 การงอกของเอนโดสปอร์ (endospore germenation)

การงอกของเอนโดสปอร์เป็นการเปลี่ยนสภาพของเอนโดสปอร์จากระยะพัก (dormancy) ให้เป็นระยะที่แบ่งตัวกลายเป็นเซลล์ปกติ ประกอบด้วยกระบวนการต่าง ๆ คือ

1.2.3.1 activation เป็นระยะการกระตุ้น โดยเมื่อเอนโดสปอร์อยู่ในสภาพที่เหมาะสม ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยสารอาหาร ปัจจัยทางกายภาพเช่น ความร้อน หรือใช้สารเคมีกระตุ้นทำให้เอนโดสปอร์เริ่มขยายขนาด

1.2.3.2 germenation เป็นระยะการงอก การสร้างร่อง germmination groove ในชั้น spore coat ทำให้ที่ผิวชั้น coat ถูกทำลาย และเกิดการย่อยสลายด้วย lytic enzyme ที่อยู่บน peptidoglycan ของชั้น cortex ทำให้ผนังเอนโดสปอร์ยอมให้น้ำและสารอาหารซึมผ่านได้ และสูญเสียความต้านทานต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ไม่ทนความร้อน ย้อมติดสีธรรมดาได้ ไม่สะท้อน

แสงในขณะที่น้ำเข้าสู่เอ็นโดสปอร์ เอนโดสปอร์ มีการใช้ออกซิเจน เพิ่มขึ้น และเกิด oxidation ของ glucose เอนโดสปอร์พองออกและมีการขับสารทิ้งออกจากเซลล์ประมาณ 30% สารที่ขับออกมาเป็นพวก กรดอะมิโน Ca^{2+}-dipicolinate และ glycopeptide

1.2.3.3 outgrowth เป็นระยะช่วงการเจริญเติบโต เมื่อเอนโดสปอร์งอกออกมาแล้ว จะมีการเจริญต่อไปและต้องการอาหารที่สมบูรณ์สำหรับเจริญ โดยเอนโดสปอร์จะบวมออกจนเห็นได้และสร้างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ปกติ (vegetative cell) เซลล์ใหม่ที่สร้างขึ้นจะหลุดออกมาจาก spore coat และยืดยาวออก กระบวนการงอกเอนโดสปอร์เป็นเซลล์ปกติใช้เวลาประมาณ 1-90 นาที

1.2.3.4 growth เป็นระยะเจริญเติบโตกลายเป็นเซลล์ปกติ (Moir, 2003; Setlow, 2003)

1.3 แหล่งที่พบ

เนื่องจากเชื้อ *B. cereus* สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในทุกสภาวะ และสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ตามดิน แหล่งน้ำ อากาศ ฝุ่นละออง และพืช (Kotiranta *et al*., 2000; Schoeni and Wong, 2005) ตลอดจนสามารถกระจายปนเปื้อนในอาหารได้หลายประเภท เซลล์และเอ็นโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษและทำให้อาหารเน่าเสียได้ มีรายงานศึกษาพบการปนเปื้อนและก่อโรคอาหารเป็นพิษในข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าว ธัญพืช พาสต้า ก๋วยเตี๋ยว แป้งและผลิตภัณฑ์จากแป้ง (Rusul and Yaacob, 1995; Lake, 2004; Haque and Russell, 2005) รายการศึกษาการตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์จากแป้งคิดเป็น 30% (Del Torre *et al*., 2001) ในพืชผัก ผักสดและผลิตภัณฑ์จากผัก (Carlin *et al*., 2000) จากรายงานการศึกษาตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในผักสด ได้แก่ พริกสด แตงกวา มะเขือเทศ แครอท กระเทียม และหัวหอมใหญ่ ในผลิตภัณฑ์จากผักและอาหารที่มีผักเป็นส่วนประกอบ จำนวน 85 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบ 36 ตัวอย่าง ที่เป็นไปได้ (presumptive) ว่าเป็นเชื้อกลุ่ม *B. cereus* ซึ่งตรวจพบไม่เกิน 10^4 cfu/g และ เมื่อทดสอบยืนยัน พบว่าเป็นเชื้อ *B. cereus* คิดเป็น 88.9% (32/36) นอกจากนี้เชื้อสามารถสร้างสารพิษ diarrhoea enterotoxin คิดเป็น 71.9% (23/32) (Valero *et al*., 2002) ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* 1 ตัวอย่าง ในตัวอย่างผักสดและสลัดผักจากทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ปริมาณอย่างน้อยที่สุด $5x10^3$ cfu/g คิดเป็น 8.3% (1/12) (Valero *et al*., 2007) ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ปริมาณ $8.32x10^3$ cfu/g ในเนื้อสัตว์ (Nel *et al*., 2004) Güven และคณะ (2006) ได้ศึกษาตรวจหาการปนเปื้อน *B. cereus* ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ จำนวน 100 ตัวอย่าง พบว่า ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ปริมาณ log 0.69-4.80 cfu/g คิดเป็น 22.4% นอกจากนี้ตรวจพบการสร้างสารพิษ diarrhoea enterotoxin ในตัวอย่างเนื้อวัว เนื้อบด เนื้อ soudjouck และเนื้อ pastrami ตรวจพบในนมและผลิตภัณฑ์จากนม จากรายงานการศึกษาของ

Reyes และคณะ (2007) ได้ศึกษาตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในนมผงและผลิตภัณฑ์จากนมจำนวน 381 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* จำนวน 175 ตัวอย่าง คิดเป็น 45.9% (175/381) และคัดเลือกเพื่อตรวจหาสายพันธ์ที่สร้างสารพิษจำนวน 94 ตัวอย่าง ตรวจพบการสร้างสารพิษ diarrhoea enterotoxin และสามารถเจริญในอุณหภูมิต่ำกว่า 7ºC จำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 29.8% (28/94) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Bartoszewicz และคณะ (2008) ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในนมดิบ และนมพาสเจอร์ไรส์ จำนวน 44 ตัวอย่าง ในจำนวนทั้งหมด 680 ตัวอย่าง คิดเป็น 6.47% และรายงานการศึกษาของ Zhou และคณะ (2008) ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ ในช่วงใบไม้ผลิ (spring) และใบไม้ร่วง (autumn) จากจำนวนตัวอย่าง 54 ตัวอย่าง คิดเป็น 71.4% และ 33.33% ตามลำดับ นอกจากนี้สามารถปนเปื้อนใน ส่วนประกอบของอาหาร วัตถุดิบที่ใช้ประกอบอาหาร เครื่องเทศ และเครื่องปรุงแต่งรสต่างๆ (Kramer and Gilbert, 1989; Iurlina *et al.*, 2006)

1.4 ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรค

ปัจจัยที่ส่วนเกี่ยวข้องในการก่อโรคอาหารเป็นพิษ ของเชื้อ *B. cereus* คือ สารพิษซึ่งเชื้อสามารถปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular substance) มีดังนี้

1.4.1 enterotoxin เป็นสารพิษที่มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5.0 kDa ประกอบด้วยสารพิษ 3 ชนิด คือ haemolysin BL (Hbl), nonhaemolytic enterotoxin (Nhe) และ cytotoxin K (CytK) (Schoeni and Wong, 2005; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008) ถูกสร้างขึ้นขณะที่เชื้อเจริญในช่วงปลายของ exponential phase และสามารถสร้างสารพิษในอาหารและในลำไส้เล็กได้ สารพิษชนิดนี้ไม่ทนต่อกรด ความร้อน และไม่ทนต่อเอนไซม์ทริปซินที่ย่อยโปรตีนในลำไส้ สามารถทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 56ºC เป็นเวลา 5 นาที มีรายงานการศึกษาพบว่าสารพิษนี้ทำให้เกิดการสะสมของของเหลวในลำไส้กระต่าย (rabbit ileal loops) และทำให้มีการทำลายเยื่อเมือกในลำไส้อย่างรุนแรง การทำการทดลองที่ผิวหนังกระต่ายพบทำให้เนื้อเยื่อตาย (necrosis) และเมื่อฉีดสารพิษนี้เข้าทางหลอดเลือดดำของหนูจะทำให้หนูตาย (Granum, 2001; Todar, 2006)

1.4.2 emetic toxin หรือเรียกว่า cereulide เป็นสารพิษที่แบคทีเรียสร้างจาก non-ribosomal peptide synthetase (Horwood *et al.*, 2004) มีคุณสมบัติเป็น cyclic peptide (cyclic dodecadepsipeptide) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำประมาณ 1.2 kDa และมีโครงสร้างเป็น [D-O-Leu-D-Ala-D-O-Val-D-Val]$_3$ (Agata *et al.*, 1994; Ehling- Schulz *et al.*, 2004) สร้างขึ้นระหว่างการสร้างเอนโดสปอร์เมื่ออยู่ในอาหาร สารพิษชนิดนี้ทนต่อกรด ความร้อน และเอ็นไซม์ทริปซินที่ย่อยโปรตีนในลำไส้ สามารถทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ126ºC นาน 90 นาที นอกจากนี้สามารถทนในสภาวะที่อุณหภูมิ 4ºC นาน 2 เดือน (Agata, 2002; Todar, 2006) จากการศึกษาพบว่า กลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษชนิดนี้โดยยับยั้งขบวนการเมทาบอลิซึมของกรดไขมัน

ภายในไมโตคอนเดรีย (Mikkola *et al*., 1999; Taylor *et al*., 2005) และเมื่อทดสอบสารพิษ emetic ในเนื้อเยื่อ (tissue culture) โดยใช้เซลล์ Hep-2 พบว่าเกิดรูช่องโหว่ง (vacuolization) ในเนื้อเยื่อที่ทดสอบ (Finlay *et al*., 1999)

1.5 ลักษณะอาการที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ

1.5.1 อาการท้องเสีย (diarrhoea type syndromes) เป็นอาการของโรคที่เกิดจาก enterotoxin ทำให้เกิดปวดท้อง อุจจาระร่วงเป็นน้ำ และอาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนไข้เล็กน้อย หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเซลล์แบคทีเรียในปริมาณสูงแล้วสร้างสารพิษขึ้นมาในลำไส้ (infection) จะแสดงอาการภายในระยะเวลา 8-16 ชั่วโมง โดยทั่วไปอาการจะทรงอยู่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง แล้วจะทุเลาลง และมีรายงานการศึกษา พบว่า กลไกการออกฤทธิ์โดยกระตุ้น adenylate cyclase ทำให้มีการเพิ่มปริมาณของ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ทำให้เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารมีการหลั่งสารน้ำและเกลือแร่ออกสู่ทางเดินอาหาร ผู้ป่วยจึงมีอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำ (Beecher, 2002) ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาหารประเภทโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ไข่ ขนมหวาน ซุบ นมและผลิตภัณฑ์จากนม ผักสดและผลิตภัณฑ์จากผัก รายงานการศึกษาตรวจพบ enterotoxin ประเภท cytotoxin K ในผู้ป่วย 3 รายที่มีอาการอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตในประเทศฝรั่งเศส แต่ไม่พบ emetic toxin (Lund *et al*., 2000)

1.5.2 อาการอาเจียน (emetic type syndromes) เป็นอาการของโรคที่เกิดจากสารพิษชนิด emetic toxin ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน คลื่นเหียน วิงเวียน ครั่นเนื้อครั่นตัว ท้องเสียเล็กน้อย จะแสดงอาการภายในระยะเวลา 1-5 ชั่วโมง หลังจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (intoxication) ในอาหาร (Paananen *et al*., 2002; Ehling-Schulz *et al*., 2004) และหากได้รับสารพิษในปริมาณมาก ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้ เช่น เกิดภาวะตับวายอย่างรุนแรง (fulminant liver failure) ในวัยรุ่นชาวสวิตเซอร์แลนด์ และในเด็กชาวเบลเยียม (Mahler *et al*., 1997; Dierick *et al*., 2005) ทำให้เป็นอันตรายต่อไต (renal damage) (Taylor *et al*., 2005) และยับยั้งเซลล์เพชฌฆาต (natural killer cells) ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Paananen *et al*., 2002) ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาหารจำพวกแป้ง เช่น ข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าว ธัญพืช พาสต้า ก๋วยเตี๋ยว แป้งและผลิตภัณฑ์จากแป้ง (Agata *et al*., 2002; Shaheen *et al*., 2006) รายงานการศึกษาตรวจพบสารพิษ emetic ในข้าวต้มและผลิตภัณฑ์จากแป้งในปริมาณสูงกว่า ในไข่ เนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ นม และนมถั่วเหลือง (Agata *et al*., 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rajkovic และคณะ (2006) พบว่าเมื่อใช้เชื้อ *B. cereus* 2 สายพันธ์มาเพาะเลี้ยงในแป้งมันฝรั่ง

พาสต้า และข้าวต้ม ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 28ºC นาน 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อสูงถึง 10^8 CFU/g และตรวจพบสารพิษ emetic ในตัวอย่างอาหารทั้ง 3 ชนิด

1.6 ปริมาณเชื้อที่ก่อโรค (Infective doses)

ปริมาณเชื้อของเซลล์ปกติ (vegetative cell) ที่ก่อโรคทั้งอาการท้องเสียและอาเจียนในอาหาร คือ 10^3-10^{10} cfu/g (ml) (Notermans and Batt, 1998) แต่ปริมาณเชื้อที่พบบ่อยในอาหาร คือ 10^5-10^8 cfu/g (ml) และมีรายงานพบว่า ปริมาณเอนโดสปอร์ที่ต่ำกว่าปริมาณเซลล์ปกติสามารถก่อให้โรคแบบอาการท้องเสียได้ เนื่องจากเอนโดสปอร์สามารถรอดชีวิตและทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร (gastric acid) ได้ดี (Clavel *et al*., 2004)

ตารางที่ 1 สรุปลักษณะการก่อโรคอาหารเป็นพิษของเชื้อ *B. cereus*

ลักษณะ	โรคอาหารเป็นพิษแบบท้องเสีย	โรคอาหารเป็นพิษแบบอาเจียน
ประเภทสารพิษ	โปรตีน; enterotoxin:Hbl, Nhe และ CytK	cyclic peptide; emetic toxin (cereulide)
ตำแหน่งการสร้างสารพิษ	ในลำไส้เล็กของคนหรือ host	ปรากฏในอาหาร
ปริมาณเชื้อที่ก่อโรค	10^5-10^8CFU/g (ml)	10^5-10^8CFU/g (ml)
ระยะเวลาฟักตัว	8-16 ชั่วโมง	0.5-6 ชั่วโมง
ระยะเวลาแสดงอาการ	12-24 ชั่วโมง	6-24 ชั่วโมง
อาการ	ปวดเกร็งท้อง อุจจาระร่วงเป็นน้ำ	คลื่นไส้ อาเจียน คลื่นเหียนวิงเวียน ครั่นเนื้อครั่นตัว
อาหารที่เกี่ยวข้อง	อาหารประเภทโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ไข่ ขนมหวาน ซุบ นมและผลิตภัณฑ์จากนม ผักสดและผลิตภัณฑ์จากผัก	อาหารจำพวกแป้ง เช่น ข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าว ธัญพืช พาสต้า ก๋วยเตี๋ยว แป้งและผลิตภัณฑ์จากแป้ง

ที่มา: Granum, 2007

1.7 การระบาด

การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *B. cereus* พบได้ทั่วโลก (Clavel *et al*., 2007; Granum, 2007) และพบว่าจำนวนการระบาดจะเพิ่มขึ้นในแถบประเทศอุตสาหกรรม (Kotiranta *et al*., 2000) แต่อย่างไรก็ตามความรุนแรงของลักษณะอาการที่แสดงต่าง ๆ นั้น พบว่าแตกต่างกัน เช่น ลักษณะอาการแบบอาเจียนจะพบในประเทศอังกฤษ ออสเตรเลีย แคนาดา ฟินแลนด์ เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น (Shinakawa *et al*., 1995)

ในขณะที่ลักษณะอาการแบบอุจจาระร่วงพบมากในยุโรปทางเหนือและอเมริกาทางเหนือ ประเทศแคนาดา นอร์เวย์ บัลกาเรีย ฟินแลนด์ และฮังการี (Kotiranta *et al*., 2000) เมื่อ ค.ศ. 1973-1985 พบการระบาด 17.8 % ของแบคทีเรียทั้งหมดที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษที่ในประเทศฟินแลนด์ 11.5% ในเนเธอร์แลนด์ 0.8% ในสก็อตแลนด์ 0.7% ในอังกฤษและแคว้นเวลส์ 2.2% ในแคนาดา 0.7% ในญี่ปุ่น และ 15% ในฮังการี (Kramer and Gilbert, 1989) ในปี ค.ศ.1960-1992 พบการระบาดจากเชื้อ *B. cereus* 1-22% ในแถบประเทศยุโรป ญี่ปุ่น และอเมริกาทางตอนเหนือ (Beattie and Williams, 2000) ในปี ค.ศ.1993-1998 พบการระบาดจากเชื้อ *B. cereus* 12% ในประเทศเนเธอร์แลนด์(Schmidt, 2001) ส่วนในปี ค.ศ.1998-2000 มีรายงานการระบาด 7% ในเด็กของโรงเรียนในประเทศสหรัฐอเมริกาทางตอนเหนือ (Daniels *et al*., 2002) และมีรายงานในปีค.ศ. 2005 มีรายงานการระบาด 1.4% จากเชื้อ *Bacillus* sp. (ประกอบด้วย non-*cereus*) (EFSA, 2006)

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *B. cereus* แต่อย่างไรก็ตามก็เป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องมีการควบคุมเพื่อป้องกันการระบาดของเชื้อดังกล่าว

1.8 การดื้อยาปฏิชีวนะและการรักษา

เนื่องจากเชื้อ *B. cereus* สามารถสร้างเอ็นไซม์ β-lactamase ได้ ส่งผลทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม penicillin และ cephalosporins (Alfaro *et al*.,1996) นอกจากนี้เชื้อยังดื้อต่อยา trimetroprim ด้วย มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *B. cereus* จำนวน 54 สายพันธุ์ พบว่า *B. cereus* ทุกสายพันธุ์ ดื้อต่อยา penicillin, oxacillin และ cephalosporin (Weber *et al*., 1988) ดื้อต่อยากลุ่ม β-lactam และ trimethoprim-sulphamethoxazole (De la Rosa *et al*., 1993) ดื้อต่อยา bacitracin, erythromycin, penicillin และ streptomycin (Jensen *et al*., 2001) ดื้อต่อยา nisaplin ที่ความเข้มข้น 5000 IU คิดเป็น 60% (Banerjee and Sarkar, 2004) ดื้อต่อยา penicillin คิดเป็น 90% (Rosenquist *et al*., 2005) ดื้อต่อยา amoxicillin และ oxacillin (Güven *et al*., 2006) ดื้อต่อยา penicillin และ erythromycin (Citron and Applemen 2006) ดื้อต่อยา amoxicillin-clavulanic acid, cefotaxime, erythromycin, penicillin และ tetracycline คิดเป็น 60%, 71%, 1%, 99% และ 6% ตามลำดับ (Turmbull *et al*., 2004) และดื้อต่อยา amoxicillin, ampicillin, ceftriaxone, clarithomycin, erythromycin, penicillin, oxacillin และ trimethoprim-sulphamethoxazole (Luna *et al*., 2007)

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ได้ผล และเป็นตัวเลือกในการรักษาสำหรับ *B. cereus* (รวมถึง non-*cereus* ที่ก่อโรค) ได้แก่ ยากลุ่ม aminoglycosides, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, tetracycline และ vancomycin (Logan and Turnbull, 2003) มีรายงานการศึกษา

เกี่ยวกับความไวของยาปฏิชีวนะต่อ *B. cereus* จำนวน 54 สายพันธุ์ พบว่า *B. cereus* ทุกสายพันธุ์ไวต่อยา imipenem, vancomycin, chloramphenicol, gentamicin และ ciprofloxacin. (Weber *et al.*, 1988) และ ไวต่อยา vancomycin, clindamycin และ gentamicin ค่า MIC_{50} เท่ากับ 2.0 0.5 และ 2.0 µg/ml ตามลำดับ และค่า MIC_{90} เท่ากับ 2.0 1.0 และ 2.0 µg/ml ตามลำดับ (Gigantelli *et al.*, 1991) เช่นเดียวกันกับรายงานของ Turnbull *et al.*, (2004) พบว่า ยา gentamicin และ ciprofloxacin สามารถฆ่าเชื้อและมีความไวต่อเชื้อ *B. cereus* 100% ในขณะที่ยา vancomycin สามารถฆ่าเชื้อและมีความไวต่อเชื้อ *B. cereus* 99% Rosenquist และคณะ (2005) ได้ศึกษาความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *B. cereus* และ *B. thuringiensis* ที่แยกได้จากอาหารพร้อมบริโภคพบว่า ไวต่อยา chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, streptomycin, tetracycline, erythromycin และ vancomycin คิดเป็น 100% และในขณะเดียวกัน Güven และคณะ (2006) ศึกษาความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากเนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์พบว่า ส่วนใหญ่ไวต่อยา gentamicin และ vancomycin และจากการศึกษาความไวของยา daptomycin, ciprofloxacin, vancomycin และกลุ่มยาอื่น ๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ssp. พบว่า ยามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ที่ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.06-2, 0.06-4 และ 0.5-2 µg/ml ตามลำดับ ค่า MIC_{90} คือ 1.0, 0.25 และ 1.0 µg/ml ตามลำดับ และค่า MIC_{50} คือ 1.0, 0.125 และ 0.5 µg/ml ตามลำดับ (Citron และ Applemen 2006) เช่นเดียวกับ Luna และคณะ (2007) ได้ศึกษาเกี่ยวกับความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *Bacillus* ssp. ที่ก่อโรคได้แก่ *B. cereus, B. anthracis, B. mycoides, B. pseudomycoides* และ *B. thuringiensis* พบว่า ไวต่อยา chloramphenicol, ciprofloxacin, gatifloxacin, gentamicin, levofloxacin, linezolid, moxifloxacin, rifampicin, streptomycin, tetracycline, tigecycline และ vancomycin

2. การศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรต่อแบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่รับประทานได้ (edible plants) จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ savory, laurel, oregano, basil, cumin, fennel, myrtle, pickling herb และ mint ต่อเชื้อ *B. cereus* พบว่า มีพืชสมุนไพรจำนวน 4 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* คือ savory และ laurel ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 15% v/v sea fennel ที่ความเข้มข้น 10 และ 15% v/v และ cumin ที่ความเข้มข้น 15% (Özcan and Erkmen, 2001) การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารในกลุ่ม triterpenoids จากสารสกัดด้วย ethyl acetate ของ *Nympoides cristatum* พบว่าสารในกลุ่ม triterpenoids มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus, B. subtilis*, *E. coli* และ *Shigella sonnei* ที่ค่า MIC เท่ากับ 64, 128, 64 และ 32 µg/ml ตามลำดับ (Rahaman *et al.*, 2002) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ของสารสกัดด้วย 80% แอลกอฮอล์ และ อะซิโตน จากพืชที่รับประทานได้ (edible plants) ทั้งหมด 26 ชนิด จากประเทศจีน ญี่ปุ่น ไทย และเยเมน ต่อเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *B.cereus*, *S.aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* และ *Salmonella infantis* พบว่า มีพืช 6 ชนิด ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B.cereus* คือ สะเดา (*Azadirachta indica*), อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia)*, ผักกาดส้ม (*Rumex nervosus*), อีหรุด (*Ruta graveolens*), *Thymus serpyllum* และขิง (*Zingiber officinale*) ที่ค่า MIC อยู่ในช่วง 165-660 mg/l (Alzoreky and Nakahara, 2003) การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเมทานอลของพืชสมุนไพรในประเทศอิหร่าน 180 ชนิด ต่อเชื้อ *P. aeruginosa, P. fluorescens, B. subtilis*, *B. cereus* และ *B. pumilis* พบว่าเมื่อทดสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion ที่ความเข้มข้น 20 mg/ml มีพืชสมุนไพร 78 ชนิด ที่แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *B. subtilis, B. pumilis, P. fluorescens และ P. aeruginosa* คิดเป็น 88.4%, 39.7%, 37.1%, 37.1% และ 10.2% ตามลำดับ ซึ่งพืชที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าวเป็นพืชที่จัดอยู่ในกลุ่ม Apiaceae จำนวน 9 ชนิดและกลุ่ม Compositae จำนวน 8 ชนิด, และ Labiatae จำนวน 7 ชนิด *Myrtus communis* มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus* sp ที่ค่า MIC เท่ากับ 1.87 mg/ml ส่วน *Dianthus caryophyllus* และ *Terminalia chebula* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *P. fluorescens, P. aeruginosa* ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.46 และ 1.87 mg/ml ตามลำดับ (Shahidi bonjar *et al.*, 2003) Nasar-Abbas และ Halkman (2004) ได้ศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำจากพืชสมุนไพร iranian sumac (*Rhus coriaria L.*) ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหารบางชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกรัมบวก 6 ชนิด คือ *B. cereus, B. megaterium, B. subtilis, B. thuringiensis, L. monocytogenes* และ *S. aureus* สำหรับแบคทีเรียกรัมลบ 6 ชนิด คือ *S. enteritidis*, *C. freundii, E. coli* Type I, *E.coli* O157:H7*, P. vulgaris* และ *Hafnia alvei* พบว่า สารสกัด iranian sumac มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกรัมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียกรัมลบ คือในกลุ่ม *Bacillus* sp.*, S. aureus* และ *L. monocytogenes* เมื่อบ่มไว้ที่ 24 ชั่วโมง ค่า MIC อยู่ในช่วง

0.25-0.32 %, 0.49 % และ 0.67 % ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียกรัมลบเมื่อบ่มไว้ที่ 3 วัน *S. enteritidis*, *C. freundii*, *E. coli* Type I, *E.coli* O157:H7, *P. vulgaris* และ *Hafnia alvei* ที่ค่า MIC คือ 0.67 %, 0.42 %, 0.63 %, 0.60 %, 0.55 % และ 0.45 % (w/v) ตามลำดับ การศึกษาผลของ natural food preservative 2 ชนิด คือ thymol และ cymene ซึ่งแยกสารประกอบได้จากพืชกลุ่ม *Origanum* และ*Thymus* ในการต้านเชื้อ *B. cereus* ที่ความเข้มข้น 0.2-1.0 mmol/l และ 0.2-2.0 mmol/l ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด พบว่าสามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* ในระยะ exponential phase ได้ เมื่อใช้สารทดสอบร่วมกันทั้งสองชนิด (combination) พบว่าสามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* ได้ดีมากกว่ายิ่งขึ้น (Degaldo *et al.*, 2004) นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบ Eucalyptus 26 species และ flavonoid จาก *Eucalyptus maculate* พบว่า สารสกัดจาก *E. globulus*, *E. maculata* และ *E. viminalis* สามารถยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวกได้ 6 ชนิด คือ *S. aureus*, MRSA, *B.cereus*, *E. faecalis*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* และ *Propionibacterium acnes* และเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* โดยที่ค่า MIC อยู่ในช่วง 3.9-6.3 mg/l แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรัมลบ คือ *E. coli* และ *P. putida* นอกจากนี้ 2′,6′-dihydroxy-3′-methyl-4′-methoxy-dihydrochalcone, eucalyptin และ 8-desmethyl-eucalyptin ซึ่งแยกจากสารสกัดของ *E. maculata* สามารถยับยั้งเชื้อได้ 7 ชนิดโดยค่า MIC อยู่ในช่วง 1-31 mg/l (Takahashi *et al.*, 2004) Drewes และคณะ (2006) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในแถบแอฟริกาใต้จากใบด้วย hexane ของ *Helichrysum tenax* (Asteraceae) ที่เป็น monomeric และ dimeric diterpenes พบว่า แยกได้สารประกอบ monomeric จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ สาร *ent*-beyer-15-en-19-ol, 4-epimer *ent*-beyer-15-en-18-ol และ 5β, 16β-epoxide-*ent*-beyeran-19-ol และแยกได้สารประกอบ dimeric diterpenes ได้แก่ malonic acid ซึ่ง *ent*-beyer-15-en-19-ol สามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *Staphylococcus epidermidis* ได้ที่ความเข้มข้น 3.1 และ 3.6 µg/l ตามลำดับ การศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศโคลัมเบียจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Bidens pilosa*, *Bixa orellana* , *Cecropia peltata*, *Cinchona officinalis*, *Gliricidia sepium*, *Jacaranda mimosifolia*, *Justicia secunda*, *Piper pulchrum*, *P. paniculata* และ *Spilanthes americana* ต่อเชื้อ *B. cereus* พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของ *B. pilosa*, *B. orellana*, *J. mimosifolia* และ *P. pulchrum* มีฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ ค่า MIC ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิดต่อ *B. cereus* เท่ากับ 0.2 µg/ml (Rojas *et al.*, 2006) การศึกษาผลของสารสกัดจากเครื่องเทศ 2 ชนิดคือ iranian sumac และ avishan-e shirazi (*Zataria multixora*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในประเทศอิหร่านที่ใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติ (natural food preservative) โดยสกัดด้วย 80% แอลกอฮอล์ นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร คือ *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. vulgaris* และ *S. xexneri* โดยใช้วิธี disc

diffusion และ well diffusion พบว่า Iranian sumac สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่า avishan-e shirazi (*Zataria multixora*) และค่า MIC ต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* คือ 0.05 % และ 0.10 % ตามลำดับ ในขณะที่ Iranian sumac และ avishan-e shirazi สามารถยับยั้งแบคทีเรียกรัมลบ อยู่ในช่วง 0.1-2% และ 0.4-0.8 % (w/v) ตามลำดับ (Fazeli *et al*., 2007) จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากน้ำมันหอมระเหยของ *Tarchonanthus camphorates* ต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคกรัมบวก ได้แก่ *S. aureus* และ *Bacillus* spp. และแกรมลบ ได้แก่ *E. coli, Salmonella typhi, K. pneumoniae, Proteus mirabilis* และ *P. aeruginosa* โดยวิธี disc diffusion พบว่าให้ค่า inhibition zone ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *Bacillus* ssp. เท่ากับ 26.5 และ 21.0 mm. ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *E. coli, S. typhi, K. pneumoniae* และ *Pr. mirabilis* ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 26.5, 11.5, 13.0 และ 13.0 mm. ตามลำดับ แต่ไม่ให้ค่า inhibition zone ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* (Matasyoh *et al*., 2007) จากรายงานการศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย และสารประกอบหลักที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของอบเชยไทย (*Cinnamomum burmannii* Blume.) ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคระบบทางเดินอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, และ *S. anatum* และเมื่อนำมาวิเคราะห์สารประกอบหลักในสารสกัดชนิดนี้ พบว่าสารส่วนใหญ่เป็นน้ำมันหอมระเหย ((E)-cinnamaldehyde) และสารประกอบกลุ่มโพลีฟินอลหลายชนิด (proanthocyanidins, (epi) catechins) สารสกัดหยาบและสารประกอบหลักเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดได้ และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแบคทีเรียอย่างชัดเจนหลังทดสอบด้วยสารสกัดหยาบและสารประกอบหลักของอบเชยไทย (Shan *et al*., 2007) การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารในกลุ่ม triterpenoids จาก *Vladimiria muliensis* พบว่าสารในกลุ่ม triterpenoids สามารถยับยั้ง *B. cereus*, *E. faecalis, S. aureus, E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C.albicans* ได้ (Chen *et al*., 2008) นอกจากนี้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารประกอบกลุ่ม polyphenols จากผลมะกอก และองุ่น พบว่าสารประกอบกลุ่ม polyphenols สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *B. cereus, E. faecalis, S. aureus, E. coli*, *S. poona*, และยีสต์ (*S. cerevisiae* และ *C.albicans*) ได้ (Serra *et al*., 2008)

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ใบกระทุมาศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหาร เนื่องจากมีการศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรดังกล่าวเบื้องต้น พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากใบกระทุมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ (Voravuthikunchai *et al*., 2007) นอกจากนี้ใบกระทุสามารถหาได้ง่ายตามท้องถิ่นในแถบภาคใต้ของประเทศไทย

3.กระทุ

กระทุเป็นไม้ท้องถิ่นทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งพบได้บ่อยบนดินทราย บริเวณชายฝั่งทะเลทั้งสองด้านทางใต้ของไทย และจังหวัดตราดในภาคตะวันออก ความเป็นกรดด่างของดินอยู่ระหว่าง 4.0-10.0 ซึ่งเฉลี่ยคือ 5.8 (Winotai *et al.*, 2005) กระทุสามารถทนความเค็มและเกร็ดน้ำแข็ง (frost) ได้ สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง -7ºC และยังสามารถปรับตัวกับไฟป่า อีกทั้งเจริญเติบโตได้ดีหลังจากเกิดไฟไหม้ป่า

3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ **:**

รูปที่ 2 ต้น ใบ และดอกกระทุ

ชื่อวิทยาศาสตร์	:	*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk
วงศ์	:	Myrtaceae
ชื่อสามัญ (ไทย)	:	กระทุ ทุ พรวด
ชื่อสามัญ (อังกฤษ)	:	downy myrtle, downy rose myrtle, rose myrtle
ชื่ออื่น	:	กาทุ ง้าย ชวด ปุ้ย

ต้นกระทุ เป็นไม้พุ่มเขียวชะอุ่มทั้งปี ความสูงประมาณ 2-3 m

ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามรูปไข่ปลายมน (elliptic-oval) ยาวประมาณ 5-8 cm กว้างประมาณ 1.5-4 cm หน้าใบเป็นมันสีเขียวเข้ม ส่วนหลังใบสีนวลมีขนละเอียดปกคลุม

โดยมีเส้นใบนูนสามเส้น ประกอบด้วยเส้นกลางใบ 1 เส้น และเส้นขอบใบ 2 เส้น ก้านใบยาวประมาณ 5 mm เป็นเหลี่ยมมีขน

ดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อกระจุกซ้อนที่ง่ามใบหรือปลายกิ่ง ฐานรองดอกรูปถ้วย โคนกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย ปลายแยก 5 แฉก ผิวมีขนนุ่มหนาแน่น กลีบดอก 5 กลีบ รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาด 1.5-2 cm สีชมพู ด้านนอกมีขนสีขาว สีของดอกกระทุเป็นสีชมพูกุหลาบ กลีบดอกชั้นเดียว มีสีชมพูอ่อนถึงแก่ในช่อเดียวกัน ขนาดดอกกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 cm

ผล รูปกลมถึงเกือบกลม ขนาด 9-10 mm ผิวมีขนคล้ายกำมะหยี่หนาแน่น ผลอ่อน มีสีเขียวแล้วจะค่อยๆสุกกลายเป็นสีแดง จนสุกจัดกลายเป็นสีม่วงอมดำ เนื้อผลสีชมพูแดง ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดรูปไต สีน้ำตาลอ่อน ผลรับประทานได้ รสหวาน (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2548)

การปลูก ขณะนี้ยังไม่มีการปลูกกระทุเพื่อประโยชน์ทางการค้า มีเพียงการปลูกกระทุไว้เพื่อเป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์และตกแต่งสถานที่ ในมลรัฐฮาวายและฟลอริดาของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศมาเลเซียกระทุถือว่าเป็นวัชพืชหลักหรือร้ายแรง (principal or noxious weed) มีรายงานการสำรวจเบื้องต้นเกี่ยวกับสัตว์กินพืชต่อพืชชนิดนี้ตั้งแต่เดือนเมษายน 2001 ถึงเดือนพฤษภาคม 2002 เพื่อที่จะรวบรวมข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับการกระจาย, ลักษณะทางชีววิทยา และ การใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (Winotai *et al*., 2005)

มีการศึกษาและแยกสารประกอบต่างๆ ที่สกัดได้จากกระทุ พบว่าเป็นสารกลุ่ม triterpenoids และ steroids ได้แก่ lupeol, β-amyrin, β-amyrenonol, betulin, friedelin, alpha-amyrin และ taraxerol (Hui *et al*., 1975) จากนั้นมีการพบสาร triterpenoids สารใหม่ 2 สาร hopenediol และ oleananolides (Hui and Li, 1976) นอกจากนี้สามารถแยกได้สาร tomentosin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม tannins (Liu *et al*., 1997) มีการศึกษาและสามารถ แยกได้สารในกลุ่ม tannins จากใบและรากได้ 4 สาร คือ pedunculangin, casuariin, castalagin และ tomentosin (Liu *et al*., 1998) และมีรายงานว่าสามารถแยกได้สาร flavone glycosides และ ellagitannin จากใบ (Hou *et al*., 1999) สารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตจากใบกระทุสามารถแยกได้สาร rhodomyrtone ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม acylphloroglucinols (Salni *et al*., 2002) การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อจุลินทรีย์ พบว่าสาร rhodomyrtone มีฤทธิ์ในการต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ (Salni *et al*., 2002; Saising *et al*. 2008) และการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้ง *B. cereus*, *E. feacalis*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. mutans* และ *S. pyogenes* ได้ (Voravuthikunchai *et al*., 2007)

4. กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรีย

จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรีย มีรายงานการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ ต่อเซลล์ของแบคทีเรียแตกต่างกัน พบว่าสารต้านจุลินทรีย์ไปจับที่ผิวของเซลล์และสารต้านจุลินทรีย์สามารถซึมผ่านไปยังตำแหน่งสำคัญของเซลล์ เช่น ทำให้สารต้านจุลินทรีย์ไปรบกวนชั้น phospholipid bilayer ของ cell membrane สูญเสียส่วนประกอบที่อยู่ในเซลล์ ทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานและการสังเคราะห์ส่วนประกอบโครงสร้างเซลล์ ยับยั้งสารพันธุกรรมที่อยู่ในเซลล์ได้ (Kim *et al*., 1995; Nychas, 1995) และมีรายงานการศึกษาพบว่าสารต้านจุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียกรัมลบ (Lambert *et al*., 2001; Cimanga *et al*., 2002; Delaquis et al., 2002;Harpaz *et al*., 2003; Ceylan and Fung, 2004) เนื่องจากโครงสร้างแบคทีเรียกรัมบวกมีชั้น cell wall มีโปรตีนและไขมันในปริมาณน้อย ทำให้สารต้านจุลินทรีย์สามารถทำลายชั้น cell wall และ cytoplasmic membrane ได้ง่าย ทำให้ cytoplasm รั่วและเกิดการจับรวมกลุ่ม (coagulation) ได้ง่าย (Kalemba and Kunicka, 2003) ในขณะที่ cell wall ของแบคทีเรียกรัมลบประกอบด้วยชั้น outer membrane ที่ซับซ้อนและมีปริมาณโปรตีนและไขมันมากกว่าในแบคทีเรียกรัมบวกส่งผลให้ทนต่อสารต้านจุลินทรีย์ได้ดี มีการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสาร carvacrol และ thymol ต่อแบคทีเรียกรัมลบพบว่าสารดังกล่าวสามารถทำให้ชั้น outer membrane เกิดการแตกสลาย ทำให้มีการปลดปล่อย lipopolysaccharides และเพิ่มการซึมผ่านไปยังชั้น cytoplasmic membrane ได้ (Helander *et al*., 1998) และสำหรับกลไกในการออกฤทธิ์ของสาร carvacrol ต่อ *B. cereus* พบว่าสาร carvacrol ไปทำปฏิกิริยากับชั้น cell membrane โดยไปละลาย phospholipid bilayer ซึ่งผลักดันให้สาย fatty acid แยกออกและทำให้ ion ที่อยู่ใน cytoplasm รั่วไหลออก และยับยั้งการเจริญเติบโตในที่สุด (Ultee *et al*., 2000) การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบ cinnamon aldehyde จากน้ำมันหอมระเหยอบเชยต่อ *B. cereus* พบว่า cytoplasmic membrane ของเซลล์ไม่เกิดการแตกร้าวหลังจากทดสอบด้วย cinnamon aldehyde แต่ทำให้เซลล์เกิดการแยกตัวกัน (cell separation) อย่างชัดเจน (Kwon *et al*.,2003) มีรายงานการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ต่อการงอกเอนโดสปอร์ หลังจากทดสอบกับสารต้านจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 6 ชั่วโมง พบว่า ชั้น spore coat และ exosporium มัวหมอง ขอบเขตไม่ชัดเจน มีรอยแตก ผิวหยาบ สารเหลวในเอนโดสปอร์รั่วออกและหยุดทำงาน ทำให้สารต้านจุลินทรีย์สามารถเข้าไปทำลายได้ (Huang *et al*., 2007)

5. การประยุกต์ใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร

จากการศึกษาการประยุกต์ใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหารโดยวิธีทั้งการเจือจางอาหารหรือผสมในอาหาร (Pol *et al*., 2001; Smith-Palmer *et al*., 2001) มีรายงานการศึกษาพบว่าเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านของสารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร ส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้ระดับความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารสูงถึงประมาณ 2-100 เท่าเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ใช้ในหลอดทดลอง (Glass and Johnson 2004) Ultee และ Smid (2001) พบว่าสาร carvacrol จาก oreganum และ thyme ที่ความเข้มข้น 0.06 mg/ml สามารถยับยั้งการรอดชีวิต และการสร้างสารพิษของเซลล์ *B. cereus* ในหลอดทดลองได้ แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งการรอดชีวิดและการสร้างสารพิษในซุบ โดยที่ความเข้มข้นของสาร carvacrol ในซุบมากกว่าในหลอดทดลองถึง 50 เท่า Hernández-Herrero และคณะ (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย และสารประกอบจากอบเชย cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 2 และ 5 µl/100 ml ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *B. cereus* ในน้ำแครอทหลังจาก 60 วัน ที่อุณหภูมิ 12ºC ได้ การศึกษาผลของสารต้านจุลินทรีย์ของกานพลู อบเชย ไทม์ และอบเชยเดือน ต่อเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. enteritidis* ในเนยแข็ง โดยทดสอบในเนยแข็งที่มีปริมาณไขมัน 16% และ 30% พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ซึ่งที่ระดับความเข้มข้น 1% ของสารดังกล่าวสามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงถึงน้อยกว่า 1 log CFU/ml ตั้งแต่วันที่ 3 และพบว่าเนยแข็งที่มีปริมาณไขมันต่ำ (16%) สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญได้เร็วกว่าในเนยแข็งที่มีปริมาณไขมันสูง (30%) แต่ในขณะที่เมื่อทดสอบต่อเชื้อ *S. enteritidis* พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1% ของสารสกัดดังกล่าวสามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงถึงน้อยกว่า 1 log cfu/ml ได้ในเนยแข็งทั้งที่มีปริมาณไขมันต่ำและสูง (Smith-Palmer *et al*., 2001) การศึกษาผลของสารประกอบ Allyl isothiocyanate (AIT) จากน้ำมัน mustard และ horseradish ต่อเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อบด พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 300 ppm สามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลง 3 log CFU/g ที่อุณหภูมิ 4ºC ตั้งแต่วันที่ 15 และ 4.7 log cfu/g นาน 23 วัน (Muthukumarasamy *et al*., 2003) Fisher และ Phillips (2006) ศึกษาผลของสารประกอบ citral และ linalool จากมะนาว ส้ม และมะกรูดฝรั่งต่อเชื้อ *B. cereus* นำมาทดสอบโดยใช้เป็นน้ำยาล้างผักกะหล่ำปลีแบบพ่นไอน้ำพบว่า citral, linalool และมะกรูดฝรั่งสามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลง 6 log CFU/ml ที่เวลา 8-10 ชั่วโมง สำหรับปัจจัยที่ผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อประยุกต์ใช้ในอาหาร ได้แก่ ปริมาณน้ำในอาหาร ประเภทและส่วนประกอบของอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน pH ของอาหาร ความเค็มของอาหาร และอุณหภูมิ (Burt 2004; Devlieghere *et al*., 2004; Holley and Patel 2005; Ahn *et al*., 2007; Gutierrez *et al*., 2008) ปริมาณน้ำที่น้อย

กว่าของอาหารเมื่อเทียบกับอาหารที่ใช้ในหลอดทดลอง สามารถทำให้ประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ลดลงในการออกฤทธิ์ไปยังอวัยวะเป้าหมายของเซลล์แบคทีเรีย (Smith-Palmer *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Gill และคณะ (2002) พบว่า โดยส่วนใหญ่อาหารที่มีส่วนประกอบของไขมัน และโปรตีนในปริมาณสูง ๆ สามารถปกป้องเซลล์และลดการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ได้ มีรายงานการศึกษา ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารประกอบกลุ่ม polyphenols จาก carvacrol ต่อเชื้อ *B. cereus* ในนม พบว่าโปรตีนในนมมีผลต่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ลดลง (Pol *et al*. 2001) และนอกจากนี้การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารประเภทไขมันจะออกฤทธิ์ได้น้อยกว่าในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำ เนื่องจากไขมันสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ได้ดีกว่าน้ำ (Mejlholm and Dalgaard, 2002) แต่ในขณะที่ในอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารต้านจุลินทรีย์เมื่อเทียบกับอาหารประเภทโปรตีนและไขมัน ซึ่งมีรายงานการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเสจสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *S. aureus*, *S.* typhmurium และ *Pseudomonas* spp. ในข้าวได้ดีกว่าในไก่และในอาหารประเภทเนื้อ (Shelef *et al*., 1984) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษา พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *B. cereus* ในข้าวหุงสุกได้ทั้งที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4ºC หลังจากเก็บไว้ 5 และ 15 วัน ตามลำดับ (Jaisai and Lamlertthon, 2007) Gill และคณะ (2002) และ Fisher และ Phillips (2006) รายงานว่าส่วนประกอบของสารอาหารในอาหารสามารถซ่อมแซมเซลล์ที่เป็นอันตรายได้เร็วและดีกว่าในหลอดทดลอง ไม่เพียงแต่ปัจจัยภายในส่วนประกอบของลักษณะอาหารที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจัยภายนอกของอาหารก็มีผลต่อการออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกัน เช่น อุณหภูมิ ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย และการบรรจุผลิตภัณฑ์ เป็นต้น (Burt, 2004)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหาร โดยวิธี disc diffusion
2. เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์จากใบกระทุที่สามารถยับยั้งหรือฆ่าการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหาร
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเซลล์และเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหาร ทั้งในหลอดทดลองและประยุกต์ในอาหาร โดยวิธี time- kill study
4. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสในอาหาร

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* จำนวน 65 isolate ที่แยกได้จากอาหาร ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

1.2 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบ ได้แก่ *B.cereus* ATCC 11778 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ยาต้านจุลินทรีย์

2.1 แผ่นยามาตรฐาน (Oxoid)

2.1.1 Ampicillin	10 µg
2.1.2 Chloramphenicol	10 µg
2.1.3 Clindamycin	2 µg
2.1.4 Ciprofloxacin	30 µg
2.1.5 Erythromycin	15 µg
2.1.6 Gentamicin	10 µg
2.1.7 Penicillin	10 units
2.1.8 Oxacillin	10 µg
2.1.9 Tetracycline	30 µg
2.1.10 Vancomycin	30 µg

2.2 ยาปฏิชีวนะ

2.2.1 Chloramphenicol

2.2.2 Gentamicin

3. ใบกระทุ

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 Brain Heart Infusion broth (BHI) (Difco)

4.2 Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar (merck)

4.3 Motility medium (Difco)

4.4 Mueller-Hinton Agar (MHA) (Difco)

4.5 Mueller-Hinton Broth (MHB) (Difco)

4.6 Nitrate broth (Difco)

4.7 Nutrient Agar (NA) (Difco)

4.8 Nutrient broth (NB) (Difco)

4.9 Trypticase soy- blood agar (Difco)

4.10 Voges-Proskauer medium (Difco)

5. สารเคมี

5.1 Acetic acid

5.2 Barium sulfate McFarland No. 0.5

5.3 Dimethylsulfoxide (Sigma)

5.4 Ethanol (Lab Scan)

5.5 Gram Stain

5.6 Hydrochloric acid

5.7 Hydrogenperoxide

5.8 ∝-Naphthol

5.9 Potassium hydroxide

5.10 Spore Stain

5.11 Sodium chloride (Merck)

5.12 Sodium Hydroxide

5.13 Sulfanilic acid

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Autoclave (Tomy, ES 315)
2. Balance (Sartorius, BP 210S)

3. Beaker (Pyrex)
4. Centrifuge (Harrier)
5. Colony counter
6. Cotton swab
7. Duran bottle (Duran)
8. Eppendorf tube
9. Filter paper disc ขนาด 6 mm (Whatman)
10. Flask
11. Forcep
12. Freeze-dryer
13. Hot air oven (Binder, T410340)
14. Hot plate stirrer (Lab. Companion, HP 3000)
15. Incubators (Heraeus, B 5100E
16. Laminar air flow carbinet (Gelman, BH 143AS)
17. Light microscope (Olympus, CX31RBSFA)
18. Loop
19. Magnesium ribbon
20. Micropipette ขนาด 1-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, และ 100-1000 µl (Eppendorf)
21. Micropipette tip
22. Microtiter plate flat bottom 96 wells (Corning)
23. Milipore filter membrane ขนาด 0.45 µm
24. Multichannel micropipette ขนาด 20-200 µl (Finnpipette)
25. pH meter
26. Petri dishes ขนาด 9 cm (Anumbra)
27. Refrigerator (Sanyo)
28. Rotary evaporator
29. Separatory funnel
30. Slides
31. Staining rack
32. Test tube (Pyrex)
33. Vernier caliper (Whale)

34. Vortex mixer (Vortex Genie 2, G 560E)

35. Water bath (Julabo, TW 20)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การบ่งชี้ลักษณะตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย (Rhodehamel and Harmon, 2001)

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากอาหาร จำนวน 65 isolate และสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 นำมาเพาะเชื้อบนอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่มีสีขาวขุ่น โคโลนีขนาดใหญ่ และผิวหยาบขรุขระ streak ลงบนอาหาร mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีสีเทาหรือสีขาวขุ่น ทดสอบ lecithinase ให้ผลบวกสังเกตุเห็นวงใสรอบๆ โคโลนี mannitol fermentation ให้ผลลบ บนอาหารเลี้ยงเชื้อสีชมพู นำมาย้อมสีกรัม ติดสีแกรมบวก รูปแท่งตรง ขนาดใหญ่ มี endspore อยู่กลางเซลล์ใสไม่ติดสี และทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ catalase, citrate, nitrate reduction, tyrosine decomposition และ motility ให้ผลบวก ทดสอบ blood haemolysis พบลักษณะเป็นวงใสแบบ β-hemolysis และทดสอบ indole ให้ผลลบ

2. การสกัดสารสกัดหยาบจากสมุนไพร

นำใบกระทุ มาล้างให้สะอาด อบที่อุณหภูมิ 50ºC จนแห้ง บดสมุนไพรให้ละเอียดชั่งน้ำหนักก่อนการสกัด นำมาแช่ด้วย 95 % ethanol 7 วัน (แช่ 3 ครั้ง) ในอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:2 เขย่าเบา ๆ ทิ้งไว้ 7 วัน กรองสารละลาย และนำสารละลายระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45–55ºC จนแห้ง นำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักและเก็บสารสกัดที่ได้ ที่อุณหภูมิ 4ºC นำมาคำนวณหาเปอร์เซนต์ของสารสกัดหยาบที่ได้ ตามสูตร

$$\% \text{ YIELD} = \frac{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ได้จากการสกัด}}{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด}} \times 100$$

3. การแยกสารสกัดจากใบกระทุเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (Semi-purified fraction) และสารบริสุทธิ์ (Pure compound)

ละลายสารสกัดที่ได้จากข้อ 2 ด้วยเมทานอล แล้วทำการแยกส่วนที่ไม่ละลายออกโดยการกรอง นำส่วนที่เป็นสารละลายมาระเหยให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40-60ºC นำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยไดคลอโรมีเทนในปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถละลายสารสกัดได้หมด ทำการแยกส่วนสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column

chromatography) ใช้ไดคลอโรมีเทน 100% และอะซีโตน 10-100% เป็นตัวชะสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ออกจากคอลัมน์ตามลำดับ ใช้ไดคลอโรมีเทน 100% เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำการตรวจสอบสารละลายที่ถูกชะออกมาด้วยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography; TLC) ที่มีซิลิกาเจลเป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และทำการรวมสารละลายที่มีลักษณะของจุดสารบนทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีที่คล้ายกันเข้าด้วยกัน ใช้การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทำการคัดแยกสาร (bioassay-guided fractionation) จากสารสกัดไดคลอโรมีเทนให้ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified fraction) และ/หรือสารบริสุทธิ์ (pure compound) ใช้วิธีการเอกซ์เทนซีฟ 1 (extensive 1) และ 2ดี เอ็นเอ็มอาร์ สเปคโทรสโคปี (2D NMR spectroscopy) และ แมสสเปคโทรสโคปี (mass spectroscopy) ทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ซึ่งสารบริสุทธิ์นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร.วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม และคุณอัษฎาวุธ หิรัญรัตน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะมาตรฐานและสารสกัดจากสมุนไพรโดยวิธี Disc diffusion method (CLSI, 2006a)

4.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เขี่ยเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน Mueller-Hinton Broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต Mcfarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl (ปริมาณเชื้อ 1.5 x10^8 CFU /ml)

4.2 เตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

ชั่งสารสกัดหยาบ 250 mg ใส่ในขวดไร้เชื้อ ละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 ml จะได้สารสกัดที่ความเข้มข้น 250 mg/ml เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองตรวจสอบสภาพไร้เชื้อของสารสกัด ทำได้โดยนำไป streak บน NA แล้วนำไปบ่มที่ 37ºC เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หากมีเชื้อปนเปื้อนให้นำไปกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 µm ที่ทนต่อ DMSO หยดสารสกัด 10 µl ลงบนแผ่น disc ไร้เชื้อทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำไปทดสอบ สำหรับแผ่น disc ชุดควบคุมจะใช้ตัวทำละลายได้แก่ DMSO แทนสารสกัด

4.3 การทดสอบกับแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐานและแผ่นสารสกัดจากสมุนไพร

จุ่มเชื้อจากข้อ 4.1 โดยใช้ cotton swab เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) 3 แนว ทำมุม 60° วางแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, oxacillin,

penicillin, tetracycline และ vancomycin และแผ่นสารสกัดจากสมุนไพรโดยแต่ละแผ่นห่างกันประมาณ 15-20 mm. และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 mm. บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 16-18 ชั่วโมง

ใช้สายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 ทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะและสารสกัดเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ

4.4 การอ่านผล

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) แผ่นยามาตรฐานและแผ่นสารสกัดจากสมุนไพร โดยใช้ Vernier caliper สำหรับการทดสอบกับแผ่นยามาตรฐานนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานซึ่งแสดงผลออกมา 3 ลักษณะ ดังนี้

Susceptible	(S)	เชื้อมีความไวต่อยาต้านแบคทีเรีย
Intermediate	(I)	เชื้อมีความไวปานกลางต่อยาที่ทดสอบ
Resistant	(R)	เชื้อดื้อยาที่ใช้ทดสอบ

5. การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) โดยวิธี broth microdilution (CLSI, 2006b)

5.1 เตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เขี่ยเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต Mcfarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 1.0 X 10^6 CFU/ml ด้วย MHB

5.2 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดสมุนไพรโดยชั่งสารสกัดหยาบ 10.24 mg ใส่ในขวดไร้เชื้อ ละลายด้วย 10% DMSO จะได้สารสกัดที่ความเข้มข้น 10.24 mg/ml ทำการเจือจางสารสกัดแบบลำดับสองและได้ความเข้มข้นที่ต้องการคือ 10.24-0.02 mg/ml โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1024-2 µg/ml)

5.3 การทดสอบหาค่า MIC

ดูดสารสกัดหยาบ จากข้อ 5.2 ใส่ลงใน microtiter plate แบบ 96 หลุมให้มีปริมาตรหลุมละ 20 µl ดูด MHB ใส่ลงใน microtiter plate หลุมละ 160 µl ดูดเชื้อจากข้อ 5.1 ใส่ลงในแต่ละหลุมหลุมละ 20 µl ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 16-20 ชั่วโมง

การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC

5.4 การทดสอบหาค่า MBC

นำแต่ละหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากการทดสอบหาค่า MIC เพาะเลี้ยงบนอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MBC

นอกจากนี้ทำการหาค่า MIC และ MBC ของยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ chloramphenicol และ gentamicin ด้วยวิธีการเดียวกันซึ่งเลือกทดสอบจากยาปฏิชีวนะที่มีความไวมากที่สุด (100%) ต่อจำนวนเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด

นำมาหาค่า MIC_{50} และ MIC_{90} ของสารสกัดหยาบและยาปฏิชีวนะ ซึ่ง MIC_{50} คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 50% ของสายพันธุ์ที่ทดสอบ ส่วน MIC_{90} คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 90% ของสายพันธุ์ที่ทดสอบ

6. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบกระทุ่มต่อเซลล์และเอนโดสปอร์ในระหว่างการงอก เชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Time-kill study (ดัดแปลงจาก Beuchat *et al.*, 1997; Citron and Appleman 2006)

6.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เขี่ยเชื้อมา 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อด้วย MHB ให้มีเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml

6.2 การเตรียมเอนโดสปอร์ที่ใช้ทดสอบ

เตรียม inocula โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีของเชื้อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Brain Heart infusion (BHI) บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อมา 0.1 ml ใน sporulation agar plate โดยเตรียมจากอาหาร NA ที่มี $MnSO_4$ 0.05 g/l บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำโคโลนีทำ suspension ด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ (Beuchat *et al.*, 1997) และปั่นที่ 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้าง 2 ครั้ง ทำ suspension ด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ และต้มที่อุณหภูมิ 80ºC เป็นเวลา 10 นาที นับจำนวนเอนโดสปอร์เป็น spore/ml เก็บที่อุณหภูมิ -70ºC เมื่อนำมาใช้ตรวจสอบว่าเป็นเอนโดสปอร์ และปรับ suspension ของเอนโดสปอร์ ด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อให้ได้ประมาณ 10^6 CFU/ml

6.3 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดโดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการที่ความเข้มข้นของ MIC, 2 MIC และ 4 MIC (32-256 µg/ml)

6.4 การทดสอบสารสกัดต่อเซลล์

ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 500 µl จากข้อ 6.3 ใส่ลงใน NB ที่มีปริมาตรอยู่ 4 ml และเติมเชื้อที่เป็นเซลล์ จากข้อ 6.1หรือข้อ 6.2 500 µl และชุด control ที่ใส่ 10% DMSO แทนสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นับจำนวนโคโลนีที่เหลือรอด โดยนำมาทำ dilution ด้วย NSS แล้วนำแต่ละ dilution มา spread บนอาหาร NA ณ เวลาที่ 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง

6.5 การทดสอบสารสกัดต่อเอนโดสปอร์

ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 500 µl จากข้อ 6.3 ใส่ลงใน NB และน้ำกลั่นไร้เชื้อที่มีปริมาตรอยู่ 4 ml เติมเอนโดสปอร์จากข้อ 6.2 500 µl และชุด control ที่ใส่ 10% DMSO แทนสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นับจำนวนโคโลนีที่เหลือรอด โดยนำมาทำ dilution ด้วย NSS แล้วนำแต่ละ dilution มา spread บนอาหาร NA ณ เวลาที่ 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 และ 360 นาที (สำหรับเอนโดสปอร์ที่เพาะใน NB) และ ณ เวลาที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน(สำหรับเอนโดสปอร์ที่เพาะใน น้ำกลั่นไร้เชื้อ) บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง

ตรวจผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี คำนวณเป็น CFU/ml และ เขียนกราฟระหว่าง log จำนวนโคโลนี (CFU/ml) กับเวลา

7. การทดสอบผลการใช้สารสกัดหยาบจากใบกระทุและอุณหภูมิร่วมกันต่อเอนโดสปอร์

นำ suspension ของเอนโดสปอร์จากข้อ 6.2 ดูดใส่หลอดไร้เชื้อ 2.5 ml เติมน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 2 ml และเติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 500 µl จากข้อ 6.3 และชุด control ที่ใส่ 10% DMSO แทนสารสกัด นำไปบ่มที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 50, 60, 70, 80 และ 90ºC นับจำนวนโคโลนีที่เหลือรอด โดยนำมาทำ dilution ด้วย NSS แล้วนำแต่ละ dilution มา spread บนอาหาร NA ณ เวลาที่ 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง

ตรวจผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี คำนวณเป็น CFU/ml และ เขียนกราฟระหว่าง log จำนวนโคโลนี (CFU/ml) กับเวลา

8. การทดสอบผลการใช้สารสกัดหยาบจากใบกระทุและอุณหภูมิร่วมกันต่อเอนโดสปอร์หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80ºC

นำ suspension ของเอนโดสปอร์จากข้อ 6.2 ดูดใส่หลอดไร้เชื้อ 2.5 ml เติมน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 2 ml นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80ºC เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว และเติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 500 µlจากข้อ 6.3 และชุด control ที่ใส่ 10% DMSO แทนสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นับจำนวนโคโลนีที่เหลือรอด โดยนำมาทำ dilution ด้วย NSS แล้วนำแต่ละ dilution มา spread บนอาหาร NA ณ เวลาที่ 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 และ 360 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง

ตรวจผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี คำนวณเป็น CFU/ml และ เขียนกราฟระหว่าง log จำนวนโคโลนี (CFU/ml) กับเวลา

9. การทดสอบผลความคงตัวของสารสกัดจากใบกระทุ่อต่อเชื้อ *B.cereus* ที่ระดับ pH ต่าง ๆ (de Carvalho *et al.*, 2007)

9.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เขี่ยเชื้อมา 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml ด้วย MHB

9.2 การทดสอบสารสกัดต่อเชื้อที่ระดับ pH ต่าง ๆ

ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 500 µl จากข้อ 8.2 ดูด NB ที่ปรับ pH ตั้งแต่ 4, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ปริมาตร 4ml และเติมเชื้อจากข้อ 9.1 ปริมาตร 500 µl และชุด control ที่ใส่ 10% DMSO แทนสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 12 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เหลือรอด โดยนำมาทำ dilution ด้วย NSS แล้วนำแต่ละ dilution มา spread บนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 24 ชั่วโมง

ตรวจผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี คำนวณเป็น CFU/ml และ เขียนกราฟระหว่าง log จำนวนโคโลนี (CFU/ml) กับเวลา

10. การทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากใบกระทุ่อต่อเซลล์และการงอกเอนโดสปอร์ในอาหาร (Grande *et al.*, 2006)

10.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เขี่ยเชื้อมา 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน NB บ่มที่

อุณหภูมิ 35°C นาน 24 และ 48 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml ด้วย

10.2 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดโดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการที่ความเข้มข้นของ MIC, 2MIC, 4MIC, 8MIC, 16MIC และ 32MIC (32-1024 µg/ml)

10.3 การเตรียมตัวอย่างอาหาร

อาหารที่ใช้ได้แก่ ข้าวต้มสำเร็จรูป (Knorr, Unilever Thai Trading, Bangkok, Thailand) และสเต็กปลาทูน่ากระป๋องพร้อมบริโภค (Roza, Hi-Q Food Products, Samutprakan, Thailand) โดยชั่งผงข้าวต้ม 20 g ผสมด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ 200 ml (เจือจาง 1:10) ต้ม 2-3 นาทีตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็น และสำหรับสเต็กปลาทูน่ากระป๋องนำมาเจือจางเป็น 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher 5 นาที ทำการตรวจยืนยันการปนเปื้อนของเชื้อก่อนทดสอบ โดยนำมาทำ dilution ด้วย NSS แล้วนำแต่ละ dilution มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร NA

10.4 การทดสอบสารสกัดต่อเซลล์และเอนโดสปอร์ในอาหาร

เติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น จากข้อ 9.3 ปริมาตร 500 µl และหลอดควบคุมที่ใส่ 10% DMSO แทนสารสกัด ใส่ลงในหลอด ที่มีข้าวต้ม และสเต็กปลาทูน่ากระป๋องปริมาตร 4 ml และดูด suspensions ของเอนโดสปอร์หรือเซลล์ 500 µl จากข้อ 9.1 และ 9.2 หลังจากนั้นนำหลอดทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 35°C และ 6°C โดยที่อุณหภูมิ 35°C นับจำนวนเอนโดสปอร์และเซลล์ที่เหลือรอด ณ เวลาที่ 0, 6, 12, 24 ชั่วโมงและที่อุณหภูมิ 6°C ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน การนับจำนวนเอนโดสปอร์และเซลล์ที่เหลือรอด โดยนำมาทำ dilution ด้วย NSS แล้วนำแต่ละ dilution มา spread บนอาหาร NA นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง

ตรวจผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี คำนวณเป็น CFU/ml และ เขียนกราฟระหว่าง log จำนวนโคโลนี (CFU/g) กับเวลา

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลการบ่งชี้ลักษณะตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

การบ่งชี้ลักษณะจากตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร 65 isolates มาทดสอบ mannitol fermentation, lecithinase activity, catalase, blood haemolysis, nitrate reduction, motility, indole production ย้อมสีกรัม และย้อมสีเอนโดสปอร์ พบว่าเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้คือ ทดสอบ mannitol fermentation บนอาหาร MYP agar และ indole production ให้ผลลบคิดเป็น 100% ทดสอบ lecithinase activity, blood haemolysis และ catalase ให้ผลบวกคิดเป็น 100% นอกจากนี้ทดสอบ tyrosine decomposition, nitrate reduction และ motility ให้ผลบวกคิดเป็น 98.46% 92.31% และ 86.15% ตามลำดับ นำมาย้อมสีกรัม ติดสีกรัมบวก รูปแท่งตรง ขนาดใหญ่ มี endspore อยู่กลางเซลล์ใสไม่ติดสี เมื่อย้อมสีเอนโดสปอร์ เอนโดสปอร์ติดสีเขียว รูปรี อยู่กลางเซลล์ ติดสีแดง

2. ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากใบกระทุและสารสกัดบริสุทธิ์

การสกัดสารจากใบกระทุด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:2 พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะหนืด สีเขียวเข้ม คำนวณเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบที่ได้มีค่าเท่ากับ 8.15% และสารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้คือสาร rhodomyrtone มีค่าเท่ากับ 0.0011%

3. ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะมาตรฐานและสารสกัดหยาบจากสมุนไพรโดยวิธี Disc Diffusion

3.1 ยาปฏิชีวนะ

การทดสอบรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะมาตรฐานของเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหารและสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าเชื้อที่แยกได้จากอาหารไวต่อยา chloramphenicol และ gentamicin คิดเป็น 100% และไวต่อยา vancomycin, ciprofloxacin, erythromycin, clindamycin และ tetracycline คิดเป็น 93.85%, 90.77%, 81.54%, 78.48% และ 69.23% ตามลำดับ ไวปานกลางต่อยา clindamycin, tetracycline, erythromycin, ciprofloxacin และ vancomycin คิดเป็น 21.54%, 16.92%, 15.38%, 9.23% และ 6.15% ตามลำดับ และดื้อต่อยา ampicillin, oxacillin และ penicillin คิด

เป็น 100% นอกจากนี้ดื้อต่อยา tetracycline และ erythromycin คิดเป็น 13.85% และ 3.08% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากอาหาร (จำนวน 65 isolate)

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (µg)	Susceptible	Intermediate	Resistant
Gentamicin	10	65 (100%)	0	0
Ampicillin	10	0	0	65 (100%)
Penicillin	10	0	0	65 (100%)
Oxacillin	1	0	0	65 (100%)
Vancomycin	30	61 (93.85%)	4 (6.15%)	0
Erythromycin	15	53 (81.54%)	10 (15.83%)	2 (3.08%)
Ciprofloxacin	5	59 (90.77%)	6 (9.23%)	0
Tetracycline	30	45 (69.23%)	11 (16.92%)	9 (13.85%)
Chloramphenicol	10	65 (100%)	0	0
Clindamycin	2	51 (78.46%)	14 (21.54%)	0

เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 ไวต่อยา chloramphenicol, clindamycin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, tetracycline และ vancomycin และดื้อต่อยา ampicillin, oxacillin และ penicillin

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ *Bacillus cereus*

Inhibition zone (mm)	Numbers of isolates (%) (n=65)
10.00-12.00	29 (44.62%)
12.01-14.00	23 (35.38%)
14.01-16.00	12 (18.46%)
16.01-18.00	1 (1.54%)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Inhibition zone ของ *B. cereus* ATCC 11778 เท่ากับ 14.35±0.14 mm

3.2 สารสกัดหยาบจากใบกระทุ

จากการทดสอบเมื่อนำแผ่น disc ที่มีสารสกัดหยาบจากใบกระทุที่สกัดด้วย 95% ethanol ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/disc มาทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรียได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (inhibition zone) ส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วง 10-12 mm และ 12.01-14.00 mm คิดเป็น 44.62% และ 35.38% ตามลำดับ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เฉลี่ยของเชื้อเท่ากับ 12.77 ± 0.89 และเมื่อทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เท่ากับ 14.35 ± 0.14 mm.

4. ผลการทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานและสารสกัดจากสมุนไพรโดยวิธี broth microdilution

4.1 ยาปฏิชีวนะ

เลือกทดสอบหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะใช้สำหรับควบคุมคุณภาพ 2 ชนิด ได้แก่ ยา chloramphenicol และ gentamicin ต่อเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหารและสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า ยา chloramphenicol ต่อเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหาร ค่า MIC อยู่ในช่วง 2-8 µg/ml โดยค่า MIC_{50} และ MIC_{90} มีค่าเท่ากับ 4 µg/ml และค่า MBC อยู่ในช่วง 16-512 µg/ml ส่วนยา gentamicin มีค่า MIC อยู่ในช่วง 1-4 µg/ml มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} คือ 1 และ 2 µg/ml ตามลำดับ และค่า MBC อยู่ในช่วง 16-64 µg/ml จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า ค่า MIC_{50}

และ MIC_{90} ของยาทั้ง 2 ชนิดคือ chloramphenicol และ gentamicin ต่ำกว่า ค่า MIC breakpoint เมื่อทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 ค่า MIC และ MBC ของยา chloramphenicol เท่ากับ 2 µg/ml และ 256 µg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ยา gentamicin มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1 µg/ml และ 32 µg/ml ตามลำดับ

4.2 สารสกัดหยาบจากใบกระทุ

ค่า MIC ของสารสกัดที่ใช้ทดสอบได้ผลแสดงในตารางที่ 4 พบว่าเมื่อทดสอบสารสกัดต่อเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหาร ค่า MIC อยู่ในช่วง 16-64 µg/ml มีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 32 µg/ml และ 64 µg/ml ตามลำดับค่า MBC อยู่ในช่วง 32-256 µg/ml ส่วนค่า MIC และ MBC ของสารสกัดต่อเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 เท่ากับ 32 และ 64 µg/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของยาปฏิชีวนะและสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเชื้อ *Bacillus cereus*

Antibacterial agents	MIC (µg/ml) (n=65)			MBC (µg/ml) (n=65)	*B. cereus* ATCC 11778	
	Range	MIC_{50}	MIC_{90}		MIC	MBC
สารสกัดหยาบจากใบกระทุ	16-64	32	64	32-256	32	64
Chloramphenicol	2-8	4	4	16-512	2	256
Gentamicin	1-4	1	2	16-64	1	32

4.3 สารสกัดบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่ได้จากสารสกัดหยาบจากใบกระทุคือ rhodomyrtone มาทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเชื้อ *B. cereus* 4 สายพันธุ์ คือ NPRC 203, NPRC 205, NPRC 235 และ NPRC 247 นอกจากนี้ทำการทดสอบกับ *B. cereus* ATCC 11778 ค่า MIC และ MBC ได้ผลดังตารางที่ 5 พบว่าค่า MIC ของสารสกัดบริสุทธิ์ คือ 0.5 µg/ml และค่า MBC อยู่ในช่วง 2-8 µg/ml ในขณะที่ค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 มีค่าเท่ากับ 0.5 µg/ml และ 4 µg/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดบริสุทธิ์ Rhodomyrtone ต่อเชื้อ *Bacillus cereus*

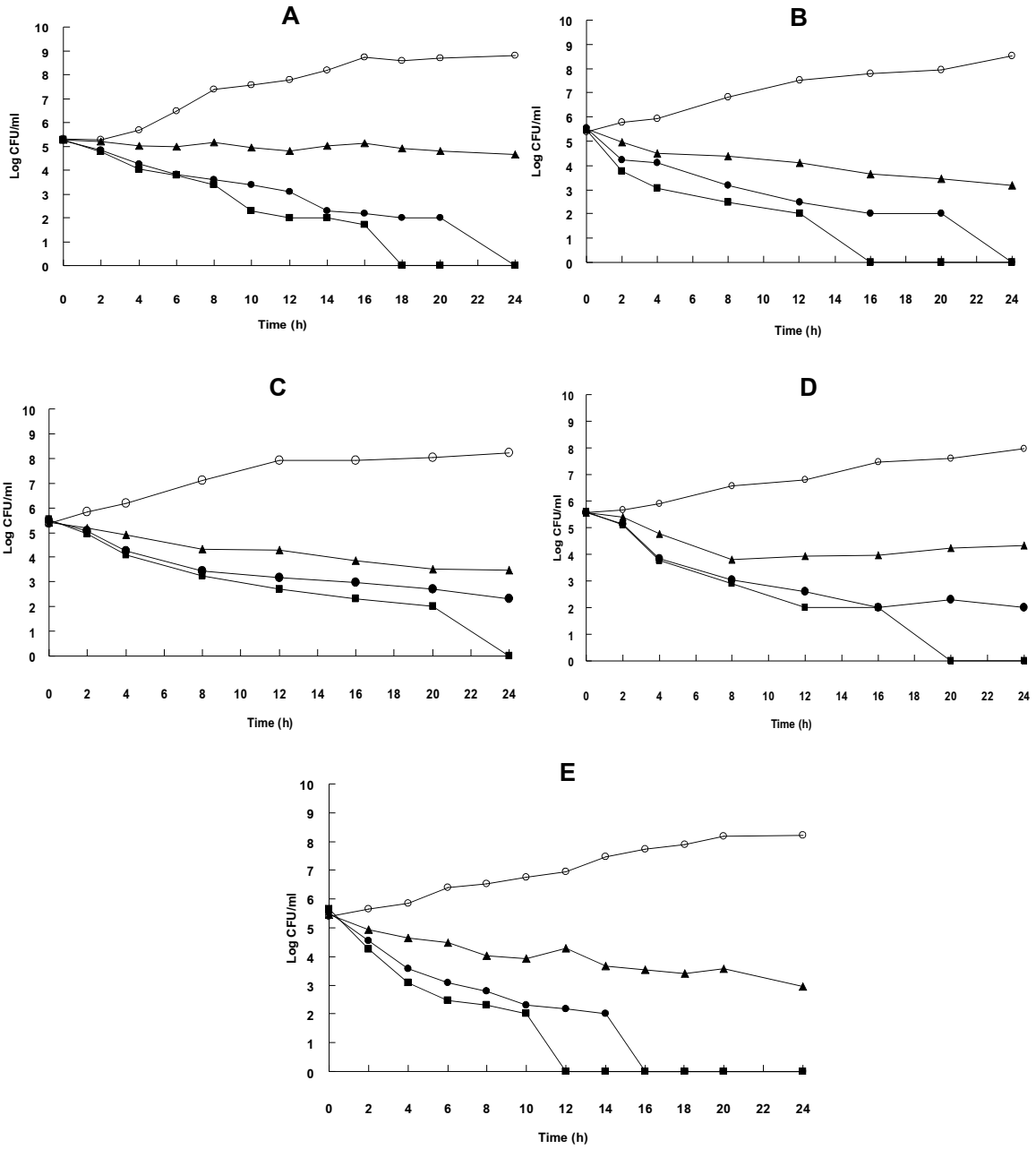
Isolates	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
NPRC 203	0.5	4
NPRC 205	0.5	4
NPRC 235	0.5	8
NPRC 247	0.5	2
B. cereus ATCC 11778	0.5	4

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบกระทุ่อเซลล์และเอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง โดยวิธี time-kill study

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบกระทุ่อเซลล์และเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* โดยวิธี time-kill study ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3 และรูปที่ 4 ตามลำดับ ซึ่งเลือกทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อ *B. cereus* 4 isolates จากตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากอาหารของอาหารแต่ละชนิด และสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 พบว่ารูปแบบของการรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะที่เป็นเซลล์และการงอกเอนโดสปอร์ไม่แตกต่างกัน เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นความสามารถในการยับยั้งเชื้อหรือฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นด้วย ผลของสารสกัดต่อการอยู่รอดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน NB พบว่าการรอดชีวิตของเชื้อในชุดควบคุมนั้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ สูงถึง 8-9 log CFU/ml ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้น MIC (32µg/ml) สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ เมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 2MIC และ 4MIC โดยส่วนใหญ่จำนวนเชื้อลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นอย่างน้อยที่สุด 3 log CFU/ml ภายในเวลา 6-24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 4MIC สารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดภายในเวลา16-20 ชั่วโมง สำหรับสายพันธุ์ NPRC 203 (รูปที่ 3A), NPRC 205 (รูปที่ 3B), NPRC 247 (รูปที่3D) และยกเว้น NPRC 235 (รูปที่ 3C) สารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 (รูปที่ 3E) สารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดภายในเวลา 12 ชั่วโมง

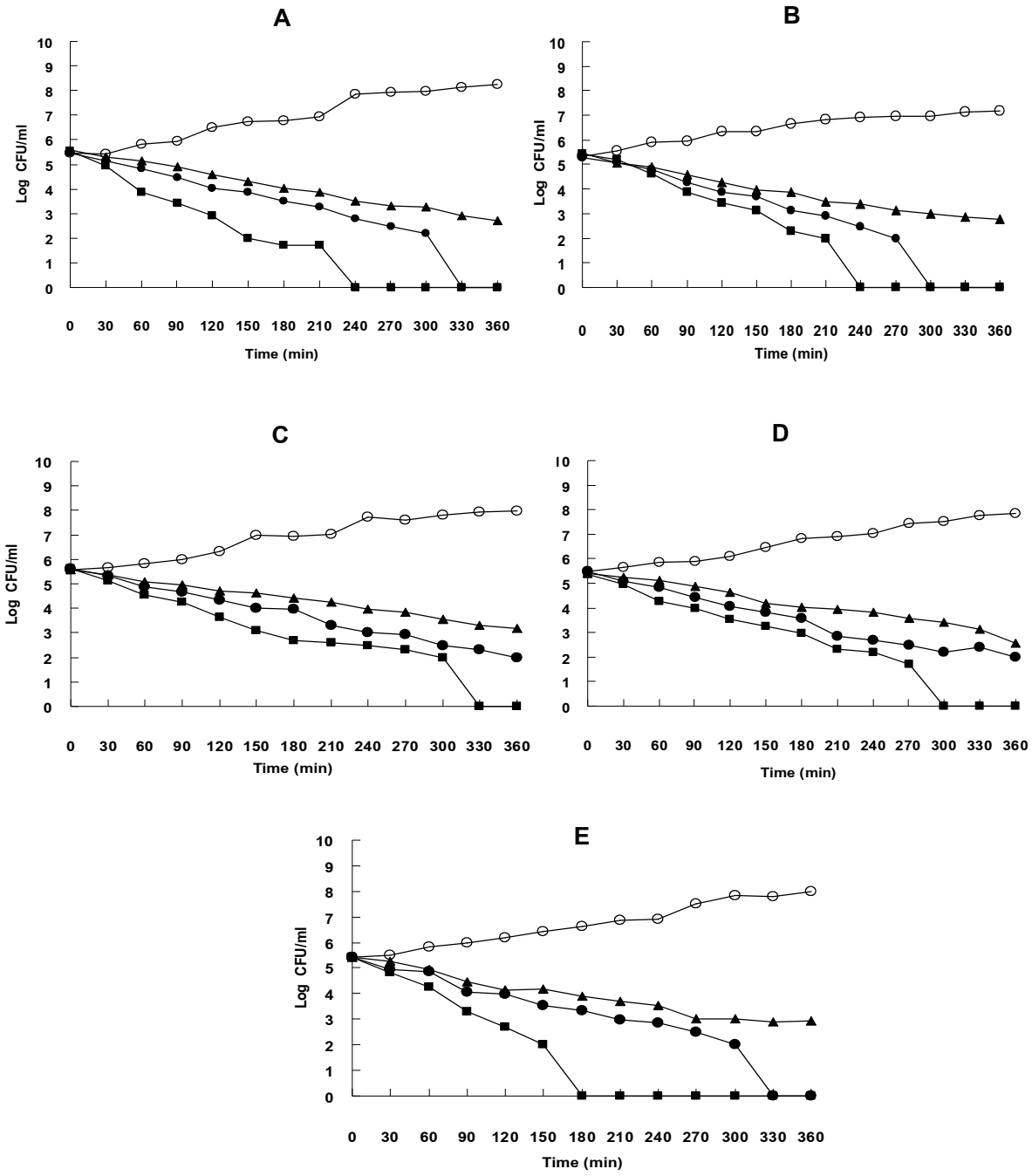
ผลของสารสกัดหยาบจากใบกระทุ่อการงอกเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่เพาะเลี้ยงใน NB ดังรูปที่ 4 พบว่าการรอดชีวิตของเชื้อในชุดควบคุมนั้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ สูงถึง 8 log CFU/ml ภายในเวลา 360 นาที ที่ความเข้มข้น MIC สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนโดสปอร์ได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบเช่นเดียวกับการอยู่รอดของเซลล์ แต่ใช้เวลาในการยับยั้งได้เร็วกว่า และสารสกัดที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงอย่างน้อยที่สุด 3 log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นชุดควบคุมภายในเวลา 150-270 นาที และสารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดที่เวลา 240 นาที สำหรับสายพันธุ์ NPRC 203 (รูปที่ 4A) และ NPRC 205 (รูปที่ 4B) ที่เวลา 300 นาที สำหรับสายพันธุ์ NPRC 247 (รูปที่ 4D) และที่เวลา 330 สำหรับสายพันธุ์ NPRC 235 (รูปที่ 4C) ในขณะที่สายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 (รูปที่ 4E) สารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดภายในเวลา 180 นาที

และเมื่อทดสอบผลของสารสกัดจากใบกระทุ่อเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 5 (A-E) พบว่าที่ความเข้มข้น MIC, 2MIC, 4MIC, 8MIC และ16MIC สารสกัดไม่มีผลต่อการอยู่รอดของจำนวนเอนโดสปอร์ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น

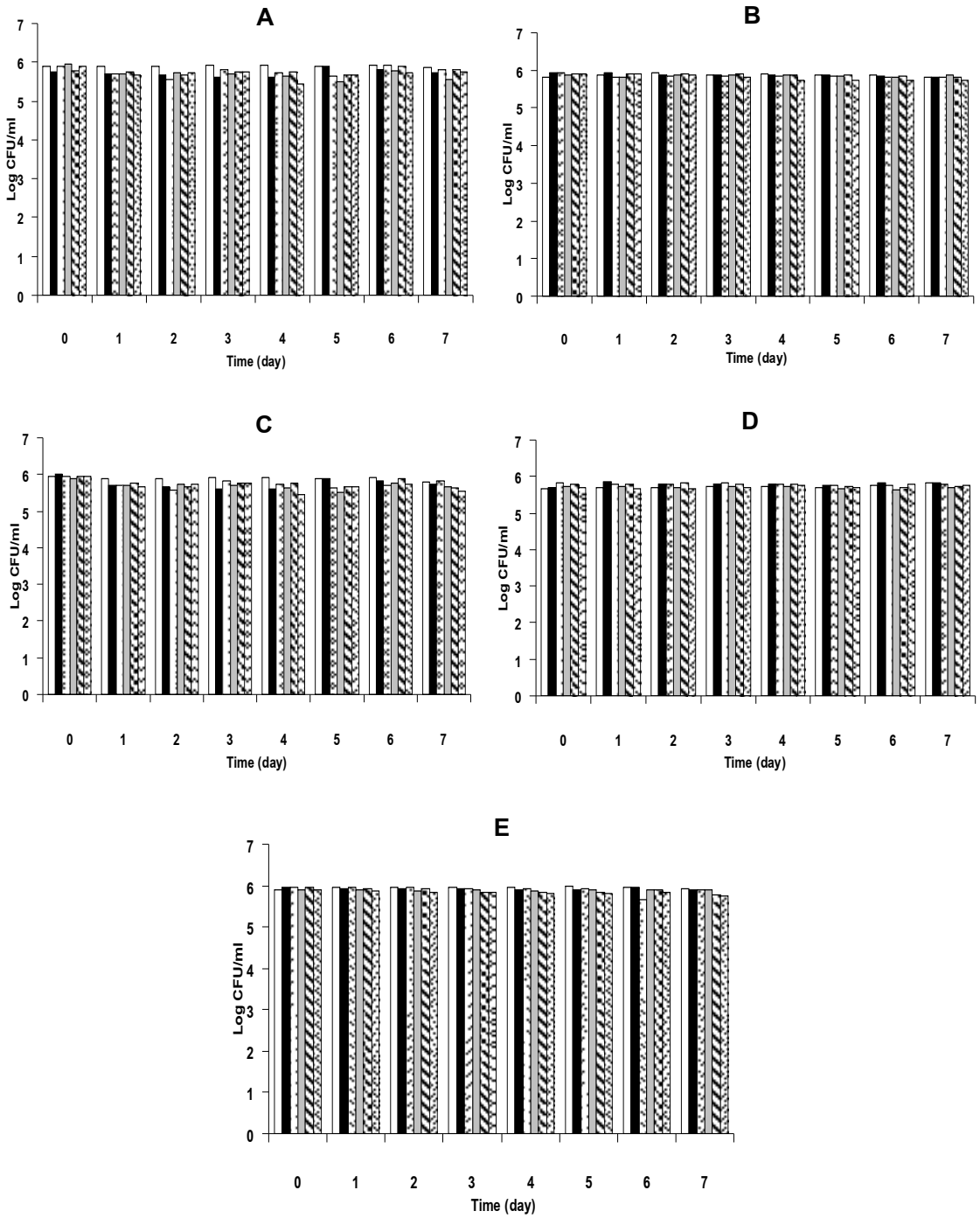


รูปที่ 3 ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่อการอยู่รอดของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงใน NB สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247

(D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■)



รูปที่ 4 ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงใน NB สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■)



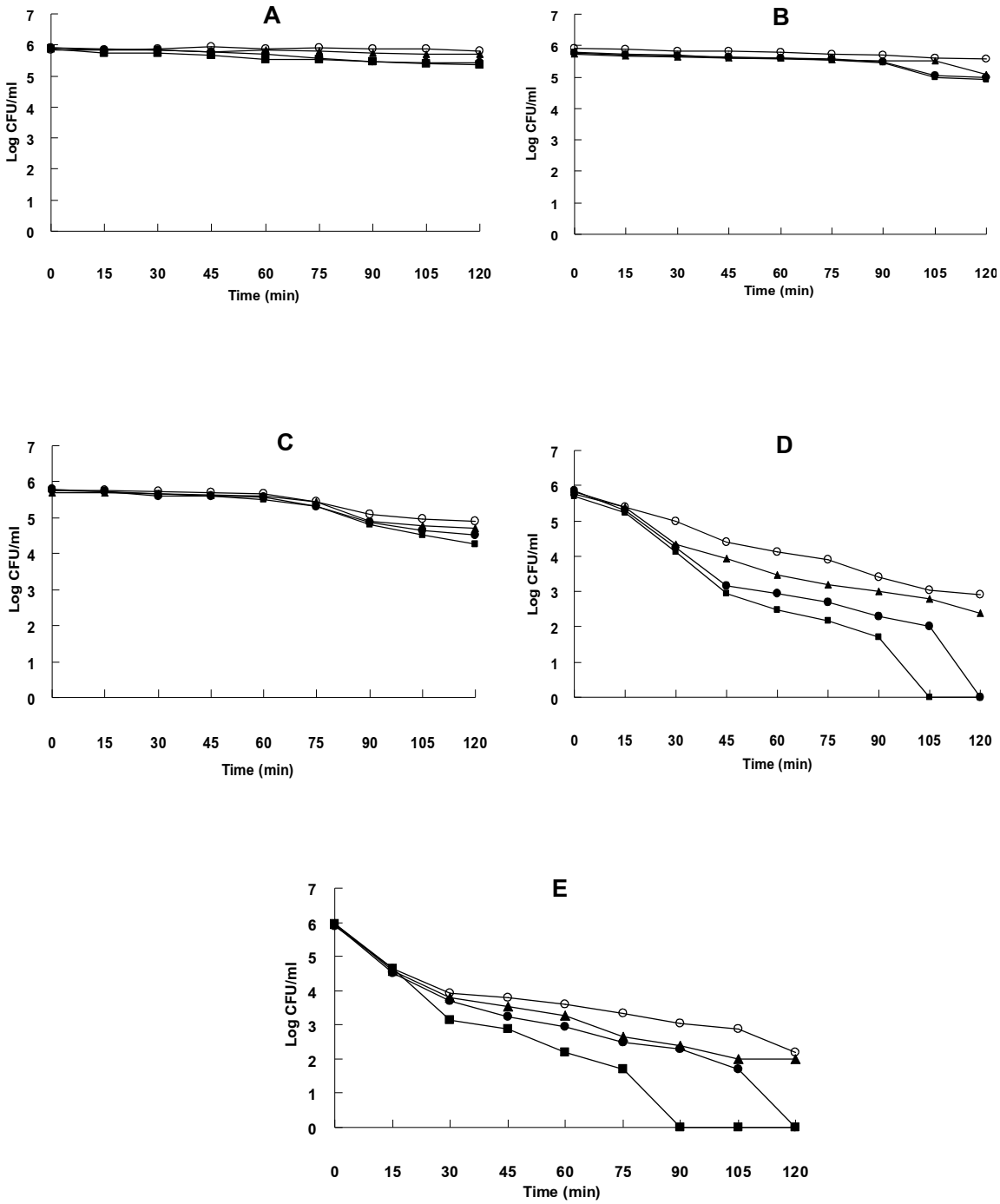
รูปที่ 5 ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่มต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (□) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (■) 2MIC (▒) 4MIC (▩ 8MIC (▨ และ 16MIC (▧)

