



(ร่าง)

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชอาหาร  
เพื่อโอกาสในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ

โดย ผศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัง และคณะ  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ตุลาคม 2556

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชอาหาร  
เพื่อโอกาสในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัง

นายกานต์ วงศาริยะ

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	vi
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	vii
บทคัดย่อ	xi
Abstract	xii
สารบัญรูปภาพ	xiii
สารบัญตาราง	xvi
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ทบทวนวรรณกรรม	2
บทที่ 2 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค	
2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก	7
2.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร	10
2.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน	22
2.4 สรุปผลการทดลอง	39
บทที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ	
3.1 น้ำมันหอมระเหย	40
3.2 สารสกัดพืชพื้นเมือง	48
3.3 สรุปผลการทดลอง	54

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 การศึกษาคุณลักษณะและพัฒนาวิธีตรวจสอบแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน	
4.1 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบและวิธีการเพาะเลี้ยง	55
4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในปลาทะเลเพื่อนำไปตรวจสอบ ความสามารถในการสร้างฮิสตามีน	55
4.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีนของเชื้อที่คัดแยก ได้จากปลาทะเลด้วยวิธี Thin layer chromatographic assay	58
4.4 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่สามารถ สร้างฮิสตามีนได้ที่คัดแยกจากปลาทะเล	60
4.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ที่ คัดแยกได้จากปลาทะเลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA	64
4.6 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (primers) สำหรับใช้ในการ ตรวจสอบการปรากฏของยีนฮิสทีดีนดีคาร์บอกซิเลส ( <i>hdc</i> gene)	70
4.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวน <i>hdc</i> gene ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR	76
4.8 การทดสอบความจำเพาะของ primers ต่อแบคทีเรียที่สามารถ สร้างฮิสตามีนโดยวิธี PCR	79
4.9 การทดสอบความไวของ primers ต่อ <i>hdc</i> gene ของแบคทีเรียที่ สามารถสร้างฮิสตามีนโดยวิธี PCR	82



## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.10 การทดสอบความไวของ primers ต่อ hdc gene ของแบคทีเรียที่ สามารถสร้างฮิสตามีนในสภาวะจำลองที่มีเนื้อปลาเป็นองค์ประกอบ	85
4.11 สรุปผลการทดลอง	87
บทที่ 5 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของตัวรับน้ำมันหอมระเหย ต่อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนที่คัดแยกได้จากปลาทะเล	89
เอกสารอ้างอิง	93
ภาคผนวก	96

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สามารถดำเนินการลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากผู้ร่วมงานทุกท่านและหน่วยงานต่างๆ ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทุนวิจัย อันเป็นจุดเริ่มต้นให้โครงการนี้เกิดขึ้นได้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.ดร. นันทวัน บุญยะประกฤษ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำทางวิชาการมาโดยตลอด ขอขอบคุณ รศ.ดร. วราภรณ์ จรรย์าประเสริฐ ที่ให้ความร่วมมือและสนับสนุนในส่วนของผลิตภัณฑ์ นางสาวพนิดา พานทอง นางสาวปัทมพรณ โลมะรัตน์ ที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยนี้เป็นอย่างดี ขอขอบคุณบุคคลากรภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยในทุกๆ ด้าน ผู้วิจัยหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้เกี่ยวข้อง และเป็นข้อมูลเบื้องต้นอันจะก่อให้เกิดการพัฒนาต่อไปในอนาคต

## บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

โครงการวิจัยย่อยนี้รับผิดชอบในส่วนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชอาหารและศึกษาแบคทีเรียถึงเอนไซม์ที่สร้างฮิสตามีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อมีผลรวมทั้งผลิตภัณฑ์เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อในปลาทะเลและอาการแพ้ที่อาจเกิดขึ้นในมนุษย์ ในส่วนแรกของโครงการซึ่งศึกษาถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่า น้ำมันตะไคร้มีฤทธิ์ดีที่สุดสำหรับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก รองลงมาคือน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันพลู ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 11 สายพันธุ์ของสารสกัดพืชพื้นเมืองทั้งหมด จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดยอดหมักกักให้ผลต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคทางเดินอาหารได้ดี ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบโดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.39-3.13 มก./มล. และ 3.13-12.5 มก./มล. ตามลำดับ โดยออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อ *Salmonella paratyphi B* และ *Enterococcus sp.* โดยมีค่า MIC ประมาณ 0.39 มก./มล. สำหรับสารสกัดฆ่าเลือดและหลุมพื่อออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella typhi* ได้ดีมาก โดยมีค่า MIC เพียง 0.78 มก./มล. สำหรับฤทธิ์ต่อแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาที่ค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดฆ่าเลือดและหมักกักแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.39-3.125 มก./มล. และ MBC อยู่ในช่วง 0.39-12.5 มก./มล. จึงเป็นพืชที่มีศักยภาพและน่าสนใจที่จะศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ต่อไป

สำหรับฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดพืชพื้นเมือง 11 ชนิด ได้แก่ กระโดนบก เสม็ดชุน มันทูปุมมะตูมชาอู๋ ฆ่าเลือด ชะอม ขี้ขวง หวายลิง ปลีกกล้วย ผักหวานป่า และชะมวง ซึ่งทำการคัดเลือกจากพืชจากโครงการย่อยที่ 1-3 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยทำการทดสอบผลของสารสกัดพืชต่อการหลั่ง nitric oxide และ pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) และ interleukin-6 (IL-6) พบว่า สารสกัดชะมวงที่ 100 มก./มล. สามารถยับยั้งการหลั่งของ nitric oxide จาก murine peritoneal macrophage cell line (RAW 264.7) ภายหลังการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharides (LPS) ถึงร้อยละ 57.3 เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณ TNF- $\alpha$  และ IL-6 ที่หลั่งจากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า สารสกัดชะมวงให้ผลดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของสารสื่ออักเสบได้ถึงร้อยละ 42.7 และ 76.9 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ dexamethasone สารต้านการอักเสบซึ่งใช้เป็นสารควบคุมในการทดลองนี้ มีผลยับยั้งที่ร้อยละ 52.2 และ 90 ตามลำดับเมื่อเทียบกับความเข้มข้นเท่ากัน ในส่วนฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย 11 ตัวอย่าง ได้แก่ แมงลัก กะเพรา โหระพา พลู กานพลู อบเชย ตะไคร้ กระชาย ผิวมะกรูด ใบมะกรูด ข่า พบว่า น้ำมันพลู น้ำมันอบเชย น้ำมันแมงลัก น้ำมันตะไคร้ น้ำมันกะเพราและน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. สามารถยับยั้งการหลั่งของ nitric oxide จาก murine peritoneal macrophage cell line (RAW 264.7) ภายหลังการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharides (LPS) ถึงร้อยละ 89.27, 87.03, 85.14, 82.79, 73.06 และ 71.32 ตามลำดับ โดยน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นให้ผลยับยั้งที่ต่ำกว่าร้อยละ 70 เมื่อเทียบกับ dexamethasone สารต้านการอักเสบซึ่งใช้เป็นสารควบคุมในการทดลองนี้ ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีผลยับยั้งที่ร้อยละ 69.32 เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณสารสื่ออักเสบ TNF- $\alpha$  ที่หลั่งจากเซลล์ RAW 264.7

ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า น้ำมันอบเชยให้ผลดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของสารสื่ออักเสบนี้ได้ถึงร้อยละ 98.24 นอกจากนี้ ยังมี น้ำมันแมงลัก และน้ำมันกานพลู ที่มีผลยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$  ได้ร้อยละ 84.95 และ 79.90 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ dexamethasone ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีผลยับยั้งที่ร้อยละ 66.50 เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณ IL-6 ที่หลังจากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า น้ำมันอบเชยให้ผลดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของสารสื่ออักเสบได้ถึงร้อยละ 97.09 นอกจากนี้ ยังมีน้ำมันกานพลู น้ำมันแมงลัก และน้ำมันพลูที่มีผลยับยั้งการหลั่ง IL-6 ได้ร้อยละ 81.28, 72.69 และ 68.01 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ dexamethasone ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีผลยับยั้งที่ร้อยละ 59.67

นอกจากนี้ โครงการนี้ยังมีเป้าหมายเพื่อศึกษาแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนจากการทำงานของเอนไซม์ histidine decarboxylase ที่เปลี่ยนฮิสติดีน (histidine) ไปเป็นฮิสตามีน (histamine) ซึ่งฮิสตามีนเป็นสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ภายหลังจากที่ผู้บริโภครับประทานเนื้อปลาที่มีการปนเปื้อนโดยอาการแพ้ขึ้นอยู่กับความไวของผู้บริโภคต่อปริมาณของฮิสตามีนที่ได้รับ ซึ่งในบางรายมีอาการแพ้ที่รุนแรงอาจถึงแก่ชีวิตได้ โดยจะทำการศึกษาในระดับยีนเพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อน นอกจากนี้ ยังทำการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สำหรับล้าง/แช่อาหารทะเลเพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนอีกด้วย สำหรับการทดลองในส่วนนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนจากตัวอย่างปลาทะเลทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ปลาทูตัวสั้น (short-bodies mackerel) ปลาลัง (indian mackerel) ปลาซาบะ (pacific mackerel) ปลาอินทรี (king mackerel) และปลาโอดำ (longtail tuna) ซึ่งผลจากการตรวจสอบการสร้างฮิสตามีนโดยวิธี Thin layer chromatography สามารถคัดแยกเชื้อที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ทั้งหมด 41 ตัวโดยแบ่งเป็น 15 ตัวที่คัดแยกได้จากปลาทูตัวสั้น 19 ตัวคัดแยกได้จากปลาลัง 5 ตัวอย่างคัดแยกได้จากปลาโอดำและ 2 ตัวที่คัดแยกได้จากปลาอินทรี หลังจากนั้นนำเชื้อกลุ่มดังกล่าวมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งผลการทดสอบพบว่า เชื้อตัวอย่างทั้ง 41 ตัวเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อนสั้น ในส่วนของการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและซูโครส พบว่าเชื้อตัวอย่างทั้งหมดสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสได้เพียงอย่างเดียวยกเว้นเชื้อ 5 ตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาโอดำที่สามารถย่อยน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแลคโทสได้ และไม่พบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีเชื้อ 8 ตัวที่สามารถสร้างก๊าซได้ นอกจากนี้ พบว่าเชื้อตัวอย่างทั้งหมดให้ผลบวกในการทดสอบ catalase test และให้ผลลบในการทดสอบ oxidase และส่วนในการทดสอบ motility test พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 28 ตัวที่ให้ผลบวก หลังจากนั้นทำการศึกษาในระดับยีนโดยออกแบบ primers เพื่อใช้ในการตรวจสอบการปรากฏของยีน histidine decarboxylase gene (*hdc* gene) โดยใช้ฐานข้อมูลใน NCBI เพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลของยีน *hdc* ทั้งหมดเพื่อนำมาหาส่วนที่เป็น conserved region ของยีนนี้สำหรับออกแบบ universal primers ทั้งหมด 3 คู่ ซึ่งผลจากการทดลองในส่วนของ specificity test ของ primers กับเชื้อมาตรฐานที่สามารถสร้าง histamine ได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Morganella morganii* ATCC 25830, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 และเชื้อที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ทั้ง 41 ตัวอย่างซึ่งผลจากการทดลองพบว่า คู่ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R ให้ผล specificity ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับคู่ primers อีกสองคู่ โดยคู่ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R ให้ผลบวกกับ *M. morganii*, *E. aerogenes* และเชื้อที่คัดแยกได้จาก

ปลาทะเล โดยขนาดของยีนเป้าหมาย (PCR product) ที่ได้จากคู่ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R มีขนาดเท่ากับ 578 bp หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนเป้าหมายที่ได้จากเชื้อ *M. morganii* และ *E. aerogenes* ผลการจากวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ของยีนเป้าหมายที่ได้จาก *M. morganii* พบว่าเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ *hdc* gene ใน NCBI พบว่าลำดับเบสของยีนเป้าหมายดังกล่าวมีความเหมือนกับ *hdc* gene ของ *M. morganii* ในฐานข้อมูลถึงร้อยละ 99 และในส่วนของยีนเป้าหมายที่ได้จากเชื้อ *E. aerogenes* เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ *hdc* gene ของเชื้อ *E. aerogenes* ในฐานข้อมูลพบว่ามีความเหมือนกับ *hdc* gene ของเชื้อ *E. aerogenes* ในฐานข้อมูลร้อยละ 94

เมื่อทำการทดสอบ sensitivity ของคู่ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R ต่อ *M. morganii* และ *E. aerogenes* โดยแบ่งวิธีการเตรียม template สำหรับการทดสอบเป็น 3 แบบคือ whole cells, heat treated cell lysates และ genomic DNA ผลจากการทดลองสำหรับ *M. morganii* พบว่า template ที่ได้จาก cell lysates และ whole cells ให้ค่า sensitivity ที่ดีที่สุดคือ  $10^2$  CfU/mL ในขณะที่ genomic DNA ที่ได้จากชุดสกัดทางการค้าให้ค่า sensitivity เท่ากับ  $10^4$  CfU/mL สำหรับการทดสอบ sensitivity ของคู่ primer นี้ต่อ *E. aerogenes* พบว่า template ชนิด cell lysates และ genomic DNA ให้ผลดีที่สุดโดยปริมาณเชื้อต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีนเป้าหมายเท่ากับ  $10^5$  CfU/mL และในส่วน of whole cells พบว่าปริมาณเชื้อที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยีนเป้าหมายคือ  $10^6$  CfU/mL และในการทดสอบ sensitivity ของคู่ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R ต่อเชื้อ *M. morganii* และ *E. aerogenes* ในสถานะจำลองที่มีเนื้อปลาเป็นองค์ประกอบ สำหรับเชื้อ *M. morganii* พบว่า template ที่ได้จาก cell lysates ให้ค่า sensitivity ที่ดีที่สุดคือ  $10^3$  CfU/mL รองลงมาคือ genomic DNA และ whole cells โดยมีค่า sensitivity เท่ากับ  $10^5$  CfU/mL และ  $10^6$  CfU/mL ตามลำดับ ขณะที่ค่า sensitivity ของคู่ primer ต่อเชื้อ *E. aerogenes* พบว่า template ที่ได้จาก cell lysates ให้ค่า sensitivity ดีที่สุดคือ  $10^6$  CfU/mL ในขณะที่ค่า sensitivity ที่ได้จาก template ที่เป็น whole cells และ genomic DNA มีค่าเท่ากับ  $10^7$  CfU/mL ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนของตำรับน้ำมันหอมระเหยทั้ง 16 ตำรับ โดยพบว่าตำรับที่ 3 ที่ประกอบด้วยน้ำมันตะไคร้ร้อยละ 4 w/v ที่ใช้ polyethylene glycol เป็นสารช่วยทำละลายให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ โดยพบว่ามีค่า MIC และ MBC ที่ระดับความเจือจาง 1 : 32 เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *M. morganii*, *E. aerogenes* และ KM134 และนอกจากนั้นพบว่าที่ระดับความเจือจาง 1 : 64 เป็นความระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อได้หลังจากทำการทดสอบกับเชื้อ N30 ในส่วนของตำรับน้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วยน้ำมันโหระพาเป็นองค์ประกอบ ที่ซึ่งมีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบคือตำรับที่ 1 ที่ประกอบด้วยน้ำมันโหระพาร้อยละ 2 w/v โดยผลจากการทดลองพบว่าตำรับที่ 1 ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ N30 โดยมีค่า MIC และ MBC ที่ระดับความเจือจางเท่ากับ 1 : 32 ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *M. morganii*, KM134 และ *E. aerogenes* พบว่าระดับความเจือจางที่ให้ค่า MIC และ MBC คือ 1 : 16, 1 : 16 และ 1 : 8 ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันพบว่าตำรับน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้และน้ำมันโหระพาตำรับที่ 5 ที่มีอัตราส่วนระหว่างน้ำมันตะไคร้ต่อน้ำมันโหระพาในอัตราส่วน 2 : 0.5 มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ N30 และ

KM134 โดยพบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ระดับความเจือจาง 1 : 32 และให้ค่า MIC และ MBC ที่ระดับความเจือจาง 1 : 16 เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *M. morganii* และ *E. aerogenes* ตามลำดับ

## บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชอาหารและศึกษาแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อดังกล่าว รวมทั้งผลิตภัณฑ์เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อในปลาทะเลและอาการแพ้ที่อาจเกิดขึ้นในมนุษย์ ในส่วนแรกของโครงการซึ่งศึกษาถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่า น้ำมันตะไคร้มีฤทธิ์ดีที่สุดสำหรับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก ส่วนฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 11 สายพันธุ์ของสารสกัดพืชพื้นเมืองทั้งหมด พบว่า สารสกัดยอดหมักกักให้ผลต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคทางเดินอาหารได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ สำหรับฤทธิ์ต่อแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนได้นั้น พบว่าสารสกัดข้าวเลียดและหมักกักแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีที่สุด จึงเป็นพืชที่มีศักยภาพและน่าสนใจที่จะศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ต่อไป สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดพืชพื้นเมืองซึ่งทำการคัดเลือกจากพืชจากโครงการย่อยที่ 1-3 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยทำการทดสอบผลของสารสกัดพืชต่อการหลั่ง nitric oxide และ pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) และ interleukin-6 (IL-6) พบว่า พบว่า สารสกัดชะมวงให้ผลดีที่สุด ในส่วนฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย พบว่า น้ำมันพลูและน้ำมันอบเชยสามารถยับยั้งการหลั่งของ nitric oxide จาก murine peritoneal macrophage cell line (RAW 264.7) ภายหลังการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharides (LPS) และยับยั้งการหลั่งของ pro-inflammatory cytokines ได้ดีมาก

นอกจากนี้ โครงการนี้ยังมีเป้าหมายเพื่อศึกษาแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนจากการทำงานของเอนไซม์ histidine decarboxylase ที่เปลี่ยนฮิสทิดีน (histidine) ไปเป็นฮิสตามีน (histamine) สำหรับการทดลองในส่วนนี้ ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนจากตัวอย่างปลาทะเลด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ชีวเคมีและชีวโมเลกุล และทำการออกแบบ primers เพื่อใช้ในการตรวจสอบการปรากฏของยีน histidine decarboxylase gene (*hdc* gene) ในตัวอย่างปลาทะเล โดยใช้ส่วนที่เป็น conserved region ของยีนนี้สำหรับออกแบบ universal primers เพื่อใช้ตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนในปลาทะเลด้วยวิธี PCR ซึ่งสามารถคัดเลือก primers ที่มีความจำเพาะกับยีนดังกล่าวในแบคทีเรียหลายชนิด คือ คู่ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R และสามารถใช้ตรวจสอบกับ template ที่เป็น whole bacterial cells, heat treated cell lysates และ genomic DNA ที่สกัดจากแบคทีเรียได้

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนของตำรับน้ำมันหอมระเหยนั้น พบว่า ตำรับที่ประกอบด้วยน้ำมันตะไคร้ร้อยละ 4 w/v ที่ใช้ polyethylene glycol เป็นสารช่วยทำละลายให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการ ในส่วนของตำรับน้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วย น้ำมันโหระพาเป็นองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ คือ ตำรับที่ประกอบด้วยน้ำมันโหระพาร้อยละ 2 w/v ในขณะเดียวกันพบว่าตำรับน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้และน้ำมันโหระพาในอัตราส่วน 2 : 0.5 มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนได้

## Abstract

This study was mainly aimed to investigate the biological activities of edible indigenous plants and study histamine producing bacteria which caused food allergy in order to develop detection method and antiseptic products to reduce bacterial contamination in sea fish. The first part of this study included antibacterial activity of the plants. The results showed that lemongrass oil possessed the best antibacterial activity against cariogenic bacteria while *Zanthoxylum acanthopodium* DC. leaf extract had the promising activity against gastrointestinal pathogens. Moreover, *Zanthoxylum acanthopodium* DC. and *Premna obtusifolia* R.Br. extracts were effective against histamine-producing bacteria and could be interesting for further characterization. The anti-inflammatory activity of edible indigenous plants was also examined by selection of plants with antioxidant activity from Project 1-3 and tested for the effect of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) productions. It was demonstrated that *Garcinia cowa* Roxb. extract gave the best activity while betel vine and cinnamon oils were also of interest.

In addition, another study on histamine producing bacteria was focused on histidine decarboxylase enzyme. The contaminated bacteria from sea fish could be isolated by microbiological, biochemical and biomolecular techniques. The universal primers (Hdc\_2F and Hdc\_2R) were designed and tested for specificity and sensitivity to detect histidine decarboxylase gene (*hdc* gene) in fish samples by PCR method. This detection method could effectively detect histamine producing bacterial contamination in whole bacterial cells, heat treated cell lysates, and genomic DNA.

Finally, antiseptic products to reduce bacterial contamination in sea fish were also tested. Formulation containing 4% w/v lemongrass oil with polyethylene glycol gave the best antibacterial activity and formulation containing 2% w/v sweet basil oil was also of interest. Moreover, mixed formulation of 2% w/v lemongrass oil and 0.5% w/v sweet basil oil also inhibited the growth of histamine producing bacteria.



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 Inhibition zone ที่เกิดจากน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่มีผลต่อ <i>M. morganii</i> (A), <i>P. arenosus</i> (B), <i>Myroides</i> sp. (C), <i>A. junii</i> (D) โดยวิธี disc diffusion	25
รูปที่ 2 TLC chromatogram ของน้ำมันกานพลู (clove oil) เมื่อพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric reagent	27
รูปที่ 3 ผลการทดลอง bioautography ของน้ำมันกานพลู (clove oil)	29
รูปที่ 4 TLC chromatogram ของน้ำมันโหระพา (sweet basil oil) เมื่อพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric reagent	30
รูปที่ 5 ผลการทดลอง bioautography ของน้ำมันโหระพา (sweet basil oil)	32
รูปที่ 6 TLC chromatogram ของน้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil) เมื่อ spray ด้วย anisaldehyde-sulfuric reagent	33
รูปที่ 7 ผลการทดลอง Bioautography ของน้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil)	35
รูปที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดพืช 11 ชนิด แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้ง: ก) nitric oxide ข) TNF- $\alpha$ และ ค) IL-6	46
รูปที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย 11 ชนิด แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้ง nitric oxide	49
รูปที่ 10 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย 11 ชนิด แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้ง TNF- $\alpha$	51
รูปที่ 11 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย 11 ชนิด แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้ง IL-6	53
รูปที่ 12 การเจริญและลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่สามารถสร้างสารประกอบ biogenic amines	57
รูปที่ 13 การทดสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีนของเชื้อตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาทะเล	59
รูปที่ 14 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ที่คัดแยกได้จากปลาทะเล	61
รูปที่ 15 โครงสร้างของ pGEM-T Easy	65
รูปที่ 16 ภาพแสดงขนาดของยีน 16S rDNA ของเชื้อตัวอย่างหลักจากการเพิ่มจำนวนโดยใช้คู่ primer 27F และ 1492R	65
รูปที่ 17 การตรวจสอบมีอยู่ของ DNA เป้าหมายใน cloning vector หลังจากตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ NcoI	66

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 18 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ระหว่างเชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ (N1, N10, N12, N30, N31, N39, N48, N51) และ <i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i> KT	68
รูปที่ 19 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ระหว่างเชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ (LT94B1) และเชื้อ <i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	69
รูปที่ 20 การจัดเรียงลำดับเบสบริเวณอนุรักษ์ของ <i>hdc</i> gene สำหรับการออกแบบ Hdc_1F และ Hdc_1R	75
รูปที่ 21 ผลการทดสอบหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการปรากฏของ <i>hdc</i> gene โดยใช้ Hdc_1F และ Hdc_1R primer	78
รูปที่ 22 ผลการทดสอบหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการปรากฏของ <i>hdc</i> gene โดยใช้ Hdc_2F และ Hdc_2R primer	78
รูปที่ 23 ผลการทดสอบหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการปรากฏของ <i>hdc</i> gene โดยใช้ Hdc_3F และ Hdc_3R primer	78
รูปที่ 24 การทดสอบความจำเพาะของ Hdc_2F และ Hdc_2R primer ต่อแบคทีเรียมาตรฐานและแบคทีเรียตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาทะเลที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้	80
รูปที่ 25 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>hdc</i> gene ของ <i>E. aerogenes</i> ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย Hdc_2F และ Hdc_2R primer กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>hdc</i> gene ของ <i>E. aerogenes</i> ที่อยู่ฐานข้อมูล NCBI	81
รูปที่ 26 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>hdc</i> gene ของ <i>M. morganii</i> ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย Hdc_2F และ Hdc_2R primer กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>hdc</i> gene ของ <i>M. morganii</i> ที่อยู่ฐานข้อมูล NCBI	81
รูปที่ 27 การทดสอบความไวของ primer Hdc_2F และ Hdc_2R ในการตรวจสอบการมีอยู่ของ <i>hdc</i> gene ใน <i>M. morganii</i> จากตัวอย่าง cell lysates (A) whole cells (B) และ genomic DNA (C)	84
รูปที่ 28 การทดสอบความไวของ primer Hdc_2F และ Hdc_2R ในการตรวจสอบการมีอยู่ของ <i>hdc</i> gene ใน <i>E. aerogenes</i> จากตัวอย่าง cell lysates (A) whole cells (B) และ genomic DNA (C)	84
รูปที่ 29 การทดสอบความไวของ primer Hdc_2F และ Hdc_2R ในการตรวจสอบการปรากฏของ <i>hdc</i> gene ในเชื้อ <i>M. morganii</i> จากตัวอย่าง cell lysates (A) whole cells (B) และ genomic DNA (C)	86

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

### หน้า

รูปที่ 30 การทดสอบความไวของ primer Hdc_2F และ Hdc_2R ในการตรวจสอบการปรากฏ ของ <i>hdc</i> gene ในเชื้อ <i>E. aerogenes</i> จากตัวอย่าง cell lysates (A) whole cells (B) และ genomic DNA (C)	86
รูปที่ 31 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนของตำรับ น้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 4% (w/v)	91

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 อาการผิดปกติที่เกิดขึ้นหลังจากการบริโภคปลาที่มีการปนเปื้อนฮิสตามีน	4
ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านการเจริญของน้ำมันหอมระเหยต่อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก	9
ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)	13
ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของการเจือจางน้ำมันหอมระเหย	23
ตารางที่ 5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด โดยวิธี disc diffusion (ขนาดวงใสเป็น cm)	24
ตารางที่ 6 ค่า MIC และ MBC (% v/v) ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ <i>M. morganii</i> , <i>P. arenosus</i> , <i>A. junii</i> และ <i>Myroides</i> sp.	26
ตารางที่ 7 ค่า MIC และ MBC (mg/ml) ของสารสกัดพืชต่อเชื้อ <i>M. morganii</i> , <i>P. arenosus</i> , <i>A. junii</i> และ <i>Myroides</i> sp.	37
ตารางที่ 8 ผลการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ของสารสกัดพืชชนิดต่างๆ	41
ตารางที่ 9 ผลการยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$ ของสารสกัดพืชชนิดต่างๆ	43
ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งการหลั่ง IL-6 ของสารสกัดพืชชนิดต่างๆ	45
ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ	49
ตารางที่ 12 ผลการยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$ ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ	51
ตารางที่ 13 ผลการยับยั้งการหลั่ง IL-6 ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ	53
ตารางที่ 14 การปนเปื้อนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาทะเล	57
ตารางที่ 15 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีน ที่คัดแยกได้จากปลาทะเล	62
ตารางที่ 16 ค่า MIC และ MBC ของตำรับน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีน	92

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

พืชอาหารเป็นพืชเป็นที่นิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวาง จึงจัดได้ว่าเป็นพืชที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคสูง หากมีการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์อย่างจริงจังถึงฤทธิ์และคุณสมบัติทางชีวภาพของพืชอาหารเหล่านี้ ก็อาจเป็นการเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของพืชเหล่านี้ ซึ่งเป็นการส่งเสริมการปลูกและเพิ่มรายได้ของเกษตรกรในทางอ้อม สำหรับในโครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมีความสนใจในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบต่างๆ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของพืชอาหาร เพื่อแสวงหาโอกาสในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังมีความสนใจแบคทีเรียที่สร้างสารฮิสตามีน (histamine) ได้ เนื่องจากฮิสตามีน คือ สารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้อย่างรุนแรง โดยแฝงอยู่ในอาหารทะเลหลายชนิด สารชนิดนี้ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนและจะสามารถที่จะย่อยสลายเนื่อปลาให้ยุ่ยลงและเน่าเสียได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งการตกค้างของสารนี้ยังก่อผลกระทบต่อการทำงานของประเทศเป็นอย่างมาก อีกทั้งฮิสตามีนนั้นยังจัดเป็นสาร biogenic amines ที่สำคัญ ซึ่งนอกเหนือจากการก่อให้เกิดอาการแพ้ ยังทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิต ตัวแดง ปวดศีรษะและคลื่นไส้ อาเจียนอีกด้วย และเมื่อเราได้รับสารชนิดนี้เข้าไปนานๆ อาจทำให้เกิดการสะสมและกลายเป็นมะเร็งในที่สุด การสร้างสารฮิสตามีนนั้น มักเป็นตัวบ่งชี้ว่าเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้น โดยแบคทีเรียจะทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่อยู่ในอาหาร คือ ฮิสทิดีนให้เป็นฮิสตามีนโดยอาศัยเอนไซม์ฮิสทิดีน คาร์บอกซิลเลส (histidine carboxylase) มีรายงานว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากปลาสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Morganella psychrotolerans*, *Morganella morganii*, *Raoultella planticola*, *Enterobacter aerogenes*, *Photobacterium phosphoreum* ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus capitis* การศึกษาในเชิงลึกระดับโมเลกุลของเอนไซม์ฮิสทิดีน คาร์บอกซิลที่ผลิตขึ้นจากเชื้อที่แยกได้ในประเทศที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน การเข้าใจถึงการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์นี้จากแบคทีเรีย จะช่วยในการค้นหาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอนไซม์นี้ได้โดยตรง ซึ่งจะช่วยลดการเน่าเสียของอาหารทะเลจากการขนส่ง และลดปัญหากับคู่ค้าในต่างประเทศได้

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสารจากพิษอาหารที่มีฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการแพ้ในอาหารทะเล
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคน/สัตว์และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารจากพิษอาหาร เพื่อแสวงหาโอกาสในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่สร้างฮิสตามีนในระดับชีวโมเลกุล

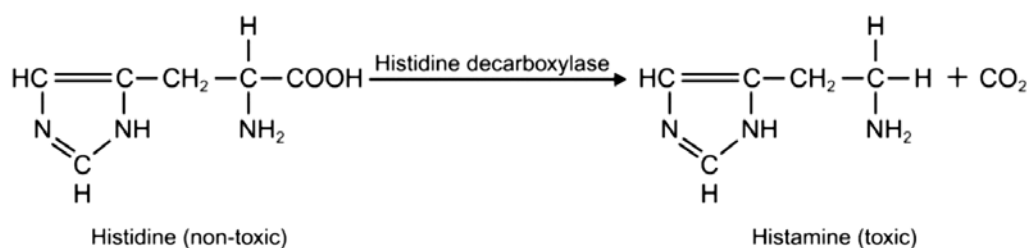
## 1.3 ทบทวนวรรณกรรม

พิษอาหารเป็นพิษเป็นที่นิยมนับประทานกันอย่างกว้างขวาง จึงอาจจัดได้ว่าเป็นพิษที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคสูง หากมีการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์อย่างจริงจังถึงฤทธิ์และคุณสมบัติทางชีวภาพของพิษอาหารเหล่านี้ ก็อาจเป็นการเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของพิษเหล่านี้ ซึ่งเป็นการส่งเสริมการปลูกและเพิ่มรายได้ของเกษตรกรในทางอ้อม สำหรับวัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้ส่วนแรกจะมุ่งเน้นศึกษาและทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์ รวมทั้งฤทธิ์ด้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการอาหารทะเลเป็นพิษของพิษอาหาร เป็นที่ทราบกันว่า scombrototoxin เป็นชื่อเรียกฮิสตามีน (histamine) คือ สารที่ก่อให้เกิดอาการพิษอย่างรุนแรง โดยแฝงอยู่ในอาหารทะเลหลายชนิด และเมื่อเราได้รับสารชนิดนี้เข้าไปนานๆ อาจทำให้เกิดการสะสมและกลายเป็นมะเร็งในที่สุด สารนี้ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนและสามารถที่จะย่อยสลายเนื้อปลาให้ยุ่ยลงและเน่าเสียอย่างรวดเร็ว นอกจากผลเสียจากการสะสมต่อสุขภาพแล้ว การตกค้างของสารนี้ยังก่อผลกระทบต่อ การส่งออกเป็นอย่างมาก ซึ่งหากมีการตรวจพบสารนี้ในปริมาณที่มากเกินไปกำหนด อาจส่งผลกระทบต่อ การส่งออกของประเทศ ดังนั้นการหาสารจากธรรมชาติที่ช่วยลดการสร้างฮิสตามีน จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ โดยพิษอาหารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดจะถูกคัดเลือก และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อ ในส่วนที่สองจะเน้นหนักในการศึกษาถึงยีนที่ควบคุมการสร้างฮิสตามีนในระดับโมเลกุล ซึ่งการเข้าใจถึงการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์นี้จากแบคทีเรีย จะช่วยในการค้นหาตรวจสอบและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอนไซม์นี้ได้โดยตรง ซึ่งสามารถลดการเกิดความเป็นพิษ การเน่าเสียของอาหารทะเลจากการขนส่ง และลดปัญหากับลูกค้าในต่างประเทศได้

