ผลการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดต่อ *Bacillus cereus* ในข้าวหุงสุก

นวลจันทร์ ใจใส และ สุภาพร ล้ำเลิศธน*

Inhibition Effects of Kaffir Lime's Peel Oil on *Bacillus cereus* in Cooked Rice

Nuanjun Jaisai and Supaporn Lamlertthon*

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

*Corresponding author. E-mail address: paolamlertthon@hotmail.com (S. Lamlertthon)

Received 30 April 2007; accepted 14 November 2007

The results of this paper were presented in part at The Third Naresuan University Research Conference, Phitsanulok, Thailand during 28-29 September 2007

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศเป็นสารถนอมอาหารธรรมชาติ การศึกษานี้ได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้าน *Bacillus cereus* ของน้ำมันหอมระเหย 12 ชนิด คือ น้ำมันกะเพรา น้ำมันกานพลู น้ำมันข่า น้ำมันขิง น้ำมันขมิ้นชัน น้ำมันตะไคร้ น้ำมันไพล น้ำมันพริกไทยดำ น้ำมันใบมะกรูด น้ำมันผิวมะกรูด น้ำมันโหระพา และน้ำมันลูกผักชี ผลการประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (MBC) ด้วยวิธี microbroth dilution test แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด คือ น้ำมันผิวมะกรูด และน้ำมันตะไคร้ มีฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดี มีค่า MIC เท่ากับ 2 % v/v การศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของสารผสมน้ำมันผิวมะกรูดและน้ำมันตะไคร้ พบว่า มีการต้านฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ส่วนการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อ *B. cereus* ของน้ำมันผิวมะกรูดในข้าวหุงสุก พบว่า น้ำมันผิวมะกรูดสามารถยับยั้งการเจริญ *B. cereus* ในข้าวหุงสุกได้ ทั้งที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 ^{o}C หลังจากเก็บไว้ 5 และ 15 วัน ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำมันผิวมะกรูดเพื่อเป็นสารถนอมอาหารในอาหารประเภทข้าวต่อไป

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย; ผิวมะกรูด; บาซิลลัส ซีเรียส; ข้าวหุงสุก

Abstract

This research aimed to investigate the possibility to use essential oils from spices as natural food preservatives. In this study twelve essential oils including holy basil, clove, galanga, ginger, turmeric, lemongrass, plai, black pepper, kaffir lime's leaf, kaffir lime's peel, sweet basil and coriander oils were evaluated for their inhibitory effects against *Bacillus cereus*. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) by microbroth dilution test showed that two essential oils, lemongrass and kaffir lime's peel oils, exhibited high activities on *B. cereus* giving the MICs of 2% v/v. The study of synergistic bacteriostatic effect found that the kaffir lime's peel and lemongrass oils had antagonistic effects on inhibition of *B. cereus*. Experiments in cooked rice showed that kaffir lime's peel oil was able to inhibit the growth of *B. cereus* in cooked rice at both ambient temperature and 4 ^{o}C after 5 and 15 days of storage, respectively. The results in this study suggest the possibility to use kaffir lime's peel oil as food preservative for rice products.

Keywords: Essential oil; Kaffir lime's peel; *Bacillus cereus*; Cooked rice

บทนำ

ปัญหาโรคท้องร่วงเนื่องจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ยังคงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญ ดังมีรายงานจากกองควบคุมโรคระบาด ในปี พ.ศ. 2547 ที่เก็บรวบรวมจากโรงพยาบาล 13 แห่ง พบว่าผู้ป่วยโรคท้องร่วงมียอดสูงถึง 3,262 ราย ในช่วงเพียง 3 เดือนแรกของปี (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค, 2547) และจากการสำรวจขององค์กรอนามัยโลกในปี ค.ศ. 2000 พบว่ามีประชากรกว่า 2 ล้านคนทั่วโลกเสียชีวิตด้วยโรคท้องร่วง (World Health Organization, 2002) โดยพบว่าสาเหตุหลักของโรคท้องร่วงเกิดจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียในอาหารต่าง ๆ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp.

B. cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีการสร้างสปอร์ และมีการเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและมีอากาศเพียงเล็กน้อย เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร โดยจะมีการสร้างสารพิษ และมีแหล่งสะสมและแพร่กระจายของเชื้ออยู่ในอาหารประเภทข้าว เนื้อสัตว์ต่างๆ พืชผัก และผลิตภัณฑ์นม อุบัติการณ์ระบาดของเชื้อนี้พบครั้งแรกปี ค.ศ. 1967 ในสหรัฐอเมริกา และต่อมาในปี ค.ศ. 1971 ได้พบการระบาดอีกครั้งในประเทศอังกฤษ การระบาดบ่อยครั้ง พบว่า เกิดจากอาหารประเภทที่เหลือบริโภคและนำมาอุ่นที่อุณหภูมิไม่สูงและไม่นานพอ จึงเป็นการกระตุ้นให้สปอร์ของเชื้องอกและเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นผลิตสารพิษออกมา จนเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคได้ (สุมณฑา, 2545)

ในการใช้กระบวนการถนอมอาหารบางชนิด เช่น การใช้ความร้อนกับอาหาร และการเติมสารเคมีลงไปในอาหาร สามารถที่จะช่วยลดการระบาดของอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ได้ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการต่างๆ เหล่านี้อาจมีผลกระทบต่อเนื้อสัมผัสของอาหาร หรือความต้องการของผู้บริโภค (Mareira et al., 2005) ซึ่งในปัจจุบันกระแสการบริโภคของโลกกำลังเปลี่ยนไปหาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ มีแนวโน้มการกลับมาให้ความสำคัญกับสารที่ได้จากธรรมชาติ ทั้งมีการต่อต้านการใช้สารสังเคราะห์ต่างๆ และยังมีรายงานความเป็นพิษและการแพ้สารต่างๆ ที่เติมลงไป (Burt, 2004; Konning et al., 2004) จากปัญหาดังกล่าวจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการหรือสารใหม่ๆ เพื่อลดหรือกำจัดแบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย ดังนั้น การนำสารจากธรรมชาติมาใช้ควบคุมเชื้อกลุ่มนี้น่าจะเป็นแนวทางที่ได้รับการยอมรับ

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารธรรมชาติที่มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมทั้งฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้าง (Mari et al., 2003; Mourey & Canillac, 2002; Pessoa et al., 2002; Ultee & Smid, 2001) จึงมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งที่จะนำเอาน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพรประเภทเครื่องเทศ เช่น มะกรูด โหระพา กะเพรา และข่า เป็นต้น มาใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *B. cereus* อย่างไรก็ดี แม้ว่ารายงานการศึกษาวิจัยจะเป็นที่ยอมรับกันถึงการเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย หากแต่ว่ารายงานการศึกษาประสิทธิภาพของฤทธิ์ดังกล่าว ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง และยังจำกัดอยู่ในน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ไม่พบในประเทศไทย ดังนั้น หากมีข้อมูลเพิ่มเติมในส่วนของการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในอาหารต่างๆ ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยเป็นสารกันเสียในอาหารโดยวิธีการต่างๆ เช่น การผสมลงไปในอาหาร ฉีดพ่นบนผิวผลิตภัณฑ์จำพวกเนื้อสัตว์ และฉีดพ่นบนภาชนะที่บรรจุ เป็นต้น ดังนั้น ในการศึกษานี้จึงจะทำการศึกษาฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันหอมระเหยในหลอดทดลอง รวมทั้งถึงฤทธิ์ในอาหาร เพื่อที่จะได้เป็นแนวทางไปสู่การประยุกต์ใช้ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

แบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ ได้แก่ *Bacillus cereus* (DMST 5040) เป็นสายพันธุ์มาตรฐานจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ (DMST Culture Collection)

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ

ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย จีน จำกัด, กรุงเทพฯ ซึ่งมีการควบคุมการผลิตและการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ของน้ำมันหอมระเหย โดย รศ.ดร.นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ

น้ำมันหอมระเหย	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้	องค์ประกอบหลัก
กานพลู	*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry	Clove oil	ดอก	Eugenol 98.14%
กะเพรา	*Ocimum tenuiflorum* L.	Holy basil oil	ส่วนเหนือพื้นดิน	Eugenol methyl ether 27.50% Caryophyllene 20.13%
ข่า	*Alpinia galanga* (L.) Sw.	Galanga oil	เหง้า	Eucalyptol 49.71%
ขิง	*Zingiber officinale* Roscoe	Ginger oil	เหง้า	Zingiberene 40.68% alpha-Farnesene 15.00%
ขมิ้นชัน	*Curcuma longa* L.	Turmeric oil	เหง้า	ar-Tumerone 16.13% Tumerone 37.11% Curlone 14.87%
ตะไคร้	*Cymbopogon citratus* DC. Stapf	Lemongrass oil	ส่วนเหนือพื้นดิน	alpha-Citral 45.38% 3,7-dimethyl 2,6-octadienal 34.07%
พริกไทยดำ	*Piper nigrum* L.	Black pepper oil	เมล็ด	bata-Caryophyllene 40. 82%, Limonene 19.30%
ลูกผักชี	*Corianerum sativum* L.	Coriander oil	เมล็ด	beta-Linalool 87.19%
ผิวมะกรูด	*Citrus hystrix* DC.	Kaffir lime's peel oil	ผิวผล	D-limonene 25.24% beta- Pinene 15.82% alpha-Terpieol 11.34%
ใบมะกรูด	*Citrus hystrix* DC.	Kaffir lime's leaf oil	ใบ	Citronellal 76.65%
ไพล	*Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.	Plai oil	เหง้า	Terpinen – 4 –ol 28.54% Phellanrene 31.92%
โหระพา	*Ocimum basilicum* L.	Sweet basil oil	ส่วนเหนือพื้นดิน	p-Propenyl 89.48%

การประเมินความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญและความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี microbroth dilution test

เจือจางน้ำมันหอมระเหยในช่วงความเข้มข้น 0.125-4% v/v โดยผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB ที่มี tween 80 ผสมอยู่ 0.5% v/v ลงใน 96-well microtiter plate จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 10 µl ลงในอาหารแต่ละหลุมปริมาตร 300 µl ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 6 LogCFU/ml นำไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Bossole et al., 2003) อ่านค่า MIC จากหลุมที่มีน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สังเกตไม่เห็นมีการเจริญ ด้วยการดูจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผสมเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผสม chloramphenicol (ความเข้มข้น 2-128 µg/ml) และเชื้อเป็นตัวควบคุมบวก จากนั้นตรวจหาค่า MBC โดยถ่ายเชื้อจากหลุมที่ไม่มีการเจริญลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA ที่ไม่มีน้ำมันหอมระเหยผสมอยู่ นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง MBC ประเมินได้จากการสังเกตความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อต่อไปบนอาหารแข็ง เปรียบเทียบค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยกับ ค่า MIC ของ chloramphenicol

การทดสอบการเสริมฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันหอมระเหย

นำน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ดี 2 ชนิดมาทำการตรวจสอบการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสอง ด้วยวิธี checkerboard microbroth dilution test (Collee et al., 1996) โดยทำการเจือจางน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิด ผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ ที่ความเข้มข้นมากกว่า เท่ากับ และต่ำกว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสอง (fractional inhibitory concentration, FIC) จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 10 µl ลงในอาหารเหลวแต่ละหลุม

ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 6 LogCFU/ml นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสอง ด้วยดัชนีชี้วัดที่เรียกว่า fractional inhibitory concentration index (FIC index) ซึ่งคือ การนำผลลัพธ์ของการรวมกันของค่า FIC ต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดที่แสดงผลยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ทำการแปรผลโดยพิจารณาจาก ค่า FIC index

ค่า FIC index = $FIC_A + FIC_B$

FIC = ค่าความเข้มข้นของสารผสมน้ำมันหอมระเหย A และ B ที่แสดงเป็นจำนวนเท่าของค่า MIC

FIC_A = ค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย A ในสารผสมน้ำมันหอมระเหย A และ น้ำมันหอมระเหย B

FIC_B = ค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย B ในสารผสมน้ำมันหอมระเหย B และ น้ำมันหอมระเหย A

แปลผล FIC index โดยน้อยกว่า 1 หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (synergism) เท่ากับ 1 หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างกัน (indifference) มากกว่า 1 หมายถึง มีฤทธิ์ต้านกัน (antagonism)

<u>การทดสอบฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันหอมระเหยในข้าวหุงสุก</u>

