



รายงานการวิจัยเรื่อง การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกแบคทีเรีย
เพื่อใช้ในการควบคุมโรค epizootic ulcerative syndrome ในปลาช่อน

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน

Assistant Professor Dr. Eakaphun Bangyeekhun

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

พิมพ์เผยแพร่โดยมหาวิทยาลัยศิลปากร

ปี พ.ศ. ที่เสร็จ 2552

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ ดร. สุปราณี ชินบุตร (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง) สำหรับคำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ของโครงการวิจัย Prof. Dr. Kishio Hatai (Division of Fish Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Animal Science University ประเทศญี่ปุ่น) สำหรับคำแนะนำและความอนุเคราะห์หา *Aphanomyces invadans* สายพันธุ์ RF6 และ NJM 9510 และนางสาวสนิรส์ม์ แสงเมือง (ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร) สำหรับความร่วมมือในการปฏิบัติงานของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร (ทุนเลขที่ SURDI รดน./2551/03)

ชื่อโครงการ การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกแบคทีเรียเพื่อใช้ในการควบคุมโรค epizootic ulcerative syndrome ในปลาช่อน

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ ปีพุทธศักราช 2552

บทคัดย่อ

Epizootic ulcerative syndrome (EUS) คือโรคที่เกิดจากการติดเชื้อของรา *Aphanomyces invadans* ในปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติและปลาเพาะเลี้ยง การใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียสำหรับควบคุมและป้องกันการเกิดโรค EUS ในปลาจะเป็นทางเลือกที่เหมาะสมเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีที่อาจตกค้างในสิ่งแวดล้อม การวิจัยนี้ได้แยกแบคทีเรียจำนวน 60 ไอโซเลท โดยแยกได้จากปลาช่อน (*Channa atriatu*s Block) 17 ไอโซเลท ปลาดุก (Cyclocheilichthys enoplos Bleeker) 8 ไอโซเลท ปลาอุก (Clarias macrocephalus Günther) 8 ไอโซเลท และปลานิล (*Tilapia oreochromis* Niloticus) 27 ไอโซเลท และมีแบคทีเรียเพียง 10 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. invadans* ได้ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท MSU050 และ MSU052 ซึ่งแยกได้จากปลาดุก มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก คือสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2-5 และในสภาวะที่มีเกลือ น้ำที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-3 และไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ แบคทีเรียไอโซเลท MSU049 ซึ่งแยกได้จากปลาดุก เจริญได้ไม่ดีในสภาวะที่เป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2-5 และในสภาวะที่มีเกลือ น้ำ และไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดง ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลทอื่นเจริญได้ไม่ดีในสภาวะที่เป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2-5 และในสภาวะที่มีเกลือ น้ำ แต่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดง แบคทีเรียไอโซเลท MSU049, MSU050 และ MSU052 ถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และสามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท MSU049 เป็น *Staphylococcus epidermidis* และแบคทีเรียไอโซเลท MSU050 และ MSU052 เป็น *Enterobacter cloacae* และเป็นเชื้อตัวเดียวกัน การทดสอบความสามารถในการป้องกันและควบคุมโรค EUS ด้วยการเติมเชื้อ *S. epidermidis* MSU049 และ *E. cloacae* MSU050 ให้แก่ปลาช่อนที่ได้รับการชักนำให้ติดเชื้อ *A. invadans* พบว่าสามารถลดอัตราการตายจากร้อยละ 60 เป็นร้อยละ 10 และร้อยละ 25 ตามลำดับ

คำสำคัญ: โพรไบโอติกแบคทีเรีย, epizootic ulcerative syndrome, EUS, *Aphanomyces invadans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*

Research Isolation and characterization of the potential probiotic bacteria for control epizootic ulcerative syndrome in snakehead fish

Researcher Assistant Professor Dr. Eakaphun Bangyeekhun

Office Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University

Research Grants Research and Development Institute, Silpakorn University

Year 2009

ABSTRACT

Epizootic ulcerative syndrome (EUS) is a serious disease caused by an Oomycotan, *Aphanomyces invadans*, in both natural and farmed fish. To protect and prevent the fish from EUS, the application of probiotic bacteria is an alternative approach to reduce the use of antibiotics and other therapeutic chemicals. In this study, sixty bacterial isolates were pure isolated from digestive tract of 4 fish species i.e. 17 isolates from snakehead (*Channa atriatius* Block), 8 isolates from soldier river barb (*Cyclocheilichthys enoplos* Bleeker), 8 isolates from catfish (*Clarias macrocephalus* Günther) and 27 isolates from Nile tilapia (*Tilapia oreochromis* Niloticus). Of these, only 10 isolates showed inhibition activity against the growth of *A. invadans* *in vitro*. The isolate MSU050 and MSU052 isolated from soldier river barb exhibited the potential probiotic activities, that is they could resist to the acid condition (pH 2.0-5.0) and bile salt (up to 0.30%), and showed the non-hemolysis on the blood agar. The isolate MSU049 isolated from soldier river barb could not grow in medium with acid condition and in bile salt, and showed the non-hemolysis on the blood agar. Other isolates could not grow in medium with acid condition and in bile salt, but showed hemolytic activity on red blood cells. Therefore, bacteria isolate MSU049, MSU050 and MSU052 were selected for further studies. Base on morphological examination, some biochemical tests and 16S rDNA sequence, the MSU049 was tentatively identified as *Staphylococcus epidermidis* while the MSU050 and MSU052 were precisely the same strain and tentatively identified as *Enterobacter cloacae*. In the challenge test of *A. invadans* at medial lethal concentration (10^6 zoospore/ml) on snakehead, the probiotic *S. epidermidis* MSU049 and *E. cloacae* MSU050 decrease mortality rate from 60% to 10% and 25%, respectively.

Key words: probiotic bacteria, epizootic ulcerative syndrome, EUS, *Aphanomyces invadans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*

สารบัญเรื่อง

สารบัญตาราง.....	5
สารบัญภาพ.....	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	9
บทนำ.....	10
บทตรวจสอบเอกสาร.....	12
วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
ผลการวิจัย.....	35
วิจารณ์ผลการวิจัย.....	55
สรุปและข้อเสนอแนะ.....	58
บรรณานุกรม.....	59
ภาคผนวก.....	67

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1. รายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้โฟรโบอิดิกในสัตว์น้ำ.....	14
ตารางที่ 2. ชนิดของปลา แหล่งตัวอย่างปลา และความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Aphanomyces invadans</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	37
ตารางที่ 3. การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 3 4 5 และ 6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	41
ตารางที่ 4. การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 3 4 5 และ 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	42
ตารางที่ 5. การเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่เติมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.15 และ 0.30 ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส.....	43
ตารางที่ 6. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท MSU049, MSU050 และ MSU052.....	46
ตารางที่ 7. ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Aphanomyces invadans</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	68
ตารางที่ 8. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2, 3, 4, 5 และ 6 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ.....	76
ตารางที่ 9. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2, 3, 4, 5 และ 6 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ.....	80
ตารางที่ 10. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.15 และ 0.30 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ.....	84
ตารางที่ 11. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.15 และ 0.30 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ.....	87
ตารางที่ 12. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ.....	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 13. บันทึกการตายของปลาช่อน เมื่อชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา <i>Aphanomyces invadans</i> ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3).....	91
ตารางที่ 14. ร้อยละอัตราการตายสะสมของปลาช่อน เมื่อชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา <i>Aphanomyces invadans</i> ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3).....	92
ตารางที่ 15. บันทึกการตายของปลาช่อน เมื่อใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย <i>Staphylococcus epidermidis</i> MSU049 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน ก่อนหรือหลังการชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา <i>Aphanomyces invadans</i> ด้วยวิธีการต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ (n=3).....	93
ตารางที่ 16. ร้อยละอัตราการตายสะสมของปลาช่อน เมื่อใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย <i>Staphylococcus epidermidis</i> MSU049 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน ก่อนหรือหลังการชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา <i>Aphanomyces invadans</i> ด้วยวิธีการต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ (n=3).....	94
ตารางที่ 17. บันทึกการตายของปลาช่อน เมื่อใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย <i>Enterobacter cloacae</i> MSU050 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน ก่อนหรือหลังการชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา <i>Aphanomyces invadans</i> ด้วยวิธีการต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ (n=3).....	97
ตารางที่ 18. ร้อยละอัตราการตายสะสมของปลาช่อน เมื่อใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย <i>Staphylococcus epidermidis</i> MSU049 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน ก่อนหรือหลังการชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา <i>Aphanomyces invadans</i> ด้วยวิธีการต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ (n=3).....	98

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1. การยับยั้งการเจริญของรา <i>Aphanomyces invadans</i> โดยแบคทีเรียไอโซเลท MSU001 (ก), MSU003 (ข), MSU027 (ค), MSU033 (ง), MSU037 (จ), MSU040 (ฉ), MSU046 (ช), MSU049 (ซ), MSU050 (ญ) และ MSU052 (ฎ) ด้วยเทคนิค point inoculation (point inoculation 3 ตำแหน่ง ชุดควบคุม 1 ตำแหน่ง).....	36
ภาพที่ 2. การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท MSU049 (ก), MSU050 (ข) และ MSU052 (ค) แบบที่ไม่สามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง และ MSU040 (ง) แบบที่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์บนอาหาร blood agar.....	44
ภาพที่ 3. การติดสีย้อมแกรมบวกของแบคทีเรียไอโซเลท MSU049 (ก), และแกรมลบของแบคทีเรียไอโซเลท MSU050 (ข) และ MSU052 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์.....	46
ภาพที่ 4. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอติกของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย <i>S. epidermidis</i> MSU049 กับ 16S rDNA ของแบคทีเรีย <i>S. epidermidis</i> SW-3/RSE (accession No. FJ415323), <i>S. epidermidis</i> TPL02 (accession No. EU373368) และ <i>S. epidermidis</i> HNR19 (accession No. EU373384) ในฐานข้อมูลของ NCBI และ * แสดงการอนุรักษ์ของนิวคลีโอติก.....	48
ภาพที่ 5. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอติกของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย <i>E. cloacae</i> MSU050 และ MSU052 กับ 16S rDNA ของแบคทีเรีย <i>E. cloacae</i> CMG3058 (accession No. EU048321) และ <i>E. cloacae</i> CMG3058 (accession No. EU849019) ในฐานข้อมูลของ NCBI และ * แสดงการอนุรักษ์ของนิวคลีโอติก.....	49
ภาพที่ 6. การเจริญของ <i>S. epidermidis</i> MSU049 (สี่เหลี่ยม) และ <i>E. cloacae</i> MSU050 (สามเหลี่ยม) โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 620 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ.....	50
ภาพที่ 7. ร้อยละการตายสะสมของปลาช่อน หลังจากทำการชักนำให้เกิดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ที่ความเข้มข้น 10^5 (วงกลม) 10^6 (สี่เหลี่ยม) และ 10^7 (สามเหลี่ยม) สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ.....	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

- ภาพที่ 8. ร้อยละการตายสะสม (ก) และอัตราการตายสะสมในวันที่ 15 โดย กลุ่มที่ 1 เป็นชุดควบคุมการไม่เกิดโรค กลุ่มที่ 2 เป็นชุดควบคุมการเกิดโรค กลุ่มที่ 3 เป็นชุดทดลองใส่โพไบโอติกแบคทีเรีย กลุ่มที่ 4 เป็นชุดทดลองใส่โพไบโอติกแบคทีเรียครั้งเดียวและเลี้ยงปลาเป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา กลุ่มที่ 5 เป็นชุดทดลองใส่โพไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา กลุ่มที่ 6 เป็นชุดทดลองใส่ zoospore เป็นเวลา 3 วัน ก่อนเติมโพไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาครั้งเดียว และกลุ่มที่ 7 เป็นชุดทดลองใส่ zoospore เป็นเวลา 3 วัน ก่อนทำเต็มโพไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน (ข) ของปลาช่อน เมื่อใช้โพไบโอติกแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* MSU049 ก่อนหรือหลังการชักนำให้เกิดโรคโดยรา *Aphanomyces invadans* ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 4 ซ้ำ สัญลักษณ a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ..... 53
- ภาพที่ 9. ร้อยละการตายสะสม (ก) และอัตราการตายสะสมในวันที่ 15 โดย กลุ่มที่ 1 เป็นชุดควบคุมการไม่เกิดโรค กลุ่มที่ 2 เป็นชุดควบคุมการเกิดโรค กลุ่มที่ 3 เป็นชุดทดลองใส่โพไบโอติกแบคทีเรีย กลุ่มที่ 4 เป็นชุดทดลองใส่โพไบโอติกแบคทีเรียครั้งเดียวและเลี้ยงปลาเป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา กลุ่มที่ 5 เป็นชุดทดลองใส่โพไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา กลุ่มที่ 6 เป็นชุดทดลองใส่ zoospore เป็นเวลา 3 วัน ก่อนเติมโพไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาครั้งเดียว และกลุ่มที่ 7 เป็นชุดทดลองใส่ zoospore เป็นเวลา 3 วัน ก่อนทำเต็มโพไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน (ข) ของปลาช่อน เมื่อใช้โพไบโอติกแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* MSU050 ก่อนหรือหลังการชักนำให้เกิดโรคโดยรา *Aphanomyces invadans* ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 4 ซ้ำ สัญลักษณ a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ..... 54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

EUS = Epizootic Ulcerative Syndrome

MG = Mycotic Granulomatosis

MRS = deMan, Rogosa and Sharpe

NA = Nutrient agar

NB = Nutrient broth

RSD = Red Spot Disease

บทนำ

Epizootic ulcerative syndrome (EUS) คือโรคของปลาในเขตร้อนที่พบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย โดยปลาจะมีลักษณะอาการเป็นแผลซ้ำหรือแผลเน่าที่บริเวณกล้ามเนื้อ อันมีสาเหตุมาจากรา *Aphanomyces invadans* (Roberts และคณะ, 1994b) ปัจจุบันการระบาดของ EUS พบได้ในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะใน เอเชีย ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา (Hatai, 1980; Lilley และคณะ, 1997; Roberts และคณะ, 1993; Willoughby และคณะ, 1995) นอกจาก EUS จะเป็นโรคที่สามารถระบาดได้อย่างรวดเร็วและเป็นสาเหตุให้ปลาตายได้ในจำนวนมากแล้ว ยังมีปลามากกว่า 100 ชนิดที่สามารถติดโรคนี้ได้ (Lilley และคณะ, 1992) มีการประมาณการว่า ในช่วงปี พ.ศ. 2526-2536 ประเทศไทยต้องประสบกับการสูญเสียทางเศรษฐกิจอันเนื่องมาจากผลกระทบของ EUS ประมาณหนึ่งร้อยล้านเหรียญสหรัฐ (Chinabut, 1994) ดังนั้น EUS จึงนับว่าเป็นปัญหาสำคัญของอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลา

การป้องกันโรค EUS สามารถทำได้โดยใช้สารเคมี เช่น Coptal (a chelate copper compound), malachite green, hydrogen peroxide, Proxitane 0510 (มี 5% peracetic acid in hydrogen peroxide เป็นองค์ประกอบ) เป็นต้น (Lilley และคณะ 1998) ซึ่งสารเคมีเหล่านี้จัดเป็นสารอันตรายและต้องห้ามในหลายประเทศ เพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีอันตรายที่สามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อม การใช้โพรไบโอติก (probiotics) แบคทีเรียในการป้องกันโรค EUS จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าจะช่วยให้ผลในการยับยั้งการเกิดโรคระบาดในปลาที่ดี

Fuller (1989) ให้คำนิยามของโพรไบโอติกแบคทีเรียไว้ว่า “อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายและรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร” โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติป้องกันเชื้อก่อโรคโดยสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านให้ทำงานได้ดีขึ้น สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ มีความสามารถในการแข่งขันเพื่อแย่งอาหารหรือพื้นที่เกาะอาศัยกับเชื้อก่อโรค ทนต่อกรดและเกลือได้ดี เกาะติดกับเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้โพรไบโอติกแบคทีเรียจะต้องไม่เป็นเชื้อก่อโรคและควรแยกได้จากเจ้าบ้านเองด้วย (Dunne และคณะ 1999) ปัจจุบันมีการใช้โพรไบโอติกในการเสริมการเจริญเติบโตและป้องกันโรคในคน หมู วัว ไก่ และในสัตว์น้ำ (Jung, 1993; Verschuere และคณะ 2000) ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การเพาะเลี้ยงปลา กุ้ง และหอย โพรไบโอติกสามารถทำให้สุขภาพของสัตว์น้ำดีขึ้นและลดอัตราการเกิดโรคจากเชื้อราและแบคทีเรียได้ ชนิดของโพรไบโอติกที่เคยมีการรายงานไว้ได้แก่จุลินทรีย์ในสกุล *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, และ *Saccharomyces* (Holzapfel และคณะ 1998) และโพรไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้แก่แบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Vibrio* และ *Pseudomonas* (Verschuere และคณะ 2000)

เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานการใช้ไฟโรไบโอติกเพื่อควบคุมโรค EUS ที่เกิดจากรา *A. invadans* การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะแยกไฟโรไบโอติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *A. invadans* จากระบบทางเดินอาหารของปลา และนำไปใช้ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน

บทตรวจสอบเอกสาร

1. Epizootic ulcerative syndrome (EUS)

EUS คือโรคของปลาในเขตร้อนที่พบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย โดยปลาจะมีลักษณะอาการเป็นแผลซ้ำหรือแผลเน่าที่บริเวณกล้ามเนื้อ โดยมีสาเหตุมาจากรากโรค *Aphanomyces invadans* (Roberts และคณะ, 1994b) ระยะแรกของการเกิดโรคมีการเรียกชื่อโรคตามภูมิภาคที่เกิด การระบาดครั้งแรกเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1971 จากฟาร์มปลา ayu (*Plecoglossus altivelis*) ในประเทศญี่ปุ่น และเรียกโรคนี้ว่า Mycotic Granulomatosis (MG; Miyazaki และ Ergusa, 1972) ต่อมาได้พบการระบาดในปลาหลายชนิดเช่น ปลาทอง (*Carassius auratus*) Formosan snakehead (*Channa maculate*) และปลาไน (*Cyprinus carpio*) เป็นต้น ได้มีการแยกเชื้อสาเหตุของโรคและพบว่าเป็นราใน ดิวิชัน Oomycota และตั้งชื่อว่า *Aphanomyces piscicida* (Hatai, 1980) การระบาดครั้งที่สองเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1972 โดยพบการติดเชื้อในปลา gray mullet (*Mugil Cephalus*) ในรัฐ Queensland ประเทศออสเตรเลีย และเรียกโรคที่พบนี้ว่า Red Spot Disease (RSD; McKenzie และ Hall, 1976) ในเวลาต่อมาพบการระบาดของ RSD ในรัฐ New South Wales, North Territory และ Western Australia การระบาดของโรคได้เข้ามาสู่หลายประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยในปี ค.ศ. 1980 พบการระบาดในอินโดนีเซีย ปี ค.ศ. 1981 พบการระบาดในประเทศไทย ปี 1982-1983 พบการระบาดใน Papua New Guinea ปี 1983-1984 พบการระบาดในประเทศพม่า ลาว และ กัมพูชา ในปี 1986 ได้มีการประชุม The Consultation of Experts on Ulcerative Fish Diseases ในกรุงเทพมหานคร และได้มีมติให้เรียกโรคระบาดนี้ว่า Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS; FAO, 1986) ปัจจุบันการระบาดของ EUS พบได้ในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะใน เอเชีย ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา (Hatai, 1980; Lilley และคณะ, 1997; Roberts และคณะ, 1993; Willoughby และคณะ, 1995)

เนื่องจากมีปลามากกว่าหนึ่งร้อยชนิดที่สามารถเป็นโรค EUS ได้ (Lilley และคณะ, 1992) อีกทั้งเป็นโรคที่สามารถระบาดได้อย่างรวดเร็วและเป็นสาเหตุให้ปลาตายได้ในจำนวนมาก ดังนั้น EUS จึงนับว่าเป็นปัญหาสำคัญของอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืด มีการประมาณการว่า ในช่วงปี พ.ศ. 2526-2536 ประเทศไทยต้องประสบกับการสูญเสียทางเศรษฐกิจอันเนื่องมาจากผลกระทบของ EUS ประมาณหนึ่งร้อยล้านเหรียญสหรัฐ (Chinabut, 1994)

การระบาดของ EUS มักจะเกิดในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว (Bondad-Reantaso และคณะ, 1992) ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของรา *A. invadans* (Lumanlan-Mayo และคณะ, 1997) และยังเป็นช่วงที่ปลาอ่อนแอเพราะมีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ (Catap และ Munday, 1998; Chinabut และคณะ, 1995) ปลาที่ติดเชื้อจะมีอาการเชื้องซึมและลอยตัวขึ้นผิวน้ำ เป็นแผลซ้ำเป็นจำเ็อดและเปื่อยอย่างรุนแรงตามส่วนต่างๆ ของปลา เห็นได้ชัดเจนที่บริเวณส่วนหัวและลำตัว เหงือกและอวัยวะ

ภายในมีสีซีดจาง มีอาการม้ามโต และสามารถตรวจพบ myotic granulomas ได้ในเนื้อเยื่อ (Chinabut และ Roberts, 1999)

การศึกษา histopathology ในปลาที่ติดเชื้อ สามารถตรวจพบ inflammatory response ที่มีต่อราได้ ซึ่งพบว่ามีเซลล์ macrophage มาล้อมรอบเส้นใยของราทำให้เกิดเป็น mycotic granuloma (Chinabut และคณะ, 1995; Wada และคณะ, 1996) เซลล์ macrophage ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อหลายชนิดของปลา ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) รวมถึงเส้นใยและสปอร์ของรา แต่จากการศึกษาพบว่า สปอร์ที่ถูก macrophage กลืนกินเข้าไปยังคงมีชีวิตอยู่และสามารถเจริญเป็นเส้นใยได้ (Thompson และคณะ, 1999) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกการทำลายราก่อโรคโดยเซลล์เจ้าบ้านนั้นไม่เป็นผล

2. โพรไบโอติกแบคทีเรีย

โพรไบโอติกแบคทีเรียหมายถึงอาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายและรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Fuller, 1989) นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจเกี่ยวกับโพรไบโอติกแบคทีเรียมาตั้งแต่คริสต์ศตวรรษที่ 1900 โดย Elie Metchnikoff ให้ความสนใจว่าเหตุใดชาวบัลแกเรียจึงมีอายุยืน และพบว่าชาวบัลแกเรียรับประทานโยเกิร์ต ซึ่งเป็นนมหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* เป็นประจำในชีวิตประจำวัน จึงได้มีสุขภาพดี ในปัจจุบันนอกจากจะมีการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียในคนแล้ว ยังได้มีการใช้ในสัตว์หลายชนิด เช่น หมู วัว และไก่

โพรไบโอติกแบคทีเรียจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย ไม่เป็นเชื้อก่อโรค โดยทั่วไปได้แก่เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Bifidobacterium* และ *Weissel* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก นอกจากนี้ยังมี *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* และ *Saccharomyces* เป็นต้น ดังนั้นการคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียจึงนิยมที่จะแยกจากอาหารหรือจากระบบทางเดินอาหาร และโพรไบโอติกแบคทีเรียควรที่จะมีชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้นาน ดังนั้นโพรไบโอติกแบคทีเรียควรที่จะมีคุณสมบัติ ทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด ทนต่อเกลือน้ำดี ทนทานต่อยาปฏิชีวนะ และมีความสามารถในการยึดเกาะที่ผนังลำไส้ (Beachey, 1981; Hood และ Zottola, 1988; Fuller, 1992)

Chukeatirote (2003) ได้สรุปกลไกของเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรียในการส่งเสริมสุขภาพของคนและสัตว์โดยอาจเป็นผลมาจาก (1) การทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ในระบบทางเดินอาหารของคนมีเชื้อจุลินทรีย์มากกว่า 100 ชนิด มีจำนวนประมาณ 10^{10} - 10^{12} เซลล์ ในจำนวนนี้มีทั้งแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์และแบคทีเรียที่ก่อโรค การรับประทานโพรไบโอติกแบคทีเรียจะเป็นการเพิ่มจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ในสภาวะที่เหมาะสมร่างกายควรจะมีแบคทีเรียที่มีประโยชน์ประมาณร้อยละ 85 ของแบคทีเรียทั้งหมด (2) การส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน โพรไบโอติกแบคทีเรียสามารถส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันได้หลายวิธี เช่น เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของชั้นเยื่อเมือก (mucosa) ของลำไส้

ซึ่งป้องกันการติดเชื้อ หรือสามารถกระตุ้นการทำงานของ induced tumour necrosis factor- α (TNF- α) และ interleukin-6 (IL-6) ซึ่งเป็นกลไกของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่เจาะจง (3) การป้องกันมะเร็ง โพรไบโอติกแบคทีเรียบางชนิดสามารถทำลายสารก่อมะเร็งได้ จึงสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง

3. โพรไบโอติกแบคทีเรียในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

แนวคิดในการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเกิดขึ้นมานานกว่า 30 ปี โพรไบโอติกแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแตกต่างจากนิยามที่ให้ไว้โดย Fuller (1989) กล่าวคือโพรไบโอติกแบคทีเรียที่ใช้ในสัตว์น้ำมีความหลากหลายกว่าสัตว์บก และไม่จำเป็นต้องอยู่ในระบบทางเดินอาหารเท่านั้น โพรไบโอติกแบคทีเรียอาจจะอยู่ในระบบทางเดินอาหาร เหงือก หรือผิวหนังของสัตว์น้ำ (Harris, 1993) เนื่องจากสัตว์น้ำอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีเชื้อจุลินทรีย์มากมาย ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ หรือในทางกลับกัน สามารถที่จะตรวจพบจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำได้ในแหล่งน้ำเช่นกัน (Cahill, 1990) ดังนั้นการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงไม่จำเป็นต้องให้สัตว์กินเสมอไป Moriarty (1999) ได้เสนอานิยามของโพรไบโอติกแบคทีเรียในสัตว์น้ำว่าควรที่จะหมายถึงการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต และมีประโยชน์ลงในแหล่งน้ำด้วย

การใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สัตว์น้ำมีสุขภาพดี โดยวัดจากการมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น และ/หรือมีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น ทั้งในธรรมชาติหรือจากการชักนำให้ติดเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำจำนวนมาก ดังสรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. รายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกแบคทีเรีย	ความสามารถของโพรไบโอติกแบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Aeromonas</i> sp.	● ลดอัตราการตายและลดอัตราการตายของตัวอ่อนของหอยนางรม (Pacific oyster) เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Vibrio tubiashii</i>	Gibson และคณะ, 1998
<i>Bacillus coagulans</i>	● ลดอัตราการตายและเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในลูกกุ้งขาว	Zhou และคณะ, 2008
<i>Bacillus pumilis</i> และ <i>Citrobacter freundii</i>	● ลดอัตราการตายในปลา <i>Oreochromis niloticus</i> เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i>	Aly และคณะ, 2008

ตารางที่ 1. (ต่อ) รายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกแบคทีเรีย	ความสามารถของโพรไบโอติกแบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> และ <i>Bacillus subtilis</i>	☐ เพิ่มอัตราการรอดและจำนวนเพิ่มผลผลิตของ ปลาดุก (channel catfish)	Queiroz และ Boyd, 1998
<i>Bacillus subtilis</i>	☐ สามารถควบคุมการเจริญของ <i>Vibrio harveyi</i> และสามารถลดอัตราการตายของตัวอ่อนกึ่งกุลาดำ เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>V. harveyi</i>	Vaseeharan และ Ramasamy, 2003
<i>Bacillus</i> sp.	☐ เพิ่มน้ำหนักตัวของตัวอ่อนของปลาตาเดียว (turbot) ☐ เพิ่มน้ำหนักตัว เพิ่มอัตราการรอดของตัวอ่อน กึ่งกุลาดำ และลดอัตราการตายเมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> และ <i>Vibrio</i> spp. ☐ สามารถป้องกันการติดเชื้อ <i>Aeromonas caivae</i> , <i>A. hydrophila</i> และ <i>Streptococcus</i> sp. ในปลานิล	Gatesoupe, 1994 Rengpipat และคณะ, 1998 Dalmin และ คณะ, 2001 เสาวนิตและ คณะ, 2546
<i>Carnobacterium divergens</i>	☐ ลดอัตราการตายของลูกปลาแซลมอน (Atlantic salmon) เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Aeromonas</i> <i>salmonicida</i> ☐ ลดอัตราการตายของลูกปลาของปลาคอด (Atlantic cod) เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Vibrio</i> <i>anguillarum</i>	Gildberg และ คณะ, 1995 Gildberg และ คณะ, 1997; 1998

ตารางที่ 1. (ต่อ) รายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกแบคทีเรีย	ความสามารถของโพรไบโอติกแบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Carnobacterium</i> sp.	☐ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Vibrio anguillarum</i> และ <i>Aeromonas salmonicida</i> ที่แยกได้จากลำไส้และมุลของปลา ☐ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Vibrio anguillarum</i> ที่แยกได้จากมุลของปลาตาเดียว (turbot) ☐ สามารถเจริญได้ในระบบทางเดินอาหารของปลาเทราท์ (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) และพบว่ามี การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Vibrio anguillarum</i> และ <i>Aeromonas salmonicida</i> ☐ สามารถควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เช่น <i>Aeromonas salmonicida</i>, <i>Vibrio ordalii</i> และ <i>Yersinia ruckevi</i> ในลูกปลา และปลา Fingerling salmonicida	Imada และคณะ, 1985 Olsson และคณะ, 1998 Jöborn และคณะ (1997) Robertson และคณะ (2000)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	☐ สามารถช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของตัวอ่อนปลา sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Tovar และคณะ, 2002
<i>Enterococcus faecium</i>	☐ เพิ่มการเจริญและระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล	Wang และคณะ, 2008
<i>Flavobacterium</i> sp.	☐ เพิ่มการเจริญของ <i>Chaetoceros gracilis</i> , <i>Isochrysis galbana</i> และ <i>Pavlova lutheri</i>	Suminto และ Hirayama, 1997
Fluorescent pseudomonad	☐ ลดอัตราการตายของปลาแซลมอน (Atlantic salmon) เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Aeromonas salmonicida</i>	Smith และ Davey, 1993
<i>Lactobacillus plantarum</i>	☐ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Aeromonas salmonicida</i> ที่ปรากฏในการเลี้ยง rotifer ☐ เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนของปลาตาเดียว (halibut)	Gatesoupe, 1991 Olafsen, 1998

ตารางที่ 1. (ต่อ) รายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกแบคทีเรีย	ความสามารถของโพรไบโอติกแบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Lactobacillus lactis</i>	● ลดการเจริญของ rotifer เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Vibrio anguillarum</i>	Harzevili และคณะ, 1998
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> และ <i>Streptococcus lactis</i>	● เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนของปลาตาเดียว (turbot)	García de la Banda และคณะ, 1992
Lactic acid bacteria	● ใช้ LAB เป็นอาหารเลี้ยง rotifer และใช้ rotifer เป็นอาหารเลี้ยงลูกปลา turbot สามารถต้านทานการก่อโรคของ <i>Vibrio</i> เพิ่มขึ้น และมีอัตราการตายลดลง	Gatesoupe, 1999
<i>Pediococcus acidilactici</i>	● ลดอัตราการตายของกุ้ง <i>Litopenaeus stylirostris</i> เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Vibrio</i> sp. และสามารถเพิ่มน้ำหนักตัว	Castex และคณะ, 2008
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	● ลดอัตราการตายของลูกปลาเทราท์ (rainbow trout) เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Vibrio anguillarum</i>	Gram และคณะ, 1999
<i>Streptococcus faecium</i>	● มีความสามารถในการเกาะติดกับผนังลำไส้สูง และสามารถลดปริมาณ <i>Escherichia coli</i> ในลำไส้ของปลา (<i>Israeli crap</i>)	Bogut และคณะ, 1998
<i>Vibrio alginolyticus</i>	● ลดอัตราการตายของลูกปลาของปลาแซลมอน (Atlantic salmon) เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Vibrio anguillarum</i> และเชื้อ <i>V. ordalii</i> ● เพิ่มน้ำหนักตัวและการอยู่รอดของกุ้งขาวตัวเต็มวัยและลดปริมาณ <i>V. parahaemolyticus</i> ในกุ้ง ● ลดอัตราการตายของ <i>Artemia nauplii</i> เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>	Austin และคณะ, 1995 Garriques และ Arevalo, 1995 Gomez-Gil และคณะ, 1998

ตารางที่ 1. (ต่อ) รายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกแบคทีเรีย	ความสามารถของโพรไบโอติกแบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Vibrio pelagius</i>	● ลดอัตราการตายของตัวอ่อนของปลาตาเดียว (turbot) เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Aeromonas caviae</i>	Ringø และ Vadstein, 1998
<i>Vibrio</i> sp.	● ลดอัตราการตายของตัวอ่อนของหอย (<i>Argopecten purpuratus</i>) เมื่อชักนำให้ติดเชื้อ <i>Vibrio anguillarum</i>	Riquelme และคณะ, 1997

จากผลของงานวิจัยจำนวนมากทำให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียสำหรับอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่กลไกการทำให้สัตว์น้ำมีสุขภาพดียังไม่มีการพิสูจน์ที่แน่ชัด Verschuere และคณะ (2000) ได้สรุปความเป็นไปได้ของกลไกของโพรไบโอติกแบคทีเรียที่ทำให้สัตว์น้ำมีสุขภาพดีโดย ไว้ดังนี้

1. ความสามารถในการผลิตสารซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ: โดยที่สารเหล่านี้จะ (1) มีผลยับยั้งโดยตรง เช่น สารปฏิชีวนะ สาร bacteriocins, hydrogen peroxide เอนไซม์ เช่น lysozyme, protease หรือ protease inhibitor หรือ (2) มีผลยับยั้งทางอ้อม เช่น การหลั่ง siderophores เพื่อจับเหล็กในสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งส่งผลให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติไม่สามารถเจริญได้ (Imada และคณะ, 1985; Nair และคณะ, 1985; Sugita และคณะ, 1997)

2. ความสามารถในการแก่งแย่งใช้อาหาร: ในแหล่งน้ำมีจุลินทรีย์ที่ใช้สารอินทรีย์เป็นอาหารอยู่เป็นจำนวนมาก การแก่งแย่งใช้อาหารเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดและสามารถเพิ่มจำนวนประชากร Rico-Mora และคณะ (1998) พบว่าแบคทีเรียสามารถยับยั้งการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ในสาหร่าย *Skeletonema costatum* ได้ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. alginolyticus* ได้โดยตรง จึงเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียชนิดนี้น่าจะมีความสามารถในการแก่งแย่งอาหาร และทำให้การเจริญของ *V. alginolyticus* ลดลงได้

3. ความสามารถในการเกาะติดกับเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารหรือผิวหนัง: กลไกนี้เป็นการแข่งขันและปกป้องไม่ให้เชื้อก่อโรคเข้าเจริญในปลาเจ้าบ้าน ซึ่งความสามารถแก่งแย่งเกาะติดกับเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารสามารถพบได้ในโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Canobacterium* (Jöborn และคณะ, 1997) และในเชื้อก่อโรค *Vibrio anguillarum* และ *Aeromonas hydrophila* (Krovacek และคณะ, 1987; Garcia และคณะ, 1997)

4. ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน: องค์ประกอบของผนังเซลล์โพรไบโอติกแบคทีเรีย เช่น lipopolysaccharide, peptidoglycan หรือ glucan มีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ

เซลล์เจ้าบ้านต่อเชื้อไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และปรสิต (Raa, 1996) โดยเฉพาะในตัวอ่อนของปลา กุ้ง และ สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ เนื่องจากมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะต่ำกว่าตัวเต็มวัย ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคได้ (Söderhäll และ Cerenius, 1998)

5. ความสามารถในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำ: โพรไบโอติก *Bacillus* spp. มีความสามารถที่จะใช้สารอินทรีย์ในน้ำได้ดี ช่วยให้น้ำสะอาดขึ้น และส่งเสริมอัตราการเจริญของตัวอ่อนกุ้ง และช่วยลดจำนวนของ vibrios ในน้ำ (Stanier และคณะ, 1963)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์และปลาที่ใช้ในการทดลอง

1. รา *Aphanomyces invadans* สายพันธุ์ NJM9510 ด้วยความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Kishio Hatai (Division of Fish Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Animal Science University ประเทศญี่ปุ่น)
2. ปลาช่อน จำนวน 1 ตัว ซื้อจากฟาร์มปลาในจังหวัดสุพรรณบุรี
ปลาช่อนและปลาตะโกก จำนวนละ 1 ตัว ซื้อจากคนจับปลาในคลองหนองดินแดง อ. เมือง จ. นครปฐม
ปลาช่อน ปลาดุก และ ปลานิล จำนวนละ 1 ตัว ซื้อจากตลาด อ. เมือง จ. นครปฐม

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารกึ่งแข็ง

1.1 ส่วนผสมอาหารกึ่งแข็งประกอบด้วย

- Peptone (Lab M, UK.) 10 กรัม
- Beef extract (BIOMARK, India) 3 กรัม
- Sodium chloride (UNIVAR, Australia) 5 กรัม
- Agar (Himedia Laboratory, India) 3 กรัม

1.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร และใส่หลอดขนาด 10x50 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิเมตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้เป็น agar tall

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar

2.1 ส่วนผสม Blood agar base, pH 6.6–7.0

- Beef Heart, Infusion form (Scharlau Chemie, Spain) 500 กรัม
- Tryptone (Sisco, India) 10 กรัม
- Sodium chloride (UNIVAR, Australia) 5 กรัม
- Agar (Himedia Laboratory, India) 15 กรัม

2.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 950 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.8 แล้วฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.3 เตรียม Defibrinated blood โดยเจาะเลือดกระต่ายด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีลูกแก้วจำนวนมาก (ปลอดเชื้อ) แกว่งขวดรูปชมพู่ตลอดเวลาจนไฟบรินในเลือดจับกับลูกแก้วจนหมด

2.4 ผสม Defibrinated blood ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงใน blood agar base ปริมาตร 950 มิลลิลิตรและใส่จานเพาะเชื้อ

3. Carbohydrate fermentation broth

3.1 ส่วนผสม Phenol red broth base, pH 7.2–7.6

Peptone (Lab M, UK.) 10 กรัม

Beef extract (BIOMARK, India) 1 กรัม

Sodium chloride (UNIVAR, Australia) 5 กรัม

Phenol red (RANKEM, India) 0.018 กรัม

3.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 แล้วฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3 เตรียมสารละลายน้ำตาล glucose, lactose, sucrose manose และ adonitose ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ชนิดละ 100 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรู 0.45 μm

3.4 ผสม Phenol red broth base ปริมาตร 900 มิลลิลิตร กับสารละลายน้ำตาล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเตรียมเป็นอาหารเหลวในหลอดปลอดเชื้อหลอดละ 3–5 มิลลิลิตร

4. Christensen urea agar

4.1 ส่วนผสม Urea broth base ประกอบด้วย

Peptone (Lab M, UK.) 1 กรัม

Sodium chloride (UNIVAR, Australia) 5 กรัม

Monopotassium hydrogen phosphate (UNIVAR, Australia) 2 กรัม

Glucose (UNIVAR, Australia) 1 กรัม

Phenol red (RANKEM, India) 0.012 กรัม

Agar (Himedia Laboratory, India) 15 กรัม

4.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 แล้วฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4.3 ละลาย urea ปริมาตร 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรู 0.45 μm

4.4 ผสมสารละลาย urea ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ urea broth base ปริมาตร 900 มิลลิลิตร จนเข้ากันดี แล้วใส่หลอดปลอดเชื้อ ประมาณ 3-4 มิลลิลิตรต่อหลอด และเอียงหลอดเป็น agar slant

5. Decarboxylase broth

5.1 ส่วนผสม decarboxylase broth base ประกอบด้วย

Peptone (Lab M, UK.) 5 กรัม

Beef extract (BIOMARK, India) 5 กรัม

Glucose (UNIVAR, Australia) 0.5 กรัม

Pyridoxal (Sigma, USA) 5.0 กรัม

Bromocresol purple (BDH Chemical, England) 0.1 กรัม

Cresol red (BDH Chemical, England) 0.005 กรัม

5.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร

5.3 ละลายกรดอะมิโนที่ใช้ทดสอบ (L-lysine, L-ornithine หรือ L-arginine) ปริมาตร 1 กรัม ลงใน decarboxylase broth base ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 แล้วใส่หลอดขนาด 10x50 มิลลิลิตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. MR-VP broth

6.1 ส่วนผสม MR-VP broth ประกอบด้วย

Polypeptone (LAB-SCAN, Poland) 7 กรัม

Glucose (UNIVAR, Australia) 5 กรัม

Dipotassium hydrogen phosphate (Guangzhou Jinhuada Chemical, Chian) 5 กรัม

6.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.9 และใส่หลอดขนาด 10x50 มิลลิลิตร หลอดละ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. MRS agar

7.1 ส่วนผสม MRS broth ประกอบด้วย

อาหารสำเร็จรูป MRS (BIOMARK) 55.15 กรัม

Agar (Himedia Laboratory, India) 15 กรัม

7.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.8 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และใส่จานเพาะเชื้อ

8. MRS broth

8.1 ส่วนผสม MRS broth ประกอบด้วย

อาหารสำเร็จรูป MRS (BIOMARK) 55.15 กรัม

8.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.8 และใส่หลอดขนาด 10x50 มิลลิลิตร หลอดละ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. Nutrient broth (NB)

9.1 ส่วนผสม Nutrient broth ประกอบด้วย

Beef extract (BIOMARK, India) 3 กรัม

Peptone (Lab M, UK.) 5 กรัม

9.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.8 และใส่หลอดขนาด 10x50 มิลลิลิตร หลอดละ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. Nutrient agar (NA)

10.1 ส่วนผสม Nutrient broth ประกอบด้วย

Beef extract (BIOMARK, India) 3 กรัม

Peptone (Lab M, UK.) 5 กรัม

Agar (Himedia Laboratory, India) 15 กรัม

10.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.8 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และใส่จานเพาะเชื้อ

11. OF medium

11.1 ส่วนผสม OF medium ประกอบด้วย

Peptone (Lab M, UK.) 2 กรัม

Glucose (UNIVAR, Australia) 10 กรัม

Sodium chloride (UNIVAR, Australia) 5 กรัม

Dipotassium hydrogen phosphate (Guangzhou Jinhuada Chemical, Chian) 0.3 กรัม

Bromthymol blue (BDH Chemical, England) 0.05 กรัม

Agar (Himedia Laboratory, India) 3 กรัม

11.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร และใส่หลอดขนาด 10x50 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิเมตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้เป็น agar tall

12. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PG-1 (Peptone Glucose-1) Agar

12.1 ส่วนผสมของ Salt solution ประกอบด้วย

MgCl₂.2H₂O (UNIVAR, Australia) 1.7 กรัม

CaCl₂.2H₂O (RANKEM, India) 1.45 กรัม

FeCl₃.2H₂O (QREC, New Zealand) 0.2 กรัม

KCl (RANKEM, India) 3.7 กรัม

Na₂EDTA (AMRESCO, USA) 0.55 กรัม

12.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร

12.3 ส่วนผสมของ Primary phosphate buffer ประกอบด้วย

Na₂HPO₄.2H₂O (UNILAB, Australia) 23.7 กรัม

12.4 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร

12.5 ส่วนผสมของ Secondary phosphate buffer ประกอบด้วย

NaH₂PO₄.2H₂O (UNILAB, Australia) 18.4 กรัม

12.6 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร

12.7 ส่วนผสมของ PG-1 base ประกอบด้วย

Mycological peptone (OXOID) 6 กรัม

Glucose (UNIVAR, Australia) 3 กรัม

Agar (HIMedia Laboratory, India) 15 กรัม

12.8 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่

12.9 ตวง Salt solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่

12.10 ตวง Primary phosphate buffer และ Secondary phosphate buffer อย่างละ 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่