ในปัจจุบันพบว่า มีการขยายตัวตลาดอาหารทะเลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากผู้บริโภคหันมานิยมบริโภคอาหารทะเลเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากการตื่นตัวด้านการดูแลสุขภาพ อย่างไรก็ตามพบว่าอาหารทะเลเป็นหนึ่งในแหล่งที่สำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับการแพร่ระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคอาหารที่มีสารพิษปนเปื้อนหรือมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค (food poisoning) ในหลายๆประเทศ (1, 2, 3) พบว่าปลาทะเลและผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากปลาทะเลเป็นสาเหตุสำคัญของอาการอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจากการบริโภคอาหารทะเล ซึ่งการระบาดของอาการอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากการบริโภคปลาทะเลและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากปลาทะเลนั้นส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการเกิดการปนเปื้อนของ biogenic amine ที่ซึ่งถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในปลาทะเลหรือผลิตภัณฑ์แปรรูปจากปลาทะเล (2, 4, 5) Biogenic amines เป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นโดยการถูกแทนที่ hydrogen atom ของ ammonia ด้วยหมู่ alkyl หรือ aryl (6) โดยปกติ สารประกอบ biogenic amines สามารถถูกสร้างและสลายได้ในระหว่างกระบวนการ metabolism ของเซลล์ โดยทั่วไปการปนเปื้อนของสารประกอบ biogenic amines ในอาหารเช่น ปลา ไวน์ ซีส เบียร์ และเนื้อ ส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการกระบวนการ decarboxylation

ของ amino acids โดยเอนไซม์ decarboxylase ที่ซึ่งถูกสร้างโดยแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร เหล่านั้น (6,7) ผลการจากศึกษาพบว่าสารประกอบ biogenic amines ที่มีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการอาหารเป็นพิษคือ ฮิสตามีน (8)อาการอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากการบริโภคปลาทะเลที่เป็นฮิสตามีน (Histamine fish poisoning) หรือเรียกอีกอย่างว่า scombroid poisoning เนื่องจากการระบาดของ Histamine fish poisoning ส่วนใหญ่พบในปลาที่อยู่ในวงศ์ Scombridae และ Scomberesocidae ยกตัวอย่างเช่น Tuna, Mackerel, Bonito และ Jack โดยพบว่าปลาที่อยู่ในวงศ์ Scombridae และ Scomberesocidae เป็นปลาที่มีระดับของกรดอะมิโนฮิสทีดิน (Histidine) ในเนื้อสูงที่ซึ่งสามารถถูกใช้เป็นสารตั้งต้น(substrate) สำหรับเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase enzyme) ที่ซึ่งถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย (9, 10) ผลจากการทำงานของ decarboxylase enzyme ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเนื้อปลาทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนฮิสทีดินไปเป็นฮิสตามีน ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการสะสมของฮิสตามีนในระดับสูงในเนื้อปลา(9,11) นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่ไม่ได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ scombroid fish ที่พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการระบาดของ Histamine fish poisoning ยกตัวอย่างเช่น Mahi-Mahi (*Coryphaena* spp.), Sardine (*Sardinella* spp.), Pilchards (*Sardine pilchardus*), Anchovies (*Engraulis* spp.), Herring (*Clupea* spp.), marlin (*Makaira* spp.) และ Bluefish (*Pomatomus* spp.) (10)

กระบวนการสังเคราะห์ฮิสตามีนในปลานั้นส่วนใหญ่เป็นผลมาจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเนื้อปลาที่ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ฮิสทีดินดีคาร์บอกซิเลส โดยเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนฮิสทีดินให้กลายเป็นฮิสตามีน ซึ่งกลไกการทำงานของเอนไซม์ฮิสทีดินดีคาร์บอกซิเลส (9, 11)



### รูปแสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ฮิสทีดินดีคาร์บอกซิเลส

กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้จากปลาที่ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการระบาดของ Histamine fish poisoning ได้แก่ *Morganella morganii*, *Klebsella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium* spp., *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter lowffi*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas* spp. และ *Photobacterium* spp. (6,12,13)

โดยทั่วไปจะไม่พบการสะสมของฮิสตามีนในปลาสด ทั้งปลาที่จัดอยู่ในกลุ่ม scombroid fish และปลาที่ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม scombroid fish โดยพบว่าฮิสตามีนจะถูกสร้างและสามารถถูกตรวจพบได้เมื่อนำปลาไปเก็บรักษาในอุณหภูมิหรือผ่านกระบวนการผลิตที่ไม่เหมาะสม ผลจากการศึกษาที่ผ่านมาคาดว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้นั้นไม่ได้เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ของปลาแต่พบว่าเกิดจากการปนเปื้อนขึ้นภายหลังจากที่ปลาถูกจับ (14, 15) เมื่อผู้บริโภคบริโภคปลาทะเลที่มีการปนเปื้อนของฮิสตามีนในระดับสูงส่งผลทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้หลายรูปแบบขึ้นอยู่กับความไวในการตอบสนองต่อระดับฮิสตามีนของระบบภูมิคุ้มกันในแต่ละบุคคล (9, 10) โดยอาการป่วยที่พบได้หลังจากการบริโภคปลาที่มีการปนเปื้อนของฮิสตามีนได้แก่ อาการแพ้ที่แสดงออกทางผิวหนัง อาการผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) และอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นเกี่ยวกับระบบประสาท (nervous systems) โดยแสดงไว้ในตารางที่ 1 (9, 10)

ตารางที่ 1 อาการผิดปกติที่เกิดขึ้นหลังจากการบริโภคปลาที่มีการปนเปื้อนฮิสตามีน

Location	Specific symptoms
Skin	rash, urticaria, edema
Gastrointestinal tract	nausea, vomiting, diarrhea, abdominal cramps
Nervous system	headache, palpitations, tingling, flushing, itching

ที่ผ่านมาพบว่ามีรายงานเกี่ยวกับการระบาดของ Histamine fish poisoning ในหลายประเทศของทวีปเอเชีย อเมริกาเหนือ และบางประเทศในทวีปยุโรป สำหรับในส่วนของทวีปเอเชีย การป่วยอันเนื่องมาจาก Histamine fish poisoning มีการรายงานว่าไม่เพียงแต่เกิดจากการบริโภคปลาทะเลที่ไม่สดเท่านั้นแต่ยังรวมถึงการบริโภคผลิตภัณฑ์จากปลาทะเลด้วยเช่นกัน (15, 16) โดยพบว่าการระบาดของ Histamine fish poisoning ครั้งใหญ่ที่สุดเท่าที่มีการบันทึกไว้เกิดขึ้นที่ประเทศญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1973 โดยพบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 2656 รายที่มีอาการอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากการบริโภคปลา Horse mackerel ตามแหล่งที่มีการปนเปื้อนของฮิสตามีนในทางกลับกันการระบาดของ Histamine fish poisoning ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือซึ่งมีการระบาดของอาการอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจาก Histamine fish poisoning ในจำนวนที่น้อยกว่ายกตัวอย่างเช่นในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีการระบาดของ Histamine fish poisoning มากที่สุดในรัฐฮาวายและแคลิฟอร์เนีย (17) โดยในระหว่างปี ค.ศ. 1983-1992 พบว่าการระบาดของ Histamine fish poisoning เป็นสาเหตุหลักของการป่วยอันเนื่องมาจากการอาหารเป็นพิษจากการบริโภคอาหารทะเล โดยพบว่าร้อยละ 57 ของอาการอาหารเป็นพิษมีสาเหตุมาจาก Histamine fish poisoning เนื่องจากการบริโภคปลา Tuna และ Mahi-Mahi ที่มีการปนเปื้อนฮิสตามีน (18) แต่อย่างไรก็ตามการระบาดครั้งใหญ่ที่สุดของ Histamine fish poisoning ในประเทศสหรัฐอเมริกาเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1973 ซึ่งมีผู้ป่วยทั้งหมด 254 รายจาก 8 รัฐโดยมีรายงานว่าผู้ป่วยที่เกิดอาการอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากการบริโภคปลา Tuna กระป๋องที่ซึ่งมีการตรวจพบการปนเปื้อนของฮิสตามีนในระดับ 68-280 มิลลิกรัมต่อเนื้อปลา 100 กรัม (16, 19) ส่วนในของประเทศแคนาดา พบว่ามีการรายงานการระบาด



ของ Histamine fish poisoning ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1975 โดยการระบาดส่วนใหญ่ในระหว่างปี ค.ศ. 1970 ถึง 1995 พบว่าการระบาดส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการบริโภคปลา Tuna, Mahi-Mahi และ Marlin แต่อย่างไรก็ตามการระบาดครั้งใหญ่ที่สุดของประเทศแคนาดาเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1987พบว่า มีผู้ป่วยที่มีอาการอาหารเป็นพิษเนื่องมาจากการบริโภคปลา Mackerel รมควันที่มีการปนเปื้อนของฮิสตามีนจำนวน 14 ราย และในครั้งต่อมาในปี ค.ศ. 1991 พบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 12 รายที่มีอาการอาหารเป็นพิษซึ่งมีสาเหตุมาจาก Histamine fish poisoning หลังจากการบริโภคปลา Marlin และอีกครั้งหนึ่งในปี ค.ศ. 1994 มีรายงานว่าผู้ป่วย 12 รายที่มีอาการอาหารเป็นพิษหลังจากการบริโภค Tuna ที่มีการปนเปื้อนของฮิสตามีน (20, 21) สำหรับการระบาดของ Histamine fish poisoning ในทวีปยุโรปพบว่าส่วนใหญ่ของรายงานที่พบเป็นรายงานการระบาดของประเทศที่อยู่ในกลุ่มสหราชอาณาจักรประกอบด้วย อังกฤษ เวลส์ และสกอตแลนด์ โดยพบว่าในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1976 ถึง 1990 มีรายงานเกี่ยวกับอาการอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก Histamine fish poisoning จำนวน 441 ฉบับโดยมีผู้ป่วยรวมกันถึง 962 ราย นอกจากนี้ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1980 ถึง 1989 ในประเทศอังกฤษและเวลส์มีรายงานเกี่ยวกับการป่วยด้วยอาการอาหารจำนวนทั้งสิ้น 294 ฉบับ โดยพบว่ามี 60 ฉบับเป็นรายงานการเกิดอาการเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก Histamine fish poisoning หลังจากบริโภคปลา Meckerel และ ปลา Meckerel แปรรูป (15, 22) และนอกจากนี้พบว่ายังมีการรายงานการระบาดของ Histamine fish poisoning ในปี ค.ศ. 1979 ที่เมืองปาเลโมประเทศอิตาลี ซึ่งส่งผลให้มีผู้ป่วยด้วยอาการอาหารเป็นพิษถึง 250 รายโดนพบว่ามีสาเหตุมาจากการบริโภคปลา Tuna และ Mackerel (15, 23) สำหรับประเทศไทยมีการรายงานเกี่ยวกับอาการอาหารที่เกี่ยวข้องกับ Histamine fish poisoning ค่อนข้างน้อยอาจเป็นผลมาจากการวินิจฉัยที่ผิดพลาดระหว่างอาการป่วยอันเนื่องมาจาก Histamine fish poisoning และ อาการป่วยอันมีสาเหตุมาจากการแพ้อาหาร (Food allergy) ซึ่งมีลักษณะอาการผิดปกติที่ใกล้เคียงกัน ในปัจจุบันรายงานเกี่ยวกับอาการอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก Histamine fish poisoning มีเพียง 1 ฉบับเท่านั้นโดยเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1989 ซึ่งมีรายงานพบว่ามีผู้ป่วยเด็ก 2 รายจากจังหวัดเชียงใหม่ที่ซึ่งรักษาตัวอยู่ในศูนย์ Tuberculosis มีอาการปวดศีรษะ(frontal headache) อัตราการเต้นของหัวใจไม่สม่ำเสมอ มีเหงื่อออกมากบริเวณใบหน้า คอและลำตัว ถ่ายเหลว คลื่นไส้ อาเจียน และมีอาการปวดบริเวณหลัง โดยอาการดังกล่าวข้างต้นเกิดขึ้นหลังจากการบริโภคปลา Indian mackerel ที่ไม่สดเพียงเล็กน้อย ซึ่งหลังจากแพทย์ได้ทำการวินิจฉัยคาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจาก Histamine fish poisoning นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ใหญ่จำนวน 14 รายก็ปรากฏอาการใกล้เคียงกันกับคนไข้เด็กทั้ง 2 รายหลังจากบริโภคปลา Indian mackerel ที่มาจากแหล่งเดียวกัน (24) ผลจากการระบาดของอาการอาหารเป็นพิษอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของฮิสตามีนเป็นผลทำให้ทางองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ได้ทำการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนของฮิสตามีนในปลาทะเลและผลิตภัณฑ์ที่มาจากปลาทะเลให้มีระดับของฮิสตามีนไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อเนื้อปลา 100 กรัม (50 ppm) (9) ในปัจจุบันพบว่ามีการพัฒนาวิธีการหลายหลากวิธีเพื่อให้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนและตรวจสอบการมีอยู่ของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างฮิสตามีนในปลาทะเลและผลิตภัณฑ์จากปลาทะเล ยกตัวอย่างเช่น อาหารที่ความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีน การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography, Fluorometric method, Enzyme based screening test (ELISA Kit), High performance liquid chromatography (HPLC) และ Copper chelation method (25, 29) ซึ่งผลจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮิสตา

มีนที่ให้ผลที่แม่นยำและน่าเชื่อถือที่สุดคือการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Enzyme based screening test (ELISA Kit) แต่อย่างไรก็ตามยังเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ต้องใช้เวลาและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง (15)

เพราะฉะนั้นการทำความเข้าใจเกี่ยวกับธรรมชาติรวมถึงคุณลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนและคุณสมบัติรวมถึงการทำงานของเอนไซม์ฮิสทีดิลคาร์บอกซิเลสมีความสำคัญไม่เพียงแต่ใช้สำหรับการพัฒนาวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบแต่ยังสามารถใช้การป้องกันการระบาดของอาการอาหารเป็นพิษที่เกี่ยวข้องกับ Histamine fish poisoning ซึ่งในการศึกษาทดลองครั้งได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะของยีนฮิสทีดิลคาร์บอกซิเลสเพื่อนำไปพัฒนาการตรวจสอบด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่เพื่อใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนที่ปนเปื้อนในปลาทะเลได้ในอนาคต

## บทที่ 2

### การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

#### 2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก

##### น้ำมันหอมระเหย

1. น้ำมันพลู (betel vine)
2. น้ำมันกะเพรา (holy basil)
3. น้ำมันตะไคร้ (lemongrass)
4. น้ำมันโหระพา (sweet basil)
5. น้ำมันข่า (galangal)
6. น้ำมันใบมะกรูด (kaffir lime leaf)
7. น้ำมันขมิ้น (turmeric)
8. น้ำมันผิวมะกรูด (kaffir lime peel oil)
9. น้ำมันกระชาย (finger root)
10. น้ำมันแมงลัก (hairy basil)
11. น้ำมันไพล (phlai)
12. น้ำมันผิวส้มโอ (pomelo)

##### แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277
2. *Streptococcus mutans* ATCC 25175
3. *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556

##### วิธีการทดลอง

นำเชื้อที่ใช้ในการทดสอบเพาะลงในอาหาร Brain heart infusion broth (BHI; Difco) โดยนำเชื้อ *S. mutans* และ *S. sanguinis* ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีปริมาณ CO<sub>2</sub> เท่ากับ 5% เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ *P. gingivalis* จะทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปรับค่าความขุ่นโดยให้มีค่าการดูดแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 (10<sup>7</sup> CfU/mL) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันหอมระเหยจะทำการทดสอบด้วยวิธี broth dilution method (two fold serial dilution) ใน 96-well polystyrene microtiter plate โดยใช้ tween 80 และ ethanol เป็นสารช่วยทำละลาย โดยกำหนดให้มีช่วงระดับความเจือจางอยู่ในช่วง 1 : 2 ถึง 1 : 1024 จากความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ หลังจากนั้นนำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 20 µL เติมลงในแต่ละหลุมที่มีน้ำมันระเหยความเข้มข้นตามระดับความเจือจางที่กำหนดไว้ข้างต้นโดยกำหนดให้มีปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมมีค่าเท่า 200 µL และมีความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบเท่ากับ 10<sup>6</sup>

Cfu/mL หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงทำการบันทึกค่า MIC (minimum inhibitory concentration) โดยดูจากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ (สารละลายใส) และทำการตรวจหาค่าความเข้มข้นที่เป็นค่า MBC (minimum bactericidal concentration) โดยเขียนเชื้อจากหลุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อลงบนอาหาร Brain heart infusion agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกค่า MBC โดยดูจากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง

### **ผลการทดลอง**

ผลจากการศึกษาฤทธิ์ด้านการเจริญของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อก่อโรคในช่องปากด้วยวิธี broth dilution method พบว่า น้ำมันตะไคร้มีฤทธิ์ดีที่สุดสำหรับการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบรองลงมาคือ น้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันพลู ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยน้ำมันตะไคร้มีค่า MIC และ MBC เท่ากับร้อยละ 0.02 v/v และร้อยละ 0.04 v/v เมื่อทำการทดสอบกับ *P. gingivalis* และ *S. mutans* ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.011 v/v และ 0.09 v/v เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่น้ำมันตะไคร้ที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *S. sanguinis* ได้ ในขณะที่น้ำมันใบมะกรูดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.125 v/v เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. gingivalis* และ *S. mutans* ได้และมีค่า MBC เท่ากับความเข้มข้นร้อยละ 0.125 v/v และ 0.25 v/v ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันใบมะกรูดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและสามารถฆ่าเชื้อ *S. sanguinis* ได้คือความเข้มข้นร้อยละ 0.25 v/v และ 0.5 v/v ในส่วนของฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการด้านการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบในส่วนของน้ำมันพลู พบว่าน้ำมันพลูให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อตัวอื่นที่ใช้ในการทดสอบ โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับร้อยละ 0.15 v/v และร้อยละ 0.3 v/v ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *P. gingivalis* และ *S. sanguinis* พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้คือความเข้มข้นร้อยละ 0.3 v/v และ 0.6 v/v ตามลำดับและพบว่าความเข้มข้นที่เป็นค่า MBC ต่อเชื้อ *P. gingivalis* คือ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 v/v

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ด้านการเจริญของน้ำมันหอมระเหยต่อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก

น้ำมันหอมระเหย	<i>P. gingivalis</i>		<i>S. sanguinis</i>		<i>S. mutans</i>	
	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)
น้ำมันพลู	0.3	0.6	0.6	>0.6	0.15	0.3
น้ำมันกะเพรา	>1.0	>1.0	0.3	>0.6	0.15	0.3
น้ำมันตะไคร้	0.02	0.04	0.011	0.093	0.02	0.04
น้ำมันโหระพา	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
น้ำมันข่า	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	0.208	>1.0
น้ำมันใบมะกรูด	0.125	0.125	0.25	0.5	0.125	0.25
น้ำมันขมิ้น	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
น้ำมันผิวมะกรูด	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
น้ำมันกระชาย	1.0	>1.0	>1.0	>1.0	0.5	>1.0
น้ำมันแมงลัก	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
น้ำมันไพล	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
น้ำมันเปลือกส้มโอ	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0

## 2.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

### 2.2.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชพื้นเมือง

#### พืชพื้นเมืองจากทั่วประเทศที่นำมาทดสอบ

##### ภาคอีสาน

1.น้ำเต้า	21.ผักติ้ว
2.แก่นโคม	22.ผักกาดฮีน
3.ตดหมา	23.ยอดหมักก้าก
4.ผักอีหนูนกก้าน	24.แตงโมอ่อน
5.ว่านตุตหมูปใบ	25.ยอดกระเจี๊ยบแดง
6.อุตพิษก้าน	26.ก้านคูณ
7.หมาน้อย	27.ผักแพงพวย
8.อีหนูนใบ	28.ผักชีลาว
9.ข้าเลียด	29.ผักแพว
10.ผักพราย	
11.ไข่น้ำ	
12.ตุตหมูปเหง้า	
13.ตะคร้อ	
14.อุตพิษใบ	
15.ถั่วแดง	
16.แขยง	
17.ลั่นปี่	
18.ตลับ	
19.ก้านตง	
20.หญ้านางแดง	

##### ภาคเหนือและกลาง

1.กันภัย	11.สะแล
2.ปลั่งขาว	12.ดอกชะคราม

3. กาดนา	13. ใบชะคราม
4. ชะอม	14. ผักหวานป่า
5. แคนหางคำ	15. ผักเบี้ยทะเล
6. กระเจ็ด	16. ผักขี้ขวง
7. หลุมพี	17. ปลีกกล้วยนอก
8. ผักเบี้ยหิน	18. ผักแปม
9. ดอกปลีกกล้วย	19. หวายลิง
10. ชะมวง	

#### ภาคใต้

1. กระโดนน้ำ	12. ผักยอ
2. ผักเหลียง	13. ผักคาคั่วแหวน
3. ส้มเฒ่า	14. แฉง
4. ชำมะเรียง	15. ดอกขจร
5. ผักกูด	16. ภูมิ
6. พลองเหมือด	17. มันปู
7. ลูกเหลียง	18. กระโดนบก
8. มะมุด	19. ดอกโสน
9. ดาหลา	20. กระถิน
10. ก้านจอบ	21. ผักเม็ก
11. เสริม็ดชุม	

พืชทั้งหมดได้ถูกคัดเลือกและนำมาสกัดโดยโครงการย่อยที่ 1, 2 และ 3

#### แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Enterococcus sp.*
3. *Bacillus cereus*
4. *Proteus vulgaris*
5. *Escherichia coli*
6. *Salmonella enteritidis*

7. *Salmonella typhimurium*
8. *Salmonella typhi*
9. *Salmonella paratyphi A*
10. *Salmonella paratyphi B*
11. *Shigella flexneri*

#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบโดยนำมาละลายในสารละลาย 5% DMSO โดยให้มีความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบเท่ากับ 50 mg/ml
2. เพาะเชื้อที่ใช้ในการทดสอบในอาหาร TSB ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง
3. นำเชื้อที่ได้มาปรับค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
4. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อเชื้อด้วยวิธี broth microdilution method แบบ two-fold serial dilution เพื่อหาค่า MIC (minimum inhibitory concentration) และ MBC (minimum bactericidal concentration)

#### ผลการทดลอง

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองทั้งหมดพบว่า สารสกัดยอดหมักทำให้ผลต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคทางเดินอาหารได้ดี และให้ผลการยับยั้งที่ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบโดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.39-3.13 mg/ml และ 0.78-12.5 mg/ml ตามลำดับ โดยออกฤทธิ์ดีที่สุดที่สุดต่อ *S. paratyphi B* และ *Enterococcus sp.* โดยมีค่า MIC ประมาณ 0.39 mg/ml สำหรับสารสกัดฆ่าเลือดและหลุมพื้เชื้อ *S. typhi* ได้ดีมาก โดยมีค่า MIC เพียง 0.78 mg/ml โดยพืชที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดีที่สุด คือ ฆ่าเลือด ซึ่งมีฤทธิ์เป็น bactericidal โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 1.562 mg/ml เท่ากัน (ตารางที่ 3)



ตารางที่ 3ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)

Plant extract	<i>E. coli</i>		<i>B. cereus</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>Sh. flexneri</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. enteritidis</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1.ผักเป็ดหิน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
2.ดอกปลีกล้วย	>25	>25	12.5	25	12.5	25	12.5	25	>25	>25	25	>25
3.สะแล	>25	>25	6.25	25	>25	>25	12.5	25	>25	>25	>25	>25
4.ดอกชะคราม	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
5.ชะคราม	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
6.ผักหวานป่า	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
7.ผักเป็ดทะเล	>25	>25	25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
8.ผักชีขวง	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
9.ปลีกล้วยนอก	>25	>25	12.5	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
10.ผักแปม	>25	>25	12.5	25	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25
11.หว่ายลิง	>25	>25	25	25	25	>25	>25	>25	12.5	25	>25	>25
12.น้ำเต้า	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
13.แก่นโสม	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25

ตารางที่ 3 (ต่อ)ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)

Plant extract	<i>E. coli</i>		<i>B. cereus</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>Sh. flexneri</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. enteritidis</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
14.ผักชีลาว	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
15.หญ้านางแดง	3.13	6.25	>25	>25	>25	>25	3.13	12.5	3.13	6.25	12.5	25
16.ข่ามะเขี๋ยง	>25	>25	25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25
17.เหมือดแล	12.5	25	6.25	12.5	12.5	12.5	3.13	12.5	3.13	12.5	6.25	12.5
18.กระโดนน้ำ	6.25	25	1.56	6.25	12.5	25	>25	>25	6.25	12.5	12.5	>25
19.ผักเหลียง	>25	>25	12.5	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
20.ส้มเฒ่า	25	25	12.5	12.5	12.5	25	12.5	>25	6.25	12.5	12.5	12.5
21.ก้านคูณ	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
22.ผักแพงพวย	6.25	12.5	6.25	3.13	12.5	25	12.5	>25	6.25	12.5	6.25	25
23.ยอดหมักก้าก	0.78	3.13	0.78	1.56	3.13	12.5	3.13	12.5	0.78	3.13	1.56	6.25
24.ผักกาดฮีน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
25.ยอดกระเจี๋ยบแดง	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	25	6.25	12.5	12.5	25	12.5	12.5
26.ผักแพว	12.5	25	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5	25	12.5	25	12.5	12.5

ตารางที่ 3 (ต่อ)ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)

Plant extract	<i>E. coli</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>Sh. flexneri</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
27. ผักยอ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25	3.125	6.25
28. ผักคาด	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25	12.5	25
29. แฉง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
30. ดอกขจร	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
31. ภูมิ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	25	3.125	6.25
32. มันปู	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
33. ลูกเหลียง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
34. กระโดน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	25	>25	>25	>25	>25
35. ผักกูด	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
36. ดาหลา	12.5	25	>25	>25	12.5	25	12.5	25	6.25	12.5	3.125	12.5
37. ก้านจอบ	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25
38. ดอกโสน	12.5	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	>25
39. กระถิน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	6.25	12.5
40. มะมุด	25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25	>25	>25	25	>25
41. ผักเม็ก	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
42. ตดหมา	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	25	12.5	25

ตารางที่ 3 (ต่อ)ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)

Plant extract	<i>E. coli</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>Sh. flexneri</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
43. ตูดหมูบ (ใบ)	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	1.562	3.125
44. ตูดหมูบ (เหง้า)	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	0.781	3.125	0.195	0.195
45. ตะคร้อ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
46. แขยง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	0.390	0.390	0.195	0.195
47. ข้าเลียด	1.562	1.562	1.562	1.562	1.562	1.562	1.562	1.562	1.562	1.562	1.562	1.562
48. หমান้อย	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
49. ใสน้ำ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
50. อุดพิษ (ใบ)	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	25	>25	>25
51. อีมูน (ใบ)	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
52. อุดพิษ (ก้าน)	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
53. อีมูน (ก้าน)	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
54. ก้านตง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	12.5	3.125	6.25
55. ตลับ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	25
56. ผักพราย	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	0.781	3.125	0.195	0.390
57. ลิ่นปี	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	25	12.5	25
58. ถั่วแดง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25

ตารางที่ 3 (ต่อ)ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)

Plant extract	<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>Enterococcus sp.</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>S. typhi</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1.ผักเบี้ยหิน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
2.ดอกปลีกล้วย	25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25	25	>25
3.สะแล	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25
4.ดอกชะคราม	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
5.ใบชะคราม	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
6.ผักหวานป่า	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
7.ผักเป็ดทะเล	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
8.ผักชีขวง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
9.ปลีกล้วยนอก	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25
10.ผักแปม	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
11.หว่ายลิง	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	25	>25
12.น้ำเต้า	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
13.แก่นโสม	12.5	>25	1.56	3.13	3.13	6.25	12.5	>25	3.13	3.13

ตารางที่ 3 (ต่อ)ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)

Plant extract	<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>Enterococcus sp.</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>S. typhi</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
14.ผักชีลาว	12.5	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
15.หญ้านางแดง	3.13	6.25	1.56	3.13	1.56	1.56	6.25	12.5	1.56	3.13
16.ชำมะเรียง	25	>25	>25	>25	12.5	25	12.5	>25	25	>25
17.เหมือดแล	3.13	6.25	3.13	6.25	1.56	3.13	12.5	25	3.13	12.5
18.กระโดนน้ำ	3.13	12.5	12.5	>25	1.56	6.25	6.25	25	3.13	6.25
19.ผักเหลียง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25
20.ส้มเฒ่า	6.25	12.5	12.5	25	1.56	6.25	25	>25	6.25	25
21.ก้านคูณ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
22.ผักแพงพวย	6.25	12.5	6.25	12.5	6.25	25	3.13	12.5	12.5	12.5
23.ยอดหมักก้าก	0.78	0.78	0.39	0.78	0.39	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56
24.ผักกาดฮีน	12.5	25	12.5	>25	25	>25	25	>25	12.5	>25
25.ยอดกระเจี๊ยบแดง	6.25	25	12.5	>25	6.25	25	12.5	12.5	6.25	25
26.ผักแพว	6.25	12.5	>25	>25	3.13	12.5	12.5	>25	12.5	25
27.ผักติ้ว	25	>25	>25	>25	3.13	12.5	12.5	12.5	12.5	25
28.แตงโมอ่อน	>25	>25	>25	>25	3.13	12.5	>25	>25	>25	>25

ตารางที่ 3 (ต่อ)ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)

Plant extract	<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>Enterococcus sp.</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>S. typhi</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
29. อดพิษก้าน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
30. อดพิษใบ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
31. ก้านตง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
32. ตลับ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25
33. ผักพราย	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
34. ลิ่นปี่	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
35. หมาน้อย	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
36. แขยง	12.5	>25	12.5	25	12.5	25	25	>25	25	>25
37. ถั่วแดง	>25	>25	25	>25	25	>25	25	>25	>25	>25
38. ลูกเหลียง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
39. มันปู	1.562	6.25	3.125	12.5	1.562	12.5	6.25	25	3.125	3.125
40. ตดหมา	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
41. อีหนูใบ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
42. ผักเม็ก	3.125	12.5	12.5	25	3.125	12.5	6.25	>25	6.25	25
43. ผักคาดหัวแหวน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25

ตารางที่ 3 (ต่อ)ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)

Plant extract	<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>Enterococcus sp.</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>S. typhi</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
44.ฝักยอ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
45.ตุลุมใบ	>25	>25	25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25
46.อินูนก้าน	25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25	25	25
47.แจง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
48.ดอกโสน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
49.ชำเลือด	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25	6.25	6.25	12.5	0.78	1.56
50.ไข่น้ำ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
51.ภูมิ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
52.กระถิน	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	25
53.ดอกขจร	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
54.ดาหลา	6.25	12.5	6.25	12.5	6.25	12.5	25	>25	6.25	12.5
55.ตะคร้อ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
56.ตุลุมใบเห้ง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
57.กระโดน	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	25	>25
58.มะนุด	>25	>25	>25	>25	12.5	>25	>25	>25	25	25



ตารางที่ 3 (ต่อ)ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของสารสกัดพืชพื้นเมืองแสดงเป็นค่า MIC และ MBC (mg/ml)

Plant extract	<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>Enterococcus sp.</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>S. typhi</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
59.ผักกูด	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
60.ก้านจอบ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25
61.กันภัย	12.5	25	>25	>25	12.5	12.5	>25	>25	12.5	25
62.ชะมวง	12.5	12.5	3.13	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5	3.13	6.25
63.หลุมพี	12.5	12.5	3.13	6.25	12.5	12.5	3.13	6.25	0.78	1.56
64.แคหางค่าง	12.5	12.5	>25	>25	>25	>25	12.5	12.5	25	>25
65.กาดนา	25	>25	12.5	>25	25	25	12.5	25	>25	>25
66.ปลั่งขาว	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
67.กระเจต	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
68.ชะอม	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25

