ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ เช่น จากปลานิลที่มีลักษณะปกติ น้ำและโคลนบริเวณกระชังที่เลี้ยงปลานิล และจากอาหารหลายชนิด ได้แก่ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว ข้าวและอาหารหมักดองทางภาคอีสาน ได้เชื้อแบคทีเรียรวมทั้งหมด 119 สายพันธุ์ ซึ่งเมื่อนำมาคัดเลือกหาเชื้อที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาโดยใช้เทคนิค agar-overlaying และ well-diffusion พบแบคทีเรีย 25 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ที่ดีคือสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas caviae*, *A. hydrophil*a และ *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล จากนั้นได้เลือกเชื้อที่มีความสามารถสูงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปลาในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ไอโซเลท CR1T5 นำมาใช้ในการทำ "challenged test" ซึ่งพบว่าเชื้อ CR1T5 สามารถป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้ดีและยังช่วยส่งเสริมการเจริญของปลานิลอีกด้วย จากการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การย้อมติดสีแกรม และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ พบว่าไอโซเลท CR1T5 มีคุณลักษณะตรงกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum*

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในระดับฟลาสก์เขย่า ได้แก่ค่าอุณหภูมิ ความเร็วรอบ และค่า pH ที่เหมาะสมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อ *L. plantarum* CR1T5 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°ซ. pH 6.5 และความเร็วรอบการเขย่าบน rotary incubator shaker ที่ 50 รอบต่อนาที เมื่อทำการแทนที่น้ำตาลกลูโคสใน MRS medium ด้วยกากน้ำตาล พบว่าเชื้อ *L. plantarum* CR1T5 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเติมกากน้ำตาล 10 % และเมื่อทำการแทนที่ peptone และ meat extract ด้วยนมผงพร่องมันเนย พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดเมื่อมีนมผงเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย 8% เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ไปปรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วย modified MRS medium ที่เติมกากน้ำตาลและนมผงในถังหมัก พบว่าเชื้อ *L. plantarum* CR1T5 เจริญและให้ปริมาณเซลล์สูงสุดในเวลาสองวันเมื่อจัดให้ความเร็วรอบของการกวน (agitation speed) เป็น 100 รอบต่อนาที

จากการศึกษาวิธีการเก็บถนอมเชื้อ *L. plantarum* CR1T5 ในรูปเซลล์ผงแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลเซชัน (lyophilization) และการทำให้แห้งบนอาหารปลาเม็ดด้วยลมร้อน (warm air-drying) ในการทำไลโอฟิไลเซชันได้ศึกษาสาร protective substances ซึ่งใช้ปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม รวม 3 ชนิด ได้แก่ 18% skim milk, 4% trehalose และ 4% sucrose พบว่าเชื้อ *L. plantarum* CR1T5 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจากกระบวนการไลโอฟิไลเซชันเมื่อแขวนลอยเซลล์ใน trehalose, skim milk และ sucrose คิดเป็น 79.1, 72.4 และ 71.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อทำการเก็บเซลล์แห้งที่ได้จากการไลโอฟิไลเซชันเป็นเวลา 10 สัปดาห์ที่ 4°ซ. พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อเมื่อใช้ trehalose, skim milk และ sucrose เป็น 75.7, 65.0 และ 67.0 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเก็บเซลล์แห้งนั้นที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเมื่อใช้ trehalose, skim milk และ sucrose เชื้อมีการรอดชีวิตคิดเป็น 47.3, 56.1 และ 55.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนกระบวนการทำให้เซลล์แห้งบนอาหารปลาเม็ดด้วยลมร้อน (warm air-drying) เมื่อใช้สาร protective substances ต่างๆ กัน ๔ ชนิด พบว่าเชื้อมีการรอดชีวิตจากกระบวนการทำแห้งนี้ 91.8, 92.9, 91.6 และ 92.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อแขวนลอยเซลล์ใน 10% skim milk, 12% sucrose, normal saline solution และ MRS broth ก่อนนำไปดูดซับบนอาหารปลาเม็ด และเมื่อเก็บรักษาเชื้อผงแห้งที่เคลือบอยู่ในอาหารปลาเม็ดนาน ๖๐ วัน พบว่าเมื่อเก็บอาหารปลาเม็ดนั้นที่ 4°ซ. เชื้อมีการรอดชีวิตเมื่อใช้ skim milk, sucrose, NaCl solution และ MRS broth คิดเป็น 83.7, 77.2, 83.0 และ 55.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเก็บรักษาอาหารปลาเม็ดที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเมื่อใช้ skim milk, sucrose, NaCl solution และ MRS broth ในการแขวนลอยเซลล์ เชื้อมีการรอดชีวิตคิดเป็น 31.7, 53.3, 45.1, และ 41.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่ากระบวนการทำแห้งด้วยลมร้อนนั้นมีศักยภาพในการพัฒนานำไปใช้ในการถนอมเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* CR1T5 ในระดับอุตสาหกรรมโดยพบว่าเชื้อสามารถรอดชีวิตได้ดีจากการกระบวนการทำแห้งและระหว่างการเก็บที่ 4°ซ. เนื่องจากวิธีนี้นอกจากจะไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงแล้ว ยังง่ายต่อการปฏิบัติและมีค่าใช้จ่ายต่ำอีกด้วย

