การวิเคราะห์โปรตีนของสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Bacillus subtilis*สายพันธุ์ B-1

Proteomic analysis of antimicrobial extract from *Bacillus subtilis* strain B-1

สุปราณี พึ่งแพง[1,2,3], ชลอ ลิ้มสุวรรณ[3] และวัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล[3,4]

Supranee Pungpang[1,2,3], Chalor Limsuwan[3] and Watchariya Purivirojkul[3,4]

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสาตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[3]ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง วิทยาเขตบางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 10900

[4]ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900

Corresponding author e-mail: puy_0109@hotmail.co.th

บทคัดย่อ

*Bacillus subtilis*สายพันธุ์ B-1 คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 2 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*ABRCA 01 และ *Streptococcus agalactiae*ABRCS 01นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น *Listeria innocua* ATCC 33090 และ *Staphylococcus aureus*ATCC 12600เป็นต้น (Pungpang *et. al.*, 2011) แยกสารต้านจุลินทรีย์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ นำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค chromatrography จากนั้นวิเคราะห์สารดังกล่าวโดยใช้เทคนิค two dimensional gel electrophoresis เพื่อหาค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลพบจุด 5 จุด ซึ่งมีค่า pI อยู่ในช่วง 3-7 และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 4-5 กิโลดาลตัน ทำการตัดทั้ง 5 จุด ผ่านเข้าเครื่อง liquid chromatrography mass spectrophotometry/mass spectrophotometry (LC-MS/MS) พบว่าจุดที่ 3 และ 5 มีความเกี่ยวข้องกับสารต้านจุลินทรีย์ mycosubtilin และ lipopeptide ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก

คำสำคัญ: เชื้อ*Bacillus subtilis*, สารต้านจุลินทรีย์

Abstract

Bacillus subtilis strainB-1, isolated from fish culture pond, inhibited 2 type of pathogenic bacteria in aquaculture, *Aeromonas hydrophila*ABRCA 01 and*Streptococcus agalactiae*ABRCS 01. In addition *B. subtilis* B-1 can inhibit the pathogenic bacteria in industry such as *Listeria innocua* ATCC 33090 and*Staphylococcus aureus*ATCC 12600. The antimicrobial substance was extracted from supernatant and purified by chromatography and two dimensional gel electrophoresis techniques for pI value and molecular weight. Five spots on the gel had pI value

between 3-7 of and the molecular weigh of them were between 4-5 kDa then cut them to LC-MS/MS. The third and fifth spot related with mycosubtilin and lipopeptide, respectively that inhibited the growth of Gram positive bacteria.

Key word: *B. subtilis*, antimicrobial activity

บทนำ

แบคทีเรียสกุล *Bacillus*เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถเจริญได้ในทุกสภาพแวดล้อมและพบว่าแบคทีเรียสกุลนี้ยังสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ได้แก่ bacitracin, subpeptin และ polymyxin เป็นต้น โดยทางการแพทย์มีการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างคล้ายสารต้านจุลินทรีย์ขึ้นมา และมีการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมกันอย่างแพร่หลาย (Katz and Demain, 1977; Wu *et al*., 2005)มีงานวิจัยหลายสาขาสนับสนุนว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้ง หรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค โดยเฉพาะในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก จึงมีการศึกษาในด้านคุณสมบัติทั้งทางกายภาพ ชีวภาพ และเคมี เช่น การทนความร้อน การทนกรด-ด่าง ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และโครงสร้างของสารกลุ่มดังกล่าว เป็นต้น รวมทั้งมีการนำแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมอาหาร (Verschuere *et al*., 2000; Bizani *et al*., 2005; Gray *et al*., 2006; Lisboa *et al*., 2006; Motta *et al.,* 2007) ซึ่งถือเป็นอีกทางเลือกที่จะลดการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น oxytetracycline, oxaolinic acid, nalidixic acid เป็นต้นที่เป็นสาเหตุของปัญหาเรื่องยาตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ และอุตสาหกรรมอื่น ๆ

Bacillus สายพันธุ์ B-1 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา จากการทดสอบเบื้องต้นโดยสุปราณีและคณะ (2550) พบว่าเชื้อนี้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae*สายพันธุ์ที่ก่อโรค Streptococcosis ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยต่อเนื่องโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของสารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การทำสารต้านจุลินทรีย์ให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pinchuk *et al.* (2001); Oscariz *et al.* (2006) และ Atsushi *et al*. (2008) แยกสารต้านจุลินทรีย์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ซึ่งจะมีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อ (cell-free neutralized supernatant, CFNS) โดยใช้ amberlite XAD-16 น้ำหนัก 20 กรัม ใส่ลงใน CFNS 1 ลิตร จากนั้นเขย่าให้เกิดการกระจายตัวสม่ำเสมอด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการแยก amberlite XAD-16 ออกจาก CFNS แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วย ethanol ความเข้มข้น 40%ปริมาตร 80 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม 2-propanol ความเข้มข้น 70% ลงไปปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปประเหยด้วยเครื่องระเหยสารละลายแบบหมุนเหวี่ยง (evaporator) จนเหลือปริมาตรรวมประมาณ 5 มิลลิลิตร และนำสารที่ได้ไปทำให้

เป็นสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) นำสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากขั้นต้น ผ่านเข้าไปใน hypersil BDS C_{18} reverse-phase column (thermo scientific) ที่ผ่านการทำให้เกิดสภาวะสมดุลด้วยสารละลาย acetonitrile ที่มี 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) ผสมอยู่และต่อกับเครื่อง HPLC ด้วยอัตราเร็วประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากนั้นแยกสารต้านจุลินทรีย์ออกจาก column ด้วยสารละลายผสมระหว่าง acetonitrile ที่มี 0.1% TFA และมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ acetonitrile อย่างต่อเนื่องจาก 15 ถึง 70% ภายในเวลา 30 นาที ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดโปรตีนที่ถูกแยกออกมาจาก column ด้วย photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร และเก็บสารละลายที่ถูกแยกออกมา เพื่อตรวจวัดค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ กับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*และ *Streptococcus agalactiae* โดยวิธี critical dilution assay แบบ agar well diffusion

2. ศึกษาค่า isoelectric point ขององค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้เทคนิค two dimensional gel electrophoresis (2 D PAGE) เตรียมสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 2 ด้วย 2 D clean-up kit และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford (1976) เพื่อปรับให้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 10-62 ไมโครกรัม เพื่อใช้แยกตามค่า pI (isoelectric point) บน immobiline dry strip ที่ช่วง pH 3-10 ใน rehydration buffer ช่วง pH 3-10 โดยตั้งค่าเครื่อง ettan IPGphor ให้ rehydration นาน 12 ชั่วโมงที่ 20 องศาเซลเซียสขั้นที่ 1 ความต่างศักย์ 250 โวลต์ต่อชั่วโมงนาน 30 นาทีขั้นที่ 2 ความต่างศักย์ 500โวลต์ต่อชั่วโมงนาน 30 นาทีและขั้นที่ 3 ความต่างศักย์ 7,500 โวลต์ต่อชั่วโมงนาน 1 ชั่วโมง 30 นาทีเมื่อครบขั้นตอนแช่ immobiline drystrip ใน equilibration buffer ที่มี dithiothreitol นาน 10 นาทีและเปลี่ยนมาแช่ใน equilibration buffer ที่มี iodoacetamide นาน 10 นาที นำ immobiline dry strip ไปแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลบนSodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (stacking gel 17.5 % acrylamide) ใช้ marker เป็นโปรตีนมาตรฐานใช้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 300 โวลต์นาน 15 นาทีและเปลี่ยนเป็นกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 300 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาทีนำแผ่นเจลที่ได้ย้อมด้วย coomassie brilliant blue R-250 นาน 12 ชั่วโมง แล้วล้างเจลจนเห็นจุดโปรตีนชัดเจน

3. วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิคLiquid chromatography–mass spectrometry/ mass spectrometry (LC-MS/MS) และเปรียบเทียบชนิดโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีนนำแถบโปรตีนของสารต้านจุลินทรีย์จาก 2 D PAGE ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS (thermo electron corporation) ที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice Units) ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติอุทยานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ จังหวัดปทุมธานีข้อมูล mass spectrometry spectrum ของโปรตีนที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน MASCOT