6. ผลการทดสอบการใช้สารสกัดหยาบจากใบกระทุและอุณหภูมิร่วมกันต่อเอนโดสปอร์

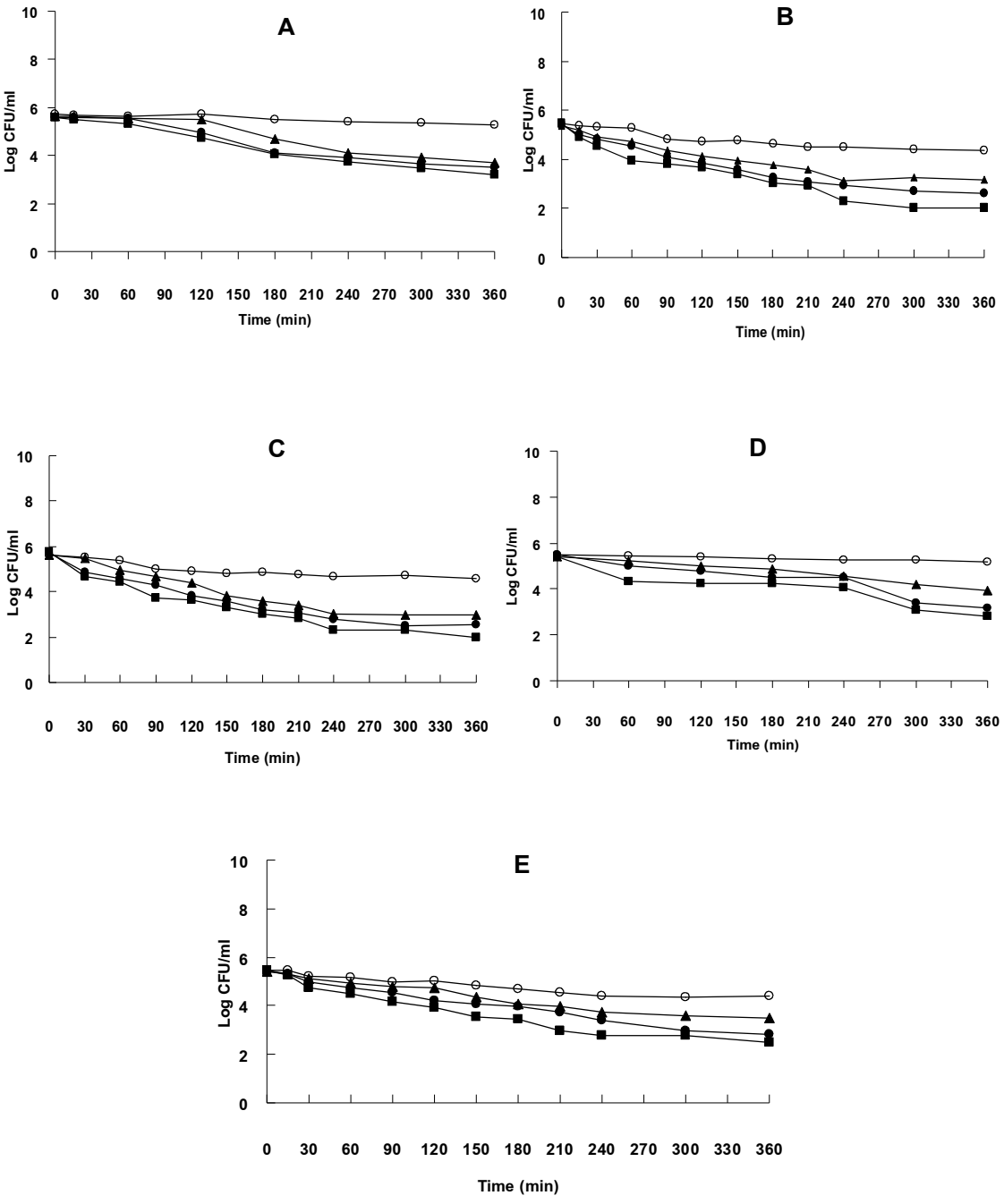
จากการศึกษาผลของการใช้อุณหภูมิและสารสกัดร่วมกันต่อเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* โดยวิธี time-kill study ซึ่งใช้ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 50, 60, 70, 80 และ 90ºC ทดสอบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 ดังรูปที่ 6 พบว่าที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70ºC สารสกัดไม่มีผลต่อการอยู่รอดของจำนวนเอนโดสปอร์ทุกระดับความเข้มข้นเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นในขณะที่อุณหภูมิ 80ºC และ 90ºC สารสกัดมีผลในการเสริมฤทธิ์ต้านเอนโดสปอร์ได้ดีกว่าการใช้อุณหภูมิเพียงอย่างเดียว ที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถทำให้การอยู่รอดของเจำนวนเอนโดสปอร์ลดลงอย่างน้อยที่สุด 3 log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นภายในเวลา 60 และ 45 นาที ตามลำดับ

7. ผลของการใช้สารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเอนโดสปอร์หลังจากผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 80ºC

จากผลของการใช้สารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเอนโดสปอร์หลังจากผ่านความร้อนที่ อุณหภูมิ 80ºC โดยเลือกทดสอบตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากอาหารของแต่ละชนิด 4 isolates และสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 ได้ผลดังรูปที่ 7 เมื่อเลือกทดสอบที่อุณหภูมิ 80ºC เป็นเวลา 15 นาที นำมาย้อมสีกรัมของเอนโดสปอร์ พบว่าเอนโดสปอร์เริ่มติดสีกรัมซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนโดสปอร์เริ่มมีการสูญเสียสภาวะเอนโดสปอร์เกิดขึ้นดังรูปที่ 8 และเมื่อเติมสารสกัดแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่าที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถทำให้การอยู่รอดของจำนวนเอนโดสปอร์ลดลงอย่างน้อยที่สุด 2log CFU/ml เมื่อเทียบกับเชื้อเริ่มต้น ที่เวลา 210 นาที สำหรับสายพันธุ์ NPRC 235 (รูปที่ 7C) ที่เวลา 240 นาที สำหรับสายพันธุ์ NPRC 205 (รูปที่ 7B) และสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 (รูปที่ 7E) ที่เวลา 300 นาที สำหรับสายพันธุ์ NPRC 247 (รูปที่ 7D) และที่เวลา 360 นาที สายพันธุ์ NPRC 203 (รูปที่ 7A)

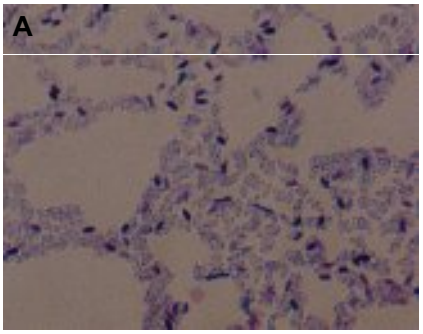


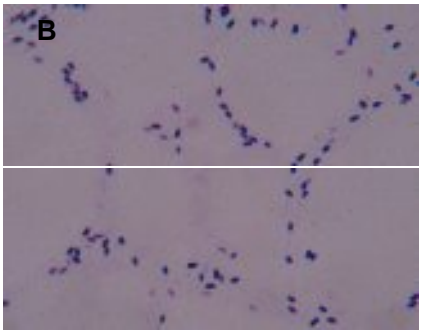
รูปที่ 6 ผลของการทดสอบสารสกัดจากใบกระทุและอุณหภูมิร่วมกันต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ที่ระดับอุณหภูมิ 50°C (A), 60°C (B), 70°C (C), 80°C (D) และ 90°C (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■)

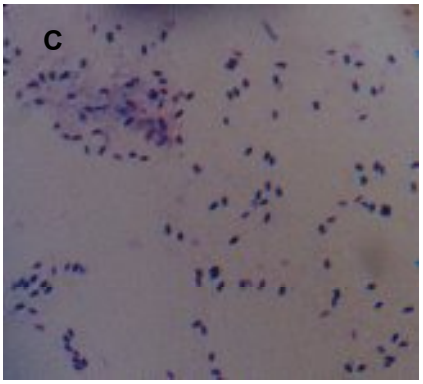


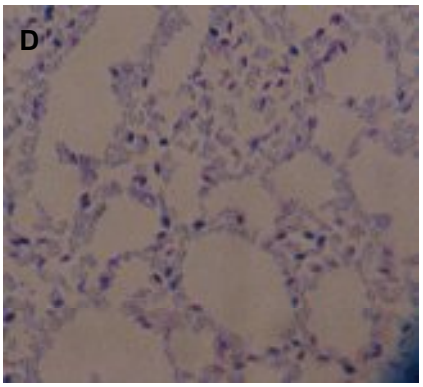
รูปที่ 7 ผลของการทดสอบสารสกัดจากใบกระทุ่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ หลังจากผ่านอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาที สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC

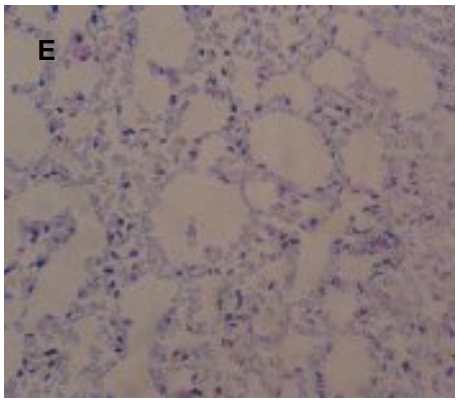
11778 (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■)







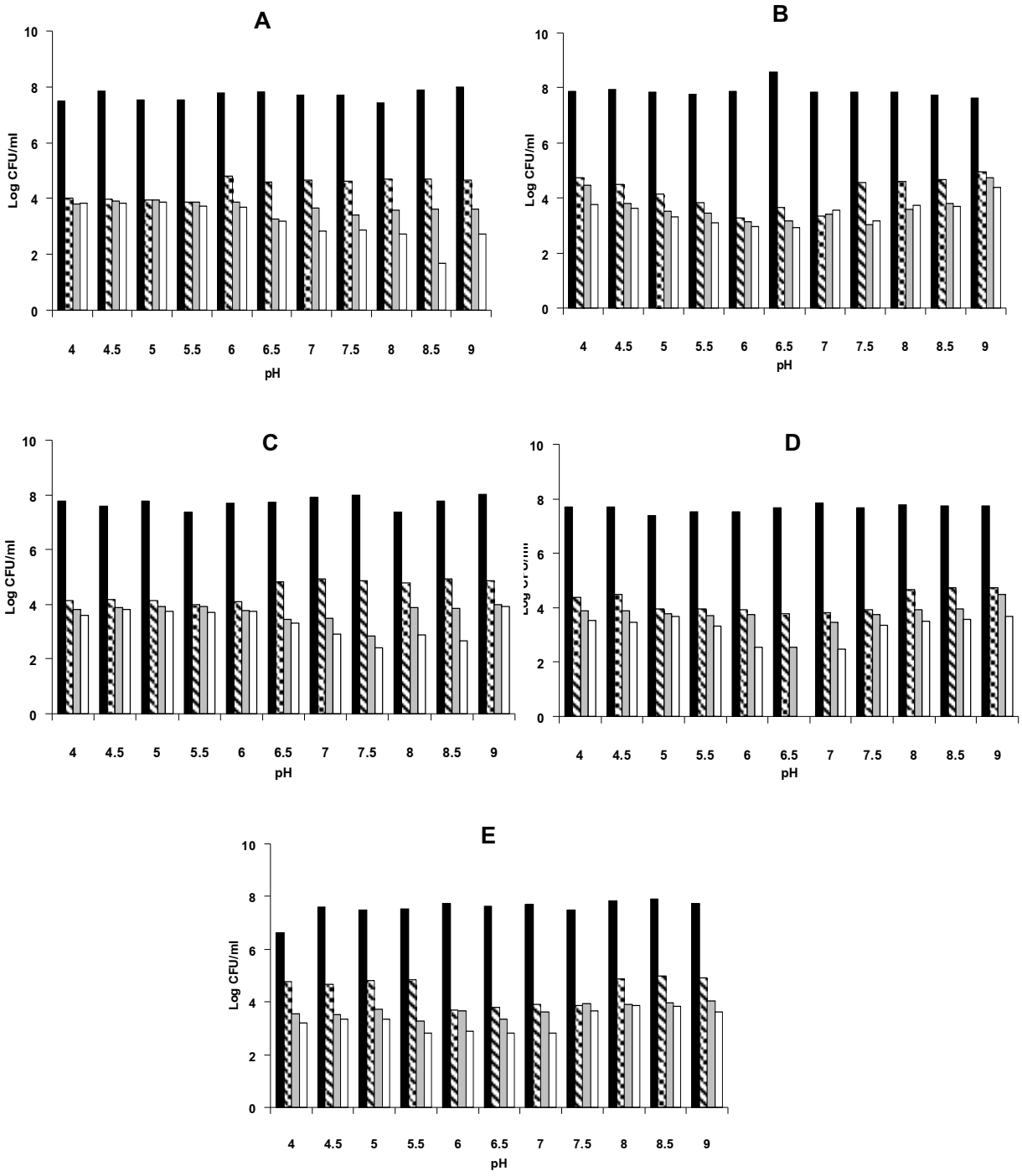




รูปที่ 8 ผลของการติดสีกรัมของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* หลังจากทดสอบที่อุณหภูมิ 80ºC เป็นเวลา 15 นาที สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E)

8. ผลการทดสอบความคงตัวของสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับ pH ต่าง ๆ

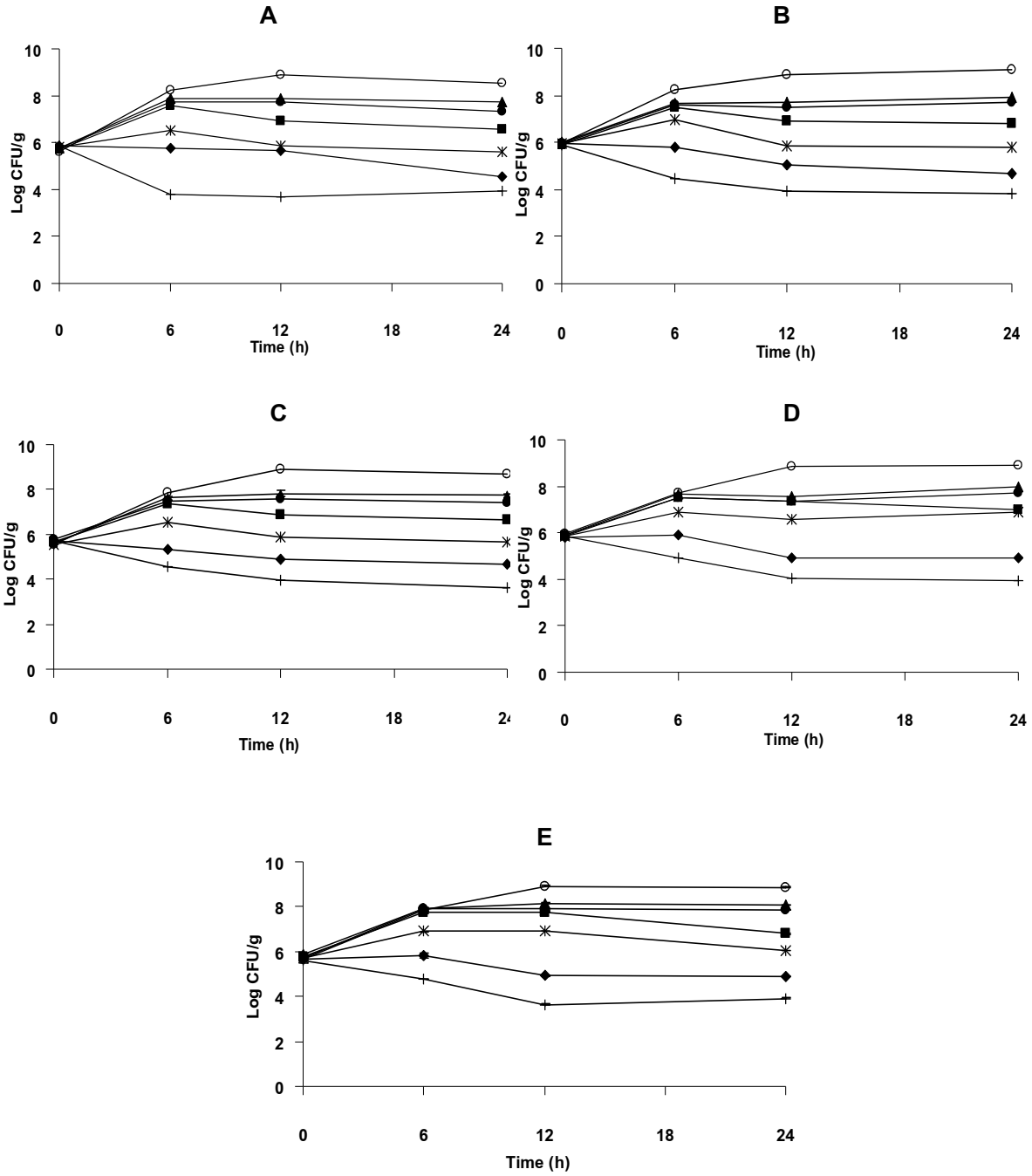
จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ *B. cereus* โดยปรับระดับ pH ต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (NB) (pH 4-9) โดยเลือกทดสอบจากตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากอาหาร 4 isolates และสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 9 รูปแบบของการรอดชีวิตของเชื้อหลังจากทดสอบสารสกัด 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 2MIC และ 4MIC พบว่า สารสกัดมีความคงตัวในการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *B. cereus* ได้ทุกระดับ pH ที่ทดสอบ โดยส่วนใหญ่สารสกัดสามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงอย่างน้อยที่สุด 2 log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นของทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ



รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่อต่อเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ระดับ pH ต่าง ๆ หลังจากบ่ม 12 ชั่วโมง สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (■) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▨), 2MIC (▩) และ 4MIC (□)

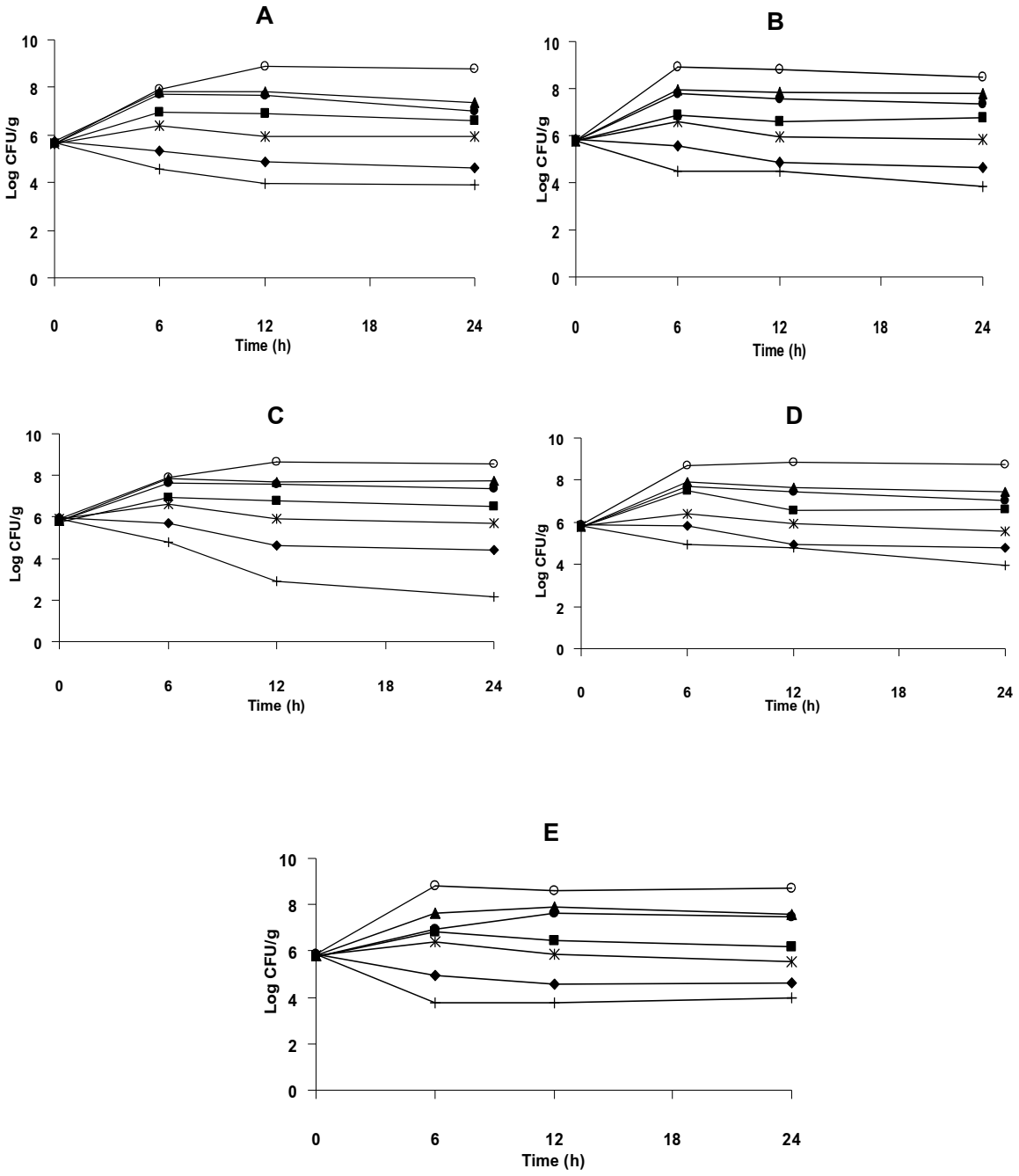
9. ผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากใบกระทุ่อเซลล์และเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในข้าวต้มสำเร็จรูป และสเต็กปลาทูน่ากระป๋องพร้อมบริโภค

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบกระทุ่อเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกของเชื้อ *B. cereus* ในข้าวต้มสำเร็จรูป และสเต็กปลาทูน่ากระป๋องพร้อมบริโภคปริมาณเชื้อสุดท้าย 10^5 CFU/ml ที่อุณหภูมิ 6ºC และ 37ºC โดยวิธี time-kill study ซึ่งเลือกทดสอบจากตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากอาหาร 4 isolates และสายพันธุ์มาตรฐาน *B. cereus* ATCC 11778 พบว่า ที่อุณหภูมิ 37ºC สารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 6ºC สำหรับที่อุณหภูมิ 37ºC ผลของสารสกัดต่อการรอดชีวิตของเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกของเชื้อ *B. cereus* ในข้าวต้มสำเร็จรูปดังรูปที่ 10 -11 และสเต็กปลาทูน่ากระป๋องพร้อมบริโภคดังรูปที่ 12-13 ไม่แตกต่างกัน พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกในชุดควบคุมนั้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ สูงถึง 8-9 log CFU/ml ภายในเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดที่ความเข้มข้น 8 MIC (256 µg/ml) และ 16 MIC (512 µg/ml) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกของเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ที่ความเข้มข้น 32 MIC (1024 µg/ml) สารสกัดสามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงอย่างน้อยที่สุด 2 log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นภายในเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับในขณะที่ ที่อุณหภูมิ 6°C สารสกัดแสดงการออกฤทธิ์ต่อการรอดชีวิตของเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกของเชื้อ *B. cereus* ในข้าวต้มสำเร็จรูปดังรูปที่ 14-15 และสเต็กปลาทูน่ากระป๋องพร้อมบริโภคดังรูปที่ 16-17 พบว่าการรอดชีวิตของเชื้อในชุดควบคุมมีปริมาณคงที่ และที่ความเข้มข้น 32 MIC สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกของเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ โดยสามารถทำให้จำนวนเชื้อลดลงอย่างน้อยที่สุด 2 log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นภายที่เวลา 5-7 วัน

