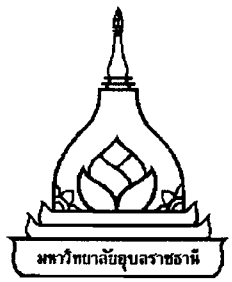
# การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอุยเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

วอนสมัย ดาลาแสน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี




# SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA FROM THE INTESTINE OF CLARIAS MACROCEPHALUS AS PROBIOTICS IN AQUACULTURE

VONSAMAY DALASAEN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN AGRICULTURE
FACULTY OF AGRICULTURE
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2014
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**

**มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**

**ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**

**สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์**

**เรื่อง** การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอุยเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

**ผู้วิจัย** นางวอนสมัย ดาลาแสน

**คณะกรรมการสอบ**

| | |
|---|---|
| รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณีต งามเสน่ห์ | ประธานกรรมการ |
| ดร.อัจฉรา จุฑาเกตุ | กรรมการ |
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา พยุหะ | กรรมการ |
| รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร | กรรมการ |

**อาจารย์ที่ปรึกษา** .....

(ดร.อัจฉรา จุฑาเกตุ)

.....

(รองศาสตราจารย์ธีระพล บันสิทธิ์)

คณบดีคณะเกษตรศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

**ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**

**ปีการศึกษา 2557**

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ดร. อัจฉรา จุฑาเกตุ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา พยุหะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาทิพย์ แหลมคม กรรมการที่ปรึกษา และ รองศาสตราจารย์ ดร. ปราณีต งามเสน่ห์ กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำในการเรียนและการทำงานวิจัยตั้งแต่เริ่มแรกจนสำเร็จการศึกษา ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณกรมความร่วมมือเพื่อการพัฒนาระหว่างประเทศ กระทรวงการต่างประเทศ ประเทศไทย ที่สนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้รับรองผู้วิจัยเข้ามาศึกษาในมหาวิทยาลัยแห่งนี้ พร้อมทั้งอำนวยความสะดวกทุกด้านตลอดระยะเวลา 3 ปี ขอบพระคุณอาจารย์คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ และความช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณนายศุภกร สีสันต์ และนางสาวจำนงค์ จันทะสี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำและโรคพืช ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆในการเรียนและการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ชำนาญ แก้วมณี และพี่ๆนักวิชาการ ณ ฟาร์มประมง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการเลี้ยงและการควบคุมโรคปลา ขอขอบพระคุณน้องๆ ปริญญาเอก และปริญญาโท ณ ห้องโครงการประมงที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลและแก้ไขภาษาไทย ตลอดจนช่วยปรับแก้รูปเล่มจนสำเร็จเป็นอย่างดี

สิ่งที่ขาดไม่ได้ผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณพ่อแม่และสามีอันเป็นที่รักที่ช่วยดูแลลูกๆและคอยเป็นกำลังใจในเวลาที่มีปัญหามาตลอดเวลา ขอบพระคุณพี่ๆ น้องๆ ที่เป็นพลังอันสำคัญที่ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนด้านต่างๆ จนสำเร็จ ส่วนคุณค่า ความรู้และประโยชน์ใด ๆ ที่เป็นกุศลอันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ศึกษาขอทดแทนบุรณคุณแด่ทุก ๆ ท่านที่มีส่วนร่วม ทั้งที่ได้กล่าวและไม่ได้กล่าวถึง สุดท้ายข้าพเจ้าขอแสดงความรู้บุญคุณจากความช่วยเหลือทั้งโดยตรงและทางอ้อม จากทุก ๆ ท่าน ด้วยความเคารพยิ่ง

วอนสมัย ดาลาแสน
ผู้วิจัย

# บทคัดย่อ


ชื่อเรื่อง : การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอุยเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ผู้วิจัย : วอนสมัย ดาลาแสน

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เกษตรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.อัจฉรา จุฑาเกตุ

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก ปลาดุกอุย โปรไบโอติกส์

งานวิจัยเรื่องการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอุยเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกส์ ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลา และศึกษาความทนทานของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกต่อสภาพความเป็นกรดและน้ำดี และความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จากการศึกษาพบว่าจากจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้งหมด 77 ไอโซเลท มี 9 ไอโซเลทที่แสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทุกสายพันธุ์ได้ในระดับดีด้วยวิธี agar spot test และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวมาทำการจำแนกชนิดด้วยชุดทดสอบแบคทีเรียสำเร็จรูป API 20 strep และ API 50 CHL พบว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก *Enterococcus faecium* 6 ไอโซเลท *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 2 ไอโซเลท และ *Lactobacillus brevis* 1 ไอโซเลท การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งด้วยวิธี disc diffusion assay โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ปกติ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพให้เป็นกลาง และน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Proteinase K พบว่าขนาดของบริเวณยับยั้งแตกต่างกันบ่งชี้ว่ากลไกการยับยั้งเป็นผลมาจากการผลิตกรดอินทรีย์และแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้ยังพบว่า *L. brevis* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* และ *Flavobacterium columnare* ได้ดีกว่า *E. faecium* และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการทดสอบความทนทานของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อสภาวะภายในทางเดินอาหาร พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลทสามารถมีชีวิตและอยู่รอดได้ในระดับค่าความเป็นกรดที่ 3 และ 2 และในน้ำดีสดปลาดุกอุยความเข้มข้นร้อยละ 10 ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า *Ent. faecium* เกือบทุกไอโซเลท และ *L. brevis* สามารถต้านทานต่อยาnorfloxacin, sulphamethoxazole, ciprofloxacin, oxolinic acid และ sulphamethoxazole/trimethoprim ส่วน *Lc. lactis* ssp. *lactis* มีความสามารถในการต้านทานต่อยา oxolinic acid, sulphamethoxazole, และ sulphamethoxazole/trimethoprim

จากคุณสมบัติข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแบคเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลทที่แยกได้นี้มีศักยภาพในการเป็นโปรไบโอติกส์สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

# ABSTRACT


TITLE : SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA FROM THE INTESTINE OF *CLARIAS MACROCEPHALUS* AS PROBIOTICS IN AQUACULTURE

AUTHOR : VONSAMAY DALASAEN

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : AGRICULTURE

ADVISOR : ACHARA JUTAGATE, Ph.D.

KEYWORDS : LACTIC ACID BACTERIA, *CLARIAS MACROCEPHALUS*, PROBIOTIC

The aim of the present study was to isolate lactic acid bacteria, which possessed antibacterial activity against fish pathogens, from the intestine of *Clarias macrocephalus* and to examine their pH and bile tolerance and their antibiotic resistance that use in aquaculture. The results showed that of the 77 isolates, 9 demonstrated the great inhibition against all indicator bacteria by agar spot test. The 9 isolates were identified as *Enterococcus faecium* (6 isolates), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (2 isolates) and *Lactobacillus brevis* (1 isolate) by using 20 strep and API 50 CHL identification system. Their ability to produce antimicrobial substances was evaluated by disc diffusion assay using crude cell-free culture supernatants, neutralized cell culture supernatants and proteinase K culture supernatants. The differences in the sizes of inhibition zones indicated that the mechanism of inhibition results from production of organic acid and bacteriocin. Moreover, *L. brevis* showed significantly greater action than *E. faecium*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* on *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* and *Flavobacterium columnare.* In order to assess their survival through the intestinal tract, pH and *C. macrocephalus* bile were determined. The results showed that all isolates survived 6 hours at pH 3, 2 and 10 % of *C. macrocephalus* bile. In addition, most of *Ent. faecium* isolates and *L. brevis* were resistant to norfloxacin, sulphamethoxazole, ciprofloxacin, oxolinic acid and sulphamethoxazole/ trimethoprim. The 2 isolates of *Lc. lactis* ssp. lactis resisted to sulphamethoxazole, oxolinic acid and sulphamethoxazole/ trimethoprim. Consequently, these 9 isolates should be considered as probiotic bacteria with interesting potential for aquaculture.

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| **กิตติกรรมประกาศ** | ก |
| **บทคัดย่อภาษาไทย** | ข |
| **บทคัดย่อภาษาอังกฤษ** | ง |
| **สารบัญ** | จ |
| **สารบัญตาราง** | ช |
| **สารบัญภาพ** | ซ |
| **คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ** | ฌ |
| **บทที่ 1 บทนำ** | |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตการศึกษาค้นคว้า | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| **บทที่ 2 การตรวจเอกสาร** | |
| 2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก | 4 |
| 2.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก | 7 |
| 2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารของปลา | 12 |
| 2.4 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก | 13 |
| 2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้ง | 17 |
| 2.6 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นโปรไบโอติกส์ (probiotics)ในสัตว์น้ำ | 19 |
| 2.7 การคัดเลือกโปรไบโอติกส์ | 24 |
| 2.8 กลไกการทำงานของโปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำ | 26 |
| **บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย** | |
| 3.1 เชื้อจุลินทรีย์และอุปกรณ์ | 27 |
| 3.2 วิธีการ | 30 |
| 3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ | 36 |
| 3.6 สถานที่ทำการวิจัย | 36 |
| **บทที่ 4 ผลการวิจัย** | |
| 4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลา | 37 |
| 4.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ | 37 |
| 4.3 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสกุลและชนิด | 39 |
| 4.4 กลไกการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค | 43 |
| 4.5 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติก | 45 |
| 4.6 การทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก | 48 |

# สารบัญ (ต่อ)


| | หน้า |
|---|---|
| **บทที่ 5 อภิปรายผล** | **50** |
| **บทที่ 6 สรุปผล** | **54** |
| **เอกสารอ้างอิง** | |
| **ภาคผนวก** | |
| ก อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดสอบ | 68 |
| ข สารเคมีและน้ำยา | 72 |
| ค ผลการศึกษา | 75 |
| ง ขั้นตอนการทำวิจัย | 91 |
| **ประวัติผู้วิจัย** | **98** |

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก | 10 |
| 2 | แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ | 21 |
| 3 | การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ | 38 |
| 4 | ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาของแบคทีเรียกรดแลคติก | 38 |
| 5 | การวิเคราะห์ข้อมูลเทียบกับตารางมาตรฐานของ Alexsson, 1998 | 40 |
| 6 | การอ่านผลผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์ใน apiweb | 40 |
| 7 | ผลการทดสอบชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Enterococcus*, *Lactococcus* ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 strep | 41 |
| 8 | ผลการทดสอบชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus*, ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL | 42 |
| 9 | ผลความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ต่อการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion method แบบไม่ปรับค่าความเป็นกรด | 43 |
| 10 | ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารยับยั้งที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการปรับค่าความเป็นกรด (neutralized culture supernatants) | 44 |
| 11 | ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์จากการทดสอบความทนทานกรดของแบคทีเรียกรดแลคติก | 46 |
| 12 | จำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกจากการทดสอบความทนทานต่อน้ำดีสดปลาดุกอุย | 48 |
| 13 | ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ | 49 |
| ค.1 | ผลการทดสอบสัญฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก | 76 |
| ค.2 | ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ของแบคทีเรียกรดแลคติก | 79 |
| ค.3 | ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* ของแบคทีเรียกรดแลคติก | 82 |
| ค.4 | ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *F. columnare* ของแบคทีเรียกรดแลคติก | 85 |
| ค.5 | ผลการทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบบไม่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วยวิธี disc diffusion method | 88 |
| ค.6 | ผลการทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบบปรับค่าความเป็นกรด | 89 |
| ค.7 | ผลการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกจากการทดสอบความทนทานต่อกรด | 90 |
| ค.8 | ผลการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกจากการทดสอบความทนทานต่อน้ำดีสดปลาดุกอุยความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ | 90 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | รูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติก | 5 |
| 2 | ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก | 8 |
| 3 | ขั้นตอนการคัดแยกจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำ | 25 |
| 4 | การวางแผ่นยาปฏิชีวนะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ | 35 |
| 5 | ตัวอย่างความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ | 39 |
| 6 | การยับยั้งเชื้อก่อโรคของน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก | 45 |
| 7 | ความทนต่อค่าความเป็นกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้หลังจาก 6 ชั่วโมง | 46 |
| 8 | ผลการทดสอบความทนต่อน้ำดีสดปลาดุกอุยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้หลังจาก 6 ชั่วโมง | 47 |
| 9 | ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก | 59 |
| ง.1 | ขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ปลาดุกอุย | 92 |
| ง.2 | การทดสอบพื้นฐานการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก | 92 |
| ง.3 | การทดสอบคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสกุล | 93 |
| ง.4 | การทดสอบในระดับชนิด | 93 |
| ง.5 | การทดสอบด้วยวิธี Agar spot method | 93 |
| ง.6 | การทดสอบการสร้างสารยับยั้งด้วยวิธี Disc diffusion method | 94 |
| ง.7 | การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติก | 94 |
| ง.8 | การทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ | 94 |
| ง.9 | ขั้นตอนการทดสอบชนิดด้วยชุดทดสอบ API 20 strep | 95 |
| ง.10 | ขั้นตอนการทดสอบชนิดด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL | 96 |
| ง.11 | ผลการทดสอบชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติก | 97 |

# คำอธิบายสัญลักษณ์และอักสรย่อ

| | |
|---|---|
| mm | มิลลิเมตร millimeter |
| ml | มิลลิลิตร milliliter |
| g | กรัม gram |
| µg | ไมโครกรัม microgram |
| °C | องศาเซลเซียส degree celsius |
| CFU/ml | colony forming unit |
| OD | ความยาวคลื่นแสง optical density |
| mg/ml | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร |
| pKa | ค่าคงที่ของความเป็นกรดเป็นด่าง |
| ppm | part per million |

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ปลาดุกอุย (*Clarias marocephalus*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เป็นที่นิยมของผู้บริโภคเนื่องจากมีเนื้อนุ่ม ฟู และมีสีสันน่ารับประทาน รวมทั้งมีกลิ่นและรสชาติดี นอกจากนี้ปลาดุกอุยเพศเมียยังมีความสำคัญยิ่งต่อการเพาะพันธุ์ปลาดุกบิ๊กอุย ซึ่งเป็นปลาลูกผสมที่ได้จากการผสมเทียมระหว่างแม่ปลาดุกอุย (*C. marocephalus*) และพ่อปลาดุกอัฟริกัน (*C. gariepinus*) (Senanan et al., 2004: 167 – 184)ปลาดุกลูกผสมนี้เป็นชนิดพันธุ์ที่มีการเพาะเลี้ยง และซื้อขายกันมากในตลาดภายในประเทศผลผลิตประมาณ 50,000 ตันต่อปี (กรมประมง, 2555: 19) และตลาดส่งออกไปยังต่างประเทศ เพื่อตอบสนองต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุย จึงมีความต้องการแม่พันธุ์ปลาดุกบิ๊กอุยเพิ่มมากขึ้น ทำให้ปลาดุกอุยในธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์มีจำนวนลดลง และยังพบปัญหาการปนเปื้อนทางพันธุกรรมของประชากรส่งผลต่อการนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์สำหรับการผลิตลูกปลาดุกบิ๊กอุย (Na-Nakorm et al., 2004: 145 – 163; Senanan et al., 2004: 167 – 184) อีกทั้งมีการใช้แม่พันธุ์ปลาที่ยังไม่สมบูรณ์เพศในการผลิตลูกปลาส่งผลทำให้อัตราการฟักและอัตราการรอดตายของลูกปลาต่ำ นอกจากนี้เกษตรกรบางรายได้นำเข้าแม่พันธุ์ปลาดุกอุยจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น กัมพูชา และเวียดนาม ทำให้เสี่ยงต่อการทำลายสายพันธุ์ปลาดุกอุยของไทย (Panprommin et al., 2008: 60 – 68) ดังนั้นการพัฒนาการเลี้ยงปลาดุกอุยให้ประสบความสำเร็จจึงจำเป็นอย่างยิ่งต่อการส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตปลาดุกบิ๊กอุยให้ยั่งยืน และเป็นการอนุรักษ์พันธุ์ปลาดุกอุยให้คงอยู่สืบไป อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลาดุกอุยมักประสบปัญหาการระบาดของโรค (โสภา อารีรัตน์ และอุมาลัย สะดวกดี, 2543: 363 – 365) โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และ *Flavorbacterium columnare* ซึ่งพบว่ามีการระบาดมากระหว่างการอนุบาลลูกปลา การป้องกันและควบคุมโรค โดยการใช้ยาปฏิชีวนะทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาในตัวปลา และปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคซึ่งจะทำให้การควบคุมโรคเป็นไปได้ด้วยความยากลำบากยิ่งขึ้น ดังนั้นการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปที่การหาวิธีการต่าง ๆ มาใช้ในการจัดการจุลินทรีย์ในระบบการเลี้ยง และในตัวของสัตว์น้ำ เพื่อลดปริมาณเชื้อที่จะก่อให้เกิดโรค และเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์น้ำ

แบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้มีความสำคัญต่อสุขภาพ และขบวนการทางสรีระวิทยาของเจ้าบ้าน (Hagi et al., 2004: 335 – 346) โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) ซึ่งเป็นแบคทีเรียหลักที่เป็นประโยชน์ และได้มีการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกส์หรับสัตว์น้ำ (Verschuere

et al., 2000: 655 – 671; Pirarat et al., 2006: 339 – 347) แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของปลาที่มีสุขภาพดี โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างกรด และสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค ป้องกันการตั้งรกรากและการเพิ่มปริมาณของเชื้อก่อโรคหรือเชื้อฉวยโอกาสอันจะส่งผลให้ปลาเกิดการเจ็บป่วย (Ringo et al., 1993: 767 – 776) นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการผลิตเอนไซม์ในการย่อยอาหาร การสังเคราะห์วิตามินและกรดไขมันที่จำเป็น (Sugita et al., 2002: 1004 – 1011; Ringo and Birkbeck, 1999: 79 – 93) และกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรค (Olafsen, 2001: 223 – 247; Sugita et al., 2002: 1004 – 1011; Gomez and Balcazar, 2008: 145 – 154) ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้จึงมีผลต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของปลา อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ปลามีอยู่ค่อนข้างจำกัด โดยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาในปลาเขตอบอุ่น (Hagi et al., 2004: 335 – 346; Asakarian et al., 2008: 302 – 311; Ghiasi, 2011: 12747 – 12751) และมีรายงานว่าประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ปลามีความผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ (Hagi et al., 2004: 335 – 346)

ดังนั้นการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอุยที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกส์ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจและสามารถนำมาใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคในปลาดุกอุยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## 1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอุย

1.2.2 เพื่อคัดเลือกและจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบ

1.2.3 เพื่อทดสอบความทนต่อสภาวะภายในทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

1.2.4 เพื่อทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

## 1.3 ขอบเขตการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้ เป็นการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ปลาดุกอุย โดยการสุ่มปลาดุกอุย ที่มีน้ำหนักประมาณ 10 $\pm$ 2.4 กรัม จำนวน 30 ตัว เพื่อนำมาใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลา นำแบคทีเรียที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคปลาโดยวิธี Agar spot method และคัดเลือกไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งในระดับดี

มาทำการจัดจำแนกสกุลและชนิดแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวิธีการจำแนกขั้นพื้นฐาน และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี จากนั้นนำไอโซเลทที่คัดเลือกมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี Disc diffusion assay สุดท้ายนำมาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกส์ และความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ข้อมูลชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ปลาดุกอุย

1.4.2 ได้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาดุกอุย

# บทที่ 2
# การตรวจเอกสาร

## 2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria, LAB) เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส (Catalase enzyme) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีรูปร่างเป็นท่อนและรูปกลม รูปร่างของเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อม (ภาพที่1) แหล่งที่มักพบแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ เนื้อ ผลิตภัณฑ์นมและอาหารหมักดองต่างๆ แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถหมักหรือย่อยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม จากชนิดและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เชื้อผลิตได้นี้ จึงจัดแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) และกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) โดยกลุ่มแรกสามารถผลิตกรดแลคติกจากการหมักย่อยน้ำตาลได้สูงประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ที่เหลืออีก 5 เปอร์เซ็นต์จะผลิตกรดแอซีติก (acetic acid) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย สำหรับแบคทีเรียกลุ่มหลัง หลังจากการหมักย่อยน้ำตาลดังกล่าวแล้วจะผลิตกรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ผลิตกรดแอซีติก กรดฟอร์มิก (Formic acid) รวมทั้งเอทธานอล (Ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (บุษกร อุตภิชาติ, 2548: 19 – 29) แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ(strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการพลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน ความต้องการอาหารค่อนข้างสลับซับซ้อนใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน และเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารช่วยในการเจริญ และวิตามินต่าง ๆ เช่น ไบโอติน (Biotin) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น และต้องการอาหารที่มีแป้งชนิดหมักได้โคโลนีขนาดเล็ก สามารถทนกรดได้ดี รวมทั้งแหล่งพลังงานจากกระบวนการหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส และแลคโตส นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังมีลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ ความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง แหนม เนยแข็ง นมเปรี้ยว เป็นต้น (Stiles and Holzapfel, 1997: 1 – 29) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมต่างๆทั่วไป รวมถึงในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต เช่น มนุษย์ หนู หมู สัตว์ปีก และสัตว์น้ำเป็นต้น

**ภาพที่ 1 รูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติก (A) แบคทีเรียรูปร่างท่อน (B) แบคทีเรียรูปร่างกลม (C) รูปร่างแบบ Tetrad ที่มี 4 เซลล์ยึดเกาะกัน**

**ที่มา:** Asia food journal. (2015)

**2.1.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก**

การจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกแบ่งออกเป็น 4 สกุล (Genus) ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* โดยอาศัยคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติก ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติกถูกจัดจำแนกออกเป็น 12 สกุล ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา กระบวนการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ ชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติคที่ผลิตได้ และข้อมูลทางพันธุกรรม (Rattanachikunsopon and Phunkhachorn, 2010: 218 – 288) ได้แก่

2.1.1.1 *Streptococcus* มีรูปร่างกลมหรือรูปวงรีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 – 1.2 ไมครอนจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญเติบโต ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 – 41 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยแบคทีเรีย 39 ชนิด (Itoh et al., 2006: 368 – 374)

2.1.1.2 *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่เคลื่อนที่ได้ไม่ทุกสายพันธุ์ประกอบด้วยแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Vagococcus flauvalis* และ *V. samoninarum* โดยมีการคัดแยกได้จากปลา brown trout ซึ่งทำการศึกษา 1 ครั้งเท่านั้น (Gonzalez et al., 2000: 389 – 391)

2.1.1.3 *Lactococcus* มีรูปร่างกลมหรือรูปวงรีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 – 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นหัวเชื้อในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบในพืชชนิดต่างๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำมันดิบ ประกอบด้วยแบคทีเรีย 5 ชนิด *Lc. lactic* ssp. *lactic, Lc. lactic* ssp. *cremoris, Lc. lactic* ssp. *hordniae, Lc. garvieae, Lc. plantarum, Lc. raffinolactis* และ *Lc. Piscium* (Salminen et al., 2004 : 9 – 16)

2.1.1.4 *Enterococccus* เซลล์มีรูปร่างวงรี จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้นๆ ผลิตกรดแลคติคชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ และสามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส (Ogier and Serror, 2008: 219 – 301) บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คาตาเลสเทียมได้ประกอบด้วยแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Ent. faecalis, Ent. faecium, Ent. avium, Ent. galinarum* และ *Ent. cecorum*

2.1.1.5 *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.36 – 43 ไมครอน แบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกันโดยแบ่งตัวครั้งที่สองในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์สี่เซลล์ติดกัน ในสภาวะไร้อากาศผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส ประกอบด้วย 6 ชนิดได้แก่ *P. acidilactici, P. damonosus, P. dextrinicus, P. inopinatus, P. parvulus, P. pentosaceus* และแบคทีเรียกลุ่มนี้มี G + C เป็นองค์ประกอบในจีโนมอยู่ประมาณ 34 – 44 เปอร์เซ็นต์ (Holzapfel et al., 2006: 229 – 266)

2.1.1.6 *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือนสกุล *Pediococcus* เจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ NaCl สูงถึง18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบส 16S rRNA ใกล้เคียงกับสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* (Salminen et al., 2004: 9 – 16)

2.1.1.7 *Aerococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Aerococcus viridian* และ *A. viridians*.

2.1.1.8 *Leuconostoc* เซลล์มีสัณฐานวิทยาขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ หากเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่เมื่ออยู่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวที่อยู่เป็นคู่หรือสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส ช่วยเพิ่มกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญเติบโตต้องการสารอาหารสูงปัจจุบันประกอบด้วยแบคทีเรีย 8 ชนิด ได้แก่ *Leu. mesenteroides, Leu. lactic, Leu. gelidum, Lue carnosum, Leu. psedomesenteroides, Leu. citreum, Leu. argentinum* และ *Leu. fallzx* ในกลุ่มนี้มี G + C เป็นองค์ประกอบประมาณ 37 – 40 เปอร์เซ็นต์ (Bjokroth and Holzapfel., 2006: 264 – 319)

2.1.1.9 *Oenococcus* สกุลนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งถูกจัดอยู่ในสกุล *Leuconostoc* เชื้อสกุลนี้มีลักษณะต่างจากชนิดอื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน เนื่องจากมีคุณสมบัติในการทนกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ เช่น ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น DNA hybridization และลำดับเบสของ 16S rRNA (Bjokroth and Holzapfel., 2006: 264 – 319)

2.1.1.10 *Weissella* มีเซลล์เป็นรูปร่างแท่งและกลมมีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* เมื่อก่อนถูกจัดในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 ชนิด ได้แก่ *Leu. Paramesenteroides* (*W. paramesenteroides*), *L. confuse* (*W. confuses*), *L. minor*

(*W.minor*), *L. halotolerans* (*W. halotolerans*), *L. Kandleri* (*W. kandleri*), *L. viridescens* (*W. viridescens*), *W. hellenica* (Salminen and Lahtinen. 2011 : 95 – 112)

2.1.1.11 *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G + C ภายในสกุลสูง คือ ระหว่าง 32 - 53 เปอร์เซ็นต์ พบในแหล่งต่างๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์ พบในสัตว์ พืชและน้ำทิ้ง เป็นต้น บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนกลม (coccobacilli) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญเติบโต (Ringo et al., 1998: 767 – 776) ประกอบ ด้วย 55 ชนิด ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1) กลุ่ม obligately homofermentative *Lactobacilli* มีความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดแลคติก โดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโตสและกลูโคสไม่ได้

2) กลุ่ม facultatively heterofermentative *Lactobacilli* มีความสามารถในการหมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP pathway มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phoshoketolas จึงหมักน้ำตาลเพนโตสได้

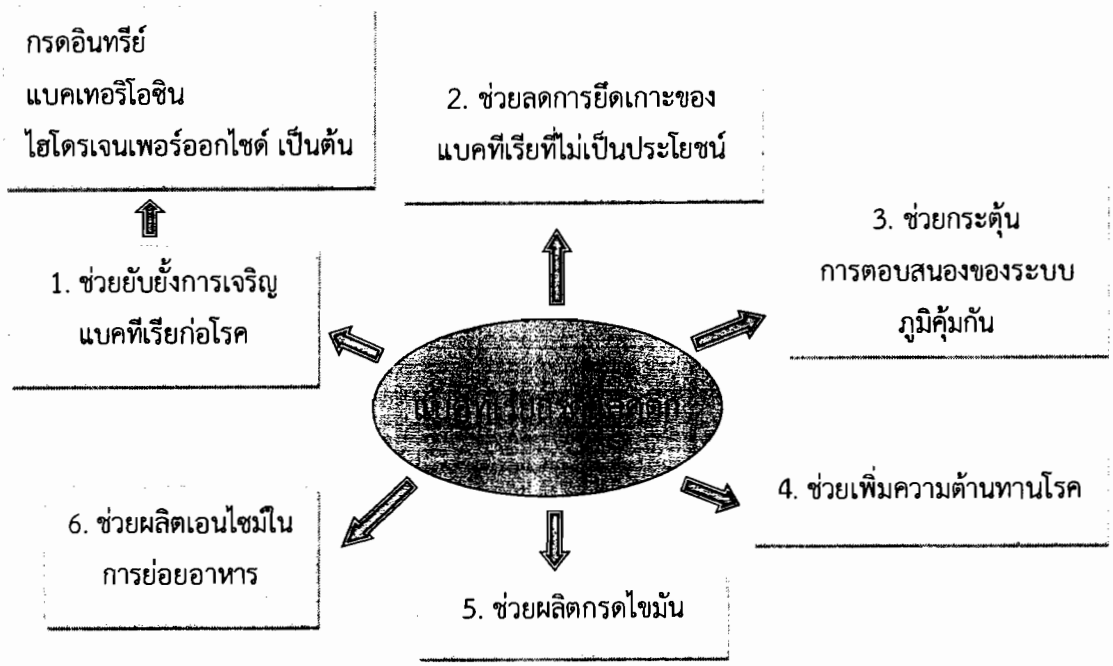
3) กลุ่ม obligately heterofermentative *Lactobacilli* มีความสามารถในการหมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโตสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทได้ แลคเตต เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

2.1.1.12 *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือท่อนเรียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 0.7 ไมครอน และยาว 1.1 - 3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) คาร์บอนไดออกไซด์ แอซีเทต และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *C. divergens, C. piscicola, C. gallinarum, C. mobile, C. funditum* และ *C. alterfunditum* มี G+C เป็นองค์ประกอบในจีโนมประมาณ 31.6 – 37.2 เปอร์เซ็นต์

## 2.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ป้องกันการตั้งรกรากและการเพิ่มปริมาณของเชื้อที่ก่อโรค และแบคทีเรียที่ฉวยโอกาสที่จะส่งผลให้ปลาเกิดการเจ็บป่วย (Ringo et al., 1993: 767 – 776) นอกนี้ยังมีส่วนช่วยในการผลิตเอนไซม์ในการย่อยอาหาร การสังเคราะห์วิตามินและกรดไขมันที่จำเป็น (Sugita et al., 2002: 1004 – 1011; Ringo and Birkbeck, 1999: 79 – 93) และยังช่วยกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรค (ภาพที่ 2) ซึ่งมีการศึกษาที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมีความไวต่อ

macrophage และ lymphocyte ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin (IgA) และผลิต gamma interferon ผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (pathogens) และยังมีคุณสมบัติเป็น antitumor โดยเฉพาะ *L. acidophilus* (Olafsen, 2001: 223 – 247; Sugita et al., 2002: 1004 – 1011; Gomez and Balcazar, 2008: 145 – 154) ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดจึงจัดเป็นโปรไบโอติกส์ และมีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย รวมถึงการพยายามคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกส์ที่มีประสิทธิภาพ (ตารางที่1)




**ภาพที่ 2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก**

Heo and Yang (2002: 200 – 205) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ จากลำไส้ปลา ปลาหมักและกิมจิ (kimchi) และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจำนวน 20 ไอโซเลท เป็น *Lactobacillus sakei* BK19 ที่สามารถทนกรดได้ดี และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลา ได้แก่ *Vibrio alginolyticus, V. salmonicida, V. harvei parahaemolyticus, V. minicus* และ *V. vulnificus* การจำแนก และคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ไก่ จากการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด 41 ไอโซเลทพบว่า 37 ไอโซเลทมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Typhimurium 292, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 จากนั้นนำทั้ง 37 ไอโซเลทมาศึกษาการทนต่อความเป็นกรดเป็นด่าง, ox-bile, bile salt และ เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เพียง 6 ไอโซเลทจากทั้งหมด 37 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็น

กรด-ด่าง ระหว่าง 2 – 10 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ได้ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถทนต่อ ox-bile ที่ความเข้มข้น 3, 6, 9 เปอร์เซ็นต์ และ bile-salt ที่ความเข้มข้น 0.3, 0.6, 0.9 เปอร์เซ็นต์ (เบญจรัตน์ ยิ้มมิ่ง และปณิชา ปั่นสุ่น, 2553: 1-26) การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 52 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากอาหารทะเล (กุ้ง หอย ) และอาหารทะเลหมักดอง กุ้งจ่อม หอยดอง และปลาจ่อม ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *L. bulgaricus* TISTR 541, *S. aureus* TISTR 118, *V. parahaemolyticus* SH1, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *P. fluorescens* DMST 20076, *S. typhimurium* DMST 0562 และมีความทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก น้ำดีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตแบคเทอริโอซินและเอนไซม์ amino acid decarboxylase (Nanasombat et al., 2012: 255 – 262) และการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลานิล Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) 6 สายพันธ์ คือ *Ent. faecium, Leu. mesenteroides, L. fermentum, L. plantarum, Leu. Mesenteroides, Ent. durans* ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ (Zapata, 2013: 2176 - 6076)

นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารโดยเฉพาะอาหารหมักดองต่างๆ แบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากจะเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารหมักดองแล้ว ยังใช้ในการรักษาและถนอมอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักอื่น ๆ ซึ่งอาหารประเภทนี้จะมีสี กลิ่น รสชาติ และสามารถรักษารูปร่างได้ดี เช่น ไวน์ เบียร์ เค้กข้าว นม เนื้อและปลาโดยการผลิตกรดอินทรีย์เพื่อการควบคุมหรือยับยั้งจุลินทรีย์ putrefactive แบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010: 218 – 228) เช่น การคัดแยก *Pediococcus* sp.G5 จากเนยแกะพื้นเมือง (Slovak traditional sheep's cheese) มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* (Hladikova et al., 2012: 80 – 85) และแบคทีเรียกรดแลคติก Sb2 ที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง (*Lates calcarifer)* มีคุณสมบัติ ในการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งทั้งเชื้อที่ทำให้เนื้อเน่าเสียและก่อโรคได้ (Rumjuankiat et al., 2010: 870 – 877) นอกจากนี้ *L. plantalum* ยังสามารถผลิตกรด phenyllactic (PLA) และ 4-hydroxy-phenyllactic (OH-PLA) ซึ่งช่วยในการรักษาอาหาร และสามารถเพิ่มปริมาณ phenylalanine และลดปริมาณ tyrosine เพื่อช่วยปรับปรุงคุณภาพของอาหาร (Valerio et al., 2004: 289 – 295)

**ตารางที่ 1 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก**

| แบคทีเรียกรดแลคติก | สัตว์น้ำ | ประโยชน์ | อ้างอิง |
|---|---|---|---|
| *Lactococcusc lactis*, *Enterococcus faecium*, *Ent. mundtii* | Turbot (*Psetta maxima*) | ช่วยยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* | Campos et al. (2006: 356 – 364) |
| *Pediococcus pentosaceus* LM2, *P. pentosaceus* SL4, *Ent. faecium* SF | Marin fish (fish, shrimp, shellfish) | ช่วยต้านเชื้อก่อโรคจากคน เช่น *S. aureus*, *Lis. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* | Buntin et al. (2008: 141 – 148) |
| *Ent. faecium* MC13, *Streptococcus phocae* P180 | Shrimp and marine fish | ช่วยยับยั้งเชื้อ *Vibrio haveyi* และ *V. parahaemolyticus* | Swain et al. (2009: 697 -793) |
| *Lactobacillus* sp. | Catfish (*Clarias orientailis*), Hari fish (*Anguilla* sp.), Roho fish (*Labeo rohita*) | ช่วยสร้างสารยับยั้ง *Aeromonas* sp, *A. samonicida* และ Vibrio sp. | Dhanasekaran et al. (2010: 203 – 112) |
| *Lc. lactis* | Tilapia (*Oreochromis niloticus*) | ช่วยยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* | Zhou et al. (2010: 73 – 80) |
| *Lc. lactis* TW34 | Patagonian fish (*Odontesthes platensis*) | ช่วยต้านเชื้อ *Lc. Garvieae* | Sequeiros et al. (2010: 237 – 245) |
| *Lactobacillus sp. Weissella sp. Entercoccus sp. Pediococcus sp.* | Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) | ช่วยยับยั้งเชื้อ *Yersinia ruckeri, A. salmonicida* | Sica et al. (2012: 869 – 879) |

**ตารางที่ 1 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)**

| แบคทีเรียกรดแลคติก | สัตว์น้ำ | ประโยชน์ | อ้างอิง |
|---|---|---|---|
| *L. brevis* FPTLB3 | Freshwater fish, mrigala (*Cirrhinus mrigala*) | สร้างสารยับยั้งเชื้อ *E. coli* MTCC 1563, *Ent. faecalis* MTCC 2729, *L. casei* MTCC 1423, *L. sakei* ATCC 15521 and *S. aureus* ATCC 25923. | Banerjee et al. (2013: 17 – 25) |
| *Lc. faecium, Leu. mesenteroides, L. plantalum, L. fermentum, Ent. duran* | Nile Tilapia (*O. niloticus*) | สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลา เช่น *P. aeroginosa* T3, *P. putida* T4, *Vibrio harveyi* T34 *Mycobacterium marinum* T217 | Zapata, (2013: 2157 – 6076) |
| *Ent. faecalis* | Snakehead fish (*Channal striatus Bloch*) | *A. hydrophila, P.aeruginosa* และ *Shewanella putrefaciens* | Allameh et al. (2014: 2014 – 2222) |
| *L. brevis* | Estuarine Fish (*Mugil cephalus*) | ช่วยต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคในปลา กุ้ง และเชื้อก่อโรคในคน | Ghosh et al. (2014: 1 – 11) |
| *L. casei* X2 | Rotifer (*Brachionus plicatilis*) | ช่วยต้านเชื้อ *V. alginolyticus* | Lamari, (2014: 699 – 709) |

**2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารของปลา**

ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารจะมีผลต่อสุขภาพของปลาหรือเจ้าบ้าน (Perez et al., 2010: 1 – 6) เนื่องจากจะช่วยดูดซับสารอาหาร การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ (microbial balance) และแบคทีเรียบางชนิดจะยึดเกาะที่เซลล์เยื่อบุในระบบทางเดินอาหาร (mucosal barrier fortification) ซึ่งเป็นกลไกในการขัดขวางการเกาะยึดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Salmonella* sp. (Hagi et al., 2004: 355 – 346) โดยมีรายงานว่าพบกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในลำไส้ของปลาที่มีสุขภาพแข็งแรง (Ringo and Gatesoupe, 1998: 177 – 203)

**2.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในระยะการเจริญต่าง ๆ ของปลา**

2.3.1.1 ระยะวัยอ่อน (larval stages) ระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำยังพัฒนาไม่สมบูรณ์และชนิดของจุลินทรีย์ประจำถิ่นขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่และอาหารที่กินเข้าไป ดังนั้นในระยะนี้ควรมีการจัดการคุณภาพของน้ำในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสัตว์น้ำให้ดี นอกจากนี้ในระยะวัยอ่อนของสัตว์น้ำเหมาะแก่การให้โปรไบโอติกส์ ซึ่งจะทำให้ตัวอ่อนของสัตว์น้ำแข็งแรงขึ้น (Ringo and Gatesoupe, 1998 : 177 – 203) แบคทีเรียกรดแลคติกจะพบน้อยมากในระยะวัยอ่อนของสัตว์น้ำ จากรายงานพบ *Lb. plantarum* ในตัวอย่างตัวอ่อนของปลา cod และในน้ำที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนของปลา cod (Strom and Ringo, 1993: 226 – 228)

2.3.1.2 ระยะวัยรุ่น (juveniles and on growing fish) เป็นระยะที่อวัยวะของปลามีการแบ่งแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ระบบทางเดินอาหารจะประกอบด้วย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ไส้ติ่ง ลำไส้ใหญ่และลำไส้เล็ก ลำไส้ของปลาแต่ละประเภทจะมีความยาวที่แตกต่างกันจึ่งทำให้การดูดซึมอาหารแตกต่างกัน (Ringo, 1993 : 767 – 776) ทำการคัดแยกแบคทีเรียชนิดต่างๆ จากเฉพาะส่วนกระเพาะอาหารของปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) มีค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 3.5 – 4.5 พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติก ที่อยู่ในระบบย่อยอาหารนี้ถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร

Gonzalez et al. (2000: 383 – 391) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในปลาน้ำจืดที่จับจากธรรมชาติ โดยเฉพาะปลา brown trout (*Salmo trutta*) จากการจำแนก 249 ไอโซเลท พบว่า 237 ไอโซเลทมีรูปร่างเป็นท่อน 12 ไอโซเลทมีรูปร่างกลม และ 90 เปอร์เซ็นต์หรือ 226 ไอโซเลทไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร Acetate (Rogosa) agar ซึ่งถูกจัดอยู่ในสกุล *Carnobacterium* และ 22 ไอโซเลตจัดในสกุล *Lactobacillus, Enterococcus, Lactococcus* และ *Vagococcus* และมี 1 ไอโซเลตที่ไม่สามารถจัดจำแนกในระดับสกุลได้

Askarian et al. (2008: 302 – 311) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารของปลา 2 ชนิด คือ Beluga (*Huso huso*) และ Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) ที่จับจากแหล่งเดียวกัน พบว่าจำนวนประชากรและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในปลา 2 ชนิดนี้

แตกต่างกัน โดยปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในปลา Beluga นั้นจะมีมากกว่าในปลา Persian Sturgeon และชนิดเด่นที่พบในปลา Beluga (*Huso huso*) คือ *L. curvatus, Lc. raffinolactis, Lc. lactis Streptococcus* sp. ส่วนในปลา Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) คือ *Ent. seriolicida* และ *Leu. Mesenteroides*

**2.4 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก**

แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตกรดแลคติกที่เป็นกรดอินทรีย์ได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสแบบ homofermentation การหมักจากแบคทีเรียกรดแลกติคยังได้กรดอะซิติก เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ การหมักแบบ heterofermentation เป็นการสะสมของกรดอินทรีย์ควบคู่กับการลดค่าความเป็นกรดเป็นด่างมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990: 149 - 164) การยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากแบคทีเรียกรดแลคติกจึงอาศัยกลไกหรือผลของการผลิตกรดอินทรีย์จากการหมักน้ำตาล มีผลทำให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารลดลง (Davidson and Hoover, 1993: 127 – 160) นอกจากกรดอินทรีย์ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล คาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Ouwehand and Vesterlund, 2004: 375 – 395) สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตได้มีดังนี้

**2.4.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)**

กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกจะได้กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก การสะสมกรดอินทรีย์จะส่งผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยอาศัยฤทธิ์ของกรดที่ไม่แตกตัวในกรดอ่อน เนื่องจากกรดอินทรีย์เมื่ออยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันทำให้สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เกิดการสะสมทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างภายในเซลล์สูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดอินทรีย์ที่สะสมภายในเซลล์จะแตกตัว ทำให้ได้ไฮโดรเจนอิออน (hydrogen ion) เป็นจำนวนมาก ซึ่งไฮโดรเจนอิออนจะไปรบกวนกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง, ค่าคงที่การแตกตัว (pKa) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ กรดอ่อนจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่ำ แม้ว่ากรดแลคติก และกรดอะซิติก จะมีผลต่อการยับยั้งในวงกว้าง รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ และรา (De Vuyst and Vandamme, 1994: 91 – 142) แต่ในสภาวะค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่ำ กรดอะซิติกที่มีค่า pKa สูง( pKa = 4.74) จะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดแลคติกที่มีค่า pKa ต่ำ (pKa = 3.85) ทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่ากรดแลคติก (Davidson and Hoover, 1993:127 – 160; Lindgren and Dobrogosz, 1990: 149 – 164)

กรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสีย (Tramer, 1966: 204 – 205) รวมทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ เช่น *S. aureus*,

*Salmonella* และ *E. coli* ที่ก่อโรคในลำไส้ของคน (Kao and Frazier, 1966: 215 – 255; Chung and Goepfert, 1970: 326 – 328; Park et al., 1973: 543 –546) รวมถึง *Lr. monocytogenase* (González and Dominguez, 2006: 1331 – 1339) ส่วนกรดอะซิติกมีผลต่อการลดจำนวนของ *Samonella* ในการผลิตเนยแข็งที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่ำกว่า 5.4 (Chung and Goepfert, 1970: 326 – 328) กรดอะซิติกที่ผลิตโดย *Leu. citrovorum* มีฤทธิ์ ในการยับยั้ง Phychrotrophic bacteria และ *Salmonella* (Davidson and Hoover, 1993: 127 – 160) นอกจากนี้ยังมีรายงานการยับยั้ง *Sal. thyphimurium* โดยการใช้กรดแลคติก และกรดอะซิติกร่วมกัน ซึ่งการใช้กรดทั้ง 2 ร่วมกันจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง (Rubin, 1978: 623 – 624) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Adam and Hall (1988: 287 – 292) บ่งชี้ว่ากรดแลคติก และกรดอะซิติกมีความสามารถส่งเสริมกันในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Samonella* ได้

### 2.4.2 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ในสภาพที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) โดยการทำงานของฟลาโวโปรตีนออกซิเดส (flavoprotein oxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) เพื่อกำจัดอิเล็กตรอนส่วนเกินออกจาก NADH โดยปราศจากการสร้าง ATP ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถสร้าง 6 เอนไซม์คาตาเลต ซึ่งทำหน้าที่สลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและออกซิเจนได้ ดังนั้นจึงพบการสะสมของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ถูกสร้างขึ้นและมีการปล่อยออกมานอกเซลล์ การเกิดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มากเกินไปอาจจะไปยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกได้ ซึ่ง Forntaine et al. (1996: 253 – 260) พบว่าไม่มีการสะสมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ เพราะไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สามารถถูกทำลายโดยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase), ฟลาโวโปรตีน และซูโดคาตาเลต (pseudocatalase) (De Vuyst and Vandamme, 1994: 91 – 142)

$$NADH + H^+ + O_2 \xrightarrow{NADH:H_2O_2\ oxidase} NAD^+ + H_2O_2$$

$$Pyruvate + phosphate + O_2 \xrightarrow{Pyruvate\ oxidase} acetylphosphate + CO_2 + H_2O_2$$

$$\alpha\text{-Glycerophosphate} + O_2 \xrightarrow{\alpha\text{-Glycerophosphate}} dihydroxyacetinephosphate + H_2O_2$$

$$O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{Superoxide} H_2O_2 + O_2$$

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดซ์ที่มีฤทธิ์รุนแรงต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะออกซิไดซ์กลุ่มซัลฟไฮดริล (sulfhydryl) ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนในเซลล์และมีผลต่อไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำให้เกิดเพอร์ออกซิเดชัน (peroxidation) ของไขมันที่อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแล้วทำให้ permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงขึ้นความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่าง ๆ เสียไป (Kong and Davison, 1980: 18 – 29) นอกจากนี้ ในปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จะมีการขนส่งออกซิเจนทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Fortaine et al., 1996: 253 – 260) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีส่วนในการสร้าง superoxide ($O_2^-$) และ hydroxyl ($OH^-$) radicals ที่ทำให้เกิดการทำลายชีวะโมเลกุลอื่นด้วย ได้แก่ กรดนิวคลีอิก (Byczkowski and Gessner, 1988: 569 – 580) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นอกจากจะมีผลต่อเซลล์โดยตรงแล้วยังมีผลในทางอ้อม เช่น เมื่อไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ออกซิไดซ์ไธโอไซยาเนท (thiocyanate) โดยมีเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เป็นคาตาลิสทำให้เกิดสารไฮโปไซยาไนท์ (hypocyanite, OSCN) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยไฮโปไซยาไนท์ทำให้โครงสร้างเสียและมีผลในการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า lactoperoxidase antibacterial system กลไกหลักในการยับยั้งจุลินทรีย คือ การขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิส ซึ่งอาจจะไปยับยั้งขั้นตอนการขนส่งกลูโคส รวมทั้งขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) และกลีเซอราลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ทำให้เกิดการออกซิเดชันของซัลฟไฮดริล (sulfhydryl) ในองค์ประกอบของเอนไซม์ ดังสมการ

$$\text{Thiocyanate } (SCN^-) + H_2O_2 \longrightarrow \text{hypothiocyanite } (OSCN^-) + H_2O \qquad (2.1)$$

จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีหลายชนิด เช่น *S. aureus* ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Dahiya and Speck, 1968: 1568 – 1572) มีรายงานการยับยั้ง *Pseudomonas* spp. ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารในอุณหภูมิต่ำ ซึ่งไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. plantarum* ระหว่างการเก็บรักษาหอยนางรมโดยการแช่แข็ง (Price and Lee, 1970: 13 – 18) เป็นต้น

**2.4.3 คาร์บอนไดออกไซด์**

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซส โดยแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม heterofermentative การยับยั้งจุลินทรีย์โดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดขึ้น ทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ โดยการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนด้วย

คาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลในการยับยั้งการเกิด decarboxylation นอกจากนี้พบว่าการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์มีผลต่อสมบัติในการเลือกผ่านของเมมเบรน membrane ดังนั้นจึงทำให้คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่ม Psychrotrope อย่างไรก็ตามพบว่าคาร์บอนไดออกไซม์ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Wagner and Moberg, 1989: 143 – 147) และเมื่อใช้ความเข้มข้น 20-50 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งราได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990: 149 – 164)

**2.4.4 ไดอะซิติล (Diacetyl)**

ไดอะซิติลหรือ 2,3-butanedione เป็นสารที่ให้กลิ่นรสในเนย และผลิตภัณฑ์นม นอกจากนี้ยังพบในไวน์ขาว ไวน์แดง บรั่นดี กาแฟคั่ว หญ้าหมัก และอาหารหมักชนิดอื่นๆ (De Vuyst and Vandamme, 1994: 91 – 142) จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ไดอะซิติลเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของ pyruvate แบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถหมักซิเตรท (Hugenholtz, 1993: 165 – 178) ซึ่งไดอะซิติลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติก กลไกการยับยั้งของไดอะซิติลจะเกิดจากไดอะซิติลทำปฏิกิริยากับ arginine-binding protein ของแบคทีเรียแกรมลบ จึงมีผลต่อการใช้อาร์จินิน (arginine) ภายในเซลล์

ความเข้มข้นของไดอะซิติลมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ความเข้มข้นของไดอะซิติลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป เช่น ไดอะซิติลที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ และที่ระดับความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกยกเว้นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Jay, 1982: 525 – 532) นอกจากนี้พบว่า ไดอะซิติลความเข้มข้น 334 ppm จะมีผลในการยับยั้ง *Yersinia*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Samonella* และ *Listeria* (Motlagh et al., 1991: 873 – 878) ไดอะซิติลให้ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ ได้ดีที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างน้อยกว่า 7 แม้ว่าไดอะซิติลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่การนำไปใช้ต้องใช้ในปริมาณค่อนข้างสูง ไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) เพื่อหวังผลในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ แต่จะนิยมใช้เป็น aseptic agent ในการทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องมือต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่า เนื่องจากไดอะซิติลเป็นสารที่ระเหยเร็ว

**2.4.5 รูเทอริน (Reuterin)**

*Lactobacillus reuterin* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์หลายชนิด *L. reuteri* สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเรียกว่า รูเทอริน เมื่อเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจนและแหล่งอาหารประกอบด้วยกลูโคสและกลีเซอรอลหรือกรีเซอรอลดีไฮด์ รูเทอรินไม่ใช่โปรตีนเนื่องจากไม่ถูกทำลายจาก proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคเทอริโอซิน ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว และไวรัส แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญจากรูเทอริน ได้แก่ *Samonella, Shigella, Clostridium, Staphylococcus* และ *Listeria* ซึ่งกลไกการยับยั้งเกิดจากรูเทอรินทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลุ่มซัลฟไฮดริล เช่น เอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส (ribonucleotide reductase) ทำให้ไม่เกิดการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต (sup state) ส่งผลให้เซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้

**2.4.6 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)**

แบคเทอริโอซินเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ทีมีการใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ที่เป็นสารประกอบโปรตีน (ประกอบด้วยกรดอะมิโน 30-60 โมเลกุล) แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ชนิด (species) เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน ส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อเซลล์ที่ผลิต (Garneau et al., 2002: 577 – 592) กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากการทำรูทีฟอสโฟไลปิดในเซลล์เมมเบรน (membrane) ของจุลินทรีย์เป้าหมายแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ปัจจุบันมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ ได้แก่ *Leuconostoc, Lactobacillus, Pediococcus, Lactococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme, 1994: 91 – 142) แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดออกฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้าง (Delves-Broughton, 1990: 100 – 117) กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไนซิน nisin เกิดจากไนซินทำให้เกิดรูและขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลค่าความเป็นกรดเป็นด่างทำให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และการสลายตัวของ ATP ทำให้เซลล์ตาย

การยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินและการใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร เนื่องจากเป็นที่ยอมรับว่าเป็นสารที่ปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยประเภทโปรติเอส (protease) จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ทนต่อความเป็นกรดเป็นด่างและความร้อน บางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* แบคเทอริโอซินมักถูกควบคุมการสร้างโดยพลาสมิด (plasmid) จึงง่ายต่อการทำ

genetic manipulation นอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้นโดยช่วยเพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภคอาหาร

**2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้ง**

เทคนิคที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การคัดเลือกด้วยอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งและการคัดเลือกด้วยอาหารเหลว (Cadirci and Citak, 2005: 237 – 241)

**2.5.1 การคัดเลือกด้วยอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง สามารถแบ่งเป็น 2 แบบดังนี้**

วิธีคู่เชื้อเจริญไม่พร้อมกัน (deferred method) วิธีการนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกในเบื้องต้น โดยการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แล้วเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (soft agar) ที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลวจะช่วยลดการแพร่กระจายของโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกได้ดีกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หรืออาจทำการฆ่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญอยู่ด้วยสารเคมี เช่น คลอโรฟอร์มหรือความร้อนเพื่อป้องกันการแพร่กระจายดังกล่าว นอกจากนี้อาจเลือกใช้วิธีการทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อด้านที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ คว่ำลงบนฝาด้านบนของจานเพาะเชื้อด้วยวิธีการที่ปลอดเชื้อ แล้วเททับด้านบน (บริเวณก้นจานเพาะเชื้อเดิม) ด้วยแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งวิธีการแบบนี้โคโลนีของแบคทีเรียทดสอบและแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจะไม่สัมผัสกันโดยตรง เนื่องจากมีชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งกั้นอยู่ ส่วนการอ่านผลสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเหมือนวิธีการตรวจสอบทั่วไป

วิธีคู่เชื้อเจริญพร้อมกัน (simultaneous method หรือ direct assay) เป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายและใช้เวลาน้อยกว่าวิธี deferred method วิธีการนี้สามารถทำได้ โดยการเกลี่ยแบคทีเรียทดสอบบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 – 10 นาที จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบความสามารถในการยับยั้งมาปลูกเชื้อแบบจุดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยแบคทีเรียทดสอบนำไปบ่มด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสม การอ่านผลสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเหมือนวิธีการตรวจสอบทั่วไป

**2.5.2 การคัดเลือกด้วยอาหารเหลว**

วิธีการนี้ส่วนใหญ่ใช้ในการตรวจวัดกิจกรรม (activity) ของแบคทีเรียเนื่องจากสามารถกำจัดปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ โดยเริ่มจากขั้นตอนการแยกเซลล์แบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยวิธีการกรองหรือปั่นเหวี่ยงแยก นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปแยกเอากรดหรือสารในกลุ่ม dialyable compound ออกด้วยวิธีการ dialysis หรือการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางเพื่อลดผลของกรด การเติมเอนไซม์คาตาเลต เพื่อลดผลจากไฮโดรเจน

เพอร์ออกไซด์ รวมทั้งกำจัดสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ นำนำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยการเติมลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ (agar well diffusion) แล้วตรวจผลโดยดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้น หรืออาจใช้วิธีการเติมลงไปในสารแขวนลอยของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ แล้วตรวจผลโดยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) หรือวิธีการนับจำนวนแบคทีเรียทดสอบที่เหลืออยู่ด้วยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งวิธีการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาได้อีกด้วย โดยสิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการนำเทคนิคแบบนี้มาใช้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ในการเพาะเชื้อต้องมีความเหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และในสารแขวนลอยผสมที่ทำการทดสอบจะต้องมีอาหารเพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

## 2.6 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นโปรไบโอติกส์ (probiotics) ในสัตว์น้ำ

โปรไบโอติกส์โดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพของสิ่งที่มีชีวิต เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วช่วยให้ร่างกายมีสุขภาพที่ดีขึ้น ซึ่งอาจช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของจุลชีพในร่างกาย และส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ ซึ่งมีมากมายหลายชนิด (Balcazar et al., 2006: 173 – 186) โปรไบโอติกส์ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในรายงานวิจัยของ (Lilly and Stillwell, 1965: 747 – 748) ที่ได้กล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งผลิตออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง โดยเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของสารปฏิชีวนะ ซึ่งจะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด นอกจากนี้ Parker (1974: 4 - 5) ได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า โปรไบโอติกส์ คือ สิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่หลั่งออกมามีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ต่อมาได้มีคำจำกัดความที่มีความเหมาะสมเสนอโดย Fuller (1989: 365 – 378) ซึ่งได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า โปรไบโอติกส์ คือ อาหารเสริม ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และยังก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ (host) โดยช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตนั้น ส่วนในสัตว์น้ำโปรไบโอติกส์ยังหมายความรวมถึงการปรับปรุงคุณภาพน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Moriaty, 1998: 351 – 358)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์น้ำ ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียจะส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ จึงมีความพยายามเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ (Ringo and Gatesoupe, 1998: 177 – 203) ซึ่งอาจทำได้ 3 วิธี คือ (1) การเติมแบคทีเรียกรดแลคติกลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา (2) นำแบคทีเรียกรดแลคติกผสมกับอาหารสัตว์น้ำ และ (3) การให้อาหารสัตว์น้ำซึ่งมีสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกและเพิ่มประสิทธิภาพการยึดเกาะเยื่อบุผิวของแบคทีเรียกรดแลคติก (Ringo et al., 1998: 177 – 203) นอกจากนี้ยังมีการคัดแยกแบคทีเรียสายกรดแลคติกสายพันธุ์ใหม่ ๆ เพื่อนำไปใช้เป็นโปร

ไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งมีผลเสียด้านการตกค้างของสารปฏิชีวนะ ในเนื้อสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม (Gatesoupe, 1999a: 147 – 165)

การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำนั้นจะมีหลักการที่แตกต่างจากการใช้โปรไบโอติกส์ในสัตว์บกและมนุษย์ เนื่องจากตัวอ่อนของสัตว์น้ำจะพัฒนาอยู่ภายในสภาวะแวดล้อมภายนอก (Gatesoupe, 1999b: 147 – 165) ซึ่งชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นโปรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**

| แบคทีเรียกรดแลคติก | สัตว์น้ำ | วิธีใช้ | ผลจากการใช้ | อ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| *Canobacterium divergens* | Atlantic cod (*Gadus morhua)* | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของ Atlantic cod (*Gadus morhua)* | Gildberg et al. (1997: 1 – 7) |
| *Canobacterium divergens* | Atlantic cod (*Gadus morhua)* | ผสมอาหาร | ช่วยต้านต่อเชื้อ *V. anguillarum* | Gildberg and Mikkelsen, (1998: 103 – 113) |
| *Pseudomonas florescens* (AH2) | Rainbow trout | ฉีดเชื้อ *P. florescens* ใน อัตรา $10^5$ CFU/ml ระยะเวลา 5 วัน | ช่วยต้านเชื้อ *V. agnguillarum* | Gram et al. (1999: 969 – 973) |
| *Carnobacterium* sp. | Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) | ผสมอาหาร | ลดการเกิดโรคที่มีสาเหตุจาก *A. samonicida, V. ordalli, Y. ruckeri* แต่ไม่ต้านต่อเชื้อ *V. anguillarum* | Robertson et al. (2000: 235 – 243) |
| *Pseudomonas florescens* | Rainbow trout | เติมในน้ำที่ใช้เลี้ยง | ช่วยลดการเกิดโรคที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก | Gram et al. (2001: 1 – 11) |
| *Lactobacillus rhamnochus* ATCC 53103 | rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน | Nikoskelainen et al. (2003: 443 – 452) |

**ตารางที่ 2 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นโปรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ต่อ)**

| แบคทีเรียกรดแลคติก | สัตว์น้ำ | วิธีใช้ | ผลจากการใช้ | อ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| *Lactobacillus platarum* | White shrimp (*Litopenacus vannamei* ) | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการเจริญและตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน | Chiu et al. (2007: 364 – 377) |
| *Enterococcus faecium* | Tilapia nilotica (*Oreochomis niloticus*) | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการเจริญและตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน | Wang et al. (2008: 203 – 207) |
| *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus subtilis* | Tilapia nilotica (*Oreochomis niloticus*) | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการเจริญและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน | Aly et al. (2008: 128 – 136) |
| *Lactobacillus delbrueckii* sp. | Sea bass *(Dicentrarchus labrax)* | ใช้แช่ rotifer และ *Artimia* | ช่วยเพิ่มการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของ *Dicentrarchus labrax* larvae | Picchietti et al. (2009: 368 – 376) |
| *Lactococcus lactis* | Tilapia nilotica (*Oreochomis niloticus*) | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการเจริญและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน | Zhou et al. (2010: 73 – 80) |
| *Canobacterium* sp. | *Hepialus gonggaensis* | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและเพิ่ม enzyme ช่วยย่อยในทางเดินอาหาร | Yin et al. (2011: 529 – 533) |
| *Lactobacillus* sp. | Zebra fish (*Danio rerio*) | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการยึดเกาะ | Zhou et al. (2012: 150 – 157) |
| *Lactobacullus plantalum* | White srimp (*Litopenacus vannamei*) | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการเจริญและอัตราการรอด | Kongnum and Hongpattarkere. (2012: 170 – 177) |

**ตารางที่ 2 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นโปรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ต่อ)**

| แบคทีเรียกรดแลคติก | สัตว์น้ำ | วิธีใช้ | ผลจากการใช้ | อ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| *L. plantarum, L. salivarius, L .rhmnosus* | *P. pelagicus* | ผสมในน้ำเลี้ยง | ช่วยเพิ่มอัตราการรอดและเพิ่ม enzyme ช่วยย่อย | Talpur et al. (2012: 54 – 64) |
| *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, *Lactobacillas casei* X2 | Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต | Lamari et al. (2013: 137 – 145) |
| *Lactobacillus plantarum* VSG3 | ปลาเขตอบอุ่น Rohu fish (*Labeo rohita*) | ผสมอาหาร | ช่วยเพิ่มการเจริญ ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน และต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* | Giri and et al., (2013 : 660 – 666) |
| *Lactobacillus casei* X2 | *Artemia franciscana cysts* | เติมในน้ำเลี้ยง | ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของ *Artimia* (*Brachionus plicatilis*) | Lamari, (2014: 699 – 709) |

**2.7 การคัดเลือกโปรไบโอติกส์**

คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกส์ โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกส์ควรมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้

2.7.1 เป็นจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกว่าเป็นที่ยอมรับและมีความปลอดภัย (GRAS= Generally Recognized As Safe) โดยไม่ทำให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษ

2.7.2 ต้องทนต่อสภาวะความเป็นกรดของน้ำย่อยที่กระเพาะอาหารและทนน้ำดีที่ลำไส้เล็กภายในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้านได้ โดยในระบบการย่อยอาหารของปลาประกอบด้วยอวัยวะหลัก 3 ส่วนคือ กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้ (intestine) และไส้ติ่ง (pyloriccaeca) ค่าความเป็นกรดด่างในกระเพาะอาหารของปลามีสภาวะเป็นกรด (ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 2-4) ซึ่งเป็นสภาวะเหมาะแก่การทำงานของเอนไซม์เปปซิน (pepsin) สำหรับในส่วนของลำไส้มีสภาวะเป็นกลางถึงด่าง (ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 7-11) และพบเอนไซม์อยู่ในอวัยวะดังกล่าว เช่น เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) อะไมเลส (amylase) เป็นต้น ชนิดของเอนไซม์ที่พบในระบบย่อยอาหารของปลาจะขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการกินอาหารของปลา สำหรับไส้ติ่งของปลาจะทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์และช่วยดูดซึมสารอาหาร นอกจากนี้ยังมีน้ำดี (bile) ซึ่งผลิตจากตับ (liver) ถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดี (gall bladder) ของระบบย่อยอาหาร โดยน้ำดีมีหน้าที่ส่งเสริมให้เอนไซม์ไลเปส (lipase) เข้าไปย่อยไขมันในบริเวณลำไส้ (Jobling, 1995: 175 – 210)

2.7.3 ต้องเป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปถึงระบบทางเดินอาหารส่วนท้าย (ลำไส้) ได้

2.7.4 สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในการยึดเกาะเยื่อบุผนังของระบบทางเดินอาหาร

2.7.5 มีความสามารถในการผลิตสารต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่บุกรุกหรือก่อให้เกิดโรค สารที่สร้างขึ้นสามารถเพิ่มความต้านทานต่อการณ์ติดเชื้อภายในลำไส้ได้

2.7.6 กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน ทำให้สัตว์น้ำสร้างแอนติบอดี (antibody) มากขึ้นส่งผลดีให้สัตว์น้ำมีความทนทานต่อแบคทีเรียก่อโรค

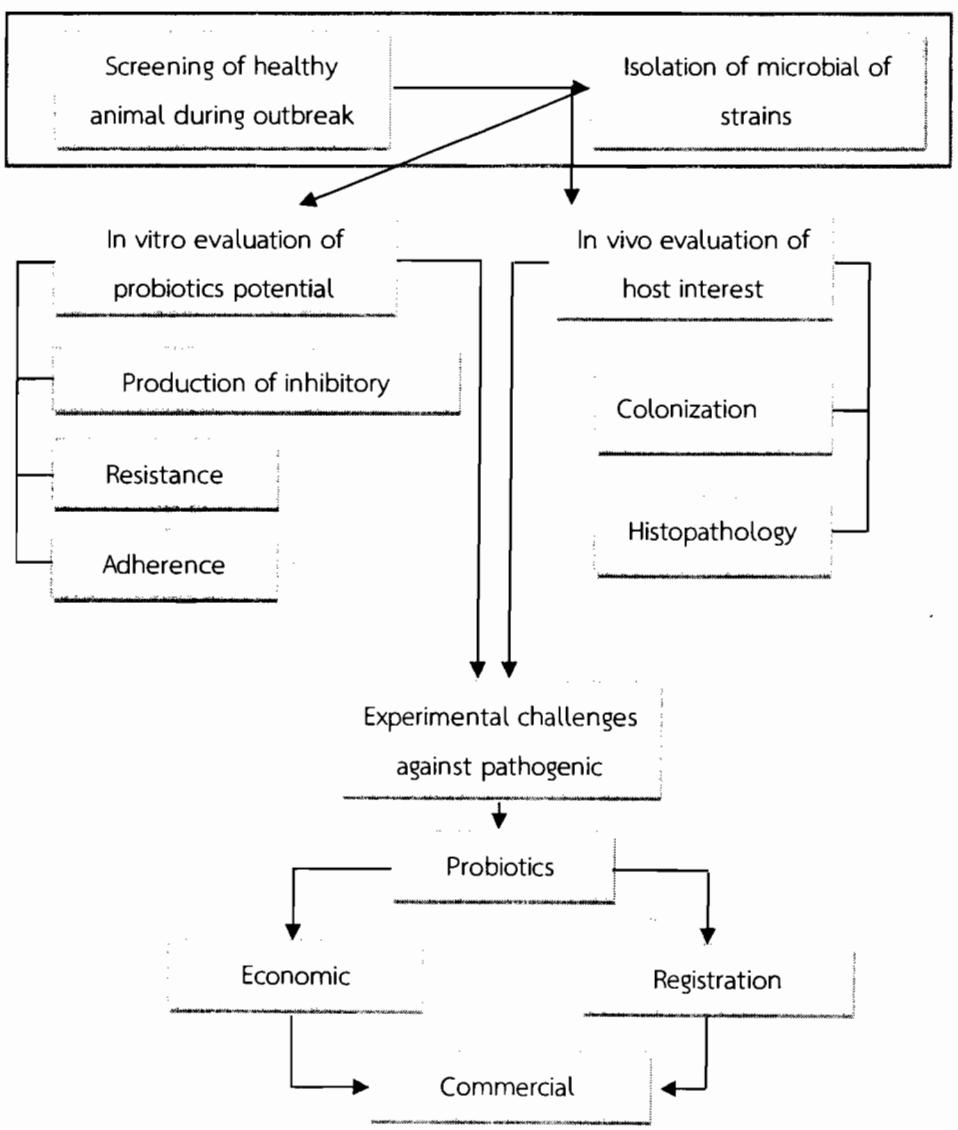
2.7.7 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกส์ที่อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ต้องมีชีวิตอยู่ได้นานเก็บรักษาง่ายและมีชีวิตอยู่ได้นานจนกว่าจะนำมาใช้

2.7.8 มีชีวิตอยู่ได้นานในอาหาร เนื่องจากกระบวนการผลิตอาหารมีปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น กระบวนการให้ความร้อน แรงอัด สภาวะความเป็นกรด การเติมสารบางชนิดลงในอาหารเพื่อช่วยในการถนอมคุณภาพของอาหาร รวมถึงการเติมสารปฏิชีวนะ

2.7.9 ไม่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

2.7.10 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ โดยเพาะเลี้ยงง่ายเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและราคาไม่แพง

Balcaza et al. (2006: 173 – 186) เสนอขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำไปใช้เป็นโปรไบโอติกส์ ดังภาพที่ 3 โดยเริ่มจากทำการคัดเลือกสัตว์ที่แข็งแรงที่อยู่ในช่วงของการระบาดของโรคมาทำการคัดแยกแบคทีเรียโปรไบโอติกส์ หรือทำการแยกจากสัตว์ที่มีสุขภาพดี จากนั้นนำไปทดสอบศักยภาพในการเป็นโปรไบโอติกส์ในหลอดทดลอง เช่น ทดสอบการสร้างสารยับยั้ง การแก่งแย่งอาหาร ความทนทานต่อปัจจัยต่างๆ การยึดเกาะในทางเดินอาหาร นอกจากนี้ควรมีการประเมินศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกส์ในตัวเจ้าบ้านที่สนใจ เช่น ทดสอบความสามารถในการตั้งรกราก และทดสอบทางพยาธิสภาพ ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรคกับสัตว์ที่สนใจ เพื่อประเมินว่าจะสามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกส์ได้หรือไม่




**ภาพที่ 3 ขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำ**

**ที่มา:** Balcaza et al. (2006: 178)

**2.8 กลไกการทำงานของโปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำ**

สำหรับกลไกของโปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำ ที่ช่วยให้สัตว์น้ำทนต่อโรคและส่งเสริมให้สัตว์น้ำมีสุขภาพแข็งแรงขึ้นสามารถแบ่งได้ดังนี้ (Balcazar et al., 2006: 173 – 186)

2.8.1 การสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ (production of inhibitory compounds) พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน กรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น

2.8.2 การยึดเกาะที่เยื่อบุผิวเซลล์ (competition for adhesion sites) การยึดเกาะของโปรไบโอติกส์ที่ครอบครองพื้นที่ของเซลล์เยื่อบุในระบบทางเดินอาหารเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันหรือขัดขวางการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Salmonella* sp. โดยกลไกการยึดเกาะจะเริ่มตั้งแต่ แบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกส์เจริญบนผนังลำไส้ แล้วแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้จำนวนมาก ซึ่งจะขัดขวางไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคมาเกาะบนผนังลำไส้ได้

2.8.3 การเพิ่มภูมิต้านทาน (enhancement of the immune response) เป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำให้มีความทนทานต่อการก่อโรคของไวรัส แบคทีเรีย รา และปรสิต โดยเฉพาะ ในระยะวัยอ่อนของสัตว์น้ำ ซึ่งมีระบบภูมิคุ้มกันที่ยังมีประสิทธิภาพต่ำ (Nikoskelainen et al. 2003: 443 – 452) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยให้อาหารปลาที่ผสมแบคทีเรียกรดแลคติกใช้เป็นโปรไบโอติกส์ (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103) เปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ผสมแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าหลังการให้อาหารเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบ *Lb. rhamnosus* ATCC53103 ในตัวอย่างลำไส้ปลา rainbow trout ปริมาณเซลล์เท่ากับ $9.0 \times 10^9$ โคโลนีต่อกรัม ในขณะที่ชุดควบคุมพบจำนวนเซลล์น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม ส่วนตัวอย่างเมือกบริเวณผิวหนังของปลาดังกล่าวมีจำนวนเซลล์ $1.0 \times 10^3$ - $5.0 \times 10^7$ โคโลนีต่อกรัม ในขณะที่ชุดควบคุมจะไม่พบแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวและน้ำที่ใช้เลี้ยงมีจำนวนเซลล์ $3.9 \times 10^3$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมจะไม่พบแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าค่าที่ใช้ชี้วัดประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันของปลา คือ respiratory burst (RB), Immunoglobulin (Ig) และ serum bactericidal activity (Sb) มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกส์ แสดงให้เห็นว่าโปรไบโอติกส์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันของปลา rainbow trout ได้

2.8.5 การปรับปรุงคุณภาพน้ำ (improvement of water quality) พบว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. สามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ในน้ำไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดย (Dalmin et al. 2001) ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่าสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงให้ดีขึ้น เพิ่มอัตราการรอดและการเจริญเติบโตของกุ้งได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Vibrio* sp. ได้อีกด้วย จากที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นจะเห็นได้ว่า

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้มีส่วนสำคัญในการใช้เป็นสารถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังใช้เป็นวิธีชีวภาพบำบัดหรือการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคในสิ่งมีชีวิต เช่น การใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ การใช้ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียใส่ลงในน้ำหรืออาหารเพื่อป้องกันโรคและเพื่อกระตุ้นให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ดังนั้นการคัดแยกและศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์จากตัวอย่างลำไส้ปลาดุกอุย จึงเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่น่าสนใจ นอกจากนี้การศึกษาคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น รวมถึงคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกส์และการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาดุกบิ๊กอุยที่ความนิยมเลี้ยงอย่างแพร่หลาย

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการ

## 3.1 เชื้อจุลินทรีย์และอุปกรณ์

### 3.1.1 แบคทีเรียทดสอบ (Indicator bacteria)

แบคทีเรียก่อโรคในปลาที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย *Aeromonas hydrophila* AHAQH001 และ AHAQH002 *Strepcoccus agalactiae* SAAQH001 และ SAAQH002 และ *Flavobacterium columnare* FCAQH001 และ FCAQH002 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์

### 3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2.1 สารเคมี

1) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
2) กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
3) แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)
4) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
5) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)
6) แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)
7) แมงกานีสซัลเฟต เตตราไฮเดรต ($MnSO_4.4H_2O$)
8) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ตรีไฮเดรต ($K_2HPO_4.3H_2O$)
9) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$)
10) สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$ solution)
11) N,N,N',N'- Tetramethyl-1,4-phenylene-diammonium dichloride
12) กลีเซอรอลร์ (glycerol)
13) สีย้อมแกรม Gram strains (crystal violet, iodine, Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์, Safranin)
14) McFarland Standard
15) Alcohol ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
16) Phosphate buffer saline (PBS)

17) ชุดจำแนกชนิดแบคทีเรียสำเร็จรูป API 20 strep, API 50 CHL (bioMerieux)

18) ยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 10µg, Oxytetracycline 30µg, Norfloxacin 10µg, Sulphamethoxazole 25µg, Enrofloxacin 5µg, Ciprofloxacin 5µg, Oxolinic acid 2µg, Sulphamethozole Trimethoprim 25µg.

3.1.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Tryticase soyabean agar (TSA)
2) Nutrition Agar (NA)
3) Tryticase soyabean digest medium (TSB)
4) MRS (Man Rogosa and Sharpe) agar
5) MRS (Man Rogosa and Sharpe) broth
6) Yeast extract powder
7) Beef extract powder
8) Brain heart infusion (BHI) agar
9) Agar powder

3.1.2.3 เครื่องมือ

1) เครื่องแก้วที่จำเป็นในการทดลอง เช่น หลอดทดลอง หลอดดักแก๊ส
2) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น CP224S, Germany)
3) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น CP3202S, Germany)
4) เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (Sartorius รุ่น PP-15, Germany)
5) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (J.P.SELECTA รุ่น FUSE (A):10, Japan)
6) ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) (J.P.SELECTA รุ่น FUSE (A):4, Japan)
7) ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) (ESCO@SMART CONTROL)
8) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อระบบความดัน (Autoclave) (TOMY รุ่น SX-700, Japan)
9) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (JULABO รุ่น D-77960, Germany)
10) กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Olympus รุ่น CH-2, Japan)
11) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (รุ่น CE 1010, Germany)
12) ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Mitsubishi รุ่น MR-F36E-GY)
13) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sanyo รุ่น SF-C992, Thailand)
14) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (BRUNSWICK SCIENTIFIC)

15) เครื่องปั่นเหวียงควบคุมอุณหภูมิ certifier (รุ่น MICROFRIGER-BL, Spain)

16) เตาอบไมโครเวฟ (Sharp Microwave oven รุ่น R-215)

17) Vortex (รุ่น FINEVORTEX)

18) เครื่องกรองจุลินทรีย์ปลอดเชื้อ (Sartorius รุ่น Minisart®, Germany)

19) Cycling ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

**3.2 วิธีการ**

**3.2.1 ปลา และการสุ่มตัวอย่าง**

ทำการเพาะพันธุ์ และอนุบาลลูกปลาดุกอุย ณ ฟาร์มประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนในบ่อซีเมนต์ให้อาหารไรแดง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำไปอนุบาลต่อในบ่อดิน และเลี้ยงไว้จนมีขนาดที่ต้องการและให้อาหารสำเร็จรูป 2 ครั้งต่อวัน สุ่มลูกปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 10 $\pm$ 2.4 กรัม โดยสุ่มจำนวน 30 ตัว เพื่อใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลา

**3.2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก**

นำปลามาชั่งไว้ในตู้ทดลองและงดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสลบลูกปลาด้วยน้ำแข็งและใช้เครื่องมือผ่าตัดในการเปิดช่องท้องโดยวิธีที่ปลอดเชื้อ แยกลำไส้ออกมาและนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนัก ล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง และบดตัวอย่างในน้ำเกลือปริมาตร 3 - 5 มิลลิลิตร ก่อนนำสารละลายที่ได้ไปใช้ในการแยกเชื้อ

ทำการเจือจางสารละลายที่ได้จากการบดตัวอย่างลำไส้ โดยเจือจางครั้งละ 10 เท่าและแยกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี spread plate ในอาหาร MRS (de Man – Rogosa and Sharp) agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนบ่มไว้เป็นระยะเวลา 24 – 48 ชั่วโมง

สุ่มเก็บโคโลนีมีบริเวณใส มาเลี้ยงในอาหารจานใหม่ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และนำโคโลนีไปทดสอบการย้อมแกรม การสร้างเอนไซม์คาตาเลต และทดสอบ Oxidase reaction จากนั้นเลือกเฉพาะโคโลนีที่ให้ผลการย้อมแกรมเป็นบวก ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส และให้ผลการทดสอบ Oxidase reaction เป็นลบ และนำเชื้อไปเก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น15 เปอร์เซ็นต์ เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

**3.2.3 การจำแนกคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อที่แยกได้**

3.2.3.1 การทดสอบ Catalase test

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีอายุ 18 – 24 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบไม่ใช้ออกซิเจน จากนั้นหยด $H_2O_2$ solution ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้ loop หรือไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อลงผสมให้เข้ากัน ทำการบันทึกผลการทดสอบ ผลเป็นบวก เกิดฟองแก๊ส ผลเป็นลบ ไม่มีฟอง

3.2.3.2 การทดสอบ Oxidase test

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีอายุ 18 – 24 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแบบไม่ใช้ออกซิเจน หยดสาร tetramethyl-1, 4-pheylene-diammonium dichloride ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระดาษกรอง 1 หยด จากนั้นใช้ loop หรือไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้ว แตะเชื้อเล็กน้อยขีดลงบนกระดาษกรองที่หยดสาร แล้วทำการบันทึกผลการทดสอบผลเป็นบวกเมื่อเกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที ผลเป็นลบไม่มีการเปลี่ยนสีบนกระดาษกรองที่หยด หรือเปลี่ยนสีหลังจาก 60 วินาที

3.2.3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียด้วยการย้อมแกรม Gram strain

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีอายุ 18 – 24 ชั่วโมงบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบไม่ใช้ออกซิเจน นำห่วงถ่ายเชื้อ (loop) เผาไฟจนแดงทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะหยดน้ำ นำมาแตะวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด นำห่วงถ่ายเชื้อ (loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะเชื้อมาผสมกันในหยดน้ำบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด จากนั้นทำให้เชื้อกระจายออกเป็นบริเวณบาง ๆ ปล่อยสไลด์ทิ้งไว้ ในอากาศให้แห้ง (Air dry) สามารถทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์โดยใช้ความร้อน คือ นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อนๆ ประมาณ 4 – 5 ครั้ง ปล่อยให้สไลด์เย็นลงแล้วนำไปทำการย้อมแกรมต่อไป

การย้อมแกรมหยดสี Crystal violet ลงบนแผ่นสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยด Gram iodine ลงบนแผ่นสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออก ล้างแผ่นสไลด์ด้วย Acetone-alcohol (Decolorizer) ให้ Iodine ออกสีเหลือจาง ๆ แล้วล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นย้อมทับด้วยสี Safranin O เป็นเวลา 30 – 60 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง ทำการตรวจดูด้วย Oil immersion lens ของกล้องจุลทรรศน์ ทำการบันทึกผล แบคทีเรียทีเป็นแกรมบวก จะติดสีม่วง หรือน้ำเงินของ Crystal violet แบคทีเรียทีเป็นแกรมลบจะติดสีแดง หรือชมพูของ Safranin o

**3.2.4 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar Spot method**

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แบบไม่ใช้ออกซิเจน จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อนำมาวางเป็นวงกรมบนอาหาร MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแบบไม่ใช้ออกซิเจน

เลี้ยงเชื้อทดสอบ *A. hydrophila, F. columnare* และ *S. agalactiae* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อทำการเตรียม Suspended wash cell

ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 (1.5 x $10^8$ CFU/ml) ใช้ micropipette ดูดเชื้อแล้วเติมลงในหลอดทดลองปริมาณ 700 ไมโครลิตร จากนั้นดูดอาหารแบบกึ่งแข็ง TSB YE (Tryticase soyabean digest medium + Yeast extract ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ + agar ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 6.3 มิลลิลิตร ลงผสมกับเชื้อ แล้วเททับบน MRS agar spot plate ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนแรกนำไปบ่มแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบันทึกผล โดยการวัดขนาดของโคโลนี (colony) (มิลลิเมตร) และขนาดบริเวณใส (clear zone colony) (มิลลิเมตร) จากนั้นนำไปคำนวณค่า inhibition index (Cadirci and Citak, 2005: 237 – 241)

**3.2.5 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสกุล (Genus level)**

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบทุกสายพันธุ์ได้ในระดับดี โดยวิธี agar spot method มาทำการจัดจำแนกในระดับสกุล (Axelsson, 1998: 1 - 72) โดยศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ ดังต่อไปนี้

3.2.5.1 รูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคส

นำ loop เขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์ที่มีอายุ 18 – 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจผลการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส โดย heterofermentative lactic acid bacteria จะพบการสร้างแก๊สในหลอดดักแก๊ส ส่วน homofermentative lactic acid bacteria จะไม่พบการสร้างแก๊ส

3.2.5.2 การทดสอบความสามารถเจริญในอาหารที่มีปริมาณเกลือต่าง ๆ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ผสมเกลือแกลง NaCl ในอัตรา 6.5 และ 18.0 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง (Test tube) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำหลอดดังกล่าวไปบ่มแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเจริญของแบคทีเรียโดยทำการเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม หลอดที่มีความขุ่นแสดงว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้

3.2.5.3 ทดสอบความสามารถเจริญในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง pH 4.4 และ 9.6 ด้วย 2N HCl และ 2N NaOH ตามลำดับที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำหลอดดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเจริญ

ของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอดควบคุม หลอดมีการเปลี่ยนสีหรือมีความขุ่นแสดงว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้

3.2.5.4 ทดสอบการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำหลอดดังกล่าวไปบ่มแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 10, 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน และบ่มที่ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 – 72 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเจริญของแบคทีเรียโดยทำการเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอดควบคุม หลอดที่มีความขุ่นแสดงว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้

บันทึกผลการทดสอบ และทำการจัดจำแนกระดับสกุลตามวิธีการของ (Axelsson, 1998: 1 – 72) และนำไปจำแนกระดับชนิดต่อไป

**3.2.6 การจัดจำแนกในระดับชนิด (Species level)**

นำแบคทีเรียที่ผ่านการจัดจำแนกในระดับสกุลและผ่านการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคทุกสายพันธุ์มาจำแนกในระดับชนิด โดยนำแบคทีเรียดังกล่าวเลี้ยงในอาหาร MRS Agar ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ Loop เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 4.0 สำหรับการทดสอบด้วยชุดทดสอบแบคทีเรียสำเร็จรูป API 20 Strep และเขี่ยเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 2.0 สำหรับการทดสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL ทำตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือที่แนบมากับชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบ API 20 Strep และ API 50 CHL จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้มาแปรผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปของชุดจำแนกแบคทีเรียดังกล่าวใน https://apiweb.biomerieux.com

**3.2.7 การทดสอบกลไกลการสร้างสารยับยั้งด้วยวิธี Disc diffusion method**

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาทำการทดสอบการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion method ตามวิธีการของ Lima et al. (2007: 103 – 107) ด้วยการดัดแปลงเล็กน้อย โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่น (optical density) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร และปรับความขุ่นให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ด้วยอาหารเหลว MRS broth แล้วเติมเชื้อดังกล่าวลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรที่เลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแบบไม่ใช้ออกซิเจน ทำการแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 – 20 นาที เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ (cell- free supernatant) และแบ่งน้ำเลี้ยงเซลล์ออกเป็น 3 ส่วน คือ 1) ส่วนที่ไม่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง pH 2) ส่วนที่ปรับ pH ให้เป็นกลาง

ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 N และ 3) ส่วนที่เป็นกลางและนำไปเติมเอนไซม์ Proteinase K 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (1mg/ml) ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรองน้ำเลี้ยงเซลล์ทั้งสามส่วนผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อความพรุน 0.2 ไมโครเมตร (syling filter, Satorius) และนำไปเก็บไว้ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดสอบในขั้นต่อไป

เขี่ยเชื้อทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวผสมน้ำเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ $10^6$ CFU/ml ดูดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรและเกลี่ยให้กระจาย (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทิ้งไว้ให้แห้ง

นำกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแปะบนหน้าจานอาหารที่ผ่านการเกลี่ยเชื้อทดสอบ จากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ส่วนในปริมาณ 30 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษที่นำมาแปะไว้บนอาหารดังกล่าว ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และใช้ อาหาร MRS broth เป็นชุดควบคุม (negative control) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบบไม่ใช้ออกซิเจน ทำการบันทึกผลโดยการวัดขนาดบริเวณใส

**3.2.8 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติก**

3.2.8.1 การทดสอบความทนทานต่อกรด

เพาะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาได้ บนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อผสมกับสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) นำไปปรับให้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ $10^8$ CFU/ml จากนั้นดูดเชื้อดังกล่าวลงในสารละลาย PBS ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดเท่ากับ 2, 3 และชุดควบคุม ซึ่งใช้ Phosphate buffer saline (PBS) ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงและสุ่มนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ณ เวลาที่ 0 และ 6 ชั่วโมง โดยทำการเกลี่ยเซลล์ บนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

3.2.8.2 การทดสอบความทนทานต่อน้ำดีสดปลอดเชื้อของปลาดุกอุย

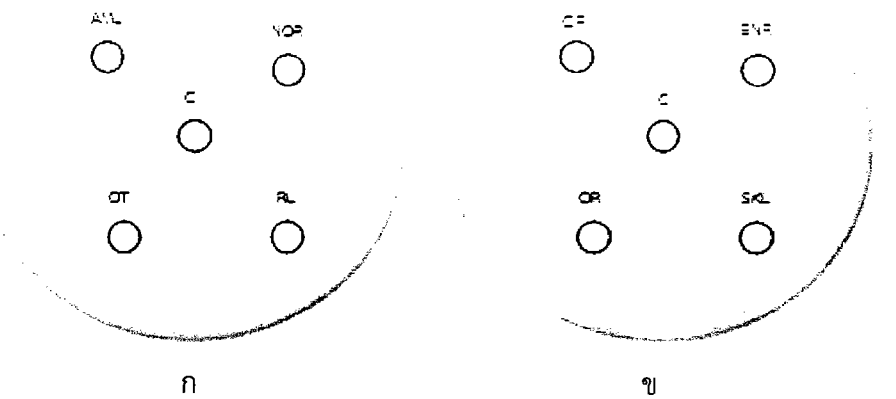
นำปลามาขังไว้ในตู้ทดลอง และทำการอดอาหารเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการสลบปลาด้วยน้ำแข็งและเปิดช่องท้องโดยวิธีที่ปลอดเชื้อ เก็บตัวอย่างน้ำดี และเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในหลอดน้ำเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และปรับระดับความขุ่นของสารละลายแบคทีเรียให้เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ทำการเกลี่ยเชื้อ

ปริมาตร 100 ไมโครลิตรบนอาหาร MRS Agar ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที ใช้ forceps คีบ แผ่นยาปฏิชีวนะ (Antibiotic disc) วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มแบบไม่ใช้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมงจากนั้นทำการบันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (Clear zone (มิลลิเมตร mm))

3.2.8.3 การทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการคัดแยกด้วยวิธี disc diffusion method บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในหลอดน้ำเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบระดับความขุ่นของสารละลายแบคทีเรียให้มีระดับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ทำการเกลี่ยเชื้อ spread plate บนอาหาร MRS Agar ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที ใช้ forcep คีบ แผ่นยาปฏิชีวนะ Antibiotic disc วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมงจากนั้นบันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (Clear zone) (มิลลิเมตร) นำผลดังกล่าวเปรียบเทียบค่าความไวของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยาปฏิชีวนะ



ก ข

**ภาพที่ 4** การวางแผ่นยาปฏิชีวนะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ก: จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วางยา Amoxcyline, Norfloxacin, Oxytetracyclin, Sulphamethoxazole ข: จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วางยา Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Oxolinic acid, Sulphamethoxazole/ Trimethoprim

### 3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรียทดสอบที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (inhibition zone) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ตามแหล่งความผันแปร (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยความแตกต่างของจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกระหว่างชุดควบคุมกับชุดทดสอบความเป็นกรดเท่ากับ 3, 2 และชุดควบคุมกับน้ำดีสดปลาความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างชนิด โดยใช้วิธี t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ และฟาร์มประมง ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

# บทที่ 4
# ผลการศึกษา

## 4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอุย

จากการนำตัวอย่างลำไส้ปลาดุกอุยมาทำการคัดแยกแบคทีเรียด้วยการเกลี่ย (spread plate) บนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งสิ้น 77 ไอโซเลท จากจำนวนแบคทีเรีย 150 ไอโซเลทที่สร้างกรดและทำให้เกิดบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ซึ่งผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียที่แยกได้ให้ผลการย้อมแกรมเป็นแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนดังกล่าวประกอบไปด้วยแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม จำนวน 65 ไอโซเลท และรูปร่างท่อน จำนวน 12 ไอโซเลท (ตารางผนวกผลการศึกษา)

## 4.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ

จากการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 77 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Agar spot method โดยการปลูกเชื้อแบบจุดบนอาหารแข็ง MRS Agar เททับด้วยอาหารกึ่งแข็ง TSBYE soft agar ที่ผสมเชื้อทดสอบ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทุกไอโซเลทแสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 3) ทั้งนี้ความสามารถของการยับยั้งขึ้นอยู่กับไอโซเลทและสายพันธุ์ของเชื้อทดสอบ โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 54 ไอโซเลท หรือเท่ากับ 70.1 เปอร์เซ็นต์สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อ *A. hydrophilla* (AHAQH001), 63 ไอโซเลท หรือเท่ากับ 81.8 เปอร์เซ็นต์สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อ *A. hydrophilla* (AHAQH002), 59 ไอโซเลท หรือเท่ากับ 76.7 เปอร์เซ็นต์สร้างสารยับยั้งเชื้อ *S. agalacteae* (SAAQH001), 62 ไอโซเลทหรือเท่ากับ 80.5 เปอร์เซ็นต์สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อ *S. agalacteae* (SAAQH002) 72 ไอโซเลทหรือเท่ากับ 93.5 เปอร์เซ็นต์สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อ *F. columnare* (FCAQH001) และ 67 ไอโซเลท หรือเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อ *F. columnare* (FCAQH002) และมีเพียง 31 ไอโซเลทหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่แยกได้เท่านั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ทั้งนี้พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 9 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วย ไอโซเลทที่ 5, 15, 28, 30, 47, 53, 68, 76 และ 106 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (inhibitory zones) อยู่ระหว่าง 10 – 50 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 3 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้**

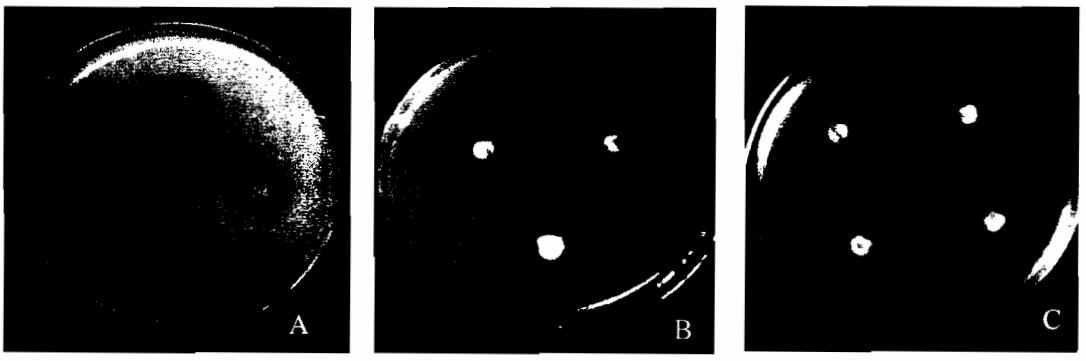
| แบคทีเรียทดสอบ | จำนวนไอโซเลท (n=77) | เปอร์เซ็นต์ไอโซเลทยับยั้ง (%) |
|---|---|---|
| *Aeromonas hydrophila* AHAQH001 | 54 | 70.1 |
| *Aeromonas hydrophila* AHAQH002 | 63 | 81.8 |
| *Streptococcus agalactiae* SAAQH001 | 59 | 76.6 |
| *Streptococcus agalactiae* SAAQH002 | 62 | 80.5 |
| *Flavobacterium columnare* FCAQH001 | 72 | 93.5 |
| *Flavobacterium columnare* FCAQH002 | 67 | 87 |

**ตารางที่ 4 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาของแบคทีเรียกรดแลคติก**

| ไอโซเลท | แบคทีเรียทดสอบ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | AHAQH 001 | AHAQH 002 | SAAQH 001 | SAAQH 002 | FCAQH 001 | FCAQH 002 |
| 5 | + | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 15 | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| 28 | + | ++ | + | + | + | + |
| 30 | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 47 | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ |
| 53 | + | + | + | + | + | ++ |
| 68 | + | ++ | + | + | ++ | ++ |
| 76 | + | ++ | + | ++ | +++ | +++ |
| 106 | + | +++ | + | ++ | ++ | ++ |

เครื่องหมาย + แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง

(+) = 10 – 25 มิลลิเมตร, (++) = 26 – 38 มิลลิเมตร, (+++) = 39 – 50 มิลลิเมตร




**ภาพที่ 5** ตัวอย่างความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้แก่ *A. hydrophila* (A), *S. agalactiae* (B) และ *F. columnare* (C)

### 4.3 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสกุลและชนิด

#### 4.3.1 การจำแนกระดับสกุล (Genus level)

จากการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทุกสายพันธุ์ได้ในระดับดี มาทำการจัดจำแนกสกุล โดยทำการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การเจริญในเกลือแกง NaCl ความเข้มข้นต่างๆ การเจริญในสภาพความเป็นกรดเป็นด่างต่างๆ และการสร้างแก๊สในกระบวนการ ใช้กลูโคส จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับตารางคุณสมบัติต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลต่างๆ ตามวิธีการของ(Axelsson 1998: 1 – 72) พบว่า พบว่าไอโซเลทที่ 5, 15, 28, 30, 47 และ 106 จัดอยู่ในสกุล *Enterococcus* ไอโซเลทที่ 53 และ 68 จัดอยู่ในสกุล *Lactococcus* ส่วนไอโซเลทที่ 76 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* (ตารางที่ 5)

#### 4.3.2 การจำแนกในระดับชนิด (Species level)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลทมาจัดจำแนกในระดับชนิด โดยใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูปแบบ API 20 Strep (bioMerieux) สำหรับการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* และ *Lactococcus* และ API 50 CHL (bioMerieux) สำหรับการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* พบว่าได้ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8 เมื่อนำผลการทดสอบที่ได้ ไปผ่านกระบวนการประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปที่ใช้สำหรับชุดจำแนก API 20 Strep และ API 50 CHL พบว่าแบคทีเรียสกุล *Enterococcus* ทั้ง 6 ไอโซเลทมีคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงกับ *E. faecium* ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนก 99.5 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสกุล *Lactococcus* ทั้ง 2 ไอโซเลทมีคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงกับ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนก 93.8 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* 1 ไอโซเลทมีคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงกับ *Lactobacillus brevis* ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนก 93.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

**ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ข้อมูลเทียบกับตารางมาตรฐาน**

| การทดสอบต่างๆ | สายพันธุ์ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Ent. faecium* (n=6) | | *Lc. lactis* ssp. *lactis* (n=2) | | *L. brevis* (n=1) | |
| รูปร่างของแบคทีเรีย | กลม | กลม | กลม | กลม | ท่อน | ท่อน |
| การติดสีแกรม | แกรมบวก | แกรมบวก | แกรมบวก | แกรมบวก | แกรมบวก | แกรมบวก |
| เอนไซม์คาตาเลต | ⁻ve | ⁻ve | ⁻ve | ⁻ve | ⁻ve | ⁻ve |
| อุณหภูมิ 10°C | ⁺ve | ⁺ve | ⁺ve | ⁺ve | ±ve | ⁺ve |
| อุณหภูมิ15°C | | ⁺ve | | ⁺ve | | ⁺ve |
| อุณหภูมิ 45°C | ⁺ve | ⁺ve | ⁻ve | ⁺ve | ±ve | ⁺ve |
| ความเค็ม 6.5 % | ⁺ve | ⁺ve | ⁻ve | ⁻ve | ±ve | ⁺ve |
| ความเค็ม 18 % | ⁺ve | ⁺ve | ⁻ve | ⁺ve | ±ve | ⁺ve |
| ความเป็นกรดเป็นด่าง pH 4.4 | ⁺ve | ⁺ve | ⁺ve | ⁺ve | ⁻ve | ⁺ve |
| ความเป็นกรดเป็นด่าง pH 9.6 | ⁺ve | ⁺ve | ⁻ve | ⁻ve | ±ve | ⁺ve |
| การสร้างแก๊ส | ⁻ve | ⁻ve | ⁻ve | ⁻ve | ⁻ve | ⁻ve |

ในกรอบสีแดง (▭) คือ ผลที่ได้จากการศึกษา ⁻ve = ผลการทดสอบเป็นลบ ⁺ve = ผลการทดสอบเป็นบวก

**ที่มา**: Axelsson, (1998: 1 – 72)

**ตารางที่ 6 การอ่านผลผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ใน apiweb**

| ชนิด | เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% of identify) |
|---|---|
| *Enterococcus faecium* (n=6) | 99.5 |
| *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (n=2) | 93.8 |
| *Lactobacillus brevis* (n=1) | 93.6 |

**ตารางที่ 7** ผลการทดสอบทางชีวะเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Enterococcus*, *Lactococcus* ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 strep

| API 20 strep (bioMerieux) | สายพันธุ์ | |
|---|---|---|
| | *Ent. faecium* 05, 15, 28, 30, 47,106 | *Lc. lactis ssp. lactis* 53, 68 |
| Voges-Proskauer | $^{+}$ve | $^{+}$ve |
| Hippurate hydrolysis | $^{-}$ve | $^{-}$ve |
| Esculin hydrolysis | $^{+}$ve | $^{+}$ve |
| Pyrrolidonyl aminopeptidase | $^{-}$ve | $^{-}$ve |
| α–Galactosidase | $^{-}$ve | $^{-}$ve |
| β-Glucuronidase | $^{-}$ve | $^{-}$ve |
| β-Galactosidase | $^{+}$ve | $^{-}$ve |
| Alkaline phosphatase | $^{+}$ve | $^{-}$ve |
| Leucine arylamidase | $^{+}$ve | $^{+}$ve |
| Arginine dihydrolase | $^{+}$ve | $^{+}$ve |
| Ribose | $^{+}$ve | $^{-}$ve |
| Arabinose | $^{+}$ve | $^{-}$ve |
| Mannitol | $^{-}$ve | $^{+}$ve |
| Sorbitol | $^{-}$ve | $^{-}$ve |
| Lactose | $^{+}$ve | $^{-}$ve |
| Trehalose | $^{+}$ve | $^{+}$ve |
| Inulin | $^{-}$ve | $^{-}$ve |
| D-Raffinose | $^{-}$ve | $^{-}$ve |
| Hydrolyse amidon | $^{-}$ve | $^{-}$ve |
| Glycogen | $^{-}$ve | $^{-}$ve |
| β-haemolysis | $^{-}$ve | $^{-}$ve |

$^{-}$ve = การทดสอบเป็นลบ $^{+}$ve = การทดสอบเป็นบวก

**ตารางที่ 8 ผลการทดสอบทางชีวะเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lacto*bacillus ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL**

Strep 0 – 19

| Tube | Active ingredients | Result |
|---|---|---|
| 0 | CONTOL | - |
| 1 | GLYcerol | - |
| 2 | ERYthritol | - |
| 3 | D-ARAbinose | - |
| 4 | L-ARAbinose | + |
| 5 | D-RIBose | + |
| 6 | D-XYLose | + |
| 7 | L-XYLose | - |
| 8 | D-ADOnitol | - |
| 9 | Methyl-βD-Xylopyranoside | - |
| 10 | D-GALactose | + |
| 11 | D-GLUcose | + |
| 12 | D-FRUctose | + |
| 13 | D-MaNose | - |
| 14 | L-SorBosE | - |
| 15 | L-RHAmnose | - |
| 16 | DULcitol | - |
| 17 | INOsitol | - |
| 18 | D-MANnitol | - |
| 19 | D-SORbitol | - |

Strep 20 – 39

| Tube | Active Ingredients | Result |
|---|---|---|
| 20 | Methyl-αD-Mannopyranoside | - |
| 21 | Methyl-αD-Glucopyranoside | - |
| 22 | N-AcetylGlucosamine | + |
| 23 | AMYgdalin | - |
| 24 | ARButin | - |
| 25 | ESCulin ferric citrate | - |
| 26 | SALicin | - |
| 27 | D-CELlobiose | - |
| 28 | D-MALtose | + |
| 29 | D-LACtose (bovin origin) | - |
| 30 | D-MELibiose | + |
| 31 | D-SACcharose (sucrose) | + |
| 32 | D-TREhalose | - |
| 33 | INUlin | - |
| 34 | D-MeLeZitose | - |
| 35 | D-RAFfinose | - |
| 36 | AmiDon (starch) | |
| 37 | GLYGcoGen | - |
| 38 | XyLiTol | - |
| 39 | GENtiobiose | - |

Strep 40 – 49

| Tube | Active Ingredients | Result |
|---|---|---|
| 40 | D-TURanose | - |
| 41 | D-LYXose | - |
| 42 | D-TAGatose | - |
| 43 | D-FUCose | - |
| 44 | L-FUCose | - |
| 45 | D-ARabitoL | - |
| 46 | L-ARabitoL | - |
| 47 | Potassium GlucoNaTe | + |
| 48 | Potassium 2-KetoGluconate | - |
| 49 | Potassium 5-KetoGluconate | + |

**4.4 กลไกการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค**

จากการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้ในระดับดี ด้วยวิธี Agar spot test จำนวน 9 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลวด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารยับยั้งที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับค่า pH (cell-free culture supernatant) จะมีค่าแตกต่างกันไป โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส อยู่ระหว่าง 6.6 – 17.0 มิลลิเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับไอโซเลท และสายพันธุ์ของแบคทีเรียทดสอบ เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ปรากฏบนแบคทีเรียทดสอบพบว่า *F. columnare* มีความไวต่อสารยับยั้งที่สร้างจาก *E. faecium* และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* มากกว่า *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งอยู่ระหว่าง 16.0 – 16.8 มิลลิเมตร และ 14.5 – 16.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ *L. brevis* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ได้ดีกว่า *E. faecium* และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคนี้เป็นผลมาจากสารยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ ซึ่งทำให้เกิดสภาพเป็นกรด

**ตารางที่ 9 ผลความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ต่อการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion method แบบไม่ปรับค่าความเป็นกรด**

| ชนิด | ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (mm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | AHAQH0 01 | AHAQH0 02 | SAAQH0 01 | SAAQH0 02 | FCAQH0 01 | FCAQH0 02 |
| *Ent. faecium* (n=6) | 6.6(0.01)* Bb | 8.8(0.03) Bb | 7.2(0.03) Bb | 7.3(0.01) Bb | 16.8(0.03) Aab | 16.0(0.04) Aa |
| *Lc. lactis* ssp. *lactis* (n=2) | 7.1(0.01) Bb | 9.0(0.01) Bb | 7.2(0.04) Ab | 7.3(0.01) Bb | 15.6(0.01) Ab | 16.0(0.03) Aa |
| *L. brevis* (n=1) | 16.0(0.05) Aa | 16.0(0.03) Aa | 14.5(0.05) Aa | 15.6(0.03) Aa | 17.0(0.00) Aa | 16.0(0.10) Aa |

[a]อักษรตัวพิมพ์ใหญ่แสดงการเปรียบเทียบความไวของแบคทีเรียทดสอบต่อสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลท (แนวนอน)

อักษรตัวพิมพ์เล็กแสดงการเปรียบเทียบความสามารถของสารยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละสายพันธุ์ (แนวตั้ง)

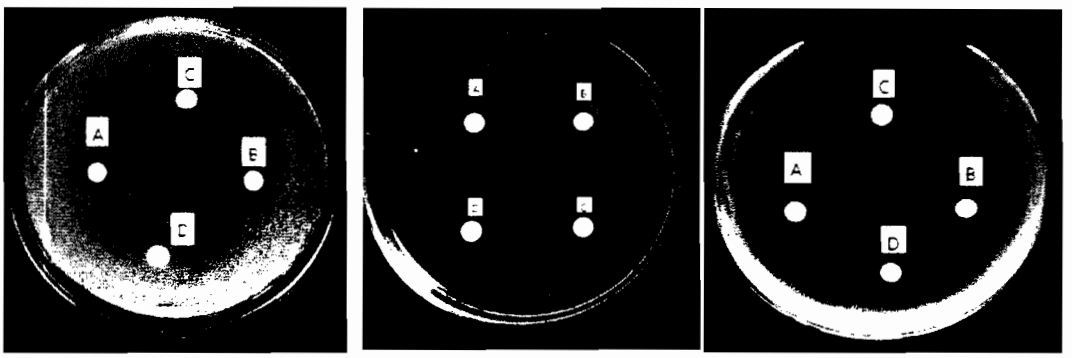
ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เมื่อใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับค่า pH (neutralized culture supernatant) เพื่อกำจัดความสามารถในการยับยั้งที่เป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลทสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งอยู่ระหว่าง 6.1 – 10.8 มิลลิเมตร เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ปรากฏบนแบคทีเรียทดสอบพบว่า *A. hydrophila* มีความไวต่อสารยับยั้งที่สร้างจาก *L. brevis* ได้มากกว่า *F. columnare* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และ *L. brevis* ยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila*, *S. agalactiae* และ *F. columnare* ได้ดีกว่า *E. faecium* และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 10) ในขณะที่ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาพเป็นกลางและผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K (proteinase K - treated culture supernatant) (ภาพที่ 5) ยืนยันได้ว่านอกเหนือจากกรดอินทรีย์แล้ว แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลทนี้สามารถสร้างสารยับยั้งประเภทโปรตีนหรือแบคเทอริโอซินได้

**ตารางที่ 10 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารยับยั้งที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการปรับค่าความเป็นกรด pH (neutralized culture supernatants)**

| ชนิด | ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (mm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | AHAQH 001 | AHAQH 002 | SAAQH 001 | SAAQH 002 | FCAQH 001 | FCAQH 002 |
| *Ent. faecium* (n=6) | 6.4(0.02)* Ab | 6.6(0.02) Ab | 6.3(0.02) Ab | 6.5(0.02) Ab | 6.4(0.02) Ab | 6.6(0.01) Ab |
| *Lc. lactis* ssp. *lactis* (n=2) | 6.3(0.00) Ab | 6.3(0.00) Ab | 6.2(0.01) Ab | 6.1(0.02) Ab | 6.2(0.02) Ab | 6.7(0.02) Ab |
| *L. brevis* (n=1) | 10.8(0.05) Aa | 10.7(0.03) Aa | 10.5(0.08) ABa | 10.2(0.07) Aa | 8.9(0.02) Ca | 9.0(0.03) BCa |

[a]อักษรตัวพิมพ์ใหญ่แสดงการเปรียบเทียบความไวของแบคทีเรียทดสอบต่อสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลท (แนวนอน)
อักษรตัวพิมพ์เล็กแสดงการเปรียบเทียบความสามารถของสารยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละสายพันธุ์ (แนวตั้ง)
ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)




**ภาพที่ 6** การยับยั้งเชื้อก่อโรคของน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก (A) ไม่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (B) ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (C) ชุดควบคุม (D) ใช้เอนไซม์ช่วยย่อย Proteinase k

## 4.5 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

### 4.5.1 การทดสอบความทนทานต่อความเป็นกรด

จากการศึกษาความทนทานต่อความเป็นกรดต่าง ๆ โดยการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการคัดแยกด้วย 2 วิธี agar spot method และ Disc diffusion method ของการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคและจากการทดสอบชนิดของแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ ลงในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดเท่ากับ 6.5 (ชุดควบคุม), 3 และ 2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง OD = $600_{nm}$ และทำการเกลี่ย spread place บนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ของ *Ent. faecium, Lc. lactic* ssp. *lactis* และ *L. brevis* จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมงที่ทำการศึกษา (ผนวกตาราง ค.7) จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ชุดควบคุม pH 6.5 กับชุดทดสอบความทนทานต่อความเป็นกรดเท่ากับ 3 และ 2 ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบความทนทานต่อกรดที่ระดับค่าความเป็นกรดเท่ากับ 3 และ 2 จะไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 11) และพบว่าปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 3 และ 2 จะลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง

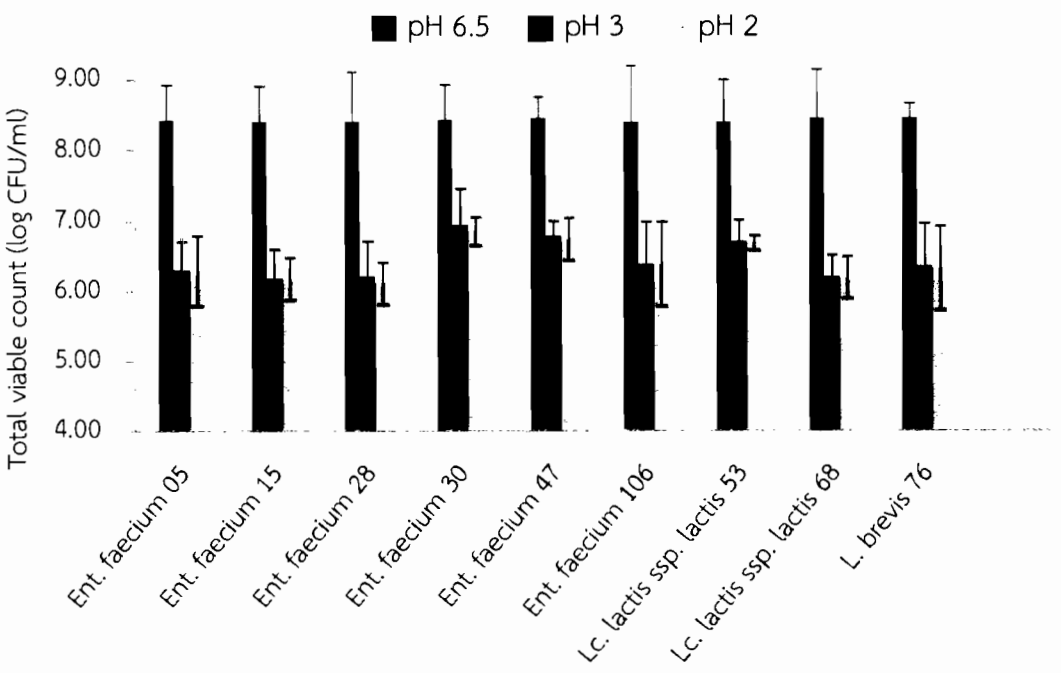
จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดพบว่ากลุ่ม *Ent. faecium* สามารถทนกรดได้ดีกว่า *L. brevis* ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วน *Ent. faecium* และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* จะไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ ($P>0.05$) ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 7

**ตารางที่ 11 จำนวนเซลล์จากการทดสอบความทนทานต่อกรดของแบคทีเรียกรดแลคติก**

| ชนิด | จำนวนเซลล์ (Log CFU/ml) | | |
|---|---|---|---|
| | pH 6.5 | pH 3 | pH 2 |
| *Ent. faecium* 05 | $(8.43 \pm 0.5)^{A,b}$ | $(6.30 \pm 0.4)^{B,b}$ | $(6.29 \pm 0.5)^{B,b}$ |
| *Ent. faecium* 15 | $(8.41 \pm 0.5)^{A,bc}$ | $(6.19 \pm 0.4)^{B,bc}$ | $(6.18 \pm 0.3)^{B,bc}$ |
| *Ent. faecium* 28 | $(8.41 \pm 0.7)^{A,bc}$ | $(6.22 \pm 0.5)^{B,bc}$ | $(6.11 \pm 0.3)^{B,bc}$ |
| *Ent. faecium* 30 | $(8.44 \pm 0.5)^{A,bc}$ | $(6.95 \pm 0.5)^{B,bc}$ | $(6.87 \pm 0.2)^{B,bc}$ |
| *Ent. faecium* 47 | $(8.47 \pm 0.3)^{A,b}$ | $(6.80 \pm 0.2)^{B,b}$ | $(6.75 \pm 0.3)^{B,b}$ |
| *Ent. faecium* 106 | $(8.41 \pm 0.8)^{A,b}$ | $(6.40 \pm 0.6)^{B,b}$ | $(6.39 \pm 0.6)^{B,b}$ |
| *Lc. lactis* ssp. *lactis* 53 | $(8.41 \pm 0.6)^{A,c}$ | $(6.73 \pm 0.3)^{B,c}$ | $(6.70 \pm 0.1)^{B,c}$ |
| *Lc. lactis* ssp. *lactis* 68 | $(8.46 \pm 0.7)^{A,b}$ | $(6.22 \pm 0.3)^{B,b}$ | $(6.20 \pm 0.3)^{B,b}$ |
| *L. brevis* 76 | $(8.48 \pm 0.2)^{A,a}$ | $(6.38 \pm 0.6)^{B,a}$ | $(6.39 \pm 0.6)^{B,a}$ |

[a]อักษรตัวพิมพ์ใหญ่แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ค่าความความเป็นกรด pH 6.5, 3 และ 2 ในช่วงสิ้นสุดการทดสอบ (แนวนอน) ค่าตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างในทางสถิติ ($P< 0.05$)

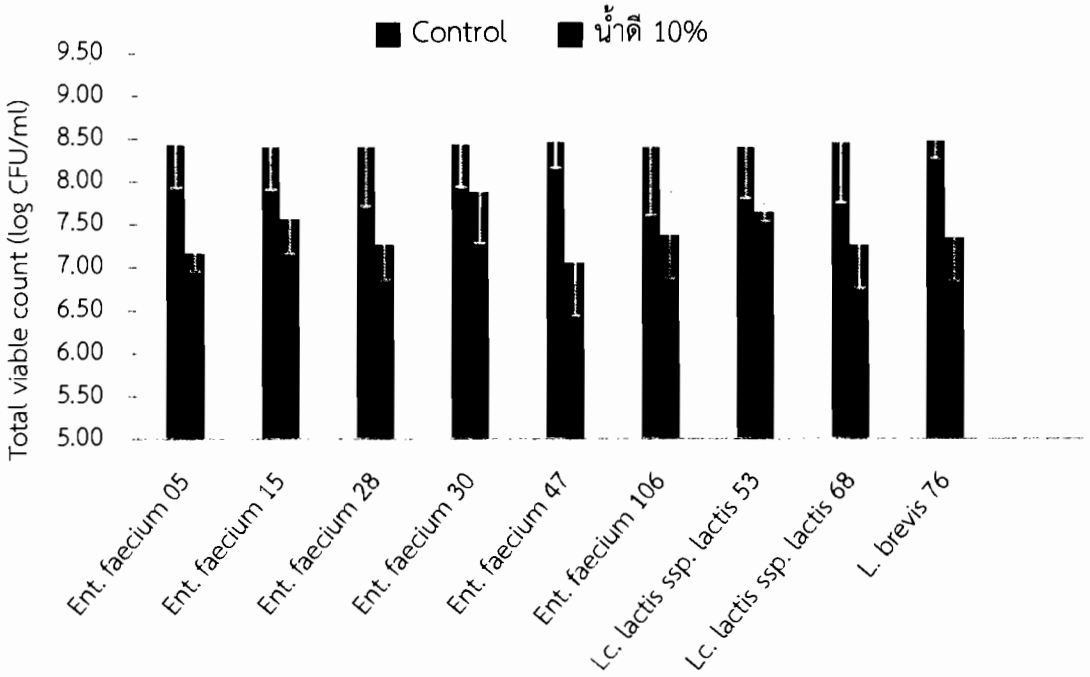
อักษรตัวพิมพ์เล็กแสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด ในช่วงระยะสิ้นสุดการทดสอบ (แนวตั้ง) ค่าตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างในทางสถิติ ($P< 0.05$)




**ภาพที่ 7 ความทนต่อค่าความเป็นกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้หลังจาก 6 ชั่วโมง**

### 4.5.2 การทดสอบความทนทานต่อน้ำดีสดของปลาดุกอุย

จากการศึกษาความทนทานของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อน้ำดีสดปลอดเชื้อของปลาดุกอุย โดยการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการคัดแยกได้ลงในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ที่ไม่เจือจางน้ำดีสด และสารละลาย (PBS) ที่ทำการเจือจางน้ำดีสดปลาดุกอุยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ และจากการวิเคราะห์ข้อมูลค่าความแปรปรวนของแบคทีเรียแต่ชนิดพบว่าปริมาณเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดในชุดควบคุม *Ent. faecium, Lc. lactic* ssp. *lactis*, *L. brevis* ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นของแต่ละชนิดจะไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าความแปรปรวนของชุดทดสอบน้ำดีสดปลาดุกอุยความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 12) จากตารางแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *Ent. faecium* 30 สามารถทนทานหรืออยู่รอดได้ดีกว่า *Ent. faecium* 47 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนชนิดอื่น คือ *Ent. faecium, Lc. lactis* ssp. *lactis* และ *L. brevis* สามารถอยู่รอดได้ในน้ำดีสดปลาดุกอุยความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ ($P>0.05$) จากผลการทดสอบแสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทัง 9 ไอโซเลทสามารถอยู่รอดในน้ำดีสดปลาดุกอุยที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์




**ภาพที่ 8 ผลการทดสอบความทนต่อน้ำดีสดปลาดุกอุยของแบคทีเรียกรดแลคติที่คัดแยกได้หลังจาก 6 ชั่วโมง**

**ตารางที่ 12 จำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกจากการทดสอบความทนทานต่อน้ำดีสดปลาดุกอุย**

| ชนิด | จำนวนเซลล์ (Log CFU/ml) | |
|---|---|---|
| | Control | น้ำดีสดปลาดุกอุย 10 % |
| *Ent. faecium* 05 | $(8.43 \pm 0.5)^{A,bc}$ | $(7.16 \pm 0.2)^{B,bc}$ |
| *Ent. faecium* 15 | $(8.41 \pm 0.5)^{A,bc}$ | $(7.56 \pm 0.4)^{B,bc}$ |
| *Ent. faecium* 28 | $(8.41 \pm 0.7)^{A,c}$ | $(7.26 \pm 0.4)^{B,c}$ |
| *Ent. faecium* 30 | $(8.41 \pm 0.7)^{A,a}$ | $(7.88 \pm 0.6)^{B,a}$ |
| *Ent. faecium* 47 | $(8.47 \pm 0.3)^{A,bc}$ | $(7.05 \pm 0.6)^{B,bc}$ |
| *Ent. faecium* 106 | $(8.41 \pm 0.8)^{A,bc}$ | $(7.37 \pm 0.5)^{B,bc}$ |
| *Lc. lactis* ssp. *lactis* 53 | $(8.41 \pm 0.6)^{A,bc}$ | $(7.64 \pm 0.1)^{B,bc}$ |
| *Lc. lactis* ssp. *lactis* 68 | $(8.46 \pm 0.7)^{A,abc}$ | $(7.26 \pm 0.5)^{B,abc}$ |
| *L. brevis* 76 | $(8.48 \pm 0.2)^{A,ab}$ | $(7.34 \pm 0.5)^{B,ab}$ |

[a]อักษรตัวพิมพ์ใหญ่แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบน้ำดีสดปลาดุกอุย10 เปอร์เซ็นต์ในช่วงสิ้นสุดการทดสอบ (แนวนอน) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างในทางสถิติ ($P< 0.05$)

[a]อักษรตัวพิมพ์ใหญ่แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด ในช่วงสิ้นสุดการทดสอบ (แนวตั้ง) ค่าตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างในทางสถิติ ($P< 0.05$)

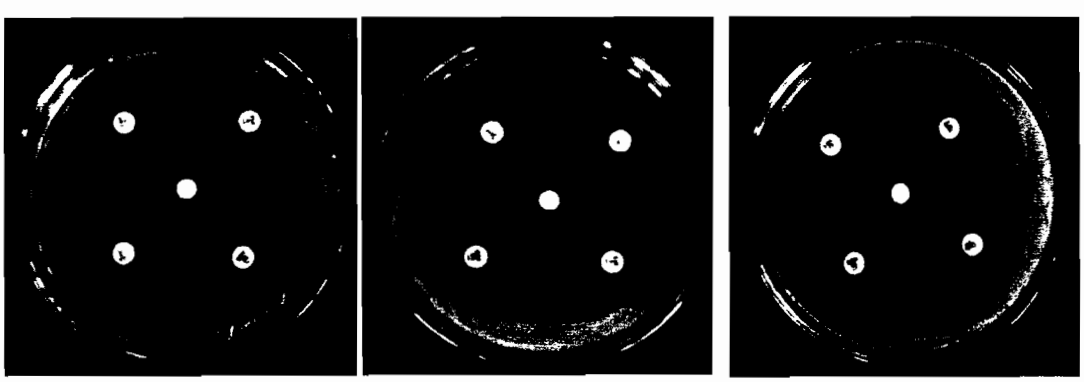
### 4.6 การทดสอบความต้านทานต่อการต้านยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำนวน 8 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท พบว่าส่วนใหญ่ *Ent. faecium* และ *L. brevis* มีความต้านทานต่อยา Amoxycilin, Norfloxacin, Oxytetracyclin, Sulphamethoxazole, Oxolinic acid, Ciprofloxacin, Enrofloxacin และ Sulphamethoxazole/Trimethoprim ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 0 – 15 มิลลิเมตรพบว่า *Ent. faecium* ไอโซเลท 28 มีความต้านทานต่อยา Oxolinictacid และ Sulphamethoxazole แต่ไม่มีความต้านทานต่อยา Amoxcylin, Norfloxacin, Oxytetracyclin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin และ Sulphamethoxazole/ Trimethoprim ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 21 – 32 มิลลิเมตร และยังพบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* ทั้ง 2 ไอโซเลทมีความต้านทานต่อยา Sulphamethoxazole, Oxolinic acid และ Sulphamethoxazole/Trimethoprim แต่จะมีความต้านทานต่อยา Amoxcylin และ Oxytetracyclin ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 24 – 29 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 13

**ตารางที่ 13 ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้**

| ยาปฏิชีวนะ | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสของยาปฏิชีวนะ (mm) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Ent. faecium* | | | | | | *Lc. lactis ssp. lactis* | | *L. brevis* 76 |
| | 05 | 15 | 28 | 30 | 47 | 106 | 53 | 68 | |
| AML(10 µg) | 15 | 15 | 29 | 16 | 16 | 16 | 24 | 26 | 15 |
| NOR(10 µg) | 6 | 6 | 21 | 0 | 0 | 0 | 12 | 10 | 0 |
| OT(30 µg) | 15 | 15 | 32 | 14 | 16 | 15 | 27 | 29 | 16 |
| SL(25 µg) | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CIP(5 µg) | 6 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0 | 14 | 12 | 0 |
| ENR(10 µg) | 9 | 9 | 29 | 9 | 9 | 11 | 16 | 17 | 10 |
| OA(2 µg) | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ST(25 µg) | 6 | 0 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

AML= Amoxycilin, NOR = Norfloxacin, OT = Oxytetracyclin, SL = Sulphamethoxazole,
CIP = Ciprofloxacin, ENR = Enrofloxacin, OA = Oxolinic acid, Sulphamethoxazole/ Trimethoprim



**ภาพที่ 9 ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก**

# บทที่ 5
# อภิปรายผล

การศึกษานี้เป็นการทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลำไส้ปลาดุกในการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกส์แก่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงปลาดุกอุย จากการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 9 ไอโซเลท จากแบคทีเรียทั้งสิ้น 77 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ในระดับดีทั้ง 6 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar spot test ซึ่งเป็นวิธีการเบื้องต้นที่นำมาใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกต่อผู้ปฏิบัติงาน (Cadirci and Citak, 2005: 237 – 241) โดยบริเวณใสที่ปรากฏบนเชื้อก่อโรคนั้นเป็นผลมาจากสารยับยั้งทุกประเภทที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาจัดจำแนกระดับสกุล (Axelsson, 1998: 1 – 72) โดยการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา การเจริญของเชื้อในอาหารเหลว MRS และสภาวะการบ่มเชื้อที่แตกต่างกันและการจำแนกในระดับชนิด โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาทั้ง 9 ไอโซเลทประกอบไปด้วย *Enterococcus faecium* จำนวน 6 ไอโซเลท *Lactococcus lactis* spp. *lactis* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *Lactobacillus brevis* 1 ไอโซเลทที่ระดับความถูกต้องของการจำแนก เท่ากับ 99.5, 93.8 และ 93.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สัตว์น้ำแต่ละชนิดจะมีปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แตกต่างกันมีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Enterococcus* ได้จากสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น การคัดแยก *Ent. faecium*, *Ent. casseliflavus*, *Ent. faecalis*, *Ent. mundtii* และ *Ent. raffinosus* จากฟาร์มปลาในประเทศไทย (Petersen and Dalsgaard, 2003: 395 – 402) การคัดแยก *Ent. faecium*, *Ent. durans* และ *Ent. avium* จากปลา *Prochilodus argenteus Agassiz* (Silva et al., 2005: 1686 – 1698) การคัดแยก *Ent. faecium, Leuconostoc mesenteroides, L. fermentum, L. plantalum* จากปลานิล (Zapata, 2013: 2157 – 6076) การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *Enterococcus* sp. จากปลา brown trout (Gonzalez et al., 2000: 383 – 391) การคัดแยก *Ent. faecalis* จากปลาในประเทศไอซ์แลนด์ (Iceland) (Nilsen et al., 2003: 2975 – 2984) และจากปลาช่อน Snakehead fish (*Channa striatus*) (Allameh et al., 2014: 2215 – 2222)

นอกจากนั้นยังมีการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lc. lactis* จากฟาร์มเลี้ยงปลา turbot (*Psetta maxima*) จากปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Campos et al., 2006: 356 – 364; Zhou et al., 2010: 73 – 80) และการคัดแยก *Lc. lactis* TW34 จากปลา Patagonian fish (*Odontesthes platensis*) (Sequeiros et al., 2010: 237 – 245; Sun et al., 2012: 218 – 289) เช่นเดียวกับ *L. brevis* ที่สามารถคัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลาหลายชนิด เช่น ปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) (Bucio et al., 2006: 476 – 482) ปลายีสกเทศ (*Cirrhinus mrigala*) (Banerjee et al., 2013: 17 – 25) และ ปลากระบอก (*Mugil cephalus*) (Ghosh et al., 2014: 1 - 11)

เพื่อตรวจสอบรูปแบบของสารยับยั้งที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาผลิตขึ้น จึงมีการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งด้วยวิธี disc diffusion method ซึ่งเป็นการทดสอบกิจกรรมการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว โดยเฉพาะการสร้างสารยับยั้งประเภทโปรตีน หรือแบคเทอริโอซินในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH เพื่อกำจัดกรดอินทรีย์ และได้ดำเนินการทดสอบภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เพื่อยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Lima et al., 2007: 103 – 107) โดยกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสามารถประเมินได้จากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนแบคทีเรียทดสอบ (May-Harting et al., 1972: 315 – 422) จากการทดสอบพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับค่า pH มีขนาดลดลงไปจากเดิมที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับค่า pH บ่งชี้ว่ากลไกหนึ่งของการยับยั้งมาจากการสร้างกรดอินทรีย์ ส่วนบริเวณใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับค่า pH นั้นเป็นผลมาจากการผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารยับยั้งประเภทโปรตีน สอดคล้องกับผลการทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพให้เป็นกลาง และนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ Proteinase K แล้วไม่พบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบใดๆเลย (Demerdash and Mostafa, 2008: 9 – 14) เมื่อพิจารณาขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion assay แล้วพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก *L. brevis* มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบคือ *Aeromonas hydrophila, Streptococcus agalactiae* และ *Flavobacterium columnare* ได้ดีกว่า *Ent. faecium* และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* (ตารางที่ 9 และ 10) บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์นี้ผลิตขึ้น สอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* FPTLB3 ซึ่งแยกได้จากปลา mrigala (*Cirrhinus mrigala*) ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด (Banerjee et al., 2013: 17 – 25) และการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำของ *L. brevis* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของปลากระบอก (*Mugil cephalus*) (Ghosh et al., 2014: 1 – 11)

การศึกษาความทนต่อกรดและน้ำดีเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์เพราะการทดสอบดังกล่าวแสดงถึงการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ที่จะไปถึงระบบทางเดินอาหารและความสามารถ

ตั้งรกรากในลำไส้ (Perez et al., 2011: 499 – 507) ซึ่งระบบการย่อยอาหารของปลาประกอบด้วยอวัยวะหลัก 3 ส่วนคือ กระเพาะอาหาร ลำไส้ และไส้ติ่ง ค่าความเป็นกรดด่างในกระเพาะอาหารของปลามีสภาวะเป็นกรด (ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 2 – 4) ในส่วนของลำไส้มีสภาวะเป็นกลางถึงด่าง (ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 7 – 11) และส่วนของน้ำดี (bile) ที่ผลิตจากตับถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดี (gall bladder) ในระบบการย่อยอาหารน้ำดีมีหน้าที่ส่งเสริมให้เอนไซม์ไลเปส (lipase) เข้าไปย่อยไขมันบริเวณลำไส้ (Jobling, 1995: 175 – 210) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบความทนของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อค่าความเป็นกรดเท่ากับ 3, 2 และความทนทานต่อน้ำดีสดปลาดุกอุยความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาทั้ง 9 ไอโซเลทสามารถมีชีวิตรอดในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 3 และ 2 (ภาพที่ 6) และสามารถอยู่รอดในน้ำดีสดปลาดุกอุยความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่7) มีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *L. brevis*, *L. plantarum, L. pentosus* และ *L.paracasei* สามารถมีอัตราการรอดในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 2.5 ได้ถึง 60 – 80 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง (Pennacchia et al., 2004: 309 – 317; Nanasombath et al., 2012: 255 – 262) และ *Lactobacillus* สามารถเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดเท่ากับ 1 ภายใน 1 ชั่วโมง (Maragkoudakis et al. 2006: 189 – 199) เช่นเดียวกับแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากปลา rainbow trout สามารถอยู่รอดในค่าความเป็นกรดเท่ากับ 3 ภายในระยะเวลา 1.5 ชั่วโมง บางสายพันธุ์สามารถอยู่รอดในความเป็นกรดเท่ากับ 2 และสามารถมีชีวิตรอดในน้ำดีสดความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 1.5 ชั่วโมง (Sica et al., 2012: 869 – 879) *Enterococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. สามารถทนกรดเท่ากับ 2.5 และทนต่อน้ำดีเกลือ 0.3 oxygall (Shoo et al., 2015: 3 – 12), (Balcazar et al. 2008: 188 – 191) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Enterococcus* ที่คัดแยกได้จากปลาทองสามารถมีชีวิตรอดได้ที่ค่าความเป็นกรดเท่า 3 และ 4 แต่ไม่สามารถทนทานต่อค่าความเป็นกรดเท่ากับ 2 ได้ และแบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวสามารถมีชีวิตรอดได้ในน้ำดีสดปลาช่อนความเข้มข้น 10, 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปรีชา ภูมิพื้นผล, 2550: 56 – 74)

การศึกษาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 9 ไอโซเลทต่อยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถต้านทานต่อยา Norfloxacin, Sulphamethoxazole, Ciprofloxacin, Oxolinic acid และ Trimethoprim และไม่สามารถต้านทานต่อยา Amoxycilin, Oxytetracyclin และ Enrofloxacin เช่นเดียวกับแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากปลาทรายแดงสามารถต้านทานต่อยา Norfloxacin, Oxolinic acid, Sulfamethoxazole/ Trimethoprim Gentamycin, Naldixic acid และ Neomycin (ฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์ และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์, 2555: 220 – 229) และ *E. faecalis* สามารถต้านทานต่อยา Steptomycin ไม่มีความต้านทานต่อยา Amoxycilin, Tetracycline, Chloramphenicol, Ampixillin (Allameh et al., 2014: 2215 – 2222) และมีรายงานว่า

*Lactobacillus* sp. และ Bifidobacterium spp. สามารถต้านทานต่อยา aztreonam, cycloserin, kanamycin, nalidixic acid, polymyxin B and spectinomycin แต่ไม่ต้านทานต่อยา cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, lincomycin, metronidazole, neomycin, paromomycin, streptomycin, tetracycline and vancomycin (Aimmo et al., 2007: 35 – 42) ซึ่งความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกขึ้นกับชนิด และสายพันธุ์ โดยความสามารถในการต้านทานมีพื้นฐานมาจาก 2 ปัจจัยคือ การมียีนที่ต้านต่อยาปฏิชีวนะและการปรับตัวในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ (Mathur and Shingh, 2005: 177 – 203) การทดสอบคุณสมบัติการต้านทานต่อยาเป็นคุณสมบัติข้อหนึ่งในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกส์ เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้ยาปฏิชีวนะเข้ามาเกี่ยวข้อง สาเหตุเนื่องมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมทำให้สัตว์น้ำเกิดการดื้อยา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

# บทที่ 6
# สรุปผลงานวิจัย

การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำและการทดสอบคุณสมบัติบางประการในการเป็นโปรไบโอติกส์ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 9 ไอโซเลท จากจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 77 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลทนี้แสดงผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลาน้ำจืดทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบได้ในระดับดี เมื่อนำไปจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป API พบว่าแบคทีเรีย 6 ไอโซเลทมีคุณสมบัติตรงกับ *Enterococcus faecium* ที่ระดับความถูกต้อง 99.5 เปอร์เซ็นต์แบคทีเรีย 2 ไอโซเลทมีคุณสมบัติตรงกับ *Lactococcus lactis*dssp. *lactis* ที่ระดับความถูกต้อง 93.8 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรีย 1 ไอโซเลทมีคุณสมบัติตรงกับ *Lactobacillus brevis* ที่ระดับความถูกต้อง 93.6 เปอร์เซ็นต์การคัดแยกได้ถูกจัดเป็น 3 ชนิด คือ *Enterocoocus faecium* จำนวน 6 ไอโซเลท *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *Lactobacillus brevis* จำนวน 1 ไอโซเลท

จากการศึกษากิจกรรมการยับยั้งด้วยวิธี Disc diffusion method ของสารยับยั้งที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์แบบต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 9 สายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งประเภทกรดอินทรีย์ และสารยับยั้งประเภทโปรตีนหรือแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้ยังพบว่า *L. brevis* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* และ *Flavobacterium columnare* ได้ดีกว่า *E. faecium* และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดสอบความทนทานของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อสภาวะภายในทางเดินอาหาร พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลทสามารถมีชีวิต และอยู่รอดได้ในระดับค่าความเป็นกรดที่ 3 และ 2 และในน้ำดีสดปลาดุกอุยความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า *Ent. faecium* เกือบทุกไอโซเลท และ *L. brevis* สามารถต้านทานต่อยา sulphamethoxazole, norfloxacin, ciprofloxacin, oxolinic acid และ sulphamethoxazole/trimethoprim ส่วน *Lc. lactis* ssp. *lactis* มีความสามารถในการต้านทานต่อยา sulphamethoxazole, oxolinic acid และ sulphamethoxazole/ trimethoprim

จากคุณสมบัติแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลทที่คัดแยกได้นี้มีศักยภาพในการเป็นโปรไบโอติกส์สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

# เอกสารอ้างอิง

# เอกสารอ้างอิง


กรมประมง. **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2555**. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สารสนเทศกรมประมง กะทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2555.

บุษกร อุตภิชาติ. "มารู้จัก แบคทีเรียกรดแลคติกกันเถอะ", **วารสารวิทยาศาสตร์ทักษิณ**. 2(2): 19 – 29, 2548.

ฐิติรัตน รัตนวิวัลย์ และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์. "การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล", **ในการประชุมวิชาการเกษตรนเรศวรครั้งที่ 10**. น. 220 – 229. คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม: มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2555.

เบญจรัตน์ ยิ้มมิ่ง และปณิชา ปั่นสุ่น. **การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากลำไส้ไก**. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2553.

ปรีชา ภูมิพื้นผล. "การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงาม", วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: **มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**, 2550.

โสภา อารีรัตน์ และอุมาลัย สะดวกดี. "โรคปลาดุกอุยในบ่อเลี้ยง", **ในรายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2534**. น 363 – 365. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดแห่งชาติ: กรมประมง, 2534.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. **การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544.

Adams, M.R. and C.J. Hall. "Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures", **Int.J. Food Sci.Technol**. 23: 278 – 292, 1998.

Allameh, S.K and et al. "Properties of *Enterococcus faecalis*, a new probiotic bacterium isolated from the intestine of snakehead fish (*Channa striatus* Bloch)", **Academic Journals**. 8(22): 2215 – 2222, 2014.

Aly, S. M and et al. "Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections", **Fish & Shellfish Immunology**. 25: 128 – 136, 2008.

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)


Aimmo, D and et al. "Antibiotic resistance of Lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. Isolated from dairy and pharmaceutical product", **Int J food Microbiol.** 115(1): 35 – 42, 2007.

Asia Food Journal. "Pros and con of probiotics", **In Contineo Media Pte Ltd Interaction Network**. http://www.asiafoodjournal.com/article/pros-and-cons-of-probiotics/2362. 29 May, 2015

Askarian, F. A and et al. "Diversity of lactic acid bacteria in the gastrointestinal tracts of reared Beluga (*Huso huso*) and Persian Stergeon (*Acipenser persicus*): A comparative study", **J Fish Aqua Sci**. 3: 302 – 311, 2008.

Assefa, E and et al. "Effect of temperature and pH on the antimicrobial activity of inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated from Ergo, an Ethiopian traditional fermented milk", **African J. Microbiol. Res.** 2: 229 – 234, 2008.

Axelsson, L. "Lactic acid bacteria: Classification and physiology", 1998. p. 1- 72. *In* S. Salminen and A. V. Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. New York: Marcel Dekker, Inc.

_____. "Lactic acid bacteria: Classification and physiology (3rd ed)", 2004. p. 1-66. *In* S. Salminen and et al. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, New York: Marcel Dekker, Inc.

Balcazar, J.L and et al. "The role of probiotic in aquaculture", **Veter. Microbial.** 114: 173 – 186, 2006.

_____. "Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish", **Aquaculture**. 278: 188 – 191, 2008.

Banerjee, S.P and et al. "Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish", **J Food Sci Technol**. 50(1): 17 – 25, 2013.

Bjokroth, J and Holzapfel. W. "Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*", **Prokaryotes.** 4: 267–319, 2006.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Bucio, A and et al. "Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system", **Food Microbiol.** 23: 476 – 482, 2006.

Buntin, N and et al. "Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics", **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 30(1): 141 – 148, 2008.

Byczkowski, J and T. Gessner. "Biological role of superoxide ion-radical", **Int. J. Biochem.** 20: 569–580, 1988.

Cadirci, B.H. and S. Citak. "A comparison of two methods used for measuring Antagonistic Activity of Lactic acid bacteria", **Pakistan Journal of Nutrition**. 4(4): 237 – 241, 2005.

Campose, C.A and et al. "Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*)", **Food Research International.** 39: 356 – 364, 2006

Chung, K.C. and J.M. Geopfert. "Growth of *Salmorella* at low pH", **J. Food Sci.** 35: 326 – 328, 1970.

Chiu, C.H and et al. "Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*", **Fish and Shellfish immunology.** 23: 364 – 377, 2012.

Dahiya, R.S. and M.L. Speck. "Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*", **J. Dairy Sci.** 5: 1568-1572, 1968.

Davidson, P.M. and D.G. Hoover. "Antimicrobial components from lactic acid bacteria", 1993. p 127–160. *In* S. Salminen and A. V. Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria**, New York: Marcel Dekker, Inc.

Deemerdash, H.E and H. Mostafa. "Antimicrobial activity of *Lactobacilli* and *bifidobacterium* isolates", J Genet Eng Biotechnol. 6 (2): 9-14. 2008.

Delves-Broughton, J. "Nisin and its use as a food preservative", **Food Technol.** 4: 100 – 117, 1990.

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. New York: Blackie Academic & Professional, 1994.

Dhanasekaran, D and et al. "Probiotic effect of *Lactobacillus* isolates against bacterial pathogens in fresh water fish", **Journal of Coastal Development**. 3(2): 103 – 112, 2010.

Fuller, R. "Probiotic in man and animal", **J. Appl. Bacteriol**. 66: 365 – 378, 1989.

Fontaine, E.A and et al. "*Lactobacilli* from women with without bacterial vaginosis and observation on the significance of hydrogen peroxide", **Curr. Mirobiol**. 60: 253 – 260, 1996.

Garcia, D.L.B and et al. "Influence of lactic bacterial additives on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae culture", **Oceano. Bol. Instit. Esp**. 8: 247 – 254, 1992.

Garneau, S and et al. "Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria", **Biochimie.** 84: 577 – 592, 2002.

Gatesoupe, F.J. "The use of probiotics in aquaculture", **Aquaculture.** 180: 147–165, 1999a.

_____. "The use of probiotics in aquaculture", **Aquaculture. 147 – 165,** 1999b.

Ghiasi, F. "Predominant lactic acid bacteria isolated from the intestines of silver carp in low water temperature", **Academic Journal**. 10(59): 12747 – 12751, 2011.

Ghosh and et al. "Gut Associated Lactic Acid Bacteria Isolated from the Estuarine Fish Mugil cephalus: Molecular Diversity and Antibacterial Activities against Pathogens", **International Journal of Aquaculture**. 4 (1): 1 – 11, 2014.

Gildberg, A and H. Mikkeksen. "Effects of supplementing the feed to Atlantic cod *Gadus morhua/* fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*", **Aquaculture**. 167: 103 – 113, 1998.

Giri, S.S and et al. "Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *labeo rohita*", **Fish & Shellfish immunology**. 34: 660 – 666, 2013.

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Gomez, G.D and J.L. Balcazar. "A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish", **FEMS Immunol Med Microbiol.** 52: 145 – 154, 2008.

Gonzalez, C. J and et al. "Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes", **Food Microbiology.** 17: 383 – 391, 2000.

_____and J.L. Dominguez. "Efficacy of lactic acid against Listeria monocytogenes attached to poultry skin during refrigerated storage", **J. Appl. Microbiol.** 101(6): 1331 – 1339, 2006.

Gram, L and et al. "In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis", **Aquaculture.** 199: 1 – 11, 2001.

Hagi, T and et al. "Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish", **Aquaculture.** 234: 335 – 346, 2004.

Harikrishnan, R and et al. "*Lactobacillus sakei* BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to *streptococcosis* infection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*", **Fish & Shellfish immunology.** 29: 1037 – 1043, 2010.

Heo, M.S and B.K. Yang. "Screening of probiotic strains for use in aquaculture", **J. Fish. Sci. Tech.** 5: 200 – 205, 2002.

Hladikova, Z and et al. "Antimicrobial activity of selected of lactic acid cocci and production of organic acid", **Acta chimia Slovaca.** 5: 80 – 85, 2012.

Holzapfel, W.H and et al. "The genetera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*", **Prokaryotes.** 4: 229 – 266, 2006.

Hugenholtz, J. "Citrate metabolism in lactic acid bacteria", **FEMS Microbiol. Rev.** 12: 165 – 178, 1993.

Itoh, Y and et al. "dnaJ and gyrB gene sequence relationship among species and strains of genus Streptococcus", **Systematic and Applied Microbiology.** 29: 368 – 374, 2006.

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)


Jay, J.M. "Antimicrobial properties of diacetyl", **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 525 – 532, 1982.

Kao, C.T and W.C. Frazier. "Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*", **Appl. Microbiol.** 14: 251 – 255, 1966.

Kongnum, K and T. Hongpattarakere. "Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*", **Fish & Shellfish Immunology.** 32: 170 – 177, 2012.

Kong, S and A. J. Davison. "The role of interactions between $O_2$, $H_2$, $OH^-$ and $O_2^-$ in free radical damage to biological systems", **Arch. Biochem. Biophys.** 204: 18 – 29, 1980.

Lamari, F and et al. "Comparison of the effects of the dietary addition of two lactic acid bacteria on the development and conformation of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and the influence on associated microbiota", **Aquaculture.** 376 – 379: 137 – 145, 2013.

_____. "Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and in vivo test on *Artemia* nauplii", **Aquacult Int.** 22: 699 – 709, 2014.

Lilly, D.M and R.H. Stillwell. "Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms", **Science.** 147: 747 – 748, 1965.

Lima, E.D and et al. "Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by Lactobacillus spp. isolated from chickens", **The Canadian Journal of Veterinary Research.** 71: 103 – 107, 2007.

Lindgren, S.E and W.J. Dobrogosz. "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations", **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 149 – 164, 1990.

Mayr-Harting, A and et al. "Method for studying bacteriocins", Cited T. Bergen and J.R. Norris, eds. **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, Inc., 1972.

Merrifield, D.L and et al. "The current status and future focus of probitic and prebiotic application for salmonids", **Aquaculture**. 302(1 – 2): 1 – 18, 2010.

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Moriaty, D.J.W. "Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds", **Aquaculture.** 164: 351 – 358, 1998.

Motlagh, A.M and et al. "Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites", **J. Food Prot.** 54: 873 – 878, 1991.

Na Nakorn, U and et al. "Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgession from introduced farmed *C. gariepinus*", **Aqua.** 240: 145 – 163, 2004.

Nanasombath, S and et al. "Screening and identification of lactic acid bacteria from raw seafoods and Thai fermented seafood products for their potential use as starter cultures", **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 34(3): 255 – 262, 2012.

Ndagano, D and et al. "Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the Weissella genus isolated from food", **J. Food Sci.** 76(6): 305 – 311, 2011.

Nikoskelainen, S and et al. "Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*)", **Fish & Shellfish Immunol.** 15: 443 – 452, 2003.

Nilsen, et al. "Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333", **Appl. Environ. Microbiol.** 69(5): 2975 – 2984, 2003.

Ogier, J.C and P. Serror. "Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus", **International Journal of Food Microbiology. Sci.** 126: 291 – 301, 2008.

Olafsen, J.A. "Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture", **Aquac.** 200: 223 – 247, 2001.

Ouwehand, A.C and S. Vesterlund. "Antimicrobial components from lactic acid bacteria", 2004. 375 – 395, In S. Salminen and A. Von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, New York: Marcel Dekker, Inc.

Panpommin, D and et al. "Molecular characterization and seasonal expression of vitellogenin gene from Gunther's walking catfish *Clarias macrocephalus*", **Aquac.** 276: 60 – 68, 2008.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Park, H.S and et al. "Fate of enterophatogenic strains of *Escherichia coli* during manufacture and ripening of Camembert cheese", **J. Milk Food Technol.** 36: 543 – 546, 1973.

Parker, R.B. "Probiotics, the other half of the antibiotic story", **Anim. Nutr. Health.** 29: 4 – 5, 1974.

Pennacchia, C and et al. "Selection of *Lactobacillus* strains fromfermented sausages for their protential use as probiotics", **J. Meat Sci.** 67: 309 – 317, 2004.

Petersen, A and A. Dalsgaard. "Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand", **Environ. Microbiol.** 5(5): 395 – 402, 2003.

Perze, T and et al. "Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem", **Nature Publishing group.** 12: 1 – 6, 2010.

_____. "Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garviea*", **J Fish Dis.** 34(7): 499 – 507, 2011.

Picchietti, S and et al. "Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.)", **Fish & Shellfish Immunology.** 26: 368 – 376, 2009.

Pirarat, N and et al. "Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental Edwardsiella tarda infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*)", **Vet. Immunol. Immunophatol.** 113: 339 – 347, 2006.

Price, R.J. and J.S. Lee. "Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli", **J. Milk Food Technol.** 33: 13 – 18, 1970.

Rattanachaikunsopon, P and Phumkhachorn. P. "Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production", Scholars Research Library. **Annals of Biological Research.** 1(4): 218 – 228, 2010.

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Ringo, E. "Dose chromic oxide ($Cr_2O_3$) affect faecal lipid and intestinal bacteria flora in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*)", **Aqua. Fish Manage.** 24: 767 – 776, 1993.

Ringo, E and F.J. Gatesoupe. "Lactic acid bacteria in fish: review", **Aquaculture.** 160: 177 – 203, 1998.

Ringo, E and et al. "The effect of dietary fatty acid on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)", **J. Appl. Microbiol.** 85: 855 – 864, 1998.

Ringo, E and T.K. Birkbeck. "Intestinal microflora of fish larvae and fry", **Aquac. Res.** 30: 73 – 93, 1999.

Robertson, P.A.W and et al. "Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)", **Aquaculture.** 185: 235 – 243, 2000.

Rubin, H.E. "Taxicological model for a two-acid system", **Appl. Environ. Microbiol.** 36: 623 – 624, 1978.

Rumjuankiat, K and et al. "Screening and partial characterization bacteriocin from lactic acid bacteria in fish gastrointestinal tract", **KKU Res J.** 15: 870 – 877, 2010.

Sahoo, T.K and et al. "In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from the Gut of Labeo rohita and Catla catla", **Probiotics Antimicrob Proteins.** 1 – 11, 2015.

Salminen, S and et al. **Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspects Third edition**, New York: revised and expanded, 2004.

Senanan, W and et al. "Genetic impacts of hybrid catfish farming (*Clarias macrocephalus* x *C. gaiepinus*) on native catfish populations in central Thailand", **Aquac.** 235: 167 – 184, 2004.

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Sequeiros, C and et al. "Inhibitory activity against the Wsh pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish", **Arch Microbiol.** 192: 237 – 245, 2010.

Sica, M.G and et al. "Characterization of probiotics of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) farming", **Antonie van Leeuwenhoek.** 101: 869 – 879, 2012.

Silva, F.C.P and et al. "Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz", **J. Fish Biol.** 67: 1686 – 1698, 2005.

Strom, E and E. Ringo. "Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* (L.) larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water", 1993. p. 226 – 228, Cited B.T.Walther and H.J. Fyhn, eds. **Physiology and Biochemical Aspects of Fish Development.** Bergen Norway: University of Bergen.

Stiles, M.E and W.H. Holzapfel. "Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy", **Int. J. Food Microbiol.** 36: 1 – 29, 1997.

Sugita, H and et al. "Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens", **Fish Sci.** 68: 1004 – 1011, 2002.

Sun, Y.Z and et al. "Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinepherus coioides*", **Aquaculture Nutrition.** 43(2): 198 – 207, 2012.

Swain A.M and et al. "Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against Vibriosis and shrimp *Penaeus monodon*", **World J Microbiol Biotechnol.** 25: 697 – 703, 2009.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Talpur, A.D and et al. "Isolation and screening of lactic acid bacteria from the gut of Blue swimming crab *P.pelagicus*, and in vitro inhibition assay and small scale in vivo model for validation of isolates as probiotic", **Academic Journals Inc.** 1 – 28, 2011.

Talpur, A.D and et al. "Inhibition of pathogens by lactic acid bacteria and application as water additive multi isolates in early Stages larviculture of *P. pelagicus* (Linnnaeus, 1758)", **J. Anim.Plant Sci.** 22(1): 54 – 64, 2012.

Tramer, J. "Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*", **Nature.** 204 – 205, 1966.

Valerio and et al. "Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation", **FEMS Microbiology letters.** 233: 289 – 295, 2004.

Verschuere, L and et al. "Probiotic bacteria as biological control agent in aquaculture", **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64(4): 675 – 671, 2000.

Wang, Y.B and et al. "Effect of probiotics, *Enteroccus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response", **Aquaculture.** 227: 203 – 207, 2008.

Wagner, M K and L. J. Moberg. "Present and future use of traditional antimicrobial", **Food Tech.** 43: 143 – 147, 1998.

Yin, Y and et al. "Effects on growth and digestive enzyme activities of the *Hepialus gonggaensis* larvae caused by introducing probiotics", **World J Microbiol Biotechnol.** 27: 529 – 533, 2011.

Zapata, A. A. "Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Nile Tilapia Intestine (*Oreochromis niloticus*)", **Journal of Biology and Life Science.** 4(1): 164 – 171, 2013.

Zhou, X and et al. "Inhibition ability of probiotic, *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* andstudy of its immunostimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*)", **International Journal of Engineering, Science and Technology.** 2(7): 73 – 80, 2010.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก
# อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดสอบ

**1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**1.1 Soyabean Casein Digest Agar (TSA)**

| | |
|---|---|
| Pancreatic digest of casein | 15.0 กรัม |
| Papaic digest of soybean meal | 5.0 กรัม |
| Sodium chloride | 5.0 กรัม |
| Agar | 15.0 กรัม |

ละลาย Soyabean Casein Digest Agar ปริมาณ 40.0 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง pH ที่ 25 องศาเซลเซียส 7.3 ± 0.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 lbs ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

**1.2 Soyabean Casein Digest Medium (TSB)**

| | |
|---|---|
| Casein enzyme hydrolysate | 17.0 กรัม |
| Papaic digest of soyabean meal | 3.0 กรัม |
| Sodium chloride | 5.0 กรัม |
| Dipotassium phosphate | 2.5 กรัม |
| Dextrose | 2.5 กรัม |

ละลายส่วนผสมในปริมาณ 30.0 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง pH ที่ 25 องศาเซลเซียส 7.3 ± 0.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 lbs ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

**1.3 Lactobacillus MRS Agar (MRS Agar)**

| | |
|---|---|
| Proteose Peptone | 10.00 กรัม |
| Beef extract | 10.00 กรัม |
| Yeast extract | 5.00 กรัม |
| Dextrose | 20.00 กรัม |
| Polysorbate 80 or Tween 80 | 1.00 กรัม |
| Ammonium citrate | 2.00 กรัม |
| Sodium acetate | 5.00 กรัม |
| Magnesium sulphate | 0.10 กรัม |
| Manganese sulphate | 0.05 กรัม |
| Dipotassium phosphate | 2.00 กรัม |
| Agar | 12.00 กรัม |

ละลายส่วนผสมในปริมาณ 67.15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง pH ที่ 25 องศาเซล เซียส 6.5 ± 0.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 lbs ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

**1.4 Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth)**

| | |
|---|---|
| Proteose Peptone | 10.00 กรัม |
| Beef extract | 10.00 กรัม |
| Yeast extract | 5.00 กรัม |
| Dextrose | 20.00 กรัม |
| Polysorbate 80 or Tween 80 | 1.00 กรัม |
| Ammonium citrate | 2.00 กรัม |
| Sodium acetate | 5.00 กรัม |
| Magnesium sulphate | 0.10 กรัม |
| Manganese sulphate | 0.05 กรัม |
| Dipotassium phosphate | 2.00 กรัม |

ละลายส่วนผสมในปริมาณ 55.15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง pH ที่ 25 องศาเซลเซียส 6.5 ± 0.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 lbs ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

**1.5 Nutrition Agar (NA)**

| | |
|---|---|
| Beef extract | 3.0 กรัม |
| Casein peptone | 5.0 กรัม |
| Agar | 1.5 กรัม |

ละลายส่วนผสมตามปริมาณในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง pH ที่ 25 องศาเซลเซียส 6.5 ± 0.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 lbs ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

**1.6 MRS + 0.5% $CaCO_3$**

| | |
|---|---|
| MRS Agar | 6.72 กรัม |
| Calcium Carbonate | 0.5% |

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 lbs ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

**1.7 TSB soft agar**

| | |
|---|---|
| Soyabean Casein Digest Medium broth | 3.0 กรัม |
| Yeast extract | 0.6 g |
| Agar powder | 0.75 % |

ละลายส่วนผสมดั่งกล่าวในน้ำกลั่น 100 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 lbs ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

**1.8 MRS broth glycerol 15%**

| | |
|---|---|
| MRS Broth | 5.16 กรัม |
| Glycerol | 15% |

เท Glycerol ใส่ในกระบอกตวง Cylinder ตามปริมาณ เช่น 15 ml จากนั้นชั่งอาหาร MRS Broth ใส่ในบีกเกอร์ beaker เติมน้ำทีละน้อยเพื่อละลายอาหาร เทใส่กระบอกตวงที่เติม Glycerol แล้ว เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตรที่ต้องการ ใช้ Paraffin ปิดปากกระบอกตวงเขย่าในเข้ากัน จากนั้นใช้ปีเป็ดหรือ micro pipette ดูดใส่ eppendorf tube 1.5 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 lbs ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

# ภาคผนวก ข
# สารเคมีและน้ำยา

**1. Crystal violet**

สารละลาย A

| | |
|---|---|
| 85% Crystal violet | 2.00 กรัม |
| 95% Ethyl alcohol | l 0.00 กรัม |

สารละลาย B

| | |
|---|---|
| Ammonium oxalate | 8.00 กรัม |
| น้ำกลั่น | 80.00 กรัม |

ละลายสารละลาย A โดยละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด จากนั้นผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ถ้ามีตะกอนกรองก่อนการใช้และถ้าสีเข้ม เกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

**2. Safranin O counterstain (Stock solution)**

| | |
|---|---|
| Safranin O | 2.50 กรัม |
| 95% Ethyl alcohol | 100.00 มิลลิลิตร |

ละลายสี ในแอลกอฮอล์ ถ้าจะใช้สีในการย้อมให้เจือจางเป็น 1:10 (stock safranin O 10 มิลลิลิตร ผสมกับ น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร) ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้ทุกครั้ง

**3. Gram's iodine solution (Mordant)**

| | |
|---|---|
| Iodine (crystal) | 1.00 กรัม |
| Potassium iodide (KI) | 2.00 กรัม |
| น้ำกลั่น | 300.00 มิลลิลิตร |

ละลาย Iodine และ KI ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆก่อนแล้วเติมน้ำให้ครบ จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชา

**4. 3% Hydrogen Peroxide Solution**

| | |
|---|---|
| Hydrogen | 8.00 กรัม |
| น้ำกลั่น | 100.00 มิลลิลิตร |

**5. การเตรียม McFarland solution**

5.1 0.5 McFarland ประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| 1% Sulfuric acid | 995.00 ml |
| 1% Barium chloride | 5.00 ml |

5.2 2.0 McFarland

| | |
|---|---|
| 1% Sulfuric acid | 980.00 ml |
| 1% Barium chloride | 20.00 ml |

5.3 4.0 McFarland

| | |
|---|---|
| 1% Sulfuric acid | 960.00 ml |
| 1% Barium chloride | 40.00 ml |

ผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันดีแล้วแบ่งมาประมาณ 10 ml ใส่หลอด test tube (เอา test tube ชนิดเดียวกับที่เตรียมเชื้อทดสอบ) เพื่อเก็บไว้เทียบความขุ่นกับเชื้อทดสอบหรือตัวอย่าง ส่วนสารละลายที่เหลือเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**6. การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS)**

ประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| โซเดียมคลอไรด์ NaCl | 8.0 g |
| โพแทสเซียมคลอไรด์ KCl | 0.2 g |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $Na_2HPO_4$ | 1.44 g |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต $KH_2PO_4$ | 0.24 g |

ผสมสารดังกล่าวในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ไมโครลิตร ทำการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วย 1N HCl เมื่อปรับค่าเท่ากับ 6.5 แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 – 30 นาที

# ภาคผนวก ค
# ตารางผลการทดสอบ

**ตารางที่ ค.1 ผลการทดสอบสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก**

| isolated | รูปร่าง | อุณหภูมิ | | | ความเค็ม | | pH | | $CO_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 C | 15 C | 45 C | 6.5% | 18.0 % | 4.4 | 9.6 | |
| 1 | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 2 | Cocci | + | + | + | - | - | + | + | homo |
| 3 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 4 | Rod | + | + | + | + | + | - | - | homo |
| 5 | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 6 | rod | + | + | + | - | - | + | + | homo |
| 8 | Cocci | + | + | - | - | - | - | + | homo |
| 8a | Cocci | + | + | - | - | - | - | - | homo |
| 9 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 10 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 11 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 12 | Cocci | + | + | + | - | + | - | + | homo |
| 12a | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 13 | Cocci | + | + | + | + | + | + | - | homo |
| 14 | Cocci | + | + | + | + | + | - | - | homo |
| 15 | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 16 | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 17 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 19 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 21 | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 22a | Cocci | + | + | + | + | + | - | + | homo |
| 25 | Cocci | + | + | + | - | + | - | + | homo |
| 27 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 28 | Cocci | + | + | + | - | + | - | - | homo |
| 29a | Cocci | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 30a | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 32 | Cocci | + | + | + | + | + | - | - | homo |

**ตารางที่ ค.1 ผลการทดสอบสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)**

| isolated | รูปร่าง | อุณหภูมิ | | | ความเค็ม | | pH | | $CO_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 C | 15 C | 45 C | 6.5% | 18.0 % | 4.4 | 9.6 | |
| 33 | Cocci | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 33a | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 36 | Rod | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 37 | Cocci | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 37a | Cocci | + | - | - | - | - | - | + | homo |
| 38 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 38a | Rod | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 39 | Rod | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 42 | Cocci | + | + | - | - | + | - | + | homo |
| 43 | Rod | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 44 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 45 | Cocci | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 46 | Cocci | + | + | + | - | - | + | + | homo |
| 47 | Rod | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 47a | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 48 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 50 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 51 | Cocci | + | + | + | - | + | - | + | homo |
| 51a | Cocci | + | + | + | + | - | + | - | homo |
| 53 | Cocci | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 53a | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 54 | Cocci | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 56 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 56a | Cocci | + | + | - | - | - | - | + | homo |
| 58 | Cocci | + | + | - | - | - | - | + | homo |
| 58a | Cocci | + | + | - | - | - | - | + | homo |
| 60 | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |

**ตารางที่ ค.1 ผลการทดสอบสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)**

| isolated | รูปร่าง | อุณหภูมิ | | | ความเค็ม | | pH | | $CO_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 C | 15 C | 45 C | 6.5% | 18% | 4.4 | 9.6 | |
| 62 | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 63 | Cocci | + | + | + | + | + | - | - | homo |
| 64 | Cocci | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 65 | Rod | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 66 | Cocci | + | + | - | - | - | - | + | hetero |
| 67 | Cocci | + | + | + | + | + | + | - | homo |
| 68 | Rod | + | + | - | + | + | - | + | homo |
| 68a | Cocci | + | + | - | + | + | - | + | homo |
| 69 | Cocci | + | + | - | - | - | - | - | homo |
| 72 | Cocci | + | + | + | + | + | - | - | homo |
| 74 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 76 | Rod | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 77 | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 78 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 79 | Rod | + | + | + | - | - | - | - | homo |
| 84 | Cocci | + | + | - | + | + | - | - | homo |
| 90 | Cocci | + | + | + | + | + | - | + | homo |
| 92 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 106 | Cocci | + | + | + | + | + | + | + | homo |
| 121 | Cocci | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 123 | Rod | + | + | + | - | - | - | + | homo |
| 131 | Cocci | + | + | + | - | - | + | + | homo |
| 149 | Cocci | + | + | + | - | - | + | + | homo |

ตารางที่ ค.2 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ของแบคทีเรียกรดแลคติก

| Isolated | *Aeromonas hydrophila* 1 | | | *Aeromonas hydrophila* 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index |
| 1 | 4.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 12.0 | 1.40 |
| 2 | 5.0 | 7.0 | 0.40 | 5.0 | 11.0 | 1.20 |
| 3 | 6.0 | 10.0 | 0.67 | 5.0 | 26.5 | 4.30 |
| 4 | 6.0 | 13.0 | 1.17 | 4.0 | 20.0 | 4.00 |
| 5 | 5.5 | 15.0 | 1.73 | 6.0 | 37.5 | 5.25 |
| 6a | 5.0 | 9.0 | 0.80 | 6.0 | 33.0 | 4.50 |
| 8 | 4.0 | 0.0 | 0.00 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 8a | 6.0 | 11.0 | 0.83 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 9 | 6.0 | 18.0 | 2.00 | 4.0 | 6.0 | 0.50 |
| 10 | 4.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 7.0 | 0.40 |
| 11 | 5.0 | 20.0 | 3.00 | 5.0 | 8.0 | 0.60 |
| 12 | 4.0 | 5.0 | 0.25 | 5.0 | 15.0 | 2.00 |
| 12a | 6.0 | 9.0 | 0.50 | 6.0 | 16.5 | 1.75 |
| 13 | 6.0 | 11.0 | 0.83 | 6.0 | 11.0 | 0.83 |
| 14 | 6.0 | 9.0 | 0.50 | 5.0 | 12.0 | 1.40 |
| 15a | 5.5 | 18.0 | 2.27 | 4.0 | 13.5 | 2.38 |
| 16 | 4.0 | 7.0 | 0.75 | 4.0 | 14.0 | 2.50 |
| 17 | 5.5 | 9.0 | 0.64 | 6.0 | 15.0 | 1.50 |
| 19 | 4.0 | 0 | 0.00 | 4.0 | 0 | 0.00 |
| 21 | 4.0 | 0 | 0.00 | 6.0 | 8.0 | 0.33 |
| 22 | 4.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 33.5 | 5.70 |
| 25 | 5.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 9.0 | 0.80 |
| 27 | 4.0 | 0 | 0.00 | 4.0 | 8.0 | 1.00 |
| 28 | 5.5 | 11.0 | 1.00 | 6.0 | 24.0 | 3.00 |
| 29 | 5.0 | 11.5 | 1.30 | 6.0 | 33.0 | 4.50 |
| 30 | 6.0 | 17.5 | 1.92 | 6.0 | 30.5 | 4.08 |

ตารางที่ ค.2 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ของแบคทีเรียกรดแลคติก

| Isolated | *Aeromonas hydrophila* 1 | | | *Aeromonas hydrophila* 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index |
| 32 | 4.0 | 6.0 | 0.50 | 5.0 | 17.5 | 2.50 |
| 33 | 6.0 | 8.0 | 0.33 | 5.0 | 9.0 | 0.80 |
| 33a | 6.0 | 10.0 | 0.67 | 6.0 | 16.5 | 1.75 |
| 36 | 5.5 | 10.0 | 0.82 | 5.0 | 30.0 | 5.00 |
| 37 | 5.0 | 8.0 | 0.60 | 5.0 | 15.0 | 2.00 |
| 37a | 5.5 | 11.0 | 1.00 | 5.0 | 18.0 | 2.60 |
| 38 | 5.5 | 0 | 0.00 | 6.0 | 10.5 | 0.75 |
| 38a | 6.0 | 9.0 | 0.50 | 6.0 | 15.0 | 1.50 |
| 39 | 5.0 | 8.5 | 0.70 | 5.0 | 27.5 | 4.50 |
| 42 | 5.0 | 7.0 | 0.40 | 4.0 | 8.0 | 1.00 |
| 43 | 4.0 | 6.0 | 0.50 | 4.0 | 0 | 0.00 |
| 44 | 4.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 45 | 4.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 35.0 | 3.70 |
| 46 | 5.0 | 0 | 0.00 | 4.0 | 8.0 | 1.00 |
| 47 | 5.0 | 7.0 | 0.40 | 4.0 | 0 | 0.00 |
| 47a | 5.0 | 2.0 | 3.00 | 6.0 | 27.0 | 3.50 |
| 48 | 5.0 | 11.0 | 1.20 | 5.0 | 16.3 | 2.25 |
| 50 | 5.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 51 | 5.5 | 9.0 | 0.64 | 5.5 | 11.5 | 1.09 |
| 51a | 6.0 | 8.0 | 0.33 | 7.0 | 13.0 | 0.86 |
| 53 | 4.0 | 8.0 | 1.00 | 6.0 | 19.0 | 2.17 |
| 53a | 6.0 | 10.0 | 0.67 | 6.0 | 13.5 | 1.25 |
| 54 | 5.0 | 7.0 | 0.40 | 5.0 | 31.5 | 5.30 |
| 56 | 5.0 | 0 | 0.00 | 4.0 | 6.0 | 0.50 |
| 56a | 5.0 | 0 | 0.00 | 4.0 | 5.0 | 0.00 |
| 58 | 6.0 | 9.0 | 0.50 | 4.0 | 12.0 | 2.00 |

ตารางที่ ค.2 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)

| Isolated | *Aeromonas hydrophila* 1 | | | *Aeromonas hydrophila* 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index |
| 58a | 6.0 | 8.0 | 0.33 | 7.0 | 21.0 | 2.00 |
| 60 | 4.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 15.0 | 2.00 |
| 62 | 6.0 | 10.0 | 0.67 | 7.0 | 17.0 | 1.43 |
| 63 | 4.0 | 8.0 | 1.00 | 5.0 | 29.5 | 4.90 |
| 64a | 4.0 | 0 | 0.00 | 4.0 | 0 | 0.00 |
| 65 | 4.0 | 6.0 | 0.50 | 5.0 | 7.0 | 0.40 |
| 66 | 4.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 29.0 | 4.80 |
| 67 | 4.0 | 0 | 0.00 | 4.0 | 0 | 0.00 |
| 68 | 6.0 | 11.0 | 0.83 | 5.0 | 22.0 | 3.40 |
| 68a | 6.0 | 18.0 | 2.00 | 6.0 | 25.0 | 3.17 |
| 69 | 5.0 | 12.0 | 1.40 | 7.0 | 20.0 | 1.86 |
| 72 | 5.5 | 0 | 0.00 | 6.0 | 21.0 | 2.50 |
| 74 | 5.0 | 7.0 | 0.40 | 5.0 | 8.0 | 0.60 |
| 76 | 6.0 | 21.0 | 2.50 | 7.0 | 32.0 | 3.57 |
| 77 | 5.0 | 18.0 | 2.60 | 6.0 | 39.0 | 5.50 |
| 78 | 6.0 | 10.0 | 0.67 | 4.0 | 0 | 0.00 |
| 79 | 5.0 | 0 | 0.00 | 4.0 | 0 | 0.00 |
| 84 | 6.0 | 0 | 0.00 | 7.0 | 20.0 | 1.86 |
| 90 | 5.0 | 6.5 | 0.30 | 6.0 | 14.0 | 1.33 |
| 92 | 5.0 | 7.5 | 0.50 | 6.0 | 8.0 | 0.33 |
| 106 | 5.0 | 17.0 | 2.40 | 5.0 | 25.0 | 4.00 |
| 121 | 6.0 | 17.0 | 1.83 | 4.0 | 0 | 0 |
| 123 | 5.0 | 17.0 | 2.40 | 4.0 | 0 | 0.00 |
| 131 | 4.0 | 7.0 | 0.75 | 5.0 | 17.0 | 2.4 |
| 149 | 5.0 | 7.0 | 0.40 | 5.0 | 7.5 | 0.5 |

**ตารางที่ ค.3 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* ของแบคทีเรียกรดแลคติก**

| Isolated | *Streptococcus agalactiae* 1 | | | *Streptococcus agalactiae* 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index |
| 1 | 7.0 | 25.0 | 2.57 | 6.0 | 21.5 | 2.58 |
| 2 | 6.5 | 22.5 | 2.46 | 6.0 | 19.5 | 2.25 |
| 3 | 6.0 | 11.0 | 0.83 | 6.0 | 21.5 | 2.58 |
| 4 | 6.0 | 16.0 | 1.67 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 5 | 7.0 | 25.0 | 2.57 | 6.0 | 23.5 | 2.92 |
| 6a | 5.0 | 0 | 0 | 4.0 | 0 | 0.00 |
| 8 | 5.0 | 15.5 | 2.10 | 6.0 | 8.0 | 0.33 |
| 8a | 5.0 | 0 | 0 | 6.0 | 10.0 | 0.67 |
| 9 | 6.0 | 11.5 | 0.92 | 5.0 | 14.5 | 1.90 |
| 10 | 5.0 | 15.0 | 2.00 | 6.0 | 14.0 | 1.33 |
| 11 | 5.0 | 11.5 | 1.30 | 5.0 | 10.5 | 1.10 |
| 12 | 5.0 | 9.0 | 0.80 | 6.0 | 11.5 | 0.92 |
| 12a | 5.0 | 11.5 | 1.30 | 5.0 | 12.5 | 1.50 |
| 13 | 5.0 | 12.5 | 1.50 | 5.0 | 10.5 | 1.10 |
| 14 | 6.0 | 0 | 0.00 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 15a | 6.0 | 26.0 | 3.33 | 6.0 | 23.5 | 2.92 |
| 16 | 7.0 | 25.0 | 2.57 | 7.0 | 21.5 | 2.07 |
| 17 | 5.0 | 11.5 | 1.30 | 5.0 | 11.5 | 1.30 |
| 19 | 6.0 | 13.5 | 1.25 | 5.0 | 10.5 | 1.10 |
| 21 | 7.0 | 20.0 | 1.86 | 6.0 | 20.5 | 2.42 |
| 22 | 5.5 | 12.5 | 1.27 | 5.0 | 18.0 | 2.60 |
| 25 | 6.0 | 0 | 0 | 7.0 | 0 | 0.00 |
| 27 | 5.0 | 13.0 | 1.60 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 28 | 5.5 | 11.0 | 1.00 | 5.0 | 11.0 | 1.20 |
| 29 | 6.0 | 10.0 | 0.67 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 30 | 6.0 | 26.0 | 3.33 | 6.0 | 23.5 | 2.92 |

ตารางที่ ค.3 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* ของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)

| Isolated | *Streptococcus agalactiae* 1 | | | *Streptococcus agalactiae* 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index |
| 32 | 6.0 | 15.0 | 1.50 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 33 | 6.0 | 0 | 0 | 6.0 | 10.0 | 0.67 |
| 33a | 5.0 | 13.5 | 1.70 | 5.0 | 10.5 | 1.10 |
| 36 | 6.0 | 22.5 | 2.75 | 5.5 | 15.0 | 1.73 |
| 37 | 5.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 7.0 | 0.40 |
| 37a | 5.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 12.0 | 1.40 |
| 38 | 6.0 | 0 | 0.00 | 6.0 | 11.5 | 0.92 |
| 38a | 5.0 | 13.5 | 1.70 | 5.0 | 11.5 | 1.30 |
| 39 | 7.0 | 20.0 | 1.86 | 6.0 | 19.0 | 2.17 |
| 42 | 6.0 | 13.0 | 1.17 | 5.0 | 11.5 | 1.30 |
| 43 | 5.0 | 12.5 | 1.50 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 44 | 5.0 | 15.0 | 2.00 | 5.0 | 8.0 | 0.60 |
| 45 | 5.0 | 12.0 | 1.40 | 4.0 | 6.0 | 0.50 |
| 47 | 5.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 47a | 7.0 | 0 | 0.00 | 6.0 | 17.5 | 1.92 |
| 48 | 6.0 | 18.0 | 2.00 | 6.0 | 19.5 | 2.25 |
| 50 | 6.0 | 12.5 | 1.08 | 5.0 | 7.0 | 0.40 |
| 51 | 5.0 | 12.5 | 1.5 | 6.0 | 15.0 | 1.50 |
| 51a | 7.0 | 13.5 | 0.93 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 53 | 6.0 | 21.0 | 2.50 | 6.0 | 19.5 | 2.25 |
| 53a | 6.0 | 12.5 | 1.08 | 5.0 | 10.0 | 1.00 |
| 54 | 5.0 | 11.0 | 1.20 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 56 | 6.0 | 14.5 | 1.42 | 5.0 | 10.5 | 1.10 |
| 56a | 6.0 | 0 | 0.00 | 6.0 | 15.0 | 1.50 |
| 58 | 5.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 58a | 5.0 | 14.5 | 1.90 | 5.0 | 7.5 | 0.50 |

ตารางที่ ค.3 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* ของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)

| Isolated | *Streptococcus agalactiae* 1 | | | *Streptococcus agalactiae* 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index |
| 60 | 6.0 | 13.0 | 1.17 | 6.0 | 12.0 | 1.00 |
| 62 | 6.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 63 | 6.0 | 15.0 | 1.50 | 7.0 | 15.0 | 1.14 |
| 64 | 6.0 | 13.0 | 1.17 | 6.0 | 13.0 | 1.17 |
| 65 | 5.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 8.0 | 0.60 |
| 66 | 6.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 8.0 | 0.60 |
| 67 | 6.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 14.5 | 1.90 |
| 68 | 7.0 | 22.5 | 2.21 | 6.0 | 21.5 | 2.58 |
| 68a | 5.0 | 12.5 | 1.50 | 5.0 | 12.5 | 1.50 |
| 69 | 5.0 | 17.0 | 2.40 | 5.0 | 11.5 | 1.30 |
| 72 | 5.0 | 11.5 | 1.30 | 5.0 | 11.5 | 1.30 |
| 74 | 6.0 | 0 | 0.00 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 76 | 6.5 | 12.0 | 0.85 | 5.0 | 0 | 0.00 |
| 77 | 6.0 | 21.0 | 2.50 | 6.0 | 22.0 | 2.67 |
| 78 | 6.0 | 23.5 | 2.92 | 7.0 | 26.0 | 2.71 |
| 79 | 7.0 | 21.0 | 2.00 | 7.0 | 15.5 | 1.21 |
| 84 | 7.0 | 17.0 | 1.43 | 6.0 | 17.5 | 1.92 |
| 90 | 5.0 | 0 | 0.00 | 5.0 | 8.5 | 0.70 |
| 92 | 5.0 | 10.0 | 1.00 | 5.5 | 13.0 | 1.36 |
| 106 | 5.0 | 13.0 | 1.60 | 5.0 | 10.5 | 1.10 |
| 121 | 6.0 | 20.0 | 2.33 | 6.0 | 24.0 | 3.00 |
| 123 | 6.0 | 13.5 | 1.25 | 5.5 | 13.5 | 1.45 |
| 131 | 5.5 | 14.0 | 1.55 | 6.0 | 14.5 | 1.42 |
| 149 | 6.5 | 25.0 | 2.85 | 4.0 | 12.5 | 2.13 |

**ตารางที่ ค. 4 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *F. columnare* ของแบคทีเรียกรดแลคติก**

| Isolated | *Flavobacterium columnare* 1 | | | *Flavobacterium columnare* 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index |
| 1 | 7.0 | 29.0 | 3.14 | 7.0 | 30.0 | 3.29 |
| 2 | 7.0 | 33.5 | 3.79 | 7.0 | 30.5 | 3.36 |
| 3 | 8.0 | 34.0 | 3.25 | 7.0 | 30.0 | 3.29 |
| 4 | 6.0 | 17.0 | 1.83 | 6.0 | 20.5 | 2.42 |
| 5 | 8.0 | 32.5 | 3.06 | 7.0 | 30.0 | 3.29 |
| 6a | 6.0 | 20.0 | 2.33 | 6.0 | 25.5 | 3.25 |
| 8 | 6.0 | 20.5 | 2.42 | 6.0 | 17.5 | 1.92 |
| 8a | 6.0 | 21.5 | 2.58 | 6.0 | 16.0 | 1.67 |
| 9 | 8.0 | 27.0 | 2.38 | 7.0 | 30.0 | 3.29 |
| 10 | 6.0 | 32.5 | 4.42 | 6.0 | 28.0 | 3.67 |
| 11 | 6.0 | 20.0 | 2.33 | 6.0 | 26.0 | 3.33 |
| 12 | 6.0 | 28.5 | 3.75 | 6.0 | 30.5 | 4.08 |
| 12a | 6.0 | 25.0 | 3.17 | 6.0 | 30.0 | 4.00 |
| 13 | 6.0 | 13.5 | 1.25 | 6.0 | 20.0 | 2.33 |
| 14 | 6.0 | 0 | 0.00 | 6.0 | 9.0 | 0.50 |
| 15a | 7.0 | 35.0 | 4.00 | 7.0 | 26.0 | 2.71 |
| 16 | 6.0 | 30.0 | 4.00 | 6.0 | 34.5 | 4.75 |
| 17 | 6.0 | 28.0 | 3.67 | 7.0 | 34.0 | 3.86 |
| 19 | 6.0 | 15.0 | 1.50 | 6.0 | 10.0 | 0.67 |
| 21 | 6.0 | 26.0 | 3.33 | 6.0 | 25.5 | 3.25 |
| 22 | 6.0 | 15.5 | 1.58 | 6.0 | 21.5 | 2.58 |
| 25 | 7.0 | 0 | 0.00 | 7.0 | 0 | 0.00 |
| 27 | 6.0 | 17.0 | 1.83 | 6.0 | 24.0 | 3.00 |
| 28 | 6.0 | 17.0 | 1.83 | 6.0 | 20.0 | 2.33 |
| 29 | 6.0 | 16.0 | 1.67 | 6.0 | 24.0 | 3.00 |
| 30 | 7.0 | 35.0 | 4.00 | 7.0 | 34.0 | 3.86 |

ตารางที่ ค.4 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *F. columnare* ของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)

| Isolated | *Flavobacterium columnare* 1 | | | *Flavobacterium columnare* 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index |
| 32 | 8.0 | 28.5 | 2.56 | 7.0 | 28.0 | 3.00 |
| 33 | 7.0 | 26.0 | 2.71 | 7.0 | 30.5 | 3.36 |
| 33a | 7.0 | 29.0 | 3.14 | 7.0 | 31.5 | 3.50 |
| 36 | 7.0 | 17.0 | 1.43 | 7.0 | 20.5 | 1.93 |
| 37 | 6.0 | 13.5 | 1.25 | 6.0 | 30.5 | 4.08 |
| 37a | 6.0 | 16.0 | 1.67 | 6.0 | 21.5 | 2.58 |
| 38 | 6.0 | 22.5 | 2.75 | 8.0 | 30.5 | 2.81 |
| 38a | 6.0 | 22.0 | 2.67 | 6.0 | 25.5 | 3.25 |
| 39 | 6.0 | 32.0 | 4.33 | 6.0 | 31.0 | 4.17 |
| 42 | 6.0 | 18.5 | 2.08 | 6.0 | 31.5 | 4.25 |
| 43 | 6.0 | 30.0 | 4.00 | 7.0 | 27.5 | 2.93 |
| 44 | 6.0 | 24.5 | 3.08 | 6.0 | 24.5 | 3.08 |
| 45 | 6.0 | 32.0 | 4.33 | 6.0 | 27.5 | 3.58 |
| 46 | 7.0 | 34.0 | 3.86 | 6.0 | 30.5 | 4.08 |
| 47 | 7.0 | 31.0 | 3.43 | 6.0 | 31.5 | 4.25 |
| 47a | 7.0 | 31.0 | 3.43 | 6.0 | 21.5 | 2.58 |
| 48 | 6.0 | 23.0 | 2.83 | 6.0 | 30.0 | 4.00 |
| 50 | 6.0 | 23.0 | 2.83 | 6.0 | 21.5 | 2.58 |
| 51 | 6.0 | 22.5 | 0.00 | 6.0 | 10.0 | 0.67 |
| 51a | 8.0 | 22.0 | 1.75 | 7.0 | 11.5 | 0.64 |
| 53 | 6.0 | 25.5 | 3.25 | 7.0 | 9.0 | 0.29 |
| 53a | 7.0 | 20.5 | 1.93 | 6.0 | 9.0 | 0.50 |
| 54 | 6.0 | 21.5 | 2.58 | 5.0 | 10.5 | 1.10 |
| 56 | 6.0 | 20.5 | 2.42 | 6.0 | 12.0 | 1.00 |
| 56a | 6.0 | 21.0 | 2.50 | 6.0 | 10.0 | 0.67 |
| 58 | 6.0 | 20.5 | 2.42 | 6.0 | 17.5 | 1.92 |

ตารางที่ ค.4 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *F. columnare* ของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)

| Isolated | *Flavobacterium columnare* 1 | | | *Flavobacterium columnare* 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index | Colony (mm) | Clear zone (mm) | Inhibition index |
| 58a | 8.0 | 29.0 | 2.63 | 6.0 | 18.5 | 0.00 |
| 60 | 8.0 | 29.0 | 2.63 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 62 | 7.0 | 20.0 | 1.86 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 63 | 7.0 | 23.0 | 2.29 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 64 | 6.0 | 19.0 | 2.17 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 65 | 6.0 | 29.0 | 3.83 | 6.0 | 30.5 | 4.08 |
| 66 | 6.0 | 18.0 | 2.00 | 6.0 | 21.5 | 2.58 |
| 67 | 6.0 | 13.5 | 1.25 | 6.0 | 18.0 | 2.00 |
| 68 | 6.0 | 20.5 | 2.42 | 6.0 | 18.5 | 2.08 |
| 68a | 6.0 | 23.0 | 2.83 | 6.0 | 20.5 | 2.42 |
| 69 | 6.0 | 27.5 | 3.58 | 6.0 | 30.5 | 4.08 |
| 72 | 7.0 | 35.5 | 4.07 | 7.0 | 0 | 0.00 |
| 74 | 6.0 | 17.0 | 1.83 | 6.0 | 12.0 | 1.00 |
| 76 | 6.0 | 35.5 | 4.92 | 6.0 | 30.5 | 4.08 |
| 77 | 6.0 | 30.5 | 4.08 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 78 | 7.0 | 28.5 | 3.07 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 79 | 7.0 | 29.0 | 3.14 | 6.0 | 32.0 | 4.33 |
| 84 | 6.0 | 16.0 | 1.67 | 6.0 | 0 | 0.00 |
| 90 | 6.0 | 0 | 0.00 | 6.0 | 15.5 | 1.58 |
| 92 | 6.0 | 17.5 | 1.92 | 6.0 | 24.5 | 3.08 |
| 106 | 6.0 | 25.5 | 3.25 | 6.0 | 18.5 | 2.08 |
| 121 | 6.0 | 31.0 | 4.17 | 6.0 | 30.5 | 4.08 |
| 123 | 6.0 | 28.5 | 3.75 | 6.0 | 24.5 | 3.08 |
| 131 | 6.0 | 0 | 0.00 | 6.0 | 25.5 | 3.25 |
| 149 | 6.0 | 15.0 | 1.50 | 6.0 | 20.5 | 2.42 |

ตารางที่ ค.5 ผลการทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบบไม่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วยวิธี Disc diffusion method

| isolated | Indicator microorganisms: diameter of inhibitory zone (mm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | AHAQH 001 | AHAQH 002 | SAAQH 001 | SAAQH 002 | FCAQH 001 | FCAQH 002 |
| 2 | 6.7 ± 0.03 | 00 | 11.3 + 0.05 | 11.3 + 0.05 | 18.0 + 0.05 | 17.7 + 0.05 |
| 3 | 6.0 + 0.00 | 00 | 6.0 + 0.00 | 0.00 | 18.3 + 0.00 | 0.00 |
| 5 | 6.5 + 0.00 | 8.3 + 0.14 | 7.2 + 0.03 | 6.5 + 0.04 | 16.3 + 0.03 | 16.2 + 0.03 |
| 9 | 6.3 + 0.03 | 7.8 + 0.03 | 7.2 + 0.03 | 6.3 + 0.03 | 16.3 + 0.05 | 15.3 +0.05 |
| 11 | 6.3 + 0.05 | 0.00 | 0.00 | 6.5 + 0.00 | 15.3 + 0.07 | 17.2 + 0.07 |
| 12 | 0.00 | 0.00 | 6.2 + 0.03 | 6.5 + 0.04 | 6.0 + 0.00 | 14.3 + 0.05 |
| 12a | 0.00 | 6.3 + 0.03 | 6.0 +0.00 | 6.5 + 0.04 | 16.0 + 0.05 | 12.7 + 0.05 |
| 13 | 0.00 | 6.5 + 0.00 | 7.0 + 0.00 | 6.8 + 0.03 | 18.3 + 0.14 | 15.3 + 0.14 |
| 15 | 6.8 + 0.03 | 9.7 + 0.05 | 7.3 + 0.03 | 7.3 + 0.00 | 18.7 + 0.12 | 18.5 + 0.12 |
| 16 | 6.2 + 0.03 | 0.00 | 6.5 + 0.00 | 6.0 + 0.03 | 17.3 + 0.05 | 16.3 + 0.05 |
| 17 | 0.00 | 8.3 + 0.05 | 0.00 | 6.8 + 0.00 | 13.3 + 0.05 | 17.3 + 0.05 |
| 28 | 7.8 ± 0.03 | 7.3 + 0.05 | 7.0 ± 0.00 | 7.3 ± 0.00 | 16.2 + 0.05 | 12.3 + 0.05 |
| 30 | 6.5 + 0.04 | 9.7 + 0.05 | 7.2 + 0.03 | 7.7 + 0.03 | 17 5 + 0.05 | 15.7 + 0.05 |
| 33a | 6.0 + 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 16.2 + 0.10 | 14.7 + 0.10 |
| 36 | 0.00 | 10.7 + 0.1 | 0.00 | 0.00 | 12.0 + 0.05 | 16.7 + 0.05 |
| 38a | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.0 + 0.00 | 11.7 + 0.14 | 13.7 + 0.14 |
| 39 | 0.00 | 0.00 | 7.8 + 0.17 | 6.0 + 0.00 | 16.8 + 0.05 | 14.7 + 0.05 |
| 42 | 0.00 | 0.00 | 7.0 + 0.00 | 0.00 | 16.3 + 0.05 | 12.3 + 0.05 |
| 47a | 6.7+ 0.05 | 9.8 + 0.03 | 7.3 + 0.10 | 7.9 + 0.02 | 14.5 + 0.05 | 15.3 + 0.05 |
| 48 | 0.00 | 9.3 + 0.05 | 0.00 | 6.0 + 0.00 | 15.7 + 0.10 | 13.7 + 0.10 |
| 51a | 0.00 | 9.7 + 0.1 | 0.00 | 0.00 | 14.3 + 0.05 | 17.3 + 0.05 |
| 53 | 8.5 ± 0.00 | 10.0 + 0.05 | 0.00 | 6.2 + 03 | 6.00 + 0.00 | 14.3 + 0.05 |
| 54 | 0.00 | 10.3 + 0.05 | 0.00 | 6.0 + 0.00 | 15.7 + 0.14 | 15.3 + 0.14 |
| 58 | 0.00 | 9.0 + 00 | 0.00 | 6.0 + 0.00 | 14.0 + 0.00 | 0.00 |
| 68 | 0.00 | 8.0 + 00 | 0.00 | 0.00 | 9.0 + 0.00 | 0.00 |
| 68a | 7.5 ± 0.00 | 8.0 + 00 | 7.5 ± 0.03 | 6.0 + 0.00 | 12.2 + 0.05 | 15.3 + 0.05 |
| 69 | 6.0 + 0.00 | 9.0 + 0.09 | 0.00 | 0.00 | 15.3 + 0.14 | 14.7 + 0.14 |
| 76 | 15.5 + 0.0 | 13.5 + 0.05 | 14.6 + 0.05 | 14.0 + 0.02 | 17.0 + 0.09 | 16.2 + 0.09 |
| 92 | 6.0 + 0.00 | 11.4 + 0.05 | 0.00 | 6.0 + 0.00 | 15.7 + 0.05 | 15.3 + 0.05 |
| 106 | 7.0 + 0.00 | 8.0 + 00 | 7.3 + 0.07 | 7.7 + 0.03 | 17.5 + 0.10 | 17.3 + 0.10 |
| 149 | 7.2 + 0.03 | 7.7 + 0.03 | 6.0 + 0.00 | 6.5 + 0.00 | 15.3 + 0.14 | 16.7 + 0.14 |

**ตารางที่ ค.6 ผลการทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบบปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง**

| Isolated | Indicator microorganisms: diameter of inhibitory zone (mm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | AHAQH001 | AHAQH002 | SAAQH001 | SAAQH002 | FCAQH001 | FCAQH002 |
| 2 | 0.00 | 6.7 ± 0.03 | 6.0 ± 0.05 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 |
| 3 | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 |
| 5 | 6.3 ± 0.03 | 6.5 ± 0.00 | 6.2 ± 0.03 | 6.3 ± 0.03 | 6.0 ± 0.00 | 6.7 ± 0.03 |
| 9 | 6.0 ± 0.00 | 6.3 ± 0.03 | 6.0 ± 0.00 | 6.2 ± 0.03 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 |
| 11 | 0.00 | 6.3 ± 0.05 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 12 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 12a | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 13 | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 |
| 15 | 6.5 ± 0.00 | 6.8 ± 0.03 | 6.8 ± 0.07 | 6.7 ± 0.03 | 6.4 ± 0.03 | 6.5 ± 0.01 |
| 16 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.3 ± 0.04 | 6.3 ± 0.03 |
| 17 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 28 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.5 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 |
| 30 | 6.3 ± 0.03 | 6.7 ± 0.03 | 6.0 ± 0.00 | 6.5 ± 0.01 | 6.3 ± 0.03 | 6.6 ± 0.01 |
| 33a | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.2 ± 0.03 | 6.2 ± 0.03 |
| 36 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.2 ± 0.03 | 6.2 ± 0.03 |
| 38a | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.2 ± 0.03 | 6.2 ± 0.03 |
| 39 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.2 ± 0.03 | 6.2 ± 0.03 |
| 42 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 47a | 6.3 ± 0.03 | 6.7 ± 0.05 | 6.8 ± 0.03 | 6.4 ± 0.03 | 6.6 ± 0.02 | 6.5 ± 0.00 |
| 48 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 000 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 51a | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.01 |
| 53 | 6.6 ± 0.00 | 6.5 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.6 ± 0.01 |
| 54 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 |
| 58 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 |
| 68 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 |
| 68a | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.3 ± 0.03 | 6.2 ± 0.01 | 6.5 ± 0.04 | 6.7 ± 0.00 |
| 69 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 76 | 10.8 + 0.05 | 10.7 + 0.03 | 10.5 + 0.08 | 10.2 + 0.07 | 8.9 + 0.02 | 9.0 + 0.03 |
| 92 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 |
| 106 | 6.8 ± 0.03 | 7.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.5 ± 0.01 | 6.3 ± 0.03 | 6.6 ± 0.01 |
| 149 | 6.0 ± 0.00 | 7.2 ± 0.03 | 0.00 | 0.00 | 6.0 ± 0.00 | 6.0 ± 0.00 |

**ตารางที่ ค.7 ผลการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกจากการทดสอบความทนทานต่อกรด**

| ชนิด | pH 6.5 | | pH 3 | | pH 2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 ชั่วโมง | 6 ชั่วโมง | 0 ชั่วโมง | 6 ชั่วโมง | 0 ชั่วโมง | 6 ชั่วโมง |
| *Ent. faecium* 05 | $2.6 \times 10^8$ | $2.7 \times 10^8$ | $1.4 \times 10^7$ | $2.0 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^7$ | $2.0 \times 10^6$ |
| *Ent. faecium* 15 | $2.4 \times 10^8$ | $2.6 \times 10^8$ | $1.95 \times 10^7$ | $1.5 \times 10^6$ | $1.65 \times 10^7$ | $1.5 \times 10^6$ |
| *Ent. faecium* 28 | $2.5 \times 10^8$ | $2.6 \times 10^8$ | $2.75 \times 10^7$ | $1.65 \times 10^6$ | $2.2 \times 10^7$ | $1.25 \times 10^6$ |
| *Ent. faecium* 30 | $2.7 \times 10^8$ | $2.7 \times 10^8$ | $1.5 \times 10^7$ | $9.0 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^7$ | $7.4 \times 10^6$ |
| *Ent. faecium* 47 | $2.9 \times 10^8$ | $2.9 \times 10^8$ | $1.65 \times 10^7$ | $6.1 \times 10^6$ | $1.7 \times 10^7$ | $3.75 \times 10^6$ |
| *Ent. faecium* 106 | $2.5 \times 10^8$ | $2.6 \times 10^8$ | $2.59 \times 10^7$ | $4.0 \times 10^6$ | $2.58 \times 10^7$ | $1.9 \times 10^6$ |
| *Lc. lactis* ssp. 53 | $2.5 \times 10^8$ | $2.6 \times 10^8$ | $2.85 \times 10^7$ | $4.6 \times 10^6$ | $2.8 \times 10^7$ | $3.4 \times 10^6$ |
| *Lc. lactis* ssp. 68 | $2.8 \times 10^8$ | $2.8 \times 10^8$ | $3.0 \times 10^7$ | $1.69 \times 10^6$ | $2.65 \times 10^7$ | $5.6 \times 10^6$ |
| *L. brevis* 76 | $2.9 \times 10^8$ | $3.0 \times 10^8$ | $2.45 \times 10^7$ | $2.4 \times 10^6$ | $2.5 \times 10^7$ | $2.2 \times 10^6$ |

**ตารางที่ ค.8 ผลการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกจากการทดสอบความทนทานต่อน้ำดีสดปลาดุกอุยความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์**

| ชนิด | Control | | น้ำดีสดปลาดุกอุย 10 % | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 ชั่วโมง | 6 ชั่วโมง | 0 ชั่วโมง | 6 ชั่วโมง |
| *Ent. faecium* 05 | $2.62 \times 10^8$ | $2.71 \times 10^8$ | $2.3 \times 10^7$ | $1.4 \times 10^7$ |
| *Ent. faecium* 15 | $2.4 \times 10^8$ | $2.52 \times 10^8$ | $8.3 \times 10^7$ | $3.6 \times 10^7$ |
| *Ent. faecium* 28 | $2.5 \times 10^8$ | $2.58 \times 10^8$ | $2.2 \times 10^7$ | $1.8 \times 10^7$ |
| *Ent. faecium* 30 | $2.69 \times 10^8$ | $2.72 \times 10^8$ | $7.7 \times 10^7$ | $7.5 \times 10^7$ |
| *Ent. faecium* 47 | $2.89 \times 10^8$ | $2.93 \times 10^8$ | $5.8 \times 10^7$ | $4.3 \times 10^7$ |
| *Ent. faecium* 106 | $2.47 \times 10^8$ | $2.56 \times 10^8$ | $1.4 \times 10^7$ | $1.1 \times 10^7$ |
| *Lc. lactis* ssp. 53 | $2.45 \times 10^8$ | $2.6 \times 10^8$ | $3.6 \times 10^7$ | $1.8 \times 10^7$ |
| *Lc. lactis* ssp. 68 | $2.84 \times 10^8$ | $2.8 \times 10^8$ | $2.8 \times 10^7$ | $2.2 \times 10^7$ |
| *L. brevis* 76 | $2.9 \times 10^8$ | $3.0 \times 10^8$ | $3.1 \times 10^7$ | $2.2 \times 10^7$ |

# ภาคผนวก ง
# ภาพขั้นตอนการทดสอบและผลการทดสอบ

การเตรียมอุปกรณ์ การเก็บตัวอย่างลำไส้ปลาดุกอุย

การบดตัวอย่างลำไส้ การเจือจางตัวอย่างลำไส้ Spread plate

**ภาพที่ ง.1 ขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ปลาดุกอุย**

การย้อมแกรม การสร้างเอนไซม์คาตาเลส การทดสอบ Oxidase

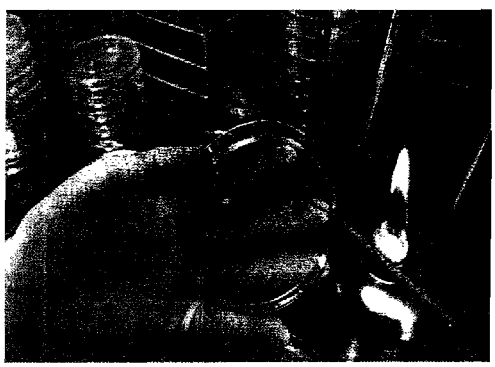
**ภาพที่ ง.2 การทดสอบพื้นฐานการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก**

การทดสอบการเจริญในความเค็มต่าง ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และการสร้างแก๊ส

**ภาพที่ ง.3 การทดสอบคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสกุล**

ชุดทดสอบทางชีวะเคมีของ API 20 strep และ API 50 CHL

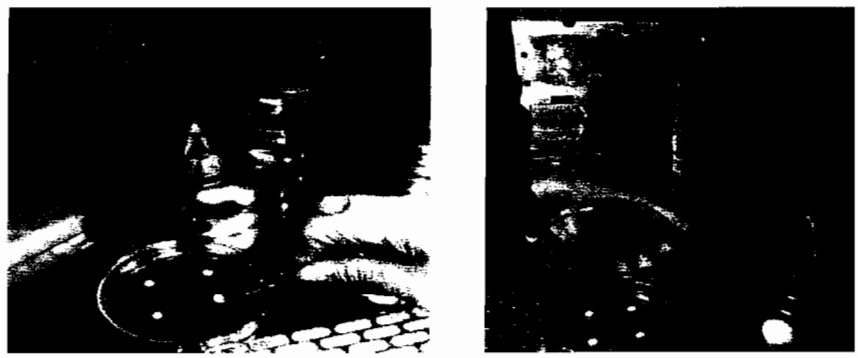
**ภาพที่ ง.4 การทดสอบในระดับชนิด**



การวางเชื้อแบบจุดบนอาหารแข็ง

การเตรียมอาหารแบบกึ่งแข็งผสมเชื้อทดสอบ

**ภาพที่ ง.5 การทดสอบด้วยวิธี Agar spot method**



การวางกระดาษปลอดเชื้อ การหยดน้ำเลี้ยงเซลล์

**ภาพที่ ง.6 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งด้วยวิธี Disc diffusion method**

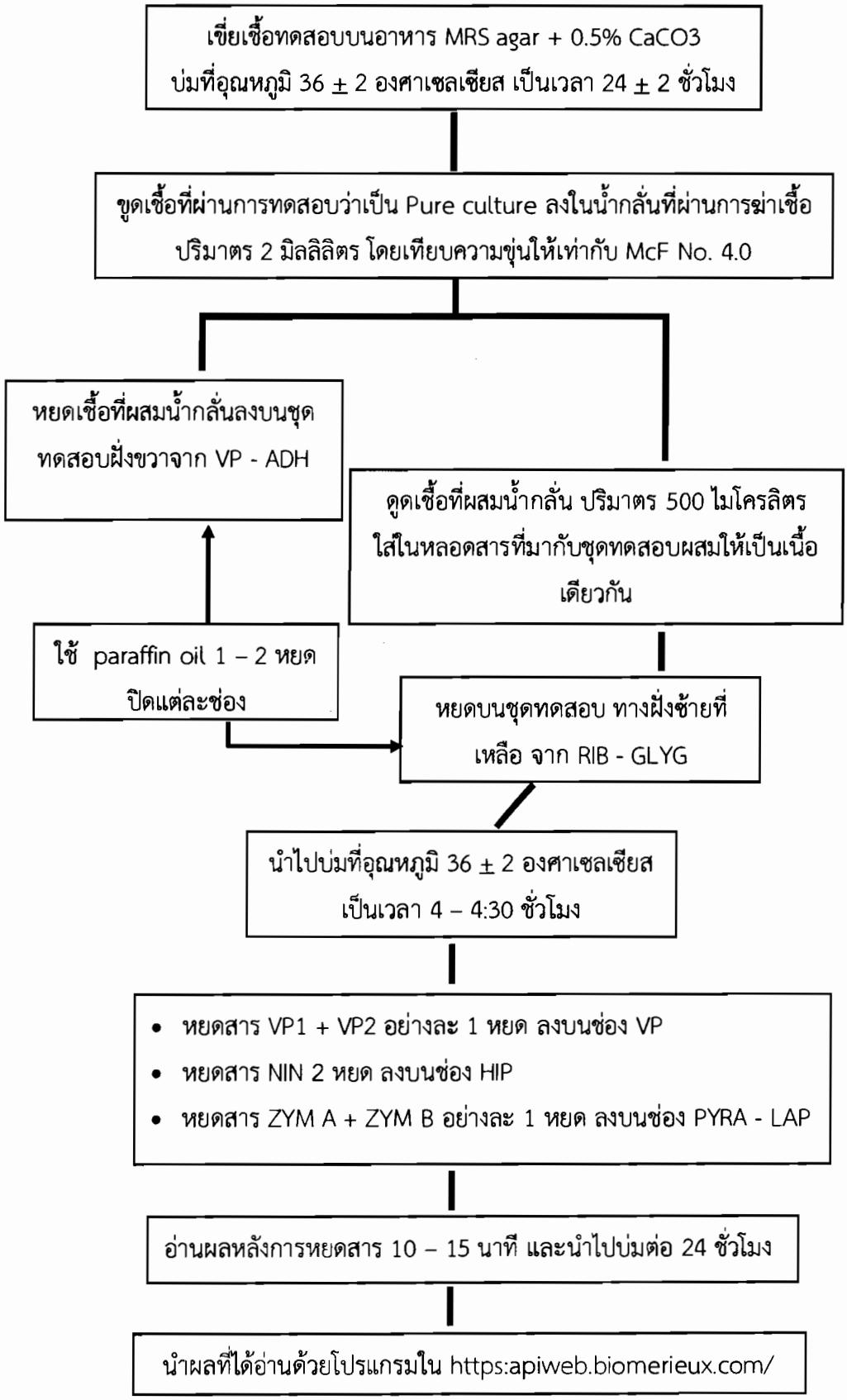
การปรับสารละลาย PBS การเจือจางน้ำดีปลา การวัดค่าดูดกลืนแสง

**ภาพที่ ง.7 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติก**

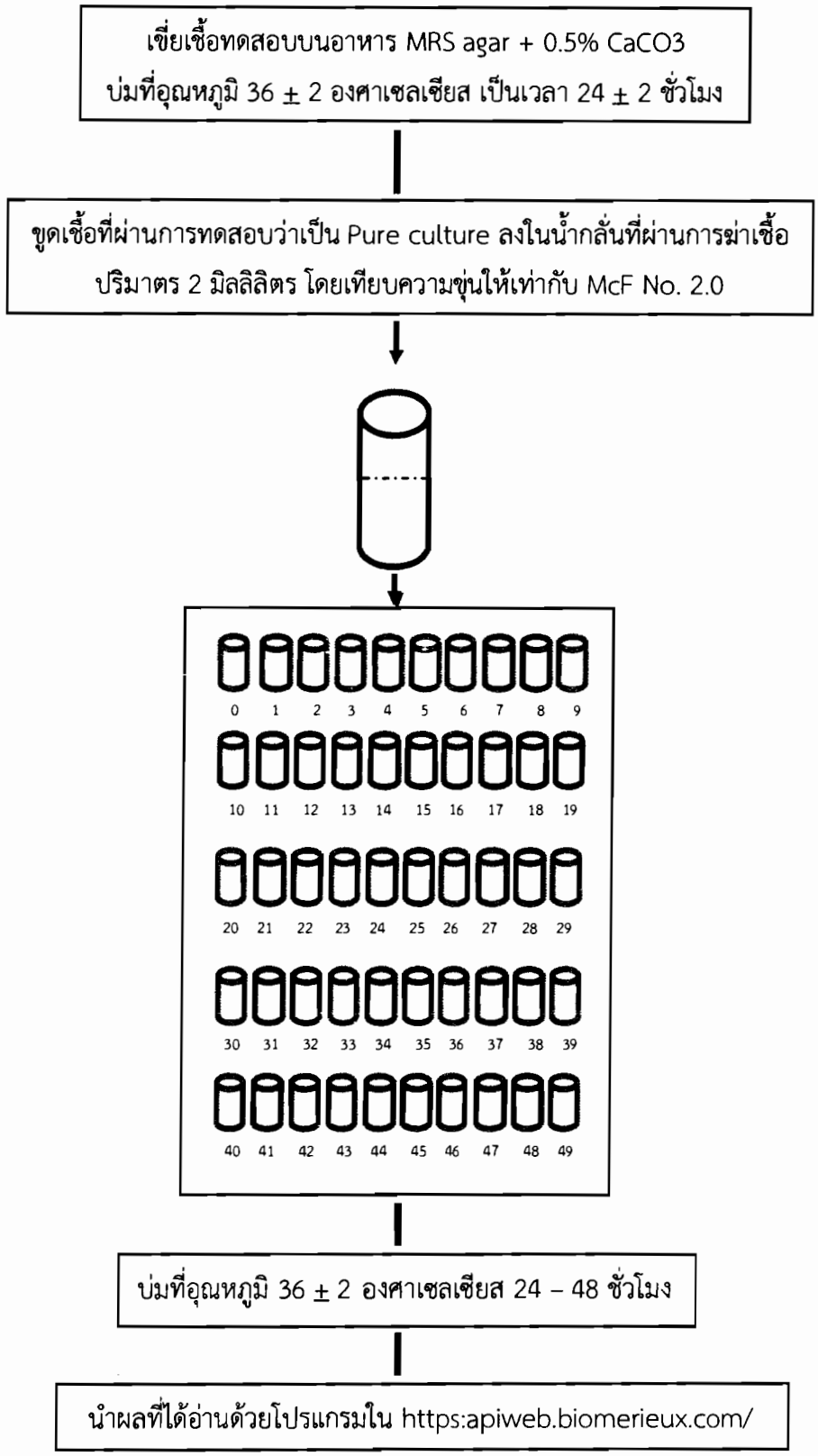
การเกลี่ยเชื้อ LAB การวางแผ่นยา

**ภาพที่ ง.8 การทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ**

**ภาพที่ ง.9 ขั้นตอนการทดสอบชนิดด้วยชุดทดสอบ API 20 strep**

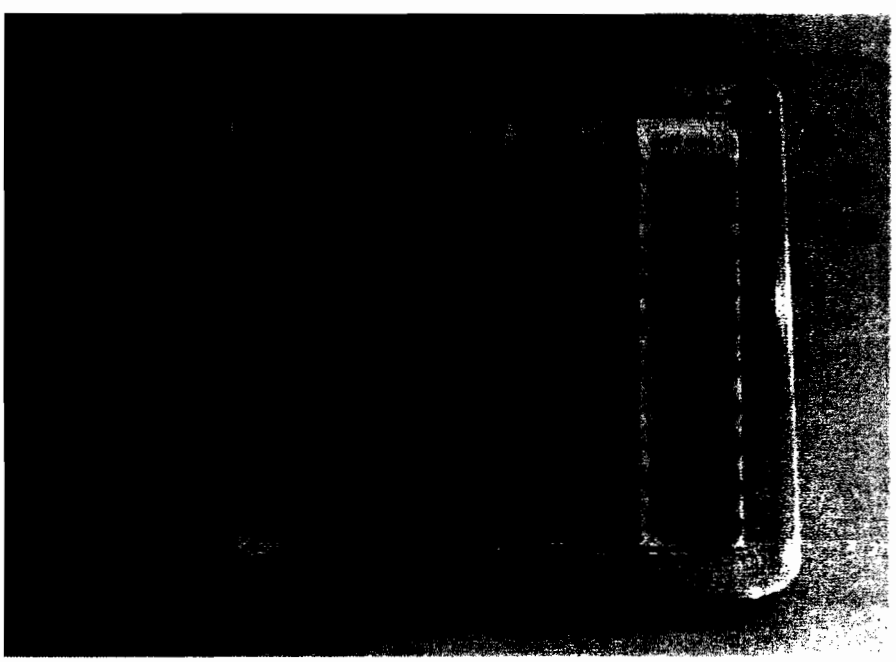


**ภาพที่ ง.10 ขั้นตอนการทดสอบชนิดด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL**



ผลการทดสอบชนิดด้วยชุด API 20 Strep ให้ผลเป็น *Enterococcus faecium*

ผลการทดสอบชนิดด้วยชุด API 20 Strep ให้ผลเป็น *Lactococcus lactis ssp. lactis*



ผลการทดสอบชนิดด้วยชุด API 50 CHL ให้ผลเป็น *Lactobacillus brevis*

**ภาพที่ ง.11 ภาพผลการทดสอบชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติก**

# ประวัติผู้วิจัย

**ชื่อ** นางวอนสมัย ดาลาแสน

**ประวัติการศึกษา** พ.ศ. 2539 – 2544 มหาวิทยาลัยแห่งชาติลาว
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์

**ประวัติการทำงาน** พ.ศ. 2544 – ปัจจุบัน
ศูนย์พัฒนาการเลี้ยงปลาน้ำช่วง กรมปสุสัตว์และการประมง กระทรวงกะสิกำและป่าไม้ นครหลวงเวียงจันท์

**ตำแหน่ง** หัวหน้าหน่วยงาน

**สถานที่ทำงานปัจจุบัน** ศูนย์พัฒนาการเลี้ยงปลาน้ำช่วง กรมปสุสัตว์และการประมง กระทรวงกะสิกำและป่าไม้ นครหลวงเวียงจันท์ โทรศัพท์ 856-20 22451633