Chulalongkorn Medical Journal

Volume 31
Issue 5 *May 1987*

Article 7

5-1-1987

ผลกระทบต่อการก่อสปอร์ของแอนแอโรบิค คล๊อสตริเดียม โบทูลินุ่ม ทัยป์ เอ. เนื่องจากความร้อนและอุลตร้าไวโอเล็ต

ดวงรัตน์ วภาสถิต

นราทร ธรรมขุตร

นิพนธ์ อุดมสันติสุข

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

วภาสถิต, ดวงรัตน์; ธรรมขุตร, นราทร; and อุดมสันติสุข, นิพนธ์ (1987) "ผลกระทบต่อการก่อสปอร์ของแอนแอโรบิค คล๊อสตริเดียม โบทูลินุ่ม ทัยป์ เอ. เนื่องจากความร้อนและอุลตร้าไวโอเล็ต," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 31: Iss. 5, Article 7.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol31/iss5/7

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลกระทบต่อการก่อสปอร์ของแอนแอโรบิค คล๊อสตริเดียม โบทูลินุ่ม ทัยป์ เอ. เนื่องจากความร้อนและรังสีอุลตร้าไวโอเล็ต*

ดวงรัตน์ วิภาสถิต**
นราทร ธรรมบุตร** นิพนธ์ อุดมสันติสุข**

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 lather. 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, จุลชีพแอนแอโรบิค clostridia ย่อมจะก่อเกิดสปอร์* โดยที่ Clostridium แต่ละตัวจะก่อ single internal spore เพื่อทนทานในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (unfavourable conditions) Clostridial spore ที่ก่อเกิดนี้ไม่มีกระบวนการดูดซึมอาหาร หรือขับถ่ายของเสียออกจากตัว (waste products) จึงนับได้ว่าสปอร์เป็น "resting cell" ที่ทนทาน ความแห้ง (desiccation), ความร้อน, ทนแสงอุลตร้า (ultraviolet light) และทน chemical agensts ต่าง ๆ ได้[1]

ยิ่งไปกว่านี้ การที่จุลชีพ *Clostridium botulinum* สร้างสปอร์ที่ทนสิ่งแวดล้อมได้ดีนั้น ทำให้จุลชีพนี้สามารถปนเปื้อนอาหารที่ปรุงขึ้น และก่อโรคอาหารเป็นพิษ (botulism) ได้ง่ายกว่าจุลชีพไร้สปอร์ ฉะนั้น ในธรรมชาติสปอร์ของจุลชีพนี้จึงนับว่าเป็นกลวิธานที่ยังชีพ (effective survival mechanism) ส่วนในทัศนะของระบาดวิทยานั้นสปอร์นี้นับว่าเป็นกลวิธาน (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 แต่ที่มีอุบัติการของโรคนี้น้อยเป็นเพราะการวิเคราะห์หาจุลชีพก่อโรคแอนแอโรบส์ทำได้ยาก ถ้าปราศจากอุปกรณ์ในการแยกวิเคราะห์

สำหรับประเทศไทย นับเนื่องจากมีรายงานแสดงถึงอุบัติการณ์ของจุลชีพ *Cl. botulinum*, type E จากอาหารทะเล และมีรายงานการพบผู้ป่วยที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษจาก *Cl. botulinum*, type A[4,5] ประกอบกับหน่วยแอนแอโรบส์** มีจุลชีพ anaerobic lyophelized *Cl. botulinum*, type A (ATCC # 9564) จาก ATCC*** เป็น reference strain อยู่ และทางหน่วยฯ ยังมีอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงแอนแอโรบส์อย่างสมบูรณ์อยู่แล้ว ด้วยเหตุดังกล่าว คณะผู้วิจัยฯ จึงได้ศึกษา physical agents บางชนิดที่มีผลกระทบต่อการก่อสปอร์ของ *Cl. botulinum*, type A.

