

ความสามารถและกลไกของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* Antimicrobial Activity and Mechanism of Thymol against *Listeria monocytogenes*

ปาริชาติ พุ่มขจร* พิชญทัฬห์ โทธม และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ

Parichat Phumkhachorn* Pitchayaton Thothom and Pongsak Rattanachaiunsopon

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

*E-mail: scpariph@gmail.com

Received: Nov 22, 2021

Revised: Feb 12, 2022

Accepted: Mar 21, 2022

บทคัดย่อ

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียก่อโรคลิสเทอริโอซิส ซึ่งสามารถติดต่อสู่คนโดยการกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน ความปลอดภัยและผลกระทบต่อสุขภาพของการใช้สารเคมีถนอมอาหารเพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารยังเป็นเรื่องที่ต้องพิจารณา ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะหาสารจากธรรมชาติที่ปลอดภัย เช่น ไทมอล มาใช้แทนสารเคมี การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถและกลไกของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* จากการใช้วิธี swab paper disc พบว่าไทมอลสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* และเมื่อใช้วิธี broth dilution assay พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไทมอลที่สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* มีค่าเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ เมื่อนำเซลล์ของ *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วยไทมอลไปเลี้ยงบนอาหาร BHI พบว่าเซลล์ดังกล่าวไม่สามารถกลับมาเจริญได้อีก แสดงว่าไทมอลมีกลไกการยับยั้งเชื้อแบบทำให้เซลล์ตาย จากการนำเซลล์ของ *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วยไทมอลไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าไทมอลสามารถทำให้เกิดความเสียหายกับผิวเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบว่าเซลล์ของ *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วยไทมอลมีการรั่วไหลของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนออกจากเซลล์ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไทมอลมีศักยภาพที่จะนำมาใช้แทนสารเคมีถนอมอาหารเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในอาหาร

คำสำคัญ: สารถนอมอาหาร ลิสเทอริโอซิส ไทมอล ความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์

Abstract

Listeria monocytogenes is a bacterial pathogen causing listeriosis. It is transmitted to humans through the consumption of contaminated foods. Safety and impact on human health of chemical preservatives for preventing the growth of microorganisms in foods is still under discussion. Thus, there is an attempt to find natural substances such as thymol as alternatives to chemical food preservatives. This study aimed to examine antimicrobial activity and mode of action of thymol against *L. monocytogenes*. By swab paper disc method, it was found that thymol had ability to inhibit *L. monocytogenes*. By broth dilution assay, the minimal inhibitory concentration of thymol against *L. monocytogenes* was found to be 1 mM. Thymol treated cells of *L. monocytogenes* could not grow on fresh BHI media, indicating that thymol had bactericidal effect on *L. monocytogenes* cells. Scanning electron microscope revealed that cell surface of *L. monocytogenes* was damaged by thymol. This result is in agreement with the finding showing the leakage of nucleic acids and proteins from thymol treated *L. monocytogenes* cells. This study suggests that thymol has potential to be an alternative to chemical food preservatives to control contaminated *L. monocytogenes* in foods.

Keywords: Food preservatives, Listeriosis, Thymol, Antibacterial activity

1. บทนำ

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแบบแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลา (flagella) ที่มีอยู่รอบตัวเซลล์ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่มีเลือดเป็นส่วนประกอบ (blood agar) จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างสมบูรณ์ (β -hemolysis) *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ทั้งในคนและสัตว์ สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ พืชและสัตว์ เชื้อนี้ชอบเจริญในสภาวะที่มีความชื้น และยังสามารถเจริญได้แม้ในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ เมื่อคนกินอาหารที่มี *L. monocytogenes* ปนเปื้อนสามารถป่วยเป็นโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า ลิสเทอริโอซิส (listeriosis) [1] ผู้ติดเชื้อจะแสดงอาการภายในเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง หรือภายใน 2-3 วัน หลังจากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยการกิน อาการของโรคลิสเทอริโอซิสเป็นไปได้ทั้งแบบไม่รุนแรงและแบบรุนแรง โรคนี้หากเกิดกับเด็กเล็กหรือผู้สูงอายุที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ อาจทำให้เสียชีวิตได้ และหากเกิดกับหญิงตั้งครรภ์มักทำให้เกิดการแท้ง หรือความผิดปกติของทารก การติดเชื้อ *L. monocytogenes* สามารถป้องกันได้หลายวิธี เช่น การรักษาอนามัยส่วนบุคคล การรับประทานอาหารที่ผ่านการปรุงอย่างถูกสุขลักษณะ การถนอมอาหารอย่างถูกวิธี และการใช้สารกันเสียหรือสารกันบูด (food preservatives) เต็มลงในอาหารเพื่อช่วยการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหาร

สารกันเสียหรือสารกันบูดนับว่ามีบทบาทสำคัญอย่างมากในการรักษาอาหารให้มีความสดใหม่และช่วยยืดอายุของอาหารให้สามารถเก็บไว้ได้นานขึ้น นอกจากนี้สารกันเสียยังช่วยลดการเน่าเสียและป้องกันโรคติดเชื้อจากจุลินทรีย์ (โดยเฉพาะแบคทีเรีย ราและยีสต์) หน้าที่หลักของสารกันเสียคือ ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย และแบคทีเรียที่ก่อโรค และช่วยลดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ในอาหารเพื่อรักษาอาหารให้คงอยู่ในสภาพธรรมชาติหรือใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติให้มากที่สุด การถนอมอาหารโดยใช้สารเคมี (chemical preservation) นับเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้กันมาอย่างยาวนานและแพร่หลาย สารเคมีที่นิยมใช้ในอาหาร เช่น กรดซอร์บิก (sorbic acid) กรดเบนโซอิก (benzoic acid) สารไนเตรต-ไนไตรต์ (nitrate-nitrite) และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide) [2] อย่างไรก็ตามการใช้สารเหล่านี้ในการถนอมอาหารอาจส่งผลเสียหรืออันตรายต่อผู้บริโภคหากใช้ในปริมาณที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานหรือใช้ในปริมาณมากเกินไป ดังนั้น

ผลกระทบจากการใช้สารเคมีในการถนอมอาหารในแง่ของความปลอดภัยจึงยังเป็นสิ่งที่ต้องพิจารณาอย่างรอบคอบทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและกำลังได้รับความนิยมคือ การใช้สารกันเสียที่ได้จากธรรมชาติ (natural preservatives) [3] เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

ไทมอล (thymol) เป็นสารที่พบในน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซึ่งสกัดได้จากพืชหลายชนิดในวงศ์ Lamiaceae เช่น *Thymus vulgaris* หรือรู้จักกันโดยทั่วไปว่า ไทม์ (thyme) ไทมอลมีชื่อทางเคมีคือ 2-isopropyl-5-methylphenol และเป็นสารในกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์ (monoterpenoid) [4] คุณสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของไทมอลคือ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial activity) มีรายงานว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลากหลายชนิดทั้งแบคทีเรียก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร (food spoilage bacteria) และแบคทีเรียก่อโรค [5], [6], [7] ตลอดจนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (antifungal activity) นอกจากนี้ไทมอลยังมีคุณสมบัติอื่นที่น่าสนใจอีกหลายประการ เช่น ด้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) ด้านการเกิดมะเร็ง (anticarcinogenesis) และช่วยเพิ่มรสชาติของอาหาร [8], [9] ด้วยเหตุนี้ไทมอลจึงจัดเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติและถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี การเติมไทมอลลงในอาหารนอกจากจะช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และช่วยยืดอายุของอาหารแล้ว ยังช่วยปรุงแต่งกลิ่น/รส และช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่อาหารได้อีกทางหนึ่งด้วย ทั้งนี้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหารทั้งในยุโรปและสหรัฐอเมริกาต่างก็ยอมรับการเติมไทมอลลงในอาหาร โดยองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; FDA) จัดว่าไทมอลเป็นสารที่ปลอดภัยต่อการบริโภค (generally recognized as safe; GRAS) [10]