## 2.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน

### 2.3.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนของน้ำมันหอมระเหย

#### วิธีการทดลอง

##### 1. การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียจาก stock มาเพาะ ลงบน TSA Plate แล้วนำไปบ่มเพาะในตู้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจาก TSA Plate ที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงต่อใน TSB แล้วนำไปบ่มเพาะภายใต้อุณหภูมิห้องนาน 16-18 ชั่วโมง

##### 2. Antimicrobial susceptibility test

###### 2.1 Disc diffusion method

นำเชื้อที่บ่มเพาะใน TSB ภายใต้อุณหภูมิห้องนาน 16-18 ชั่วโมง มาปรับความขุ่นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า OD เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 nm นำเชื้อที่ทำการปรับค่า OD แล้วมา streak บน TSA เพื่อให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้ง plate จากนั้นหยดน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการทดสอบปริมาตร 10  $\mu$ L ลงบน paper disc ที่ sterile บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้น

###### 2.2 Broth microdilution method

เตรียมน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 1.0 %v/v โดยใช้ oil : tween 80 : 95% ethanol : TSB ในอัตราส่วน 1 : 3 : 3 : 93 นำเชื้อที่บ่มเพาะใน TSB ภายใต้อุณหภูมิห้องนาน 16-18 ชั่วโมงมาปรับความขุ่นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 nm ดูดน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100  $\mu$ L ใส่ลงในหลุมแบบ 2-fold serial dilution ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมเชื้อที่ได้ปรับค่า OD เตรียมไว้แล้วลงใน 96-well plate ทุกหลุมซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยดังตารางที่ 4 นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง แปลผลการทดลองโดยหลุมที่ขุ่น แสดงว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนหลุมที่ใสแสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยค่า MIC ดูได้จากหลุมที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยังให้ผลการทดลองใสอยู่ แล้วทำการหาค่า MBC โดยการใช้วิธี drop plate method

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของการเจือจางน้ำมันหอมระเหย

แถว	Nutrient Broth (μL)	Oil (μL)	Adjusted culture (μL)	Final concentration	
				μL/ml	%v/v
A	-	100 μL of stock solution	20	5.0	0.50
B	100	100 μL of stock solution	20	2.5	0.25
C	100	100 μL from B	20	1.25	0.13
D	100	100 μL from C	20	0.63	0.06
E	100	100 μL from D	20	0.31	0.03
F	100	100 μL from E	20	0.16	0.02
G	100	100 μL from F	20	0.08	0.01
H	100	100 μL from H	20	0.04	0.004

### 3. การทดลองหาสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี Bioautography

#### 3.1 การเตรียม TLC โดยใช้ Silica gel GF<sub>254</sub>

เตรียม System ในการ develop TLC ซึ่งประกอบด้วย Toluene : EtOAc (93:7) สำหรับ lemongrass oil และ clove oil ส่วน Toluene : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3:1) สำหรับ Sweet basil oil โดยทิ้งไว้ให้อิ่มตัวประมาณ 1 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกลำดับน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ครอบคลุมแบคทีเรียที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากผลการทดลอง antimicrobial susceptibility test ซึ่งพบว่าน้ำมันหอมระเหยสามชนิดที่มีฤทธิ์นี้คือ lemongrass oil, clove oil และ sweet basil oil

เตรียมน้ำมันให้มีความเข้มข้น 1 %v/v โดยใช้ ethanol เจือจาง และเตรียมสารละลายมาตรฐาน ซึ่งเป็น major components ของน้ำมันแต่ละชนิดใช้เป็น reference มีดังนี้ คือ eugenol, caryophylline ใช้เป็น reference สำหรับ clove oil และ myrcene, geraniol, citral, citronellol, citronellal ใช้เป็น reference สำหรับ lemongrass oil ส่วน methyl charvicol, linalool, methyl eugenol, cineol ใช้เป็น reference สำหรับ sweet basil oil

Spot น้ำมันแต่ละชนิดและสาร reference ลงบนแผ่น TLC แล้วนำแผ่น TLC ที่ spot เรียบร้อยแล้ว ไป develop ใน system ที่เตรียมไว้ เมื่อถึงระยะที่กำหนดแล้วจึงนำแผ่น TLC ขึ้นมา และทิ้งให้ solvent ระเหยออกไปจากแผ่นจนหมด

#### 3.2 การทดลอง Bioautography

นำเชื้อที่บ่มเพาะใน TSB ภายใต้อุณหภูมิห้องนาน 16-18 ชั่วโมงมาปรับความขุ่นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า OD เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 nm จากนั้นนำแผ่น TLC ที่เตรียมไว้วางบน agar base ที่แข็งตัวแล้ว โดยหยาด้าน silica gel ขึ้นด้านบน ทำการผสมเชื้อที่ปรับค่า OD แล้วให้เข้ากับ agar seed แล้วเท agar seed ที่ผสมเชื้อแล้วทับลงบน agar plate

ที่วางแผ่น TLC ไว้แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิห้องนาน 16-18 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยดูจากตำแหน่งของ clear zone ที่เกิดขึ้นทั้งจากน้ำมันหอมระเหยและสาร reference (spray ด้วย tetrasolium salt เพื่อให้เห็น clear zone ชัดเจนยิ่งขึ้น)














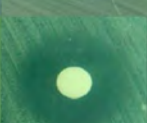


























#### ผลการทดลอง

จากการทดลองด้วยวิธี disc diffusion พบว่า clove oil สามารถยับยั้ง *Morganella morganii* ได้ดีที่สุด ส่วน sweet basil oil สามารถยับยั้ง *Acinetobacter junii* ได้ดีที่สุด และ lemongrass oil สามารถยับยั้ง *Myroides sp.*, *Psychrobacter arenosus* ได้ดีที่สุด ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่มีผลต่อ *M. morganii*, *Myroides sp.*, *P. arenosus*, *A. junii* ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 1

ตารางที่ 5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดโดยวิธี disc diffusion (ขนาดวงใสเป็น cm)

Oil \ เชื้อ	<i>M. morganii</i>	<i>A. junii</i>	<i>Myroides sp.</i>	<i>P. arenosus</i>
1. Finger root oil	$0.87 \pm 0.06$	$0.9 \pm 0$	$1.63 \pm 0.06$	$1.47 \pm 0.06$
2. Lime oil	ND	$1.4 \pm 0$	$2.7 \pm 0.3$	$1.47 \pm 0.06$
3. Betel vine oil	$0.97 \pm 0.06$	$2.13 \pm 0.06$	$2.07 \pm 0.06$	$2.67 \pm 0.32$
4. Clove oil	$1.57 \pm 0.06$	$2.17 \pm 0.06$	$2.27 \pm 0.06$	$2.90 \pm 0.10$
5. Kaffir Lime oil	$1.43 \pm 0.06$	$1.90 \pm 0.10$	$1.90 \pm 0.10$	$1.87 \pm 0.12$
6. Kaffir Lime Leaf oil	ND	$1.33 \pm 0.12$	$5.70 \pm 0$	$4.20 \pm 0.28$
7. Lemongrass oil	$1.10 \pm 0.10$	$1.87 \pm 0.12$	$9.25 \pm 0.35$	$4.37 \pm 0.61$
8. Galanga oil	ND	$1.20 \pm 0.10$	$1.13 \pm 0.06$	$1.23 \pm 0.06$
9. Holy Basil oil	$1.10 \pm 0.10$	$1.70 \pm 0$	$2.00 \pm 0$	$2.0 \pm 0.10$
10. Sweet Basil Oil	$1.33 \pm 0.06$	$3.03 \pm 1.37$	$2.81 \pm 0.12$	$2.60 \pm 0.39$

\*\*หมายเหตุ ND = not detected

	A	B	C	D
น้ำมันกานพลู (clove oil)				
น้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil)				
น้ำมันโหระพา (sweet basil oil)				
น้ำมันกะเพรา (holy basil oil)				
น้ำมันข่า (galanga oil)				
น้ำมันผิวมะกรูด (kaffir lime oil)				
น้ำมันใบมะกรูด (kaffir lime leaf oil)				
น้ำมันมะนาว (lime oil)				
น้ำมันพลู (betel vine oil)				
น้ำมันกระชาย (finger root oil)				

รูปที่ 1 Inhibition zone ที่เกิดจากน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่มีผลต่อ *M. morganii* (A), *P. arenosus* (B), *Myroides* sp. (C), *A. junii* (D) โดยวิธี disc diffusion

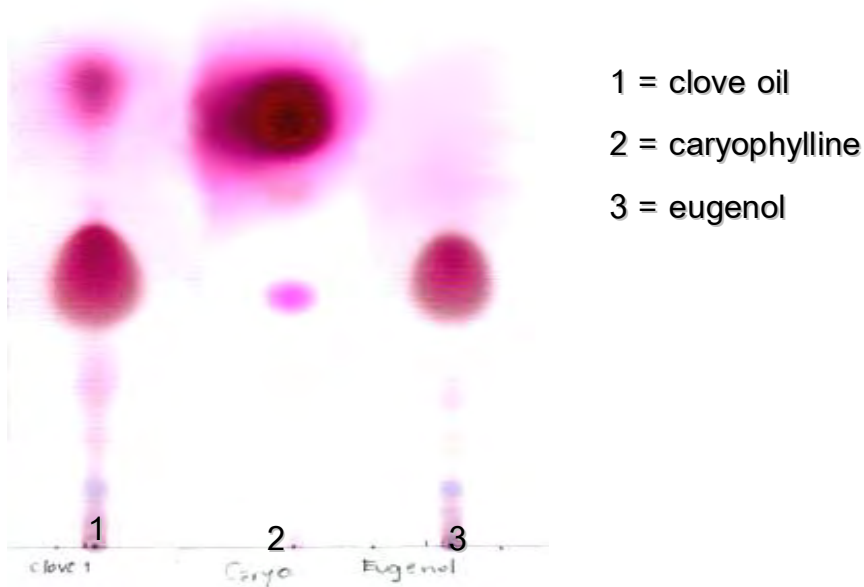
เมื่อพิจารณาที่ค่า MIC และ MBC พบว่า น้ำมันกานพลู (clove oil) แสดงฤทธิ์ดีที่สุดต่อ *M. morganii* (MIC=0.125%v/v, MBC=0.250%v/v) ส่วนน้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil) และน้ำมันใบมะกรูด (kaffir lime leaf oil) แสดงฤทธิ์ดีที่สุดต่อ *P. arenosus* และ *Myroides sp.* (MIC and MBC=0.016 – 0.031%v/v) และสำหรับ *A. junii* ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดโดยน้ำมันพลู (betel vine oil) (MIC=0.031%v/v) และถูกทำลายได้ดีที่สุดด้วยน้ำมันตะไคร้ น้ำมันโหระพา และน้ำมันใบมะกรูด (MBC = 0.125%v/v) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่า MIC และ MBC (% v/v) ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *M. morganii*, *P. arenosus*, *A. junii* และ *Myroides sp.*

เชื้อ Oil	<i>M. morganii</i>		<i>P. arenosus</i>		<i>Myroides sp.</i>		<i>A. junii</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Clove	0.13	0.25	0.06	0.13	0.06	0.25	0.06	0.13
Lemongrass	0.50	0.50	0.02	0.02	0.02	0.03	0.13	0.13
Lime	> 0.50	> 0.50	> 0.50	> 0.50	0.03	0.25	0.50	0.50
Betel vine	> 0.50	> 0.50	0.63	> 0.50	0.13	0.50	0.03	0.25
Kaffir lime leaf	> 0.50	> 0.50	0.02	0.03	0.02	0.03	0.25	0.50
Kaffir Lime	> 0.50	> 0.50	0.25	0.25	0.13	0.25	0.13	0.13
Galanga	> 0.50	> 0.50	> 0.50	> 0.50	> 0.50	> 0.50	> 0.50	> 0.50
Finger root	> 0.50	> 0.50	0.25	0.50	0.25	0.25	0.25	> 0.50
Sweet basil	0.25	0.50	0.06	0.25	0.06	0.13	0.13	0.25
Holy Basil	> 0.50	> 0.50	0.06	0.13	0.13	0.50	0.13	> 0.50

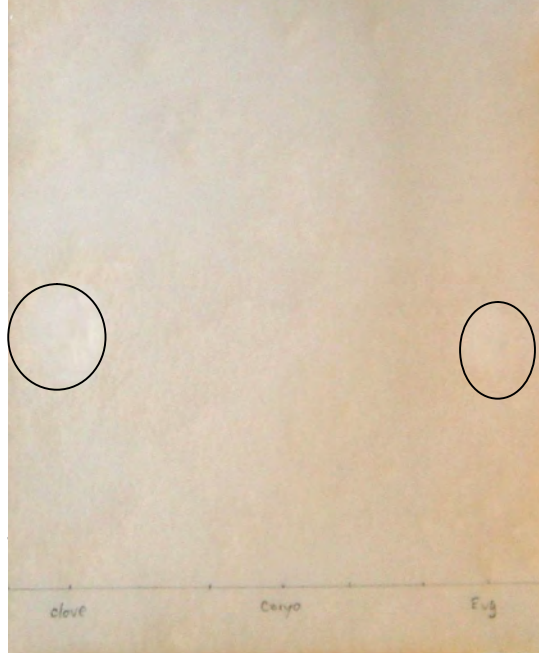
จากผลการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion และ broth microdilution เมื่อนำมาพิจารณาคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อทั้งสี่ชนิดได้ดีที่สุด และนำไปหาสาร major components ที่คาดว่าจะเป็สารที่ทำให้ น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี TLC และ bioautography method พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่น่าสนใจในการนำไปทำการทดลองต่อมีสามชนิด คือ น้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil) น้ำมันโหระพา (sweet basil oil) และ น้ำมันกานพลู (clove oil)

เมื่อทำการศึกษาด้วยวิธี TLC bioautography พบว่า สารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยที่แสดงฤทธิ์ antibacterial activity น่าจะเป็น eugenol ใน clove oil ส่วนใน lemongrass oil คือ citral และใน sweet basil oil คือ methyl charvicol (รูปที่ 2-7) ซึ่งในส่วนของการตรวจสอบวิเคราะห์เพื่อยืนยันสารออกฤทธิ์นี้ ได้ส่งต่อให้โครงการย่อยที่ 1 ดำเนินการต่อแล้ว



รูปที่ 2 TLC chromatogram ของน้ำมันกานพลู (clove oil) เมื่อพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric reagent

*M. morganii*

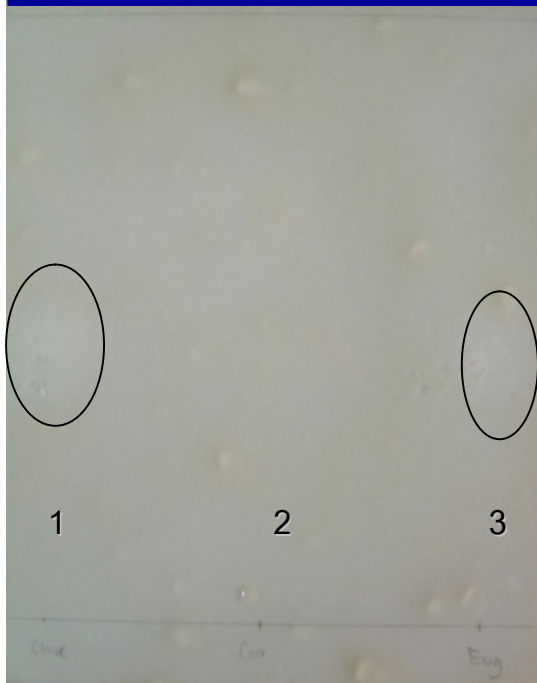


1 = clove oil

2 = caryophylline

3 = eugenol

*A. junii*



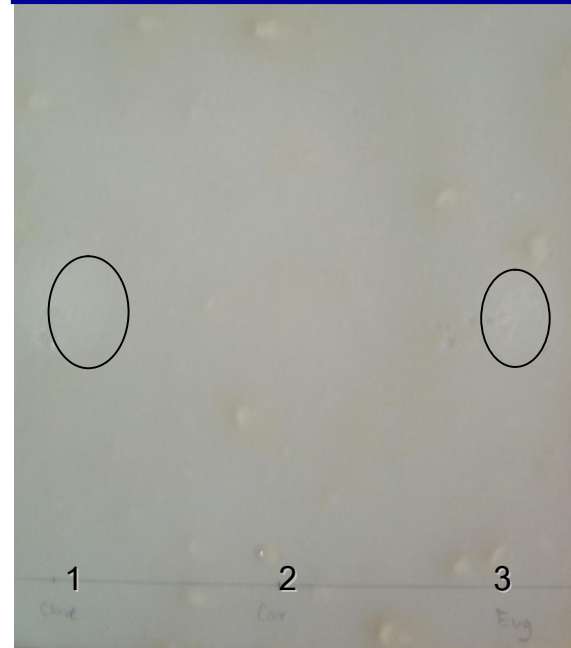
1 = clove oil

2 = caryophylline

3 = eugenol

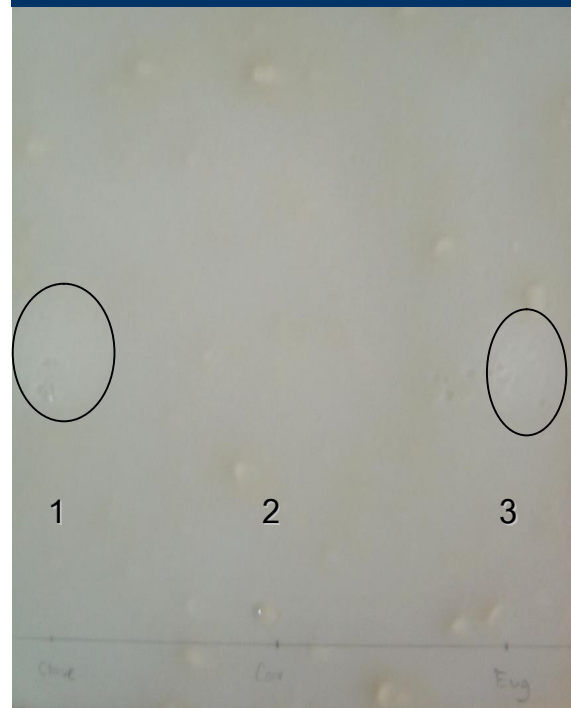


*Myroides sp.*



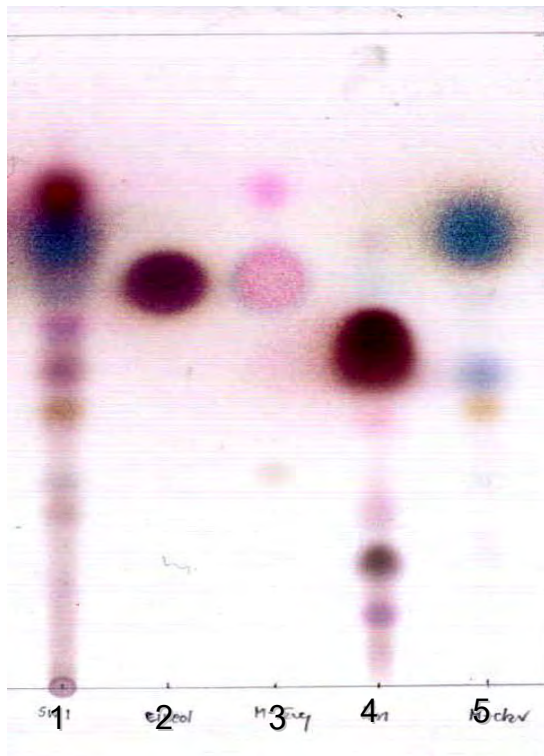
- 1 = clove oil
- 2 = caryophylline
- 3 = eugenol

*P. arenosus*



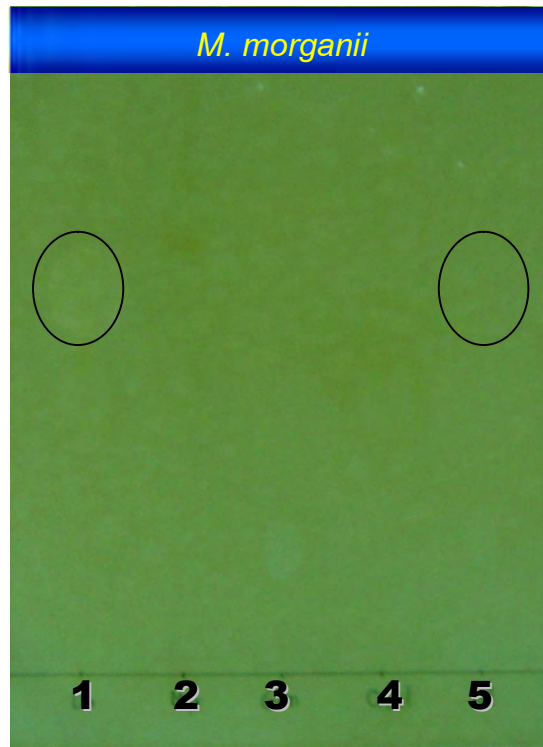
- 1 = clove oil
- 2 = caryophylline
- 3 = eugenol

รูปที่ 3 ผลการทดลอง bioautography ของน้ำมันกานพลู (clove oil)

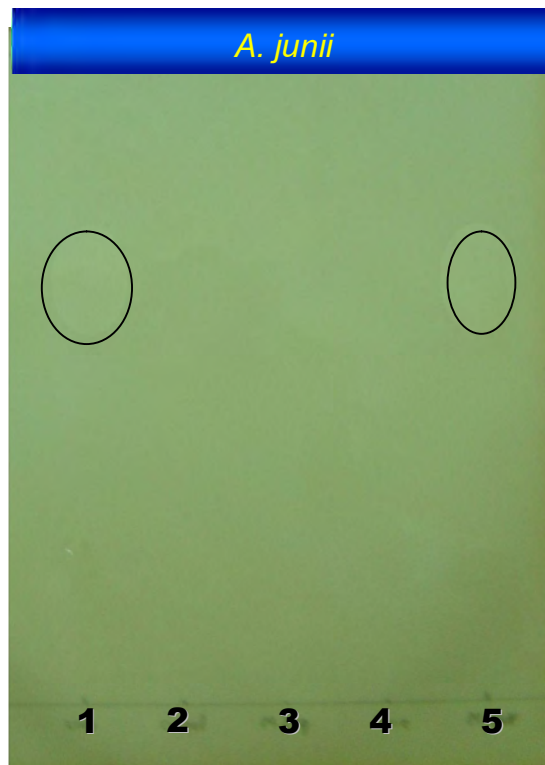


- 1 = sweet basil oil
- 2 = cineol
- 3 = methyl eugenol
- 4 = linalool
- 5 = methyl charvicol

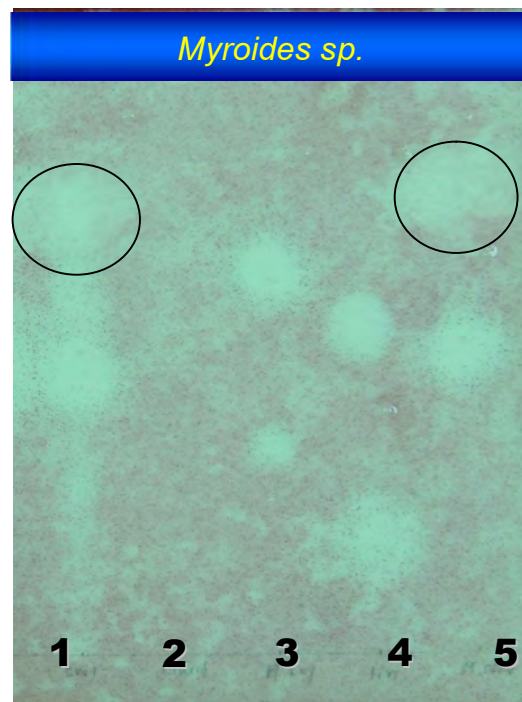
รูปที่ 4 TLC chromatogram ของน้ำมันโหระพา (sweet basil oil) เมื่อพ่นด้วย anisaldehyde- sulfuric reagent



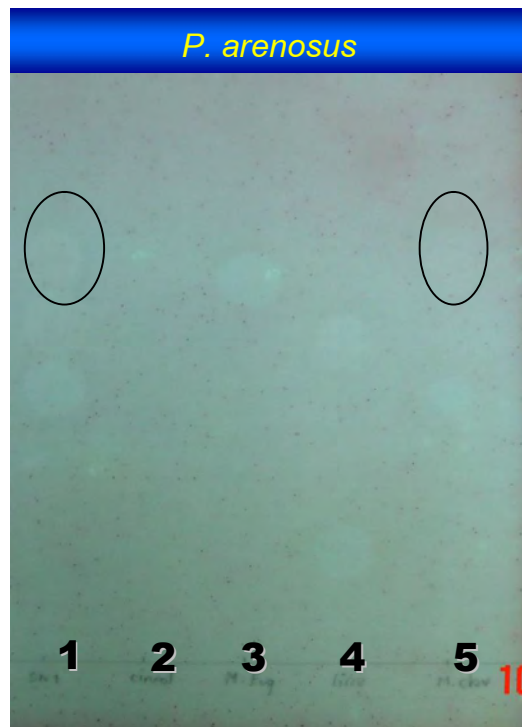
- 1 = sweet basil oil
- 2 = cineol
- 3 = methyl eugenol
- 4 = linalool
- 5 = methyl charvicol



- 1 = sweet basil oil
- 2 = cineol
- 3 = methyl eugenol
- 4 = linalool
- 5 = methyl charvicol

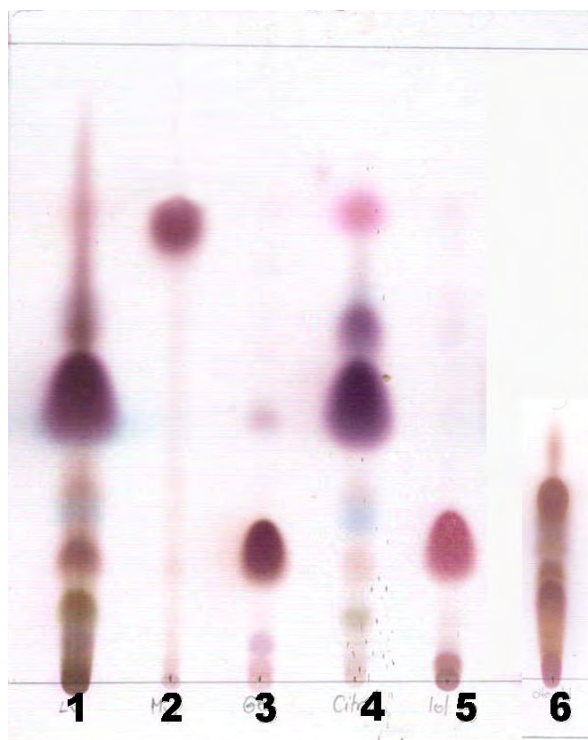


- 1 = sweet basil oil
- 2 = cineol
- 3 = methyl eugenol
- 4 = linalool
- 5 = methyl charvicol



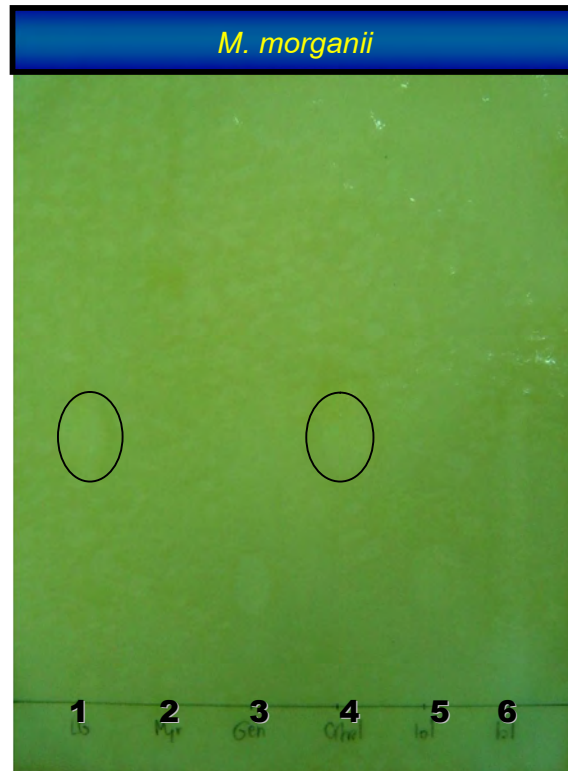
- 1 = sweet basil oil
- 2 = cineol
- 3 = methyl eugenol
- 4 = linalool
- 5 = methyl charvicol

รูปที่ 5 ผลการทดลอง bioautography ของน้ำมันโหระพา (sweet basil oil)



- 1 = lemongrass oil
- 2 = myrcene
- 3 = geraniol
- 4 = citral
- 5 = citronellol
- 6 = citronellal

รูปที่ 6 TLC chromatogram ของน้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil) เมื่อ spray ด้วย anisaldehyde-sulfuric reagent



1 = lemongrass oil

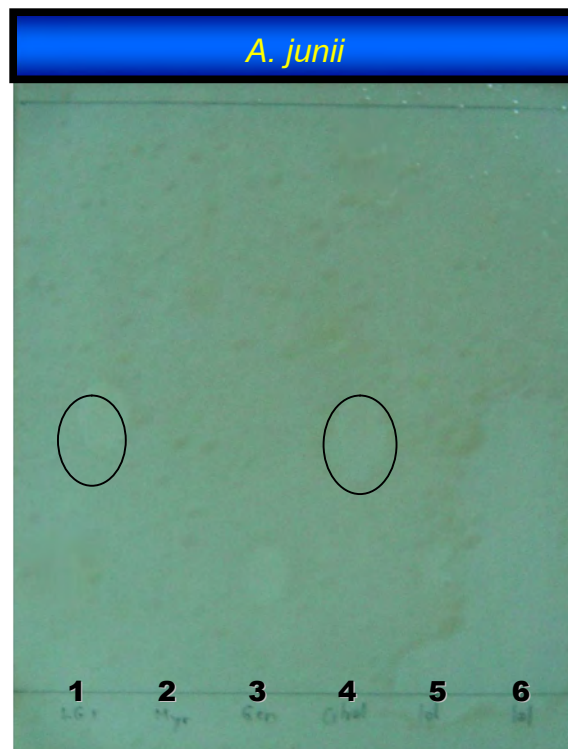
2 = myrcene

3 = geraniol

4 = citral

5 = citronellol

6 = citronellal



1 = lemongrass oil

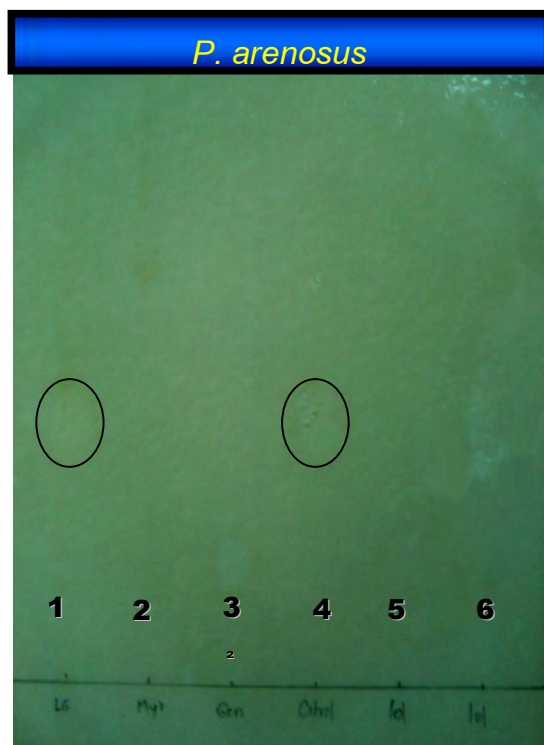
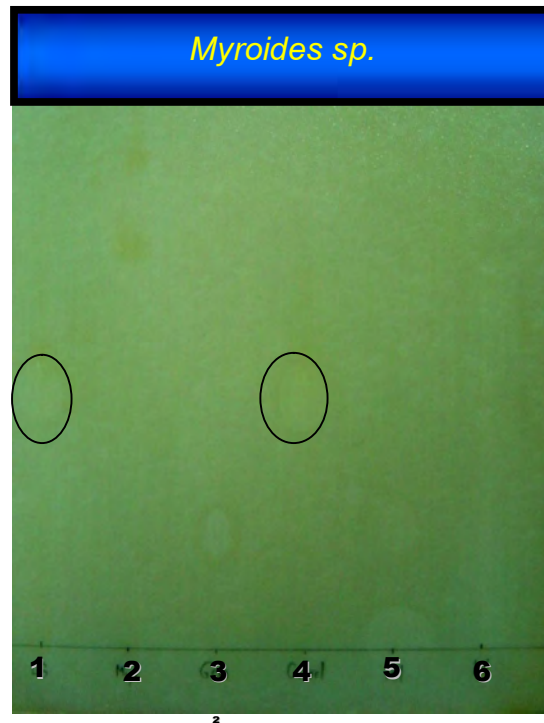
2 = myrcene

3 = geraniol

4 = citral

5 = citronellol

6 = citronellal



รูปที่ 7 ผลการทดลอง Bioautography ของน้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil)