In this study, 119 bacterial strains were isolated from various kinds of samples such as healthy *Tilapia* fish, water and sediment around the cultured fish-cages, and several kinds of traditional fermented foods, rice and fermented milk. These bacterial cultures were screened for the isolates that exhibited probiotic activities against fish pathogens by using the agar-overlaying and well-diffusion techniques. It was found that 25 isolates could inhibit growth of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *Streptococcus* sp. that were pathogens of *Tilapia* fish. Among these bacteria tested, the isolate called CR1T5 demonstrated the most effectiveness as probiotics, therefore, it was further employed in the "challenged test". It was revealed that the isolate CR1T5 not only protected *Tilapia* fish from bacterial infection but also enhanced the fish growth. Characterization of the isolate CR1T5 was performed using morphological, physiological and biochemical tests. It was shown that the characteristics of CR1T5 were consistent with *Lactobacillus plantarum.*

Studying growth conditions of *L. plantarum* CR1T5 was preliminary performed at a flask scale using MRS medium. The obtaining results showed that *L. plantarum* CR1T5 grew best at 30°C, pH 6.5 and 50 rpm shaking speed. When glucose in MRS broth was replaced by molasses, it was found that *L. plantarum* CR1T5 grew best in the medium containing 10% molasses. When peptone and meat extract in MRS medium were replaced by skim milk, the bacterium grew best in the medium containing 8% skim milk. All these obtaining growth conditions were thereafter applied on a cultivation of the probiotic *L. plantarum* CR1T5 in a 7-L fermentor. It was shown that *L. plantarum* CR1T5 yielded the highest cell population after cultivation at 30°C, pH 6.5 and 100 rpm agitation speed for 2 days in a modified MRS broth containing 10% molasses and 8% skim milk.

Lyophilization and warm air-drying were used to preserve bacterial cells of probiotic *L. plantarum* CR1T5. In this study, we examined various kinds of protective agents being used in maintaining bacterial cell viability. For lyophilization, 18% skim milk, 4% trehalose, and 4% sucrose were employed as cryoprotectants for *L. plantarum* CR1T5. It was found that the survival of *L. plantarum* CR1T5 from lyophilizing process when suspending in trehalose, skim milk and sucrose solution was 79.1, 72.4 and 71.0 percent, respectively. The lyophilized cells were stored for 10 weeks. It was shown that when using trehalose, skim milk and sucrose as cryoprotectants, the percentage of survival of CR1T5 kept at 4°C was 75.7, 65.0 and 67.0, respectively whereas

being kept at room temperature the survival was lower at 47.3, 56.1 and 55.8 percent, respectively. For warm air-drying, cell suspension of CR1T5 was adsorbed on fish feed-pellets before drying at 42°C for 6 h. It was shown that CR1T5 survived the warm air-drying better than lyophilizing processes as shown by its survival of 92.9, 92.4, 91.8 and 91.6 percent in 10% skim milk, 12% sucrose, 0.85% NaCl and MRS broth, respectively. Feed pellets containing CR1T5 were stored for 60 days. It has been demonstrated that when using skim milk, sucrose solution, NaCl solution, and MRS broth as protective substances, the percentage of survival of CR1T5 kept at 4°C was 83.7, 77.2, 83.0 and 55.9 respectively while being kept at room temperature the survival was much lower at 31.7, 53.3, 45.1 and 41.1 percent, respectively. The high percentage of *L. plantarum* CR1T5 cells survived the warm air-drying process and during storage at 4°C made this process a promising method to preserve the probiotic bacteria for commercial purposes. Therefore, up to two-months-trial period, warm air-drying would be a process of choice according to its lower costs and more practical for the commercial scale production.