# รายงานวิจัย

## ประสิทธิภาพยีสต์โปรไบโอติกในการควบคุมเชื้อก่อโรค
## ในกุ้งขาวแวนนาไม
## The efficacy of probiotic yeasts to control pathogenic microorganisms in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)


ชาคริยา ฉลาด Chakhriya Chalad
วิกิจ ผินรับ Wikit Phinrub

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย



ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2564

# รายงานวิจัย

## ประสิทธิภาพยีสต์โปรไบโอติกในการควบคุมเชื้อก่อโรค ในกุ้งขาวแวนนาไม

## The efficacy of probiotic yeasts to control pathogenic microorganisms in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)


ชาคริยา ฉลาด Chakhriya Chalad
วิกิจ ผินรับ Wikit Phinrub

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย



ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2564

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2564 เป็นงานวิจัยเพื่อก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ในการศึกษาประสิทธิภาพยีสต์โปรไบโอติกในการควบคุมเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อเป็นแนวทางการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน เพื่อผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำต่อไป

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือ ตลอดจนสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้การช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกด้วยดี ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่ช่วยในการทำวิจัยครั้งนี้ลุล่วงได้ด้วยดี ตลอดจนครอบครัวและผองเพื่อนที่ให้ความห่วงใยให้กำลังใจเสมอมา ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านและหน่วยงาน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาส นี้

ชาคริยา ฉลาด
วิกิจ ผินรับ
กันยายน 2565

# ประสิทธิภาพยีสต์โปรไบโอติกในการควบคุมเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม

**ชาคริยา ฉลาด[1] และ วิกิจ ผินรับ[2]**

## บทคัดย่อ

จากตัวอย่างกุ้งทะเลที่เก็บจากตลาดนัดในพื้นที่ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง จำนวน 3 ครั้ง สามารถแยกยีสต์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ได้ 16 ไอโซเลท จากจำนวน 48 ไอโซเลท และมี 10 ไอโซเลท ได้แก่ CC8 CC12 CC15 CC16 CC18 CC20 CC24 CC26 CC30 และ CC32 มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี อยู่ระหว่าง 9.0 ถึง 23.1 มิลลิเมตร จากการทดสอบความเป็นพิษของยีสต์ 10 ไอโซเลท พบว่า กุ้งที่ฉีดไอโซเลท CC8 CC18 CC20 CC24 และ CC26 มีอัตรารอดชีวิตร้อยละ 100 ในขณะที่กุ้งฉีดไอโซเลท CC12 CC15 CC16 และ CC30 มีอัตรารอดร้อยละ 96.7 ± 4.7 และกุ้งที่ฉีดไอโซเลท CC32 มีอัตรารอดร้อยละ 93.3 ± 0 เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน จากการทดสอบการรอดชีวิตของยีสต์ พบว่าไอโซเลท CC26 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด คือ $3.6 \times 10^{6}$ CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน และ $8.5 \times 10^{2}$ CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน รองลงมา คือ ไอโซเลท CC20 CC24 CC8 CC30 CC18 CC32 CC12 CC16 ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท CC16 และ ไอโซเลท CC32 ไม่พบการรอดชีวิตเมื่อเวลาผ่านไป 9 วัน จากการทดสอบการยึดเกาะกับโฮสต์ของยีสต์ พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ไอโซเลท CC26 CC24 CC20 มีจำนวน $2.9 \times 10^{4}$, $2.1 \times 10^{4}$ และ $1.8 \times 10^{4}$ CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน มีจำนวน 6.2 x 10, 4.1.9 x 10 และ 3.7 x 10 CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท CC12 CC15 และ CC30 ไม่มีการเกาะติดกับโฮสต์เมื่อเวลาผ่านไป 9 วัน และไอโซเลท CC16 และ CC32 ไม่มีการเกาะติดกับโฮสต์เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน จากการบ่งชี้สปีชีส์ของยีสต์ 10 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS region สามารถบ่งชี้ยีสต์ได้ 4 จีนัส และ 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Yarrowia lipolytica* และ *C. glabrata* โดยมี %identity ระหว่าง 99 - 100

จากการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่ายีสต์ *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* และ *W. anomalus* สามารถนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

**คำสำคัญ:** ยีสต์โปรไบโอติก เชื้อก่อโรค กุ้งขาวแวนนาไม

[1]อาจารย์ สาขาศึกษาทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

[2]อาจารย์ สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

# The efficacy of probiotic yeasts to control pathogenic microorganisms in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

**Chakhriya Chalad[1] and Wikit Phinrub[2]**

## Abstract

In this work, a total of three time were collected wild shrimp samples from retail markets in Sikao district, Trang province, southern Thailand. Sixteen out of 48 yeast isolates exhibited inhibitory activity toward *Vibrio parahaemolyticus, V. harveyi* and *V. vulnificus*. Ten isolates that possessed high inhibitory activity with inhibition zone between 9.0 and 23.1 mm were CC8 CC12 CC15 CC16 CC18 CC20 CC24 CC26 CC30 and CC32. The toxicity of 10 isolates yeast was found that CC8, CC18, CC20, CC24 and CC26 isolates caused no harm to shrimp, while shrimp injected with isolates CC12, CC15, CC16 and CC30 had a survival rate 96.7 ± 4.7 and shrimp injected with CC32 isolate had a survival rate of 93.3 ± 0 after 5 days. The survival of 10 isolates yeast, CC26 isolate showed that the highest survival rates of $3.6 \times 10^6$ CFU/ml at 1 day and $8.5 \times 10^2$ CFU/ml after 10 days, followed by CC20 CC24 CC8 CC30 CC18 CC32 CC12 CC16 isolates, respectively. However, CC16 and CC32 isolates no survival after 9 days. The adhesion of yeast, CC26 CC24 CC20 isolates were $2.9 \times 10^4$, $2.1 \times 10^4$ and $1.8 \times 10^4$ CFU/ml after 1 day, respectively. There were 6.2 x 10, 4.1.9 x 10 and 3.7 x 10 CFU/ml after 10 days, respectively. While CC12, CC15 and CC30 isolates did not adhered to the host after 9 days and CC16 and CC32 isolates did not adhered to the host after 7 days. Yeast species identification was performed by polymerase chain reaction (PCR) targeted to the internal transcribed spacer (ITS) region and confirmed by sequencing. Four genera and 5 species of yeast were *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Yarrowia lipolytica* และ *C. glabrata* that identified with 99-100% homology to the GenBank sequences.

Therefore, *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* and *W. anomalus* can be used in whiteleg shrimp culture for effective pathogen control.