### 2.3.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนของสารสกัดพืชพื้นเมือง

#### แบคทีเรียทดสอบ

1. *Morganella morganii*
2. *Myroides sp.*
3. *Psychrobacter arenosus*
4. *Acinetobacter junii*

#### วิธีการทดลอง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1

#### ผลการทดลอง

จากการทดลอง เมื่อพิจารณาที่ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดพืชพื้นเมืองที่รวบรวมได้จากทั่วประเทศทั้งหมดต่อแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน พบว่า สารสกัดข้าเลือดและหมักกากแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.39-3.13 mg/ml และ MBC อยู่ในช่วง 0.39-12.5 mg/ml ดังตารางที่ 7 พืชทั้งสองชนิด จึงเป็นพืชที่มีศักยภาพและน่าสนใจที่จะศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ต่อไป



ตารางที่ 7 ค่า MIC และ MBC (mg/ml) ของสารสกัดพืชต่อเชื้อ *M. morganii*, *P. arenosus*, *A. junii* และ *Myroides sp.*

Plant extract	<i>M. morganii</i>		<i>A. junii</i>		<i>Myroides sp.</i>		<i>P. arenosus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1.น้ำเต้า	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
2.แก่นโสม	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
3.ตดหมา	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
4.ผักอินูนก้าน	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
5.ว่านตุตหมูปใบ	25	> 25	> 25	> 25	25	> 25	> 25	> 25
6.อุตพิษก้าน	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
7.หมาน้อย	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
8.อินูนใบ	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
9.ข้าเลียด	3.13	6.25	0.39	0.39	3.13	3.13	0.39	0.39
10.ผักพราย	> 25	> 25	> 25	> 25	25	> 25	> 25	> 25
11.ไผ่น้ำ	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
12.ตุตหมูปเหง้า	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
13.ตะคร้อ	> 25	> 25	> 25	> 25	12.5	12.5	25	25
14.อุตพิษใบ	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
15.ถั่วแดง	> 25	> 25	> 25	> 25	25	> 25	> 25	> 25
16.แขยง	12.5	25	3.125	12.5	6.25	6.25	6.25	12.5
17.ลิ้นปี่	> 25	> 25	25	> 25	25	> 25	> 25	> 25
18.ตลับ	> 25	> 25	25	> 25	25	> 25	> 25	> 25
19.ก้านตง	> 25	> 25	25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
20.หญ้านางแดง	12.5	3.125	6.25	12.5	3.125	12.5	1.562	3.125
21.ผักติ้ว	25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
22.ผักกาดฮีน	> 25	> 25	> 25	> 25	25	> 25	> 25	> 25
23. ยอดหมักกาก	3.13	12.5	0.39	1.56	0.39	1.56	0.39	0.78
24.แดงโมอ่อน	> 25	> 25	25	> 25	25	> 25	> 25	> 25

Plant extract	<i>M. morgani</i>		<i>A. junii</i>		<i>Myroides sp.</i>		<i>P. arenosus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
25.ยอด กระเจียวแดง	12.5	25	12.5	12.5	12.5	25	12.5	25
26.ก้านคูณ	25	25	25	> 25	25	> 25	25	> 25
27.ผักแพงพวย	3.125	12.5	25	> 25	0.78	1.562	1.562	12.5
28.ผักชีลาว	> 25	> 25	25	25	> 25	> 25	> 25	> 25
29.ผักแว่น	6.25	12.5	3.125	12.5	6.25	6.25	3.125	12.5
30.ชะมวง	12.5	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25	12.5
31.กันภัย	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5
32.ปลั่งขาว	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
33.กาดนา	12.5	25	12.5	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5
34.ชะอม	> 25	> 25	25	> 25	6.25	> 25	> 25	> 25
35.แคหางค่าง	> 25	> 25	25	> 25	6.25	> 25	> 25	> 25
36.กระเจ็ด	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
37.หลุมพี	3.13	12.5	1.56	6.25	1.56	6.25	1.56	3.13
38.ผักเบี้ยหิน	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
39.ดอกปลี กล้วย	12.5	25	12.5	25	25	> 25	12.5	25
40.สะแล	> 25	> 25	12.5	25	25	> 25	12.5	12.5
41.ดอกชะคราม	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
42.ชะคราม	> 25	> 25	25	> 25	25	25	> 25	> 25
43.ผักหวานป่า	> 25	> 25	6.25	12.5	> 25	> 25	> 25	> 25
44.ผักเบี้ยทะเล	> 25	> 25	25	> 25	25	25	25	> 25
45.ผักขี้ขวง	3.125	6.25	> 25	> 25	25	25	> 25	> 25
46.ปลีกล้วย นอก	> 25	> 25	> 25	> 25	25	25	25	> 25
47.ผักแปม	> 25	> 25	12.5	25	12.5	25	6.25	3.13
48.หวายลิง	> 25	> 25	1.56	3.13	25	> 25	1.562	3.13

Plant extract	<i>M. morganiiii</i>		<i>A. junii</i>		<i>Myroides sp.</i>		<i>P. arenosus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
49.กระโดนน้ำ	1.56	6.25	> 25	> 25	1.56	6.25	1.56	6.25
50.ผักเหลียง	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
51.ส้มเฒ่า	6.25	12.5	12.5	> 25	3.125	12.5	12.5	12.5
52.ข่ามะเขีย	12.5	25	25	25	12.5	25	12.5	25
53.พลอง เหมือด	1.56	3.13	3.13	12.5	> 25	> 25	6.25	12.5

### สรุปผลการทดลอง

ในส่วนแรกของโครงการซึ่งศึกษาถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่างๆ พบว่า น้ำมันตะไคร้ มีฤทธิ์ดีที่สุดสำหรับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก รองลงมาคือน้ำมันใบมะกรูด และน้ำมันพลู ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 11 สายพันธุ์ของสารสกัดพืชพื้นเมืองทั้งหมดนั้น จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดยอดหมักกักให้ผลต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคทางเดินอาหารได้ดี ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบโดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.39-3.13 มก./มล. และ 3.13-12.5 มก./มล. ตามลำดับ โดยออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อ *Salmonella paratyphi B* และ *Enterococcus sp.* โดยมีค่า MIC ประมาณ 0.39 มก./มล. สำหรับสารสกัดข่าเลือดและหลุมพืออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella typhi* ได้ดีมาก โดยมีค่า MIC เพียง 0.78 มก./มล. สำหรับฤทธิ์ต่อแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนได้นั้น จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดข่าเลือดและหมักกักแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.39-3.125 มก./มล. และ MBC อยู่ในช่วง 0.39-12.5 มก./มล. จึงเป็นพืชที่มีศักยภาพและน่าสนใจที่จะศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ต่อไป

## บทที่ 3

### การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดพืชอาหารนี้ เนื่องจากมีสารทดสอบจำนวนมาก จึงได้ทำการคัดเลือกจากพืชที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยการประชุมหารือร่วมกับโครงการย่อยที่ 1-3 ซึ่งรับผิดชอบในส่วนของการสกัดและแยกสารออกฤทธิ์ ได้พืชทั้งหมด 11 ชนิด คือ กระโดน หวายลิง มะตูมซาอุ ข้าวเลื้อย ชะมวง เสม็ดขุน มันปู ชะอม ปลีกกล้วย ผักหวานป่า ผักขี้ขวง โดยทำการทดสอบดังต่อไปนี้

#### 3.1 สารสกัดพืชพื้นเมือง

##### 3.1.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide ของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านต่อ RAW 246.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS)

###### วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยง RAW 246.7 macrophages cells ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 1X L-glutamine และ 1X Penicillin/Streptomycin โดยให้มีปริมาณ cell เริ่มต้นเท่ากับ  $10^6$  cell/ml นำ cell ไปเลี้ยงในสภาวะ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อใน 96-well microtiter plate โดยให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ  $5 \times 10^5$  cells/ml เลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เทอาหารเดิมออกและล้างด้วย DMEM 1 ครั้ง หลังจากนั้นเติมอาหารพร้อมด้วย LPS 100 ng/ml นำไปบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลาหลังจากกระตุ้นด้วย LPS แล้วเติมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบให้ในความเข้มข้น 100 µg/ml ลงในหลุมแต่ละหลุม หลังจากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. วิเคราะห์ปริมาณ nitric oxide โดยนำส่วนใสในแต่ละหลุมมาผสมกับ Griess reagent ในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งในการทดลองนี้ปริมาณของส่วนใสและ Griess reagent เท่ากับ 100 µL
6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ก่อนทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง

### ผลการทดลอง

จากผลการทดลองเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) พบว่า สารสกัดชะมวงมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง nitric oxide จากเซลล์ macrophage ภายหลังการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ได้ดีที่สุด โดยสามารถลดปริมาณ nitric oxide ได้ถึงร้อยละ 57.33 ส่วนสารสกัดข้าเลือด เสม็ดขุน และมันปู ให้ผลดีในลำดับถัดมา คือ ยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ได้ที่ร้อยละ 40.67, 39.68 และ 39.37 ตามลำดับ โดยหวายลิงและผักชีขวงไม่มีผลด้านการหลั่งของ nitric oxide (ตารางที่ 8) ในขณะที่ dexamethasone ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบและใช้เป็น positive control ในการทดลอง สามารถยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ได้ถึงร้อยละ 62.50

ตารางที่ 8 ผลการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ของสารสกัดพืชชนิดต่างๆ

สารสกัดพืช	ปริมาณ nitrite ( $\mu\text{mol/L}$ )	Percentage of Inhibition
กระโดน	38.54	27.55
มะตูมขาว	40.64	23.62
หวายลิง	62.36	ND
ข้าเลือด	31.56	40.67
<b>ชะมวง</b>	<b>22.70</b>	<b>57.33</b>
เสม็ดขุน	32.09	39.68
มันปู	32.25	39.37
ชะอม	48.55	8.73
ปลีกกล้วย	45.86	13.79
ผักหวานป่า	39.74	25.31
ผักชีขวง	52.85	0.65
Dexamethasone	19.95	62.50

ND : ไม่สามารถประเมินได้

### 3.1.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$ ของสารสกัดสมุนไพรรพินบ้านต่อ RAW 246.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS)

#### วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยง RAW 246.7 macrophages cells ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 1X L-glutamine และ 1X Penicillin/Streptomycin โดยให้มีปริมาณ cell เริ่มต้นเท่ากับ  $10^6$  cells/ml นำ cell ไปเลี้ยงในสภาวะ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงต่อใน 96-well microtiter plate โดยให้จำนวน cell เริ่มต้นในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ  $5 \times 10^5$  cells/ml เลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เติอาหารเดิมออกและล้างด้วย DMEM 1 ครั้ง หลังจากนั้นเติมอาหารพร้อมด้วย LPS 100 ng/ml นำไปบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลาหลังจากกระตุ้นด้วย LPS แล้วเติมสารสกัดพืชที่ใช้ในการทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml ลงในหลุมแต่ละหลุม หลังจากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลาบ่มนำส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) ไปวิเคราะห์หาปริมาณ TNF- $\alpha$  ด้วยชุดทดสอบ ELISA เทียบกับ TNF- $\alpha$  มาตรฐาน

#### ผลการทดลอง

จากผลการทดลองเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดชะมวงให้ผลยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$  จากเซลล์ macrophage ภายหลังการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ได้ดีที่สุด โดยสามารถลดปริมาณ TNF- $\alpha$  ได้ถึงร้อยละ 42.70 ส่วนสารสกัดปลีกล้วย เสม็ดขุน และชะอม ให้ผลดีในลำดับถัดมา คือ ยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$  ได้ที่ร้อยละ 41.73, 34.02 และ 29.18 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ในขณะที่ dexamethasone ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบและใช้เป็น positive control ในการทดลอง สามารถยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ได้ถึงร้อยละ 53.22

ตารางที่ 9 ผลการยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$  ของสารสกัดพืชชนิดต่างๆ

สารสกัดพืช	ปริมาณ TNF- $\alpha$ (ng/ml)	Percentage of Inhibition
กระโดน	2418	16.60
ยอดมะตูม	2375	18.07
หวายลิง	2197	24.21
ข้าเลียด	2199	24.14
ชะมวง	1661	42.70
เสมีดขุน	2163	34.02
มันปู	3773	ND
ชะอม	2053	29.18
ปลีกล้วย	1689	41.73
ผักหวานป่า	2485	14.28
ผักขี้ขวง	2206	23.90
Dexamethasone	1356	53.22

ND : ไม่สามารถประเมินได้

### 3.1.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-6 ของสารสกัดสมุนไพรรพินบ้านต่อ RAW 246.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS)

#### วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยง RAW 246.7 macrophages cells ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 1X L-glutamine และ 1X Penicillin/Streptomycin โดยให้มีปริมาณ cell เริ่มต้นเท่ากับ  $10^6$  cells/ml นำ cell ไปเลี้ยงในสภาวะ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงต่อใน 96-well microtiter plate โดยให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ  $5 \times 10^5$  cells/ml เลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เทอาหารเดิมออกและล้างด้วย DMEM 1 ครั้ง หลังจากนั้นเติมอาหารพร้อมด้วย LPS 100 ng/ml นำไปบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลาหลังจากกระตุ้นด้วย LPS แล้วเติมสารสกัดพืชที่ใช้ในการทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml ลงในหลุมแต่ละหลุม หลังจากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลาบ่มนำส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) ไปวิเคราะห์หาปริมาณ IL-6 ด้วยชุดทดสอบ ELISA เทียบกับ IL-6 มาตรฐาน

#### ผลการทดลอง

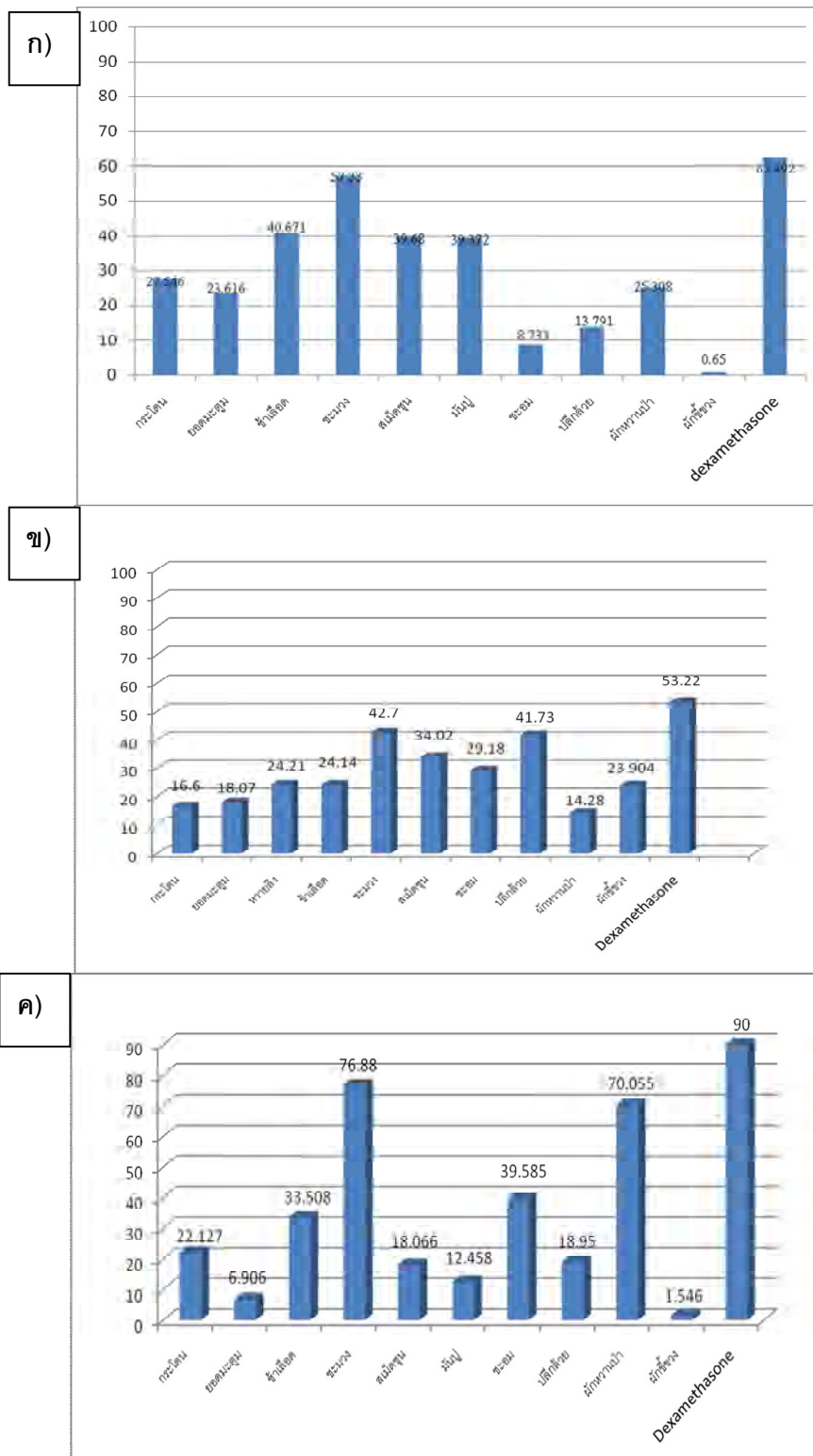
จากผลการทดลองเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดชะมวงให้ผลยับยั้งการหลั่ง IL-6 จากเซลล์ macrophage ภายหลังการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ได้ดีที่สุด โดยสามารถลดปริมาณ IL-6 ได้ถึงร้อยละ 76.88 ส่วนสารสกัดผักหวานป่า ชะอม และข้าเลียด ให้ผลดีในลำดับถัดมา คือ ยับยั้งการหลั่ง IL-6 ได้ที่ร้อยละ 70.05, 39.58 และ 33.51 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ในขณะที่ dexamethasone ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบและใช้เป็น positive control ในการทดลอง สามารถยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ได้ถึงร้อยละ 90.00



ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งการหลั่ง IL-6 ของสารสกัดพืชชนิดต่างๆ

สารสกัดพืช	ปริมาณ IL-6 (ng/ml)	Percentage of Inhibition
กระโดน	1409	22.13
ยอดมะตูม	1685	6.91
หวายลิง	1866	ND
ข้าเลียด	1203	33.51
<b>ชมวง</b>	<b>418</b>	<b>76.88</b>
เสม็ดขุน	1483	18.07
มันปู	1584	12.46
ชะอม	1093	39.58
ปลีกล้วย	1467	18.95
ผักหวานป่า	542	70.05
ผักชีขวง	1782	1.55
Dexamethasone	181	90.00

ND : ไม่สามารถประเมินได้



รูปที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดพืช 11 ชนิด แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้ง: ก) nitric oxide ข) TNF- $\alpha$  และ ค) IL-6

ในการศึกษาถึงฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดพืชพื้นเมือง 11 ชนิด (รูปที่ 8) ได้แก่ กระโดนบก เสม็ดขุน มันปู มะตูมขาว ช้าเลือด ชะอม ขี้ขวง หวายลิง ปลีกกล้วย ผักหวานป่า และ ชะมวง ซึ่งทำการคัดเลือกจากพืชจากโครงการที่ 1-3 ซึ่งมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยทำการทดสอบผลของสารสกัดพืชต่อการหลั่ง nitric oxide และ pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) และ interleukin-6 (IL-6) เนื่องจากจัดเป็นสารสำคัญที่ร่างกายสร้างขึ้นเมื่อเกิดการติดเชื้อหรือการอักเสบ โดยการสร้างสารนี้ในปริมาณที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดอันตรายกับเซลล์ปกติ ในการทดลองนี้เซลล์ murine peritoneal macrophage cell line (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย endotoxin คือ lipopolysaccharides (LPS) จะหลั่งสารดังกล่าวข้างต้น เมื่อเติมสารสกัดพืชพื้นเมืองชนิดต่างๆ และสังเกตผลพบว่า สารสกัดชะมวงที่ 100 มก./มล. สามารถยับยั้งการหลั่งของ nitric oxide ได้ถึงร้อยละ 57.33 เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณ tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) และ interleukin-6 (IL-6) ที่หลั่งจากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า สารสกัดชะมวงให้ผลดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของสารสื่ออักเสบได้ถึงร้อยละ 42.70 และ 76.88 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ dexamethasone สารต้านการอักเสบซึ่งใช้เป็นสารควบคุมในการทดลองนี้ มีผลยับยั้งที่ร้อยละ 53.22 และ 90.00 ตามลำดับเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นเท่ากัน ดังนั้น ชะมวงจึงเป็นพืชที่มีความน่าสนใจในการทดสอบและแยกหาสารออกฤทธิ์ต่อไป

### 3.2 น้ำมันหอมระเหย

#### 3.2.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide ของน้ำมันหอมระเหยต่อเซลล์

RAW 246.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS)

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหยนี้ ได้ทำการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่ยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการประชุมหารือร่วมกับโครงการย่อยที่ 1 ได้พืชทั้งหมด 11 ชนิด คือ แมงลัก กะเพรา โหระพา พลู กานพลู อบเชย ตะไคร้ กระชาย ผิวมะกรูด ใบมะกรูด ข่า โดยทำการทดสอบดังต่อไปนี้

#### วิธีการทดลอง

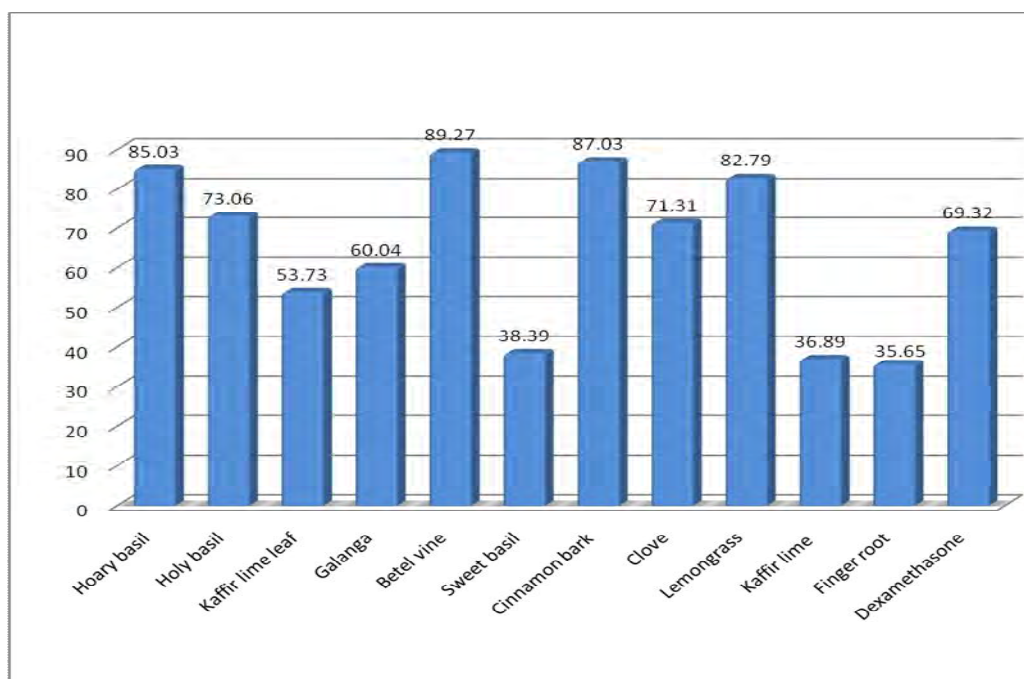
1. เพาะเลี้ยง RAW 246.7 macrophages cells ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 1X L-glutamine และ 1X Penicillin/Streptomycin โดยให้มีปริมาณ cell เริ่มต้นเท่ากับ  $10^6$  cell/ml นำ cell ไปเลี้ยงในสภาวะ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อใน 96-well microtiter plate โดยให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ  $5 \times 10^5$  cells/ml เลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เติมน้ำอาหารเดิมออกและล้างด้วย DMEM 1 ครั้ง หลังจากนั้นเติมน้ำอาหารพร้อมด้วย LPS 100 ng/ml นำไปบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลาหลังจากกระตุ้นด้วย LPS แล้วเติมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml ลงในหลุมแต่ละหลุม หลังจากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. วิเคราะห์ปริมาณ nitric oxide โดยนำส่วนใสในแต่ละหลุมมาผสมกับ Griess reagent ในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งในการทดลองนี้ปริมาณของส่วนใสและ Griess reagent เท่ากับ 100  $\mu$ L
6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ก่อนทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง

#### ผลการทดลอง

น้ำมันพลู น้ำมันอบเชย น้ำมันแมงลัก น้ำมันตะไคร้ น้ำมันกะเพราและน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. สามารถยับยั้งการหลั่งของ nitric oxide จาก murine peritoneal macrophage cell line (RAW 264.7) ภายหลังการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharides (LPS) ถึงร้อยละ 89.27, 87.03, 85.14, 82.79, 73.06 และ 71.32 ตามลำดับ โดยน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นให้ผลยับยั้งที่ต่ำกว่าร้อยละ 70 เมื่อเทียบกับ dexamethasone สารต้านการอักเสบซึ่งใช้เป็นสารควบคุมในการทดลองนี้ ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีผลยับยั้งที่ร้อยละ 69.32 (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ

น้ำมันหอมระเหย	ปริมาณ nitrite ( $\mu\text{mol/L}$ )	Percentage of Inhibition
1. Hoary basil	5.45	85.03
2. Holy basil	9.82	73.06
3. Kaffir lime leaf	16.86	53.73
4. Galanga	14.54	60.04
5. Betel vine	3.91	89.27
6. Sweet basil	22.45	38.39
7. Cinnamon bark	4.73	87.03
8. Clove	10.45	71.31
9. Lemongrass	6.27	82.79
10. Kaffir lime	23.00	36.89
11. Finger root	23.45	35.65
12. Dexamethasone	11.18	69.32



รูปที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย 11 ชนิด แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้ง nitric oxide

### 3.2.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$ ของน้ำมันหอมระเหยต่อ RAW 246.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS)

#### วิธีการทดลอง

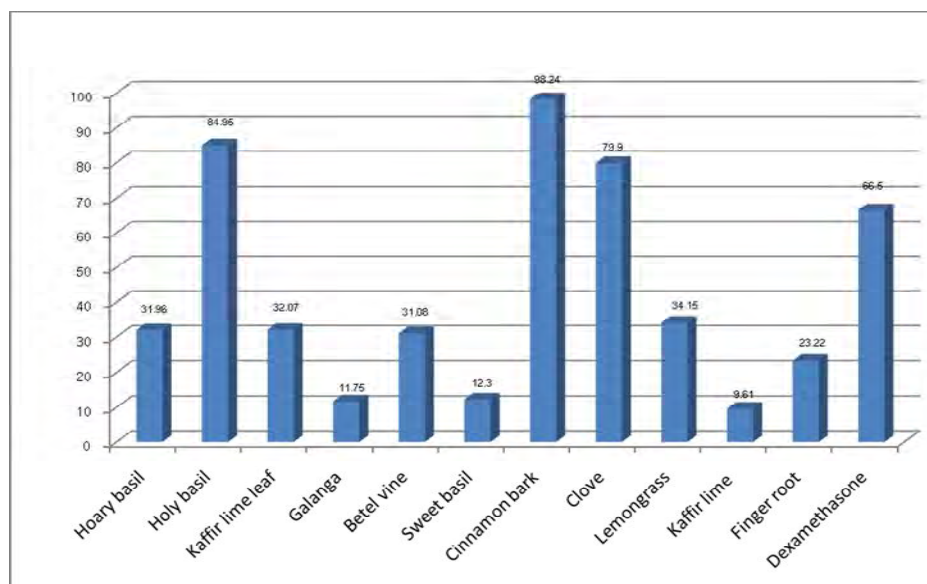
1. เพาะเลี้ยง RAW 246.7 macrophages cells ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 1X L-glutamine และ 1X Penicillin/Streptomycin โดยให้มีปริมาณ cell เริ่มต้นเท่ากับ  $10^6$  cells/ml นำ cell ไปเลี้ยงในสภาวะ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงต่อใน 96-well microtiter plate โดยให้จำนวน cell เริ่มต้นในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ  $5 \times 10^5$  cells/ml เลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เติอาหารเดิมออกและล้างด้วย DMEM 1 ครั้ง หลังจากนั้นเติมอาหารพร้อมด้วย LPS 100 ng/ml นำไปบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลาหลังจากกระตุ้นด้วย LPS แล้วเติมน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml ลงในหลุมแต่ละหลุม หลังจากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลาบ่มนำส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) ไปวิเคราะห์หาปริมาณ TNF- $\alpha$  ด้วยชุดทดสอบ ELISA เทียบกับ TNF- $\alpha$  มาตรฐาน

#### ผลการทดลอง

เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณสารสื่ออักเสบ tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) ที่หลั่งจากเซลล์ RAW 246.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า น้ำมันอบเชยให้ผลดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของสารสื่ออักเสบนี้ได้ถึงร้อยละ 98.24 นอกจากนี้ ยังมี น้ำมันแมงลัก และน้ำมันกานพลู ที่มีผลยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$  ได้ร้อยละ 84.95 และ 79.90 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ dexamethasone ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีผลยับยั้งที่ร้อยละ 66.50 (ตารางที่ 12 )

ตารางที่ 12 ผลการยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$  ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ

น้ำมันหอมระเหย	ปริมาณ TNF- $\alpha$ (ng/ml)	Percentage of Inhibition
1. Hoary basil	1239	31.96 31.96
2. Holy basil	274	84.95 84.95
3. Kaffir lime leaf	1237	32.07 32.07
4. Galanga	1607	11.75 11.75
5. Betel vine	1255	31.08 31.08
6. Sweet basil	1597	12.3 12.3
7. Cinnamon bark	32	98.24 98.24
8. Clove	366	79.9 79.9
9. Lemongrass	1199	34.15 34.15
10. Kaffir lime	1646	9.61 9.61
11. Finger root	1398	23.22 23.22
12. Dexamethasone	610	66.5 66.5



รูปที่ 10 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย 11 ชนิด แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้ง TNF- $\alpha$

### 3.1.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-6 ของน้ำมันหอมระเหยต่อ RAW 246.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS)

#### วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยง RAW 246.7 macrophages cells ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 1X L-glutamine และ 1X Penicillin/Streptomycin โดยให้มีปริมาณ cell เริ่มต้นเท่ากับ  $10^6$  cells/ml นำ cell ไปเลี้ยงในสภาวะ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงต่อใน 96-well microtiter plate โดยให้จำนวน cell เริ่มต้นในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ  $5 \times 10^5$  cells/ml เลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เติอาหารเดิมออกและล้างด้วย DMEM 1 ครั้ง หลังจากนั้นเติมอาหารพร้อมด้วย LPS 100 ng/ml นำไปบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลาหลังจากกระตุ้นด้วย LPS แล้วเติมน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml ลงในหลุมแต่ละหลุม หลังจากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลาบ่มนำส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) ไปวิเคราะห์หาปริมาณ IL-6 ด้วยชุดทดสอบ ELISA เทียบกับ IL-6 มาตรฐาน

#### ผลการทดลอง

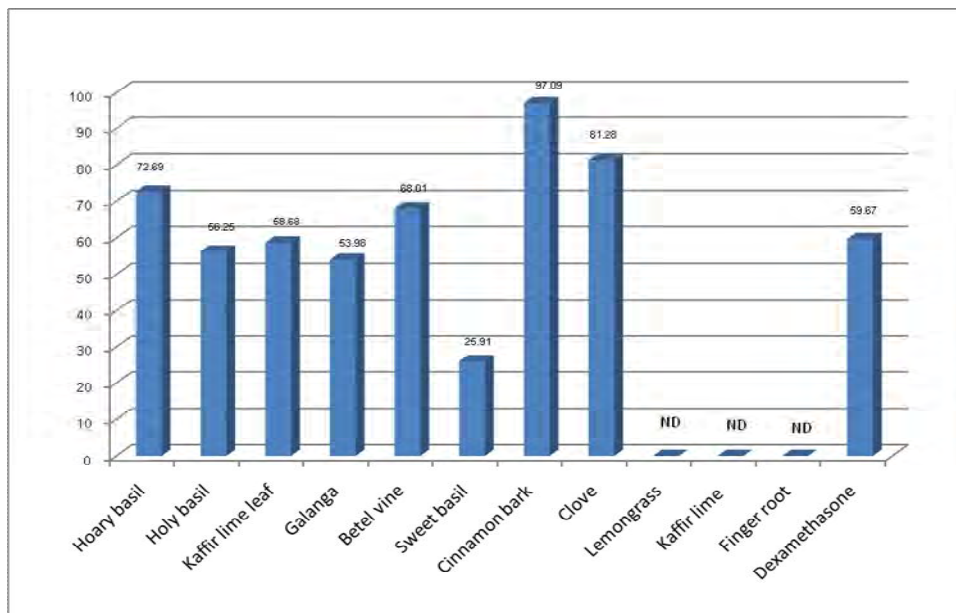
เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณ interleukin-6 (IL-6) ที่หลังจากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า น้ำมันอบเชยให้ผลดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของสารสื่ออักเสบได้ถึงร้อยละ 97.09 นอกจากนี้ ยังมีน้ำมันกานพลู น้ำมันแมงลัก และน้ำมันพลูที่มีผลยับยั้งการหลั่ง IL-6 ได้ร้อยละ 81.28, 72.69 และ 68.01 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ dexamethasone ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีผลยับยั้งที่ร้อยละ 59.67 (ตารางที่ 13)



