

## การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ของ *Brevibacillus laterosporus* SA 14 ในน้ำเกลือที่ผสมเอนไซม์อะไมเลส

ดร.ณิ ชันวิริยะกุล<sup>1</sup>, เบญจมาศ บุญส่งเสริม<sup>1</sup>, รัตนากรณ์ กิมาคม<sup>1</sup>, มณฑล เลิศคนาวณิชกุล<sup>2\*</sup>

### บทคัดย่อ

เพื่อศึกษาฤทธิ์ปฏิชีวนะของชีวสารที่ผลิตจากแบคทีเรียอันอาจนำไปใช้เป็นสารต้นแบบในการผลิตสารต้านจุลชีพ จึงได้นำแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14 ที่แยกได้จากอากาศ มาทดสอบฤทธิ์ดังกล่าว พบว่าการเตรียมชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ให้ได้ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA 14 ที่บ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วันด้วย 50 % แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ปฏิชีวนะต้านแบคทีเรียดัชนีแกรมบวก (*Staphylococcus aureus*, *Viridans group*) แบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) รวมถึงเชื้อรา (*Candida albicans*) เมื่อนำไปทดสอบโดยวิธีการซึมแพร่ผ่านของสารเข้าเนื้อวุ้น แต่ฤทธิ์ดังกล่าวจะลดลงเมื่อผสมรวมกับเอนไซม์อะไมเลส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ยับยั้งเม็ดเลือดแดงจากชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ทั้งที่ผสมหรือไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส อย่างไรก็ตามเมื่อเจือจางชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ให้ได้ไทดเตอร์ที่สูงกว่า 1:8 พบว่าฤทธิ์ยับยั้งเม็ดเลือดแดงดังกล่าวจะหายไปแต่คงเหลือเฉพาะฤทธิ์ปฏิชีวนะ เมื่อทดสอบโดยวิธีการซึมแพร่ผ่านของสารเข้าเนื้อวุ้น และพบว่าชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ยังสามารถทำลายจุลินทรีย์ในน้ำลายได้เมื่อเจือจางถึงไทดเตอร์ 1:128 เมื่อทดสอบด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว จึงอาจศึกษาถึงการนำชีวสารกึ่งบริสุทธิ์มาใช้เป็นสารต้นแบบในการผลิตน้ำยาบ้วนปากชนิดไร้แอลกอฮอล์ต่อไป

**คำสำคัญ:** ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, ชีวสาร, *Brevibacillus laterosporus*

<sup>1</sup>นักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์

<sup>2</sup>สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

\*ผู้รับผิดชอบบทความ

## Antimicrobial activity of partially purified bio-compounds of *Brevibacillus laterosporus* SA14 in saline with added amylase

Darunee Chanwiriya<sup>1</sup>, Benjamas Bunsongserm<sup>1</sup>, Ratanaporn Kimakom<sup>1</sup>, Monthon Lertcanawanichakul<sup>2\*</sup>

### Abstract

To study antimicrobial activity of biocompounds produced from bacteria which may lead to development of a model for antimicrobial substances production, *Brevibacillus laterosporus* SA14, isolated from air sample was studied. The partially purified biocompounds (PPBs) were prepared from 600 ml Luria Bertani culture broth of 2 day *Brev. laterosporus* SA 14 by means of 50 % ammonium sulfate precipitation. The PPBs could inhibit the growth of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Viridans group*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* & *Pseudomonas aeruginosa*) and yeast-like fungi (*Candida albicans*). The antimicrobial activity was decreased when incubated with 1 mg/ml amylase for 5 hours at 37 °C. Moreover, the PPBs could show hemolytic activity which was disappeared at a titer higher than 1:8, but still had the antimicrobial activity when tested with agar well diffusion. Interestingly, PPBs at a titer 1:128 could inhibit the growth of microorganisms in saliva when tested with microbroth dilution. It is therefore interesting to conduct further study on the application of this PPBs in production of alcohol free mouthwash.

**Keywords:** Antibacterial activity, Biocompound, *Brevibacillus laterosporus*

---

<sup>1</sup>Undergraduate Medical Technology students, School of Allied Health Sciences and Public Health

<sup>2</sup>Division of Medical Technology, School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80161

\* Corresponding author (e-mail: lmonthon@wu.ac.th)

## บทนำ

ปัจจุบันโรคติดเชื้อมีการแพร่ระบาดมากขึ้นประกอบกับการนำยาต้านจุลชีพมาใช้รักษาโรคติดเชื้ออย่างไม่ถูกต้องทำให้เกิดภาวะวิกฤตของการดื้อยา<sup>(1,2)</sup> จึงได้มีความพยายามค้นหาสิ่งมีชีวิตจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อนำมาใช้ทดแทนยาต้านจุลชีพในการป้องกันการดื้อยาของเชื้อก่อโรคติดเชื้อและหนึ่งในสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นก็คือจุลินทรีย์โดยพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มีตั้งแต่แอคติโนมัยซีท แบคทีเรีย และรา<sup>(3)</sup>

