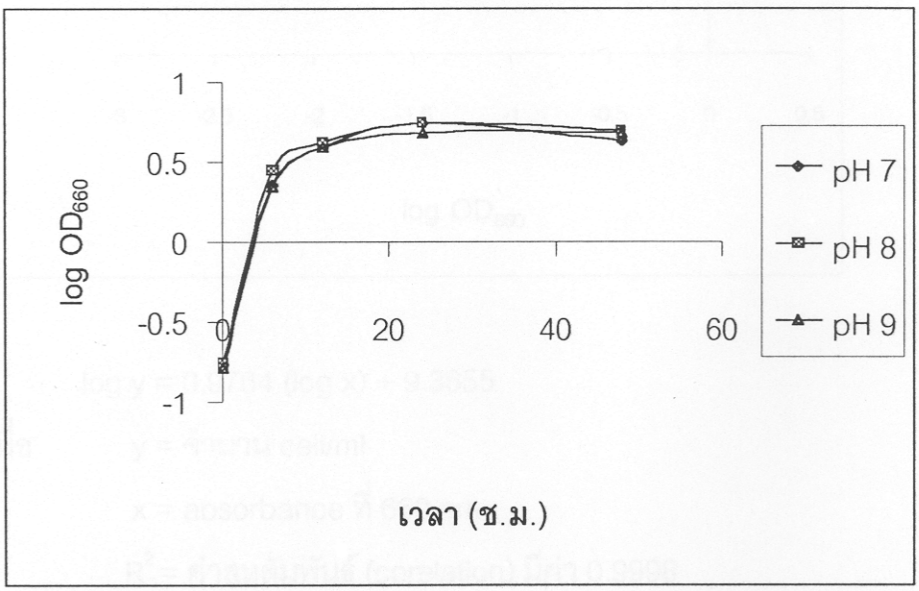
3. ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*V. harveyi*)

3.1.1 การวัดการเจริญของ *V. harveyi* ที่ pH 7.0, 8.0 และ 9.0

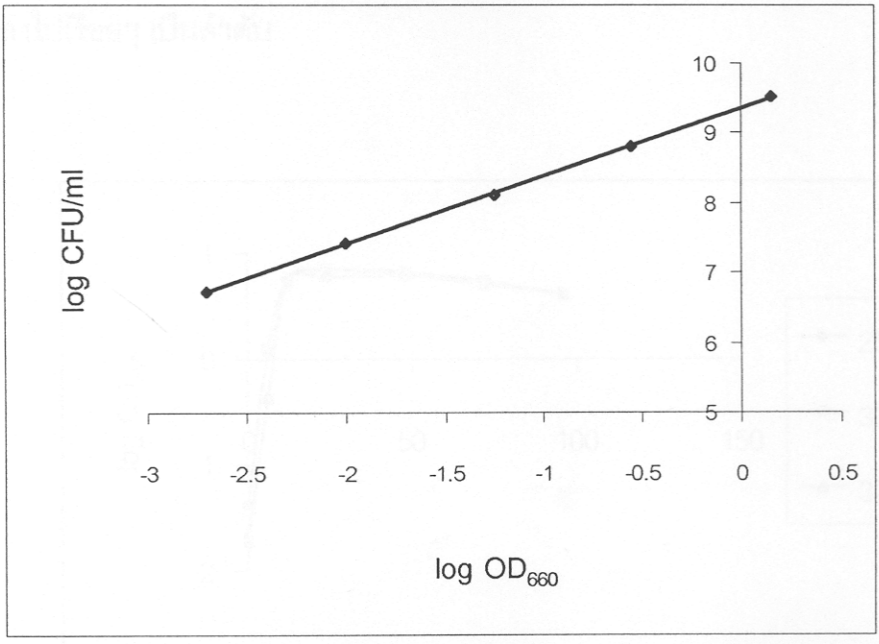
การเจริญของ *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB (เติม 1.5%NaCl) ที่ pH 7.0, 8.0 และ 9.0 เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C ติดตามผลด้วยการวัดความขุ่นจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ 660 nm ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่งโมงตามลำดับ ในผลสภาพ pH ที่หลากหลาย แสดงผลในตารางภาคผนวกที่ 1 รูปที่ 5 พบว่ารูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* ที่ pH 7.0, 8.0 และ 9.0 มีความคล้ายคลึงกันมาก โดยการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกแล้วค่อยๆช้าลง จนถึงจุดที่เชื้อมีการเจริญสูงสุดในเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 5 กราฟแสดงการเจริญของ *V. harveyi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH ต่างๆ

3.1.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ *V. harveyi*

การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm กับจำนวน CFU/ml ของเชื้อ โดยแสดงผลในรูป log CFU/ml กับค่า log OD_{660} ช่วยทำให้การทดลองทำได้รวดเร็วขึ้นและนำกลับมาหาปริมาณที่ถูกต้องโดยใช้ colony plate count อีกครั้งหนึ่ง ดังแสดงผลในตารางภาคผนวกที่ 2 รูปที่ 6