**Keyword:** Probiotic yeasts, Pathogenic microorganisms, *Litopenaeus vannamei*

[1] Department of General Studies, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang

[2] Department of Aquaculture and Fishery product, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang

# สารบัญ

หน้า


| | |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ข |
| บทคัดย่อภาษาไทย | ค |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ง |
| สารบัญ | จ |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| สารบัญภาพ | ช |
| บทนำ | |
| - ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| - หลักการ แนวคิด ทฤษฎี หรือสมมติฐาน | 2 |
| - การทบทวนวรรณกรรม เอกสาร งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| วัตถุประสงค์ | 12 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 12 |
| วิธีการดำเนินงานวิจัย | 13 |
| ผลการวิจัยและอภิปรายผล | 16 |
| สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ | 24 |
| บรรณานุกรม | 25 |
| ภาคผนวก | 30 |

# สารบัญตาราง

หน้า


ตารางที่ 3.1 จำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้ และจำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม 16

ตารางที่ 3.2 ผลกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ของสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้ 17

ตารางที่ 3.3 อัตราการรอดชีวิตของยีสต์ในกุ้งขาวแวนนาไม 19

ตารางที่ 3.4 ผลการบ่งชี้ชนิดของไอโซเลทยีสต์ 10 สายพันธุ์ 23

# สารบัญภาพ

หน้า


ภาพที่ 1.1 กลไกการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 6

ภาพที่ 3.1 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม (*V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus*) ของยีสต์ ด้วยวิธี modified agar well technique 18

ภาพที่ 3.2 จำนวนการรอดชีวิตของไอโซเลทยีสต์ที่ฉีดเข้าในกุ้งขาวแวนนาไม เป็นระยะเวลา 10 วัน 20

ภาพที่ 3.3 จำนวนการยึดเกาะกับโฮสต์ของไอโซเลทยีสต์กับกุ้งขาวแวนนาไม เป็นระยะเวลา 10 วัน 21

ภาพที่ 3.4 โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar (ก และ ค) และสัณฐานวิทยาของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข และ ง) 22

# บทนำ

## ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ตามยุทธศาสตร์ชาติด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ตัวชี้วัด ประกอบด้วย (1) พื้นที่สีเขียวที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (2) สภาพแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติที่เสื่อมโทรมได้รับการฟื้นฟู (3) การเติบโตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และ (4) ปริมาณก๊าซเรือนกระจก มูลค่าเศรษฐกิจฐานชีวภาพ ประเด็น 1. สร้างการเติบโตอย่างยั่งยืนบนสังคมเศรษฐกิจสีเขียว โดย (1) เพิ่มมูลค่าของเศรษฐกิจฐานชีวภาพให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน (2) อนุรักษ์และฟื้นฟูความหลากหลายทางชีวภาพในและนอกถิ่นกำเนิด (3) อนุรักษ์และฟื้นฟูแม่น้ำลำคลองและแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วประเทศ (4) รักษาและเพิ่มพื้นที่สีเขียวที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และ (5) ส่งเสริมการบริโภคและการผลิตที่ยั่งยืน ยุทธศาสตร์วิจัย วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) (2) การสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ยุทธศาสตร์มหาวิทยาลัย (1) สร้างความโดดเด่นและเป็นเลิศเฉพาะทางตามอัตลักษณ์เชิงพื้นที่ และยุทธศาสตร์จังหวัด (1) สร้างฐานเศรษฐกิจของจังหวัดด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมที่มั่นคงและยั่งยืน

การเพาะเลี้ยงกุ้งถือเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่เติบโตและขยายตัวอย่างรวดเร็วและเป็นส่วนสำคัญต่อเศรษฐกิจโลก (Das *et al*., 2008) แต่การเพาะเลี้ยงกุ้งในปัจจุบัน มักมีโรคระบาด ซึ่งปัญหาเกี่ยวกับโรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง (Balcazar *et al*., 2006) การควบคุมโรคโดยการใช้ยาปฏิชีวนะแม้จะได้ผล แต่การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นจำนวนมากทำให้แบคทีเรียสามารถพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ในที่สุด (Moriarty, 1997) และส่งผ่านยีนที่มีคุณสมบัติดื้อยาไปยังสายพันธุ์อื่นๆ ทำให้ต้องเพิ่มปริมาณการใช้ยามากขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ยิ่งกว่านั้นการใช้ยาปฏิชีวนะก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในกุ้งซึ่งกระทบต่อการส่งออก ไม่เป็นที่ยอมรับในตลาดต่างประเทศ รวมถึงส่งผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค (Kumar *et al*., 2016) การเพาะเลี้ยงกุ้งจึงต้องอาศัยเทคนิคใหม่ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและจุลชีววิทยาซึ่งจะเป็นเครื่องมือสำคัญในการได้รับปริมาณและคุณภาพของผลผลิตที่สูงขึ้น การเติมสารต่างๆ ในอาหารกุ้ง การจัดการที่ดีภายในฟาร์มด้านลูกพันธุ์กุ้ง ดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมถือเป็นบทบาทสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งและลดโรคกุ้งได้ (Ringø *et al*., 2014) การจัดการให้กุ้งเจริญเติบโตดี มีสุขภาพแข็งแรงและมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant) และการเสริมสารอาหารบางชนิด (Nutrients supplementation) ที่เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและเพิ่มความต้านทานการติดเชื้อโรคจึงถูกนำมาใช้ (Raa, 1996) ดังนั้น โปรไบโอติกจึงถูกเลือกให้เป็นอีกวิธีการทางชีวภาพที่มีประโยชน์และน่าสนใจสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้ง (Nayak, 2010) เนื่องจากเป็นวิธีที่จัดว่าเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและปลอดภัยต่อผู้บริโภค เนื่องจากวิธีนี้เป็นการใช้ศัตรูทางธรรมชาติในการควบคุมและกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรค เพิ่มภูมิคุ้มกันและรักษาคุณภาพน้ำ โดยยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ถือได้ว่ามีความปลอดภัย เนื่องจากไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดการแพ้และไม่ก่อให้เกิดโรค (Fredlund *et al*., 2002)

ส่วนประกอบของเซลล์ยีสต์สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโฮสต์ ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (Navarrete และ Tovar-Ramírez, 2014) นอกจากนี้ยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเอนไซม์ได้หลากหลายชนิด (Zhenming *et al.*, 2006; Nayak, 2011)

สำหรับการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาประสิทธิภาพยีสต์โปรไบโอติกในการควบคุมเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อเป็นแนวทางการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน เพื่อผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำต่อไป