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. จากการทดลองเมื่อฉีดสารที่สกัดได้ผ่านเข้าไปใน column ที่ต่อกับเครื่อง HPLC พบว่ามี fraction เวลาประมาณ 23 นาที มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ*A. hydrophila* ABRCA 01และ *S. agalactiae* ABRCS 01 ได้ (Fig 1)

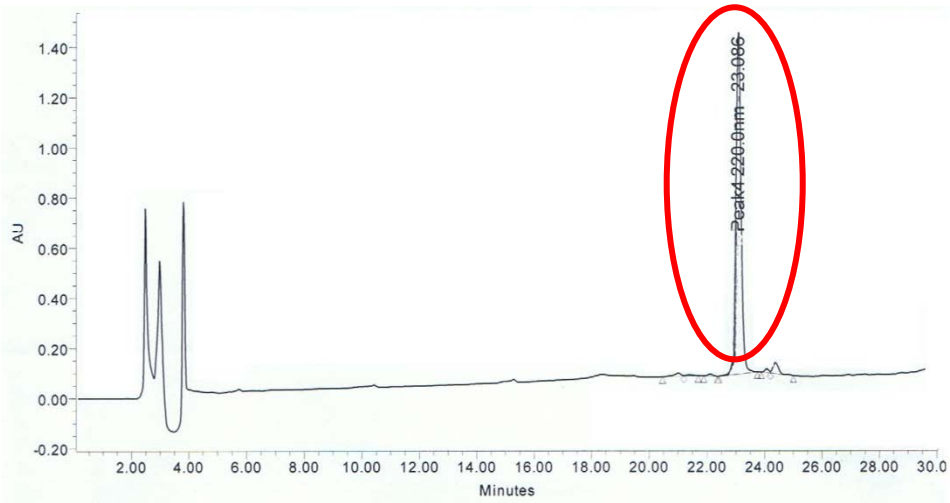

Figure1 mass spectrum ของสารต้านจุลินทรีย์ B1-1 และนำมา refractionโดยใช้เทคนิค chromatrography

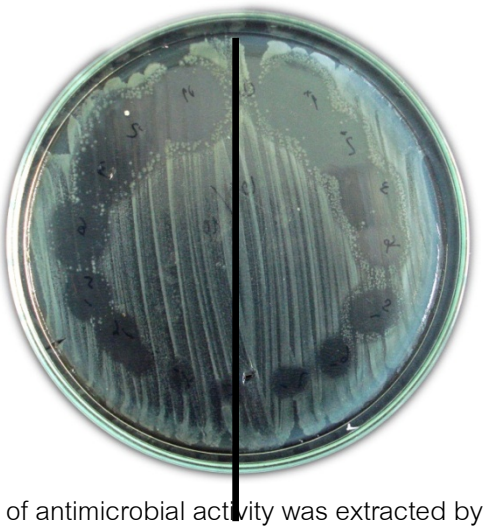

Figure 2 The fraction (23 min) of antimicrobial activity was extracted by HPLC against with *A. hydrophila*ABRCA 01

2. เมื่อนำสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาแยกด้วยด้วยเทคนิค 2 D PAGE พบจุดโปรตีนทั้ง 5 จุดด้วยกัน ได้แก่ spot 1, spot 2, spot 3, spot 4 และ spot 5 ซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 3, 5, 6, 6.5 และ 5 (Fig 3) โดยตำแหน่งปรากฏใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4 กิโลดาลตันตามภาพที่ 2 และเมื่อพิจารณาตามหลัก

ของค่า pI พบว่า spot 1 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน asparatic acid หรือ glutamic acid เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain, spot 2 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน cysteine เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain spot 3 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน glycine, isoleucineหรือ leucine เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain,spot 4 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน proline เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain และ spot 5 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน cysteine เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain คล้ายกับ spot 2 จากผลการทดลองค่า pI ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดแบ่งตามความแตกต่างของโซ่กิ่ง (branced chain) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กรดอะมิโนที่เป็นกลาง จะมีโซ่กิ่งเป็น hydrocarbon (aliphatic หรือ aromatic) ได้แก่ alanine, valine, leucine และ isoleucine กลุ่มที่ 2 กรดอะมิโนที่เป็นกรด มีโซ่กิ่งเป็นหมู่ carboxylic group (-COOH) ได้แก่ aspartate และ glutamate และกลุ่มสุดท้าย กรดอะมิโนที่เป็นเบส มีโซ่กิ่งเป็นหมู่อะมิโน (-NHR)ได้แก่ lysine และ arginine เทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกโปรตีน โดยอาศัยความแตกต่างของค่า pI ซึ่งคือค่าความเป็นกรด-ด่างที่ประจุรวมของกรดอะมิโนหรือโปรตีนเป็นศูนย์ โดยกรดอะมิโนหรือโปรตีนจะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้ากระแสตรง