*Bacillus species* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสร้างสปอร์ ซึ่งถูกนำมาศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะอย่างกว้างขวาง<sup>(4)</sup> โดยพบว่ามี *Bacillus* หลายชนิดที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อโรคได้ ดังที่เคยได้มีรายงานในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่สามารถแยกเชื้อ *Brevibacillus laterosporus* SA 14 (เดิมเรียก *Bacillus laterosporus*)<sup>(5)</sup> ที่ผลิตสารปฏิชีวนะทำลายจุลินทรีย์อื่นๆ รวมถึงแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะคือ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* และ *methicilin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยสารปฏิชีวนะ (ชีวสาร) ที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นโปรตีนที่มีขนาด 116.25 กิโลดาลตัน แสดงฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียและฤทธิ์จะลดลงเมื่อผสมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ย่อยไขมัน<sup>(6,7)</sup> รวมถึงฤทธิ์ของชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA 14 จะลดลงเมื่อผสมกับเอนไซม์อะไมเลส นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ย่อยเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (beta-hemolysis) ควบคู่กับฤทธิ์ปฏิชีวนะดังกล่าว หากนำตัวเชื้อมาใช้โดยตรงกับมนุษย์อาจทำให้เกิดอันตรายได้ ดังนั้นจึงได้พยายามหลีกเลี่ยงการนำเอาเชื้อที่มีชีวิตมาใช้โดยตรงกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูงโดยเฉพาะในมนุษย์ จึงได้พยายามศึกษาหาวิธีการลดการย่อยเม็ดเลือดแดงดังกล่าวเพื่อนำเอาสารปฏิชีวนะมาใช้ประโยชน์และลดอันตรายที่อาจจะเกิดขึ้นมาจากฤทธิ์ beta-hemolysis โดยการเตรียมให้อยู่ในรูปแบบของชีวสารกึ่งบริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ SA 14 เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ในการพัฒนาสารปฏิชีวนะดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เป็นน้ำยาบ้วนปากที่ปราศจากแอลกอฮอล์ โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้งานและอาจเป็นประโยชน์ต่อผู้ติดเชื้อเอชไอวี ที่มีปัญหาการ

ติดเชื้อราในช่องปากและมีการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างมากมาย โดยอาจช่วยลดปริมาณการใช้ยาต้านจุลชีพและอาจช่วยลดปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพของจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อประโยชน์ในการป้องกันและ/หรือรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไปในอนาคต

## วัสดุและวิธีการศึกษา

### 1. เชื้อทดสอบ (test strains)

แบคทีเรียทดสอบ *Brevibacillus laterosporus* SA14 แยกได้จากอากาศภายในมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช<sup>(6, 8)</sup>

แบคทีเรียดัชนีและราดัชนี ซื้อมาจากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research: TISTR) ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* TISTR 517 และแบคทีเรียกลุ่ม viridans (*Streptococcus* sp.: clinical isolate แบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* TISTR 887 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781) รายีสต์ (*Candida albicans* TISTR 5779) และจุลินทรีย์ในน้ำลายจากอาสาสมัคร

จุลินทรีย์ดัชนีทุกชนิดนำไปทดสอบดูการถูกยับยั้งการเจริญด้วยชีวสารกึ่งบริสุทธิ์ (PPBs) โดยวิธีการซึมผ่านของสารเข้าเนื้อวุ้น (agar well diffusion) และใช้จุลินทรีย์ในน้ำลายเป็นตัวแทนนำไปทดสอบดูการถูกยับยั้งการเจริญด้วย PPBs โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (microbroth dilution)

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เลขที่โครงการ/รหัส 51/004

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อซื้อจาก Difco (Detroit, MI), Merck (Darmstadt, Germany), Hi-media (Mumbai, India) และ Scharlau (Barcelona, Spain) ได้แก่ nutrient agar/broth, Mueller-Hinton (MH), Luria Bertani (LB), sabouraud dextrose (SD), blood agar base, plate count agar (PCA)

### 3. สารเคมี

ชุดสีย้อม ได้แก่ crystal violet, iodine, 95% alcohol, safranin และ malachite green สารเคมีสำหรับ

การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford<sup>(9)</sup> ได้แก่ bovine serum albumin (Fluka, WI, USA) และ dye reagent concentrate (Biorad, CA, USA) สารเคมีอื่นๆ ได้แก่ อะไมเลส (amylase: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), McFarland standard No. 0.5 (Biomérieux, SA Marcy-l'Etoile, France), กลีเซอรอล (Merck, Darmstadt, Germany), แอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ (RCI Lab Scan, Bangkok, Thailand), น้ำยาบ้วนปากลิสเตอริน