การทดสอบเริ่มจากนำข้าวหุงสุกที่เตรียมไว้มาทำการตรวจยืนยันการปนเปื้อนของเชื้อ โดยการเจือจางข้าวหุงสุกในระดับความเจือจางต่าง ๆ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เพื่อให้ทราบจำนวนเชื้อทั้งหมดที่ปนเปื้อนในข้าวหุงสุกก่อนทดสอบ จากนั้นจึงเติมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 4 ml ต่อข้าวหนัก 100 กรัม ลงในข้าวหุงสุกที่เตรียมไว้ (ชุดควบคุมไม่ต้องเติมน้ำมันหอมระเหย) ผสมให้เข้ากัน ถ่ายเชื้อ *B. cereus* ปริมาณ 3 LogCFU/g ลงในข้าวหุงสุก และแบ่งข้าวหุงสุกเป็นส่วนส่วนละ 25 กรัม บรรจุในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ติดตามผลการอยู่รอดของเชื้อ *B. cereus* ใน 2 สภาวะ คือ ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 ^{o}C ข้าวหุงสุกที่เก็บที่อุณหภูมิห้องตรวจนับปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่มีชีวิต ที่เวลา 30 นาที, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน และข้าวหุงสุกที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ตรวจนับจำนวนเชื้อที่เวลา 30 นาที, 3, 6, 9, 12 และ 15 วัน (Cox et al., 1998) ทำการติดตามผลการอยู่รอดของ *B. cereus* ในแต่ละช่วงเวลาโดยนำข้าวหุงสุก ตัวอย่างละ 1 ส่วน มาทำการเจือจาง 10 เท่า ด้วย 1% neutralised soya peptone ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีปั่นที่ความเร็วปานกลาง เป็นเวลา 2 นาที ตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อลดผลสืบเนื่อง (carryover effect) ของฤทธิ์ต้าน *B. cereus* จากน้ำมันหอมระเหย จากนั้นเจือจางลำดับขั้นครั้งละ 10 เท่า จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม นำตัวอย่างข้าวหุงสุกที่ได้มานับจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol-egg yolk-polymyxin agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนับจำนวนโคโลนี แสดงผลจำนวนโคโลนีเป็นค่า LogCFU/g และนำตัวอย่างข้าวหุงสุกไปทำให้เชื้อ *B. cereus* มีเพิ่มจำนวนมากขึ้นโดยเลี้ยงเชื้อใน enrichment medium และจากการติดตามผลวันสุดท้ายแล้ว ไม่พบว่ามีการเจริญของเชื้อ *B. cereus* เพื่อยืนยันจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

<u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

นำผลการทดลองทั้ง 2 ซ้ำ มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ independent Student t-test ด้วยโปรแกรม SPSS 11.5 for Windows

ผลการศึกษา

จากการประเมิน ค่า MIC และค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหย 12 ชนิด ได้แก่ น้ำมันกะเพรา น้ำมันกานพลู น้ำมันข่า น้ำมันขิง น้ำมันขมิ้นชัน น้ำมันตะไคร้ น้ำมันพริกไทยดำ น้ำมันไพล น้ำมันใบมะกรูด น้ำมันผิวมะกรูด น้ำมันโหระพา และน้ำมันลูกผักชี ในการออกฤทธิ์ต้าน *B. cereus* โดยวิธี microbroth dilution test พบว่า น้ำมันผิวมะกรูด

สามารถออกฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 2 % v/v และรองลงมาคือ น้ำมันตะไคร้ มีค่า MIC เท่ากับ 2 % v/v และค่า MBC > 4% v/v ส่วนน้ำมันหอมระเหยอื่น ได้แก่ น้ำมันกะเพรา น้ำมันกานพลู น้ำมันข่า น้ำมันขิง น้ำมันขมิ้นชัน น้ำมันไพล น้ำมันพริกไทยดำ น้ำมันใบมะกรูด น้ำมันโหระพา และน้ำมันลูกผักชี พบว่า ออกฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ต่ำสุด โดยมีค่า MIC และ MBC > 4% v/v (ตารางที่ 2) และเมื่อทดสอบการเสริมฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งได้เลือกน้ำมันผิวมะกรูดและน้ำมันตะไคร้มาทำการตรวจสอบ เนื่องจากมีฤทธิ์ดีในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *B. cereus* โดยวิธี checkerboard microbroth dilution test จากการตรวจสอบ พบว่า เมื่อผสมรวมกันระหว่างน้ำมันผิวมะกรูดและน้ำมันตะไคร้ มีการออกฤทธิ์ต้านการเจริญต่อ *B. cereus* ระหว่างน้ำมันหอมระเหยทั้งสอง โดยมีค่า FIC index เท่ากับ 3.5 (ตารางที่ 3) และเมื่อพิจารณาจากผลการประเมินค่า MIC และ การไม่เสริมฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันผิวมะกรูดและน้ำมันตะไคร้ จึงเลือกใช้น้ำมันผิวมะกรูดทำการทดสอบในข้าวหุงสุก เนื่องจากการออกฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดี และการยอมรับในเรื่องของกลิ่นรสอาหาร โดยผสมน้ำมันผิวมะกรูดในข้าวหุงสุก ผลการออกฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันผิวมะกรูดที่ความเข้มข้น 4% v/w ในข้าวหุงสุกที่อุณหภูมิห้องดังแสดงในตารางที่ 4 จะเห็นว่า จำนวน *B. cereus* ที่ตรวจพบในข้าวหุงสุกในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีความแตกต่างกันในทุกวันที่สุ่มตัวอย่าง โดย *B. cereus* ที่ตรวจพบในชุดทดสอบมีจำนวนน้อยกว่าชุดควบคุม และในวันที่ 4 ชุดทดสอบมีจำนวนเชื้อเพียง 2 LogCFU/g เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีจำนวนถึง 14.41 LogCFU/g จากเชื้อเริ่มต้นใน 30 นาทีแรก 2.66 และ 3.72 LogCFU/g ตามลำดับ จำนวนเชื้อ *B. cereus* ในชุดควบคุมต่างจากชุดทดสอบโดยเฉลี่ย 12 LogCFU/g ในวันที่ 5 ของการทดสอบ ดังนั้น ข้อมูลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิห้อง น้ำมันผิวมะกรูดสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ดี ส่วนที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมและชุดทดสอบมีความแตกต่างกันเล็กน้อย คือ แตกต่างกันสูงสุดประมาณ 1 LogCFU/g และภายหลัง 15 วัน เชื้อ *B. cereus* ที่ตรวจพบในชุดควบคุมและชุดทดสอบมีจำนวนใกล้เคียงกัน คือ 2.30 และ 2 LogCFU/g ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง *B. cereus* (MICs) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า *B. cereus* (MBCs) ของน้ำมันหอมระเหย (% v/v) ทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution test

น้ำมันหอมระเหย	MIC/MBC (% v/v)	
	MIC	MBC
กะเพรา	>4	>4
กานพลู	>4	>4
ข่า	>4	>4
ขิง	>4	>4
ขมิ้นชัน	>4	>4
ตะไคร้	2	>4
ไพล	>4	>4
พริกไทยดำ	>4	>4
ใบมะกรูด	>4	>4
ผิวมะกรูด	2	2
โหระพา	>4	>4
ลูกผักชี	>4	>4
Chloramphenicol (μg/ml)	32	32

ตารางที่ 3 การตรวจสอบการเสริมฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี checkerboard microbroth test

น้ำมันหอมระเหย	ฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของการผสมน้ำมันหอมระเหย				
	MIC เดี่ยว (%v/v)	MIC สารผสม (%v/v)	FIC	FIC index [a]	ผลการออกฤทธิ์รวมกัน
น้ำมันตะไคร้	2	4	2	3.50	ต้านฤทธิ์กัน
น้ำมันผิวมะกรูด	2	3	1.5		

[a]FIC index: น้อยกว่า 1 หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน
เท่ากับ 1 หมายถึง ไม่แตกต่างกัน
มากกว่า 1 หมายถึง มีฤทธิ์ต้านกัน

ตารางที่ 4 จำนวน *B. cereus* ที่ตรวจพบในข้าวหุงสุกใส่น้ำมันผิวมะกรูดความเข้มข้น 4 มิลลิลิตร ต่อข้าวหนัก 100 กรัม (ชุดทดสอบ) และไม่ใส่น้ำมันผิวมะกรูด (ชุดควบคุม) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 ^{o}C

ระยะเวลาในการเก็บรักษา (นาที/วัน)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในข้าวหุงสุก (LogCFU/g)±SD	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
อุณหภูมิห้อง		
30 นาที	3.73 ± 0.01	2.66 ± 0.26*
1 วัน	8.64 ± 0.93	2.30 ± 0.42*
2 วัน	14.72 ± 0.03	2.71 ± 0.57*
3 วัน	14.37 ± 0.52	2.15 ± 0.21*
4 วัน	14.41 ± 0.47	2.00 ± 0.00*
5 วัน	14.11 ± 0.52	2.80 ± 0.71*
อุณหภูมิ 4 °C		
30 นาที	3.74 ± 0.07	2.47 ± 0.67*
1 วัน	3.49 ± 0.11	2.39 ± 0.13*
3 วัน	3.04 ± 0.26	2.35 ± 0.49
6 วัน	2.83 ± 0.18	2.15 ± 0.21
12 วัน	2.15 ± 0.21	2.24 ± 0.34
15 วัน	2.30 ± 0.42	2.00 ± 0.00