$$\log y = 0.9764 (\log x) + 9.3655$$

เมื่อ y = จำนวน cell/ml

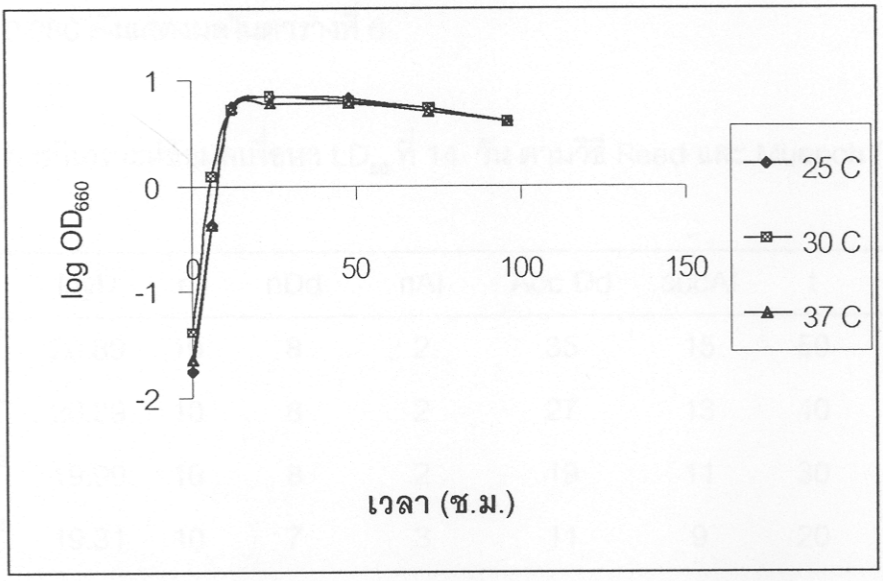
x = absorbance ที่ 660 nm

R^2 = ค่าสหสัมพันธ์ (corelation) มีค่า 0.9998

รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงในรูป log OD_{660} กับค่าปริมาณ เชื้อในรูป log CFU/ml ของ *V. harveyi*

3.1.3 การหาการเจริญของ *V. harveyi* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การเจริญของ *V. harveyi* .ในอาหารเหลว TSB (เติม 1.5%NaCl) เขย่าที่อุณหภูมิ 25°C, 30°C และ 37°C ตามลำดับ ติดตามผลด้วยการวัดความขุ่นจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm ณ. เวลาต่างๆ ดังแสดงผลในตารางภาคผนวกที่ 3 รูปที่ 7 พบว่า รูปแบบการเจริญของ *V. harveyi* มีความใกล้เคียงกันในอาหารเหลวชนิดนี้ที่อุณหภูมิทดสอบ โดยการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *V. harveyi* ในช่วงแรกเป็นไปอย่างรวดเร็วตามเวลาที่เพิ่มขึ้น จนถึงจุดที่มีการเจริญของเชื้อสูงสุดในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนเชื้อลดลงไปเรื่อยๆ เป็นลำดับ



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาของการเจริญและปริมาณความขุ่นของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

3.1.4 การเจริญของ *V. harveyi* ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ

เมื่อทำการลากเชื้อ *V. harveyi* บนอาหารวุ้น TSA ที่ผสมเกลือ NaCl ลงไปให้มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ppt พบว่า *V. harveyi* สามารถเจริญได้ที่ระดับความเค็มตั้งแต่ 5 - 50 ppt แต่เมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้นเป็น 75 - 100 ppt เชื้อ *V. harveyi* ไม่สามารถเจริญต่อไปได้

3.2 การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi*

จากการนำเชื้อ *V. harveyi* มาทดสอบหาความรุนแรง โดยฉีดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.08, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5 โดยวัดค่าความขุ่นที่ OD_{660} บันทึกเวลาและจำนวนกุ้งที่ตายแล้วนำมาคำนวณค่า LD_{50} พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.12×10^8 CFU/ml หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm เท่ากับ 0.086 ดังแสดงผลในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา LD_{50} ที่ 14 วัน ตามวิธี Reed และ Muench (1938)

conc	lnyD	n	nDd	nAl	Acc Dd	accAl	t	Per M
1.18×10^9	20.89	10	8	2	35	15	50	80
7.16×10^8	20.39	10	8	2	27	13	40	80
4.82×10^8	19.99	10	8	2	19	11	30	80
2.45×10^8	19.31	10	7	3	11	9	20	70
1.97×10^8	19.10	10	4	6	4	6	10	40

conc = concentration of V. harveyi (cell/ml/shrimp)

lnyD = lny dose

n = number of test shrimp per concentration

nDd = number of dead shrimp

nAl = number of living shrimp

accDd = accumulate of dead shrimp

accAl = accumulate of living shrimp

t = total of accumulate of dead and living shrimp

Per M = cumulative percentage mortality

การคำนวณค่า LD_{50} ที่ 14 วัน

จากสูตร

LD_{50} = lny concentration below 50%mortality + (50-mortality below 50%/mortality above 50% - mortality below 50%)(lny concentration above 50% mortality – lny concentration below 50%)

= 19.10 + [(50 - 40) / (70 - 40)] (119.31 – 19.10)

= 19.10 + 0.073 = 19.173

get anti lny 17.96 = 2.12×10^8

การคำนวณหาค่า absorbance

จากสูตร

$$\log y = 0.9764 (\log x) + 9.3655$$

เมื่อ y = จำนวนเซลล์ต่อมิลลิเมตร

x = absorbance ที่ 660 นาโนเมตร

R^2 = ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) = 0.9998

แทนค่า ในสูตร

8.33 = 0.9764 (log x) + 9.3655

x = 0.086

ดังนั้นค่า absorbance ที่ 660 นาโนเมตร คือ 0.086

3.3 การคัดเลือก *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* สายพันธุ์