pH=pI

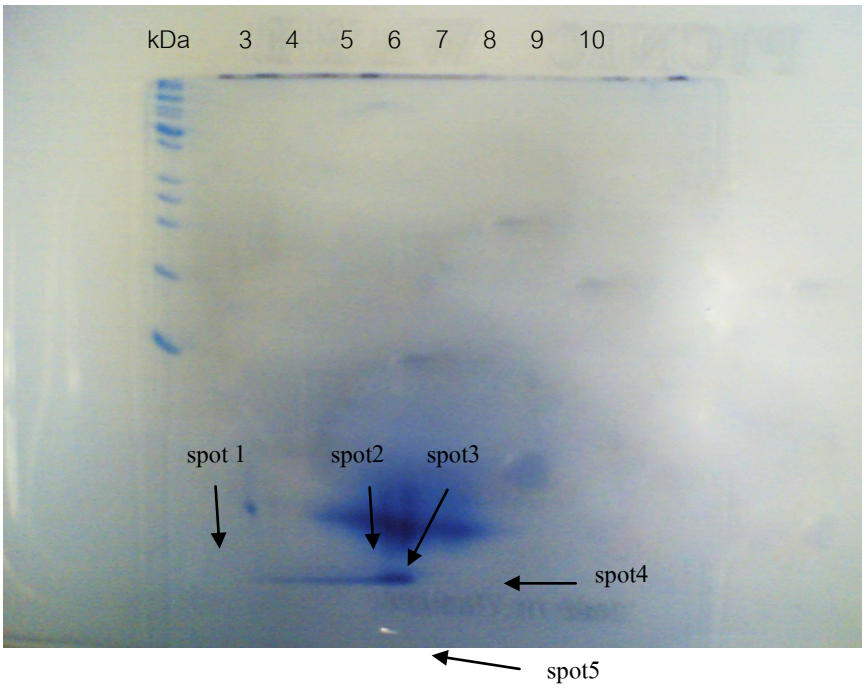

Figure3จุดโปรตีนspot 1, spot 2, spot 3, spot 4 และ spot 5

3. เมื่อส่งตัวอย่างโปรตีนที่ได้จาก 2D-PAGE ในแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณเท่ากับ 4 กิโลดาลตัน เพื่อวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้ mass spectrum ของโปรตีน spot 1(Fig 3) ซึ่งได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้ AETVAYEDLLAGGGMAGA KEAGK, spot 2(Fig 4) ซึ่งได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้QISSITPDME ITTILKGGM,spot 3 (Fig 5) ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้ QAVRNIVK, spot 4

(Fig 6) ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้AETVAYEDLLAG GGM AGAKEAGK, spot 5 (Fig 7) ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้GTVCSPFALFAVLENTGEKLK

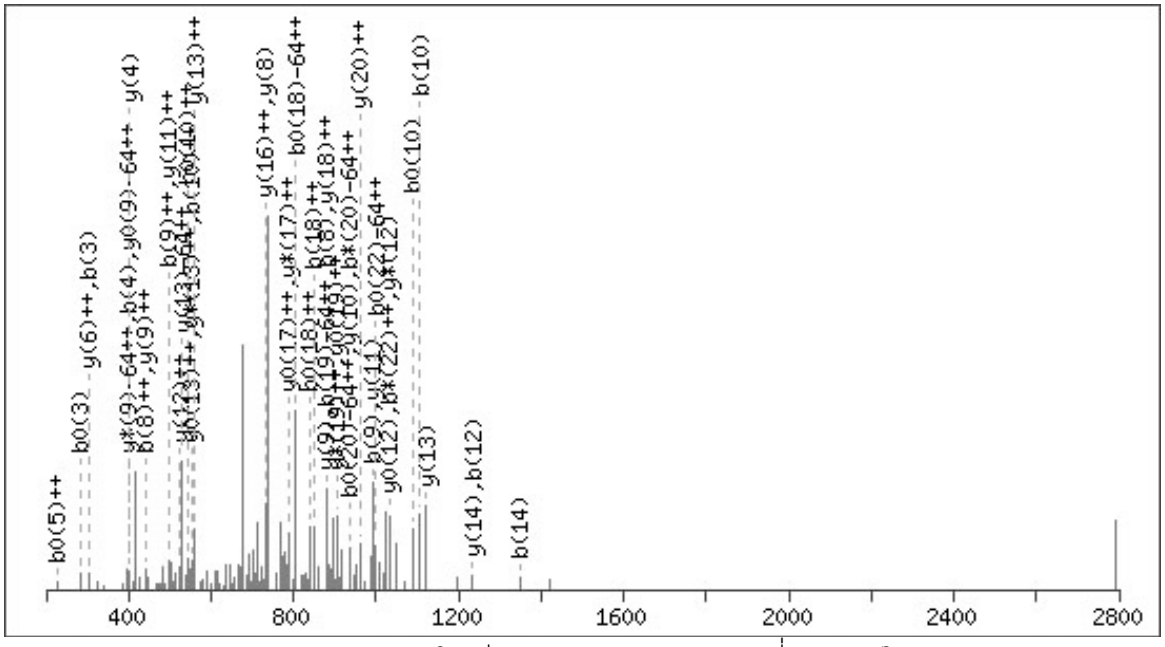

Figure 4 mass spectrum ของโปรตีน spot 1 จาก 2D-PAGE ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS

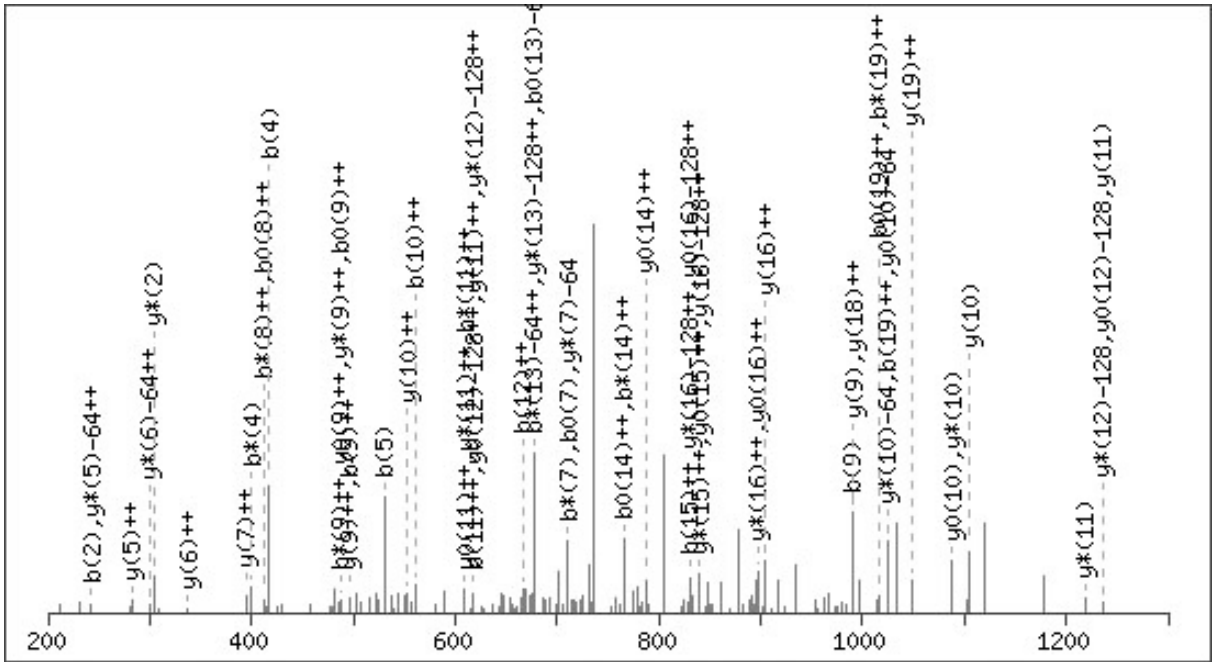

Figure 5 mass spectrum ของโปรตีน spot 2 จาก 2D-PAGE ที่โดยเทคนิค LC-MS/MS

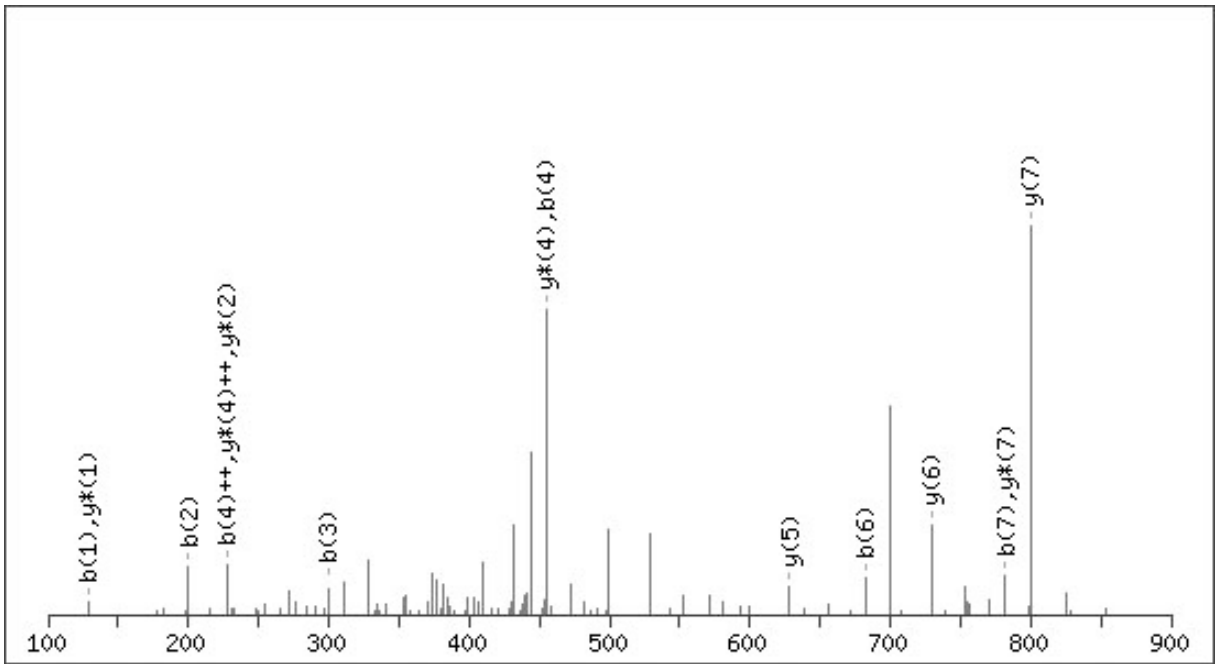

Figure 6 mass spectrum ของโปรตีน spot 3 จาก 2D-PAGE ที่โดยเทคนิค LC-MS/MS

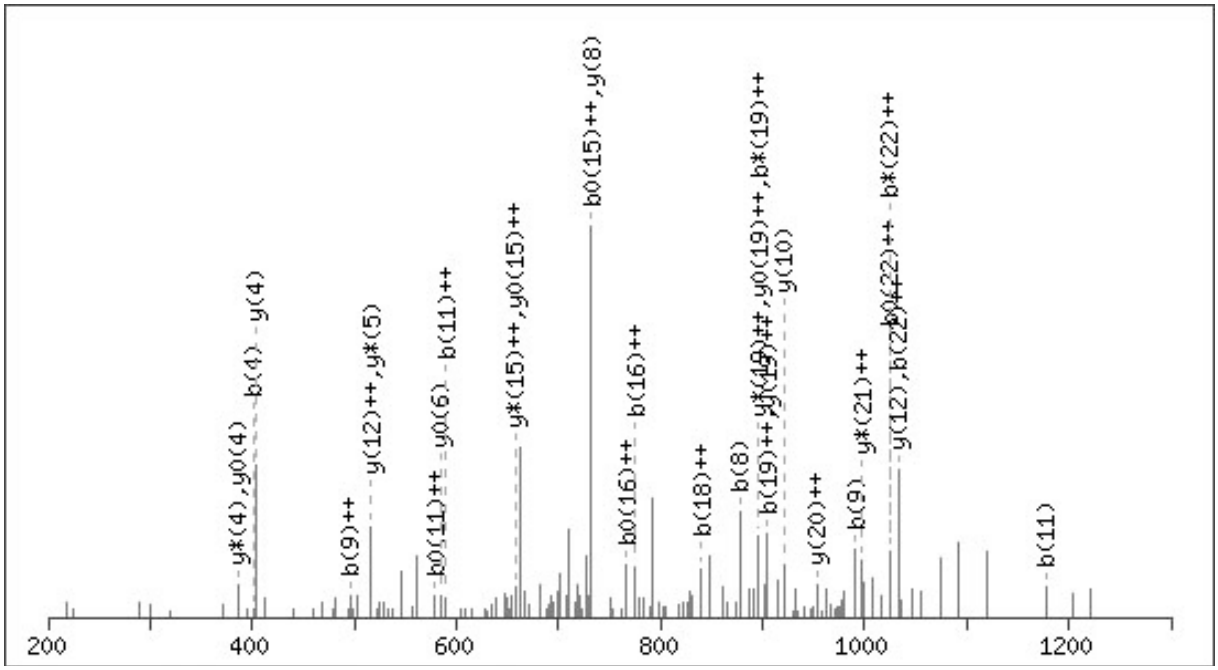

Figure 7 mass spectrum ของโปรตีน spot 4 จาก 2D-PAGE ที่โดยเทคนิค LC-MS/MS

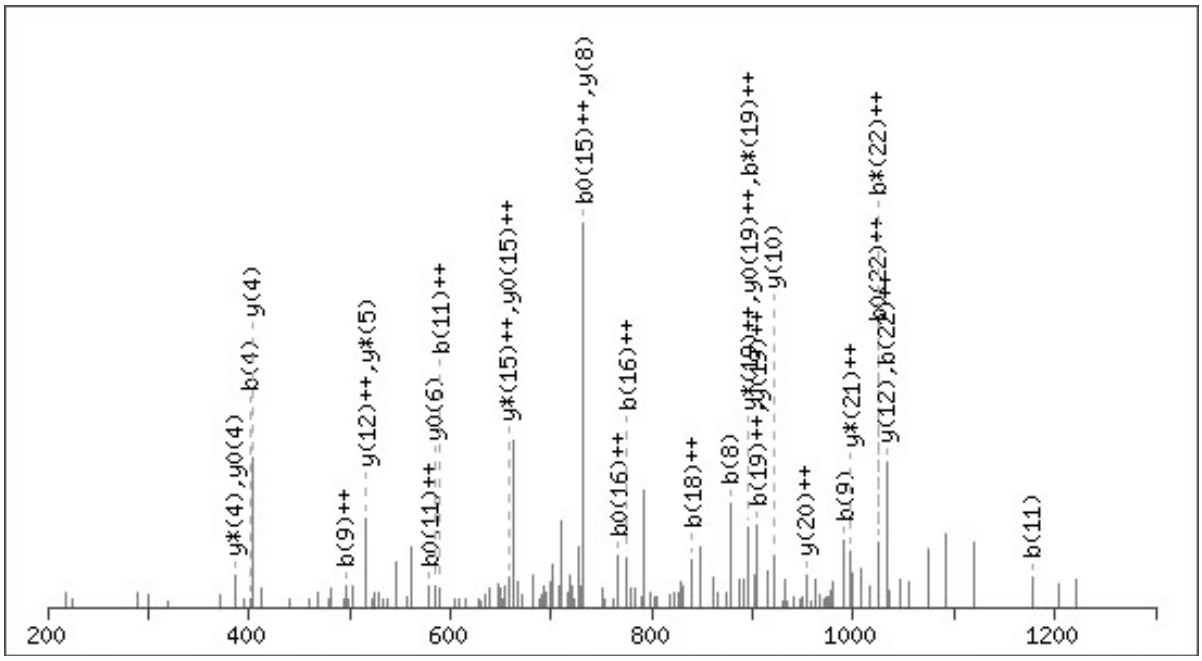

Figure 8 mass spectrum ของโปรตีน spot 5 จาก 2D-PAGE ที่โดยเทคนิค LC-MS/MS

จากการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ได้ผลลัพธ์ออกมาเป็น peptide mass fingerprint (PMF) และนำผลที่ได้ไปค้นหาในฐานข้อมูลของ MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า โปรตีนที่ค้นหาทั้งหมดนั้นมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 ซึ่งยังไม่สามารถจำแนกได้ชัดเจนว่าเป็นโปรตีนชนิดใดในฐานข้อมูล และชนิดของข้อมูลที่ได้นั้น มีเพียง spot ที่ 3 และ 5 ที่เกี่ยวข้องกับสารต้านจุลินทรีย์ คือ กลุ่มสาร mycosubtilin และ lipopeptide ตามลำดับ แต่ค่า MOWSE score ของสารทั้ง 2 ชนิดยังต่ำกว่า 65 และเมื่อทำการคัดเลือก m/z peak ของ PMF ที่มี intensity สูงสุดมาแตกเป็นอนุพันธ์ พบว่าค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้งค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และวิธีการดังกล่าวจะสามารถนำมาใช้ได้ก็ต่อเมื่อมีฐานข้อมูลที่เพียงพอ และหากต้องการเพิ่มความน่าเชื่อถือ ควรใช้เทคนิค Edmen degradation เข้ามาช่วยเพื่อให้สามารถทราบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนได้ และนำไปเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ เป็นการยืนยันข้อมูลที่ได้ เนื่องจากวิธีดังกล่าวเป็นการตัดกรดอะมิโนเรียงตามลำดับทีละตัว

สรุปผลการทดลอง

การทำให้สารต้านจุลินทรีย์ให้เป็นสารบริสุทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี พบว่าสารต้านจุลินทรีย์ออกมาที่ช่วงเวลาประมาณ 23 นาที เมื่อนำมาแยกน้ำหนักโมเลกุลและหาค่า pI โดยใช้ 2 D PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4 กิโลดาลตัน และมีจุด 5 จุดเกิดขึ้น และพบว่ามี 2 จุดที่น่าสนใจ จุดที่ 3 และ

5 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ mycosubtilin และ lipopeptide เมื่อเทียบฐานข้อมูลจาก Mascot search results

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Atsushi, U., H. Nagai, M. Ishida, Y. Nagashima and K. Shiomi. (2008). Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin, a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. Toxicon.(52) 574-581.

Bizani, D., A.P.M. Dominguez and A. Brandelli. (2005). Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. Letter Applied Microbiology(41) 269-273.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*Analytical Biochemistry*.(72) 248-254.

Gray, E.J., K.D. Lee, A.M. Souleimanov, M.R. Di Falco, X. Zhou, A. Ly, T.C. Charles, B.T. Driscoll and D.L. Smith. (2006). A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promotingrhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology* (100)545-554.

Katz, E. and A.L. Demain. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriological Reviews (41) 449-74.

Lisboa, M.P, D. Bonatto, D. Bizani, J.A.P. Henriques and A. Brandelli. (2006). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology* (9)111–116.

Motta, A.S., D.M. Lorenzini and A. Brandelli. (2007). Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon basin. Current Microbiology (54) 282–286.

Oscariz, J.C., L. Cintas, H. Holo, I. Lasa, I.F. Nes and A.G. Pisabarro. (2006). Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. FFMS Microbiology Letters (254) 108-115.

Pinchuk, I.V., P. Bressollier, B. Verneuil, B. Fenet,I.B. Sorokulova, F. Mégraud and M.C. Urdaci. (2001). *Invitro* anti-helicobacter pylori activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. Antimicrobial Agents Chemotherapy (45) 3156-3161.

Pungpang, S.,K. Boonprab, S. Tunkijjanukij, N. Areechonand P. Srisapoome. (2007). Efficiency of Bacteria Isolated from Fish Ponds on Controlling of Pathogenic Bacteria, *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Agricultural Science Journal (38) 571-580.(in Thai)

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. (2000). Probiotics bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology Molecular Biology Reviews (64) 655-671.

Wu, S., S. Jia, D. Sun, M. Chen, X. Chen, J. Zhong and L. Huan. (2005). Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM 4. Current Microbiology (51) 292–296.