วัตถุประสงค์

ก. ศึกษาผลกระทบของความร้อนและการแผ่รังสีอุลตร้าไวโอเล็ต ต่อจุลชีพ *Cl. botulinum*, type A (ATCC # 9564)

ข. ความสำคัญของการก่อปฐมสปอร์ (sporangium) ของ *Cl. botulinum*

วัสดุและวิธีการ

1. **วัสดุ**
   - 1.1 จุลชีพ แอนแอโรบิค *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 บร๊อธ (broth) ที่ประกอบด้วย trypticase ร้อยละ 5, peptone ร้อยละ 0.5, sodium thioglycollate ร้อยละ 0.1 (TPT) เพื่อเพาะเลี้ยงสปอร์ที่ก่อขึ้น
   - 1.3 Anaerobic equipments ประกอบด้วย anaerobic incubator, chamber, CO_2 cabinet, jar กับ Oxoid gas generator kit และบร๊อธที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแอนแอโรบส์[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, Marryland. U.S.A.

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

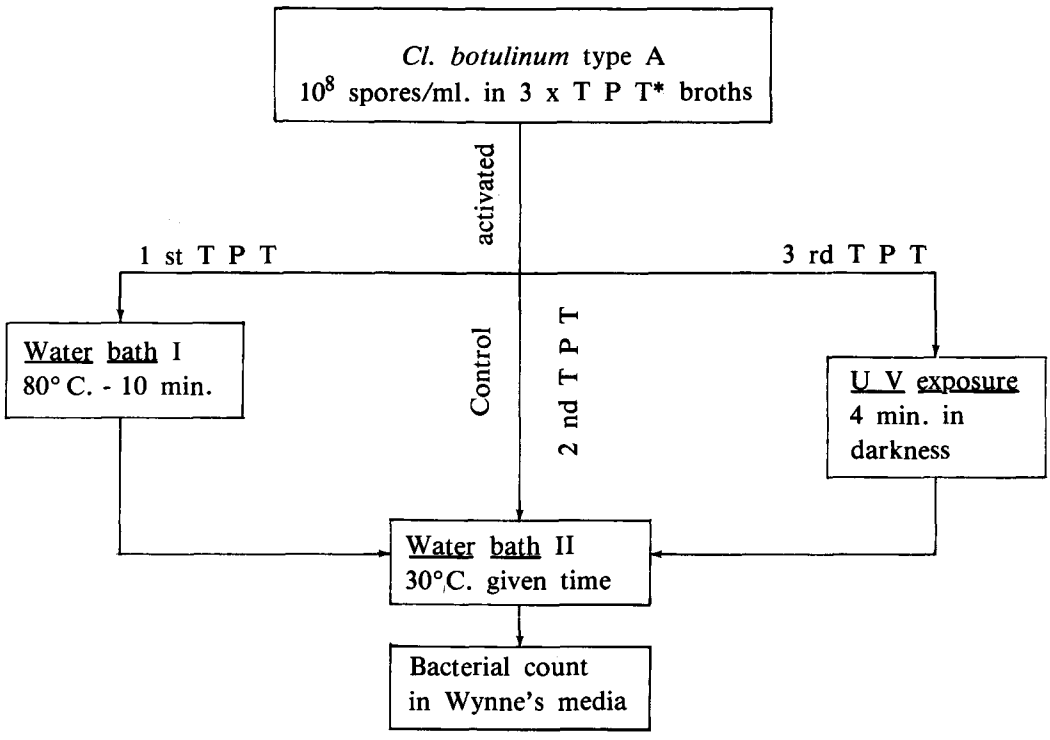
Narathorn และคณะ, Holdeman และคณะ[6,7,8,9] ซึ่งต้องอาศัย anaerobic equipments หลายชนิด[8,9,11]

2.2 เตรียม spore-free-medium[11,12,13]

2.2.1 เพาะเลี้ยง *Cl. botulinum* ดังกล่าวใน Wynne's media และปรุงให้มีสปอร์จำนวน 10^8/มล. นำมาเก็บใน TPT บร๊อธจำนวน 15 มล. 3 หลอด, ต่อมานำสปอร์ที่ก่อมาล้างด้วย M/15 phosphate buffer และปั่นใน refrigerated continouous 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 ถ่ายสปอร์ที่ล้างแล้ว (10^8 สปอร์/มล.) ใน TPT บร๊อธ จำนวน 3 หลอด ลงใน Thunberg anaerobic meter flasks 3 ใบ แต่ละ flask ทำให้เป็น 100 มล. ด้วย TPT บร๊อธ

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



* T P T = Trypticase peptone thioglycollate broth.

2.3.1 นับจำนวนแอนแอโรบส์หลังสัมผัสความร้อนและรังสี Flask ใบที่ 1 แช่อ่างอุ่น 80° C (Water Bath I) นาน 10 นาที ต่อมาย้ายมาแช่ในอ่างอุ่นอันที่ 2 อุณหภูมิ 30° C (Water Bath II) เมื่อครบ 2 ช.ม. แรกเก็บแซมเปิลตรวจต่อไปเก็บทุก 3 ช.ม. เป็นเวลาติดต่อกันนาน 37 ช.ม. นำทุกแซมเปิลไป "seed" ในอาหารปรุงเพื่อนับจำนวนแอนแอโรบส์ในแซมเปิล[6,7,8,9] Flask ใบที่ 2 แช่อ่างอุ่นใบที่ 2 ตลอดเวลา (Water Bath II) และเก็บแซมเปิล

มานับจำนวนแอนแอโรบส์ตามเวลาที่กำหนด เช่นเดียวกับ flask ใบที่ 1

Flask ใบที่ 3 exposed ต่อรังสี UV โดยให้มีระยะห่างกัน 21 ซ.ม. นาน 4 นาที ในห้องมืด เมื่อครบเวลา นำ flask นี้ไปแช่ใน Water Bath II เก็บแซมเปิลมานับจำนวนแอนแอโรบส์ตามเวลาที่กำหนดเช่นเดียวกับ flask ใบที่ 1 และ 2

2.3.2 ศึกษาสัณฐานโดยกล้องจุลทรรศน์ ย้อมสีแกรมทุกแซมเปิล เพื่อดู vegetative form ดูเวลาที่แอนแอโรบส์ก่อ sporangium หรือเป็นสปอร์สมบูรณ์แล้ว โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast A-O-Spensor # 1-4 วิธีการศึกษานี้แสดงใน 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 และจำนวนสปอร์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 34 (Table 1) ส่วนการก่อเกิด sporangium นั้น พบครั้งแรกเมื่อชั่วโมงที่ 11 (Table 2)

รังสี UV กระตุ้นให้แอนแอโรบส์นี้ ก่อสปอร์ทนทานชั่วโมงที่ 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.	+ 0	+ SV	+ SV	+ S SV	+ S V	+ S V	+ S V	+ S V	+ S V C	+ S V C
2. U V radiation exposure (4 min) in darkness	+	+ S SV	+ S SV	+ S V	+ S V	+ S V	+ S V	+ S V	+ S V	+ S V
3. Control	+ SV	+ V	+ V	+ V	+ V	+ V	+ V	+ V	+ V_C	+ V_C

Note :

+ = spores presentation; C = contamination; 0 = no orgainisms.

V = vegetative forms; SV = no vegetative forms; + S = spores in sporangium;

วิจารณ์

การศึกษานี้ใช้ *Clostridium botulinum* type A ซึ่งเป็นแอนแอโรบส์สายพันธุ์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ (botulism) มากที่สุด แม้ว่าการวิจัยนี้เป็นในห้องปฏิบัติการ แต่ก็เลียนแบบอุบัติการก่อโรคอาหารเป็นพิษในธรรมชาติ ซึ่งเห็นได้จากอุณหภูมิใน Water Bath I กำหนดให้มี 80° C ซึ่งเป็น sublethal temperature อุณหภูมิในการปรุงอาหารประเภทยำ พล่า มัก จะไม่ถึง 100° C สปอร์ทนทานเกิดขึ้นได้ง่าย อุณหภูมิใน Water Bath II นั้น เป็นอุณหภูมิทั่ว ๆ ไป ในสิ่งแวดล้อม จึงเป็นอุณหภูมิพอเหมาะที่แอนแอโรบิค *Cl. botulinum* นี้เจริญเติบโต ส่วนรังสี UV ที่ใช้นี้ ระยะระหว่างต้นกำเนิดรังสีถึงแอนแอโรบส์ห่างกันถึง 21 ซ.ม. ซึ่งระยะห่างขนาดนี้นับว่าเป็น sublethal dose ของรังสี

โดยทั่ว ๆ ไปนั้น แอนแอโรบส์จะก่อสปอร์ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะ dehydrated-state หรือในผนัง cell wall ของจุลชีพแอนแอโรบส์มี Calcium dipicolinate ดั่งจำนวนมาก (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 ชั่วโมงทำไม่ได้เพราะเป็นเวลาเที่ยงคืน การใช้รังสี UV ในห้องมืดก็เพื่อป้องกัน photoreactivation.[15]

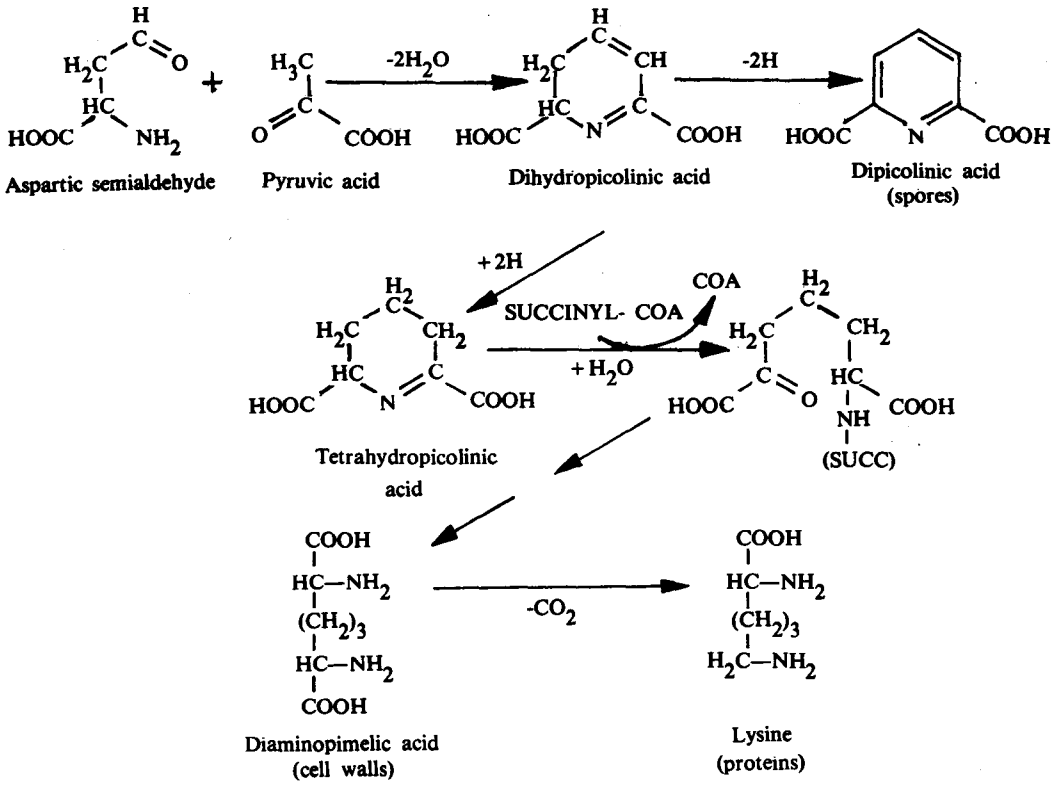


Figure 2 Biosynthesis of dipicolinic acid, diaminopimelic acid and lysine.[1]

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

ในกลุ่มคอนโทรล เมื่อชั่วโมงที่ 11 จำนวนแอนแอโรบส์อยู่ใน maximum stationary phase ส่วนจำนวนแอนแอโรบส์ในกลุ่มสัมผัสความร้อนและรังสี UV กลับอยู่ใน lag phase และ early accelaration phases (Fig. 3)

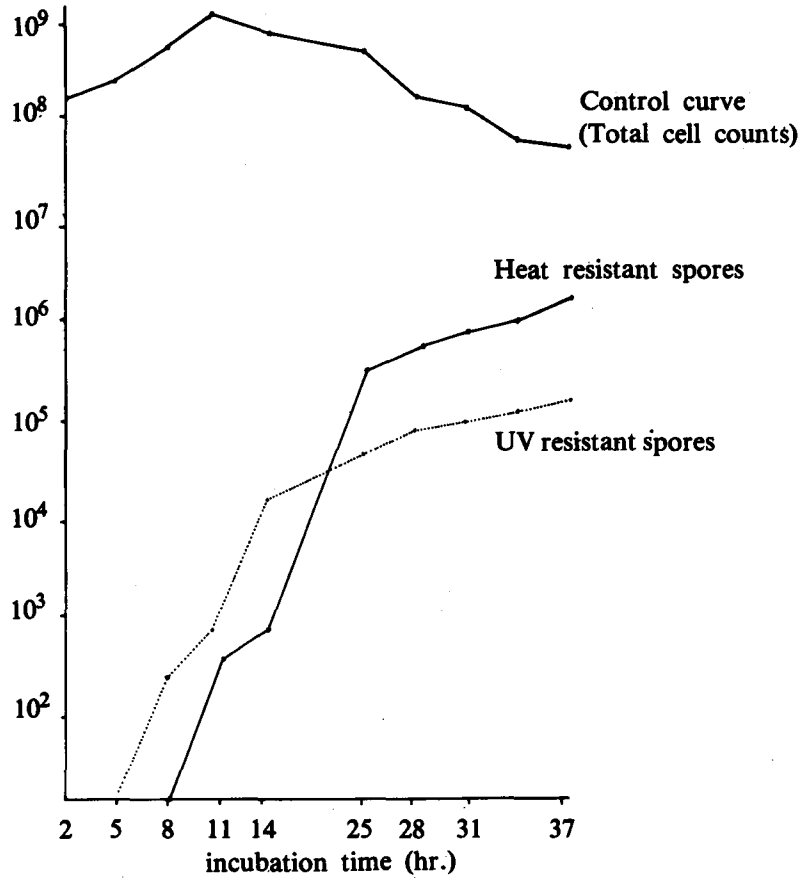
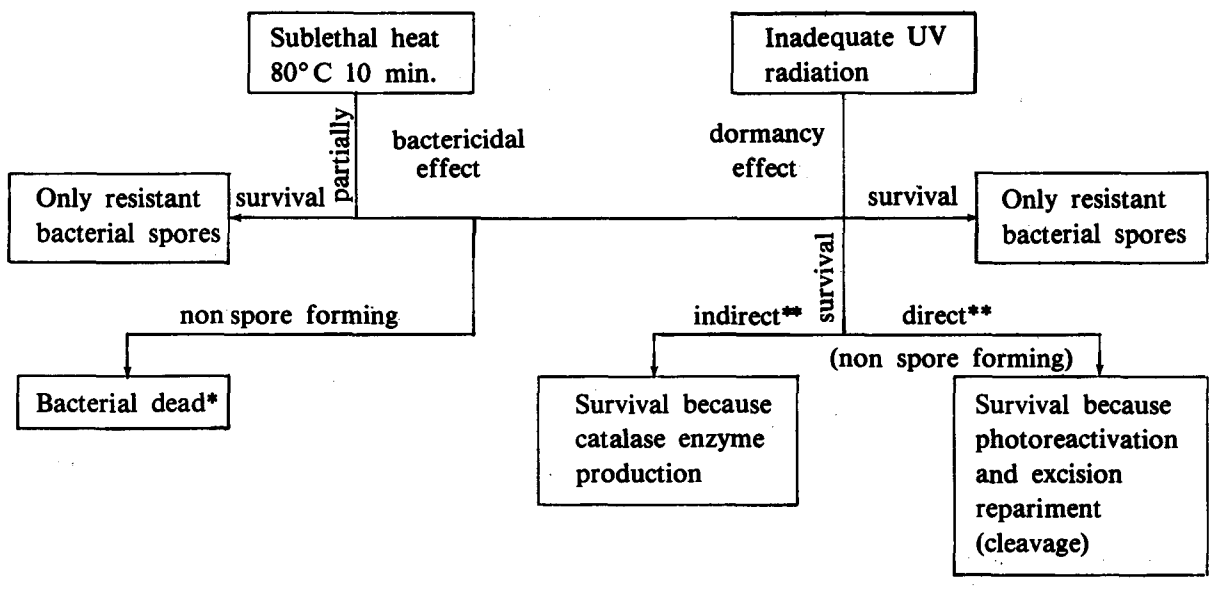


Figure 3 Development of resistance to heat and U V radiation during the sporulating cycle of *Cl. botulinum* type A-A T C C # 9654. Each point represents the average of triplicate counts.

ในกลุ่มคอนโทรล นั้น จำนวนแอนแอโรบิค *Cl. botulinum* นับได้อยู่ในระยะ decline phase กลุ่มที่สัมผัสความร้อนและรังสี 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)

เมื่อดูสัณฐานแอนแอโรบส์นี้ด้วยจุลทรรศน์ phase contrast เห็นสปอร์ได้ชัดเจน การย้อมสีแกรมจากแซมเปิลชั่วโมงที่ 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 การศึกษานี้จึงชี้ให้เห็นว่า ในธรรมชาติ sporangium จะเกิดก่อนมี new resistant spores ด้วยเช่นกัน

Sublethal heat ก็ดี หรือรังสี UV ก็ดี ย่อมจะฆ่า vegetative form ของ *Cl. botulinum*, type A ได้เป็นส่วนมาก ส่วนสปอร์ที่เกิดขึ้นไม่ถูกทำลายไปได้ (Fig.4) ฉะนั้นการก่อเกิดสปอร์ทนนั้น นอกจากสิ่งแวดล้อมขาดอาหารแล้ว การสัมผัส sublethal heat หรือรังสี UV เกิด sporulation ได้เสมอ ยิ่งไปกว่านี้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าในการปรุงอาหารเพื่อบริโภคก็ดี การใช้รังสี UV เพื่อถนอมอาหารก็ดี ถ้าใช้ขนาดไม่ได้ระดับมาตรฐาน (inappropiate 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* มีอยู่ในดินทั่วไป โอกาสที่จะปนเปื้อนผักผลไม้ และอาหารอื่น ๆ ย่อมมีมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่นำมาบรรจุกระป๋อง ก่อนนำมาบริโภคควรให้ความร้อนให้เพียงพอเพื่อให้แน่ใจว่าจะไม่มีสปอร์ทน หลงเหลืออยู่ มิฉะนั้นจะเกิดอันตรายเมื่อบริโภคอาหารดังกล่าวตามที่มีตัวอย่างผู้ที่บริโภคอาหารที่ปนเปื้อน เกิดโรคอาหารเป็นพิษจนถึงแก่ความตาย[17] การทำ home canned foods โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารประเภทถั่ว (string beans) และ corn ตลอดจนอาหารรมควันหรืออาหารในหม้อตุ๋นสูญญากาศก็ดี (smoked fish, vacuum-packed fresh fish ใน plastic bags) ควรจะทำให้ถูกวิธีการและควรจะนำมาต้มไม่น้อยกว่า 20 นาทีก่อนบริโภค[1,18]

สำหรับในประเทศไทยนั้น กระทรวงอุตสาหกรรมมองเห็นอันตรายจากโรคอาหารเป็นพิษ จึงกำหนดมาตรฐานในการผลิตอาหารกระป๋องทุกชนิดให้ถูกหลักวิชาการเหมือนสากลทั่วโลก มิฉะนั้นจะเกิดอันตรายถึงชีวิตตามที่ปรากฏเสมอ ๆ ในต่างประเทศ[17,18]

สรุป

ความร้อนที่ต่ำกว่าจุดเดือดหรือรังสีอุลตร้า ไวโอเล็ตมีผลกระทบต่อแอนแอโรบิค คล็อสตริเดียม โบทูลินุ่ม, ทัยป์ เอ. โดยกระตุ้นแอนแอโรบส์นั้นให้ก่อสปอร์ที่ทนทาน เปรียบได้กับการใช้ความร้อนไม่สูงพอในการปรุงอาหารหรือใช้รังสีอุลตร้าไวโอเล็ตไม่ถูกวิธี ในการถนอมอาหารสิ่งเหล่านี้จะเกิดสปอร์ทนทาน ปนเปื้อนอาหารและโรคโบทูลิซึ่มในชุมชน งานวิจัยนี้พบว่า รังสีอุลตร้าไวโอเล็ตกระตุ้นให้แอนแอโรบส์นี้ก่อสปอร์ทน เร็วกว่าความร้อนที่ต่ำกว่าจุดเดือด นอกจากนั้น งานวิจัยนี้ยังพบว่าการสัมผัสกับ physical agents ใดก็ตาม sporangium ที่ตรวจพบย่อมจะเป็นดรรชนีให้ทราบว่า แอนแอโรบส์นี้จะก่อเกิดสปอร์ทนขึ้น

อนึ่ง ในงานวิจัยนี้ คณะผู้รายงานยังวิจารณ์การใช้ความร้อนที่เหมาะสม การใช้รังสีอุลตร้าไวโอเล็ตให้ถูกวิธีการสามารถป้องกันการก่อสปอร์ทน และป้องกันโรคโบทูลิซึ่มได้ดี

อ้างอิง

1. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Review of Medical Microbiology. 13 ed. Los Altos, Califonia : 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 : Amercan 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 sporulaing 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.