การทดสอบ *B. subtilis* 27 สายพันธุ์ บนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5%NaCl) ที่มีเชื้อ *V. harveyi* เกลี่ยอยู่ทั่ว ดังแสดงผลในตารางที่ 7 และรูปที่ 8 แสดงผลบางตัวอย่าง พบว่า *B. subtilis* 5 สายพันธุ์ ที่ให้ผลยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาจากความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุมที่ใส่เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์เหล่านี้ คือ *B. subtilis* ABS-D10, ABS-D18, ABS-D19, ABS-D24 และ ABS-D28 ทำการคัดเลือก *B. subtilis* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* มากที่สุดจาก เชื้อ *B. subtilis* 5 สายพันธุ์ที่ได้ โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* ทั้ง 5 สายพันธุ์ดังกล่าว การทดสอบแบ่งออกเป็น 2 ชุด โดยชุดแรกใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่กรอง ชุดที่สองใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแล้ว และทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า โดยผลที่ได้เป็น ดังนี้ คือ ในชุดแรกน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-D18, ABS-D19, ABS-D24 และ ABS-D28 ทั้ง 4 สายพันธุ์ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ไม่ดี สังเกตจากความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุมที่ใส่เชื้อ *B. subtilis* เหล่านี้ ยังมีความขุ่นของเชื้อ *V. harveyi* อยู่ ต่างจาก *B. subtilis* ABS-D10 ที่ความกว้างของบริเวณใสไม่มากนักแต่ชัดเจนกว่าคือ สามารถยับยังเชื้อ *V. harveyi* ได้ทั้งหมดในบริเวณที่เห็นวงใส และเพื่อให้เห็นผลการทดลองชัดเจนขึ้นจึงทำการทดลองชุดที่สองได้ผลดังนี้ คือ *B. subtilis* ABS-D18, ABS-D19, ABS-D24 และ ABS-D28 ทั้ง 4 สายพันธุ์ให้ผลการยับยั้ง *V. harveyi* โดยสังเกตจากบริเวณใสรอบๆ หลุมแผ่กว้างออกแต่พบว่ายังมีความขุ่นของ *V. harveyi* อยู่ แสดงว่า *B. subtilis* ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่กล่าวมายังไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ทั้งหมด ต่างจาก *B. subtilis* ABS-D10 ที่บริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุมที่ใส่เชื้อนี้เห็นได้ชัดเจน แสดงถึงความสามารถในการยับยั้ง *V. harveyi* ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ เมื่อนำผลการทดลองทั้งสองชุดเปรียบเทียบกันพบว่าชุดที่สองเห็นผลการยับยั้ง *V. harveyi* ได้ดีกว่าชุดที่หนึ่ง โดยสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุมมีความกว้างมากกว่าและวงใสที่ได้ชัดเจนกว่า แต่การทดลองทั้งสองชุดให้ผลที่สอดคล้องกัน คือ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้ง *V. harveyi* มากที่สุด ได้แก่ *B. subtilis* ABS-D10 ดังแสดงผลในรูปที่ 9 และ รูปที่ 10 ตามลำดับ ซึ่งจากผลดังกล่าว *B. subtilis* ABS-D10 จึงถูกคัดเลือก เพื่อใช้ทำการทดลองในหัวข้อต่อไป

ตารางที่ 7 แสดงผลที่ได้จากการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* โดยเชื้อ *B. subtilis*

เชื้อที่ทดสอบ	ผลที่ได้	เชื้อที่ทดสอบ	ผลที่ได้
ABS-D10	-	ABS-D33	-
ABS-D04	-	*ABS-D18	+ 1
ABS-D05	-	ABS-D13	+ 1
ABS-D02	+ 1	ABS-D17	+ 1
ABS-D08	-	ABS-D12	+ 1
ABS-D09	-	*ABS-D28	+3
*ABS-D24	+ 3	ABS-D29	-
ABS-D25	-	ABS-D31	-
ABS-D06	-	ABS-D32	-
*ABS-D10	+ 3	*ABS-D19	+ 2
ABS-D03	-	ABS-D27	-
ABS-D34	-	ABS-D20	-
ABS-D11	+ 1	ABS-D21	-
		ABS-D30	-

