ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae*

1.1 การแยกเชื้อและการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ

จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา จำนวน 6 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 10^2-10^4 cfu/มิลลิลิตร ตัวอย่างลำไส้จำนวน 2 ตัวอย่าง มีค่าระหว่าง 10^5-10^8 cfu/กรัม และเมือกของปลานิลจำนวน 2 ตัวอย่าง มีค่าระหว่าง 10^2-10^4 cfu/กรัม โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากบ่อเลี้ยงปลา ลำไส้และเมือกได้ 67, 25 และ 22 isolates ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 114 isolates (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างและจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่เก็บ	จำนวนเชื้อที่แยกได้ (isolates)
น้ำจากบ่อเลี้ยงปลา	1	7
	2	9
	3	15
	4	10
	5	11
	6	15
ลำไส้	1	11
	2	14
เมือก	1	12
	2	10
รวม	**10**	**114**

จากผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำในบ่อเลี้ยงปลา เมือกและลำไส้ของปลานิล พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจนับมีความแตกต่างกัน โดยบริเวณทางเดินอาหารใน

ส่วนลำไส้เป็นบริเวณที่พบเชื้อแบคทีเรียสูงสุดมีค่าระหว่าง 10^5-10^8 cfu/กรัม ในขณะที่ตัวอย่างจากเมือกและตัวอย่างของน้ำในบ่อเลี้ยงปลามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียระหว่าง 10^2-10^4 cfu/กรัม และ 10^2-10^4 cfu/มิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Al-Harbi (2003) ได้รายงานชนิดและปริมาณของแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบการเลี้ยงปลานิล hybrid tilapia โดยทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำและโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิล ตัวอย่างจากเหงือกและลำไส้ของปลานิล พบแบคทีเรียทั้งหมด 15 สกุล และ 18 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม aerobic heterophic แกรมลบรูปท่อน ชนิดที่พบมากที่สุด คือ *Corynebacterium urealyticum, Shewanella putrefaciens* และ *A. hydrophila* ซึ่งดวงพร (2545) ได้รายงานว่าประชากรของจุลชีพในแหล่งน้ำถูกกำหนดโดยสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของแหล่งน้ำนั้น ๆ เช่น อุณหภูมิ แสง ความเค็ม โดยเฉพาะองค์ประกอบที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญ สอดคล้องกับ Cahill (1990) ซึ่งได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นของปลา เช่น ปลา rainbow trout, ปลา salmon, ปลานิล พบว่าโดยทั่วไปแบคทีเรียที่อาศัยในแหล่งน้ำของสัตว์น้ำมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเค็ม ส่วนแบคทีเรียที่พบที่เหงือกและผิวหนังเป็นแบคทีเรียแบบชั่วคราวมากกว่าแบบประจำถิ่น ส่วนแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารที่ลำไส้พบว่ามีความหลากหลายสูงกว่าในแหล่งน้ำ และพบว่าเป็นกลุ่มของพวก obligate anaerobes นอกจากนี้ Al-Harbi and Uddin (2004) ได้ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในระบบการเลี้ยงปลานิล พบว่าแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิลเป็นบริเวณที่พบความหลากหลายของปริมาณแบคทีเรียสูงกว่าในสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่นเดียวกับ Molinari *et al*. (2003) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของปลานิลโดยเก็บในส่วนกระเพาะอาหารส่วนหน้าและส่วนหลัง พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่ม bacilli ได้แก่ *A. hydrophila, A. veronii, Burkholderia cepacia, Chromobacterium violacium, Citrobacter freundii, Escherichai coli* และ *Flavimonas oryzihabitans* เช่นเดียวกับ Al-Harbi and Uddin (2003) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวปริมาณแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงปลานิล hybrid tilapia ในช่วง 1 ปี พบว่าปริมาณแบคทีเรียมีค่าอยู่ในช่วง $1.8\pm0.9\text{x}10^2$-$6.0\pm1.2\text{x}10^4$ cfu/มิลลิลิตร และพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในช่วงหน้าร้อน ต่อมา Al-Harbi and Uddin (2005) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงปลานิล โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิล ตัวอย่างเหงือกและลำไส้ของปลานิล พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 10^3 cfu/มิลลิลิตร, 10^6-10^7 cfu/มิลลิลิตร, 10^5-10^6 cfu/มิลลิลิตร และ 10^7-10^8 cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 87 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน จากการจำแนกพบว่าส่วนใหญ่

เป็นเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus, V. parahaemolyticus*, *Chryseomonas* sp., *Streptococcus* sp. และ *Shewanella putrefaciens*

1.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae*

1.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Cross streak techniques

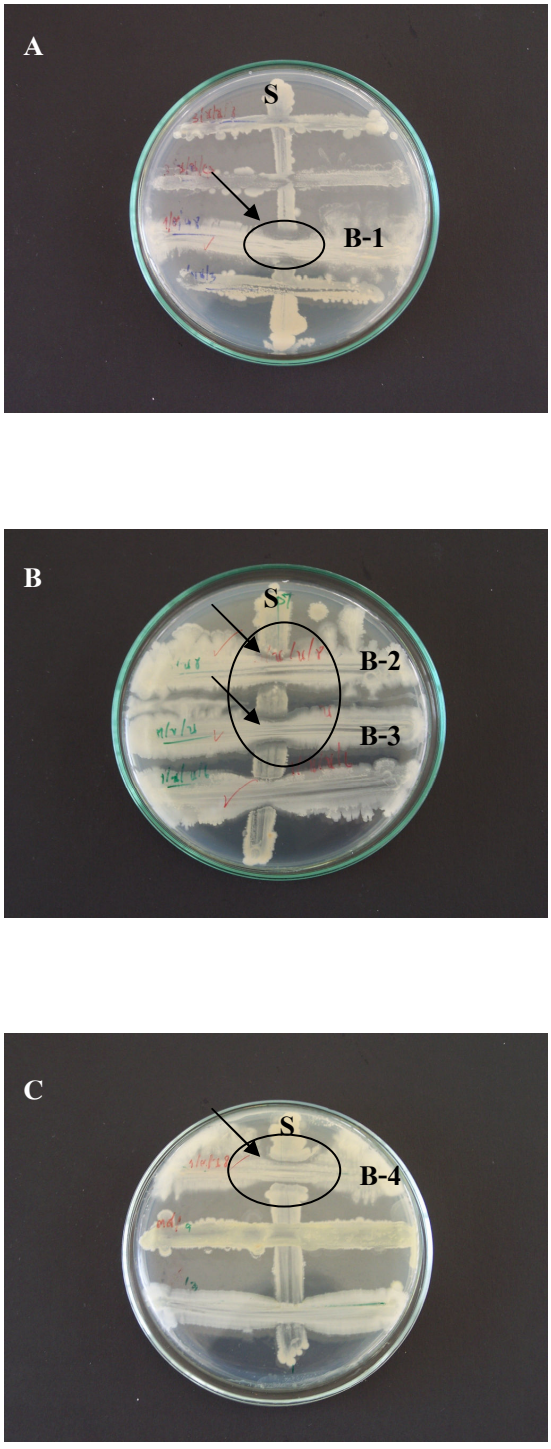
ภายหลังจากการนำตัวอย่างแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 1.1 นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยวิธี Cross streak technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA พบว่าจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 114 isolates มีเพียงจำนวน 4 isolates เท่านั้นที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ใช้ทดสอบได้ โดยสามารถสังเกตบริเวณแนวของการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยในแนวตั้ง (S) ขีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและในแนวขวางขีดเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 1.1 หากมีการสร้างสารซึ่งยับยั้งเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรครอยขีดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจะเจริญไม่ต่อเนื่อง จากภาพ 1A มีแบคทีเรีย isolate B-1 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งเจริญในแนว S ได้ โดยสังเกตจากแนวการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ไม่ต่อเนื่องเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ isolate อื่นในจานเพาะเชื้อเดียวกันที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ได้ เช่นเดียวกับเชื้อ isolates B-2 และ B-3 (ภาพ 1B) ก็มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้เช่นเดียวกัน แต่สามารถสังเกตความสามารถในการยับยั้งอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบระหว่างทั้งสอง isolates คือ B-2 และ B-3 โดยที่ isolate B-3 มีบริเวณรอยของการเจริญของเชื้อก่อโรคมากกว่าเมื่อเทียบกับ isolate B-2 ที่รอยของการเจริญของเชื้อน้อยกว่า และเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ส่วน isolate B-4 (ภาพ 1C) ที่มีความสามารถในการยับยั้งเช่นเดียวกับ isolate อื่น ๆ โดยสังเกตจากแนวการเจริญของเชื้อก่อโรคในแนว S แต่ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญอาจน้อยกว่า isolate B-1, isolates B-2 และ B-3 เนื่องจากแนวการยับยั้งการเจริญแคบกว่าจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนจากการทดลอง นอกจากนี้วิธีการ Cross streak technique เป็นวิธีการทั่วไปที่ใช้ในการทดสอบหา microbial antagonistic activity และยังสามารถใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ในจานเพาะเชื้อเดียวกัน สอดคล้องกับการทดลองของ Austin *et al*. (1995) ซึ่งใช้วิธีเดียวกันนี้ในการศึกษาความสามารถของสาร antibacterial ที่ผลิตโดยแบคทีเรียโปรไบโอติก *V. alginolyticus* ซึ่งช่วยในการลดการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *A. salmonicida, V. anguillarum* และ *V. ordalii* บนอาหาร TSA ที่ผสม 1% NaCl

เพื่อดูประสิทธิภาพของแบคทีเรียก่อนที่จะนำไปทดสอบในระดับ *in vivo* นอกจากนี้ Robertson *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธีการ Cross streaking method ในการศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา เช่น *A. hydrophila* ในปลา Goldfish, *A. salmonicida* ในปลา Atlantic salmon, *F. psychrophilum* ในปลา Coho salmon, *S. milleri* ในปลา Koi carp และเชื้อแบคทีเรีย *V. anguillarum* ในปลา Atlantic cod โดยเชื้อแบคทีเรีย *Carnobacterium* sp. และจากการทดสอบพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Carnobacterium* sp. สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้งหมด ซึ่งจินตลา (2544) ได้ทำการศึกษาการใช้เทคนิค Cross streak method ในการคัดเลือกแบคทีเรียแล็กติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพจากผลิตภัณฑ์ประมง นำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้แก่ *Salmonella enteritidis*, *V. parahaemolyticus* และพบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแล็กติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 14 isolates จากทั้งหมด 335 isolates

Irianto and Austin (2002) ได้ทำการศึกษาการใช้เทคนิควิธีการ Cross streak เพื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียจากลำไส้ของปลา Atlantic Salmon, rainbow trout และ turbot ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. salmonicida* ได้ 11 isolates จากทั้งหมด 177 isolates เช่นเดียวกับ Chythanya *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* I-2 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บนอาหาร TSAS โดยวิธีการ Cross streak method ซึ่งทำการเปรียบเทียบที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส มีการยับยั้งที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 10 และ 20 องศาเซลเซียส ขณะที่ Carraturo *et al.* (2006) ได้ใช้วิธีเดียวกันในการศึกษาความสามารถของสาร bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *V. mediterranei* 1 ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากผลการทดลองที่กล่าวมาชี้ให้เห็นว่าวิธีการคัดเลือกแบคทีเรีย antagonistic activity โดยการใช้เทคนิค Cross-streak เป็นวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระดับ *in vitro* ก่อนที่จะนำแบคทีเรียดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ต่อไป

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 isolates มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่แตกต่างกันไป ซึ่งเห็นได้จากวิธี Cross streak technique และทั้ง 4 isolates เป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากน้ำในบ่อเลี้ยงปลาที่สถานีวิจัยประมงกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะประมง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Garriques and Arevalo (1995) ได้รายงานถึงเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ซึ่งแยก

ได้จากน้ำเลี้ยงที่โรงเพาะฟักลูกกุ้ง *Litopenaeus vannamei* ซึ่งมีสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังจากแช่ลูกกุ้งด้วยเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ $2x10^3$ เซลล์/มิลลิลิตร พบว่าลูกกุ้งมีอัตราการรอดตายเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Chythanya *et al.* (2002) ได้รายงานถึงการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* I-2 ที่แยกได้จาก Estuarine water ซึ่งมีความสามาถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrios* ได้แก่ *V. harveyi, V. fluvialis, V. parahaemolyticus, V. damsela* และ *V. vulnificus* นอกจากนี้ Vaseeharam and Ramasamy (2003) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่คัดเลือกได้จากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* นอกจากนี้ Vijayan *et al.* (2006) ได้รายงานถึงการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi, V. fluvialis, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* และ *Aeromonas* spp. ที่คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำกร่อย Muttukkadu lagoon ที่ภาคใต้ของ Chennai ซึ่งก็ คือ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* PS-102 จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอาจจะอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันกับสัตว์น้ำหรือตามสภาพธรรมชาติก็ได้



ภาพที่ 1 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ด้วยวิธี Cross streak

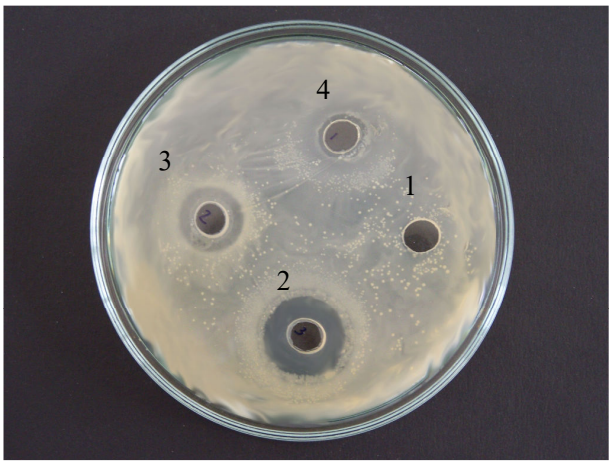
1.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion techniques

ภายหลังจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยวิธี Cross streak techniques แล้ว นำแบคทีเรียดังกล่าวมาตรวจสอบการผลิตสารยับยั้งจุลชีพด้วยวิธี Agar well diffusion techniques พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารยับยั้งจุลชีพได้ โดยสังเกตจากบริเวณส่วนใสที่เกิดหลังจากหยดสารละลายส่วนใสที่ได้จากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ลงไป ซึ่งมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับความสามารถในการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ และเพื่อให้เห็นการยับยั้งที่ชัดเจนขึ้นจึงบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากสารยับยั้งจุลชีพบางชนิดมีโมเลกุลใหญ่สามารถซึมผ่านวุ้นได้ช้า เช่น สารที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มแล็คติกชนิดที่เรียกว่า “bacteriocin” (จินตลา, 2544; Hoover and Harlander, 1993) จากการทดลองโดยวิธี Cross streak technique ทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียจาก 4 isolates เหลือเพียงแค่ 3 isolates ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งได้แก่ B-1, B-3 และ B-4 จากนั้นนำเชื้อทั้ง 3 isolates ไปทำการทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion techniques ต่อไป พบว่าสารละลายส่วนใสที่ได้จากแบคทีเรีย 3 isolates สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* โดยสามารถเห็นบริเวณใสรอบวุ้นที่เจาะในอาหาร NA ทั้ง 3 isolates โดยเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมซึ่งใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ NB เท่านั้น ซึ่งจากการทดสอบไม่เห็นบริเวณส่วนใสรอบ ๆ รอยเจาะแสดงให้เห็นว่าในอาหารไม่มีสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียปนอยู่ และเมื่อเปรียบเทียบกับหลุมที่หยดสารละลายส่วนใสที่ได้จากแบคทีเรีย isolates B-1, B-3 และ B-4 พบความแตกต่างของขนาดบริเวณโซนใสอย่างเห็นได้ชัด โดย isolate B-1 มีขนาดของบริเวณโซนใสซึ่งมีรัศมีใหญ่ที่สุดประมาณ 4 มิลลิเมตร isolate B-3 ขนาดประมาณ 1.5 มิลลิเมตร และสารละลายส่วนใสจาก isolate B-4 จะให้บริเวณโซนใสที่มีรัศมีน้อยที่สุดมีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร ซึ่งวิธีดังกล่าวทำให้เราทราบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เราคัดเลือกจากข้อ 1.1 และ 1.2.1 มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรีย สอดคล้องกับการทดลองของ Gram *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *V. anguillarum* ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* AH2 ด้วยเทคนิค Agar well diffusion เพื่อใช้ในการยืนยันผลการทดลองในระดับ *in vitro* ก่อนที่จะนำไปใช้ทดสอบในระดับ *in vivo* โดยการเชื้อแช่แบคทีเรีย *P. fluorescens* AH2 ร่วมกับปลา rainbow trout ขณะที่ Spanggard *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาการใช้เทคนิค Agar well diffusion เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรีย Antagonistic ที่ได้จากลำไส้ของปลา rainbow trout ที่มีความสามารถในการ

ยับยั้งเชื้อ *A. salmonicida* และ *Yersinia ruckeri* ซึ่งพบเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ทั้งหมด 1,018 isolates เมื่อทำการคัดเลือกด้วยวิธีการดังกล่าว พบว่าเหลือเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเพียง 11 isolates และได้ทำการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อ พบว่า 9 isolates เป็นกลุ่ม *Pseudomonas* spp. และอีก 2 isolates เป็น *Carnobacterium* spp. และต่อมา Gram *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติก โดยนำแบคทีเรีย *P. fluorescens* AH 2 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. salmonicida* ในปลา rainbow trout (Gram *et al.*,1999) ไปใช้ในการศึกษาต่อเพื่อยับยั้งการเกิดโรค furunculosis ในปลา salmon (*Salmo sa*lar L.) โดยวิธี Agar well diffusion นอกจากนี้การศึกษาของ Chythanya *et al.* (2002) ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธีการคัดเลือกหาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค Vibriosis ในกุ้ง โดยการใช้วิธีการ Cross streak technique และ Agar well diffusion technique ตามลำดับ และจากเทคนิคดังกล่าวพบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่สุด คือ *Pseudomonas* I-2 นอกจากนี้ Vaseeharam and Ramasamy (2003) รายงานการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* BT23 เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรค *Vibrio* sp. ในกุ้งกุลาดำ โดยทำการทดสอบในระดับ *in vitro* ด้วยวิธีการ Agar well diffusion technique เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาก่อนนำไปใช้ต่อในระดับ *in vivo* เช่นเดียวกันกับ Gullian *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษาโดยการใช้เทคนิคเดียวกันเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* P62 ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุด คือ 54 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น *Bacillus* P64 และ *Vibrio* P63 ตามลำดับ

Chabrillon *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาโดยใช้วิธีการ Agar well technique เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ โดยทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากฟาร์ม Senegalese sole, *Solea sengalensis* Kaup และ gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 19 isolates และเมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้โดยวิธี Agar well technique พบว่ามีเพียง 4 isolates เท่านั้นที่มีสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้เทคนิค Agar well diffusion ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหรือการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกเป็นที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ในระดับ *in vitro* และช่วยให้สามารถการตัดสินใจในการเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดนำไปใช้ในการทดลองระดับ *in vivo* ต่อไป

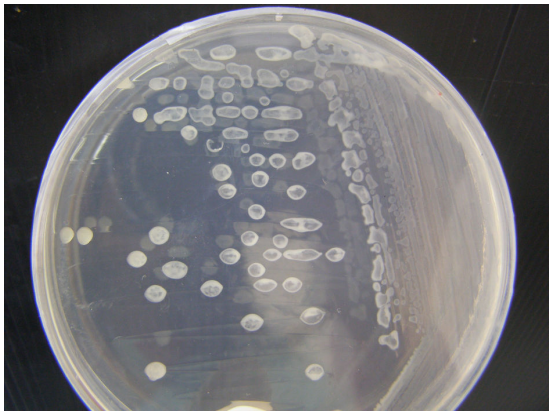
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารที่แบคทีเรียสร้างออกแล้วสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้นั่นควรเป็นสารซึ่งถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรียแล้วปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular product) ซึ่งให้ผลการทดสอบตรงกับการทดลองโดยวิธี Cross streak method ซึ่งเกิดจากการแพร่ของโปรตีนบนตัวกลางที่เป็นอาหารแข็งไปยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในบริเวณรอบ ๆ ทำให้สามารถสังเกต Clear zone ของการยับยั้งได้ตามมา ซึ่งเป็นสารที่ได้จากขบวนการ metabolism ของสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น แบคทีเรียและราบางชนิด โดยมีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตอื่น สารที่ผลิตได้ไม่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต แต่อาจเป็นประโยชน์สำหรับการอยู่รอดของจุลินทรีย์ ถ้าหากจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งสามารถสร้างสารออกมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ก็เท่ากับเป็นการลดคู่แข่งในการเจริญเติบโตลงได้ และเป็นการเพิ่มโอกาสการอยู่รอดของตัวเอง ซึ่งเป็นกลไกการทำงานของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แบคทีเรียดังกล่าวต้องมีความสามารถในการแก่งแย่งสารอาหาร รวมทั้งผลิตสารใด ๆ ก็ตามที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคและสามารถเห็นผลการยับยั้งได้ในหลอดทดลอง



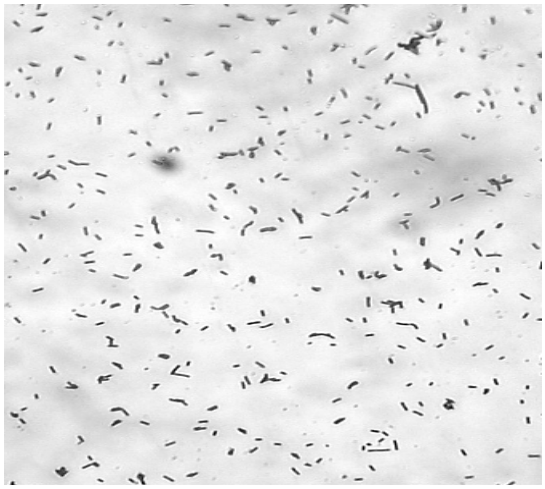
ภาพที่ 2 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี Agar well diffusion techniques โดยหลุมที่ 1 คือ หลุมที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ NB เป็นหลุมควบคุมที่ไม่มีสารจากแบคทีเรีย หลุมที่ 2 เป็นหลุมที่ใส่สารละลายจากแบคทีเรีย isolate B-1 หลุมที่ 3 คือ หลุมที่ใส่สารละลายจากแบคทีเรีย isolate B-3 และหลุมที่ 4 เป็นหลุมที่ใส่สารละลายจากแบคทีเรีย isolate B-4 ตามลำดับ

1.3 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกในวิธีการข้างต้น ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* มาทำการจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรีย isolate B-1 คือ *B. licheniformis*, แบคทีเรีย isolate B-3 คือ *B. subtilis* และแบคทีเรีย isolate B-4 คือ *B. licheniformis* ตามลำดับ ลักษณะของเชื้อทั้ง 3 isolates มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) เซลล์เรียงต่อกันเป็นสาย หรืออาจเป็นเซลล์เดี่ยว สร้างสปอร์ภายใน (endospore) สปอร์มีรูปร่างรี กลม อาจพบอยู่ตรงกลางเซลล์ หรือปลายเซลล์ เซลล์สามารถเคลื่อนที่โดยใช้แฟลเจลลัมหลายเส้นรอบ ๆ เซลล์ (peritrichous flagella) ติดสีแกรมบวก สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่ว ๆ ไป ขนาดของโคโลนีค่อนข้างใหญ่ ตั้งแต่ 2-7 มิลลิเมตร ผิวขรุขระ แห้ง คล้ายฝุ่น หรือมีริ้วรอยเป็นเส้นที่ออกจากจุดศูนย์กลาง ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวอาจจะเจริญลอยอยู่บนผิวหน้าของอาหารเหลว หรืออาจทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหรือใสและมีตะกอนทึบอยู่ที่ก้นหลอด สอดคล้องกับการรายงานของพรทิภา (2536) ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีขึ้นหากมีกลูโคส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 25-27 องศาเซลเซียส (คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียทั้ง 3 isolates แสดงไว้ในตารางที่ 2)



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *B. licheniformis* รหัส B-1 บนอาหาร Todd-Hewitt agar อายุ 24 ชั่วโมง

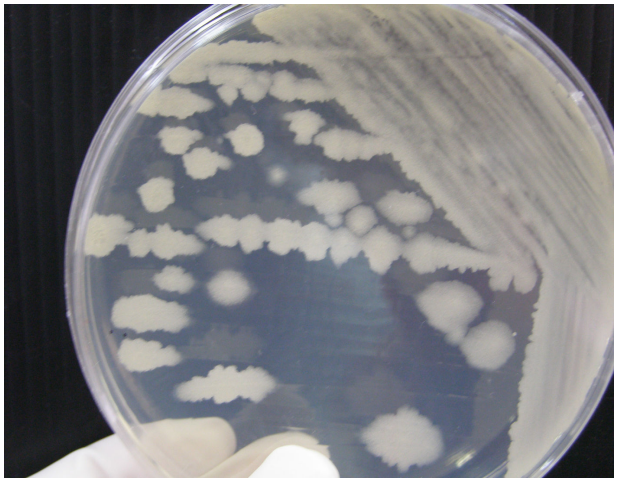


ภาพที่ 4 ลักษณะของเชื้อ *B. licheniformis* รหัส B-1 บนอาหาร Todd-Hewitt agar อายุ 24 ชั่วโมง เมื่อย้อมสีแบบ Gram's stain

ลักษณะของเชื้อ *B. licheniformis* รหัส B-1 โดยทั่วไปมีขนาด 0.6-0.8 จนถึงขนาด 1.5-3.0 ไมครอน เมื่อวัดด้วย electron micrograph มีขนาดประมาณ 0.5-0.8 ไมครอน จนถึงขนาด 1.5-2.3 ไมครอน เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อเจริญบนอาหาร Glucose agar โคโลนีจะใส เยิ้ม (ภาพที่ 3) สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยมีแฟลกเจลลาแบบ peritrichous ขนาดสั้นแต่จำนวนไม่มาก สปอร์ของเชื้อเป็นแบบ ellipsoidal, cylindrical, central หรือ paracentral และมีลักษณะบวมโป่งออกที่บริเวณส่วน Sporangia ช่วงของอุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้สูงที่สุดประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส และต่ำสุดที่ประมาณ 15 องศาเซลเซียส สามารถเจริญที่ความเค็ม 7 เปอร์เซ็นต์ของ NaCl ได้ และสามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างที่ประมาณ 5.0-5.9 ผลของการทดสอบ Biochemical test ที่ให้ผลบวก ได้แก่ Catalase, Oxidase, สามารถสร้างกรดได้จากน้ำตาล glucose, arabinose, xylose และ trehalose สามารถย่อยแป้งและใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังให้ผลในการเกิดปฏิกริยาของ reduction nitrate เป็น nitrite สามารถพบเชื้อ *B. licheniformis* ได้ในดิน น้ำทะเล น้ำจืด ในอาหารพวกอาหารแห้ง เครื่องเทศ เม็ดโกโก้ และยังพบได้ในส่วน rumen ของวัวอีกด้วย (Colin, 1989) (ลักษณะเชื้อ *B. licheniformis* ที่ได้จากการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 4)

ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ดังเช่นการรายงานของ Haroun *et al.* (2006) ได้รายงานถึงการใช้แบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ผสมเป็นโปรไบโอติกในอาหาร Biogen พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของปลานิล (*O. niloticus*) ให้ดีขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ

Nejad *et al.* (2006) ได้รายงานผลของการใช้แบคทีเรีย *B. licheniformis* ผสมเป็น commercial probiotic เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวอินเดีย *Fenneropenaeus indicus* พบว่าในระบบทางเดินอาหารมีปริมาณเชื้อ *Bacillus* เพิ่มขึ้น กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ amylase, protease และ lipase มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น 11-17 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักเพิ่มขึ้น 8-22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับ Li *et al.* (2007) ได้รายงานการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว *L. vannamei* พบว่าค่า total haemocyte count, phenoloxidase และ superoxide dismutase มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)



ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *B. subtilis* รหัส B-3 บนอาหาร Todd-Hewitt agar อายุ 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 6 ลักษณะของเชื้อ *B. subtilis* รหัส B-3 บนอาหาร Todd-Hewitt agar อายุ 24 ชั่วโมง เมื่อย้อมสีแบบ Gram's stain

ลักษณะของเชื้อ *B. subtilis* รหัส B-3 โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 0.7-0.8 ไมครอน จนถึงขนาด 2.0-3.0 ไมครอน เมื่อวัดด้วย electron micrograph มีขนาดประมาณ 0.5-0.6 ไมครอน จนถึงขนาด 1.1-3.5 ไมครอน ลักษณะโคโลนีแห้ง ขอบโคโลนีหยัก (ภาพที่ 5) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อเจริญบนอาหาร Glucose agar โปรโตพลาซึมจะย้อมติดสี haematoxylin and esocin สามารถเคลื่อนที่ได้ มีแฟลกเจลลาแบบ peritrichous ขนาดยาวและจำนวนมาก สปอร์ของเชื้อเป็นแบบ ellipsoidal, cylindrical, central หรือ paracentral และมีลักษณะบวมโป่งออกที่บริเวณส่วน Sporangia ช่วงของอุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้สูงที่สุดประมาณ 45-55 องศาเซลเซียส และต่ำสุดที่ประมาณ 5-20 องศาเซลเซียส สามารถเจริญที่ความเค็ม 7 เปอร์เซ็นต์ของ NaCl และสามารถทนค่าความเป็นกรด-ด่างที่ประมาณ 5.7 ผลของการทดสอบ Biochemical test ที่ให้ผลบวก ได้แก่ Catalase, Voges-Proskauer, สามารถสร้างกรดได้จากน้ำตาล glucose, arabinose, xylose และ mannitol สามารถใช้ประโยชน์จาก citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังให้ผลในการเกิดปฏิกริยาของ reduction nitrate เป็น nitrite สามารถพบเชื้อ *B. subtilis* ได้ในดิน น้ำทะเล น้ำจืด และดินตะกอน ในอาหารพวก เครื่องเทศ เม็ดโกโก้ ถั่ว และขนมปัง (Colin, 1989) (ลักษณะเชื้อ *B. subtilis* ที่ได้จากการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 6)

เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียอีกชนิดที่มีการนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อควบคุมแบคทีเรียที่ก่อโรค ดังรายงานของ Bairagi *et al.* (2004) ซึ่งได้รายงานการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ได้จากลำไส้ของปลา *O. mossambicus* โดยใส่ลงไปพร้อมกับ *Leucaena leucocephala* leaf meal เพื่อเพิ่มปริมาณของ free amino acid และ free fatty acid ให้กับ *Labeo rohita* fingerings นอกจากนี้ Keysami *et al.* (2007) ได้รายงานการนำแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้กับกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* โดยผ่านทาง artemia เพื่อกระตุ้นอัตราการเติบโตและเพิ่มอัตราการรอดตาย จากการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดจาก 32.2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 55.3 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถลดปริมาณแบคทีเรียแกรมลบในน้ำเลี้ยงลงได้อีกด้วย

เชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* อยู่ในวงศ์ Bacillaceae และยังพบว่าเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่ว ๆ ไปในธรรมชาติ โดยมีการกระจายของเชื้อกว้างขวางทั่วโลก มักพบในระบบนิเวศแบบ Saprophyte ในพื้นดิน ซึ่งอาจกระจายไปกับฝุ่นละออง น้ำหรือติดไปกับพืชหรือสัตว์ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในระหว่างที่มีการกระจายออกไป เนื่องจากสามารถสร้างสปอร์ซึ่งมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี อภิญญา (2525) และ พรทิพภา (2536) รายงานว่าแบคทีเรียสกุลนี้มีทั้งที่เป็นพวก Mesophile facultative หรือ Obligate thermophile, Psycophile, Acidophile และ Halophile แบคทีเรียสกุลนี้บางชนิดสามารถเจริญได้ในที่ที่อุณหภูมิเย็นจัดและร้อนจัด pH ที่สูงหรือต่ำมาก หรือในสภาพที่มีเกลือเข้มข้นสูง

จากผลการทดลองในข้อ 1.2 พบว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ก่อโรค Streptococcosis ในปลานิลในการทดลองระดับ *in vitro* สอดคล้องกับของสุชาดา (2535) ซึ่งรายงานว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ 168 ชนิด จากทั้งหมดของแบคทีเรียที่ผลิตได้ประมาณ 360 ชนิด เช่น bacitracin ผลิตโดย *B. liceniformis*, polymyxin และ colistin ผลิตโดย *B. polymyza*, subtilin, subsporin และ bacillocin ผลิตโดย *B. subtilis* นอกจากนี้ยังพบว่ามีการนำแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย เพื่อช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ และควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ เช่น *Vibrio* spp. สอดคล้องกับการทดลองของ Kozasa (1986) ที่มีการนำมาเป็นโปรไบโอติกมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. toyoi* เพื่อช่วยลดอัตราการตายของปลา Japanese eel และปลา yellowtail จากการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Edwardsiella* sp. ต่อมา Gatesoupe (1993) ทำการศึกษาการใช้สปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* IP5832 โดยการให้ผสมเป็นอาหารของ rotifer และนำไปให้ลูกปลา turbot กิน เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับ

Queiroz and Boyd (1998) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการรอดตาย และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในปลา channel catfish ขณะที่ Kenedy *et al*. (1998) รายงานการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ได้จากปลา common snook, *Centropomus undecimalis* โดยการเติมลงไปในน้ำเลี้ยง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ในช่วง larvae ของ common snook และลดความเค็มจาก ca. 36 เป็น ca. 3 practical salinity units เช่นเดียวกับ Moriarty *et al.* (1998) รายงานการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เพื่อเพิ่มอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำและควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ในบ่อเลี้ยง Rengpipat *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองโดยการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* S11 ผสมอาหารให้กุ้งกิน พบว่าอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสม *Bacilllus* S11 จะดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ โดย *Bacillus* S11 มีประสิทธิภาพในการไปกระตุ้นและเพิ่มกระบวนการ phagocytosis ส่วน Gullian (2004) รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* 64 พบว่าสามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้ง *Penaeus vannamei* ได้ขณะที่ Vaseeharan and Ramasamy (2003) ทำการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* BT23 เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio* ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นิตยา และคณะ (2549) ศึกษาการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำ ผสมอาหารให้กับกุ้งกิน พบว่าที่อัตราส่วน 1:1 ของเชื้อแบคทีเรียที่ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถทำให้ระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นและพบว่ายังมีผลทำให้จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ในลำไส้น้อยลงอีกด้วย

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

คุณสมบัติที่ทดสอบ	**เชื้อที่ทำการทดสอบ**		
	B-1	B-3	B-4
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ท่อนยาว	ท่อนยาว	ท่อนยาว
การติดสีแกรม	+	+	+
การเคลื่อนที่	+	+	+
Voges Proskauer reaction	-	+	-
H_2S production /TSI	- /K/A	-/K/A	-/K/A
Gelatinase production	+	+	+
Oxidase production	+	+	+
Catalase production	+	+	+
Nitrate reduction/ N_2 gas	+/-	+/-	+/-
Urease production	+	-	+
Citrate Utilization	+	+	+
Propionate Utilization	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Esculin hydrolysis	-	-	-
Production of acid from			
Glucose	+	+	+
Manitol	-	+	-
D-Xylose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Lecithinase production	-	-	-
Starch hydrolysis	+	-	+
ชนิดของแบคทีเรียที่จำแนกได้	*B. licheniformis*	*B. subtilis*	*B. licheniformis*

1.4 การประเมินขนาดของโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยดัดแปลงตามวิธีของ Arun *et al*. (1987); Zheng and Slavik (1999) และ Laemmli (1970)

จากการทดลองในขั้นต้นเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยใช้ Cross streak technique และ Agar well diffusion technique คือเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 และเพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่เชื้อแบคทีเรียสร้างออกมาซึ่งมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จึงนำเชื้อแบคที่เรียที่คัดเลือกได้ไปทำการทดลองต่อ

1.4.1 การประเมินขนาดของโปรตีนโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ผลจากการนำโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของ *B. licheniformis* รหัส B-1 มาแยกตามน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีการ SDS-PAGE โดยแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่นำไปย้อมสีเพื่อหาขนาดของโปรตีน และส่วนที่ไม่ย้อมสีเพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผลการศึกษาแผ่นเจลส่วนแรกที่นำไปหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่ามีแถบโปรตีนเกิดขึ้นในบริเวณส่วนที่สนใจคือ 3 แถบล่าง ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4, 7 และ 20 kDa (ตำแหน่ง a, b และ c ตามลำดับ) (ภาพที่ 7.1) เมื่อเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Katz and Demain (1977) และ Bizani and Brandelli (2002) รายงานการศึกษาที่เกี่ยวกับสาร peptide antibiotics ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. พบว่ามีขนาดอยู่ในช่วง 0.27-4.5 kDa

1.4.2 การทดสอบความสามารถของโปรตีนที่ได้จากวิธี SDS-PAGE ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* หลังจากนำแผ่นเจลที่ไม่ได้ย้อมสีซึ่งมีโปรตีนในช่วงดังกล่าวไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยตัดแผ่นเจลแต่ละส่วนไปทดสอบโดยเปรียบเทียบกับแผ่นเจลส่วนที่ไม่มีโปรตีน พบว่าแถบโปรตีนที่เกิดการยับยั้งจะอยู่ในตำแหน่ง a (ล่างสุด) ที่มีขนาดประมาณ 4 kDa โดยสังเกตจากส่วนใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่นเจล (ภาพที่ 7.2) และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบจาก Molecular weight marker พบว่ามีน้ำหนักอยู่ในช่วงประมาณ 4 kDa สอดคล้องกับการทดลองของ Galvez *et al.* (1993) รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสาร antimicrobial amoebicin A12-A และ A12-B ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย

B. licheniformis A12 โดยทำการหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SPS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.43 kDa และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Naegleria fowleri*, *Saccharomyces heterogenicus* และ *Cryptococcus neoformans* รวมทั้งสามารถยับยั้งเชื้อรา เช่น *Aspergilus niger*, *Microsporum canis* เป็นต้น นอกจากนี้ Zheng and Slavik (1999) ทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคได้ซึ่งผลิตจาก *B. subtilis* โดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.4 kDa และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และ *Listeria monocytogenes* ได้ ขณะที่ Lee *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวสารพวก antimicrobial ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. polyfermenticus* ที่ชื่อว่า Polyfermenticin SCD พบว่าสารดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รวมทั้งราและยีสต์ได้ เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.3 kDa นอกจากนี้ Martirani *et al.* (2002) ได้รายงานถึงการศึกษาเกี่ยวกับสารที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* thermophilic strain พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวผลิตสารพวก antimicrobial ชื่อ bacillocin 490 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *B. anthracis*, *B. stearothermophilus* และ *B. smithii* ได้ และเมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2 kDa เช่นเดียวกับ Cherif *et al.* (2003) ได้รายงานการวิเคราะห์สาร antimicrobial จากเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringieusis* sp. *entomocidus* H09 มีชื่อว่า entomocin 9 เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SPS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12.4 kDa และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้ง *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อราบางชนิด ได้แก่ *Aspergilus nidulans*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminis* และ *Botrytis cinerea* ได้ นอกจากนี้ Risoen *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวสารในกลุ่ม antimicrobial ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 14579 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.4 kDa และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Micrococcus luteus* ได้

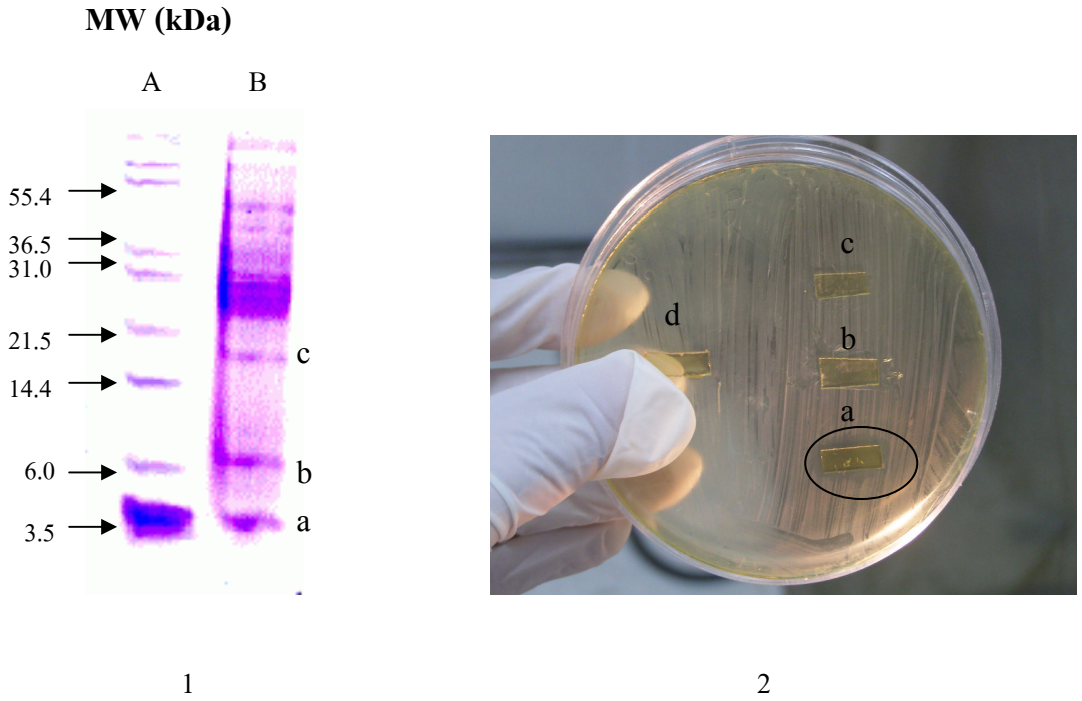
การทดลองครั้งนี้ให้ผลคล้ายกับการทดลองของ Cladera-Olivera *et al.* (2004) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์สาร antimicrobial จากเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* strain P40 ที่แยกได้จาก Amazon basin พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes*, *B. cereus* และเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* spp. ได้ เช่นเดียวกับ Korenblum *et al.* (2005) ได้รายงานการทดลองศึกษาเกี่ยวสารในกลุ่ม antimicrobial ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* LFE-1, *B. firmus* H_2O-1 และ *B. licheniformis* T6-5 ซึ่งแยกได้จาก Brazilian oil reservoir พบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง sulphate reducing bacteria ขณะที่ Gray *et al.* (2005) ได้รายงานผลการทดลองซึ่งใช้วิธี

SDS-PAGE ในการแยกโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* NEB17 พบว่าโปรตีนชนิดนี้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนประมาณ 3.16 kDa ชื่อว่า baciteriocin thuricin 17 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *E. coli* นอกจากนี้ Bizani *et al*. (2005) ได้รายงานการสกัดสาร antimicrobial จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* พบว่าเป็นสาร Cerein 8A เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SPS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 kDa และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. และ *L. monocytogenes* ได้

นอกจากนี้ Lisboa *et al*. (2006) ได้ทำการทดลองเกี่ยวสารพวก antimicrobial ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* ซึ่งแยกได้จาก Briazilian Atlantic forest เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีโมเลกุลประมาณ 5 kDa และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Serratia marcesuns* และ *Pasteurella naemolytica* ได้ เช่นเดียวกับ Motta *et al.* (2007) ได้รายงานการทดลองศึกษาสารในกลุ่ม antimicrobial จาก *Bacillus* sp. P34 ที่แยกได้จากปลา Piau-com-pinta (*Leporinus* sp.) และเมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5 kDa และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Pattnik *et al.* (2001) รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสาร Bacteriocin-like compound (lichenin) ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ที่แยกได้จาก water buffalo เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SPS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.4 kDa และพบว่าสารชนิดดังกล่าวเป็น secondary metabolite สอดคล้องกับรายงานของ อภิญญา (2525) ได้รายงานว่าการสร้างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย จะสร้างเมื่อการเติบโตของเซลล์เข้าสู่ช่วงสุดท้ายของระยะ exponential phase เรียกระยะการเจริญนี้ว่า trophophase ซึ่งอยู่ในช่วง primary metabolism เป็นระยะที่มีกระบวนการสร้างสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการดำรงชีวิต ส่วนระยะการผลิตสารปฏิชีวนะเรียกว่า “idiophase” และเรียกสารปฏิชีวนะที่ได้ว่า “idiolites” ซึ่งเกิดขึ้นในช่วง secondary metabolism จึงจัด “idiolites” เป็นสารที่ไม่จำเป็นสำหรับการเจริญ แต่อาจเป็นประโยชน์สำหรับการอยู่รอดของจุลินทรีย์ เนื่องจากในธรรมชาติมีอาหารจำกัดสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทุกชนิด ตัวอย่างเช่น การผลิตสารปฏิชีวนะ bacitracin โดยเชื้อ *B. lichenoformis* พบว่าเกิดขึ้นก่อนการสร้างสปอร์ หรือเกิดในระยะแรก ๆ ของการสร้างสปอร์ และจะปลดปล่อยสารปฏิชีวนะออกมาขณะที่สปอร์งอก เพื่อเป็นการป้องกันเซลล์ใหม่จากจุลินทรีย์อื่นใน

สภาพแวดล้อม ทำให้มีโอกาสรอดชีวิตมากขึ้น นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ อาจถูกทำลายได้ด้วยสารที่เซลล์สร้างขึ้นเอง ดังนั้นจุลินทรีย์จึงมีการผลิตสารปฏิชีวนะหลังจากเจริญเต็มที่แล้วซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีความทนทานต่อสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้น ซึ่งกลไกดังกล่าวที่สร้างขึ้นมานั้นเพื่อป้องกันตนเองให้รอดพ้นจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปนั่นเอง



ภาพที่ 7 1) น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนของสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียจากเชื้อ *B. licheniformis* รหัส B-1 (lane B) ด้วยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (lane A) 2) ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากโปรตีนที่สกัดได้ใน 3 ตำแหน่งส่วนล่าง (a, b และ c) เทียบกับแผ่นเจลส่วนที่ไม่มีโปรตีนจากแบคทีเรีย (d)

2. การศึกษาความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อปลานิล และศึกษาความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความคุ้มโรค

2.1 การศึกษาความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อปลานิล

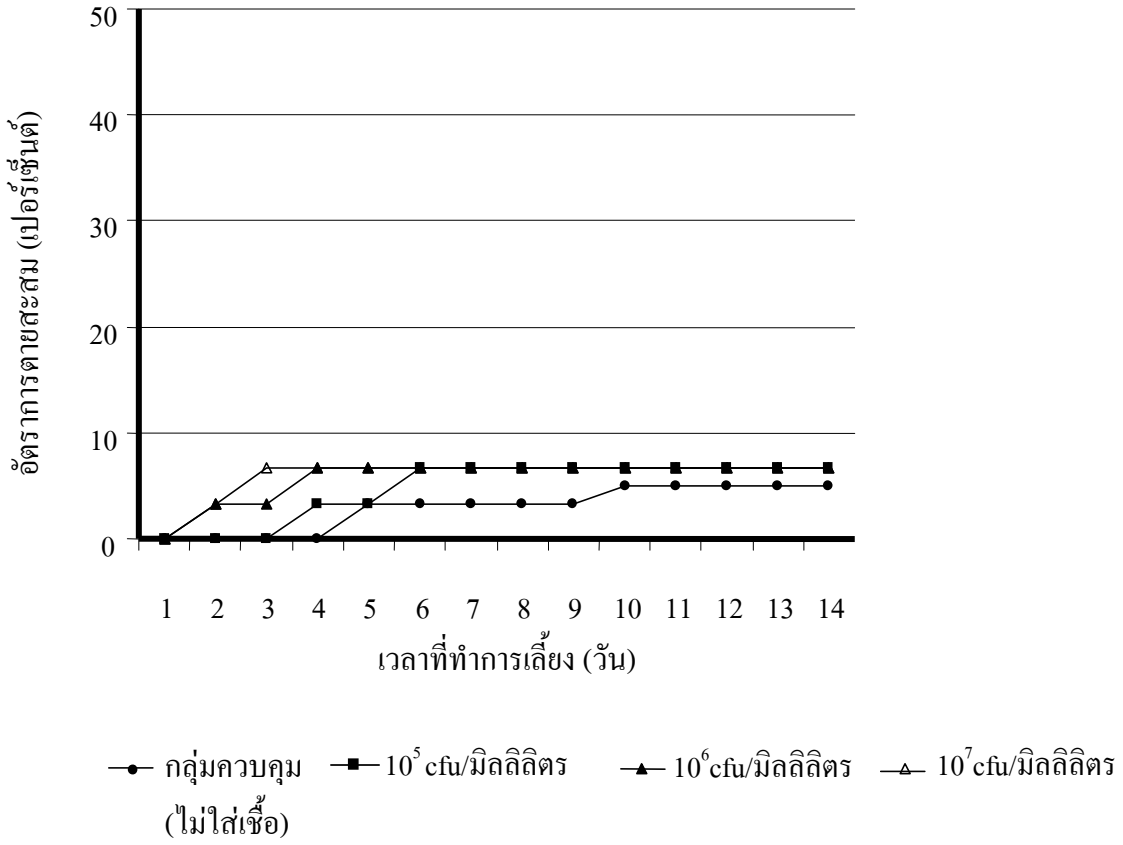
จากผลการศึกษาความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าภายหลังจากที่ปลามีการสัมผัสเชื้อแบคทีเรียพบว่าในช่วงวันที่ 1-3 ที่ความเข้มข้น 10^5 cfu/มิลลิลิตร ไม่มีอัตราการตายเกิดขึ้น แต่จะเริ่มพบอัตราการตายของปลาในวันที่ 4 ประมาณ 3.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าคงที่จนถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 3.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวันที่ 7 มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นเป็น 6.67±2.88 เปอร์เซ็นต์ และคงที่ไปจนถึงวันที่ 14 จากวันแรกที่ปลาได้สัมผัสเชื้อจนถึงวันที่ 14 พบว่ามีอัตราการตายเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเท่ากับ 6.67±2.88 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ 10^6 cfu/มิลลิลิตร พบอัตราการตายของปลาทดลองภายหลังจากที่ปลามีการสัมผัสเชื้อแบคทีเรียในวันที่ 2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ และจากนั้นอัตราการตายมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 มีค่าเท่ากับ 6.67±2.88 เปอร์เซ็นต์และคงที่ไปจนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง (ภาพที่ 8)

ขณะที่ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ 10^7 cfu/มิลลิลิตร เริ่มพบอัตราการตายในวันที่ 2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าอัตราการตายเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 และคงที่ไปจนถึงวันที่ 14 ของการทดลองซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.67±2.88 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย พบอัตราการตายในวันที่ 4 และคงที่จนถึงวันที่ 9 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของอัตราการตายในช่วงวันที่ 10 และไม่พบการตายอีกจนถึงวันที่ 14 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.33±2.66 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าอัตราการตายเฉลี่ยของปลาทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วง นั่นคือ การตายที่เกิดในช่วงก่อน 7 วัน และการตายในช่วงหลังจาก 7 วัน สำหรับการตายของปลาในช่วงแรกเกิดขึ้นเนื่องจากการที่ปลาอยู่ในสภาพหนาแน่นภายในโหลทดลอง จึงทำให้เกิดสภาวะเครียดกับปลาทดลอง ทำให้ปลาเกิดอาการก้าวร้าว ทำร้ายกันเอง เป็นผลทำให้ปลาตายและเมื่อนำปลาที่ตายไปเขี่ยเชื้อ ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 และเชื้อก่อโรคอื่น ๆ ส่วนการตายของปลาในช่วงหลังอาจจะเกิดจากสาเหตุที่ปลาทดลองอยู่ในสภาพที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เพื่อกำจัดของเสีย จึงทำให้คุณภาพน้ำมีการเปลี่ยนแปลง เป็นผลทำให้ปลาตาย

และเมื่อนำปลาที่ตายไปเขี่ยเชื้อ ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 และเชื้อก่อโรคอื่น ๆ เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 8)

จากผลการทดลองความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 กับปลาทดลองพบอัตราการตายประมาณ 6.67±2.88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 5.33±2.66 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่ใช่อัตราการตายที่ผิดปกติ และจากการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียจากปลาที่ตายไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 จึงแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีความปลอดภัยต่อปลาทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sharp *et al.* (1989) ได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* จัดว่าเป็น GRAS bacteria ซึ่งปลอดภัยต่อการนำไปประยุกต์ใช้และในประเทศไทยเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ให้เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกได้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ปัจจุบันมีการนำโปรไบโอติกไปใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคทั้งในปลา กุ้งและสัตว์น้ำอื่น ๆ นอกจากนี้ Irianto and Austin (2002) ได้รายงานว่าโปรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นกลุ่มหลักซึ่งถือเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการนำไปใช้กันอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นวิธีการให้ในรูปของสปอร์ผสมในอาหาร การให้ผ่านทางอาหารที่มีชีวิต เช่น rotifer หรือ artemia นอกจากนี้วิธีการเติมลงในน้ำที่ใช้เลี้ยง เป็นอีกวิธีที่นิยมไม่ว่าจะเป็นในปลา Common snook (Kennedy *et al.*,1998), Channel catfish (Queiroz and Boyd, 1998), *O. niloticus* (Suyanandana *et al.*, 1998) *Brachionus plicatilis* (Hirata *et al*., 1998) และ *Oncorhynchus mykiss* (Gram *et al*., 1999; 2001)



ภาพที่ 8 อัตราการตายสะสมของปลานิลที่สัมผัสแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันภายใน 14 วัน ของการทดลอง

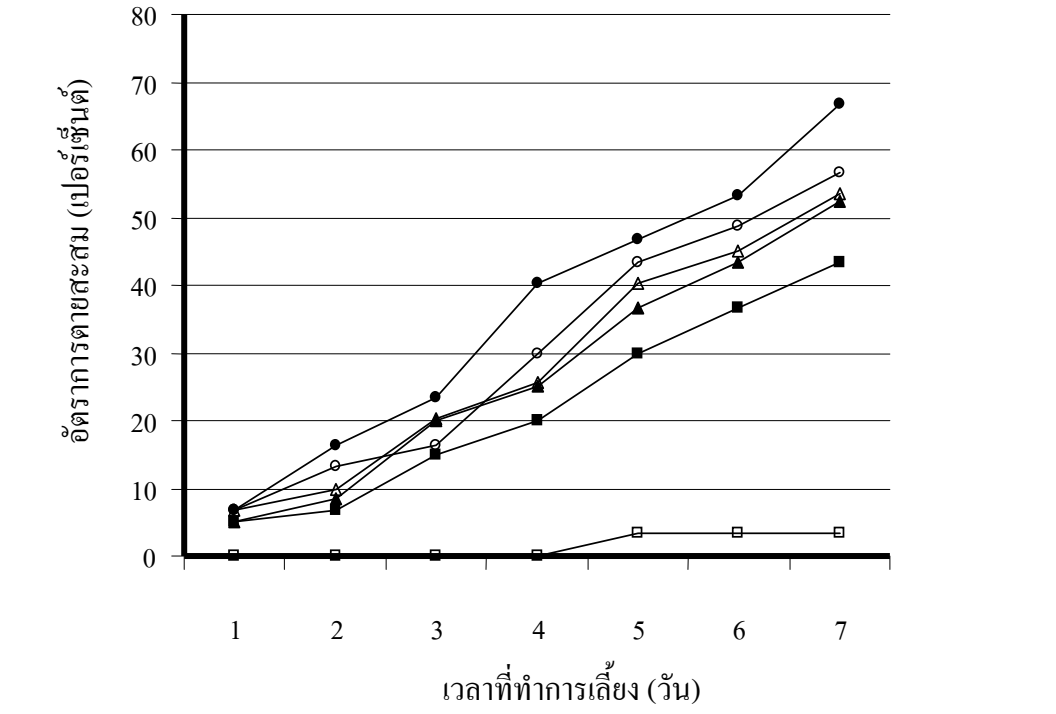
2.2 การศึกษาความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ใช้ในการทดสอบความคุ้มโรค

จากผลการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ใช้ในการทดสอบความคุ้มโรค พบอัตราการตายเพียงเล็กน้อยภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากที่เชื้อแบคทีเรียสัมผัสกับปลาทดลอง และพบว่ามีแนวโน้มของอัตราการตายเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเป็น 10^9 cfu/มิลลิลิตร ซึ่งพบว่าอัตราการตายในช่วง 3 วันแรก เพิ่มขึ้นจาก 6.67±0.00 เปอร์เซ็นต์ เป็น 23.33±2.09 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่างจากชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^5 cfu/มิลลิลิตร ที่พบอัตราการตายในวันแรกเท่ากับ 5.33±2.66 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 15.33±2.66 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ส่วนในกลุ่มที่ใช้ระดับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เท่ากับ 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/มิลลิลิตร พบอัตราการตายในช่วงวันแรก ๆ ไม่ค่อยแตกต่างกันคือประมาณ 5.33±2.66, 6.67±2.12 และ 6.67±2.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และในวันที่ 3 อัตราการตายจะอยู่ที่ 20.67±1.98, 20.33±2.15 และ 16.33±3.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในช่วงแรก ๆ นี้อัตราการตายในทุกชุดการทดลองจะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ โดยพบว่าอัตราการตายเฉลี่ยจะเพิ่มประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ และจะพบว่ามีแนวโน้มที่อัตราการตายเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 3 ไปจนถึงวันที่ 5 อีกครั้ง โดยในวันที่ 5 พบว่าอัตราการตายที่ความเข้มข้น 10^5 และ 10^6 cfu/มิลลิลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน คือ ไม่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามีอัตราการตายที่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มทดลองที่ใช้ความเข้มข้น 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/มิลลิลิตร ซึ่งในช่วงนี้มีค่าอัตราการตายเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และจากวันที่ 5 จนถึงวันที่ 7 พบว่ามีอัตราการตายสะสมที่สูงขึ้นเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะในกลุ่มทดลองที่มีการใช้เชื้อแบคทีเรียเข้มข้นเท่ากับ 10^9 cfu/มิลลิลิตร ค่าอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 66.67±4.71 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/มิลลิลิตร มีค่าอัตราการตายประมาณ 52.33±4.71, 53.67±2.64 และ 56.67±3.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนในกลุ่มที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 cfu/มิลลิลิตร จากวันที่ 5 จนถึงวันที่ 7 มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในวันที่ 7 มีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 43.33±3.09 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าอัตราการตายของปลาทดลองที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/มิลลิลิตร ในช่วง 5 วันแรกสามารถแบ่งค่าความเข้มข้นได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีค่าอัตราการตายเกิน 40 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ที่ความเข้มข้น 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/มิลลิลิตร และอีกกลุ่มที่ความเข้มข้น 10^5 และ 10^6 cfu/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าอัตราการตายสะสม

ไม่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในช่วงหลังวันที่ 5 ไปจนถึงวันที่ 7 สามารถแบ่งค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลาทดลองตายออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มความเข้มข้นที่ให้ค่าอัตราการตายไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ คือ ที่ความเข้มข้น 10^5 cfu/มิลลิลิตร และกลุ่มความเข้มข้นที่ทำให้อัตราการตายของปลาทดลองเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ที่ความเข้มข้น 10^6, 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/มิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มความเข้มข้นที่ทำให้มีอัตราการตายเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกที่ความเข้มข้น 10^9 cfu/มิลลิลิตร มีอัตราการตายสูงถึง 66.67±4.71 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 2 ความเข้มข้น 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/มิลลิลิตร มีค่าอัตราการตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองทำให้ได้ค่าอัตราการตายที่สูงที่สุด ค่าที่อยู่ในช่วงกลาง และค่าที่ต่ำที่สุด เมื่อพิจารณาจากค่าทั้ง 3 จึงทำให้สามารถตัดค่าสูงที่สุดและค่าต่ำที่สุดออก เหลือค่าที่ให้พิจารณาแต่เพียงค่ากลางเท่านั้น คือ ที่ความเข้มข้น 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/มิลลิลิตร ซึ่งพบว่าทั้ง 3 ค่าให้อัตราการตายที่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 จึงเลือกค่าที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/มิลลิลิตร เป็นค่าเหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบความคุ้มโรค เนื่องจากสอดคล้องกับการทดลองของ Brunt and Austin (2005) ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียโปรไบโอติก *A. sobria* GC2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค Streptococcosis ในปลา rainbow trout โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* 00-318 ที่ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^6 cfu/มิลลิลิตร ในการทดสอบช่วงความเข้มข้นที่เลือกใช้ในการหาค่าที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความคุ้มโรคขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ ประการ เช่น ขนาดปลา ความสามารถในการผลิตเชื้อทดสอบ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Li and Gatlin (2004) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถของผลิตภัณฑ์ prebiotic Grobiotic TM AE ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* ในปลา hybrid striped bass (*Moronechrysops* x *M. saxatilis*) โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นที่ 10^5 cfu/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นทดสอบ ขณะที่ Shoemaker *et al*. (2000) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง fish density และระดับความเข้มข้นที่ทำให้เกิดโรค Streptococcosis ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* โดยการแช่ที่ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ $2.5x10^7$, $5x10^7$ $1x10^8$ cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ และพบอัตราการตายเป็น 4.8, 28.4 และ 25.6 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Shoemaker *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะการเจริญเติบโตและความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* ในปลานิล โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้น 10^3, 10^4 และ 10^5 cfu/มิลลิลิตร จากการทดลองเห็นได้ว่าเมื่อมีการใช้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระดับที่เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้อัตราการตายของปลาทดลองเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเชื้อทดสอบ โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น 29.6, 36.3, 45.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายสะสมเฉลี่ยของปลานิลที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค Streptococcosis ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

3. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียต่อการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลภายใต้สภาพห้องทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าปลาในกลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) ที่ไม่มีการใส่แบคทีเรียเลยเริ่มสามารถสังเกตเห็นอัตราการตายในวันที่ 5 ประมาณ 1.66±2.87 เปอร์เซ็นต์ และคงที่จนถึงวันที่ 9 แต่มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 10 เท่ากับ 3.3±5.77 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มคงที่จนถึงวันที่ 7 และเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 มีอัตราการตายประมาณ 5.33±2.66 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุการตายในช่วงแรกอาจจะเกิดจากปลาทดลองอยู่ในสภาวะเครียดภายใต้สภาพห้องทดลอง จึงแสดงอาการก้าวร้าว ทำร้ายกันเอง ส่งผลทำให้เกิดการตาย ส่วนการตายในช่วงหลัง คือประมาณหลังวันที่ 10 อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการทดลองที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ มีการสะสมของปริมาณของเสียในโหลทดลองเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อคุณภาพน้ำที่เปลี่ยนไปจึงทำให้ปลาตายและเมื่อนำปลาที่ตายมาเขี่ยเชื้อพบว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียใด ๆ ขึ้น (ภาพที่ 10, ตารางที่ 4)

ส่วนกลุ่มการทดลองที่ 2 ซึ่งใช้สารละลายแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ความเข้มข้น 10^5 cfu/มิลลิลิตร มีอัตราการตายหลังจากที่ปลาทดลองสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียใน 24 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 1.67±2.87 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 เป็น 3.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ และคงที่ไปจนถึงวันที่ 4 หลังจากวันที่ 4 ไปจนถึงวันที่ 9 พบว่ามีอัตราการตายเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในแต่ละวันและหลังจากวันที่ 9 พบว่าอัตราการตายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.33±2.93 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกลุ่มทดลองที่ 3 ซึ่งใช้สารละลายแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/มิลลิลิตร พบอัตราการตายหลังจาก 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1.67±2.87 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าหลังจากนั้นอัตราการตายค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 8 และเริ่มมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นในวันที่ 9 โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อครบ 14 วัน ซึ่งมีค่าอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 13.33±2.63 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10, ตารางที่ 4)

ในกลุ่มการทดลองที่ 4 ซึ่งใช้สารละลายแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/มิลลิลิตร หลังจากที่ปลาทดลองมีการสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียใน 24 ชั่วโมงแรกไม่พบอัตราการตาย แต่จะเริ่มพบอัตราการตายเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 4 ซึ่งเท่ากับ 1.67±2.87 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มคงที่จนถึงวันที่ 7 เท่ากับ 3.33±5.77 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 10 และมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 12 มีค่าเท่ากับ 8.33±2.77

เปอร์เซ็นต์ และคงที่จนถึงวันที่ 14 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าในช่วง 7 วันแรก อัตราการตายของปลาไม่สูงมาก สาเหตุการตายอาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* สามารถแพร่กระจายภายใน 24-72 ชั่วโมง และพบว่าอัตราการตายหลังจากวันที่ 7 มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียใด ๆ โดยเฉพาะในช่วงหลังวันที่ 10 ที่มีอัตราการตายสูงกว่าวันแรกประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปลาในกลุ่มทดลองโดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย isolate B-1 เท่ากับ 10^5 cfu/มิลลิลิตร มีอัตราการตายที่ค่อนข้างสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่มีค่าความเข้มข้นเท่ากับและสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค คือที่ 10^6 และ 10^7 cfu/มิลลิลิตร แต่ก็ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการตายสะสมแต่อย่างใด ($P>0.05$) อีกทั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เป็นเชื้อที่ก่อโรคแบบเรื้อรัง ทำให้สังเกตเห็นอาการตายที่เพิ่มขึ้น ในช่วงหลังสาเหตุที่มีแนวโน้มของการตายเพิ่มขึ้นที่สำคัญอีกประการ คือ ตัวปลาทดลอง หากปลาทดลองมีอาการเครียดไม่ว่าจะด้วยสาเหตุใด ๆ ก็ตามจะส่งผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลาต่ำลงทำให้ปลามีการยอมรับเชื้อที่ง่ายขึ้น

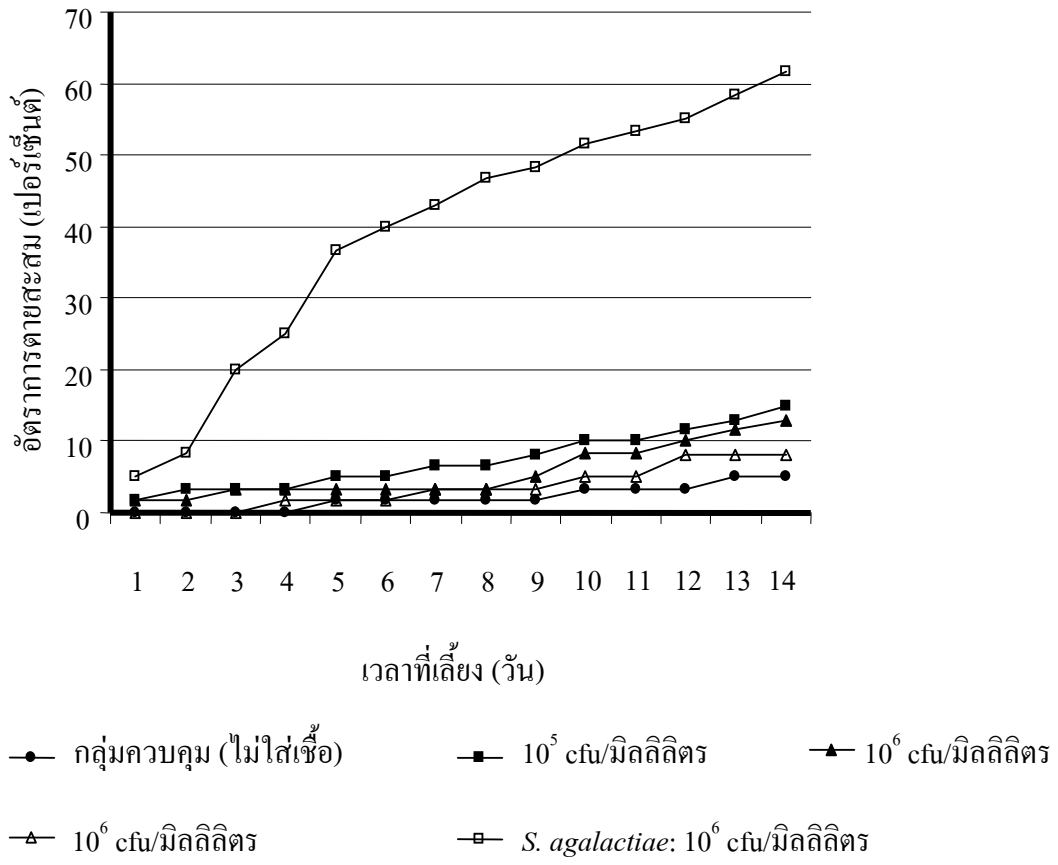
ส่วนในกลุ่มที่ใช้ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^6 และ 10^7 cfu/มิลลิลิตร ควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค พบว่าโอกาสในการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียย่อมมีมากกว่าอีกทั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 มีอัตราการเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วกว่าภายในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยสังเกตจากกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิด นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้ จึงส่งผลให้ปลาทดลองในกลุ่มที่ความเข้มข้น 10^6 และ 10^7 cfu/มิลลิลิตร มีค่าอัตราการตายที่ต่ำกว่าในกลุ่มแรกที่ได้รับเชื้อ *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ความเข้มข้น 10^5 cfu/มิลลิลิตร ซึ่งความสามารถในการผลิตสารดังกล่าวมีประโยชน์สำหรับแบคทีเรียเมื่อต้องมีการแข่งขันในสภาวะแวดล้อมที่จำกัด เพื่อการอยู่รอด แต่อย่างไรก็ตามยังพบการตายของปลาที่เกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* เนื่องจากปลาบางส่วนมีสภาวะเครียดเมื่ออยู่ในสภาพห้องทดลอง ปลาจึงแสดงอาการก้าวร้าว ทำร้ายกันเอง เนื่องจากความหนาแน่นของปลาในโหลทดลอง สภาพอากาศ และแสงสว่าง อาจส่งผลให้ปลามีการยอมรับเชื้อได้ง่ายกว่าปกติ จึงส่งผลทำให้ปลาบางส่วนตาย นอกจากนี้เมื่อสังเกตปลาทดลองที่ตายด้วยเชื้อ *S. agalactiae* จะพบว่าปลามีอาการว่ายน้ำช้าลง ลำตัวคล้ำ ไม่กินอาหาร และเมื่อนำปลาดังกล่าวไปเขี่ยเชื้อจากส่วนตับ พบเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเล็ก ๆ จำนวนมากและเมื่อทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

ส่วนในกลุ่มที่ 5 ซึ่งได้รับเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบว่ามีอัตราการตายเพิ่มขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมงที่ปลามีการสัมผัสกับเชื้อ และพบว่ามีแนวโน้มของอัตราการตายเพิ่มขึ้น ในช่วงวันที่ 3 มีอัตราการตายเพิ่มจากวันแรกประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นเป็นเกือบ 20 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 ในวันที่ 10 อัตราการตายของปลาเพิ่มสูงขึ้นเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นถึงวันที่ 14 พบว่ามีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 61.67±2.58 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำปลาที่ตายมาเขี่ยเชื้อ พบมีเชื้อโคโลนีขนาดเล็กจำนวนมากและการตรวจสอบยืนยันผลทางชีวเคมีว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน พบว่าอัตราการตายของปลาในแต่ละกลุ่มที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1ในทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น 15.33±2.93, 13.67±2.63 และ 8.33±2.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอัตราการตายของปลาทั้ง 3 กลุ่ม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มปลาที่ไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ซึ่งมีอัตราการตายสูงถึง 61.67±2.58 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ทุกความเข้มข้นมีความสามารถในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้

จากผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Garriques and Arevalo (1995) ได้รายงานถึงการใช้เชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่เป็นโปรไบโอติกโดยการแช่ร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้น $2x10^3$ cfu/มิลลิลิตร ให้กับลูกกุ้ง *L. vannamei* หลังจาก 96 ชั่วโมง ไม่พบอัตราการตายเลย เช่นเดียวกับ Gram *et al.* (1999) ได้รายงานการใช้เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก *P. fluorescens* AH2 ที่ความเข้มข้น 10^5 cfu/มิลลิลิตร แช่นาน 5 วัน และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *V. anguillarum* ที่ความเข้มข้น 10^4-10^5 cfu/มิลลิลิตร โดยการแช่นาน 1 ชั่วโมง และแช่ด้วยเชื้อแบคทีเรียโปรไปโอติกอีกครั้งที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/มิลลิลิตร นาน 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดอัตราการตายของปลา rainbow trout ในวันแรกจาก 46 เปอร์เซ็นต์ เป็น 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบ 7 วัน ส่วนในกลุ่มที่ไม่มีการให้แบคทีเรียโปรไปโอติกพบอัตราการตายเท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Makridis *et al.* (2000) ได้รายงานการใช้แบคทีเรีย 2 ชนิด strain 4: 44 และ PB52 เพื่อเพิ่มอัตราการรอดและการเจริญเติบโตของ turbot larvae โดยวิธีการเติมเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวลงไปในน้ำ พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนจาก $2.5\pm1.4x10^4$ bacteria/larva เป็น $5.2\pm1.5x10^4$ bacteria/larva และ $0.4\pm0.1x10^4$ bacteria/larva เป็น $12.5\pm0.7x10^4$ bacteria/larva ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Gram *et al.* (2001) ได้รายงานการใช้เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* AH2 ที่ความเข้มข้น 10^5-10^6 cfu/มิลลิลิตร และใส่เชื้อแบคทีเรียก่อโรค *A. salmonicida* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^4

cfu/มิลลิลิตร โดยการเติมลงไปในน้ำเลี้ยงปลา salmon พบว่าปลามีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น 70-80 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ Spanggaard *et al.* (2001) ได้รายงานการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก *Pseudomonas* spp. และ *Carnobacterium* spp. โดยการแช่ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *V. anguillarum* ให้กับปลา rainbow trout พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ Vaseeharan and Ramasamy (2003) ได้ทำการศึกษาอัตราการตายสะสมของลูกกุ้งกุลาดำที่มีการให้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* BT23 โดยการแช่เป็นช่วงเวลาสั้นเปรียบเทียบกับการแช่เป็นช่วงเวลานาน ช่วงเวลาสั้นแช่เพียง 1 ชั่วโมง และช่วงเวลานานแช่ 5 วัน และทดสอบความต้านทานโรคด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่าอัตราการตายสะสมเป็น 60 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการทดลองเห็นได้ว่าวิธีการใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้แช่ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* สามารถลดอัตราการตายของปลาทดลองลงได้ และวิธีการนี้ถือเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่เป็นการประยุกต์นำเอาแบคทีเรียโปรไบโอติกไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพเห็นได้จากรายงานข้างต้น นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นโดยทั่วไปของการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจะอยู่ในช่วง 10^5-10^8 cfu/มิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการได้แก่ ชนิดและขนาดของปลา รูปแบบการเพาะเลี้ยง เป็นต้น



ภาพที่ 10 อัตราการตายสะสมของปลานิลที่แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค Streptococcosis โดยเชื้อ *S.agalactiae* (S) ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 cfu/มิลลิลิตร

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเหนี่ยวนำให้เกิดโรค Streptococcosis โดยเชื้อ *S .agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 cfu/มิลลิลิตร ในช่วงเวลา 14 วัน

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมที่วันต่าง ๆ				
	1	3	5	7	14
กลุ่มการทดลองที่ 1 (กลุ่มควบคุมผลลบ[1])	0.00±0.00	0.00±0.00	1.66±2.87	1.66± 2.87	5.33±2.67
กลุ่มการทดลองที่ 2 (10^5:10^6 cfu/มิลลิลิตร)	1.67±2.87 a	3.33±5.77 a	5.33±2.66 a	6.67±2.87 a	15.33±2.93 a
กลุ่มการทดลองที่ 3 (10^6:10^6 cfu/มิลลิลิตร)	1.67±2.87 a	3.33±5.77 a	3.33±2.08 a	3.33±1.53 a	13.67±2.63 a
กลุ่มการทดลองที่ 4 (10^7:10^6 cfu/มิลลิลิตร)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1.66±2.87 a	3.33±5.77 a	8.33±2.77 a
กลุ่มการทดลองที่ 5 (กลุ่มควบคุมผลบวก[2])	5.33±0.02 b	20.67±2.67 b	36.67±2.76 b	43.33±5.09 b	61.67±2.58 b

หมายเหตุ ค่าความเฉลี่ยของอัตราการตายสะสม±ความแปรปรวนที่กำกับไว้โดยพยัญชนะภาษาอังกฤษ ซึ่งแตกต่างกันในแนวตั้ง ตั้งแต่กลุ่มการทดลองที่ 2-5 แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

[1] กลุ่มควบคุมผลลบไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 และ *S .agalactiae*

[2] กลุ่มควบคุมผลบวกใส่เชื้อ *S .agalactiae*