[a]ปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยเฉลี่ยที่เวลา 0 เท่ากับ 3.78±0.03 LogCFU/g
[b]ค่าเฉลี่ยจาก 2 ชุดทดสอบ ชุดทดสอบละ 2 ซ้ำ
*ค่าเฉลี่ยของชุดควบคุมและชุดทดสอบที่ระยะเวลาเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

อภิปรายผลการศึกษา

ประเมินความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญและความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี microbroth dilution test

เมื่อประเมิน ค่า MIC และค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหยทดสอบ โดยเจือจางน้ำมันหอมระเหยในช่วงความเข้มข้น 0.125-4% v/v ด้วยวิธี microbroth dilution test ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำมันผิวมะกรูดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 2% v/v องค์ประกอบที่พบในน้ำมันผิวมะกรูดเป็นส่วนมาก ได้แก่ limonene (25.24%) และ beta-pinene (15.82%) และยังมีองค์ประกอบย่อย เช่น terpinen-4-ol (9.57%) และ isopulegol (2.24%) (ตารางที่ 1) การที่น้ำมันผิวมะกรูดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* นั้น เนื่องจากมีสาร limonene, beta-pinene, terpinen-4-ol และ isopulegol อยู่ด้วย (บัญญัติ, 2527) Doman & Deans (2000) ได้รายงานว่า limonene สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ส่วน alpha-pinene สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ต่างจาก beta-pinene และ terpinen-4-ol ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเทียบกับน้ำมันใบมะกรูดซึ่งองค์ประกอบ

ที่พบส่วนมาก คือ citronellal (76.65%) (ตารางที่ 1) ซึ่งเคยมีรายงานว่า citronellal เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำที่ความเข้มข้น 0.1% v/v จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* สายพันธุ์ Scott A ได้ ทั้งนี้องค์ประกอบย่อยที่พบในน้ำมันใบมะกรูด และมีรายงานการถึงความสามารถในการต้านแบคทีเรียได้มีเพียง isopulegol และ linalool เท่านั้น จากข้อมูลนี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำมันใบมะกรูดมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ได้น้อยกว่า หรือ อาจเป็นเพราะน้ำมันผิวมะกรูดมีองค์ประกอบต่างๆ หลายชนิดมากกว่า และอาจเกิดการเสริมฤทธิ์ระหว่างองค์ประกอบย่อยต่างๆ รวมทั้งองค์ประกอบต่างๆ ที่พบในน้ำมันผิวมะกรูด เช่น limonene, beta-pinene และ alpha-terpinene สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ดี

ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์รองลงมา ได้แก่ น้ำมันตะไคร้ มีค่า MIC เท่ากับ 2% v/v และค่า MBC >4% v/v การที่น้ำมันตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ B. cereus ได้ดีที่สุด มีค่า MIC และค่า MBC เท่ากับ 2% v/v เนื่องจากน้ำมันตะไคร้มี citral (45.38 %) เป็นองค์ประกอบหลัก (ตารางที่ 1) ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยการศึกษาต่างๆ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกับ *B. cereus* ได้ดี โดยมีรายงานว่า citral ความเข้มข้น 0.05% w/v สามารถต้าน *L. monocytogenes* Scott A ได้ (Delaquis et al., 2002) สอดคล้องกับการศึกษาโดย Oussalah et al. (2007) ที่ระบุว่า ค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น MIC 0.1-0.6% v/v สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* O 0157:H7 และ *S. typhi* ที่มีค่า MIC มากกว่า 0.8% v/v โดยเฉพาะสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 0.1% v/v และจากรายงานของ Wilkinson et al. (2003) ในการศึกษาฤทธิ์ของ citral พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีสุดต่อ *S. aureus* เช่นกัน นอกจากนี้ Hammer et al. (1999) ยังได้รายงานว่า น้ำมันตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ โดยเฉพาะสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC และค่า MBC เท่ากับ 0.06% v/v

<u>การทดสอบการเสริมฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันหอมระเหย</u>