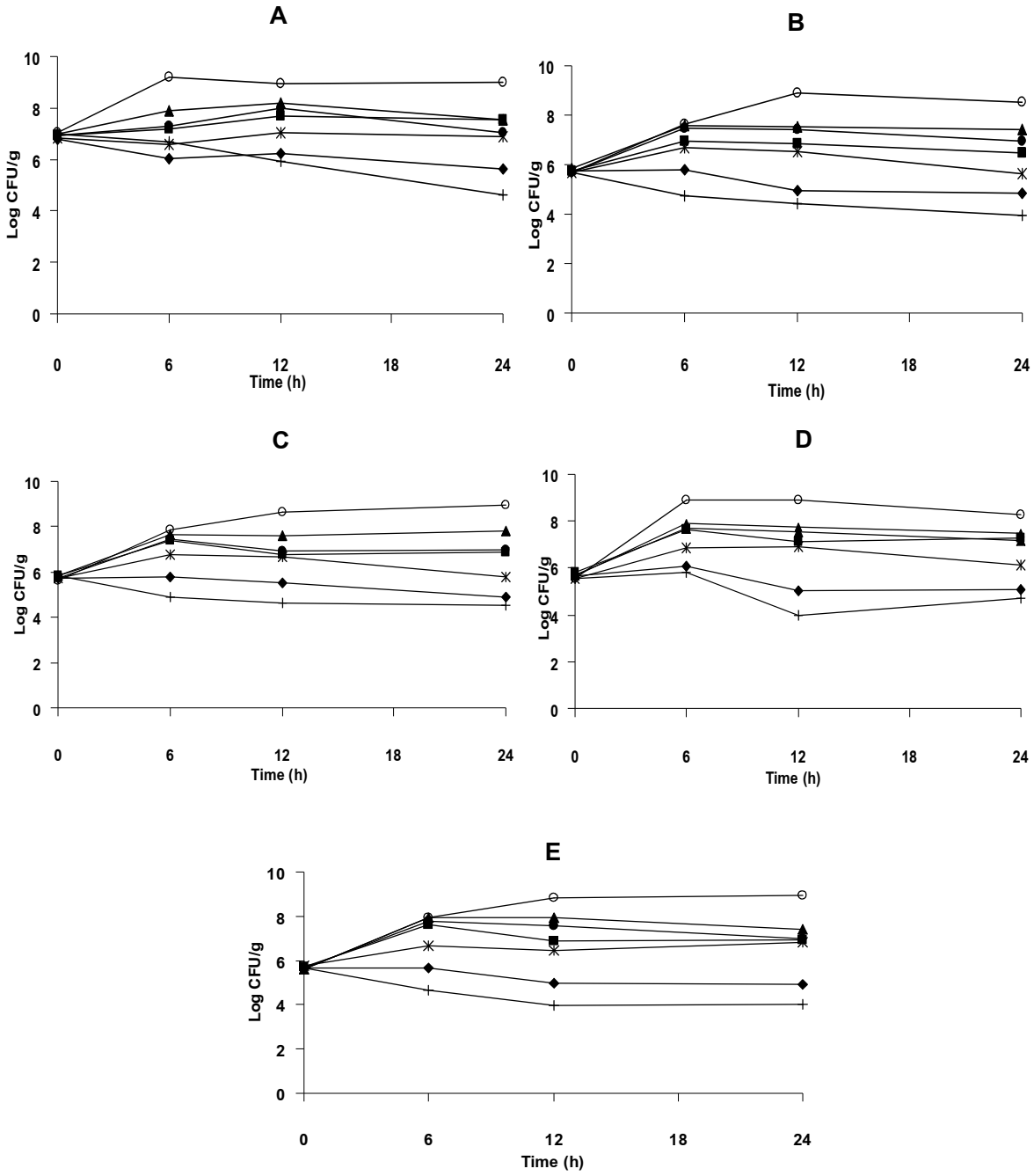


รูปที่ 10 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการอยู่รอดของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในข้าวต้มพร้อมบริโภค ที่อุณหภูมิ 37°C สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และ

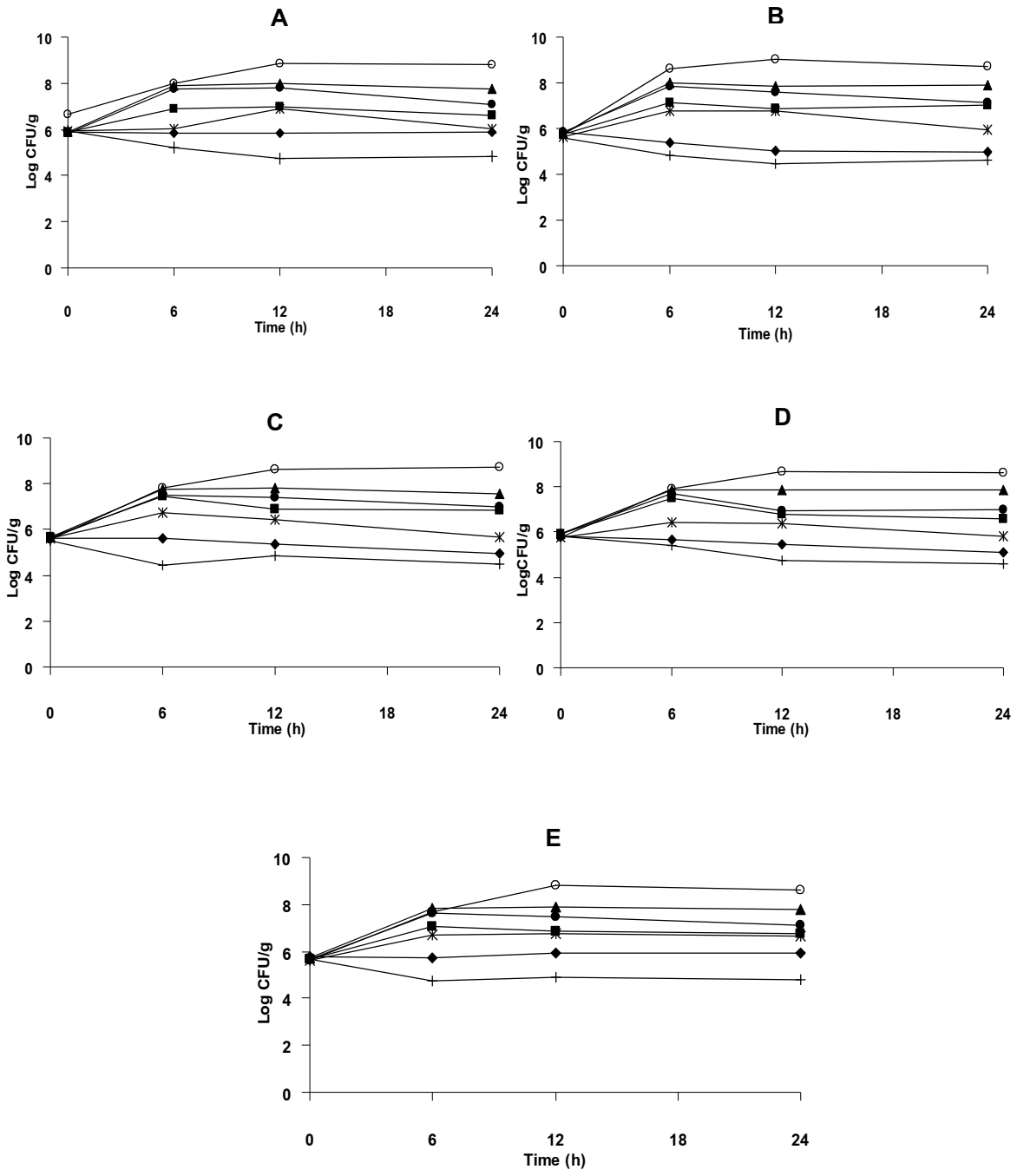
หลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความ MIC (▲), 2MIC (●) 4MIC (■) 8MIC (∗) 16MIC (◆) และ 32MIC (+)



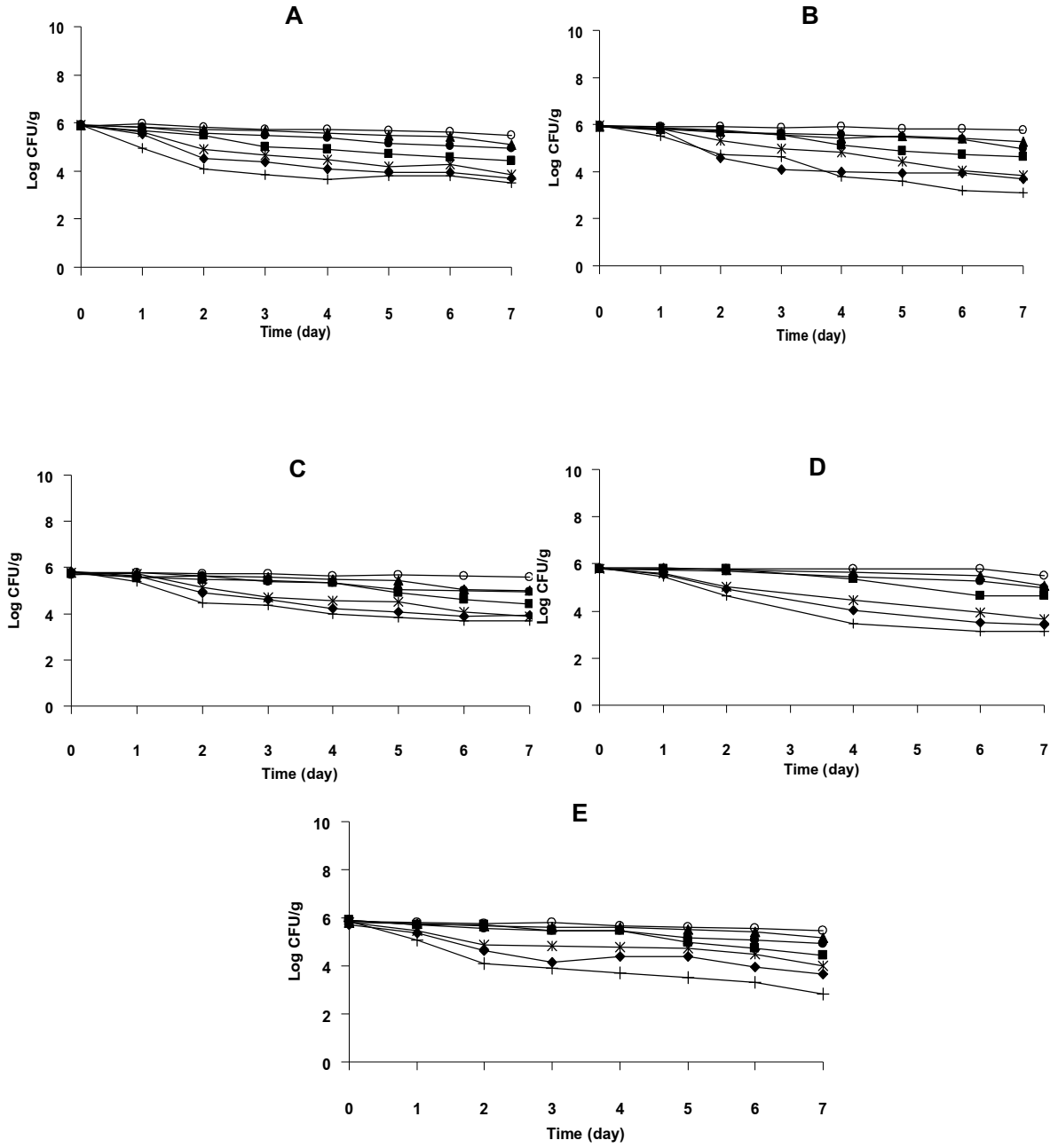
รูปที่ 11 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในข้าวต้มพร้อมบริโภค ที่อุณหภูมิ 37°C สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■) 8MIC (✳) 16MIC (◆) และ 32MIC (+)



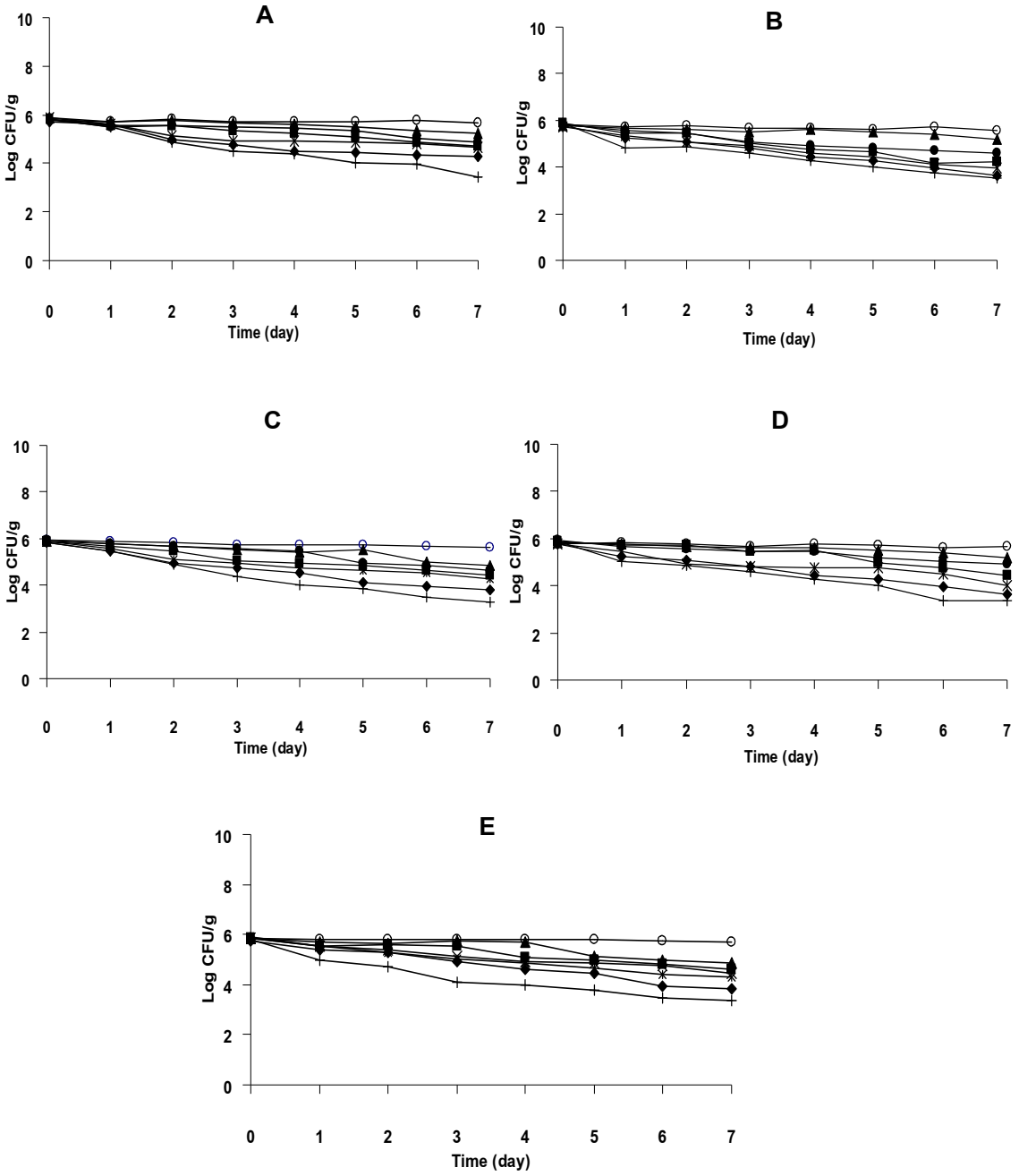
รูปที่ 12 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการอยู่รอดของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในสเต็กปลาทูน่ากระป๋อง ที่อุณหภูมิ 37°C สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■) 8MIC (✳) 16MIC (◆) และ 32MIC (+)



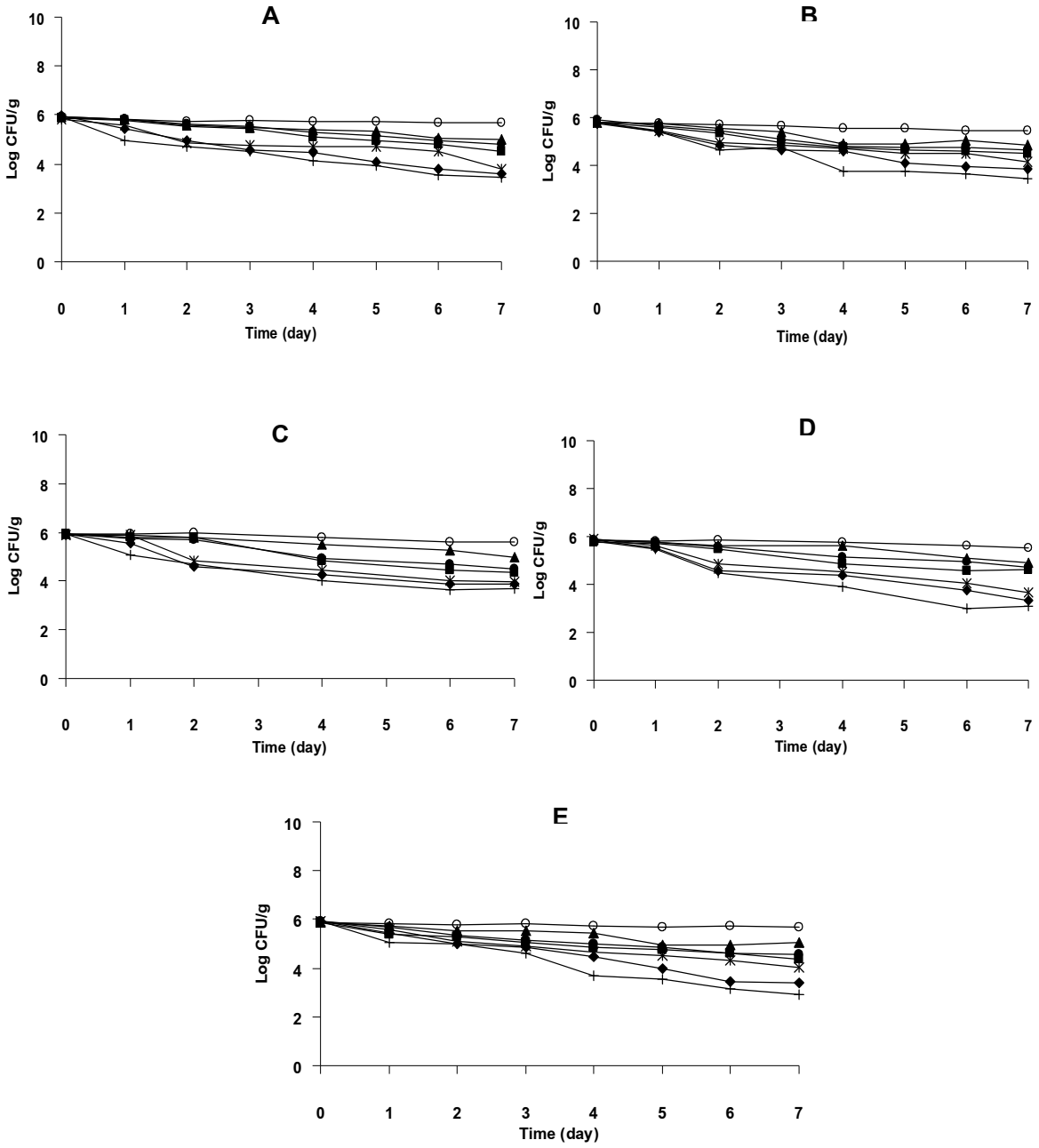
รูปที่ 13 ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่มต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในสเต็กปลาทูน่ากระป๋อง ที่อุณหภูมิ 37°C สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ 4MIC (■) 8MIC (✳) 16MIC (◆) และ 32MIC (+)



รูปที่ 14 ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่อการอยู่รอดของของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในข้าวต้มพร้อมบริโภค ที่อุณหภูมิ 6°C สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■) 8MIC (✳) 16MIC (◆) และ 32MIC (+)

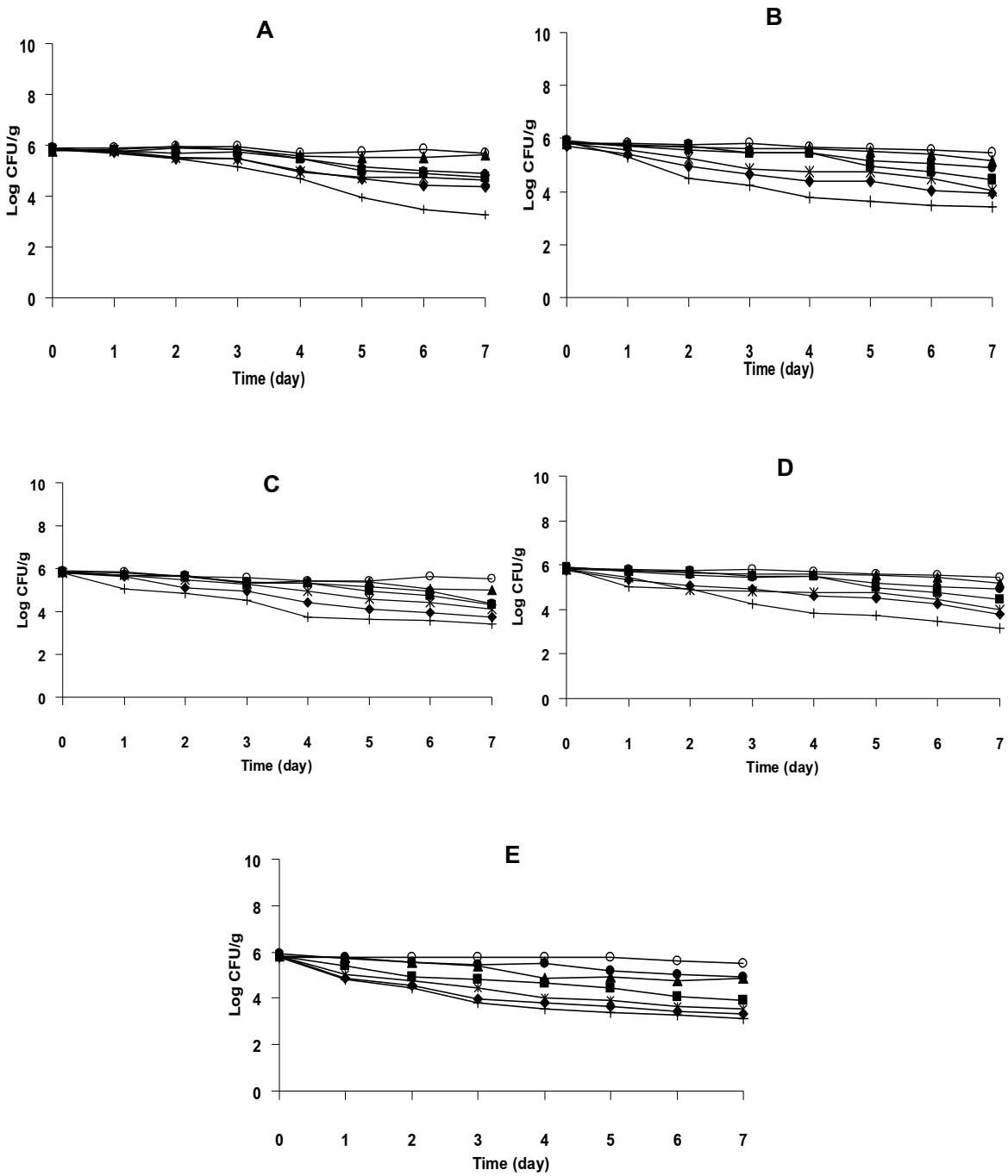


รูปที่ 15 ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในข้าวต้มพร้อมบริโภค ที่อุณหภูมิ 6°C สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■) 8MIC (✳) 16MIC (◆) และ 32MIC (+)



รูปที่ 16 ผลของสารสกัดจากใบกระทุต่อการอยู่รอดของเซลล์ของเชื้อ *Bacillus cereus* เพาะเลี้ยงในสเต็กปลาทูน่ากระป๋อง ที่อุณหภูมิ 6°C สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B), NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และ

หลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■) 8MIC (✳) 16MIC (◆) และ 32MIC (+)



รูปที่ 17 ผลของสารสกัดจากใบกระทุ่มต่อการอยู่รอดของเอนโดสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เพาะเลี้ยงในสเต็กปลาทูน่ากระป๋อง ที่อุณหภูมิ 6°C สายพันธุ์ NPRC 203 (A), NPRC 205 (B),

NPRC 235 (C), NPRC 247 (D) และ *B.cereus* ATCC 11778 (E) ชุดควบคุม (○) และหลังจากทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC (▲), 2MIC (●) และ4MIC (■) 8MIC (✳) 16MIC (◆) และ 32MIC (✚)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในกระบวนการผลิตอาหารระดับอุตสาหกรรมได้มีการเติมสารเคมีสังเคราะห์ ฮอร์โมน และยาปฏิชีวนะ ต่าง ๆ ลงไปในอาหารเพื่อควบคุมและกำจัดแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งในคนและในอาหารสัตว์นั้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถเกิดการกระจายและถ่ายทอดการดื้อยาสู่มนุษย์ได้ง่าย (Schlegelova *et al*., 2003; Lateef *et al*., 2005) ตลอดจนส่งผลกระทบไปทั่วโลกทั้งต่อสุขภาพและเศรษฐกิจ ปัจจุบันนี้มีงานวิจัยหลายงานที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. cereus* มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่อย่างกว้างขวาง ได้แก่ ยากลุ่ม beta-lactams, erythromycin, tetracyclines, และกลุ่มอื่นๆ (Jensen *et al*., 2001; Turmbull *et al*., 2004; Luna *et al*., 2007) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อ *B. cereus* ดื้อต่อยากลุ่ม beta-lactams คิดเป็น 100% นอกจากนี้ดื้อต่อยา tetracycline และ erythromycin คิดเป็น 13.85% และ 3.08% ตามลำดับ เนื่องจากเชื้อ *B. cereus* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นมีนักวิจัยจำนวนมากจึงได้พยายามหาวิธีต่างๆ เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการกำจัด ควบคุม และลดการระบาดของแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหาร จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบกระทุที่สกัดด้วย 95% ethanol ต่อเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหาร ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ สารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากพืชมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ซึ่งสารสกัดจากพืชมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์โดยตรงไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ฆ่า (cidal) หรือยับยั้ง (static) ซึ่งขณะนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อจุลินทรีย์น้อยมาก จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ *B. cereus* ในครั้งนี้ พบว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบอยู่ในช่วง 16-64 µg/ml และ 32-256 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ของสารสกัดด้วย 80% แอลกอฮอล์ และ อะซิโตน จากพืชที่รับประทานได้ (edible plants) ทั้งหมด 26 ชนิด จากประเทศจีน ญี่ปุ่น ไทย และเยเมน ต่อเชื้อ *B.cereus*, *S.aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* และ *Salmonella infantis* พบว่า มีพืช 6 ชนิด ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B.cereus* คือ สะเดา (*Azadirachta indica*), อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia)*, ผักกาดส้ม (*Rumex nervosus*), อีหรุด (*Ruta graveolens*), *Thymus serpyllum* และขิง (*Zingiber officinale*) ที่ค่า MIC อยู่ในช่วง 165-660 mg/l (Alzoreky and Nakahara, 2003)

จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้คือ rhodomyrtone และมีฤทธิ์ดีในการต้านเชื้อ *B. cereus* โดยมีค่า MIC คือ 0.5 µg/ml และค่า MBC อยู่ในช่วง 2-8 µg/ml เป็น

ที่น่าสนใจว่าสาร rhodomyrtone ที่แยกได้จากใบกระทุในครั้งนี้มีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อ *B. cereus* ซึ่งค่าที่ได้นี้ใกล้เคียงกับค่า MIC ของยา chloramphenicol และ gentamicin มาก จะเห็นว่า ค่า MIC ของสาร rhodomyrtone น้อยกว่า ค่า MIC ของยา chloramphenicol และ gentamicin ประมาณ 2-8 เท่า และเมื่อเทียบค่า MIC ของสาร rhodomyrtone กับค่า MIC ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อ *B. cereus* คือ ค่า MIC ของสาร rhodomyrtone น้อยกว่า ค่า MIC ของสารสกัดหยาบประมาณ 128 เท่า ซึ่งสาร rhodomyrtone เป็นสารในกลุ่ม acylphloroglucinols เช่นเดียวกับการศึกษาของ Salni *et al*., 2002 พบว่ากลไกในการออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ของสารกลุ่มนี้ยังไม่มีรายงานแน่ชัดแต่จากผลการศึกษาครั้งนี้คิดว่าสารกลุ่มนี้น่าจะมีฤทธิ์ฆ่า (cidal) มากกว่ายับยั้ง (static) เนื่องจากค่า MBC เท่ากับ MIC หรือแตกต่างกันไม่เกิน 4 เท่า (Lorian, 1996) นอกจากสารในกลุ่ม acylphloroglucinols ที่พบในพืชกลุ่มนี้แล้วมีรายงานการค้นพบสารกลุ่มอื่นก่อนหน้านี้ ได้แก่ triterpenoids (Hui *et al*.,1975; Hui and Li, 1976), tannins (Ai *et al*., 1997; Hou *et al*., 1998), ellagitannin และ flavone glycoside (Hou *et al*.,1999) ซึ่งสารเหล่านี้มีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์จุลินทรีย์แตกต่างกันไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วย ethyl acetate จากใบกระทุสามารถแยกได้สาร rhodomyrtone ที่จัดอยู่ในกลุ่ม acylphloroglucinols มีฤทธิ์ในการต้าน *E. coli* และ *S. aureus* (Salni *et al*., 2002; Saising *et al*., 2008) นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารในกลุ่ม triterpenoids ที่สกัดด้วย ethyl acetate ของ *Nympoides cristatum* พบว่าสารในกลุ่ม triterpenoids มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus,* ที่ค่า MIC เท่ากับ 64 µg/ml ตามลำดับ (Rahaman *et al*., 2002)

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเซลล์และเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* โดยวิธี time-kill study พบว่ารูปแบบของการรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะที่เป็นเซลล์และการงอกเอนโดสปอร์ไม่แตกต่างกัน เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นความสามารถในการยับยั้งเชื้อหรือฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นด้วย ผลของสารสกัดต่อการอยู่รอดของเซลล์และการงอกเอนโดสปอร์ในหลอดทดลอง (เพาะเลี้ยงใน NB) พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ เมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 2MIC และ 4MIC โดยส่วนใหญ่จำนวนเชื้อลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมอย่างน้อยที่สุด 3 log CFU/ml ภายในเวลา 6-8 ชั่งโมง ที่ความเข้มข้น 4MIC สารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดภายในเวลา 16-24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารต้านจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียกรัมลบ เนื่องจาก cell wall ของแบคทีเรียกรัมลบประกอบด้วยชั้น outer membrane ที่ซับซ้อนและมีปริมาณโปรตีนและไขมันมากกว่าในแบคทีเรียกรัมบวก ส่งผลให้ทนต่อสารต้านจุลินทรีย์ได้ดี ซึ่งในแบคทีเรียกรัมบวกนั้นสารต้านจุลินทรีย์สามารถทำลายชั้น cell wall และ cytoplasmic membrane ทำให้ cytoplasm รั่วและเกิดการจับรวมกลุ่ม (coagulation) ได้ง่าย (Kalemba and Kunicka, 2003) มีรายงานการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ต่อเซลล์แบคทีเรียแตกต่างกัน พบว่าสารต้านจุลินทรีย์ไปจับที่ผิวของเซลล์และสารต้านจุลินทรีย์สามารถ

ซึมผ่านไปยังตำแหน่งสำคัญของเซลล์ เช่น ทำให้สารต้านจุลินทรีย์ไปรบกวนชั้น phospholipid bilayer ของ cell membrane สูญเสียส่วนประกอบที่อยู่ในเซลล์ ทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานและการสังเคราะห์ส่วนประกอบโครงสร้างเซลล์ ยับยั้งสารพันธุกรรมที่อยู่ในเซลล์ได้ (Kim *et al*., 1995; Nychas, 1995) ในขณะที่การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ต่อการงอกเอนโดสปอร์ พบว่าหลังจากทดสอบกับสารต้านจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 6 ชั่วโมง ชั้น spore coat และ exosporium มัวหมอง ขอบเขตไม่ชัดเจน มีรอยแตก ผิวหยาบ สารเหลวในเอนโดสปอร์รั่วออกและหยุดทำงาน ทำให้สารต้านจุลินทรีย์สามารถเข้าไปทำลายได้ (Huang *et al*., 2007) จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดไม่มีผลในการต้านฤทธิ์ยับยั้งการอยู่รอดของเอนโดสปอร์เชื้อของ *B. cereus* มีรายงานการศึกษาพบว่ายาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อก็ต่อเมื่อเอนโดสปอร์งอกกลายเป็นเซลล์ปกติ แต่ในขณะที่เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเอนโดสปอร์จะทนต่อยาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลินทรีย์ (Abriouel *et al*., 2002; Citron and Applemen 2006, Grande *et al*., 2006) การเปลี่ยนแปลงเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียกลายเป็นเซลล์ปกตินั้นประกอบด้วย 4 ระยะที่สำคัญ คือ การกระตุ้น (activation) การงอก (germination) ช่วงการเจริญเติบโต (outgrowth) และ เจริญเติบโต (growth) (Moir 2003; Setlow 2003) ซึ่งพบว่าถ้าขาดระยะใดระยะหนึ่งทั้ง 4 ระยะขั้นดังกล่าวขั้นต้น เอนโดสปอร์ไม่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์ปกติได้ จะไม่ส่งผลผลกระทบต่อภาวะเสี่ยงอันตรายกับสุขภาพของผู้บริโภค (de Carvalho et al. 2007) แต่ทั้งนี้และทั้งนั้นก็เป็นสิ่งจำเป็นอย่างที่ต้องมีการควบคุมมิให้มีการปนเปื้อนเชื้อ *B.cereus* ในอาหารเนื่องจากทั้งเซลล์ปกติหรือเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B.cereus* สามารถไปเกาะติดบนสิ่งมีชีวิตได้ เช่น เยื่อบุผิว ผิวหนังภายนอกและภายในของมนุษย์และสัตว์ มีรายงานพบว่า เซลล์ปกติหรือเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B.cereus* สามารถไปเกาะติดที่เซลล์เยื่อบุผิวของมนุษย์จากนั้นก็สร้างสารพิษ enterotoxin ทำให้เกิดอันตรายและมีอาการเรื้อรังที่อวัยวะเป้าหมาย (Andersson *et al*., 1998)

เนื่องจากเอนโดสปอร์ทนต่อสารต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ ดังนั้น การใช้สารสกัดเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ต้านเอนโดสปอร์ มีรายงานการศึกษาพบว่า การใช้สารต้านจุลินทรีย์ร่วมกับวิธีทางเคมี-กายภาพอื่น ๆ สามารถทำให้เกิดการงอกเอนโดสปอร์ได้ (Pol *et al*., 2001) และการพัฒนาวิธีโดยใช้สารต้านจุลินทรีย์ร่วมกับวิธีทางเคมี-กายภาพอื่น ๆ ช่วยเพิ่มการออกฤทธิ์สารต้านจุลินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น (Grande *et al*., 2006) ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดและกระตุ้นการงอกเอนโดสปอร์ โดยใช้สารสกัดและอุณหภูมิร่วมกัน จากผลการทดลองการใช้สารสกัดและอุณหภูมิร่วมกันต่อเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* พบว่าที่อุณหภูมิ 80ºC และ 90ºC สารสกัดมีผลในการเสริมฤทธิ์ต้านเอนโดสปอร์ได้ดีกว่าการใช้อุณหภูมิเพียงอย่างเดียว มีรายงานการศึกษาพบว่า การใช้อุณหภูมิเป็นวิธีที่ใช้โดยทั่วไปในการกำจัดแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ แต่การใช้อุณหภูมิสูง ๆ ในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นเป็นเหตุทำให้สารอาหารโปรตีนถูกทำลาย สูญเสียวิตามินและสารระเหยสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติ

ได้ (Lado and Yousef 2002) โดยปกติแล้วเมื่อย้อมสีกรัมเอนโดสปอร์ไม่ติดสีกรัมดังนั้นจากผลการทดลองขั้นต้นจึงเลือกทดสอบที่อุณหภูมิ 80ºC เป็นเวลา 15 นาที และเมื่อนำมาย้อมสีกรัมของเอนโดสปอร์ เอนโดสปอร์เริ่มติดสีกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนโดสปอร์เริ่มมีการงอกหรือสูญเสียสภาพการเป็นเอนโดสปอร์เกิดขึ้น และเมื่อเติมสารสกัดแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่าสารสกัดสามารถทำให้การอยู่รอดของจำนวนเอนโดสปอร์ลดลงได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ปริมาตรเชื้อที่ใช้ทดสอบ อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ pH ของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม และระยะเวลาใช้ในการบ่ม (Friedman *et al*., 2002) จากการศึกษาความคงตัวของสารสกัดหยาบจากใบกระทุต่อเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับ pH ต่างๆ พบว่า สารสกัดมีความคงตัวในการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *B. cereus* ได้ทุกระดับ pH ที่ทดสอบ จากผลการทดลองฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ *B. cereus* ในหลอดทดลองที่ได้นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเซลล์และเอนโดสปอร์ที่งอกของเชื้อ *B. cereus* ได้จึงนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารต่อไป

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ *B. cereus* ในอาหารครั้งนี้เลือกตัวอย่างอาหารตามกลุ่มลักษณะอาการ 2 แบบ คือ ข้าวต้มสำเร็จรูป และสเต็กปลาทูน่ากระป๋องพร้อมบริโภค ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบผลของสารสกัดหยาบในอาหารทั้ง 2 ชนิดต่อเซลล์และการงอกเอนโดสปอร์เชื้อ *B. cereus* ที่อุณหภูมิ 37ºC และ 6ºC พบว่าที่อุณหภูมิ 37ºC สารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 6ºC ซึ่งขณะนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระทุในอาหารต่อเชื้อ *B. cereus* หรือจุลินทรีย์อื่นๆ น้อยมาก จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบกระทุสามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์และเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดในอาหารมากกว่าเมื่อเทียบในหลอดทดลองถึง 4-32 เท่า แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาการใช้สารต้านจุลินทรีย์ต่างๆ ในอาหาร มีรายงานการศึกษา พบว่าเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร โดยส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้ระดับความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารสูงถึงประมาณ 2-100 เท่าเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ใช้ในหลอดทดลอง (Glass and Johnson 2004) Ultee และ Smid (2001) พบว่าสาร carvacrol จาก oreganum และ thyme ที่ความเข้มข้น 0.06 mg/ml สามารถยับยั้งการรอดชีวิดของเซลล์ *B. cereus* และการสร้างสารพิษในหลอดทดลองได้ แต่ยับยั้งการรอดชีวิดของเซลล์และการสร้างสารพิษในซุบ ที่ความเข้มข้นของสาร carvacrol ในซุบมากกว่าในหลอดทดลองถึง 50 เท่า Hernández-Herrero และคณะ (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (cinnamon) และสารประกอบจากอบเชย cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 2 และ 5 µl/100 ml ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *B. cereus* ในน้ำแครอทหลังจาก 60 วัน ที่อุณหภูมิ 12ºC ได้ สำหรับปัจจัยที่ผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อประยุกต์ใช้ในอาหาร ได้แก่ ปริมาณน้ำในอาหาร ประเภทและส่วนประกอบของอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน pH ของอาหาร ความเค็มของอาหาร

และอุณหภูมิ (Burt 2004; Devlieghere *et al*., 2004; Holley and Patel 2005; Ahn *et al*., 2007; Gutierrez *et al*., 2008) ปริมาณน้ำที่น้อยกว่าของอาหารเมื่อเทียบกับอาหารที่ใช้ในหลอดทดลอง สามารถทำให้ประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ลดลงในการออกฤทธิ์ไปยังอวัยวะเป้าหมายของเซลล์แบคทีเรีย (Smith-Palmer *et al*., 2001) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Gill และคณะ (2002) พบว่า โดยส่วนใหญ่อาหารที่มีส่วนประกอบของไขมัน และโปรตีนในปริมาณสูง ๆ สามารถปกป้องเซลล์และลดการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ได้ มีรายงานการศึกษา ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารประกอบกลุ่ม polyphenols จาก carvacrol ต่อเชื้อ *B. cereus* ในนม พบว่าโปรตีนในนมมีผลต่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ลดลง (Pol *et al*. 2001) และการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ของอาหารประเภทไขมันจะออกฤทธิ์ได้น้อยกว่าในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำ เนื่องจากไขมันสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ได้ดีกว่าน้ำ (Mejlholm and Dalgaard, 2002) แต่ในขณะที่อาหารพวกคาร์โบไฮเดรตไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารต้านจุลินทรีย์เท่ากับอาหารประเภทโปรตีนและไขมัน ซึ่งมีรายงานการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเสจสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, *S.* typhmurium และ *Pseudomonas* spp. ในข้าวได้ดีกว่าในไก่และในอาหารประเภทเนื้อ (Shelef *et al*., 1984) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษา พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *B. cereus* ในข้าวหุงสุกได้ทั้งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4ºC หลังจากเก็บไว้ 5 และ 15 วัน ตามลำดับ (Jaisai and Lamlertthon, 2007) Gill และคณะ (2002) และ Fisher และ Phillips (2006) มีรายงานการศึกษา ส่วนประกอบของสารอาหารในอาหารสามารถซ่อมแซมเซลล์ที่เป็นอันตรายได้เร็วและดีกว่าในหลอดทดลอง ในผลการทดลองนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในอาหารอาหารที่มีส่วนประกอบพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน พบว่าสารสกัดไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* นอกจากนี้จะเห็นว่าไม่เพียงแต่ปัจจัยภายในส่วนประกอบของลักษณะอาหารที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ และปัจจัยภายนอกของอาหารก็มีผลต่อการออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกัน เช่น อุณหภูมิ ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย และ การบรรจุผลิตภัณฑ์ เป็นต้น (Burt, 2004) การออกฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และจากผลการทดลอง พบว่าที่อุณหภูมิ 37ºC สารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 6ºC เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้ช่วงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยเซลล์มีการแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ส่งผลให้สารสกัดที่อยู่ในอาหารนั้นสามารถแพร่ไปยังส่วนประกอบของเซลล์ และรบกวนเอนไซม์ต่าง ๆ ทำให้เซลล์ไม่สามารถทำงานได้ (Buchanan *et al*., 2002) ที่อุณหภูมิต่ำๆ พบว่าเซลล์หยุดการเจริญเติบโต ทำให้สารต้านจุลินทรีย์ไม่สามารถแทรกซึมไปยังเซลล์ได้ ซึ่งปัจจัยที่ควบคุมการหยุดการเจริญเติบโตมี 2 ปัจจัย คือ ปฏิกิริยาการสร้างเอนไซม์ของเซลล์ลดช้าลง และสารเหลวของ cytoplasmic membrane ลดลงทำให้เกิดการรบกวนกลไกการส่งขนพลังงานในเซลล์

(Mossel *et al*., 1995) และส่วนใหญ่เมื่อลดอุณหภูมิ การตอบสนองของเซลล์จะลดลง โดยชักนำให้โปรตีนที่ปกป้องเซลล์ที่เป็นอันตรายอยู่ในสภาวะช็อก (cold shock proteins) (Lee, 2003) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษา พบว่าสารต้านจุลินทรีย์ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่อุณหภูมิ 37ºC ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 15ºC และ 5ºC (Abriouel *et al*., 2002) จะเห็นได้ว่าจากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบจากใบกระทุที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ (256-1024 µg/ml) สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์และเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในอาหารได้ ซึ่งถ้าหากจะนำไปพัฒนาเป็นสารชีวภาพในอาหารควรพิจารณาและมีการทดสอบความเป็นพิษ (Tocixity) ของสารสกัดด้วย

จากผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบกระทุมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ที่ดีมากทั้งในหลอดทดลองและประยุกต์ในอาหาร จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดหยาบ และ สารบริสุทธิ์ rhodomyrtone จากใบกระทุทำการศึกษาต่อไป เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการพัฒนาเป็นสารชีวภาพในการควบคุม *B. cereus* ในอาหารต่อไป

บทที่ 5

สรุป

1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากใบกระทุต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* เบื้องต้น พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ทุก isolates ที่ทดสอบ โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (inhibition zones) อยู่ในช่วง 10.50-17.20 mm.

2. สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากใบกระทุมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหาร ที่ค่า MIC อยู่ในช่วง 16-64 µg/ml และ ค่า MBC อยู่ในช่วง 32-256 µg/ml

3. สารสกัดบริสุทธิ์จากใบกระทุมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากอาหารที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5 µg/ml และค่า MBC อยู่ในช่วง 2-8 µg/ml

4. สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเซลล์และเอนโดสปอร์ในระยะงอกของ *B. cereus* ได้ทั้งในหลอดทดลองที่ค่าความเข้มข้น MIC 2MIC และ 4MIC และในขณะที่เมื่อทดสอบในอาหารที่ค่าความเข้มข้น 8MIC 16MIC และ 32MIC

5. จากผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์จากใบกระทุมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ที่ดีมากทั้งในหลอดทดลองและประยุกต์ในอาหาร จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัด และ สาร rhodomyrtone จากใบกระทุ ทำการศึกษาต่อไปเพื่อใช้เป็นทางเลือกในการพัฒนาเป็นสารชีวภาพในการควบคุม *B. cereus* ในอาหารต่อไป

รายการเอกสารอ้างอิง

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญา, 2548. คู่มือศึกษาพันธุ์พืชป่า เล่มที่ 2. ชุมนุมการเกษตรแห่งประเทศไทย: กรุงเทพฯ

Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martı´nez-Bueno, M. and Valdivia, E., 2002. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1473–1477.

Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. and Isobe, M. 1994. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol Lett. 121: 31–34.

Agata, N., Ohta, M. and Yokoyama, K. 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. Int J Food Microbiol. 73: 23–27.

Ahn, J., Grün, I. U. and Mustapha, A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. Food Microbiol. 24: 7–14.

Alfaro, D.V., Davis, J., Kim S., Bia, F. and Bogard J.F., Briggs, J.W., Liggett P.E.1996. Experimental *Bacillus cereus* posttraumatic endophthalmitis and treatment with ciprofloxacin, Br. J. Ophthalmol. 80: 755–758.

Alzoreky, N. S. and Nakahara, K. 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Int. J. Food Microbiol. 80: 223-30.

Andersson, A., Granum, P.E. and Ronner, U. 1998. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. Int. J. Food Microbiol. 39: 93-99.

Banerjee, M. and K. P. Sarkar. 2004. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. Food Microbiol. 21: 335-342.

Bartoszewicz, M., Hansenb, B. M. and Swiecicka, I. 2008. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiol. 25: 588-596.

