RESEARCH ARTICLE

Efficacy of Effective Microorganisms (EM) Against *Burkholderia pseudomallei* in Rice Field Soil

Narisorn Na-ngam[1*], Pitak Noimay[1], Thitima Nutrawong[2]

Abstract

Objective — *Burkholderia pseudomallei* is the cause of melioidosis. The organism can be commonly found in environments such as soil and water in endemic areas, particularly in the Northeastern of Thailand. This study aimed to use Effective Microorganisms (EM) to inhibit *B. pseudomallei* contaminated in rice field soil.

Materials and Methods — The 15-day-fermented EM solution at 1.38 x 10^{11} cfu/ml was prepared and then diluted in 0.1 % peptone water to make 8 concentrations of 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 70% and 100%. Each concentration contained 200 ml solution. Then, we divided the experiment into 2 sets. In the first set, a 40 ml solution containing 10^{10} cfu/ml *B. pseudomallei* was then added into each EM solution without adding rice field soil. However, in the second set, we added 200 g of a sterile sample of rice field soil into each EM solution prepared as the above. For both sets, we detected *B. pseudomallei* and measured pH in each mixture on days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, and 49.

Results — In the first set of experiment, *B. pseudomallei* was not isolated from all EM dilutions except 0% at day 1 or later after inoculation. Before we added 40 ml of B. pseudomallei at 10^{10} cfu/ml into each EM dilution, pHs of the concentrations of 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 70% and 100%, were 7.30, 6.33, 5.67, 5.32, 5.13, 4.74, 4.41 and 3.72%, respectively. However, in the second set of experiment, we could not isolate *B. pseudomallei* from the mixtures at concentration of 50% or higher at day 1 after inoculation. At the end of experiment (day 49), pHs of soil-EM mixtures at concentration of 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 70% and 100% were 5.26, 6.80, 6.82, 6.83, 6.53, 6.11, 5.95 and 5.62, respectively.

Conclusion — Effective Microorganisms in high concentration can efficiently inhibit *B. Pseudomallei* in rice field soil.

KKU Vet J. 2009;19(1):30-37 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords: EM, effective microorganism, *Burkholderia pseudomallei*

[1]Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khonkaen University, Khonkaen, Thailand 40002

[2]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khonkaen University, Khonkaen, Thailand 40002

*__Corresponding author__ E-mail: narnan@kku.ac.th

ผลของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (อีเอ็ม) ต่อการยับยั้งเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในดินนา

นริศร นางาม[1*], พิทักษ์ น้อยเมล์[1], ฐิติมา นุตราวงศ์ [2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ *Burkholderia pseudomallei* เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสีส พบเชื้อนี้อยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินและน้ำของถิ่นระบาด โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนั้น การศึกษานี้จึงต้องการประเมินการใช้จุลินทรีย์ อีเอ็ม ในการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินนา

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ จุลินทรีย์ อีเอ็ม ที่หมักครบ 15 วันมีจุลินทรีย์รวมเท่ากับ 1.38 x 10^{11} เซลล์/มล. แล้วนำมาทำเจือจางที่ความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 70% และ 100% โดยปริมาตรในแต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 200 มล. การทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วน การทดลองที่ 1 ไม่ใช้ดินนา และเติม *B. pseudomallei* ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. ปริมาตร 40 มล. ลงในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายจุลินทรีย์ อีเอ็ม แต่การทดลองที่ 2 เติมดินนาปริมาณ 200 กรัม ลงในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายดังกล่าว ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการตรวจหาเชื้อ *B. pseudomallei* และวัดระดับของ pH ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 35, 42, และ 49 ของการทดลอง

ผลการศึกษา ในการทดลองที่ 1 ตรวจไม่พบเชื้อ *B. pseudomallei* ในวันที่ 1 และวันต่อ ๆ มาของการทดลอง ในทุกความเข้มข้นของสารละลายจุลินทรีย์ อีเอ็ม ยกเว้นความเข้มข้น 0% ส่วน pH ของสารละลายดังกล่าว วัดเมื่อเริ่มต้นทดลอง ที่ความเข้มข้น 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 70% และ 100% เท่ากับ 7.30, 6.33, 5.67, 5.32, 5.13, 4.74, 4.41 และ 3.72 ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายจุลินทรีย์ อีเอ็ม ที่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *B. Pseudomallei* ในวันที่ 1 ของการทดลอง หรือหลังจากนั้น คือ 50 % หรือมากกว่า ส่วน pH ของสารละลายดังกล่าว วัดเมื่อวันสิ้นสุดการทดลอง ที่ความเข้มข้น 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 70% และ 100% เท่ากับ 5.26, 6.80, 6.82, 6.83, 6.53, 6.11, 5.95, และ 5.62 ตามลำดับ

ข้อสรุป จุลินทรีย์ อีเอ็ม ที่มีความเข้มข้นในระดับสูง สามารถยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินนาได้

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2552;19 (1):30-37 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: อี เอ็ม จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ *เบรอค์โคลเดอเรีย ซูโดมาลิอาย*

[1]ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

[2]ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ:** E-mail: narnan@kku.ac.th

บทนำ

โรคเมลิออยโดสีสสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในคนและสัตว์ มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็น Saprophytic bacteria พบอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดินและน้ำของถิ่นที่มีการระบาดของโรคดังกล่าว อาจพบได้ทั้งชนิด Arabinose positive (Ara+) คือ *B. thailandensis* หรือชนิด Arabinose negative (Ara-) คือ *B. pseudomallei* แต่เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดสีส มักเป็นชนิด Arabinose negative (Ara-) [1] เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีชีวิตอยู่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องได้นาน 8 สัปดาห์ ในโคลนตมที่มีน้ำท่วมขังได้นาน 7 เดือน ที่อุณหภูมิตู้เย็น (4˚C) มีชีวิตอยู่นานหลายเดือน และสามารถเจริญที่ pH 4.5-8 อุณหภูมิ 15-42˚C ในดินที่มีปริมาณน้ำร้อยละ 10 ทำให้เชื้อแบคทีเรียนี้มีชีวิตอยู่ได้ถึง 70 วัน [2,3] โรคนี้กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในคนและสัตว์ในเขตร้อน โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ เวียดนาม ลาว และกัมพูชา เป็นต้น พบอุบัติการณ์โรคสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยมีอัตราส่วนผู้ป่วย 137.9/100,000 คน พบโรคมากในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน ถึงร้อยละ 75 ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็น ชาวนา ชาวไร่ ที่ต้องสัมผัสกับดินและน้ำเป็นประจำ เชื่อว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังที่เป็นแผลหรือรอยถลอก [4,5]

จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ หรือจุลินทรีย์ อีเอ็ม ประกอบด้วย กลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน กลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน กลุ่มเชื้อรา และกลุ่มยีสต์ รวมกันมากกว่า 80 ชนิด แบคทีเรียพวก *Lactobacillus casei, L. brugaricus* และ *Streptococcus lactis* ผลิตกรดแลคติก ที่เหลือจะเป็นพวกจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง เชื้อรารูปเส้นใย ยีสต์ เป็นต้น มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงดินจากนำโรคไปเป็นสภาพที่ต้านทานโรค ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวน นอกจากนี้ยังเร่งการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุและป้องกันการเกิดกลิ่นเหม็น [6]

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อต้องการทราบว่าจุลินทรีย์ อีเอ็ม สามารถยับยั้งเชื้อ *B. Pseudomallei* ในดินนาได้หรือไม่ ทดลองโดยการปรับเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์ อีเอ็ม จากน้อยไปหามาก จากนั้นดูความสามารถในการยับยั้งตามระยะเวลาที่จุลินทรีย์ อีเอ็ม สัมผัสกับดินนาที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย *B. pseudomallei* ทั้งนี้เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐาน สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุม ป้องกัน และกำจัดเชื้อโรคเมลิออยโดสีสในสิ่งแวดล้อมต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมจุลินทรีย์ อีเอ็ม

ผู้วิจัยเลือกซื้อจุลินทรีย์ อีเอ็ม จากบริษัทคิวเซ จำกัด โดยผสมในสัดส่วน อีเอ็ม: กากน้ำตาล: น้ำส้มสายชู 5%: เหล้าขาว 40 ดีกรี: น้ำสะอาด เท่ากับ 1:1:1:1:10 ส่วน ตามลำดับ หมักในภาชนะปิด 15 วัน แล้วตรวจวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์รวมด้วยวิธี Standard plate counts [7] ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างเชื้อ B. pseudomallei

B. pseudomallei ซึ่งแยกได้จากดินในเขตจังหวัดขอนแก่นได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเพาะเชื้อใน Ashdown's agar ที่ 37˚C ระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อ ตามวิธี McFarland [8] โดยมีการยืนยันจำนวนเชื้อด้วยวิธี Standard plate counts [7] ให้ได้ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. ซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้เกิดระบาดของโรคได้ [2] โดยเจือจางเชื้อใน 0.1% peptone water

การเตรียมตัวอย่างดินและการทดสอบผลของจุลินทรีย์ อีเอ็ม ต่อการทำลายเชื้อ B. pseudomallei

นำดินนาที่ซื้อจากเจ้าของนาริมถนนสายขอนแก่น-โกสุมพิสัย มาผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธี Autoclave แล้วนำดินใส่ขวดขนาด 250 มล. ขวดละ 200 กรัม เติม *B. pseudomallei* ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. ที่มีจุลินทรีย์ อีเอ็ม ความเข้มข้น 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 70%, และ 100% ตามลำดับ โดยผสมให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างดินปริมาณ 3 กรัม เพื่อนำไปเพาะหา *B. pseudomallei* ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, และทุก 7 วัน ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างจะวัด pH ทุกครั้งด้วย [9-11]

วิธีการตรวจวิเคราะห์

ใช้ pH meter (Bacman, USA) วัด pH ดินทดลองและจุลินทรีย์ อีเอ็ม สำหรับการตรวจหา *B. pseudomallei* ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ Selective media TBSS-C 20 และ Asdown's agar [10,11]

ผลการศึกษา

การวิเคราะห์จุลินทรีย์ อีเอ็ม และผลต่อการกำจัดเชื้อ *B. pseudomallei* ใน 0.1% peptone water จุลินทรีย์ อีเอ็ม เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ผลด้านจุลชีววิทยาพบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์รวมเท่ากับ 1.38 x 10^{11} เซลล์/มล. มี pH ที่ความเข้มข้น 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 70% และ 100% เท่ากับ 7.30, 6.33, 5.67, 5.32, 5.13, 4.74, 4.41 และ 3.72 ตามลำดับ **(Table 1)** เมื่อเติม *B. pseudomallei* ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. ปริมาตร 40 มล. พบว่าหลังเติมเชื้อไปแล้ว 24 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบเชื้อนี้ได้ในทุกความเข้มข้นของจุลินทรีย์ อีเอ็ม **(Table 2)**

Table 1. pHs in Each EM Concentration During Day 0 Through Day 5

Day	EM Concentrations (%)							
	0	5	10	20	40	50	70	100
0	7.30	6.33	5.67	5.32	5.13	4.74	4.41	3.72
1	7.25	6.22	5.69	5.31	5.16	4.68	4.36	3.69
2	7.27	6.29	5.72	5.33	5.05	4.67	4.37	3.69
3	7.29	6.24	5.71	5.36	5.17	4.70	4.37	3.65
4	7.30	6.37	5.81	5.40	5.21	4.75	4.38	3.73
5	7.26	6.31	5.74	5.35	5.11	4.79	4.40	3.66

Table 2. Efficacy of EM Concentrations Against *B. pseudomallei* in 0.1% Peptone Water

Day	EM Concentrations (%)							
	0	5	10	20	40	50	70	100
0	++++	++++[a]	-	-	-	-	-	-
1	++++	-[b]	-	-	-	-	-	-
2	++++	-	-	-	-	-	-	-
3	++++	-	-	-	-	-	-	-
4	++++	-	-	-	-	-	-	-
5	++++	-	-	-	-	-	-	-

[a]A sign indicates positive detection of *B. Pseudomallei.*

[b]A sign indicates negative detection of *B. Pseudomallei.*

ผลของจุลินทรีย์อีเอ็มต่อการกำจัดเชื้อ B. pseudomallei ในดินนา

ส่วนดินนาที่ผสมกับจุลินทรีย์ อีเอ็ม ที่ความเข้มข้นดังกล่าว มี pH เท่ากับ 5.27, 4.81, 4.61, 4.43, 4.19, 4.16, 4.10 และ 3.90 ตามลำดับ **(Table 3)** หลังเติม *B. pseudomallei* ขนาดเดียวกันที่ 24 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์ อีเอ็ม ที่ความเข้มข้น 50-100% ไม่สามารถตรวจเชื้อนี้ได้ และที่ความเข้มข้น 20% และ40% หลังเติมเชื้อนี้ไปแล้ว 14 วัน ไม่สามารถตรวจเชื้อนี้เช่นกัน และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 49 วัน พบว่า pH ของดินทดลองใกล้เคียงกับดินนาควบคุมซึ่งมี pH = 5.26 **(Table 3** และ **Table 4)**

Table 3. pH in Each EM Concentration in Rice Field Soil-EM Mixtures

Day	EM Concentrations							
	0	5	10	20	40	50	70	100
0	5.27	4.81	4.61	4.43	4.19	4.16	4.10	3.90
1	5.31	4.94	4.69	4.57	4.34	4.23	4.33	4.15
2	5.31	5.15	4.72	4.65	4.44	4.36	4.38	4.23
3	5.30	5.32	5.0	4.60	4.38	4.34	4.30	4.21
4	5.29	5.30	5.24	4.73	4.38	4.41	4.36	4.26
5	5.30	5.56	5.30	4.90	4.38	4.34	4.34	4.27
6	5.40	5.99	5.42	5.13	4.45	4.40	4.38	4.30
7	5.29	5.94	5.53	5.27	4.48	4.45	4.44	4.31
14	5.10	6.43	6.22	5.84	5.10	4.98	4.63	4.39
21	5.21	6.65	6.42	6.16	5.74	5.55	5.30	4.79
28	5.30	6.78	6.75	6.28	6.0	5.81	5.81	5.09
35	5.40	6.81	6.75	6.54	6.07	5.85	5.80	5.29
42	5.10	6.71	6.79	6.59	6.10	5.87	5.95	5.40
49	5.26	6.80	6.82	6.83	6.53	6.11	5.95	5.62

วิจารณ์

ผลการศึกษานี้บ่งบอกว่า จุลินทรีย์ อีเอ็มมีความสามารถในการต้านเชื้อ *B. Pseudomallei* ในดินนาได้ แต่ต้องใช้ความเข้มข้นในระดับสูง จากการทดลองนี้ ถ้าต้องการการต้านเชื้อ *B. Pseudomallei* ขนาด 10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลิลิตร ในดินนา 200 กรัม ให้ได้ภายใน 24 ชั่วโมง จำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์ อีเอ็ม ขนาด 1.38×10^{11} เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 50%-100% ของขนาดตั้งต้น

จุลินทรีย์ อีเอ็ม ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่สามารถตรวจพบ *B. pseudomallei* หลังเติมเชื้อนี้ไปแล้ว 24 ชั่วโมง และในดินนาผสม อีเอ็ม ที่ความเข้มข้น 50-100% และที่ความเข้มข้น 20% และ 40% ไม่สามารถตรวจพบ *B. pseudomallei* หลังเติมเชื้อนี้ไปแล้ว 24 ชั่วโมง และ 14 วัน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า อีเอ็ม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลาย *B. pseudomallei* และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 49 วัน pH ของดินนาที่ผสม อีเอ็ม ใกล้เคียงกับดินนาควบคุม ชี้ให้เห็นว่า อีเอ็ม มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ดินนาชั่วคราว และไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้ อีเอ็ม ต่อการยับยั้ง *B. pseudomallei* ยังไม่มีงานวิจัยการตีพิมพ์เผยแพร่มากนัก อย่างไรก็ตามมีรายงานการใช้ปูนขาวความเข้มข้น 10% และ 40% สามารถทำลาย *B. pseudomallei* ในน้ำและในดินได้ตามลำดับ แต่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม [9] และการใช้คลอรีน 0.1-0.5% ฆ่าเชื้อ *B. pseudomallei* [13] นอกจากนี้มีรายงานการใช้ อีเอ็ม ในการกำจัด *Salmonella Enteritidis* ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5% ระยะเวลา 1 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 100% ระยะเวลา 30 นาที จึงจะสามารถทำลายเชื้อ *S.* Enteritidis ในอุจจาระไก่ได้ [14]

จุลินทรีย์ อีเอ็ม มีข้อดีคือเกษตรกรสามารถจัดหาและเตรียมเองได้ มีราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม จึงมีความเหมาะสม ที่เกษตรกรจะนำไปใช้ประโยชน์ และจากผลการศึกษานี้ก็เป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความเข้มข้นที่เหมาะสมของจุลินทรีย์อีเอ็มต่อการต้านเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินนา ซึ่งเป็นแนวทางในการนำไปศึกษาต่อ หรือประยุกต์ใช้จริงในภาคสนาม ทั้งนี้จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความร้อน แสงแดด หรือจุลชีพชนิดอื่นที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ที่อาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ อีเอ็ม ในการต้านเชื้อ *B. pseudomallei*

Table 4. Efficacy of EM Against *B. pseudomallei* in Rice Field Soil-EM Mixtures

Day	EM dilutions							
	0	5	10	20	40	50	70	100
0	++++	++++	++++[a]	++++	++++	+	+	+
1	++++	++++	-	-	-	-	-	-
2	++++	++++	++[b]	++	++	-	-	-
3	++++	++++	-	++	++	-	-	-
4	++++	++++	+[c]	+	+	-	-	-
5	++++	++++	++	+	+	-	-	-
6	++++	++++	-[d]	-	+	-	-	-
7	++++	++	-	-	+	-	-	-
14	++++	++	-	-	-	-	-	-
21	++++	++++	++	-	-	-	-	-
28	++++	++++	++	-	-	-	-	-
35	++++	++++	++	-	-	-	-	-
42	++++	++++	++	-	-	-	-	-
49	++++	++++	++	-	-	-	-	-

[a]A sign indicates positive detection of *B. pseudomallei* with high number.

[b]A sign indicates positive detection of *B. pseudomallei* with moderate number.

[c]A sign indicates positive detection of *B. pseudomallei* with low number.

[d]A sign indicates negative detection of *B. Pseudomallei.*

เอกสารอ้างอิง

1. Gilmore G, Barnes J, Ketheesan N, Norton R. Use of antigens derived from *Burkholderiapseudomallei, B. thailandensis,* and *B. cepacia* in the indirect hemagglutination assay for melioidosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14 (11):1529-1531.
2. Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. Melioidosis. Veterinary Medicine: *A Text Book of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats and Horses*, 6th ed. England: Bailliere Tindall; 1983.
3. Tong S, Yang S, Lu Z, He W. Laboratory investigation of ecological factors influencing the environmental presence of *B. pseudomallei. J Microbiol Immunol.* 1996;40:451-453.
4. Leelarasamee A. Melioidosis in southeast Asia. *Acta Tropica.* 2000;74:129-132.
5. Vuddhakul V, Tharavichitkul P, Na-ngam N, Jitsurong S, Kunthawa B, Noimay P, et al. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60(3):458-461.

6. จุลพงษ์ ทวีศรี. จุลินทรีย์ อี เอ็ม. *วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ.* 2543;10 (2):2-5.
7. LeChevallier MW, Seidler RJ, Evans TM. Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Appl Environ Microbiol.* 1980;40 (5):922-930.
8. McFarland J. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Am Med Assoc.* 1907;14:1176-1178.
9. Na-ngam N, Angkititakul S, Noimay P, Thamlikitkul V. The effect of quicklime (calcium oxide) as an inhibitor of *Burkholderia pseudomallei. Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2004; 98:337-341.
10. Wuthiekanun V, Smith MD, White NJ. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89:491-503.
11. Wuthiekanun V, Smith MD, Dance DAB, White NJ. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in North-eastern of Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89:41-43.
12. Ashdown, L.P. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology.* 1979;11(2):293-297.
13. Chaita T, Ankititrakul S, Wanitjiewaphan K, Hannond P, Kongthaworn A, Trakarnthai K. Minimum concentration of chlorine against *Burkholderia pseudomallei* from human and animal isolates. *10th Asean Conference in Medical Laboratory Technology.* Chiang Mai Thailand 26-30 April 2004 (Abstract); p267.
14. นริศร นางาม, วสันต์ จันทรสนิท, พิทักษ์ น้อยเมล์. การศึกษาประสิทธิผลของ อี เอ็ม ต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา เอ็นทิไรติดีส. *วารสารวิจัย มข.* 2549;11(4):281-286.