



การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของ *Brevibacillus laterosporus* SA14 ภายหลังการทำฆ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและสารเคมี

สุดาวรรณ รัตนปริคณ¹, สุริติ เพ็ชรสงค์¹, อุทุมพร รัตน¹, มณฑล เลิศคนาวณิชกุล^{2*}

บทคัดย่อ

Brevibacillus laterosporus SA14 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน สร้างสปอร์ และสามารถผลิตชีวสารยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก รวมไปถึงแบคทีเรียดื้อยา methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) คณะผู้วิจัยได้ทำการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียดังกล่าวโดยการทำฆ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและสารเคมี 1-hexyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (NTG) พบว่าสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ฆ่าเหล่าออกมาได้จำนวน 5 ไอโซเลท แบ่งเป็นฆ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตจำนวน 3 ไอโซเลท (UV1, UV2, LZ1) และฆ่าเหล่าด้วยสารเคมีจำนวน 2 ไอโซเลท (NTG1, NT8) ซึ่งนำเลี้ยงเชื้อและตัวเซลล์แบคทีเรียฆ่าเหล่าทั้งหมดยังคงแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 517 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 นอกจากนี้ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเม็ดเลือดแดงเมื่อทดสอบด้วยวิธีจุดเชื้อ และ/หรือวิธีซึมผ่านของสารเข้าเนื้อวุ้น ตัวเซลล์แบคทีเรียฆ่าเหล่าส่วนใหญ่มีความทนทานต่อกรดน้ำดี รวมไปถึงยาปฏิชีวนะต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม อย่างไรก็ตามพบว่ามีเฉพาะน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียฆ่าเหล่า LZ1 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดเลือดแดงต่ำที่สุด ซึ่งอาจจะนำไปศึกษาเพื่อพัฒนาใช้เป็นต้นแบบของยาปฏิชีวนะต่อไปในอนาคต

คำหรัส : *Brevibacillus laterosporus*, การฆ่าเหล่า, สารยับยั้งเม็ดเลือดแดง, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

¹นักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์

²สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Characteristic changing of *Brevibacillus laterosporus* SA14 by ultraviolet and chemical mutagenesis

Sudawan Rattanaparikon¹, Suthidee Petsong¹, Uthoomporn Rattana¹, Monthon Lertcanawanichakul^{2*}

Abstract

Brevibacillus laterosporus SA14, Gram-positive spore-forming bacterium, could produce biocompounds which inhibit the growth of Gram-positive cocci in cluster (*Staphylococcus aureus*), including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The characteristic changing of this bacterium was done by random mutagenesis, using ultraviolet (UV) or 1-hexyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (NTG). Five mutants were isolated, three from UV mutagenesis, named as UV1, UV2, LZ1; and two from chemical mutagenesis, named as NTG1, NT8. The cells and culture broth of all mutants could inhibit the growth of indicating bacteria, *Staphylococcus aureus* TISTR 517 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and still had hemolytic activity when tested by means of spot on lawn and agar well diffusion. The mutant cells were less resistant to acid, oxgall bile and antibiotics than those of wild type (SA 14). However, only culture broth of LZ1 mutant gave the least hemolytic activity. It may be used for further study as a model to develop the antimicrobial drugs.

Key Words: *Brevibacillus laterosporus*, Mutagenicity, Hemolytic activity, Antibacterial activity

¹Undergraduate Medical Technology students, School of Allied Health Sciences and Public Health