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* โดยเริ่มจากการหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (minimal inhibitory concentration; MIC) ของไทมอลในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าว ศึกษากลไกของไทมอลในการยับยั้งแบคทีเรีย และผลของไทมอลต่อรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและการรั่วไหลขององค์ประกอบสำคัญภายในเซลล์ (กรดนิวคลีอิกและโปรตีน) ออกจากเซลล์

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. แบคทีเรียและการเพาะเลี้ยง

แบคทีเรียที่ใช้ คือ *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 เลี้ยงในอาหาร Brain Heart Infusion (BHI) medium และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียใช้กลีเซอรอล (glycerol) ผสมกับแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว (BHI broth) ในสัดส่วนของกลีเซอรอล : แบคทีเรีย เท่ากับ 20 : 80 (v/v) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2. การเตรียมสารละลายไทมอล

ไทมอลที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นของบริษัท HiMedia (India) การเตรียมสารละลายไทมอล (stock solution) ทำโดยใช้ 95% เอทานอล (ethanol) เป็นตัวทำละลาย โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ (mM) เก็บสารละลายไทมอลไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และหลีกเลี่ยงการถูกแสง

2.3. การศึกษาความสามารถของไทมอลในการยับยั้ง *L. monocytogenes*

การศึกษาความสามารถของไทมอลในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ทำโดยใช้วิธี swab paper disc ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เลี้ยง *L. monocytogenes* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีของเชื้อลงในหลอดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.9% sodium chloride; NaCl) ปลอดเชื้อและปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (sterile swab) จุ่มเชื้อในหลอดแล้วนำมาป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton (MH) agar นำแผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อ (sterile filter paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Schleicher & Schuell, New Hampshire, USA) วางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ป้ายแบคทีเรียไว้ หยดสารละลายไทมอล (stock solution) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกระดาษกรอง นำจานอาหารดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งมีลักษณะเป็นวงใส (inhibition zone) เกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรอง การทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ และในชุดการทดลองควบคุม (control) ใช้ 95% เอทานอลแทนสารละลายไทมอล

2.4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไทมอลในการยับยั้ง *L. monocytogenes*

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไทมอลในการยับยั้ง *L. monocytogenes* หรือการหาค่า MIC (minimal inhibitory concentration) ของไทมอลในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ทำโดยวิธี broth dilution assay ซึ่งมีวิธีการดังนี้ นำหลอดทดลองมา 8 หลอด เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MH (Mueller hinton) broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงไปในหลอด เติมสารละลายไทมอล (stock solution) และเติม *L. monocytogenes* (ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 McFarland) ลงไปในหลอด โดยปรับให้ความเข้มข้นสุดท้ายของไทมอลแต่ละหลอดมีค่าเท่ากับ 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 และ 0.015 มิลลิโมลาร์ และปรับปริมาณ *L. monocytogenes* ภายในหลอดให้มีค่าเท่ากันทุกหลอดคือ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร นำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญจากความขุ่น (turbidity) ของเชื้อภายในหลอด การทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ และในชุดการทดลองควบคุม (control) ใช้ 95% เอทานอลแทนสารละลายไทมอล

2.5. การศึกษากลไกการยับยั้ง *L. monocytogenes* โดยไทมอล

การศึกษากลไกการยับยั้ง *L. monocytogenes* โดยไทมอลทำโดยนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MH broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติม *L. monocytogenes* ลงไปให้มีปริมาณเชื้อในหลอดเท่ากับ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร เติมสารละลายไทมอลลงไปโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MIC จากนั้นนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตูดสารละลายในหลอดปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พร้อมทั้งใช้ลูป (loop) จุ่มสารละลายในหลอดดังกล่าวเชื้อ (streak) ลงบนจานอาหาร BHI agar นำอาหารทั้งสองชนิดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว หากไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย แสดงว่าไทมอลมีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียแบบทำให้เซลล์ตาย (bactericidal activity) แต่หากมีการเจริญของแบคทีเรีย แสดงว่าไทมอลมีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียแบบทำให้เซลล์หยุดการเจริญ (bacteriostatic activity) การทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ และในชุดควบคุมใช้ 95% เอทานอลแทนสารละลายไทมอล