หมายเหตุ - ไม่ยับยั้ง

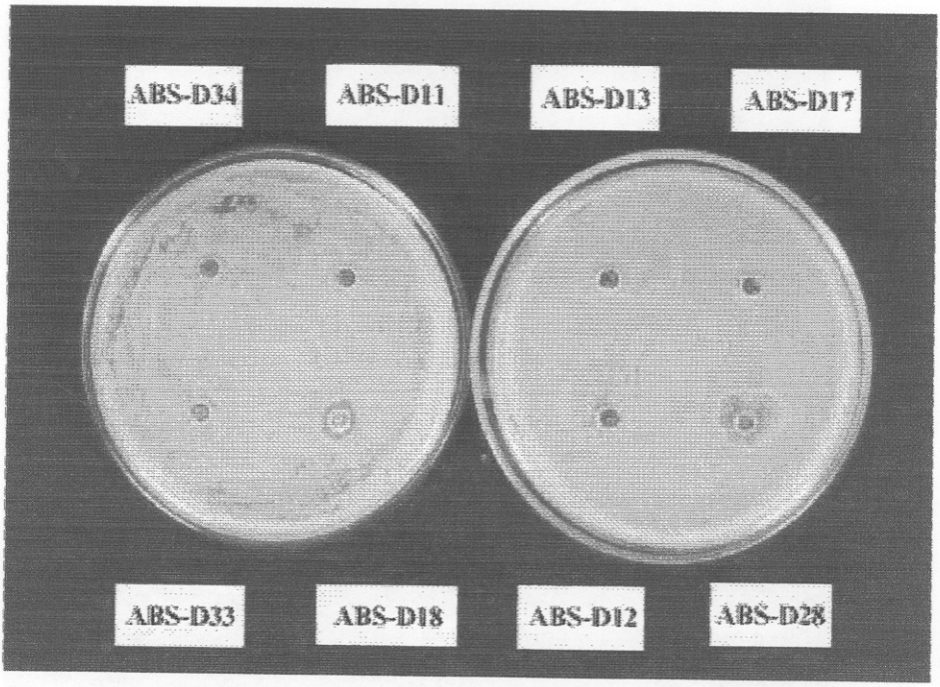
+ 1 ยับยั้งประมาณ 8 mm

+ 2 ยับยั้งประมาณ 9 - 10 mm

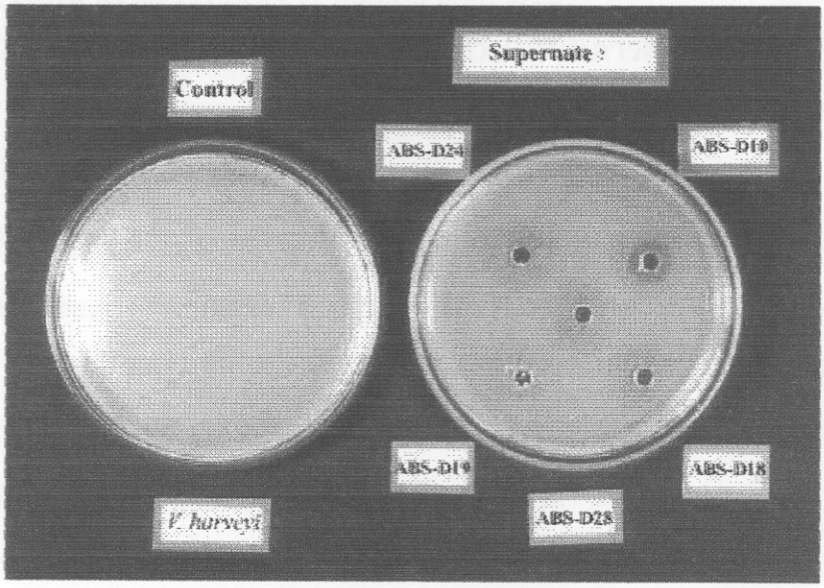
+ 3 ยับยั้งประมาณ 11 - 12 mm

+ 4 ยับยั้งประมาณ 13 - 15 mm

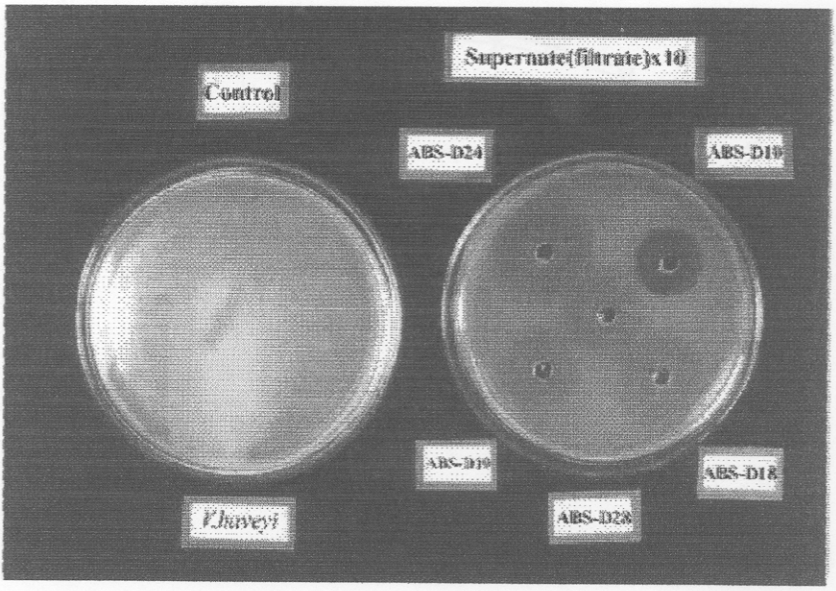
* สายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือก



รูปที่ 8 ตัวอย่างการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (*V. harveyi*) โดย *B. subtilis* 8 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 27 สายพันธุ์บนอาหารวุ้น TSA+1.5%NaCl



รูปที่ 9 การยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* โดย *B. subtilis* 5 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* ABS-D10, -D18, -D19, -D24 และ -D28