²Division 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

Brevibacillus laterosporus เป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ให้ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าหยาบด้าน และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์อยู่ด้านข้างเซลล์ (laterate)⁽¹⁾ มี biohazard level ระดับที่ 1 และสามารถผลิตสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ยับยั้ง MRSA ได้ ซึ่งสารปฏิชีวนะดังกล่าวมีความทนทานต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส (°C) อีกทั้งยังทนทานต่อสารเคมี เอนไซม์ย่อยโปรตีน และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมไปถึงสามารถทนสภาวะที่เป็นด่างสูง แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะดังกล่าวอาจมีฤทธิ์คงอยู่ได้แม้ผ่านเข้าสู่กระเพาะอาหารและลำไส้ (pH = 3-10)⁽²⁾ อย่างไรก็ตามยังคงพบฤทธิ์ย่อยเม็ดเลือดแดงจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. laterosporus* สายพันธุ์ SA14 ซึ่งอาจก่อให้เกิดโทษถ้าหากนำมาใช้งานจริงกับสิ่งมีชีวิตโดยวิธีรับประทาน ดังนั้นการทำฆ่าเชื้อ SA14 ด้วยวิธีรังสีอัลตราไวโอเลต หรือสารเคมี อาจจะทำให้ได้สายพันธุ์ฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์การย่อยเม็ดเลือดแดงลดลงแต่ยังคงแสดงฤทธิ์ทำลายเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตามการทำฆ่าเชื้อด้วยวิธีรังสีอัลตราไวโอเลต และสารเคมี เป็นการเกิดฆ่าเชื้อแบบสุ่ม จึงอาจทำให้มีลักษณะต่างๆ ของเชื้อเปลี่ยนแปลงไปด้วย ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบเกี่ยวกับลักษณะดังกล่าวไว้ด้วย เช่น คุณสมบัติการต้านแบคทีเรียดัชนี คุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ความทนทานต่อกรดและน้ำดี รวมไปถึงความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในด้านการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ได้สายพันธุ์ที่มีประโยชน์ตรงตามวัตถุประสงค์มากยิ่งขึ้นกว่าเดิม เพื่อสามารถนำไปใช้ในด้านโพรไบโอติกต่อไปในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Brevibacillus laterosporus* SA14⁽¹⁾ และแบคทีเรียดัชนี ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 517 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (สำนักวิทยาศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์) ที่เก็บรักษาไว้ใน 15 % กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80°C มาแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวโดยขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB: Scharlau) สำหรับ SA14 และ

nutrient agar (NA: Pronadisa) สำหรับแบคทีเรียดัชนี จากนั้นนำไปหมักเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแยกแบ่งเก็บเชื้อทดสอบทั้งหมดลงใน 15 % กลีเซอรอล เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อเลี้ยงแบคทีเรีย SA14 ให้ผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ LB (Scharlau) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดัชนี ได้แก่ Mueller Hinton agar (M-H: Pronadisa) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อการดูฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดง ได้แก่ blood agar base (BA: Pronadisa) ที่ใช้ผสมรวมกับเลือดมนุษย์ 5 % อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับคัดเลือกแบคทีเรียฆ่าเชื้อได้แก่ NA (Pronadisa) อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจนับเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต ได้แก่ plate count agar (PCA: Pronadisa)

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทำฆ่าเชื้อ ได้แก่ 1-hexyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (NTG: Sigma, USA) และ Phosphate buffer pH 7.2 ส่วนสารเคมีที่ใช้เพื่อทดสอบความทนทานต่อกรดและน้ำดี ได้แก่ hydrochloric acid (Carlo Erba) ความเข้มข้น 3 M และ Oxgall bile (Difco, Detroit, MI) ความเข้มข้น 0.1-1.0 % (w/v)

4. ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะที่ใช้เพื่อทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Oxoid ได้แก่ Gentamicin (G 30), Kanamycin (K 30), Erythromycin (E 15), Ampicillin (AM 10), Oxacillin (OX 1), Clindamycin (DA 2), Tetracycline (Te 30) และ Carbenicillin (CAR 100)

5. ขั้นตอนการทำฆ่าเชื้อ^(3, 4)

5.1 การทำฆ่าเชื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV)

นำโคโลนีของ SA14 มาปรับเทียบความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) จากนั้นเทใส่ลงในจานเพาะเชื้อพลาสติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร/จาน แล้วนำไปวางใต้หลอดกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเลต ($\lambda = 254 \text{ nm}$) เป็นเวลาโดยประมาณ 4-6 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ

แล้วนำไปวางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยแบคทีเรียไปกระจายเชื้อด้วยเทคนิคเกลี่ยเชื้อ (spread plate) บนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ 2 วัน แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อผ่าเหล่าที่ปรากฏขึ้นมาจุด (spot) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธีราดทับ (overlay method)

5.2 การผ่าเหล่าด้วยสารเคมี

เชื้อโคโลนีของ SA14 จำนวน 1 โคโลนี ใส่ลงไปในสารละลายก่อกำเสร 1-hexyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที และ 30 นาที จากนั้นปั่นเก็บตะกอนเชื้อที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนเชื้อด้วย phosphate buffer (pH 7.2) แล้วนำไปทำเจือจางแบบ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) จากนั้นเกลี่ยเชื้อบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วสุ่มคัดเลือกโคโลนีของเชื้อผ่าเหล่าที่ปรากฏขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาจุดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธีราดทับ

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธีราดทับ

นำโคโลนีของแบคทีเรียทั้งสองชนิดมาแยกปรับเทียบความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) จากนั้นแยกนำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมได้มาชนิดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว LB ปริมาตร 9 มิลลิลิตรที่หลอมเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 50 °C ผสมให้เข้ากัน (ปริมาณของเชื้อขณะนี้เท่ากับ 1.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เททับลงบนโคโลนีของแบคทีเรียผ่าเหล่าที่สุ่มเลือกได้จากข้อ 5 แล้วรอให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสของการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ด้วยการเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนระหว่างขนาดของโคโลนีต่อวงใสของการยับยั้ง โดยใช้ SA 14 ดังเดิมเป็นตัวควบคุมการทดลอง

7. ขั้นตอนการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียผ่าเหล่า

7.1 คุณสมบัติต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion

7.1.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำ SA 14 ดังเดิม และผ่าเหล่าที่คัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นจากข้อ 6 มาแยกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25x125 มิลลิเมตร บ่มเลี้ยงเชื้อใน shaking incubator ความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 2 % ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB มาถ่ายใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวด Duran ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อใน shaking incubator ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อในแต่ละวันมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีราดทับ โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรียในแต่ละวันมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเอาตะกอนเชื้อออกไป ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อแยกนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อรอการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion

7.1.2 การทำ agar well diffusion

นำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 6.1 ไปป้ายให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M-H ด้วยสำลีพันปลายไม้ปราศจากเชื้อ ผึ่งให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งไม่เกิน 10 นาที จากนั้นใช้ทิป (tip) ปราศจากเชื้อขนาด 1,000 ไมโครลิตร เจาะลงไปบนวุ้นแล้วแกะเอาวุ้นออกด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) โดยให้มีจำนวนหลุมครบตามจำนวนตัวอย่าง แล้วจึงหยดน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ในแต่ละวันลงในหลุมๆ ละ 80 ไมโครลิตร แล้ววางจานเพาะเชื้อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ น้ำเลี้ยงเชื้อซึมผ่านเข้าเนื้อวุ้นจนหมด จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสของการยับยั้งเชื้อรอบหลุมทดสอบ

7.2 การศึกษาคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

7.2.1 ทดสอบโดยน้ำเลี้ยงเชื้อ

หยดน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 7.1.1 ลงในหลุมของจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมเลือด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ น้ำเลี้ยงเชื้อซึมผ่านเข้าเนื้อวุ้นจนหมด แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสของการย่อยเม็ดเลือดแดงรอบหลุมทดสอบ

7.2.2 ทดสอบโดยโคโลนี

เตรียมสารแขวนลอย SA 14 ตั้งเดิมและผ่าเหล่าให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นดูดสารแขวนลอยจากแบคทีเรียดังกล่าวแต่ละชนิดๆ ละ 10 ไมโครลิตรหยดลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมเลือด แล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสของการย่อยเม็ดเลือดแดงรอบโคโลนีของแบคทีเรียทดสอบ

7.3 การศึกษาความทนทานต่อกรดและน้ำดี

7.3.1 การทดสอบความทนทานต่อกรด

นำโคโลนีของ SA 14 ตั้งเดิมและผ่าเหล่าชนิดละ 1 โคโลนี มาแยกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 9 มิลลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25x125 มิลลิเมตร ใน shaking incubator ที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียแต่ละชนิดๆ ละ 1 % ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB มาถ่ายใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25x125 มิลลิเมตร ที่ปรับ pH ด้วย 3 M HCl ให้อยู่ในระดับ pH ต่างๆ (2.0, 2.5 และ 3.0) แล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดิมดังกล่าวข้างต้น สังเกตการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยดูความขุ่นด้วยสายตา

นำสารแขวนลอยแบคทีเรียมาทำเจือจางแบบ 10 เท่า แล้วนำไปตรวจนับหาเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้เทคนิคเกลี่ยเชื่อบนจานเพาะเชื้อ PCA นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อที่ตรวจนับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 7.0 (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