2.6. การศึกษาผลของไทมอลต่อลักษณะของเซลล์ *L. monocytogenes* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษาผลของไทมอลต่อลักษณะของเซลล์ *L. monocytogenes* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) ทำโดยนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MH broth มาเติม *L. monocytogenes* ลงไปให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือละลายไทมอลลงไปให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC ส่วนในชุดการทดลองควบคุมใช้ 95% เอทานอลแทนน้ำเกลือละลายไทมอล หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียมากรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร นำเซลล์แบคทีเรียที่ติดอยู่บนแผ่นกระดาษกรองมาตรึง (fix) ด้วย 2.5% กลูutaraldehyde (glutaraldehyde) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยสารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate-buffered saline; PBS) (pH 7.2) 3 ครั้ง แล้วทำการดองน้ำออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยจุ่มเซลล์ในสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 30%, 50%, 70%, 80% และ 100% โดยแต่ละความเข้มข้นใช้เวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไปทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่องทำแห้งตัวอย่าง (Samdri PVT-3B Critical Point Dryer; Tousimis, USA) นำไปวางบนแท่นติดตัวอย่าง (stub) แล้วนำไปเคลือบด้วยทองคำ (gold) ก่อนนำไปศึกษาภายใต้กล้อง SEM (JEOL JSM-6010LV, Tokyo, Japan)

2.7. การศึกษาผลของไทมอลต่อการรั่วไหลของสารต่าง ๆ ออกจากเซลล์ *L. monocytogenes*

การศึกษานี้เป็นการศึกษาผลของไทมอลต่อการรั่วไหลของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนและออกจากเซลล์ทำดังนี้ เลี้ยง *L. monocytogenes* ใน BHI broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรีย (bacterial pellet) ไปล้างด้วย PBS และละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียใน PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไทมอลลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MIC บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) ไปตรวจวัดปริมาณกรดนิวคลีอิกและโปรตีน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD)

ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ การทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ และในชุดการทดลองควบคุมใช้ 95% เอทานอลแทนน้ำเกลือละลายไทมอล

3. ผลการวิจัย

3.1. การศึกษาความสามารถของไทมอลในการยับยั้ง *L. monocytogenes*

จากการศึกษาความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* โดยวิธี swab paper disc พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวโดยสังเกตจาก inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบแผ่น paper disc เมื่อหยดไทมอล 10 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MH agar ที่มี *L. monocytogenes* เจริญอยู่ (Figure 1) ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone มีค่าเท่ากับ 18 ± 0.2 มิลลิเมตร ไม่พบ inhibition zone รอบแผ่น paper disc ที่หยด 95% เอทานอล

3.2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไทมอลในการยับยั้ง *L. monocytogenes*

จากการหาค่า MIC ของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* โดยการนำไทมอลที่มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) จาก 2 ถึง 0.015 มิลลิโมลาร์ เติมน้ำในหลอดที่มีเชื้อ หลังจากบ่มและตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยดูจากความขุ่นภายในหลอดพบว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของไทมอลที่ไม่พบการเจริญของ *L. monocytogenes* ภายในหลอด คือ 1 มิลลิโมลาร์ (Figure 2) ดังนั้นค่า MIC ของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* จึงมีค่าเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์

3.3. การศึกษากลไกการยับยั้ง *L. monocytogenes* โดยไทมอล

เมื่อเติมไทมอลความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC ในหลอดที่มี *L. monocytogenes* แล้วนำไปบ่มข้ามคืน และนำของเหลวภายในหลอดย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง BHI broth และ BHI agar ซึ่งปราศจากไทมอล หลังจากบ่มข้ามคืนปรากฏว่าไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารทั้งสองชนิด แสดงว่าไทมอลมีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียแบบทำให้เซลล์ตาย (bactericidal activity)

3.4. การศึกษาผลของไทมอลต่อลักษณะของเซลล์ *L. monocytogenes* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เซลล์ *L. monocytogenes* ที่สัมผัสกับไทมอลที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC (1 มิลลิโมลาร์) และที่ไม่สัมผัสกับไทมอล (ใช้ 95% เอทานอลแทนไทมอล) หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาศึกษารูปร่างภายใต้กล้อง SEM พบว่า เซลล์ของ *L. monocytogenes* ที่สัมผัสกับไทมอลมีการเปลี่ยนแปลง คือ ผิวเซลล์ด้านนอกขรุขระ และมีจุดคล้ายรูกระจายตามผิวเซลล์ ในขณะที่ผิวด้านนอกของเซลล์ *L. monocytogenes* ที่ไม่สัมผัสกับไทมอลยังคงมีลักษณะเรียบ (Figure 3)

3.5. การศึกษาผลของไทมอลต่อการรื้อไหลของสารต่าง ๆ ออกจากเซลล์ *L. monocytogenes*

ในการศึกษาการรื้อไหลของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนออกจากเซลล์ *L. monocytogenes* ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็นสองชุดคือ ชุดควบคุมใช้ 95% เอทานอล และชุดทดสอบใช้ไทมอลที่มีความเข้มข้นเท่ากับ MIC หรือ 1 มิลลิโมลาร์ เติมนลงในเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ใน PBS และบ่มให้เซลล์ได้สัมผัสกับเอทานอลหรือไทมอลเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงเก็บ cell-free supernatant ของทั้งสองชุดการทดลองมาวิเคราะห์ปริมาณกรดนิวคลีอิกและโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₂₆₀ และ OD₂₈₀ ตามลำดับ ผลปรากฏว่า OD₂₆₀ และ OD₂₈₀ ของชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.04±0.01 และ 0.05±0.01 ตามลำดับ ส่วน OD₂₆₀ และ OD₂₈₀ ของชุดทดสอบมีค่าเท่ากับ 1.20±0.25 และ 2.23±0.37 ตามลำดับ (Table 1)

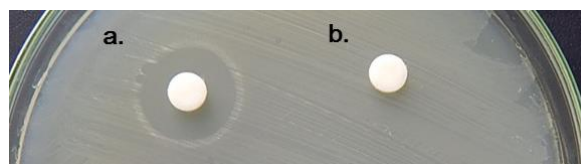


Figure 1 Antibacterial activity (inhibition zone) against *L. monocytogenes* by the swab paper disc method: (a) thymol; (b) 95% ethanol (control)

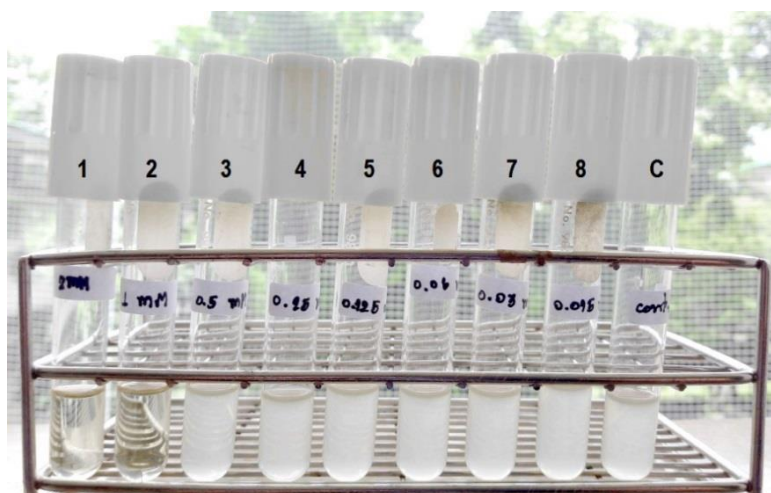


Figure 2 Broth dilution assay for determining of MIC of thymol against *L. monocytogenes*:

1 = 2 mM; 2 = 1 mM; 3 = 0.5 mM; 4 = 0.25 mM; 5 = 0.125 mM; 6 = 0.06 mM;
7 = 0.03 mM; 8 = 0.015 mM; C = control (95% ethanol)

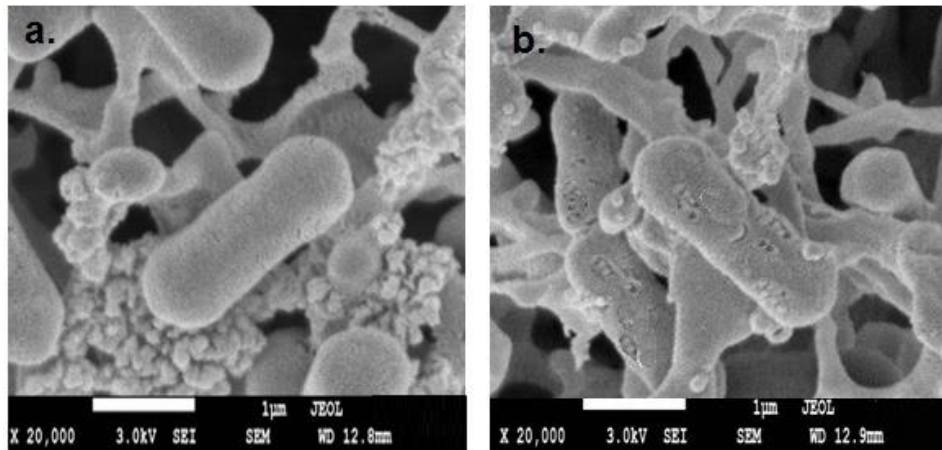


Figure 3 Scanning electron microscopy of *L. monocytogenes*:

(a) cells without treatment (b) cells treated with MIC (1 mM) of thymol

Table 1 The OD₂₆₀ and OD₂₈₀ in cell-free supernatants of *L. monocytogenes* after treating with thymol and with 95% ethanol. Data are expressed as mean±SD (n = 3).

Treatment	OD ₂₆₀ nm	OD ₂₈₀ nm
95% ethanol	0.04±0.01	0.05±0.01
MIC of thymol	1.20±0.25	2.23±0.37

4. อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าไทมอล ซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชในธรรมชาติสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ที่ผ่านมามีรายงานวิจัยเกี่ยวกับความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด Marino et al. [11] พบว่าไทมอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli*, *E. coli* O157: H7, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens* และ *P. putida* และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Micrococcus* spp., *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *B. thuringiensis* และ *Listeria innocua* Mith et al. [12] รายงานว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหาร เช่น *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* และ *E. coli* O157:H7 และยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสีย เช่น *Brochothrix thermosphacta* และ *P. fluorescens* Walczak et al. [13] พบว่าไทมอลช่วยลดการสร้างสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ของ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ที่มักเจริญอยู่บนพื้นผิวของวัสดุต่าง ๆ

ซึ่งนิยมใช้ในอุปกรณ์ทางการแพทย์และใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ของอาหาร Nostro et al. [14] รายงานว่าไทมอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียคือ methicillin และแบคทีเรียไวต่อ methicillin ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่า MIC ของไทมอลในการยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบคือแหล่งที่มาของพืชที่นำมาใช้สกัด เคยมีการศึกษาน้ำมันหอมระเหย (essential oil; EO) จำนวน 179 ตัวอย่างจากพืช 89 ชนิดมาหาค่า MIC ของ EO เหล่านั้นในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบสองชนิดคือ *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร พบว่าค่า MIC ของ EO ส่วนใหญ่ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวจะอยู่ในช่วง 6400 ถึง 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย MIC ของไทมอลจะอยู่ในช่วง 1600 ถึง 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งที่มาของไทมอล [14] เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้นมาเปรียบเทียบกับค่า MIC ของไทมอลในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ที่ได้จากการทดลองนี้ นับว่ามีความสอดคล้องกัน เพราะในการทดลองนี้ค่า MIC ของไทมอลมีค่าเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ หรือเท่ากับ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรซึ่งอยู่ในช่วงดังกล่าว การนำไทมอลไปใช้ในอาหารควรคำนึงถึงปริมาณที่เติมลงไปในการอาหารด้วย เนื่องจากไทมอล