การศึกษาในส่วนนี้ได้เลือกน้ำมันผิวมะกรูดและน้ำมันตะไคร้ที่มีฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดี โดยมีค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองเท่ากับ 2% v/v (ตารางที่ 2) ทำการทดสอบโดยวิธี checkerboard microbroth dilution test พบว่า น้ำมันผิวมะกรูดและน้ำมันตะไคร้แสดงการออกฤทธิ์ต้านในการยับยั้งการเจริญ *B. cereus* มีค่า FIC index เท่ากับ 3.5 จากการศึกษาของ Sandri et al. (2007) ได้รายงานไว้ว่า พืชวงศ์ Lamiaceae ได้แก่ *Cunila galioides* ที่มี citral เป็นองค์ประกอบหลัก 77.9% จากการตรวจสอบด้วยวิธี microdilution broth test มีฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดีกว่า *C. galioides* ที่องค์ประกอบหลักเป็น mentha-trans-2,8-dienol 20% และ limonene 13.6% ค่า MIC ที่ได้คือ 0.04% และ 1.25% v/v ตามลำดับ ดังนั้น แสดงให้เห็นว่า citral น่าจะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการออกฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดีกว่า limonene และในการทดสอบครั้งนี้ปริมาณน้ำมันผิวมะกรูดและน้ำมันตะไคร้ที่ใช้ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อนำมาใช้ในรูปผสมอาจทำให้องค์ประกอบหลัก limonene และ citral ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองมีความเข้มข้นลดลง ทำให้ฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองลดลงตามไปด้วย และก่อนหน้านี้มีการศึกษาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ขององค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยและสารต้านแบคทีเรียอื่น ดังเช่น Yamazaki et al. (2004) ได้รายงานการเสริมฤทธิ์ระหว่าง nisin และ diglycerol fatty acid ester ร่วมกับ carvacrol, thymol และ eugenol ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* โดยแสดงการเสริมฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อมีการใช้ nisin, diglycerol fatty acid ester และ carvacrol ร่วมกัน

<u>การทดสอบฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันผิวมะกรูดในข้าวหุงสุก</u>

สำหรับผลการออกฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ของน้ำมันผิวมะกรูดในข้าวหุงสุก จะเห็นว่าปริมาณ *B. cereus* ที่ตรวจพบในข้าวหุงสุกชุดทดสอบและชุดควบคุมที่อุณหภูมิห้อง มีความแตกต่างกันในทุกวันที่สุ่มตัวอย่าง โดย *B. cereus* ที่ตรวจพบในชุดทดสอบมีจำนวนน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเฉลี่ย 12 LogCFU/g ในวันที่ 5 ของการทดสอบ จากเชื้อเริ่มต้นใน 30 นาทีแรก 2.66 และ 3.72 LogCFU/g ตามลำดับ ดังนั้น ข้อมูลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิห้องน้ำมันผิวมะกรูดสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในข้าวหุงสุกได้ดี

ทั้งนี้อาจเนื่องจากส่วนประกอบส่วนใหญ่ของข้าวเป็นคาร์โบไฮเดรต โดยจากรายงานพบว่า ข้าวโดยเฉลี่ยมีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 53-80.4% มีไขมัน และโปรตีนประมาณ 3-5% และ 2-5% ตามลำดับ (ณรงค์, 2538) ซึ่งจากรายงานก่อนหน้า พบว่า อาหารพวกคาร์โบไฮเดรตไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับอาหารประเภทไขมันและโปรตีน เช่น น้ำมันเสจ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, *Pseudomonas* spp. และ *S. typhimurium* ในข้าวได้ดีกว่าในไก่ โดยมีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 0.4% และ มากกว่าหรือเท่ากับ 1% ตามลำดับ และยับยั้งการเจริญของเชื้อได้บ้าง หรือ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้เลยในอาหารประเภทเนื้อ (Shelef et al., 1984) ดังนั้น จึงทำให้น้ำมันผิวมะกรูดยังคงสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีในการทดสอบในข้าวหุงสุก และที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เชื้อ *B. cereus* มีการเพิ่มจำนวนขึ้นในช่วงแรก ๆ จากนั้นค่อย ๆ ลดจำนวนลง โดยภายหลัง 15 วัน เชื้อ *B. cereus* ที่ตรวจพบในชุดทดสอบและชุดควบคุมมีจำนวนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) คือ 2 และ 2.30 LogCFU/g ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิที่ 4 ^{o}C น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดมีผลทำให้เชื้อชุดควบคุม มีจำนวนลดลงอย่างช้า ๆ ดังนั้น ที่เวลาเพียง 15 วัน จึงยังคงไม่เห็นฤทธิ์ของน้ำมันผิวมะกรูดในการยับยั้ง *B. cereus* อาจต้องใช้ระยะเวลาในการทดสอบที่นานกว่านี้เพื่อเห็นผลที่ชัดเจนขึ้น