#### 4. การทดสอบยืนยันกลุ่มเชื้อ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียดัชนี ราดซ์นี และแบคทีเรียทดสอบ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SD สำหรับแบคทีเรียและรา ตามลำดับ ตรวจสอบลักษณะโคโลนี และรูปร่างของกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์<sup>(10,11)</sup> จากนั้นแยกแบ่งเก็บจุลินทรีย์ใน 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อร่อนนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

#### 5. การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SA14

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียสายพันธุ์ SA14 จำนวน 5 โคโลนี มาแยกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร จำนวน 5 หลอด บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ ใน shaking incubator ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อของแต่ละหลอดมาเปรียบเทียบความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland No.0.5 แล้วนำมาปริมาณ 2 มิลลิลิตร แยกไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด จากนั้นนำขวดทั้งหมดไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ ใน shaking incubator ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที แยกเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปเตรียม PPBs

#### 6. การเตรียม PPBs

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ในขั้นตอนก่อนหน้านี้ มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีปริมาณเท่ากับ 50 % ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตครั้งละเล็กน้อย และกวนปั่นสารจนกระทั่งละลายจนหมดและปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกวนปั่นเบาๆ ตลอดคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นแยกแบบ

ควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แยกเก็บตะกอนและละลายตะกอนด้วยน้ำเกลือ 0.85 % NaCl ปริมาตร 3-4 มิลลิลิตร หรือจนตะกอนละลายหมด

นำสารละลาย PPBs ไปกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตส่วนเกินโดยนำไปทำไดอะไลซิสในถุงไดอะไลซิสที่มีรูผ่านขนาด 3.5 กิโลดาลตัน ที่แช่ในภาชนะบรรจุ 0.85 % NaCl จนท่วมถุง dialysis และกวนปั่นเบาๆ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาส่วนที่ไม่ละลายออกไปด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดปริมาณโปรตีนของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Bradford<sup>(9)</sup> โดยใช้ BSA เป็นสารมาตรฐานและแยกเก็บสารละลาย PPBs ในหลอดทดลองและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°ซ เพื่อร่อนนำไปศึกษาคุณสมบัติของ PPBs ในการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดัชนีด้วยวิธี agar well diffusion และ/หรือ microbroth dilution

#### 7. การศึกษาผลของเอนไซม์อะไมเลสต่อ PPBs

ผสม PPBs กับ เอนไซม์อะไมเลส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง<sup>(12)</sup> จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ของ PPBs ด้วยวิธี agar well diffusion และ/หรือ microbroth dilution เปรียบเทียบกับ PPBs ที่ไม่ได้ผสมเอนไซม์อะไมเลสและน้ำยาบ้วนปากลิสเตอริน ตามลำดับ

#### 8. การศึกษาฤทธิ์ของ PPBs ในการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

##### 8.1 วิธี agar well diffusion

แยกเตรียมสารแขวนลอยจุลินทรีย์ดัชนีจากโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA หรือ SD ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 แล้วนำไปป้ายให้ทั่วพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง จากนั้นเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นหลุมด้วยทูปขนาด 1,000 ไมโครลิตรด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ แยกหยอด PPBs ที่ผ่านการทำเจือจางสองเท่า ลงในหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว หลุมละปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนน้ำเลี้ยงเชื้อซึมผ่านเข้าเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อจนหมด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตวงใสรอบหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลในหน่วย arbitrary unit ต่อ มิลลิลิตร(AU/ml)<sup>(13)</sup> โดยใช้สูตร AU/ml = (1,000/d)D

เมื่อ D แทน ค่าเจือจางต่ำสุดที่ทำให้ผลการยับยั้งเชื้อ และ d แทนปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำเหมือนเดิมแต่เปลี่ยนมาใช้ PPBs ที่ผสมเอนไซม์อะไมเลส

## 8.2 โดยวิธี micro broth dilution

ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำลาย โดยนำตัวอย่างน้ำลายจากอาสาสมัครมาทำเจือจาง 10 เท่าด้วย 0.85 % NaCl แล้วตรวจวัดปริมาณเชื้อทั้งหมดด้วยเทคนิคกระจายเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PCA จากนั้นเตรียมน้ำลายให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อร่อนนำไปผสมกับ PPBs ที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส หรือน้ำยาบ้วนปากกลิสเตอร์ริน (เรียกว่าสารทดสอบ)

ดูอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ใส่ลงในหลุมที่ 2-10 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นดูสารทดสอบแยกใส่ลงในหลุมที่ 1 และ หลุมที่ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วผสมสารทดสอบให้เข้ากันในหลุมที่ 2 ดูสารละลายหลุมที่ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปใส่ในหลุมที่ 3 และทำเช่นเดียวกันจนถึงหลุมที่ 9 ให้ดูสารผสมทิ้งไป 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำลายที่ผ่านการทำเจือจางแล้วในขั้นตอนใส่ลงในทุกหลุม ละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) โดยดูหลุมทดสอบสุดท้ายที่ใส และบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำ

สุดในการทำลายจุลินทรีย์ (Minimum Lethal Concentration: MLC) โดยนับจำนวนโคโลนีไม่เกิน 5 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อเมื่อทดสอบโดยวิธีกระจายเชื้อ

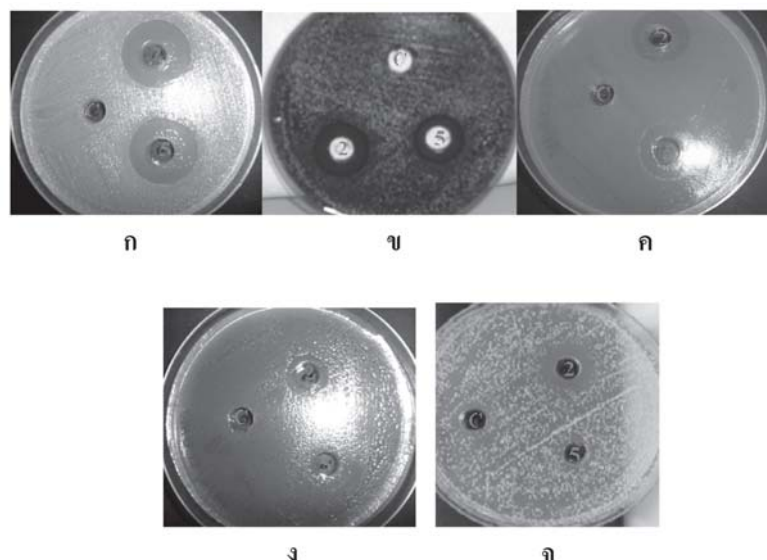
## 9. การศึกษาฤทธิ์ของ PPBs ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

เจือจาง PPBs ทั้งที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลสแบบสองเท่าแล้วนำไปหยอดลงในหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมเลือด (blood agar: BA) เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี agar well diffusion บันทึกผลการย่อยเม็ดเลือดแดงรอบหลุมทดสอบ

## ผลการศึกษา

### 1. การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดัชนี

แบคทีเรียสายพันธุ์ SA14 ที่ถูกแยกเลี้ยงไว้จำนวน 5 ขวด ตามสภาวะที่ระบุไว้ข้างต้น พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกออกมาได้จากขวดเลี้ยงแบคทีเรีย SA14 ในขวดที่ 2 และ 5 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดัชนี ยกเว้น *Ps. aeruginosa* TISTR 781 และราดัชนี *C. albicans* TISTR 5779 แต่เมื่อนำไปเตรียมให้อยู่ในรูป PPBs ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50 % ของน้ำเลี้ยงเชื้อพบว่า PPBs แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดัชนีได้ทุกชนิด โดยมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1.86 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดัชนีของ PPBs เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion

(ก) *Staphylococcus aureus* TISTR 517 (ข) viridans group (*Streptococcus* sp.) (ค) *Escherichia coli* TISTR 887; (ง) *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 และ (จ) *Candida albicans* TISTR 5239 C: 0.85 % NaCl 2 และ 5: PPBs ขวดที่ 2 และ 5 ตามลำดับ

## 2. การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ PPBs ที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส

PPBs ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 1.86 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ผสมเอนไซม์อะไมเลส แสดงฤทธิ์

ต้านจุลินทรีย์ดัดชนีน้อยกว่า PPBs ที่ไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส แต่ฤทธิ์ดังกล่าวให้ผลคงเดิมกับแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 517 (ตารางที่ 1)

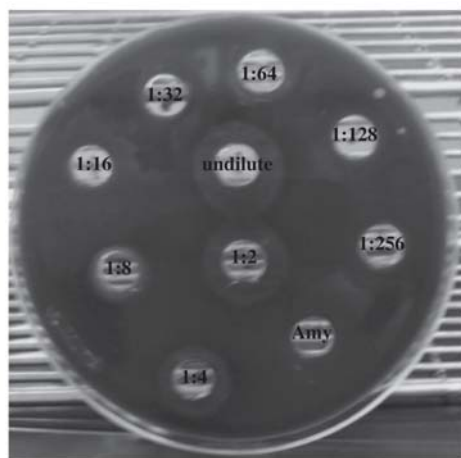
ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดัดชนีของ PPBs ที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส

| จุลินทรีย์ดัดชนี                           | ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดัดชนี<br>(AU/ml) |                   |
|--------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
|                                            | ไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส                 | ผสมเอนไซม์อะไมเลส |
| <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 517     | 1,280                                | 1,280             |
| viridans group ( <i>Streptococcus</i> sp.) | 640                                  | 80                |
| <i>Escherichia coli</i> TISTR 887          | 320                                  | 80                |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TISTR 781    | 40                                   | 20                |
| <i>Candida albicans</i> TISTR 5239         | 20                                   | 1                 |