Beattie, S.H. and Williams, A.G. 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. Lett Appl Microbiol. 28: 221-225.

Beecher, D.J. 2002. The *bacillus cereus* group. In: sussman M (ed). Molecular Medical Microbiology. London, UK: Acadamic Prees. 1161-1190.

Beuchat, L. R., Clavero, M. R. and Jaquette, C. B. 1997. Effects of nisin and temperature on survival, growth, and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1953-1958.

Brewer, M. S. and Prestat, C. J. 2002. Consumer attitudes toward food safety issues. J. Food Safety. 22: 67-83.

Brewer, M. S. and Rojas, M. 2008. Consumer attitudes toward issues in food safety. J. Food Safety. 28: 1-22.

Buchanan, R. L., Whiting, R. C. and Golden, M. H. 2002. Modeling acid inactivation of foodborne microorganisms In V. K. Juneja and J. N. Sofos, (eds). Control of foodborne microorganisms. Marcel Dekker, New York, NY.

Burt, s. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223–253.

Busatta, C., Vidal, R.S., Popiolski, A.S., Mossi, A.J., Dariva, C., Rodrigues, M.R.A., Corazza, F.C., Corazzaa, M.L., Vladimir Oliveiraa, J. and Cansian, R.L. 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiol. 25: 207–211

Carlin, F., Guinebretiere, M. H. Choma, C., Pasqualini, R., Braconnier, A. and Nguyen-the, C. 2000. Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purées. Food Microbiol. 17: 153-165.

Ceylan, E. and Fung, D. Y. C. 2004. Antimicrobial activity of spices. J. Rapid Methods Autom. Microbiol. 12: 1-55.

Chen, J. J., Fei,D.Q., Chen,S.G. and Gao, K. 2008. Antimicrobial Triterpenoids from *Vladimiria muliensis*. J. Nat. Prod. 71: 547-550.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans,N., Totté, J., Pieters, L. and Vlietinck, A.J., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J. Ethnopharmacology. 79: 213–220.

Citron, D. M. and Appleman, M. D. 2006. In Vitro Activities of Daptomycin, Ciprofloxacin, and Other Antimicrobial Agents against the Cells and Spores of Clinical Isolates of *Bacillus* Species. J. Clin Microbiol. 44: 3814–3818.

Claus D, Berkeley RCW. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, et al. (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Baltimore, Williams and Wilkins: 1105–1139.

Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C. and Schmitt, P. 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. J Appl Microbiol. 97: 214–219.

Clavel, T., Carlin, F., Dargaignaratz, C., Lairon, D., Nguyen-The, C. and Schmitt, P. 2007. Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media. J Appl Microbiol. 103: 1568–1575.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006a. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, Ninth edition, CLSI Document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006b. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, Seventh edition, CLSI Document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Daniels, N.A., MacKinnon, L., Rowe, S.M., Bean, N.H., Griffin, P.M.and Mead, P.S. 2002. Foodborne disease outbreaks in United States schools. Pediatr. Infect. Dis. J. 21: 623–628.

de Carvalho, A.A.T., Costa, E.D., Mantovani, H.C. and Vanetti, M.C.D. 2007. Effect of bovicin HC5 on growth and spore germination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from spoiled mango pulp. J. Appl. Microbiol. 102: 1000-100

Degaldo, B., Fernández, P.S., Palop, A. and Periago, P. M. 2004. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. J. Food Microbiol. 21: 327–334.

Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International J. Food Microbiol. 74: 101–109.

De la rosa, M.C., Mosso, M.A., Garcia, M.L. and Plaza, C. 1993. Resistance to the antimicrobial agents of bacteria isolated from non-sterile pharmaceuticals. J. Appl. Bacteriol. 74: 570-577.

Del Torre, M., Della Corte, M. and Stecchini, M.L. 2001. Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. Int. J. Food Microbiol. 63: 199-207.

Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. Food Microbiol. 21: 703–714.

Drewes, S.E., Mudau, K.E., van Vuuren, S.F. and Viljoen, A.M. 2006. Antimicrobial monomeric and dimeric diterpenes from the leaves of *Helichrysum tenax var tenax*. J. Phytochemistry. 67: 716-722.

Dorman, H. J. and Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88: 308-316.

Ehling-Schulz, M., Fricker, M. and Scherer, S. 2004. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. FEMS. Microbiol Lett. 232: 189-195.

Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nat Rev Microbiol. 1: 117-126.

European Food Safety Authority (EFSA). 2006. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. EFSA J. 94: 2–228.

Fazeli, M. R., Amin, G., Attari, M. M. A.,Ashtiani,H., Jamalifar, H. and Samadi, N. 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (Zataria *multiflora*) against some food-borne bacteria. Food Control. 18: 646–649.

Finlay, W.J., Logan, N.A. and Sutherland, A.D. 1999. Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. Appl Environ Microbiol 65: 1811–1812.

Fisher, K. and Phillips, C.A. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of C*ampylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus in vitro* and in food systems. J. Appl Microbiol. 101: 1232–1240

Gigantelli, J.W., Torres Gomez, J. and Osato, M.S. 1991. In vitro susceptibilities of ocular *Bacillus cereus* isolates to clindamycin, gentamicin, and vancomycin alone or in combination. J. Antimicrob Agents Chemother. 35: 201-202.

Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P.and Holley, R.A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. Int. J. Food Microbiol. 73: 83–92.

Glass, K.A. and Johnson, E.A. 2004. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. Food Microbiol. 21: 675–682.

Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N.B., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Martinez-Canamero, M. and Galvez, A. 2006. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. Int. J. Food Microbiol. 106: 185-194.

Granum, P.E. 2001. *Bacillus cereus*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology. Fundamentals and Applications, (2nd edition),pp. 373–381, ASM Press, Washington, DC.

Granum, P. E. 2007. *Bacillus cereus*. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers (Doyle MP & Beuchat LR, eds), pp. 445–455. ASM Press, Washington, DC.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. Int. J. Food Microbiol. 124: 91–97.

Güven, K., Mutlu, M. B. and Avci, O. 2006. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey. J. Food Safety. 26: 30-40.

Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm,T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. and Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agricultural and Food Chem. 46:, 3590–3595.

.

Haque, A. and Russell, N. J. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice. Int. J. Food Microbiol. 98: 23-34.

Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V. and Gelman, A. 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). J. Food Protect. 66: 410–417.

Hernández-Herrero, L.A., Giner, M.J. and Valero, M. 2008. Effective chemical control of psychrotrophic *Bacillus cereus* EPSO-35AS and INRA TZ415 spore outgrowth in carrot broth. Food Microbiol. 25: 714–721.

Holley, R.A. and Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22: 273–292.

Hou, A.J., Wu, Y.J. and Liu, Y.Z. 1999. Flavones glycosides and ellagitannin from downy rosemyrtle (*Rhodomyrtus tomentosa*). Zhongcaoyao. 30: 645-648.

Huang, X., Z. Lu, X. Bie, F. Lu, H. Zhao and S. Yang.2007. "Optimization of inactivation of endospores of Bacillus cereus by antimicrobial lipopeptides from Bacillus subtilis fmbj strains using a response surface method. Appl Microbiol Biotechnol. 74: 454-61.

Hui, W.H. and Li, M.M. 1976. Two new triterpenoids from *Rhodomyrtus tomentosa*. Phytochemistry. 15: 1741-1743.

Hui, W.H., Li, M.M. and Luk, K. 1975. Triterpenoids and steroids from *Rhodomyrtus tomentosa*. Phytochemistry. 14: 833-834.

Iurlina, M. O., Saiz, A. I., Fuselli, S. R. and Fritz, R.2006. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. LWT. 39: 105-110.

Jaisai, N. and Lamlertthon, S. 2007. Inhibition Effects of Kaffir Lime's Peel Oil on *Bacillus cereus* in Cooked rice. Naresuan University Journal. 15: 195-203.

Jensen, L.B., Baloda, S., Boye, M. and Aarestrup, F.M. 2001. Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. J. Environ Int. 26: 581-587.

Kalemba, D. and Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr. Med. Chem. 10: 813-829.

Kim, J., Marshall, M. R. and Wei, C. 1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. J Agric Food Chem. 43: 2839-2845.

Konning, G.H., Agyare, and C., Ennison, B. 2004. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. Fitoterapia 75: 65–67.

Kotiranta, A., Lounatmaa, K. and Haapasalo, M. 2000. Epidemiology and pathogenesis

of *Bacillus cereus* infections. Microbes Infect. 2: 189–198.

Kotzekidou, P., Giannakidis, P. and Boulamatsis, A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. LWT. 41. 119–127.

Kramer , J. and Gilbert, R. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* sp. In: Doyles M.P. (editor), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, New York and Basel. 21-70.

Kwon,J.A., Yu,C.B.and Park, H.D. 2003. Bactericidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. Lett. Appl. Microbiol. 37: 61–65.

Lado, B.H. and Yousef, A.E. 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. Microbes Infect. 4: 433–440.

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. J Appl Microbiol. 91: 453–462.

Lateef, A., Oloke, J. K. and Gueguimkana, E. B. 2005. The prevalence of bacterial resistance in clinical, food, water and some environmental samples in Southwest Nigeria. Environ Monit Assess. 100: 59-69.

Lee, K. 2003. Cold shock response in *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*: a comparison of the protection generated by brief pre-treatment at less severe temperatures. *Process Biochem*. 39: 2233-2239.

Limsuwan, S. and Voravuthikunchai, S. P. 2008. *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Eleutherine americana* Merr. and *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as

antibiofilm producing and antiquorum sensing in *Streptococcus pyogenes*. FEMS Immunol Med Microbiol. 53: 429-436.

Liu, Y.Z., Hou, A.J., Ji, C.R. and Wu, Y.J. 1997. A new C-glycosidic hydrolyzable tannin from *Rhodomyrtus tomentosa*. Chinese Chemical Letters. 8: 39-40.

Liu, Y.Z., Hou, A.J., Ji, C.R. and Wu, Y.J. 1998. Isolation and structure of hydrolysable tannins from *Rhodomyrtus tomentosa*. Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa. 10: 14-19.

Logan, N., and Turnbull P.C.B. 2003. *Bacillus* and other aerobic endosporeforming bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH *et al*., eds. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. Washington, DC: American Society for Microbiology. 445–60.

Lorian, V. 1996. Antibiotic in Laboratory Medicine. 4th ed. Williams and Wilkins: Baltimore.

Luna, V. A., King, D. S., Gulledge, J., Cannons, A.C., Amuso, P.T. and Cattani, J. 2007. Susceptibility of *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre® automated microbroth dilution and Etest® agar gradient diffusion methods. J. Antimicrob Chemother. 22: 1-13.

Lund, T., De Buyser, M.L., and Granum, P.E. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol Microbiol. 38: 254–261.

Matasyoh, C.J., Kiplimo, J.J., Karubiu, M.N. and Hailstorks, P.T. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphorates*. 101: 1183-1187.

Mejlholm, O. and Dalgaard, P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. Lett Appl Microbiol. 34: 27– 31.

Mikkola, R., Saris N.E., Grigoriev, P.A., Andersson, M.A. and Salkinoja-Salonen, M.S. 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. Eur J Biochem. 263: 112–117.

Moir, A. 2003. Bacterial spore germination and protein mobility. Trends Microbiol. 11: 452–454.

Mossel, D. A. A., J. E. L. Corry, C. B. Struijk, and R. M. Baird. 1995. Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies, p. 699. John Wiley and Sons, Chichester, England.

Muthukumarasamy, P., Han, J.H.and Holley, R.A., 2003. Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *E. coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. J. Food Protect. 66:2038–2044.

Nasar-Abbas, S. M. and Halkman, A. K. 2004. Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. Int. J. Food Microbiol. 97: 63-69.

Nel, S., Lues, J.F.R., Buys, E.M. and Venter, P. 2004. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. Meat Sci. 66: 667–674.

Notermans, S. and Batt, C.A. 1998. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. Symp Ser Soc Appl Microbiol. 27: 51S-61S.

Nychas, G. J. E. 1995. Natural antimicrobials from plants. In New Methods of Food Preservation; Gould, G. W., Ed.; Blackie Academic & Professional: London, 58-89.

Özcan, M. and Erkmen, O. 2001. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. Eur Food Res Technol. 212: 658-660.

Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M. S. and Timonen, T. 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. Clin Exp Immunol. 129: 420-428.

Pol, I.E., Mastwijk, H.C., Slump, R.A., Popa, M.E. and Smid, E.J. 2001. Influence of food matrix on inactivation of B*acillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. J. Food Prot. 64: 1012– 1018.

Pol, I.E., Willy, G.C., van Arendonk, W.G.C., Mastwijk, H.C., Kromer, J.,Smid, E.J. and Moezelaar, R. 2001. Sensitivities of germinating spores and carvacrol-adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed-electric-field treatment. Applied and Environmental Microbiology 67: 1693–1699.

Prajapati, R.S. and Cutting, S.M. 2002. Spore and sporulation and germination. In In: Sussman, M. (ed.) Molecular Medical Microbiology, San Diego, CA: Academic, pp. 199–208.

Rahaman, A., Sayeed, A., Islam, A. and Chowdhury, D. 2002. Characterization and Biological Screening of a triterpenoids from *Nympoides cristatum.* Biological Sciences. 2: 46-48.

Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Ombregt, S.A., Jääskeläinen E, Salkinoja-Salonen, M. and Debevere, J. 2006. Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. J Food Prot. 69: 847–852.

Reyes, J. E., Bastías, J. M., GutiÉrrez, R.M. and Rodríguez, M.O. 2007. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. Food Microbiol. 24: 1-6.

Rhodehamel, J.E. and Harmon, S.M. 2001. *Bacillus cereus*. Bacteriological analytical manual online, Chapter 14.

Rojas, J.J., Ochoa, V. J., Ocampo, S. A. and Munoz, J. F. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. BMC Complement Altern Med. 6: 1-6.

Rosenquist, H., Smidr, L., Andersen, S.R., Jensen, G.B. and Wilcks, A. 2005. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. FEMS Microbiol Lett. 250: 129-136.

Rusul, G. and Yaacob, N. H. 1995. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. Int. J. Food Microbiol. 25: 131-139.

Saising, J., Hiranrat, A., Mahabusarakam, W., Ongsakul, M. and Voravuthikunchai, S.P. 2008. Rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as a Natural Antibiotic for Staphylococcal Cutaneous Infections. J. Health Science. 54: 589-595.

Salni, D., Sargent, M. V., Skelton, B. W., Soediro, I., Sutisna, M., White, A. H. and Yulinah, E. 2002. Rhodomyrtone, an antibiotic from *Rhodomyrtus tomentosa*. Aust. J. Chem. 55: 229-232.

Schaedler, R.W., Dubos, R. and Costello, R. 1965. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. J. Exp.Med. 122: 59–66.

Schlegelova, J., Brychta, J., Klimova, E., Napravnikova, E. and Babak, V. 2003. The prevalence of and resistance to antimicrobial agents of *Bacillus cereus* isolates from foodstuffs. Vet. Med.-Czech. 11: 331–338.

Schoeni, J.L. and Wong, A.C. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. J. Food Prot. 68: 636–648.

Serra, A. T., Matias, A. A., Nunes, A. V. M., Leitão, M.C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M. T., Romão, M. V. S. and Duarte, C.M. 2008. *In vitro* evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. Innovative Food Science & Emerging Technol. 9: 311–319.

Setlow, P. 2003. Spore germination. Curr Opin Microbiol. 6: 550–556.

Shaheen. R., Andersson, M.A., Apetroaie, C., Schulz, A., Ehling-Schulz, M., Ollilainen, V.M. and Salkinoja-Salonen, M.S. 2006 Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Int J Food Microbiol. 107: 287–294.

Shahidi bonjar, G. H., Nik, A. K.,Heydari, M. R.,Ghasemzadeh, M. H.,Farrokhi, P.R., Moein, M. R., Mansouri, S. and Foroumadi, A. 2003. Anti-Pseudomona and Anti-Bacilli activity of some medicinal plant of Iran. Daru. J. 4:157-163.

Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D. and Corke, H. 2007. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. J. Agric. Food Chem. 55: 5484-5490.

Shelef, L.A., Jyothi, E.K.and Bulgarelli, M.A. 1984. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. J.Food Sci. 49: 737–740.

Shinagawa, K., Konuma, H., Sekita, H. and Sugii, S. 1995. Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett. 130: 87–90.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol. 18: 463– 470.

Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. and Granum, P.E. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS. Microbiol Rev. 32: 579-606.

Takahashi, T., Kokubo, R. and Sakaino, M. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. Lett Appl Microbiol. 39: 60-64.

Taylor, J.M., Sutherland, A.D., Aidoo, K.E. and Logan, N.A. 2005. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. FEMS Microbiol Lett. 242 : 313-317.

Todar, K. 2006. Todar's online book of bacteriology. Available at. http://textbookofbacteriology.net/*B.cereus*.html. Accessed March 14, 2007.

Turnbull, P.C.B., Sirianni, N.M. and LeBron, C.I. 2004. MICs of selected antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* from a range of clinical environmental sources as determined by the Etest. J Clin Microbiol. 42: 3626–3634.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A. and Smid, E.J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Archives of Microbiology. 174 : 233– 238.

Ultee, A. and Smid, E.J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus.* Int. J. Food Microbiol. 64: 373-378

Valero, M. and Francés, E. 2006. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. Food Microbiol. 23: 68-73.

Valero, M. and Giner, M. J. 2006. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. Int. J. Food Microbiol. 106: 90 - 94.

Valero, M., Hernández-Herrero, L. A., Fernández, P.S. and Salmero, M.C. 2002. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. Food Microbiol. 19: 491-499.

Valero, M., Hernandez-Herrero, L. A. and Giner, M.J. 2007. Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* Strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. Food Microbiol. 24: 671-677.

Voravuthikunchai, S.P. and Kitpipit, L. 2005. Antibacterial activity of crude extracts of Thai medicinal plants against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Songklanakarin J.Sci. Technol. 27: 525-534.

Voravuthikunchai, S. P., Limsuwan, S. and Chusri, S. (2007) New Perspectives on Herbal Medicines for Bacterial Infections. In *Recent Progress in Medicinal Plants*, Vol.18: Natural Products II (Govil, G. N., Singh, V. K. and Siddqui, T., Eds.), Stadium Press, LLC, Houston, Texas, U.S.A., pp. 41-101.

Weber, D.J., Saviteer, S.M., Rutala, W.A. and Thomann, C.A. 1988. In vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 32: 642-645.

Winotai, A., Wright, T. and Goolsby, J.A. 2005. Herbivores in Thailand on *Rhodomyrtus tomentosa* (Myrtaceae), an invasive weed in Florida. Florida Entomologist. 88: 104-105.

Zhou, G., Liu, H., He, J., Yuan, Y. and Yuan, Z. 2008. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. Int. J. Food Microbiol. 121: 195 – 200.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Brain Heart Infusion broth

ส่วนประกอบ	Calf Brains, Infusion from 200 g	7.7 g
	Beef Heart, Infusion from 250 g	9.8 g
	Proteose Peptone	10.0 g
	Sodium Chloride	5.0 g
	Disodium Phosphate	2.5 g
	Distilled water	1000.0 ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 37 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml ละลายส่วยผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที

Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar

ส่วนประกอบ	Meat extract	1.0 g
	Peptone from casein	10.0 g
	D-mannitol	10.0 g
	Sodium chloride	10.0 g
	Phenol red (1% solution ใน 95% ethanol)	0.025 g
	Agar	12.0 g
	Distilled water	900.0 ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 43 g ต่อน้ำกลั่น 900 ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50ºC แล้วเติม polymyxin B solution 2.5 ml และ egg yolk 50% 12.5 ml ต่ออาหาร 225 ml

Motility medium

ส่วนประกอบ	Dextrose	5.0 g
	Trypticase	10.0 g
	Yeast extract	2.5 g
	Na_2HPO_4	2.5 g

	Agar	3.0 g
	Distilled water	1000.0 ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 108 g ต่อน้ำกลั่น 900 ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที ตั้งให้เย็นที่ อุณหภูมิ 50ºC

Mueller-Hinton Agar (MHA)

ส่วนประกอบ	Beef extract	300.0	g
	Casamino acids technical	17.5	g
	Starch	1.5	g
	Agar	15.0	g
	Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 38.0 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที

Mueller-Hinton Broth (MHB)

ส่วนประกอบ	Beef extract	300.0	g
	Bacto Casamino acids technical	17.5	g
	Bacto soluble starch	1.5	g
	Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 21.0 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที

Nitrate broth

ส่วนประกอบ	Beef extract	3.0	g
	Peptone	5.0	g
	KNO_3 (nitrite-free)	1.0	g
	Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม ละลายส่วยผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที

Nutrient Agar (NA)

ส่วนประกอบ	Beef extract	3.0	g
	Peptone	5.0	g
	Agar	15.0	g
	Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 23.0 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที

Nutrient broth (NB)

ส่วนประกอบ	Beef extract	3.0	g
	Peptone	5.0	g
	Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 8.0 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที

Trypticase soy- blood agar

ส่วนประกอบ	Trypticase peptone	15.0	g
	Phytone peptone	5.0	g
	Sodium chloride	5.0	g
	Agar	2.5	g
	Distilled water	950.0	ml

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 30.0 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที ตั้งให้เย็นที่ อุณหภูมิ 50ºC เติมเลือดปริมาตร 50 ml

ภาคผนวก ข

1. น้ำยาทดสอบ Catalase

35% H_2O_2	8.6 ml
Distilled water	1000.0 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชาแล้วแช่ตู้ยืน

2. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีกรัม

2.1 Crystal violet

สารละลาย A : ละลาย crystal violet 2.0 g ใน 95% ethyl ethanol ปริมาตร 20 ml

สารละลาย B : ละลาย ammonium oxalate 0.8 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 ml

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองได้เป็น crystal violet staining reagent

2.2 95% ethyl ethanol

2.3 Gram iodine

บด iodine 1.0 g และ potassium iodine 2.0 g เข้าด้วยกัน แล้วค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไปผสมจนกระทั่ง iodine ละลาย เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml เก็บไว้ในขวดสีชา

2.4. Safranin

ละลาย safranin O 2.5% (w/v) ใน 95% ethyl ethanol ปริมาตร 10 ml เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

3. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีเอ็นโดสปอร์

3.1 Malachite green

ละลาย malachite green 10.0 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

3.2 Safranin 0

ละลาย safranin O 0.25 g ในน้ำกลั่น ปริมาตร 20 ml

4. 0.85% Normal Saline Solution

Sodium chloride	0.85	g
Distilled water	100	ml

วิธีเตรียม ละลาย Sodium chloride ในน้ำกลั่นแล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที

5. McFarland standard

วิธีเตรียม

นำ H_2SO_4 1% v/v ผสมกับ $BaCl_2.2H_2O$ 1.175% w/v จะได้ตะกอนขาวขุ่นของ $BaSO_4$ อัตราส่วนของ H_2SO_4 1% และ $BaCl_2.2H_2O$ 1.175% เพื่อเตรียม McFarland standard หมายเลขต่างๆ ดังตาราง

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx. cell density ($X10^8$/mL)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ภาคผนวก ค

ค่า Inhibition zone (mm), ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของสารสกัดจากใบกระทุ่ต่อ *Bacillus cereus*