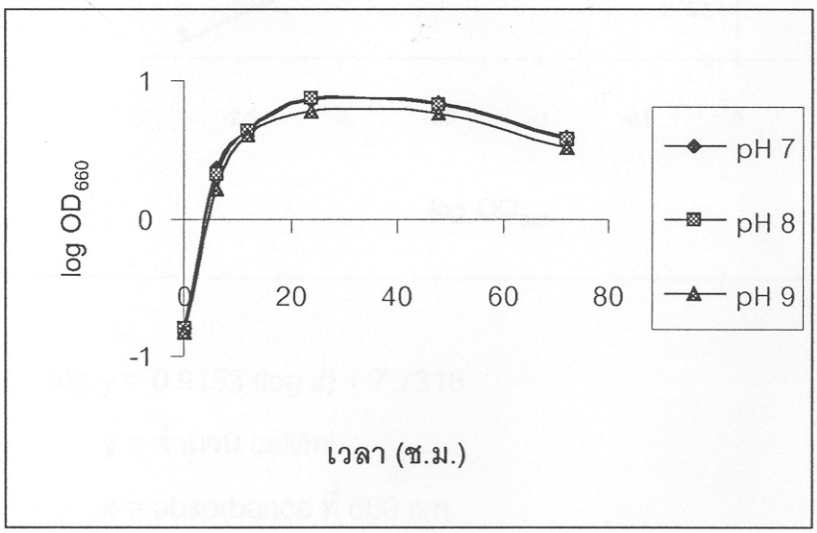


รูปที่ 10 การยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* โดย *B. subtilis* 5 สายพันธ์ ชุดที่สอง (supernate กรอง และทำให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า)

3.4 การศึกษาการเจริญของ *B. subtilis* ABS-D10

3.4.1 การเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ABS-D10 ในสภาวะที่มี pH 7.0, 8.0 และ 9.0

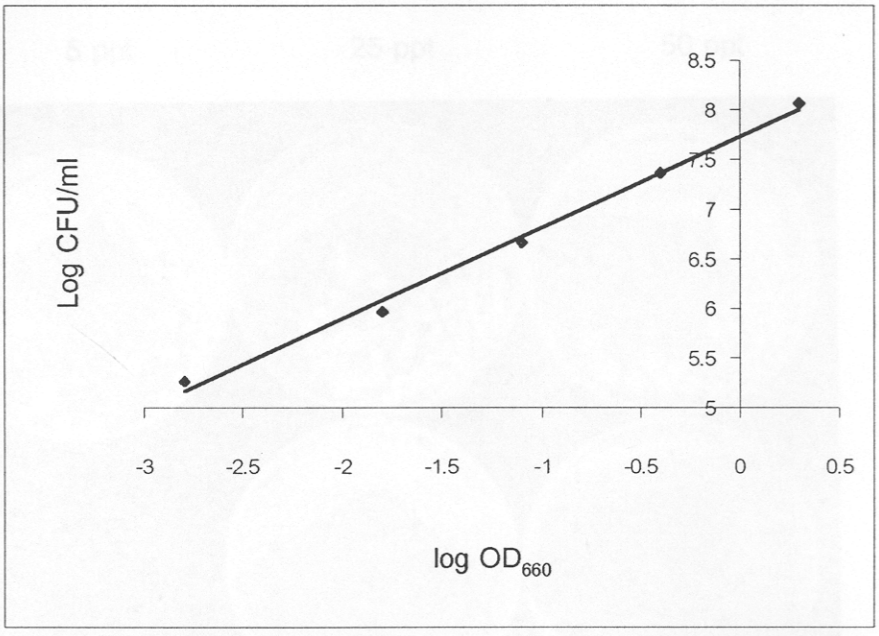
การวัดการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 ที่มีเชื้อเริ่มต้น 5% inoculum เพาะเลี้ยงในฟลาส์ที่มีอาหารเหลว TSB (เติม 1.5%NaCl) ที่ pH 7.0, 8.0 และ 9.0 เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C ในเวลาต่างๆ ที่ 0, 6, 12, 24,48และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 660 nm ดังแสดงผลในตารางภาคผนวกที่ 4 รูปที่ 11 พบว่าเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 มีการเจริญอย่างรวดเร็วแล้วค่อยๆช้าลง จนถึงจุดสูงสุดในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจะลดลง โดยรูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 ที่ pH 7.0 และ pH 8.0 ไม่ต่างกัน ส่วนที่ pH 9.0 เชื้อเจริญถึงจุดสูงสุดได้น้อยกว่าในสภาวะ pH 7.0 และ 8.0



รูปที่ 11 กราฟการเจริญของ *B. subtilis* ABS-D10 ในสภาวะ pH ต่างๆ

3.4.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ *B. subtilis* ABS-D10

จากการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ABS-D10 แล้วเจือจางเชื้อให้มีความขุ่นที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 5 รูปที่ 12 จะเห็นได้ว่า เมื่อความขุ่นของเชื้อเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์ของเชื้อ ก็เพิ่มขึ้นตามลำดับ