สรุปผลการศึกษา

จากการประเมินค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี microbroth dilution test น้ำมันตะไคร้และน้ำมันผิวมะกรูดสามารถออกฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดี และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยทั้งสองไปผสมรวมกันเพื่อทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *B. cereus* พบว่า เกิดการต้านฤทธิ์กันระหว่างสารผสมของน้ำมันตะไคร้และน้ำมันผิวมะกรูด ดังนั้น การทดสอบในอาหารจึงเลือกใช้น้ำมันผิวมะกรูดผสมกับข้าวหุงสุกเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* เมื่อเก็บไว้อุณหภูมิห้อง ภายหลัง 5 วัน จำนวนเชื้อ *B. cereus* ในชุดควบคุมและชุดทดสอบแตกต่างกันมากกว่า 12 LogCFU/g และการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C จำนวนเชื้อในชุดควบคุมมีการเจริญได้อย่างช้า ๆ ภายหลัง 15 วัน เชื้อ *B. cereus* ในชุดควบคุมและชุดทดสอบ มีจำนวนใกล้เคียงกัน คือ 2.30 และ 2 LogCFU/g ตามลำดับ ดังนั้น น้ำมันผิวมะกรูดสามารถออกฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ได้ดีทั้งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 ^{o}C ทั้งนี้ การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ควรต้องใช้ระยะเวลาในการทดสอบที่นานกว่านี้ เพื่อเห็นผลการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ของน้ำมันผิวมะกรูดที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย จีน จำกัด, กรุงเทพฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดลอง และ รศ.ดร.นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ทำการควบคุมการผลิต และการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำมันหอมระเหย

เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ นิยมวิทย์. (2538). *องค์ประกอบและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของอาหาร*. กรุงเทพฯ: ฟอร์แมทพริ้นติ้ง.

บัญญัติ สุขศรีงาม. (2527). *เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร* (เล่มที่ 1). กรุงเทพฯ: อมรการพิมพ์.

ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. (4 มีนาคม 2547). *โรคห้องร่วงมาพร้อมกับหน้าร้อน*. สืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2548. จาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_3_002c.asp?info_id=785

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

Bassole, I. H. N., Ouattara, A. S., Nebie, R., Ouattaraa, C. A. T., Kabore, Z. I., & Traore, S. A. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oil of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*, *62*, 209-212.

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*, 223-253.

Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmion, B. P., & Simmons, A. (Eds.). (1996). Practical medical microbiology (14^{th} ed.). New York: Churchill Livingstone.

Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, *74*, 101-109.

Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, *88*, 308-316.

Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, *86*, 985-990.

Konning, G. H., Agyare, C., & Ennison, B. (2004). Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. *Fitoterapia*, *75*, 65-67.

Mari, M., Bertolini, P., & Pratella, G. C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*, *94*, 761-766.

Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, *38*, 565-570.

Mourey, A., & Canillac, N. (2002). Anti-*Listeria* monocytogenes activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, *13*, 289-292.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, *18*, 414-420.

Pessoa, L. M., Morais, S. M. Bevilaqua, C. M. L., & Luciano, J. H. S. (2002). Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, *109*, 59-63.

Sandri, I. G. Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare A. P. L., & Echeverrigaray, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*, *103*, 823-882.

Shelef, L. A., Jyothi, E. K., & Bulgarellii, M. A. (1984). Growth of Enteropathogenic and Spoilage Bacteria in Sage-Containing Broth and Foods. *Journal of Food Science*, *49*, 737-740.

Ultee, A., & Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, *64*, 373-378.

Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., & Cavanagh, H. M. A. (2003). Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 76-81.

World Health Organization. (January, 2002). Food safety and foodborne illness. Retrieved on September 20, 2005, from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html

Yamazaki, K., Yamamoto, T., Kawai, Y., & Inoue, N. (2004). Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiology*, *21*, 283-289.