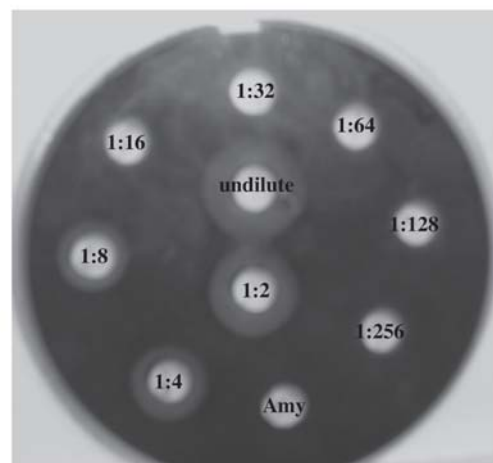
## 3. ฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ PPBs ที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส

PPBs ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 1.86 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทั้งที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส

แสดงฤทธิ์ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์มีค่าเท่ากัน คือ ในหลุมที่ 4 ของการเจือจางแบบ 2 เท่า ซึ่งมี titer เท่ากับ 1: 8 หรือมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 0.23 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงใน รูปที่ 2



ก



ข

รูปที่ 2 ฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ PPBs ที่ผสมเอนไซม์อะไมเลส (ก) และไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส (ข) เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion Amy : เอนไซม์อะไมเลส

#### 4. การออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในน้ำลายโดย PPBs ที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส

PPBs ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 1.86 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทั้งที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส ให้ MIC ในน้ำลายเท่ากับ 0.024 และ 0.017 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อศึกษาด้วยวิธี microbroth dilution หรือมีค่า

titer โดยประมาณเท่ากับ 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ ส่วน MLC ในน้ำลาย มีค่าเท่ากับ 0.064 และ 0.035 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือมีค่า titer โดยประมาณเท่ากับ 1:32 และ 1:64 ตามลำดับ โดยทั้งค่า MIC และ MLC ที่หาได้จาก PPBs ที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส เป็น titer ที่ต่ำกว่าค่าที่ได้จากน้ำยาบ้วนปากลิสเตอร์ีน (1:256) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นต่ำสุดของ PPBs ที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลสในการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในน้ำลาย

| น้ำลาย              | ความเข้มข้นต่ำสุด<br>(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) |       |                            |       | Titer                      |       |       |       |                                |       |
|---------------------|----------------------------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|-------|-------|--------------------------------|-------|
|                     | PPBs                                         |       | PPBs ผสม<br>เอนไซม์อะไมเลส |       | น้ำยาบ้วนปาก<br>ลิสเตอร์ีน |       | PPBs  |       | PPBs ผสม<br>เอนไซม์<br>อะไมเลส |       |
|                     | MIC                                          | MLC   | MIC                        | MLC   | MIC                        | MLC   | MIC   | MLC   | MIC                            | MLC   |
| 1                   | 0.014                                        | 0.029 | 0.014                      | 0.029 | 1:64                       | 1:64  | 1:128 | 1:64  | 1:128                          | 1:64  |
| 2                   | 0.014                                        | 0.029 | 0.029                      | 0.058 | 1:128                      | 1:128 | 1:128 | 1:64  | 1:64                           | 1:32  |
| 3                   | 0.014                                        | 0.029 | 0.029                      | 0.058 | 1:256                      | 1:128 | 1:128 | 1:64  | 1:64                           | 1:32  |
| 4                   | 0.029                                        | 0.058 | 0.029                      | 0.116 | 1:256                      | 1:128 | 1:64  | 1:32  | 1:64                           | 1:16  |
| 5                   | 0.014                                        | 0.029 | 0.029                      | 0.058 | 1:256                      | 1:128 | 1:128 | 1:64  | 1:64                           | 1:32  |
| 6                   | 0.007                                        | 0.014 | 0.007                      | 0.014 | > 1:512                    | 1:256 | 1:256 | 1:128 | 1:256                          | 1:128 |
| 7                   | 0.029                                        | 0.058 | 0.029                      | 0.116 | 1:256                      | 1:128 | 1:64  | 1:32  | 1:64                           | 1:16  |
| เฉลี่ย <sup>1</sup> | 0.017                                        | 0.035 | 0.024                      | 0.064 |                            |       |       |       |                                |       |

#### วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จุลินทรีย์ดัดชนิดนี้ทั้งหมดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้ถูกยืนยันกลุ่มเชื้อดังกล่าวก่อนนำมาศึกษาพบว่าถูกต้องตามลักษณะการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อ<sup>(10)</sup> จึงนำไปใช้เป็นจุลินทรีย์ดัดชนิดนี้ในการศึกษาครั้งนี้ สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ SA14 มีลักษณะรูปร่างของโคโลนีและรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์สัมพันธ์กับแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus* spp.)<sup>(6,7,10,11,14)</sup>