$$\log y = 0.9153 (\log x) + 7.7318$$

เมื่อ y = จำนวน cell/ml

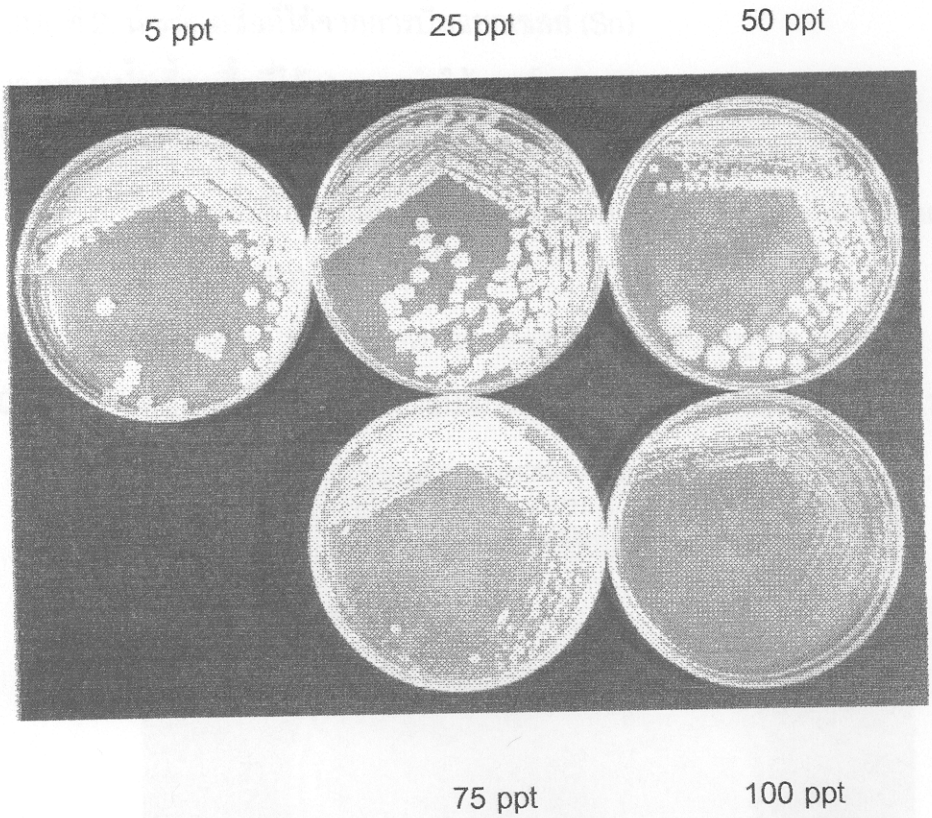
x = absorbance ที่ 660 nm

R^2 = ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) มีค่า 0.9938

รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log OD_{660} กับ log CFU/ml ของ *B. subtilis* ABS-D10

3.4.3 การเจริญของ *B. subtilis* ABS-D10 ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ

เมื่อทำการลากเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 บนอาหารวุ้น TSA ที่ผสมเกลือ NaCl ลงไปให้มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ppt พบว่า *B. subtilis* ABS-D10 สามารถเจริญได้ทุก ๆ ระดับความเค็ม ตั้งแต่ 5 -100 ppt แต่การเจริญลดลงเมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 13 เห็นได้ว่า *B. subtilis* ABS-D10 เจริญได้ดีที่ระดับความเค็มในช่วง 5-50 ppt



รูปที่ 13 การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 ที่ศึกษาบนอาหารวุ้น TSA ที่เติมเกลือ NaCl ลงไปให้มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ppt ตามลำดับ

3.5 ผลการทดสอบสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยง *B. subtilis* ABS-D10 รูปแบบต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*

จากการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ABS-D10 ในอาหารเหลว TSB (เติม1.5%NaCl) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อนำเชื้อที่เลี้ยงได้แบ่งออกเป็น 5 ส่วน แล้วเตรียมเป็นเชื้อทดสอบรูปแบบต่างๆ สำหรับยับยั้งการเจริญ *V. harveyi* ดังแสดงผลในรูปที่ 14 และ ตารางภาคผนวกที่ 6 พบว่า สารออกฤทธิ์จาก *B. subtilis* ABS-D10 แบบที่ 1 – 5 คือ

แบบที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อที่มีตัวเซลล์ (Sc)

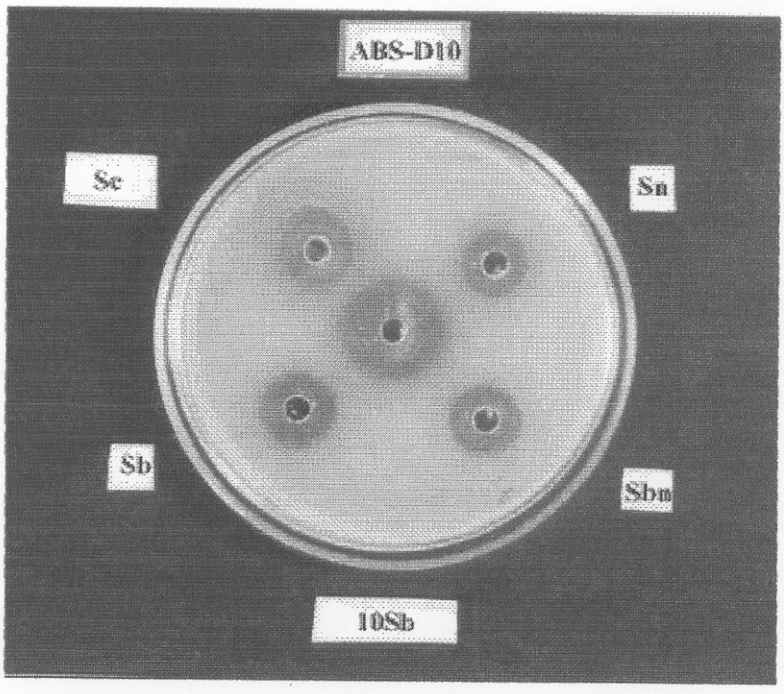
แบบที่ 2 น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ (Sn)