ตารางที่ 13 ผลการยับยั้งการหลั่ง IL-6 ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ

น้ำมันหอมระเหย	ปริมาณ IL-6 (ng/ml)	Percentage of Inhibition
1. Hoary basil	540	72.69
2. Holy basil	865	56.25
3. Kaffir lime leaf	817.5	58.68
4. Galanga	910	53.98
5. Betel vine	632.5	68.01
6. Sweet basil	1465	25.91
7. Cinnamon bark	57.5	97.09
8. Clove	370	81.28
9. Lemongrass	2805	ND
10. Kaffir lime	3845.25	ND
11. Finger root	4113.5	ND
12. Dexamethasone	797.5	59.67

ND : ไม่สามารถประเมินได้



รูปที่ 11 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย 11 ชนิด แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้ง IL-6

### 3.3 สรุปผลการทดลอง

สำหรับฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดพืชพื้นเมือง 11 ชนิด ได้แก่ กระโดนบก เสม็ด ชุน มันปู มะตูมซาอู ข่าเลือด ชะอม ขี้ขวง หวายลิง ปลีกกล้วย ผักหวานป่า และชะมวง ซึ่งทำการคัดเลือกจากพืชจากโครงการย่อยที่ 1-3 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยทำการทดสอบผลของสารสกัดพืชต่อการหลั่ง nitric oxide และ pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) และ interleukin-6 (IL-6) พบว่า สารสกัดชะมวงที่ 100 มก./มล. สามารถยับยั้งการหลั่งของ nitric oxide จาก murine peritoneal macrophage cell line (RAW 264.7) ภายหลังการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharides (LPS) ถึงร้อยละ 57.3 เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณ TNF- $\alpha$  และ IL-6 ที่หลั่งจากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า สารสกัดชะมวงให้ผลดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของสารสื่ออักเสบได้ถึงร้อยละ 42.7 และ 76.9 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ dexamethasone สารด้านการอักเสบซึ่งใช้เป็นสารควบคุมในการทดลองนี้ มีผลยับยั้งที่ร้อยละ 52.2 และ 90 ตามลำดับเมื่อเทียบกับความเข้มข้นเท่ากัน

ในส่วนฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย 11 ตัวอย่าง ได้แก่ แมงลัก กะเพรา โหระพา พลู กานพลู อบเชย ตะไคร้ กระชาย ผิวมะกรูด ใบมะกรูด ข่า พบว่า น้ำมันพลู น้ำมันอบเชย น้ำมันแอมลัก น้ำมันตะไคร้ น้ำมันกะเพราและน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. สามารถยับยั้งการหลั่งของ nitric oxide จาก murine peritoneal macrophage cell line (RAW 264.7) ภายหลังการกระตุ้นด้วย LPS ถึงร้อยละ 89.27, 87.03, 85.14, 82.79, 73.06 และ 71.32 ตามลำดับ โดยน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นให้ผลยับยั้งที่ต่ำกว่าร้อยละ 70 เมื่อเทียบกับ dexamethasone สารด้านการอักเสบซึ่งใช้เป็นสารควบคุมในการทดลองนี้ ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีผลยับยั้งที่ร้อยละ 69.32 เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณสารสื่ออักเสบ TNF- $\alpha$  ที่หลั่งจากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า น้ำมันอบเชยให้ผลดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของสารสื่ออักเสบนี้ได้ถึงร้อยละ 98.24 นอกจากนี้ ยังมีน้ำมันแอมลัก และน้ำมันกานพลู ที่มีผลยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$  ได้ร้อยละ 84.95 และ 79.90 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ dexamethasone ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีผลยับยั้งที่ร้อยละ 66.50 เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณ IL-6 ที่หลั่งจากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า น้ำมันอบเชยให้ผลดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการหลั่งของสารสื่ออักเสบได้ถึงร้อยละ 97.09 นอกจากนี้ ยังมีน้ำมันกานพลู น้ำมันแอมลัก และน้ำมันพลูที่มีผลยับยั้งการหลั่ง IL-6 ได้ร้อยละ 81.28, 72.69 และ 68.01 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ dexamethasone ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีผลยับยั้งที่ร้อยละ 59.67

## บทที่ 4

### การศึกษาคุณลักษณะและพัฒนาวิธีตรวจสอบแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีน

#### 4.1 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบและวิธีการเพาะเลี้ยง

*Morganella morganii* ATCC 25830, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Klebsiella planticola* DMST 15700, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* นำเชื้อแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวข้างมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Tryptic Soy agar (TSA; Difco Laboratories, Dickinson and Company, USA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ยกเว้น เชื้อ *P. fluorescens* ที่ต้องบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในปลาทะเลเพื่อนำไปตรวจสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีน

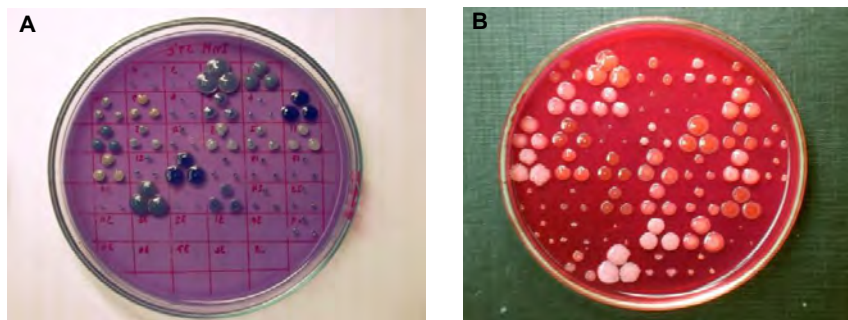
##### วิธีการทดลอง

ตัวอย่างปลาทะเลที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ซึ่งซื้อมาจากตลาดอาหารสดและห้างค้าปลีกขนาดใหญ่ในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ปลาทูต้วน (Short bodies mackerel; *Rastrelliger brachysoma*) ปลาลัง (Indian mackerel; *Rastrelliger kanagurta*) ปลาซาบะ (Pacific mackerel; *Scomber japonicas*) ปลาอินทรี (King mackerel; *Scomberomorus cavalla*) และปลาโอดำ (Long tail tuna; *Thunnus tonggol*) จากนั้นทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้จากปลาตัวอย่างโดยนำเนื้อปลาตัวอย่างของปลาแต่ละชนิดปริมาณ 10 กรัมนำไปบดให้ละเอียด หลังจากนั้นนำไปใส่ใน flask ที่มี 0.1% peptone ปริมาตร 90 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำตัวอย่างเนื้อปลาที่อยู่ใน 0.1% peptone มาทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution ด้วย 0.1% peptone หลังจากนั้นนำไปทำการ pour plate โดยใช้อาหาร TSA และ อาหาร differential medium 2 ชนิดสำหรับการคัดแยกเชื้อที่สามารถสร้างสารจำพวก biogenic amines ได้โดยชนิดแรกถูกพัฒนาขึ้นโดย Niven และคณะ (27) ซึ่งประกอบด้วย 0.5% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 2.7% (w/v) L-histidine, 0.5% (w/v) NaCl, 0.1% (w/v) CaCO<sub>3</sub>, 2.0% (w/v) agar และ 0.006% bromocresol purple (pH 5.3) โดยเชื้อที่สามารถสร้างสารประกอบ biogenic amines ได้โคโลนีของเชื้อจะมีสีม่วงหรือสีม่วงอมเทา ส่วน differential medium ชนิดที่สองที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Yoshinaga และคณะ(28) ประกอบด้วย 0.5% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) L-histidine, 0.5% (w/v) NaCl, 1.5% (w/v) agar และ cresol red (pH 6.5) โดยเชื้อที่สามารถสร้างสารประกอบ biogenic amines ได้โคโลนีของเชื้อจะมีสีแดงอมชมพูทำการนับจำนวนเชื้อที่เจริญทั้งหมดบนอาหาร TSA (Total plate

count) นำเชื้อที่เจริญบนอาหาร differential medium ทั้งสองชนิดที่มีสีตามทฤษฎีไว้ข้างต้นนำไปตรวจสอบการสร้างฮิสตามีนด้วยวิธี Thin layer chromatographic assay

### ผลการทดลอง

จากผลการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสาร biogenic amines จากตัวอย่างปลาทะเลทั้ง 5 ชนิดได้แก่ ปลาทูตัวสั้น (short bodies mackerel), ปลาลัง (indian mackerel), ปลาซาบะ (pacific mackerel), ปลาอินทรี (king mackerel) และ ปลาโอดำ (long tail tuna) ด้วยอาหาร differential medium ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่สามารถสร้างสารประกอบ biogenic amines เมื่อเจริญบนอาหาร differential medium ทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 12) โดยผลจากการทดลองพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาทูตัวสั้น ปลาลัง ปลาอินทรี ปลาโอดำและปลาซาบะที่สามารถสร้างสารประกอบ biogenic amines ได้หลังจากทำการคัดแยกโดยใช้อาหาร differential medium ที่พัฒนาขึ้นโดย Niven และคณะมีจำนวนเท่ากับ 72 ตัว 109 ตัว 117 ตัว 106 ตัวและ 109 ตัวตามลำดับ ในขณะที่เชื้อที่สามารถสร้างสารประกอบ biogenic amines หลังจากทำการคัดแยกโดยใช้อาหาร differential medium ที่พัฒนาขึ้นโดย Yoshinaga และคณะมีจำนวนเท่ากับ 81 ตัว 112 ตัว 130 ตัว 131 ตัวและ 121 ตัวตามลำดับ ในขณะที่ผลจากการหาปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากปลาทะเลตัวอย่างทั้ง 5 ชนิดที่ซึ่งแสดงดังตารางที่ 14 พบว่าตัวอย่างปลาโอดำที่ซื้อมาจากตลาดอาหารสดมีค่าการปนเปื้อนของเชื้อเยอะที่สุดคือ  $2.90 \times 10^6$  Cfu/mL รองลงมาคือปลาอินทรีและปลาทูตัวสั้นที่ซื้อมาจากห้างสะดวกซื้อโดยมีค่าการปนเปื้อนเท่ากับ  $2.70 \times 10^6$  และ  $2.47 \times 10^6$  Cfu/mL ตามลำดับในขณะที่ปลาลังที่ซื้อตลาดขายอาหารสดมีค่าการปนเปื้อนที่น้อยที่สุดคือ  $1.49 \times 10^6$  Cfu/mL



**รูปที่ 12** การเจริญและลักษณะของโคโลนีของเชื้อที่สามารถสร้างสารประกอบ biogenic amines ได้บนอาหาร differential medium ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Niven และคณะ (A) และที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Yoshinaga และคณะ (B)

**ตารางที่ 14** การปนเปื้อนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาทะเล

ตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่ตรวจพบ	ระดับความเจือจาง	ปริมาณเชื้อต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (Cfu/mL)
ปลาทูตัส <sup>a</sup>	247	$10^{-4}$	$2.47 \times 10^6$
ปลาทูตัส <sup>b</sup>	207	$10^{-4}$	$2.07 \times 10^6$
ปลาลัง <sup>a</sup>	191	$10^{-4}$	$1.91 \times 10^6$
ปลาลัง <sup>b</sup>	149	$10^{-4}$	$1.49 \times 10^6$
ปลาซาบะ <sup>a</sup>	215	$10^{-4}$	$2.15 \times 10^6$
ปลาซาบะ <sup>b</sup>	206	$10^{-4}$	$2.06 \times 10^6$
ปลาอินทรี <sup>a</sup>	271	$10^{-4}$	$2.70 \times 10^6$
ปลาโอคำ <sup>b</sup>	290	$10^{-4}$	$2.90 \times 10^6$

a; ตัวอย่างปลาทะเลที่ได้จากห้างสะดวกซื้อ

b; ตัวอย่างปลาทะเลที่ได้จากตลาดจำหน่ายอาหารสด

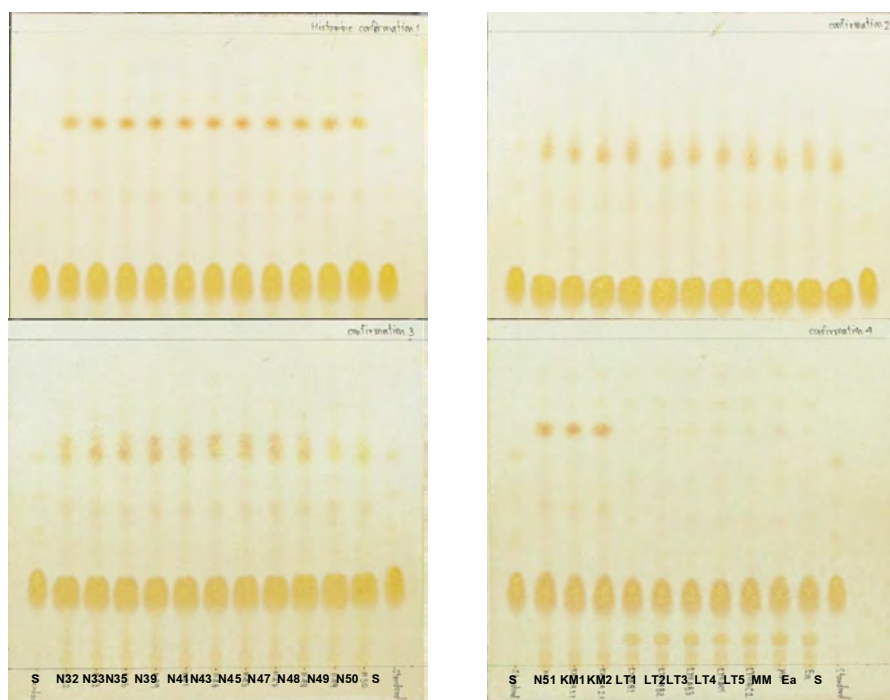
### 4.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีนของเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาทะเลด้วยวิธี Thin layer chromatographic assay

#### วิธีการทดลอง

นำเชื้อตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปลาทะเลมาทำการทดสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีนด้วยวิธี Thin layer chromatographic assay โดยนำเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาทะเลทั้ง 5 ชนิด นำไปเพาะลงในอาหาร TSB ที่มีส่วนผสมของกรดอะมิโนฮิสทีดินในอัตราส่วน 1% W/V นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตรนำไป spot ลงบนแผ่น TLC (Aluminium sheet Silica gel 60 F<sub>254</sub>) หลังจากนั้นนำไปพัฒนาโดยใช้ระบบที่มีอัตราส่วนของ chloroform :methanol :ammonia ในอัตราส่วน 25 :15:3 ปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นนำแผ่น TLC ที่พัฒนาเสร็จแล้วไปตรวจสอบการปรากฏของฮิสตามีนโดยใช้สารที่เป็นตัวทำปฏิกิริยา คือ Pauly's reagent ซึ่งประกอบด้วยสารละลายทั้งหมด 3 ส่วนคือ solution A ที่ซึ่งมีส่วนผสมของกรดซัลฟานิลิกจำนวน 9.55 กรัมละลายอยู่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.5 นอร์มัล solution B ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไนไตรด์ความเข้มข้น 5% และ solution C ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10% โดยขั้นตอนในการตรวจสอบการปรากฏของฮิสตามีนให้นำ solution A และ solution B มาผสมให้เข้ากันก่อนในอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ที่พัฒนาแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำ solution C มาพ่นทับลงไป โดยฮิสตามีนจะปรากฏขึ้นบนแผ่น TLC โดยมีสีส้มแดง

#### ผลการทดลอง

ผลจากการทดสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีนของแบคทีเรียตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาทะเลโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatographic assay (รูปที่ 13) ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าจากจำนวนตัวอย่างแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้จากปลาทะเลที่มีความสามารถในการสร้างสารประกอบ biogenic amines ได้จากการคัดแยกโดยใช้อาหาร differential medium ทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีแบคทีเรียตัวอย่างเพียง 44 ตัวเท่านั้นที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ โดยแบ่งเป็น 15 ตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาทุตัวสั้น ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้มาจากปลาทุตัวสั้นที่ซื้อจากห้างสะดวกซื้อจำนวน 6 ตัวอย่าง (N1, N2, N4, N5, N9 และ N10) และตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาทุตัวสั้นที่ซื้อจากตลาดจำหน่ายอาหารสดจำนวน 9 ตัวอย่าง (N11, N12, N15, N16, N17, N18, N20, N21 และ N24) ในขณะที่ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้จำนวน 19 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาลังโดยแบ่งเป็น 11 ตัวอย่าง (N25, N26, N27, N28, N29, N30, N31, N32, N33, N35 และ N39) ที่คัดแยกได้จากปลาลังที่ซื้อมาจากห้างสะดวกซื้อและอีก 8 ตัวอย่าง (N41, N43, N45, N47, N48, N49, N50 และ N51) คัดแยกได้จากปลาลังที่ซื้อมาจากตลาดจำหน่ายอาหารสดและนอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้จากปลาอินทรีและปลาโอดำที่ซื้อจากตลาดจำหน่ายของสดจำนวน 2 ตัวอย่าง (KM 134.1.1, KM 134.2.1) 5 ตัวอย่าง (LT94B1, LT94B2, LT94B3, LT94C1 และ LT94C2) ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปลาซาบะ



รูปที่ 13 การทดสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีนของเชื้อตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาทะเล  
(S: standard. KM1: KM134.1.1, KM2: KM134.2.1, LT1: LT94B1, LT2: LT94B2, LT3: LT94B3, LT4: LT94C1, LT5: LT94C2, MM: *M. morganii*, Ea: *E. aerogenes*)

#### 4.4 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ ที่คัดแยกจากปลาทะเล

##### วิธีการทดลอง

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้นั้นจะทำการทดสอบเบื้องต้นด้วยการย้อมสีเชื้อตัวอย่าง (Gram stain) และรวมถึงการทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำตาลกลูโคส แล็กโทสและซูโครส การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ การสร้างก๊าซ การทดสอบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์ออกซิเดส และการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหาร Triple sugar iron agar (TSI agar) ในการทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำตาลและการสร้างก๊าซของเชื้อ โดยทำการเพาะเชื้อที่คัดแยกได้ลงในอาหาร TSI agar slant โดยใช้เข็มแตะโคโลนีแล้วแทงลงตรงกลางในอาหาร TSI agar จากนั้นตั้งขึ้นมาตรงๆและ streak บนอาหารส่วนที่เป็น slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสสามารถทำได้โดยการเขียนเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น slide ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อยู่สังเกตฟองที่เกิดขึ้นและทำการบันทึกผล การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดสสามารถทำได้โดยการทดสอบด้วยสาร Tetramethyl-p-phenylenediamine (TPD) โดยทำการหยดสาร TPD ลงบนแผ่นกระดาษกรองให้ชุ่ม จากนั้นเขียนเชื้อที่ใช้ในการทดสอบลงบนกระดาษกรอง สังเกตดูสีม่วงที่เกิดขึ้นและบันทึกผล สำหรับการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อนั้นจะทำการทดสอบโดยใช้อาหาร Motility test medium (MO) ซึ่งเป็นอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) โดยใช้เข็มเขียนเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบแทงลงตรงกลางของอาหาร จากนั้นตั้งขึ้นมาตรงๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

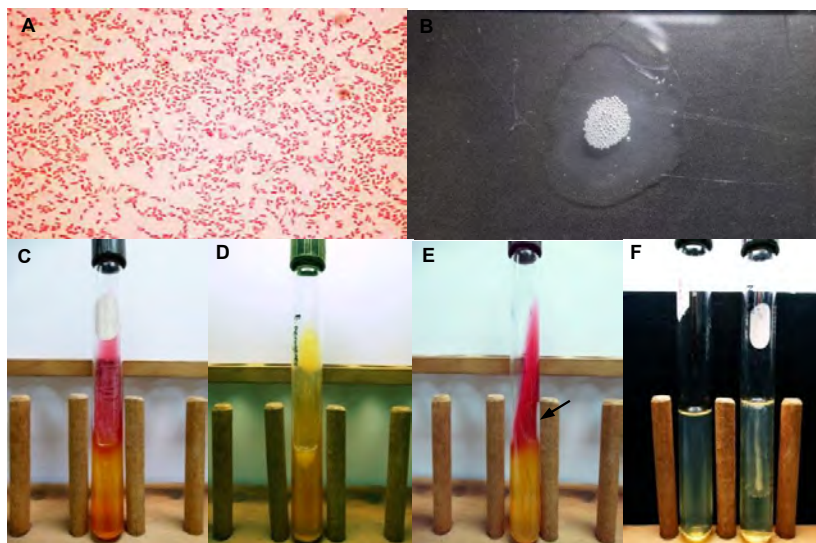
##### ผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้จำนวน 41 ตัวอย่าง ซึ่งคัดแยกได้จากปลาทะเล โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นที่ทำการทดสอบคือ การย้อมสี (gram stain) และรวมถึงการทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำตาลกลูโคส แล็กโทสและซูโครส การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ การสร้างก๊าซ การทดสอบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์ออกซิเดส และการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 14 และตารางที่ 15 โดยผลจากการทดลองพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 41 ตัวอย่างและรวมถึงเชื้อมาตรฐาน *M. morganii* และ *E. aerogenes* เมื่อทำการย้อมสีพบว่าเชื้อตัวอย่างทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบและมีลักษณะเป็นแท่งสั้นสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสได้เพียงอย่างเดียวโดยสีของอาหาร TSI จะเปลี่ยนสีจากสีส้มไปเป็นสีเหลืองบริเวณก้นหลอด และเปลี่ยนเป็นสีแดงบริเวณผิวหน้าอาหารที่มีการ streak เชื้อ ยกเว้นเชื้อตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาโอตัว LT94B1, LT94B2, LT94B3, LT94C1 และ LT94C2 ที่สามารถย่อยน้ำตาลกลูโคส ซูโครสหรือแล็กโทสได้ซึ่งเป็นผลทำให้สีของอาหาร TSI เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งก้นหลอดและผิวหน้าอาหาร

นอกจากนี้ พบว่าเชื้อตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการทดสอบให้ผลบวกเมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลส และให้ผลลบเมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ออกซิเดส รวมถึงไม่พบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อตัวอย่างที่ทำการทดสอบ 8 ตัวอย่างได้แก่ N10, N12, N45, LT94B1, LT94B2, LT94B3, LT94C1 และ LT94C2 สามารถสร้างก๊าซได้สำหรับ



การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่พบว่าเชื้อตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่างที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้แก่ N2, N4, N5, N9, N10, N11, N12, N15, N16, N17, N18, N 20, N21, N24, N25, N26, N28, N32, N33, N41, N43, N48, N51, KM134.1.1, KM134.2.1, LT94B1, LT94B2, LT94B3, LT94C1 และ LT94C2



**รูปที่ 14** การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ที่คัดแยกได้จากปลาทะเล ดังต่อไปนี้

ภาพ A ลักษณะของเชื้อและการติดสีย้อมได้กล้องจุลทรรศน์

ภาพ B การทดสอบการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส

ภาพ C ถึง E การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆและการสร้างก๊าซ

ภาพ F การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อที่คัดแยกได้

ตารางที่ 15 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนที่คัดแยกได้จากปลาทะเล

Culture	Glucose fermentation	Lactose/Sucrose fermentation	Gas production	H <sub>2</sub> S production	Catalase activity	Oxidase activity	mortality
1. N1	+	-	-	-	+	-	-
2. N2	+	-	-	-	+	-	+
3. N4	+	-	-	-	+	-	+
4. N5	+	-	-	-	+	-	+
5. N9	+	-	-	-	+	-	+
6. N10	+	-	+	-	+	-	+
7. N11	+	-	-	-	+	-	+
8. N12	+	-	+	-	+	-	+
9. N15	+	-	-	-	+	-	+
10. N16	+	-	-	-	+	-	+
11. N17	+	-	-	-	+	-	+
12. N18	+	-	-	-	+	-	+
13. N20	+	-	-	-	+	-	+
14. N21	+	-	-	-	+	-	+
15. N24	+	-	-	-	+	-	+
16. N25	+	-	-	-	+	-	+
17. N26	+	-	-	-	+	-	+
18. N27	+	-	-	-	+	-	-
19. N28	+	-	-	-	+	-	+
20. N29	+	-	-	-	+	-	-
21. N30	+	-	-	-	+	-	-
22. N31	+	-	-	-	+	-	-
23. N32	+	-	-	-	+	-	+
24. N33	+	-	-	-	+	-	+
25. N35	+	-	-	-	+	-	-
26. N39	+	-	-	-	+	-	-
27. N41	+	-	-	-	+	-	+
28. N43	+	-	-	-	+	-	+
29. N45	+	-	+	-	+	-	-
30. N47	+	-	-	-	+	-	-
31. N48	+	-	-	-	+	-	+
32. N49	+	-	-	-	+	-	-
33. N50	+	-	-	-	+	-	-
34. N51	+	-	-	-	+	-	+
35. KM 134.1.1	+	-	-	-	+	-	+
36. KM 134.2.1	+	-	-	-	+	-	+

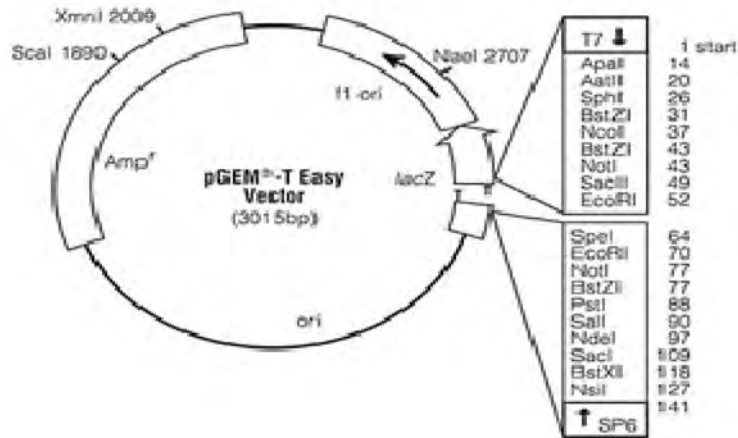
37. LT94B1	+	+	+	-	+	-	+
38. LT94B2	+	+	+	-	+	-	+
39. LT94B3	+	+	+	-	+	-	+
40. LT94C1	+	+	+	-	+	-	+
41. LT94C2	+	+	+	-	+	-	+
<i>M.</i> <i>morganii</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>E.</i> <i>aerogenes</i>	+	+	+	-	+	-	+

#### 4.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ที่คัดแยกได้ จากปลาทะเลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

##### วิธีการทดลอง

ในการทดลองนี้จะทำการเพิ่มจำนวนของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้โดยใช้คู่ primers ซึ่งประกอบด้วย forward primer คือ 27F ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ reverse primer คือ 1492R ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' โดยปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP, 20 pmol primer, 10 ng DNA template และ 0.5 U Taq DNA polymerase โดยสภาวะที่ออกแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ด้วยวิธี PCR เริ่มต้นด้วยการ denaturation เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาทีหลังจากนั้นจะเข้าสู่รอบของการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายซึ่งในการทดลองนี้จะทำทั้งหมด 35 รอบ โดยขั้นตอนในแต่ละรอบประกอบด้วย กระบวนการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที กระบวนการ annealing ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 60 วินาทีและกระบวนการ extension ที่อุณหภูมิ 72°C 90 วินาที และเมื่อดำเนินปฏิกิริยา PCR จนครบ 35 รอบแล้วขั้นตอนสุดท้ายกระบวนการ final extension เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ตรวจสอบการปรากฏของ DNA เป้าหมายด้วยวิธี gel electrophoresis โดยขนาดของยีนเป้าหมายมีขนาดเท่ากับ 1.5 kb หลังจากนั้นนำ DNA เป้าหมายที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ gel extraction ด้วย commercial kit (QIAquick Gel Extraction Kit) หลังจากนั้นนำเชื่อมกับ cloning vector คือ pGEM-T Easy vector (Promega) (รูปที่ 15) เพื่อนำไปเพิ่มจำนวนใน cell เจ้าบ้าน โดยการเชื่อม DNA เป้าหมายกับ cloning vector นั้นจะทำในหลอดปฏิกิริยา (ligation mixture) ที่ประกอบด้วย 2X ligation buffer, vector, PCR product, T4 DNA ligase และ ultrafiltration water หลังจากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำขึ้น DNA เป้าหมายที่เชื่อมต่อเข้ากับ vector แล้วเข้าสู่ cell เจ้าบ้านโดยวิธี heat shock method ซึ่งในที่นี้ใช้ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เป็น cell เจ้าบ้าน นำเวกเตอร์พร้อมด้วย DNA เป้าหมายที่ได้จาก ligation mixture ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเติมลงหลอดทดลองที่มี 50 ไมโครลิตรของเซลล์เจ้าบ้านอยู่ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งอีก 1-2 นาที เติมน้ำ 850 ไมโครลิตรของอาหาร LB broth (Lennox; Difco) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างไป spread ลงบนอาหาร LB agar ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม 0.5 mM IPTG และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม X-gal จากนั้นนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเซลล์เจ้าบ้านได้รับเวกเตอร์พร้อมด้วย DNA เป้าหมายหรือไม่โดยใช้วิธี blue/white screening โดยเซลล์เจ้าบ้านที่สามารถรับเวกเตอร์พร้อมด้วย DNA เป้าหมายจะปรากฏโคโลนีสีขาว ส่วนเซลล์เจ้าบ้านที่สามารถรับเวกเตอร์แต่ไม่มี DNA เป้าหมายจะปรากฏโคโลนีสีฟ้า หลังจากนั้นนำเชื้อที่ปรากฏโคโลนีสีขาวนำไปสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบว่ามีชิ้นของ DNA เป้าหมายอยู่ใน vector หรือไม่ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *Nco*I (NEB) และ *Eco*R<sub>I</sub> (NEB) หลังจากนั้นนำพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมายไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อต่อไป

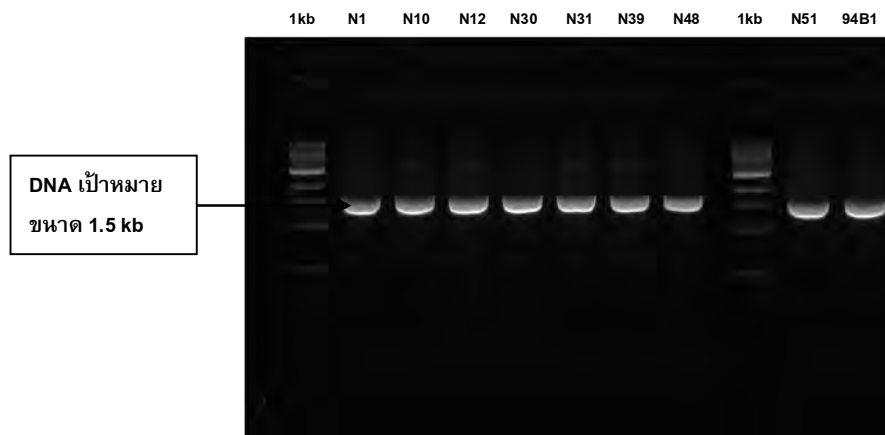
### pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points