เป็นสารที่มีกลิ่น (aroma compound) ทั้งนี้มีรายงานว่า หาก EO มีค่า MIC ต่ำกว่า 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ถือว่ามีปริมาณน้อยมากจนแทบจะไม่มีผลต่อกลิ่น ดังนั้นจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอาหารได้หลากหลายชนิด [14] EO ชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้เช่นเดียวกับ ไทมอล เช่น คาร์วาครอล (carvacrol) ยูจีนอล (eugenol) ซินนามาลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) และวานิลลิน (vanillin) [15]

ในการทดลองนี้ไทมอลที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC มีกลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบบทำให้เซลล์ตาย เพราะเมื่อนำ *L. monocytogenes* ที่สัมผัสกับไทมอลเป็นเวลาข้ามคืนไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไทมอล กลับไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย อาจกล่าวได้ว่าไทมอลที่ใช้ในการทดลองนี้มีค่า MIC เท่ากับค่า MBC (minimal bactericidal concentration) ทั้งนี้ค่า MIC และ MBC ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ Mith et al. [12] รายงานว่า MIC และ MBC ของไทมอลมีค่าเท่ากันสำหรับ *L. monocytogenes* NCTC 11994, *L. monocytogenes* S0580, *P. fluorescens* ATCC 13525 และ *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 แต่สำหรับ *E. coli* O157:H7 S0575 กลับพบว่าค่า MBC จะสูงกว่า MIC ถึง 2 เท่า ค่า MIC และ MBC ยังขึ้นอยู่กับรูปแบบการเจริญ (form) ของเซลล์แบคทีเรียด้วย Cai et al. [15] รายงานว่า MIC และ MBC ของไทมอลมีค่าเท่ากันสำหรับเซลล์ปกติ (vegetative form) ของแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารคือ *Alicyclobacillus acidoterrestris* แต่สำหรับในรูปแบบสปอร์ (sporulated form) ของเชื้อดังกล่าวค่า MIC และ MBC จะสูงขึ้นเป็น 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ค่า MIC ยังขึ้นอยู่กับโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียอีกด้วย แบคทีเรียแกรมบวกมักจะไว (sensitive) ต่อไทมอลมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ Trombetta et al. รายงานว่า MIC ของไทมอลสำหรับ *S. aureus* มีค่าต่ำกว่า MIC สำหรับ *E. coli* เกือบ 2 เท่า [16]

เมื่อนำเซลล์ *L. monocytogenes* ที่สัมผัสและที่ไม่ได้สัมผัสกับไทมอลมาศึกษาด้วยกล้อง SEM พบว่าไทมอลทำให้ผิวของเซลล์ *L. monocytogenes* ผิดปกติ แสดงว่าไทมอลน่าจะมิกไกบางอย่างที่ไปมีผลต่อผิวเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นผนังเซลล์ (cell wall) หรือเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD₂₆₀ และ OD₂₈₀) ใน cell-free supernatant หลังจากเซลล์ได้สัมผัสกับไทมอลเป็นระยะเวลาหนึ่ง ผลการทดลองที่ได้ยังช่วยยืนยันว่าไทมอล

น่าจะไปมีผลทำให้เกิดเซลล์รั่วหรือเซลล์แตกสลายในที่สุด จนสามารถตรวจวัดปริมาณกรดนิวคลีอิกและโปรตีนได้ใน cell-free supernatant แม้ว่าจะมีข้อมูลจำนวนมากที่สนับสนุนเกี่ยวกับฤทธิ์ของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่กลไกการออกฤทธิ์ (mode of action) ของไทมอลในการยับยั้งแบคทีเรีย ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด Xu et al. [17] กล่าวว่ากลไกการออกฤทธิ์ของไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* คือไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำให้การซึมผ่านสารเข้าและออก (membrane permeability) และความต่างศักย์ไฟฟ้า (membrane potential) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ Wang et al. [18] ได้ศึกษาผลของไทมอลต่อเซลล์ *S. aureus* พบว่าไทมอลที่ความเข้มข้นต่ำสร้างความเสียหายต่อกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ และไทมอลที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity) และยังไปจับกับดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (destabilization of DNA) Zhou et al. [19] เชื่อว่าไทมอลทำให้เกิดการตายของ *S. aureus* โดยไปจับกับเอนไซม์อัลโดคีโตรีดักเตส (aldo-keto reductase; AKR) และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ส่งผลให้ NADPH ภายในเซลล์ลดลงและเกิดการตายของเซลล์ในที่สุด

5. บทสรุป

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความสามารถของไทมอลในการยับยั้ง *L. monocytogenes* รวมทั้งกลไกที่ไทมอลใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าว จากการทดลองพบว่าไทมอลสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes* แบบทำให้เซลล์ตาย โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าไทมอลสามารถทำให้เกิดความเสียหายที่ผิวเซลล์ของ *L. monocytogenes* และส่งผลทำให้มีการรั่วไหลของกรดนิวคลีอิก และโปรตีนออกจากเซลล์ที่ถูกทำลายโดยไทมอล

6. References

- [1] Lopes-Luz, L. and et al. 2021. *Listeria monocytogenes*: Review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays. **Critical Reviews in Microbiology**. 47(5): 647-666.
- [2] Amit, S.K. and et al. 2017. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. **Agriculture & Food Security**. 6: 51.

- [3] Campelo, M.C.S., Medeiros, J.M.S. and Silva, J.B.A. 2019. Natural products in food preservation. **International Food Research Journal**. 26(1): 41-46.
- [4] Escobar, A. and et al. 2020. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. **Arabian Journal of Chemistry**. 13(12): 9243-9269.
- [5] Srisuthum, W. and et al. 2018. Influence of temperature on antimicrobial activity and mode of action of thymol against *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 20(1): 36-43. (in Thai)
- [6] Sepahvand, S. and et al. 2021. Antimicrobial activity of thymol and thymol-nanoemulsion against three food-borne pathogens inoculated in a sausage model. **Food and Bioprocess Technology**. 14: 1936-1945.
- [7] Klein, G., Ruben, C. and Upmann, M. 2013. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. **Current Microbiology**. 67(2): 200-208.
- [8] Marchese, A. and et al. 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**. 210: 402-414.
- [9] Salehi, B. and et al. 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. **Phytotherapy Research**. 32(9): 1688-1706.
- [10] Castillo, S. and et al. 2014. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. **Food Control**. 35(1): 132-136.
- [11] Marino, M., Bersani, C. and Comi, G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. **Journal of Food Protection**. 62(9): 1017-1023.
- [12] Mith, H. and et al. 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Science & Nutrition**. 2(4): 403-416.
- [13] Walczak, M. and et al. 2021. Potential of carvacrol and thymol in reducing biofilm formation on technical surfaces. **Molecules**. 26(2723): 1-12.
- [14] Thielmann, J., Muranyi, P. and Kazman, P. 2019. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Heliyon**. 5(6): e01860.
- [15] Cai, R. and et al. 2019. Antibacterial activity and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores. **LWT Food Science and Technology**. 105: 377-384.
- [16] Trombetta, D. and et al. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 49(6): 2474-2478.
- [17] Xu, J. and et al. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**. 47: 147-149.
- [18] Wang, L.H. and et al. 2017. Combination of microbiological, spectroscopic and molecular docking techniques to study the antibacterial mechanism of thymol against *Staphylococcus aureus*: Membrane damage and genomic DNA binding. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 409: 1615-1625.
- [19] Zhou, W. and et al. 2019. Thymol mediates bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* by targeting an aldo-keto reductase and consequent depletion of NADPH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 67(30): 8382-8392.