*Brev laterosporus* เดิมใช้ชื่อว่า *Bacillus laterosporus*<sup>(11,14)</sup> ให้ลักษณะโคโลนีรูปร่างไม่แน่นอนขนาดประมาณ 3-5 มิลลิเมตร สีขาวขุ่นทึบแสง ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าหยาบด้านและสร้างสปอร์บริเวณด้านข้างเซลล์ ซึ่งตรงกับลักษณะของ *Brev. laterosporus* SA14 ที่มีรายงานตรวจพบฤทธิ์ทำลาย

จุลินทรีย์ แบคทีเรียดัดชนิดนี้แกรมบวก แบคทีเรียดัดชนิดนี้แกรมลบ และรายีสต์รวมทั้งฤทธิ์ beta-hemolysis เมื่อทดสอบโดยโคโลนีหรือแม้กระทั่งน้ำเลี้ยงเชื้อ<sup>(6,7,15)</sup> และ PPBs โดยที่ฤทธิ์ beta-hemolysis สามารถทำให้หมดไปได้โดยการเจือจาง PPBs ที่มีระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น 1.86 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรให้มี titer ตั้งแต่ 1:8 ขึ้นไป แต่พบว่ายังคงแสดงฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียดัดชนิดนี้ได้แม้จะเจือจางสูงถึงที่ titer 1:128 ดังแสดงใน ตารางที่ 2

#### ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดัดชนิดนี้ของน้ำเลี้ยงเชื้อและ PPBs

น้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA 14 มีฤทธิ์ปฏิชีวนะสามารถทำลายแบคทีเรียได้หลายกลุ่มรวมทั้งรายีสต์

เมื่อทดสอบโดยวิธี cross streak และสารปฏิชีวนะดังกล่าว มีความทนทานต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้หลายชนิด โดยเฉพาะเอนไซม์ทริปซิน รวมถึงทนทานต่อสารเคมีและความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิสูงถึง 100 °ซ<sup>(7)</sup> แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าราอีส์ *C. albicans* และ *Ps. aeruginosa* ทนทานต่อสารปฏิชีวนะที่ได้มาจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14 เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion ซึ่งอาจเนื่องมาจากวิธีการทดสอบที่ต่างกันโดยพบว่าวิธีที่ใช้เชื้อเป็นตัวทดสอบเช่น cross streak หรือ spot on lawn มักให้ผลดีกว่าใช้สารที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ<sup>(16)</sup> ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณสารปฏิชีวนะที่อาจมีอยู่น้อยหรือสูญเสียไประหว่างการเตรียม<sup>(16,17)</sup> หรืออาจเนื่องจากโครงสร้างที่แตกต่างกันของกลุ่มจุลินทรีย์กล่าวคือ แบคทีเรียแกรมลบและราอีส์มีผนังเซลล์ที่ซับซ้อนและคอยทำหน้าที่กั้นสารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์จึงทำให้สารปฏิชีวนะในน้ำเลี้ยงเชื้อเข้าไปยังตำแหน่งเป้าหมายได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก<sup>(18,19)</sup> แต่เมื่อทดสอบฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ด้วย PPBs ที่มีระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 1.86 มิลลิกรัม/มิลลิตร ที่เตรียมได้จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50 % ของน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถต้านจุลินทรีย์ได้ทุกชนิดดีกว่าน้ำเลี้ยงเชื้ออาจเนื่องมาจากสารปฏิชีวนะใน PPBs มีความเข้มข้นสูงกว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแกรมบวกยังคงถูกยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและราอีส์ด้วย PPBs ดังกล่าว

## ผลกระทบของเอนไซม์อะไมเลสต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ PPBs

แม้ว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Brev. laterosporus* SA14 จะมีความทนทานต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนรวมถึงเอนไซม์ชนิดอื่น เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แต่เมื่อนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำให้ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียหายไปและพบว่าฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ PPBs ลดลงเมื่อนำไปผสมรวมกับเอนไซม์อะไมเลส ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ยกเว้นฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 517 ที่ยังคงเดิมซึ่งอาจเนื่องมาจาก

โครงสร้างผนังเซลล์ที่มีความไวต่อสารออกฤทธิ์ใน PPBs มากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ลดลงเมื่อผสมเอนไซม์อะไมเลสลงไป PPBs อาจเป็นเพราะว่ามีการย่อยกลุ่มสารบางโมเลกุลโดยเฉพาะกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตออกไปเพราะมีรายงานว่า การแปลรหัสโปรตีนในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มักเกิด nonribosomal post-translation modification เนื่องจากเป็นโปรตีนที่ผลิตจาก nonribosomal peptide ซึ่งสังเคราะห์ได้โดยอาศัยเอนไซม์ nonribosomal peptide synthetase เพื่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมพร้อมที่จะทำงาน โดยอาจมีการเติมกลุ่มคาร์โบไฮเดรตกลุ่มไขมันรวมทั้งกลุ่มสารเคมีต่างๆ ให้กับโปรตีน หรือมีการตัดกรดอะมิโนบางตัวออก<sup>(20-23)</sup> ทำให้โครงสร้างของโปรตีนใน PPBs พร้อมทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความเสถียรมากขึ้น ซึ่งหากโปรตีนที่ออกฤทธิ์ใน PPBs มีการเติมกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเข้าไปก็จะทำให้ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ PPBs ที่ผสมกับเอนไซม์อะไมเลสลดลงเพราะเอนไซม์อะไมเลสไปย่อยคาร์โบไฮเดรตที่เติมเข้าไปในโปรตีนทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนที่ไม่ออกฤทธิ์

## ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในช่องปากของ PPBs

หาก PPBs ที่เตรียมออกมาได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นโปรตีนที่มีการเติมกลุ่มคาร์โบไฮเดรตในกระบวนการ post-translation modification ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ก็จะทำให้ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ PPBs ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์อะไมเลส อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ PPBs ทั้งที่ผสมและไม่ผสมเอนไซม์อะไมเลส ก็ยังคงมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่ำกว่าน้ำยาบ้วนปากลิสเตอรินที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ ซึ่งสามารถฆ่าได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และราบางชนิด<sup>(24)</sup> แต่แอลกอฮอล์อาจจะทำให้ปากแห้งและมักกลืนปากได้เร็วขึ้น<sup>(25,26)</sup> และหากสัมผัสกับแอลกอฮอล์ปริมาณสูงเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อในช่องปากและนำไปสู่การเป็นมะเร็งในช่องปาก<sup>(27,28)</sup> ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ โดยเฉพาะในกลุ่มของผู้ที่มีเยื่อช่องปากอักเสบ ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำ ผู้ป่วยเอดส์ ดังนั้นการหาทางเลือกอื่นแทนการใช้ยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้กับผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าว

ดังที่ได้มีความพยายามศึกษาการประยุกต์ใช้น้ำยาบ้วนปาก ไรแอลกอฮอล์ที่มีส่วนผสมของ chlohexidine และ brilliant green ขึ้นมาและสามารถทำลายจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ<sup>(29)</sup>

PPBs จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 เป็นชีวสารตัวหนึ่งที่น่าสนใจนำมาศึกษาประยุกต์ใช้เป็นน้ำยาบ้วนปากชนิดที่ไรแอลกอฮอล์เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และรา ยีสต์ ถึงแม้ว่าเมื่อนำไปผสมกับเอนไซม์อะไมเลสแล้วจะทำให้ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ลดลงไปก็ตาม ส่วนฤทธิ์ beta-hemolysis ซึ่งอาจเป็นอันตรายหากนำไปใช้งานในสิ่งมีชีวิตนั้นสามารถทำให้หายไปได้โดยนำ PPBs ที่มีระดับปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 1.86 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปเจือจางให้มี titer เท่ากับ 1:16 โดยพบว่าที่ระดับ titer ดังกล่าวยังตรวจพบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ beta-hemolysis ไม่ใช่ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ซึ่งหากต้องการนำไปเป็นสารต้นแบบในการทำน้ำยาบ้วนปากไรแอลกอฮอล์ก็อาจต้องมีการพัฒนานำไปใช้ร่วมกับสารเคมีอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ เช่น brilliant green<sup>(29)</sup> หรือ chlorhexidine หรือสารสกัดสมุนไพร<sup>(30)</sup> แต่จะต้องพิจารณาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PPBs ในการนำไปผสมในส่วนประกอบของน้ำยาบ้วนปากไรแอลกอฮอล์ รวมไปถึงฤทธิ์ที่เสริมหรือลดทอนกันของสารเคมีที่จะนำมาใช้เป็นส่วนผสมลงไปในน้ำยาบ้วนปากไรแอลกอฮอล์ เพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถนำไปพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยและสามารถนำไปใช้งานได้จริงอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

## สรุปผลการศึกษา

PPBs ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 1.86 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่เตรียมได้จากการตกตะกอนโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA 14 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 50 % ของน้ำเลี้ยงเชื้อ สามารถแสดงฤทธิ์ปฏิชีวนะต้านแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกได้ดีกว่า แบคทีเรียแกรมลบ และรา ยีสต์ และพบมีฤทธิ์ beta-hemolysis ที่สามารถทำให้หมดไปได้ด้วยการเจือจางถึง titer 1:16 ซึ่งยังคงพบฤทธิ์ปฏิชีวนะต้านจุลินทรีย์ในน้ำลายเมื่อทำเจือจางสูงถึง titer 1:128 ซึ่งเป็นค่าเจือจางที่ไม่ทำให้เกิดฤทธิ์

ย่อยเม็ดเลือดแดงแต่ยังคงออกฤทธิ์ที่เป็นสารปฏิชีวนะ จึงน่าสนใจที่จะนำมาใช้ศึกษาเป็นสารต้นแบบในการผลิตเป็นน้ำยาบ้วนปากชนิดไรแอลกอฮอล์ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (WU-51109) และโครงการเครือข่ายการวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทรัพยากรชีวภาพ (Bioresources Research Network, BRN), ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ขอขอบคุณ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์บางอย่างในการทำงานวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