รูปที่ 15 โครงสร้างของ pGEM-T Easy

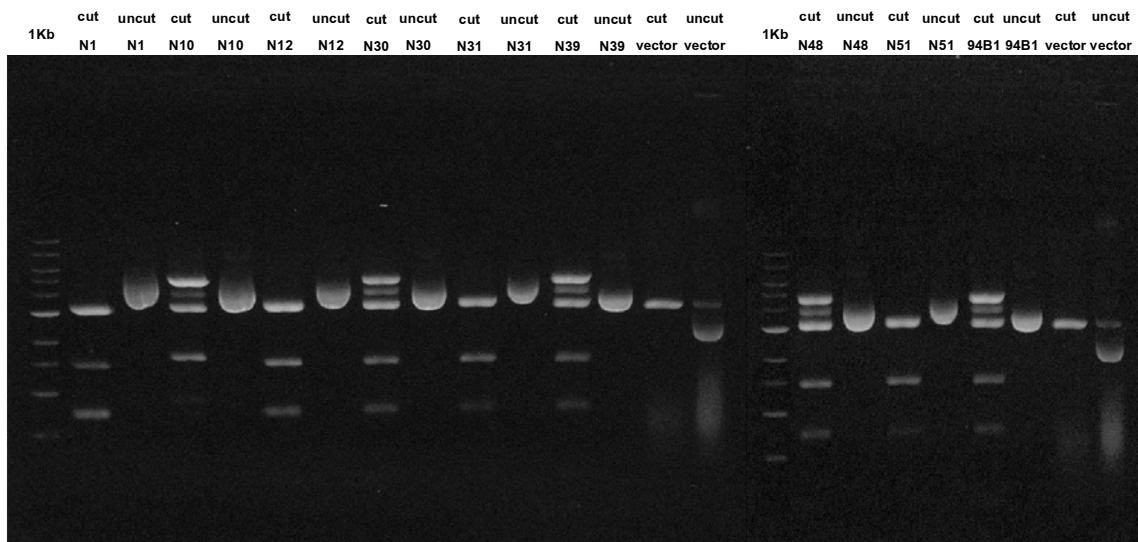
### ผลการทดลอง

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนที่คัดแยกได้จากปลาทะเลนั้น การทดลองในครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนจำนวน 9 ตัวอย่างจากทั้งหมด 41 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยเชื้อจำนวน 9 ตัวอย่างประกอบด้วย N1, N10, N12, N30, N31, N39, N48, N51 และ LT94B1 ซึ่งผลการเพิ่มจำนวน 16S rDNA ด้วยคู่ primers 27F และ 1492R โดยผลจากการทดลองพบว่าเชื้อตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่างให้ขนาดของ PCR product ตรงกับขนาดของ DNA เป้าหมายคือ 1.5 kb (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 ภาพแสดงขนาดของยีน 16S rDNA ของเชื้อตัวอย่างหลักจากการเพิ่มจำนวนโดยใช้คู่ primer 27F และ 1492R

หลังจากนั้นเมื่อนำ DNA เป้าหมายเชื่อมเข้ากับ cloning vector และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อทำการเพิ่มจำนวน หลังจากนั้นตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA เป้าหมายที่อยู่ใน cloning vector โดยการนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *EcoRI* โดยผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงดังรูปที่ 17 และหลังจากนั้นนำยีน *16S rDNA* ของเชื้อตัวอย่างที่ทำการเพิ่มจำนวนใน cloning vector ไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rDNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rDNA* ของเชื้อตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่างได้แก่ N1, N10, N12, N30, N31, N39, N48 และ N51 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rDNA* ของเชื้อ *Morganella morganii* subsp. *morganii* KT (CP004345.1) ถึงร้อยละ 99 ดังแสดงในรูปที่ 18 ขณะที่เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rDNA* ที่ได้จากเชื้อ LT94B1 พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rDNA* ของเชื้อ *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 (CP00284.1) ถึงร้อยละ 99 ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 17 การตรวจสอบมีอยู่ของ DNA เป้าหมายใน cloning vector หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NcoI*





```

*****
CP004345.1 GCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCC 1000
N1 GCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCC 1000
N10 GCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCC 1000
N12 GCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCC 1000
N30 GCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCC 1000
N31 GCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCC 1000
N39 GCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCC 1000
N48 GCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCC 999
N51 GCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCC 1000
ruler .....910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000
*****
CP004345.1 TTCCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGC 1100
N1 TTCCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGC 1100
N10 TTCCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGC 1100
N12 TTCCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGC 1100
N30 TTCCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGC 1100
N31 TTCCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGC 1100
N39 TTCCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGC 1100
N48 TTCCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGC 1099
N51 TTCCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGC 1100
ruler .....1010.....1020.....1030.....1040.....1050.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100
*****
CP004345.1 CAGCGGTGATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA 1200
N1 CAGCGGTGATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA 1200
N10 CAGCGGTGATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA 1200
N12 CAGCGGTGATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA 1200
N30 CAGCGGTGATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA 1200
N31 CAGCGGTGATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA 1200
N39 CAGCGGTGATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA 1200
N48 CAGCGGTGATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA 1199
N51 CAGCGGTGATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA 1200
*****
CP004345.1 CACGTGCTACAATGGCGGTATACAAGGGAAGCGACCCCGGAGGGCAAGCGGAACCTATAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC 1300
N1 CACGTGCTACAATGGCGGTATACAAGGGAAGCGACCCCGGAGGGCAAGCGGAACCTATAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC 1300
N10 CACGTGCTACAATGGCGGTATACAAGGGAAGCGACCCCGGAGGGCAAGCGGAACCTATAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC 1300
N12 CACGTGCTACAATGGCGGTATACAAGGGAAGCGACCCCGGAGGGCAAGCGGAACCTATAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC 1299
N30 CACGTGCTACAATGGCGGTATACAAGGGAAGCGACCCCGGAGGGCAAGCGGAACCTATAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC 1300
N31 CACGTGCTACAATGGCGGTATACAAGGGAAGCGACCCCGGAGGGCAAGCGGAACCTATAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC 1300
N39 CACGTGCTACAATGGCGGTATACAAGGGAAGCGACCCCGGAGGGCAAGCGGAACCTATAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC 1300
N48 CACGTGCTACAATGGCGGTATACAAGGGAAGCGACCCCGGAGGGCAAGCGGAACCTATAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC 1299
N51 CACGTGCTACAATGGCGGTATACAAGGGAAGCGACCCCGGAGGGCAAGCGGAACCTATAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC 1300
ruler .....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300
*****
CP004345.1 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC 1400
N1 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC 1400
N10 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC 1400
N12 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC 1399
N30 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC 1400
N31 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC 1400
N39 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC 1400
N48 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC 1399
N51 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC 1400
ruler .....1310.....1320.....1330.....1340.....1350.....1360.....1370.....1380.....1390.....1400
*****
CP004345.1 AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTCCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA 1481
N1 AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTCCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA 1481
N10 AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTCCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA 1481
N12 AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTCCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA 1480
N30 AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTCCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA 1481
N31 AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTCCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA 1481
N39 AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTCCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA 1481
N48 AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTCCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA 1480
N51 AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTCCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAA 1481
ruler .....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480

```

รูปที่ 18 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ระหว่างเชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ (N1, N10, N12, N30, N31, N39, N48, N51) และ *Morganella morganii* subsp. *morganii* KT (CP004345.1)



CP00284.1	ACTTAAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA	100
LT94B1	-----TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA	77
ruler	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100	
CP00284.1	CGAGCGCGGCGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAG	200
LT94B1	CGAGCGCGGCGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAG	177
ruler	.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200	
CP00284.1	TGGGGGACCTTCGGGCCCTC---ATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGCAGATCCCTAGCTGGTC	297
LT94B1	TGGGGGACCTTCGGGCCCTC---ATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGCAGATCCCTAGCTGGTC	277
ruler	.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300	
CP00284.1	TGAGAGGATGACCCAGCCACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGC	397
LT94B1	TGAGAGGATGACCCAGCCACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCAGC	377
ruler	.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	
CP00284.1	CATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAA--GTACTTTAGCGAGGAGGAGGCGTTAAGGTTAATAACCTTGCGGATTGACGTTACTCGCA	495
LT94B1	CATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAAGTACTTTAGCGAGGAGGAGGCGTTAAGGTTAATAACCTTGCGGATTGACGTTACTCGCA	477
ruler	.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500	
CP00284.1	GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGGTCTGT	595
LT94B1	GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGGTCTGT	577
ruler	.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600	
CP00284.1	CAAGTCGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTG	695
LT94B1	CAAGTCGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTG	677
ruler	.....610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700	
CP00284.1	AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGAT	795
LT94B1	AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGAT	777
ruler	.....710.....720.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800	
CP00284.1	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTA-AACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTA	894
LT94B1	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTA-AACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTA	877
ruler	.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880.....890.....900	
CP00284.1	CGGCCG--AAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTC	992
LT94B1	CGGCCGCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTC	977
ruler	.....910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000	
CP00284.1	TTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGT	1092
LT94B1	TTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGT	1077
ruler	.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100	
CP00284.1	TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAGTGGAGGAAGGTGGGGATG	1192
LT94B1	TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAGTGGAGGAAGGTGGGGATG	1177
ruler	.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200	
CP00284.1	ACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAA--GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAACGGACCTCATAA	1290
LT94B1	ACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAACGGACCTCATAA	1277
ruler	.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300	
CP00284.1	CTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTATGACTGGG	1490
LT94B1	CTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTATGACTGGG	1477
ruler	.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500	
CP00284.1	GTGAAGTCGTAAACAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGGTTGGATCACCTCCTTACCTTAAGAA	1554
LT94B1	GTGAAGTCGTAAACAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGGTTGG-----	1519
ruler	.....1510.....1520.....1530.....1540.....1550.....1560....	

รูปที่ 19 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ระหว่างเชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ (LT94B1) และเชื้อ *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 (CP00284.1)

#### 4.6 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (primers) สำหรับใช้ในการตรวจสอบการปรากฏของยีนฮิสทีดินดีคาร์บอกซิเลส (*hdc* gene)

##### วิธีการทดลอง

การออกแบบ primers ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบการปรากฏของ *hdc* gene นั้นในขั้นตอนแรกต้องทำการเก็บข้อมูลที่มีรายงานเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *hdc* gene ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้ใช้ฐานข้อมูลของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ที่ซึ่งมีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ National Center of Biotechnology Information (NCBI) จากนั้นทำการรวบรวมข้อมูลของ *hdc* gene ที่อยู่ในฐานข้อมูลและนำมาจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม bioedit และ clustalX เพื่อช่วยในการหาส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) ของ *hdc* gene เพื่อใช้สำหรับการออกแบบ primers สำหรับในการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene

##### ผลการทดลอง

ผลจากการรวบรวมข้อมูลของเชื้อที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้จากฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้สำหรับการออกแบบ primers ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบการปรากฏของ *hdc* gene พบว่ามีเชื้อที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ทั้งหมดจำนวน 24 สายพันธุ์คือ *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* sp., *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp., *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Haemophilus* sp., *Halomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Lactobacillus* spp., *Morganella* sp., *Marinomonas* sp., *Oenococcus* sp., *Ornithobacterium* sp., *Photobacterium* spp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* spp., *Raoultella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* sp., *Sulfurovum* sp., *Tetragenococcus* spp. และ *Vibrio* sp. และหลังจากนั้นเมื่อนำลำดับเบสของ *hdc* gene ของเชื้อในกลุ่มตัวอย่างดังกล่าวมาจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม bioedit และ clustalX เพื่อช่วยในการหาส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) ของ *hdc* gene เพื่อใช้สำหรับการออกแบบ primers ซึ่งผลจากการจัดเรียงพบว่าสามารถออกแบบ primers สำหรับส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของ *hdc* gene ได้จากตัวอย่างเชื้อ 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *A. salmonicida* (CP000644.1), *E. aerogenes* (CP002824), *H. influenzae* (FQ670204, FQ670178), *Marinomonas* sp. (CP000749), *M. mediterranea* (CP002583), *P. fluorescens* (CP003041, Y09356), *P. entomophila* (CT573326) และ *V. harveyi* (CP000789) โดยผลการจัดเรียงเพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ของเชื้อในกลุ่มแรก แสดงดังภาพที่ 4 โดยลำดับเบสของ primers ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของเชื้อในกลุ่มแรกคือ Hdc\_1F 5' TTT-AAA-ATC-GGG-TAT-CCT-GA-3' และ Hdc\_1R 5' TGA-GGC-ATG-GTA-ATC-AAA-TG-3' โดย PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย primer คู่ดังกล่าวจะมีขนาดเท่ากับ 996 bp สำหรับเชื้อที่ในกลุ่มที่ 2 ที่ใช้สำหรับการออกแบบ primer เพื่อใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ประกอบด้วย *K. planticola* (M62746), *M. morganii* (AB259290, J02577), *P. vulgaris* (AB083204), *P. fluorescens* (CP003041, Y09356), *P. entomophila* (CT573326), *R. planticola* (AB083205), *R. ornithinolytica* (FJ469565), *V. harveyi* (CP000789), *E. aerogenes* (M62745), *P. damsela* (AB084251, AB259289) และ *P. phosphoreum* (AB259287) ซึ่งผลของการจัดเรียงแสดงดังรูปที่ 20 โดยลำดับเบสของ primers ที่ใช้สำหรับการ

ตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของเชื้อในกลุ่มที่ 2 คือ Hdc\_2F 5'TGG-GGT-GTS-ACC-AAT-GG-3' และ Hdc\_2R 5'GTR-TGG-CCG-TTA-CGY-GAR-CC-3' โดย PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย primer คู่ดังกล่าวจะมีขนาดเท่ากับ 578 bp และนอกจากนี้สำหรับ Hdc\_3F 5'TCH-ATY-ARY-AAC-TGY-GGT-GAC-TGG-RG-3' และ Hdc\_3R 5'CCC-ACA-KCA-TBA-RWG-GDG-TRT-GRC-C-3' นั้นเป็น primer ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ที่ออกแบบโดย Takahashi และคณะ โดย PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย primer คู่นี้จะมีขนาดเท่ากับ 709 bp

CP000644.1	ATGATAATGGGTTTGTCTATCAGAAAGATGCCGGGAAATAGAGTCGTTTGGCGGTATTGTGTGCGCATCAATATTTCAATATCGGTTATCCAGAGCGCGG	100
CP002824	-----ATGCTTTTATCTATTGCCGATCAAAATAAACTCGATGCAATTTGGTCATACCTGTGTAAGAAATCGCTACATTTAAATTTGGCTACCCCTGAATCTG	94
FQ670204	-----ATGAAATTTATCAATGAAAGATCAAGTTAAATTTAGATGAATTTATGGTTATTGTTTAAAGAAATCGTTTCCTTAACCTTAGGGTACCCCTGAATCAG	94
FQ670178	-----ATGAAATTTATCAATGAAAGATCAAGTTAAATTTAGATGAATTTATGGTTATTGTTTAAAGAAATCGTTTCCTTAACCTTAGGGTACCCCTGAATCAG	94
CP000749	-----ATGAACTTATCTATTGCAAAATGAAGCGCTCTAGACTCCTTTTGGAGCTACTGTTTACAGCATCAGTATTTAAATATCGGCTATCCAGAGCTCG	94
CP002583	-----ATGAACTTCTCAGCAACGACCAAGAGCAGCTAAATAATTTTGGCAATCTGCTAGAGCATCAATATTTAAATTTGGCTATCTGAAATCTG	94
CP003041	-----ATGACTTTATCCCTCGCCGACCAAGCAAGCTTGAAGGCTTCTGCGAGCACTGCGTGACATCAGTATTTCAATTTGGGTATCCCGAATCAG	94
Y09356	-----ATGACTTTATCCCTCGCCGACCAAGCAAGCTTGAAGGCTTCTGCGAGCACTGCGTGACATCAGTATTTCAATTTGGGTATCCCGAATCAG	94
CT573326	-----ATGACTTTGTCTCTGCGAGCCGCGCTGCGATCAATTTCTGGAGCATTCGCTGAAAGAACAGTATTTCAATATCGGCTATCCGGAAGACG	94
CP000789	-----ATGAACTATCCGATGAGGATCTAAGCAGACTTAACGAGTTCTGGCTTACTGCGAGCAAAACCAATATTTAACTGCGGATCTCTGAATCTG	94
ruler	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100	
CP000644.1	CTGACTTTGACTACTCCGCTTTAAACCGTTTCTTAAACTTCTCTATCAATAACTG--TGGTATTGG--AGCCAGCAGAGCAACTACCTTCTCAACTCTCT	197
CP002824	CTGATTTTGATTACACCATCTGCGGAGCGTTTCTGCGTTTCTCAATTAATAACTG--TGGTACTGG--GGGAGTACTGTAACATTATTATCAACTCTCT	191
FQ670204	CAGATATTGATTATTCCGTTTATGAAAAGTTTGGAAATATTAAATTTAATAACTG--TGGTATTGG--GCTGAATCTGTAATTTTAAATTTAAATACATT	191
FQ670178	CAGATATTGATTATTCCGTTTATGAAAAGTTTGGAAATATTAAATTTAATAACTG--TGGTATTGG--GCTGAATCTGTAATTTTAAATTTAAATACATT	191
CP000749	CAGATTTTGATTACTCCTCTTATATCTGTTTTCATTTTCTTGAACAAATG--TGGTACTGG--CGAGAACTGAGCAATATGCACTGAATCTCTT	191
CP002583	CTGATTTTGATTATTCATCTATTTAAGTTTCTTAAATTTTCACTCAATAATG--TGGCGATTGG--CGCGAACCAAGATTTAGCCTCAACTCTAT	191
CP003041	CGATTTTGATTACTCCAGCTGACCGCTTCTTGCAGTTTCAATTAACAACCTG--CGGCGACTGG--AACGAGTACAGCAACTACCTGTTGAATCTGTT	191
Y09356	CGATTTTGATTACTCCAGCTGACCGCTTCTTGCAGTTTCAATTAACAACCTGCTGCGGACTGGGAATGAGTACAGCAACTACCTGTTGAATCTGTT	194
CT573326	CGATTTCAACTACGCCAGCTGACCGCTTCTGCGTTTCTCCATCAACAACCTG--CGCGACTGG--GCGAGCCGCGCAACTACCTGCTCAACTCTGTT	191
CP000789	CTGATTTTGATTATTCCGAACTAGAAAAGTTTATGAAGTTTCCATCAATAACTG--TGGAGATTGG--AGAGAAAGAAAGCAATACAGACTCAACTCTCT	191
ruler	110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200	
CP000644.1	TGATTTGAAAGAGGTTGATGCAATTTCTTGCACCTGTTCTGCAATTCCTTTTGGAGCAAGTTGGGGTTATGTGACCAACGCTGGTACTGAGGGGAAT	297
CP002824	CGACTTTGAAAAGAGTCTAGGAGTATTTCTCCGCGATATTCAAAATCCCCCTTTCGCGAAGCTGGGGCTATGTGACCAACGCTGGCAGAGAAAGTAAT	291
FQ670204	TGAATTTGAAAAGAGTGTAAATGGAATATTTTATGATTATTTTAAATTAGTAAGGAAGATGCTTGGGGATATGTGACAAATGGTGGTACAGAAAGGAAT	291
FQ670178	TGAATTTGAAAAGAGTGTAAATGGAATATTTTATGATTATTTTAAATTAGTAAGGAAGATGCTTGGGGATATGTGACAAATGGTGGTACAGAAAGGAAT	291
CP000749	CGAGTTTGAGGAGAGCTCATGCACTACTTCCGCGAGTTATTTAAATATCTTTTCAAGAGAGTTGGGGGTATGTGACCAATGGCGGCTGAGGAAAC	291
CP002583	TGATTTGAGAGAGATGTTTAACTATTTCTCAGAGCTGTTTCAATTTGATTTCAGAAAGACAGCTGGGGCTATGTGACCAATGGCGGCTGAGGAAAT	291
CP003041	CGACTTTGAAAAGAGCTCATGCACTATTTCCGCGAGCTGTTCAACATTTGCCCTTGAAGACAGTTGGGGTATGTGACCAATGGCGGCTGAGGAAAC	291
Y09356	CGACTTTGAAAAGAGCTCATGCACTATTTCCGCGAGCTGTTCAACATTTGCCCTTGAAGACAGTTGGGGTATGTGACCAATGGCGGCTGAGGAAAC	294
CT573326	CGACTTCGAGAGAGCTGTATGCGCTACTTCCGCGAGCTGTTTCAACATTTCCCTCTGAAAGAGAGTTGGGGCTAGCTGACCAATGGCGGCTGAGGAAAC	291
CP000789	CGACTTTGAGAAAGATGTATGCGTTACTTCCAGTTGTTTCAACATCCCCCAAGAAAGTTGGGGCTATATTTTCAACGCTGGTACCGAGGCAAC	291
ruler	210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300	
CP000644.1	ATGTTTCGGATGCTATCTGGCCCGGAGTTATTTCTGAGGCAACATATATATTACTCAAAAGATACATATTTCCGTTGCAAGATCATCCGACTATTGA	397
CP002824	ATGTTTCGGTATCTATCTGGGAGAGAACTGTTCCCGAAGCGACGCTCTACTATTCAAAAGATACCTACTATTTCCGTCGCCAAATTCGTCAACTGCTGC	391
FQ670204	ATGTTTCGGTATATGCTAGCCAGAGAACTTTCCTAATCTACAGCTATTTTATTCARAGGAAGCTCACTATTTGCGAGCTAAATTTGAATTTTACITTA	391
FQ670178	ATGTTTCGGTATATGCTAGCCAGAGAACTTTCCTAATCTACAGCTATTTTATTCARAGGAAGCTCACTATTTGCGAGCTAAATTTGAATTTTACITTA	391
CP000749	ATGTTTCGGTATCTACTAGCAAGGAGCTATTTCCAAATTCGACTTTGATATTTTCCAAAGAGACACACTATTTCCGTCGCTAAATTTGAATTTTAA	391
CP002583	ATGTTTCGGATGCTACTAGCAAGAGCTTTTCCGAAATTCACAGCTTTATTTATTCARAGGAAGCTCACTATTTGCGAGCTAAATTTGAATTTTAA	391
CP003041	ATGTTTCGGTATCTACTGGGACGCAACTGTTTCCGGAAGCGACCGCTGACTACTCGAAGAGACACCCACTACTCCGTCGCAAGATCTGCAAAATTTATGC	391
Y09356	ATGTTTCGGTATCTACTGGGACGCAACTGTTTCCGGAAGCGACCGCTGACTACTCGAAGAGACACCCACTACTCCGTCGCAAGATCTGCAAAATTTATGC	394
CT573326	ATGTTTCGGTATCTACTGGGCGGGAACGTTTCCCAACGCGACCGCTGACTACTCGAAGAGACACCCACTATTTCCGTCGCAAGATCTGCAAAATTTATGC	391
CP000789	CTGTTTTCCTGTTATTTAGCGCGTGAGCTTTTCCAAACGCGCTATCTCTATTACTCTGAGAAAGCCACTACTCGGTCGATAAATTCGCTAGATTACTTA	391
ruler	310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	
CP000644.1	GAGTAAATCATGTATGCTGATTCACTGCTTAATGCGGAGATGAATTTATGATGACCTGATCAATCGAATTCGACTGGATGGAGAGCGTCACCCATTAT	497
CP002824	GTATCAAAATCGCAACTGCTGGAATCTCAGCCAGAGCGGAGAAATGGATTATGACGATTGATCAATAAAATCAGGACCTCAGGCGAAGCCATCCCATCAT	491
FQ670204	GAATGAAATCTTCCGCTGCTTGAACGCTCAAAAAGATGCTGTTGTTGATTATGAAGATTTAATTAATAGATTCTCAATCAGGAGAAAACATCCTATTAT	491
FQ670178	GAATGAAATCTTCCGCTGCTTGAACGCTCAAAAAGATGCTGTTGTTGATTATGAAGATTTAATTAATAGATTCTCAATCAGGAGAAAACATCCTATTAT	491
CP000749	GGATGAAATCTTCCCTTGTGACACGCTAGATAATGCTGAAATAAATACAGATGACCTGATACAAAAGATCTTATCAACAGGCAAAACAGCCAAATAT	491
CP002583	AGATGAAATCTTCCCTTATGAGACCAACGCTACGGGCGAAATCGACATCGATGATCTCACCCTAAATTAATTAACCAAGAGAAACAGCCGATCAT	491
CP003041	GGATCAAAATGCGCTGCGGCTGGAATCGCTGCCAATGCGGAAATCGACTACGACGACCTGATGGCAAAATTAACCGCGACAGGAGCGCTACCCCATCAT	491
Y09356	GGATCAAAATGCGCTGCGGCTGGAATCGCTGCCAATGCGGAAATCGACTACGACGACCTGATGGCAAAATTAACCGCGACAGGAGCGCTACCCCATCAT	494
CT573326	GCATCGACTGCGCGCGGTGGAGTGCCTGCCAACGCTGAGATCGACTACGACGACCTGATGGCGAAGATCGCCGCGCAGGAGCAGCAACCCGATCAT	491
CP000789	ACATCCCATCGCGCAAGATCCCTGCTCTATCAATGCTGAAATAGATTATCAACAGCTCGTAACTCAAAATTTAGCGAGACCAACAGGCAATCCCATAT	491
ruler	410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500	
CP000644.1	ATTTGCCAATAGAGGACGAGTACAGGGGCGACAGCAATATTGCCACCATTCAAAGAGCTTGAAGAAATAGGAATCACCAGGGGGACTATTAC	597
CP002824	TTTCGCCAATATTGGCACAACGGTACGCGCGCTGTTGATATATCGCTGAGATACAGAAACGTTATCGCTGCGCTGGGATCTCCACGTTGAAGATTATTAT	591
FQ670204	TTTAGCTAATTTAGGTTCTACAGTACATGGTGCTATTGATGATATAAGTAAATTTCAAAAACCTATGTCACAAGCTGGTTTAAACGCTGAGGATTATTAT	591
FQ670178	TTTAGCTAATTTAGGTTCTACAGTACATGGTGCTATTGATGATATAAGTAAATTTCAAAAACCTATGTCACAAGCTGGTTTAAACGCTGAGGATTATTAT	591
CP000749	ATTTGCCAATATAGGCAACCAATGCTGAGGAGCTGATATATTTGCCAATTCCAATTTGCAACTCAAGCAAAATTCATATCGATGCAACCAACTACTAT	591
CP002583	ATTTGCCAATATCGGCACTACCATGTCAGGGCGGATCGATAATATTCGATGAATTAAGCAATTAAGCAATAGGCATTGATAGAAACGACTCTCAT	591
CP003041	CTTCGCCAATATCGGCACTACCATGCTGAGCGCGTGGATAATATTCGTCACCATTCAGCAACGCGCTGCAACAGGCGAGGATTCGCCGCCAGGACTACTAC	591
Y09356	CTTCGCCAATATCGGCACTACCATGCTGAGCGCGTGGATAATATTCGTCACCATTCAGCAACGCGCTGCAACAGGCGAGGATTCGCCGCCAGGACTACTAC	594
CT573326	CTTCGCTAATGCTGATGACCATGCGCGCGTGGATGACCAATATTCGCCACCATTCAGCAGCGCGCTGGAGGAAGTGGGATTCGCCGCTGAGGACTACTAC	591
CP000789	CTTCGCTAATGCTGCTCAACTATGCGAGCTGCTATCGATGACATTCGAAGAAATACAGAAATGACCTCCGCTACTAGGCTCGCAGGAAAGATTTATTAT	591
ruler	510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600	









```

      * * * * *
M62746 TGTGGATAATCCACAGCCGTTAACTTCGCAGATGGCATTGATTCTATTGGTGTTCGGGACACAAAAATGATTGGCTCACCAGATTCCITGCGGCATTGTT 597
AB259290 CGTTGATGATGCACAGCCATTCACTTTTCCTGACGGTATCGACTCAATCGGTGTTCCGGCCACAAAAATGATTGGCTCGCCATCCCTTGGCGTATCGTT 597
J02577 CGTTGATGATGCACAGCCATTCACTTTTCCTGACGGTATCGACTCAATCGGTGTTCCGGCCACAAAAATGATTGGCTCGCCATCCCTTGGCGTATCGTT 597
AB083204 CGTCGACGATCCGCAAGCCGTTTCACTTTTCGAGACGGCATCGACTCTATCGCGCTCTCCGGCCACAAGATGATTGGCTCGCCATCCCTTGGCGTATCGTT 597
CP003041 CGTCGATCACCACACACCCCTTCTCGTTTTCGCGACGGCATCGACTCGATCTCGCGCTCTCCGGCCACAAGATGATTGGCTCGCCATCCCTTGGCGTATCGTT 597
Y09356 CGTCGATCACCACACACCCCTTCTCGTTTTCGCGACGGCATCGACTCGATCTCGCGCTCTCCGGCCACAAGATGATTGGCTCGCCATCCCTTGGCGTATCGTT 600
CT573326 CGTCGATAATCCACAGCCGTTTAACTTCGCAGATGGCATTGATTCCATTGGTGTTCGGGACACAAAAATGATTGGCTCACCAGATTCCCTTGGCGTATCGTT 597
AB083205 TGTGGATAATCCACAGCCGTTTAACTTCGCAGATGGCATTGATTCCATTGGTGTTCGGGACACAAAAATGATTGGCTCACCAGATTCCCTTGGCGTATCGTT 597
FJ469565 TGTGGATAATCCACAGCCGTTTAACTTCGCAGATGGCATTGATTCCATTGGTGTTCGGGACACAAAAATGATTGGCTCACCAGATTCCCTTGGCGTATCGTT 597
CP000789 TGTGGATGACCCACACACCCCTTACCTTCGCGGATGGTATCGACTCGATTGGCGTATCCGGACACAAAAATGATTGGCTCACCAGATTCCCTTGGCGTATCGTT 597
M62745 CGTGAGGATCCACACACCCCTTACCTTCGCGGATGGTATCGACTCGATTGGCGTATCCGGACACAAAAATGATTGGCTCACCAGATTCCCTTGGCGTATCGTT 597
AB084251 TGTGATGAACCGCAAGGATTCAACTTTGCGGATGGTATCGACTCTATTGGGTCTCTCGGACACAAAAATGATTGGCTCACCAGATTCCCTTGGCGTATCGTT 597
AB259287 TGTGATGAACCGCAAGGATTCAACTTTGCGGATGGTATCGACTCTATTGGGTCTCTCGGACACAAAAATGATTGGCTCACCAGATTCCCTTGGCGTATCGTT 597
AB259289 TGTGATGAACCGCAAGGATTCAACTTTGCGGATGGTATCGACTCTATTGGGTCTCTCGGACACAAAAATGATTGGCTCACCAGATTCCCTTGGCGTATCGTT 597
ruler .....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600

      * * * * *
M62746 GTTGCTAAAAAGAAAAATGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 697
AB259290 GTTGCTGAAGAAAGAAACGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 697
J02577 GTTGCTGAAGAAAGAAACGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 697
AB083204 GTTGCTGAAGAAAGAAACGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 697
CP003041 GTTGCTGAAGAAAGAAACGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 697
Y09356 GTTGCTGAAGAAAGAAACGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 700
CT573326 GTTGCTGAAGAAAGAAACGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 697
AB083205 GTTGCTGAAGAAAGAAACGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 697
FJ469565 GTTGCTGAAGAAAGAAACGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 697
CP000789 GTTGCTGAAGAAAGAAACGTCGATCGGATCTCTGTAGAGATTGATTATATTTCTGCTCAGGATAAAACCATTTCCGGTTCGGTAAACGGTCAATACCCAC 697
M62745 GTAGCCAAAGAAAGCAACGTCGACCGTATCAGCGTAGAGATGAGTACTATCTCGGCCACGATAAAACGATTTCGGTTCAGGAAAGGTCATACCCCTT 697
AB084251 ATTGCTAAGAAAGCAATGTTGACCAAGATCACAGTAGAAATTGACTACATTGCGAGCTACGATAAAACCATTCAGGTTCCAGTAATGGTCACACACCCAC 697
AB259287 GTAGCCAAAGAAAGCAATGTTGACCAAGATCACAGTAGAAATTGACTACATTGCGAGCTACGATAAAACCATTCAGGTTCCAGTAATGGTCACACACCCAC 697
AB259289 ATTGCTAAGAAAGCAATGTTGACCAAGATCACAGTAGAAATTGACTACATTGCGAGCTACGATAAAACCATTCAGGTTCCAGTAATGGTCACACACCCAC 697
ruler .....610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700

      * * * * *
M62746 TCATGATGTGGG 709
AB259290 TCATGCTGTGGG 709
J02577 TCATGCTGTGGG 709
AB083204 TCATGATGTGGG 709
CP003041 TCATGATGTGGG 709
Y09356 TCATGATGTGGG 712
CT573326 TCATGATGTGGG 709
AB083205 TCATGATGTGGG 709
FJ469565 TCATGCTGTGGG 709
CP000789 TATTATGTGGA 709
M62745 TCATGATGTGGG 709
AB084251 TCATGCTGTGGG 709
AB259287 TAAATGATGGT 709
AB259289 TAAATGATGGG 709
ruler .....710..

```

รูปที่ 20 การจัดเรียงลำดับเบสบริเวณอนุรักษ์ของ *hdc gene* สำหรับการออกแบบ Hdc\_1F และ Hdc\_1R

#### 4.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวน *hdc gene* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction; PCR)

##### วิธีการทดลอง

สำหรับการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *hdc gene* นั้น ในการทดลองครั้งนี้จะทำการศึกษาถึงอุณหภูมิที่ primers สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing temperature) และความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *hdc gene* โดยในหลอดปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มจำนวน *hdc gene* นั้นจะประกอบด้วย 1.forward primer (20 pmol/μL) 2.reverse primer (20 pmol/μL) 3.dNTP (0.2 mM) 4. 1X PCR reaction buffer (NEB; 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 2 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% TritonX-100) 5. *Taq* DNA polymerase (1Unit) 6.template DNA (20 ng) 7. น้ำปลอดประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *hdc gene* แล้วจึงนำไปทดสอบความจำเพาะและความไวของ primers ต่อ *hdc gene* ของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนต่อไปโดยเชื่อมาตรฐานที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ที่ใช้การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc gene* คือ *E. aerogenes* และ *M. morganii*

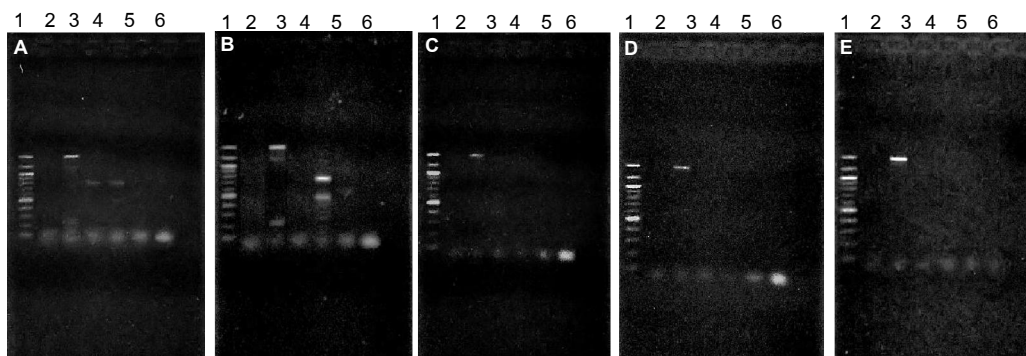
##### ผลการทดลอง

สำหรับการทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc gene* นั้น โดยการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *hdc gene* โดย primer ที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ประกอบด้วย Hdc\_1F Hdc\_1R, Hdc\_2F Hdc\_2R และ Hdc\_3F Hdc\_3R ซึ่งมีการกำหนดช่วงของ annealing temperature ที่ใช้ในการทดสอบที่แตกต่างกัน สำหรับ Hdc\_1F และ Hdc\_1R ซึ่งค่า annealing temperature ที่ใช้ในการทดสอบคือ 42°C, 44°C, 46°C, 48°C และ 50°C ในขณะที่ค่า annealing temperature ที่ใช้ในการทดสอบสำหรับ Hdc\_2F และ Hdc\_2R คือ 46°C, 48°C, 50°C, 52°C และ 54°C และสุดท้ายค่า annealing temperature ที่ใช้ในการทดสอบสำหรับ Hdc\_3F และ Hdc\_3R คือ 50°C, 52°C, 54°C, 56°C และ 58°C ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าการทดสอบเพื่อหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc gene* โดยใช้คู่ primer Hdc\_1F และ Hdc\_1R พบว่าทุก annealing temperature ที่ใช้ในการทดสอบนั้นไม่สามารถให้ pcr product ที่ตรงกับขนาดของยีนเป้าหมายที่ต้องการซึ่งมีขนาดเท่ากับ 996 bp จากทุกเชื้อตัวอย่าง

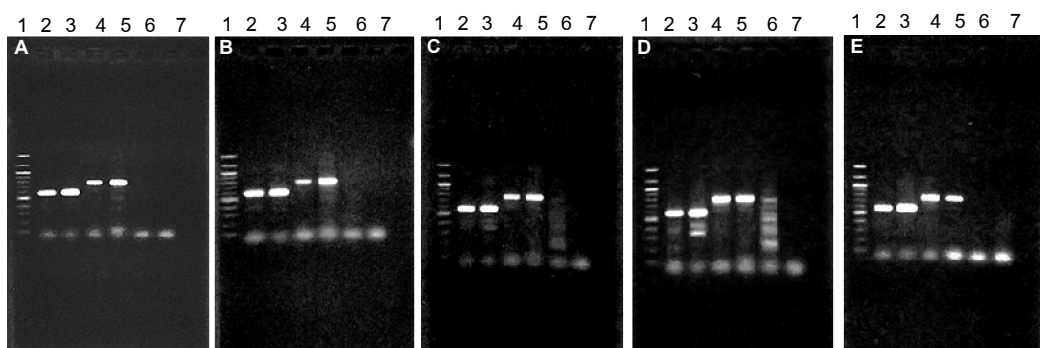
ในขณะที่การทดสอบเพื่อหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc gene* โดยใช้ Hdc\_2F และ Hdc\_2R primer (รูปที่ 21) พบว่าที่ทุก annealing temperature ที่ใช้ในการทดสอบ primers ที่ใช้ในการทดสอบสามารถตรวจพบ *hdc gene* *E. aerogenes* และ *M. morganii* ได้โดยมีขนาดของ PCR product เท่ากับ 578 bp แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการปรากฏ PCR product ที่มีขนาดเท่ากับยีนเป้าหมายเมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *K. planticola*, *K. pneumonia* และ *P. fluorescens* ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าที่ annealing temperature เท่ากับ 54°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc gene* เนื่องจากพบว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวไม่มีการปรากฏของ PCR product ขนาดอื่น ๆ เกิดขึ้นในการเพิ่มจำนวนของยีนเป้าหมายของเชื้อ *E. aerogenes* และ *M. morganii* ดังแสดงในรูปที่ 22 สำหรับ



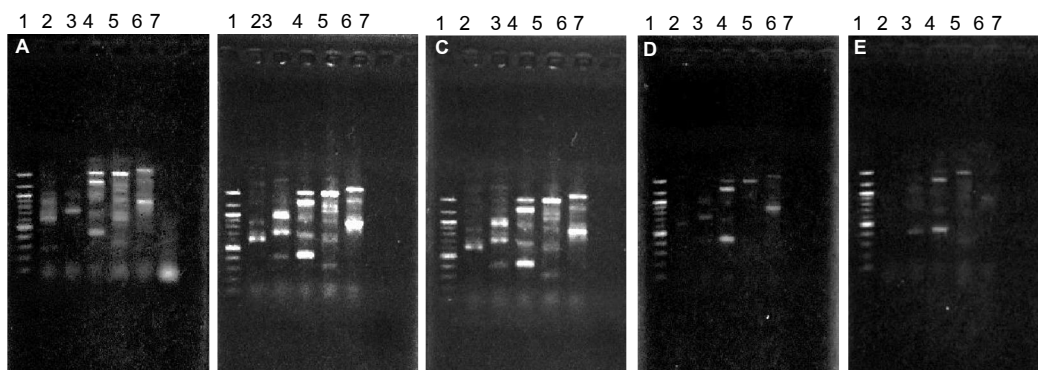
ผลการทดลองเพื่อหา annealing temperature ที่เหมาะสมในการตรวจสอบการมีอยู่ *hdc* gene โดยใช้ Hdc\_3F และ Hdc\_3R นั้นพบว่าคู่ primers ที่ใช้ในการทดสอบสามารถให้ PCR product ที่มีขนาดตรงกับขนาดของยีนเป้าหมายที่ต้องการคือ 709 bp หลังจากทำการทดสอบที่ annealing temperature เท่ากับ 0°C, 52°C และ 54°C กับเชื้อ *M. morganii* เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการปรากฏของ PCR product ที่มีขนาดตรงกับยีนเป้าหมายหลังจากทดสอบกับเชื้อ *E. aerogenes*, *K. planticola*, *K. pneumoniae* และ *P. fluorescens* ในทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 21 ผลการทดสอบหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการปรากฏของ *hdc* gene โดยใช้ Hdc\_1F และ Hdc\_1R primer (A : 42°C, B : 44°C, C : 46°C, D : 48°C, E : 50°C)



รูปที่ 22 ผลการทดสอบหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการปรากฏของ *hdc* gene โดยใช้ Hdc\_2F และ Hdc\_2R primer (A : 46°C, B : 48°C, C : 50°C, D : 52°C, E : 54°C)

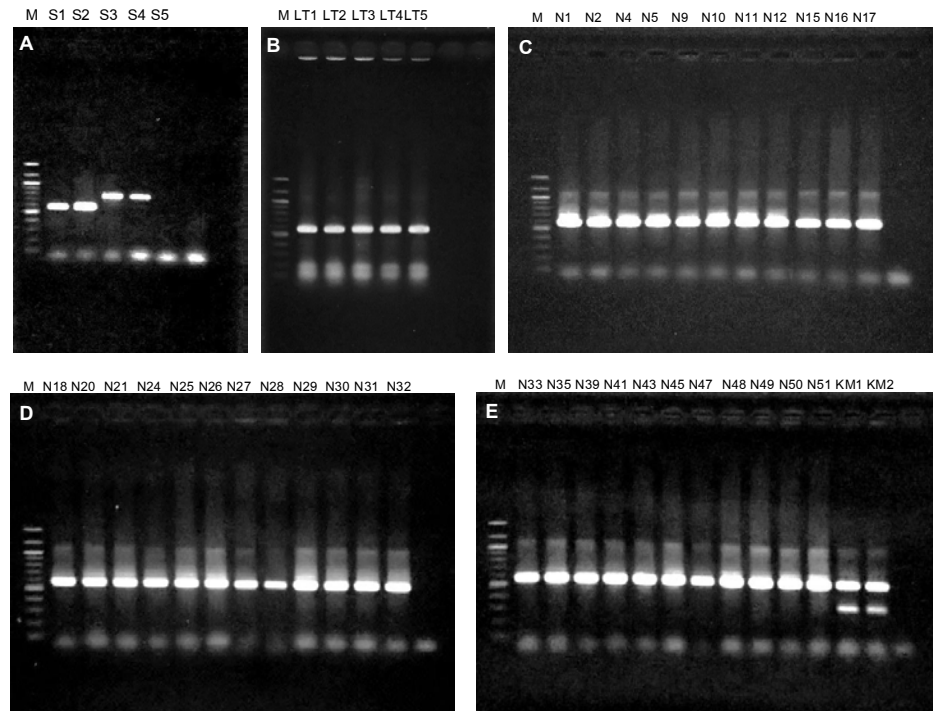


รูปที่ 23 ผลการทดสอบหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการปรากฏของ *hdc* gene โดยใช้ Hdc\_3F และ Hdc\_3R primer (A : 50°C, B : 52°C, C : 54°C, D : 56°C, E : 58°C)

#### 4.8 การทดสอบความจำเพาะของ primers ต่อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีน โดยวิธี PCR

หลังจากทำการทดสอบเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวน *hdc* gene ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ เมื่อได้สถานะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *hdc* gene แล้วจากนั้นจึงทำการทดสอบความจำเพาะของ primers ต่อ *hdc* gene ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ด้วยวิธี PCR โดยทำการทดสอบทั้งเชื้อมาตรฐานและเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาทะเล

สำหรับการทดสอบความจำเพาะของ Hdc\_2F และ Hdc\_2R primer ต่อ *hdc* gene ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ทั้งในส่วนของเชื้อมาตรฐาน *E. aerogenes* และ *M. morganii* และเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาทะเลจำนวน 41 ตัวอย่าง นอกจากนี้ทำการทดสอบความจำเพาะของ primer ต่อเชื้อมาตรฐานที่ไม่สามารถสร้างฮิสตามีนได้จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *K. platicola*, *K. pneumoniae* และ *P. fluorescens* ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า Hdc\_2F และ Hdc\_2R primer ที่สามารถตรวจพบ *hdc* gene ในเชื้อมาตรฐานและเชื้อตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาทะเลทุกตัวที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ โดย PCR product ที่เกิดขึ้นมีขนาดตรงกับขนาดของยีนเป้าหมายคือมีขนาดเท่ากับ 576 bp ในขณะที่ไม่พบการปรากฏของ PCR product เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *P. fluorescens* ดังแสดงในรูปที่ 24 และเมื่อนำ PCR product ที่ได้จากเชื้อ *E. aerogenes*, *M. morganii* และ *K. planticola* ไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *hdc* gene ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ได้จากเชื้อ *E. aerogenes* มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *hdc* gene ของเชื้อ *E. aerogenes* ในฐานข้อมูลเท่ากับ 94% และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ได้จากเชื้อ *M. morganii* พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. morganii* ในฐานข้อมูลเท่ากับ 99% ดังรูปที่ 25-26



รูปที่ 24 การทดสอบความจำเพาะของ Hdc\_2F และ Hdc\_2R primer ต่อแบคทีเรียมาตรฐาน: A (S1: *E. aerogenes*, S2: *M. morganii*, S3: *K. planticola*, S4: *K. pneumoniae* และ S5: *P. fluorescens*) และแบคทีเรียตัวอย่างที่คัดแยกได้จากปลาทะเลที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ (B, C, D และ E)

```

* *****
ATCC13048 CGTTTATCGTGGCGGAGATGTAGTCGATCTCTACGCTGATACGGTTCGAGTTGGCTTCTTGGCTACCAATGCCGATGGAATCGGGGAGCCGATC 100
KCTC2190 CGTTTATCGTGGCGGAGATGTAGTCGATCTCTACGCTGATACGGTTCGAGTTGGCTTCTTGGCTACCAATGCCGATGGAATCGGGGAGCCGATC 100
query TGATTTATAGTGGCGGAGGTGTAGTCGAAATAAAAAAGTAGAATTAGATTTATAGGCTACCAATGACGCATGGAATCGGGGAGCCGATC 100
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100
*****
ATCC13048 ATTTTGTGTCGGGAAACGCCAATCGAATCGATACCATCCGCGAAGGTAAACGGTTGTGGATCCTCCACGAAAGGCAAGATCATGCCGCTTAGCGCGGC-A 199
KCTC2190 ATTTTGTGTCGGGAAACGCCAATCGAATCGATACCATCCGCGAAGGTAAACGGTTGTGGATCCTCCACGAAAGGCAAGATCATGCCGCTTAGCGCGGC-A 199
query ATTTTGTGTCGGGAAACGCCAATCGAATCGATACCATCCGCGAAGGTAAACGGTTGTGGATCCTCCACGAAAGGCAAGATCATGCCGCTTAGCGCGGTA 200
ruler .....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200
*****
ATCC13048 TCCGCGGTAGATAAATACTTCACTGCGGATCCCGAGCGCA-GCGATACG-TTTCGTATCTCAGCGATATTATCAACAGCGCCGCGTACCGTTGTGCC 297
KCTC2190 TCCGCGGTAGATAAATACTTCACTGCGGATCCCGAGCGCA-GCGATACG-TTTCGTATCTCAGCGATATTATCAACAGCGCCGCGTACCGTTGTGCC 297
query ACCGCGGTAGATCAGAATCTTCACTGCGGATCCCGAGCGCAAGGCTTTCTGATATCAGCGATATTATCAACAGCGCCGCGTACCGATGTGCC 300
ruler .....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300
*****
ATCC13048 AATATTGGCGAAATGATGGGATGGCGTTCGCGTGGGTCTGATTTTATGATCAAAATCGTCATAATCCATTTCCTCGCTGGCTGAGATTCCACCAAGT 397
KCTC2190 AATATTGGCGAAATGATGGGATGGCGTTCGCGTGGGTCTGATTTTATGATCAAAATCGTCATAATCCATTTCCTCGCTGGCTGAGATTCCACCAAGT 397
query AATATTGGCGAAATGATGGGATGGCGTTCGCGTGGGTCTGATTTTATGATCAAAATCGTCATAATCCATTTCCTCGCTGGCTGAGATTCCACCAAGT 400
ruler .....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400
*****
ATCC13048 TCGGATTTGATACGCGAGCTTTGACGATTTTGGCGACGGAATAGTGAGTATCTTTTGAATAGTAGAGCGTGCCTTCCGGGAACAGTTCTCTTCCAGAT 497
KCTC2190 TCGGATTTGATACGCGAGCTTTGACGATTTTGGCGACGGAATAGTGAGTATCTTTTGAATAGTAGAGCGTGCCTTCCGGGAACAGTTCTCTTCCAGAT 497
query TCGGATTTGATACGCGAGCTTTGACGATTTTGGCGACGGAATAGTGAGTATCTTTTGAATAGTAGAGCGTGCCTTCCGGGAACAGTTCTCTTCCAGAT 500
ruler .....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500
*****
ATCC13048 AGCAACCAAA-CATATTACTTTCTGTGCCACCGTTGGTGACATAGCCCCAGCTTTCCG 554
KCTC2190 AGCAACCAAA-CATATTACTTTCTGTGCCACCGTTGGTGACATAGCCCCAGCTTTCCG 554
query AGCAACCAAAACATTTTACTTTTGTGCCACCATTTGGTGCCATACCCCAAAAAATC 558
ruler .....510.....520.....530.....540.....550.....

```

รูปที่ 25 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *hdc* gene ของ *E. aerogenes* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย Hdc\_2F และ Hdc\_2R primer กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *hdc* gene ของ *E. aerogenes* ที่อยู่ฐานข้อมูล NCBI

```

ATCC25830 TGCATCAGCAACTGCGGTCACTGCGGCGCAATATTGCAACTACCTGCTGAACCTTTTCGATTTCGAGAAAGAGTATGAGTATTTCCGACAGCTGTCAAAAATCCGTTTGAACAAAGC 120
JCM1672 TGCATCAGCAACTGCGGTCACTGCGGCGCAATATTGCAACTACCTGCTGAACCTTTTCGATTTCGAGAAAGAGTATGAGTATTTCCGACAGCTGTCAAAAATCCGTTTGAACAAAGC 120
query .....
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120
*****
ATCC25830 TGGGGTTATGTGACGACGCGGTACCGAAGGTAACATGTTCCGTTGCTACCTGGGCGGTGAATCTTCCCTGACGGTACCGTGTACTATTCAAAAGATACTCACTATTCCGTTGCGAAA 240
JCM1672 TGGGGTTATGTGACGACGCGGTACCGAAGGTAACATGTTCCGTTGCTACCTGGGCGGTGAATCTTCCCTGACGGTACCGTGTACTATTCAAAAGATACTCACTATTCCGTTGCGAAA 240
query .....ATCTTCCCTGACGGTACCGTGTACTATTCAAAAGATACTCACTATTCCGTTGCGAAA 57
ruler .....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240
*****
ATCC25830 ATCGTTAAATTAATCGGTATCAAAATCTCAGGTTGTTGAATCTCTGCGAAACGGCGAAATCGACTATGACGATCTGATGAAAAAATCGCTGACGATAAAGAAGCGCATCCGATCATTTTC 360
JCM1672 ATCGTTAAATTAATCGGTATCAAAATCTCAGGTTGTTGAATCTCTGCGAAACGGCGAAATCGACTATGACGATCTGATGAAAAAATCGCTGACGATAAAGAAGCGCATCCGATCATTTTC 360
query ATCGTTAAATTAATCGGTATCAAAATCTCAGGTTGTTGAATCTCTGCGAAACGGCGAAATCGACTATGACGATCTGATGAAAAAATCGCTGACGATAAAGAAGCGCATCCGATCATTTTC 177
ruler .....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360
*****
ATCC25830 GCTAACATCGGTACCACTGTCCGCGGTGCTATTGATGATATCGTGAAATCCAGAAACGCGTGAAGCCAGCCGGATCAAAAGTGAAGATTACTACCTGCGACGCTGATCCGCGACTGAGC 480
JCM1672 GCTAACATCGGTACCACTGTCCGCGGTGCTATTGATGATATCGTGAAATCCAGAAACGCGTGAAGCCAGCCGGATCAAAAGTGAAGATTACTACCTGCGACGCTGATCCGCGACTGAGC 480
query GCTAACATCGGTACCACTGTCCGCGGTGCTATTGATGATATCGTGAAATCCAGAAACGCGTGAAGCCAGCCGGATCAAAAGTGAAGATTACTACCTGCTAGCTGATCCGCGACTGAGC 297
ruler .....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480
*****
ATCC25830 GGCATGATCCTGCCATTTCGTTGATGATGCACAGCCATTCACTTTTGTGACGCTATCGACTCAATCGGTGTTTCCGGCCACAAAATGATTGGTTGCGCAATCCCTTGGGGTATCGTTGTT 600
JCM1672 GGCATGATCCTGCCATTTCGTTGATGATGCACAGCCATTCACTTTTGTGACGCTATCGACTCAATCGGTGTTTCCGGCCACAAAATGATTGGTTGCGCAATCCCTTGGGGTATCGTTGTT 600
query GGCATGATCCTGCCATTTCGTTGATGATGCACAGCCATTCACTTTTGTGACGCTATCGACTCAATCGGTGTTTCCGGCCATAAAATGATTGGTTGCGCAATCCCTTGGGGTATCGTTGTT 417
ruler .....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600
*****
ATCC25830 GCGAAGAAAGAAAACGTGGATCGTATTTCGTTGAAATCGACTACATCTCCGCACACGACAAAA 664
JCM1672 GCGAAGAAAGAAAACGTGGATCGTATTTCGTTGAAATCGACTACATCTCCGCACACGACAAAA 664
query GCAAGAAAGAAAACGTGGATCGTATTTCGTTGAAATCGACTACTTCTCC----- 469
ruler .....610.....620.....630.....640.....650.....660.....

```

รูปที่ 26 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *hdc* gene ของ *M. morgani* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย Hdc\_2F และ Hdc\_2R primer กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *hdc* gene ของ *M. morgani* ที่อยู่ฐานข้อมูล NCBI

#### 4.9 การทดสอบความไวของ primers ต่อ *hdc* gene ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนโดยวิธี PCR

##### วิธีการทดลอง

##### 4.9.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบ

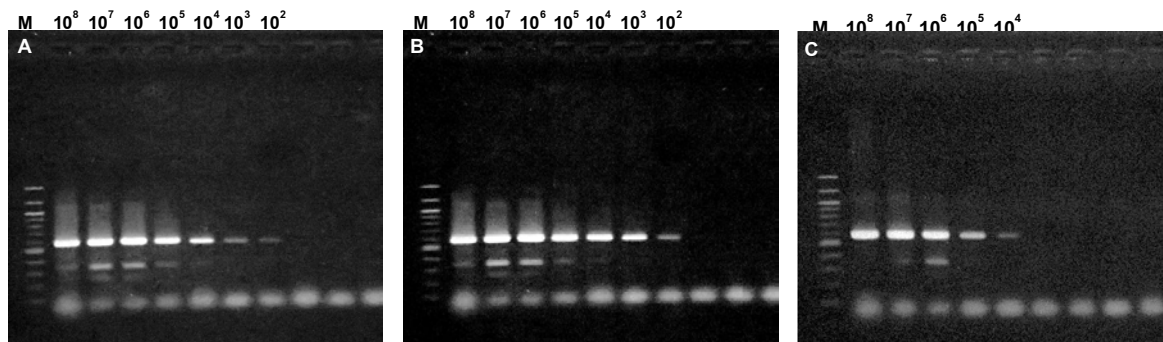
ในการทดลองสำหรับการทดสอบความไวของ primers ต่อ *hdc* gene ต่อเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีน สำหรับการทดลองในครั้งนี้ทำการทดสอบโดยใช้เชื้อมาตรฐาน 2 สายพันธุ์คือ *E. aerogenes* ATCC 13048 และ *M. morganii* ATCC 25830 ทำการเพาะเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทั้งสองสายพันธุ์ลงในอาหาร TSB โดยนำบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญแล้วดังกล่าวมาใช้เป็นเชื้อตั้งต้น โดยนำเชื้อตั้งต้นไปเพาะต่อลงในอาหาร TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งกำหนดให้มีปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่า 1% ปริมาตรหลังจากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °C จนกระทั่งเชื้อที่ใช้ในการทดลองเจริญจนมีค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 จากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณเชื้อต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Cfu/mL)

##### 4.9.2 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทดสอบ

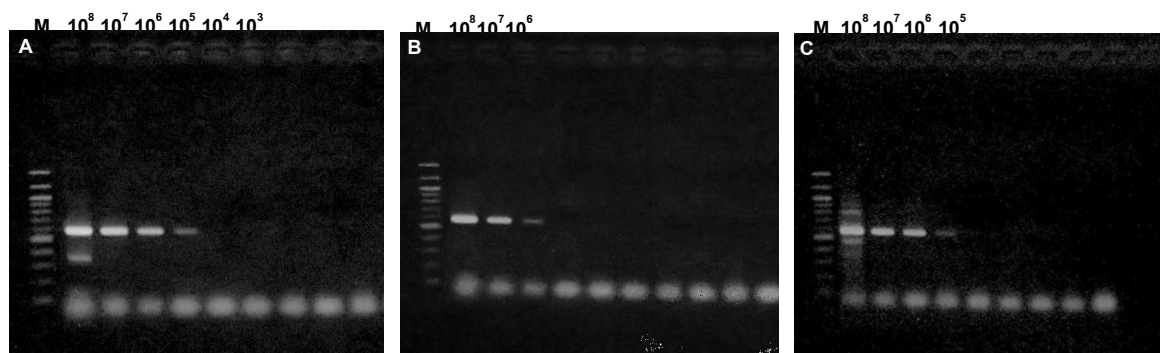
โดยในการทดลองครั้งนี้จะทำการทดสอบความไวของ primers ต่อ *hdc* gene ของแบคทีเรียมาตรฐานโดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วนคือ 1) การทดสอบความไวของ primers ต่อ *hdc* gene จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยชุดสกัดทางการค้า (Commercial DNA extraction kit) ซึ่งชุดสกัดทางการค้าที่ใช้สำหรับการทดลองในครั้งนี้คือ Puregene Core Kit B ของบริษัท QIAGEN 2) การทดสอบความไวของ primers ต่อ *hdc* gene จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการต้ม โดยในขั้นตอนนี้นำเชื้อที่ใช้ในการทดสอบที่เจริญจนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่า 1.0 นำมาทำการเจือจางที่ละ 10 เท่าโดยให้เชื้อที่จะใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้นเชื้ออยู่ในช่วง  $10^9$  ถึง  $10^1$  Cfu/mL หลังจากนั้นนำเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง เติมน้ำปลอดประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำตัวอย่างมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสปริมาตร 2 ไมโครลิตรเพื่อมาตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene และ 3) การทดสอบความไวของ primers ต่อเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ โดยตรงโดยไม่ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอนำเชื้อที่ใช้ในการทดสอบที่เจริญจนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่า 1.0 นำมาทำการเจือจางที่ละ 10 เท่าโดยให้เชื้อที่จะใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้นเชื้ออยู่ในช่วง  $10^8$  ถึง  $10^2$  Cfu/mL หลังจากนั้นนำเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นเติมน้ำเกลือละลาย 0.1% peptone ปริมาตร 50 ไมโครลิตรทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเชื้อที่ความเข้มข้นต่างในสารละลาย 0.1% peptone ปริมาตร 5 ไมโครลิตรนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene

### ผลการทดลอง

สำหรับการทดสอบความไวของ Hdc\_2F and Hdc\_2R ในการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ในเชื้อ *M. morganii* และ *E. aerogens* ในตัวอย่าง template ที่แตกต่างกันคือ genomic DNA ที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดทางการค้า cell lysates ที่ได้จากการต้มและการทดสอบโดยใช้ตัวเชื้อโดยตรง(whole cells) ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าสำหรับเชื้อ *M. morganii* นั้น primer ที่ใช้ในการทดสอบสามารถตรวจพบ *hdc* gene ได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่  $10^2$  CfU/mL จากตัวอย่าง cell lysates และ whole cells ในขณะที่ตัวอย่าง genomic DNA ที่ได้จากการสกัดโดยชุดสกัดทางการค้าสามารถตรวจพบการมีอยู่ของ *hdc* gene ที่ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $10^4$  CfU/mL (รูปที่ 27) ในขณะที่เมื่อทำการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ในเชื้อ *E. aerogenes* พบว่าคู่ primer ที่ใช้ในการทดสอบสามารถตรวจพบ *hdc* gene ได้ ที่ความเข้มข้นของเชื้อที่  $10^5$  CfU/mL สำหรับ cell lysates และ genomic DNA ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบกับ whole cells พบว่า คู่ primer ที่ใช้ในการทดสอบสามารถตรวจพบ *hdc* gene ณ ระดับความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $10^6$  CfU/mL (รูปที่ 28)



รูปที่ 27 การทดสอบความไวของ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R ในการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ใน *M. morganii* จากตัวอย่าง cell lysates (A) whole cells (B) และ genomic DNA (C)



รูปที่ 28 การทดสอบความไวของ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R ในการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ใน *E. aerogenes* จากตัวอย่าง cell lysates (A) whole cells (B) และ genomic DNA (C)



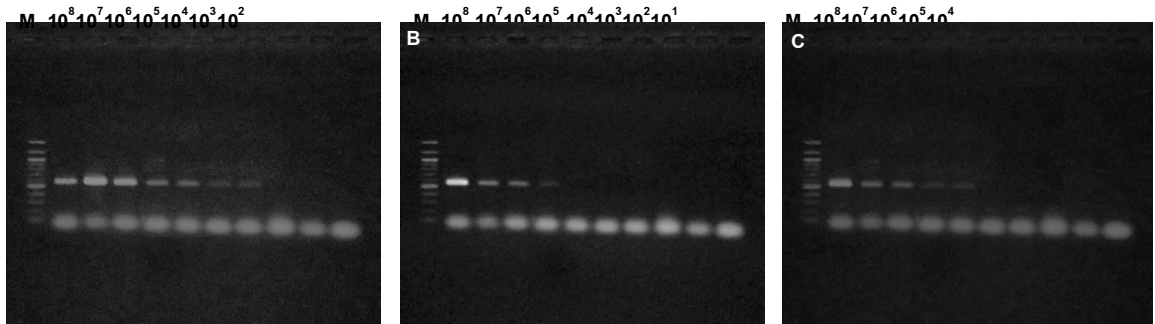
#### 4.10 การทดสอบความไวของ primers ต่อ *hdc* gene ของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง ฮิสตามีนในสภาวะจำลองที่มีเนื้อปลาเป็นองค์ประกอบ

##### วิธีการทดลอง

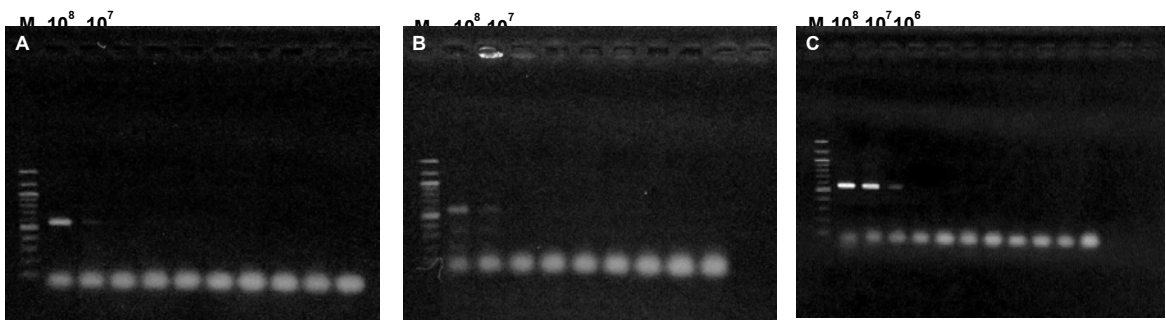
สำหรับการทดสอบในขั้นตอนนี้เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบคือ *E. aerogenes* ATCC 13048 และ *M. morganii* ATCC 25830 ซึ่งขั้นตอนในการเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบนั้นมีขั้นตอนเหมือนดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบเจริญจนมีค่าการดูดกลืนเท่า 1.0 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรจากนั้นนำเชื้อมาเจือจางด้วยปริมาตร 10 มิลลิลิตรเติมลงในสารละลาย 0.1% peptone ปริมาตร 40 มิลลิลิตรและหลังจากนั้นนำเนื้อปลาที่บดละเอียด ปริมาณ 10 กรัมใส่ลงในสารละลาย 0.1% peptone ที่มีเชื้ออยู่ ซึ่งเนื้อปลาที่ใช้ในการทดสอบคือ Indian mackerel หลังจากนั้นทำการเจือจางที่ละ 10 เท่าในสารละลาย 0.1% peptone โดยให้ความเข้มข้นของเชื้ออยู่ในช่วง  $10^8$  ถึง  $10^1$  Cfu/mL จากนั้นทำการทดสอบความไวของ primers เหมือนดังขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อก่อนหน้านี้

##### ผลการทดลอง

สำหรับการทดสอบความไวของ Hdc\_2F และ Hdc\_2R primers ในการตรวจสอบการปรากฏของ *hdc* gene ของเชื้อ *M. morganii* และ *E. aerogenes* ในสภาวะจำลองที่มีเนื้อปลาเป็นองค์ประกอบ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถของ primer ในการสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ในตัวอย่าง genomic DNA ที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดทางการค้า cell lysates ที่ได้จากการต้มและ whole cells ซึ่งผลการทดลองพบว่าสำหรับเชื้อ *M. morganii* นั้นคู่ primer ที่ใช้ในการทดสอบสามารถตรวจพบการมีอยู่ของ *hdc* gene ได้ที่ณ ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่  $10^2$  Cfu/mL จาก cell lysates และเมื่อทำการทดสอบกับ whole cells พบว่าความระดับความเข้มข้นของเชื้อที่สามารถตรวจพบว่าการมีอยู่ของ *hdc* gene ได้คือ  $10^5$  Cfu/mL และในส่วน of ตัวอย่างของ genomic DNA ของเชื้อ *M. morganii* ที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดทางการค้า พบว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของเชื้อที่สามารถตรวจพบการปรากฏของ *hdc* gene ได้มีค่าเท่ากับ  $10^4$  Cfu/mL ดังแสดงในรูปที่ 29 ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบเพื่อตรวจสอบการมีปรากฏของ *hdc* gene ในเชื้อ *E. aerogenes* พบว่าคู่ primers สามารถตรวจพบ *hdc* gene ได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $10^7$  Cfu/mL จากตัวอย่าง cell lysates และ whole cells ในขณะที่ตัวอย่าง genomic DNA สามารถตรวจพบ *hdc* gene ได้ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ  $10^5$  Cfu/mL ดังแสดงในรูปที่ 30



รูปที่ 29 การทดสอบความไวของ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R ในการตรวจสอบการปรากฏของ *hdc* gene ในเชื้อ *M. morganii* จากตัวอย่าง cell lysates (A) whole cells (B) และ genomic DNA (C)



รูปที่ 30 การทดสอบความไวของ primer Hdc\_2F และ Hdc\_2R ในการตรวจสอบการปรากฏของ *hdc* gene ในเชื้อ *E. aerogenes* จากตัวอย่าง cell lysates (A) whole cells (B) และ genomic DNA (C)

#### 4.11 สรุปผลการทดลอง

การปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ในอาหารทะเลโดยเฉพาะในปลาทะเล ส่งผลให้เกิดการสะสมของสารประกอบ biogenic amines โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮิสตามีน ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ฮิสทีดีนดีคาร์บอกซิเลสที่สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนฮิสทีดีนในเนื้อปลาให้กลายเป็นฮิสตามีน การปนเปื้อนของฮิสตามีนในปลาทะเลไม่เพียงแต่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคยังส่งผลกระทบต่อธุรกิจที่เกี่ยวข้องกับการส่งออกปลาทะเลและผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปมาจากปลาทะเล ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือในการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ซึ่งจัดเป็นต้นเหตุของการสะสมและการเพิ่มปริมาณของฮิสตามีนในเนื้อปลา ซึ่งในศึกษารั้งนี้ได้ทำการพัฒนาระบบตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยทำการออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะบริเวณอนุรักษ์ของ *hdc* gene ของกลุ่มเชื้อที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ โดยในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในตัวอย่างปลาทะเลที่คาดว่าสามารถสร้างฮิสตามีนได้ด้วยวิธีเบื้องต้นโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด differential medium 2 ชนิดหลังจากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการสร้างฮิสตามีนด้วยวิธี Thin layer chromatographic assay ซึ่งผลการทดลองพบว่า เชื้อที่คัดแยกได้จากปลาทะเลที่ซึ่งให้ผลเป็นบวกเมื่อเจริญบนอาหาร differential medium ทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำมายืนยันความสามารถในการสร้างฮิสตามีนด้วยวิธี Thin layer chromatographic assay พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ให้ผลเป็น false positive เนื่องจากมีเชื้อที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้เพียง 41 ตัวเท่านั้นจากเชื้อที่คัดแยกได้จากอาหาร differential medium ทั้ง 2 ชนิดจำนวน 1,088 ตัว โดยผลที่เป็น false positive ที่เกิดขึ้นนั้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากเชื้อที่เจริญบนอาหาร differential medium ส่วนใหญ่สามารถสร้างสารประกอบ biogenic amines ชนิดอื่นที่สามารถเปลี่ยนสีของ indicator ที่อยู่ในอาหารได้จึงทำให้สีของโคโลนีมีสีเหมือนกันหรือใกล้เคียงกับสีของโคโลนีของเชื้อที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ หลังจากนั้นนำเชื้อที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้จำนวน 41 ตัวมาทดสอบความจำเพาะและความไวของ primers ที่ออกแบบ ซึ่งผลการทดลองพบว่า Hdc\_2F และ Hdc\_2R primer สามารถตรวจสอบการปรากฏของ *hdc* gene ได้ในตัวอย่างทั้ง 41 ตัวของเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาทะเลและในเชื้อมาตรฐานที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้คือ *E. aerogenes* และ *M. morganii* นอกจากนั้นเมื่อทำการทดสอบความไวของ Hdc\_2F และ Hdc\_2R primer พบว่าคู่ primers ที่ใช้ในการทดลองมีค่าไวต่อ *hdc* gene ของเชื้อ *M. morganii* มากกว่าเชื้อ *E. aerogenes* โดยพบว่าปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบการปรากฏของ *hdc* gene ได้คือ  $10^2$  CfU/mL จากตัวอย่าง cell lysates ที่ได้จากเชื้อตัวอย่างที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อและการทดสอบในสภาวะที่มีเนื้อปลาเป็นองค์ประกอบ ในขณะที่ความเข้มข้นของเชื้อ *E. aerogenes* ที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบการปรากฏของ *hdc* gene คือ  $10^5$  CfU/mL ในตัวอย่าง cell lysates ที่ได้จากเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการทดสอบในสภาวะที่มีเนื้อปลาเป็นองค์ประกอบนั้น ปริมาณเชื้อ *E. aerogenes* ที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบการปรากฏของ *hdc* gene ได้คือ  $10^6$  CfU/mL จากตัวอย่างที่เป็น genomic DNA สำหรับความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบความไวของคู่ primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของ *hdc* gene ของเชื้อ *M. morganii* และ *E. aerogenes* นั้นอาจมีผลมาจากความแตกต่างกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *hdc* gene ของเชื้อ

ทั้งสองชนิด แต่อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการสร้างฮิสตามีนของเชื้อที่ปนเปื้อนในปลาทะเลจะสามารถตรวจพบได้ก็ต่อเมื่อปลาเริ่มมีการเน่าเสียหรือมีปริมาณของเชื้อปนเปื้อนเกินกว่า  $10^7$  CfU/mL (30) ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณที่ตรวจวัดได้โดย Hdc\_2F และ Hdc\_2R ที่ใช้ในการทดลองนี้ ด้วยเหตุนี้การพัฒนาระบบตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือสำหรับใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ในปลาทะเลและผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากปลาทะเล

## บทที่ 5

### การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของตัวรับน้ำมันหอมระเหย ต่อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนที่คัดแยกได้จากปลาทะเล

#### 1. ตัวรับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ

- ตัวรับที่ 1 ตัวรับน้ำมันโหระพาความเข้มข้น 2% (w/v)  
ตัวรับที่ 2 ตัวรับน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้น 3% (w/v)  
ตัวรับที่ 3 ตัวรับน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้น 4% (w/v)  
ตัวรับที่ 4 ตัวรับน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้กับน้ำมันโหระพาในอัตราส่วน 1:1 (Mix 1:1)  
ตัวรับที่ 5 ตัวรับน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้กับน้ำมันโหระพาในอัตราส่วน 2:0.5 (Mix 2:0.5)  
ตัวรับที่ 6 ตัวรับน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้น 1% (w/v)  
ตัวรับที่ 7 ตัวรับน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้น 2% (w/v)  
ตัวรับที่ 8 ตัวรับน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้น 3% (w/v)  
ตัวรับที่ 9 ตัวรับน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้น 4% (w/v)  
ตัวรับที่ 10 ตัวรับน้ำมันโหระพาความเข้มข้น 0.5% (w/v)  
ตัวรับที่ 11 ตัวรับน้ำมันโหระพาความเข้มข้น 1% (w/v)  
ตัวรับที่ 12 ตัวรับน้ำมันโหระพาความเข้มข้น 1.5% (w/v)  
ตัวรับที่ 13 ตัวรับน้ำมันโหระพาความเข้มข้น 2% (w/v)  
ตัวรับที่ 14 ตัวรับน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้กับน้ำมันโหระพาในอัตราส่วน 1:0.5 (Mix 1:0.5)  
ตัวรับที่ 15 ตัวรับน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้กับน้ำมันโหระพาในอัตราส่วน 1:1 (Mix 1:1)  
ตัวรับที่ 16 ตัวรับน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้กับน้ำมันโหระพาในอัตราส่วน 2:0.5 (Mix 2:0.5)

โดยตัวรับน้ำมันหอมระเหยตัวรับที่ 1 ถึงตัวรับที่ 5 ใช้ polyethylene glycol (PEG) เป็นสารช่วยทำละลายในขณะที่ตัวรับที่ 6 ถึงตัวรับที่ 16 ใช้ xanthan gum เป็นสารช่วยทำละลาย

#### 2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

*Morganella morganii* ATCC 25830

*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

N30 เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ที่คัดแยกได้จากปลาฉลาม (indian mackerel)

KM134 เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนได้ที่คัดแยกได้จากปลาอินทรี (king mackerel)

### 3. การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของตำรับน้ำมันหอมระเหยต่อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง ฮิสตามีนโดยวิธี broth dilution method

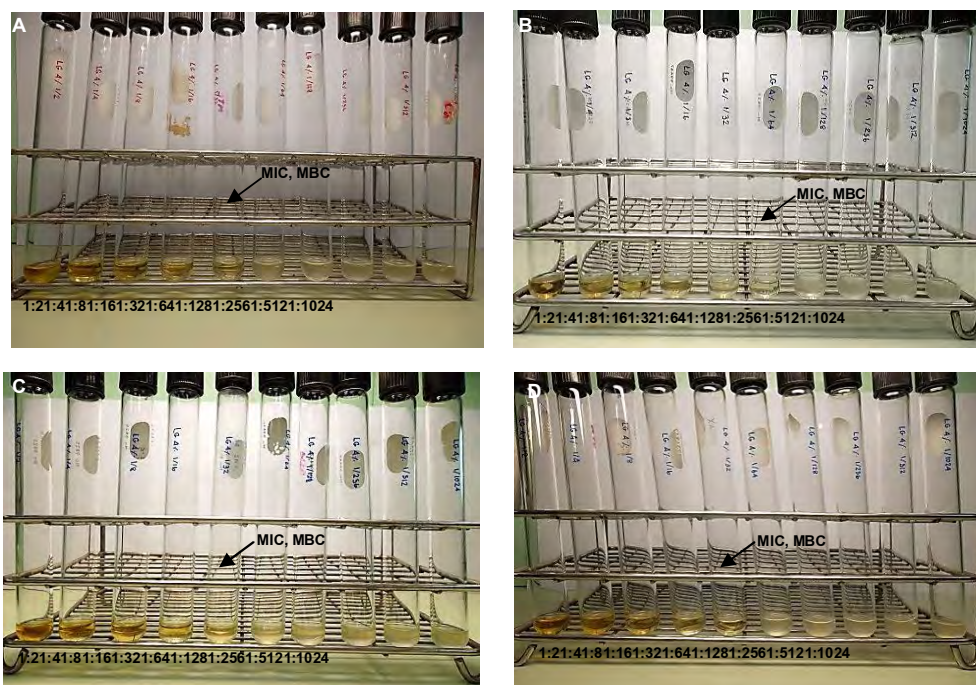
#### วิธีการทดลอง

นำเชื้อที่ใช้ในการทดสอบเพาะลงในอาหาร Muller hinton broth (MHB; Difco) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับค่าความขุ่นให้มีค่าเท่ากับ 0.5 McFarland standard และนำไปเจือจางอีก 10 เท่าใน 0.1% peptone เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นประมาณ  $10^7$  Cfu/mL นำตำรับที่ใช้ในการทดสอบนำมาเจือจางด้วยวิธี two fold serial dilution โดยกำหนดให้มีช่วงระดับความเจือจางอยู่ในช่วง 1:2 ถึง 1:1024 จากความเข้มข้นเริ่มต้นของตำรับที่ใช้ในการทดสอบ นำเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้วปริมาตร 50  $\mu$ L นำลงไปเติมลงในหลอดทดลองที่มีตำรับที่ใช้ในการทดสอบที่ทำการเจือจางแล้วโดยกำหนดให้ความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบในแต่ละหลอดมีค่าเท่ากับ  $5 \times 10^5$  Cfu/mL หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงทำการบันทึกค่า MIC (minimum inhibitory concentration) โดยดูจากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ (สารละลายใส) และทำการตรวจหาค่าความเข้มข้นที่เป็นค่า MBC (minimum bactericidal concentration) โดยเขียนเชื้อจากหลอดทดลองที่ไม่พบการเจริญของเชื้อลงบนอาหาร Muller Hinton agar (MHA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกค่า MBC โดยดูจากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง

#### ผลและสรุปผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนของตำรับน้ำมันหอมระเหยทั้ง 16 ตำรับโดยตำรับที่ 1 ถึงตำรับที่ 5 ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันโหระพา (sweet basil) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 w/v ตำรับน้ำมันตะไคร้ (lemongrass) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 4 w/v และตำรับที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้ต่อน้ำมันโหระพาตามอัตราส่วน 1 : 1 และ 2 : 0.5 ตามลำดับ ซึ่งตำรับที่ 1 ถึงตำรับที่ 5 ใช้ polyethylene glycol (PEG) เป็นตัวช่วยทำละลาย ในขณะที่ตำรับที่ 6 ถึงตำรับที่ 16 ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 w/v ตำรับน้ำมันโหระพาที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 w/v และตำรับที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้ต่อน้ำมันโหระพาตามอัตราส่วน 1 : 0.5, 1 : 1 และ 2 : 0.5 ตามลำดับ ซึ่งตำรับที่ 6 ถึงตำรับที่ 16 ใช้ xanthan gum เป็นตัวช่วยทำละลาย โดยการทดสอบครั้งนี้ใช้เชื้อทดสอบคือ *M. morganii*, *E. aerogenes* และเชื้อตัวอย่างที่คัดแยกจากปลาทะเลอีก 2 ตัว ( N30 และ KM 134) ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า ตำรับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ polyethylene glycol เป็นสารช่วยทำละลายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบได้ดีกว่าตำรับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ xanthan gum เป็นสารช่วยทำละลาย โดยพบว่าตำรับที่ 3 ที่ประกอบด้วยน้ำมันตะไคร้ร้อยละ 4 w/v ที่ใช้ polyethylene glycol เป็นสารช่วยทำละลายให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 31 โดยพบว่าค่า MIC และ MBC ที่ระดับความเจือจาง 1 : 32 เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *M. morganii*, *E. aerogenes* และ KM134 และนอกจากนั้นพบว่าที่ระดับความเจือจาง 1 : 64 เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อได้ หลังจากทำการทดสอบกับเชื้อ N30 ในส่วนของตำรับน้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วยน้ำมันโหระพา

เป็นองค์ประกอบซึ่งมีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ คือ ตำรับที่ 1 ที่ประกอบด้วยน้ำมันโหระพาร้อยละ 2 w/v โดยผลจากการทดลองพบว่าตำรับที่ 1 ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ N30 โดยมีค่า MIC และ MBC ที่ระดับความเจือจางเท่ากับ 1 : 32 ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *M. morganii*, KM134 และ *E. aerogenes* พบว่าระดับความเจือจางที่ให้ค่า MIC และ MBC คือ 1 : 16, 1 : 16 และ 1 : 8 ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันพบว่าตำรับน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันตะไคร้และน้ำมันโหระพาตำรับที่ 5 ที่มีอัตราส่วนระหว่างน้ำมันตะไคร้ต่อน้ำมันโหระพาในอัตราส่วน 2 : 0.5 มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ N30 และ KM134 โดยพบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในระดับความเจือจาง 1 : 32 และให้ค่า MIC และ MBC ที่ระดับความเจือจาง 1 : 16 เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ *M.morganii* และ *E. aerogenes* ตามลำดับ



รูปที่ 31 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีนของตำรับน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 4% (w/v) (A: *M. morganii*, B: N30, C: KM134, D: *E. aerogenes*)

ตารางที่ 16 ค่า MIC และ MBC ของตำรับน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างฮิสตามีน

ตำรับ น้ำมันหอม ระเหย	<i>M. morganii</i>		<i>E. aerogenes</i>		N30		KM134	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ตำรับที่ 1	1:16	1:16	1:8	1:8	1:32	1:32	1:16	1:16
ตำรับที่ 2	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:32	1:32
ตำรับที่ 3	1:32	1:32	1:32	1:32	1:64	1:64	1:32	1:32
ตำรับที่ 4	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:16
ตำรับที่ 5	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32	1:32	1:32
ตำรับที่ 6	1:2	1:2	>1:2	>1:2	1:4	1:2	1:2	1:2
ตำรับที่ 7	1:4	1:2	>1:2	>1:2	1:8	1:8	1:4	1:4
ตำรับที่ 8	1:4	1:4	1:2	>1:2	1:8	1:8	1:4	1:4
ตำรับที่ 9	1:8	1:8	1:2	>1:2	1:16	1:16	1:8	1:8
ตำรับที่ 10	>1:2	>1:2	>1:2	>1:2	>1:2	>1:2	>1:2	>1:2
ตำรับที่ 11	>1:2	>1:2	>1:2	>1:2	1:2	1:2	1:2	>1:2
ตำรับที่ 12	1:2	>1:2	>1:2	>1:2	1:4	1:4	1:2	>1:2
ตำรับที่ 13	1:2	>1:2	>1:2	>1:2	1:8	1:8	1:2	>1:2
ตำรับที่ 14	1:2	1:2	>1:2	>1:2	1:16	1:16	1:2	1:2
ตำรับที่ 15	1:2	1:2	1:2	>1:2	1:8	1:8	1:2	1:2
ตำรับที่ 16	1:4	1:4	1:2	>1:2	1:8	1:8	1:4	1:4



## เอกสารอ้างอิง

1. Upton HF. Seafood safety: Background and Issue. Congressional Research Service. 2010; 1-11.
2. Huss HH. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. Food Control. 1997;8(2):486-93.
3. Sumner J, Ross T. A semi-quantitative seafood risk assessment. Int J Food Microbiol. 2002;77:55-9.
4. Lipp EK, Rose JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. Rev sci tech Off int Epiz. 1997;16(2):620-60.
5. Tao Z, Sato M, Zhang H, Yamaguchi T, Nakano T. A survey of histamine content in seafood sold in markets of nine countries. Food Control. 2006;22:430-32.
6. Chong CY, Abu Bakar F, Russly AR, Jamilah B, Mahyudin NA. The effects of food processing on biogenic amines formation. Inter Food Res J. 2011;18(3):867-76.
7. ten Brink, Damink C, Joosten HMLJ, Huis in't Veld JHJ. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. Int J Food Micro. 1990;11:73-4.
8. Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Res Int. 1996;29(7):675-90.
9. Taylor SL, Stratton JE, Nordless JA. Histamine poisoning (scombroid fish poisoning) an allergy-like intoxication. Clin Toxicol. 1989;27(4&5):225-40.
10. Hungerford JM. Scombroid poisoning: A review. Toxicon. 2012;56:231-43.
11. McLauchlic J, Little, CL, Grant KA, Mithani, V. Scombrototoxic fish poisoning. J Public Health. 2006;28(1):61-2.
12. Chen HC, Kung HF, Chen WC, Lin WF, Hwang DF, Lee YC, Tsai YH. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. Food Chem. 2008;106:612-18.
13. Björnsdóttir-Butler K, Bolton GE, Jaykus LA, McClellan-Green PD, Green DP. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. Int J Food Microbiol. 2010;139:161-67.
14. Ababouch L, Afilall ME, Rhafirii S, Busta FF. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25°C). Food Microbiol. 1991;8:127-36.
15. Lehane L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited. Int J Food Microbiol. 2000;28:1-37.

16. Taylor SL. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. Crit. Rev. Toxicol. 1986;17(2):91-128.
17. Hughes JM, Horwitz MA, Merson MH, Barker WH, Gangarosa EJ. Foodborne disease outbreaks of chemical etiology in the United States, 1970-1974. Am. J. Epidemiol. 1977;105(3):233-244.
18. Lipp EK, Rose JB, The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. Rev. Sci. Technol. 1997;16(2):620-40.
19. Merson MH, Baine WB, Gangarosa EJ, Swanson RC. Scombroid fish poisoning. Outbreak traced to commercially canned tuna fish. J. Am. Med. Assoc. 1974;228(10):1268-69.
20. Todd EC, Brown DJ, Rutherford M, Grolla A, Saarkoppel H, Chan A, McGregor G, Reffle J, Ryan S, Jerrett N. Scombroid poisoning –an outbreak in two Ontario communities. Can. Commun. Dis. Rep. 1992;18(3):17-19.
21. Todd EC. Seafood-associated diseases and control in Canada. Rev. Sci. Technol. 1997;16(2):661-72.
22. Sockett PN, Food poisoning outbreak associated with manufactured foods in England and Wales. Commun. Dis. Rep. 1991;1(10):105-9.
23. Molinari G, Montagnoli G, Pellegrini G, Caroli G. [Hygiene and health importance of histamine as an unhealthy factor in several food products]. Ann. Ig. 1989;1(3-4):637-46.
24. Ponprasert B, Laoprasert P. Scombroid poisoning in children: report 2 cases. Chiang Mai Med. Bull. 1989;28:27.
25. Shultz DE, Chang GW, Bjeldanes LF. Rapid thin layer chromatographic method for the determination of histamine in fish products. J. AOAC Int. 1976;59(6):1224-25.
26. Yen G, Hsieh C. Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. J. Food Sci. 1991;56(1):158–60.
27. Niven JR CF, Jeffrey MB, Corlett JR DA. Differential Plating Medium for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria. Appl Environ Microb. 1981;41(1):321-22.
28. Yoshinaga DH, Frank HA. Histamine-producing bacteria in decomposing Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Appl. Env. Microbiol. 1982;44:447-52.
29. Takahashi H, Kimura B, Yoshikawa M, Fujii T. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine producing bacteria and their application in detection and identification of these organism on fish. Appl. Environ. Microbiol. 2003;69(5):2568-79.

30. Kung HF, Lee TM, Lin CS, Hong TY, Tsai YH. Polymerase chain reaction for the detection of histamine producing bacteria isolated from Taiwanese foods. J Food Drug Anal. 2012;20(1):74-82.

## ภาคผนวก

### ผลงานนำเสนอในการประชุมระดับนานาชาติ

1. Karn Wongsariya, Nuntavan Bunyaphrathatsara, Pongthep Wilaipun, Krit Thirapanmethee, and **Mullika T. Chomnawang**. Development of Simple and Reliable Methods for Detection of Histamine Producing Bacteria. The 7<sup>th</sup> Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences. December 14-16, 2011, Bangkok. Thailand.

### ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Karn Wongsariya, Nuntavan Bunyaphrathatsara, Vimol Srisukh, **Mullika T. Chomnawang**. Evaluation of Thai spice essential oils and their active compounds for anti-cariogenic activity and mechanism of action. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*: 2013, Accepted.
2. Karn Wongsariya, Nuntavan Bunyaphrathatsara, Vimol Srisukh, **Mullika T. Chomnawang**. Synergistic interaction and mode of action of *Citrus hystrix* DC. essential oil against bacteria causing periodontal diseases. *Pharmaceutical Biology*: Posted online on 9 Oct 2013.
3. Pattamapan Lomarat, Panida Phanthong, Karn Wongsariya, **Mullika T. Chomnawang**, Nuntavan Bunyaphrathatsara. Bioautography-guided isolation of antibacterial compounds of essential oils from Thai spices against histamine-producing bacteria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*. 2013 May; 26(3): 473-7. (ร่วมกับโครงการย่อยที่ 1)



## Proceeding

### The 7<sup>th</sup> Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences ADVANCING PHARMACY FOR ASEAN COMMUNITY



In Conjunction with  
The 2<sup>nd</sup> Universiti Kebangsaan Malaysia -  
Mahidol University Joint Scientific Conference

Organized by  
Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Thailand

in association with  
Hanoi University of Pharmacy, Vietnam  
Ha Chi Minh City University of Medicine & Pharmacy, Vietnam  
Universiti Kebangsaan Malaysia, Malaysia

December 14-16, 2011  
Amoma Hotel, Bangkok, Thailand

## Development of Simple and Reliable Methods for Detection of Histamine Producing Bacteria

Karn Wongsariya<sup>1</sup>, Nuntavan Bunyapraphatsara<sup>2</sup>, Pongthep Wilaipun<sup>3</sup>, Krit Thirapanmethee<sup>1</sup> and Mullika T. Chomnawang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Sri-ayudhya, Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup>Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Sri-ayudhya, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup>Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Ngam Wong Wan, Bangkok 10900, Thailand

**Key words:** histamine, thin layer chromatography, Tuna fish, histidine decarboxylase

### INTRODUCTION

Histamine is one of the important biogenic amines which can be isolated from fish in family of mackerel, tuna, mahimahi, and sardine. Many reports indicated that high level of histamine contamination in fish was a result of bacteria converted free amino acid, histidine to histamine, by histidine decarboxylase enzyme<sup>1-2</sup>. The results of previous studies indicated that histamine producing bacteria were not part of fish normal flora but instead represented post-catching contamination<sup>3</sup>. Varieties of bacterial species have been isolated from fish such as *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, and *Hafnia alvei*. Consumption of fish containing high amount of histamine can cause hypotension illness with a variety of symptoms including rash, urticaria, nausea, vomiting, diarrhea, flushing and itching of the skin<sup>2,4</sup>. The U.S. Food and Drug Administration established the standard program and guideline for monitoring histamine in fish product not higher than 5 mg/100 g (50 ppm)<sup>1</sup>. Therefore, the aim of present study is to develop the simple and reliable method for detection of histamine producing bacteria.

## MATERIALS AND METHODS

**Media:** Histamine forming bacterium isolation agar (BHI) was prepared from 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, 2.7% L-histidine, 0.5% NaCl, 0.1% CaCO<sub>3</sub>, 2.0% agar, and 0.006% bromocresol purple<sup>1</sup>. Histidine broth was prepared from 1% peptone, 0.3% yeast extract, 1.5% NaCl, and 0.5% L-histidine<sup>5</sup>.

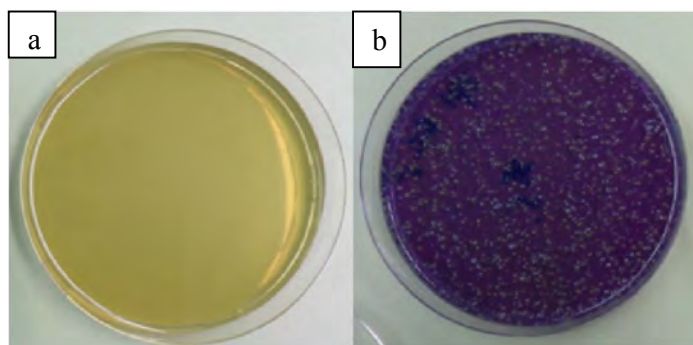
**Bacterial strains and Determination of histamine production:** Positive histamine producing bacteria, *Morganella morganii* was provided by the Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Thailand. The histamine producing bacteria were screened from fresh Tuna fish which were purchased from convenience store. HBI agar, developed by Niven and co-worker, was used for primary screening of histamine producing bacteria. All positive colonies which producing purple halo colony on HBI agar were transferred to histidine broth and further incubated at room temperature for 18 h. After that the ability of histamine production was confirmed by thin layer chromatography method. Five microliters of histidine broth were drawn for each tube and spotted on TLC plate (Silica gel 60 F254). The TLC was performed using methanol: ammonia: chloroform (20:1:1) as mobile phase. The spot of histamine was visualized after sprayed with Pauly's reagent.

**PCR assay:** Specific detection of histamine decarboxylase gene (*hdc*) was performed using specific set of primer (HDCpf: 5'-ATGGCGTATTTTGCTGAAATT-3', HDCpr: 5'-CTAAAAGCCAACTGTACGTTT-3'). PCR amplification was performed in 20  $\mu$ l reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100 (pH 8.8), 20 pmol of each primer, 0.5 mM each of four dNTPs, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase, and 10 ng of DNA template. The amplification processes were carried out 30 cycles (94°C for 1 min, 58°C for 1 min, and 72°C for 1 min). with an initial denaturation at 94°C for 4 min and a final extension at 72°C for 4 min. PCR products were analyzed on 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide and visualized under aUV at 245 nm.

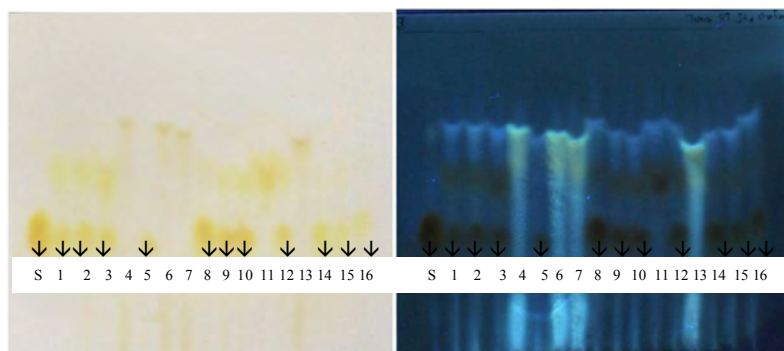
## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, histamine producing bacteria were primarily determined by differential medium based on the color change of bromocresol purple, from yellow to purple, in response to a pH change from 5.3 or higher as showed in Figure 1. The positive results observed from differential medium were further confirmed by thin layer chromatography method. The TLC results indicated that false positive could be obtained from differential medium assay since no histamine production was detected by TLC after growth in histidine broth. Nine out of seventeen isolates showed orange spots at the same level of the histamine standard after developed

and visualized with Pauly's reagent (Figure 2). Next, histidine decarboxylase gene was examined by PCR assay. Nine isolates of histamine producing bacteria showed PCR bands at the expected size approximately 709 bp. which was indifferent when compared with the standard strain (Figure 3). Our data indicated that the isolated bacteria could contain *hdc* gene which involved in histamine production.

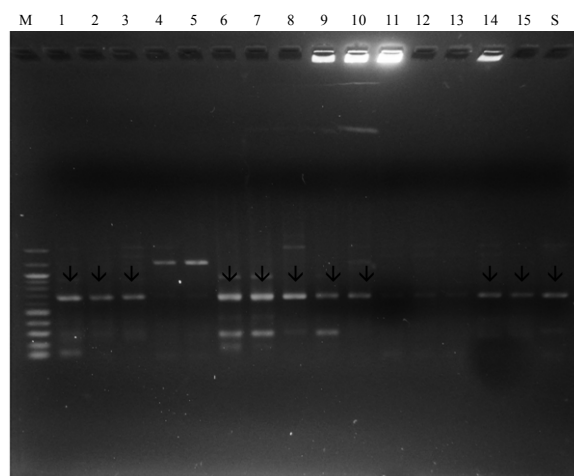


**Figure 1.** (a); Histamine forming bacterium agar (HBI), (b); HBI agar changed from yellow to purple as a result from growth of histamine forming bacteria.



**Figure 2.** The band pattern of histamine from each isolated colony. The level of histamine of each isolated was compared with histamine . Lanes: S, histamine standard, 1 tuna 49, 2 tuna 51, 3 tuna 52, 4 tuna 53, 5 tuna 54, 6 tuna 55, 7 tuna 56, 8 *M. morganii*, 9 tuna 57, 10 tuna 58, 11 tuna 59, 12 tuna 60, 13 tuna 61, 14 tuna 62, 15 tuna 63, and 16 tuna 64. The identical spots were indicated by arrow.





**Figure 3.** The band pattern of PCR products of the *hdc* gene. The PCR products was performed by comparing with reference strain (*M. morgani*). Lanes: M, 100bp ladder size marker 1 tuna 49, 2 tuna 51, 3 tuna 52, 4 tuna 53, 5 tuna 54, 6 tuna 55, 7 tuna 56, 8 tuna 57, 9 tuna 58, 10 tuna 59, 11 tuna 60, 12 tuna 61, 13 tuna 62, 14 tuna 63, 15 tuna 64, and S, *M. morgani*. The identical bands were indicated by arrow.

## CONCLUSION

This study provided the reliable method for detection of histamine producing bacteria. The HBI agar and thin layer chromatography were the appropriate procedures for primary screening of histamine producing bacteria. However, the results from HBI agar must be confirm with thin layer chromatography assay to abstain from false positive results. The presence of *hdc* gene could be confirmed by PCR. However, quantitative assay such as HPLC and ELISA may be needed to determine the amount of histamine contamination in food samples.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Co-ordinating Center for Research and Development to increase value of the Plants Indigenous of Thailand, Mahidol University and the Thailand Research Fund. The author wish to thank staffs in the department of Microbiology.

## REFERENCES

1. Tao Z, Sato M, Han Y, et al. A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination. *Food Control* 2011; 22: 1154-1157.

2. Satomi M, Furushita M, Oikawa H, et al. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. *Int J Food Microbiol* 2008; 126: 202-209.
3. Ababouch L, Afilal ME, Rhafiri S, et al. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25°C). *Food Microbiol* 1991; 8: 127-136.
4. Kung HF, Wang TY, Huang YR, et al. Isolation and identification of histamine-forming bacteria in tuna sandwiches. *Food Control* 2009; 20: 1013-1017.
5. Takahashi H, Kimura B, Yoshikawa M, et al. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organism in fish. *Appl Environ Microb*. 2003; 69(5): 2568-2579.