

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลกระทบต่อการก่อสปอร์ของแอนแอโรบิก คล็อสทริเดียม โบ툴ินัม ทัยป์ เอ. เนื่องจากความร้อนและรังสีอุลตรา ไวโอเล็ต*

ดวงรัตน์ วิชาสถิต**

นราทร ธรรมบุตร** นิพนธ์ อุคมสันติสุข**

Vipastit D, Dhamabutra N, Udomsantisuk N. Study of the effect of heat and ultraviolet radiation on the sporulation of *Clostridium botulinum*, type A (ATCC # 9564). *Chula Med J* 1987 May; 31(5) : 399-407

The ATCC # 9564, anaerobic Clostridium botulinum type A, was exposed to physical agents such as heat and UV radiation for a given time and at a given temperature. UV irradiation was ineffective against Cl. butalinum, type A. When compared to heat exposure in the former induced the formation of resistant spores more rapidly than the latter. In this study the sporangium revealed the primary formation of resistant spores. Sublethal heat exposure and the ineffectiveness of UV irradiation have proven to be the primary factors in disease transmission.

The killing action of physical agents, the sudden death victims of botulism and the problems of food cooked by heat as well as food preserved by UV irradiation are also discussed in this article.

Reprint requests : Vipastit D, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.

Received for publications. August 9, 1986.

* ได้รับการสนับสนุนโดย Goodner Foundation, Philadelphia, USA.

** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมขาดอาหาร, ขาดสารประกอบไนโตรเจนหรือขาดธาตุคาร์บอน, จุลชีพแอนแอโรบิก clostridia ย่อมจะก่อเกิดสปอร์* โดยที่ Clostridium แต่ละตัวจะก่อ single internal spore เพื่อทนทานในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (unfavourable conditions) Clostridial spore ที่ก่อเกิดนี้ไม่มีกระบวนการดูดซึมอาหาร หรือขับถ่ายของเสียออกจากตัว (waste products) จึงนับได้ว่าสปอร์เป็น “resting cell” ที่ทนทาน ความแห้ง (desiccation), ความร้อน, ทนแสงอุลตราไวโอเล็ต (ultraviolet light) และทน chemical agents ต่าง ๆ ได้⁽¹⁾

ยิ่งไปกว่านี้ การที่จุลชีพ *Clostridium botulinum* สร้างสปอร์ที่ทนสิ่งแวดล้อมได้ดีนั้น ทำให้จุลชีพนี้สามารถปนเปื้อนอาหารที่ปรุงขึ้น และก่อโรคอาหารเป็นพิษ (botulism) ได้ง่ายกว่าจุลชีพไรสปอร์ ฉะนั้น ในธรรมชาติ สปอร์ของจุลชีพนี้จึงนับว่าเป็นกลไกการที่ยังชีพ (effective survival mechanism) ส่วนในทัศนะของระบาดวิทยานั้น สปอร์นี้ นับว่าเป็นกลไกการ (population control mechanism) ในการก่อโรคติดเชื้อที่สำคัญ⁽²⁾ ยิ่งไปกว่านี้ *Cl. botulinum* บางสายพันธุ์สามารถก่อสปอร์ทนทานสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้นานถึงกว่า 30 ปี โดยจำนวนสปอร์ลดลงอย่างช้า ๆ จาก 1.7×10^6 - 2.9×10^5 ในสภาวะที่มีอุณหภูมิระหว่าง 25°C ถึง +25°C⁽³⁾ จุลชีพนี้ย่อมจะก่อโรคอาหารเป็นพิษได้เสมอ แต่ที่มีอุบัติการณ์ของโรคนี้น้อยเป็นเพราะการวิเคราะห์หาจุลชีพก่อโรคแอนแอโรบัสทำได้ยาก ถ้าปราศจากอุปกรณ์ในการแยกวิเคราะห์

สำหรับประเทศไทย นับเนื่องจากมีรายงานแสดงถึงอุบัติการณ์ของจุลชีพ *Cl. botulinum*, type E จากอาหารทะเล และมีรายงานการพบผู้ป่วยที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษจาก *Cl. botulinum*, type A^(4,5) ประกอบกับหน่วยแอนแอโรบัส** มีจุลชีพ anaerobic lyophilized *Cl. botulinum*, type A (ATCC # 9564) จาก ATCC*** เป็น reference strain อยู่ และทางหน่วยฯ ยังมีอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงแอนแอโรบัสอย่างสมบูรณ์อยู่แล้ว ด้วยเหตุดังกล่าว คณะผู้วิจัยฯ จึงได้ศึกษา physical agents บางชนิดที่มีผลกระทบต่อสปอร์ของ *Cl. botulinum*, type A.

วัตถุประสงค์

- ก. ศึกษาผลกระทบของความร้อนและการแผ่รังสีอุลตราไวโอเล็ต ต่อจุลชีพ *Cl. botulinum*, type A (ATCC # 9564)
- ข. ความสำคัญของการก่อสปอร์ (sporangium) ของ *Cl. botulinum*

วัสดุและวิธีการ

1. วัสดุ

- 1.1 จุลชีพ แอนแอโรบิก *Cl. botulinum*, type A (ATCC # 9564)
- 1.2 อาหารเลี้ยง *Cl. botulinum* type A ประกอบด้วย
 - 1.2.1 Selective media หลายชนิดตามแบบของ Narathorn และคณะ, Holdeman และคณะ^(6,7,8,9)
 - 1.2.2 อาหารพิเศษ (Wynne's media) เพื่อเร่งการก่อสปอร์ของ *Cl. botulinum* type A⁽¹⁰⁾
 - 1.2.3 บร็อธ (broth) ที่ประกอบด้วย trypticase ร้อยละ 5, peptone ร้อยละ 0.5, sodium thioglycollate ร้อยละ 0.1 (TPT) เพื่อเพาะเลี้ยงสปอร์ที่ก่อกำขึ้น
- 1.3 Anaerobic equipments ประกอบด้วย anaerobic incubator, chamber, CO₂ cabinet, jar กับ Oxoid gas generator kit และบร็อธที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแอนแอโรบัส^(8,9,10)
- 1.4 ตู้เย็น G.E. ชนิด continuous centrifugation system**** UV-lamp, ของ General Electric Co., Type G-15 T8, 15 Watts ซึ่งมีรังสี 253.7 nm/mm.²

2. วิธีการ

- 2.1 เพาะเลี้ยง *Cl. botulinum* type A (ATCC # 9564) ใช้วิธีการตามแบบ

* sporulation

** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

*** American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. U.S.A.

**** Model PR-Z, International Equipment Company (G.E.) 1284, Soldiers Road, Boston, Mass. U.S.A.

Narathorn และคณะ, Holdeman และคณะ^(6,7,8,9) ซึ่งต้องอาศัย anaerobic equipments หลายชนิด^(8,9,11)

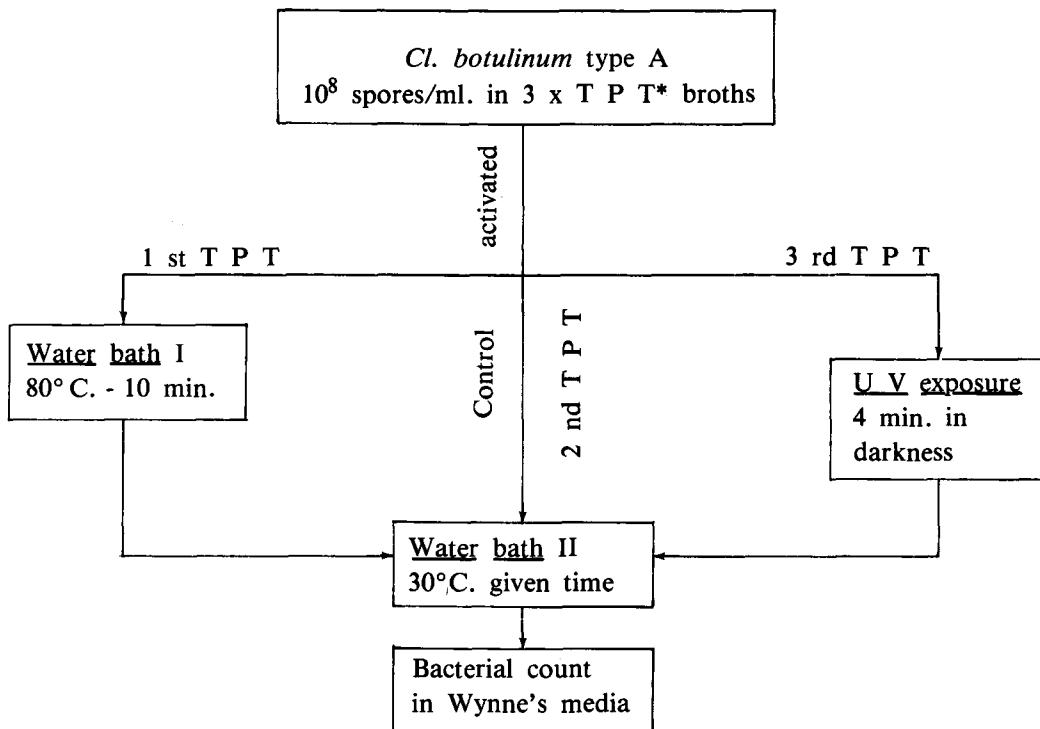
2.2 เตรียม spore-free-medium^(11,12,13)

2.2.1 เพาะเลี้ยง *Cl. botulinum* ดังกล่าวใน Wynne's media และปรุ้งให้มีสปอร์จำนวน 10^8 /มล. นำมาเก็บใน TPT บริสุทธิ์จำนวน 15 มล. 3 หลอด, ต่อมานำสปอร์ที่ก่อดำด้วย M/15 phosphate buffer และปั่นใน refrigerated continuous centrifugation ต่อมาเขย่าด้วย glass

beads 10 นาที เพื่อทำลาย non-spore-clump กรอง spore suspension ด้วย sintered-glass filter เก็บในตู้เย็นธรรมดาพร้อมที่จะใช้

2.3 ศึกษาผลกระทบของความร้อนและรังสี UV ว่าการก่อสปอร์ของ *Cl. botulinum*, type A ถ้ายสปอร์ที่ล้างแล้ว (10^8 สปอร์/มล.) ใน TPT บริสุทธิ์ จำนวน 3 หลอดลงใน Thunberg anaerobic meter flasks 3 ใบ แต่ละ flask ทำให้เป็น 100 มล. ด้วย TPT บริสุทธิ์

Figure 1 Diagram showing steps of exposure to various physical agents.



* T P T = Trypticase peptone thioglycollate broth.

2.3.1 นับจำนวนแอนแอโรบัสหลังสัมผัสความร้อนและรังสี Flask ใบที่ 1 แช่อ่างอุ่น 80°C (Water Bath I) นาน 10 นาที ต่อมาย้ายมาแช่ในอ่างอุ่นอันที่ 2 อุณหภูมิ 30°C (Water Bath II) เมื่อครบ 2 ชม. แรกเก็บแซมเปิล

ตรวจต่อไปเก็บทุก 3 ชม. เป็นเวลาติดต่อกันนาน 37 ชม. นำทุกแซมเปิลไป "seed" ในอาหารปรุ้งเพื่อนับจำนวนแอนแอโรบัสในแซมเปิล^(6,7,8,9) Flask ใบที่ 2 แช่อ่างอุ่นใบที่ 2 ตลอดเวลา (Water Bath II) และเก็บแซมเปิล

มานับจำนวนแอนแอโรบัสตามเวลา
ที่กำหนด เช่นเดียวกับ flask
ใบที่ 1

Flask ใบที่ 3 exposed ต่อรังสี
UV โดยให้มีระยะห่างกัน 21 ซม.
นาน 4 นาที ในห้องมืด เมื่อครบ
เวลา นำ flask นี้ไปแช่ใน Wa-
ter Bath II เก็บแชมเปิดมานับ
จำนวนแอนแอโรบัสตามเวลาที่
กำหนดเช่นเดียวกับ flask ใบที่ 1
และ 2

2.3.2 ศึกษาสัณฐานโดยกล้องจุลทรรศน์
ย้อมสีแกรมทุกแชมเปิด เพื่อดู
vegetative form ดูเวลาที่แอน-
แอโรบัสก่อ sporangium หรือ
เป็นสปอร์สมบูรณ์แล้ว โดยใช้
กล้องจุลทรรศน์ phase contrast
A-O-Spensor # 1-4 วิธีการ
ศึกษานี้แสดงใน Figure 1a



Figure 1 a The typical sporangium of *Cl. botulinum* type A (A T C C # 9564).

ผลการศึกษา

ความร้อนกระตุ้นให้ *Cl. botulinum*, type A (ATCC
9564) ก่อสปอร์ชั่วโมงที่ 11 และจำนวนสปอร์เพิ่มขึ้น
เรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 34 (Table 1) ส่วนการก่อเกิด
sporangium นั้น พบครั้งแรกเมื่อชั่วโมงที่ 11 (Table 2)

รังสี UV กระตุ้นให้แอนแอโรบัสนี้ ก่อสปอร์
ทนทานชั่วโมงที่ 8 (Table 1) ส่วนการก่อเกิด sporangium
นั้น พบเมื่อชั่วโมงที่ 5 (Table 2)

รังสี UV กระตุ้น *Cl. botulinum*, type A
ให้ก่อสปอร์ทนทานเร็วกว่าความร้อน

Table 1 Enumeration of *Cl. botulinum*, type A (A T C C # 9564) after the given exposure time to heat or U V radiation.

The physical agents	Exposure time to various physical agents (hours)									
	Hours of exposure (on the day of study)					Hours of exposure (on the next day of study)				
	2 (8 AM) [*]	5 (11 AM)	8 (2 PM)	11 (5 PM)	14 (8 PM)	25 (7 AM)	28 (10 AM)	31 (1 PM)	34 (4 PM)	37 (7 PM)
1. Heat exposure 80°C for 10 min.	0 ^{***}	0	0	4.5 × 10 ² ^{**}	6.3 × 10 ²	2.7 × 10 ⁵	4.5 × 10 ⁵	6.3 × 10 ⁵	7.2 × 10 ⁵	0.9 × 10 ⁶
2. U V radiation exposure (4 min) in darkness	0	0	4.5 × 10 ²	6.3 × 10 ²	0.9 × 10 ⁴	4.5 × 10 ⁴	6.3 × 10 ⁴	7.2 × 10 ⁴	8.1 × 10 ⁴	0.9 × 10 ⁵
3. Control	1 × 10 ⁸	1.8 × 10 ⁸	4.5 × 10 ⁸	7.2 × 10 ⁸	6.3 × 10 ⁸	4.5 × 10 ⁸	0.9 × 10 ⁸	8.1 × 10 ⁷	5.4 × 10 ⁷	4.5 × 10 ⁷

*in parenthesis were the time before and after noon (12 O'clock).

**The value was the average of triplicate-counts.

***No growth.

Table 2 Microscopic morphology of *Cl. botulinum*, type A (A T C C # 9564) resistant spores from the donated samples after exposure to heat or U V radiation.

The physical agents	Exposure time to various physical agents (hours)									
	Hours of exposure (on the day of study)					Hours of exposure (on the next day of study)				
	2 (8 AM)	5 (11 AM)	8 (2 PM)	11 (5 PM)	14 (8 PM)	25 (7 AM)	28 (10 AM)	31 (1 PM)	34 (4 PM)	37 (7 PM)
1. Heat exposure 80°C for 10 min.	+	+	+	+ S	+ S	+ S	+ S	+ S	+ S	+ S
	0	SV	SV	SV	V	V	V	V	V	V
								C	C	
2. U V radiation exposure (4 min) in darkness	+	+ S	+ S	+ S	+ S	+ S	+ S	+ S	+ S	+ S
		SV	SV	V	V	V	V	V	V	V
3. Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SV	V	V	V	V	V	V	V	V _C	V _C

Note :

+ = spores presentation;

C = contamination;

0 = no organisms.

V = vegetative forms;

SV = no vegetative forms;

+ S = spores in sporangium;

วิจารณ์

การศึกษานี้ใช้ *Clostridium botulinum* type A ซึ่งเป็นแอนแอโรบัสสายพันธุ์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ (botulism) มากที่สุด แม้ว่าการวิจัยนี้เป็นในห้องปฏิบัติการ แต่ก็เลียนแบบปฏิบัติการก่อโรคอาหารเป็นพิษในธรรมชาติ ซึ่งเห็นได้จากอุณหภูมิจนใน Water Bath I กำหนดให้มี 80° C ซึ่งเป็น sublethal temperature อุณหภูมิในการปรุงอาหารประเภทยำ ปลา มัก จะไม่ถึง 100° C สปอร์ทนทานเกิดขึ้นได้ง่าย อุณหภูมิใน Water Bath II นั้น เป็นอุณหภูมิต่ำ ๆ ไป ในสิ่งแวดล้อม จึงเป็นอุณหภูมิพอเหมาะที่แอนแอโรบิค *Cl. botulinum* นี้เจริญเติบโต ส่วนรังสี UV ที่ใช้นี้ ระยะระหว่างต้นกำเนิดรังสีถึงแอนแอโรบัสห่างกันถึง 21 ซม. ซึ่งระยะทางขนาดนั้นนับว่าเป็น sublethal

dose ของรังสี

โดยทั่ว ๆ ไปนั้น แอนแอโรบัสจะก่อสปอร์ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะ dehydrated-state หรือในผนัง cell wall ของจุลชีพแอนแอโรบัสมี Calcium dipicolinate คั่งจำนวนมาก (Fig. 2)⁽¹⁾ การนำ *Cl. botulinum* มาเพาะเลี้ยงใน media ธรรมดาจึงไม่เกิดสปอร์ง่าย Media ที่ใช้ในการศึกษามี trypticase, peptone และ sodium thioglycollate เป็นอาหารที่เพียงพอ⁽¹⁴⁾ การก่อสปอร์ทนทานที่เกิดขึ้นจึงเนื่องมาจากการกระตุ้นโดยตรงของความร้อนหรือรังสี UV การนับโคโลนี ซึ่งได้จากสปอร์ที่ทนทานงอกออกมาเป็น vegetative form นั้นได้ทำซ้ำกันถึง 3 ครั้ง เพื่อให้ได้ความแม่นยำ การนับโคโลนี ที่ 17 ชั่วโมงทำไม่ได้เพราะเป็นเวลายาวเกินไป การใช้รังสี UV ในห้องมืดก็เพื่อป้องกัน photoreactivation.⁽¹⁵⁾

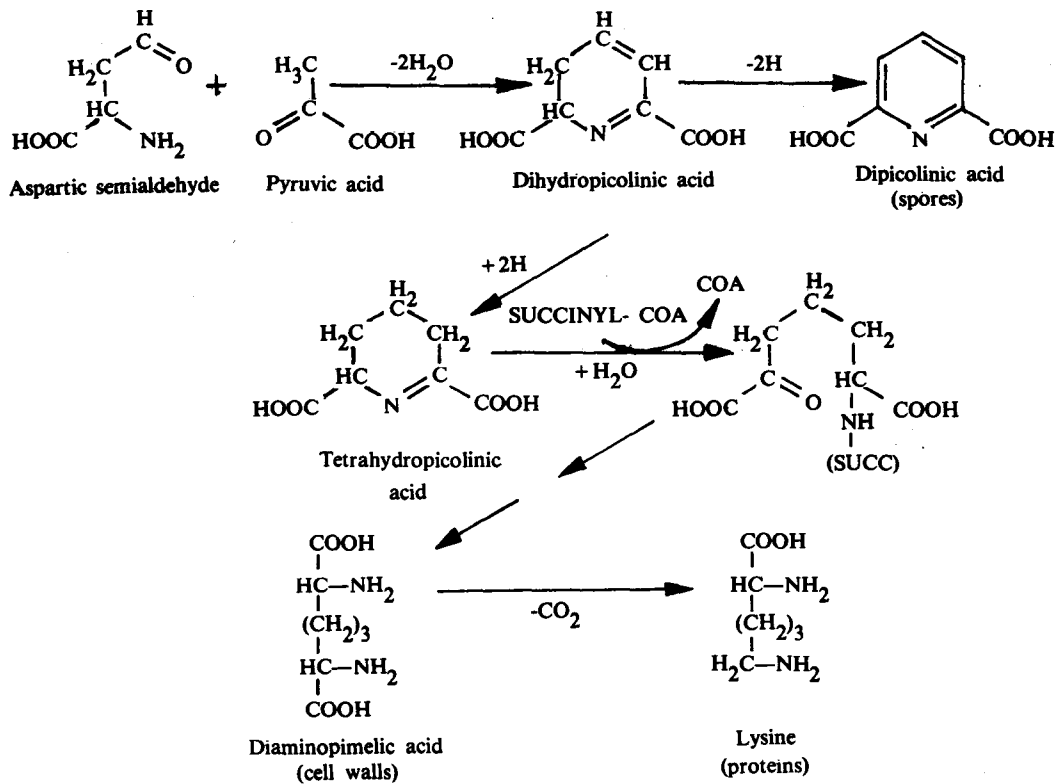


Figure 2 Biosynthesis of dipicolinic acid, diaminopimelic acid and lysine.⁽¹⁾

จากตารางที่ 1, สปอร์ทนความร้อนเกิดขึ้นเมื่อชั่วโมงที่ 11 ส่วนสปอร์ที่ทนรังสี UV ก่อขึ้นเมื่อชั่วโมงที่ 8. จำนวน surviving spores เพิ่มขึ้นเร็วเป็น "plateau" เมื่อชั่วโมงที่ 14 ถึงชั่วโมงที่ 25 (Fig. 3)

ในกลุ่มคอนโทรล เมื่อชั่วโมงที่ 11 จำนวนแอน-

แอโรบัสอยู่ใน maximum stationary phase ส่วนจำนวนแอนแอโรบัสในกลุ่มสัมผัสความร้อนและรังสี UV กลับอยู่ใน lag phase และ early acceleration phases (Fig. 3)

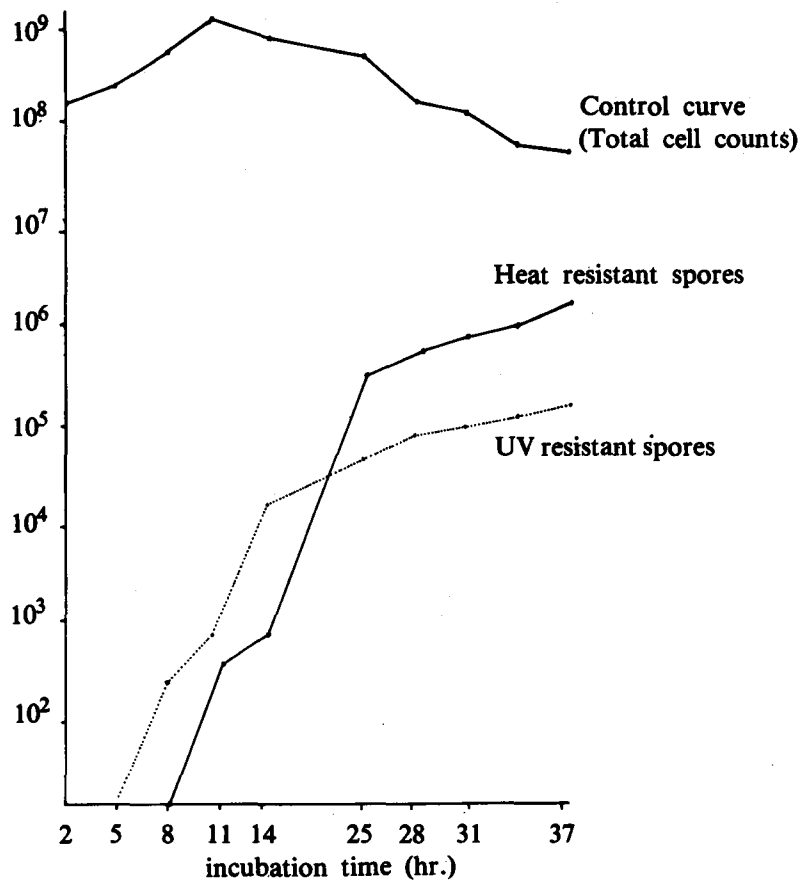
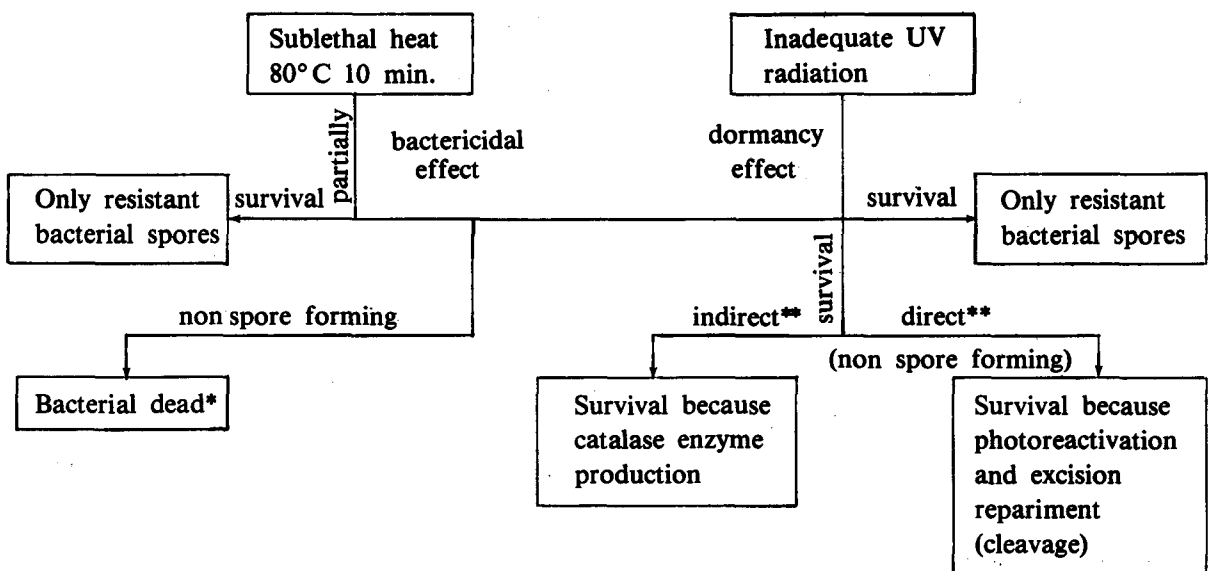


Figure 3 Development of resistance to heat and U V radiation during the sporulating cycle of *Cl. botulinum* type A-A T C C # 9654. Each point represents the average of triplicate counts.

ในกลุ่มคอนโทรล นั้น จำนวนแอนแอโรบิก *Cl. botulinum* นับได้อยู่ในระยะ decline phase กลุ่มที่ สัมผัสความร้อนและรังสี UV ในระยะ acceleration phase (Fig. 3)

Figure 4 Diagram showing the effect of physical agents to the sporeforming bacteria



*denatured bacterial protein.

**direct and indirect effects to resistant bacteria.

ฉะนั้น รังสี UV มีประสิทธิภาพด้อยกว่าความร้อน เพราะรังสี UV กระตุ้นให้เกิด resistant *Cl. botulinum* type A เร็วกว่าสัมผัสความร้อน (Table 1)

เมื่อคุณลักษณะแอนแอโรบิสนี้ด้วยจุลทรรศน์ phase contrast เห็นสปอร์ได้ชัดเจน การย้อมสีแกรมจากแฮมเปิล ชั่วโมงที่ 11 หลังจาก expose ต่อความร้อนและรังสี UV พบ vegetative cells ลดลง แต่กลับพบ sporangium มากขึ้น (Table 2) ในกลุ่มคอนโทรลไม่พบ sporangium เลย ตรงกันข้ามกับกลุ่มที่สัมผัสความร้อนและรังสี UV กลับพบ sporangium ได้ชัดเจน (Fig. 1a) ฉะนั้น sporangium จึงนับได้ว่าเป็นดรรชนีในการเกิด "resistant spores" ใหม่ การศึกษาเรื่องนี้ชี้ให้เห็นว่า ในธรรมชาติ sporangium จะเกิดก่อนมี new resistant spores ด้วยเช่นกัน

Sublethal heat ก๊าซ หรือรังสี UV ก๊าซ ย่อมจะฆ่า vegetative form ของ *Cl. botulinum*, type A ได้เป็นส่วนมาก ส่วนสปอร์ที่เกิดขึ้นไม่ถูกทำลายไปได้ (Fig.4) ฉะนั้นการก่อเกิดสปอร์ท่อนั้น นอกจากสิ่งแวดล้อมอาหารแล้ว การสัมผัส sublethal heat หรือรังสี UV เกิด sporulation ได้เสมอ ยิ่งไปกว่านี้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าในการปรุงอาหารเพื่อบริโภคที่ดี การใช้รังสี UV เพื่อถนอมอาหารที่ดี ถ้าใช้ขนาดไม่ต่ำกว่ามาตรฐาน (inappropriate physical agents) ย่อมกระตุ้นการเกิด resistant spores และก่อโรคอาหารเป็นพิษ (botulism) ก็เกิดขึ้นได้โดยง่าย

อนึ่ง ในปัจจุบันมีการใช้รังสี UV นี้ในการถนอมอาหารหลายชนิด ส่วนปัญหาที่ว่าจะมีรังสีตกค้างในอาหารและก่อเกิดโรคมะเร็งนั้น ได้มีการพิสูจน์แล้วว่าเป็นความจริง เพราะ ionizing radiation ชนิดนี้จะหายไปจากการปนเปื้อนได้เร็วมาก ยิ่งไปกว่านั้น รังสีชนิดนี้จะไม่ทำให้กลิ่นและรสชาติของอาหารผิดไปจากเดิมด้วย⁽¹⁶⁾

ในธรรมชาติ สปอร์ของ *Cl. botulinum* มีอยู่

ในดินทั่วไป โอกาสที่จะปนเปื้อนผักผลไม้ และอาหารอื่น ๆ ย่อมมีมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่นำมาบรรจุกระป๋องก่อนนำมาบริโภคควรให้ความร้อนให้เพียงพอเพื่อให้แน่ใจว่าจะไม่มีสปอร์ทน หลงเหลืออยู่ มิฉะนั้นจะเกิดอันตรายเมื่อบริโภคอาหารดังกล่าวตามที่มิตัวอย่างผู้ที่บริโภคอาหารที่ปนเปื้อน เกิดโรคอาหารเป็นพิษจนถึงแก่ความตาย⁽¹⁷⁾ การทำ home canned foods โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารประเภทถั่ว (string beans) และ corn ตลอดจนอาหารรมควันหรืออาหารในหม้อตุ๋นสุญญากาศที่ดี (smoked fish, vacuum-packed fresh fish ใน plastic bags) ควรจะทำให้ถูกวิธีการและควรจะนำมาต้มไม่น้อยกว่า 20 นาทีก่อนบริโภค^(1,18)

สำหรับในประเทศไทยนั้น กระทรวงอุตสาหกรรมมองเห็นอันตรายจากโรคอาหารเป็นพิษ จึงกำหนดมาตรฐานในการผลิตอาหารกระป๋องทุกชนิดให้ถูกหลักวิชาการเหมือนสากลทั่วโลก มิฉะนั้นจะเกิดอันตรายถึงชีวิตตามที่ปรากฏเสมอ ๆ ในต่างประเทศ^(17,18)

สรุป

ความร้อนที่ต่ำกว่าจุดเดือดหรือรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีผลกระทบต่อแอนแอโรบิก คลอสตริเดียม โบทูลินัม, ทัยบีเอ. โดยกระตุ้นแอนแอโรบิสนั้นให้ก่อสปอร์ที่ทนทาน เปรียบได้กับการใช้ความร้อนไม่สูงพอในการปรุงอาหารหรือใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตไม่ถูกวิธี ในการถนอมอาหารสิ่งเหล่านี้จะเกิดสปอร์ทนทาน ปนเปื้อนอาหารและโรคโบทูลิซึมในชุมชนงานวิจัยนี้พบว่า รังสีอัลตราไวโอเล็ตกระตุ้นให้แอนแอโรบิสนี้ก่อสปอร์ทน เร็วกว่าความร้อนที่ต่ำกว่าจุดเดือด นอกจากนั้น งานวิจัยนี้ยังพบว่าการสัมผัสกับ physical agents ใดก็ตาม sporangium ที่ตรวจพบย่อมจะเป็นดรรชนีให้ทราบ ว่า แอนแอโรบิสนี้จะก่อเกิดสปอร์ทนขึ้น

อนึ่ง ในงานวิจัยนี้ คณะผู้รายงานยังวิจารณ์การใช้ความร้อนที่เหมาะสม การใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตให้ถูกวิธีการสามารถป้องกันการก่อสปอร์ทน และป้องกันโรคโบทูลิซึมได้ดี

อ้างอิง

1. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Review of Medical Microbiology. 13 ed. Los Altos, California : Lange Medical Publication, 1978. 23, 25, 194
2. Slepecky RA. Ecology of bacterial sporeformers. In : Spores V. Halvorson HO, Hanson R, Cambell LL eds. Spores. Washington : American Society Microbiology, 1972.
3. Louis DS Smith. Botulism, The organism, its toxins, the disease. In : Albert Balows eds. Botulism. Springfield, Illinois : Charles C Thomas, 1977. 49-53
4. Narathorn D, Somying T. Isolation of *Clostridium botulinum*, type E from seafood.

- Siriraj Med Garz 1981 Aug; 33(8) : 493-500
5. Dolaya S, Sravuth S. Botulism. J Infect Dis Antimicrob Agents 1982; 5 : 220-226
 6. Narathorn D, Sripayak B, Thunyahan S. Bacterial flora of health and infected women's vaginal and cervical areas. Chula Med J 1982 Nov; 26(6) : 592-541
 7. Narathorn D, Kamol-Rathanukul P, Lertpocasombat K, Chuntaruchada S. Bacteriology of penile lesions. Chula Med J 1984 Jul; 28(7) : 745-768
 8. Narathorn D, Prachub T, Duangrath V. Isolation of anaerobic bacteria from clinical samples. Chula Med J 1972 Jul; 17(3) : 130-135
 9. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. Anaerobe Laboratory Manual. 4 ed. Blackbury, Virginia : Polytechnics Institute of Anaerobe and State University, 1977. 105
 10. Suzuki JB, Grecz N. A study of metabolic factors involved in the intracellular germination of Clostridium botulinum spores after phagocytosis. J Med Microbiol 1972 Nov; 5(4) : 381-394
 11. Narathorn D, Narinrath P, Kuncharee L. Management of "Home Made" anaerobic chamber. Bull Med Tech Assoc Thai 1981 Jan; 9(1) : 8-24
 12. Durban E, Goodnow R, Grecz N. Changing in resistance and heat during sporulation and germination of Clostridium botulinum 33 A. J Bacteriol 1970 May; 102(2) : 590-592
 13. Narathorn D, Phuphaibul K. Primary report on enumeration and identification of microorganisms in urinary tract-infections. Chula Med J 1968 Jan; 13(1) : 8-18
 14. Vinter V. The formation of cystine-rich structure in sporulating cells and its possible role in the resistance of spores. In : Halvorsan HO, ed. Spores II Minneapolis : Burgess Publishing, 1961. 127-141
 15. Lawrence CA, Black SS. Disinfection, Sterilization and Preservation. In : Lawrence CA, Black SS, eds. Medical Microbiology. Philadelphia : Lea & Febiger, 1968.
 16. Griffin SP. Radiation safe for food preservation. In : Waxman JS, ed. College of Graduate Studies News. Philadelphia : Thomas Jefferson University, 1985. 9
 17. Howard J. The canned menace called botulism. Life Magaz 1971 Sep; 71(11) : 26-31
 18. Regulation from Joint FAO/WHO food standard programme. Codex Alimentarius Commission. 1969.