1. วีระวรรณ ลูวิระ. การดื้อยาปฏิชีวนะ. สงขลานครินทร์เวชสาร 2549; 24: 453-9.
2. นลินี อัสวโกตี, สุรภี เทียนกริม, ศศิธร ลิขิตนุกูล, อัมภา วิชากุล. ประสิทธิภาพด้านโรคติดเชื้อในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : โฮลิสติก 2540; 63-84.
3. Aharonowitz Y, Demain AL. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Can J Microbiol 1979; 25: 61-7.
4. Berdy J. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. Adv Appl Microbiol 1974; 18: 309-406.
5. Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. Int J Syst Bacteriol 1996; 46: 939-46.
6. มณฑล เลิศคนาวนิชกุล, ศรัณญา หนูชุม, ศราวุธ ปาลีโภชน, วาสนา จงต๊ะ. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยชีวสารที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SA14. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2551; 50: 75-86.

7. อภิญา ชูพันธุ์, กฤษณวัฒน์ นาคบุตร, กิ่ง ดาววีระกุล, กิจศักดิ์ ชววิสิฐ, มณฑล เลิศคณาวนิชกุล.ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาเมธิซิลลินของเชื้อแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14.วารสารมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2551; 5: 47-56.
8. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล, ซากาเรีย เจ๊ะมะ, นาฏศิลป์ทองแดง, นิตยา จรนิวาส. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท.วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2550; 49: 110-9.
9. Bio-Rad Laboratories Ltd. คู่มือการใช้งาน Biorad protein assay. กรุงเทพฯ : Bio-Rad Laboratories Ltd co.
10. John GH. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup>ed. Maryland: Williams & Wilkins; 1994; 605-51.
11. Logan, NA. Modern identification methods. In: Berkeley RCW, Heyndrickx M, Logan NA, and de Vos P (eds). "Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives". Blackwell Science, Oxford, United Kingdom 2002; 123-40.
12. Shimei W, Shifang J, Dandan S, Meiling C, Xiuzhu C, Jin Z, et al. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B Produce by *Bacillus subtilis* JM4. Curr Microbiol 2005; 5: 292-6.
13. Ivanova I, Miteva V, Stefanova TS, Pantev A, Budakov I, Danova S, et.al. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. Int J Food Microbiol 1998; 42: 147-58.
14. Logan NA, Hoffmaster A, Popovic T. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds.) "*Histoplasma, Blastomyces, Coccidioides and other dimorphic fungi causing symptoms in mycoses*". Vol. 9<sup>th</sup>. Washington, DC: ASM Press 2007; 1802-38.
15. สุดาวรรณ รัตนปริคณ, สุธิติ เพ็ชรสงค์, อุทุมพร รัตนะ, มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของ *Brevibacillus laterosporus* SA14 ภายหลังการทำฆ่าเชื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและสารเคมี. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2552; 21: 113-22.
16. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล, ทรงธรรม สว่างนพ. การเปรียบเทียบวิธี 2 วิธีในการศึกษาฤทธิ์การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus*. วารสารมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2552; 5: 161-71.
17. Cadirci BH, Citak S. A comparison of two methods for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. Pakistan J Nutr 2005; 4: 237-41.
18. Dielbandhosing SK, Zhang H, Caro LHP, van der Vaart LM, Klis FM, Verrips CT, et al. Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 4047-52.
19. Rhoades J, Roller S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 80-6.
20. Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA. Nonribosomal peptides: from genes to products. Nat Prod Rep 2003; 20: 275.
21. Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. ChemBioChem 2002; 3: 490-504.
22. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol 2005; 56: 845-57.
23. Mannanov RN, Sattarova RK. Antibiotics Produced by *Bacillus* Bacteria. Chem Nat Compd 2001; 37: 117-23.

24. Larson EL, Morton HE. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger 1991; 191-203.
25. American Dental Association (ADA). Division of Communications. Burning mouth syndrome. J Am Dent Assoc 2005; 136: 1191.
26. No author. For the dental patient. What you should know about bad breath. J Am Dent Assoc 2003; 134: 135.
27. Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA. Alcohol and Cancer. In: Galanter M. "Recent developments in alcoholism: the consequences of alcoholism". New York, London: Plenum Press 1998; 67-96.
28. Soames JV. Oral Pathology. In: Soames JV. "Oral epithelial tumors, melanocytic naevi, and malignant melanoma". 4<sup>th</sup> ed. Karachi: Oxford University Press 2005; 139.
29. Bahna P, Hanna HA, Dvorak T, Vaporciyan A, Chambers M, Raad I. Antiseptic effect of a novel alcohol free mouthwash: a convenient prophylactic alternative for high-risk patients. Oral Oncol 2007; 43: 159-64.
30. Salehi P, Momeni Danaie Sh. Comparison of the antibacterial effects of persica mouthwash with chlorhexidine on *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. DARU 2006; 14: 2006.