12.11 นำสารละลาย PG-1 base, salt solution และ phosphate buffer ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาผสมกัน

13. Simmons citrate agar

13.1 ส่วนผสม Nutrient broth ประกอบด้วย

Magnesium sulfate (Fluka Chemika, USA) 0.2 กรัม

Monoammonium phosphate (UNIVAR, Australia) 1 กรัม

Dipotassium hydrogen phosphate (Guangzhou Jinhua Chemical, China) 1 กรัม

Sodium chloride (UNIVAR, Australia) 2 กรัม

Sodium citrate (UNIVAR, Australia) 2 กรัม

Bromthymol blue (BDH Chemical, England) 0.08 กรัม

Agar (HIMedia Laboratory, India) 15 กรัม

13.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.8 และใส่หลอดขนาด 10x50 มิลลิลิตร หลอดละ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเอียงหลอดเป็น agar slant

14. Triple sugar iron (TSI) agar

14.1 ส่วนผสม Triple sugar iron ประกอบด้วย

Beef extract (BIOMARK, India) 3 กรัม

Yeast extract (Lab M, UK.) 3 กรัม

Peptone (Lab M, UK.) 15 กรัม

Proteose peptone (HIMedia Laboratory, India) 5 กรัม

Lactose (BIOBASIC, Canada) 10 กรัม

Saccharose (UNIVAR, Australia) 10 กรัม

Dextrose (UNIVAR, Australia) 1 กรัม

Ferrous sulfate (QREC, New Zealand) 0.2 กรัม

Sodium thiosulfate (Lab M, UK.) 0.3 กรัม

Sodium chloride (UNIVAR, Australia) 5 กรัม

Phenol red (RANKEM, India) 0.024 กรัม

Agar (Himedia Laboratory, India) 15 กรัม

14.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 และใส่หลอดขนาด 10x50 มิลลิลิตร หลอดละ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเอียงหลอดเป็น agar slant

15. Tryptone broth

15.1 ส่วนผสม Tryptone broth ประกอบด้วย

Tryptone (Sisco, India) 8 กรัม

Yeast extract (Lab M, UK.) 5 กรัม

Sodium chloride (UNIVAR, Australia) 2.5 กรัม

15.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร และใส่หลอดขนาด 10x50 มิลลิลิตร หลอดละ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

1. Benzocaine

1.1 สารละลาย Benzocaine ประกอบด้วย

Benzocaine (Sigma, USA) 10 กรัม

1.2 ละลายส่วนประกอบในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 100 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. Catalase reagent

1.1 สารละลาย Benzocaine ประกอบด้วย

H_2O_2 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 35 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

1.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 32 มิลลิลิตร

3. Gram stain ประกอบด้วย

3.1 Gram crystal violet ประกอบด้วย

Solution A ประกอบด้วย

Crystal violet (90% dye content; LOBA Cheme, India) 10 กรัม

95% Ethanol (MERCK, USA) 100 มิลลิลิตร

Solution B ประกอบด้วย

Ammonium oxalate (Guangzhou Jinhuada Chemical, Chian) 4 กรัม

Distilled water 400 มิลลิลิตร

ผสม solution A กับ B เข้าด้วยกัน ตั้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วกรองก่อนใช้

3.2 Gram iodine ประกอบด้วย

Iodine (Fluka Chemika, USA) 2 กรัม

Potassium iodide (KI; J.T. Baker, USA) 4 กรัม

น้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร

ผสมและเก็บในขวดสีชา

3.3 Decolorizing agent

95% Ethanol (MERCK, USA)

3.4 Gram safranin O ประกอบด้วย

Safranin O (BDH, England) 0.25 กรัม

95% ethanol (MERCK, USA) 10 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมและเก็บในขวดสีชา

4. KOH

1.1 สารละลาย KOH ประกอบด้วย

KOH (BDH, England) 40 กรัม

1.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. Kovac indole reagent

5.1 Kovac indole reagent ประกอบด้วย

Pure amyl หรือ isoamyl alcohol (Fluka Chemika, USA) 150 มิลลิลิตร

p-Dimethylaminobenzaldehyde (Fluka Chemika, USA) 10 กรัม

HCl (conc.; J.T. Baker, USA) 50 มิลลิลิตร

5.2 ผสมและเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4–10 องศาเซลเซียส

6. Methyl red Indicator

6.1 Methyl red Indicator ประกอบด้วย

Methyl red (Fluka Chemika, USA) 0.1 กรัม

6.2 ละลายส่วนประกอบในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

7. 1-naphthol

6.1 Methyl red Indicator ประกอบด้วย

1-naphthol (Fluka Chemika, USA) 5 กรัม

6.2 ละลายส่วนประกอบในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 100 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8. Oxidase reagent

8.1 Oxidase reagent ประกอบด้วย

p-Aminodimethylaniline oxalate (Fluka Chemika, USA) 0.3 g

8.2 ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา และใช้ภายใน 2–3 วัน

3. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

- นำตัวอย่างปลาเป็นจากแหล่งต่างๆ (ที่ระบุไว้ในข้อ 1) ใส่ในกะละมัง เติมน้ำให้ท่วมตัวปลา และหยดสารละลาย Benzocaine ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อให้ปลาหยุดการเคลื่อนไหว
- เมื่อปลาสลบ ผ่าท้องปลาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
- ใช้ก้านไม้สำลีป้ายบริเวณกระเพาะและทางเดินอาหารของปลา และลากลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient agar (NA) และอาหารสูตร deMan, Rogosa and Sharpe agar (MRS) และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ใช้ห้วงแยกเชื้อเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3 และลากลงบนอาหารสูตร NA หรือ MRS บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดียว
5. ใช้ห้วงแยกเชื้อเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จากข้อ 4 และแกว่งในอาหารเหลวสูตร NB หรือ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ใช้ปิเปตดูดแบคทีเรียในอาหารเหลว NB หรือ MRS broth จากข้อ 5 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม glycerol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นหัวเชื้อ

4. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* ด้วยเทคนิค point inoculation

1. เลี้ยงรา *A. invadans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PG-1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน
2. ทำการต่อเชื้อ *A. invadans* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PG-1 จานใหม่โดยใช้อุปกรณ์เจาะไม้คอร์ก เจาะปลายเส้นใยแล้วนำมาวางไว้ตรงกลางจานอาหารใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน
3. ใช้เข็มเย็บตะเข็บแบคทีเรียที่แยกได้จากกระเพาะปลาอายุ 1 วัน มาทำจุดลงบนจานอาหารที่เลี้ยงรา อายุ 3 วัน โดยใช้เข็มเย็บตะเข็บแบคทีเรีย ลงบนจาน 2 จุด และน้ำกลั่น 2 จุด (ชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
4. สังเกตและวัดขนาด inhibition zone ที่เกิดขึ้นระหว่างระหว่างแบคทีเรียและรา
5. ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ
6. คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่เกิด inhibition zone ระหว่างแบคทีเรียและราเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย

1. นำเชื้อแบคทีเรียถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ใช้ปิเปตดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร MRS ที่การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. วัดการเจริญของเชื้อ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และจดบันทึก
4. ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

6. การศึกษาความสามารถในการทนต่อกรด

1. นำเชื้อแบคทีเรียถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร NB หรือ MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ใช้ปิเปตดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร NB หรือ MRS ที่การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 3 4 5 และ 6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. วัดการเจริญของเชื้อ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และจดบันทึก
4. ทำการทดลองเชื้อละ 3 ซ้ำ

7. การศึกษาความสามารถในการทนต่อน้ำดีเกลือ

1. นำเชื้อแบคทีเรียถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร NB หรือ MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ใช้ปิเปตดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร NB หรือ MRS ที่เติมน้ำดีเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.15 และ 0.30 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. วัดการเจริญของเชื้อ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และจดบันทึก
4. ทำการทดลองเชื้อละ 3 ซ้ำ

8. การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

1. นำเชื้อแบคทีเรียถ่ายลงในอาหารแข็งสูตร NA หรือ MRS บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ใช้เข็มหยดย้ำและเชื้อแบคทีเรียมาจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar 4 ตำแหน่ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. สังเกตดูลักษณะบริเวณที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar
4. ทำการทดลองเชื้อละ 3 ซ้ำ

9. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. การติดสีแกรม: นำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งสูตร NA หรือ MRS อายุ 24 ชั่วโมง มาย้อมดูการติดสีแกรม ศึกษารูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. การทดสอบการเคลื่อนที่: ใช้เข็มเขี่ยตะเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเหลวสูตร NB ลงในอาหารสูตรอาหารกึ่งแข็ง ให้ลึกประมาณ 2/3 ของหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. การสร้างออกซิเดส: หยด oxidase reagent ลงบนกระดาษกรอง 1-2 หยด ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากอาหารสูตร NA slant และป้ายลงบน oxidase reagent
4. การสร้างคะตะเลส: หยด catalase reagent ลงบนแผ่นสไลด์ 1-2 หยด ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากอาหารสูตร NA slant และป้ายลงบน catalase reagent
5. การทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก: ใช้เข็มเขี่ยตะเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเหลวสูตร NB ลงในอาหารสูตร OF medium ให้ลึกประมาณ 2/3 ของหลอดทดลอง จำนวน 2 หลอด เทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อปิดทับผิวหน้าอาหาร 1 หลอด และอีกหลอดหนึ่งไม่ต้องปิดทับผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. การสร้างยูเรียเอส: ใช้ห่วงเขี่ยตะเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเหลวสูตร NB ลงในอาหารสูตร Christensen urea agar slant และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. การทดสอบ TSI: ใช้เข็มเขี่ยตะเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเหลวสูตร NB ลงในอาหารสูตร TSI agar slant ให้ลึกประมาณ 2/3 ของหลอดทดลอง แล้วใช้เข็มเขี่ยอันเดมลากเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. การสร้างอินโดล: ใช้ปิเปตดูดเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสูตร tryptone broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และหยดด้วย Kovacs indole reagent 5-10 หยด เขย่าแรงๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ amyralcohol แยกชั้นและเกิดปฏิกิริยานาน 1 นาที
9. การทดสอบเมทิลเรด: ใช้ปิเปตดูดเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสูตร MR-VP broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วหยดด้วย methyl red reagent 1-2 หยด โดยให้น้ำยาค่อยๆ ไหลไปตามข้างหลอดทดลองและไม่ต้องเขย่า
10. การทดสอบ Voges-Proskauer test (MR-VP test): ใช้ปิเปตดูดเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสูตร MR-VP broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง หยดด้วยสารละลาย KOH ที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 1-naphthol อย่างละ 5-10 หยด เขย่าแรงๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที

11. การใช้ซิเตรต: ใช้ห้วงตะเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเหลวสูตร NB ลงในอาหารสูตร Simmons citrate agar slant และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
12. การใช้กรดอะมิโน: ใช้ห้วงตะเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเหลวสูตร NB ลงในอาหารสูตร decarboxylase broth และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
13. การใช้น้ำตาล: ใช้ปิเปตดูดเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงใน carbohydrate fermentation broth และบ่มเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

10. การหาลำดับนิวคลีโอติกของ 16S rDNA

1. ตรวจหาลำดับกรดนิวคลีโอติกของ 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยปิเปตสารดังต่อไปนี้ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์สำหรับเอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 5 ไมโครลิตร	
แมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลา	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ 008F ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลา	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ 517R ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลา	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส	ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
น้ำ	ปริมาตร 36.5 ไมโครลิตร
เซลล์แบคทีเรีย	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 008F คือ AACTYAAAKGAATTGACGG

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 517R คือ ACGGGCGGTGTGTGTRC
2. นำหลอดทดลองใส่ลงในเครื่องเครื่องเทอร์มอลไซเคิลอร์ (ESCO รุ่น Swift™ mini Thermal cycler) และทำปฏิกิริยาลูกโซ่ ด้วยโปรแกรม (1) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เป็นจำนวน 1 รอบ (2) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ (3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เป็นจำนวน 1 รอบ
3. ตรวจสอบชิ้นส่วนของ 16S rDNA โดยนำผลของปฏิกิริยาลูกโซ่มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอกาโรสเจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2
4. แยกชิ้นส่วนของ 16S rDNA ออกจากอกาโรสเจลโดยทำตามวิธีการของ Agarose gel DNA extraction kit (UltraClean™ 15 DNA Purification Kit, MO BIO)

5. หาลำดับเบสโดยใช้บริการของบริษัท วอร์ดเมดิค จำกัด และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov)

11. การผลิตสปอร์รา *Aphanomyces invadans*

1. เลี้ยงรา *A. invadans* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิตร ที่มีอาหารสูตร PG-1 ปริมาตร 50 มิลลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน
2. ปั่นเส้นใยจากข้อ 1 จำนวน 3 ขวด ด้วยเครื่องปั่น
3. เทเส้นใยที่ปั่นลงในขวดขนาด 300 มิลลิตร ที่มีอาหารสูตร PG-1 ปริมาตร 100 มิลลิตร และเลี้ยงราที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน
4. ล้างเส้นใยด้วยน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 ชั่วโมง และกระตุ้นการสร้างสปอร์โดยเลี้ยงราในขวดขนาด 3000 มิลลิตร ที่มีน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 750 มิลลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง
5. กรองเพื่อแยกเส้นใยออกจากสปอร์ และนับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemocytometer

12. การศึกษาผลของความเข้มข้นของ zoospore ของรา *Aphanomyces invadans* ต่อการชักนำให้เกิดโรค EUS ในปลาช่อน

1. เลี้ยงปลาช่อนขนาดตัวละประมาณ 55 ± 5 กรัม จำนวน 3 ตัว ในตู้ปลาขนาด $12 \times 24 \times 18$ นิ้ว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ปลาได้ปรับตัว
2. ปรับระดับน้ำในตู้ปลาให้มีปริมาตร 15 ลิตร และเติมสปอร์ราที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^5 , 10^6 หรือ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิตร
3. บันทึกการตายของปลาเป็นเวลา 15 วัน และตรวจหาราจากเนื้อเยื่อปลาและ/หรือแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อปลาเพื่อยืนยันว่าการตายของปลาเกิดจากรา *A. invadans*
4. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

13. การศึกษาความสามารถของไฟโรไบโอติกแบคทีเรียที่แยกได้ในการควบคุมโรค EUS ในปลา

1. แบ่งปลาช่อนขนาดตัวละประมาณ 45±5 กรัม เป็น 7 กลุ่มๆ ละ 3 ตัว

กลุ่มที่ 1 เป็นชุดควบคุมการไม่เกิดโรค โดยไม่ทำการใส่สปอร์ราและไฟโรไบโอติกแบคทีเรีย

กลุ่มที่ 2 เป็นชุดควบคุมการเกิดโรค โดยทำการใส่สปอร์รา

กลุ่มที่ 3 เป็นชุดทดลอง โดยทำการใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรีย

กลุ่มที่ 4 เป็นชุดทดลอง โดยเลี้ยงปลาร่วมกับไฟโรไบโอติกแบคทีเรียเป็นเวลา 14 วัน (โดยใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรียครั้งเดียว) ก่อนทำการเติมสปอร์รา (เพื่อศึกษาความสามารถในการป้องกันโรค)

กลุ่มที่ 5 เป็นชุดทดลอง โดยเลี้ยงปลาร่วมกับไฟโรไบโอติกแบคทีเรียเป็นเวลา 14 วัน (โดยใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรียทุกๆ 3 วัน) ก่อนทำการเติมสปอร์รา (เพื่อศึกษาความสามารถในการป้องกันโรค)

กลุ่มที่ 6 เป็นชุดทดลอง โดยเลี้ยงปลาร่วมกับสปอร์รา เป็นเวลา 3 วัน ก่อนทำการเติมไฟโรไบโอติกแบคทีเรีย โดยใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรียครั้งเดียว (เพื่อศึกษาความสามารถในการรักษาโรค)

กลุ่มที่ 7 เป็นชุดทดลอง โดยเลี้ยงปลาร่วมกับสปอร์รา เป็นเวลา 3 วัน ก่อนทำการเติมไฟโรไบโอติกแบคทีเรีย โดยใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรียทุกๆ 3 วัน (เพื่อศึกษาความสามารถในการรักษาโรค)

2. เลี้ยงปลาในตู้ปลาขนาด 12 x 24 x 18 นิ้ว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันเพื่อให้ปลาปรับตัว

3. ปรับระดับน้ำในตู้ปลาให้มีปริมาตร 15 ลิตร และเติมสปอร์ราที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ/หรือไฟโรไบโอติก ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4. บันทึกการตายของปลาเป็นเวลา 15 วัน และตรวจหารากจากเนื้อเยื่อปลาและ/หรือแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อปลาเพื่อยืนยันว่าการตายของปลาเกิดจากรา *A. invadans*

5. ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

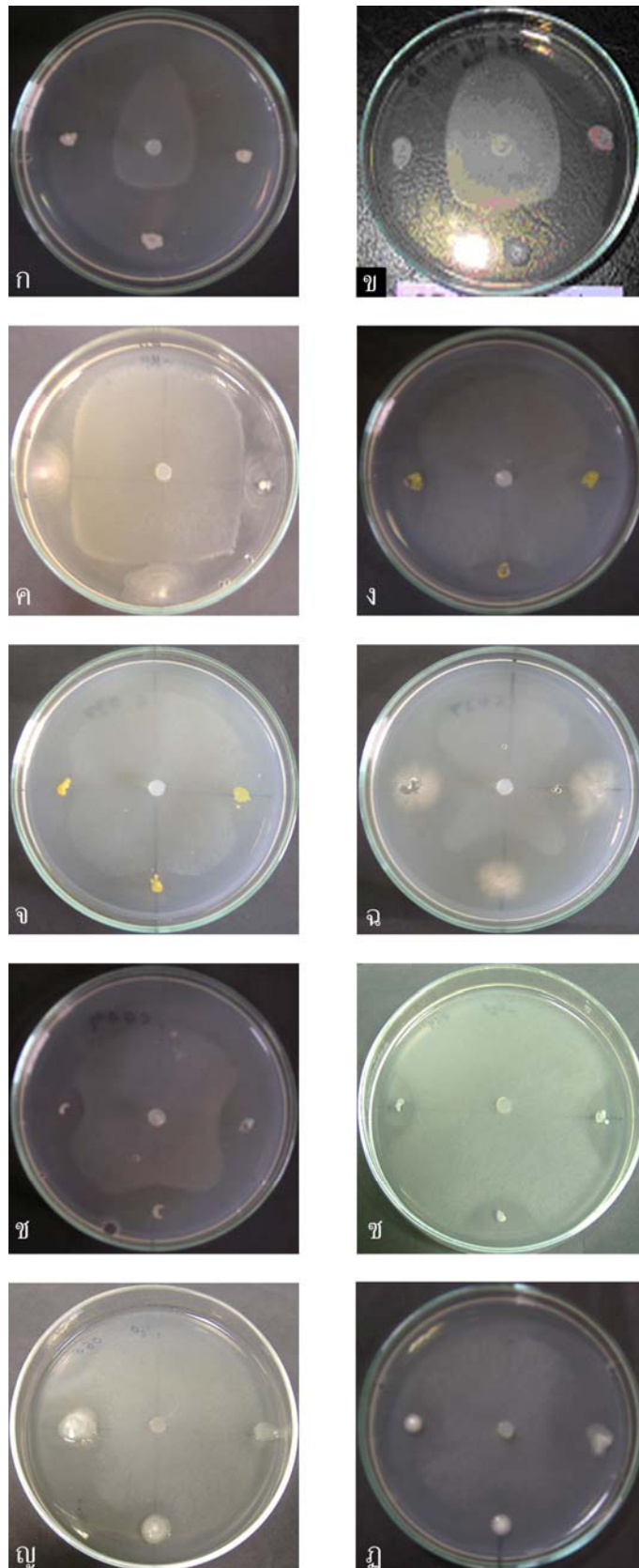
14. สถิติที่ใช้ในการทดลอง

1. วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลจากผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยสถิติ One-Way ANOVA และ Tukey's test โดยทดสอบทุกการทดลองที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ $P \leq 0.05$

ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารปลาและการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans*

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างปลาปลาช่อน (*Channa striatus* Block) และปลาตะโกก (*Cyclocheilichthys enoplos* Bleeker) จากแหล่งน้ำธรรมชาติจากคลองหนองดินแดง อ.เมือง จ.นครปฐม และปลาช่อน ปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther) และ ปลานิล (*Tilapia oreochromis* Niloticus) จากตลาดใน จ. นครปฐม และนำมาแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของปลาโดยการ streak plate ลงในอาหารสูตร NA และ MRS สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลท โดยตั้งชื่อเป็นไอโซเลท MSU001 ถึง MSU060 แล้วจึงนำแบคทีเรียทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค EUS ด้วยเทคนิค point inoculation พบว่ามีแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรา *A. invadans* ซึ่งมีค่า inhibition index ระหว่าง 0.3-1.6 (ภาพที่ 1 และ ตารางที่ 2)



ภาพที่ 1. การยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* โดยแบคทีเรียไฮโซเลท MSU001 (ก), MSU003 (ข), MSU027 (ค), MSU033 (ง), MSU037 (จ), MSU040 (ฉ), MSU046 (ช), MSU049 (ซ), MSU050 (ญ) และ MSU052 (ฎ) ด้วยเทคนิค point inoculation (point inoculation 3 ตำแหน่ง ชุดควบคุม 1 ตำแหน่ง)

ตารางที่ 2. ชนิดของปลา แหล่งตัวอย่างปลา และความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ชนิดและแหล่งตัวอย่างปลา	ไอโซเลทของ แบคทีเรียที่แยกได้	Inhibition index ¹	กลุ่ม ²
ชุดควบคุม	น้ำกลั่น	0	a
ปลาช่อน (<i>Channa striatus</i>) ตลาดนครปฐม	MSU001	1.25±0.19	f, g
	MSU002	0	a
	MSU003	1.15±0.17	f
	MSU004	0	a
	MSU005	0	a
	MSU006	0	a
	MSU007	0	a
ปลาดุก (<i>Clarias macrocephalus</i>) ตลาดนครปฐม	MSU008	0	a
	MSU009	0	a
	MSU010	0	a
	MSU011	0	a
	MSU012	0	a
	MSU013	0	a
	MSU014	0	a
	MSU015	0	a

¹ค่า inhibition index แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยของ inhibition zone ระหว่างขอบเส้นใยราถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียจากการทดลอง 3 ซ้ำ

²กลุ่มที่จำแนกตามความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Tukey' test ($P \leq 0.05$) สัญลักษณ์ a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2. (ต่อ) ชนิดของปลา แหล่งตัวอย่างปลาและความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ชนิดและแหล่งตัวอย่างปลา	ไอโซเลท ของ แบคทีเรียที่แยกได้	Inhibition index ¹	กลุ่ม ²
ปลานิล (<i>Tilapia oreochromis</i>) ตลาดนครปฐม	MSU016	0	a
	MSU017	0	a
	MSU018	0	a
	MSU019	0	a
	MSU020	0	a
	MSU021	0	a
	MSU022	0	a
	MSU023	0	a
	MSU024	0	a
	MSU025	0	a
ปลาช่อน (<i>Channa striatus</i>) คลองหนองดินแดง จ. นครปฐม	MSU026	0	a
	MSU027	1.58±0.30	f
	MSU028	0	a
	MSU029	0	a
	MSU030	0	a
	MSU031	0	a
	MSU032	0	a
	MSU033	0.33±0.05	f, g
	MSU034	0	a
	MSU035	0	a

¹ค่าinhibition index แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยของ inhibition zone ระหว่างขอบเส้นใยราถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียจากการทดลอง 3 ซ้ำ

²กลุ่มที่จำแนกตามความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Tukey' test ($P \leq 0.05$) สัญลักษณ์ a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2. (ต่อ) ชนิดของปลา แหล่งตัวอย่างปลาและความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ชนิดและแหล่งตัวอย่างปลา	ไอโซเลท ของ แบคทีเรียที่แยกได้	Inhibition index ¹	กลุ่ม ²
ปลานิล (<i>Tilapia oreochromis</i>) ตลาดนครปฐม	MSU036	0	a
	MSU037	0.89±0.33	c
	MSU038	0	a
	MSU039	0	a
	MSU040	0.93±0.31	c, d
	MSU041	0	a
	MSU042	0	a
	MSU043	0	a
	MSU044	0	a
	MSU045	0	a
ปลาตะโกก (<i>Cyclocheilichthys enoplos</i>) คลองหนองดินแดง จ.นครปฐม	MSU046	1.74±0.09	f
	MSU047	0	a
	MSU048	0	a
	MSU049	0.44±0.10	b
	MSU050	0.81±0.16	d, e
	MSU051	0	a
	MSU052	1.11±0.10	e
	MSU053	0	a

¹ค่า inhibition index แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยของ inhibition zone ระหว่างขอบเส้นใยราถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียจากการทดลอง 3 ซ้ำ

²กลุ่มที่จำแนกตามความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Tukey' test ($P \leq 0.05$) สัญลักษณ์ a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2. (ต่อ) ชนิดของปลา แหล่งตัวอย่างปลาและความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ชนิดและแหล่งตัวอย่างปลา	ไอโซเลท ของ แบคทีเรียที่แยกได้	Inhibition index ¹	กลุ่ม ²
ปลานิล (<i>Tilapia oreochromis</i>) ตลาดนครปฐม	MSU054	0	a
	MSU055	0	a
	MSU056	0	a
	MSU057	0	a
	MSU058	0	a
	MSU059	0	a
	MSU060	0	a

¹ค่า inhibition index แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยของ inhibition zone ระหว่างขอบเส้นใยราถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียจากการทดลอง 3 ซ้ำ

²กลุ่มที่จำแนกตามความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Tukey' test ($P \leq 0.05$) สัญลักษณ์ a-g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่สามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans*

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อ *A. invadans* ทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 3 4 5 และ 6 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส และวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4) พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียทุกไอโซเลท ที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 3 และ 4 มีการเจริญแตกต่างจากชุดควบคุมที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าแบคทีเรีย MSU050 และ MSU052 สามารถเจริญในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 2 และ 3 ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 3. การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 3 4 5 และ 6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ไอโซเลทแบคทีเรีย	ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตรของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ ¹				
		2	3	4	5	6
NB	MSU001	0.09±0.01 ^a	0.08±0.01 ^a	0.10±0.00 ^a	0.48±0.29 ^b	0.62±0.42 ^b
NB	MSU003	0.07±0.01 ^a	0.07±0.01 ^a	0.09±0.01 ^a	0.34±0.03 ^b	0.41±0.04 ^c
NB	MSU027	0.01±0.00 ^a	0.04±0.01 ^a	0.06±0.24 ^b	1.10±0.01 ^c	1.30±0.02 ^c
MRS broth	MSU033	0.02±0.00 ^a	0.07±0.00 ^{ab}	0.24±0.06 ^{bc}	0.29±0.08 ^{cd}	0.47±0.11 ^d
NB	MSU037	0.01±0.00 ^a	0.02±0.00 ^{ab}	0.05±0.00 ^b	2.00±0.02 ^c	2.20±0.03 ^c
NB	MSU040	0.01±0.00 ^a	0.03±0.01 ^a	0.20±0.00 ^a	1.40±0.01 ^b	1.80±0.02 ^c
NB	MSU046	0.01±0.01 ^a	0.04 ±0.00 ^a	0.08±0.00 ^a	0.86±0.13 ^b	0.64±0.30 ^b
MRS broth	MSU049	0.02±0.01 ^a	0.05±0.05 ^a	0.02±0.01 ^a	0.85±0.06 ^b	0.99±0.01 ^c
MRS broth	MSU050	0.16±0.06 ^a	0.19± 0.06 ^a	0.25± 0.06 ^a	0.18 ±0.06 ^a	1.70±0.04 ^b
MRS broth	MSU052	0.24±0.05 ^a	0.22 ±0.05 ^a	0.16± 0.05 ^a	0.21± 0.07 ^a	1.30±0.01 ^b

¹ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

^{a b c} กลุ่มที่จำแนกตามความแตกต่างทางสถิติต่อการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท เมื่อทดสอบด้วย

Tukey' test ($P \leq 0.05$) สัญลักษณ์ a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4. การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 3 4 5 และ 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ไอโซเลทแบคทีเรีย	ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตรของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ ¹				
		2	3	4	5	6
NB	MSU001	0.16±0.04 ^a	0.10±0.03 ^a	0.13±0.03 ^a	0.37±0.28 ^{bc}	0.90±0.21 ^c
NB	MSU003	0.08±0.02 ^a	0.07±0.02 ^a	0.11±0.03 ^a	0.67±0.21 ^{bc}	0.71±0.09 ^c
NB	MSU027	0.07±0.04 ^a	0.12±0.01 ^a	0.71±0.10 ^b	1.62±0.12 ^c	0.92±0.11 ^{bc}
MRS broth	MSU033	0.13±0.09 ^a	0.17±0.06 ^a	0.08±0.02 ^a	0.09±0.08 ^a	0.41±0.13 ^b
NB	MSU037	0.09±0.01 ^a	0.2±0.06 ^a	0.17±0.02 ^a	2.01±0.07 ^b	1.75±0.08 ^b
NB	MSU040	0.10±0.04 ^a	0.11±0.04 ^a	0.15±0.03 ^a	2.90±0.10 ^b	1.73±0.09 ^b
NB	MSU046	0.02±0.02 ^a	0.05±0.02 ^a	0.18±0.01 ^a	0.95±0.22 ^b	0.92±0.19 ^b
MRS broth	MSU049	0.04±0.02 ^a	0.08±0.02 ^a	0.02±0.02 ^a	1.85±0.01 ^b	2.65±0.00 ^c
MRS broth	MSU050	0.26±0.05 ^a	0.40±0.02 ^a	0.16±0.07 ^a	0.11±0.07 ^a	6.70±0.05 ^b
MRS broth	MSU052	0.34±0.21 ^a	0.19±0.04 ^a	0.16±0.01 ^a	0.23±0.03 ^a	5.90±0.05 ^b

¹ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

^{a,b,c} กลุ่มที่จำแนกตามความแตกต่างทางสถิติต่อการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท เมื่อทดสอบด้วย

Tukey' test ($P \leq 0.05$) สัญลักษณ์ a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อ *A. invadans* ทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส และวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร (ตารางที่ 5) พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการเจริญของแบคทีเรียทุกไอโซเลท ยกเว้น ไอโซเลท MSU037 ในอาหารที่เติมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 แตกต่างจากอาหารที่ไม่เติมเกลือน้ำดีอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท MSU003, MSU040 และ MSU050 ในอาหารที่เติมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ต่างจากอาหารที่ไม่เติมเกลือน้ำดีอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การเจริญของแบคทีเรียทุกไอโซเลท ยกเว้น ไอโซเลท MSU050 ในอาหารที่เติมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 ต่างจากอาหารที่ไม่เติมเกลือน้ำดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท MSU050 และ MSU052 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่

เติมเกลื่อนำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส มีการเจริญของมากกว่าการเจริญของแบคทีเรียไฮโซเลท อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 5. การเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่เติมเกลื่อนำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 0.15 และ 0.30 ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส

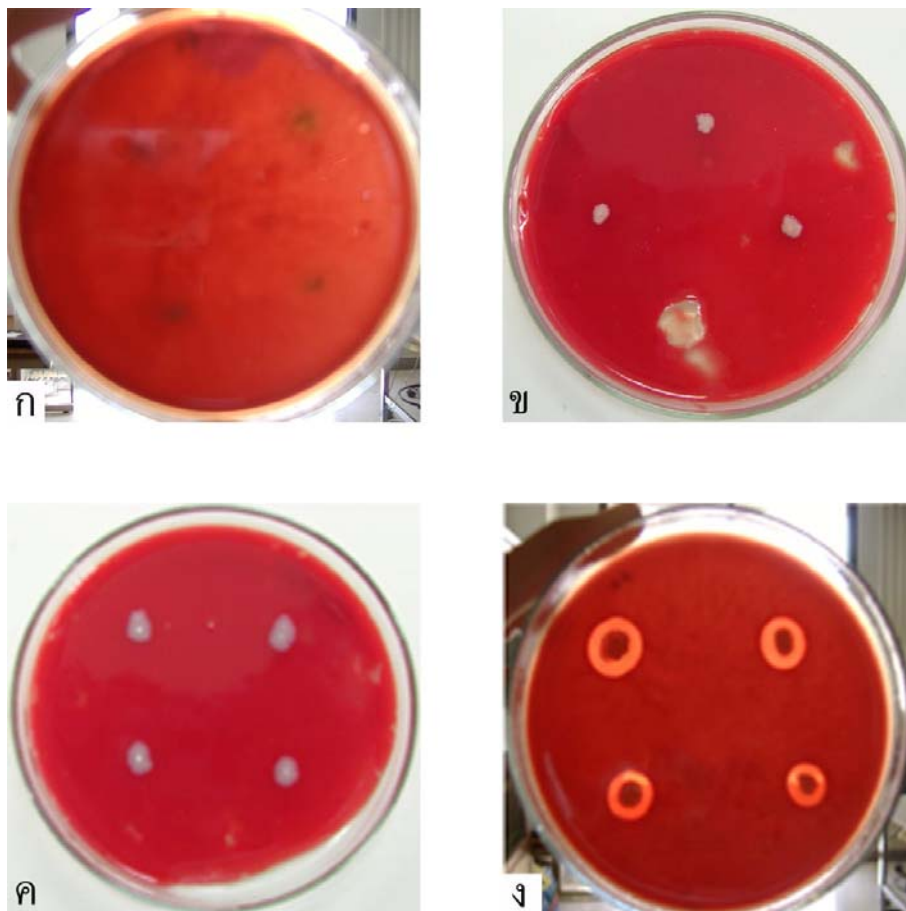
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ไฮโซเลท แบคทีเรีย	ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตรของ เซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลื่อนำดี ที่ความเข้มข้นร้อยละ ¹		
			0	0.15	0.3
25	NB	MSU001	0.68±0.16 ^a	0.58±0.07 ^a	0.68±0.46 ^a
	NB	MSU003	0.62±0.44 ^a	0.74±0.21 ^a	0.67±0.42 ^a
	NB	MSU027	2.10±0.06 ^a	2.40±0.04 ^a	1.80±0.04 ^a
	MRS broth	MSU033	5.50±0.38 ^a	0.46±0.15 ^a	0.23±0.06 ^a
	NB	MSU037	4.30±0.08 ^a	3.80±0.07 ^b	2.40±0.00 ^c
	NB	MSU040	4.30±0.07 ^a	3.80±0.06 ^a	2.30±0.01 ^a
	NB	MSU046	0.70±0.30 ^a	0.40±0.14 ^a	0.87±0.11 ^a
	MRS broth	MSU049	3.10±0.09 ^a	0.56±0.09 ^b	0.19±0.03 ^a
	MRS broth	MSU050	8.20±0.06 ^a	8.50±0.01 ^a	8.80±0.10 ^a
	MRS broth	MSU052	8.80±0.05 ^a	9.00±0.07 ^a	8.80±0.02 ^a
37	NB	MSU001	0.89±0.002 ^a	0.64±0.06 ^b	0.44±0.14 ^b
	NB	MSU003	0.82±0.002 ^a	1.47±0.10 ^a	0.71±0.06 ^b
	NB	MSU027	2.30±0.002 ^a	1.65±0.02 ^b	0.97±0.02 ^c
	MRS broth	MSU033	1.92±0.001 ^a	0.34±0.10 ^b	0.16±0.02 ^c
	NB	MSU037	3.52±0.002 ^a	1.87±0.20 ^b	0.89±0.11 ^c
	NB	MSU040	3.00±0.002 ^a	2.18±0.12 ^{ab}	0.90±0.30 ^b
	NB	MSU046	0.760±0.002 ^a	0.44±0.10 ^b	0.38±0.04 ^b
	MRS broth	MSU049	2.93±0.002 ^a	0.29±0.07 ^b	0.24±0.03 ^b
	MRS broth	MSU050	4.71±0.002 ^a	5.90±0.02 ^a	5.93±0.17 ^a
	MRS broth	MSU052	6.87±0.002 ^a	5.70±0.01 ^b	5.72±0.03 ^b

¹ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

^{a b c} กลุ่มที่จำแนกตามความแตกต่างทางสถิติต่อการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไฮโซเลท เมื่อทดสอบด้วย

Tukey' test ($P \leq 0.05$) สัญลักษณ์ a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อ *A. invadans* ทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท MSU001, MSU033, MSU037, MSU040 และ MSU046 มีความสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ทำให้เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี (Beta hemolysis) แบคทีเรียไอโซเลท MSU003 และ MSU027 มีความสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงอย่างไม่สมบูรณ์และเกิดบริเวณสีเขียวรอบโคโลนี (Alpha hemolysis) และแบคทีเรียไอโซเลท MSU049, MSU050 และ MSU052 ไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (Gamma hemolysis หรือ Non-hemolysis; ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2. การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท MSU049 (ก), MSU050 (ข) และ MSU052 (ค) แบบที่ไม่สามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง และ MSU040 (ง) แบบที่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์บนอาหาร blood agar

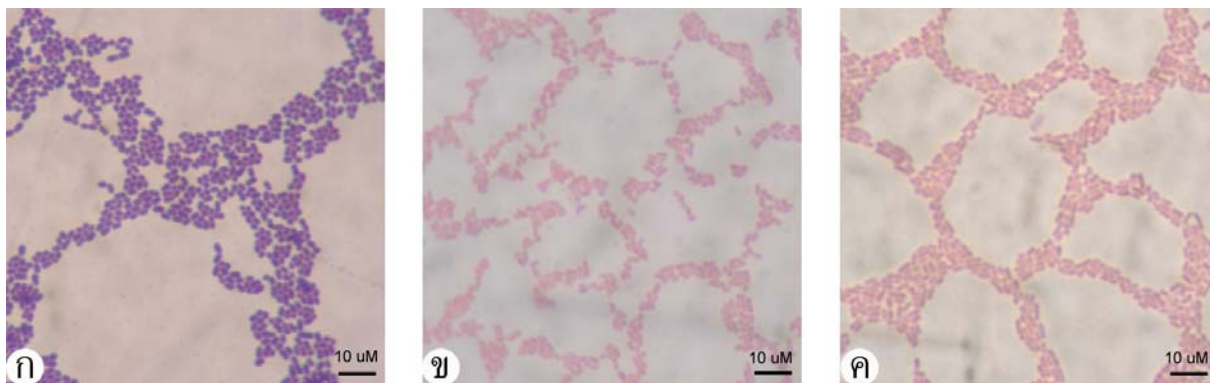
จากการศึกษาการทนต่อสภาวะที่เป็นกรด การทนต่อเกลือน้ำดี และการเจริญบน Blood agar สามารถที่จะสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท MSU050 และ MSU052 มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก กล่าวคือ สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ ถึงแม้ว่าการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด-

ต่างเท่ากับ 2 และ 3 จะน้อยกว่าชุดควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 แต่มีการเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียไฮโซเลท อื่น สามารถทนต่อเกลือได้ดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 และไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง ซึ่งแสดงว่าอาจจะไม่เป็นเชื้อก่อโรค จึงจะได้นำแบคทีเรียไฮโซเลท MSU050 และ 052 ไปศึกษาในขั้นต่อไป นอกจากนี้จะได้นำแบคทีเรียไฮโซเลท MSU049 ไปศึกษาร่วมด้วย เนื่องจากเป็นเชื้ออีกหนึ่งชนิดที่ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ ถึงแม้ว่าจะมีการเจริญในสภาวะที่เป็นกรดและในเกลือได้ดีไม่ได้

3. การระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของโพรไบโอติกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans*

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ภาพที่ 3) ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของโพรไบโอติกแบคทีเรียไฮโซเลท MSU049, MSU050 และ MSU052 (ตารางที่ 6) และตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ด้วยรูปวิธานของ Brenner (1984) และ Schleifer (1986) แบคทีเรีย MSU049 เป็นแกรมบวก รูปร่างกลม มีขนาดเซลล์ประมาณ 1 ไมครอน เคลื่อนที่ไม่ได้ มีการเรียงตัวเป็นคู่ สี่เซลล์ หรือคล้ายพวงองุ่น การทดสอบคะตะเลสให้ผลเป็นบวก ซึ่งจำแนกเป็นแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าเหมือนกับ *Staphylococcus epidermidis* สายพันธุ์ SW-3/RSE, TPL02 และ HNR19 ในฐานข้อมูลของ NCBI ในระดับความเหมือนร้อยละ 100 (ภาพที่ 4) จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียไฮโซเลท MSU049 เป็น *Staphylococcus epidermidis*

ในขณะที่แบคทีเรียไฮโซเลท MSU050 และ MSU052 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ไม่โค้งงอ สามารถเคลื่อนที่ได้ มีขนาดเซลล์ประมาณ 1 ไมครอน การทดสอบออกซิเดสเป็นลบ การทดสอบ IMViC เป็นแบบ ลบ ลบ บวก บวก จึงเป็นไปได้ว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าเหมือนกับ *Enterobacter cloacae* (ภาพที่ 5) และ *Pantoea agglomerans* (synonyme: *Enterobacter agglomerans*) ในฐานข้อมูลของ NCBI ในระดับความเหมือนร้อยละ 99 แต่เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วพบว่า MSU050 และ MSU052 น่าจะเป็น *E. cloacae* เนื่องจาก *E. cloacae* สามารถใช้ lysine และ ornithine ได้ แต่ *P. agglomerans* ไม่สามารถใช้ได้ (Nazarowec-White และ Farber, 1997) และ *E. cloacae* ใช้น้ำตาลแลคโตสได้ดีและให้ผลการทดสอบอินโดลที่ชัดเจนกว่า *P. agglomerans* และเนื่องจาก MSU050 และ MSU052 แยกได้จากปลาตะโกกตัวเดียวกัน และยังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA เหมือนกันทุกประการ จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียทั้งสองไฮโซเลท นี้เป็นเชื้อเดียวกัน



ภาพที่ 3. การติดสีแกรมบวกของแบคทีเรียไฮโซเลท MSU049 (ก), และแกรมลบของแบคทีเรียไฮโซเลท MSU050 (ข) และ MSU052 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 6. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไฮโซเลท MSU049, MSU050 และ MSU052

	แบคทีเรีย		
	MSU 049	MSU 050	MSU 052
ลักษณะโคโลนี	กลม เล็ก สีขาว	กลม ใหญ่ สีขาว	กลม ใหญ่ สีขาว
รูปร่างของเซลล์	กลม	รูปแท่ง	รูปแท่ง
การติดสีแกรม	แกรมบวก	แกรมลบ	แกรมลบ
oxidase test	-	-	-
catalate test	+	+	+
motile	non motile	motile	motile
OF test	OF	OF,G	OF,G
Urease	+	+	+
TSI (Slant/Bottom)	Alk / Alk	Alk/AG	Alk/AG
Indole	-	-	-
MR	+	-	-
VP	-	+	+
Citrate	-	+	+
Decarboxylase test :			
Lysine	+	-	-
Ornithine	+	+	+
Arginine	+	+	+

	แบคทีเรีย		
	MSU 049	MSU 050	MSU 052
Fermentation :			
- Glucose	A	AG	AG
- Lactose	A	A	A
- Sucrose	A	AG	AG
- Manose	A	AG	AG
- Adonitose	Alk	Alk	Alk

สัญลักษณ์ A = สร้างกรด; Alk = สร้างเบส; G = สร้างก๊าซ; OF = oxidation-fermentation,
+ พบการเจริญ, - ไม่พบการเจริญ

MSU049	GAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG	60
SW-3/RSE	GAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG	65
TPL02	GAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG	64
HNR19	GAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG	60

MSU049	AACAGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATA	120
SW-3/RSE	AACAGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATA	125
TPL02	AACAGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATA	124
HNR19	AACAGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATA	124

MSU049	ACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTG	180
SW-3/RSE	ACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTG	185
TPL02	ACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTG	184
HNR19	ACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTG	184

MSU049	AACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCG	240
SW-3/RSE	AACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCG	245
TPL02	AACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCG	244
HNR19	AACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCG	244

MSU049	CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	300
SW-3/RSE	CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	305
TPL02	CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	304
HNR19	CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG	304

MSU049	GGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG	360
SW-3/RSE	GGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG	365
TPL02	GGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG	364
HNR19	GGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG	364

MSU049	GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTT	420
SW-3/RSE	GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTT	425
TPL02	GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTT	424
HNR19	GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTT	424

MSU049	CGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTG	480
SW-3/RSE	CGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTG	485
TPL02	CGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTG	484
HNR19	CGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTG	484

MSU049	ACGGTACCTAATCAGA	496
SW-3/RSE	ACGGTACCTAATCAGA	501
TPL02	ACGGTACCTAATCAGA	500
HNR19	ACGGTACCTAATCAGA	500

ภาพที่ 4. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีอิกของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย *S. epidermidis* MSU049 กับ 16S rDNA ของแบคทีเรีย *S. epidermidis* SW-3/RSE (accession No. FJ415323), *S. epidermidis* TPL02 (accession No. EU373368) และ *S. epidermidis* HNR19 (accession No. EU373384) ในฐานข้อมูลของ NCBI และ * แสดงการอนุรักษ์ของนิวคลีอิก

MSU050	AGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGG	60
MSU052	AGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGG	60
CMG3058	AGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGG	60
FR	AGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGG	62

MSU050	TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAA	120
MSU052	TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAA	120
CMG3058	TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAA	120
FR	TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAA	122

MSU050	CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAG	180
MSU052	CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAG	180
CMG3058	CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAG	180
FR	CTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAG	182

MSU050	ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAG	240
MSU052	ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAG	240
CMG3058	ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAG	240
FR	ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAG	242

MSU050	TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC	300
MSU052	TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC	300
CMG3058	TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC	300
FR	TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC	302

CMG3058	CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA	360
FR	CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA	360
MSU050	CACACTGGAACCTGAGACACGATCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA	360
MSU052	CACACTGGAACCTGAGACACGATCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA	362

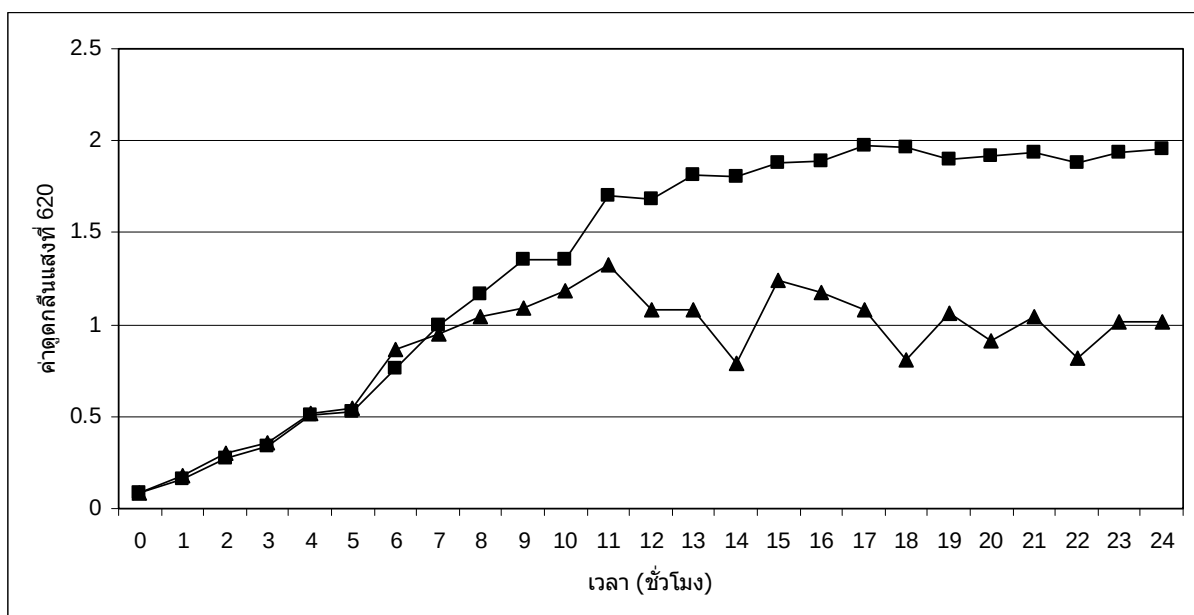
MSU050	CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA	420
MSU052	CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA	420
CMG3058	CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA	420
FR	CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA	422

MSU050	AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGT	474
MSU052	AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGT	474
CMG3058	AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGT	474
FR	AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGT	476

ภาพที่ 5. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีอิกของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย *E. cloacae* MSU050 และ MSU052 กับ 16S rDNA ของแบคทีเรีย *E. cloacae* CMG3058 (accession No. EU048321) และ *E. cloacae* CMG3058 (accession No. EU849019) ในฐานข้อมูลของ NCBI และ * แสดงการอนุรักษ์ของนิวคลีอิก

4. การเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* MSU049 และ *Enterobacter cloacae* MSU050

เมื่อวัดการเจริญของ *S. epidermidis* MSU049 และ *E. cloacae* MSU050 ด้วยวิธีการวัดความขุ่นของเซลล์พบว่าเชื้อทั้งสองมีการเจริญในระยะ lag phase ระหว่างชั่วโมงที่ 1-5 เข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 6-11 และเข้าสู่ระยะ stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป (ภาพที่ 6) แต่ *S. epidermidis* MSU049 มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.268 ต่อชั่วโมง และใช้เวลา 2.590 ชั่วโมงในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ในขณะที่ *E. cloacae* MSU050 มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.337 ต่อชั่วโมง และใช้เวลา 2.059 ชั่วโมงในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า

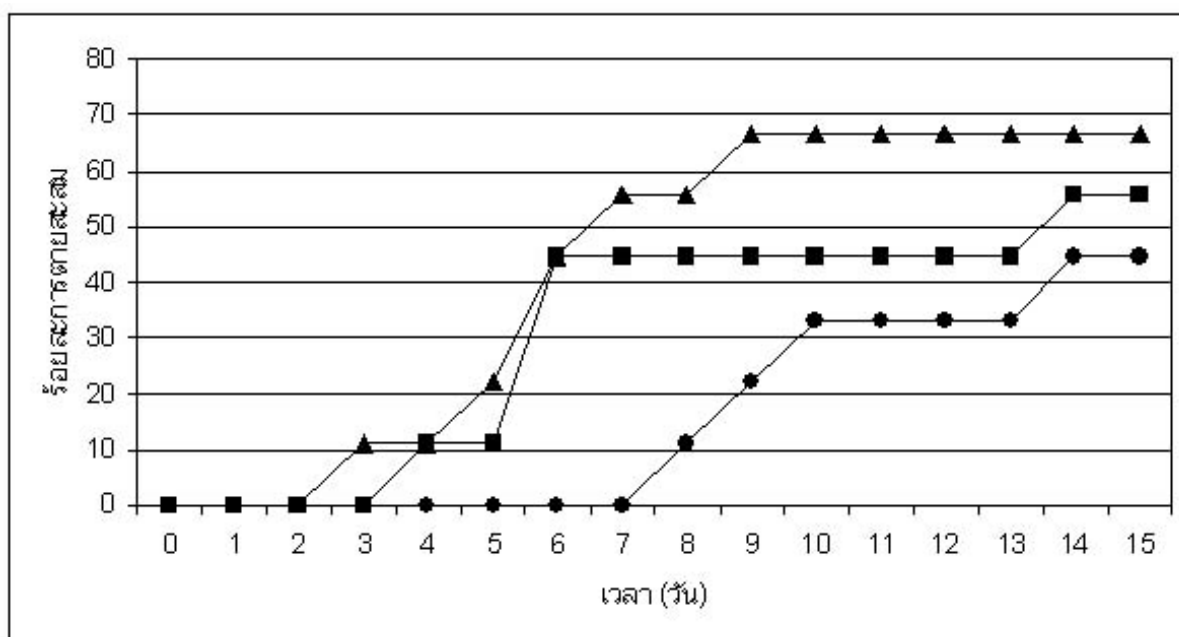


ภาพที่ 6. การเจริญของ *S. epidermidis* MSU049 (สี่เหลี่ยม) และ *E. cloacae* MSU050 (สามเหลี่ยม) โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 620 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การศึกษาผลของความเข้มข้นของ zoospore ของรา *Aphanomyces invadans* ต่อการชักนำให้เกิดโรค EUS ในปลาช่อน

เมื่อชักนำให้เกิดโรค EUS ในปลาช่อน โดยเติม zoospore ของรา *A. invadans* ที่ความเข้มข้น 10^5 , 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในตู้ปลา ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสังเกตการณ์เกิดโรคเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้ปลาช่อนตายประมาณร้อยละ 45 ในวันที่ 14 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้ปลาช่อนตายประมาณร้อยละ 45 ในวันที่ 6 และร้อยละ 55 ในวันที่ 14 ในขณะที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้ปลาช่อนตายประมาณร้อยละ 55 ในวันที่ 7 และร้อยละ 65 ในวันที่ 9 (ภาพที่ 7) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณการตายของปลาช่อนเมื่อชักนำให้เกิดโรคโดยใช้ zoospore 10^5 , 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำเนื้อเยื่อของปลาที่ตายมาศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยราในเนื้อเยื่อได้ และสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากปลาที่ตายได้

จากผลของการศึกษานี้ จึงได้เลือกใช้ zoospore ที่ความเข้มข้นของ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นมาตรฐานสำหรับชักนำให้เกิดโรค EUS ในปลาช่อน เนื่องจากความเข้มข้นนี้สามารถทำให้ปลาช่อนตายได้ร้อยละ 50



ภาพที่ 7. ร้อยละการตายสะสมของปลาช่อน หลังจากทำการชักนำให้เกิดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ที่ความเข้มข้น 10^5 (วงกลม) 10^6 (สี่เหลี่ยม) และ 10^7 (สามเหลี่ยม) สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

6. การศึกษาความสามารถของโพรไบโอติก *Staphylococcus epidermidis* MSU049 และ *Enterobacter cloacae* MSU 050 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน

เมื่อศึกษาความสามารถของโพรไบโอติก *S. epidermidis* MSU049 และ *E. cloacae* MSU 050 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน โดยแบ่งปลาเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นชุดควบคุมการไม่เกิดโรค ไม่ใส่สปอร์ราและโพรไบโอติกแบคทีเรีย

กลุ่มที่ 2 เป็นชุดควบคุมการเกิดโรค ใส่สปอร์รา

กลุ่มที่ 3 เป็นชุดทดลอง ใส่โพรไบโอติกแบคทีเรีย

กลุ่มที่ 4 เป็นชุดทดลอง ใส่โพรไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาครั้งเดียว และเลี้ยงปลาเป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา

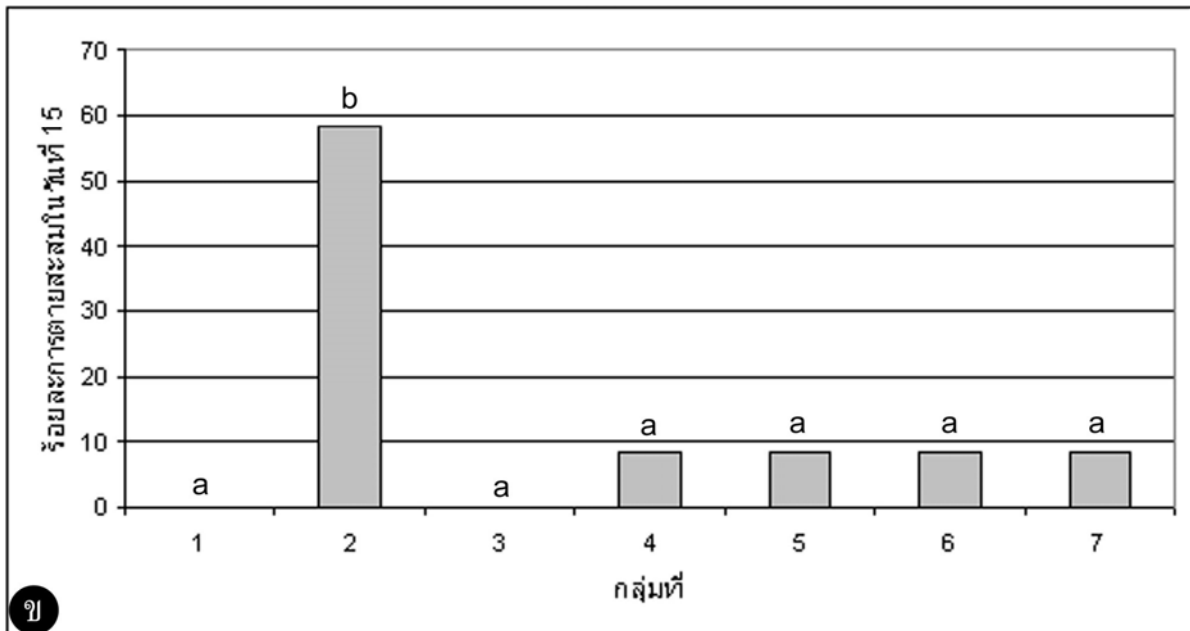
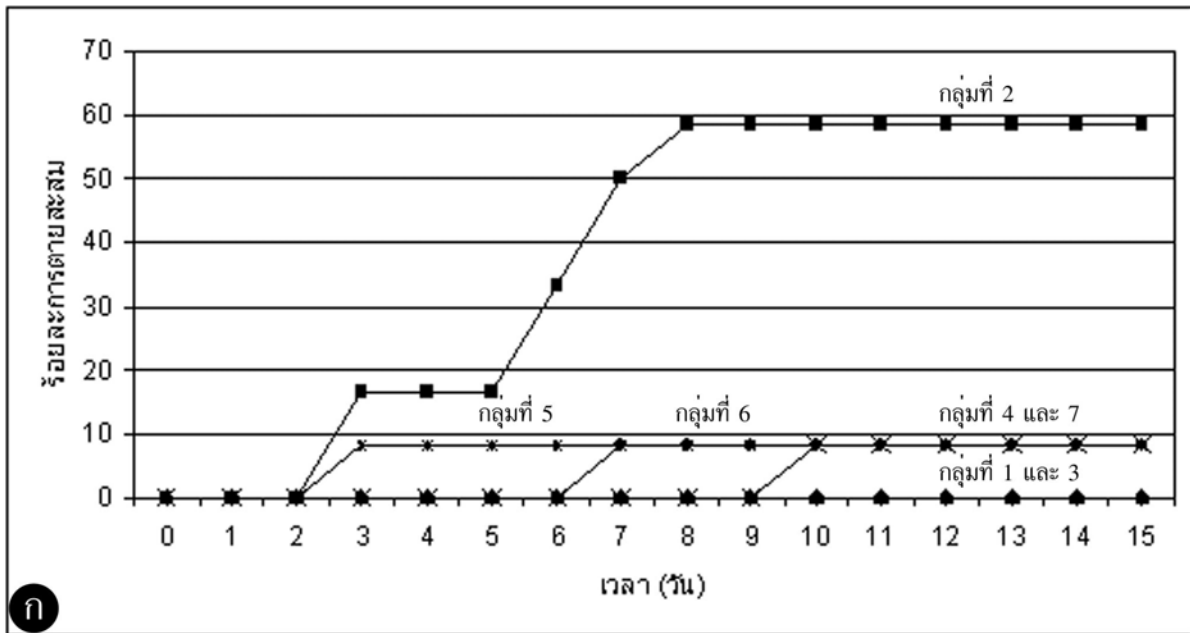
กลุ่มที่ 5 เป็นชุดทดลอง ใส่โพรไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา

กลุ่มที่ 6 เป็นชุดทดลอง ใส่ zoospore ให้แก่ปลาเป็นเวลา 3 วัน ก่อนเติมโพรไบโอติกแบคทีเรีย ให้แก่ปลาครั้งเดียว

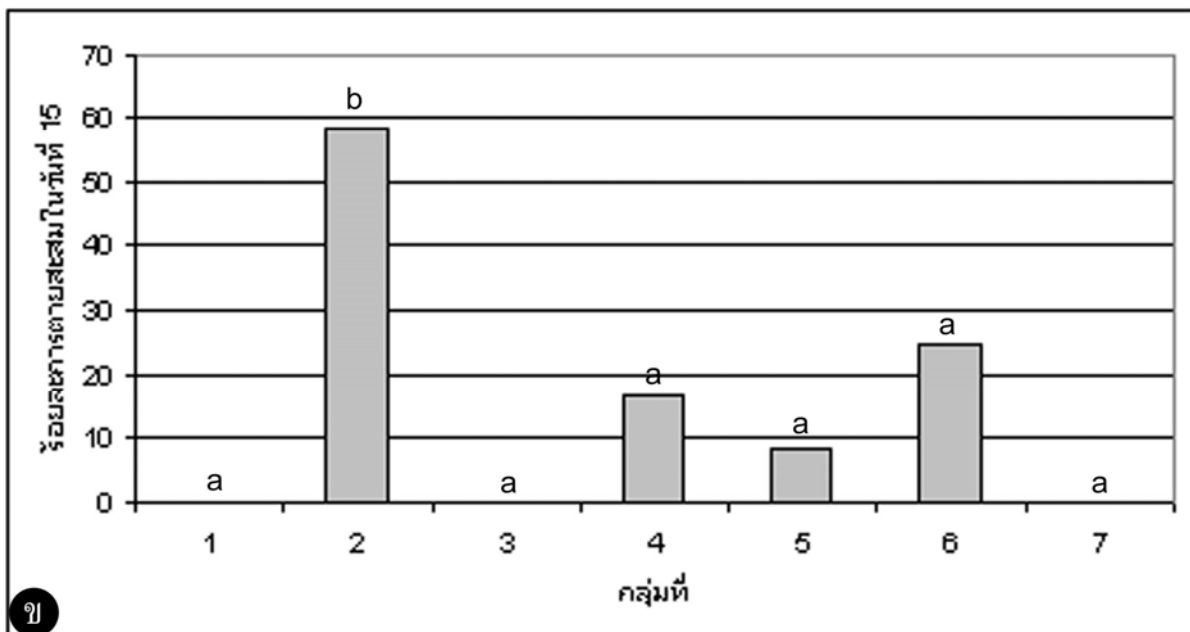
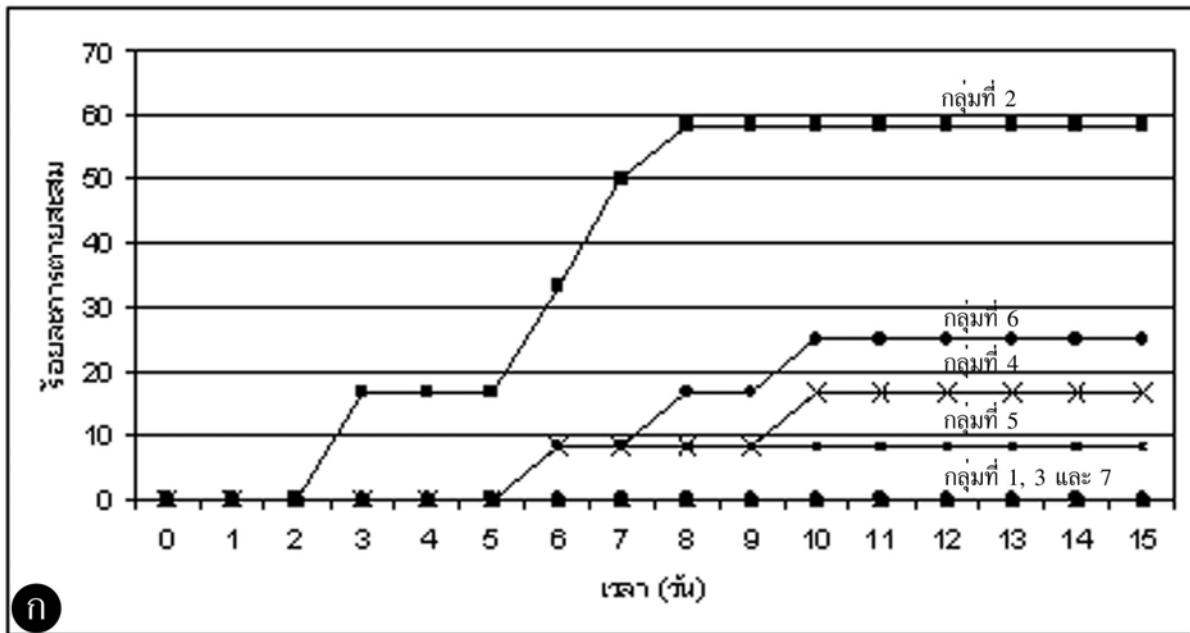
กลุ่มที่ 7 เป็นชุดทดลอง ใส่ zoospore ให้แก่ปลาเป็นเวลา 3 วัน ก่อนเติมโพรไบโอติกแบคทีเรีย ให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน

จากผลของการทดลองพบว่าโพรไบโอติก *S. epidermidis* MSU049 ไม่สามารถทำให้ปลาตายได้ และการใส่โพรไบโอติกก่อนหรือหลังการชักนำให้เกิดโรค EUS จะพบอัตราการตายของปลาช่อนประมาณร้อยละ 10 (ภาพที่ 8) และการเติมโพรไบโอติกแบคทีเรียสามารถช่วยให้อัตราการตายของปลาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

E. cloacae MSU050 ไม่สามารถทำให้ปลาตายได้ และพบว่าการใช้โพรไบโอติกก่อนการชักนำให้เกิดโรค EUS จะมีอัตราการตายของปลาช่อนประมาณร้อยละ 10-15 แต่การใช้โพรไบโอติก หลังการชักนำให้เกิดโรค EUS จะมีอัตราการตายของปลาช่อนประมาณร้อยละ 0-25 และการเติมโพรไบโอติกทุกๆ 3 วัน ช่วยลดอัตราการตายของปลาช่อนประมาณร้อยละ 0-10 ในขณะที่การเติมโพรไบโอติกเพียงครั้งเดียวทำให้ปลาช่อนมีอัตราการตายมากกว่า ประมาณร้อยละ 15-25 (ภาพที่ 9) และการเติมโพรไบโอติกแบคทีเรียสามารถช่วยให้อัตราการตายของปลาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำเนื้อเยื่อของปลาที่ตายจากชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อ *A. invadans* มาศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์ สามารถพบเส้นใยราในเนื้อเยื่อได้ และสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากปลาที่ตายได้



ภาพที่ 8. ร้อยละการตายสะสม (ก) และอัตราการตายสะสมในวันที่ 15 โดย กลุ่มที่ 1 เป็นชุดควบคุมการไม่เกิดโรค กลุ่มที่ 2 เป็นชุดควบคุมการเกิดโรค กลุ่มที่ 3 เป็นชุดทดลองใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรีย กลุ่มที่ 4 เป็นชุดทดลองใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรียครั้งเดียวและเลี้ยงปลาเป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา กลุ่มที่ 5 เป็นชุดทดลองใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา กลุ่มที่ 6 เป็นชุดทดลองใส่ zoospore เป็นเวลา 3 วัน ก่อนเติมไฟโรไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาครั้งเดียว และกลุ่มที่ 7 เป็นชุดทดลองใส่ zoospore เป็นเวลา 3 วัน ก่อนทำเติมไฟโรไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน (ข) ของปลาช่อน เมื่อใช้ไฟโรไบโอติกแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* MSU049 ก่อนหรือหลังการชักนำให้เกิดโรคโดยรา *Aphanomyces invadans* ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 4 ซ้ำ สัญลักษณ์ a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 9. ร้อยละการตายสะสม (ก) และอัตราการตายสะสมในวันที่ 15 โดย กลุ่มที่ 1 เป็นชุดควบคุมการไม่เกิดโรค กลุ่มที่ 2 เป็นชุดควบคุมการเกิดโรค กลุ่มที่ 3 เป็นชุดทดลองใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรีย กลุ่มที่ 4 เป็นชุดทดลองใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรียครั้งเดียวและเลี้ยงปลาเป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา กลุ่มที่ 5 เป็นชุดทดลองใส่ไฟโรไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 14 วัน ก่อนเติมสปอร์รา กลุ่มที่ 6 เป็นชุดทดลองใส่ zoospore เป็นเวลา 3 วัน ก่อนเติมไฟโรไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาครั้งเดียว และกลุ่มที่ 7 เป็นชุดทดลองใส่ zoospore เป็นเวลา 3 วัน ก่อนทำเติมไฟโรไบโอติกแบคทีเรียให้แก่ปลาทุกๆ 3 วัน (ข) ของปลาซอลน เมื่อใช้ไฟโรไบโอติกแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* MSU050 ก่อนหรือหลังการชักนำให้เกิดโรคโดยรา *Aphanomyces invadans* ข้อมูลจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 4 ซ้ำ สัญลักษณ์ a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิจารณ์ผลการวิจัย

Epizootic ulcerative syndrome (EUS) คือโรคที่มีสาเหตุมาจากรา *Aphanomyces invadans* ในปลาน้ำจืดและปลาน้ำกร่อยหลายชนิด เช่น ปลาช่อน ปลาตะเพียน ปลาแรด และปลามอ เป็นต้น โดยปลาจะมีแผลเน่าเปื่อยเป็นหลุม ที่ส่วนหัวและข้างลำตัว ถึงแม้ว่าผลของการทดลองในห้องปฏิบัติการจะพบว่า Coptal (a chelate copper compound), malachite green, hydrogen peroxide และ Proxitane 0510 (มี 5% peracetic acid in hydrogen peroxide เป็นองค์ประกอบ) สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. invadans* (Lilley และคณะ 1998) แต่ในปัจจุบันยังไม่มียาหรือสารเคมีใดที่ใช้รักษาปลาที่ติดโรคในบ่อเลี้ยงได้ เพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีอันตรายที่สามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อม การใช้โฟรบิโอติกแบคทีเรียในการป้องกันโรค EUS จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าจะช่วยให้ผลในการยับยั้งการเกิดโรคระบาดในปลาได้

Verschuere และคณะ (2000) แนะนำคุณสมบัติของโฟรบิโอติกแบคทีเรียสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไว้ว่า (1) ต้องไม่เป็นโทษต่อสัตว์น้ำ (2) สัตว์น้ำควรที่จะสามารถยอมรับโฟรบิโอติกแบคทีเรียได้ (3) ควรที่จะสามารถเจริญได้ในตำแหน่งที่โฟรบิโอติกทำงานได้ เช่น ในระบบทางเดินอาหาร บนผิวปลา (4) ควรที่จะให้ผลการทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เช่นเดียวกับเมื่อทำในหลอดทดลอง (*in vitro*) และ (5) ควรที่จะไม่มียีนก่อโรคหรือยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ การคัดเลือกโฟรบิโอติกแบคทีเรียในการทดลองนี้ได้คำนึงถึงความปลอดภัยและความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากระบบทางเดินอาหารของปลาโดยคาดหวังว่าเชื้อที่สามารถแยกได้น่าจะมีคุณสมบัติดังที่ Verschuere และคณะ (2000) แนะนำไว้ และได้ทำการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโฟรบิโอติกบางประการ โดยทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและสภาวะที่มีเกลือน้ำดี ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้ น่าจะทนต่อกรดและน้ำดีในกระเพาะอาหารได้เช่นกัน และทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้อาจจะเป็นเชื้อก่อโรคซึ่งไม่เหมาะสมต่อการใช้เป็นโฟรบิโอติก (Schulze และคณะ, 2006)

ผลการคัดกรองพบว่าแบคทีเรีย MSU050 และ MSU052 สามารถยับยั้งการเจริญของราและมีคุณสมบัติเป็นโฟรบิโอติก ในขณะที่ MSU049 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของราและไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ แต่ไม่ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและสภาวะที่มีเกลือน้ำดี แต่เนื่องจาก Moriarty (1999) ให้นิยามของโฟรบิโอติกแบคทีเรียสำหรับใช้ในสัตว์น้ำไว้มากกว่าที่ Fuller (1989) ให้ไว้ คือควรที่จะหมายรวมถึงการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตและมีประโยชน์ลงในแหล่งน้ำด้วย นอกเหนือจากการเป็นอาหารเสริมที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายและรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ด้วยเหตุนี้เองจึงได้นำแบคทีเรีย MSU049 ไปศึกษาต่อโดยตั้งสมมติฐานไว้ว่าน่าจะลดอัตราการตายของปลาช่อนเมื่อชักนำให้ติดเชื้อ *A. invadans* ได้ ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรดและสภาวะที่มีเกลือน้ำดีได้ เพราะกลไกการทำงานของ MSU049 อาจจะไม่เกิดขึ้นในระบบทางเดินอาหารของปลา

แบคทีเรีย MSU049 MSU050 และ MSU052 แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลาตะโกกที่ได้มาจากคลองหนองดินแดง จังหวัดนครปฐม เป็นแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งมีจุลินทรีย์ที่หลากหลาย อีกทั้งมีนิสสัยกินหอยสองฝา กุ้ง ปู ไรติเฟอร์ ไรแดง แพลงค์ตอนและสาหร่าย เป็นอาหาร (เจดั่น, 2538) ซึ่งเป็นอาหารตามธรรมชาติ จึงมีโอกาที่จะรับแบคทีเรียดีที่มีประโยชน์ต่อตัวปลา ต่างจากปลาเลี้ยงซึ่งอยู่ในแหล่งน้ำที่เป็นระบบปิด และกินอาหารสำเร็จรูป และบางครั้งอาจใช้ยาปฏิชีวนะร่วมด้วย จึงทำให้แบคทีเรียที่มีประโยชน์ถูกทำลายลง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA สามารถสรุปได้ว่า MSU049 เป็น *Staphylococcus epidermidis* และเมื่อนำไปศึกษาความสามารถในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน พบว่าสามารถลดอัตราการตายจากประมาณร้อยละ 60 เหลือร้อยละ 10 จากการตรวจสอบเอกสาร ไม่พบการรายงานว่า *S. epidermidis* มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เป็นปฏิปักษ์หรือถูกใช้ในการควบคุมโรคจากราในสัตว์ชั้น Oomycota มาก่อน ถึงแม้ว่า Kusuda และ Sugiyama (1981) รายงานว่า *S. epidermidis* เป็นเชื้อก่อโรคในปลา แต่ในความเป็นจริงแล้ว *S. epidermidis* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้บนผิวของคน สัตว์บก และปลาหลายชนิด (Cahill, 1990) และสามารถเป็นแบคทีเรียช่วยโอกาส เมื่อปลายอยู่ในสภาพอ่อนแอ หรือมีการชักนำให้ติดเชื้อที่ความเข้มข้นสูง (Huang และคณะ, 1999) แต่ในการทดลองนี้ได้ทำการใส่เชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ MSU049 ที่ความเข้มข้น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้แก่ปลาช่อนและไม่ทำให้ปลาตาย แต่สามารถช่วยลดอัตราการตายของปลาเมื่อชักนำให้ติดเชื้อ *A. invadans* ได้

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA สามารถสรุปได้ว่า MSU050 และ MSU052 เป็นแบคทีเรียไอโซเลตเดียวกัน คือ *Enterobacter cloacae* และเมื่อนำไปศึกษาความสามารถในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน พบว่าสามารถลดอัตราการตายจากประมาณร้อยละ 60 เหลือร้อยละ 0-25 โดยพบว่าการเติม *E. cloacae* MSU050 ให้แก่ปลาช่อน ก่อนการชักนำให้ติดเชื้อ มีแนวโน้มในการลดอัตราการตายได้ดีกว่าหลังการชักนำให้ติดเชื้อ และการเติมเชื้อทุกๆ 3 วัน มีแนวโน้มในการลดอัตราการตายได้ดีกว่าการเติมเชื้อเพียงครั้งเดียว จากการตรวจสอบเอกสาร ไม่พบการรายงานว่า *E. cloacae* มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกหรือมีการใช้ในสัตว์น้ำมาก่อน แต่มีรายงานการใช้ *E. cloacae* เป็นเชื้อสำหรับการควบคุมโรคเน่าคอดินในพืชที่เกิดจากรา *Pythium* spp. ถึงแม้ว่า *E. cloacae* จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดินได้ดีและสามารถควบคุมในระยะแรกเริ่มของการก่อโรคโดย *Pythium* spp. ได้ แต่กลไกการควบคุมทางชีวภาพของ *E. cloacae* ต่อ *Pythium* spp. ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Nelson และ Maloney, 1992; Roberts และคณะ, 1994a) เนื่องจาก *A. invadans* และ *Pythium* spp. จัดเป็นราในชั้น Oomycetes เหมือนกัน จึงเชื่อได้ว่า *E. cloacae* จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. invadans* ในการก่อโรคในปลาได้ และน่าจะมีส่วนในการควบคุมโรค EUS เป็นเช่นเดียวกันกับการควบคุมโรคเน่าคอดินโดยรา *Pythium* spp.

ในการศึกษานี้ได้รายงานถึงการคัดแยกและการใช้ *S. epidermidis* และ *E. cloacae* เพื่อใช้ในการควบคุมการก่อโรค EUS โดย *A. invadans* เป็นครั้งแรก กลไกการป้องกันและควบคุมโรค EUS โดยเชื้อโพรไบโอติกทั้งสองชนิด การศึกษาถึงวิธีการเก็บ วิธีการนำไปใช้ และปริมาณของโพรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการใช้งานในบ่อเลี้ยงปลา รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับความปลอดภัยของเชื้อต่อสัตว์น้ำ สัตว์อื่นๆ และคน ควรที่จะได้รับการศึกษาต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. จากการคัดแยกแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของปลา สามารถแยกเชื้อได้ 60 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *A. invadans* พบว่ามีแบคทีเรียปฏิบักรษ์ 10 ไอโซเลท
2. จากการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติก พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท MSU050 และ MSU052 มีคุณสมบัติเป็น โพรบิโอติก คือสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรด-ด่างเท่าดับ 2-5 ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-3 และไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้
3. จากการนำแบคทีเรียทั้งไอโซเลท MSU 049, MSU050 และ MSU052 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA สามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท MSU049 เป็น *Staphylococcus epidermidis* และแบคทีเรียไอโซเลท MSU050 และ MSU052 เป็น *Enterobacter cloacae* และเป็นเชื้อเดียวกัน
4. จากการศึกษาลงของความเข้มข้น zoospore ของรา *A. invadans* ต่อการชักนำให้เกิดโรคในปลาช่อน พบว่าที่ความเข้มข้น 10^5 , 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้ปลาช่อนตายประมาณร้อยละ 45, 55 และ 65 ตามลำดับ และความเข้มข้นของสปอร์ที่ทำให้ปลาช่อนตายร้อยละ 50 คือ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
5. จากการทดสอบความสามารถในการป้องกันและควบคุมโรค EUS ด้วยการเติมเชื้อ *S. epidermidis* MSU049 และ *E. cloacae* MSU050 ให้แก่ปลาช่อนที่ได้รับการชักนำให้ติดเชื้อ *A. invadans* พบว่าสามารถลดอัตราการตายจากร้อยละ 60 เป็นร้อยละ 10 และ ร้อยละ 25 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรที่จะมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการป้องกันและควบคุมโรค EUS โดยเชื้อโพรบิโอติก *S. epidermidis* MSU049 และ *E. cloacae* MSU050
2. ควรที่จะมีการศึกษาเกี่ยวกับป้องกันและควบคุมโรค EUS โดยเชื้อโพรบิโอติก *S. epidermidis* MSU049 และ *E. cloacae* MSU050 ในบ่อเลี้ยงปลาช่อน เพื่อหาวิธีการและปริมาณของโพรบิโอติกที่เหมาะสมต่อการใช้
3. ควรที่จะมีการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการเก็บเชื้อโพรบิโอติกให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้
4. ควรที่จะมีการศึกษาเกี่ยวกับความปลอดภัยของเชื้อ *S. epidermidis* MSU049 และ *E. cloacae* MSU050 ว่าไม่เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำและสัตว์อื่นๆ รวมถึงคนด้วย

บรรณานุกรม

- เจ็ดฉัน อมาตยกุล. 2538. ปลาตะโกก. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร.
- เสาวนิต ทองพิมพ์, พิษานิกา ชอบจิตต์ และ สมพงษ์ ดุลจินดาชบาพร. 2546. การแยกหาและศึกษาเชื้อซึ่งแสดงศักยภาพแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถยับยั้งโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลานิล. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- Aly SM, Abd-El-Rahman AM, John G and Mohamed MF. 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, 277: 1-6.
- Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, Effendi I and Griffith DRW. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, 18: 93–96.
- Beachey EH., 1981. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *Journal of Infectious Diseases* 143: 325-345.
- Bogut I, Milakovic Z, Bukvic S and Zimmer R. 1998. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*, 43: 231-235.
- Bondad-Reantaso MG, Lumanlan SC, Natividad JM and Phillips MJ. 1992. Environmental monitoring of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish from Munoz, Nueva Ecija in the Philippines. In: Subasinghe RP and Arthur JR (eds). *Diseases in Asian Aquaculture 1*. Asian Fisheries Society. Manila, The Philippines. p 475-490.
- Brenner DJ. 1984. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: Krieg NR, Holt GJ, Murray RGE, Brenner DJ, Bryant MP, Moulder JW, Pfennig N, Sneath PHA and Staley JT (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1*. William & Wilkins. Baltimore. p 408-600
- Cahill MM. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbiological Ecology*, 19: 21–41.
- Castex M, Chim L, Pham D, Lemaire P, Wabete N, Nicolas J, Schmidely P and Mariojouis C. 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*, 275: 182-193.

- Catap ES and Munday BL. 1998. Effects of variations of water temperature and dietary lipids on the expression of experimental epizootic ulcerative syndrome (EUS) in sand whiting, *Sillago ciliata*. *Journal of Fish Pathology*, 33: 327-335.
- Chinabut S. 1994. EUS in Thailand. In: Roberts RJ, Campbell B and Marcrae IH (eds). *Proceedings of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative Syndrome (25-27 January 1994)*. Aquatic Animal Health Research Institute. Bangkok, Thailand. p 58-60.
- Chinabut S. and Roberts R J. 1999. Pathology and histopathology of epizootic ulcerative syndrome (EUS). The Aquatic Animal Health Research Institute. Bangkok.
- Chinabut S, Roberts RJ, Willoughby GR and Person MD. 1995. Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. *Journal of Fish Diseases*, 18: 41-47.
- Chukeatirote E. 2003. Potential use of probiotics. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 25: 275-282.
- Dalmin G, Kathiresan K, Purushothanman A. 2001. Effect of probiotic on bacteria population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39: 939-942.
- Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EMM, O'Sullivan GC, Shanahan F and Kevin J. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 279-292.
- FAO. 1986. Report of the expert consultation on ulcerative fish diseases in the Asia-Pacific region (TCP/RAS/4508; 5-9 August 1986). FAO Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok.
- Fuller R. 1989. A review: probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.
- Fuller R. 1992. Problems and prospects. In: Fuller R (ed). *Probiotics. The Scientific basis*. Chapman & Hall, London. UK. p 377-386.
- Garcia T, Otto K, Kjelleberg S and Nelson DR. 1997. Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal muscle. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1034-1039.

- García de la Banda I, Chereguini O and Rasines I. 1992. Influencia de la adición de bacteria lácticas en el cultivo larvario del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Boletín Instituto Español de Oceanografía, 8: 247–254. (In Spanish)
- Garriques D and Arevalo G. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In Browdy CL and Hopkins JS (eds). Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA. p 53–59.
- Gatesoupe FJ. 1991. *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. In Kaushik S (ed). Fish nutrition in practice. Proceedings of the 4th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France. p 561–568.
- Gatesoupe FJ. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. Aquatic Living Resources, 7: 277–282.
- Gatesoupe FJ. 1999. The use of probiotic in aquaculture. Aquaculture, 180: 147–165.
- Gibson L, Woodworth J, and George A. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. Aquaculture, 169: 111–120.
- Gildberg A, Johansen A, and Bogwald J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture, 138: 23–34.
- Gildberg A and Mikkelsen H. 1998. Effects of supplementing the feed of Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immunostimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. Aquaculture, 167: 103–113.
- Gildberg A, Mikkelsen H, Sandaker E and Ringø E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia, 352: 279–285.

- Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF and Inglis V. 1998. Reduction in *Artemia* nauplii mortality with the use of a probiotic bacterium. In Kane AS and Poynton SL (eds). Proceedings of the Third International Symposium on Aquatic Animal Health. APC Press. Baltimore, Md. p 116.
- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, Huber I and Nielsen T. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2—a possible probiotic treatment of fish. Applied and Environmental Microbiology, 65: 969–973
- Harris JM. 1993. The presence nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. Microbiological Ecology, 25: 195-231.
- Harzevili ARS, Van Duffel H, Dhert P, Swings J and Sorgeloos P. 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). Aquaculture Research, 29: 411–417.
- Hatai K. 1980. Studies on pathogenic agents of saprolegniasis in freshwater fish. Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries. Nakasaki, Japan.
- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ. 1998. Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology. 41: 85-101.
- Hood SK and Zottola EA. 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. Journal of Food Science 53: 1514-1516.
- Huang S, Chen W, Shei M, Liao I and Chen S. 1999. Studies on Epizootiology and Pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in Tilapia (*Oreochromis* spp.) Cultured in Taiwan. Zoological Studies, 38: 178-188.
- Imada C, Maeda M and Taga N. 1985. Purification and characterization of the protease inhibitor “Monastatin” from a marine *Alteromonas* sp. with reference to inhibition of the protease product by a bacterium pathogenic to fish. Canadian Journal of Microbiology, 31: 1089-1094.
- Jöborn A, Olsson JC, Conway PL and Kjelloberg S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substrate in intestinal mucus and fecal extracts by *Canobacterium* sp. Strains K1. Journal of Fish Disease, 20: 383-392.
- Jung SC. 1993. Probiotic in human and animals. ATCC Quarterly Newsletter. 13: 1-4.

- Krovacek K, Faris A, Ahne W and Mansson I. 1987. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* to fish cells and to mucuscoated glass slides. FEMS Microbiology Letter, 42:85–89.
- Kusuda R and Sugiyama A. 1981. Studies on the characters of *Staphylococcus epidermidis* isolated from diseased fishes - I. On the morphological, biological and biochemical properties. Journal of Fish Pathology, 16: 15-24.
- Lilley JH, Callinan RB, Chinabut S, Kanchanakhan S, MacRae IH and Phillips MJ. 1998. Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Technical handbook. The Aquatic Animal Health Research Institute. Bangkok.
- Lilley JH, Hart D, Richards RH, Roberts RJ, Cerenius L and Söderhäll K. 1997. Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish kills. The Veterinary Record, 140: 653-654.
- Lilley JH, Phillips MJ and Tonguthai K. 1992. A review of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asia. Aquatic Animal Health Research Institute and Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific. Bangkok.
- Lumanlan-Mayo SC, Callinan RB, Paclibare JO, Catap ES and Fraser GC. 1997. Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in rice-fish culture systems: an overview of field experiments 1993-1995. In: Flegel TW and MacRae IH (eds). Diseases in Asian Aquaculture III. Asian Fisheries Society. Manila, The Philippines. p 129-138
- McKenzie RA and Hall WTK. 1976. Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). Australia Veterinary Journal, 52: 230-231.
- Miyazaki T and Egusa S. 1972. Studies on mycotic granulomatosis in fresh water fish – I Mycotic granulomatosis in goldfish. Fish Pathology 7, 15-25.
- Moriarty DJW. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Bell CR, Brylinsky M and Johnsson-Green P (eds). Microbial Biosystem: New Frontiers. Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canada.
- Nair S, Tsukamoto K, and Shimidu U. 1985. Distribution of bacteriolytic bacteria in the coastal marine environments of Japan. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 51: 1469–1473.
- Nazarowec-White, M. and Farber, J.M. 1997. *Enterobacter sakazakii*: a review. Int J Food Microbiol. 34:103-13.

- Nelson EB and Maloney AP. 1992. Molecular approaches for understanding biological control mechanisms in bacteria: studies of the interaction of *Enterobacter cloacae* with *Pythium ultimum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 14: 106-114.
- Olafsen JA. 1998. Interactions between hosts and bacteria in aquaculture. Proceedings from the US-EC Workshop on Marine Microorganisms: Research Issues for Biotechnology. European Commission. Brussels, Belgium., 127–145.
- Olsson JC, Jöborn A, Westerdahl A, Blomberg L, Kjelleberg S and Conway PL. 1998. Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. Journal of Fish Disease, 21: 1–9.
- Queiroz J and Boyd C. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. Journal of World Aquaculture Society, 29: 67–73.
- Raa J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Review of Fish Science, 4: 229-288.
- Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, and Menasveta P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture, 167:301–313.
- Rico-Mora R, Voltolina D, and Villaescusa-Celaya JA. 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. Aquaculture, 19: 1–6.
- Roberts DP, Short NMJr, Maloney AP, Nelson EB and Schff DA. 1994a. Role of colonization in biological control: studies with *Enterobacter cloacae*. Plant Science, 101: 83-89.
- Roberts RJ, Campbell B, MacRae IH. 1994b. Proceedings of the regionals seminar on epizootic ulcerative syndrome (25-27 january 1994). The Aquatic Animal Health Research Insitute. Bangkok.
- Roberts RJ, Willoughby LG and Chinabut S. 1993. Mycotic aspects of epizootic ulcrative syndrome (EUS) of Asian fishes. Journal of Fish Diseases, 16: 169-183.
- Robertson PO, Dowd C, Burrells C, Williams P and Austin B. 2000. Use of *Canobacterium* sp. for Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) and rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquaculture, 185: 235-243.
- Ringø E, and Vadstein O. 1998. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. Journal of Applied Microbiology, 84: 227–233.

- Riquelme C, Araya R, Vergara N, Rojas A, Guaita M and Candia M. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 154: 17–26.
- Schleifer KH. 1986. GramPositive cocci. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt GJ, Murray RGE, Brenner DJ, Bryant MP, Moulder JW, Pfennig N, and Staley JT (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2*. William & Wilkins. Baltimore. p 999-1103.
- Schulze AD, Alabi AO, Tattersall-Sheldrake AR and Miller KM. 2006. Bacterial diversity in marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256: 50-73.
- Smith P and Davey S. 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *Journal of Fish Diseases*, 16: 521–524.
- Stanier RY, Doudoroff M, and Adelberg EA. 1963. *The microbial world*. Prentice-Hall Inc. N.J.
- Sugita H, Matsuo N, Hirose Y, Iwato M and Deguchi Y. 1997. *Vibrio* sp. Strain NM10 isolate from intestine of a Japanese coastal fish has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4986-4989.
- Suminto K and Hirayama K. 1997. Application of a growth-promoting bacterium for stable mass culture of three marine microalgae. *Hydrobiologia*, 358: 223–230.
- Söderhäll K and Cerenius L. 1998. Role of the prophenol oxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10: 23-28.
- Thompson KD, Lilley JH, Chen SC, Adams A and Richards RH. 1999. The immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 9:195-210.
- Tovar D, Zambonino J, Cahu C, Gatesoupe FJ, Vázquez-Juárez R and Lésel R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204: 113-123.
- Vaseeharan B and Ramasamy P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23 a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letter in Applied Microbiology* 36: 83-87.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P and Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 64: 655-671.

- Wada S, Rha S, Kondoh T, Suda H, Hatai K and Ishii H. 1996. Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida*. Journal of Fish Pathology, 31:71-80.
- Wang Y, Tian Z, Yao J and Li W. 2008. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture, 277: 203-207.
- Willoughby LG, Roberts RJ and Chinabut S. 1995. *Aphanomyces invaderis* Sp.-Nov, the fungal pathogen of fresh-water tropical fish affected by epizootic ulcerative syndrome. Journal of Fish Diseases, 18: 273-275.
- Zhou X, Wang Y and Li W. 2008. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) base on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture, article in press.

ภาคผนวก

ตารางที่ 7. ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	การทดลองซ้ำที่	Inhibition zone (cm)	เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย (cm)	Inhibition index (Inhibition zone/เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย)	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
MSU001	1	1.00	0.90	1.11	1.25 $\pm$ 0.19
	2	1.25	0.85	1.47	
	3	1.00	0.85	1.18	
MSU002	1	0	0.70	0	0 $\pm$ 0.00
	2	0	0.90	0	
	3	0	0.60	0	
MSU003	1	1.00	0.75	1.33	1.15 $\pm$ 0.17
	2	0.85	0.85	1.00	
	3	1.00	0.90	1.11	
MSU004	1	0	0.70	0	0 $\pm$ 0.00
	2	0	0.95	0	
	3	0	0.60	0	
MSU005	1	0	1.25	0	0 $\pm$ 0.00
	2	0	0.95	0	
	3	0	0.95	0	
MSU006	1	0	0.50	0	0 $\pm$ 0.00
	2	0	0.65	0	
	3	0	0.65	0	
MSU007	1	0	0.75	0	0 $\pm$ 0.00
	2	0	0.70	0	
	3	0	0.65	0	
MSU008	1	0	0.35	0	0 $\pm$ 0.00
	2	0	0.25	0	
	3	0	0.40	0	
MSU009	1	0	0.85	0	0 $\pm$ 0.00
	2	0	0.80	0	
	3	0	0.85	0	
MSU010	1	0	0.65	0	0 $\pm$ 0.00
	2	0	0.60	0	
	3	0	0.75	0	

ตารางที่ 7. (ต่อ) ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	การทดลองซ้ำที่	Inhibition zone (cm)	เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย (cm)	Inhibition index (Inhibition zone/เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย)	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
MSU011	1	0	0.55	0	0 ± 0.00
	2	0	0.50	0	
	3	0	0.50	0	
MSU012	1	0	1.25	0	0 ± 0.00
	2	0	1.20	0	
	3	0	1.10	0	
MSU013	1	0	0.85	0	0 ± 0.00
	2	0	0.80	0	
	3	0	0.80	0	
MSU014	1	0	0.65	0	0 ± 0.00
	2	0	0.60	0	
	3	0	0.65	0	
MSU015	1	0	0.45	0	0 ± 0.00
	2	0	0.45	0	
	3	0	0.45	0	
MSU016	1	0	0.95	0	0 ± 0.00
	2	0	0.95	0	
	3	0	0.90	0	
MSU017	1	0	0.25	0	0 ± 0.00
	2	0	0.25	0	
	3	0	0.30	0	
MSU018	1	0	0.45	0	0 ± 0.00
	2	0	0.50	0	
	3	0	0.55	0	
MSU019	1	0	0.65	0	0 ± 0.00
	2	0	0.65	0	
	3	0	0.60	0	
MSU020	1	0	0.75	0	0 ± 0.00
	2	0	0.80	0	
	3	0	0.85	0	

ตารางที่ 7. (ต่อ) ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	การทดลองซ้ำที่	Inhibition zone (cm)	เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย (cm)	Inhibition index (Inhibition zone/เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย)	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
MSU021	1	0	0.60	0	0 ± 0.00
	2	0	0.60	0	
	3	0	0.70	0	
MSU022	1	0	0.80	0	0 ± 0.00
	2	0	0.85	0	
	3	0	0.75	0	
MSU023	1	0	0.35	0	0 ± 0.00
	2	0	0.35	0	
	3	0	0.40	0	
MSU024	1	0	0.95	0	0 ± 0.00
	2	0	0.95	0	
	3	0	1.00	0	
MSU025	1	0	0.55	0	0 ± 0.00
	2	0	0.55	0	
	3	0	0.60	0	
MSU026	1	0	0.75	0	0 ± 0.00
	2	0	0.75	0	
	3	0	0.85	0	
MSU027	1	1.00	0.80	1.25	1.58 ± 0.30
	2	1.10	0.60	1.83	
	3	1.00	0.60	1.67	
MSU028	1	0	1.20	0	0 ± 0.00
	2	0	1.20	0	
	3	0	1.10	0	
MSU029	1	0	1.10	0	0 ± 0.00
	2	0	1.10	0	
	3	0	1.20	0	
MSU030	1	0	0.60	0	0 ± 0.00
	2	0	0.70	0	
	3	0	0.70	0	

ตารางที่ 7. (ต่อ) ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	การทดลองซ้ำที่	Inhibition zone (cm)	เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย (cm)	Inhibition index (Inhibition zone/เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย)	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
MSU031	1	0	1.50	0	0 ± 0.00
	2	0	1.55	0	
	3	0	1.70	0	
MSU032	1	0	1.20	0	0 ± 0.00
	2	0	1.25	0	
	3	0	1.35	0	
MSU033	1	0.60	2.00	0.30	0.33 ± 0.05
	2	0.70	1.80	0.39	
	3	0.60	1.90	0.32	
MSU034	1	0	0.55	0	0 ± 0.00
	2	0	0.60	0	
	3	0	0.70	0	
MSU035	1	0	0.85	0	0 ± 0.00
	2	0	0.85	0	
	3	0	0.80	0	
MSU036	1	0	1.35	0	0 ± 0.00
	2	0	1.30	0	
	3	0	1.25	0	
MSU037	1	0.30	0.50	0.60	0.89 ± 0.33
	2	0.50	0.60	0.83	
	3	0.50	0.40	1.25	
MSU038	1	0	0.65	0	0 ± 0.00
	2	0	0.75	0	
	3	0	0.80	0	
MSU039	1	0	1.20	0	0 ± 0.00
	2	0	1.20	0	
	3	0	1.30	0	
MSU040	1	0.30	0.50	0.60	0.93 ± 0.31
	2	0.40	0.40	1.00	
	3	0.60	0.50	1.20	

ตารางที่ 7. (ต่อ) ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	การทดลองซ้ำที่	Inhibition zone (cm)	เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย (cm)	Inhibition index (Inhibition zone/เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย)	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
MSU041	1	0	0.55	0	0 ± 0.00
	2	0	0.50	0	
	3	0	0.50	0	
MSU042	1	0	0.80	0	0 ± 0.00
	2	0	0.80	0	
	3	0	0.80	0	
MSU043	1	0	1.15	0	0 ± 0.00
	2	0	1.10	0	
	3	0	1.10	0	
MSU044	1	0	0.60	0	0 ± 0.00
	2	0	0.60	0	
	3	0	0.70	0	
MSU045	1	0	0.45	0	0 ± 0.00
	2	0	0.45	0	
	3	0	0.55	0	
MSU046	1	1.20	0.70	1.71	1.74 ± 0.09
	2	1.10	0.60	1.83	
	3	1.00	0.60	1.67	
MSU047	1	0	1.20	0	0 ± 0.00
	2	0	1.20	0	
	3	0	1.10	0	
MSU048	1	0	1.10	0	0 ± 0.00
	2	0	1.00	0	
	3	0	1.00	0	
MSU049	1	0.10	0.3	0.33	0.44 ± 0.10
	2	0.10	0.2	0.50	
	3	0.20	0.4	0.50	
MSU050	1	0.60	0.6	1.00	0.81 ± 0.16
	2	0.50	0.7	0.71	
	3	0.50	0.7	0.71	

ตารางที่ 7. (ต่อ) ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของรา *Aphanomyces invadans* เมื่อเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร PG-1 เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	การทดลองซ้ำที่	Inhibition zone (cm)	เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย (cm)	Inhibition index (Inhibition zone/เส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรีย)	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
MSU051	1	0	0.70	0	0 ± 0.00
	2	0	0.70	0	
	3	0	0.70	0	
MSU052	1	0.70	0.60	1.17	1.11 ± 0.10
	2	0.70	0.70	1.00	
	3	0.70	0.60	1.17	
MSU053	1	0	0.55	0	0 ± 0.00
	2	0	0.50	0	
	3	0	0.60	0	
MSU054	1	0	1.20	0	0 ± 0.00
	2	0	1.20	0	
	3	0	1.10	0	
MSU055	1	0	0.85	0	0 ± 0.00
	2	0	0.85	0	
	3	0	0.80	0	
MSU056	1	0	0.45	0	0 ± 0.00
	2	0	0.50	0	
	3	0	0.50	0	
MSU057	1	0	0.85	0	0 ± 0.00
	2	0	0.85	0	
	3	0	0.80	0	
MSU058	1	0	0.60	0	0 ± 0.00
	2	0	0.60	0	
	3	0	0.70	0	
MSU059	1	0	0.85	0	0 ± 0.00
	2	0	0.85	0	
	3	0	0.80	0	
MSU060	1	0	1.00	0	0 ± 0.00
	2	0	1.00	0	
	3	0	0.90	0	

ANOVA

ZONE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.295	59	.259	176.085	.000
Within Groups	.177	120	.001		
Total	15.472	179			

ZONE

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
2	3	.0000					
8	3	.0000					
9	3	.0000					
10	3	.0000					
11	3	.0000					
12	3	.0000					
13	3	.0000					
14	3	.0000					
15	3	.0000					
16	3	.0000					
17	3	.0000					
18	3	.0000					
19	3	.0000					
20	3	.0000					
21	3	.0000					
22	3	.0000					
23	3	.0000					
24	3	.0000					
25	3	.0000					
26	3	.0000					
28	3	.0000					
29	3	.0000					
30	3	.0000					
31	3	.0000					
32	3	.0000					
34	3	.0000					
35	3	.0000					
36	3	.0000					
38	3	.0000					
39	3	.0000					
41	3	.0000					
42	3	.0000					
43	3	.0000					
44	3	.0000					
45	3	.0000					
47	3	.0000					
48	3	.0000					
51	3	.0000					

49	3	.1333					
40	3		.4333				
37	3		.4333				
50	3		.5333	.5333			
33	3			.6333	.6333		
52	3				.7000		
3	3					.9500	
27	3					1.0333	1.0333
1	3					1.0833	1.0833
46	3						1.1000
Sig.		.119	.721	.721	.999	.119	.999

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 8. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2, 3, 4, 5 และ 6 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

แบคทีเรีย	อาหาร	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6
MSU001	NB	0.076	0.081	0.094	0.495	1.140/0.132*
		0.086	0.068	0.096	0.737	0.899
		0.098	0.080	0.097	0.200	0.832
MSU003	NB	0.063	0.070	0.077	0.376	0.380
		0.070	0.065	0.080	0.322	0.455
		0.076	0.076	0.102	0.328	0.387
MSU027	NB	0.011	0.034	0.41	1.454/0.124*	1.564/0.146*
		0.013	0.054	0.87	1.234/0.111*	1.420/0.138*
		0.009	0.032	0.54	1.126/0.098*	1.322/0.109*
MSU033	MRS broth	0.019	0.065	0.305	0.201	0.471
		0.015	0.072	0.227	0.345	0.350
		0.014	0.067	0.198	0.327	0.574
MSU037	NB	0.009	0.018	0.046	1.784/0.208*	1.690/0.250*
		0.011	0.023	0.050	1.560/0.175*	1.628/0.196*
		0.007	0.026	0.049	1.704/0.203*	1.654/0.223*
MSU040	NB	0.006	0.027	0.025	1.534/0.137*	1.584/0.168*
		0.012	0.033	0.022	1.490/0.132*	1.562/0.162*
		0.008	0.021	0.019	1.600/0.156*	1.628/0.196*
MSU046	NB	0.005	0.040	0.071	0.977	0.613
		0.018	0.044	0.080	0.718	0.964
		0.009	0.038	0.077	0.887	0.357
MSU049	MRS broth	0.025	0.107	0.023	0.876	0.995
		0.011	0.013	0.029	0.785	0.978
		0.013	0.040	0.009	0.897	0.998
MSU050	MRS broth	0.165	0.124	0.302	0.191	1.390/0.149*
		0.212	0.248	0.183	0.128	1.396/0.151*
		0.100	0.189	0.251	0.221	1.445/0.213*
MSU052	MRS broth	0.269	0.204	0.157	0.271	1.454/0.148*
		0.260	0.183	0.197	0.208	0.208
		0.184	0.282	0.125	0.137	0.137

* ค่าวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรที่อ่านจากการทำเจือจาง 10 เท่า

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PH2	Between Groups	.168	9	.019	33.152	.000
	Within Groups	.011	20	.001		
	Total	.179	29			
PH3	Between Groups	.126	9	.014	15.240	.000
	Within Groups	.018	20	.001		
	Total	.145	29			
PH4	Between Groups	.844	9	.094	14.544	.000
	Within Groups	.129	20	.006		
	Total	.973	29			
PH5	Between Groups	2.115	9	.235	21.844	.000
	Within Groups	.215	20	.011		
	Total	2.330	29			
PH6	Between Groups	2.216	9	.246	8.471	.000
	Within Groups	.581	20	.029		
	Total	2.797	29			

PH2

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
40.00	3	.00867			
37.00	3	.00900			
46.00	3	.01067			
27.00	3	.01100			
33.00	3	.01600			
49.00	3	.01633			
3.00	3	.06967	.06967		
1.00	3		.08667		
50.00	3			.15900	
52.00	3				.23767
Sig.		.108	.996	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PH3

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
37.00	3	.02233	
40.00	3	.02700	
27.00	3	.04000	
46.00	3	.04067	
49.00	3	.05333	
33.00	3	.06800	
3.00	3	.07033	
1.00	3	.07633	
50.00	3		.18700
52.00	3		.22300
Sig.		.500	.895

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PH4

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
49.00	3	.02033	
40.00	3	.02200	
37.00	3	.04833	
46.00	3	.07600	
3.00	3	.08633	
1.00	3	.09567	
52.00	3	.15967	
33.00	3	.24333	
50.00	3	.24533	
27.00	3		.60667
Sig.		.062	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PH5

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
27.00	3	.11100		
40.00	3	.14167		
50.00	3	.18000	.18000	
37.00	3	.19533	.19533	
52.00	3	.20533	.20533	
33.00	3	.29100	.29100	
3.00	3	.34200	.34200	
1.00	3		.47733	
49.00	3			.85267
46.00	3			.86067
Sig.		.227	.053	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PH6

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
27.00	3	.13100		
52.00	3	.13400		
50.00	3	.17100	.17100	
40.00	3	.17533	.17533	
37.00	3	.22300	.22300	
3.00	3	.40733	.40733	
33.00	3	.46500	.46500	
1.00	3	.62100	.62100	.62100
46.00	3		.64467	.64467
49.00	3			.99033
Sig.		.052	.066	.257

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 9. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2, 3, 4, 5 และ 6 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

แบคทีเรีย	อาหาร	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6
MSU001	NB	0.166	0.074	0.113	0.675	0.951
		0.190	0.098	0.162	0.327	0.666
		0.119	0.139	0.106	1.156/0.135*	1070/0.137*
MSU003	NB	0.090	0.059	0.092	0.725	0.973
		0.055	0.089	0.095	0.439	0.607
		0.087	0.070	0.150	0.853	0.729
MSU027	NB	0.043	0.113	0.654	1.090/0.134*	1.026/0.118*
		0.049	0.125	0.826	0.893	0.804
		0.107	0.109	0.646	1.098/0.140*	0.994
MSU033	MRS broth	0.365	0.144	0.104	0.195	0.704
		0.417	0.168	0.127	0.059	0.321
		0.384	0.111	0.162	0.170	0.505
MSU037	NB	0.092	0.177	0.151	1.488/0.195*	1.462/0.210*
		0.094	0.168	0.173	1.434/0.205*	1.300/0.147*
		0.082	0.269	0.192	1.348/0.203*	1.342/0.169*
MSU040	NB	0.081	0.141	0.177	1.254/0.168*	1.472/0.213*
		0.144	0.070	0.120	1.434/0.218*	1.584/0.263*
		0.076	0.110	0.155	1.264/0.185*	1.388/0.189*
MSU046	NB	0.050	0.073	0.186	1.108/0.119*	0.943
		0.010	0.047	0.154	0.687	0.716
		0.008	0.042	0.191	1.042/0.128*	1.090/0.125*
MSU049	MRS brot	0.024	0.104	0.026	0.054	1.696/0.282*
		0.010	0.013	0.037	1.450/0.190*	1.690/0.270*
		0.021	0.030	0.002	1.410/0.177*	1.660/0.276*
MSU050	MRS broth	0.265	0.124	0.502	0.191	2.220/0.702*
		0.312	0.348	0.183	0.103	2.230/0.710*
		0.103	0.189	0.251	0.221	2.245/0.628*
MSU052	MRS broth	0.269	0.204	0.157	0.271	2.225/0.644*
		0.360	0.183	0.197	0.208	2.285/0.685*
		0.284	0.382	0.325	0.037	2.010/0.475*

* ค่าวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรที่อ่านจากการทำเจือจาง 10 เท่า

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PH2	Between Groups	.415	9	.046	22.944	.000
	Within Groups	.040	20	.002		
	Total	.456	29			
PH3	Between Groups	.140	9	.016	4.530	.002
	Within Groups	.069	20	.003		
	Total	.209	29			
PH4	Between Groups	.970	9	.108	21.097	.000
	Within Groups	.102	20	.005		
	Total	1.072	29			
PH5	Between Groups	.759	9	.084	1.889	.113
	Within Groups	.892	20	.045		
	Total	1.651	29			
PH6	Between Groups	1.151	9	.128	1.968	.099
	Within Groups	1.299	20	.065		
	Total	2.450	29			

PH2

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
49.00	3	.01833				
46.00	3	.02267				
27.00	3	.06633	.06633			
3.00	3	.07733	.07733			
37.00	3	.08933	.08933			
40.00	3	.10033	.10033	.10033		
1.00	3		.15833	.15833		
50.00	3			.22667	.22667	
52.00	3				.30433	.30433
33.00	3					.38867
Sig.		.464	.319	.060	.535	.428

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PH3

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
49.00	3	.04900		
46.00	3	.05400	.05400	
3.00	3	.07267	.07267	
1.00	3	.10367	.10367	.10367
40.00	3	.10700	.10700	.10700
27.00	3	.11567	.11567	.11567
33.00	3	.14100	.14100	.14100
37.00	3	.20467	.20467	.20467
50.00	3		.22033	.22033
52.00	3			.25633
Sig.		.089	.058	.101

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PH4

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
49.00	3	.02167		
3.00	3	.11233	.11233	
1.00	3	.12700	.12700	
33.00	3	.13100	.13100	
40.00	3	.15067	.15067	
37.00	3	.17200	.17200	
46.00	3	.17700	.17700	
52.00	3	.22633	.22633	
50.00	3		.31200	
27.00	3			.70867
Sig.		.054	.064	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PH5

Tukey HSD

		Subset for alpha = .05
MSU	N	1
49.00	3	.14033
33.00	3	.14133
50.00	3	.17167
52.00	3	.17200
40.00	3	.19033
37.00	3	.20100
46.00	3	.31133
1.00	3	.37900
27.00	3	.38900
3.00	3	.67233
Sig.		.122

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PH6

Tukey HSD

		Subset for alpha = .05
MSU	N	1
37.00	3	.17533
40.00	3	.22167
49.00	3	.27600
33.00	3	.51000
1.00	3	.58467
46.00	3	.59467
52.00	3	.60133
27.00	3	.63867
50.00	3	.68000
3.00	3	.76967
Sig.		.183

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 10. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.15 และ 0.30 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

แบคทีเรีย	อาหาร	0% bile salt	0.15% bile salt	0.30% bile salt
MSU001	NB	0.800	0.515	1.260/0.151*
		0.747	0.566	0.984
		0.500	0.654	0.910
MSU003	NB	0.945	0.629	1.188/0.186*
		1.182/0.127*	0.605	0.960
		0.802	0.988	0.852
MSU027	NB	1.538/0.150*	1.754/0.255*	1.308/0.180*
		1.522/0.234*	1.670/0.276*	1.384/0.223*
		1.630/0.255*	1.587/0.202*	1.350/0.140*
MSU033	MRS broth	1.824/0.361*	0.338	0.300
		0.982	0.630	0.204
		1.588/0.294*	0.405	0.190
MSU037	NB	1.700/0.507*	1.740/0.348*	1.506/0.237*
		1.716/0.345*	1.960/0.466*	1.556/0.240*
		1.711/0.452*	1.734/0.340*	1.522/0.233*
MSU040	NB	1.702/0.503*	1.740/0.346*	1.502/0.237*
		1.716/0.335*	1.960/0.455*	1.552/0.241*
		1.700/0.451*	1.734/0.350*	1.511/0.223*
MSU046	NB	0.864	0.334	0.826
		0.353	0.555	0.998
		0.868	0.298	0.789
MSU049	MRS broth	1.346/0.201*	0.478	0.212
		1.774/0.375*	0.652	0.206
		1.700/0.339*	0.546	0.162
MSU050	MRS broth	2.440/0.898*	2.375/0.849*	2.420/0.801*
		2.355/0.782*	2.400/0.870*	2.385/0.999*
		2.385/0.790*	2.370/0.845*	2.370/0.845*
MSU052	MRS broth	2.385/0.822*	2.480/0.967*	2.430/0.877*
		2.440/0.898*	2.430/0.907*	2.440/0.860*
		2.460/0.920*	2.410/0.823*	2.470/0.890*

* ค่าวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรที่อ่านจากการทำเจือจาง 10 เท่า

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BILE0.15	Between Groups	1.298	9	.144	12.317	.000
	Within Groups	.234	20	.012		
	Total	1.532	29			
BILE0.3	Between Groups	2.679	9	.298	7.122	.000
	Within Groups	.836	20	.042		
	Total	3.515	29			
BILE0	Between Groups	1.282	9	.142	2.963	.021
	Within Groups	.961	20	.048		
	Total	2.243	29			

BILE0

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
27.00	3	.21300	
49.00	3	.30500	.30500
40.00	3	.42967	.42967
37.00	3	.43467	.43467
33.00	3	.54567	.54567
3.00	3	.62467	.62467
1.00	3	.68233	.68233
46.00	3	.69500	.69500
50.00	3	.82333	.82333
52.00	3		.88000
Sig.		.065	.096

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

BILE0.15

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
27.00	3	.24433				
40.00	3	.38367	.38367			
37.00	3	.38467	.38467			
46.00	3	.39567	.39567			
33.00	3	.45767	.45767	.45767		
49.00	3		.55867	.55867	.55867	
1.00	3		.57833	.57833	.57833	
3.00	3			.74067	.74067	.74067
50.00	3				.85467	.85467
52.00	3					.89900
Sig.		.367	.485	.097	.073	.733

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

BILE0.3

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
27.00	3	.18100	
49.00	3	.19333	
33.00	3	.23133	
40.00	3	.23367	
37.00	3	.23667	
3.00	3	.66600	.66600
1.00	3	.68167	.68167
46.00	3		.87100
52.00	3		.87567
50.00	3		.88167
Sig.		.142	.944

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 11. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.15 และ 0.30 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

แบคทีเรีย	อาหาร	0% bile salt	0.15% bile salt	0.30% bile salt
MSU001	NB	0.888	0.515	1.260/0.151*
		0.885	0.566	0.984
		0.884	0.654	0.910
MSU003	NB	0.823	0.629	1.188/0.186*
		0.821	0.605	0.960
		0.829	0.988	0.852
MSU027	NB	1.502/0.232*	1.754/0.255*	1.308/0.180*
		1.500/0.230*	1.670/0.276*	1.384/0.223*
		1.500/0.228*	1.587/0.202*	1.350/0.140*
MSU033	MRS broth	1.466/0.190*	0.338	0.300
		1.468/0.192*	0.630	0.204
		1.467/0.190*	0.405	0.190
MSU037	NB	1.835/0.350*	1.740/0.348*	1.506/0.237*
		1.838/0.352*	1.960/0.466*	1.556/0.240*
		1.839/0.353*	1.734/0.340*	1.522/0.233*
MSU040	NB	1.790/0.298*	1.740/0.346*	1.502/0.237*
		1.792/0.300*	1.960/0.455*	1.552/0.241*
		1.788/0.297*	1.734/0.350*	1.511/0.223*
MSU046	NB	0.755	0.334	0.826
		0.756	0.555	0.998
		0.760	0.298	0.789
MSU049	MRS broth	1.750/0.293*	0.478	0.212
		1.748/0.290*	0.652	0.206
		1.752/0.295*	0.546	0.162
MSU050	MRS broth	2.190/0.471*	2.375/0.849*	2.420/0.801*
		2.191/0.473*	2.400/0.870*	2.385/0.999*
		2.187/0.470*	2.370/0.845*	2.370/0.845*
MSU052	MRS broth	2.268/0.685*	2.480/0.967*	2.430/0.877*
		2.271/0.688*	2.430/0.907*	2.440/0.860*
		2.270/0.687*	2.410/0.823*	2.470/0.890*

* ค่าวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรที่อ่านจากการทำเจือจาง 10 เท่า

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BILE0.15	Between Groups	.817	9	.091	3.252	.013
	Within Groups	.558	20	.028		
	Total	1.375	29			
BILE0.3	Between Groups	1.826	9	.203	12.766	.000
	Within Groups	.318	20	.016		
	Total	2.144	29			
BILE0	Between Groups	1.471	9	.163	8.753	.000
	Within Groups	.373	20	.019		
	Total	1.845	29			

BILE0

Tukey HSD

MSU	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
33.00	3	.19067			
40.00	3	.29833	.29833		
37.00	3	.35167	.35167		
50.00	3	.47133	.47133	.47133	
49.00	3		.60367	.60367	.60367
27.00	3		.62400	.62400	.62400
52.00	3		.68667	.68667	.68667
46.00	3			.75700	.75700
3.00	3			.82100	.82100
1.00	3				.88567
Sig.		.317	.057	.111	.312

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

BILE0.15

Tukey HSD

		Subset for alpha = .05
MSU	N	1
27.00	3	.16500
37.00	3	.18767
40.00	3	.21833
49.00	3	.29000
33.00	3	.33633
3.00	3	.42867
46.00	3	.43700
52.00	3	.56367
50.00	3	.59033
1.00	3	.64400
Sig.		.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

BILE0.3

Tukey HSD

		Subset for alpha = .05				
MSU	N	1	2	3	4	5
33.00	3	.16333				
49.00	3	.23900	.23900			
46.00	3	.37867	.37867	.37867		
1.00	3	.43800	.43800	.43800		
40.00	3		.54367	.54367	.54367	
52.00	3		.57200	.57200	.57200	
50.00	3		.59367	.59367	.59367	
3.00	3			.71333	.71333	.71333
37.00	3				.88833	.88833
27.00	3					.97067
Sig.		.250	.061	.089	.073	.325

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 12. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เวลา (ชั่วโมง)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> MSU049			<i>Enterobacter cloacae</i> MSU050		
0	0.085	0.086	0.079	0.089	0.087	0.089
1	0.184	0.175	0.183	0.164	0.163	0.165
2	0.298	0.294	0.302	0.275	0.252	0.287
3	0.355	0.367	0.359	0.354	0.337	0.336
4	0.509	0.521	0.534	0.517	0.502	0.498
5	0.642	0.415	0.59	0.536	0.543	0.499
6	0.927	0.804	0.871	0.821	0.718	0.731
7	0.826	1.064	0.95	0.956	0.984	1.042
8	1.034	1.064	1.023	1.15	1.246	1.108
9	1.069	1.116	1.076	1.258	1.46	1.345
10	1.005	1.44	1.118	1.35	1.353	1.355
11	1.24	1.232	1.498	1.712	1.682	1.699
12	0.883	1.198	1.163	1.658	1.72	1.67
13	1.174	0.909	1.169	1.81	1.85	1.79
14	0.634	0.741	0.999	1.856	1.818	1.748
15	1.39	1.162	1.166	1.864	1.866	1.902
16	1.002	1.168	1.354	2	1.788	1.892
17	1.276	0.747	1.222	1.932	2	1.994
18	0.995	0.619	0.818	2	2.015	1.89
19	1.312	0.727	1.152	1.872	1.867	1.944
20	0.951	0.822	0.954	1.886	1.889	1.987
21	1.126	1.132	0.874	1.972	1.896	1.936
22	0.825	0.768	0.863	1.952	1.848	1.85
23	1.018	1.006	1.008	1.954	1.95	1.899
24	1.014	1.02	1.008	1.96	1.955	1.948

* ค่าวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรที่อ่านจากการทำเจือจาง 10 เท่า

ตารางที่ 13. บันทึกการตายของปลาช่อน เมื่อชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา *Aphanomyces invadans* ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

เวลา (วัน)	10 ⁵ สปอร์ต่อมิลลิลิตร			10 ⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร			10 ⁷ สปอร์ต่อมิลลิลิตร		
0									
1									
2									
3							1		
4				1					
5									1
6					1	1		2	
7					1				1
8	1								
9		1					1		
10	1								
11									
12									
13									
14			1	1					
15									
รวมปลา ตาย	2	1	1	2	2	1	2	2	2
รวมปลา รอดตาย	1	2	2	1	1	2	1	1	1

ตารางที่ 14. ร้อยละอัตราการตายสะสมของปลาช่อน เมื่อชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา *Aphanomyces invadans* ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

เวลา (วัน)	10 ⁵ สปอร์ต่อมิลลิลิตร			10 ⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร			10 ⁷ สปอร์ต่อมิลลิลิตร		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0
4	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0
5	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	33.33
6	0	0	0	33.33	33.33	33.33	33.33	66.66	33.33
7	0	0	0	33.33	66.66	33.33	33.33	66.66	66.66
8	33.33	0	0	33.33	66.66	33.33	33.33	66.66	66.66
9	33.33	33.33	0	33.33	66.66	33.33	66.66	66.66	66.66
10	66.66	33.33	0	33.33	66.66	33.33	66.66	66.66	66.66
11	66.66	33.33	0	33.33	66.66	33.33	66.66	66.66	66.66
12	66.66	33.33	0	33.33	66.66	33.33	66.66	66.66	66.66
13	66.66	33.33	0	33.33	66.66	33.33	66.66	66.66	66.66
14	66.66	33.33	33.33	66.66	66.66	33.33	66.66	66.66	66.66
15	66.66	33.33	33.33	66.66	66.66	33.33	66.66	66.66	66.66

ANOVA

DAY

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	741.037	2	370.519	1.500	.296
Within Groups	1482.074	6	247.012		
Total	2223.111	8			

ตารางที่ 15. บันทึกการตายของปลาช่อน เมื่อใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* MSU049 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน ก่อนหรือหลังการชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา *Aphanomyces invadans* ด้วยวิธีการต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ (n=3)

เวลา (วัน)	กลุ่มที่ 1				กลุ่มที่ 2				กลุ่มที่ 3				กลุ่มที่ 4				กลุ่มที่ 5				กลุ่มที่ 6				กลุ่มที่ 7			
0																												
1																												
2																												
3					1	1										1												
4																												
5																												
6					1		1																					
7						1		1											1									
8							1																					
9																												
10														1												1		
11																												
12																												
13																												
14																												
15																												
รวม ปลา ตาย	0	0	0	0	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
รวม ปลา รอด ตาย	3	3	3	3	1	1	1	2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3

ตารางที่ 16. ร้อยละอัตราการตายสะสมของปลาช่อน เมื่อใช้โฟรไบโอติกแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* MSU049 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน ก่อนหรือหลังการชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา *Aphanomyces invadans* ด้วยวิธีการต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ (n=3)

เวลา (วัน)	กลุ่มที่ 1				กลุ่มที่ 2				กลุ่มที่ 3				กลุ่มที่ 4				กลุ่มที่ 5				กลุ่มที่ 6				กลุ่มที่ 7			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
3	0	0	0	0	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4	0	0	0	0	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
5	0	0	0	0	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
6	0	0	0	0	66.66	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7	0	0	0	0	66.66	66.66	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0		
8	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0		
9	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0		
10	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	33.33	0	0	
11	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	33.33	0	0	
12	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	33.33	0	0	
13	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	33.33	0	0	
14	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	33.33	0	0	
15	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	33.33	0	0	

ANOVA

PERCEN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9921.365	6	1653.561	8.335	.000
Within Groups	4166.333	21	198.397		
Total	14087.698	27			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PERCEN

Tukey HSD

(I) TEST	(J) TEST	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-58.3350(*)	9.95984	.000	-90.7123	-25.9577
	3.00	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	4.10	-8.3325	9.95984	.978	-40.7098	24.0448
	4.20	-8.3325	9.95984	.978	-40.7098	24.0448
	4.30	-8.3325	9.95984	.978	-40.7098	24.0448
	4.40	-8.3325	9.95984	.978	-40.7098	24.0448
2.00	1.00	58.3350(*)	9.95984	.000	25.9577	90.7123
	3.00	58.3350(*)	9.95984	.000	25.9577	90.7123
	4.10	50.0025(*)	9.95984	.001	17.6252	82.3798
	4.20	50.0025(*)	9.95984	.001	17.6252	82.3798
	4.30	50.0025(*)	9.95984	.001	17.6252	82.3798
	4.40	50.0025(*)	9.95984	.001	17.6252	82.3798
3.00	1.00	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	2.00	-58.3350(*)	9.95984	.000	-90.7123	-25.9577
	4.10	-8.3325	9.95984	.978	-40.7098	24.0448
	4.20	-8.3325	9.95984	.978	-40.7098	24.0448
	4.30	-8.3325	9.95984	.978	-40.7098	24.0448
	4.40	-8.3325	9.95984	.978	-40.7098	24.0448
4.00	1.00	8.3325	9.95984	.978	-24.0448	40.7098
	2.00	-50.0025(*)	9.95984	.001	-82.3798	-17.6252
	3.00	8.3325	9.95984	.978	-24.0448	40.7098
	4.20	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	4.30	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	4.40	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
5.00	1.00	8.3325	9.95984	.978	-24.0448	40.7098
	2.00	-50.0025(*)	9.95984	.001	-82.3798	-17.6252
	3.00	8.3325	9.95984	.978	-24.0448	40.7098
	4.10	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	4.30	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	4.40	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
6.00	1.00	8.3325	9.95984	.978	-24.0448	40.7098
	2.00	-50.0025(*)	9.95984	.001	-82.3798	-17.6252
	3.00	8.3325	9.95984	.978	-24.0448	40.7098
	4.10	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	4.20	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	4.40	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
7.00	1.00	8.3325	9.95984	.978	-24.0448	40.7098
	2.00	-50.0025(*)	9.95984	.001	-82.3798	-17.6252
	3.00	8.3325	9.95984	.978	-24.0448	40.7098
	4.10	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	4.20	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773
	4.30	.0000	9.95984	1.000	-32.3773	32.3773

* The mean difference is significant at the .05 level.

PERCEN

Tukey HSD

TEST	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1.00	4	.0000	
3.00	4	.0000	
4.00	4	8.3325	
5.00	4	8.3325	
6.00	4	8.3325	
7.00	4	8.3325	
2.00	4		58.3350
Sig.		.978	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ 17. บันทึกการตายของปลาซ็อน เมื่อใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* MSU050 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาซ็อน ก่อนหรือหลังการชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา *Aphanomyces invadans* ด้วยวิธีการต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ (n=3)

เวลา (วัน)	กลุ่มที่ 1				กลุ่มที่ 2				กลุ่มที่ 3				กลุ่มที่ 4				กลุ่มที่ 5				กลุ่มที่ 6				กลุ่มที่ 7			
0																												
1																												
2																												
3					1	1											1											
4																												
5																												
6					1		1																					
7						1		1												1								
8							1																					
9																												
10													1												1			
11																												
12																												
13																												
14																												
15																												
รวม ปลา ตาย	0	0	0	0	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
รวม ปลา รอด ตาย	3	3	3	3	1	1	1	2	3	3	3	3	3	3	2	1	3	2	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3

ตารางที่ 18. ร้อยละอัตราการตายสะสมของปลาช่อน เมื่อใช้โฟรโมโอดิกแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* MSU049 ในการควบคุมโรค EUS ในปลาช่อน ก่อนหรือหลังการชักนำให้ติดโรค EUS ด้วยการเติม zoospore ของรา *Aphanomyces invadans* ด้วยวิธีการต่างๆ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ (n=3)

เวลา (วัน)	กลุ่มที่ 1				กลุ่มที่ 2				กลุ่มที่ 3				กลุ่มที่ 4				กลุ่มที่ 5				กลุ่มที่ 6				กลุ่มที่ 7			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
3	0	0	0	0	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4	0	0	0	0	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
5	0	0	0	0	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
6	0	0	0	0	66.66	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7	0	0	0	0	66.66	66.66	33.33	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0		
8	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0		
9	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	0	0		
10	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	33.33	0	0
11	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	33.33	0	0
12	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	33.33	0	0
13	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	33.33	0	0
14	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	33.33	0	0
15	0	0	0	0	66.66	66.66	66.66	33.33	0	0	0	0	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	33.33	0	0	0	0	33.33	0	0

ANOVA

PERCEN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10394.746	6	1732.458	9.357	.000
Within Groups	3888.111	21	185.148		
Total	14282.857	27			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PERCEN

Tukey HSD

(I) TEST	(J) TEST	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-58.3275(*)	9.62154	.000	-89.6050	-27.0500
	3.00	.0000	9.62154	1.000	-31.2775	31.2775
	4.10	-8.3325	9.62154	.974	-39.6100	22.9450
	4.20	-16.6650	9.62154	.604	-47.9425	14.6125
	4.30	-16.6650	9.62154	.604	-47.9425	14.6125
	4.40	.0000	9.62154	1.000	-31.2775	31.2775
2.00	1.00	58.3275(*)	9.62154	.000	27.0500	89.6050
	3.00	58.3275(*)	9.62154	.000	27.0500	89.6050
	4.10	49.9950(*)	9.62154	.001	18.7175	81.2725
	4.20	41.6625(*)	9.62154	.005	10.3850	72.9400
	4.30	41.6625(*)	9.62154	.005	10.3850	72.9400
	4.40	58.3275(*)	9.62154	.000	27.0500	89.6050
3.00	1.00	.0000	9.62154	1.000	-31.2775	31.2775
	2.00	-58.3275(*)	9.62154	.000	-89.6050	-27.0500
	4.10	-8.3325	9.62154	.974	-39.6100	22.9450
	4.20	-16.6650	9.62154	.604	-47.9425	14.6125
	4.30	-16.6650	9.62154	.604	-47.9425	14.6125
	4.40	.0000	9.62154	1.000	-31.2775	31.2775
4.00	1.00	8.3325	9.62154	.974	-22.9450	39.6100
	2.00	-49.9950(*)	9.62154	.001	-81.2725	-18.7175
	3.00	8.3325	9.62154	.974	-22.9450	39.6100
	4.20	-8.3325	9.62154	.974	-39.6100	22.9450
	4.30	-8.3325	9.62154	.974	-39.6100	22.9450
	4.40	8.3325	9.62154	.974	-22.9450	39.6100
5.00	1.00	16.6650	9.62154	.604	-14.6125	47.9425
	2.00	-41.6625(*)	9.62154	.005	-72.9400	-10.3850
	3.00	16.6650	9.62154	.604	-14.6125	47.9425
	4.10	8.3325	9.62154	.974	-22.9450	39.6100
	4.30	.0000	9.62154	1.000	-31.2775	31.2775
	4.40	16.6650	9.62154	.604	-14.6125	47.9425
6.00	1.00	16.6650	9.62154	.604	-14.6125	47.9425
	2.00	-41.6625(*)	9.62154	.005	-72.9400	-10.3850
	3.00	16.6650	9.62154	.604	-14.6125	47.9425
	4.10	8.3325	9.62154	.974	-22.9450	39.6100
	4.20	.0000	9.62154	1.000	-31.2775	31.2775
	4.40	16.6650	9.62154	.604	-14.6125	47.9425
7.00	1.00	.0000	9.62154	1.000	-31.2775	31.2775
	2.00	-58.3275(*)	9.62154	.000	-89.6050	-27.0500
	3.00	.0000	9.62154	1.000	-31.2775	31.2775
	4.10	-8.3325	9.62154	.974	-39.6100	22.9450
	4.20	-16.6650	9.62154	.604	-47.9425	14.6125
	4.30	-16.6650	9.62154	.604	-47.9425	14.6125

- The mean difference is significant at the .05 level.

PERCEN

Tukey HSD

TEST	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1.00	4	.0000	
3.00	4	.0000	
7.00	4	.0000	
4.00	4	8.3325	
5.00	4	16.6650	
6.00	4	16.6650	
2.00	4		58.3275
Sig.		.604	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ประวัติผู้ดำเนินการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษา วท. บ. (พฤกษศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ph. D. (Comparative physiology) Uppsala University, Sweden