**หลักการ แนวคิด ทฤษฎี หรือสมมติฐาน**

การเลี้ยงกุ้งให้มีอัตราการรอดสูง มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และไม่เป็นโรคเป็นเป้าหมายหลักของการเพาะเลี้ยงกุ้ง ขณะเลี้ยงจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะโดยไม่มีการควบคุมชนิดและปริมาณของยาให้เหมาะสม ทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณเท่าเดิมไม่ได้ผล ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยา (นิตยา และคณะ, 2549) นอกจากนี้ส่งผลอย่างมากต่อผลผลิต สภาพแวดล้อม และผู้บริโภค ผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดในการใช้โปรไบโอติกเข้ามาแก้ปัญหา โปรไบโอติก (Probiotic) มีความหมายว่า“เพื่อชีวิต (For life)” (Gismondo *et al.*, 1999; Farzanfar, 2006) ซึ่งตรงข้ามกับสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ที่หมายถึงการต้านชีวิต โปรไบโอติกเป็นเทคโนโลยีชีวภาพในการใช้จุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติไม่เป็นภัยต่อสิ่งแวดล้อมมาทดแทนการใช้สารเคมีด้วยหลักการการใช้จุลินทรีย์ที่ดีไปควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ทั้งนี้แบคทีเรียโปรไบโอติกมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางและยาวนานแล้ว ผู้วิจัยจึงสนใจการนำยีสต์โปรไบโอติกมาทำการศึกษา เนื่องจากยีสต์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน วิตามิน โพลีแซคคาไรด์ กรดไขมัน ฟอสโฟลิพิด โพลีเอมีน แอสตาแซนทิน แคโรทีนอยด์ ทรีฮาโลส กลูตาไธโอน และเอนไซม์ต่างๆ เช่น ไลเปส โปรตีเอส อินเวอร์เทส ไฟเทส ไคติเนส และ ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Zhenming *et al.*, 2006; Nayak, 2011) ส่งเสริมให้ยีสต์มีกิจกรรมออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ที่หลากหลาย และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยีสต์มีศักยภาพสูงในกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เนื่องจากยีสต์มีองค์ประกอบหลายชนิดที่มีผลโดยตรงต่อการต้านทานโรค เช่น เบต้ากลูแคน กรดนิวคลีอิก ไคติน โพลีเอมีน แมนโนโปรตีน แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ รวมทั้ง secondary metabolite เช่น แอสตาแซนทิน ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโฮสต์ ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียก่อโรค (Navarrete และ Tovar-Ramírez, 2014) นอกจากนี้ยีสต์มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้านทานโรค เพิ่มอัตรารอดตาย และส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำได้ (Chi *et al.*, 2010) และที่สำคัญการถ่ายโอนยีนดื้อยาระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกกับแบคทีเรียก่อโรคพบว่าเป็นปัญหาใหญ่และเป็นสิ่งที่น่ากังวลอย่างมาก แต่ไม่มีรายงานการถ่ายโอนยีนดื้อยาระหว่างในยีสต์โปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จะสามารถตอบคำถามของสมมุติฐานจากการศึกษาประสิทธิภาพยีสต์โปรไบโอติกในการควบคุมเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไมดังกล่าวได้ โดยเก็บตัวอย่างและคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์จากกุ้งทะเลหรือกุ้งธรรมชาติ คัดเลือกยีสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นยีสต์โปรไบโอติก โดยศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* และ *Vibrio vulnificus* ศึกษาความเป็นพิษของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกต่อกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งศึกษาการรอดชีวิตและการยึดเกาะกับโฮสต์หรือกุ้งขาวแวนนาไม ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ยีสต์โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

**การทบทวนวรรณกรรม เอกสาร งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

ยีสต์ คือ ราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส หรือเรียกว่า eukaryotic microorganism มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (Budding) หรือแบ่งตัว (Fission) เนื่องจากเป็นเซลล์เดี่ยวจึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า เนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นผิวต่อปริมาตรสูงกว่า (Kurtzman and Fell, 2000) ยีสต์ต่างจากสาหร่ายเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และไม่เหมือนโพรโทซัวเพราะมีผนังเซลล์ที่แข็งแรง นอกจากนี้ยังแตกต่างไปจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ เพราะมีขนาดใหญ่กว่า และสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันด้วย ขนาดของยีสต์แตกต่างกันตั้งแต่ ความกว้าง 1-5 µm และความยาว 5-30 µm หรือมากกว่า มักมีรูปไข่ แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวและบางชนิดเป็นทรงกลม ยีสต์แต่ละชนิดจะมีรูปร่างโดยเฉพาะ แม้จะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังมีความแตกต่างที่ขนาดและรูปร่างของแต่ละเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีแฟลกเจลลาหรืออวัยวะอื่นที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โคโลนีของยีสต์มีขนาด รูปร่าง โครงสร้าง และขอบแตกต่างกัน เช่นเดียวกับแบคทีเรีย บางชนิดอาจมีโคโลนีเรียบ บางชนิดย่น ขรุขระ บางชนิดแบนราบ หรือนูนสูงขึ้น บางชนิดขอบเรียบ บางชนิดขอบไม่แน่นอนหรือคล้ายเส้นขน โคโลนีอายุน้อยมีความหนืดคล้ายแป้งเปียก เมื่ออายุมากขึ้นจะยิ่งหนาและแห้งมากขึ้น และอาจสร้างรงควัตถุด้วย การเจริญในอาหารเหลวมีลักษณะสำคัญ บางชนิดเจริญที่ก้นหลอดตกตะกอน บางชนิดเจริญอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งหลอด บางชนิดเจริญเฉพาะผิวหน้าอาหาร เป็นแผ่นหรือฟิล์มปกคลุม ยีสต์พบทั่วไปในธรรมชาติ และแพร่กระจายไปโดยอาศัยแมลงพาไปและโดยกระแสลม ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์อาศัยอยู่บนสารอินทรีย์ที่ตายแล้ว บางชนิดเป็นปรสิตอาศัยโฮสต์ที่มีชีวิตและทำให้เกิดโรคแก่คน สัตว์ และพืชได้ ยีสต์หลายชนิดพบอยู่ในดิน ชนิดของยีสต์ในดินสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่ของเชื้อ ความสามารถที่จะอยู่รอดในธรรมชาติ องค์ประกอบของดิน อุณหภูมิ แสงแดด ความชื้นและปัจจัยอื่นๆ สามารถพบยีสต์ได้ในดินที่ว่างเปล่าหรือดินที่มีการเพาะปลูก เช่น ป่า สวน ทุ่งหญ้า จากการสำรวจ พบว่า ยีสต์สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมทุกชนิด ทั้งน้ำจืด น้ำเค็ม ปากอ่าว และพบมากที่สุดที่ชายฝั่งเนื่องจากมีสารอาหารสะสมมาก อย่างไรก็ตามก็ยังพบยีสต์ในกลางมหาสมุทรที่มีความลึก 4,000 เมตร ในทะเลดำ จำนวนยีสต์มีมากที่ระดับ 1,000 เมตรแรกของระดับน้ำ แต่ยิ่งลึกลงไปจะพบยีสต์เพียง 25% อาจเนื่องจากความเข้มข้นของออกซิเจนที่ลดลง และมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์มาก

ในทะเลสาบออนตาริโอ พบยีสต์ได้ทั้งในน้ำและในตะกอนดิน จำนวนยีสต์แตกต่างไปตามความลึก ที่ก้นแหล่งน้ำมีเซลล์มีชีวิตมากกว่าที่แหล่งน้ำตอนบนๆ อาจเนื่องจากมีปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจนและไนเตรทอยู่มาก (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2554)

ยีสต์บกหรือ terrestrial yeast มีการนำมาใช้อย่างหลากหลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ขนมอบ เครื่องดื่ม ไวน์ ไบโอเอทานอล และอุตสาหกรรมยา ในขณะที่ยีสต์ทะเลหรือ marine yeast ซึ่งพบกระจายในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ได้แก่ น้ำทะเล ตะกอนดิน ตะกอนดินทะเล ปากอ่าว วัชพืช สาหร่าย สัตว์ทะเล และระบบนิเวศของป่าชายเลน และมีรายงานถึงประโยชน์ในด้านต่างๆ และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากยีสต์ทะเล พบว่า ยีสต์ทะเลใช้เป็น biocontrol agents ได้แก่ probiotic, immuno-stimulants, siderophores, killer toxins และ vaccine ยีสต์ทะเลสามารถใช้เป็นผู้ผลิต bio-products ต่างๆ เช่น industrial enzyme, riboflavin, single cell protein, single cell oil และ nanoparticle นอกจากนี้สามารถใช้กำจัดมลพิษจากสิ่งแวดล้อมทางทะเล (Chi *et al*., 2010)

**องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์**

1. แคปซูล (Capsule) ยีสต์บางชนิดมีสารเมือก เหนียว ที่ขับออกสู่ภายนอกเซลล์ที่เรียกว่าแคปซูล ส่วนใหญ่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีทั้งเฮเทอโรพอลิแซ็กคาร์ไรด์ แมนโนส และสารที่คล้ายแป้ง

2. ผนังเซลล์ (Cell wall) ผนังเซลล์ของยีสต์จะบางในเชื้ออายุน้อยและจะหนาขึ้นตามอายุ องค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์มีพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด คือ กลูแคน 30 - 40% และแมนแนน 30% โดยกลูแคน (ประกอบด้วย ดี-กลูโคส) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในยีสต์ต่างๆ แต่แมนแนน (ประกอบด้วย ดี-แมนโนส) จะไม่พบในผนังเซลล์ของ *Schizosaccharomyces, Nadsonia, Rhodotorula* และราที่มีเส้นใยทุกชนิด ผนังเซลล์ของยีสต์มีโปรตีนประกอบอยู่ด้วย เช่น ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* มีโปรตีน 6 - 8% ซึ่งโปรตีนบางชนิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ เนื่องจากเคยพบอินเวอร์เทสและไฮโดรเลสที่ผนังเซลล์ ผนังเซลล์ยีสต์มีไขมันอยู่ 8.5 - 13.5% ปริมาณไคทินเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของยีสต์ เช่น *Schizosaccharomyces* spp. ไม่มีไคทิน *S. cerevisiae* มีไคทิน 1.0 - 2.0% และยีสต์บางชนิด เช่น ยีสต์ที่เป็นเส้นสายมีปริมาณไคทินมากถึง 2% ในส่วนกลูโคซามีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของราที่เป็นเส้นสายมีอยู่น้อย นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของสารอินทรีย์ก็มีแตกต่างกันมาก

3. เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) เยื่อหุ้มเซลล์มีความหนาประมาณ 8 μm ประกอบด้วยชั้นสามชั้นที่ทึบต่อแสงอิเล็กตรอนสองชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นในสุด เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไขมัน (รวมทั้งฟอสโฟลิพิด) โปรตีน และพอลิแซ็กคาไรด์

4. องค์ประกอบในโพรโทพลาสซึม (Protoplasm) เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยไซโทพลาสซึมซึ่งเป็นสารกึ่งเหลว ภายในมีไรโบโซมที่มี RNA และออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม ได้แก่ เอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม ซึ่งเชื่อมติดต่อกับเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอก และอาจติดต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย ในไซโทพลาสซึมมีเอนไซม์หลายชนิด

5. นิวเคลียส (Nucleus) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบ เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีสมบัติยอมให้สารบางอย่างผ่านได้เท่านั้น (Semipermeable membrane) นิวเคลียสมีหน้าที่เกี่ยวกับเมแทบอลิซึม และการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

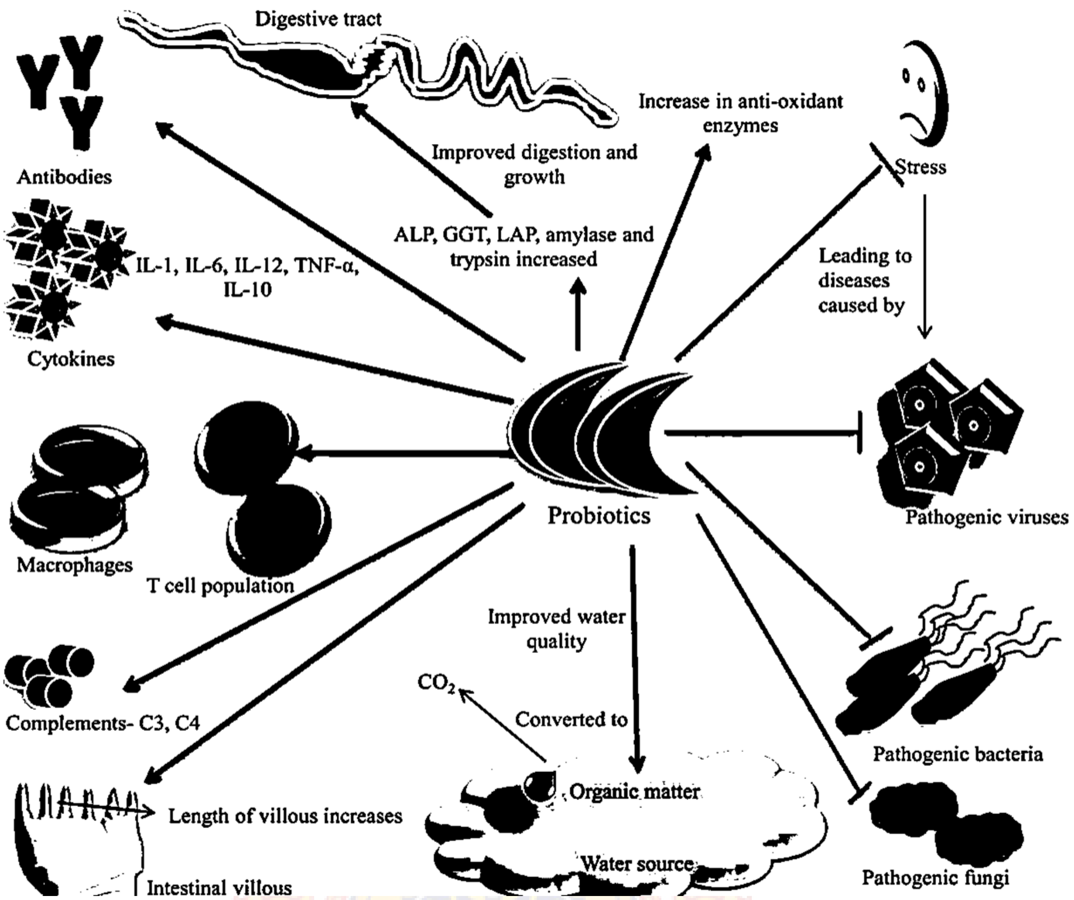
6. ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายพันอยู่ ไมโทคอนเดรียมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3 - 1 µm และความยาวถึง 3 µm มีเยื่อหุ้มสองชั้น ชั้นในจะพับเว้าเข้าข้างในเป็นคริสตี ไมโทคอนเดรียประกอบด้วยลิโพโปรตีนจำนวนมากและมี RNA และ DNA เล็กน้อย โดย DNA นี้ ต่างจาก DNA ของนิวเคลียส เนื่องจากไมโทคอนเดรียมีเอนไซม์เกี่ยวกับการหายใจ จึงเรียกว่าเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์

7. แวคิวโอล (Vacuole) ภายในเซลล์ยีสต์จะมีแวคิวโอลอยู่หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งแวคิวโอล ซึ่งมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเมื่อย้อมสี ในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตภายในแวคิวโอลจะไม่มีโครงสร้างที่เป็นชิ้นส่วน แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase แวคิวโอลจะมีสารแกรนูลเพิ่มขึ้น อาจเป็นเมตาฟอสเฟต พอลิฟอสเฟต หรือลิพิด สารที่อยู่ในแวคิวโอลที่เคยแยกได้ ได้แก่ เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการไฮโดรไลซ์ปฏิกิริยาต่างๆ เช่น โปรตีเอส ไรโบนิวคลีเอส และเอสเทอเรส จากการที่พบเอนไซม์ไฮโดรเลสในแวคิวโอล จึงคิดว่าแวคิวโอลเปรียบเหมือนไลโซโซม

8. อินคลูชันต่างๆ (Inclusion) เซลล์ยีสต์ที่แก่จะมีผนังเซลล์หนาขึ้นและสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อน ความแห้งแล้ง และสารเคมี ยีสต์บางชนิดสะสมสารต่างๆ ไว้จำนวนมาก เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน ตัวอย่าง เช่น *Endomycopsis vernalis* ใช้เป็นแหล่งอาหารไขมันสำหรับมนุษย์ในประเทศเยอรมันระหว่างสงคราม ปริมาณไขมันใน *E. vernalis* และ *Torulopsis lipofera* อาจมีมากกว่า 50% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ยีสต์ชนิดอื่นใช้เป็นแหล่งไกลโคเจน เอนไซม์ และวิตามินสำหรับจุลินทรีย์ และเป็นอาหารเสริมของคนและสัตว์ บางชนิดมีรงควัตถุสีเหลือง ส้ม ชมพู น้ำตาล หรือสีดำ ถ้าเลี้ยงเชื้อไว้นาน (ประมาณ 3 สัปดาห์) รงควัตถุเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นคาโรทีนอยด์ที่ละลายในไขมัน นอกจากนี้รงควัตถุ เช่น ไซโตโครม เฟลวิน ฮีโมโกลบิน และอื่นๆ ที่พบในพืชและสัตว์ชั้นสูง ก็พบในยีสต์ด้วย (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2554)

**คุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**

1. ตัวเร่งการเจริญเติบโต
2. ยับยั้งเชื้อก่อโรค
3. การยับยั้งการแข่งขันของแบคทีเรียก่อโรค
4. การปรับปรุงการย่อยสารอาหาร
5. การปรับปรุงคุณภาพน้ำและดิน
6. การยับยั้งการเกิด quorum sensing
7. กระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์




**ภาพที่ 1.1** กลไกการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Zorriehzahra *et al*., 2016)

**คุณสมบัติความเป็นยีสต์โปรไบโอติกและการต้านจุลชีพ**

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่กำลังได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นจากนักอุตสาหกรรมและนักวิทยาศาสตร์เนื่องจากยีสต์มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ที่หลากหลาย สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารได้อย่างกว้างขวาง สามารถช่วยปรับปรุงกลิ่นรสในอาหารหมักได้ ซึ่งนอกจากยีสต์จะมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกแล้ว ยีตส์ยังมีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ได้อีกด้วย โดยมีการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อราได้ ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ของยีสต์เกี่ยวข้องกับสารอาหาร ความเป็นกรดด่างในอาหารที่ยีสต์เจริญ การทนต่อเอธานอลความเข้มข้นสูง และการปลดปล่อยสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial compound) เช่น สารพิษต้านเชื้อรา (Antifungal killer toxin) และสารต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของยีสต์ มีความเกี่ยวข้องกับการผลิต secondary metabolites ที่เรียกว่า killer toxin หรือ mycocins (Hatoum *et al*., 2012) โดยนักวิทยาศาสตร์นิยมเรียกยีสต์ที่สร้าง killer toxin ได้ว่า killer yeast จากการศึกษาของทีมนักวิจัยจาก Ocean University of China พบว่า *Aureobasidium purpullans* HN2.3, *Debaromyces hansenii* hex-1, *Pichia guilliermondii* GZ1, *P. anomala* YF07b และ *Williopsis saturnus* WC91-2 ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล สามารถสร้างสาร killer toxin ที่ยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ก่อโรคในปู ส่วน *A. pullulans* HN2.3 สร้างสารต้นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น siderophore และสามารถฆ่าแบคทีเรีย *Vibrio anguillaram* และ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคในกุ้งได้ แต่ไม่มีผลต่อยีสต์ที่ก่อโรคโรคในปู (Wang *et. al*., 2009) ยีสต์ถือว่าเป็นหนึ่งในโพรไบโอติกที่ช่วยในเรื่องการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ได้ของอาหาร จึงถูกนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลาย เช่น ในปลา Catla carp, ปลา Mrigal carp, ปลาลูกผสม Striped bass, ปลา Japanese flounder, ปลา Grouper (*Epinephelus coioides*) ตลอดจนปลานิลและปลา Galilee tilapia (*Sarotherodon galilaeus*) (นันทพร และคณะ, 2561) เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์มีสารพวก β-glucans สาร mannan และสาร nucleic acid ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของโฮสต์ (Kühlwein *et al*., 2014) นอกจากนี้ Chang และคณะ (2003) รายงานว่าการให้อาหารกุ้งที่มีส่วนผสมของเบต้ากลูแคนในระดับ 10 กรัม/กิโลกรัมของอาหารกุ้ง เป็นเวลา 20 วัน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้ และจากงานวิจัยของ Zhenming และคณะ (2006) พบว่า ยีสต์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น polyamine ทำให้กุ้งมีอัตรารอดสูงขึ้นรวมทั้งผลิตเม็ดเลือดได้มากขึ้น รวมทั้งการนำ astaxantrin และ carotenoid ใส่ในอาหารสัตว์สามารถเป็นสารตั้งต้นในการผลิตวิตามินเอได้

**เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม**

***Vibrio parahaemolyticus*** เป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) มีลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีขนาดความยาว 1.4 - 2.6 µm และมีความกว้าง 0.5 - 0.8 µm ไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูล เมื่ออยู่ในอาหารเหลวจะเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาเส้นเดียวที่ขั้ว (Single polar flagellum) แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งหรือสิ่งแวดล้อมที่มีความหนืดสูงจะ

สามารถสร้างแฟลกเจลลารอบเซลล์ (Peritrichous flagella) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) แต่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่า ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (Chemoorganotroph) สามารถสร้างเอนไซม์ตะตะเลสและ ออกซิเดสได้ ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสแต่หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแต่ไม่ให้แก๊ส ลักษณะโคโลนีบนอาหาร thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) มีสีเขียว เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2 - 3 mm นอกจากนี้ยังสามารถหมักน้ำตาลแมนนิทอลและแมนโนสได้ แต่ไม่สามารถหมักซาลิซินหรือเซลลูไบโอส สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นอินโดลได้ เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15 - 42 องศาเซลเซียส (Mesophile) อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ คือ 5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้ คือ 44 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 30 - 35 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ที่ pH ค่อนข้างกว้าง คือ 4.8 - 11 แต่ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7.6 - 8.6 นอกจากนี้แล้ว *V. parahaemolyticus* ยังเป็นแบคทีเรียที่ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญ จึงจัดเป็นพวก halophile ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 0.5 - 8% แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 2 - 3% (Lee, 1990) *V. parahaemolyticus* มีแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติในน้ำทะเลและน้ำกร่อย สามารถแยกได้จากน้ำทะเลทั่วโลกทั้งในโซนเขตร้อนและเขตอบอุ่น (Joseph *et al*., 1982) พบได้ทั่วไปในอาหารทะเลหลายชนิด เช่น ปลา สัตว์ที่มีเปลือกแข็งหุ้ม และสัตว์จำพวกหอย เช่น หอยนางรม หอยกาบ หอยแมลงภู่ ซึ่งกินอาหารโดยการกรองจากน้ำ (FDA, 2005) นอกจากนี้สามารถพบเชื้อในแพลงก์ตอนสัตว์ โดยเชื้อดูดซับสารไคตินบนแพลงก์ตอน เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะย่อยผนังเซลล์ของแพลงก์ตอน และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในทะเล (Kaneko and Colwell, 1975) สามารถดำรงชีวิตได้หลากหลาย เช่น ล่องลอยเป็นอิสระหรือเกาะติดกับหอยแบบพึ่งพาอาศัยกันหรืออยู่ใต้ท้องเรือหรือพื้นผิวอื่นๆ ในทะเลหรือในเซลล์เจ้าบ้าน (Host) (Makino *et al*., 2003) ฤดูกาลมีอิทธิพลต่อ *V. parahaemolyticus* ที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเล โดยในช่วงฤดูหนาวเชื้อจะอาศัยอยู่ในตะกอนใต้น้ำ แต่เมื่อถึงฤดูร้อน น้ำทะเลมีอุณหภูมิสูงขึ้นซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนและมีการปนเปื้อนในทะเลเพิ่มมากขึ้น *V. parahaemolyticus* มีโครงสร้างที่มีสมบัติทางแอนติเจน 3 ชนิด คือ แอนติเจนที่แฟลกเจลลา (H antigen) แอนติเจนที่ผนังเซลล์ (O antigen) และแอนติเจนที่แคปซูล (K antigen) โดย K antigen มีสมบัติไม่ทนความร้อน สามารถกำจัดออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 2 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้จะทำให้ O antigen เผยออกมา *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์จะมี H antigen ที่เหมือนกัน การบ่งชี้ serotype ของเชื้อจึงอาศัยความแตกต่างของ lipopolysaccharide ของ O antigen และ K antigen (Joseph *et al*., 1982) มีรายงานพบว่า *V. parahaemolyticus* มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคของกุ้ง เช่น โรคติดเชื้อกับกุ้ง *Penaeus vannamei* ในบริเวณพื้นที่อ่าว Guayaquil ประเทศเอกวาดอร์ และ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่พบมากในตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่ป่วยในฟาร์มเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย (อมรชัย, 2536) นอกจากนี้ พบว่า *V. parahaemolyticus* จัดเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำมากที่สุดจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย (Ruangpan *et al.,* 1995)

***Vibrio harveyi*** เป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา สร้าง lateral flagella บนอาหารแข็ง เจริญได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เติบโตได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ให้ผลบวกใน D-mannose, cellobiose, D-gluconate, D-glucuronate, heptanoate, $\alpha$-ketoglutarate, L-serine, L-glutamate และ L-tyrosine ให้ผลลบใน arginine dihydrolase, acetoin หรือ diacetyl และสามารถใช้ $\beta$-hydroxybutyrate, D-sorbitol, ethanol, L-leucine, $\gamma$-aminobutyrate และ putrescine มีเปอร์เซ็นต์โมลของเบส G+C DNA เท่ากับ 46 - 48 เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา โดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอ็นไซม์ลูซิเฟอเรส (Luciferase) ซึ่งทำให้เรืองแสงได้ในที่มืด *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนตัวอย่างรวดเร็วในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10-40 พีพีที ที่อุณหภูมิน้ำสูงประมาณ 25-35 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชน้ำที่เชื้อนี้เจริญเติบโตดี คือ 7-9 *V. harveyi* ทำให้เกิดความเสียหายในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเป็นจำนวนมาก (Ruangpan *et al.,* 1995) เมื่อก่อนพบว่าเป็นสาเหตุการตายของกุ้งวัยอ่อนเท่านั้น แต่ต่อมาพบว่าเป็นสาเหตุการตายของกุ้งในบ่อเลี้ยงด้วย (Baticados *et al.,* 1990) *V. harveyi* เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ ความรุนแรงของการติดเชื้อเรืองแสงนั้น มีความสัมพันธ์กับชนิดและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ (Chen *et al.,* 1992) ปัญหาการเกิดโรคเรืองแสงของกุ้งในบ่อเลี้ยงพบได้ตั้งแต่ปล่อยลูกกุ้งในบ่อ 2 สัปดาห์จนถึง กุ้งใหญ่ขึ้นกับการจัดการบ่อและสภาพของพื้นบ่อ แต่ที่พบมากกุ้งมีอายุประมาณ 30 - 60 วัน และมีรายงานว่าการตายของลูกกุ้งแชบ๊วยมักเกิดขึ้นทุกครั้งเมื่อสังเกตเห็นสารเรืองแสงในน้ำทะเลที่ใช้เพาะฟัก และมีสารเรืองแสงอยู่ตามซากกุ้ง และลูกกุ้งมีชีวิตในเวลากลางคืน และเมื่อแยกเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงจากลูกกุ้งที่ป่วยเป็นโรค พบว่า เป็นเชื้อ *V. harveyi* จากการตรวจสอบจะพบเชื้อนี้มากในบ่อที่มีการตายของลูกกุ้ง 70 - 100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าลูกกุ้งระยะ nauplius มีการยอมรับเชื้อ *V. harveyi* ดีที่สุด ขณะที่กุ้งระยะ mysis และโพสลาร์วามีการยอมรับเชื้อน้อยลงตามลำดับ *V. harveyi* เป็นวิบริโอที่มีลักษณะพิเศษคือสามารถเรืองแสงได้ (Luminesense) ในสภาพต่างๆ เนื่องจากเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ luciferase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของ aldehyde และ flavin mononucleotide ($FMNH_2$) ในรูป reduced ให้ได้น้ำ กรดอินทรีย์ และ flavin mononucleotide และปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปพลังงานเรืองแสง ซึ่งมีความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร มีสีเขียวแกมเหลืองออกมา (Ziegler and Baldwin, 1981) Lavilla - Pitogo และคณะ (1992) รายงานว่าแหล่งสำคัญของแบคทีเรียเรืองแสงจะอยู่ในทางเดินอาหารส่วนกลาง (Midgut) ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำซึ่งจะถูกปล่อยออกมาในน้ำ ในขณะที่แม่กุ้งมีการวางไข่โดยแบคทีเรียจะอยู่บริเวณผิวส่วน chorion ของไข่กุ้งหลังจากวางไข่แล้ว 8 ชั่วโมง

***Vibrio vulnificus*** เป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งโค้ง ไม่มีสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยการใช้ polar flagella ในอาหารเหลวเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและจัดอยู่ในกลุ่ม halophile คือ ชอบเกลือ เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ให้ผลออกซิเดสเป็นบวก และสามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้ พบในเขต

อากาศอบอุ่นถึงร้อน แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ คือ น้ำทะเล สามารถเจริญได้ดีในน้ำที่มีอุณหภูมิ 15 – 25 องศาเซลเซียส และมีชีวิตอยู่ได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถแบ่งตัวเจริญเติบโต หรือเรียกว่า viable but non culture (VBNC) (Thompson *et al*., 2004) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) ของสัตว์ทะเล แต่สามารถก่อโรครุนแรงในมนุษย์ได้ โดยสามารถแยกเชื้อได้จากสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำทะเล ตะกอนใต้ทะเล แพลงตอนสัตว์ สัตว์น้ำชนิดต่างๆ เช่น กุ้ง ปู ปลา หอย (ชณัฐกานต์, 2555) ในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ที่เป็นเขตร้อนสามารถพบโรคติดเชื้อ *V. vulnificus* ได้ตลอดทั้งปี มักจะก่อโรคในคนที่กินอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อนี้ หรือมีบาดแผลเปิดที่สัมผัสกับเชื้อ ในคนที่แข็งแรงดีเมื่อกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อจะทำให้มีอาการในระบบทางเดินอาหาร ในคนที่มีภูมิคุ้มกันไม่ปกติโดยเฉพาะถ้ามีโรคตับอยู่ มักจะมีการติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteremia) ร่วมด้วย ทำให้มีอาการรุนแรงและอาจถึงกับเสียชีวิต *V. vulnificus* ถูกแบ่งออกเป็น 3 ชนิด (Biotype) คือ biotype 1, 2 และ 3 โดยอาศัยความแตกต่างทาง phenotype, genotype serology และ host range โดยทั่วไปเชื้อ biotype 1 ก่อโรคในคน (Linkous and Oliver, 1999) biotype 2 ก่อโรคในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลาไหล ปัจจุบันพบว่าสามารถก่อโรคในคนได้ด้วย และ biotype 3 ก่อโรคในคนและสัตว์น้ำ (Paz *et al*., 2007) พบว่า *V. vulnificus* เป็นสาเหตุของโรคเสี้ยนดำในกุ้ง โดยกุ้งจะมีจุดสีดำหรือเสี้ยนสีดำ บริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกแต่ละปล้องหรือบริเวณใต้แพนหาง เมื่อแกะเปลือกออกจะพบแผ่นแบนๆ สีดำมีรูปร่างไม่แน่นอนใต้เปลือกด้านในบางตัวจะพบลักษณะเป็นเสี้ยนดำฝังลึกลงไปในกล้ามเนื้อ เมื่อนำกุ้งไปต้มให้สุกจะเห็นเสี้ยนดำในกล้ามเนื้อได้ชัดเจน เนื่องจากบริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกแต่ละปล้องจะมีส่วนที่บอบบางของชั้นเปลือกแบคทีเรีย สามารถที่จะเข้าไปได้ง่ายกว่าบริเวณอื่นๆ ซึ่งการใช้ยาต้านจุลชีพผสมกับอาหารให้กุ้งกินจะไม่สามารถทำให้เสี้ยนหมดไปได้

**คุณสมบัติของกุ้งขาวแวนนาไม**

กุ้งขาวแวนนาไม (Whiteleg shrimp) เป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัม Arthropoda ชั้น Crustacea อันดับ Decapoda วงศ์ Penaeidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Litopenaeus vannamei* โดยทั่วไปเมื่อสมบูรณ์เต็มที่ตัวเมียจะใหญ่กว่าตัวผู้ มีลักษณะรูปร่าง คือ ลำตัวมี 8 ปล้อง มีสีขาว หน้าอกใหญ่ การเคลื่อนไหวเร็ว โดยแบ่งเป็นส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรีอยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัว สันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 ฟัน กรีด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด มีหนวดสีแดง 2 เส้นยาว ตาแดงเข้ม ส่วนลำตัว มี 6 ปล้อง เปลือกตัวสีขาวอมชมพูถึงแดง เปลือกบาง ขาว่ายน้ำ 5 คู่ มีสีขาวข้างในที่ปลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบ และมี 1 กรีหาง กุ้งขาวแวนนาไมหากินทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายน้ำ ล่องแก่ง ลอกคราบเร็วทุกๆ สัปดาห์ ไม่หมกตัว มีความแข็งแรง แต่มีนิสัยตื่นตกใจง่าย สามารถสร้างความคุ้นเคยหรือปรับลักษณะนิสัยภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ดี สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในระบบธรรมชาติและระบบกึ่งหนาแน่น ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งหรือบริเวณพื้นที่ที่มีความเค็มต่ำ แต่ระดับความเค็มที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี คือ 10 – 22 ppt อุณหภูมิที่สามารถ

เจริญได้ดี คือ 26 – 29 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดและด่างควรอยู่ระหว่าง 7.2 – 8.6 ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำควรมีค่า 4 – 9 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกุ้งขาวแวนนาไมชอบน้ำที่มีความกระด้างรวม 120 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าอัลคาไลน์ในช่วง 80 -150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ธวัชชัย, 2545) กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่กินได้ทั้งพืชและสัตว์ จุลินทรีย์ รวมทั้งซากเน่าเปื่อย พฤติกรรมการกินอาหารจะชอบกินอาหารกลางน้ำ อาหารที่ตกลงไปอยู่ที่พื้นบ่อแล้ว กุ้งจะลงไปโฉบและอุ้มขึ้นมาแทะกินกลางน้ำ ซึ่งกุ้งขาวแวนนาไมจะกินอาหารได้ดีในช่วงเวลาตั้งแต่ 08.00 น. ถึง 20.00 น. สำหรับความต้องการโปรตีนจะแตกต่างกันตามช่วงอายุของกุ้ง โดยเปอร์เซ็นต์โปรตีนในอาหารจะลดลงเมื่ออายุของกุ้งเพิ่มขึ้น โดยในช่วงวันที่ 1 ถึง 40 ให้อาหารที่มีโปรตีนสูง 40% (วัฒนา และคณะ, 2554)

# วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์
2. เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นยีสต์โปรไบโอติก โดยศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรค ความเป็นพิษ การรอดชีวิต และการยึดเกาะกับโฮสต์หรือกุ้งขาวแวนนาไม

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ด้านวิชาการ ได้สายพันธุ์ยีสต์โปรไบโอติกและองค์ความรู้การใช้ยีสต์โปรไบโอติกในการควบคุมเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม
2. ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ได้พัฒนาไปสู่การเพิ่มผลผลิตในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ
3. ด้านสังคมและชุมชน นำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดการเพาะเลี้ยงกุ้งแบบเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จะเป็นทางเลือกสำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ นักวิชาการ เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง
4. ด้านการเผยแพร่ นำองค์ความรู้ไปเผยแพร่และถ่ายทอดให้นักศึกษา และผู้สนใจ และสามารถเสนอผลงานและการเผยแพร่ข้อมูลในการประชุมทางวิชาการ การตีพิมพ์ในวารสาร

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 1. การเก็บตัวอย่าง

- เก็บตัวอย่างกุ้งทะเลหรือกุ้งธรรมชาติในพื้นที่ ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

## 2. การคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์

- นำกุ้งทะเลผ่าตัดเอาลำไส้ และ pre-enrich ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Broth (SDB) ที่เติมยาปฏิชีวนะ gentamicin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- ทำการ streak ลงบนอาหารเลี้ยง Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ที่เติม gentamicin หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีความแตกต่างกัน และ re-streak เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) เก็บสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้ไว้ในตู้ -70 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบต่อไป

## 3. การทดสอบคุณสมบัติความเป็นยีสต์โปรไบโอติก

### 3.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคของยีสต์โปรไบโอติก

- นำยีสต์ที่คัดแยกได้มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่เชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ด้วยวิธี modified agar well technique (Chalad *et al*., 2018)
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA มาทำ agar block ด้วยปลาย sterile pasteur pipette
- นำยีสต์ที่แยกได้ stab ลงบน agar block และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- ทำการเตรียมเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB) เป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 0.5 McFarland หรือ $1 \times 10^8$ CFU/ml แล้วทำการ swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA)
- หลังจากนั้นเจาะอาหาร MHA ดังกล่าวด้วย sterile pasteur pipette และนำชิ้นวุ้นออก แล้วนำ agar block ที่มียีสต์เจริญวางแทนที่ หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง ทำการวัดและบันทึก inhibition zone หรือผลกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคของยีสต์
- โดยทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ของยีสต์โปรไบโอติกตามขั้นตอนเดียวกันกับการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus*

### 3.2 การทดสอบความเป็นพิษของยีสต์โปรไบโอติก

- คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ให้ผล inhibition zone หรือมีผลกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดสูง มาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อกุ้ง

- โดยนำยีสต์แต่ละไอโซเลทเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- นำมาปั่นเอา cell pellet และปรับความเข้มข้นให้เป็น 1 x $10^8$ CFU/ml จากนั้นนำเอา suspension จำนวน 20 µl ฉีดเข้าไปในกุ้ง ขนาด 2-3 กรัม ที่ทำการเลี้ยงในตู้เลี้ยงขนาด 40 ลิตร ไอโซเลทละ 15 ตัว

- เลี้ยงกุ้งต่อโดยให้อาหารปกติ และให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา ทำการตรวจสอบอัตราการรอดตายของกุ้งเป็นเวลา 5 วัน โดยบันทึกผลทุกวัน

**3.3 การทดสอบการรอดชีวิตของยีสต์โปรไบโอติก**

- นำสายพันธุ์ยีสต์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคสูง ที่ผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อกุ้งขาวแวนนาไม มาทำการทดสอบการรอดชีวิตของยีสต์

- โดยนำยีสต์แต่ละไอโซเลทเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- นำมาปั่นเอา cell pellet และปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 x $10^8$ CFU/ml จากนั้นนำเอา suspension จำนวน 20 µl ฉีดเข้าไปในกุ้ง ขนาด 2-3 กรัม ที่ทำการเลี้ยงในตู้เลี้ยงขนาด 60 ลิตร ไอโซเลทละ 60 ตัว และเลี้ยงกุ้งต่อเป็นเวลา 10 วัน โดยให้อาหารปกติ และให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา

- สุ่มกุ้งจำนวน 3 ตัวต่อวัน มาทำการตรวจสอบการรอดชีวิตของยีสต์ โดยการนำเข้าเครื่องตีบด (Stomacher) และทำการตรวจนับยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ด้วยวิธี spread plate method โดยดำเนินการเช่นเดียวกันจนครบ 10 วัน

**3.4 การทดสอบการยึดเกาะกับโฮสต์ของยีสต์โปรไบโอติก**

- นำสายพันธุ์ยีสต์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคสูง ที่ผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อกุ้งขาวแวนนาไม มาทำการทดสอบการรอดชีวิตของยีสต์

- โดยนำยีสต์แต่ละไอโซเลทเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตามข้อ 3.3)

- นำมาปั่นเอา cell pellet และปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 x $10^8$ CFU/ml จากนั้นนำเอา suspension จำนวน 20 µl ฉีดเข้าไปในกุ้ง ขนาด 2-3 กรัม ที่ทำการเลี้ยงในตู้เลี้ยงขนาด 60 ลิตร ไอโซเลทละ 60 ตัว และเลี้ยงกุ้งต่อเป็นเวลา 10 วัน โดยให้อาหารปกติ และให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา (ตามข้อ 3.3)

- สุ่มกุ้งจำนวน 3 ตัวต่อวัน มาทำการตรวจสอบการการยึดเกาะกับโฮสต์ของยีสต์ ด้วยการผ่าตัดเอาเฉพาะลำไส้ และทำการตรวจนับยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ด้วยวิธี spread plate method โดยดำเนินการเช่นเดียวกันจนครบจำนวน 10 วัน

**3.5 การบ่งชี้ชนิดยีสต์โปรไบโอติก**

- คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ให้ผล inhibition zone หรือมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคสูง ไม่มีความเป็นพิษต่อกุ้งขาวแวนนาไม มีอัตรารอดชีวิตและสามารถยึดเกาะกับโฮสต์ได้ดี นำไปทำการบ่งชี้ชนิดยีสต์โปรไบโอติก (White *et al*., 1990, Kurtzman and Robnett, 1998)

- นำยีสต์แต่ละไอโซเลทที่เลี้ยงใน SDB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดและตรวจวัดปริมาณ DNA โดยใช้ NanoDrop spectrophotometer

- เพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดย amplify ตรงตำแหน่ง the internal transcribed spacer (ITS) region โดยใช้ primer ITS1F และ ITR4R ซึ่งมีความจำเพาะกับส่วนของ ITS1-5.8SrRNA-ITS2

- ส่วนผสมการทำ PCR ปริมาตร 20 µl มีดังนี้ deionized water 10.3 µl, 5X Buffer 4.0 µl, 10 mM ITS1-F primer 1.0 µl, 10 mM ITS4-R primer 1.0 µl, 2.5 mM dNTP 1.6 µl, *Taq* polymeras 0.1 µl และ DNA 2 µl

- สภาวะการทำ PCR คือ ขั้นตอนเริ่มแรก initial denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที และดำเนินการ 35 รอบ ในขั้นตอน denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที และในขั้นตอนสุดท้าย final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

- จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ ทำการ purify และส่ง sequencing หลังจากได้รับ sequence ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยการ blast

**3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละพารามิเตอร์