



คุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่คัดแยกได้
จากทางเดินอาหารของปลา



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

คุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่คัดแยกได้
จากทางเดินอาหารของปลา



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "คุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่คัด
แยกได้จากทางเดินอาหารของปลา"

ของ นพปฎล เสียงเพราะ

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.รัชนีภา จุฑากนก)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัตวแพทย์หญิงวรรณภา ศิริมานะ
พงษ์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพรรณ สารินทร์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ดร.ศิริวัฒน์ คูเจริญไพบุลย์)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	คุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลา
ผู้วิจัย	นพปฎล เสี่ยงเพราะ
ประธานที่ปรึกษา	ดร.รัมภา จุฑะกนก
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัตวแพทย์หญิงวรรณภา ศิริมานะพงษ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2564
คำสำคัญ	จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์, ปลานิล, แบคทีเรียก่อโรค, อาหารเสริมสำหรับสัตว์

บทคัดย่อ

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แต่ปลานิลมักมีอัตราการตายที่สูงจากปัญหาการระบาดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เกษตรกรจึงใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งและป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะก่อให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาอย่างไม่ถูกวิธี เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ปัจจุบันจึงมีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์มาเป็นทางเลือกในการเพาะเลี้ยงปลาเพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ทั้งแบคทีเรียและยีสต์จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ และนำเชื้อที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล ตลอดจนทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เบื้องต้น พบว่า สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 245 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 68 ไอโซเลต และเป็นยีสต์ 177 ไอโซเลต จึงคัดเลือกไอโซเลตเหล่านี้มาจำนวน 55 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้อย่างน้อย 3 ชนิด และให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร จำนวน 39 ไอโซเลต และยีสต์ทุกไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้ จำนวน 16 ไอโซเลต มาทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เบื้องต้น ได้แก่ การทนต่อเกลือ น้ำดี ทนความเป็นกรดสูง การยึดเกาะพื้นผิว และการสร้างไบโอฟิล์ม จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดีจำนวน 7 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้จำลองของปลา พบว่า มีไอโซเลตที่มีชีวิตรอดทั้งในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้จำลองจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ YON3/2, YCS1/1, YCS1/3, YID23 และ AT8/5 โดยมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 108.07, 107.19, 104.65, 101.59 และ 76.07% ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกทั้ง 7 ไอโซเลตมาระบุชนิดด้วยลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สำหรับแบคทีเรีย และยีนส่วน D1/D2 domain ใน 26S rDNA สำหรับยีสต์ พบว่า ไอโซเลต

CS1/3, CE1/1, AT8/5, YCS1/1, YCS1/3, YON3/2 และ YID23 มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%Identity) กับ *Weissella paramesenteroides*, *W. paramesenteroides*, *Lactiplantibacillus argenteratensis*, *Kodamaea ohmeri*, *K. ohmeri*, *Candida tropicalis* และ *Aureobasidium melanogenum* ตามลำดับ



Title	PATHOGENIC BACTERIA INHIBITING PROPERTIES IN NILE TILAPIA OF PROBIOTIC MICROBES ISOLATED FROM FISH GASTROINTESTINAL TRACTS
Author	NOPPADON SIANGPRO
Advisor	Rumpa Jutakanoke, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Wanna Sirimanapong, Ph.D.
Academic Paper	M.Sc. Thesis in Microbiology, Naresuan University, 2021
Keywords	Probiotics, Nile tilapia, Pathogenic bacteria, Feed additives

ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is an economically important fresh-water fish in Thailand. Pathogenic bacteria outbreaks cause high mortality rates in Nile Tilapia farming. Antibiotic administrations are commonly used to inhibit and prevent pathogenic bacteria infections. However, antibiotic usages and misuses lead to other concerns about antibiotic side effects. To circumvent this problem, probiotic is one of alternative for the prevention of pathogenic bacteria in fishes. The aims of this study were to isolate probiotic, both bacteria and yeast, from fish's gastrointestinal tracts and evaluate their inhibitory activities against Nile tilapia's pathogenic bacteria as well as other properties essential for probiotic functions. In this study, 245 microbial isolates (68 bacteria and 177 yeast) were found from fish's gastrointestinal tracts. Next, 55 microbial isolates constituting 39 bacterial isolates which inhibited at least 3 strains of pathogenic bacteria with the diameter of inhibition zone ≥ 8 mm, and 16 yeast isolates that can inhibit pathogenic bacteria were selected to further examine their probiotic properties. The investigated characteristics important for probiotic properties included the ability to withstand bile salt, acid tolerance, adhesion on abiotic surface and biofilm formation. The seven isolates which met the criteria were identified and further subjected to the determination of survival rate under simulated gastrointestinal fluid. The five isolates namely YON3/2, YCS1/1, YCS1/3, YID23, and AT8/5 exhibited high survival rate at 108.07, 107.19, 104.65, 101.59, and 76.07%, respectively. These seven isolates were identified by 16S rDNA and the D1/D2 domain of 26S

rDNA sequence analysis for bacterial and yeast identification, respectively. The isolate CS1/3, CE1/1, AT8/5, YCS1/1, YCS1/3, YON3/2 and YID23 shown the highest similarity (%Identity) to *Weissella paramesenteroides*, *W. paramesenteroides*, *Lactiplantibacillus argentoratensis*, *Kodamaea ohmeri*, *K. ohmeri*, *Candida tropicalis* and *Aureobasidium melanogenum*, respectively.



ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีเนื่องจากความเมตตากรุณาและความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร.รัมภา จุฑะกนก และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.สพ.ญ.วรรณมา ศิริมานะพงษ์ ที่มอบโอกาส สนับสนุนการทำวิจัย ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนช่วยเหลือข้อผิดพลาดทั้งในทางทฤษฎีและทางปฏิบัติจนทำให้งานวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์ รศ.ดร.ศิริพรรณ สารินทร์ และ ดร.ศิริวัฒน์ คุณเจริญไพบูลย์ ที่ได้ชี้แนะแนวทางในการทำงานวิจัยและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ดร.สงกรานต์ เชื้อครุฑ ที่ได้ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการทำปฏิบัติการด้านการระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา ขอขอบพระคุณ ดร.วงศกร พงศ์โสภิตานันท์ ที่ได้ให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาทุกท่านที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้า ขอขอบคุณเพื่อนนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวกเรื่องอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และอุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจาก คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ระดับบัณฑิตศึกษา ทั้งสาขาวิชาจุลชีววิทยาและสาขาอื่นๆ ตลอดจนรุ่นพี่ศิษย์เก่าคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาในการเรียนปริญญาโท

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติๆ ที่สนับสนุนและให้กำลังใจจนวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยขอน้อมบูชาพระคุณบิดา มารดา และคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนวิชาความรู้ และให้ความเมตตากรุณาตลอดจนเป็นกำลังใจสำคัญที่ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นพปฎล เสียงเพราะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศขอบคุณการ.....	ข
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	๗
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ทบทวนเอกสาร.....	4
2.1.1 ปลานิล.....	4
2.1.1.1 ชีววิทยาของปลานิล.....	4
2.1.1.2 ความเป็นมาของปลานิล.....	5
2.1.2 สถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลในประเทศไทย.....	6
2.1.2.1 สถานการณ์การผลิต.....	6
2.1.2.2 สถานการณ์การส่งออก.....	9

2.1.3 โรคปลานิล	13
2.1.4 โพรไบโอติกส์	20
2.1.4.1 แบคทีเรียโพรไบโอติกส์	22
2.1.4.2 ยีสต์โพรไบโอติกส์	24
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	35
3.1 วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	35
3.1.1 วัสดุอุปกรณ์	35
3.1.2 เครื่องมือ	36
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	37
3.1.4 สารเคมี	37
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	39
3.2.1 การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ	39
3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล	40
3.2.2.1 การเตรียมเชื้อโพรไบโอติกส์ที่คัดแยกได้	40
3.2.2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค	40
3.2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล ด้วยวิธี Agar slab	40
3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้	41
3.2.3.1 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี	41
3.2.3.2 การทดสอบการทนต่อความเป็นกรดสูง	42
3.2.3.3 การทดสอบการยึดเกาะพื้นผิว	42

3.2.3.4 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red agar	43
3.2.4 การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลอง	43
3.2.5 การระบุชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา	45
3.2.5.1 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	45
3.2.5.2 การระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้	46
3.2.5.3 การสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)	48
3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	48
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง	49
4.1 ผลการทดลอง	49
4.1.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ จากตลาดสด	49
4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล	71
4.1.2.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	71
4.1.2.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของยีสต์ที่คัดแยกได้	81
4.1.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้	94
4.1.3.1 การทดสอบการทนต่อเกลือ น้ำดี และความเป็นกรดสูง	96
4.1.3.2 การทดสอบการยึดเกาะพื้นผิว	104
4.1.3.3 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CRA	107

4.1.4 การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลอง	111
4.1.5 การระบุชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา	117
4.2 อภิปรายผลการทดลอง	122
4.2.1 การตัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ	122
4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล	123
4.2.2.1 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์	130
4.2.2.2 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของยีสต์	132
4.2.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์เบื้องต้น	133
4.2.4 การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลอง	140
4.2.5 การระบุชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา	141
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	150
บรรณานุกรม	151
ภาคผนวก	182
ประวัติผู้วิจัย	191

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณผลผลิตปลานิลจากการเพาะเลี้ยงในปี พ.ศ. 2561-2562 (เดือนมกราคม-มิถุนายน)	7
ตารางที่ 2 ผลผลิต เนื้อที่เลี้ยง และผลผลิตปลานิล เฉลี่ยต่อไร่ ปี พ.ศ. 2554-2564	8
ตารางที่ 3 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกปลานิลของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2561-2562 (เดือนมกราคม-มิถุนายน).....	11
ตารางที่ 4 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกปลานิลของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2562-2563 ..	12
ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน 16S rDNA	46
ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ของยีนส่วน D1/D2 domain ใน 26S rDNA	47
ตารางที่ 7 จำนวนไอโซเลตของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ.....	49
ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	51
ตารางที่ 9 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ที่คัดแยกได้.....	58
ตารางที่ 10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (มม. \pm SD).....	71
ตารางที่ 11 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของยีสต์ที่คัดแยกได้ (มม. \pm SD).....	81
ตารางที่ 12 ค่า OD ₆₄₀ ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในสภาวะปกติ มีเกลื่อนน้ำดี และมีความเป็นกรดสูง	96
ตารางที่ 13 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในสภาวะปกติ มีเกลื่อนน้ำดี และมีความเป็นกรดสูง	100

ตารางที่ 14	ค่า OD_{640} ของยีสต์ที่คัดแยกได้ในสภาวะปกติและมีเกลือน้ำดี.....	102
ตารางที่ 15	การเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้ในสภาวะปกติและมีเกลือน้ำดี	103
ตารางที่ 16	ค่า Ab_{590} และปริมาณการยืดเกาะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	104
ตารางที่ 17	ค่า Ab_{590} และปริมาณการยืดเกาะของยีสต์ที่คัดแยกได้	106
ตารางที่ 18	ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	107
ตารางที่ 19	ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของยีสต์ที่คัดแยกได้	109
ตารางที่ 20	คุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดเลือก	111
ตารางที่ 21	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและอัตราการรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะทางเดิน อาหารจำลอง	113
ตารางที่ 22	ผลการระบุชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา	120
ตารางที่ 23	รายงานการวิจัยที่สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้	127

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 รูปร่างลักษณะของปลานิล.....	5
ภาพที่ 2 ปริมาณผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงปลานิล ปี พ.ศ. 2559-2562 (ม.ค.-มิ.ย.).....	8
ภาพที่ 3 ปริมาณและมูลค่าปลานิลจากการเพาะเลี้ยงปลานิล ปี พ.ศ. 2554-2563.....	9
ภาพที่ 4 สัดส่วนการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลไทยปี พ.ศ. 2562 (ม.ค.-มิ.ย.)..	11
ภาพที่ 5 สัดส่วนการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลไทยปี พ.ศ. 2563	12
ภาพที่ 6 ลักษณะตาขุนขาวและโปนของปลานิลที่ติดเชื้อ <i>Streptococcus</i> spp.....	16
ภาพที่ 7 ลักษณะการมีเลือดออกที่ผิวหนังของปลานิลที่ติดเชื้อ <i>A. hydrophila</i>	17
ภาพที่ 8 รอยโรคผื่นชนิด Ecthyma gangrenosum ที่ขาในคนที่ติดเชื้อ <i>A. hydrophila</i>	17
ภาพที่ 9 ลักษณะก้อนสีขาวที่ตับของปลานิลที่ติดเชื้อ <i>E. tarda</i>	18
ภาพที่ 10 ลักษณะหางกร่อนของลูกปลานิลที่ติดเชื้อ <i>F. columnarum</i>	19
ภาพที่ 11 ลักษณะซิสต์บริเวณซีเหงือกของปลาที่เป็นโรค Epitheliocystis	19
ภาพที่ 12 คุณลักษณะเบื้องต้นของโพรบิโอติกส์	21
ภาพที่ 13 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลต กำลังขยาย 1,000X.....	70
ภาพที่ 14 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ที่คัดแยกได้บางไอโซเลต กำลังขยาย 400X.....	70
ภาพที่ 15 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของตัวควบคุมบวกต่อเชื้อแบคทีเรียก่อ โรคในปลานิล.....	76

ภาพที่ 16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ <i>A. hydrophila</i> MUVS 2018 AH 001.....	77
ภาพที่ 17 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ <i>A. sobria</i> MUVS 2017 AS	78
ภาพที่ 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ <i>E. ictaluri</i> 2010/12 EI	79
ภาพที่ 19 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ <i>E. tarda</i> MUVS 2018 ET1.....	80
ภาพที่ 20 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ <i>S. agalactiae</i> MUVS 2017 SA 001.....	80
ภาพที่ 21 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของยีสต์ที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาไนล	94
ภาพที่ 22 แผนภูมิแท่งจำนวนไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาไนล	94
ภาพที่ 23 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red agar ของเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์ม (ซ้าย) และไม่สร้างไบโอฟิล์ม (ขวา)	110
ภาพที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต CS1/3 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง	114
ภาพที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต CE1/1 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง	114
ภาพที่ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต AT8/5 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง	115
ภาพที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต YCS1/1 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง	115

ภาพที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต YCS1/3 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง	116
ภาพที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต YON3/2 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง	116
ภาพที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต YID23 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง	117
ภาพที่ 31 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อที่คัดเลือกในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง	117
ภาพที่ 32 ขนาด PCR product ของแบคทีเรียที่ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส..	118
ภาพที่ 33 ขนาด PCR product ของยีสต์ที่ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	119
ภาพที่ 34 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของไอโซเลตแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	121
ภาพที่ 35 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของไอโซเลตยีสต์ที่คัดแยกได้.....	122

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทยนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2508 จนถึงปัจจุบัน (นฤชยา, 2553) และสามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นจำนวนมาก จากรายงานขององค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) พบว่าประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีการผลิตปลานิลเป็นจำนวนมาก (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012) โดยในปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทยมีการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ไปจำหน่ายทั่วโลกเป็นอันดับที่ 16 ของโลก คิดเป็นมูลค่า 277.9 ล้านบาท (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ สำนักการค้าสินค้า, 2564) จากรายงานสถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิล ของกองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กรมประมง พบว่าประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลในช่วง 6 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2562 อยู่ที่ 5,441.7 ตัน คิดเป็นมูลค่า 209.2 ล้านบาท ทั้งปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันในปี พ.ศ. 2561 (เกวลิน, 2562) และคาดว่าจะมีผลผลิตประมาณ 210,419 ตัน ในปี พ.ศ. 2564 (เกวลิน, 2563) อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงปลานิลมักพบปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรีย (Chitmanat et al., 2016) เช่น *Streptococcus agalactiae* (Jantrakajorn et al., 2014; Suanyuk et al., 2008) *Aeromonas hydrophila* (Tipmongkolsilp et al., 2012) และ *Edwardsiella tarda* (Thongkao & Sudjaroen, 2017) โดยเฉพาะเชื้อ *S. agalactiae* ซึ่งมีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในปลานิลที่เลี้ยงในฟาร์มในประเทศไทย ด้วยค่าอัตราการความชุกมากกว่าร้อยละ 80 และส่งผลให้ปลามีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 75 (Maisak et al., 2008) ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาภาวะขาดทุนและก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นอย่างมากในปัจจุบัน (Yin et al., 2018) จากปัญหาดังกล่าวเกษตรกรมักแก้ปัญหาโดยใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมและป้องกันการเกิดโรคจากแบคทีเรีย แต่มักจะเกิดผลกระทบจากการใช้ยาที่เกินขนาดและใช้อย่างไม่ถูกวิธีตามมา เช่น การื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย (Figueiredo et al., 2012) มียาตกค้างในตัวปลาและสิ่งแวดล้อม (Abutbul et al., 2004; Agnew & Barnes, 2007) ซึ่งจะส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค อีกทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะจะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่ในตัวปลา ซึ่งจะทำให้ปลาเกิดอาการเครียด มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ และมีการเจริญเติบโตที่ช้าลง (Atal, 1982) นอกจากนี้ยังอาจส่งผลทางอ้อมต่อระบบเศรษฐกิจ โดยประเทศไทยจะไม่สามารถส่งออกปลานิลไปยังต่างประเทศได้

เนื่องจากประเทศส่วนใหญ่จะปฏิเสธการนำเข้าผลิตภัณฑ์ปลาที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยง หรือมียาปฏิชีวนะตกค้างอยู่ในเนื้อปลา (Gastalho et al., 2014; Kesarcodi-Watson et al., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องหาทางเลือกใหม่ เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ ลดอัตราการเกิดแบคทีเรียก่อโรค และลดปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล

การให้วัคซีนเป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในปลานิล (Gudding et al., 1999; Parada et al., 2007; Tu et al., 2010) แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนของปลาที่มีมากในฟาร์มเพาะเลี้ยง มีความยากลำบากในการฉีดและยังมีค่าใช้จ่ายที่สูง (Ringø et al., 2014) จึงทำให้ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับทางเลือกใหม่ของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพเพื่อทดแทนวิธีการเลี้ยงแบบดั้งเดิม คือการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ (Pinpimai et al., 2015) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคหรือเจ้าบ้าน (Host) (FAO/WHO, 2001) โดยในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โพรไบโอติกส์เป็นหนึ่งในวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมโรคติดเชื้อ ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ส่งเสริมการเจริญเติบโต การย่อยและการดูดซึมสารอาหาร (Essa et al., 2010; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Li et al., 2006; Ringø et al., 2014) และช่วยเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Yamashita et al., 2017)

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาเรนโบว์เทราต์ (Gatesoupe, 2007) ปลากระบอก (Laconi & Pompei, 2007) ปลาโมง (Meidong et al., 2018) รวมถึงปลานิล (Aly et al., 2008; Lara-Flores & Olvera-Novoa, 2013; Melo-Bolivar et al., 2019; Reda et al., 2018) ทั้งนี้การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของปลาในประเทศไทย มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลสายพันธุ์ไทยจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้จึงได้คัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ทั้งแบคทีเรียและยีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลจากปลาชนิดต่างๆ ในประเทศไทยและนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลและทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกส์เพื่อเพิ่มความต้านทานโรคติดเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงเป็นการทดแทนหรือลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลานิลต่อไปในอนาคต

1.2 จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ จากตลาดสด
2. เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลและคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้

3. เพื่อระบุเอกลักษณ์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่คัดแยกได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ทั้งแบคทีเรียและยีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล และมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดีเพื่อจะนำไปทดสอบในปลานิลในห้องปฏิบัติการจริงและในระดับฟาร์มต่อไป และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกส์เพื่อเพิ่มความต้านทานโรคติดเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงเป็นการทดแทนหรือลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลานิลในอนาคต

1.4 ขอบเขตการวิจัย

คัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ จากตลาดสดในอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก และทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลและคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อดังกล่าว ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทบทวนเอกสาร

2.1.1 ปลานิล

ปลานิล (Nile Tilapia) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (Lin.) เป็นปลา น้ำจืดชนิดหนึ่งอยู่ในวงศ์ปลาหมอสี (Cichlidae) มีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Perciformes

Family Cichlidae

Genus *Oreochromis*

Species *Oreochromis niloticus*

ปลานิลมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา (Africa) พบทั่วไปตามหนอง บึง และ ทะเลสาบในประเทศซูดาน (Sudan) ยูกันดา (Uganda) และแทนซาเนีย (Tanzania) ไปจนถึง ตะวันออกกลาง (Middle East) อาทิ อิสราเอล (Israel) จอร์แดน (Jordan) และซีเรีย (Syria) ปลา ชนิดนี้เจริญเติบโตเร็วและเลี้ยงง่ายเหมาะที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในบ่อดินได้เป็นอย่างดี จึงได้รับความนิยมและเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในหลายทวีป เช่น แอฟริกา อเมริกา (America) และเอเชีย (Asia) รวมถึงประเทศไทยที่มีการเพาะเลี้ยงนับตั้งแต่ปี 2508 เป็นต้นมา ปลานิลสามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพ การเพาะเลี้ยง ทั้งในบ่อดิน กระจก หรือคอก ในระยะเวลา 8 เดือนถึง 1 ปีปลานิลสามารถเจริญเติบโต ได้ถึงขนาด 500 กรัม เนื้อปลามีรสชาติดีจึงเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง (นฤชยา, 2553)

2.1.1.1 ชีววิทยาของปลานิล

รูปร่างลักษณะของปลานิลคล้ายกับปลาหมอเทศแต่ลักษณะพิเศษของปลานิล คือริม ฝีปากบนและล่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ตามลำตัวมีลายพาดขวางจำนวน 9 - 10 แถบ นอกจากครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ครีบ ก้น ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและอ่อนเช่นกัน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปน น้ำตาลตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่หนึ่งจุด บริเวณส่วนอ่อนของครีบหลังครีบ ก้น และครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาวและสีดำ ตัวขวางแลดูคล้ายลายข้าวตอก (ภาพที่ 1)

ปลานิลเป็นปลาที่อยู่กันเป็นฝูง สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยได้ดี สามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้ดีในช่วง 6.5 – 8.5 และทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ถึง 40 องศาเซลเซียส (°C) เนื่องจากถิ่นกำเนิดของปลานิลอยู่ในเขตร้อน ปลานิลกินได้ทั้งพืชและสัตว์ สามารถกินแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ ซากอินทรีย์และอนินทรีย์ที่เน่าเปื่อย รวมทั้งจุลินทรีย์ และพืชน้ำต่างๆ ได้ เป็นปลาที่กินอาหารในเวลากลางวันและหยุดกินอาหารในเวลากลางคืน กินอาหารได้ทั้งที่ผิวน้ำ กลางน้ำ และก้นบ่อ (กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, ม.ป.ป.)



ภาพที่ 1 รูปร่างลักษณะของปลานิล
(ที่มา: <https://bit.ly/2MIqEM4>)

2.1.1.2 ความเป็นมาของปลานิล

เมื่อครั้งที่สมเด็จพระจักรพรรดิอาคิฮิโตะ (Akihito) ทรงดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่นได้ทรงจัดส่งปลานิลจำนวน 50 ตัว ความยาวเฉลี่ยประมาณตัวละ 9 เซนติเมตร (ซม.) น้ำหนักประมาณ 14 กรัม มาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระบรมชนกาธิเบศร มหาภูมิพลอดุลยเดชมหาราช บรมนาถบพิตร (พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวรัชกาลที่ 9) เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 ในระยะแรกพระองค์ท่านได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดินเนื้อที่ประมาณ 10 ตารางเมตร (ตร.ม.) ณ บริเวณสวนจิตรลดาพระราชวังดุสิต เมื่อเลี้ยงมาได้ 5 เดือนเศษ วันที่ 1 กันยายน 2508 พระองค์ได้ทรงย้ายปลาจากบ่อเดิมไปเลี้ยงในบ่อใหม่เนื้อที่ประมาณ 70 ตร.ม. ด้วยพระองค์เอง นอกจากนี้ยังทรงมีพระราชประสงค์ให้ขยายปลาชนิดนี้เพื่อเป็นประโยชน์แก่พสกนิกรต่อไป ต่อมาพระองค์ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า “ปลานิล” และได้พระราชทานปลานิลขนาด 3-5 ซม. จำนวน 10,000 ตัว ให้แก่กรมประมง เมื่อวันที่ 17 มีนาคม 2509 เพื่อให้นำไปเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ที่แผนกทดลองและเพาะเลี้ยงในบริเวณเกษตรกลางบางเขน และที่สถานีประมงต่างๆ ทั่วราชอาณาจักรรวม 15 แห่ง เพื่อดำเนินการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์พร้อมกัน เมื่อปลานิลแพร่ขยายพันธุ์ออกไปได้มากเพียงพอแล้วจึงได้แจกจ่ายให้แก่ราษฎรนำไปเพาะเลี้ยงตามพระราชประสงค์ต่อไป นอกจากนี้พระองค์ได้ทรงตระหนักถึงความสำคัญในด้านการอนุรักษ์และการ

ปรับปรุงพันธุ์ปลา จึงทรงมีพระราชดำริให้พยายามรักษาปลานิลพันธุ์แท้เอาไว้ เพราะสังเกตเห็นว่า ปลานิลตามท้องตลาดกลายเป็นพันธุ์ไป มีขนาดเล็กและโตช้า พระราชดำรินี้ทางกรมประมงได้น้อมรับมาดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ปลานิลโดยใช้ปลานิลสายพันธุ์ซึ่งเป็นสายพันธุ์จิตรลดาจากสวนจิตรลดาเป็นพ่อแม่พันธุ์ในการควบคุมพันธุ์กรรม โดยดำเนินการคัดปลานิลสายพันธุ์จิตรลดาแบบคัดเลือกภายในครอบครัว (With-in family selection) จำนวน 5 ชั่วอายุ ซึ่งสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง ปรับปรุงพันธุ์ได้เมื่อ พ.ศ. 2536 ต่อจากนั้นได้ดำเนินการทดสอบพันธุ์ ณ ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืด ฟาร์มเกษตรกร ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา เชียงราย พิษณุโลก พิจิตร เพชรบุรี อุตรธานี และขอนแก่น ซึ่งสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง พิจารณาให้เป็นพันธุ์แนะนำภายใต้ชื่อว่า “ปลานิลจิตรลดา 1” โดยมีลักษณะประจำพันธุ์คือให้ผลผลิตสูงกว่าปลานิลสายพันธุ์ปกติร้อยละ 22 และอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าสายพันธุ์ปกติร้อยละ 10 ต่อมากรมประมงได้ตระหนักถึงความสำคัญของปลานิลต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย จึงได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยด้านการพัฒนาการเพาะเลี้ยง และปรับปรุงพันธุ์ปลานิลอย่างต่อเนื่อง จนได้สายพันธุ์ปลานิลอีก 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จิตรลดา 2 และสายพันธุ์จิตรลดา 3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่บริโภคในปัจจุบัน (นฤชยา, 2553; ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ อุตรดิตถ์, 2562)

2.1.2 สถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลในประเทศไทย

2.1.2.1 สถานการณ์การผลิต

ผลผลิตปลานิลจากการเพาะเลี้ยงในช่วง 6 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2562 มีปริมาณ 97,704 ตัน ซึ่งลดลงร้อยละ 6.6 เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปีที่ผ่านมา (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2) เนื่องจากประสบกับภัยแล้งมาตั้งแต่ปลายเดือนกุมภาพันธ์ และคาดว่าภัยแล้งจะยาวนานกว่าปีที่ผ่านมา สำหรับปริมาณผลผลิตทั้งปี พ.ศ. 2562 คาดว่าอยู่ที่ 212,400 ตัน ซึ่งเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.5 เมื่อเทียบกับปีที่ผ่านมา เนื่องจากภาครัฐยังคงมีโครงการส่งเสริมการเลี้ยงปลานิลในหลายพื้นที่ แต่ทั้งนี้ควรเฝ้าระวังเรื่องปริมาณน้ำในเขื่อน อ่างเก็บน้ำ และแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ที่คาดว่าจะมีน้อยกว่าในปีที่ผ่านมา โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เกวลิน, 2562)

ผลผลิตปลานิล ในปี พ.ศ. 2563 มีปริมาณ 205,971 ตัน จากเนื้อที่เลี้ยง 437,811 ไร่ ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่คิดเป็น 471 กิโลกรัม เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2562 พบว่า ผลผลิตลดลง ร้อยละ 3.7 เนื้อที่เลี้ยงลดลง ร้อยละ 1.8 และผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ลดลง ร้อยละ 1.9 (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3) ทั้งนี้ผลผลิตปลานิลในปี พ.ศ. 2563 ลดลง เนื่องจากสถานการณ์ภัยแล้ง ส่งผลให้ปริมาณน้ำในเขื่อนและแหล่งน้ำตามธรรมชาติไม่เพียงพอต่อการเลี้ยง เกษตรกรจำเป็นต้องชะลอการเลี้ยง ลดรอบการเลี้ยง หรือลดอัตราการปล่อยลูกพันธุ์ปลาลงบ่อเลี้ยง ส่งผลให้ผลผลิตภาพรวมทั้งประเทศลดลง อย่างไรก็ตามคาดว่าผลผลิตปลานิลในปี พ.ศ. 2564 จะมีปริมาณ 210,419 ตัน ซึ่งเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.2 จากปี พ.ศ. 2563 เนื่องจากปริมาณน้ำมีเพียงพอสำหรับการเลี้ยงในรอบปี ปริมาณฝนที่ตกทั่วถึงทุกๆ พื้นที่

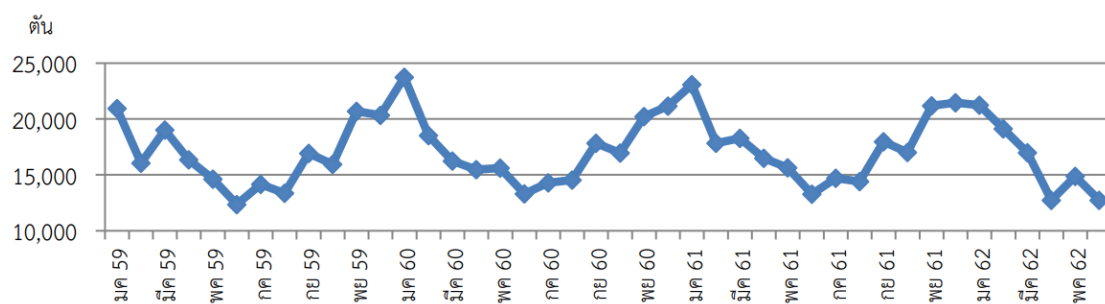
ประกอบราคาหน้าฟาร์มที่เกษตรกรจำหน่ายได้ปรับตัวสูงขึ้น จึงจูงใจให้เกษตรกรเริ่มกลับมาเลี้ยงใหม่ อีกครั้ง หลังจากที่ฟักบ่อ หรือลดรอบการเลี้ยง ด้วยเหตุจากที่ประสบภัยแล้งในปี พ.ศ. 2563 นอกจากนี้เกษตรกรมีการอนุบาลลูกปลาให้ได้ขนาดใหญ่ก่อนปล่อยลงบ่อเลี้ยงเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิต รวมทั้งเพิ่มอัตราการปล่อยลูกพันธุ์ปลาลงบ่อเลี้ยง ส่งผลให้ผลผลิตต่อไร่และผลผลิตปลานิลในปี พ.ศ. 2564 เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2563 (เกวลิน, 2563)

ตารางที่ 1 ปริมาณผลผลิตปลานิลจากการเพาะเลี้ยงในปี พ.ศ. 2561-2562 (เดือนมกราคม-มิถุนายน)

(หน่วย : ตัน)

เดือน	พ.ศ. 2561	พ.ศ. 2562
มกราคม	23,081	21,240
กุมภาพันธ์	17,847	19,116
มีนาคม	18,289	16,992
เมษายน	16,485	12,744
พฤษภาคม	15,630	14,868
มิถุนายน	13,270	12,744
กรกฎาคม	14,723	
สิงหาคม	14,414	
กันยายน	17,971	
ตุลาคม	17,009	
พฤศจิกายน	21,182	
ธันวาคม	21,467	
รวม	211,368	97,704
ไตรมาสที่ 1	59,217	57,348
ไตรมาสที่ 2	45,385	40,356

ที่มา : ข้อมูลผลผลิตเบื้องต้นรายปี พ.ศ. 2560-2561 จากคณะกรรมการพัฒนาคุณภาพข้อมูลด้านการเกษตร (กรมประมงร่วมกับสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) ทั้งนี้กรมประมงนำมากระจายเป็นรายเดือนจากการประเมินลูกพันธุ์ ณ เดือนมีนาคม พ.ศ. 2562



ภาพที่ 2 ปริมาณผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงปลานิล ปี พ.ศ. 2559-2562 (ม.ค.-มิ.ย.)

(ที่มา: เกวลิน, 2562)

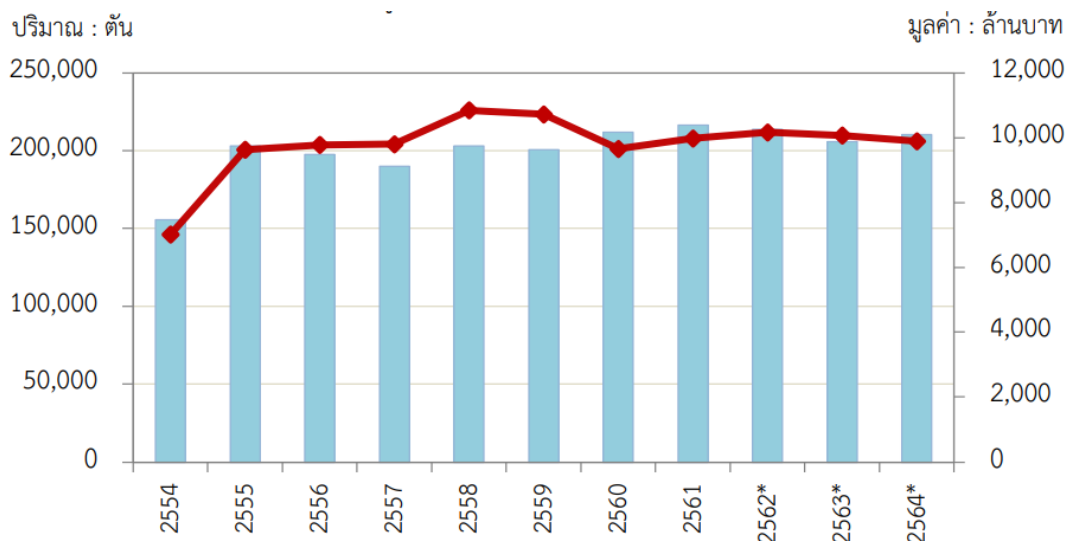
ตารางที่ 2 ผลผลิต เนื้อที่เลี้ยง และผลผลิตปลานิล เฉลี่ยต่อไร่ ปี พ.ศ. 2554-2564

ปี	ผลผลิต		เนื้อที่เลี้ยง		ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่	
	ตัน	%Δ	ไร่	%Δ	กิโลกรัม/ไร่	%Δ
2554	155,544		405,335		384	
2555	203,029	30.5	450,699	10.1	450	17.4
2556	197,595	-2.7	439,854	-2.5	449	-0.3
2557	189,946	-3.9	425,786	-3.3	446	-0.7
2558	203,227	7.0	435,252	2.2	467	4.7
2559	200,764	-1.2	427,440	-1.8	470	0.6
2560	211,929	5.6	444,502	3.8	477	1.5
2561	216,602	2.2	447,016	0.6	485	1.6
2562*	213,872	-1.3	445,779	-0.3	480	-1.0
2563*	205,971	-3.7	437,811	-1.8	470	-1.9
2564*	210,419	2.2	442,120	1.0	476	1.2

ที่มา : กลุ่มสถิติการประมง กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง กรมประมง

หมายเหตุ: เครื่องหมาย * หมายถึง ข้อมูลเบื้องต้น (คณะกรรมการพัฒนาคุณภาพข้อมูลด้านการเกษตร ณ วันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2564)

เครื่องหมาย %Δ หมายถึง ร้อยละการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับปีก่อนหน้านี้



ที่มา : กลุ่มสถิติการประมง

■ ปริมาณ

◆ มูลค่า

หมายเหตุ: เครื่องหมาย * หมายถึง ข้อมูลเบื้องต้น (คณะกรรมการพัฒนาคุณภาพข้อมูลด้านการเกษตร ณ วันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2564)

ภาพที่ 3 ปริมาณและมูลค่าปลานิลจากการเพาะเลี้ยงปลานิล ปี พ.ศ. 2554-2563

(ที่มา: เกวลิน, 2563)

2.1.2.2 สถานการณ์การส่งออก

ปริมาณการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลของประเทศไทยในช่วง 6 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2562 มีปริมาณ 5,441.7 ตัน คิดเป็นมูลค่า 209.2 ล้านบาท ทั้งปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 5.3 และ 4.2 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปีที่ผ่านมา รูปแบบผลิตภัณฑ์ปลานิลที่ส่งออกมากที่สุด คือ ปลานิลทั้งตัวแช่แข็ง คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 73 ของมูลค่า การส่งออกทั้งหมดรองลงมา คือ ปลานิลสดแช่เย็น คิดเป็นร้อยละ 10 ปลานิลมีชีวิต คิดเป็นร้อยละ 8.6 และเนื้อปลานิลแช่แข็ง คิดเป็นร้อยละ 8.4 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 4ก) โดยมีตลาดหลัก คือ กลุ่มประเทศตะวันออกกลาง ร้อยละ 39.6 กลุ่มอาเซียน (ASEAN) ร้อยละ 18.7 ประเทศสหรัฐอเมริกา (USA) ร้อยละ 16.9 กลุ่มประเทศสหภาพยุโรป (Europe) ร้อยละ 16.5 ประเทศไต้หวัน (Taiwan) ร้อยละ 3.2 และประเทศอื่นๆ ร้อยละ 5.1 (ภาพที่ 4ข) สำหรับในปี พ.ศ. 2562 คาดว่าการส่งออกจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามปริมาณผลผลิตที่เพิ่มขึ้น (เกวลิน, 2562)

ปริมาณการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2563 มีปริมาณ 5,572.9 ตัน คิดเป็นมูลค่า 194.9 ล้านบาท ทั้งปริมาณและมูลค่าลดลง 42.6% และ 42.7% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2562 รูปแบบผลิตภัณฑ์ปลานิลที่ส่งออกมากที่สุด คือ ปลานิลทั้งตัว

แช่แข็ง คิดเป็นสัดส่วน 67.3% ของมูลค่าการส่งออก ทั้งหมดรองลงมา คือ พลาสติกแช่เย็น 19.4% เนื้อปลาแช่แข็ง 6.9% ปลาหมึกแช่เย็น 6.3% และเนื้อปลานิลแช่เย็น 0.1% (ตารางที่ 4 และภาพที่ 5ก) โดยมีตลาดหลัก คือ กลุ่มตะวันออกกลาง 31.5% กลุ่มอาเซียน 26.1% สหรัฐอเมริกา 20.0% กลุ่มสหภาพยุโรป 11.6% อังกฤษ 3.9% และอื่นๆ 6.9% (ภาพที่ 5ข) การส่งออกปลานิลของไทยลดลง เนื่องจากสถานการณ์โรคระบาดโควิด-19 (Covid-19) ที่เกิดขึ้นกับประเทศผู้นำเข้าหลักหลายประเทศ ประกอบกับค่าเงินบาทแข็งค่า ซึ่งมีผลกระทบต่อขีดความสามารถในการแข่งขันการส่งออกของไทย ทำให้ราคาปลานิลไทยสูงกว่าเมื่อเทียบกับประเทศคู่แข่ง ดังนั้นไทยควรมองหาตลาดใหม่ๆ เพิ่มเติม เช่น ตลาดในกลุ่มอาเซียน และตลาดที่มีแนวโน้มการบริโภคปลานิลเพิ่มขึ้น เช่น เม็กซิโก (Mexico) ซาอุดีอาระเบีย (Saudi Arabia) แคนาดา (Canada) โกตดิวัวร์ (Cote d'Ivoire) และรัสเซีย (Russia) เป็นต้น (เกวลิน, 2563)

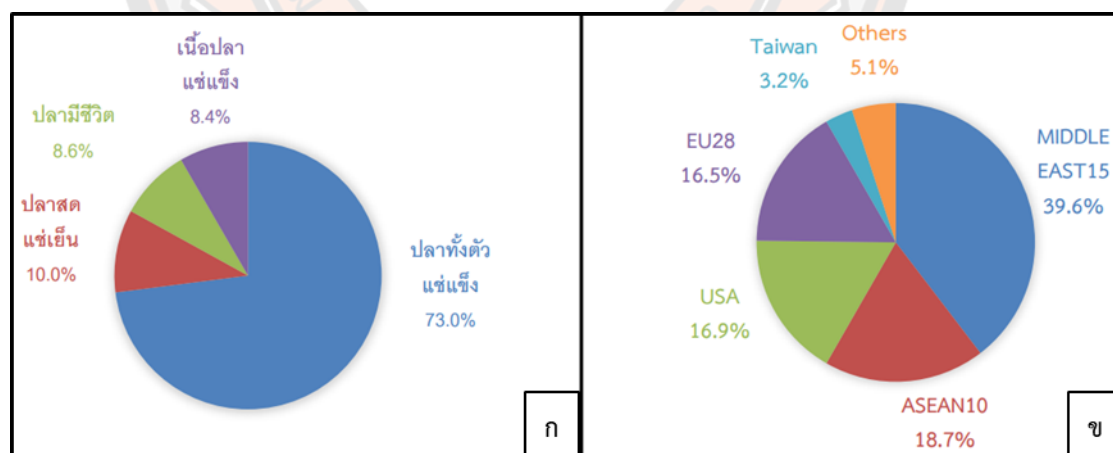


ตารางที่ 3 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกปลานิลของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2561-2562 (เดือนมกราคม-มิถุนายน)

(ปริมาณ : ตัน, มูลค่า : ล้านบาท)

รายการ	พ.ศ. 2561		พ.ศ. 2561 (ม.ค.-มิ.ย.)		พ.ศ. 2562 (ม.ค.-มิ.ย.)		ร้อยละการเปลี่ยนแปลง	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
ปลาทั้งตัว แช่แข็ง	6,674.1	308.2	3,476.7	159.5	3,366.8	152.6	-3.2%	-4.3%
เนื้อปลา แช่แข็ง	116.2	15.9	75.4	10.2	141.7	17.5	88.0%	72.0%
ปลาสดแช่ เย็น	3,746.2	48.6	1,455.8	21.5	1,438.9	21.0	-1.2%	-2.3%
ปลามีชีวิต	312.0	20.6	158.0	9.5	494.3	18.1	212.8%	90.0%
รวม	10,848.5	393.3	5,165.9	200.7	5,441.7	209.2	5.3%	4.2%

ที่มา : กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง ประมวลข้อมูลจากกรมศุลกากร



ภาพที่ 4 สัดส่วนการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลไทยปี พ.ศ. 2562 (ม.ค.-มิ.ย.)

(ก) สัดส่วนมูลค่ารูปแบบปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลไทย

(ข) สัดส่วนมูลค่าการส่งออกปลานิลไทยไปยังประเทศต่างๆ

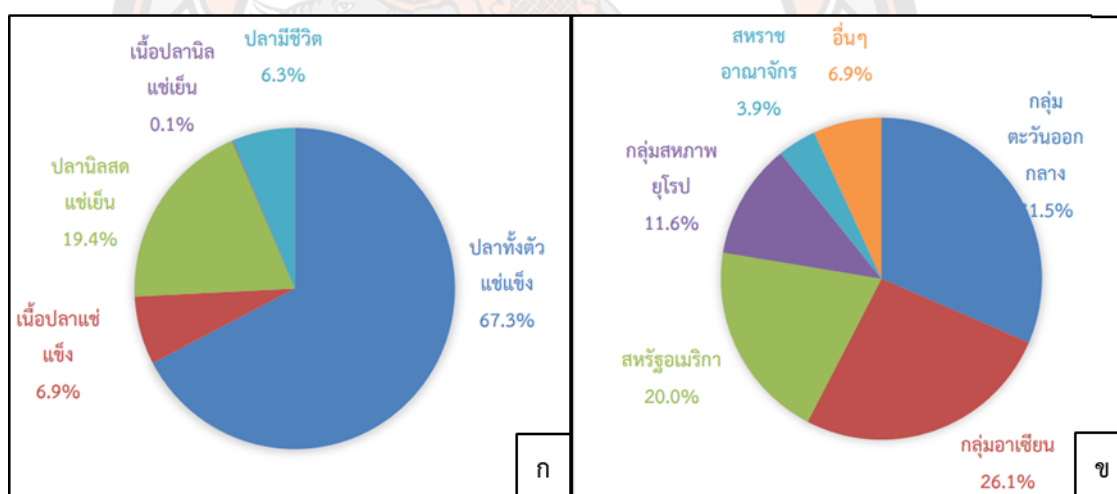
(ที่มา: เกวลิน, 2562)

ตารางที่ 4 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกปลานิลของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2562-2563

(ปริมาณ : ตัน, มูลค่า : ล้านบาท)

รายการ	2562		2563		ร้อยละการเปลี่ยนแปลง	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
ปลาทั้งตัวแช่แข็ง	5,075.1	229.5	2,417.4	131.2	-52.4	-42.8
เนื้อปลาแช่แข็ง	185.5	24.6	82.3	13.4	-55.6	-45.5
ปลาสดแช่เย็น	3,655.2	48.6	2,861.3	37.8	-21.7	-22.2
เนื้อปลาแช่เย็น	0.5	0.02	0.4	0.02	-20.0	0.0
ปลามีชีวิต	801.4	37.5	211.5	12.5	-73.6	-66.7
รวม	9,717.7	340.4	5,572.9	194.9	-42.6	-42.7

ที่มา : กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง
ประมวลข้อมูลจากกรมศุลกากร



ภาพที่ 5 สัดส่วนการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลไทยปี พ.ศ. 2563

(ก) สัดส่วนมูลค่ารูปแบบปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลไทย

(ข) สัดส่วนมูลค่าการส่งออกปลานิลไทยไปยังประเทศต่างๆ

(ที่มา: เกวลิน, 2563)

2.1.3 โรคปลานิล

ปลานิลเกิดโรคได้ง่าย เนื่องจากเกษตรกรนิยมปล่อยให้มีประชากรปลาหนาแน่นมากเกินไป และขาดการจัดการที่ดี รวมทั้งสภาวะแวดล้อม และสภาพอากาศที่มีความแปรปรวนสูง (Ghiraldelli et al., 2006) การจัดการสุขภาพปลานิลจึงเป็นวิธีการที่ใช้ป้องกันไม่ให้เกิดโรค เพราะถ้าหากปลานิลเป็นโรคแล้วโอกาสที่จะรักษานั้นทำได้ยากและการใช้ยาปฏิชีวนะถือเป็นการเพิ่มต้นทุนการเพาะเลี้ยงให้แก่เกษตรกร รวมทั้งไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นการที่จะประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงปลานิล จะต้องมีการจัดการสุขภาพปลานิลที่ดี อันได้แก่ การเตรียมบ่อที่ดี การรักษาความสะอาดบ่อ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรค และแพร่ระบาดของโรคสัตว์น้ำ การใช้ลูกพันธุ์ปลาที่แข็งแรง การจัดการคุณภาพน้ำที่ดี ไม่ใช้ยาและสารเคมี ต้องห้าม การให้อาหารที่ดีมีคุณภาพสูงจะทำให้ปลานิลเจริญเติบโตได้ผลผลิตสูง คุณภาพดี สร้างกำไรให้แก่เกษตรกร และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม การเฝ้าสังเกตพฤติกรรมและการกินอาหารของปลานิลอย่างสม่ำเสมอ จะมีส่วนช่วยในการตรวจสอบเบื้องต้นว่าปลามีปัญหาหรือไม่ และยังช่วยให้มีการแก้ไขสถานการณ์ได้อย่างรวดเร็วก่อนที่ปลาทั้งกลุ่มจะป่วยอย่างรุนแรง เกษตรกรจะต้องทราบและคุ้นเคยว่าปลาที่ปกติมีลักษณะและพฤติกรรมเป็นอย่างไร ซึ่งส่วนใหญ่มักจะมองไม่เห็นปลาที่อาศัยอยู่ในบ่อ ยกเว้นเวลาให้อาหาร และจะสังเกตเห็นปลาได้ชัดเจนเมื่อปลาเป็นโรคคือ มีปลาตาย หรือปลากำลังใกล้ตาย ปลาที่ป่วยจะเฉื่อยชา และไม่กินอาหาร อาจลอยตัวอยู่ที่ผิวน้ำ ขึ้นเกลยอยู่ตามขอบบ่อ พฤติกรรมของปลาที่ผิดปกติเหล่านี้จะเป็นตัวบ่งชี้ว่าปลามีอาการของโรคเกิดขึ้น นอกจากนี้ลักษณะทางกาย รูปร่างที่เปลี่ยนไป ไม่ว่าจะเป็นฝี การตกเลือด ครีบหักกร่อน ท้องบวม ตาโปน หากพบว่าปลามีลักษณะผิดปกติ เกษตรกรควรนำปลาไปตรวจว่าปลามีการติดเชื้อปรสิตหรือแบคทีเรียหรือไม่ พร้อมทั้งมีการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำควบคู่ไปด้วย การตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ จะช่วยทำให้หาแนวทางแก้ไขและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้ทันเวลา (ชนกันต์, 2556)

ปัจจุบันปัญหาการตายของปลานิลในบ่อและกระชัง ส่วนมากมีสาเหตุมาจากรูปแบบการจัดการฟาร์ม โดยฟาร์มที่มีการเปลี่ยนแปลงการจัดการอย่างรวดเร็ว มีความหนาแน่นในการเลี้ยงสูง การจับปลาหรือการขนย้ายปลาที่ไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดบาดแผลตามตัวปลา รวมทั้งคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่ต่ำ (Low dissolved oxygen; Low DO) ปริมาณแอมโมเนีย (Ammonia; NH_3) ไนไตรท์ (Nitrite; NO_2^-) หรือไนเตรต (Nitrate; NO_3^-) ที่สูง จะทำให้ปลาเกิดความเครียด ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคของปลา (ชนกันต์, 2556; อติเทพชัยการณ , 2555) โดยเฉพาะในช่วงหน้าร้อน ปลาจะเครียดและอ่อนแอได้ง่าย จึงทำให้เกิดการระบาดของโรคปลาได้ ดังนั้นเกษตรกรต้องมีเครื่องช่วยเพิ่มออกซิเจนไว้ใช้งานยามฉุกเฉิน หากเป็นไปได้ควรมีบ่อพักน้ำหรือแหล่งน้ำที่สะอาดเพื่อการเปลี่ยนถ่ายน้ำ โดยทั่วไปจะต้องตรวจสอบปริมาณออกซิเจนในน้ำ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรต และความเป็นกรด-ด่างของน้ำเป็นประจำ เนื่องจากคุณสมบัติของน้ำ

เหล่านี้เป็นประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยโรคปลา การบันทึกคุณสมบัติของน้ำประจำวันจะเป็นตัวอ้างอิงเมื่อมีการระบาดของโรค ในการบันทึกควรบันทึกวันที่ปล่อยปลา ขนาดของปลาที่ปล่อย แหล่งที่มาของปลา อัตราการให้อาหาร อัตราการเจริญเติบโต จำนวนปลาที่ตายในแต่ละวัน และคุณสมบัติของน้ำ ข้อมูลเหล่านี้จำเป็นสำหรับนักวิชาการเพื่อใช้ประกอบการตรวจวินิจฉัยโรคและแก้ไขปัญหา การบันทึกข้อมูลอย่างละเอียดถูกต้อง การบรรยายลักษณะอาการและพฤติกรรมของปลาที่ป่วย ผลของการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำ จะมีส่วนช่วยในการวิเคราะห์โรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ชนกันต์, 2556)

โรคปลาสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลัก คือ โรคไม่ติดเชื้อ (Non - infectious diseases) และโรคติดเชื้อ (Infectious diseases) โดยโรคไม่ติดเชื้อ มีสาเหตุมาจากสภาวะแวดล้อมอันไม่เหมาะสม การขาดสารอาหาร ความบกพร่องทางพันธุกรรม เป็นโรคที่ไม่ติดต่อและไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาได้ ในทางตรงกันข้ามโรคติดเชื้อมีสาเหตุมาจากเชื้อก่อโรค (Pathogen) ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมหรือติดมากับปลาที่เป็นพาหะของโรคและทำให้ติดต่อไปสู่ปลาตัวอื่นได้ โดยโรคติดเชื้อส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจาก ปรสิตร ไวรัส เชื้อรา และแบคทีเรีย (ชนกันต์, 2556) ซึ่งในที่นี้จะขอกกล่าวถึงโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียเท่านั้น

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคปลานิลส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีเพียงส่วนน้อยที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก กระบวนการก่อโรคของแบคทีเรียเกิดจากการที่เชื้อเข้าสู่ตัวปลาแล้วเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายผ่านทางกระแสเลือด จากนั้นแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนในอวัยวะเป้าหมายและสร้างพิษทั้งสารพิษที่ขับออกนอกเซลล์ (Exotoxin) และสารพิษที่ผนังเซลล์ (Endotoxin) ซึ่งรอยโรคที่เกิดขึ้นในปลาที่ป่วยเป็นผลจากสารพิษทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์บุผิวตามอวัยวะต่างๆ จนอวัยวะเหล่านั้นไม่สามารถทำงานได้หรือทำให้เกิดเนื้อตาย (Necrosis) ตามอวัยวะต่างๆ อย่างไรก็ตามลักษณะอาการและรอยโรคของปลานิลที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อแบคทีเรียไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อก่อโรค นอกจากนี้การเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียในลูกปลานิลมักทำให้เกิดอัตราการตายสูงและรวดเร็วโดยไม่แสดงรอยโรค ดังนั้นการวินิจฉัยชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคจึงมีความจำเป็นต่อการควบคุมโรคและการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษา โดยแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลส่วนใหญ่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ไป เช่น Tryptone Soy Agar (TSA), Blood Agar (BA), Mueller Hinton Agar (MHA) หรือ TSA/MHA ที่ผสมเกลือ (NaCl) ร้อยละ 1-3 น้ำหนัก/ปริมาตร ในกรณีที่เลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้จากน้ำกร่อย (เจนนุช, 2560)

ลักษณะของปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียจะมีการตกเลือด มีแผลตามลำตัว ครีบกร่อน มีน้ำในช่องท้อง ไม่กินอาหาร เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยมีหลายชนิด เช่น *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp. และ *Flavobacterium* spp. เป็นต้น

1. โรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย *Streptococcus* (Streptococcosis)

เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* หรือ *Streptococcus iniae* มักพบการเกิดโรคในฤดูร้อนที่น้ำมีอุณหภูมิสูงแสดงให้เห็นว่าความไวของปลาต่อการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำ (Rodkhum et al., 2011) และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 26°C จะทำให้ปลาที่ติดเชื้อตายเป็นจำนวนมากในเวลาอันสั้น (Mian et al., 2009) โรคติดเชื้อชนิดนี้สามารถติดต่อจากปลาที่เป็นโรคสู่ปลาอีกตัวหนึ่งที่อาศัยอยู่ในบ่อหรือกระชังเดียวกันได้ อาการป่วยของปลาที่ติดเชื้อจะมีการที่เด่นชัดสองรูปแบบ คือ (1) อาการป่วยแบบเฉียบพลัน ปลาจะว่ายน้ำผิดปกติ ไม่มีทิศทาง สูญเสียการทรงตัว บางตัวว่ายน้ำแบบควงส่ววน มีลักษณะภายนอกที่เด่นชัด คือ ท้องขยายใหญ่ ตาโปน กระเจกตาขุ่น (ภาพที่ 6) หรืออาจมีเลือดออกบริเวณลูกตา เลือดคั่งบริเวณโคนครีบ แผ่นปิดเหงือก ผิวหนัง และรอบรูทวาร ลักษณะอาการภายในที่เด่นชัด คือ มีของเหลวลักษณะใส หนืด ปนเลือดในช่องท้อง ตับและม้ามขยายใหญ่และมีสีซีดลง แต่ทั้งนี้ลูกปลาอาจไม่พบลักษณะผิดปกติดังกล่าว (2) อาการป่วยแบบเรื้อรัง ปลาที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังอาจพบว่าปลาจะลอยตัวอยู่บริเวณผิวน้ำ ลำตัวมีสีเข้มขึ้นในปลานิลดำ หรือซีดลงในปลานิลแดง อาจพบรอยโรคภายนอก เช่น ตุ่มหนองบริเวณคอดหางหรือใต้คาง มีรอยโรคภายใน เช่น การอักเสบของเยื่อช่องท้อง การอักเสบของเยื่อหุ้มหัวใจ ปลากินอาหารได้ลดลง อัตราการเจริญเติบโตต่ำ ทำให้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น สภาพซากไม่สมบูรณ์ มีดำหนิ ส่งผลให้เนื้อปลานิลไม่ได้มาตรฐาน (อติเทพชัยการณ, 2555)

เชื้อ *Streptococcus* spp. สามารถติดต่อสู่คนได้โดยจะทำให้เกิดอาการเซลล์เนื้อเยื่ออักเสบที่มือ ในกรณีที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteremia) จะพบอาการเยื่อหัวใจอักเสบ (Endocarditis) (ชาญณรงค์, ม.ป.ป.) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าเชื้อ *S. agalactiae* สามารถก่อโรคในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เช่น โคนม รวมถึงคนได้ (Persson et al., 2004) สำหรับหญิงมีครรภ์อาจส่งผลให้เกิดการแท้งหรือติดเชื้อหลังคลอดโดยเชื้อจะกระจายเข้าสู่กระแสเลือด อาจทำให้เกิดภาวะปอด กระดูก และข้อติดเชื้อ ในบางรายอาจทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบประสาทได้ นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อในทารกแรกเกิด โดยได้รับการถ่ายทอดเชื้อจากมารดา ซึ่งส่งผลให้เกิดพิการหรือเสียชีวิตในอัตราที่สูงขึ้น (Ip et al., 2006) โดยเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT), Nalidixic acid และ Oxolinic acid (Suanyuk et al., 2008; อติเทพชัยการณ, 2555)



ภาพที่ 6 ลักษณะตาขุ่นขาวและโปนของปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus* spp.

(ที่มา: <https://bit.ly/33DDz96>)

2. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* (Motile aeromonas septicemia; MAS)

เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. เช่น *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii* และ *Aeromonas caviae* (เจนนุช, 2560; นีออร์ และคณะ, 2564) ซึ่งเชื้อ *A. hydrophila* เป็นสาเหตุหลักของโรคดังกล่าวในปลาน้ำจืด สามารถพบเชื้อได้ในแหล่งน้ำทั่วไป โดยเฉพาะในแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์ปริมาณสูง น้ำที่ขุ่นจากแหล่งชุมชน น้ำทะเลที่มีความเค็มน้อยกว่า 10 ส่วนในหนึ่งพันส่วน (Part per thousand; ppt) (Geldreich, 1976; Hazen et al., 1978) รวมถึงตะกอนดินจากบ่อน้ำหรือบ่อเลี้ยงปลา (Seidler et al., 1980) การเกิดโรคจากเชื้อ *A. hydrophila* มักพบบ่อยในบ่อที่เลี้ยงโดยให้อาหารสดหรือการเลี้ยงแบบผสมผสาน ซึ่งสาเหตุที่เหนี่ยวนำให้ปลาติดเชื้อ ได้แก่ ความเครียดจากสภาพการเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม เช่น การเลี้ยงที่หนาแน่น อุณหภูมิน้ำที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำไม่เพียงพอ หรือปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในน้ำสูง นอกจากนี้ยังมีสาเหตุจากการบาดเจ็บจากการเคลื่อนย้ายหรือขนส่ง การให้อาหารที่มีคุณภาพไม่เหมาะสม รวมถึงบาดแผลที่เกิดจากปรสิต โดยปลาที่ติดเชื้อจะเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว ว่ายน้ำเฉื่อยชา อ้าปากหายใจบริเวณผิวหนัง ไม่กินอาหาร ครีบกร่อน เก็ดหลุด มีแผลหลุมตามลำตัว ท้องบวมมีน้ำเหลืองคั่งในช่องท้อง ตับเหลือง มีการอักเสบและตกเลือดบริเวณลำไส้ และมีเลือดออกที่ผิวหนัง (Skin hemorrhage) (ภาพที่ 7) (Aboyadak et al., 2015; ชนกันต์, 2556) นอกจากนี้เชื้อ *A. hydrophila* ยังสามารถติดต่อกับสัตว์ที่มีบาดแผลบริเวณผิวหนังจากการสัมผัสเชื้อได้ โดยทำให้เกิดอาการต่างๆ ได้แก่ แผลหลุม กล้ามเนื้อตาย (Myonecrosis) เซลล์เนื้อเยื่ออักเสบ (Cellulitis) และผื่นชนิด Ecthyma gangrenosum (ภาพที่ 8) (ชาญณรงค์, ม.ป.ป.) และอาจแพร่กระจายในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Immunocompromised patient) (Damián et al., 1995) นอกจากนี้ยังอาจติดต่อกับสัตว์ผ่านห่วงโซ่อาหาร โดยการบริโภคสัตว์น้ำที่มีเชื้อ ทำให้ผู้บริโภคป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ (Cumberbatch et al., 1979)



ภาพที่ 7 ลักษณะการมีเลือดออกที่ผิวหนังของปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila*
(ที่มา: Aboyadak et al. (2015))



ภาพที่ 8 รอยโรคผื่นชนิด Ecthyma gangrenosum ที่ขาในคนที่ติดเชื้อ *A. hydrophila*
(ที่มา: ชาญณรงค์, ม.ป.ป.)

3. โรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย *Edwardsiella* (Edwardsiellosis)

เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Edwardsiella tarda* และ *Edwardsiella ictaluri* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มักพบเป็นรูปร่างแท่ง (Bacilli) โค้งงอเล็กน้อย แต่ก็อาจมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน (Pleomorphic) เชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อก่อโรคในปลาหลายชนิดทั่วโลก รวมทั้งปลานิล (Mohanty & Sahoo, 2007; Soto et al., 2012) โดยเชื้อมักอาศัยอยู่ในเซลล์ของปลาที่ป่วย โดยมีอาการและรอยโรคคล้ายกับรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* ซึ่งรอยโรคเด่นชัดที่พบได้แก่ การติดเชื้อในกระแสเลือด ก่อให้เกิดจุดหรือเลือดออกที่อวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะครีบและหาง อาจพบแผลหลุมที่ผิวหนัง ที่กล้ำเนื้อมักพบช่องว่างที่มีแก๊สอยู่ภายใน (Large gas filled (Malodorous) cavities) และอาจพบก้อนสีขาว (White nodules) ที่ตับ (ภาพที่ 9) ปลาที่ป่วยจะไม่สามารถควบคุมอวัยวะส่วนท้ายของลำตัวได้ และไม่กินอาหาร การวินิจฉัยโรค ทำได้โดยสังเกตจาก

อาการและรอยโรค โรคจะแพร่กระจายผ่านทางน้ำหรือปลาที่ป่วยเป็นโรค โดยเชื้อ *E. tarda* สามารถติดต่อสู่สัตว์เลือดอุ่นหลายชนิดรวมถึงคนโดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารจากการบริโภคปลาที่มีเชื้อ และติดเชื้อในกระแสเลือดจากการสัมผัสเชื้อจากปลาป่วยผ่านทางบาดแผล (Gautheir, 2015; ชาญณรงค์, ม.ป.ป.)



ภาพที่ 9 ลักษณะก้อนสีขาวที่ตับของปลานิลที่ติดเชื้อ *E. tarda*
(ที่มา: <https://bit.ly/2qjKEx3>)

4. โรคคอลลัมเนริส (Columnaris) หรือโรค Saddleback

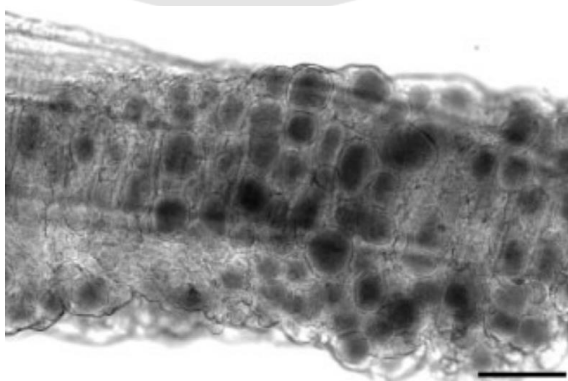
เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnarum* ชื่อเดิมคือ *Flexibacter columnaris* โรคนี้มักจะเกิดกับปลาที่มีสภาพร่างกายอ่อนแอ และเครียดเนื่องจากได้รับบาดเจ็บ หรือบอบช้ำจากการขนส่งหรือการจับ และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างกะทันหัน โดยมักเกิดในช่วงหน้าร้อน อุณหภูมิที่มีผลต่อการเกิดโรคอยู่ในช่วงประมาณ 28-30°C อาการทางคลินิกที่พบคือ บริเวณแผลจะมีเมือกหนาแน่น ต่อมาจะมีลักษณะสีเทา ทำให้สีของตัวปลาแตกต่างไปจากบริเวณปกติ คือมีสีต่างชนิดเป็นแถบๆ บางครั้งพบจุดเลือดตรงบริเวณที่เกิดโรค เหงือกครีบ และหางกร่อน (ภาพที่ 10) รวมถึงมีเนื้อเยื่อตาย การป้องกันการระบาดของโรค ทำได้โดยการลดความบอบช้ำจากการจับและคัดขนาดปลา ไม่เลี้ยงปลาหนาแน่น และเผื่อสำรองไม่ให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำลง (ชนกันต์, 2556)



ภาพที่ 10 ลักษณะหางกร่อนของลูกปลานิลที่ติดเชื้อ *F. columnarum*
(ที่มา: <https://bit.ly/35EdCrX>)

5. โรค Epitheliocystis

เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างพื้นฐานคล้ายเชื้อ *Chlamydia* spp. หรือ *Rickettsia* spp. (*Piscirickettsia* spp.) (ชนกันต์, 2556) ปลาที่เป็นโรคจะไม่แสดงลักษณะอาการผิดปกติภายนอกเนื่องจากเป็นโรคเรื้อรัง แต่ถ้าพบเชื้อในปริมาณมาก หรือติดเชือรุนแรงอาจทำให้ปลาตายได้ โดยเฉพาะในลูกปลาขนาดเล็ก โดยมีอัตราการตายตั้งแต่ร้อยละ 4 ถึงร้อยละ 10 ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของปลา เมื่อนำปลาที่ป่วยมาตรวจจะพบซิสต์ (Cyst) ใน Epithelium cell ของซีเหงือก (ภาพที่ 11) ทำให้เซลล์ที่ปลายซีเหงือกขยายขนาดขึ้นจนมีลักษณะกลมเป็นซิสต์ โดยซิสต์ของโรค Epitheliocystis หากพบเป็นจำนวนมากที่เหงือกปลาจะทำให้เซลล์บุผิวของซีเหงือกเพิ่มจำนวนขึ้นและเกิดการเชื่อมติดกันทำให้ผิวของซีเหงือกหนาขึ้น มีผลทำให้การแลกเปลี่ยนออกซิเจนระหว่างเลือดกับน้ำผิดปกติ ซึ่งมีผลต่อการหายใจและการควบคุมสมดุลน้ำของปลาที่ป่วยเป็นโรค และเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาตายได้ (Goodwin et al., 2005)



ภาพที่ 11 ลักษณะซิสต์บริเวณซีเหงือกของปลาที่เป็นโรค Epitheliocystis
(ที่มา: Goodwin et al., 2005)

โรคติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เป็นปัญหาหลักที่ทำให้เกษตรกรขาดทุน เกษตรกรจึงนำยาปฏิชีวนะและสารเคมีจำนวนมากมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในปลานิลรวมถึงสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อก่อโรค และก่อให้เกิดสารตกค้างในเนื้อปลาและสิ่งแวดล้อม เกษตรกรจึงเปลี่ยนมาใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ

2.1.4 โพรไบโอติกส์

โพรไบโอติกส์ (Probiotics) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอ จะช่วยส่งเสริมสุขภาพของสิ่งมีชีวิตที่บริโภคเข้าไป (Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host) (FAO/WHO, 2001) โดยโพรไบโอติกส์เหล่านี้จะมีหน้าที่ช่วยย่อยสลายสารอาหารให้เป็นพลังงาน สร้างวิตามินเค และบี และช่วยดูดซึมแร่ธาตุในบริเวณลำไส้ใหญ่ (Miyazawa et al., 1996) อีกทั้งยังทำหน้าที่สำคัญในการเป็นเกราะป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมภายนอก และเชื้อก่อโรคต่างๆ โดยการแย่งอาหารและเกาะบริเวณผนังลำไส้ ป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเข้ามาเกาะได้ นอกจากนี้โพรไบโอติกส์บางชนิดยังสามารถปล่อยสารเคมีบางอย่าง เช่น Bacteriocin มายับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ (Lievin et al., 2000) โดยโพรไบโอติกส์ส่วนมากมักจะอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อน หรือกึ่งกลมกึ่งท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) แต่อาจพบเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส (Pseudocatalase) ในสภาวะการเจริญที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ ไม่ต้องการแก๊สออกซิเจน (Anaerobe) หรือต้องการแก๊สออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (Microaerophile) หรือสามารถทนออกซิเจนได้ในปริมาณต่ำ (Aerotolerant anaerobe) (Wood & Holzapfel, 1997) ในปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติกถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมโพรไบโอติกส์สำหรับมนุษย์และสัตว์เพื่อส่งเสริมสุขภาพ การเจริญเติบโต และเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะมากมาย อาทิเช่น *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. และ *Bacillus* spp. เป็นต้น

เกณฑ์การคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์นั้นไม่มีหลักการที่ตายตัว หัวใจสำคัญขึ้นอยู่กับความปลอดภัยเมื่อนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะเมื่อนำโพรไบโอติกส์ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือส่วนของจุลินทรีย์ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา หรือยีสต์ ไปใช้กับมนุษย์จะต้องคำนึงถึงเรื่องความปลอดภัยหรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นที่นอกเหนือจากประโยชน์ของโพรไบโอติกส์เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีความแตกต่างกันกับการนำไปใช้ทางการแพทย์ ปศุสัตว์ และสิ่งแวดล้อม อาทิเช่น การนำโพรไบโอติกส์ไปใช้เป็นอาหารสัตว์เพื่อการเพิ่มผลผลิตและการส่งเสริมสุขภาพ ได้มีการศึกษาและนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ มาใช้ ซึ่งสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เมื่อจะนำมาใช้กับมนุษย์อาจมีผลข้างเคียงอื่นๆ ได้ ดังนั้นการที่จะนำจุลินทรีย์ชนิด

ใดมาเป็นโพรไบโอติกส์จะต้องมีการศึกษาและทดลองทางวิทยาศาสตร์เพื่อให้ทราบข้อมูลทั้งในเรื่องคุณสมบัติ ประสิทธิภาพต่อสุขภาพ และความปลอดภัย โดยต้องได้รับการรับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้ให้การรับรองว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded as Safe; GRAS) ที่สามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้

โดยทั่วไปลักษณะที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เพื่อนำมาใช้กับมนุษย์และสัตว์ มีคุณสมบัติหลักๆ ดังนี้ (Duangjitcharoen et al., 2008; Dunne et al., 2001; Morelli, 2000; Ouwehand et al., 1999; Vasiljevic & Shah, 2008)

1. สามารถเกาะติด เจริญ และเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้านได้
2. สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีเกลือน้ำดีและมีความเป็นกรดสูง
3. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร
4. ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคและไม่แก่งแย่งสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายเจ้าบ้าน
5. สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านได้
6. มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ประมาณ 10^7 - 10^9 CFU/ml)

อย่างไรก็ตามการนำโพรไบโอติกส์ไปใช้สำหรับมนุษย์ มีสิ่งที่จะต้องมุ่งเน้นก็คือเรื่องความปลอดภัย โดยมีหลักเกณฑ์ของการคัดเลือกโพรไบโอติกส์ตามหลักทฤษฎีเบื้องต้นจะครอบคลุมถึงเรื่องความปลอดภัย ประโยชน์ และลักษณะที่เหมาะสมที่จะนำโพรไบโอติกส์ไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารสำหรับมนุษย์ รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 คุณลักษณะเบื้องต้นของโพรไบโอติกส์

(ที่มา: ไชยวัฒน์, 2556)

ทั้งนี้ การคัดเลือกโพรไบโอติกส์ยังขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้งานและความเหมาะสมต่อผู้บริโภคโพรไบโอติกส์นั้นๆ ปัจจุบันทั้งนักวิจัยและผู้ประกอบการอาหารเพื่อสุขภาพให้ความสนใจศึกษาและใช้ประโยชน์จากโพรไบโอติกส์กันมากขึ้น จึงทำให้มีการกำหนดคุณสมบัติที่มีความหลากหลายมากขึ้นเพื่อใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เพื่อใช้ในทางอุตสาหกรรมหรือการค้า อาทิเช่น (D'souza et al., 2002; Lepargneur & Rousseau, 2002; Mahdhi et al., 2018; Parkes et al., 2009; Speranza et al., 2020; ไชยวัฒน์, 2556)

1. มีความปลอดภัยต่อมนุษย์หรือสัตว์ โดยไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อขณะบริโภค
2. มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อการใช้เทคโนโลยีการผลิต เช่น สามารถอยู่รอดได้เมื่อผ่านกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา และสามารถขยายกำลังการผลิตขนาดใหญ่ได้
3. มีคุณสมบัติส่งเสริมสุขภาพ เช่น ปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย ลดภาวะที่ร่างกายไม่สามารถย่อยหรือไม่ทนต่อน้ำตาลแลคโตส (Lactose intolerance) ป้องกันหรือลดระดับการเกิดสารก่อมะเร็ง ลดภาวะภูมิแพ้และการอักเสบรุนแรง ลดระดับโคเลสเตอรอล (Cholesterol) ในกระแสเลือด และส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ที่ส่งเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพ
4. คุณสมบัติทางชีวภาพอื่นๆ เช่น การทำลายสารพิษจากแบคทีเรียหรือเชื้อราบางชนิด การป้องกันการติดเชื้อซ้ำ และการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค นอกจากนี้โพรไบโอติกส์ยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มเองได้ เพื่อป้องกันตัวเองจากสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ในทางเดินอาหารและ/หรือในกระบวนการผลิต และเพื่อตั้งถิ่นฐาน (Colonization) ในทางเดินอาหารของผู้บริโภค

2.1.4.1 แบคทีเรียโพรไบโอติกส์

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก (กรดน้ำนม) ได้ ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่พบในทางเดินอาหารของคน สัตว์ และในอาหารหมักดองต่างๆ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้มีการนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์มากที่สุด ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* spp. *Enterococcus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. (Salminen et al., 1998) ในปี ค.ศ. 1900 ได้มีการคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียบริสุทธิ์ คือ *Lactobacillus acidophilus* ได้เป็นครั้งแรก ต่อมาก็ได้มีการแยกแบคทีเรีย *Lactobacillus bifidus* ซึ่งต่อมาถูกจัดอยู่ในแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacteria* ซึ่งแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มนี้เมื่อนำไปย้อมสีและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับรูปตัวอักษรเอ็กซ์ (X - shape) หรือส่วนใหญ่จะเป็นรูปตัวอักษรวาย (Y - shape) จึงเรียกชื่อตามลักษณะ คือ ไบฟิดีส หมายถึง แยก หรือเป็นสองแฉก คล้ายกับแขนของตัววายส่วน *Lactobacillus* spp. นั้น จะมีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือเรียงต่อกันเป็นสายโซ่สั้น หรือโซ่ยาว

ขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ อาหาร หรือสภาวะในการเลี้ยง ซึ่งในปัจจุบันแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และผลิตภัณฑ์นมอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ แบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. จะอาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์ โดยมักอาศัยอยู่ในลำไส้เล็ก ตั้งแต่แรกเกิด ซึ่งอาจถูกส่งผ่านมาจากมารดา แต่แบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. มักอาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ จะพบในเด็กที่ดื่มนมมารดาตั้งแต่อายุ 7 วันขึ้นไป ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ทารกที่ดื่มนมมารดาตั้งแต่แรกคลอดมีสุขภาพแข็งแรงและมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีกว่าทารกที่ดื่มนมขวดหรือนมกระป๋อง เนื่องจากภายในลำไส้ของเด็กที่ดื่มนมมารดาจะมีแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อลำไส้มากกว่าเด็กที่ดื่มนมขวด โดยเชื้อ *Bifidobacterium infantis* เป็นแบคทีเรียสกุล *Bifidobacterium* spp. ที่พบมากที่สุดถึงร้อยละ 99 ในเด็กที่มีอายุตั้งแต่ 1 สัปดาห์ขึ้นไป รองลงมาคือ *Bifidobacterium longum* ซึ่งแบคทีเรียชนิดดีเหล่านี้จะทำให้แบคทีเรียก่อโรค เช่น Coliforms และ *Enterococcus* spp. มีจำนวนน้อย และเมื่อเด็กทารกหย่านนมแม่จนเข้าสู่วัยผู้ใหญ่จะพบแบคทีเรีย *B. longum* มากที่สุด รองลงมาคือ *B. bifidum* (Mitsuoka, 2000; ไชยวัฒน์, 2556)

แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. จัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ในลำไส้ เนื่องจากพบในลำไส้มนุษย์ตั้งแต่แรกเกิดจนเจริญเติบโตเป็นผู้ใหญ่ แต่อาจมีความหลากหลายในสปีชีส์ สายพันธุ์ และจำนวนในแต่ละบุคคลหรือช่วงอายุ ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น พฤติกรรมการบริโภค ความเครียด การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ การใช้ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นจุลินทรีย์ที่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รองรับ และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพในมนุษย์มากที่สุด อย่างไรก็ตาม นอกเหนือจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. แล้วยังมีแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มอื่นที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารอีกมากมาย เช่น *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Enterococcus faecium* เป็นต้น (Mogensen et al., 2002)

แต่ในปัจจุบันจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Staphylococcus sciuri*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus coagulans*, *Paenibacillus ehimensis*, *Propionibacterium arabinosum*, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Shewanella xiamenensis*, *Chromobacterium aquaticum*, *Streptomyces flavotricini*, *Pseudomonas entomophila*, *Aeromonas veronii* และยีสต์ ก็ได้มีรายงานการนำมาใช้ประโยชน์เป็นโพรไบโอติกส์เช่นกัน (S. W. Chen et al., 2019; Hao et al., 2017; H. Huang et al., 2020; Pacheco et al., 2021; Praveschotinunt et al., 2019; Seki et al., 2003; Yi et al., 2019; สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม, 2563)

2.1.4.2 ยีสต์โพรไบโอติกส์

นอกเหนือจากแบคทีเรียโอบีโอติกส์แล้ว ในปัจจุบัน ยีสต์โพรไบโอติกส์เริ่มเข้ามามีบทบาทสำคัญมากขึ้นในอุตสาหกรรมอาหารเสริม โดยสายพันธุ์ยีสต์โพรไบโอติกส์ที่มีการรายงานมากที่สุดนับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 จนถึงปัจจุบัน คือ *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* หรือ *Saccharomyces boulardii* (SCB) (Mogensen et al., 2002) ซึ่งแยกออกมาจาก *S. cerevisiae* โดยมีคุณลักษณะที่ใกล้เคียง *S. cerevisiae* มาก แต่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาและทางสรีรวิทยาและเมตาบอลิซึม (Cardinali & Martini, 1994; McFarland, 1996) *S. boulardii* ได้รับการจดลิขสิทธิ์และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์ในหลายประเทศ โดยนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาและป้องกันโรคเกี่ยวกับลำไส้ต่างๆ เช่น โรคท้องร่วง โรคท้องเสียจากยาปฏิชีวนะ (Antibiotic-associated diarrhea; AAD) โรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง (Inflammatory bowel disease; IBD) โรคลำไส้แปรปรวน (Irritable bowel syndrome; IBS) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colon cancer) และโรคท้องเสียที่เป็นเกี่ยวข้องกับโรคเอดส์ (Fortin et al., 2018; Kotowska et al., 2005; Maupas et al., 1983; Plein & Hotz, 1993; Saint-Marc et al., 1991) นอกจากนี้ยังมียีสต์สายพันธุ์อื่นที่ได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นโพรไบโอติกส์ อาทิเช่น *S. cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Issatchenkia occidentalis*, *Kazachstania unispora*, *Kodamaea ohmeri*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida* spp., *Metschnikowia* spp., *Sporidiobolus* spp., *Clavispora* spp., *Sporobolomyces* spp. และ *Pichia* spp. (Azhar et al., 2019; Gatesoupe, 2007; Helmy et al., 2019; Kunyeit et al., 2019; Laconi & Pompei, 2007; Merrifield et al., 2010; Syal & Vohra, 2013; Waché et al., 2006)

ยีสต์โพรไบโอติกส์มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับคนและสัตว์หลายชนิด เช่น หมู สัตว์ปีก และสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยมีรายงานทางวิชาการที่สนับสนุนถึงคุณสมบัติและประโยชน์ของยีสต์ทางด้านการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เช่น การสร้างวิตามิน กรดไขมันจำเป็น สารอินทรีย์บางชนิด และสารให้กลิ่นหอมและรสชาติ (ประมาณ 2,550) โดยนิยมผลิตในรูปผงเซลล์แห้งบริสุทธิ์ (Lyophilized cell) ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) จึงมีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์ชนิดอื่นที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เช่น โยเกิร์ต (Czerucka et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการนำยีสต์โพรไบโอติกส์มาใช้เป็นกล้าเชื้อร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกในการทำผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทต่างๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีและมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค

ยีสต์โพรไบโอติกส์มีคุณสมบัติที่ดีในการส่งเสริมสุขภาพและการทำงานของลำไส้ในมนุษย์และสัตว์หลายประการ ดังที่มีงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานถึงบทบาทในการส่งเสริมสุขภาพ

และการทำงานของลำไส้มนุษย์และสัตว์ ดังนี้ (Czerucka et al., 2007; Dalmaso et al., 2006; Gedek, 1999; Li et al., 2006; Shetty & Jespersen, 2006; Tomičić et al., 2016; อรุณ, 2555)

1. ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคบางกลุ่ม เช่น *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* และแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae
2. ทำลายสารพิษจากแบคทีเรียหรือเชื้อราบางชนิด เช่น Endotoxin จากเชื้อ *Escherichia coli* O55B5 และ Aflatoxin B1 (AFB1) ของเชื้อ *Aspergillus* spp.
3. กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์
4. เพิ่มระดับสารภูมิคุ้มกันที่สำคัญ เช่น Immunoglobulin A (IgA)
5. เพิ่มระดับเอนไซม์ย่อยสลายสารอาหาร (Digestive enzyme) ในระบบทางเดินอาหาร เช่น ซูเครส (Sucrase) แลคเทส (Lactase) และมอลเทส (Maltase)
6. เพิ่มระดับกรดไขมันสายสั้น (Short-chain fatty acids; SCFAs) ที่เป็นประโยชน์ต่อลำไส้
7. กระตุ้นการทำงานของเซลล์ลำไส้และลดปริมาณสารที่ทำให้เกิดการอักเสบในระบบทางเดินอาหาร
8. เปลี่ยนแปลงกลไกการตอบสนองของเซลล์ลำไส้จากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยชะลอการตายของเซลล์ลำไส้ที่ติดเชื้อ (Apoptosis) แต่ไม่มีผลต่อการลดจำนวนของเชื้อก่อโรคที่เกาะอยู่ที่ผิวลำไส้
9. รบกวนการเกาะติดผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรค โดยเชื้อก่อโรคจะจับกับเซลล์ยีสต์แทนที่จะจับกับเซลล์เยื่อลำไส้

อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยบางรายอาจเกิดอาการติดเชื้อราในกระแสเลือด (Fungaemia) เมื่อบริโภคยีสต์โพรไบโอติกส์ เช่น ผู้ที่ใช้สายสวนเป็นเวลานาน (Hennequin et al., 2000; Perapoch et al., 2000)

นอกเหนือจากมนุษย์แล้ว ยังมีรายงานการนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ทั้งแบคทีเรียและยีสต์มาใช้ในทางปศุสัตว์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยรักษาและปรับปรุงประสิทธิภาพทั้งการผลิตและการเจริญเติบโตของสัตว์ ตลอดจนการป้องกันและควบคุมเชื้อก่อโรคในสัตว์ ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์มาประยุกต์ใช้เป็นอาหารสัตว์มากขึ้น (คึกฤทธิ์, 2561) ตัวอย่างเช่น *Bacillus* spp. ช่วยลดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงและทำให้เนื้อไก่นุ่มขึ้น (Kurtoglu et al., 2004; Zhou et al., 2010) *S. boulardii*, *Pediococcus acidilactici* และ *Enterococcus faecium* ช่วยควบคุมโรคอุจจาระร่วงหลังหย่านมและลดอัตราการตายเนื่องจากการติดเชื้อ *E. coli* ของลูกสุกร (Zeyner & Boltd, 2006) *L. acidophilus* และ *Propionibacterium freudenreichii* ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหารประเภทโปรตีนในแม่โครีดนมทำให้ผลผลิตน้ำนมเฉลี่ยต่อวันเพิ่มขึ้น (Boyd et al., 2011) *Bacillus subtilis* ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของลูกปลากัดไทย

(Siamese fighting fish) (Sharifinia & Haghparast, 2015) Probiotic cocktail ที่ประกอบด้วยเชื้อ *L. acidophilus* และ *S. baulardii* ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต การใช้อาหาร และปรับสมดุล จุลินทรีย์ในลำไส้ รวมถึงปรับปรุงโครงสร้างลำไส้ปลาที่บวมให้ดีขึ้น (Abdel-Ghany et al., 2020)

การให้โพรไบโอติกส์แก่ปลาต้องคำนึงถึงคุณสมบัติในการทนต่อความเป็นกรดสูงและเกลือแร่ในทางเดินอาหารของปลา ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นสิ่งสำคัญสำหรับจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ ที่แสดงถึงการใช้ชีวิตรอดในกระเพาะอาหารแล้วไปตั้งถิ่นฐานในลำไส้ของปลา (Pérez et al., 2010) โดยระบบทางเดินอาหารของปลานิลประกอบด้วยอวัยวะหลัก 3 ส่วน คือ กระเพาะอาหาร ลำไส้ และไส้ติ่ง (Pyloric caeca) โดยในกระเพาะอาหารมีลักษณะเป็นกระเปาะแบบเหยียดตรง กระเพาะส่วนต้นและส่วนปลายอยู่ต่อเนื่องกัน มีความเป็นกรด ค่า pH ประมาณ 2.5 ซึ่งเกิดจากการหลั่งกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl) ที่ผลิตโดยต่อมกระเพาะอาหาร (Gastric gland) ออกมาในกระเพาะอาหารเพื่อทำให้อาหารประเภทโปรตีนเสียสภาพและช่วยให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมแก่การทำงานของเอนไซม์เปปซินที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน (El-Beltagy et al., 2004) โดยกรดไฮโดรคลอริกสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์จุลินทรีย์ได้ (Smith, 2003) ส่วนในลำไส้มีสภาพเป็นกลางถึงต่าง ค่า pH ระหว่าง 7-11 และมีน้ำดีที่ผลิตจากตับแล้วถูกปล่อยเข้าสู่ลำไส้ โดยน้ำดีทำหน้าที่เป็น Emulsifier ให้ไขมันแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ แล้วเกิด Emulsion ของน้ำและน้ำมัน ทำให้น้ำมันมีพื้นที่ผิวมากขึ้นเพื่อให้เอนไซม์ไลเปสมาย่อยไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ เกลื่อน้ำดีซึ่งเป็นกรดน้ำดี (Bile acid) ชนิดหนึ่งจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเกิดความเสียหายโดยไปละลายไขมันในส่วนฟอสโฟลิปิดทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ โดยความเสียหายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลื่อน้ำดีในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Begley et al., 2005) ซึ่งโดยปกติแล้วเกลื่อน้ำดีของปลาจะมีความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 0.3% (w/v) (Jobling, 1995) จึงมีความจำเป็นในการทดสอบคุณสมบัติดังกล่าวก่อนนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์มาใช้กับปลา

ในส่วนของปลานิลนั้นมีรายงานการวิจัยทั้งในและต่างประเทศที่ศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ อาทิเช่น อาหาร ดิน และน้ำในบ่อเลี้ยงปลา รวมถึงปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลากระพง ปลาดุกอุย และปลานิล แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล และคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เบื้องต้น ตลอดจนนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงปลานิลในระดับฟาร์ม

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุปราณี และคณะ (2550) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา ในสถานีวิจัยประมงกำแพงแสน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา ได้เชื้อ

แบคทีเรียทั้งหมด 67 ไอโซเลต และเมื่อนำเชื้อดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธี Cross streak พบว่ามีเชื้อ 3 ไอโซเลต คือ B-1, B-2 และ B-3 ที่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ การทดสอบทางชีวเคมีพบว่า เชื้อ B-1 และ B-2 คือ *Bacillus licheniformis* ขณะที่ B-3 คือเชื้อ *Bacillus subtilis* จากนั้นนำเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้ส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ (Supernatant) พบว่า เชื้อ B-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* สูงที่สุด นอกจากนี้ได้ประเมินหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแบคทีเรียชนิดนี้เจริญอยู่โดยวิธี SDS-PAGE พบว่า โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 4 กิโลดาลตัน (kDa) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างชัดเจน และเมื่อนำเชื้อ B-1 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ภายใต้สภาพห้องทดลองโดยการแช่เชื้อดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10^5 , 10^6 และ 10^7 CFU/ml ร่วมกับเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml นาน 14 วัน พบว่าเชื้อ B-1 ทั้ง 3 ความเข้มข้น ลดอัตราการตายของปลานิลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีอัตราการตายสะสมที่ 14 วัน ของการทดลองเป็นร้อยละ 15.33 ± 2.93 , 13.67 ± 2.62 , 8.33 ± 2.77 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ B-1 มีอัตราการตายสะสมสูงถึงร้อยละ 61.67 ± 2.58 (Sudprasit et al., 2550)

เสาวนิต (2551) ศึกษาคัดเลือกและผลิตแบคทีเรียโพรไบโอติกส์เพื่อใช้แทนยาปฏิชีวนะที่ผสมในอาหารปลานิลและปลาทาบทิม โดยคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ เช่น จากปลานิลที่มีลักษณะปกติ น้ำ และโคลนบริเวณกระชังที่เลี้ยงปลานิล และจากอาหารหลายชนิด ได้แก่ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว ข้าว และอาหารหมักคองทางภาคอีสาน ได้เชื้อแบคทีเรียรวมทั้ง 119 ไอโซเลต เมื่อนำมาคัดเลือกลำเชื้อที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา โดยใช้วิธี Agar-overlaying และ Agar well diffusion พบว่ามีแบคทีเรีย 25 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในปลานิล ได้แก่ *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus* sp. จากนั้นได้เลือกเชื้อไอโซเลตที่มีความสามารถสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค คือ CRIT5 นำมาใช้ในการทำ Challenged test พบว่าเชื้อ CRIT5 สามารถป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้ดีและยังช่วยส่งเสริมการเจริญของปลานิลอีกด้วย จากการศึกษาจัดจำแนกชนิดของเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การดัดสีแกรม และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่า CRIT5 มีคุณลักษณะตรงกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum*

กรทิพย์ และคณะ (2554) ศึกษาผลของการใช้ Brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) ในอาหารปลานิลต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิล การทดลองถูกแบ่งเป็น 5 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ได้แก่ อาหารเม็ดเคลือบผงยีสต์บดละเอียดในอัตราส่วน 0 (ชุดควบคุม), 1, 2.5, 5 และ 10 กรัม/อาหารปลา 1 กก. แล้วเลี้ยงปลานิลน้ำหนักเริ่มต้น 71.5-74.0 กรัม

90 วัน พบว่า ปลาไนที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดเคลือบยีสต์ 1 กรัม/กก. มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average daily growth) สูงที่สุด ส่วนปริมาณ เม็ดเลือดแดงและเปอร์เซ็นต์ Phagocytosis activity ของปลาไนที่เลี้ยงด้วยอาหารเคลือบยีสต์ใน อัตราส่วน 5 กรัม/กก. มีค่าสูงที่สุด และยังพบว่าปริมาณผงยีสต์บดละเอียดที่เหมาะสมที่สุดในการ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาไนคือ 1 กรัมต่ออาหารปลา 1 กก.

ประพันธ์ศักดิ์ และคณะ (2554) ศึกษาผลของเชื้อ *Bacillus pumilus* AQBS01 ต่อระบบ ภูมิคุ้มกันและการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยนำเชื้อ *B. pumilus* ไปผสมอาหาร ปลาไนในอัตราส่วน 0, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 กรัม/อาหารปลา 1 กก. นำไปเลี้ยงปลาไนขนาด 50 กรัม เป็นเวลา 16 วัน พบว่า เชื้อ *B. pumilus* ในอัตราส่วน 1.0-5.0 กรัม/อาหารปลา 1 กก. สามารถเพิ่ม ระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยมีค่ากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม ของเม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity), ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic index) และ ประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic efficiency) รวมถึงปริมาณ O_2^- สูงกว่าชุด ควบคุม และพบว่าอัตราการรอดชีวิตของปลาได้รับเชื้อ *B. pumilus* ในอัตราส่วน 1.0-5.0 กรัม/ อาหาร 1 กก. หลังจากที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ผ่านการฉีดยาและกินมีค่าสูงกว่าปลาในชุดควบคุม นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากความยาวและน้ำหนักของปลาแต่ละกลุ่มหลังจากได้รับเชื้อ *B. pumilus* พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประพันธ์ศักดิ์ และคณะ (2554)

อุดมลักษณ์และจิรพร (2556) ศึกษาผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เฉพาะถิ่นในการยับยั้ง เชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยเก็บตัวอย่างปลาไน ดิน และน้ำ จากฟาร์มปลาไนในจังหวัดเชียงใหม่ และ จังหวัดเชียงราย จำนวน 16 แห่ง เพื่อทำการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่าสามารถแยกเชื้อได้จำนวน 110 ไอโซเลต แล้วนำเชื้อทั้ง 110 ไอโซเลตไปทดสอบ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากปลาไนที่เป็นโรค จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ P1 ถึง P8 ด้วยวิธี Agar well diffusion ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) agar พบว่า โพรไบโอติกส์ที่คัดแยกได้จำนวน 110 ไอโซเลต มี 15 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยไอโซเลต CR10-8, CR1-2, CR1-4, CR8-9, CM4-3 และ CM4-6 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทุกชนิด จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกส์ พบเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ 3 ไอโซเลต คือ CR1-2, CR7-8 และ CR10-5 แล้วนำมาทดสอบ ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาไน โดยใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปผสมจุลินทรีย์ โพรไบโอติกส์ที่คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลต ความเข้มข้น 10^8 CFU/g ให้ปลาไนกิน เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า ปลาไนในชุดการทดลองที่เสริมด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์มีอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตสูง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 เดือน และพบว่า ไอโซเลต CR7-8 ส่งผลให้ปลาไนมี

อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตจากเชื้อก่อโรค ซึ่งมีศักยภาพเหมาะสมในการนำมาเป็น โพรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงปลานิลได้

เกศินีและสัมฤทธิ์ (2557) ศึกษาผลของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เป็นอาหารเสริมใน ปลานิล โดยแบ่งปลานิลออกเป็น 5 กลุ่มการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดยกลุ่ม T1 เป็น กลุ่มควบคุม กลุ่ม T2 ใช้ยาปฏิชีวนะ Oxytetracycline เสริมในอาหาร กลุ่ม T3 ใช้เชื้อ *Bacillus brevis* เสริมในอาหาร กลุ่ม T4 ใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เสริมในอาหาร และกลุ่ม T5 ใช้เชื้อ *B. brevis* และ *S. cerevisiae* เสริมในอาหาร จากนั้นเลี้ยงปลาในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 60 วัน แล้ววัดค่าการเจริญเติบโต ค่าทางโลหิตวิทยา และความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบว่า ปลานิลกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันสูงสุดคือปลานิลในกลุ่ม T4 รองลงมา คือกลุ่ม T5, T2, T1 และ T3 สวนค่าทางโลหิตวิทยา พบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดง Haematocrit ค่า ร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte และค่าร้อยละของ Micronuclei ในเม็ดเลือดแดงของ ปลานิลทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Challenge test พบว่า ปลานิลที่มีค่า Antibody titer ต่อ เชื้อ *A. hydrophila* สูงสุดคือปลานิลในกลุ่ม T3 รองลงมาคือกลุ่ม T5, T4, T2 และ T1 และพบว่า ปลานิลในกลุ่ม T3, T5 และ T2 มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่ม T4 และ T1 อย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ดังนั้นการใช้เชื้อผสม *B. brevis* และ *S. cerevisiae* (T5) เป็นโพรไบโอติกส์จะช่วยให้ปลานิลมี อัตราการเจริญเติบโตและความต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* สูงขึ้น

วอนสมัยและอัจฉรา (2559) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาตุ๊กตอ (Clarias macrocephalus) มาศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาด้วยวิธี Agar spot test พบว่า คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 77 ไอโซเลต โดยมี 9 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* และ *Flavobacterium columnarae* จากนั้นทดสอบ กิจกรรมการยับยั้งด้วยวิธี Disc diffusion assay โดยใช้น้ำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรด แลคติก น้ำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้เป็นกลาง และน้ำอาหารเลี้ยง เชื้อที่ใส่เอนไซม์ Proteinase K พบว่า บริเวณยับยั้งของน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด มีขนาดแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่ากลไกการยับยั้งเป็นผลมาจากการผลิตกรดอินทรีย์และแบคทีริโอซิน (Bacteriocin) เมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อทั้ง 9 ไอโซเลต ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป API 20 strep และ API 50CHL พบว่า ประกอบไปด้วย *Enterococcus* sp. จำนวน 6 ไอโซเลต *Lactococcus lactis* spp. *lactis* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *Lactobacillus brevis* จำนวน 1 ไอโซเลต

สายใจ (2560) ศึกษาสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ของ *Pediococcus pentosaceus* SJK-1 ที่คัดแยกได้จากตะกอนในบ่อเลี้ยงปลานิล โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี Agar well diffusion ความทนต่อกรดและด่าง และความทนต่ออุณหภูมิสูง พบว่า *P.*

pentosaceus SJK-1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* และ *Streptococcus agalactiae* โดยให้ขนาดบริเวณการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียก่อโรคอีก 2 ชนิด ส่วนความทนต่อกรดและด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ปรับค่า pH เป็น 2, 4, 6 และ 8 เป็นเวลา 18 ชั่วโมงพบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถทนและเจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH 4, 6 และ 8 โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงมากกว่าร้อยละ 94.65 ในขณะที่อัตราการรอดชีวิตที่ pH 2 เท่ากับร้อยละ 63.71 เมื่อทดสอบความทนต่ออุณหภูมิสูงพบว่า เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 99.58 และ 99.15 ที่อุณหภูมิ 70 และ 80°C เป็นเวลา 30 นาที ตามลำดับ

วีณาและดอกกรัก (2562) ศึกษาการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลากะพงขาวผสมลงในอาหารเลี้ยงปลาชนิด เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิต และความสามารถในการต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. ของปลานิล โดยการผสมแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณ 3×10^7 CFU/g ลงในอาหารปลาที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหารปลา 1 กก. เพื่อนำไปเลี้ยงปลานิลขนาด 6.00 ± 0.14 กรัม นาน 4 สัปดาห์ โดยให้อาหาร 2% ของน้ำหนักตัว 3 มื้อต่อวัน พบว่าปลานิลที่ได้รับแบคทีเรียกรดแลคติก 1 กรัมต่ออาหาร 1 กก. มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเป็น 18.47 ± 0.42 กรัม ซึ่งให้ผลดีที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 0, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก. สำหรับอัตราการรอดชีวิตในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติก 1 และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปลานิลที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติก 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก. สามารถลดปริมาณเชื้อ *Streptococcus* sp. ในเลือดปลานิลหลังได้รับอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติกได้ดีที่สุด

ชาญวิทย์และชนกันต์ (2563) ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ *Bacillus subtilis* เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันปลานิลในบ่อดิน จังหวัดเชียงใหม่ โดยสุ่มปล่อยปลานิล (น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 18.41 กรัม/ตัว) จำนวน 40 ตัว/กระชัง ลงในกระชังขนาด 3x3x1 เมตร ความหนาแน่น 4.4 ตัว/ลูกบาศก์เมตร (ลบ.ม.) จำนวน 12 กระชัง โดยให้อาหารผสมโพรไบโอติกส์ 0 (ชุดควบคุม), 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (จำนวน 3 กระชังในแต่ละความเข้มข้น) ให้อาหาร 3% ของน้ำหนักตัว นาน 60 วัน พบว่า น้ำหนักสุดท้ายและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติกส์มีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสม โพรไบโอติกส์ ปลาที่ได้รับโพรไบโอติกส์ผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูป 2 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราแลกเนื้อดีที่สุด ส่วนอัตราการรอดชีวิต พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลของโพรไบโอติกต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ 20, 40 และ 60 วัน หลังจากให้อาหารทดลอง พบว่าค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวและ

กิจกรรมของไลโซไซม์ (Lysozyme) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า Nitroblue Tetrazolium (NBT) ในปลากลุ่มที่ผสมโปรไบโอติกส์ 2 มล./อาหาร 1 กก. หลังให้อาหาร 60 วัน สูงกว่าชุดการทดลองอื่น

Laconi and Pompei (2007) ศึกษาคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์บางประการ ของยีสต์จำนวน 42 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลากระบอก (*Mugil spp.*) 5 สปีชีส์ ได้แก่ การยึดเกาะ การยับยั้งเชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ต่างๆ พบว่า เชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อสกุล *Candida spp.*, *Metschnikowia spp.*, *Sporidiobolus spp.*, *Clavispora spp.* และ *Sporobolomyces spp.* โดยมีเชื้อจำนวน 10 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะ และพบว่ามีเชื้อจำนวน 39 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida tropicalis* โดยเชื้อส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) แต่ไม่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) และไลเปส (Lipase)

Abdel-Tawwab et al. (2008) ศึกษายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในลูกปลานิลที่ได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยเลี้ยงลูกปลาน้ำหนัก 0.33 กรัม จำนวน 25 ตัวต่อตู้ปลาขนาด 140 ลิตร จำนวน 6 ตู้ โดยแต่ละตู้จะให้อาหารปลาที่ผสมยีสต์ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 5 กรัมต่ออาหารปลา 1 กก. เป็นเวลา 12 สัปดาห์ หลังจากนั้นปลาในแต่ละตู้จะได้รับเชื้อ *A. hydrophila* โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (Interperitoneal (IP) injection) แล้วบันทึกอาการทางคลินิกและอัตราการตายต่อวันของปลาเป็นเวลา 10 วัน ประเมินการส่งเสริมการเจริญเติบโตของยีสต์ต่อลูกปลาโดยชั่งน้ำหนักและวัดขนาดตัว แล้วนำไปคำนวณดูการเจริญเติบโต การใช้อาหาร (Feed utilization) และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน (Protein turn-over) พบว่าลูกปลาที่ได้รับอาหารปลาผสมยีสต์ 1-5 กรัม/กก. มีการเจริญเติบโต การใช้อาหารที่ดีขึ้น และยังช่วยเพิ่มการสะสมของโปรตีนในตัวปลาอีกด้วย โดยปริมาณของยีสต์ที่เหมาะสมที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกปลานิลคือ 1 กรัม/กก. และลูกปลาที่ได้รับอาหารปลาผสมยีสต์ 5 กรัม/กก. มีอัตราการตายน้อยที่สุด

Aly et al. (2008) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ที่แยกได้จากอวัยวะภายในของปลานิล จำนวน 15 ไอโซเลต ในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ด้วยวิธี Agar diffusion พบว่ามีเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ *B. pumilus* (แยกได้จากอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonads)), *Bacillus firmus* และ *Citrobacter freundii* (แยกได้จากกระเพาะอาหาร) จากนั้นนำเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตไปทดสอบประสิทธิภาพในตัวปลานิล โดยให้ปลานิลสุขภาพดีจำนวน 120 ตัวกินอาหารปลาที่เติมจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อกรัม เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้อาหารปลาที่ไม่ได้เติมจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์เป็นชุดควบคุม หลังจากนั้นให้เชื้อ *A. hydrophila* แก่ปลานิลโดยการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่เติมจุลินทรีย์โปร

ไบโอดีทิกส์ไม่แสดงอาการของโรค และมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าปลานิลในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับอาหารที่เติมจุลินทรีย์โพรไบโอดีทิกส์ โดยปลานิลที่ได้รับอาหารที่เติมเชื้อ *B. pumilus* มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด

Essa et al. (2010) ศึกษาผลของอาหารปลาที่เสริมโพรไบโอดีทิกส์ ต่อการเจริญเติบโต การใช้อาหาร และประสิทธิภาพของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของปลานิล โดยเลี้ยงปลานิลที่ได้รับอาหารปลาที่เสริมโพรไบโอดีทิกส์ที่แตกต่างกัน 5 กลุ่ม เป็นเวลา 60 วัน ได้แก่ *Bacillus subtilis* NIOFSD017, *Lactobacillus plantarum* NIOFSD018, เชื้อผสม *B. subtilis* และ *L. plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* NIOFSD019, และอาหารปลาที่ไม่ได้เสริมโพรไบโอดีทิกส์เป็นกลุ่มควบคุม โดยอาหารกลุ่มที่ 1-3 มีปริมาณเชื้อโพรไบโอดีทิกส์เท่ากับ 10^7 CFU/กรัมอาหาร ส่วนกลุ่มที่ 4 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^4 CFU/กรัมอาหาร พบว่า อาหารปลาที่เสริมโพรไบโอดีทิกส์ทุกกลุ่มสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและการใช้อาหารของปลานิล ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารปลาเหล่านี้ (ยกเว้นชุดที่ได้รับอาหารปลาที่เสริมเชื้อ *S. cerevisiae*) มีประสิทธิภาพของเอนไซม์อะไมเลส, โพรตีเอส และไลเปสเพิ่มสูงขึ้น ส่วนปลาที่ได้รับอาหารปลาที่เสริมเชื้อ *S. cerevisiae* มีเพียงเอนไซม์อะไมเลสที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นเท่านั้น

Pinpimai et al. (2015) ศึกษา Encapsulated yeast *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255 ในการเป็นโพรไบโอดีทิกส์สำหรับเลี้ยงปลานิล โดยศึกษาความมีชีวิตรอด (Viability) ในขณะที่เก็บรักษาด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ (Encapsulation) ในรูปเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต (Calcium alginate) แล้วทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) และขณะที่อยู่ในทางเดินอาหารจำลองและสถานะที่มีเกลือน้ำดี พบว่าเชื้อมีชีวิตรอดหลังจากที่เก็บเชื้อด้วยวิธีการดังกล่าวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน และมีชีวิตรอดในทางเดินอาหารจำลองและสถานะที่มีเกลือน้ำดี และศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* จำนวน 30 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Agar spot พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้ถึง 20 สายพันธุ์ จากนั้นนำเชื้อไปใช้ในการเลี้ยงปลานิลเพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต อัตราการตาย และระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้ปลานิล พบว่าปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น อัตราการตายลดลงหลังจากที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* และมีปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด Intraepithelial lymphocytes (IELs) ในลำไส้เพิ่มมากขึ้น

Yamashita et al. (2017) ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพรไบโอดีทิกส์ *Lactobacillus plantarum* ที่แยกได้จากลำไส้ของปลานิลที่สุขภาพดี ในการเป็นอาหารเสริมโพรไบโอดีทิกส์ต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยการแบ่งปลานิลเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ไม่ได้เติมจุลินทรีย์โพรไบโอดีทิกส์ และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เติมจุลินทรีย์โพรไบโอดีทิกส์เป็นเวลา 58 วัน แล้วนำลำไส้มานับปริมาณเชื้อโดยวิธี Spread plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติมสารละลาย Aniline blue พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่เติม

โพรไบโอติกส์มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้เพิ่มขึ้น และพบว่าปลาชนิดนี้มีน้ำหนัก อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Food efficiency) เพิ่มขึ้น หลังจากนั้นให้เชื้อ *S. agalactiae* แก่ปลานิล แล้ววิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาพบว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารที่เติมโพรไบโอติกส์มีปริมาณเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil เพิ่มขึ้น

Kazun et al. (2018) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum* 225/1, 155/1, 211/1B, 226/1 และ 274/1 ที่แยกได้จากน้ำนมดิบ ในประเทศโปแลนด์ (Poland) ในการเป็นโพรไบโอติกส์เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยศึกษาการเจริญในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี การทนกรด การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H₂O₂) การเกาะกลุ่ม (Autoaggregation) การสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm formation) และความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคในปลาจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Acinetobacter junii* ด้วยวิธี Agar slab พบว่า เชื้อ *L. plantarum* ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดีและสภาวะที่เป็นกรดมีความสามารถในการเกาะกลุ่ม สร้างไบโอฟิล์ม และมีความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคในปลาทุกชนิด แต่ไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ทุกสายพันธุ์

Reda et al. (2018) ศึกษาความเป็นโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลานิลจำนวน 135 ไอโซเลต พบว่า มี 9 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* และ *Staphylococcus aureus* โดยเชื้อไอโซเลต 38HT สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้งหมด 5 ชนิด ในขณะที่เชื้อไอโซเลตอื่นๆ สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 1-4 ชนิด นอกจากนี้ การทดสอบเพิ่มเติมยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำดีร้อยละ 10 น้ำหนัก/ปริมาตร และสภาวะที่เป็นกรด เมื่อระบุชนิดของเชื้อด้วยวิธีการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นเชื้อ *Lactococcus lactis* (8HT, 9HT, 11HT และ 33HT) *Enterococcus faecalis* (14HT) *Lysinibacillus* sp. (38HT) และ *Citrobacter freundii* (39HT, 41HT และ 47HT)

Tachibana et al. (2020) ศึกษาผลของการให้อาหารเสริมโพรไบโอติกส์ *Enterococcus faecium* ต่อการเจริญเติบโต คุณลักษณะทางโลหิตวิทยา ซิวเคมี และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ ปลานิลที่ได้รับอาหารปลาธรรมชาติ (ชุดควบคุม; CTR) ปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติกส์ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 7 วัน (CON) ปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติกส์เป็นเวลา 7 วัน สลับกับอาหารธรรมชาติเป็นเวลา 7 วัน (Pulse-supplementation probiotic feeding) (P7) และปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติกส์

เป็นเวลา 14 วัน สลับกับอาหารธรรมดาเป็นเวลา 14 วัน (P14) โดยเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 84 วัน แล้วนำปลานิลมาทดสอบคุณลักษณะข้างต้น พบว่า ปลานิลในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันในการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดย P7 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลานิลได้ดีที่สุด และ P14 ให้ค่า Respiratory burst สูงกว่าชุดการทดลองอื่น แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคุณลักษณะทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีของปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง และทดสอบความต้านทานการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ความเข้มข้น 10^8 CFU/mL โดยการฉีดเชื้อเข้าช่องท้อง บันทึกอาการทางคลินิกและการตายของปลาเป็นเวลา 14 วัน แล้วนำมาคำนวณค่า Relative level of protection (RLP) ของปลานิลในแต่ละชุดการทดลองเปรียบเทียบกับปลานิลที่ถูกฉีดด้วยสารละลาย 0.7% (น้ำหนัก/ปริมาตร) Phosphate buffer saline (PBS) พบว่า CON ให้ค่า RLP สูงกว่าชุดการทดลองอื่น

Khunrang et al. (2021) ศึกษาผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ผสม *Lactobacillus* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* ต่อการเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันของปลานิลหลังจากได้รับเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอาหารควบคุมและกลุ่มอาหารเสริมโพรไบโอติกส์ร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 โดยผสมเชื้อ *Lactobacillus* sp. ปริมาณ 3.1×10^8 CFU กับ *S. cerevisiae* ปริมาณ 4.6×10^6 CFU แล้วเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 30 วัน จากนั้นจะฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ให้กับปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง แล้วศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกัน พบว่า อาหารเสริมโพรไบโอติกส์ผสมร้อยละ 0.5 ให้ค่า ADG และ ค่าประสิทธิภาพการป้องกันเชื้อ (Protective efficiency) และร้อยละการรอดชีวิตสูงสุด คือ 78.13 และพบว่า หลังจากที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ไปแล้ว 24 ชั่วโมง ยีน Toll-like receptor 9 (TLR9) และ Immunoglobulin มีการแสดงออกสูงกว่าปลาในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1.1 ปิเปต (Pipette)
- 3.1.1.2 บีกเกอร์ (Beaker)
- 3.1.1.3 ปากคีบ (Forceps)
- 3.1.1.4 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.1.1.5 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
- 3.1.1.6 ทิป (Micropipette tip)
- 3.1.1.7 กระบอกลวด (Cylinder)
- 3.1.1.8 หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)
- 3.1.1.9 หลอดหยดสาร (Dropper)
- 3.1.1.10 แผ่นพาราฟิล์ม (Parafilm)
- 3.1.1.11 ไม้พันสำลี (Cotton swab)
- 3.1.1.12 ที่ปั๊มปิเปต (Pipette pump)
- 3.1.1.13 ขวดฉีดน้ำกลั่น (Wash bottle)
- 3.1.1.14 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 3.1.1.15 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 3.1.1.16 เหยือกแอลกอฮอล์ (Alcohol jar)
- 3.1.1.17 ตัวกรองเข็มฉีดยา (Syringe filter)
- 3.1.1.18 คิวเวตพลาสติก (Plastic cuvette)
- 3.1.1.19 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader glass)
- 3.1.1.20 ช้อนตักสารเคมี (Stainless spatula)
- 3.1.1.21 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)
- 3.1.1.22 กระบอกฉีดยา (Disposable syringe)
- 3.1.1.23 บีกเกอร์สแตนเลส (Beaker stainless)
- 3.1.1.24 เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier caliper)
- 3.1.1.25 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

- 3.1.1.26 พายสแตนเลส (Mixing paddle stainless)
- 3.1.1.27 กระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
- 3.1.1.28 ขวดสีชาพร้อมฝาเกลียว (Laboratory bottle amber)
- 3.1.1.29 หลอดทดลองพลาสติกพร้อมฝาปิด (Plastic test tube)
- 3.1.1.30 ขวดแลปฝาเกลียว (Laboratory bottle with screw cap)
- 3.1.1.31 หลอด Centrifuge tube และที่วาง (Centrifuge tube rack)
- 3.1.1.32 แผ่นสไลด์ (Microscope slide) และกระจกปิดสไลด์ (Cover glass)
- 3.1.1.33 หลอด Microcentrifuge tube และที่วาง (Microcentrifuge tube rack)
- 3.1.1.34 หลอดทดลองแก้ว (Glass test tube) และตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)
- 3.1.1.35 ชุดอุปกรณ์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแนวนอน (Horizontal gel electrophoresis system)
- 3.1.2 เครื่องมือ
- 3.1.2.1 เตาแก๊ส (Gas stove) ยี่ห้อ Lucky Frame
- 3.1.2.2 แหล่งจ่ายไฟ (Power supply) ยี่ห้อ Major Science
- 3.1.2.3 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ยี่ห้อ Olympus
- 3.1.2.4 เตาอบไมโครเวฟ (Microwave) ยี่ห้อ Sharp
- 3.1.2.5 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Zealway, TOMY
- 3.1.2.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Mammert
- 3.1.2.7 ตู้แช่แข็ง (Freezer) ยี่ห้อ Haier
- 3.1.2.8 ตู้เย็น (Refrigerator) ยี่ห้อ Sumsung, Intercool
- 3.1.2.9 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Contherm
- 3.1.2.10 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert
- 3.1.2.11 ตู้ชีวนิรภัย (Biosafety cabinet) คลาส 2 ยี่ห้อ Astec
- 3.1.2.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet) ยี่ห้อ Holten
- 3.1.2.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ KK
- 3.1.2.14 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) ยี่ห้อ Scientific Industries
- 3.1.2.15 เครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (Stomacher) ยี่ห้อ IUL Instrument
- 3.1.2.16 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance) ยี่ห้อ Precisa
- 3.1.2.17 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital balance) ยี่ห้อ Sartorius
- 3.1.2.18 เครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา (Reciprocal shaker) ยี่ห้อ CTL
- 3.1.2.19 เครื่องวัดความขุ่น (McFarland densitometer) ยี่ห้อ Biosan

- 3.1.2.20 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Metertech
- 3.1.2.21 เครื่องดูดปล่อยสารปริมาตรน้อย (Micropipette) ยี่ห้อ Sartorius
- 3.1.2.22 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Biometra TAdvanced Thermal cycler) ยี่ห้อ Analytik Jena
- 3.1.2.23 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ยี่ห้อ Innova
- 3.1.2.24 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำ แบบตั้งโต๊ะ (Benchtop pH meter) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO
- 3.1.2.25 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifugation) ยี่ห้อ Beckman Coulter
- 3.1.2.26 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตสำหรับส่องเจล (UV transilluminator) ยี่ห้อ Cleaver
- 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ
- 3.1.3.1 Lactobacillus MRS agar ยี่ห้อ HiMedia
- 3.1.3.2 Lactobacillus MRS broth ยี่ห้อ HiMedia
- 3.1.3.3 Yeast Malt (YM) agar ยี่ห้อ HiMedia
- 3.1.3.4 Yeast Malt broth ยี่ห้อ HiMedia
- 3.1.3.5 Mueller Hinton Agar (MHA) ยี่ห้อ HiMedia
- 3.1.3.6 Mueller Hinton Broth (MHB) ยี่ห้อ HiMedia
- 3.1.3.7 Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Agar; TSA) ยี่ห้อ HiMedia
- 3.1.3.8 Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth; TSB) ยี่ห้อ HiMedia
- 3.1.3.9 Brain Heart Infusion (BHI) broth ยี่ห้อ HiMedia
- 3.1.4 สารเคมี
- 3.1.4.1 Immersion oil
- 3.1.4.2 น้ำตาลทราย (Sugar)
- 3.1.4.3 น้ำกลั่น (Distilled water)
- 3.1.4.4 น้ำบริสุทธิ์ (18.2 Ω water)

3.1.4.5 ชุดสีย้อมแกรม (Gram stain set)	
3.1.4.6 Lactophenol cotton blue (LCB)	
3.1.4.7 McFarland standards เบอร์ 0.5 และ 2	
3.1.4.8 สีย้อม Congo Red	ยี่ห้อ Fluka
3.1.4.9 สีย้อม Crystal Violet	ยี่ห้อ Merck
3.1.4.10 สีย้อม Bromocresol purple	ยี่ห้อ Fisher
3.1.4.11 ยาปฏิชีวนะ Tetracycline	ยี่ห้อ Oxoid
3.1.4.12 ยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol	ยี่ห้อ Oxoid
3.1.4.13 เอนไซม์ Pepsin	ยี่ห้อ BDH
3.1.4.14 เอนไซม์ Lysozyme	ยี่ห้อ Fluka
3.1.4.15 เอนไซม์ Pancreatin	ยี่ห้อ TCI
3.1.4.16 Agarose	ยี่ห้อ Biotech
3.1.4.17 ฐัน (Agar)	ยี่ห้อ นางเงือก
3.1.4.18 TE buffer	ยี่ห้อ Panreac
3.1.4.19 Tris ($C_4H_{11}NO_3$)	ยี่ห้อ Biotech
3.1.4.20 Phenol (C_6H_6O)	ยี่ห้อ Panreac
3.1.4.21 1kb DNA ladder	ยี่ห้อ Vivantis
3.1.4.22 Glycerol ($C_3H_8O_3$)	ยี่ห้อ Ajax
3.1.4.23 Ethanol (C_2H_5OH)	ยี่ห้อ KTBE
3.1.4.24 เกลือน้ำดี (Bile salt)	ยี่ห้อ HiMedia
3.1.4.25 MyTaq HS Red Mix	ยี่ห้อ BIOLINE
3.1.4.26 Chloroform ($CHCl_3$)	ยี่ห้อ RCI-Labscan
3.1.4.27 Isopropanol (C_3H_8O)	ยี่ห้อ RCI-Labscan
3.1.4.28 OnePCR ultra mixture	ยี่ห้อ GeneDirex
3.1.4.29 Acetic acid (CH_3COOH)	ยี่ห้อ BDH
3.1.4.30 Sodium chloride (NaCl)	ยี่ห้อ Kemaus
3.1.4.31 Hydrochloric acid (HCl)	ยี่ห้อ RCI-Labscan
3.1.4.32 Isoamyl alcohol ($C_5H_{12}O$)	ยี่ห้อ Fluka
3.1.4.33 Hydrogen peroxide (H_2O_2)	ยี่ห้อ Chem-supply
3.1.4.34 Sodium hydroxide (NaOH)	ยี่ห้อ RCI-Labscan
3.1.4.35 EDTA, Disodium (Na_2EDTA)	ยี่ห้อ Fluka

3.1.4.36 Sodium acetate (CH_3COONa)	ยี่ห้อ Rankem
3.1.4.37 Potassium acetate (CH_3COOK)	ยี่ห้อ Ajax
3.1.4.38 Ammonium oxalate ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$)	ยี่ห้อ APS
3.1.4.39 Novel juice DNA staining reagent	ยี่ห้อ GeneDireX
3.1.4.40 Sodium dodecyl sulfate ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)	ยี่ห้อ Rankem
3.1.4.41 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	ยี่ห้อ APS

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ

(ดัดแปลงจากวีณาและดอกรัก, 2562)

นำตัวอย่างทางเดินอาหารของปลา (ตั้งแต่หลอดอาหารถึงทวารหนัก) จากร้านขายปลาในตลาดสด จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 27 ตัวอย่าง จากปลา 7 ชนิด ได้แก่ ปลาตะกอก จำนวน 1 ตัวอย่าง ปลาไน จำนวน 1 ตัวอย่าง ปลาช่อน จำนวน 2 ตัวอย่าง ปลาทับทิม จำนวน 2 ตัวอย่าง ปลากระพง จำนวน 3 ตัวอย่าง ปลานิล จำนวน 3 ตัวอย่าง และปลาหมอ จำนวน 15 ตัวอย่าง มาใส่ถุงตึบดที่ปราศจากเชื้อที่มีสารละลาย 0.85% น้ำหนัก/ปริมาตร (w/v) NaCl ปริมาตร 30 มิลลิลิตร (มล.) นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (Stomacher) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นคูดตัวอย่างปริมาตร 10 มล. ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Malt (YM broth) 50 มล. (สำหรับยีสต์) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว de Man, Rogosa and Sharpe (Lactobacillus MRS broth) ปริมาตร 50 มล. (สำหรับแบคทีเรีย) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับแบคทีเรีย) และ 48 ชั่วโมง (สำหรับยีสต์) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที (Round per minute; rpm) ด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth มา Cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Selective media YM agar pH 2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth มา Cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมสี Bromocresol purple ความเข้มข้น 0.004% (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak อีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มในสภาวะเดียวกันกับก่อนหน้านั้น บันทึกลักษณะโคโลนีเดี่ยวและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สำหรับยีสต์ใช้วิธี Wet mount แบคทีเรียใช้วิธีย้อมสีแกรม (Gram staining) และทดสอบการสร้างเอนไซม์คตะเลสด้วยสารละลาย Hydrogen peroxide (H_2O_2) ความเข้มข้น 3% ปริมาตร/ปริมาตร (v/v) สำหรับแบคทีเรีย แล้วเก็บเชื้อไว้ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30% (v/v) ที่อุณหภูมิ -20°C และ/หรือ -80°C (Dowarah et al., 2018; Pagliardini et al., 2010)

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล

(ดัดแปลงจาก Strus, 1998; Yamashita et al., 2017)

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อโพรไบโอติกส์ที่คัดแยกได้

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland 0.5 (ปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.5×10^8 CFU/ml) แล้วใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Sterile cotton swab) จุ่มลงใน Suspension แล้วนำไปป้าย (Swab) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

เลี้ยงยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland 2.0 (ปริมาณเซลล์เท่ากับ 6.0×10^8 CFU/ml) (Melhem et al., 2013) แล้วใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงใน Suspension ของเชื้อ แล้วนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar ให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลต่อไป

3.2.2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียก่อโรคในปลานิลที่ต้องการทดสอบจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* MUVS 2018 AH 001, *Aeromonas sobria* MUVS 2017 AS, *Aeromonas veronii* vsmu 083, *Edwardsiella ictaluri* 2010/12 EI, *Edwardsiella tarda* MUVS 2018 ET1 และ *Streptococcus agalactiae* MUVS 2017 SA 001 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.สพ.ญ.วรรณภา ศิริมานะพงษ์ ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptone Soya broth (TSB) ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland 0.5 แล้วใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงใน Suspension แล้วนำไป Swab บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller Hinton agar (MHA) ให้ทั่วจานเพาะเลี้ยง

3.2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล ด้วยวิธี Agar slab

ตัดชิ้นวุ้นจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และ YM agar ที่มีเชื้อเจริญ ในข้อ 3.2.2.1 ให้เป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร (มม.) วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ในข้อ 3.2.2.2 โดยใช้ชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ (Negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะเป็นตัวควบคุมบวก (Positive control) ดังต่อไปนี้

เชื้อก่อโรค	ยาปฏิชีวนะ	ปริมาณ ในหน่วย µg/disc	แหล่งอ้างอิง
<i>Aeromonas</i> spp.	Tetracycline	30	Mueangkan & Chriapongsatonkul, 2018
<i>Edwardsiella</i> spp.	Chloramphenicol	30	Purkait et al., 2018
<i>S. agalactiae</i>	Tetracycline	30	Razak et al., 2019

นำจานเพาะเชื้อทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (สำหรับแบคทีเรีย) และอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับยีสต์) จากนั้นบันทึกผลการทดลองโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.) ของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้

3.2.3.1 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

(ดัดแปลงจาก Guo et al., 2010; Khagwal et al., 2014)

เลี้ยงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาใน (ผลจากข้อ 3.2.2) ที่ได้รับการคัดเลือก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดและเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl ทั้งส่วนใสเหนือตะกอน แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 100 ไมโครลิตร (มคล.) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติมเกลือน้ำดี (Bile salt) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% (w/v) (Ngov et al., 2014) (สำหรับแบคทีเรีย) และอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth (สำหรับยีสต์) ที่เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้นเดียวกัน นำแบคทีเรียไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด ส่วนยีสต์ให้นำบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (Optical density) ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร (OD₆₄₀) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ทั้งแบคทีเรียและยีสต์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS หรือ YM broth ที่เติมเกลือน้ำดีที่ปราศจากเชื้อเป็น Blank (ใช้สารละลายที่ใช้เจือจางเชื้อเป็น Blank ในกรณีที่มีการเจือจางเชื้อ เมื่อค่า OD₆₄₀ มากกว่า 0.5)

โดยประเมินการเจริญของเชื้อโดยใช้เกณฑ์การประเมิน ดังนี้

- 1) ค่า OD₆₄₀ มากกว่าหรือเท่ากับ 5 คือ มีการเจริญดี แทนด้วยสัญลักษณ์ (+++)
- 2) ค่า OD₆₄₀ มากกว่าหรือเท่ากับ 1 แต่น้อยกว่า 5 คือ มีการเจริญปานกลาง แทนด้วยสัญลักษณ์ (++)
- 3) ค่า OD₆₄₀ มากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 แต่น้อยกว่า 1 คือ มีการเจริญเล็กน้อย แทนด้วยสัญลักษณ์ (+)
- 4) ค่า OD₆₄₀ น้อยกว่า 0.1 คือ ไม่มีการเจริญ แทนด้วยสัญลักษณ์ (-)

เปรียบเทียบกับผลการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS หรือ YM broth ที่ไม่ได้เติมเกลือน้ำดีเป็นชุดควบคุม

3.2.3.2 การทดสอบการทนต่อความเป็นกรดสูง

(ดัดแปลงจาก Guo et al., 2010; Khagwal et al., 2014)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา (ผลจากข้อ 3.2.2) ที่ได้รับการคัดเลือก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสเหนือตะกอน ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 100 มล. ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ปรับค่า pH เป็น 2.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 Normality นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด จากนั้นตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth pH 2.5 ที่ปราศจากเชื้อเป็น Blank แล้วประเมินการเจริญของเชื้อดังข้อที่ 3.2.3.1 เปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth pH 6.5 เป็นชุดควบคุม

3.2.3.3 การทดสอบการยึดเกาะพื้นผิว

(ดัดแปลงจาก Yegorenkova et al., 2011; Zmantar et al., 2008)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา (ผลจากข้อ 3.2.2) ที่ได้รับการคัดเลือก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดและเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นเจือจางเชื้อในอัตราส่วนปริมาตรของเชื้อต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เป็น 1 ต่อ 100 โดยปริมาตร/ปริมาตร แล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 200 มล. ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มล. ที่บรรจุในหลอดทดลองแก้วขนาด 16x100 มม. และถ่ายเชื้อยีสต์ปริมาตร 200 มล. ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 5 มล. ที่บรรจุในหลอดทดลองแก้วขนาดเดียวกัน นำไปบ่มในสภาวะเดียวกันกับก่อนหน้า จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญทั้งสองชนิดทิ้ง แล้วล้าง

หลอดทดลองด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้ยึดเกาะอยู่ที่ผนังหลอดทดลองออกไป แล้วย้อมเซลล์ที่ยังยึดเกาะอยู่ที่ผนังหลอดทดลองด้วยสารละลายสีคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ความเข้มข้น 2% (w/v) ปริมาตรประมาณ 5.5-6 มล. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสีย้อมทิ้งแล้วล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในลักษณะคว่ำหลอด แล้วเติมสารละลายเอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้น 95% (v/v) ปริมาตรประมาณ 5.5-6 มล. เพื่อชะสีคริสตัลไวโอเลตออกจากเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่ที่ผนังหลอดทดลอง จากนั้นวัดความเข้มข้นของสีที่ถูกชะออกมาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (Abs_{590}) โดยใช้สารละลาย 95% (v/v) เอทานอลเป็น Blank แล้วประเมินปริมาณการยึดเกาะของเชื้อ โดยใช้เกณฑ์การประเมิน ดังนี้

- 1) ค่า Abs_{590} มากกว่าหรือเท่ากับ 1 คือ มีเซลล์ยึดเกาะปริมาณมาก แทนด้วยสัญลักษณ์ (+++)
- 2) ค่า Abs_{590} มากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 แต่น้อยกว่า 1 คือ มีเซลล์ยึดเกาะปานกลาง แทนด้วยสัญลักษณ์ (++)
- 3) ค่า Abs_{590} มากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 แต่น้อยกว่า 0.5 คือ มีการเซลล์ยึดเกาะปริมาณน้อย แทนด้วยสัญลักษณ์ (+)
- 4) ค่า Abs_{590} น้อยกว่า 0.1 คือ ไม่มีเซลล์ยึดเกาะ แทนด้วยสัญลักษณ์ (-)

เปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth และ YM broth ที่ปราศจากเชื้อ

3.2.3.4 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red agar

(ดัดแปลงจาก Bobbillapati et al., 2016; Freeman et al., 1989)

เพาะเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา (ผลจากข้อ 3.2.2) ที่ได้รับการคัดเลือก บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red agar (CRA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (สำหรับแบคทีเรีย) และอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (สำหรับยีสต์) สังเกตลักษณะโคโลนีและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ โคโลนี หากมีการสร้างไบโอฟิล์มโคโลนีจะมีสีดำ อาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีดำ และหากไม่มีการสร้างไบโอฟิล์มโคโลนีและอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีจะมีสีแดง (Arciola et al., 2002; Ferreira et al., 2014)

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลอง

(ดัดแปลงจาก Madureira et al., 2005; Ogunremi et al., 2015; Ripamonti et al., 2011)

เลี้ยงแบคทีเรียทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดและเลี้ยงยีสต์ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm

จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland 0.5 และ 2.0 สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ที่ปราศจากเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสเหนือตะกอน ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายกระเพาะอาหารสังเคราะห์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มล. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30°C ในสถานะที่มีออกซิเจนจำกัด จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตที่เวลา 0, 1.5 และ 3 ชั่วโมง โดยวิธีการ Standard plate count ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และ YM agar สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่ปั่นในสถานะกระเพาะอาหารจำลองครบ 3 ชั่วโมง ไปปั่นเหวี่ยงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสเหนือตะกอน ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายลำไส้สังเคราะห์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มล. นำไปปั่นในสถานะเดียวกันกับก่อนหน้านี้ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตที่เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง เช่นเดียวกันกับการทดลองก่อนหน้านี้ คำนวณอัตราการรอดชีวิตของเชื้อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เลี้ยงในสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl ที่ไม่ได้เติมเอนไซม์เปปซิน แพนครีเอติน และเกลื่อน้ำดี ดังสมการ (Bao et al., 2010)

$$\text{อัตราการรอดชีวิต} = (\log \text{CFU/ml ของเชื้อหลังการทดสอบ} \div \log \text{CFU/ml ของเชื้อเริ่มต้น}) \times 100$$

3.2.5 การระบุชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

3.2.5.1 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

(ดัดแปลงจาก Tanasupawat et al., 2016)

3.2.5.1.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ที่ปราศจากเชื้อ ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อเหนือตะกอน แล้วเติมสารละลาย Saline-EDTA ปริมาตร 500 มล. ลงไปในหลอดทดลองที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่ กระจายเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ Lysozyme ปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกกลับหลอดทดลองเบาๆ (Inverting) แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 37°C โดยการเขย่าเบาๆ ด้วยกระแสน้ำวนเป็นเวลา 15-30 นาที จะสังเกตเห็นสารละลายเริ่มหนืดเมื่อเอียงหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย 10% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกกลับหลอดทดลองเบาๆ แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งสารละลายใส แล้วเติมสารละลาย Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 600 มล. ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท แล้วผสมให้เข้ากันโดยการพลิกกลับหลอดทดลองเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายใสชั้นบนประมาณ 400 มล. มาใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่ โดยพยายามหลีกเลี่ยงชั้นโปรตีนบริเวณกลางหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Sodium acetate pH 5.2 ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรส่วนใส (ประมาณ 40 มล.) แล้วเติม 99.5% (v/v) เอทานอลเย็นลงไป 2 เท่าของปริมาตรส่วนใส (ประมาณ 800 มล.) ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกกลับหลอดทดลองเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเหนือตะกอนทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งจนสารละลายเอทานอลระเหยหมดที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 30 มล. แล้วเจือจางปริมาณดีเอ็นเอลง 10 เท่าก่อนนำมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.2.5.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบคทีเรียด้วยวิธี PCR

เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยการเติมส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR (Reaction mixture) ได้แก่ OnePCR ultra mixture, ไพรมเมอร์ 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC A-3') และ 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Eden et al., 1991), น้ำบริสุทธิ์ที่ปราศจาก

เชื้อ และ DNA template ลงไปในหลอด PCR ขนาด 200 มล. โดยความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน 16S rDNA

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตรที่ใช้ (มล.)
OnePCR ultra mixture	-	10
27F primer	10 pmole/ μ l	1
1492R primer	10 pmole/ μ l	1
น้ำบริสุทธิ์ที่ปราศจากเชื้อ	-	6
DNA template	-	2
รวม		20

ดูด Reaction mixture มาใส่ในหลอด PCR ที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Biometra TAdvanced Thermal Cycler

ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) โดยนำผลจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ปริมาตร 5 มล. ผสมกับ Novel juice DNA staining reagent ปริมาตร 1 มล. แล้วนำมาวิเคราะห์ขนาดและตรวจสอบคุณภาพด้วย 0.8% (w/v) Agarose gel ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า (Voltage) 100 โวลต์ (Volt) และ 1X TAE buffer เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วเปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ DNA ladder ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (มคก./มคล.) ขนาด 1kb โดยการส่องดูภายใต้แสง Ultraviolet (UV) ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตสำหรับส่องเจล (UV Transilluminator) จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่ง PCR product ให้กับบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ (South Korea)

3.2.5.2 การระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้

(ดัดแปลงจาก Jutakanoke et al., 2014)

3.2.5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อโคลนเดี่ยวใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ที่มี Lysis buffer อยู่ 200 มล. นำหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Potassium acetate pH 7.5 ความเข้มข้น 2.5 M ปริมาตร 200 มล. เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น

นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสเหนือตะกอน เติม 1 เท่าของ Chloroform:Isoamylalcohol (24:1) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เก็บสารละลายใสชั้นบน เติม Isopropanol เย็น ปริมาตรเท่ากับ Chloroform:isoamylalcohol ที่เติมไปก่อนหน้านี้ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 นาที ที่ส่วนใสเหนือตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 70% (v/v) เอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างอีกครั้งด้วย 90% (v/v) เอทานอล ตูดส่วนใสเหนือตะกอนทิ้ง แล้วทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยการผึ่งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 20-30 มล. เจือจางปริมาณดีเอ็นเอลง 10 เท่าก่อนนำมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR

3.2.5.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีสต์ด้วยวิธี PCR

เพิ่มปริมาณยีนส่วน D1/D2 domain ใน 26S rDNA โดยการเติมส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ MyTaq HS Red Mix, ไพรมเมอร์ F63 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') และ LR3 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3') (Kurtzman & Robnett, 1998), น้ำบริสุทธิ์ที่ปราศจากเชื้อ และ DNA template โดยความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ของยีนส่วน D1/D2 domain ใน 26S rDNA

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตรที่ใช้ (มล.)
MyTaq HS Red Mix	2X	25
F63 primer	10 pmole/ μ l	0.5
LR3 primer	10 pmole/ μ l	0.5
น้ำบริสุทธิ์ที่ปราศจากเชื้อ	-	9
DNA template	<1 μ g	15
รวม		50

ตูด Reaction mixture มาใส่ในหลอด PCR ที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Biometra TAdvanced Thermal Cycler

ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยนำ PCR product ปริมาตร 5 มล. ผสมกับ Novel juice DNA staining reagent ปริมาตร 1 มล. แล้วนำมาวิเคราะห์ขนาดและตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% (w/v) Agarose gel ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ และ 1X TAE buffer เป็นเวลาประมาณ 60 นาที แล้วเปรียบเทียบขนาดของ PCR product

กับ DNA ladder ความเข้มข้น 0.1 มคก./มคล. ขนาด 1kb โดยการส่องดูภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตสำหรับส่องเจล จากนั้นส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย

3.2.5.3 การสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม BioEdit จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีสต์และแบคทีเรียกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในธนาคารยีน (GenBank) ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Nucleotide blast (BLASTN) จากนั้นสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการเพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อที่คัดแยกได้โดยใช้โปรแกรม MEGA7 ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining method โดยมีค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 (Jutakanoke et al., 2017)

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยค่า OD_{640} ของเชื้อระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบสถานะที่มีเกลื่อน้ำดีและสถานะที่มีความเป็นกรดสูง ในข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2 โดยวิธี Independent *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป SPSS statistics

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ จากตลาดสด

ผลการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากตัวอย่างทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ จากตลาดสด โดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่มีบริเวณสีเหลืองรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมสี Bromocresol purple และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar pH 2.5 พบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 245 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 68 ไอโซเลต และเป็นยีสต์ 177 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนไอโซเลตของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ

ตัวอย่างทางเดินอาหารของปลา	จำนวนไอโซเลต		รวม
	แบคทีเรีย	ยีสต์	
ปลากะพง	0	10	10
ปลาช่อน	8	14	22
ปลาตะโกก	2	7	9
ปลาทับทิม	0	8	8
ปลานิล	3	23	26
ปลาไน	5	0	5
ปลาหมอ	50	115	165
รวม	68	177	245

จากตารางที่ 7 พบว่า สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้จากตัวอย่างทางเดินอาหารของปลา 7 ชนิด ได้แก่ ปลากะพง (*Lates calcarifer*) จำนวน 10 ไอโซเลต เป็นยีสต์ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ปลาช่อน (*Channa striata*) จำนวน 22 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 8 ไอโซเลต เป็นยีสต์ 14 ไอโซเลต ปลาตะโกก (*Cyclocheilichthys enoplos*) จำนวน 9 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต เป็นยีสต์ 7 ไอโซเลต ปลาทับทิม (*Oreochromis niloticus-mossambicus*) จำนวน 8 ไอโซเลต เป็นยีสต์ทั้งหมด 8 ไอโซเลต ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จำนวน 26 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 3 ไอโซ

เลต เป็นยีสต์ 23 ไอโซเลต ปลาไน (*Cyprinus carpio*) จำนวน 5 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียทั้งหมด 5 ไอโซเลต และปลาหมอ (*Anabas testudineus*) จำนวน 165 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 50 ไอโซเลต เป็นยีสต์ 115 ไอโซเลต

จากนั้นนำไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้งแบคทีเรียและยีสต์มาศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (สำหรับแบคทีเรีย) ให้ผลดังตารางที่ 8 และ 9 โดยพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลตติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีรูปร่างและการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกัน 6 ลักษณะ ได้แก่ รูปร่างท่อนอยู่เป็นคู่ (Diplobacilli), รูปร่างท่อนต่อกันเป็นสาย (Streptobacilli), รูปร่างกลมอยู่เป็นคู่ (Diplococci), รูปร่างกลมกึ่งท่อนอยู่เป็นคู่ (Diplococcobacilli), รูปร่างกลมกึ่งท่อนต่อกันเป็นสาย (Streptococcobacilli) และรูปร่างกลมกึ่งท่อนอยู่เป็นคู่และกลุ่ม (Coccobacilli in pairs and clusters) ดังภาพที่ 12 ส่วนยีสต์มีรูปร่างที่แตกต่างกัน 6 ลักษณะ ได้แก่ รูปร่างรี (Ovoidal), รูปร่างรี มีเส้นใยแบบมีผนังกัน (Ovoidal with truemycelium), รูปร่างรี มีเส้นใยเทียม (Ovoidal with pseudomycelium), รูปร่างกลม (Spherical), รูปร่างยาว (Elongated) และรูปร่างไม่แน่นอน (Irregular) ดังภาพที่ 13



ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ชนิดตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต	สีของโคโลนี	รูปร่างของโคโลนี	ขอบโคโลนี	ผิวหน้าโคโลนี	การติดสีแกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	การสร้างเอนไซม์	คะตะเลส
ปลาช่อน	CS1/1	ขาว	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-	
	CS1/2	ขาว	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-	
	CS1/3	ครีม	รูปร่างไม่แน่นอน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-	
	CS1/6	ขาว	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน ต่อกันเป็นสาย	-	
	CS2/2	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-	
CS2/3	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-		
CS2/4	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-		
CS2/5	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-		

ชนิดตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต	สีของโคโคไลน	รูปร่างของโคโคไลน	ขอบโคโคไลน	ผิวหน้าโคโคไลน	การดัดสีแกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	การสร้างเอนไซม์อะซิเตลเลส
มีเมือก								
ปลาตะโกก	CE1/1	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-
	CE1/2	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
ปลาบิล	ON1/1	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	ON1/2	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	ON1/3	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-
ปลาไน	CC1/1	ครีม	กลมมน	ขอบหยัก	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-
	CC1/3	ครีม	กลมมน	ขอบหยัก	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-
	CC1/4	ครีม	กลมมน	ขอบหยัก	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนต่อกันเป็นสาย	-
	CC1/5	ครีม	กลมมน	ขอบหยัก	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-

ชนิดตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต	สีของโคโคไลน	รูปร่างของโคโคไลน	ขอบโคโคไลน	ผิวหน้าโคโคไลน	การดัดสีแกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	การสร้างเอนไซม์อะซิเตลเอส
ปลาไน	CC1/6	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่และกลุ่ม	-
	AT1/1	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-
	AT1/2	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT1/3	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT1/4	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT1/6	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT1/7	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT1/8	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT1/9	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT1/10	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT1/12	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-

ปลาหมอ

ชนิดตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต	สีของโคโคไลน	รูปร่างของโคโคไลน	ขอบโคโคไลน	ผิวหน้าโคโคไลน	การติดสีแกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	การสร้างแอนไชม์	คะตะเลส
					มีเมือก				
	AT2/1	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT2/2	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT2/3	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	มันวาวมีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT2/4	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT2/6	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT2/7	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT2/8	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT2/9	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT2/11	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	

ปลาหมอ

ชนิดตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต	สีของโคโคไลน	รูปร่างของโคโคไลน	ขอบโคโคไลน	ผิวหน้าโคโคไลน	การติดสีแกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	การสร้างเอนไซม์อะซิเตลเอส
					มีเมือก			
	AT2/12	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว มีเมือก	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT2/13	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT2/14	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT3/3	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT3/4	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-
ปลาหมอ	AT3/5	ขาว	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT4/1	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT4/2	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT4/5	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	AT5/9	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-
	AT6/4	ครีม	กลมมนูน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกึ่งกลมกึ่งท่อน อยู่เป็นคู่	-

ชนิดตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต	สีของโคโคไลน	รูปร่างของโคโคไลน	ขอบโคโคไลน	ผิวหน้าโคโคไลน	การดัดสีแกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	การสร้างแอนไชม์	คะตะเลส
	AT7/1	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT7/4	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT8/1	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT8/4	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT8/5	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT8/7	ขาว	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกลมอยู่เป็นคู่	-	
	AT9/1	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT9/2	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT9/4	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT9/5	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT9/7	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกลมอยู่เป็นคู่	-	
	AT10/1	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT10/2	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT10/3	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-	
	AT10/4	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกิ่งกลมกิ่งท่อนอยู่เป็นคู่	-	

ปลาหมอ

ชนิดตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต	สีของโคโลนี	รูปร่างของโคโลนี	ขอบโคโลนี	ผิวหน้าโคโลนี	การติดสีแกรม	รูปร่างและการจัดเรียงตัว	การสร้างเอนไซม์อะซิเตเอส
	ATCU1	ขาวครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
	ATCU2	ขาวครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-
ปลาหมอ	M1/1	ครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกลมอยู่เป็นคู่	-
	M1/2	ขาวครีม	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปกลมอยู่เป็นคู่	-
	M1/3	ขาว	กลมมน	ขอบเรียบ	เรียบเป็นมันวาว	บวก	รูปท่อนอยู่เป็นคู่	-

หมายเหตุ: เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่สร้างเอนไซม์อะซิเตเอส

ตารางที่ 9 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ที่คัดแยกได้

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
ปลา กะพง	YLC1/1	ขาว	ย่น (Wrinkle)	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น
	YLC1/2	ขาว	ย่น	เรียบ	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น
	YLC1/3	ขาว	ย่น	หยัก	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น
	YLC1/4	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น
	YLC1/5	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YSTLC1/1	ขาว	ย่น	หยัก	ผิวด้าน	รูปร่างยาว
	YSTLC1/2	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YSTLC1/3	ขาว	กลมนูน	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YSTLC1/4	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YK1/8	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
ปลาช่อน	YCS1/1	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCS1/2	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCS1/3	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCS1/4	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCS1/5	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
	YCS1/6	ขาว	ย่น	หยัก	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น
	YCS2/1	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCS2/2	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCS2/3	ขาว	ย่น	เรียบ	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยเทียม
ปลาช่อน	YCS2/4	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี มีเส้นใยเทียม
	YCS2/5	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCS2/6	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCS2/7	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCS2/8	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCE1/1	ขาว	กลมมนูน	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCE1/2	ขาว	กลมมนูน	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	รี
ปลา ตะโกก	YCE1/3	ขาว	กลมมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รี
	YCE1/4	ขาว	กลมมนูน	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCE1/6	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YCE1/7	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
ปลา ตะกอก	YCE1/8	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YONM1/1	ขาว	ย่น	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	รูป มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น
	YONM1/2	ขาว	ย่น	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	รูป
ปลา ทับทิม	YONM1/3	ขาว	ย่น	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	รูป มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น
	YONM1/4	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YONM1/5	ขาว	ย่น	หยัก	ผิวด้าน	รูป มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น
	YT1/4	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	ผิวด้าน	รูป
	YT2/2	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	ผิวด้าน	รูป
	YT2/3	ขาว	กลมมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รูป
ปลานิล	YON1/1	ขาว	กลมแบน	เรียบ	ผิวด้าน	รูป
	YON1/2	ขาว	กลมแบน	เรียบ	ผิวด้าน	รูป
	YON1/3	ขาว	กลมแบน	หยัก	ผิวด้าน	รูป
	YON1/4	ขาว	กลมแบน	หยัก	ผิวด้าน	รูป
	YON1/5	ขาว	กลมแบน	เรียบ	ผิวด้าน	รูป
	YON1/6	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YON2/1	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YON2/2	ขาว	กลมมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รูป
	YON2/3	ขาว	กลมมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รูป
	YON2/4	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YON2/5	ขาว	กลมมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รูป

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์	
ปลานิล	YON2/6	ขาว	กลมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รูป	
	YON2/7	ขาว	ย่น	หยัก	ผิวด้าน	รูป	
	YON2/8	ขาว	กลมแบน	หยัก	ผิวด้าน	รูป	
	YON2/9	ขาว	กลมนูน	เรียบ	ผิวด้าน	รูป	
	YON2/10	ขาว	กลมนูน	เรียบ	ผิวด้าน	รูป	
	YON3/1	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รูป	
	YON3/2	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รูป	
	YON3/3	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รูป	
	YON3/4	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รูป	
	YON3/5	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รูป	
	YON3/6	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รูป	
	YON3/7	ขาว	กลมนูน	เรียบ มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รูป	
	ปลาหมอ	YAT1/1	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว มีเมือก	รูป
		YAT1/2	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว มีเมือก	รูป
YAT1/4		ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป	

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
	YAT1/5	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT1/6	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT2/1	ขาว	ย่น	หยัก	ผิวด้าน	รี
	YAT2/2	ขาว	ย่น	หยัก	ผิวด้าน	รี
	YAT2/3	ขาว	ย่น	หยัก	ผิวด้าน	รี
	YAT2/4	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT2/5	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT2/6	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
ปลาหมอ	YAT2/7	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT2/8	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT2/9	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT2/10	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT2/11	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT2/12	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT2/13	ขาว	ย่น	หยัก	ผิวด้าน	รี
	YAT2/14	ครีม	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
	YAT3/1	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	ผิวด้าน	รูป
	YAT3/2	ขาว	กลมมนูน	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YAT3/3	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	ไม่แน่นอน
	YAT3/4	ขาว	กลมมนูน	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YAT3/5	ขาว	กลมมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รูป
	YAT3/6	ขาว	กลมมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รูป
	YAT3/7	ขาว	กลมมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รูปร่างยาว
	YAT3/8	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
ปลาหมอ	YAT3/9	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YAT3/10	ขาว	กลมมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รูป
	YAT32/1	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YAT32/2	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YAT32/3	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YAT32/4	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YAT32/5	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป
	YAT32/6	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รูป

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
ปลาหมอ	YAT32/7	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT32/8	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT32/9	ขาว	กลมนูน	เรียบ มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT4/1	ขาว	กลมนูน	เรียบ มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT4/2	ขาว	กลมนูน	เรียบ มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT4/3	ขาว	กลมนูน	เรียบ มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT4/4	ขาว	กลมนูน	เรียบ มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT4/5	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT4/6	ขาว	กลมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รี
	YAT4/7	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT4/8	ขาว	กลมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยเทียม
	YAT4/9	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT4/10	ขาว	กลมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยเทียม
	YAT4/11	ขาว	กลมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รี
	YAT4/12	ขาว	กลมนูน	เรียบ มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT5/1	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี

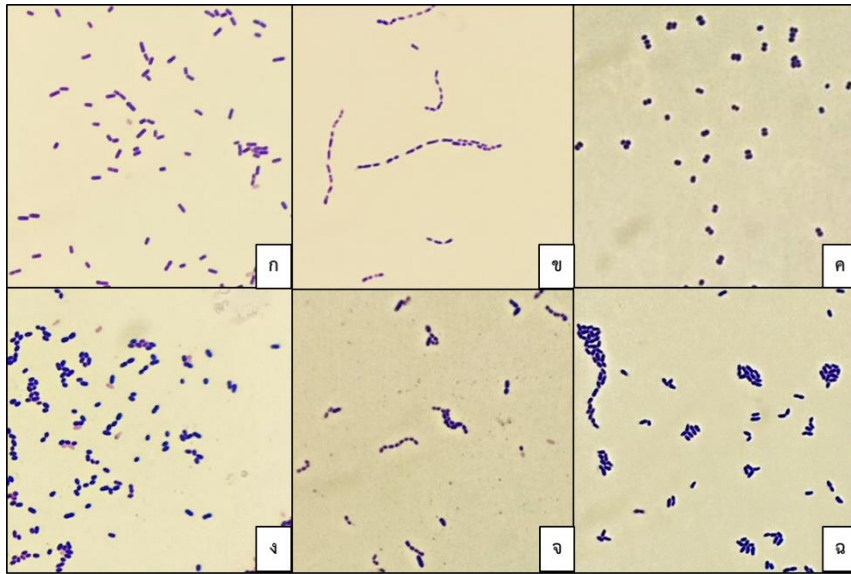
ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
	YAT5/2	ขาว	กลมมน	เรียบ	ผิวด้าน	รี
	YAT5/3	ขาว	กลมมน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี มีเส้นใยแบบมีผนังกัน
	YAT5/4	ขาว	กลมมน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT5/5	ขาว	กลมมน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT5/6	ขาว	กลมมน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT5/7	ขาว	กลมมน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยเทียม
	YAT6/1	ขาว	กลมมน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี
ปลาหมอ	YAT6/3	ขาว	กลมมน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT6/4	ขาว	กลมมน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT6/5	ขาว	กลมมน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT6/6	ขาว	กลมมน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยเทียม
	YAT6/7	ขาว	กลมมน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT6/8	ขาว	กลมมน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT7/1	ขาว	กลมมน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
ปลาหมอ	YAT7/2	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT7/3	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT7/4	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT7/5	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT7/6	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยเทียม
	YAT7/7	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยเทียม
	YAT7/8	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT7/9	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว มีเมือก	รี
	YAT7/10	ขาว	กลมนูน	เรียบ มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT8/1	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี
	YAT8/2	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น
	YAT8/3	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนขุ่น	ผิวด้าน	รี
	YAT8/4	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	รี

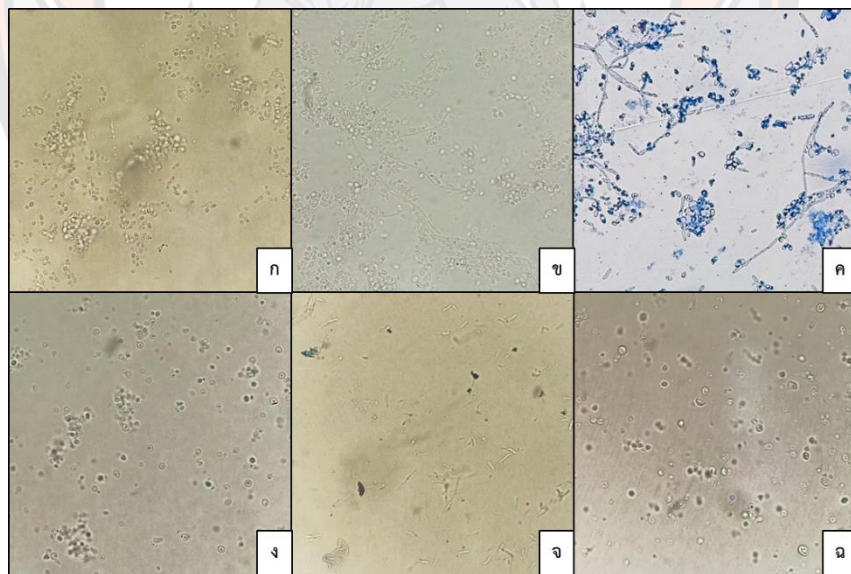
ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
ปลาหมอ	YAT8/5	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	วง
	YAT8/6	ขาว	กลมมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	วง
	YAT8/7	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	วง
	YAT8/8	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	วง
	YAT8/9	ขาว	กลมมนูน	เรียบ มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	วง
	YAT9/1	ขาว	กลมมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	วง
	YAT9/2	ขาว	กลมมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยเทียม
	YAT9/3	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	วง
	YAT9/4	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	วง
	YAT9/5	ขาว	กลมมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	วง
	YAT9/6	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	วง
	YAT9/7	ขาว	กลมมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	วง
	YAT9/8	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	วง
	YAT9/9	ขาว	กลมมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	วง

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
ปลาหมอ	YAT9/10	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT9/11	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	กลม
	YAT9/12	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT9/13	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT10/1	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT10/2	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT10/3	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	กลม
	YAT10/5	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	กลม
	YAT10/6	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	กลม
	YAT10/7	ขาว	กลมนูน	หยัก มีโซนชุ่น	ผิวด้าน	กลม
	YAT10/8	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YAT10/9	ขาว	กลมนูน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YM1/1	ขาว	กลมนูน	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YM1/2	ขาว	กลมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รี มีเส้นใยแบบมีผนังกัน
	YM1/3	ขาว	กลมนูน	หยัก	ผิวด้าน	รี

ตัวอย่าง ปลา	รหัส ไอโซเลต	สีของ โคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	รูปร่างเซลล์
ปลาหมอ	YM1/4	ขาว	กลมมน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YM1/5	ขาว	กลมมน	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YUK1/1	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YUK1/2	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YUK1/3	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YUK1/4	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YUK1/5	ขาว	ย่น	เรียบ	เรียบเป็น มันวาว	กลม
	YID23	ชมพูอ่อน จากนั้น เปลี่ยนเป็น สีดำเมื่อ บ่มเป็น เวลานาน	กลมมน	หยัก	เรียบเป็น มันวาว	กลม



ภาพที่ 13 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลต กำลังขยาย 1,000X ได้แก่ ก) รูปท่อนอยู่เป็นคู่ ข) รูปท่อนต่อกันเป็นสาย ค) รูปกลมอยู่เป็นคู่ ง) รูปกึ่งกลมกึ่งท่อนอยู่เป็นคู่ จ) รูปกึ่งกลมกึ่งท่อนต่อกันเป็นสาย และ ฉ) รูปกึ่งกลมกึ่งท่อนอยู่เป็นคู่และกลุ่ม



ภาพที่ 14 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ที่คัดแยกได้บางไอโซเลต กำลังขยาย 400X ได้แก่ ก) รูปร่างรี ข) รูปร่างรี มีเส้นใยแบบมีผนังกัน ค) รูปร่างรี มีเส้นใยเทียม ง) รูปร่างกลม จ) รูปร่างยาว และ ฉ) รูปร่างไม่แน่นอน

4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิด

4.1.2.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 68 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดจำนวน 6 ชนิด ด้วยวิธี Agar slab พบว่า ให้ผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (ม.ม. ± SD)

ไอโซเลต	แบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิด							
	AH	AS	AV	EI	ET	SA		
Positive control	26.00±0.00	28.5±0.71	26.00±0.00	30.00±0.00	33.00±1.41	36.00±1.41		
Negative control	-	-	-	-	-	-		
CS1/1	7.00±0.00	7.00±0.00	-	-	-	-		
CS1/2	7.50±0.71	7.00±0.00	-	-	-	-		
CS1/3*	9.25±0.35	9.50±0.00	-	-	12.00±0.00	9.50±0.00		
CS1/6	7.00±0.00	7.00±0.00	-	-	-	-		
CS2/2*	7.67±0.58	8.50±0.00	-	-	8.00±0.71	8.00±0.71		
CS2/3	7.50±0.00	7.75±0.35	-	-	7.25±0.35	7.50±0.00		
CS2/4	7.75±0.35	8.00±1.41	-	-	-	7.25±0.35		
CS2/5*	10.25±0.35	12.75±0.35	7.00±0.00	-	8.00±0.00	10.00±0.00		
CE1/1*	8.00±0.00	8.75±0.35	-	-	8.00±0.00	8.25±0.35		

ไอโซลิต	แบคทีเรียก่อโรคในปลานิล							
	AH	AS	AV	EI	ET	SA		
CE1/2*	8.00±0.00	8.25±0.35	-	-	-	9.75±0.35		
ON1/1	6.75±0.35	7.75±0.35	-	-	8.00±0.00	-		
ON1/2	7.50±0.00	8.25±0.35	-	-	-	8.00±0.71		
ON1/3	8.00±0.00	8.00±0.00	-	-	7.00±0.00	-		
CC1/1	7.00±0.00	7.00±0.00	-	-	11.00±0.00	-		
CC1/3	-	-	-	-	8.00±0.00	-		
CC1/4	7.00±0.00	10.00±0.00	-	-	8.00±0.00	-		
CC1/5	7.00±0.00	10.00±0.00	-	-	10.00±0.00	-		
CC1/6	7.00±0.00	7.00±0.00	-	-	6.50±0.00	6.50 ±0.00		
AT1/1*	11.00±0.00	12.00±0.00	-	13.50±0.71	11.50±0.71	9.00±0.00		
AT1/2	11.00±0.00	11.25±0.35	-	-	-	-		
AT1/3	11.00±0.00	10.75±1.06	-	-	-	-		
AT1/4	11.00±0.00	11.50±0.00	-	-	-	-		
AT1/6	10.00±1.41	11.00±0.71	-	-	-	-		
AT1/7*	14.00±0.00	13.00±0.00	-	14.00±0.00	9.50±0.71	9.50±0.71		
AT1/8*	12.75±0.35	12.75±0.35	-	14.00±0.00	9.50±0.71	10.00±0.00		
AT1/9*	12.50±0.00	13.00±0.00	-	17.00±0.00	10.50±0.71	-		

ไอโซลิต	แบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิด							
	AH	AS	AV	EI	ET	SA		
AT1/10*	11.00±0.00	13.00±0.00	-	16.50±0.71	10.00±0.00	9.25±0.35		
AT1/12*	14.00±0.00	13.00±0.00	-	17.00±0.00	-	9.25±0.35		
AT2/1	10.00±0.00	10.00±0.00	-	-	-	-		
AT2/2*	11.50±0.00	11.00±0.00	-	14.50±0.71	-	-		
AT2/3*	12.50±0.00	10.00±0.00	-	14.00±0.00	-	-		
AT2/4*	9.75±0.35	9.00±0.00	-	13.00±0.00	-	-		
AT2/6	-	-	-	-	-	-		
AT2/7*	12.25±0.35	11.75±0.35	-	9.50±0.71	-	-		
AT2/8*	11.00±0.00	10.00±0.00	-	13.00±0.00	-	-		
AT2/9*	11.00±0.00	11.00±0.00	-	12.50±0.71	-	-		
AT2/11*	9.00±0.00	10.50±0.00	-	-	-	9.00±0.00		
AT2/12*	11.50±0.00	10.50±0.00	-	-	-	8.00±0.71		
AT2/13	9.75±0.35	9.00±0.00	-	-	-	-		
AT2/14	10.00±0.00	10.00±0.00	-	-	-	-		
AT3/3*	10.00±0.00	10.50±0.00	-	-	9.75±0.35	9.50±0.71		
AT3/4*	11.75±0.35	13.00±0.00	6.75±0.35	-	13.50±0.71	8.75±0.35		
AT3/5*	11.25±0.35	13.00±0.00	6.75±0.35	-	12.25±0.35	8.50±0.00		

ไอโซลิต	แบคทีเรียก่อโรคในปลานิล							
	AH	AS	AV	EI	ET	SA		
AT4/1*	13.00±0.00	12.25±1.06	-	-	-	8.00±0.00		
AT4/2*	11.25±0.35	11.00±0.00	-	-	-	9.50±0.00		
AT4/5*	9.50±0.71	10.00±0.00	-	11.00±0.00	9.00±0.00	8.00±0.00		
AT5/9*	12.00±0.00	10.50±0.71	-	-	11.50±0.00	8.50±0.71		
AT6/4	7.50±0.00	7.50±0.00	-	-	7.75±0.35	7.50±0.71		
AT7/1	10.00±0.00	11.50±0.00	-	-	-	7.00±0.00		
AT7/4*	11.50±0.71	10.00±0.00	-	-	-	8.50±0.71		
AT8/1*	11.25±0.35	9.50±0.00	-	16.00±0.00	9.75±0.35	7.50±0.71		
AT8/4	10.75±0.35	10.50±0.71	-	-	-	7.75±0.35		
AT8/5*	13.50±0.71	10.50±1.41	7.00±0.00	16.00±0.00	13.00±0.00	9.00±0.00		
AT8/7*	11.00±0.00	9.25±0.35	-	-	16.00±0.00	-		
AT9/1*	12.00±0.00	11.00±0.00	-	15.00±0.00	10.50±0.71	-		
AT9/2*	10.00±0.00	14.25±1.06	-	-	10.75±0.35	8.00±0.00		
AT9/4*	8.50±0.71	13.00±0.00	-	-	8.75±0.35	7.25±0.35		
AT9/5*	9.25±0.35	13.67±0.58	-	-	9.00±0.00	7.50±0.71		
AT9/7	11.00±0.00	13.00±1.41	-	-	-	-		
AT10/1*	11.75±0.35	15.00±0.00	-	-	10.00±0.00	-		

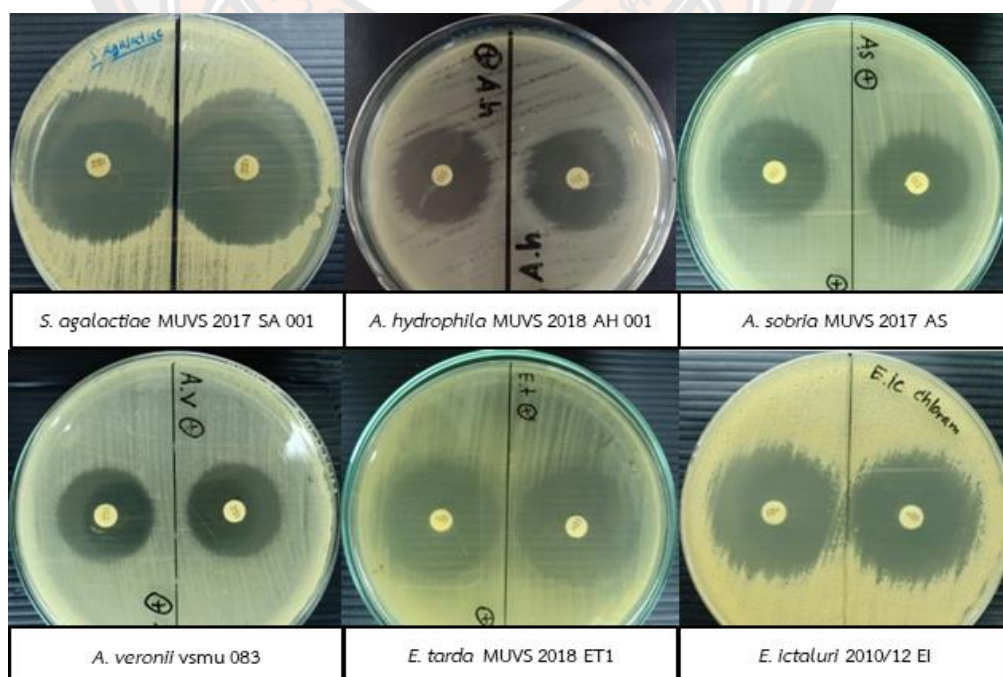
ไอโซเลต	แบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิด							
	AH	AS	AV	EI	ET	SA		
AT10/2*	11.50±0.00	10.75±1.06	-	-	8.75±0.35	6.50±0.00		
AT10/3*	11.00±0.00	10.50±1.41	-	-	11.50±0.71	8.00±0.00		
AT10/4*	12.25±0.35	10.50±0.00	-	-	10.00±0.00	7.25±0.35		
ATCU1*	9.50±0.71	14.00±0.00	-	-	7.00±0.00	8.00±0.00		
ATCU2	8.75±0.35	13.50±0.00	-	-	-	-		
M1/1	11.00±0.00	10.50±0.71	-	-	-	-		
M1/2	9.00±0.00	9.00±0.00	-	-	-	-		
M1/3	-	-	-	-	-	-		

หมายเหตุ: ตัวอักษร AH หมายถึง *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001, AS หมายถึง *A. sobria* MUVS 2017 AS, AV หมายถึง *A. veronii* vsmu 083, EI หมายถึง *E. ictaluri* 2010/12 EI, ET หมายถึง *E. tarda* MUVS 2018 ET1 และ SA หมายถึง *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001

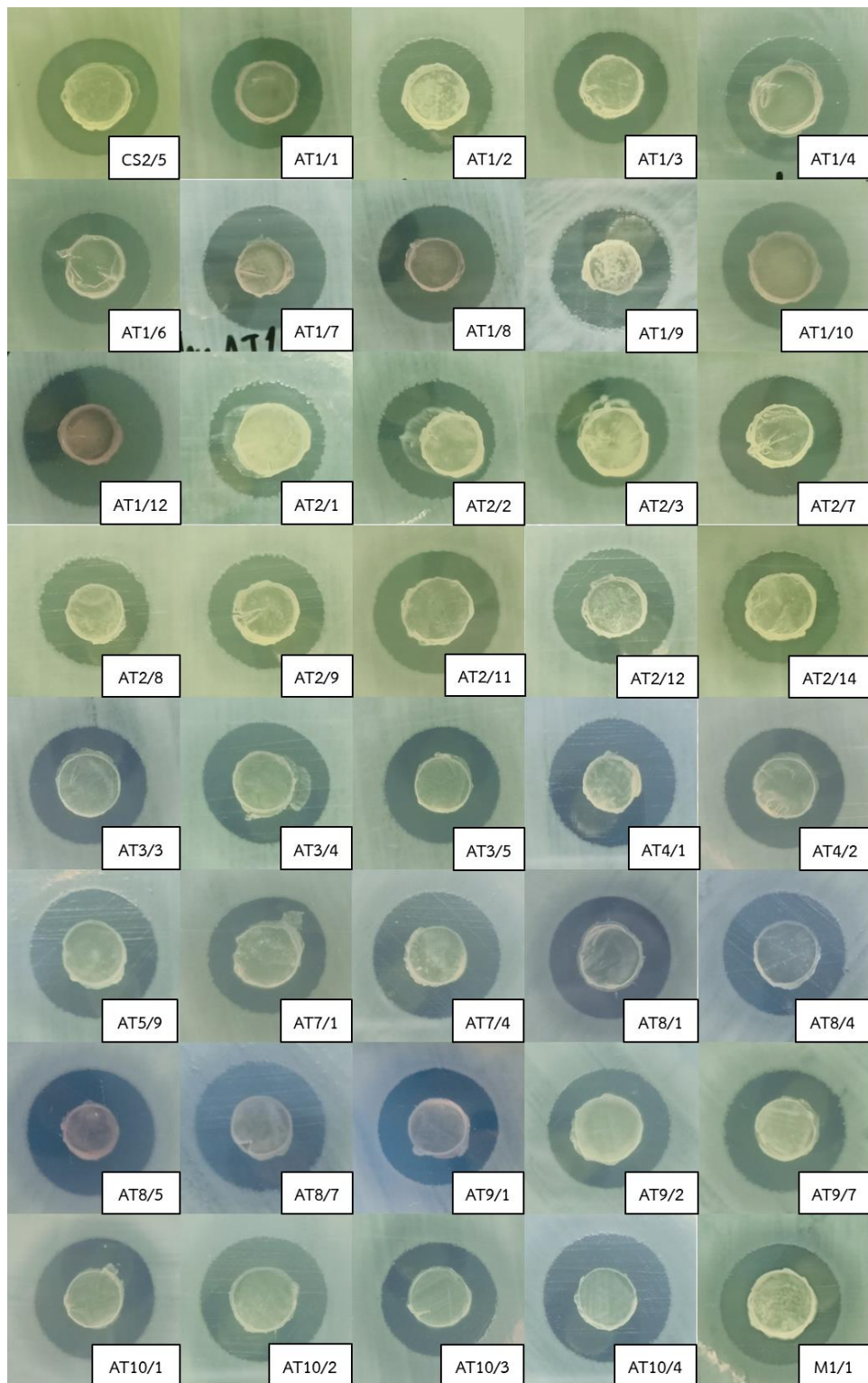
เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่เกิดบริเวณขั้ว

เครื่องหมาย * หมายถึง ไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์พรไปโอติกส์เบื้องต้น

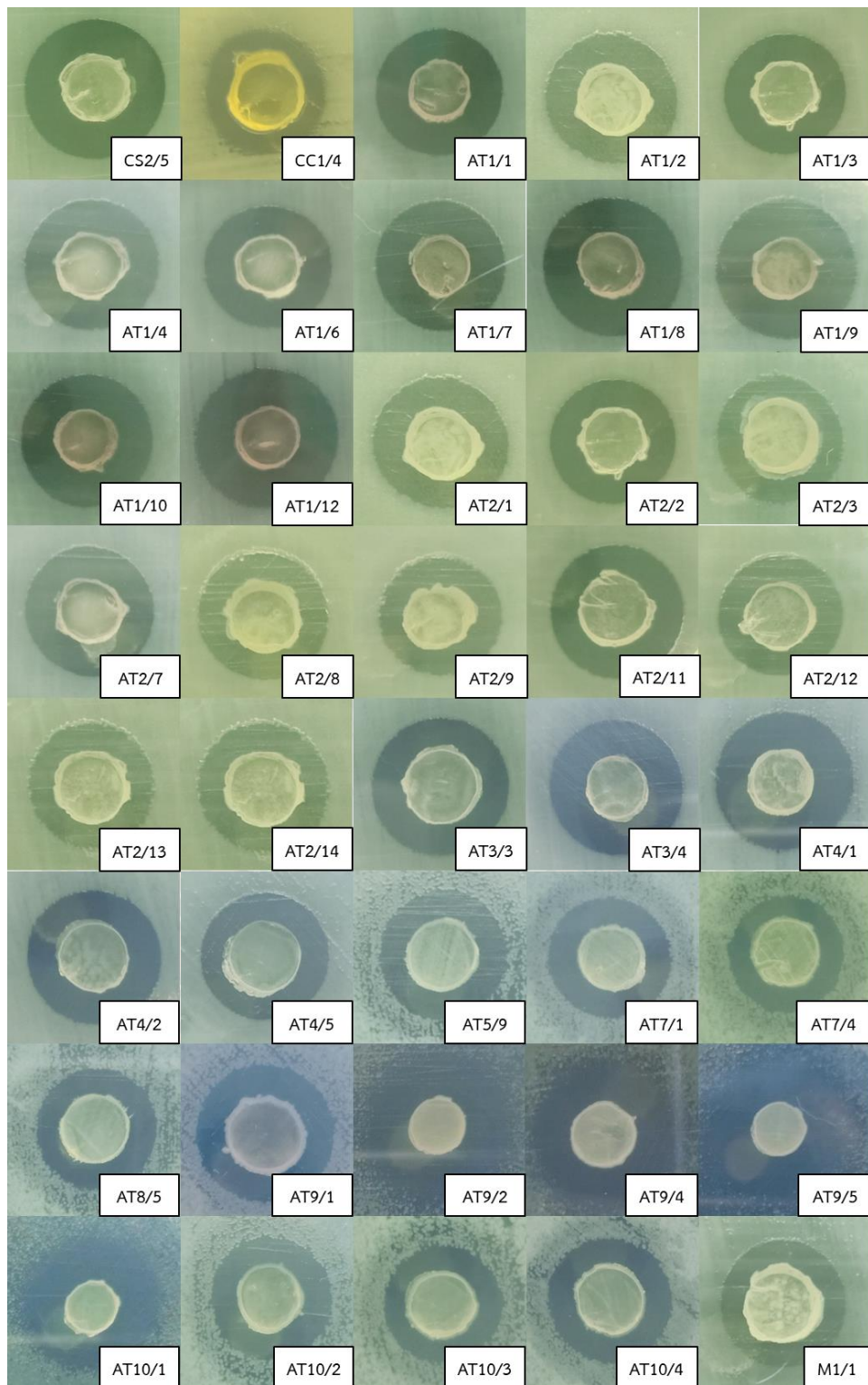
จากตารางที่ 10 พบว่า มีไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้ จำนวน 66 ไอโซเลต โดยมีไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้ 1 ชนิด มีจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ CC1/3 ยับยั้งได้ 2 ชนิด จำนวน 14 ไอโซเลต ได้แก่ CS1/1, CS1/2, CS1/6, AT1/2, AT1/3, AT1/4, AT1/6, AT2/1, AT2/13, AT2/14, AT9/7, ATCU2, M1/1 และ M1/2 ยับยั้งได้ 3 ชนิด จำนวน 23 ไอโซเลต ได้แก่ CS2/4, CE1/2, ON1/1, ON1/2, ON1/3, CC1/1, CC1/4, CC1/5, AT2/2, AT2/3, AT2/4, AT2/7, AT2/8, AT2/9, AT2/11, AT2/12, AT4/1, AT4/2, AT7/1, AT7/4, AT8/4, AT8/7 และ AT10/1 ยับยั้งได้ 4 ชนิด จำนวน 18 ไอโซเลต ได้แก่ CS1/3, CS2/2, CS2/3, CE1/1, CC1/6, AT1/9, AT1/12, AT3/3, AT5/9, AT6/4, AT9/1, AT9/2, AT9/4, AT9/5, AT10/2, AT10/3, AT10/4 และ ATCU1 ยับยั้งได้ 5 ชนิด จำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ CS2/5, AT1/1, AT1/7, AT1/8, AT1/10, AT3/4, AT3/5, AT4/5 และ AT8/1 ยับยั้งได้ทั้ง 6 ชนิด จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ AT8/5 และไม่สามารถยับยั้งได้ทั้ง 6 ชนิด จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ AT2/6 และ M1/3 และพบว่า มีไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001 ได้ จำนวน 65 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อ *A. sobria* MUVS 2017 AS ได้ จำนวน 65 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อ *A. veronii* vsmu 083 ได้ จำนวน 4 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อ *E. ictaluri* 2010/12 EI ได้ จำนวน 16 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อ *E. tarda* MUVS 2018 ET1 ได้ จำนวน 35 ไอโซเลต และยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 ได้ จำนวน 36 ไอโซเลต โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของชุดควบคุมบวกและไอโซเลตที่คัดแยกได้บางไอโซเลต แสดงดังภาพที่ 15-20



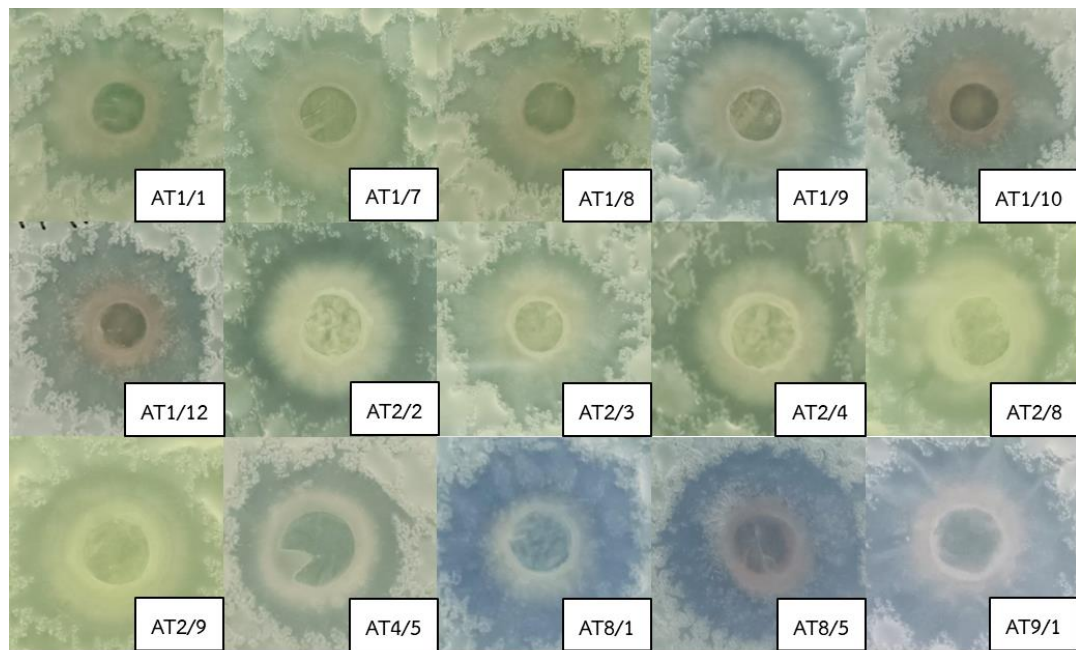
ภาพที่ 15 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของตัวควบคุมบวกต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล



ภาพที่ 16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001

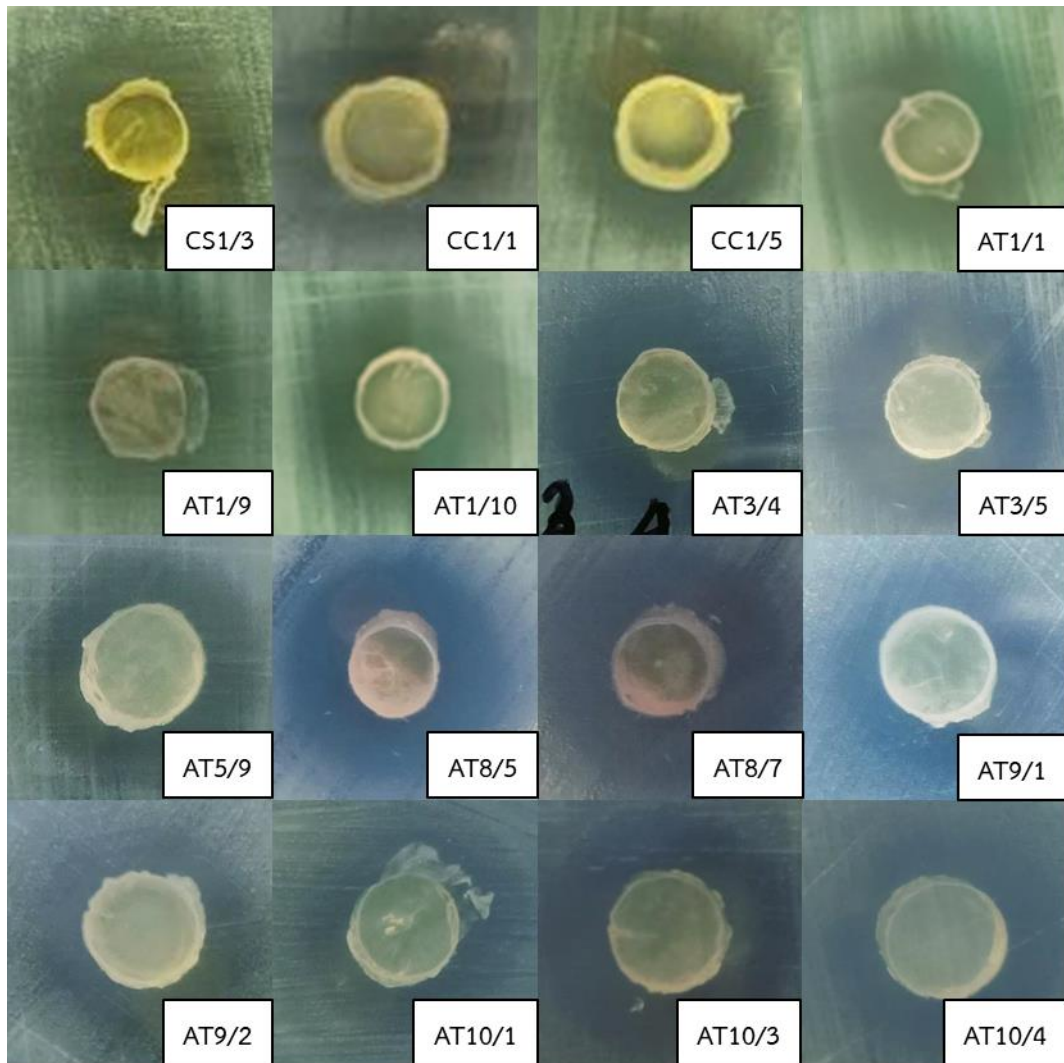


ภาพที่ 17 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ *A. sobria* MUVS 2017 AS

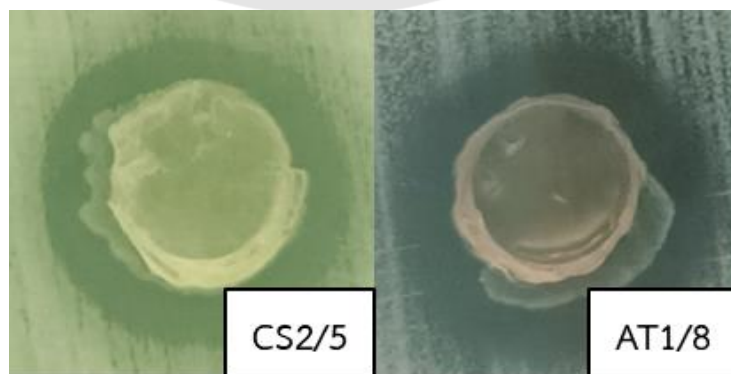


ภาพที่ 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ *E. ictaluri* 2010/12 EI





ภาพที่ 19 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ *E. tarda* MUVS 2018 ET1



ภาพที่ 20 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บางไอโซเลตต่อเชื้อ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001

ไอโซเลต	แบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิด					
	AH	AS	AV	EI	ET	SA
YON1/6	-	-	-	-	-	-
YON2/1	-	-	-	-	-	-
YON2/2*	-	-	-	10.25±0.35	-	-
YON2/3*	-	-	-	10.00±1.41	-	-
YON2/4	-	-	-	-	-	-
YON2/5*	-	-	-	9.00±0.00	-	-
YON2/6*	-	-	-	9.50±0.00	-	-
YON2/7	-	-	-	-	-	-
YON2/8	-	-	-	-	-	-
YON2/9	-	-	-	-	-	-
YON2/10	-	-	-	-	-	-
YON3/1	-	-	-	-	-	-
YON3/2*	-	-	-	7.00±0.00	-	7.00±0.00
YON3/3	-	-	-	-	-	-
YON3/4*	-	-	-	-	-	7.00±0.00
YON3/5*	-	-	-	-	-	7.00±0.00
YON3/6	-	-	-	-	-	-

ไอโซเลต	แบคทีเรียก่อโรคในปอด					
	AH	AS	AV	EI	ET	SA
YAT9/2	-	-	-	-	-	-
YAT9/3	-	-	-	-	-	-
YAT9/4	-	-	-	-	-	-
YAT9/5	-	-	-	-	-	-
YAT9/6	-	-	-	-	-	-
YAT9/7	-	-	-	-	-	-
YAT9/8	-	-	-	-	-	-
YAT9/9	-	-	-	-	-	-
YAT9/10	-	-	-	-	-	-
YAT9/11	-	-	-	-	-	-
YAT9/12	-	-	-	-	-	-
YAT9/13	-	-	-	-	-	-
YAT10/1	-	-	-	-	-	-
YAT10/2	-	-	-	-	-	-
YAT10/3	-	-	-	-	-	-
YAT10/5	-	-	-	-	-	-
YAT10/6	-	-	-	-	-	-

ไอโซเลต	แบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิด					
	AH	AS	AV	EI	ET	SA
YID23*	-	11.25±1.77	-	7.00±0.00	-	-

หมายเหตุ: ตัวอักษร AH หมายถึง *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001, AS หมายถึง *A. sobria* MUVS 2017 AS, AV หมายถึง *A. veronii* vsmu 083, EI

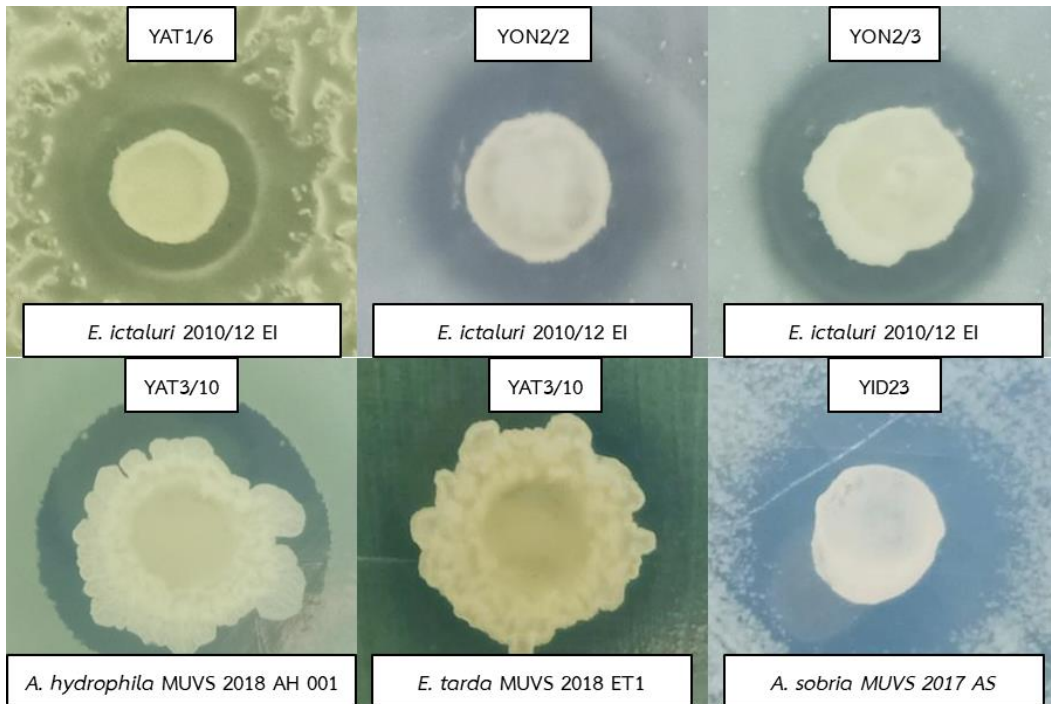
หมายถึง *E. ictaluri* 2010/12 EI, ET หมายถึง *E. tarda* MUVS 2018 ET1 และ SA หมายถึง *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001

เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่เกิดบริเวณนี้

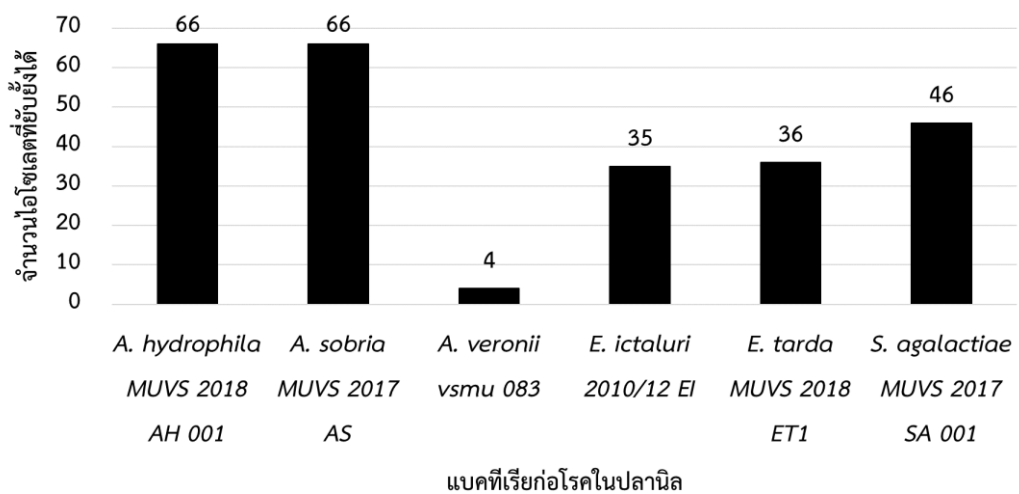
เครื่องหมาย * ไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์เบื้องต้น

จากตารางที่ 11 พบว่า มีไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้จำนวน 16 ไอโซเลต โดยมีไอโซเลตสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้ 1 ชนิด มีจำนวน 11 ไอโซเลต ได้แก่ YCS1/1, YCS1/2, YCS1/3, YCS1/4, YON2/2, YON2/3, YON2/5, YON2/6, YON3/4, YON3/5 และ YAT1/6 ยับยั้งได้ 2 ชนิด จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ YON3/2, YAT3/10, YAT8/2, YAT10/9 และ YID23 และไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้ทั้ง 6 ชนิด จำนวน 161 ไอโซเลต และพบว่า มีไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001 ได้จำนวน 1 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อ *A. sobria* MUVS 2017 AS ได้ จำนวน 1 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อ *E. ictaluri* 2010/12 EI ได้ จำนวน 19 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อ *E. tarda* MUVS 2018 ET1 ได้ จำนวน 1 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 ได้ จำนวน 10 ไอโซเลต และไม่มีไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. veronii* ได้ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของชุดควบคุมบวกและ ไอโซเลตที่คัดแยกได้บางไอโซเลต แสดงดังภาพที่ 21 (แสดงเฉพาะไอโซเลตที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 10 มม.)

เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิลของทั้งแบคทีเรียและยีสต์แล้ว พบว่ามีไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001 และ *A. sobria* MUVS 2017 AS มากที่สุด โดยมีเชื้อที่ยับยั้งได้จำนวน 66 ไอโซเลต รองลงมาคือ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001, *E. tarda* MUVS 2018 ET1 และ *E. ictaluri* 2010/12 EI โดยมีเชื้อที่ยับยั้งได้จำนวน 46, 36 และ 35 ไอโซเลต ตามลำดับ และส่วนเชื้อ *A. veronii* vsmu 083 ถูกยับยั้งได้น้อยที่สุด โดยมีเชื้อเพียง 4 ไอโซเลตที่ยับยั้งได้ ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 21 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของยีสต์ที่คัดแยกได้จากไอโซเลตต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล



ภาพที่ 22 แผนภูมิแท่งจำนวนไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิล

4.1.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรบิโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรบิโอติกส์เบื้องต้น จำนวน 55 ไอโซเลต โดยคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้อย่างน้อย 3 ชนิด และให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

บริเวณยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 8 มม. จำนวน 39 ไอโซเลต และยีสต์ทุกไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง
แบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดได้ จำนวน 16 ไอโซเลต



4.1.3.1 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีและความเข้มข้นสูง

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และมีคุณสมบัติที่ยังแบคทีเรียก่อโรคในปริมาณ 55 ไอโซเลต ซึ่งเป็นแบคทีเรีย 39 ไอโซเลต และยีสต์ 16 ไอโซเลตมาทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีและความเข้มข้นสูง พบว่า ให้ผลแสดงดังตารางที่ 12-15

ตารางที่ 12 ค่า OD₆₄₀ ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในสภาวะปกติ และมีเกลือน้ำดี มีความเข้มข้นสูง

ไอโซเลต	ค่า OD ₆₄₀ (±SD)					
	สภาวะปกติ (Control)		สภาวะที่มีเกลือน้ำดี		สภาวะที่มีความเข้มข้นสูง	
	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
CS1/3	1.863±0.017 ^A	3.230±0.085 ^a	0.389±0.004 ^B	1.423±0.173 ^b	0.131±0.006 ^C	0.098±0.000 ^C
CS2/2	1.237±0.142 ^A	2.996±0.225 ^a	0.057±0.035 ^B	0.907±0.096 ^b	0.101±0.004 ^C	0.110±0.001 ^C
CS2/5	1.676±0.000 ^A	1.905±1.905 ^a	0.404±0.059 ^B	1.945±0.191 ^a	0.094±0.001 ^C	0.075±0.003 ^C
CE1/1	1.508±0.032 ^A	2.994±0.025 ^a	0.452±0.001 ^B	1.385±0.064 ^b	0.136±0.041 ^C	0.120±0.046 ^C
CE1/2	1.565±0.057 ^A	2.652±0.085 ^a	0.426±0.055 ^B	1.020±0.042 ^b	0.090±0.015 ^C	0.074±0.015 ^C
AT1/1	1.688±0.023 ^A	2.245±0.120 ^a	0.388±0.006 ^B	0.740±0.049 ^b	0.077±0.003 ^C	0.050±0.005 ^C
AT1/7	1.618±0.048 ^A	2.070±0.028 ^a	0.352±0.018 ^B	0.690±0.057 ^b	0.077±0.006 ^C	0.052±0.003 ^C
AT1/8	1.560±0.017 ^A	2.130±0.042 ^a	0.300±0.018 ^B	0.663±0.060 ^b	0.090±0.002 ^C	0.060±0.003 ^C
AT1/9	1.858±0.093 ^A	5.605±0.148 ^a	0.192±0.091 ^B	2.688±0.605 ^b	0.100±0.003 ^B	0.121±0.004 ^C
AT1/10	1.624±0.011 ^A	2.190±0.057 ^a	0.291±0.055 ^B	0.553±0.039 ^b	0.081±0.001 ^C	0.054±0.002 ^C

ไอโซเลต	ค่า OD ₆₄₀ (±SD)							
	สถานะปกติ (Control)				สถานะที่มีความผิดปกติ			
	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
AT1/12	1.636±0.000 ^A	2.298±0.042 ^a	0.335±0.008 ^B	1.935±0.516 ^a	0.079±0.005 ^C	0.079±0.005 ^C	0.049±0.006 ^C	
AT2/2	3.330±0.064 ^A	6.282±0.501 ^a	0.312±0.003 ^B	4.245±0.177 ^b	0.160±0.001 ^C	0.160±0.001 ^C	0.140±0.003 ^C	
AT2/3	1.744±0.034 ^A	2.065±0.163 ^a	0.117±0.031 ^B	0.490±0.028 ^b	0.067±0.001 ^C	0.067±0.001 ^C	0.073±0.001 ^C	
AT2/4	2.350±0.028 ^A	6.378±0.178 ^a	0.144±0.064 ^B	2.403±0.598 ^b	0.111±0.001 ^B	0.111±0.001 ^B	0.120±0.021 ^C	
AT2/7	2.385±0.007 ^A	6.324±0.068 ^a	0.352±0.005 ^B	4.230±0.113 ^b	0.103±0.001 ^C	0.103±0.001 ^C	0.115±0.002 ^C	
AT2/8	1.788±0.124 ^A	5.718±0.535 ^a	0.458±0.017 ^B	3.265±0.870 ^b	0.143±0.021 ^C	0.143±0.021 ^C	0.127±0.003 ^C	
AT2/9	1.840±0.042 ^A	2.130±0.093 ^a	0.058±0.049 ^B	0.348±0.011 ^b	0.063±0.002 ^B	0.063±0.002 ^B	0.063±0.001 ^C	
AT2/11	1.878±0.053 ^A	2.015±0.035 ^a	0.344±0.047 ^B	1.303±0.039 ^b	0.066±0.001 ^C	0.066±0.001 ^C	0.066±0.046 ^C	
AT2/12	1.708±0.018 ^A	1.925±0.021 ^a	0.328±0.025 ^B	0.865±0.057 ^b	0.052±0.005 ^C	0.052±0.005 ^C	0.047±0.015 ^C	
AT3/3	1.413±0.004 ^A	2.016±0.204 ^a	0.315±0.008 ^B	0.518±0.018 ^b	0.066±0.047 ^C	0.066±0.047 ^C	0.064±0.046 ^C	
AT3/4	1.563±0.039 ^A	1.980±0.000 ^a	0.386±0.021 ^B	0.650±0.064 ^b	0.044±0.003 ^C	0.044±0.003 ^C	0.042±0.005 ^C	
AT3/5	1.545±0.035 ^A	2.064±0.170 ^a	0.367±0.039 ^B	0.680±0.184 ^b	0.030±0.011 ^C	0.030±0.011 ^C	0.026±0.013 ^C	
AT4/1	1.193±0.093 ^A	2.292±0.052 ^a	0.010±0.010 ^B	0.837±0.059 ^b	0.071±0.004 ^B	0.071±0.004 ^B	0.078±0.005 ^C	
AT4/2	1.553±0.032 ^A	2.058±0.008 ^a	0.388±0.030 ^B	0.700±0.141 ^b	0.051±0.013 ^C	0.051±0.013 ^C	0.048±0.016 ^C	
AT4/5	1.365±0.014 ^A	1.775±0.078 ^a	0.394±0.086 ^B	0.420±0.057 ^b	0.026±0.001 ^C	0.026±0.001 ^C	0.026±0.000 ^C	
AT5/9	1.353±0.011 ^A	1.770±0.042 ^a	0.426±0.077 ^B	0.490±0.113 ^b	0.045±0.049 ^C	0.045±0.049 ^C	0.044±0.051 ^C	

ไอโซเลต	ค่า OD ₆₄₀ (±SD)							
	สถานะปกติ (Control)				สถานะที่มีเกลือน้ำตาล			
	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
AT7/4	1.620±0.071 ^A	1.740±0.170 ^a	0.416±0.099 ^B	1.070±0.127 ^b	0.078±0.024 ^C	0.078±0.024 ^C	0.078±0.026 ^C	0.078±0.026 ^C
AT8/1	1.648±0.018 ^A	2.050±0.014 ^a	0.488±0.018 ^B	1.455±0.007 ^b	0.045±0.030 ^C	0.045±0.030 ^C	0.048±0.033 ^C	0.048±0.033 ^C
AT8/5	1.188±0.018 ^A	1.900±0.028 ^a	0.390±0.063 ^B	0.665±0.120 ^b	0.044±0.009 ^C	0.044±0.009 ^C	0.041±0.013 ^C	0.041±0.013 ^C
AT8/7	2.070±0.127 ^A	4.655±0.276 ^a	0.833±0.211 ^B	2.675±0.544 ^b	0.101±0.008 ^C	0.101±0.008 ^C	0.100±0.006 ^C	0.100±0.006 ^C
AT9/1	1.433±0.018 ^A	2.670±0.042 ^a	0.478±0.016 ^B	0.860±0.156 ^b	0.064±0.015 ^C	0.064±0.015 ^C	0.054±0.018 ^C	0.054±0.018 ^C
AT9/2	1.308±0.011 ^A	3.130±0.099 ^a	0.481±0.018 ^B	1.098±0.131 ^b	0.068±0.043 ^C	0.068±0.043 ^C	0.066±0.043 ^C	0.066±0.043 ^C
AT9/4	1.343±0.067 ^A	2.970±0.127 ^a	0.389±0.078 ^B	1.095±0.156 ^b	0.099±0.018 ^C	0.099±0.018 ^C	0.095±0.019 ^C	0.095±0.019 ^C
AT9/5	1.345±0.106 ^A	2.985±0.148 ^a	0.420±0.013 ^B	1.050±0.064 ^b	0.038±0.010 ^C	0.038±0.010 ^C	0.034±0.016 ^C	0.034±0.016 ^C
AT10/1	0.918±0.067 ^A	2.000±0.000 ^a	0.373±0.011 ^B	0.845±0.035 ^b	0.035±0.044 ^C	0.035±0.044 ^C	0.043±0.047 ^C	0.043±0.047 ^C
AT10/2	1.420±0.007 ^A	1.985±0.092 ^a	0.334±0.035 ^B	0.700±0.318 ^b	0.002±0.001 ^C	0.002±0.001 ^C	0.010±0.001 ^C	0.010±0.001 ^C
AT10/3	1.385±0.049 ^A	2.020±0.028 ^a	0.404±0.043 ^B	0.988±0.025 ^b	0.003±0.001 ^C	0.003±0.001 ^C	0.009±0.004 ^C	0.009±0.004 ^C
AT10/4	1.368±0.117 ^A	2.075±0.148 ^a	0.481±0.006 ^B	1.138±0.011 ^b	0.066±0.001 ^C	0.066±0.001 ^C	0.042±0.048 ^C	0.042±0.048 ^C

		ค่า OD ₆₄₀ (±SD)				
ไอโซเลต	สถานะปกติ (Control)		สถานะที่มีเกลือน้ำดี		สถานะที่มีความเป็นกรดสูง	
	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
ATCU1	1.403±0.012 ^A	5.432±0.278 ^a	0.564±0.177 ^B	3.377±0.214 ^b	0.127±0.018 ^C	0.138±0.017 ^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงการเปรียบเทียบค่า OD₆₄₀ ของเชื้อแต่ละไอโซเลตในสถานะที่มีเกลือน้ำดี สถานะที่มีความเป็นกรดสูง และสภาวะปกติ ที่เวลา 6 ชั่วโมง

ตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงการเปรียบเทียบค่า OD₆₄₀ ของเชื้อแต่ละไอโซเลตในสถานะที่มีเกลือน้ำดี สถานะที่มีความเป็นกรดสูง และสภาวะปกติ ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสตรัมแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 13 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในสภาวะปกติ มีเกลือน้ำดี และมีความเป็นกรดสูง

ไอโซ เลต	การเจริญของเชื้อ					
	สภาวะปกติ (Control)		สภาวะที่มีเกลือน้ำดี		สภาวะที่มีความเป็นกรดสูง	
	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
CS1/3	++	++	+	++	+	-
CS2/2	++	++	-	+	+	+
CS2/5	++	++	+	++	-	-
CE1/1	++	++	+	++	+	+
CE1/2	++	++	+	++	-	-
AT1/1	++	++	+	+	-	-
AT1/7	++	++	+	+	-	-
AT1/8	++	++	+	+	-	-
AT1/9	++	+++	+	++	+	+
AT1/10	++	++	+	+	-	-
AT1/12	++	++	+	++	-	-
AT2/2	++	+++	+	++	+	+
AT2/3	++	++	+	+	-	-
AT2/4	++	+++	+	++	+	+
AT2/7	++	+++	+	++	+	+
AT2/8	++	+++	+	++	+	+
AT2/9	++	++	-	+	-	-
AT2/11	++	++	+	++	-	-
AT2/12	++	++	+	+	-	-
AT3/3	++	++	+	+	-	-
AT3/4	++	++	+	+	-	-
AT3/5	++	++	+	+	-	-
AT4/1	++	++	-	+	-	-
AT4/2	++	++	+	+	-	-
AT4/5	++	++	+	+	-	-
AT5/9	++	++	+	+	-	-

ไอโซ เลต	การเจริญของเชื้อ					
	สภาวะปกติ (Control)		สภาวะที่มีเกลือน้ำดี		สภาวะที่มีความเป็นกรดสูง	
	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
AT7/4	++	++	+	++	-	-
AT8/1	++	++	+	++	-	-
AT8/5	++	++	+	+	-	-
AT8/7	++	++	+	++	+	+
AT9/1	++	++	+	+	-	-
AT9/2	++	++	+	++	-	-
AT9/4	++	++	+	++	-	-
AT9/5	++	++	+	++	-	-
AT10/1	+	++	+	+	-	-
AT10/2	++	++	+	+	-	-
AT10/3	++	++	+	+	-	-
AT10/4	++	++	+	++	-	-
ATCU1	++	+++	+	++	+	+

ตารางที่ 14 ค่า OD₆₄₀ ของยีสต์ที่คัดแยกได้ในสภาวะปกติและมีเกลือน้ำดี

ไอโซเลต	OD ₆₄₀ (±SD)			
	สภาวะปกติ (Control)		สภาวะที่มีเกลือน้ำดี	
	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
YCS1/1	0.390±0.031 ^A	2.898±0.008 ^a	0.211±0.030 ^B	5.548±0.111 ^b
YCS1/2	0.434±0.047 ^A	3.148±0.466 ^a	0.204±0.049 ^B	4.674±0.042 ^b
YCS1/3	0.391±0.026 ^A	2.736±0.156 ^a	0.362±0.046 ^A	6.204±0.255 ^b
YCS1/4	0.407±0.055 ^A	4.876±0.175 ^a	0.316±0.079 ^A	5.112±0.295 ^a
YON2/2	1.282±0.046 ^A	5.795±0.294 ^a	1.278±0.124 ^A	4.458±0.280 ^b
YON2/3	1.250±0.075 ^A	5.104±0.191 ^a	1.228±0.096 ^A	3.120±0.300 ^b
YON2/5	1.174±0.116 ^A	5.700±0.339 ^a	1.334±0.177 ^A	3.644±0.155 ^b
YON2/6	1.130±0.315 ^A	5.220±0.329 ^a	1.213±0.080 ^A	3.488±0.030 ^b
YON3/2	1.493±0.128 ^A	4.904±0.336 ^a	0.942±0.031 ^B	5.028±0.468 ^a
YON3/4	1.237±0.151 ^A	4.452±0.000 ^a	0.888±0.036 ^B	5.070±0.399 ^b
YON3/5	1.190±0.119 ^A	4.800±0.034 ^a	0.475±0.067 ^B	4.860±0.424 ^a
YAT1/6	0.710±0.033 ^A	6.252±0.032 ^a	0.345±0.042 ^B	6.640±0.161 ^b
YAT8/2	0.950±0.150 ^A	2.748±0.134 ^a	0.439±0.064 ^B	4.584±0.170 ^b
YAT10/8	0.928±0.013 ^A	2.520±0.435 ^a	0.925±0.069 ^A	4.428±0.468 ^b
YAT10/9	1.093±0.033 ^A	2.826±0.008 ^a	0.993±0.073 ^A	4.340±0.066 ^b
YID23	0.078±0.053 ^A	1.962±0.008 ^a	0.071±0.098 ^A	3.060±0.478 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงการเปรียบเทียบค่า OD₆₄₀ ของเชื้อแต่ละไอโซเลตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีและสภาวะปกติ ที่เวลา 6 ชั่วโมง

ตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงการเปรียบเทียบค่า OD₆₄₀ ของเชื้อแต่ละไอโซเลตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีและสภาวะปกติ ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 15 การเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้ในสภาวะปกติและมีเกลือน้ำดี

ไอโซเลต	การเจริญของเชื้อ			
	สภาวะปกติ (Control)		สภาวะที่มีเกลือน้ำดี	
	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
YCS1/1	+	++	+	+++
YCS1/2	+	++	+	++
YCS1/3	+	++	+	+++
YCS1/4	+	++	+	+++
YON2/2	++	+++	++	++
YON2/3	++	+++	++	++
YON2/5	++	+++	++	++
YON2/6	++	+++	++	++
YON3/2	++	++	+	+++
YON3/4	++	++	+	+++
YON3/5	++	++	+	++
YAT1/6	+	+++	+	+++
YAT8/2	+	++	+	++
YAT10/8	+	++	+	++
YAT10/9	++	++	+	++
YID23	-	++	-	++

จากตารางที่ 12-15 พบว่า เมื่อบ่มแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตครบ 24 ชั่วโมง มีเชื้อที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีความเป็นกรดกรดสูงได้น้อย (+) จำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ CS2/2, CE1/1, AT1/9, AT2/2, AT2/4, AT2/7, AT2/8, AT8/7 และ ATCU1 ส่วนการเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีนั้นพบว่า มีเชื้อที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีได้น้อย (+) จำนวน 20 ไอโซเลต ได้แก่ CS2/2, AT1/1, AT1/7, AT1/8, AT1/10, AT2/3, AT2/9, AT2/12, AT3/3, AT3/4, AT3/5, AT4/1, AT4/2, AT4/5, AT5/9, AT8/5, AT9/1, AT10/1, AT10/2 และ AT10/3 มีเชื้อที่เจริญได้ปานกลาง (++) จำนวน 19 ไอโซเลต ได้แก่ CS1/3, CS2/5, CE1/1, CE1/2, AT1/9, AT1/12, AT2/2, AT2/4, AT2/7, AT2/8, AT2/11, AT7/4, AT8/1, AT8/7, AT9/2, AT9/4, AT9/5, AT10/4 และ ATCU1

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ค่า OD₆₄₀ ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในสถานะที่มีความเป็นกรดสูงและมีเกลือแร่ที่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า OD₆₄₀ ของไอโซเลต CS2/5 และ AT1/12 ในสถานะที่มีเกลือแร่ที่เวลา 24 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ยีสต์ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ในสถานะที่มีเกลือแร่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยมีเชื้อที่สามารถเจริญได้ปานกลาง (++) จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ YCS1/2, YON2/2, YON2/3, YON2/5, YON2/6, YAT3/5, YAT8/2, AT10/8, AT10/9 และ YID23 มีเชื้อที่เจริญได้ดี (++++) จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ YCS1/1, YCS1/3, YCS1/4, YON3/2, YON3/4 และ YAT1/6

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง มียีสต์ที่สามารถเจริญได้โดยให้ค่า OD₆₄₀ ที่ไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ YCS1/4, YON3/2, YON3/5 และ YID23 นอกจากนี้ยังพบว่า มีเชื้อที่มีค่า OD₆₄₀ มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ YCS1/1, YCS1/2, YCS1/3, YAT8/2, YAT10/8 และ YAT10/9

4.1.3.2 การทดสอบการยึดเกาะพื้นผิว

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และมีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาในจำนวน 55 ไอโซเลต มาทดสอบการยึดเกาะพื้นผิว โดยวัดค่า Abs₅₉₀ ของสีกريسตัลที่ถูกชะออกจากเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่ที่ผนังหลอดทดลองด้วยสารละลาย 95% (v/v) เอทานอล เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้ ให้ผลแสดงดังตารางที่ 16-17

ตารางที่ 16 ค่า Abs₅₉₀ และปริมาณการยึดเกาะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ค่า Abs ₅₉₀ (±SD)	ปริมาณการยึดเกาะ
ชุดควบคุม	0.023±0.006	-
CS1/3	0.174±0.029	+
CS2/2	0.233±0.120	+
CS2/5	0.300±0.036	+
CE1/1	0.512±0.057	++
CE1/2	0.841±0.021	++
AT1/1	0.349±0.093	+
AT1/7	0.291±0.003	+
AT1/8	0.345±0.032	+

ไอโซเลต	ค่า Abs ₅₉₀ (±SD)	ปริมาณการยึดเกาะ
AT1/9	0.179±0.033	+
AT1/10	0.196±0.041	+
AT1/12	0.273±0.016	+
AT2/2	0.206±0.011	+
AT2/3	0.324±0.005	+
AT2/4	0.313±0.031	+
AT2/7	0.364±0.081	+
AT2/8	0.239±0.086	+
AT2/9	0.314±0.025	+
AT2/11	0.715±0.105	++
AT2/12	0.296±0.055	+
AT3/3	0.311±0.083	+
AT3/4	0.127±0.005	+
AT3/5	0.191±0.056	+
AT4/1	0.229±0.075	+
AT4/2	0.123±0.006	+
AT4/5	0.269±0.053	++
AT5/9	0.964±0.042	++
AT7/4	0.947±0.062	++
AT8/1	0.526±0.081	++
AT8/5	0.354±0.088	+
AT8/7	0.216±0.040	+
AT9/1	0.364±0.054	+
AT9/2	0.348±0.057	+
AT9/4	0.319±0.013	+
AT9/5	0.374±0.070	+
AT10/1	0.656±0.085	++
AT10/2	0.221±0.017	+
AT10/3	0.262±0.078	+

ไอโซเลต	ค่า Abs ₅₉₀ (±SD)	ปริมาณการยึดเกาะ
AT10/4	0.251±0.036	+
ATCU1	0.196±0.037	+

ตารางที่ 17 ค่า Abs₅₉₀ และปริมาณการยึดเกาะของยีสต์ที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ค่า Abs ₅₉₀ (±SD)	ปริมาณการยึดเกาะ
ชุดควบคุม	0.099±0.025	-
YCS1/1	1.309±0.028	+++
YCS1/2	0.933±0.035	+++
YCS1/3	1.155±0.035	+++
YCS1/4	0.898±0.105	++
YON2/2	0.752±0.039	++
YON2/3	0.350±0.098	+
YON2/5	0.305±0.048	+
YON2/6	0.338±0.080	+
YON3/2	0.215±0.063	+
YON3/4	0.199±0.067	+
YON3/5	0.253±0.076	+
YAT1/6	0.210±0.037	+
YAT8/2	0.342±0.065	+
YAT10/8	0.314±0.016	+
YAT10/9	0.374±0.008	+
YID23	0.676±0.023	++

จากตารางที่ 16 และ 17 พบว่า มีไอโซเลตที่มีการยึดเกาะได้มากจำนวน 3 ไอโซเลต โดยเป็นยีสต์ทั้งหมด ได้แก่ YCS1/1, YCS1/2 และ YCS1/3 ยึดเกาะได้ปานกลางจำนวน 11 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ CE1/1, CE1/2, AT2/11, AT4/5, AT5/9, AT7/4, AT8/1 และ AT10/1 เป็นยีสต์จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ YCS1/4, YON2/2 และ YID23 ยึดเกาะได้น้อยจำนวน 41 ไอโซเลต

4.1.3.3 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CRA

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และมีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดจำนวน 55 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CRA โดยดูลักษณะโคโลนีและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ โคโลนี พบว่า หากมีการสร้างไบโอฟิล์มโคโลนีจะมีสีดำ อาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีดำ และหากไม่มีการสร้างไบโอฟิล์มโคโลนีและอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีจะมีสีแดง แสดงดังตารางที่ 18-19 และภาพที่ 23

ตารางที่ 18 ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	สีของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนี	การสร้างไบโอฟิล์ม
CS1/3	โคโลนีใส	สีแดง	-
CS2/2	โคโลนีใส	สีแดง	-
CS2/5	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
CE1/1	โคโลนีใส	สีแดง	-
CE1/2	โคโลนีใส	สีแดง	-
AT1/1	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT1/7	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT1/8	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT1/9	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+
AT1/10	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT1/12	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT2/2	โคโลนีสีดำ	สีแดง	+
AT2/3	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT2/4	โคโลนีสีดำ	สีแดง	+
AT2/7	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+
AT2/8	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+
AT2/9	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT2/11	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT2/12	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีแดง	+
AT3/3	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	สีของอาหารเลี้ยงเชื้อ รอบโคโลนี	การสร้างไบโอฟิล์ม
AT3/4	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT4/1	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT4/2	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT4/5	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT5/9	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT7/4	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT8/1	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+
AT8/5	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+
AT8/7	โคโลนีใส	สีแดง	-
AT9/1	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+
AT9/2	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+
AT9/4	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+
AT9/5	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+
AT10/1	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT10/2	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT10/3	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
AT10/4	โคโลนีสีดำ มีเมือก	สีดำ	+
ATCU1	โคโลนีสีดำ	สีดำ	+

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + หมายถึง มีการสร้างไบโอฟิล์ม

เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่มีการสร้างไบโอฟิล์ม

ตารางที่ 19 ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของยีสต์ที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	สีของอาหารเลี้ยงเชื้อ รอบโคโลนี	การสร้างไบโอฟิล์ม
YCS1/1	โคโลนีสีชมพู	สีแดง	-
YCS1/2	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YCS1/3	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YCS1/4	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YON2/2	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YON2/3	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YON2/5	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YON2/6	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YON3/2	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YON3/4	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YON3/5	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YAT1/6	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YAT8/2	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YAT10/8	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YAT10/9	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-
YID23	โคโลนีสีแดง	สีแดง	-

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + หมายถึง มีการสร้างไบโอฟิล์ม

เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่มีการสร้างไบโอฟิล์ม

จากตารางที่ 18 และ 19 พบว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มจำนวน 34 ไอโซเลต จากแบคทีเรียทั้งหมด 39 ไอโซเลต คือ CS2/5, AT1/1, AT1/7, AT1/8, AT1/9, AT1/10, AT1/12, AT2/2, AT2/3, AT2/4, AT2/7, AT2/8, AT2/9, AT2/11, AT2/12, AT3/3, AT3/4, AT4/1, AT4/2, AT4/5, AT5/9, AT7/4, AT8/1, AT8/5, AT9/1, AT9/2, AT9/4, AT9/5, AT10/1, AT10/2, AT10/3, AT10/4 และ ATCU1 และพบว่า ยีสต์ทุกไอโซเลตไม่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม



ภาพที่ 23 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red agar ของเชื้อที่สร้างไบโอฟิล์ม (ซ้าย) และไม่สร้างไบโอฟิล์ม (ขวา)

จากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อทั้ง 55 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีประสิทธิภาพในด้านต่างๆ แตกต่างกันอย่างออกไป และพบว่าเชื้อบางไอโซเลตมีคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์เบื้องต้นหลายคุณสมบัติควบคู่กัน จึงคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์จำนวน 7 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต และยีสต์ 4 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลอง และระบุชนิดด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาต่อไป

แบคทีเรีย 3 ไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกได้แก่ AT8/5 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิลที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ ทนต่อเกลือน้ำดี ในระดับ + และมีการยึดเกาะในระดับ + CS1/3 และ CE1/1 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิลได้ 4 ชนิด โดยเฉพาะเชื้อ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 ที่มีความรุนแรงและความชุกในการระบาดในประเทศไทยเป็นอย่างมาก มีความทนทานต่อความเป็นกรดในระดับ + และเกลือน้ำดีในระดับ ++ และมีการยึดเกาะในระดับ + และ ++ ตามลำดับ สำหรับยีสต์ 4 ไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกได้แก่ YON3/2 และ YID23 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิลได้ 2 ชนิด สามารถทนต่อความเป็นกรดและเกลือน้ำดีในระดับ +++ และ ++ ตามลำดับ และมีการยึดเกาะในระดับ +++ และ ++ ตามลำดับ YCS1/1 และ YCS1/3 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ได้ ทนต่อความเป็นกรดและเกลือน้ำดีในระดับ +++ และมีการยึดเกาะในระดับ +++ โดยคุณสมบัติโพรบิโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดเลือกแสดงดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 คุณสมบัติความเป็นโพโรไบโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดเลือก

ไอโซเลต	แบคทีเรีย			ยีสต์			
	CS1/3	CE1/1	AT8/5	YCS1/1	YCS1/3	YON3/2	YID23
จากตัวอย่างปลา	CS	CE	AT	CS	CS	ON	AT
การยับยั้งเชื้อก่อ โรคในปลานิล	AH	✓	✓	✓	-	-	-
	AS	✓	✓	✓	-	-	✓
	AV	-	-	✓	-	-	-
	EI	-	-	✓	-	-	✓
	ET	✓	✓	✓	-	-	-
	SA	✓	✓	✓	✓	✓	✓
การทนกรด	6 h	+	+	-	+++	+++	+++
	24 h	-	+	-	+++	+++	+++
การทนเกลือ น้ำดี	6 h	+	+	+	+	+	-
	24 h	++	++	+	+++	+++	+++
การยึดเกาะ	+	++	+	+++	+++	+++	++
การสร้าง ไบโอฟิล์ม	-	-	✓	-	-	-	-

หมายเหตุ: ตัวอักษร AH หมายถึง *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001, AS หมายถึง *A. sobria* MUVS 2017 AS, AV หมายถึง *A. veronii* vsmu 083, EI หมายถึง *E. ictaluri* 2010/12 EI, ET หมายถึง *E. tarda* MUVS 2018 ET1, SA หมายถึง *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001, CS หมายถึง ปลาช่อน, CE หมายถึง ปลาตะโกก, AT หมายถึง ปลาหมอ และ ON หมายถึง ปลานิล

4.1.4 การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลอง

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อที่ได้ทำการคัดเลือกทั้ง 7 ไอโซเลต ในการมีชีวิตรอดเมื่อผ่านสารละลายกระเพาะอาหารและลำไส้สังเคราะห์ สามารถนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและคำนวณอัตราการรอดชีวิตได้ผลแสดงดังตารางที่ 21 และภาพที่ 24-31

จากตารางที่ 21 และภาพที่ 23-30 พบว่า มีเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลต ที่รอดชีวิตในสภาวะดังกล่าว ได้แก่ YON3/2, YCS1/1, YCS1/3, YID23 และ AT8/5 โดยมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 108.07, 107.19, 104.65, 101.59 และ 76.07% ตามลำดับ และพบว่า CS1/3 และ CE1/1

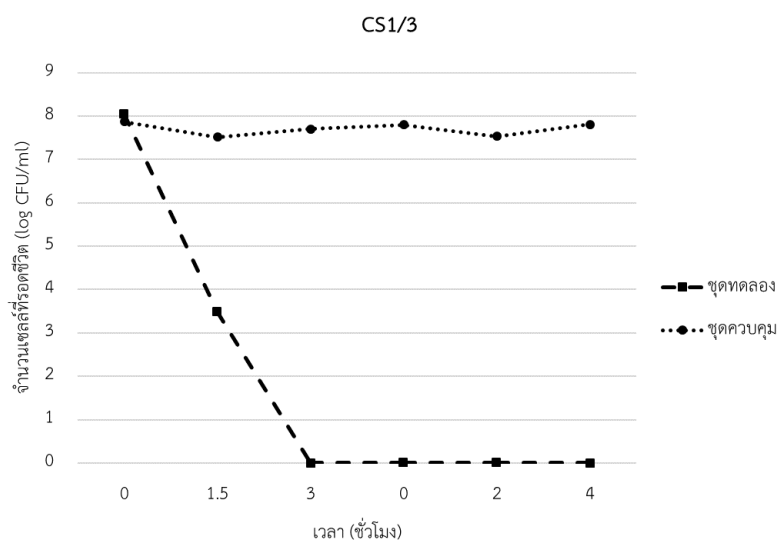
ไม่สามารถมีชีวิตรอดในสภาวะดังกล่าวได้ จะเห็นได้ว่าจำนวนเชื้อลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อสัมผัสกับสารละลายกระเพาะอาหารสังเคราะห์ โดย CS1/3 มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 43.28% ส่วน CE1/1 มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 54.59% เมื่อสัมผัสกับสารละลายกระเพาะอาหารสังเคราะห์นาน 1.5 ชั่วโมง และไม่สามารถมีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับสารละลายดังกล่าวนานเกินกว่า 1.5 ชั่วโมง



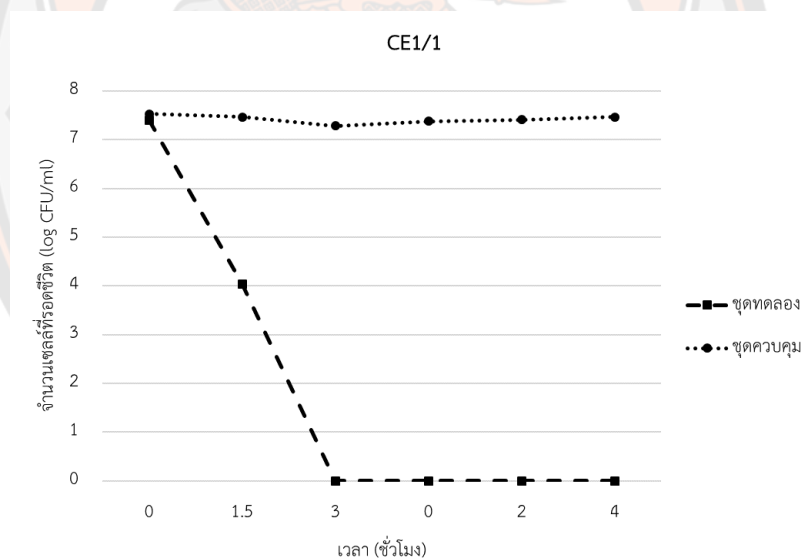
ตารางที่ 21 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและอัตราการรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง

ไอโซเลต	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (Log CFU/ml)							อัตราการรอดชีวิต (%)
	สภาวะกระเพาะอาหารจำลอง				สภาวะลำไส้จำลอง			
	0 ชั่วโมง	1.5 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง		
CS1/3	ชุดควบคุม	7.87	7.52	7.70	7.80	7.54	7.81	99.24
	ชุดทดลอง	8.04	3.48	0.00	0.00	0.00	0.00	43.28*
CE1/1	ชุดควบคุม	7.53	7.46	7.28	7.38	7.41	7.46	99.07
	ชุดทดลอง	7.40	4.04	0.00	0.00	0.00	0.00	54.59*
AT8/5	ชุดควบคุม	7.34	7.45	7.32	7.28	7.18	7.26	98.91
	ชุดทดลอง	7.23	7.04	5.36	5.40	5.53	5.50	76.07
YCS1/1	ชุดควบคุม	6.53	6.26	5.79	5.43	6.15	5.89	90.20
	ชุดทดลอง	6.26	6.11	5.72	6.08	6.66	6.71	107.19
YCS1/3	ชุดควบคุม	6.54	6.72	6.49	6.67	6.58	6.46	98.78
	ชุดทดลอง	6.66	6.79	6.74	6.76	6.83	6.97	104.65
YON3/2	ชุดควบคุม	6.04	5.36	4.62	5.34	5.20	5.08	84.11
	ชุดทดลอง	5.95	4.40	4.23	5.90	6.08	6.43	108.07
YID23	ชุดควบคุม	6.83	6.26	6.32	6.23	6.36	6.52	95.46
	ชุดทดลอง	6.28	6.23	6.34	6.30	6.43	6.38	101.59

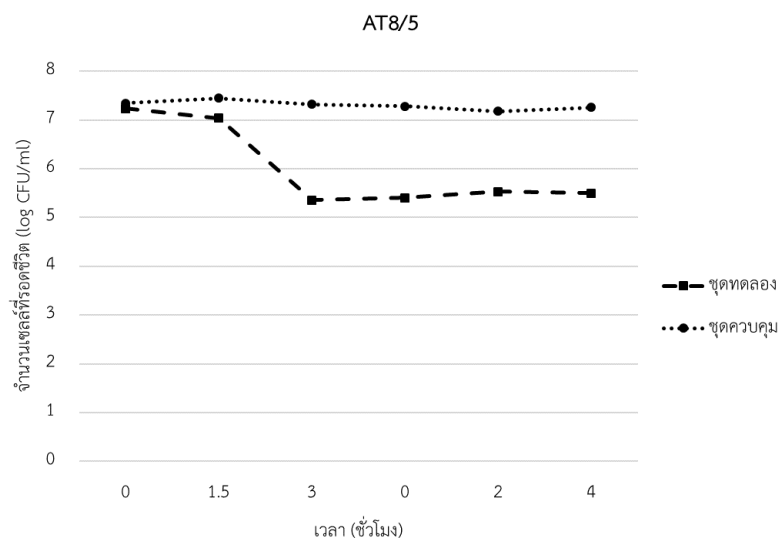
หมายเหตุ: เครื่องหมาย * แสดงอัตราการรอดชีวิตที่เวลา 1.5 ชั่วโมงในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง



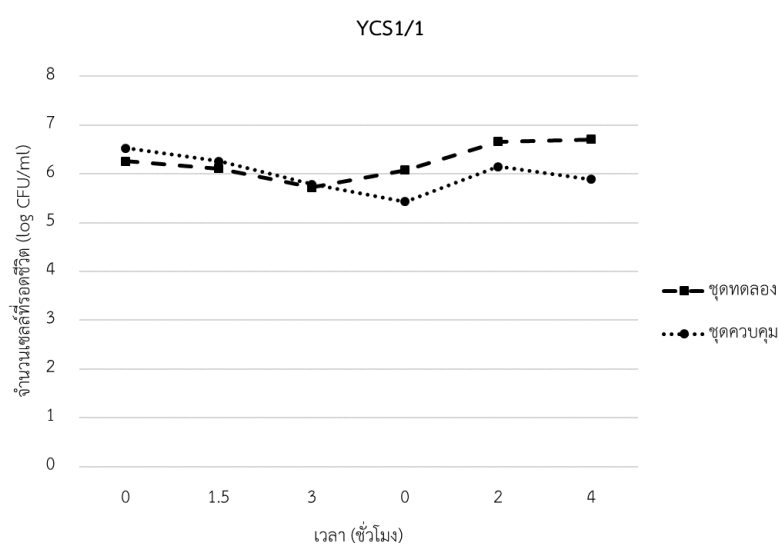
ภาพที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต CS1/3 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง



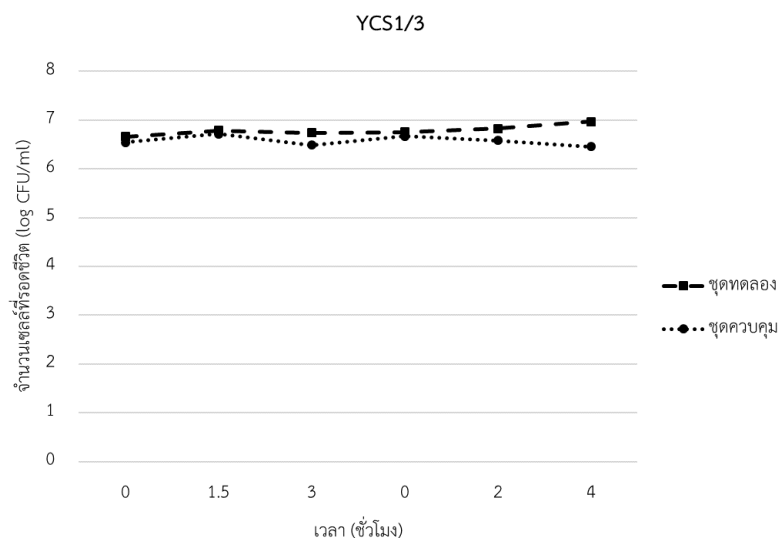
ภาพที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต CE1/1 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง



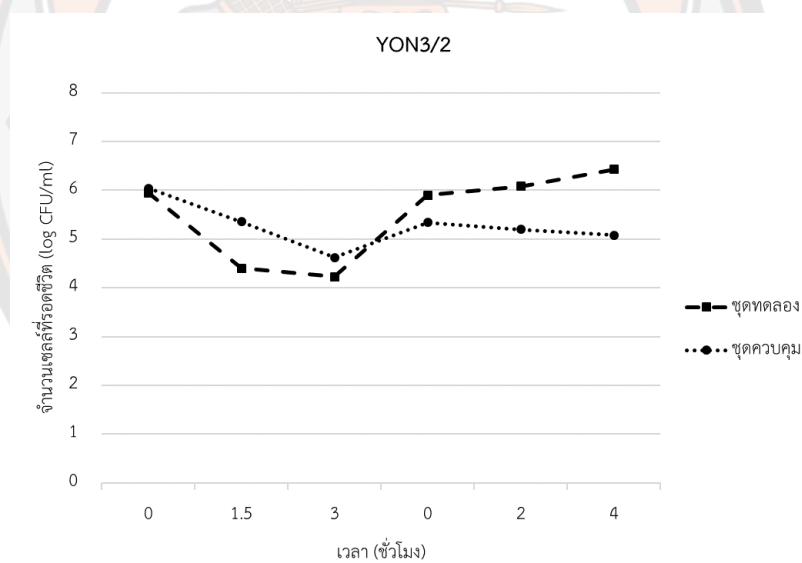
ภาพที่ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต AT8/5 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง



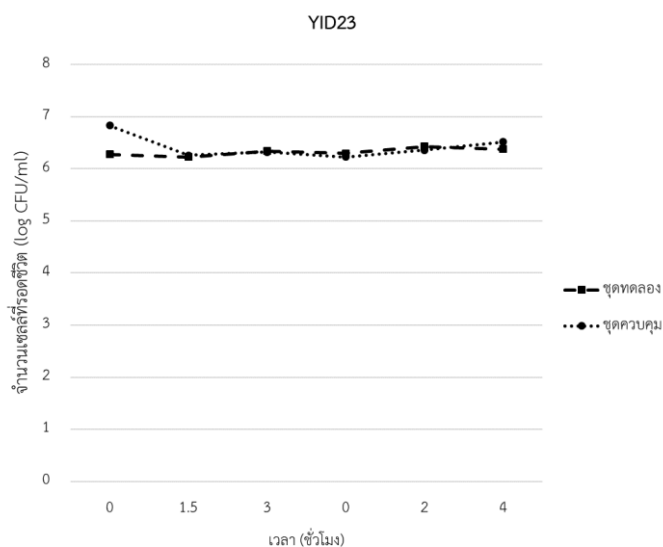
ภาพที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต YCS1/1 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง



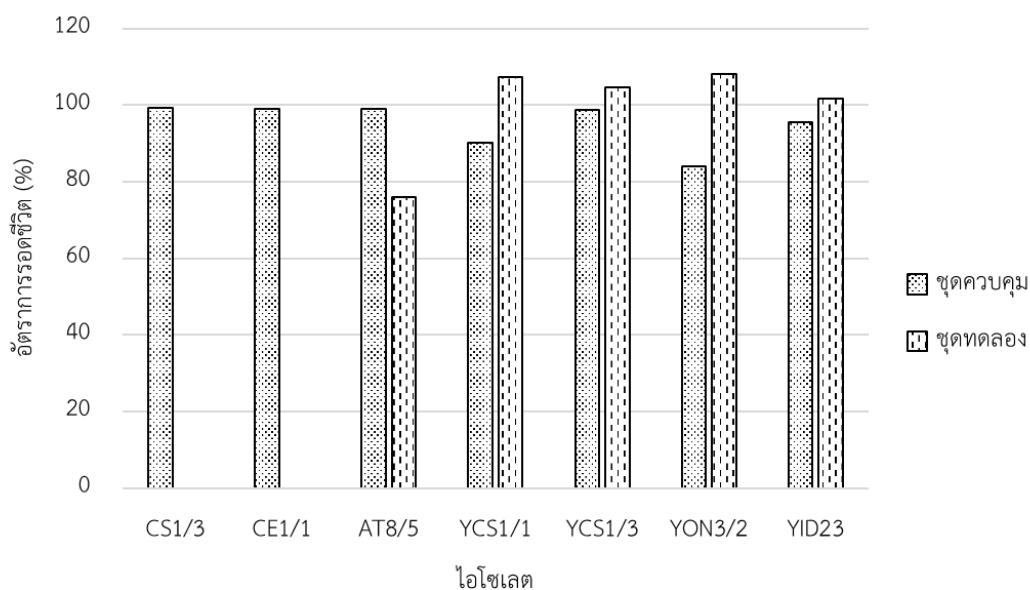
ภาพที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต YCS1/3 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง



ภาพที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต YON3/2 กับเวลาในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง



ภาพที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของไอโซเลต YID23 กับเวลาในสถานะทางเดินอาหารจำลอง

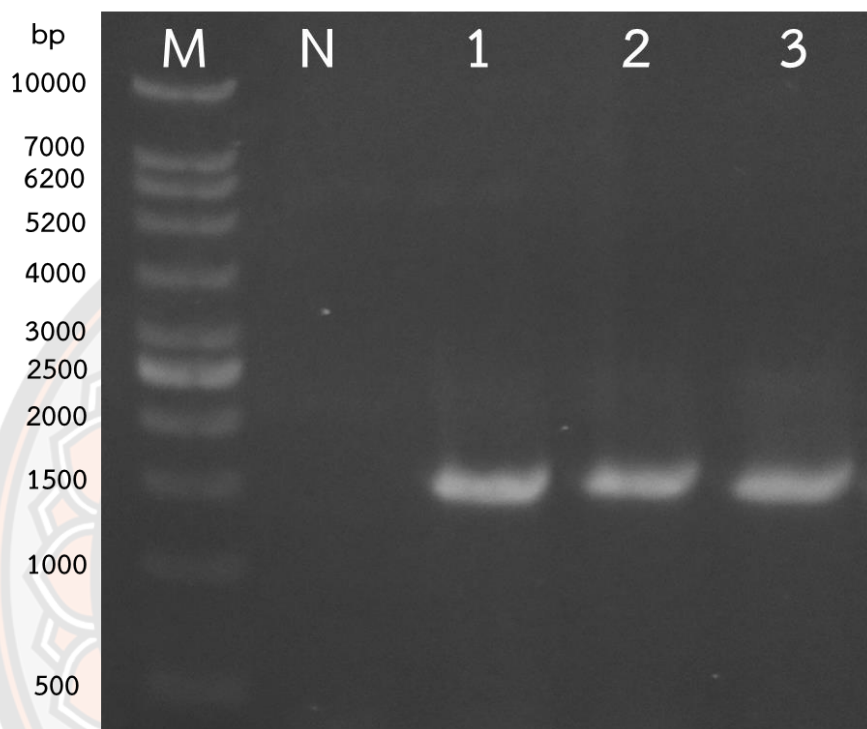


ภาพที่ 31 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อที่คัดเลือกในสถานะทางเดินอาหารจำลอง

4.1.5 การระบุชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

เมื่อนำเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลตมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สำหรับแบคทีเรีย และยีนส่วน D1/D2 domain ใน 26S rDNA สำหรับยีสต์ โดยสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน จากนั้นนำ PCR product

มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับ DNA marker พบว่า PCR product ของแบคทีเรียมีขนาด 1,500 คู่เบส (Basepairs; bp) หรือ 1.5 กิโลเบส (Kilobase; kb) ส่วน PCR product ของยีสต์มีขนาด 500 bp แสดงดังภาพที่ 32 และ 33

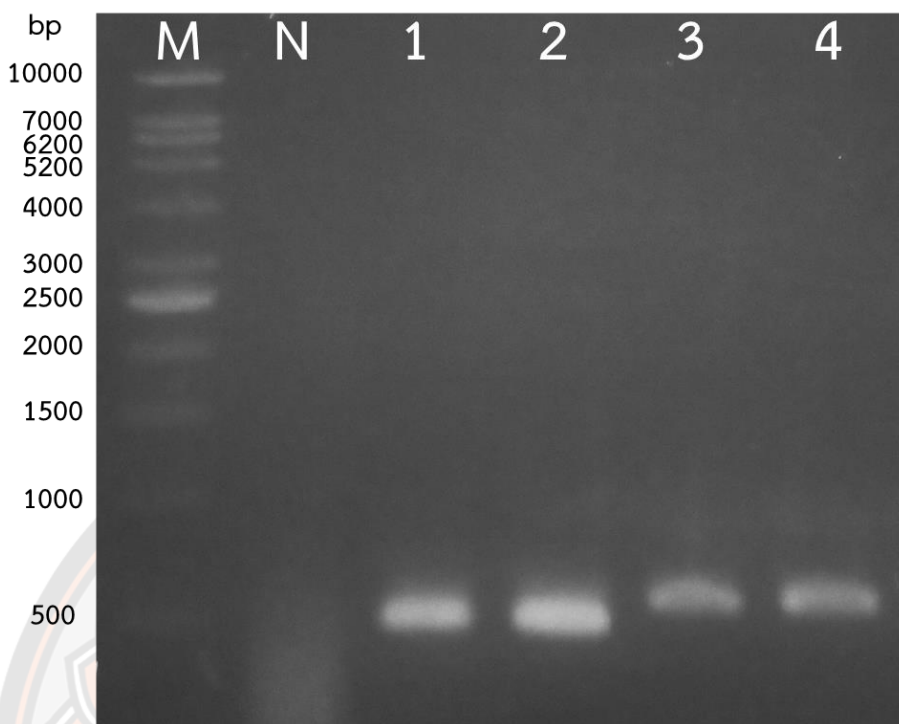


ภาพที่ 32 ขนาด PCR product ของแบคทีเรียที่ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

หมายเหตุ: M คือ DNA marker ขนาด 1 kb

N คือ Negative control

1-3 คือ AT8/5, CS1/3 และ CE1/1 ตามลำดับ



ภาพที่ 33 ขนาด PCR product ของยีสต์ที่ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

หมายเหตุ: M คือ DNA marker ขนาด 1 kb

N คือ Negative control

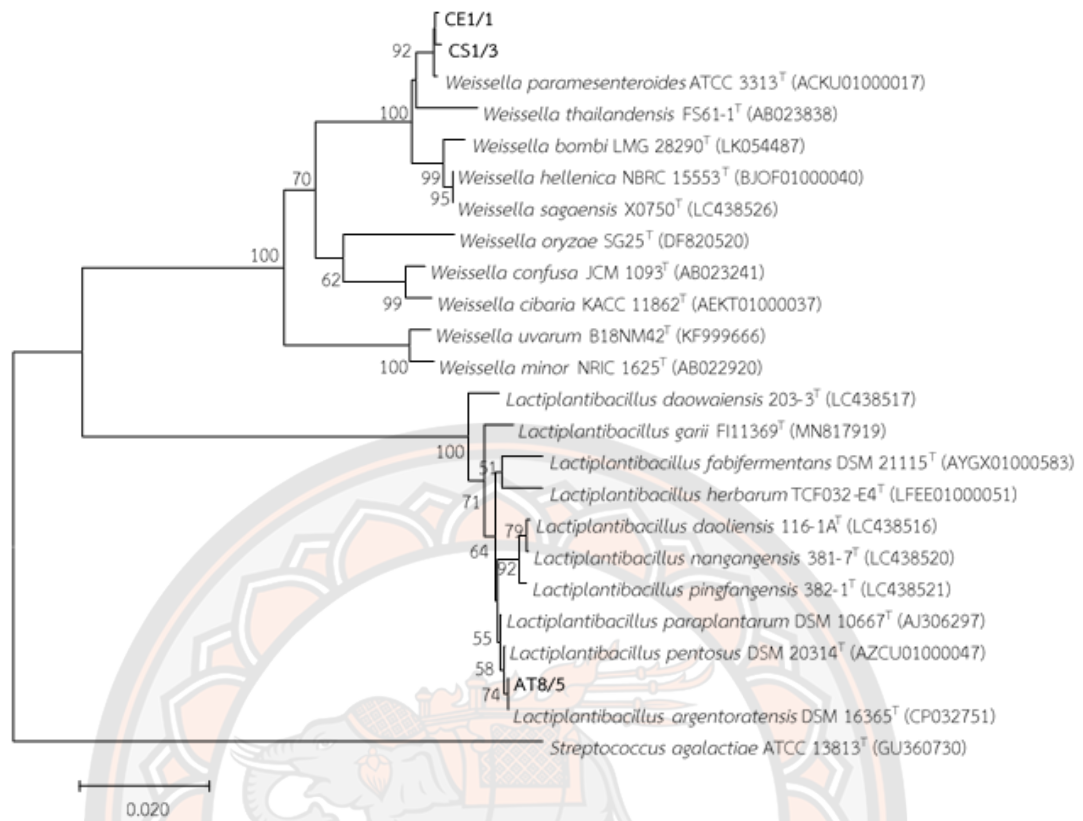
1-4 คือ YCS1/3, YCS1/1, YON3/2 และ YID23 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และยีนส่วน D1/D2 domain พบว่า ไอโซเลต CS1/3 และ CE1/1 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Weissella paramesenteroides* (ACKU01000017) โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น (%Identity) เป็น 99.79 และ 99.86% ตามลำดับ ไอโซเลต AT8/5 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Lactiplantibacillus argentoratensis* (CP032751) โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.79% ไอโซเลต YCS1/1 และ YCS1/3 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Kodamaea ohmeri* (MN268772) โดยทั้งสองไอโซเลตมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 100% ไอโซเลต YON3/2 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Candida tropicalis* (LC496591) โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 100% และไอโซเลต YID23 มีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับ *Aureobasidium melanogenum* (MT623572) โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 100% แสดงดังตารางที่ 24

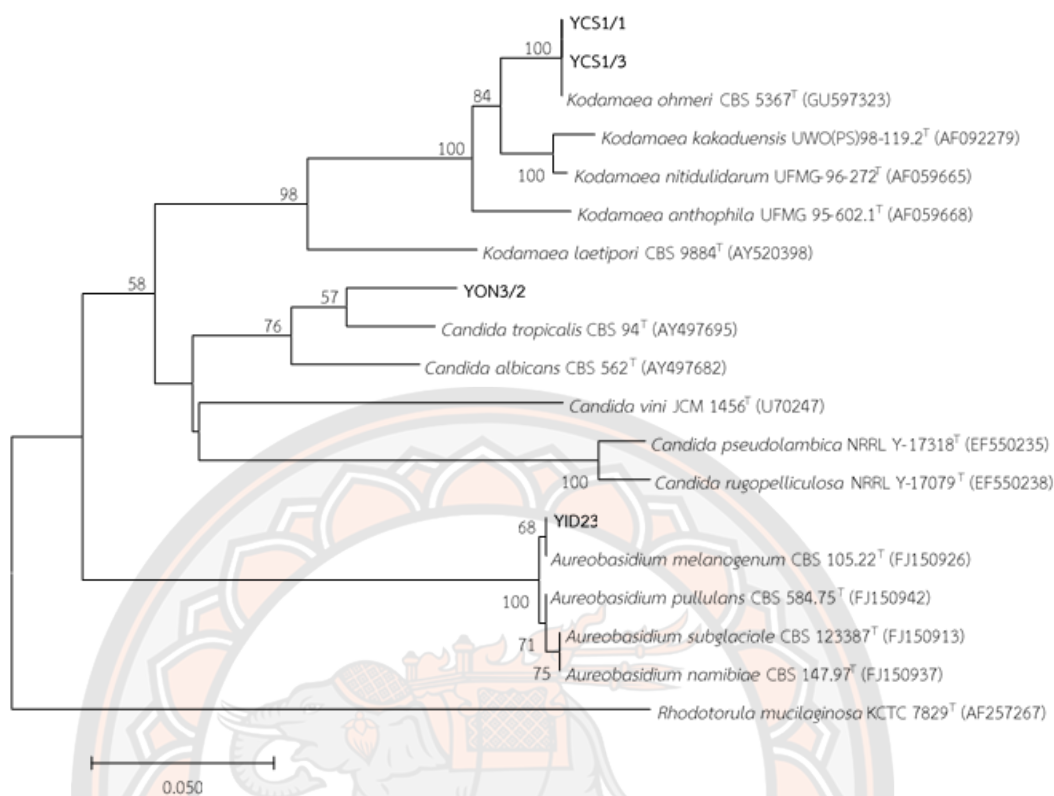
ตารางที่ 22 ผลการระบุชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

ไอโซเลต	สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงที่สุด	%Identity	Accession number	จำนวน Gap
CS1/3	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99.79	ACKU01000017	0
CE1/1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99.86	ACKU01000017	0
AT8/5	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	99.79	CP032751	0
YCS1/1	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	MN268772	0
YCS1/3	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100	MN268772	0
YON3/2	<i>Candida tropicalis</i>	100	LC496591	0
YID23	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	100	MT623572	0

จากการศึกษาสายวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Neighbor-joining method และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bootstrap method โดยทำซ้ำ 1,000 ครั้ง พบว่า แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของแบคทีเรียและยีสต์แสดงดังภาพที่ 34 และ 35 ตามลำดับ



ภาพที่ 34 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของไอโซเลตแบคทีเรียที่คัดแยกได้



ภาพที่ 35 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของไอโซเลตยีสต์ที่คัดแยกได้

จากภาพที่ 33-34 แสดงให้เห็นว่าทุกไอโซเลตมีสายวิวัฒนาการให้ผลสอดคล้องกันกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในข้อ 4.1.5 คือ ไอโซเลต CS1/3 และ CE1/1 มีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *W. paramesenteroides* ATCC 3313^T (ACKU01000017) ไอโซเลต AT8/5 มีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *L. argentoratensis* DSM 16365^T (CP032751) ไอโซเลต YCS1/1 และ YCS1/3 มีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *K. ohmeri* CBS 3567^T (GU597323) ไอโซเลต YON3/2 มีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *C. tropicalis* CBS 94^T (AY497695) และไอโซเลต YID23 มีสายวิวัฒนาการตรงกันกับ *A. melanogenum* CBS 105.22^T (FJ150926)

4.2 อภิปรายผลการทดลอง

4.2.1 การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ

จากผลการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากตัวอย่างทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ จากตลาดสด จำนวน 27 ตัวอย่าง จากปลา 7 ชนิด ได้แก่ ปลาตะโกก จำนวน 1 ตัวอย่าง ปลาไน จำนวน 1 ตัวอย่าง ปลาช่อน จำนวน 2 ตัวอย่าง ปลาทับทิม จำนวน 2 ตัวอย่าง ปลากะพง จำนวน 3 ตัวอย่าง ปลานิล จำนวน 3 ตัวอย่าง และปลาหมอ จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของ

แบคทีเรียที่มีบริเวณสีเหลืองรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมสี Bromocresol purple และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar pH 2.5 พบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 245 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 68 ไอโซเลต และเป็นยีสต์ 177 ไอโซเลต โดยสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้จากตัวอย่างทางเดินอาหารของปลาหมอบมากที่สุด เพราะใช้ตัวอย่างปลาหมอบมากกว่าปลาชนิดอื่น เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างจำนวน 3 รอบ โดยในรอบที่ 1 และ 2 พบว่า เชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาหมอบมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้มากกว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาชนิดอื่น ดังนั้น ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 จึงเลือกเก็บเฉพาะตัวอย่างปลาหมอบ จึงเป็นสาเหตุให้เชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาหมอบมีปริมาณมากกว่าปลาชนิดอื่น

แบคทีเรียที่คัดแยกได้คาดว่าเป็นแบคทีเรียผลิตภัณฑ์กรดแลคติกซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของสัตว์ชนิดต่างๆ รวมถึงปลาที่มีสุขภาพแข็งแรง (Ringø & Gatesoupe, 1998) และมีการรายงานว่าสามารถคัดแยกเชื้อดังกล่าวได้จากทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมสี Bromocresol purple จะผลิตกรดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักน้ำตาลออกมาภายนอกเซลล์ทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบโคโลนีต่ำลง แล้วทำให้เปลี่ยนสี Bromocresol purple ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ (Indicator) จากสีม่วงเป็นสีเหลือง (Lee & Lee, 2008) เมื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้มาศึกษา ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส พบว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลต ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างและการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกัน 6 ลักษณะ ได้แก่ รูปท่อนอยู่เป็นคู่ รูปท่อนต่อกันเป็นสาย รูปกลมอยู่เป็นคู่ รูปกึ่งกลมกึ่งท่อนอยู่เป็นคู่ รูปกึ่งกลมกึ่งท่อนต่อกันเป็นสาย และรูปกึ่งกลมกึ่งท่อนอยู่เป็นคู่และกลุ่ม และไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งตรงกับคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติก (Wood & Holzapel, 1997) สำหรับยีสต์ที่คัดแยกได้คาดว่าเป็นยีสต์โพรไบโอติกส์ทนกรดที่อยู่ในทางเดินอาหารของปลา เนื่องจากยีสต์โพรไบโอติกส์มักสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในลำไส้และกระเพาะอาหารที่มีค่า pH เท่ากับ 1.5-3 (Czerucka et al., 2007)

4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลจำนวน 6 ชนิด คือ *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001, *A. sobria* MUVS 2017 AS, *A. veronii* vsmu 083, *E. ictaluri* 2010/12 EI, *E. tarda* MUVS 2018 ET1 และ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 ด้วยวิธี Agar slab พบว่า มีไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้จำนวน 82 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 66 ไอโซเลต เป็นยีสต์ 16 ไอโซเลต โดยไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001 และ *A. sobria* MUVS 2017 AS มากที่สุด จำนวน 66 ไอโซเลต รองลงมาคือ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001, *E. tarda* MUVS 2018 ET1 และ *E. ictaluri*

2010/12 EI โดยมีเชื้อที่ยับยั้งได้จำนวน 46, 36 และ 35 ไอโซเลต ตามลำดับ และส่วนเชื้อ *A. veronii* vsmu 083 ถูกยับยั้งได้น้อยที่สุด โดยมีเชื้อเพียง 4 ไอโซเลตที่ยับยั้งได้ และพบว่า ไอโซเลต AT8/5 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดได้หลายชนิดมากที่สุด โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 6 ชนิด และไอโซเลต AT1/9 และ AT1/12 ให้ขนาดบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสูงที่สุด โดยมีขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 17.00 ± 0.00 ต่อเชื้อ *E. ictaluri* 2010/12 EI ซึ่งเชื้อไอโซเลต AT8/5, AT1/9 และ AT1/12 เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทางเดินอาหารของปลาหมอ ซึ่งเป็นปลาหมอที่อยู่ในทุ่งนาตามธรรมชาติ ไม่ได้ถูกเลี้ยงในระบบบ่อเลี้ยงหรือกระชังเช่นเดียวกับตัวอย่างปลาชนิดอื่น จึงอาจทำให้ปลามีความแข็งแรงมากกว่าปลาที่ถูกเพาะเลี้ยงในบ่อหรือกระชังที่จะมีความไวต่อการติดเชื้อมากกว่าปลาที่อยู่ในธรรมชาติ เนื่องจากความเครียดจากการเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูง (Intensive farming) การจัดการคุณภาพน้ำที่ไม่ดี (Conte, 2004) และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ รวมถึงอาหารที่ปลาได้รับ ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ปลาที่อยู่ในธรรมชาติและปลาเลี้ยงมีความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ (Intestinal microbiome) แตกต่างกัน โดยปลาที่อยู่ในธรรมชาติจะได้รับอาหารจากธรรมชาติที่สารอาหารหลากหลาย เช่น กรดอะมิโน วิตามิน และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในน้ำ ที่มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญและการตั้งถิ่นฐานของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ (Madigan et al., 2009; Reyes García et al., 2017) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่สามารถส่งเสริมสุขภาพและการเจริญของปลาให้ดีขึ้น นอกจากนี้การเผชิญกับเชื้อก่อโรคในธรรมชาติก็มีส่วนทำให้ปลาและจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ของปลามีความทนทานต่อเชื้อก่อโรคได้เช่นกัน โดยปลาในธรรมชาติอาจเผชิญและติดเชื้อก่อโรคได้หลากหลายชนิดกว่าปลาเลี้ยง แต่การติดเชื้อนั้นไม่รุนแรงและพบว่าปลามีอัตราการตายที่ต่ำ (Kent et al., 1998) อาจเนื่องมาจากปลาที่อยู่ในธรรมชาติมีการปรับตัวต่อเชื้อก่อโรค เพื่อความอยู่รอดในธรรมชาติ นอกจากนี้อาจเกิดจากการไม่ได้รับความเครียดจากการเพาะเลี้ยงจึงทำให้ปลามีความแข็งแรงและไม่ไวต่อการติดเชื้อ และอาจทำให้ภายในลำไส้ของปลาเหล่านี้มีสมดุลจุลินทรีย์ที่ดีมากกว่าจุลินทรีย์ที่ไม่ดี (Butt & Volkof, 2019; ศัลยา, 2557) โดย Kim and Kim (2013) ได้รายงานว่ แบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ของปลา *Paralichthys adspersus* ที่อยู่ในธรรมชาติมีปริมาณมากกว่าปลา *P. adspersus* ที่เลี้ยงในฟาร์ม เช่นเดียวกับการรายงานของ Salas-Leiva et al. (2017) ที่รายงานว่ ปลา *Paralichthys adspersus* ที่อยู่ในธรรมชาติมีความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าปลา *P. adspersus* ที่เลี้ยงในฟาร์ม โดยพบแบคทีเรียกรดแลคติก *Carnobacterium* spp. เพียงสกุลเดียวเท่านั้นในปลาเลี้ยง ในขณะที่ปลาจากธรรมชาตินั้นพบแบคทีเรียกรดแลคติกหลากหลายสกุล ได้แก่ *Streptococcus* spp., *Vagococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Weissella* spp. และ *Lactococcus* spp.

ผลการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิลจากทางเดินอาหารของปลาเหล่านี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของนฤมลและกัญญา (2561) ที่คัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ปลาทับทิม มูปลาสวยงาม และน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Aeromonas hydrophila* โดยมีเชื้อ 2 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ โดย ไอโซเลต O10 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* เท่ากับ 9.00 ± 0.081 มม. และไอโซเลต Isa60 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 37.6 ± 0.22 มม. จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบ ส่วนวิณาและตอกรัก (2562) รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยเชื้อที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ไข่ และกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ แก๊ส และเอนไซม์อะไมเลส โดยพบว่าไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุดมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.00 ± 1.00 มม. จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานในต่างประเทศ โดย Laconi and Pompei (2007) รายงานว่ายีสต์ที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลากระบอกมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida tropicalis* สำหรับ Caruffo et al. (2015) รายงานว่ายีสต์ที่คัดแยกได้จากลำไส้ของปลาชนิดต่างๆ ได้แก่ ปลาแซลมอน (*Salmo salar*, *Oncorhynchus kisutch* และ *Oncorhynchus mykiss*) ปลา Croaker (*Cilus gilberti*) และปลาหางเหลือง (*Seriola lalandi*) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio anguillarum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในปลา จากการทดสอบด้วยวิธี Diffusion โดยใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบ ในปีเดียวกัน Muthukumar and Kandeepan (2015) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของปลาน้ำจืด 4 ชนิด ได้แก่ ปลานวลจันทร์เทศ (*Cirrhinus mrigala*) ปลากระโห้อินเดีย (*Catla catla*) ปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) และปลาไน โดยเชื้อที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 1.00 ถึง 7.20 มม. จากการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion โดยใช้ส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ (Supernatant) ของเชื้อทดสอบ เมื่อนำไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพมาระบุชนิดด้วยการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Micrococcus* spp. สำหรับ Midhun et al. (2017) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ของปลาหมอ พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา 6 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* โดยพบว่าไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดีที่สุดสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค

ได้ทุกชนิด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 14.33 ± 0.88 ถึง 26.33 ± 1.20 มม. จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้ส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ของเชื้อทดสอบ เมื่อระบุชนิดของไอโซเลตดังกล่าวด้วยวิธีการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA พบว่า เป็นเชื้อ *Bacillus licheniformis* เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Reda et al. (2018) ที่รายงานว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลานิลมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล 5 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* และ *Staphylococcus aureus* จากการทดสอบด้วยวิธี Agar spot diffusion โดยใช้ตัวเซลล์ของเชื้อทดสอบ เมื่อระบุชนิดของเชื้อด้วยวิธีการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อ *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lysinibacillus* sp. และ *Citrobacter freundii* นอกจากนี้ Govindaraj et al. (2021) ยังได้รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากลำไส้ของปลาน้ำจืด 5 ชนิด ได้แก่ ปลาช่อน ปลาตะเพียนอินเดีย (*Puntius filamentosus*) ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) ปลานวลจันทร์เทศ และปลาซิวพม่า (*Rasbora daniconius*) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Aeromonas hydrophila* โดยพบไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวจำนวน 7 ไอโซเลต ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 6.33 ± 1.15 ถึง 20.67 ± 2.52 มม. จากการทดสอบด้วยวิธี Diffusion โดยใช้ส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ของเชื้อทดสอบเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนและกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ สร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคสให้ผลการทดสอบคะตะเลสและออกซิเดสเป็นลบ เมื่อระบุชนิดของเชื้อด้วยวิธีการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA พบว่าเป็นเชื้อ *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Weissella cibaria* และ *Limosilactobacillus fermentum* ทั้งนี้ รายงานการวิจัยที่สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 รายงานการวิจัยที่สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี

ตัวอย่าง	เชื้อก่อโรค	วิธีทดสอบ	ผลการทดสอบ	เชื้อที่คัดแยกได้	อ้างอิง
ลำไ้ปลาทั้บติม	<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar well	Inhibition zone	แบคทีเรีย	นฤมลและกัญญา, 2561
มูลปลาสวยงาม และน้ำในบ่อ เพาะเลี้ยงปลา สวยงาม	<i>Aeromonas hydrophila</i>	diffusion	ตั้งแต่ 9.00±0.081 ถึง 37.6±0.22 มม.		
ทางเดินอาหารปลา กะพงขาว	<i>Streptococcus</i> sp.	Agar well diffusion	Inhibition zone ของเชื้อที่มี ประสิทธิภาพที่สุด เท่ากับ 21.00±1.00 มม.	แบคทีเรียกรดแลคติก	วีณาและดอกรัก, 2562
ลำไ้ปลากระบอก	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida tropicalis</i>			ยีสต์ <i>Candida</i> spp. <i>Metschnikowia</i> spp. <i>Sporidiobolus</i> spp. <i>Clavispora</i> spp. <i>Sporobolomyces</i> spp.	Laconi & Pompei (2007)
ลำไ้ปลาเซลมอน ปลา Croaker	<i>Vibrio anguillarum</i>	Diffusion		ยีสต์	Caruffo et al., 2015

ตัวอย่าง	เชื้อก่อโรค	วิธีทดสอบ	ผลการทดสอบ	เชื้อที่คัดแยกได้	อ้างอิง
และปลาหางเหลือง					
ลำไยสีสกเทศ	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Disc diffusion	Inhibition zone ตั้งแต่ 1.00 ถึง	<i>Lactobacillus</i> spp.	Muthukumar &
ปลานวลจันทร์เทศ			7.20 มม.	<i>Bacillus</i> spp.	Kandeepan,
ปลากระโทงแทงอินเดีย				<i>Micrococcus</i> spp.	2015
และปลาไน					
ลำไยปลาทอม	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Agar well	Inhibition zone	แบคทีเรีย โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพ	Midhun et al.,
	<i>Aeromonas sobria</i>	diffusion	ตั้งแต่ 14.33±0.88	ที่สุดคือ <i>Bacillus licheniformis</i>	2017
	<i>Aeromonas caviae</i>		ถึง 26.33±1.20		
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		มม.		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
	<i>Bacillus subtilis</i>				
ลำไยปลานิล	<i>Aeromonas sobria</i>	Agar spot		<i>Lactococcus lactis</i>	Reda et al.,
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	diffusion		<i>Enterococcus faecalis</i>	2018
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Lysinibacillus</i> sp.	
	<i>Pseudomonas putida</i>			<i>Citrobacter freundii</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>				

ตัวอย่าง	เชื้อก่อโรค	วิธีทดสอบ	ผลการทดสอบ	เชื้อที่คัดแยกได้	อ้างอิง
ลำไส้ปลาช่อน	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Diffusion	Inhibition zone	<i>Lactococcus lactis</i>	Govindaraj et
ปลาตะเพียนอินเดียน	<i>Staphylococcus aureus</i>		ตั้งแต่ 6.33±1.15	<i>Enterococcus</i> sp.	al., 2021
ปลาหมอเทศ	<i>Bacillus cereus</i>		ถึง 20.67±2.52	<i>Enterococcus faecalis</i>	
ปลานวลจันทร์เทศ	<i>Escherichia coli</i>		มม.	<i>Weissella cibaria</i>	
และปลาสิวพม่า	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	
	<i>Aeromonas hydrophila</i>				

จากการรายงานที่ผ่านมาทั้งในและต่างประเทศ จะเห็นได้ว่าการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากตัวอย่างลำไส้และ/หรือทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ โดยเชื้อที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น *A. hydrophila*, *A. sobria* หรือ *S. agalactiae* แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีงานวิจัยใดที่ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาทั้ง 6 ชนิด เช่นเดียวกับงานวิจัยในครั้งนี้ และพบว่างานวิจัยส่วนใหญ่ใช้วิธี Agar well diffusion หรือ Disc diffusion โดยใช้ส่วนใสเหนือตะกอนหรือใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แต่งานวิจัยในครั้งนี้ใช้วิธี Agar slab โดยใช้ชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเพาะเชื้อก่อโรคลงไป โดยให้เชื้อทั้งสองสัมผัสกันโดยตรง นอกจากนี้งานวิจัยส่วนใหญ่ที่เป็นการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากลำไส้ปลา พบว่าเป็นการคัดแยกเฉพาะแบคทีเรียเท่านั้น และมีส่วนน้อยที่คัดแยกยีสต์โพรไบโอติกส์เท่านั้น แต่งานวิจัยนี้ได้คัดแยกทั้งโพรไบโอติกส์แบคทีเรียและยีสต์ควบคู่กัน รวมถึงศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ที่คัดแยกได้

4.2.2.1 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์

ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อที่คัดแยกได้ อาจเกิดจากสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial compounds) ชนิดต่างๆ ที่เชื้อเหล่านี้สร้างขึ้น โดยมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารต้านจุลชีพได้หลายชนิด อาทิเช่น กรดอินทรีย์ (Organic acids) ไดอะซีทิล (Diacetyl) แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และแบคทีริโอซิน (Bacteriocin) รวมถึงสารคล้ายแบคทีริโอซิน (Bacteriocin-like substances; BLS) (Mishra & Lambert, 1996; Vuyst et al., 2004) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะหมักน้ำตาลกลูโคส (Glucose) หรือเดกซ์โทรส (Dextrose) ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (ความเข้มข้นร้อยละ 2) ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway ไปเป็นกรดแลคติกและกรดอินทรีย์ชนิดอื่นอีกเล็กน้อย เช่น กรดอะซิติก โดยกรดอินทรีย์ทั้งกรดแลคติกและอะซิติกที่สร้างขึ้นจะถูกปล่อยออกมาออกเซลล์จะอยู่ในรูปโมเลกุลที่ไม่แตกตัวแล้วจะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างอิสระ (Passive diffusion) ด้วยคุณสมบัติการละลายในไขมัน (Lipophile) (Bearson et al., 1997; Kashket, 1987) ไปยังไซโทซอล (Cytosol) ที่มีค่า pH สูงกว่าค่า pKa ของกรด จึงทำให้กรดเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ แล้วให้โปรตอนหรือไฮโดรเจนไอออน (H^+) เป็นจำนวนมาก (Davidson, 2001) จึงเกิดกระบวนการเติม H^+ (Protonation) ให้กับหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) และหมู่ฟอสเฟต (Phosphate group) ในชั้นลิโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์สูญเสียเสถียรภาพ (Alakomi et al., 2000) นอกจากนี้ H^+ ยังทำให้ระดับ pH ในเซลล์ลดต่ำลงจนไซโทซอลมีสภาพเป็นกรดจึงไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และเกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของสารชีว

โมเลกุลที่สำคัญต่างๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ การจำลอง DNA (DNA replication) การถอดรหัสพันธุกรรม (Transcription) และการแสดงออกของโปรตีน (Protein expression) ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์จุลินทรีย์ (Cherrington et al., 1991; Fuller, 1989) เพื่อรักษาเสถียรภาพของค่า pH ภายในเซลล์ จึงจำเป็นต้องขับ H^+ ออกโดยใช้พลังงานจาก Adenosine triphosphate (ATP) ส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะพร่องพลังงานภายในเซลล์ (Cellular energetic depletion) และทำให้เซลล์ตายได้ในที่สุด (Davidson, 2001) ส่วนกรดอินทรีย์ในรูปแบบที่ไม่แตกตัวจะเข้าไปทำลาย Electrochemical proton gradient และเปลี่ยนแปลงความสามารถในการขนส่งสารของเยื่อหุ้มเซลล์ (Permeability) ทำให้ระบบขนส่งสารผิดปกติไป (Snijders et al., 1985) อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่ากรดอินทรีย์สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ค่อนข้างดีกว่าแกรมบวกเนื่องจากกรดอินทรีย์สามารถผ่านชั้น Outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าชั้นเปปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan; PG) ของแบคทีเรียแกรมบวก (Defoirdt et al., 2009; Servin, 2004) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียแกรมบวกอาจถูกยับยั้งด้วยสารต้านจุลชีพชนิดอื่นได้เช่นกัน เช่น แบคเทอริโอซิน (Yamashita et al., 2017) ซึ่งแบคเทอริโอซินเป็นเปปไทด์ (Peptide) หรือโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียหลายชนิด โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติก (Nettles & Barefoot, 1993) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันหรือแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน (Brink et al., 1994; Kawai et al., 1994; Klaenhammer, 1988) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gross & Morell, 1971; Parada et al., 2007; Yamashita et al., 2017) โดยแบคเทอริโอซินจะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายด้วยแรงไฟฟ้าสถิต (Electrostatic) แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการรั่วไหลของไอออน ATP สารโมเลกุลเล็ก กรดอะมิโน และ Electrolytes ภายในเซลล์ (Savadojo et al., 2006) นอกจากนี้ยังไปรบกวนแรงขับเคลื่อนโปรตอน (Proton motive force; PMF) ทำให้ไม่มีการสร้าง ATP และรบกวนการสร้างผนังเซลล์โดยเข้าเชื่อมกับ Lipid II ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเปปทิโดไกลแคน ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Brotz et al., 1998; Deegan et al., 2006) โดยปกติแล้วแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีโปรตีนภูมิคุ้มกัน (Immunity protein) ต่อแบคเทอริโอซินที่ตนเองสร้างออกมา จึงไม่ถูกยับยั้งจากแบคเทอริโอซินของตนเอง (Drider et al., 2006)

By-products อื่นๆ จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Heterofermentative lactic acid bacteria ก็มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพเช่นกัน อาทิเช่น ไดอะซีติล (2,3-butanedione) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ (Jay, 1982) โดยไดอะซีติลจะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนหรือเอนไซม์ จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนหรือเอนไซม์ ส่งผลให้การทำงานผิดปกติไป (Epperly & Dekker, 1989)

แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักแบบ Heterofermentation คาดว่าทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศ (Anaerobic environment) โดยการแทนที่โมเลกุลออกซิเจนทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ Decarboxylation ของจุลินทรีย์ชนิดอื่น และเกิดการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน (Lipid bilayer) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้คุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่านเสียไป (Eklund, 1984; Lindgren & Dobrogosz, 1990)

นอกจากนี้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วปล่อยออกมาภายนอกเซลล์และทำลายเซลล์จุลินทรีย์ชนิดอื่นเนื่องจากเป็นตัวออกซิไดซ์ (Oxidizing agent) ที่มีฤทธิ์รุนแรง โดยจะไปออกซิไดซ์หมู่ซัลไฟไฮดริล (Sulfhydryl group; SH) ภายในโมเลกุลโปรตีนและชั้นไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปและทำให้เกิดปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชัน (Peroxidation) ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้คุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่านเสียไป (Kong & Davison, 1980) นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังมีส่วนในการสร้าง Bactericidal free radicals เช่น Superoxide (O_2^-) และ Hydroxyl (OH \cdot) radical ที่ทำให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุล เช่น กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) (Byczkowski & Gessner, 1988) นอกจากนี้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นได้ เช่น ทำปฏิกิริยากับไทโอไซยาเนต (Thiocyanate; SCN $^-$) เกิดเป็นสารไฮโปไทโอไซยาไนท์ (Hypothiocyanite; OSCN $^-$) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Banks et al., 1986; Kamau et al., 1990) โดยไฮโปไทโอไซยาไนท์จะขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิสซึ่งจะไปยับยั้งกระบวนการขนส่งกลูโคสรวมทั้งขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ Hexokinase, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) และ Aldolase โดยการออกซิไดซ์หมู่ซัลไฟไฮดริลภายในโมเลกุลเอนไซม์เหล่านี้ (Bafort et al., 2014)

4.2.2.2 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของยีสต์

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของยีสต์ที่คัดแยกได้นั้น อาจเกิดจากสารยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial compounds) ชนิดต่างๆ ที่ยีสต์สร้างขึ้น อาทิเช่น เอทานอล (Hatoum et al., 2012) และสารพิษ Mycocin (Chen et al., 2015) รวมถึงกรดอะซิติกที่สร้างจากยีสต์บางสกุล เช่น *Saccharomyces* spp., *Candida* spp. และ *Dekkera* spp. (Offei et al., 2019; Radecka et al., 2015) เมื่อยีสต์เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสตามวิถีไกลโคไลซิสไปเป็นเอทานอลและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (Macedo & Brigham, 2014) ซึ่งเอทานอลที่สร้างขึ้นสามารถยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ โดยเอทานอลจะขับน้ำออกจากเซลล์ จากนั้นเซลล์จะดูดซึมเอทานอลเข้าไป แล้วเอทานอลจะไปละลายไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย และทำให้โปรตีนรวมถึงเอนไซม์เสียสภาพอย่างรวดเร็ว จึง

เป็นการรบกวนระบบ เมตาบอลิซึมของสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น การสังเคราะห์ DNA RNA โปรตีน กรดไขมัน เปปไทด์ไกลแคน และฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) รวมถึงรบกวนเอนไซม์ในกระบวนการ ไกลโคไลซิส จึงทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด (Fitzgerald et al., 1992; Maillard, 2002) นอกจากนี้ ยีสต์บางสกุลอาจจะสามารถออกซิโดซ์เอทานอลกลับไปเป็นอะเซทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) และเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดอะซิติก ซึ่งกรดอะซิติกที่สร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ (Martins et al., 2020) สำหรับ Mycocin นั้นจัดเป็น Killer toxin ประเภทโปรตีนชนิด Extracellular proteins หรือไกลโคโปรตีน (Glycoproteins) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยเฉพาะยีสต์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ส่วนฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียนั้นยังมีการรายงานไม่มากนัก (Hatoum et al., 2012) ซึ่งกลไกการยับยั้งแบคทีเรียที่เรียนั้นคาดว่าใกล้เคียงกับกลไกการยับยั้งยีสต์ คือ Mycocin จะขัดขวางการแบ่งเซลล์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA (Schmitt et al., 1996) และทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ก่อให้เกิดการรั่วไหลของไอออนต่างๆ และทำให้เซลล์ตาย (Schmitt & Breinig, 2002) นอกจากนี้ยังมีการรายงานสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่สร้างจากยีสต์ เช่น Volatile thermolabile toxic extract (Viljoen, 2006) Sophorosides (Cavalero & Cooper, 2003) และเปปไทด์ต้านจุลชีพ เช่น Saccharomycin (Branco et al., 2017)

4.2.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์เบื้องต้น

คัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรบิโอติกส์เบื้องต้น ได้แก่ การทนต่อเกลือ น้ำดี การทนความเป็นกรดสูง การยึดเกาะพื้นผิว และการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นสิ่งสำคัญสำหรับจุลินทรีย์โพรบิโอติกส์ที่แสดงถึงมีชีวิตรอดในกระเพาะอาหารแล้วไปตั้งถิ่นฐานในลำไส้ของปลา ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการทดสอบความทนทานของเชื้อที่คัดเลือกได้ต่อความเป็นกรดสูงที่ค่า pH เท่ากับ 2.5 และความทนทานต่อเกลือ น้ำดี ความเข้มข้น 1% (w/v) จึงคัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลมาจำนวน 55 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 39 ไอโซเลต และยีสต์ 16 ไอโซเลต โดยคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้อย่างน้อย 3 ชนิด และให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 8 มม. พบว่า เมื่อบ่มแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตครบ 24 ชั่วโมง มีเชื้อที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงได้น้อย (+) จำนวน 9 ไอโซเลต ส่วนการเจริญในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี นั้นพบว่า มีเชื้อที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี ได้น้อย (+) และปานกลาง (++) จำนวน 20 และ 19 ไอโซเลต ตามลำดับ สำหรับยีสต์จะนำไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอย่างน้อย 1 ชนิด มาทดสอบเฉพาะการทนต่อเกลือ น้ำดี เนื่องจากในงานวิจัยนี้ ได้คัดเลือกยีสต์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดที่ pH เท่ากับ 2.5 ดังนั้นยีสต์ทุกไอโซเลตจะมีความสามารถในการทนต่อกรดได้อยู่แล้ว จากผลการทดลอง และพบว่ายีสต์ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยมี

เชื้อที่สามารถเจริญได้ปานกลาง (++) และเจริญได้ดี (+++) จำนวน 10 และ 6 ไอโซเลต ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของงานวิจัยนี้พบว่า ในชุดการทดลองสถานะที่มีเกลือน้ำดีที่เวลา 24 ชั่วโมง มีเชื้อยีสต์จำนวน 6 ไอโซเลตที่มีค่า OD₆₄₀ มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่ายีสต์ที่อยู่ในสถานะที่มีเกลือน้ำดีมีการเจริญดีกว่ายีสต์ที่อยู่ในชุดควบคุมที่ไม่มีเกลือน้ำดี จึงอาจเป็นไปได้ว่าเกลือน้ำดีมีส่วนส่งเสริมการเจริญของเชื้อ โดยกรดอะมิโนไกลซีนหรือ ทอรีนที่หลุดออกจากโมเลกุลเกลือน้ำดีหลังจากที่ถูกทำให้แตกตัวด้วยเอนไซม์โบลซอลท์ไฮโดรเลส สามารถถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญสำหรับจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ (Hernández-Gómez et al., 2021)

แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่คัดแยกได้บางไอโซเลตมีความทนทานต่อเกลือน้ำดีและความเป็นกรดสูง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของวลัยพร และคณะ (2544) ที่รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ เช่น ปลานิล ปลาช่อน และปลาหมอสามารถเจริญได้ที่ pH 2, 4, 6, 8 และ 10 และในสถานะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 7% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับวอนสมัย (2557) รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลาดุกสามารถมีชีวิตรอดได้ในสารละลาย PBS ที่มีค่า pH เท่ากับ 2 และ 3 และในน้ำดีสดปลาดุกความเข้มข้น 10% (w/v) ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ Kavitha et al. (2018) ยังรายงานว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลาเก๋า (*Labeo calbasu*) สามารถมีชีวิตรอดได้ในสถานะที่เป็นกรดและเบส (pH 1-10) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และในสถานะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 2.5, 5.0, 7.5 และ 10% (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

นอกจากนี้ ยังพบว่าความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีและความเป็นกรดสูงของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์มีความแตกต่างกัน โดยพบว่ายีสต์ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ในสถานะที่เป็นกรด และสามารถเจริญได้ในสถานะที่มีเกลือน้ำดีในระดับดีและปานกลาง ในขณะที่มีแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสถานะที่เป็นกรดได้ในระดับน้อย จำนวน 9 ไอโซเลต จากทั้งหมด 39 ไอโซเลต และสามารถเจริญได้ในสถานะที่มีเกลือน้ำดีในระดับปานกลางและน้อย อาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของโครงสร้างผนังเซลล์ โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกประกอบด้วย เปปทิโดไกลแคน กรดไทโคอิก (Teichoic acid; TA) กรดลิโปไทโคอิก (Lipoteichoic acid; LTA) S-layer และโพลีแซคคาริไรด์ (Delcour et al., 1999) ส่วนผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วย เบต้า-กลูแคน (β -glucan) แมนโนโปรตีน (Mannoprotein) และไคติน (Chitin) (Aguilar-Uscanga & Francois, 2003) ซึ่งโครงสร้างผนังเซลล์ที่ต่างกันจึงทำให้แบคทีเรียและยีสต์มีความไวต่อการถูกทำลายด้วยกรดและเกลือน้ำดีต่างกัน โดยพบว่ายีสต์มีความทนต่อสถานะดังกล่าวได้ดีกว่าแบคทีเรียเนื่องจากกรดและเกลือน้ำดีจะแพร่ผ่านผนังเซลล์ยีสต์แล้วเข้าไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ได้ยากกว่าแบคทีเรีย

ความสามารถในการทนกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดขึ้นเนื่องจากกลไกการรักษาสมดุลกรดต่างระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม (Buffering capacity) ด้วยการเคลื่อนย้ายโปรตอนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ATPase หรือ H^+ -ATPase ที่มีชื่อว่า F₀F₁-ATPase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ที่ยึดหุ้มเซลล์ (Cell membrane-bound enzyme) ซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งโปรตอนที่เกิดจากการแตกตัวของกรดออกจากไซโตซอล โดยใช้ ATP เป็นแหล่งพลังงาน (Hutkins & Nannen, 1993) โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะทำงานได้ดีในแบคทีเรียทนกรดมากกว่าแบคทีเรียไม่ทนกรด (Kobayashi et al., 1986) นอกจากนี้ยังมีรายงานกลไกการทนกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปแบบอื่นๆ ได้แก่ GAD-dependent system, ADI pathway และการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังที่จะกล่าวถึงในย่อหน้าถัดไป (Singhvi et al., 2018; ปริมาภรณ์และวรารกร, 2561)

สำหรับกลไกการทนกรดแบบ GAD-dependent system เป็นกระบวนการเปลี่ยนกรดอะมิโนกลูตาเมต (Glutamate) ที่มีความเป็นกรดให้เป็น γ -aminobutyric acid (GABA) ที่มีความเป็นกรดต่ำกว่า ผ่านกระบวนการ Glutamate decarboxylation โดยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate decarboxylase (GAD) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะมีการดึงโปรตอนมาใช้ร่วมด้วยจึงเป็นการลดระดับโปรตอนในไซโตซอลอีกทางหนึ่ง (Huang et al., 2007) ส่วน ADI pathway เป็นกระบวนการเปลี่ยนกรดอะมิโนอาร์จินีนเป็นแอมโมเนีย (Ammonia; NH_3) และ ATP ที่มีฤทธิ์เป็นเบส จึงสามารถลดความเป็นกรดในไซโตซอลได้ (Rollan et al., 2003) สำหรับการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์นั้นจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีความเครียด เช่น อุณหภูมิ แรงดันออสโมติก หรือค่า pH ที่ไม่เหมาะสม โดยจะพบการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดที่ส่งผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ เปลี่ยนอัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัว ความยาวของสายคาร์บอน ตำแหน่งของกิ่งก้าน *cis-trans* isomerization และการปรับเปลี่ยนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เยื่อหุ้มเซลล์ไปเป็นกรดไขมันที่มีไซโคลโพรเพน (Cyclopropane fatty acid; CFA) โดยการทำงานของเอนไซม์ Cyclopropane fatty acid synthase ซึ่งกรดไขมันชนิดนี้เป็นโครงสร้างที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายด้วยกรดได้ยากขึ้น (Grogan & Cronan Jr, 1997) โดยช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีเสถียรภาพด้านการเป็นเยื่อเลือกผ่านได้ดีขึ้น แต่ยังไม่มีความชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันไซโคลโพรเพนในปริมาณสูงต่อการทนทานต่อกรด แต่มีรายงานการวิจัยมากมายที่ยืนยันแน่ชัดว่าการสร้างกรดไขมันไซโคลโพรเพนที่เพิ่มขึ้นมีส่วนเกี่ยวข้องในการช่วยให้จุลินทรีย์รอดชีวิตในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น (ปริมาภรณ์และวรารกร, 2561) สำหรับการทนทานต่อกรดของยีสต์นั้นอาจเกี่ยวข้องกับโครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์ที่มีโครงสร้างหลักเป็นเบต้ากลูแคน ประมาณร้อยละ 50-60 (Lipke & Ovalle, 1998; Nguyen et al., 1998) จึงทำให้กรดอินทรีย์ (ในที่นี้คือกรดไฮโดรคลอริก) ที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำลาย

โครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ได้ยาก นอกจากนี้ความทนทานต่อกรดของยีสต์อาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ ATPase (Pma1p-ATPase) เช่นเดียวกับแบคทีเรียกรดแลคติก (Carmelo et al., 1997; Halm et al., 2004)

ความสามารถในการทนต่อเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลคติกนั้น อาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส (Bile salt hydrolase; BSH) ที่เชื้อสร้างขึ้นมา ซึ่งเอนไซม์นี้จะไปเร่งปฏิกิริยาการแตกตัว (Deconjugation) ของเกลือแร่ที่อยู่ในรูปคอนจูเกต (Conjugated bile salt) ให้เป็นรูปดี/อันคอนจูเกต (De/Unconjugated bile salt) โดยจะได้กรดอะมิโนไกลซีน (Glycine) หรือทอรีน (Taurine) และเกลือแร่อิสระ (Free bile salt) ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ (Begley et al., 2006) นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ประจุ ชนิดของกรดไขมัน คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ และ Lipid fluidity เป็นอีกหนึ่งกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อสามารถทนต่อเกลือแร่ได้ (Begley et al., 2005; Chou & Weimer, 1999)

สำหรับความสามารถในการทนต่อเกลือแร่ของยีสต์นั้นอาจเกี่ยวข้องกับโครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ โดยภายในโมเลกุล Glycosylate mannoprotein จะประกอบด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (Phosphodiester bond) จำนวนมาก ส่งผลให้พื้นผิวของเซลล์มีประจุลบและทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ (Jigami & Odani, 1999) จึงทำให้เกลือแร่ที่มีคุณสมบัติทั้งชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (Amphipathic/Amphiphilic molecule) แพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ได้ยาก (Urduaneta & Casadesús, 2017) นอกจากนี้ยีสต์อาจสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสมาย่อยสลายโมเลกุลเกลือแร่ได้เช่นเดียวกับแบคทีเรีย โดย Hernández-Gómez et al. (2021) ได้รายงานว่าการพบกิจกรรมของเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนต่อเกลือแร่ครั้งแรกในยีสต์โพรไบโอติกส์ *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 แต่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานที่แน่ชัด

นอกจากนี้ ยังพบว่า แบคทีเรียบางไอโซเลตมีความทนทานต่อเกลือแร่แต่ไม่ทนต่อความเป็นกรดสูงที่ค่า pH เท่ากับ 2 และบางไอโซเลตไม่สามารถทนต่อสภาวะทั้งสองได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของปรีชา (2550) ที่รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากปลาทองสามารถมีชีวิตรอดได้ที่ค่า pH เท่ากับ 3 และ 4 แต่ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ที่ค่า pH เท่ากับ 2 ได้ แต่สามารถมีชีวิตรอดได้ในน้ำดีสดปลาช่อนความเข้มข้น 10, 30 และ 50% (w/v) ส่วนอุตุมลัทธิและจิรพร (2556) รายงานว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลาบิลไม่สามารถเจริญได้ที่ pH ต่ำกว่า 5 สำหรับฉวีธัญญาและคณะ (2558) รายงานว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลาบิลสามารถเจริญเติบโตในเกลือแร่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% (w/v) ได้นานเพียง 2 ชั่วโมงเท่านั้น นอกจากนี้ ศรีสรรค์และคณะ (2559) ยังรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากปลาซันและผักดองจำนวน 42 ไอโซเลต มีเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่ทนกรดที่ pH 2-4 และทนเกลือแร่ที่ความเข้มข้น

0.3% (w/v) ได้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็นเพียงร้อยละ 2.4 ของไอโซเลตทั้งหมด เช่นเดียวกับผู้สติและคณะ (2559) ที่รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกบางไอโซเลตที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักท้องถิ่นมีความสามารถในการทนต่อเกลือแร่ที่ค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายเกลือแร่ของเชื้อเหล่านี้อาจมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่ากับเชื้ออื่นๆ ซึ่งความสามารถนี้มักพบในแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* spp. และ *Enterococcus* spp. (Begley et al., 2006) ทั้งนี้ความเป็นกรดและเกลือแร่อาจมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสกุล สปีชีส์ สายพันธุ์ แหล่งอาศัยของเชื้อ รวมถึงความเข้มข้นของกรดและเกลือแร่ (Noriega et al., 2004)

อย่างไรก็ตาม การจะนำเชื้อเหล่านี้ไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกส์สำหรับปลานิล จะต้องรอดชีวิตในทางเดินอาหารของปลา ดังนั้นอาจต้องปรับปรุงสายพันธุ์ให้เชื้อสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารให้มากขึ้น ซึ่งวิธีที่เป็นที่นิยมคือการเตรียมเซลล์ด้วยสภาวะเครียดในระดับที่ต่ำกว่าระดับความเครียดจนถึงตาย (Sublethal stress) วิธีนี้มักทำให้เชื้อสามารถปรับตัวและทนต่อสภาวะไม่เหมาะสมนั้นได้ดีขึ้น (Stress response) เช่น การเตรียมเซลล์ในสภาวะกรดในระดับที่ต่ำกว่า Sublethal stress จะทำให้เชื้อสามารถปรับตัวและทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้ดีขึ้น (Chen et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีวิธีที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายอีกวิธีหนึ่งคือการห่อหุ้มเซลล์ (Encapsulation) เพื่อป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่เป็นอันตรายและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ (Kailasapathy, 2006)

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ มาทดสอบการยึดเกาะพื้นผิว โดยวัดค่า Abs₅₉₀ ของสปีคริสตัลไวโอเลตที่ถูกชะออกจากเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่ที่พื้นผิวหลอดทดลองด้วยสารละลาย 95% (v/v) เอทานอล เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้ จากการทดลองพบว่า มีไอโซเลตที่มีการยึดเกาะได้มากจำนวน 3 ไอโซเลต โดยเป็นยีสต์ทั้งหมด ยึดเกาะได้ปานกลางจำนวน 11 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 8 ไอโซเลต ยีสต์ 3 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของอุดมลักษณ์และจิรพร (2556) ที่รายงานว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลานิลมีความสามารถในการยึดเกาะผนังหลอดทดลอง สำหรับ Laconi and Pompei (2007) รายงานว่ายีสต์ที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลากระบอกมีความสามารถในการยึดเกาะทั้งในเยื่อเมือกในลำไส้ (Intestinal mucus หรือ Mucosa layer) ของปลากระบอกและบนแผ่นสไลด์แก้ว นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ายีสต์ที่คัดแยกได้จากลำไส้ของปลาเตอร์เจียนไซบีเรีย (*Acipenser baerii*) (Geraylou et al., 2014) และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) (Balakrishna, 2013) มีความสามารถในการยึดเกาะ 96-well microplate ที่เคลือบด้วยเยื่อเมือกในลำไส้ของปลา ความสามารถดังกล่าวอาจเกิดจากอันตรกิริยาแบบไม่จำเพาะโดยอาศัยคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) ของพื้นผิวเซลล์เชื่อมกับเซลล์เยื่อลำไส้ (Intestinal epithelial cells) ในระยะแรก จากนั้นในระยะต่อมาจะเกิดอันตรกิริยาแบบจำเพาะโดยใช้โมเลกุลที่ผิวเซลล์ของเชื้อ

(Haddaji et al., 2015) โดยเชื้อที่มีความไม่ชอบน้ำสูง (ผิวเซลล์ไม่มีขั้ว) จะเกาะกับเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดี (Marin et al., 1997)

แบคทีเรียกรดแลคติกจะใช้โมเลกุลตัวรับที่ผิวเซลล์ (Adhesin) ได้แก่ Surface layer associated proteins (SLAPs), Mucin binding proteins (MUBs), Fibronectin-binding proteins (FnBPs), Teichic acid, Lipoteichic acid และโมเลกุลอื่นๆ เป็นโมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะกับโมเลกุลต่างๆ ในชั้นเยื่อเมือกมิวคัส (Mucus layer) ที่ทำหน้าที่ปกคลุมเซลล์เยื่อบุลำไส้ (Intestinal epithelial cell) โมเลกุลเหล่านี้ได้แก่ Mucin oligosaccharide ที่เป็นองค์ประกอบของมิวซิน (Mucins) ในชั้นมิวคัส นอกจากนี้ยังมีโมเลกุล Glycocalyx หรือ Extracellular matrix (ECM) proteins ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนและไกลโคลิพิด (Glycolipids) ชนิดต่างๆ เช่น ไฟโบรเนคติน (Fibronectin) ทำหน้าที่เป็นลิแกนด์ (Ligand) สำหรับตัวรับบนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย เรียกโมเลกุลที่ปกคลุมลำไส้เหล่านี้ว่า Mucin polymer matrix (Bron et al., 2012; Lebeer et al., 2010) อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างกลไกการจับกันแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะในแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดโดยอาศัยโปรตีนที่ผิวเซลล์บางชนิด เช่น Cell wall-anchored proteinases ที่ช่วยเพิ่มคุณสมบัติการไม่ชอบน้ำและการจับกันอย่างจำเพาะ (Pan et al., 2006; Zhang et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโครงสร้างต่างๆ ของแบคทีเรีย ได้แก่ พิลิ (Pili) ฟิมบริ (Fimbriae) แฟล็กเจลลา (Flagellin) และ เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide; EPS) เช่น แคปซูล (Capsular polysaccharide; CPS) ยังเป็นโครงสร้างที่ช่วยให้เกิดการยึดเกาะและตั้งถิ่นฐานในลำไส้อีกด้วย (Liu et al., 2020) สำหรับกลไกการยึดเกาะของยีสต์นั้น เกิดจากการจับกันแบบไม่จำเพาะโดยอาศัยคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำและการจับกันแบบจำเพาะเช่นเดียวกับแบคทีเรีย (Sourabh et al., 2011) แต่จะแตกต่างกันที่ชนิดของโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์ โดยยีสต์จะใช้โมเลกุล Agglutinin-like sequence (Als), Fibronectin adhesin (FN), Fucoside-binding adhesin, Fimbrial adhesin, เบต้ากัลลูแคน และโมเลกุลอื่นๆ ในการยึดเกาะกับโมเลกุลต่างๆ ในชั้นเยื่อเมือกมิวคัสของโฮสต์ (Nikou et al., 2019; Williams et al., 2013)

สำหรับผลการทดลองการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่า มีไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มจำนวน 34 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียทั้งหมด และไม่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มจำนวน 21 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 5 ไอโซเลตและยีสต์ทั้งหมดทุกไอโซเลตจำนวน 16 ไอโซเลต แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ ในขณะที่ยีสต์ทุกไอโซเลตไม่สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Mahdhi et al. (2011) ที่รายงานว่ายีสต์ *Candida famata* มีคุณสมบัติโปรไบโอติกส์บางประการ คือ มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ และเกาะติดพื้นผิว แต่ไม่มีสร้างไบโอฟิล์มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red agar สำหรับ Tsveteslava et al. (2017) รายงานว่าเชื้อ *Lactobacillus fermentum* สามารถสร้าง

Exopolysaccharide และให้โคโลนีสีดำนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red agar ที่เติมน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แลคโตส และมอลโทส เช่นเดียวกับ Ibryamova et al. (2018) ที่รายงานว่าเชื้อ *Lactobacillus fermentum* สามารถสร้าง Exopolysaccharide และให้โคโลนีสีดำนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red agar ที่เติมน้ำตาลมอลโทส

การสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์นั้นเกิดจากสาร Exopolysaccharide โดยจะเป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์เชื่อมกับเซลล์ลำไส้ ทำให้การยึดเกาะมีเสถียรภาพยาวนานมากขึ้นและป้องกันตัวเองจากสภาพแวดล้อมที่ไม่พึงประสงค์ต่างๆ เช่น สภาวะในทางเดินอาหารและ/หรือในกระบวนการผลิต รวมถึงป้องกันการตั้งถิ่นฐานของเชื้อก่อโรค (Donlan, 2002; Terraf et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Exopolysaccharide ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียและยีสต์ก่อโรคบางชนิดได้ (Fracchia et al., 2010; Walencka et al., 2008) งานวิจัยในครั้งนี้จึงได้ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo Red agar โดยดูลักษณะโคโลนีและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ โคโลนี หากมีการสร้างไบโอฟิล์มโคโลนีจะมีสีดำ อาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีดำ และหากไม่มีการสร้างไบโอฟิล์มโคโลนีและอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีจะมีสีแดง ทั้งนี้กลไกการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากการสร้างไบโอฟิล์มยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามมีข้อสันนิษฐานว่าอาจเป็นผลมาจากการสร้างผลิต Exopolysaccharide จากน้ำตาลซูโครสที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ (Freeman et al., 1989; Lima et al., 2017)

ไบโอฟิล์มเป็นหนึ่งในกลไกการยึดเกาะของเชื้อกับเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งจากผลการทดสอบการยึดเกาะและการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่า แบคทีเรียบางไอโซเลตมีความสามารถในการยึดเกาะและมีการสร้างไบโอฟิล์ม ในขณะที่แบคทีเรียบางไอโซเลตและยีสต์ทุกไอโซเลตมีความสามารถในการยึดเกาะแต่ไม่มีการสร้างไบโอฟิล์ม แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่ไม่มีการสร้างไบโอฟิล์มอาจเกิดการยึดเกาะผนังลำไส้ได้ด้วยกลไกอื่นๆ ตามที่ได้กล่าวถึงในข้างต้น

จากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อทั้ง 55 ไอโซเลต จึงคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์จำนวน 7 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต และยีสต์ 4 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลองและระบุชนิดด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาต่อไป โดยแบคทีเรีย 3 ไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกได้แก่ AT8/5 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาไนที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ ทนต่อเกลือ น้ำดี ในระดับ + และมีการยึดเกาะในระดับ + CS1/3 และ CE1/1 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาไนได้ 4 ชนิด โดยเฉพาะเชื้อ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาไนที่มีความรุนแรงและความชุกในการระบาดสูงในประเทศไทย (Dangwetngam et al., 2016; Kayansamruaj et al., 2014; Maisak et al., 2008; Suanyuk et al., 2008) มีความทนทานต่อ

ความเป็นกรดในระดับ + และเกลือแร่ในระดับ ++ และมีการยึดเกาะในระดับ + และ ++ ตามลำดับ สำหรับยีสต์ 4 ไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกได้แก่ YON3/2 และ YID23 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาชนิดได้ 2 ชนิด คือ *E. ictaluri* 2010/12 EI และ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 (สำหรับ YON3/2) และ *A. sobria* MUVS 2017 AS และ *E. ictaluri* 2010/12 EI (สำหรับ YID23) สามารถทนต่อความเป็นกรดและเกลือแร่ในระดับ +++ และ ++ ตามลำดับ และมีการยึดเกาะในระดับ +++ และ ++ ตามลำดับ YCS1/1 และ YCS1/3 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 ได้ ทนต่อความเป็นกรดและเกลือแร่ในระดับ +++ และมีการยึดเกาะในระดับ +++

4.2.4 การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลอง

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อที่ได้ทำการคัดเลือกทั้ง 7 ไอโซเลต ในการมีชีวิตรอดเมื่อผ่านสารละลายกระเพาะอาหารและลำไส้สังเคราะห์ พบว่า มีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลตจากทั้งหมด 7 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถมีชีวิตรอดในสภาวะดังกล่าวได้ คือ CS1/3 และ CE1/1 โดยจำนวนเชื้อจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อสัมผัสกับสารละลายกระเพาะอาหารสังเคราะห์นาน 1.5 ชั่วโมง และไม่สามารถมีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับสารละลายดังกล่าวนานเกินกว่า 1.5 ชั่วโมง ส่วนยีสต์ทั้งหมดและแบคทีเรีย 1 ไอโซเลต ยังคงมีชีวิตรอด ได้แก่ YON3/2, YCS1/1, YCS1/3, YID23 และ AT8/5 โดยมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 108.07, 107.19, 104.65, 101.59 และ 76.07% ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการทนต่อสภาวะดังกล่าวอาจเกิดจากความสามารถในการขับ H^+ ออกจากไซโทซอลโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ H^+ -ATPase และความสามารถในการผลิตเอนไซม์โบลิซอลที่ไฮโดรเลสมาย่อยสลายเกลือแร่ ดังที่ได้กล่าวถึงในข้อที่ 4.2.3 นอกจากความเป็นกรดและเกลือแร่แล้ว ในกระเพาะอาหารยังมีเอนไซม์เปปซินที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้ออีกด้วย โดยเอนไซม์เปปซินจะทำงานร่วมกับกรดไฮโดรคลอริกในกระเพาะอาหารแล้วก่อให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์แบคทีเรีย (Gastric bactericidal barrier) โดยเข้าไปทำลายชั้นเปปทิโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ตรงตำแหน่งพันธะเปปไทด์ (Peptide interbridge) ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโน 4 ตัว (Tetrapeptide chain) ที่ทำให้น้ำตาล *N*-acetylmuramic acid (NAM) ระหว่าง Carbohydrate backbone เชื่อมกันเกิดโครงสร้างร่างแหเปปทิโดไกลแคน (Zhu et al., 2006) ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้ไม่พบในผนังเซลล์ยีสต์จึงอาจทำให้เอนไซม์เปปซินไม่สามารถทำลายเซลล์ยีสต์ได้ดีเท่าแบคทีเรีย นอกจากนี้อาจเกิดจากตัวยับยั้งเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเอส (Aspartic protease inhibitor) เช่น ตัวยับยั้งเอนไซม์เปปซินที่เชื้อสร้างขึ้น ซึ่งตัวยับยั้งนี้สามารถพบได้น้อยมากในเซลล์สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดอกไม้ทะเล พยาธิตัวกลม แอคติโนแบคทีเรีย รวมถึงยีสต์บางชนิด (Phylip et al., 2001) สำหรับการทนต่อเอนไซม์เปปซินของแบคทีเรียอาจเกิดจากโปรตีนที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์หรือผนังเซลล์ไม่มีกรดอะมิโนชนิดที่เอนไซม์เปปซินสามารถทำลายได้เป็นองค์ประกอบหรือมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น (Escobar-Ramirez et al., 2020) โดยมีงานวิจัยมากมายที่รายงานว่า

Lactobacillus spp. สามารถรอดชีวิตได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีค่า pH 2.0 และมีเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Mahmoudi et al., 2016; Maragkoudakis et al., 2006)

เมื่อเชื้อผ่านกระเพาะอาหารแล้วก็จะเข้าสู่ลำไส้เล็กที่ประกอบด้วยเกลือ น้ำดี และเอนไซม์แพนครีเอตินซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างจากตับอ่อน (Pancreas) ประกอบไปด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อโดยจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเสียหาย (Banerjee et al., 2020; Scheer & Fawzy, 1986) แต่เอนไซม์ดังกล่าวมีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเกลือ น้ำดี จึงทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนสามารถมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีเอนไซม์แพนครีเอติน (Champagne & Gardner, 2008; Maragkoudakis et al., 2006; Ruiz-Moyano et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดมีการสร้างสาร Exopolysaccharides มาห่อหุ้มเซลล์เพื่อเพิ่มความทนทานต่อสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ไวรัสของแบคทีเรียหรือแบคทีริโอเฟจ (Bacteriophage) ไอออนของโลหะหนัก (Heavy metal ions) แบคทีริโอซิน และเอนไซม์ต่างๆ เป็นต้น (Looijesteijn et al., 2001)

ซึ่งไอโซเลต AT8/5, YCS1/1, YCS1/3, YON3/2 และ YID23 สามารถทนได้ทั้งในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้จำลอง และยังพบว่ายีสต์ไอโซเลต YCS1/1, YCS1/3, YON3/2 และ YID23 มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% เนื่องจากค่า log CFU/ml ของเชื้อหลังการทดสอบมากกว่าเชื้อเริ่มต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการทนต่อสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี ที่พบว่า ยีสต์บางไอโซเลตมีค่า OD₆₄₀ ในชุดการทดลองสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเชื้ออาจจะเจริญในสภาวะทางเดินอาหารจำลองได้เช่นกัน โดยเชื้ออาจใช้กรดอะมิโนที่หลุดออกจากโมเลกุลเกลือ น้ำดี หลังจากที่ถูกทำให้แตกตัวด้วยเอนไซม์ไบลซอลท์ไฮโดรเลส เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ จึงมีความเป็นไปได้สูงว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต น่าจะสามารถทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารจริงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับปลานิลในระดับห้องปฏิบัติการและระดับฟาร์มได้

4.2.5 การระบุชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

จากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์เบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้ จึงคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์จำนวน 7 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต และยีสต์ 4 ไอโซเลต มาระบุชนิดด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สำหรับแบคทีเรีย และยีนส่วน D1/D2 domain ใน 26S rDNA สำหรับยีสต์ พบว่า ไอโซเลต CS1/3 และ CE1/1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์และสายวิวัฒนาการใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Weissella paramesenteroides* ATCC 3313^T (ACKU01000017) โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น (%Identity) เป็น 99.79 และ 99.86% ตามลำดับ ไอโซเลต AT8/5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์

และสายวิวัฒนาการใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Lactiplantibacillus argentoratensis* DSM 16365^T (CP032751) โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 99.79% ไอโซเลต YCS1/1 และ YCS1/3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Kodamaea ohmeri* (MN268772) โดยทั้งสองไอโซเลตมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 100% และมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Kodamaea ohmeri* CBS 3567^T (GU597323) ไอโซเลต YON3/2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Candida tropicalis* (LC496591) โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 100% และมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Candida tropicalis* CBS 94^T (AY497695) และ ไอโซเลต YID23 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงมากที่สุดกับ *Aureobasidium melanogenum* (MT623572) โดยมีความมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 100% และมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงมากที่สุดกับ *Aureobasidium melanogenum* CBS 105.22^T (FJ150926) ทั้งนี้มีงานวิจัยหลากหลายงานที่รายงานถึงคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์ของเชื้อเหล่านี้

Weissella paramesenteroides เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (Hexose) แบบ Heterofermentative ผ่านวิถี Hexose-monophosphate และ Phosphoketolase (PK) pathways โดยมีเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase) เป็นเอนไซม์สำคัญ ได้กรดแลคติกประมาณ 50% และผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (By-products) เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดอะซิติก รวมถึงไดอะซิติกและกรดอินทรีย์ชนิดอื่นอีกเล็กน้อย กรดฟอร์มิก (Formic acid) รวม 50% (Collins et al., 1993) *W. paramesenteroides* มักพบในผลไม้ ผักดอง ผลิตภัณฑ์จากสัตว์และนม รวมถึงทางเดินอาหารของปลา (Dinoto et al., 2018; Lonvaud-Funel, 2014) โดยเชื้อชนิดนี้มีความสามารถในการปรับค่า pH ของอาหารให้เป็นกรด (Acidification) มีการสร้างสาร EPS และมีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ได้แก่ มีความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดและโซเดียมทอโรโคเลต (Sodium taurocholate) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเกลือน้ำดี เกาะติดผิวชิน สร้างไบโอฟิล์มจากเกลือน้ำดี มีคุณสมบัติ Cell surface hydrophobicity มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค สามารถใช้พรีไบโอติกส์ในการสร้าง Short-chain fatty acids (SCFAs) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดโรค (Fessard & Remize, 2017; Pabari et al., 2020) ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Maji et al. (2016) ที่รายงานว่า *Weissella paramesenteroides* 5 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลา ยี่สกเทศ ปลากระโทงแทง ปลาฉลาม ปลาฉลาม ปลาฉลาม ปลาฉลาม และปลาลิ้น (Hypophthalmichthys molitrix) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 11.00±0.28 ถึง 13.36±0.18 มม. ซึ่งมีขนาดที่ใหญ่กว่าที่พบในงานวิจัยในครั้งนี้ ที่พบว่า ไอโซเลต CS1/3 และ CE1/1 มีขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001 เท่ากับ 9.25±0.35 และ 8.00±0.00 มม. ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากวิธีทดสอบและปริมาณเซลล์ที่ใช้ใน

การทดสอบที่แตกต่างกัน โดยในงานวิจัยนี้ใช้วิธี Agar slab และใช้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.5×10^8 CFU/ml ในขณะที่ Maji และคณะ ทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion และใช้ส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10^9 CFU/ml จึงอาจทำให้ได้บริเวณยับยั้งที่ใหญ่กว่า และพบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเป็นกรดสูงที่เวลา 3 ชั่วโมง แต่มีจำนวนเซลล์ลดลง และไม่เจริญในสภาพดังกล่าวที่เวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับไอโซเลต CS1/3 ในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ยังพบว่า 3 ใน 5 ไอโซเลต ไม่สามารถเจริญในสภาพที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.3% (w/v) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ไอโซเลต CS1/3 และ CE1/1 ในงานวิจัยนี้สามารถเจริญได้ในสภาพดังกล่าวที่เวลา 24 ชั่วโมง แม้จะความเข้มข้นของมีเกลือน้ำดีสูงมากกว่าถึง 1% (w/v) สำหรับ do Vale Pereira et al. (2017) รายงานว่าแบคทีเรีย *Weissella paramesenteroides* ที่คัดแยกได้จากลำไส้ของปลาอะราไพมา (Arapaima gigas) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา 7 ชนิด ได้แก่ *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Enterobacter* sp., *Micrococcus luteus*, *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 15.00 ± 0.20 มม. จากการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion โดยใช้ชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเพาะเชื้อก่อโรคลงไปเช่นเดียวกันกับการทดลองในครั้งนี้ แต่ใช้ปริมาณเชื้อก่อโรคเริ่มต้นน้อยกว่าคือ 10^5 CFU/ml จึงอาจทำให้ได้ขนาดบริเวณยับยั้งมากกว่าการทดลองนี้ที่มีขนาดไม่ถึง 15 มม. เนื่องจากใช้ปริมาณเชื้อก่อโรคถึง 1.5×10^8 CFU/ml นอกจากนี้ Dinoto et al. (2018) ยังรายงานว่ *Weissella paramesenteroides* SI39 และ SI42 ที่คัดแยกได้จากลำไส้ของปลาไหลหูดำ (*Anguilla bicolor*) มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งในคนและปลา ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* โดยให้ค่าการยับยั้ง (%Inhibition) 98-100% จากการวัดค่า OD₅₉₅ ของเชื้อก่อโรคที่ถูกยับยั้งด้วยส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์เชื้อทดสอบ

จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า *W. paramesenteroides* ถูกคัดแยกได้จากลำไส้ปลาหลายชนิด ทั้งชนิดที่กล่าวถึงในข้างต้นและชนิดอื่นๆ เช่น ปลาเรนโบว์เทราต์ (Desai et al., 2012) แต่ยังไม่มียางานการคัดแยกเชื้อ *W. paramesenteroides* ได้จากทางเดินอาหารของปลาช่อนและปลาตะโกกเช่นเดียวกับงานวิจัยในครั้งนี้ มีเพียงรายงานการคัดแยก *W. paramesenteroides* จากปลาร้าที่ทำจากปลาช่อนและปลาขนาดเล็ก ชนิดอื่นในประเทศไทย (Desai et al., 2012) และยังไม่พบการรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางโทรโปอิติกส์ของ *W. paramesenteroides* ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลาช่อนและปลาตะโกก งานวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่ได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *W. paramesenteroides* ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล ได้แก่ *A. hydrophila*

MUVS 2018 AH 001, *A. sobria* MUVS 2017 AS, *E. tarda* MUVS 2018 ET1 และ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 และมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์เบื้องต้นบางประการจากทางเดินอาหารของปลาช่อนและปลาทะโลก

Lactiplantibacillus argentoratensis เป็นชื่อใหม่ (New combination) ที่ได้รับการจัดหมวดหมู่ซ้ำ (Reclassification) ของเชื้อ *Lactobacillus argentoratensis* หรือ *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA gene ซ้ำ (Re-evaluation) และการทำ Phylogenomic tree (Liu & Gu, 2020) เดิมแล้ว *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* เป็น Subspecies ของ *Lactobacillus plantarum* ถูกคัดแยกได้ครั้งแรกจากผักในเมือง Strasbourg (Roman: Argentoratus) ประเทศฝรั่งเศส (France) โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และพันธุศาสตร์คล้ายกับ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยเชื้อทั้งสองชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* แตกต่างกัน และ *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* ไม่สามารถหมักน้ำตาล Melezitose และ Methyl α -D-mannoside ได้เหมือน *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์อื่น (Bringel et al., 2005) *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Homofermentative (Zheng et al., 2020) ที่มีการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway ได้ไพรูเวต (Pyruvate) แล้วเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักประมาณ 95% ด้วยเอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase; LDH) (Franz et al., 1999) ซึ่งกรดแลคติกที่เชื้อสร้างขึ้นนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวก และเนื่องจากเชื้อ *L. argentoratensis* AT8/5 มีการหมักน้ำตาลเด็คซ์โตรสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar แบบ Homofermentation จึงทำให้ได้กรดแลคติกปริมาณมากกว่า การหมักแบบ Heterofermentation ของเชื้อ *W. paramesenteroides* CS1/3 และ CE1/1 จึงทำให้ขนาดบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (*A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001, *A. sobria* MUVS 2017 AS, *A. veronii* vsmu 083, *E. ictaluri* 2010/12 EI และ *E. tarda* MUVS 2018 ET1) ของ *L. argentoratensis* AT8/5 มีขนาดใหญ่กว่า *W. paramesenteroides* CS1/3 และ CE1/1 ตัวอย่างเช่น ขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001 ของ *L. argentoratensis* AT8/5 มีขนาด 13.50 ± 0.71 มม. ในขณะที่ *W. paramesenteroides* CS1/3 และ CE1/1 ให้ขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.25 ± 0.35 และ 8.00 ± 0.00 มม. ตามลำดับ เช่นเดียวกับเชื้อ *A. sobria* MUVS 2017 AS โดย *L. argentoratensis* AT8/5 ให้ขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.50 ± 1.41 มม. ในขณะที่ *W. paramesenteroides* CS1/3 และ CE1/1 ให้ขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.50 ± 0.00 และ

8.75±0.35 มม. ตามลำดับ จึงอาจบอกได้ว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของเชื้อดังกล่าวอาจเป็นฤทธิ์ของกรดอินทรีย์ที่เชื้อผลิตขึ้น

ทั้งนี้มียางานการวิจัยที่สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้บางส่วน โดย Agaliya and Jeevaratnam (2012) รายงานว่า *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis* JJ 24 ที่คัดแยกได้จาก Idli batter (อาหารอินเดียชนิดหนึ่ง) มีคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกส์บางประการ ได้แก่ การทนต่อเกลือน้ำดี ความเป็นกรด และสภาวะทางเดินอาหาร การสร้างเอนไซม์ BSH การเกาะกลุ่มกันเอง (Auto-aggregation) และเกาะกับเชื้อต่างสายพันธุ์ (Coaggregation) คุณสมบัติ Cell surface hydrophobicity การทนต่อยาปฏิชีวนะบางชนิด ความสามารถในการนำคอลเลสเตอรอลไปใช้ และการไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ในปีต่อมา Agaliya and Jeevaratnam (2013) รายงานว่า *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis* JJ 24 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิด เช่น *Brevibacterium casei*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Aeromonas hydrophila* โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 11-18 มม. จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้ส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ของเชื้อทดสอบ โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* เท่ากับ 16 มม. ซึ่งใหญ่กว่าบริเวณยับยั้งของไอโซเลต AT8/5 ที่พบในงานวิจัยนี้ที่มีขนาด 13.50±0.71 มม. เช่นเดียวกับการรายงานของ Saraniya and Jeevaratnam (2014) ที่รายงานว่า *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis* 4 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จาก Uttapam batter (อาหารอินเดียชนิดหนึ่ง) มีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila* โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 10.00±1.00 ถึง 19.00±3.00 มม. จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้ส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ของเชื้อทดสอบ โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ของทั้ง 4 ไอโซเลต ตั้งแต่ 14.00±3.00 ถึง 18.00±4.00 มม. ซึ่งใหญ่กว่าบริเวณยับยั้งของไอโซเลต AT8/5 ที่พบในงานวิจัยนี้ และพบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตนี้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3% (w/v) เป็นเวลา 1-7 ชั่วโมง ในขณะที่ไอโซเลต AT8/5 สามารถเจริญในสภาวะดังกล่าวได้ถึง 24 ชั่วโมง แม้จะความเข้มข้นของมีเกลือน้ำดีสูงกว่าถึง 1% (w/v) นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตสามารถทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้จำลองได้ถึง 6 ชั่วโมง โดยมีเชื้อ 2 ไอโซเลตที่มีปริมาณเชื้อลดลง 2 log cycle จากเชื้อเริ่มต้น เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2 ชั่วโมง เช่นเดียวกับไอโซเลต AT8/5 ทั้งนี้ *L. argenteratensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้อาจจากการจัดหมวดหมู่ซ้ำจากเชื้อ *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* ในปี ค.ศ. 2020 ในปัจจุบันจึงยังไม่มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อดังกล่าวมากนัก รวมถึงคุณสมบัติใน

การยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิลและคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกส์เบื้องต้น รวมถึงยังไม่มีรายงานการคัดแยกเชื้อดังกล่าวได้จากปลา ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่ได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *Lactiplantibacillus argentoratensis* ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล *A. hydrophila* MUVS 2018 AH 001, *A. sobria* MUVS 2017 AS, *A. veronii* vsmu 083, *E. ictaluri* 2010/12 EI, *E. tarda* MUVS 2018 ET1 และ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 และมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์เบื้องต้นบางประการจากทางเดินอาหารของปลาหมอ

Kodamaea ohmeri มีชื่อเดิมว่า *Pichia ohmeri* และ *Yamadazyma ohmeri* เป็นยีสต์ในกลุ่ม Ascomycetous yeast อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae เป็นระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Teleomorphic state) ของ *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens* มีรายงานการคัดแยกได้จากธรรมชาติ เช่น ทราบ บ่อน้ำ น้ำทะเล ผลไม้ ดอกไม้ ซีส คีเฟอร์ (Kekir) และจากสัตว์ เช่น น้านมวัว ทางเดินอาหารของม้า วัว เป็ด ไก่ และปลาทะเล ยีสต์ชนิดนี้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้ในกระบวนการหมักผลไม้ เปลือกไม้ และของดอง (Yamada et al., 1995) ในปัจจุบันมีการรายงานว่า *K. ohmeri* มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ได้เช่นกัน โดย García-Hernández et al. (2012) รายงานว่า *Kodamaea ohmeri* ที่คัดแยกได้จากของเสียจากไก่ เนื้อมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์บางประการ คือ การรวมกลุ่มกันและการจับกับเชื้อก่อโรค (Pathogenic adherence) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* และ *Listeria monocytogenes* นอกจากนี้ Azhar et al. (2019) รายงานว่า *Kodamaea ohmeri* ที่คัดแยกได้จากคีเฟอร์ มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์บางประการ ได้แก่ การทนต่อความร้อน ทนต่อยาปฏิชีวนะ Penicillin, Streptomycin และ Ampicillin ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11.00 ± 1.00 มม. ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion โดยใช้ส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ของเชื้อทดสอบ และยังมี ความทนทานต่อกรด โดยสามารถเจริญและให้ค่า OD₆₀₀ ตั้งแต่ 1-2 ในสภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ ยังไม่มีงานวิจัยใดที่รายงานว่า *K. ohmeri* มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี มีคุณสมบัติการยึดเกาะและการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิล *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีรายงานการคัดแยก *K. ohmeri* ได้จากลำไส้ของปลาทะเล *Hexagrammes otakii* (Hirimuthugoda et al., 2006) แต่ยังไม่มียางานการคัดแยกเชื้อดังกล่าวได้จากปลาน้ำจืด และปลาช่อนดังเช่นงานวิจัยนี้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่ได้คัดแยกยีสต์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *K. ohmeri* และมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 และมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์เบื้องต้นบางประการจากทางเดินอาหารของปลาช่อน

Candida tropicalis เป็นยีสต์ในกลุ่ม Anamorphic ascomycetous yeast อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae เป็นสายพันธุ์ต้นแบบ (Type strain) ของยีสต์สกุล *Candida* แหล่งอาศัยของ *C. tropicalis* คือ ดิน น้ำเสีย อาหาร ฟองน้ำทะเล ส่วนต่างๆ ของพืชและสัตว์ สามารถใช้วัตถุดิบหลายชนิดเป็นแหล่งอาหารในการการเจริญ และยังเป็นหนึ่งในยีสต์หลายชนิดที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein; SCP) และยังสามารถใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ย่อยสลายปิโตรเลียมและคราบน้ำมันในแหล่งน้ำ (Zhang et al., 2005) รวมถึงใช้ในการลดความรุนแรงของโรคพืช เช่น โรคข้าวผลเน่า (Fruit rot) ของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Botryodiplodia theobromae* หรือ *Lasiodiplodia theobromae* (มณฑาทิพย์, 2540) อย่างไรก็ตาม Syal and Vohra (2013) ได้รายงานไว้ว่า *Candida tropicalis* ที่คัดแยกได้จาก Idli batter มีคุณสมบัติความเป็นโพไรไบโอติกส์บางประการ ได้แก่ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิร่างกายมนุษย์ สามารถเกาะกลุ่มกันเอง มีคุณสมบัติ Cell surface hydrophobicity ทนต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Penicillin G, Streptomycin และ Tetracycline สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด ได้แก่ ไลเปส โปรติเอส เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β -Galactosidase) ไฟเตส (Phytase) และแอล-แอสพาราจินิก (L-Asparaginase) สามารถผลิตวิตามินบี 12 และ Exopolysaccharide ลดปริมาณโคเรสเตอรอล ไม่ผลิตเอนไซม์เจลาติเนส (Gelatinase) และดีเอ็นเอส (DNase) และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* และ *Vibrio cholerae* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 16 ถึง 36 มม. ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Double layer นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อความเป็นกรดที่ค่า pH เท่ากับ 2, 2.5 และ 3 โดยมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% ที่เวลา 3 ชั่วโมง และทนต่อเกลือความเข้มข้น 1% (w/v) โดยมีอัตราการรอดชีวิตตั้งแต่ 98.00 \pm 0.37 ถึง 100.00 \pm 0.39% ที่เวลา 5 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ Ogunremi et al. (2015) ที่รายงานไว้ว่า *Candida tropicalis* ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักพื้นเมืองของชาวไนจีเรียมีคุณสมบัติความเป็นโพไรไบโอติกส์บางประการ ได้แก่ การเจริญที่อุณหภูมิ 37°C การรอดชีวิตในสภาวะกรด และการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส ไฟเตส และเอสเทอเรส (Esterase) สำหรับ Karasu-Yalcin et al. (2019) รายงานว่า *Candida tropicalis* ที่คัดแยกได้จาก Mihalic cheese (อาหารตุรกีชนิดหนึ่ง) มีคุณสมบัติความเป็นโพไรไบโอติกส์บางประการ ได้แก่ ความสามารถในการย่อยสลายไขมัน การหมักและการดูดซึมน้ำตาล และกรดอินทรีย์บางชนิด การเจริญในช่วงอุณหภูมิ 10-45°C ค่า pH ในช่วง 2.5-5.4 ความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 5-15% การทนต่อเกลือความเข้มข้น และความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งน้อยกว่า 1 มม. ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Agar-cup diffusion นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ *C. tropicalis* เป็นยีสต์โพไรไบโอติกส์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลา *Rhamdia quelen* อีกด้วย (Guidoli et al., 2017) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมี

รายงานการคัดแยก *C. tropicalis* ได้จากโลมา วาฬ และปลาทะเลหลายชนิด (Morii, 1973; Roth Jr et al., 1962; Takahashi et al., 2010) รวมถึงปลาน้ำจืดอย่างปลาหมอ (Das & Ghosh, 2013) แต่ยังไม่มียานวิจัยใดที่รายงานว่าคัดแยก *C. tropicalis* ได้จากทางเดินอาหารของปลานิลเช่นเดียวกับงานวิจัยในครั้งนี้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่ได้คัดแยกยีสต์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *C. tropicalis* และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิล *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 และ *E. ictaluri* 2010/12 EI และมีคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์เบื้องต้นบางประการจากทางเดินอาหารของปลานิล

Aureobasidium melanogenum เป็นยีสต์ดำ (Black yeast) ที่พบได้ทั่วไปธรรมชาติทั้งในน้ำผึ้ง ดิน โคลน ไม้ผุ หินปูน น้ำ ทะเลทราย ตลอดจนสภาพแวดล้อมที่เปียกแฉะ เช่น ผนังห้องน้ำ (Hsu et al., 2021; Jiang et al., 2016) ในอดีตเคยถูกจัดเป็น 1 ใน 4 Varieties ของ *Aureobasidium pullulans* ซึ่งประกอบด้วย *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum*, *A. pullulans* var. *subglaciale* และ *A. pullulans* var. *namibiae* (Gostinčar et al., 2014) *A. pullulans* var. *melanogenum* สามารถผลิตสารประกอบชีวภาพได้หลายชนิด เช่น พูลูลูลาน (Pullulan) และเอนไซม์ไซแลนเนส (Xylanase) ที่ถูกนำมาใช้ในทางการค้าและอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ ยา เครื่องสำอาง และอาหารทั้งคนและสัตว์ (Chuang et al., 2020; Manitchotpisit et al., 2009) ทั้งนี้ Hsu et al. (2021) ได้ศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์บางประการของ *Aureobasidium melanogenum* ที่คัดแยกได้จากเกสรผึ้ง (Bee bread หรือ Bee pollen) จากดอกชา (*Camellia sinensis*) พบว่า สารสกัดหยาบ Exopolysaccharide จากเชื้อ *A. melanogenum* ช่วยเพิ่มจำนวนประชากรแบคทีเรียในฟิล์ม γ -Proteobacteria, Bacteroidetes และ Actinobacteria ในลำไส้ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) และพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารอาหาร คือ *mijt1* (Major royal jelly protein 1) และ *vg* (Vitellogenin) ในผึ้งพันธุ์ที่ได้รับอาหารที่ผสมสปอร์ของ *A. melanogenum* และเกสรผึ้ง จึงทำให้ *A. melanogenum* มีประสิทธิภาพในการเป็นโพรบิโอติกส์สำหรับผึ้งหากใช้ร่วมกับเกสรผึ้ง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์อื่นๆ ได้แก่ การทนต่อกรดและเกลือ น้ำดี การยึดเกาะพื้นผิว และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล *A. sobria* และ *E. ictaluri* รวมถึงยังไม่มีรายงานการคัดแยก *A. melanogenum* จากทางเดินอาหารของปลา ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่ได้คัดแยกยีสต์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *A. melanogenum* และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิล *A. sobria* MUVS 2017 AS และ *E. ictaluri* 2010/12 EI และมีคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกส์เบื้องต้นบางประการจากทางเดินอาหารของปลาหมอ

ทั้งนี้ ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลของ *Aureobasidium* sp. อาจเกิดจากสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่เชื้อสร้างขึ้น อาทิเช่น (1) 2-Propylacrylic acid (2) 8,9-Dihydroxy-2-methyl-4H,5H-pyrano [3,2-c]-chromon-4-one (3) 2-Methylenesuccinic acid (4) Hexane-1,2,3,5,6-hexol และ (5) Liamocin โดยมีการรายงานว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Sarcina ventriculi* และ *Streptococcus* spp. (Bischoff et al., 2015; Botić et al., 2014; Zain et al., 2009)



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จากตัวอย่างทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ จากตลาดสด และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาชนิด 6 ชนิด พบว่า สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 245 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรีย 68 ไอโซเลต และเป็นยีสต์ 177 ไอโซเลต จากนั้นคัดเลือกไอโซเลตที่คัดแยกได้จำนวน 55 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดได้อย่างน้อย 3 ชนิด และให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร จำนวน 39 ไอโซเลต และยีสต์ทุกไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดได้จำนวน 16 ไอโซเลต มาทดสอบคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เบื้องต้น ได้แก่ การทนต่อเกลือ น้ำดี ทนความเป็นกรดสูง การยึดเกาะพื้นผิว และการสร้างไบโอฟิล์ม จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดีจำนวน 7 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้จำลองของปลา พบว่า มีไอโซเลตที่มีชีวิตรอดทั้งในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้จำลอง จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ YON3/2, YCS1/1, YCS1/3, YID23 และ AT8/5 โดยมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 108.07, 107.19, 104.65, 101.59 และ 76.07% ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกทั้ง 7 ไอโซเลตมาระบุชนิดด้วยลักษณะทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สำหรับแบคทีเรีย และยีนส่วน D1/D2 domain ใน 26S rDNA สำหรับยีสต์ พบว่า ไอโซเลต CS1/3, CE1/1, AT8/5, YCS1/1, YCS1/3, YON3/2 และ YID23 มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%Identity) กับ *Weissella paramesenteroides*, *W. paramesenteroides*, *Lactiplantibacillus argentoratensis*, *Kodamaea ohmeri*, *K. ohmeri*, *Candida tropicalis* และ *Aureobasidium melanogenum* ตามลำดับ

แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลและมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์เบื้องต้น ตลอดจนสามารถทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารจำลองได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต อาจจะสามารถทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารจริงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับปลานิลในระดับห้องปฏิบัติการและระดับฟาร์ม ตลอดจนอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกส์เพื่อเพิ่มความต้านทานโรคติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะไอโซเลต AT8/5 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลได้ทุกชนิด และยีสต์ไอโซเลต YON3/2 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 2 ชนิด หนึ่งในนั้นคือ *S. agalactiae* MUVS 2017 SA 001 จึงอาจนำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตนี้ มาใช้เป็นโพรไบโอติกส์เพื่อเป็นการทดแทนหรือลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลานิลต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

- Abdel-Ghany, H. M., Mohamed El-S, S., Abouelkhier, S. S., & Helal, A. M. (2020). Effect of a cocktail of enzymes and probiotics on the growth and the bacterial enumeration in gut and effluents of red tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 289-294.
- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A. M., & Ismael, N. E. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280(1-4), 185-189.
- Aboyadak, I., Ali, N., Goda, A., Aboelgalagel, W., & Salam, A. (2015). Molecular detection of *Aeromonas hydrophila* as the main cause of outbreak in tilapia farms in Egypt. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 2(6), 2-5.
- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., & Zilberg, D. (2004). Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 238(1-4), 97-105.
- Agaliya, P. J., & Jeevaratnam, K. (2012). Screening of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented idli batter for probiotic properties. *African Journal of Biotechnology*, 11(65), 12856-12864.
- Agaliya, P. J., & Jeevaratnam, K. (2013). Molecular characterization of lactobacilli isolated from fermented idli batter. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1199-1206.
- Agnew, W., & Barnes, A. C. (2007). *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, 122(1-2), 1-15.
- Aguilar-Uscanga, B., & Francois, J. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 268-274.
- Alakomi, H.-L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001-2005.

- Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G., & Mohamed, M. F. (2008). Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, 277(1-2), 1-6.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E., & Montanaro, L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials*, 23(21), 4233-4239.
- Atal, C. (1982). Chemistry of some biologically active Indian medicinal plants. *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part A. Physical sciences*.
- Azhar, M. A., Sakinah, M., & Munaim, A. (2019). Isolation and molecular identification of potential probiotic yeast strains found in Malaysian kefir drinks samples. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 8(4), 128-131.
- Bafort, F., Parisi, O., Perraudin, J.-P., & Jijakli, M. (2014). Mode of action of lactoperoxidase as related to its antimicrobial activity: a review. *Enzyme Research*, 2014, 1-13.
- Balakrishna, A. (2013). *In vitro* evaluation of adhesion and aggregation abilities of four potential probiotic strains isolated from guppy (*Poecilia reticulata*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(5), 793-800.
- Banerjee, S., Vishakha, K., Das, S., Dutta, M., Mukherjee, D., Mondal, J., . . . Ganguli, A. (2020). Antibacterial, anti-biofilm activity and mechanism of action of pancreatin doped zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 190, 110921.
- Banks, J., Board, R. G., & Sparks, N. (1986). Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 8(2-3), 103-147.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., . . . Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695-701.
- Bearson, S., Bearson, B., & Foster, J. W. (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 147(2), 173-180.
- Begley, M., Gahan, C. G., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 625-651.

- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Bischoff, K. M., Leathers, T. D., Price, N. P., & Manitchotpsit, P. (2015). Liamocin oil from *Aureobasidium pullulans* has antibacterial activity with specificity for species of *Streptococcus*. *Journal of Antibiotics*, 68(10), 642-645.
- Bobbillapati, J., Myneni, R., Kumar, K., Gousia, S., & Naveena Lavanya Latha, J. (2016). Methods of Determination of Biofilm Formation by *Candida albicans*. *Research Journal of Microbiology*, 12(1), 90-96.
- Botić, T., Kralj-Kunčić, M., Sepčić, K., Batista, U., Zalar, P., Knez, Ž., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Biological activities of organic extracts of four *Aureobasidium pullulans* varieties isolated from extreme marine and terrestrial habitats. *Natural Product Research*, 28(12), 874-882.
- Boyd, J., West, J., & Bernard, J. (2011). Effects of the addition of direct-fed microbials and glycerol to the diet of lactating dairy cows on milk yield and apparent efficiency of yield. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4616-4622.
- Branco, P., Francisco, D., Monteiro, M., Almeida, M. G., Caldeira, J., Arneborg, N., . . . Albergaria, H. (2017). Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 159-171.
- Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D. K., Felis, G. E., Torriani, S., & Dellaglio, F. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1629-1634.
- Brink, B., Minekus, M., Van der Vossen, J., Leer, R., & Huis, J. (1994). Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 140-148.
- Bron, P. A., Van Baarlen, P., & Kleerebezem, M. (2012). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 66-78.

- Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E., & Sahl, H.-G. (1998). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(1), 154-160.
- Byczkowski, J. Z., & Gessner, T. (1988). Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry*, 20(6), 569-580.
- Cardinali, G., & Martini, A. (1994). Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 791-797.
- Carmelo, V., Santos, H., & Sá-Correia, I. (1997). Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1325(1), 63-70.
- Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., . . . Navarrete, P. (2015). Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1093.
- Cavalero, D. A., & Cooper, D. G. (2003). The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Journal of Biotechnology*, 103(1), 31-41.
- Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41(5), 539-543.
- Chen, M. J., Tang, H. Y., & Chiang, M. L. (2017). Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefirifaciens* M1. *Food Microbiology*, 66, 20-27.
- Chen, S. W., Liu, C. H., & Hu, S. Y. (2019). Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 695-703.

- Chen, Y., Aorigele, C., Wang, C., Simujide, H., & Yang, S. (2015). Screening and extracting mycocin secreted by yeast isolated from koumiss and their antibacterial effect. *Journal of Food and Nutrition Research*, 3(1), 52-56.
- Cherrington, C., Hinton, M., Mead, G., & Chopra, I. (1991). Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Advances in Microbial Physiology*, 32, 87-108.
- Chitmanat, C., Lebel, P., Whangchai, N., Promya, J., & Lebel, L. (2016). Tilapia diseases and management in river-based cage aquaculture in northern Thailand. *Journal of Applied Aquaculture*, 28(1), 9-16.
- Chou, L. S., & Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 23-31.
- Chuang, W. Y., Hsieh, Y. C., & Lee, T. T. (2020). The effects of fungal feed additives in animals: A review. *Animals*, 10(5), 805.
- Collins, M., Samelis, J., Metaxopoulos, J., & Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 595-603.
- Conte, F. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3-4), 205-223.
- Cumberbatch, N., Gurwith, M. J., Langston, C., Sack, R. B., & Brunton, J. L. (1979). Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infection and Immunity*, 23(3), 829-837.
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(6), 767-778.
- D'souza, A. L., Rajkumar, C., Cooke, J., & Bulpitt, C. J. (2002). Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *British Medical Journal*, 324(7350), 1-6.

- Dalmaso, G., Loubat, A., Dahan, S., Calle, G., Rampal, P., & Czerucka, D. (2006). *Saccharomyces boulardii* prevents TNF- α -induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. *Research in Microbiology*, 157(5), 456-465.
- Damián, R. F., Zesati, R. V., Fernández, L. S., & García, J. L. A. (1995). Septicemia due to *Aeromonas hydrophila* in a pregnant woman: A case report and review of the literature. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 3(6), 252-255.
- Dangwetngam, M., Suanyuk, N., Kong, F., & Phromkunthong, W. (2016). Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from infected cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand: Nine-year perspective. *Journal of Medical Microbiology*, 65(3), 247-254.
- Das, P., & Ghosh, K. (2013). The presence of phytase in yeasts isolated from the gastrointestinal tract of four major carps [*Labeo rohita* (Hamilton, 1822), *Catla catla* (Hamilton, 1822), *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822), *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844)], climbing perch [*Anabas testudineus* (Bloch, 1792)] and Mozambique tilapia [*Oreochromis mossambicus* (Linnaeus, 1758)]. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(2), 403-407.
- Davidson, P. M. (2001). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. Doyle, L. Beuchat & T. Montville (Eds.), *Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers* (2nd ed. ed., pp. 765-801). Washington, DC.: American Society for Microbiology.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16(9), 1058-1071.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2009). Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances*, 27(6), 680-685.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., & Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 159-184.

- Desai, A. R., Links, M. G., Collins, S. A., Mansfield, G. S., Drew, M. D., Van Kessel, A. G., & Hill, J. E. (2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350-353, 134-142.
- Dinoto, A., Sulistiani, Suswati, Handayani, R., & Julistiono, H. (2018). *Weissella paramesenteroides* from intestine of Indonesian eel (*Anguilla bicolor McClelland*) and their potential antimicrobial property. Paper presented at the AIP Conference Proceedings.
- do Vale Pereira, G., Da Cunha, D., Pedreira Mourino, J., Rodiles, A., Jaramillo-Torres, A., & Merrifield, D. (2017). Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and isolation of potential probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 123(5), 1298-1311.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Singh, P., & Singh, B. R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PloS One*, 13(3), e0192978.
- Drider, D., Fimland, G., Héchar, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 564-582.
- Duangjitcharoen, Y., Kantachote, D., Ongsakul, M., Poosaran, N., & Chaiyasut, C. (2008). Selection of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented plant beverages. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(4), 652-655.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., . . . Daly, C. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 386-392.
- Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P., & Pace, N. R. (1991). Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified

- 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 324-325.
- Eklund, T. (1984). The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*, 1(4), 179-185.
- El-Beltagy, A., El-Adawy, T., Rahma, E., & El-Bedawey, A. (2004). Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chemistry*, 86(1), 33-39.
- Epperly, B., & Dekker, E. (1989). Inactivation of *Escherichia coli* L-threonine dehydrogenase by 2, 3-butanedione: evidence for a catalytically essential arginine residue. *Journal of Biological Chemistry*, 264(31), 18296-18301.
- Escobar-Ramírez, M. C., Jaimez-Ordaz, J., Escorza-Iglesias, V. A., Rodríguez-Serrano, G. M., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., . . . González-Olivares, L. G. (2020). *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05: An *in vitro* digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage. *Revista Argentina de microbiología*, 52(4), 305-314.
- Essa, M. A., El-Serafy, S., El-Ezabi, M. M., Daboor, S. M., Esmael, N. A., & Lall, S. P. (2010). Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 5(2), 143-162.
- Evans, J. J., Klesius, P. H., Pasnik, D. J., & Bohnsack, J. F. (2009). Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 774-776.
- FAO/WHO. (2001). Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria (pp. 1-4).
- Ferreira, A. A., Tette, P. A. S., MeNDONÇA, R. C. S., Soares, A. d. S., & Carvalho, M. M. D. (2014). Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in *Staphylococcus* spp. isolated from a poultry processing plant. *Food Science and Technology*, 34(4), 710-716.
- Fessard, A., & Remize, F. (2017). Why are *Weissella* spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation? *Fermentation*, 3(3), 38.

- Figueiredo, H., Nobrega Netto, L., Leal, C., Pereira, U. P., & Mian, G. F. (2012). *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 576-580.
- Fitzgerald, K. A., Davies, A., & Russell, A. (1992). Effect of chlorhexidine and phenoxyethanol on cell surface hydrophobicity of gram-positive and gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 14(3), 91-95.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Italy: FAO Fisheries and Aquaculture Department.
- Fortin, O., Aguilar-Uscanga, B. R., Vu, K. D., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2018). Effect of *Saccharomyces boulardii* cell wall extracts on colon cancer prevention in male F344 rats treated with 1, 2-dimethylhydrazine. *Nutrition and Cancer*, 70(4), 632-642.
- Fracchia, L., Cavallo, M., Allegrone, G., & Martinotti, M. (2010). A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2, 827-837.
- Franz, C. M., Holzappel, W. H., & Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47(1-2), 1-24.
- Freeman, D., Falkiner, F., & Keane, C. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872-874.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365-378.
- García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Nicolli, J. R., Iglesias, A. E., . . . Halaihel, N. (2012). Identification and *in vitro* screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 798-802.
- Gastalho, S., Silva, G., & Ramos, F. (2014). Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: health care impact. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 3(1), 28-44.
- Gatesoupe, F. (2007). Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*, 267(1-4), 20-30.

- Gauthier, D. T. (2015). Bacterial zoonoses of fishes: a review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *The Veterinary Journal*, 203(1), 27-35.
- Gedek, B. (1999). Adherence of *Escherichia coli* serogroup O157 and the *Salmonella* Typhimurium mutant DT104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses*, 42(4), 261-264.
- Geldreich, E. E. (1976). Microbiology of Water. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 48(6), 1338-1356.
- Geraylou, Z., Vanhove, M. P., Souffreau, C., Rurangwa, E., Buyse, J., & Ollevier, F. (2014). *In vitro* selection and characterization of putative probiotics isolated from the gut of *Acipenser baerii* (Brandt, 1869). *Aquaculture Research*, 45(2), 341-352.
- Ghiraldelli, L., Martins, M. L., & Yamashita, M. M. (2006). First record of *Trichodina compacta* Van As and Basson, 1989 (Protozoa: Ciliophora) from cultured Nile Tilapia in the state of Santa Catarina, Brazil. *International Journal of Zoological Research*, 2(4), 369-375.
- Goodwin, A., Park, E., & Nowak, B. (2005). Successful treatment of largemouth bass, *Micropterus salmoides* (L.), with epitheliocystis hyperinfection. *Journal of Fish Diseases*, 28(10), 623-625.
- Gostinčar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., . . . Han, J. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics*, 15(1), 1-29.
- Govindaraj, K., Samayanpaulraj, V., Narayanadoss, V., & Uthandakalaipandian, R. (2021). Isolation of Lactic Acid Bacteria from Intestine of Freshwater Fishes and Elucidation of Probiotic Potential for Aquaculture Application. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-13.
- Grogan, D. W., & Cronan Jr, J. E. (1997). Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 429-441.
- Gross, E., & Morell, J. L. (1971). Structure of Nisin. *Journal of the American Chemical Society*, 93(18), 4634-4635.
- Gudding, R., Lillehaug, A., & Evensen, Ø. (1999). Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(1-2), 203-212.

- Guidoli, M. G., Mendoza, J. A., Cáceres, A. d. l. C., Boehringer, S. I., & Sánchez, S. (2017). Autochthonous yeasts as growth factor in *Rhamdia quelen*: preliminary approaches. *Revista Veterinaria*, 28(1), 37-40.
- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y., & Kim, J. M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.
- Haddaji, N., Mahdhi, A. K., Krifi, B., Ismail, M. B., & Bakhrouf, A. (2015). Change in cell surface properties of *Lactobacillus casei* under heat shock treatment. *FEMS Microbiology Letters*, 362(9), fnv047.
- Halm, M., Hornbaek, T., Arneborg, N., Sefa-Dedeh, S., & Jespersen, L. (2004). Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1), 97-103.
- Hao, K., Wu, Z.-Q., Li, D.-L., Yu, X.-B., Wang, G.-X., & Ling, F. (2017). Effects of dietary administration of *Shewanella xiamenensis* A-1, *Aeromonas veronii* A-7, and *Bacillus subtilis*, single or combined, on the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) intestinal microbiota. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(4), 386-396.
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-12.
- Hazen, T., Fliermans, C., Hirsch, R., & Esch, G. (1978). Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(5), 731-738.
- Helmy, E., Soliman, S., Abdel-Ghany, T. M., & Ganash, M. (2019). Evaluation of potentially probiotic attributes of certain dairy yeast isolated from buffalo sweetened Karish cheese. *Heliyon*, 5(5), e01649.
- Hennequin, C., Kauffmann-Lacroix, C., Jobert, A., Viard, J., Ricour, C., Jacquemin, J., & Berche, P. (2000). Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(1), 16-20.
- Hernández-Gómez, J. G., López-Bonilla, A., Trejo-Tapia, G., Ávila-Reyes, S. V., Jiménez-Aparicio, A. R., & Hernández-Sánchez, H. (2021). *In vitro* bile salt hydrolase (BSH) activity screening of different probiotic microorganisms. *Foods*, 10(3), 674.

- Hirimuthugoda, N., Chi, Z., Li, X., Wang, L., & Wu, L. (2006). Diversity of phytase-producing marine yeasts. *Ciencias Marinas*, 32(4), 673-682.
- Hsu, C. K., Wang, D. Y., & Wu, M. C. (2021). A Potential Fungal Probiotic *Aureobasidium melanogenum* CK-CsC for the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Journal of Fungi*, 7(7), 508.
- Huang, H., Zhou, P., Chen, P., Xia, L., Hu, S., Yi, G., . . . Peng, J. (2020). Alteration of the gut microbiome and immune factors of grass carp infected with *Aeromonas veronii* and screening of an antagonistic bacterial strain (*Streptomyces flavotricini*). *Microbial Pathogenesis*, 143, 104092.
- Huang, J., Lehe, M., Sheng, Q., Shanqing, Y., & Dongqiang, L. (2007). Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15(2), 157-161.
- Hutkins, R. W., & Nannen, N. L. (1993). pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 76(8), 2354-2365.
- Ibryamova, S., Ivanov, R., & Ignatova-Ivanova, T. S. (2018). Study of the anticorrosion effect of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus fermentum* Ts cultivated on different carbohydrates. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(6), 366-374.
- Ip, M., Cheuk, E. S., Tsui, M. H., Kong, F., Leung, T., & Gilbert, G. L. (2006). Identification of a *Streptococcus agalactiae* serotype III subtype 4 clone in association with adult invasive disease in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4252.
- Jantrakajorn, S., Maisak, H., & Wongtavatchai, J. (2014). Comprehensive investigation of streptococcosis outbreaks in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and red tilapia, *Oreochromis* sp., of Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(4), 392-402.
- Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 525-532.
- Jiang, H., Liu, N. N., Liu, G. L., Chi, Z., Wang, J. M., Zhang, L. L., & Chi, Z. M. (2016). Melanin production by a yeast strain XJ5-1 of *Aureobasidium melanogenum* isolated from the Taklimakan desert and its role in the yeast survival in stress environments. *Extremophiles*, 20(4), 567-577.

- Jigami, Y., & Odani, T. (1999). Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1426(2), 335-345.
- Jobling, M. (1995). Fish bioenergetics. *Oceanographic Literature Review*, 9(42), 785.
- Jutakanoke, R., Endoh, R., Takashima, M., Ohkuma, M., Tanasupawat, S., & Akaracharanya, A. (2017). *Allodekkera sacchari* gen. nov., sp. nov., a Yeast Species in the Saccharomycetales Isolated from a Sugar Factory. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(2), 250-255.
- Jutakanoke, R., Tanasupawat, S., & Akaracharanya, A. (2014). Characterization and ethanol fermentation of *Pichia* and *Torulaspota* strains. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(4), 52.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), 1221-1227.
- Kamau, D., Doores, S., & Pruitt, K. (1990). Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2711-2716.
- Karasu-Yalcin, S., Senses-Ergul, S., & Ozbas, Z. (2019). Yeast strains with technological and probiotic traits isolated from Mihalic cheese. *International Food Research Journal*, 26(4), 1359-1370.
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 233-244.
- Kavitha, M., Raja, M., & Perumal, P. (2018). Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquaculture Reports*, 11, 59-69.
- Kawai, Y., Saito, T., Toba, T., Samant, S. K., & Itoh, T. (1994). Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasserii* LA39. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(7), 1218-1221.
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Katagiri, T., Hirono, I., & Rodkhum, C. (2014). Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(4), 488-495.

- Kazun, B., Kazun, K., Zylinska, J., & Siwicki, A. K. (2018). *In vitro* study of *Lactobacillus plantarum* properties as a potential probiotic strain and an alternative method to antibiotic treatment of fish. *Fisheries & Aquatic Life*, 26(1), 47-55.
- Kent, M., Traxler, G., Kieser, D., Richard, J., Dawe, S., Shaw, R., . . . Evelyn, T. (1998). Survey of salmonid pathogens in ocean-caught fishes in British Columbia, Canada. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(2), 211-219.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.
- Khagwal, N., Sharma, P., & Sharma, D. C. (2014). Screening and evaluation of *Lactobacillus* spp. for the development of potential probiotics. *African Journal of Microbiology Research*, 8(15), 1573-1579.
- Khunrang, T., Pooljun, C., Wutisutimeethavee, S., & Direkbusarakom, S. (2021). Effects of Mixed Probiotic (*Lactobacillus* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*) on the Growth Performance and Immune Gene Expression of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after *Streptococcus agalactiae* Vaccination. *Aquaculture Research*, 52(1), 3882–3889.
- Kim, D.-H., & Kim, D.-y. (2013). Microbial diversity in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 414-415, 103-108.
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337-349.
- Kobayashi, H., Suzuki, T., & Unemoto, T. (1986). Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 261(2), 627-630.
- Kong, S., & Davison, A. J. (1980). The role of interactions between O_2 , H_2O_2 , OH , e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 204(1), 18-29.
- Kotowska, M., Albrecht, P., & Szajewska, H. (2005). *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 21(5), 583-590.

- Kunyeit, L., Kurrey, N. K., Anu-Appaiah, K., & Rao, R. P. (2019). Probiotic yeasts inhibit virulence of non-albicans *Candida* species. *MBio*, *10*(5), e02307-02319.
- Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B., Balevi, T., & Polat, E. (2004). Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Additives and Contaminants*, *21*(9), 817-823.
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts from Analysis of Nuclear Large Subunit (26S) Ribosomal DNA Partial Sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, *73*(4), 331-371.
- Laconi, S., & Pompei, R. (2007). Study and characterization of intestinal yeasts of mullet (*Mugil* spp.) for potential probiotic use. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *5*(3&4), 475-480.
- Lara-Flores, M., & Olvera-Novoa, M. A. (2013). The use of lactic acid bacteria isolated from intestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), as growth promoters in fish fed low protein diets. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *41*(3), 490-497.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(3), 171-184.
- Lee, H., & Lee, Y. (2008). A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. *Letters in Applied Microbiology*, *46*(6), 676-681.
- Lepargneur, J., & Rousseau, V. (2002). Protective role of the Doderlein flora. *Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction*, *31*(5), 485-494.
- Li, J., Li, D., Gong, L., Ma, Y., He, Y., & Zhai, H. (2006). Effects of live yeast on the performance, nutrient digestibility, gastrointestinal microbiota and concentration of volatile fatty acids in weanling pigs. *Archives of Animal Nutrition*, *60*(4), 277-288.
- Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J., & Servin, A. (2000). *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, *47*(5), 646-652.

- Lima, J. L. d. C., Alves, L. R., Paz, J. N. P. d., Rabelo, M. A., Maciel, M. A. V., & Morais, M. M. C. d. (2017). Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 29(3), 310-316.
- Lindgren, S. E., & Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 7(1-2), 149-163.
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3735-3740.
- Liu, D. D., & Gu, C. T. (2020). Proposal to reclassify *Lactobacillus zhaodongensis*, *Lactobacillus zae*, *Lactobacillus argentoratensis* and *Lactobacillus buchneri* subsp. *silagei* as *Lacticaseibacillus zhaodongensis* comb. nov., *Lacticaseibacillus zae* comb. nov., *Lactiplantibacillus argentoratensis* comb. nov. and *Lentilactobacillus buchneri* subsp. *silagei* comb. nov., respectively and *Apilactobacillus kosoi* as a later heterotypic synonym of *Apilactobacillus micheneri*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6414-6417.
- Liu, Q., Yu, Z., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1-11.
- Lonvaud-Funel, A. (2014). Leuconostocaceae Family. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. United States: Academic Press.
- Looijesteijn, P. J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., & Hugenholtz, J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 71-80.
- Macedo, N., & Brigham, C. J. (2014). From beverages to biofuels: The journeys of ethanol-producing microorganisms. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3(3), 79-87.
- Madigan, M. T., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). Brock-Biology of Microorganisms. 12th International Edition: Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA94111.

- Mahdhi, A., Hmila, Z., Behi, A., & Bakhrouf, A. (2011). Preliminary characterization of the probiotic properties of *Candida famata* and *Geobacillus thermoleovorans*. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(3), 129-134.
- Mahdhi, A., Leban, N., Chakroun, I., Bayar, S., Mahdouani, K., Majdoub, H., & Kouidhi, B. (2018). Use of extracellular polysaccharides, secreted by *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* spp., as reducing indole production agents to control biofilm formation and efflux pumps inhibitor in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 125, 448-453.
- Mahmoudi, I., Moussa, O. B., Khaldi, T. E. M., Kebouchi, M., Soligot, C., Le Roux, Y., & Hassouna, M. (2016). Functional *in vitro* screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research*, 137, 91-98.
- Maillard, J. (2002). Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 16S-27S.
- Maisak, H., Patamalai, B., Amonsin, A., & Wongtavatchai, J. (2008). *Streptococcosis in Thai cultured tilapia Oreochromis nilotica*. Paper presented at the the 7th Chulalongkorn University Veterinary Science Annual Conference, Bangkok.
- Maji, U. J., Mohanty, S., Mahapatra, A. S., & Maiti, N. K. (2016). Diversity and probiotic potentials of putative lactic acid bacteria for application in freshwater aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(4), 805-818.
- Manitchotpisit, P., Leathers, T. D., Peterson, S. W., Kurtzman, C. P., Li, X. L., Eveleigh, D. E., . . . Vermillion, K. E. (2009). Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Mycological Research*, 113(10), 1107-1120.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- Marin, M., Benito, Y., Pin, C., Fernandez, M., Garcia, M., Selgas, M., & Casas, C. (1997). Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 24(1), 14-18.

- Martins, L. C., Monteiro, C. C., Semedo, P. M., & Sá-Correia, I. (2020). Valorisation of pectin-rich agro-industrial residues by yeasts: Potential and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*, 6527-6547.
- Maupas, J., Champemont, P., & Delforge, M. (1983). Treatment of irritable bowel syndrome with *Saccharomyces boulardii*: a double-blind, placebo-controlled study. *Médecine et Chirurgie Digestives*, *12*(1), 77-79.
- McFarland, L. V. (1996). *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clinical Infectious Diseases*, *22*(1), 200-201.
- Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K., & Tongpim, S. (2018). Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Plamong *Pangasius bocourti*. *Fish & Shellfish Immunology*, *73*(1), 1-10.
- Melhem, M., Bertoletti, A., Lucca, H., Silva, R., Meneghin, F., & Szeszs, M. (2013). Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(4), 1257-1266.
- Melo-Bolívar, J. F., Ruiz Pardo, R. Y., Hume, M. E., Nisbet, D. J., Rodríguez-Villamizar, F., Alzate, J. F., . . . Villamil Díaz, L. M. (2019). Establishment and characterization of a competitive exclusion bacterial culture derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) gut microbiomes showing antibacterial activity against pathogenic *Streptococcus agalactiae*. *PloS One*, *14*(5), e0215375.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Bøgwald, J., . . . Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, *302*(1-2), 1-18.
- Mian, G., Godoy, D., Leal, C., Yuhara, T., Costa, G., & Figueiredo, H. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, *136*(1-2), 180-183.
- Midhun, S. J., Neethu, S., Vysakh, A., Sunil, M., Radhakrishnan, E., & Jyothis, M. (2017). Antibacterial activity of autochthonous bacteria isolated from *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) and its *in vitro* probiotic characterization. *Microbial Pathogenesis*, *113*, 312-320.

- Mishra, C., & Lambert, J. (1996). Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5(1), 20-24.
- Mitsuoka, T. (2000). Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *Bioscience and Microflora*, 19(1), 15-25.
- Miyazawa, E., Iwabuchi, A., & Yoshida, T. (1996). Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorus, calcium and magnesium in germfree and conventionalized rats. *Nutrition Research*, 16(4), 603-613.
- Mogensen, G., Salminen, S., Crittenden, R., Bianchi, S., & Zink, R. (2002). Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bulletin-International Dairy Federation*, 377, 10-19.
- Mohanty, B., & Sahoo, P. (2007). Edwardsiellosis in fish: a brief review. *Journal of Biosciences*, 32(3), 1331-1344.
- Morelli, L. (2000). *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(2), 59-67.
- Morii, H. (1973). Yeasts predominating in the stomach of marine little toothed whales. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 39(3), 333.
- Mueangkan, N., & Chirapongsatonkul, N. (2018). Efficacy of herbal extracts to control multi-antibiotics resistant (MAR) *Aeromonas veronii* isolated from motile *Aeromonas* septicemia (MAS)-exhibiting Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Agricultural Technology*, 14(7 Special Issue), 2191-2206.
- Muthukumar, P., & Kandeepan, C. (2015). Isolation, identification and characterization of probiotic organisms from intestine of fresh water fishes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), 607-616.
- Nettles, C. G., & Barefoot, S. F. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 56(4), 338-356.
- Ngov, S., Sukboonyasatit, D., & Paseephol, T. (2014). Enhancement of probiotic survival in low pH and bile salt condition using alginate-hi-maize starch encapsulation. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 19, 141-147.
- Nguyen, T., Fleet, G., & Rogers, P. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 206-212.

- Nikou, S.-A., Kichik, N., Brown, R., Ponde, N. O., Ho, J., Naglik, J. R., & Richardson, J. P. (2019). *Candida albicans* interactions with mucosal surfaces during health and disease. *Pathogens*, 8(2), 53.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1), 79-86.
- Offei, B., Vandecruys, P., De Graeve, S., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Genome Research*, 29(9), 1478-1494.
- Ogunremi, O., Sanni, A., & Agrawal, R. (2015). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797-808.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., & Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9(1), 43-52.
- Pabari, K., Pithva, S., Kothari, C., Purama, R. K., Kondepudi, K. K., Vyas, B. R. M., . . . Ambalam, P. (2020). Evaluation of probiotic properties and prebiotic utilization potential of *Weissella paramesenteroides* isolated from fruits. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1-13.
- Pacheco, I., Díaz-Sánchez, S., Contreras, M., Villar, M., Cabezas-Cruz, A., Gortázar, C., & de la Fuente, J. (2021). Probiotic Bacteria with High Alpha-Gal Content Protect Zebrafish against Mycobacteriosis. *Pharmaceuticals*, 14(7), 635.
- Pagliardini, J., Hubmann, G., Bideaux, C., Alfenore, S., Nevoigt, E., & Guillouet, S. E. (2010). Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 1-13.
- Pan, W.-H., Li, P.-L., & Liu, Z. (2006). The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 12(3), 148-152.

- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 50(3), 512-542.
- Parkes, G. C., Sanderson, J. D., & Whelan, K. (2009). The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Lancet Infectious Diseases*, 9(4), 237-244.
- Perapoch, J., Planes, A., Querol, A., Lopez, V., Martinez-Bendayan, I., Tormo, R., . . . Salcedo, S. (2000). Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* in two newborns, only one of whom had been treated with ultra-levura. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(6), 468-470.
- Pérez, T., Balcázar, J., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., & Múzquiz, J. (2010). Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology*, 3(4), 355-360.
- Persson, E., Berg, S., Trollfors, B., Larsson, P., Ek, E., Backhaus, E., . . . Ripa, T. (2004). Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998-2001. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(9), 791-796.
- Phylip, L. H., Lees, W. E., Brownsey, B. G., Bur, D., Dunn, B. M., Winther, J. R., . . . Wlodawer, A. (2001). The Potency and Specificity of the Interaction between the IA3 Inhibitor and Its Target Aspartic Proteinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 2023-2030.
- Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Katagiri, T., Maita, M., & Pirarat, N. (2015). The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Research in Veterinary Science*, 102(1), 103-111.
- Plein, K., & Hotz, J. (1993). Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea-a pilot study. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, 31(2), 129-134.
- Praveschotinunt, P., Duraj-Thatte, A. M., Gelfat, I., Bahl, F., Chou, D. B., & Joshi, N. S. (2019). Engineered *E. coli* Nissle 1917 for the delivery of matrix-tethered therapeutic domains to the gut. *Nature Communications*, 10(1), 1-14.

- Purkait, S., Abraham, T. J., Karmakar, S., Dey, B., & Roy, A. (2018). Inhibition of fish pathogenic *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* by *Centella asiatica* in-vitro. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 9(2), 1-3.
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2015). Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov053.
- Razak, L. A. A., Musa, N., Jabar, A., & Musa, N. (2019). Therapeutic potentials of *Excoecaria agallocha* against gram-positive and gram-negative fish bacterial pathogens. *Journal of Ideas in Health*, 2(2), 87-94.
- Reda, R. M., Selim, K. M., El-Sayed, H. M., & El-Hady, M. (2018). In vitro selection and identification of potential probiotics isolated from the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), 692-703.
- Reyes García, M., Gómez-Sánchez Prieto, I., & Espinoza Barrientos, C. (2017). *Tablas peruanas de composición de alimentos*. Peru: Instituto Nacional de Salud.
- Ringø, E., & Gatesoupe, F.-J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*, 160(3-4), 177-203.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Jensen, I., Romero, J., & Lauzon, H. L. (2014). Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 24(4), 1005-1032.
- Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S., . . . Stenico, A. (2011). Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*, 17(3), 97-105.
- Rodkhum, C., Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Zhou, W., Liu, Y., & Chen, G. H. (2011). Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* serotype la infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41(3), 309-314.
- Rollan, G., Lorca, G., & de Valdez, G. F. (2003). Arginine catabolism and acid tolerance response in *Lactobacillus reuteri* isolated from sourdough. *Food Microbiology*, 20(3), 313-319.

- Roth Jr, F. J., Ahearn, D. G., Fell, J. W., Meyers, S. P., & Meyer, S. A. (1962). Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. *Limnology and Oceanography*, 7(2), 178-185.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Nevado, F. P., & de Guía Córdoba, M. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80(3), 715-721.
- Saint-Marc, T., Rossello-Prats, L., & Touraine, J. (1991). *Efficacité de Saccharomyces boulardii dans le traitement des diarrhées du SIDA*. Paper presented at the Annales de Médecine Interne (Paris).
- Salas-Leiva, J., Opazo, R., Remond, C., Uribe, E., Velez, A., & Romero, J. (2017). Characterization of the intestinal microbiota of wild-caught and farmed fine flounder (*Paralichthys adspersus*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(2), 370-378.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., . . . Mogensen, G. (1998). Demonstration of safety of probiotics-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106.
- Saraniya, A., & Jeevaratnam, K. (2014). *In vitro* probiotic evaluation of phytase producing *Lactobacillus* species isolated from Uttapam batter and their application in soy milk fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5631-5640.
- Savadogo, A., Ouattara, A. C., Bassole, H. I., & Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9), 678-683.
- Scheer, R., & Fawzy, A. (1986). Antimicrobial treatment of pancreatin. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 61(9), 253-256.
- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 257-276.
- Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schnig, I., & Tipper, D. J. (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*, 142(9), 2655-2662.
- Seidler, R. J., Allen, D., Lockman, H., Colwell, R., Joseph, S., & Daily, O. (1980). Isolation, enumeration, and characterization of *Aeromonas hydrophila* from polluted waters encountered in diving operations. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(5), 1010-1018.

- Seki, H., Shiohara, M., Matsumura, T., Miyagawa, N., Tanaka, M., Komiyama, A., & Kurata, S. (2003). Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatrics International*, 45(1), 86-90.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440.
- Sharifinia, M., & Haghparast, M. M. (2015). Evaluations of probiotic bacteria (*Bacillus* spp.) as dietary additives on growth performance and survival rate of siamese fighting fish (*Betta splendens*). *The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*, 11(1), 70-73.
- Shetty, P. H., & Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 48-55.
- Singhvi, M., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2018). Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 5911-5924.
- Smith, J. L. (2003). The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *Journal of Food Protection*, 66(7), 1292-1303.
- Snijders, J., Van Logtestijn, J., Mossel, D., & Smulderst, F. (1985). Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *Veterinary Quarterly*, 7(4), 277-282.
- Soto, E., Griffin, M., Arauz, M., Riofrio, A., Martinez, A., & Cabrejos, M. E. (2012). *Edwardsiella ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*, 24(2), 81-90.
- Sourabh, A., Kanwar, S. S., & Sharma, O. P. (2011). Screening of indigenous yeast isolates obtained from traditional fermented foods of Western Himalayas for probiotic attributes. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 2(8), 117-126.
- Speranza, B., Corbo, M. R., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2020). Biofilm formation by potentially probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Microbiology*, 87, 103393.

- Strus, M. (1998). A new method for testing antagonistic activity of lactic acid bacteria (LAB) on selected, pathogenic indicator bacteria. *MEDYCYNA DOSWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA*, 50(1-2), 123-130.
- Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G. L., & Supamattaya, K. (2008). Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-relationship to human isolates? *Aquaculture*, 284(1-4), 35-40.
- Syal, P., & Vohra, A. (2013). Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5(2), 390-398.
- Tachibana, L., Telli, G. S., de Carla Dias, D., Gonçalves, G. S., Ishikawa, C. M., Cavalcante, R. B., . . . Ranzani-Paiva, M. J. T. (2020). Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. *Aquaculture Reports*, 16, 100277.
- Takahashi, H., Ueda, K., Itano, E. N., Yanagisawa, M., Murata, Y., Murata, M., . . . Inomata, T. (2010). *Candida albicans* and *C. tropicalis* isolates from the expired breathes of captive dolphins and their environments in an aquarium. *Veterinary Medicine International*, 2010(1), 1-12.
- Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., & Oda, K. (2016). *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly (ethylene terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2813-2818.
- Terraf, M. L., Juárez Tomás, M., Nader-Macías, M., & Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6), 1517-1529.
- Thongkao, K., & Sudjaroen, Y. (2017). Human pathogenic bacteria isolation from tilapia fishes (*Oreochromis niloticus*), a possible reservoir for zoonotic transmission. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 10(6), 1563.

- Tipmongkolsilp, N., del Castillo, C. S., Hikima, J.-i., Jung, T.-S., Kondo, H., Hirono, I., & Aoki, T. (2012). Multiple drug-resistant strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from Tilapia farms in Thailand. *Fish Pathology*, 47(2), 56-63.
- Tomičić, Z., Čolović, R., Čabarkapa, I., Vukmirović, Đ., Đuragić, O., & Tomičić, R. (2016). Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Food and Feed Research*, 43(2), 103-110.
- Tsveteslava, I. I., Ibrjmov, S., Andreeva, A. I., & Ivanov, R. (2017). Study of Biofilm Formation from *Lactobacillus fermentum* S Cultivated on Different Carbohydrates. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 8(6), 282-289.
- Tu, F., Chu, W., Zhuang, X., & Lu, C. (2010). Effect of oral immunization with *Aeromonas hydrophila* ghosts on protection against experimental fish infection. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 13-17.
- Urdaneta, V., & Casadesús, J. (2017). Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Frontiers in Medicine*, 4, 163.
- Vasiljevic, T., & Shah, N. (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728.
- Viljoen, B. C. (2006). Yeast ecological interactions. Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. In A. Querol & G. Fleet (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages* (pp. 83-110). Berlin, Germany: Springer.
- Vuyst, L. d., Avonts, L., & Makras, L. (2004). Probiotics, prebiotics and gut health. In C. Remacle & B. Reusens (Eds.), *Functional foods, ageing and degenerative disease* (pp. 416-482). Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing Ltd.
- Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F. J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., & Quentel, C. (2006). Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*, 258(1-4), 470-478.
- Walenska, E., RóŻalska, S., Sadowska, B., & RóŻalska, B. (2008). The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiologica*, 53(1), 61-66.

- Williams, D. W., Jordan, R. P., Wei, X.-Q., Alves, C. T., Wise, M. P., Wilson, M. J., & Lewis, M. A. (2013). Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *Journal of Oral Microbiology*, 5(1), 224-34.
- Wood, B. J. B., & Holzapfel, W. H. N. (1997). *The Lactic Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria*. New York: Blackie Academic & Professional.
- Yamada, Y., Suzuki, T., Matsuda, M., & Mikata, K. (1995). The phylogeny of *Yamadazyma ohmeri* (Etchells et Bell) Billon-Grand based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Kodamaea* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(6), 1172-1174.
- Yamashita, M., Pereira, S., Cardoso, L., de Araujo, A., Oda, C., Schmidt, É., . . . Mouriño, J. (2017). Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1235-1243.
- Yegorenkova, I. V., Tregubova, K. V., Matora, L. Y., Burygin, G. L., & Ignatov, V. V. (2011). Biofilm formation by *Paenibacillus polymyxa* strains differing in the production and rheological properties of their exopolysaccharides. *Current Microbiology*, 62(5), 1554-1559.
- Yi, C. C., Liu, C. H., Chuang, K. P., Chang, Y. T., & Hu, S. Y. (2019). A potential probiotic *Chromobacterium aquaticum* with bacteriocin-like activity enhances the expression of indicator genes associated with nutrient metabolism, growth performance and innate immunity against pathogen infections in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 124-134.
- Yin, X., Mu, L., Bian, X., Wu, L., Li, B., Liu, J., . . . Ye, J. (2018). Expression and functional characterization of transferrin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 74(1), 530-539.
- Zain, M., Awaad, A. S., Razak, A., Maitland, D., Khamis, N., & Sakhawy, M. (2009). Secondary metabolites of *Aureobasidium pullulans* isolated from Egyptian soil and their biological activity. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(10), 1582-1591.
- Zeyner, A., & Boldt, E. (2006). Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90(1-2), 25-31.

- Zhang, B., Zuo, F., Yu, R., Zeng, Z., Ma, H., & Chen, S. (2015). Comparative genome-based identification of a cell wall-anchored protein from *Lactobacillus plantarum* increases adhesion of *Lactococcus lactis* to human epithelial cells. *Scientific Reports*, 5(1), 1-12.
- Zhang, Y., Rittmann, B. E., Wang, J., Sheng, Y., Yu, J., Shi, H., & Qian, Y. (2005). High-carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*. *Process Biochemistry*, 40(2), 857-863.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H., Mattarelli, P., . . . Walter, J. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1-77.
- Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q., & Li, W. (2010). Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. *Poultry Science*, 89(3), 588-593.
- Zhu, H., Hart, C., Sales, D., & Roberts, N. (2006). Bacterial killing in gastric juice—effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*, 55(9), 1265-1270.
- Zmantar, T., Chaieb, K., Makni, H., Miladi, H., Abdallah, F. B., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2008). Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. *Journal of Basic Microbiology*, 48(4), 308-314.
- เกวลิน หนูฤทธิ์. (2562). สถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ในช่วง 6 เดือนแรกปี 2562. from <https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/Monthly%report/tilapiaสถานการณ์ปลานิล%202%/2062.pdf>
- เกวลิน หนูฤทธิ์. (2563). สถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ในปี 2563 และแนวโน้มปี 2564. from <https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/Monthly%20report/tilapia/ปลานิล%20ไตรมาส%204%2063.pdf>
- เกศินี จันทโรสภณ, และสัมพันธ์ ประวิทย์ธนา. (2557). ผลของการใช้เชื้อ *Bacillus brevis* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นโปรไบโอติกต่อการเจริญและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลานิล. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*, 8(2), 31-41.

- เจนนุช ว่องธวัชชัย. (2560). โรคติดเชื้อและการจัดการสุขภาพปลานิลเพาะเลี้ยง. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสาวนิต ทองพิมพ์. (2551). การคัดเลือกและผลิตแบคทีเรียโปรไบโอติก เพื่อใช้แทนยาปฏิชีวนะที่ผสมในอาหารปลานิลและปลาตะเพิม. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- ไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2556). โปรไบโอติก จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ. กรุงเทพฯ: สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.
- กรทิพย์ กัณนิการ์, ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์, นิวุฒิ หวังชัย, และชนกันต์ จิตมนัส. (2554). ผลของการใช้บริเวอรีสตีในอาหารปลานิลต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน. Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49, กรุงเทพฯ.
- กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ สำนักงานการค้าสินค้า. (2564). ปลานิลและผลิตภัณฑ์. from <https://api.dtn.go.th/files/v3/614af620ef4140fe44141855/download#:~:text=สำหรับผลผลิตปลานิลใน,ผลผลิตต่อไร่%20และผลผลิต>.
- กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง. (ม.ป.ป.). ชีววิทยาของปลานิล. from <https://www.fisheries.go.th/genetic/index.php/2013-11-15-01-35-24/85-2013-11-25-08-28-46/101-2014-02-06-01-52-39?showall=&start=2>
- ศีกฤทธิ ศีลาฉาย. (2561). โปรไบโอติกที่ใช้ประโยชน์ในปลาสัตว์. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 36(1), 152-160.
- ชาญณรงค์ รอดคำ. (ม.ป.ป.). โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา. from http://www.micro.vet.chula.ac.th/index.php/doc/doc_download/57
- ชาญวิทย์ สุวรรณ, และชนกันต์ จิตมนัส. (2563). การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก เสริมอาหารปลานิล เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกัน. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 17(1), 63-74.
- ณัฐนิชา สุขไชยพร, ศศิมันัส อุณัจจ์, ประพันธ์ศักดิ์ ศีระชะภูมิ, และนนทวิทย์ อารีย์ชน. (2558). การคัดเลือก *Bacillus* spp. จากปลานิลเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53, กรุงเทพฯ.
- นฤชยา ไกรเนตร. (2553). การเพาะเลี้ยงปลานิล. นนทบุรี: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- นฤมล อยู่หนูน, และกัญญา สอนสนิท. (2561). การแยกและคัดเลือกโปรไบโอติกเพื่อประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม Paper presented at the งานประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม, นครปฐม.

- นินอร์ จิรพงษ์จรกุล, ศุภณัฐ วัฒนธรรม, มณี ศรีชนะนันท์, ธรรมบุญ งานวิสุทธิพันธ์, และกิตติชนม์ อุเทนพะพันธ์. (2564). ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงต่อค่าพารามิเตอร์เลือดและความไวต่อเชื้อ *Aeromonas veronii* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). *แก่นเกษตร*, 1, 611-617.
- ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์, และวรากร เกิดทรัพย์. (2561). ผลของการเตรียมหัวเชื้อด้วยสภาวะที่เป็นกรดต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* ในสภาวะกรดและในน้ำผลไม้จำลอง. *วิศวกรรมสารเกษตร*, 8(3), 29-50.
- ประพันธ์ศักดิ์ ศรีชนะภูมิ, มยุรี จัยวัฒน์, และนนทวิทย์ อารียชน. (2554). การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ต่อระบบภูมิคุ้มกันและการยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49, กรุงเทพฯ.
- ประมวล ทรายทอง. (2550). โพรไบโอติกยีสต์. *วารสารอาหาร*, 37(4), 297-301.
- ปรีชา ภูมิพื้นผล. (2550). การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาสุยงาม. (ปริญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ผุสดี ตั้งวัชรินทร์, จิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์, และกานต์ สุขสุแพทย์. (2559). การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 34(2), 67-76.
- มณฑาทิพย์ เสาร์ห้า. (2540). การควบคุมโรคซัวผลเน่าของมะม่วงโดยใช้ยีสต์. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วัลย์พร ทิมบุญธรรม, มังกร โรจน์ประภากร, สุริยา สาสนรักกิจ, เสรี เจริญกิจมงคล, และเปรมสุดาสมาน. (2544). การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39, กรุงเทพฯ.
- วอนสมัย ดาลาแสน. (2557). การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาตุ๊กต๋อเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.
- วอนสมัย ดาลาแสน, และอัจฉรา รัตนชัย. (2559). ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากลำไส้ปลาตุ๊กต๋อ (*Clarias macrocephalus*). *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 18(1), 75-83.

- วีณา จิรัฏฐิวัชรุตม์กุล ชัยसार, และดอกรัก ชัยसार. (2562). ผลของการใช้แบคทีเรียแลคติกต่อความต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิล. *วารสารเทคโนโลยีการประมง*, 13(1), 54-62.
- ศรีสรรค์ ปุพบุญ, นริศรา ปัตถภัย, สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, ปารีชาติ พุ่มขจร, และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุล โสภณ. (2559). การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักเพื่อนำมาพัฒนาเป็นตัวนำดีเอ็นเอ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 18(1), 21-19.
- ศัลยา คงสมบูรณ์เวช. (2557). โพรไบโอติกส์ จุลินทรีย์สุขภาพ. *ไทยเนอร์สซิงใหม่*, 7, 46-54.
- ศุนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ อุดรดิตถ์. (2562). ประวัติ/ความเป็นมาของปลานิล. from https://www4.fisheries.go.th/local/index.php/main/view_activities/1220/64289
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม. (2563). โพรไบโอติก Probiotics. ปทุมธานี: ภาพพิมพ์.
- สายใจ แก้วอ่อน. (2560). สมบัติการเป็นโพรไบโอติกของ *Pediococcus pentosaceus* SJK-1. Paper presented at the The 9th Rajamangala University of Technology National Conference and The 8th Rajamangala University of Technology International Conference กรุงเทพฯ.
- สุปราณี พึ่งแพง, กังสดาลย์ บุญปราบ, สุริยัน ชาญกิจงานุกิจ, นนทวิทย์ อารีชัย, และประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา. (2550). การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 38(6), 571-580.
- อดิเทพชัยการณ ภาชนะวรรณ. (2555). สเตรปโตคอคคัส อะกาแลคเทีย แบคทีเรียก่อโรคในคน โคนม และปลา. *วารสารมหาวิทยาลัยนครพนม*, 2(3), 10-17.
- อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. (2555). ยีสต์โพรไบโอติก. *วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้*, 3(1), 66-73.
- อุดมลักษณ์ สมพงษ์, และจิรพร เพกเกาะ. (2556). ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เฉพาะถิ่นต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งโรคติดเชื้อในปลานิล (Nile tilapia: *Oreochromis niloticus*). มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Lactobacillus MRS broth

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Lactobacillus MRS broth	55.15
Final pH (25°C)	6.5±0.2
วิธีการเตรียม	

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Lactobacillus MRS broth ปริมาณ 55.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน บรรจุในภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Pound-force per square inch; psi) เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนิ่งความดันไอ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.2 Lactobacillus MRS broth pH 2.5

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Lactobacillus MRS broth	55.15
Final pH (25°C)	2.5±0.1
วิธีการเตรียม	

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Lactobacillus MRS broth ปริมาณ 55.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. คนให้เข้ากัน ปรับค่า pH เป็น 2.5±0.1 ด้วยสารละลาย 1N HCl ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร บรรจุในภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนิ่งความดันไอ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.3 Lactobacillus MRS broth ที่เติมเกลือน้ำดี

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Lactobacillus MRS broth	55.15
เกลือน้ำดี	10.00
Final pH (25°C)	6.5±0.2
วิธีการเตรียม	

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Lactobacillus MRS broth ปริมาณ 55.15 กรัม และเกลือน้ำดี ปริมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. คนให้เข้ากัน ปรับค่า pH เป็น 6.5±0.2 แล้ว

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร บรรจุในภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.4 Lactobacillus MRS agar

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Lactobacillus MRS agar	67.15
Final pH (25°C)	6.5±0.2

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Lactobacillus MRS agar ปริมาณ 67.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มจนจืดละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่หรือขวดแลปฟลาเกลียว แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงมีอุณหภูมิประมาณ 50°C จึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก จานละประมาณ 15-20 มล. รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นจนแข็งตัวแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.5 Lactobacillus MRS agar ที่เติมสี Bromocresol purple

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Lactobacillus MRS agar	67.15
สี Bromocresol purple	0.04
Final pH (25°C)	6.5±0.2

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Lactobacillus MRS agar ปริมาณ 67.15 กรัม และสี Bromocresol purple ปริมาณ 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มจนจืดละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่หรือขวดแลปฟลาเกลียว แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงมีอุณหภูมิประมาณ 50°C จึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก จานละประมาณ 15-20 มล. รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นจนแข็งตัวแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.6 Yeast Malt broth

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
YM broth	21.43
Final pH (25°C)	6.2±0.2

วิธีการเตรียม

ซังอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป YM broth ปริมาณ 21.43 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน บรรจุในภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.7 Yeast Malt broth pH 2.5

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
YM broth	21.43
Final pH (25°C)	2.5±0.1

วิธีการเตรียม

ซังอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป YM broth ปริมาณ 21.43 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. คนให้เข้ากัน ปรับค่า pH เป็น 2.5±0.1 ด้วยสารละลาย 1N HCl ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร บรรจุในภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.8 Yeast Malt broth ที่เติมเกลือน้ำดี

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
YM broth	21.43
เกลือน้ำดี	10.00
Final pH (25°C)	6.2±0.2

วิธีการเตรียม

ซังอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Lactobacillus MRS broth ปริมาณ 21.43 กรัม และเกลือน้ำดี ปริมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. คนให้เข้ากัน ปรับค่า pH เป็น 6.2±0.2 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร บรรจุในภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.9 Yeast Malt agar

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
YM agar	41.84
Final pH (25°C)	6.2±0.2

วิธีการเตรียม

ซังอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป YM agar ปริมาณ 41.84 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มจนวุ้นละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่หรือขวดแลปฝาเกลียว แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงมีอุณหภูมิประมาณ 50°C จึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก จานละประมาณ 15-20 มล. รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นวุ้นแข็งตัวแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.10 Yeast Malt agar pH 2.5

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
YM broth	21.43
วุ้น	15.00
Final pH (25°C)	2.5±0.1

วิธีการเตรียม

ซังอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป YM broth ปริมาณ 21.43 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มล. คนให้เข้ากัน ปรับค่า pH เป็น 2.5±0.1 ด้วยสารละลาย 1N HCl ปรับปริมาตรเป็น 300 มล. แล้วบรรจุในขวดรูปชมพู่หรือขวดแลปฝาเกลียวขนาด 500 มล. จากนั้นซังผงวุ้นปริมาณ 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มล. คนให้เข้ากัน นำไปต้มจนวุ้นละลาย บรรจุในขวดแลปฝาเกลียวขนาด 1 ลิตร แล้วนำวุ้นและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่า pH แล้วไปทำให้ปราศจากเชื้อแยกกันที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นและอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงมีอุณหภูมิประมาณ 50°C จึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในวุ้นที่บรรจุอยู่ในขวดแลปฝาเกลียวขนาด 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทส่วนผสมดังกล่าวลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก จานละประมาณ 15-20 มล. รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นวุ้นแข็งตัวแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.11 Tryptone Soya Broth

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
TSB	30.00
Final pH (25°C)	6.2±0.2

วิธีการเตรียม

ซังอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป TSB ปริมาณ 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน บรรจุในภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.12 Tryptic Soya Agar

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
------------	-----------

TSA	45.00
Final pH (25°C)	7.3±0.2
วิธีการเตรียม	

ซั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป TSA ปริมาณ 45 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มจนวุ้นละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่หรือขวดแลปฝาเกลียว แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงมีอุณหภูมิประมาณ 50°C จึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกจานละประมาณ 15-20 มล. รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นวุ้นแข็งตัวแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.13 Mueller Hinton Agar

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
MHA	38.00
Final pH (25°C)	7.3±0.1
วิธีการเตรียม	

ซั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป MHA ปริมาณ 38 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน นำไปต้มจนวุ้นละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่หรือขวดแลปฝาเกลียว แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงมีอุณหภูมิประมาณ 50°C จากนั้นตูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 มล. ด้วย Autopipette ขนาด 5 มล. ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นวุ้นแข็งตัวแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.14 Congo Red Agar

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Brain Heart Infusion broth	37.00
น้ำตาลทราย	50.00
สี Congo red	0.80
วุ้น	15.00
Final pH (25°C)	7.4±0.2
วิธีการเตรียม	

ซั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป BHI broth ปริมาณ 37 กรัม น้ำตาลทราย 50 กรัม และผงวุ้น 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 960 มล. คนให้เข้ากัน แล้วบรรจุในขวดแลปฝาเกลียวขนาด 1 ลิตร จากนั้นซั่งสี Congo red ปริมาณ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. คนให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา แล้วนำสีและอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำให้ปราศจากเชื้อแยกกันที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15

psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนิ่งความดันไอ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้สีและอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงมีอุณหภูมิประมาณ 50°C จึงเทสีปริมาตร 40 มล. ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอยู่ในขวดแลบฝาเกลียวขนาด 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทส่วนผสมดังกล่าวลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก จานละประมาณ 15-20 มล. รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นวันแข็งตัวแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

2. สารเคมี

2.1 0.85% NaCl

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
NaCl	8.50
วิธีการเตรียม	

ชั่งผง NaCl ปริมาณ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน บรรจุในภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนิ่งความดันไอ จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C หรืออุณหภูมิห้อง

2.2 สีคริสตัลไวโอเลต

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
สีคริสตัลไวโอเลต	100.00
แอมโมเนียมออกซาลेट	10.00

95% เอทานอล

วิธีการเตรียม

ชั่งสีคริสตัลไวโอเลตปริมาณ 20 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล ปริมาตร 200 มล. คนให้เข้ากัน จากนั้นชั่งแอมโมเนียมออกซาลेटปริมาณ 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. คนให้เข้ากัน แล้วผสมส่วนผสมทั้งสองให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

2.3 สารละลายกระเพาะอาหารจำลอง

ส่วนประกอบ	
NaCl	0.85 กรัม
Pepsin	0.30 กรัม
น้ำบริสุทธิ์	100 มล.
Final pH (25°C)	2.5±0.1
วิธีการเตรียม	

ซังผง NaCl ปริมาณ 0.85 กรัม และ Pepsin 0.3 กรัม ละลายในน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 50 มล. คนให้เข้ากัน ปรับค่า pH เป็น 2.5 ± 0.1 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มล. แล้วบรรจุใส่ภาชนะ

2.4 สารละลายลำไส้จำลอง

ส่วนประกอบ

NaCl	0.85 กรัม
เกลือน้ำดี	1.00 กรัม
Pancreatin	0.10 กรัม
น้ำบริสุทธิ์	100 มล.
Final pH (25°C)	8.0 ± 0.1

วิธีการเตรียม

ซังผง NaCl ปริมาณ 0.85 กรัม เกลือน้ำดี 1.0 กรัม และ Pancreatin 0.1 กรัม ละลายในน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 50 มล. คนให้เข้ากัน ปรับค่า pH เป็น 8.0 ± 0.1 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มล. แล้วบรรจุใส่ภาชนะ