แบบที่ 3 น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกและกรอง (Sb)

แบบที่ 4 น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกและปั่นแยกเซลล์ (Sbn)

แบบที่ 5 น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกกรองแยก และทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า (10Sb)

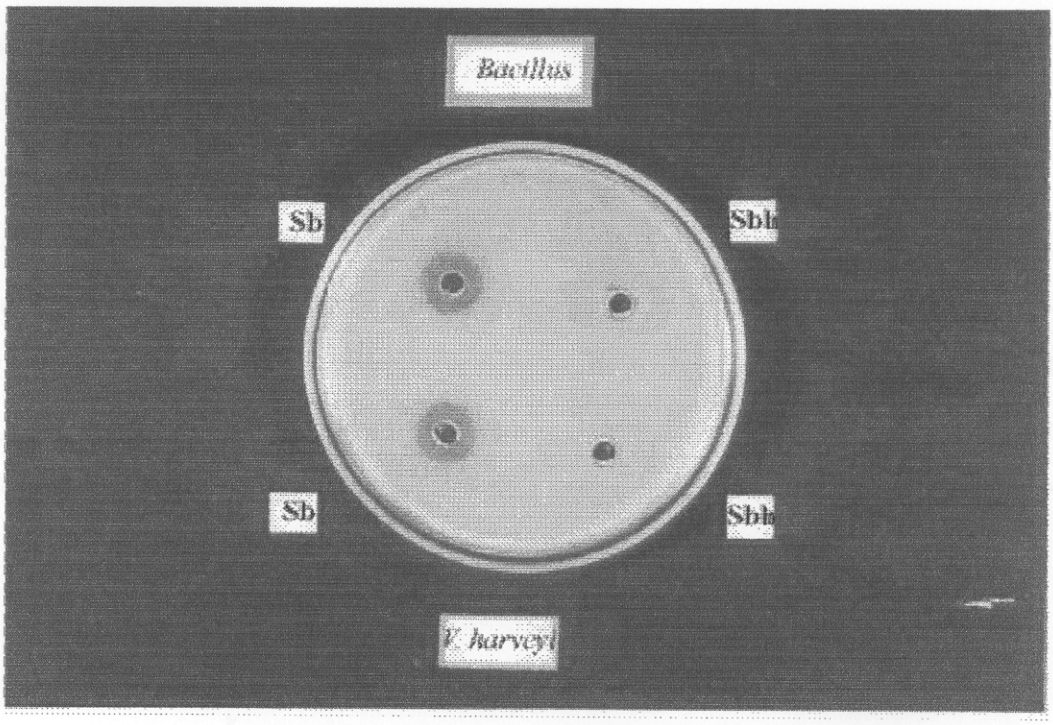
สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* เห็นได้อย่างชัดเจนในทุกรูปแบบของ *B. subtilis* ABS-D10 และการยับยั้งเห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อน้ำเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นมากขึ้น 10 เท่า



รูปที่ 14 *การออกฤทธิ์ของ B. subtilis* ABS-D10 *ในรูปแบบต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของ V. harveyi*

3.6 ความเสถียรของสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS-D10 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 046

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS-D10 ในอาหารเหลว TSB(เติม 1.5%NaCl) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและนำเชื้อไปทำให้เซลล์แตกแล้วแยกเอาเฉพาะส่วนใส (supernate) โดยนำส่วนใสที่ได้ส่วนหนึ่งไปผ่านความร้อนจากไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำเชื้อทั้งที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน ไปหยดในหลุมที่ถูกเจาะไว้บนอาหารวุ้นTSAที่มีเชื้อ *V. harveyi* เกลี่ยกระจายอยู่ทั่วผิวหน้าวุ้น หลังจากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการยับยั้ง ดังแสดงผลในตารางภาคผนวกที่ 7 รูปที่ 15 พบว่า สารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS-D10 ให้ผลยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* แต่สารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำไปผ่านความร้อนจากไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 5 นาที ไม่เห็นวงใสรอบหลุม จึงไม่เห็นผลการยับยั้ง



รูปที่ 15 การยับยั้ง *V. harveyi* โดยสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 ที่ผ่านและไม่ผ่านหม้อนึ่งไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 5 นาที

Sb : น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกและกรอง

Sbh : น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทำให้เซลล์แตก , กรอง และนำไปเข้าหม้อนึ่งอัตโนมัติความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C นาน 5 นาที

3.7 ปริมาณของ *B. subtilis* ABS-D10 ที่สามารถยับยั้ง *V. harveyi* บนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5%NaCl)

การศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งระหว่าง *V. harveyi* กับ *B. subtilis* ABS-D10 โดยการผสมเชื้อทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้ออย่างละ 1 ml โดยมีปริมาณของ *V. harveyi* คงที่ที่ 10^3 CFU/ml และปริมาณของเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 ต่างกันที่ 10^1-10^5CFU/ml เขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาหาจำนวนโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิดที่เหลือบนอาหารวุ้น TSA (เติม 1.5%NaCl) ภายหลังการบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ที่เวลา 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 และ 10 ในหลอดควบคุมที่มีเฉพาะเชื้อเดียวทั้ง *B. subtilis* และ *V. harveyi* มีปริมาณถูกต้องและไม่เปลี่ยนแปลงคือ 10^3 CFU/ml ในหลอดที่ผสมระหว่าง *B. subtilis* กับ *V. harveyi* นั้นพบว่า *B. subtilis* และ *V. harveyi* นั้นมีจำนวนที่ถูกต้อง หลังจากเชื้อทั้งสองชนิดผสมกันนาน 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณ *B. subtilis* ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ *V. harveyi* นั้นไม่สามารถตรวจพบได้ในหลอดที่มี *B. subtilis* 10^4 และ 10^5 CFU/ml