7.3.2 การทดสอบความทนทานต่อน้ำดี

เตรียม SA 14 ตั้งเดิมและผ่าเหล่าให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No.0.5 จากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียแต่ละชนิดๆ ละ 10 ไมโครลิตร มาหยดลงผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ผสม oxgall bile ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-1.0 % (w/v) [0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 % (w/v)] รอให้หยดสารแขวนลอยแบคทีเรีย

แห้งแล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ สังเกตการเจริญของเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละจาน เป็นเวลา 5 วัน

7.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

เตรียม SA 14 ตั้งเดิมและผ่าเหล่าให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No.0.5 แล้วนำไปป้ายให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M-H ด้วยสำลีพันปลายไม้ปราศจากเชื้อวางทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำแผ่นยาปฏิชีวนะต่างๆ วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว แล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสของการยับยั้งเชื้อรอบแผ่นยาปฏิชีวนะ

ผลการศึกษา

แบคทีเรีย SA 14 ให้โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าหยาบด้านเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และย้อมติดสีแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์อยู่ด้านข้างเซลล์

1. การทำผ่าเหล่าและคัดเลือกแบคทีเรียผ่าเหล่า

ใช้เกณฑ์คัดเลือกแบคทีเรียผ่าเหล่าด้วยการดูสัดส่วนขนาดของโคโลนีต่อขนาดของวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียดัชนีเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย SA14 ตั้งเดิม จากการทำผ่าเหล่าสายพันธุ์ตั้งเดิมดังกล่าวด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและการทำผ่าเหล่าด้วยสารเคมี พบว่าแบคทีเรีย SA 14 มีปริมาณเซลล์ลดลงเหลือ 10% จาก 1.5×10^8 CFU/mL เหลือ 1.5×10 CFU/mL เมื่อถูกนำไปผ่านรังสีอัลตราไวโอเลต ($\lambda = 254$ nm) เป็นระยะเวลา 3.5 นาที และสามารถคัดเลือกแบคทีเรียผ่าเหล่าได้จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ UV1, UV 2 และ LZ1 สำหรับการทำผ่าเหล่าด้วยสารเคมีเมื่อนำไปสัมผัสกับสารก่อผ่าเหล่า NTG นาน 20 และ 30 นาที สามารถคัดเลือกแบคทีเรียผ่าเหล่าได้จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ NTG1 และ NT8 ซึ่งแบคทีเรียผ่าเหล่าทั้งหมดสามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดัชนีชนิดใดชนิดหนึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งเดิม (1:18 สำหรับ *S. aureus* และ 1:15 สำหรับ *B. subtilis*) โดยแบคทีเรียผ่าเหล่าให้สัดส่วนของขนาดโคโลนีต่อขนาดวงใสในช่วง 1:15 ถึง 1:21 สำหรับ *S. aureus* และเท่ากับ 1:12 ถึง 1:20 สำหรับ *B. subtilis* (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตโดย Brevibacillus laterosporus SA 14 ตั้งเดิมแล้วผ่าเหล่า โดยการเทียบสัดส่วนของโคโลนีต่อวงใสของการยับยั้งเชื้อ

แบคทีเรีย		ขนาดโคโลนี : ขนาดวงใสของการยับยั้งเชื้อ (มม.)	
		<i>S. aureus</i> TISTR 517	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
ดั้งเดิม	SA 14	1:18	1:15
ผ่าเหล่า	UV1	1:18	1:20
UV	UV2	1:15	1:20
	LZ1	1:20	1:14
ผ่าเหล่า	NTG1	1:21	1:12
สารเคมี	NT8	1:19	1:16

2. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียผ่าเหล่า

2.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ผลิต

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ผลิตของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการบ่มเลี้ยงแบคทีเรียผ่าเหล่า (UV1, UV2, NTG1, LZ1 และ NT8) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB เป็นเวลา 5 วัน พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียผ่าเหล่าทั้งหมดแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ผลิตทั้ง 2 ชนิด ได้ในวันที่ 3 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ

อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย LZ1 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ผลิตทั้งสองชนิดตั้งแต่วันที่ 1 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ส่วน NTG1 และ NT8 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ผลิตตั้งแต่วันที่ 2 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ และแบคทีเรียผ่าเหล่า UV1 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ผลิตเฉพาะ *B. subtilis* ตั้งแต่วันที่ 2 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ และน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียทั้งหมดยังคงแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ผลิตจนถึงการบ่มเลี้ยงในวันที่ 5 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตของแบคทีเรียผ่าเหล่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion¹

แบคทีเรีย		ขนาดวงใสของการยับยั้ง (มม.) ²									
		<i>S. aureus</i> TISTR 517					<i>B. subtilis</i> ATCC 6633				
		d1	d2	d3	d4	d5	d1	d2	d3	d4	d5
ดั้งเดิม	SA 14	9	9	21	24	25	9	9	25	27	28
ผ่าเหล่า UV	UV-1	9	9	22	25	26	9	15	26	28	28
	UV-2	9	9	25	25	25	9	9	28	28	28
	LZ1	17	21	25	26	27	16	23	26	27	28
ผ่าเหล่าสารเคมี	NTG-1	9	19	25	26	26	9	19	25	26	29
	NT8	9	23	26	26	29	9	23	28	28	28

¹ ความกว้างของหลุม มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 9 มิลลิเมตร

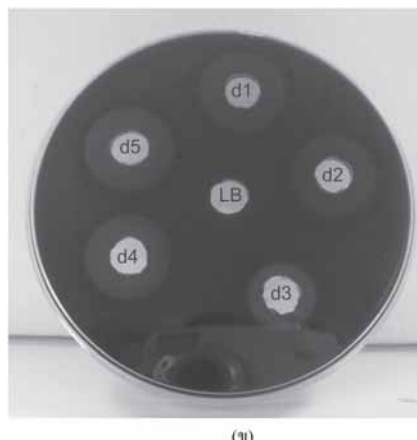
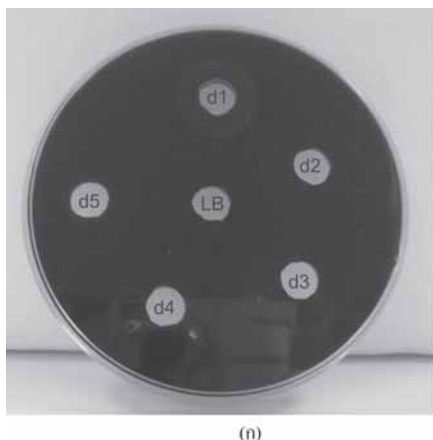
² d1 d2 d3 d4 d5 คือ ระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงเชื้อในวันที่ 1, 2, 3, 4, และ 5 ตามลำดับ

2.2 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

2.2.1 ทดสอบโดยน้ำเลี้ยงเชื้อ

ฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาจากการบ่มเลี้ยงเชื้อตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 5 ในจานเพาะเชื้อแข็งเสริมเลือด พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียผ่าเหล่า UV1 และ UV2 แสดงฤทธิ์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทั้ง 5 วัน

ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใกล้เคียงกับแบคทีเรียผ่าเหล่า NT8 ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากแบคทีเรียผ่าเหล่า NTG1 แสดงฤทธิ์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงในวันที่ 2 และวันที่ 5 สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียผ่าเหล่า LZ1 แสดงฤทธิ์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเพียงในวันที่ 1 เท่านั้น (รูปที่ 1) ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ซึ่งผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงสรุปได้ใน ตารางที่ 3



รูปที่ 1 ฤทธิ์การย่อยเม็ดเลือดแดงของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียผ่าเหล่า LZ1 (ก) และ SA14 (ข) d1 d2 d3 d4 d5 คือระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงเชื้อในวันที่ 1, 2, 3, 4, และ 5 ตามลำดับ ; LB คืออาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani

2.2.2 ทดสอบโดยโคโลนี

ฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเมื่อทดสอบโดยโคโลนีด้วยการเปรียบเทียบขนาดวงใสของแบคทีเรีย SA14

ดั้งเดิมและผ่าเหล่า พบว่าไม่เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มโดยวัดขนาดของวงย่อยเม็ดเลือดแดงได้ในช่วง 12-13 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของน้ำเลี้ยงเชื้อและโคโลนี

แบคทีเรีย		ฤทธิ์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง					
		น้ำเลี้ยงเชื้อ					โคโลนี
		d1	d2	d3	d4	d5	โคโลนี : โซนใส
ดั้งเดิม	SA 14	+	+	+	+	+	1:12
ผ่าเหล่าUV	UV1	+	+	+	+	+	1:12
	UV2	+	+	+	+	+	1:12
	LZ1	+	-	-	-	-	1:13
ผ่าเหล่า	NTG1	-	+	-	-	+	1:13
สารเคมี	NT8	+	-	+	+	+	1:12

หลุมทดสอบ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร, - ไม่เกิดวงใสของการย่อยเม็ดเลือดแดง, + เกิดวงใสของการย่อยเม็ดเลือดแดง

d1 d2 d3 d4 d5 คือ ระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงเชื้อในวันที่ 1, 2, 3, 4, และ 5 ตามลำดับ

2.3 ความทนทานต่อกรดและน้ำดี

แบคทีเรียผ่าเหล่าทั้งหมดไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ปรับระดับ pH ต่ำกว่า 3.0 (pH 2.0, 2.5 และ 3.0) รวมทั้งไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของ oxgall bile ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 %

2.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรียผ่าเหล่าทั้งหมดมีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาศึกษามากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม ยกเว้นยา tetracycline ที่มีความไวลดลง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความไวของแบคทีเรียผ่าเหล่าต่อยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ (µg)	ขนาดวงใส (มม.)					
	SA14	UV1	UV2	NTG1	LZ1	NT8
Gentamicin (CN10)	18	24	23	20	21	23
Kanamycin (K30)	17	17	16	21	21	20
Erythromycin (E15)	38	37	35	41	39	41
Ampicillin (AM10)	16	26	25	29	28	28
Oxacillin (OX1)	17	20	14	17	17	20
Clindamycin (DA2)	8	12	10	14	14	13
Tetracycline (Te30)	25	19	18	16	18	21
Carbenicillin (CAR100)	33	33	32	33	35	35

วิจารณ์ผลการศึกษา

การผ่าเหล่าของสิ่งมีชีวิต เกิดขึ้นได้จากการสัมผัสรังสีและสารเคมี ซึ่งอาจทำให้เกิดการผ่าเหล่าในลักษณะที่มีประโยชน์หรือโทษต่อสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่นการทำผ่าเหล่า *Streptomyces fradiae* ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เพื่อให้มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ tylosin ได้มากขึ้น⁽³⁾ และการทำให้เกิดการผ่าเหล่าด้วยสารเคมี ก็สามารถปรับปรุงคุณลักษณะดังกล่าวได้ด้วยเช่นกัน⁽⁴⁾

B. laterosporus SA14 เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตชีวสารปล่อยออกมานอกเซลล์ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มแกรมบวกรูปกลม (*S. aureus*) รวมไปถึงเชื้อดื้อยา MRSA⁽¹⁾ แต่พบว่ามีคุณลักษณะบางประการที่ไม่พึงประสงค์ คือการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง⁽⁵⁾ จึงได้นำแบคทีเรียดังกล่าวไปทำการผ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตหรือสารเคมีเพื่อพยายามลดฤทธิ์การย่อยเม็ดเลือดแดง โดยมีรายงานว่ารังสีอัลตราไวโอเลตมีผลต่อ thymine dimer ส่วน NTG ออกฤทธิ์โดยการเติมหมู่ alkyl

เช่น ethyl และ methyl ในโมเลกุลของเบส ซึ่งมีผลทำให้เบสมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปไม่สามารถทำหน้าที่เป็นต้นแบบสำหรับสร้าง DNA สายใหม่ได้ ทำให้สาย DNA ที่สร้างขึ้นใหม่มีเบสที่เข้าคู่กับตำแหน่งดังกล่าวผิดพลาด มักจะมีความจำเพาะต่อการเกิดการผ่าเหล่าที่ตำแหน่งของเบส purine⁽⁶⁾ ซึ่งทำให้เกิดการผ่าเหล่าของแบคทีเรียได้ การศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย ผ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต 3 ไอโซเลต และผ่าเหล่าด้วยสารเคมี 2 ไอโซเลต ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีขึ้นได้ดีกว่าแบคทีเรียดั้งเดิม

แบคทีเรียผ่าเหล่าทั้งหมด รวมไปถึงสายพันธุ์ดั้งเดิมยังคงให้ลักษณะโคโลนีที่เหมือนกันแต่มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะบางอย่างดังนี้ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียดีขึ้น ฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ความทนทานต่อกรดและน้ำดี และความไวต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียผ่าเหล่า LZ1 ที่ถูกทำให้ผ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สามารถผลิตชีวสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียดีขึ้นได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเลตอาจทำให้

เกิดการผ่าเหล่าที่ทำให้แบคทีเรียมีการสังเคราะห์ผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังที่ได้เคยมีรายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีที่มีผิวขรุขระมากขึ้นของ *S. fradiae* ที่ผ่าเหล่าโดยรังสีอัลตราไวโอเลต^(3, 7) ซึ่งเป็นผลโดยตรงที่ปรากฏขึ้นที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยที่แบคทีเรียที่มีแคปซูลจะมีลักษณะโคโลนีเรียบ ส่วนแบคทีเรียที่ไม่มีแคปซูลจะมีโคโลนีหยาบ ด้าน ขรุขระ⁽³⁾ นอกจากนี้แบคทีเรียผ่าเหล่ามีความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์มากขึ้น ได้แก่ Ampicillin^(6, 8) โดยแบคทีเรียผ่าเหล่าถูกยับยั้งการเจริญมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมโดยดูได้จากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของการยับยั้งเชื้อ (ตารางที่ 4) ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ถูกทำให้ผ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เช่น LZ1 อาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางตำแหน่งในชั้นของผนังเซลล์และ/หรือเยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลทำให้มีความสามารถในการปลดปล่อยสารปฏิชีวนะออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อได้ง่ายและมีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์มากขึ้น แต่ในส่วนของฤทธิ์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่ลดลงอาจเนื่องมาจากรังสีอัลตราไวโอเลตไปทำลายตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารที่ออกมาย่อยเม็ดเลือดแดง ทั้งที่อาจเป็นตำแหน่งที่ปรากฏอยู่บนโครโมโซมหรือพลาสมิด ดังเช่นได้เคยมีรายงานการทำให้ฤทธิ์ย่อยเม็ดเลือดแดงลดลงได้ด้วยการทำ plasmid curing ด้วยสารเคมี ethidium bromide⁽⁵⁾ ซึ่งต้องทำการศึกษาในขั้นต่อไปสำหรับแบคทีเรียผ่าเหล่า LZ1 เพราะว่าสายพันธุ์ผ่าเหล่าดังกล่าวให้ฤทธิ์ย่อยเม็ดเลือดแดงเพียงในวันที่ 1 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ในขณะที่สายพันธุ์ผ่าเหล่าอื่นๆ ให้ฤทธิ์ดังกล่าวทุกวัน (ตั้งแต่วันที่ 1-5) ของการบ่มเลี้ยงเชื้อและที่น่าสนใจคือสายพันธุ์ผ่าเหล่า NTG1 และ NT8 มีฤทธิ์ย่อยเม็ดเลือดแดงแบบกระโดดข้ามวัน ซึ่งอาจเกิดจากการถูกดูดซับของสารที่มีฤทธิ์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยตัวเชื้อแบคทีเรียเอง หรืออาจเป็นผลเนื่องมาจากการผลิตสารย่อยเม็ดเลือดแดงที่มีคุณสมบัติไม่คงทนต่อออกซิเจน (oxygen labile) เช่นเดียวกับ streptolysin O (SLO) ที่มีฤทธิ์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่ถูกผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus*⁽⁹⁾ จึงทำให้สารที่ถูกผลิตออกมาจะสลายตัวเมื่อสัมผัสออกซิเจน ทำให้ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งน่าจะต้อง

ทำการทดลองต่อไปในสภาวะไร้ออกซิเจนเพื่อยืนยันผลสรุปอีกครั้งหนึ่งต่อไป นอกจากนี้ยังพบมีอีกคุณลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปคือแบคทีเรียผ่าเหล่าทุกชนิดมีความทนทานต่อกรดและน้ำดีได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ทำให้อาจยังไม่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นยารับประทานเพราะไม่ทนต่อสภาวะในกระเพาะอาหารและลำไส้แต่อาจนำมาใช้เป็นยาใช้ภายนอกได้

แบคทีเรียผ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต หรือสารเคมี NTG สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดัชนีได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี แต่ในการทำผ่าเหล่าบางกรณีอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนีได้ดังเช่นมีรายงานใน *Streptomyces*⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการทำผ่าเหล่า *B. subtilis* ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต, NTG และ Co⁶⁰-gamma-rays ทำให้มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดัชนีเพิ่มสูงขึ้น⁽¹¹⁾ หรือสามารถผลิต alkaline protease ได้ในปริมาณสูงขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม⁽⁴⁾ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการทำผ่าเหล่าแบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตหรือสารเคมี NTG ร่วมกับการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและการบ่มเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะสามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตสารปฏิชีวนะได้ดียิ่งขึ้น^(4, 5, 7, 11, 12)

สรุปผลการศึกษา

สามารถคัดแยกแบคทีเรียผ่าเหล่าได้จำนวน 5 ไอโซเลทจาก *B. laterosporus* SA14 ดั้งเดิม เมื่อนำไปผ่านรังสีอัลตราไวโอเลตและสารเคมี 1-hexyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (NTG) ตั้งชื่อว่า UV1, UV2, LZ1, NTG1 และ NT8 โดยแต่ละไอโซเลท มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดัชนีและฤทธิ์ย่อยเม็ดเลือดแดงที่ใกล้เคียงกันแต่มีคุณลักษณะบางอย่างที่เปลี่ยนไป คือแบคทีเรียผ่าเหล่าทนทานต่อกรด (pH 2.0, 2.5, 3.0) น้ำดี และยาปฏิชีวนะ ลดต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียผ่าเหล่า LZ1 มีคุณสมบัติย่อยเม็ดเลือดแดงที่ลดลงแต่ยังคงมีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียดัชนี ดังนั้นจึงน่าจะนำไปศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติด้านอื่นๆ เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในแง่ของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (WU51109) และสำนักงานคณะกรรมการการวิจัย (RSA50008) ที่ให้เงินสนับสนุนการทำงานวิจัย ขอขอบคุณสำนักวิทยาศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์บางอย่างในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. กฤษณวัฒน์ นาคบุตร, กิ่ง ดาววีระกุล, อภิญา ชูพันธุ์. การศึกษาคุณสมบัติของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียหมายเลข SA14, SA15 หรือ SA16 ที่มีฤทธิ์ต้านสแตปฟีโลคอคคัสที่ดื้อยาเมธิซิลลิน. ภาคนิพนธ์เทคนิคการแพทย์ สำนักวิทยาศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, 2550.
2. ศรีญา หนูชม, ศราวุธ ปาลีโกชน, วาสนา จงต๊ะ. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของชีวสารที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ SA14. ภาคนิพนธ์เทคนิคการแพทย์ สำนักวิทยาศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, 2549.
3. Khaliq S, Akhtar K, Ghauri MA, Iqbal R, Khalid AM, Muddassar M. Change in colony morphology and kinetics of tyrosin production after UV and gamma irradiation mutagenesis of *Streptomyces fradiae* NRRL-2702. Microbiol Res (in press).
4. Wang HY, Liu DM, LiuY, Cheng CF, Huang Q, Zhang YZ. Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing. Lett Appl Microbiol 2006; 44 : 1-6.
5. Santos JA, Gonzalez CJ, Otero A, Lopez LGM. Hemolytic activity and production in different *Aeromonas* species isolate from fish. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 5612-14.
6. ภัทรชัย กิรติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพมหานคร : หจก.วี.เจ.พริ้นติ้ง 2549: 129-68.
7. รังสี UV. [serial online] Available from : URL : http://zftfoods.com/zftfoods/th/index.php?option=com_content&task=view&id=74&Itemid=41. [cited 2008 November 16].
8. ยาด้านจุลชีพ. [serial online] Available from : URL : http://www.natres.psu.ac.th/Department/AnimalScience/drug/PowerPoint/Antimicrobial_drugs/Antibac_Intro.pps [cited 2008 November 20].
9. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. เอนไซม์และสารบางอย่างที่สร้างโดยแบคทีเรีย. เอกสารคำสอนรายวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์, 2549: 9-11. (อัดสำเนา)
10. Savage MG. Improvement in Streptomycin-producing strain of *Streptomyces griseus* by ultraviolet and x-ray energy. Science 1949; 57: 429-41.
11. สุชาติ คุชชัยสิทธิ์. การผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในสัตว์เศรษฐกิจ. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 สาขาเกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร เศรษฐศาสตร์และบริหารธุรกิจ ศึกษาศาสตร์ มนุษยศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม วันที่ 3-6 กุมภาพันธ์ 2536: 285-99.
12. Sanders ME, Morelli L, Tompkins TA. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. Com Rev Food Sci Food Safety 2003; 2: 101-10.