ตารางที่ 8 ผลการยับยั้ง *V. harveyi* โดย *B. subtilis* ABS-D10 หลังจากผสมเชื้อไว้ 0 ชั่วโมง บนอาหาร TSA (เติม 1.5%NaCl)

เชื้อตั้งต้น (CFU/ml)		ปริมาณเชื้อหลังเลี้ยงรวมกัน (CFU/ml)	
B. subtilis	*V.harveyi*	*B. subtilis*	*V.harveyi*
1×10^3	0	6.0×10^2	0
0	1×10^3	0	1.5×10^3
1×10^1	1×10^3	1.0×10^1	2×10^3
1×10^2	1×10^3	2.1×10^2	1.5×10^3
1×10^3	1×10^3	6.2×10^2	2.2×10^3
1×10^4	1×10^3	5.3×10^3	2×10^2
1×10^5	1×10^3	4.4×10^4	1.5×10^3

ตารางที่ 9 ผลการยับยั้ง *V. harveyi* โดย *B. subtilis* ABS-D10 หลังจากผสมเชื้อไว้ 24 ชั่วโมง บนอาหาร TSA (เติม 1.5%NaCl)

เชื้อตั้งต้น (CFU/ml)		ปริมาณเชื้อหลังเลี้ยงรวมกัน (CFU/ml)	
B. subtilis	*V.harveyi*	*B. subtilis*	*V.harveyi*
1×10^3	0	5.6×10^2	0
0	1×10^3	0	1×10^3
1×10^1	1×10^3	1.5×10^2	1.7×10^4
1×10^2	1×10^3	5.0×10^2	2.7×10^4
1×10^3	1×10^3	2.0×10^3	3.1×10^4
1×10^4	1×10^3	3.8×10^4	0
1×10^5	1×10^3	2.7×10^5	0

3.8 ค่า MIC และ MBC ของสารจาก *B. subtilis* ABS-D10 ต่อเชื้อ*V. harveyi* โดยวิธี tube dilution

B. subtilis ABS-D10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB (เติม1.5%NaCl) ด้วยความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30°C นาน 3 วัน ปั่นแยกเซลล์ออก แล้วนำส่วนใสมาสกัดสารปฏิชีวนะตามวิธีการของ Mckeen *et al.*(1986) นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งพบว่า จากน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 ml สามารถสกัดสารในปริมาณ 130 mg (น้ำหนักแห้ง) คิดเป็นผลผลิต 0.026 % (น้ำหนักสาร/ปริมาตรเชื้อ) ลักษณะของสารปฏิชีวนะที่ได้มีสีน้ำตาล ละลายกลับใน 80% แอทธานอล ให้มีความเข้มข้น 10 mg/ml เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 mg/ml ผสมกับ *V. harveyi* คงที่ที่ 10^3 CFU/ml พบว่า ได้ค่า MIC อยู่ที่ค่าความเข้มข้น 0.25 mg/ml และค่า MBC อยู่ที่ค่าความเข้มข้น 0.5 mg/ml ดังแสดงผลในตารางที่ 11

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้ง *V. harveyi* โดยสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10

สารที่เติม (ml)	หมายเลขหลอดทดลอง				
	1	2	3	4	5
TSB+1.5%NaCl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Crude extract ของเชื้อ *B. subtilis* 2 mg/ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
เชื้อ *V. harveyi* ความเข้มข้น 10^3 cfu/ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Final dilution (mg/ml)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
หลอดที่ใส (+), ขุ่น (-)	+	+	+	-	-
จำนวนเชื้อที่ได้จากการ spread plate (colony)	0	0	>300		

3.9 การหาระดับความเข้มข้นของ *V. harveyi* ที่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดหยาบจาก *B. subtilis* ABS-D10

ผลจากการผสมสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 กับ *V. harveyi* ความเข้มข้นต่างๆในหลอดทดลองนาน 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml สามารถยับยั้ง *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้น $1 \times 10^1 - 1 \times 10^4$ CFU/ml

ส่วนสารสกัดหยาบ *B. subtilis* ABS-D10 ที่ความเข้มข้นคงที่เป็น 1 mg/ml สามารถยับยั้ง *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้น $1 \times 10^1 - 1 \times 10^6$ CFU/ml ดังแสดงผลในตารางที่ 12

ตารางที่ 11 ระดับความเข้มข้นของ *V. harveyi* ที่ถูกยับยั้งโดยสกัดหยาบจากเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10

สารที่เติม (ml)	*V. harveyi* ความเข้มข้นต่างๆ (CFU/ml) ปริมาตร 1 ml			
	10^3	10^4	10^5	10^6
สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (0.5 mg/ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
จำนวนเชื้อที่ได้จากการ spread plate (colony)	0	0	$1.5x10^2$	$1.2x10^3$
สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (1.0 mg/ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
จำนวนเชื้อที่ได้จากการ spread plate (colony)	0	0	0	0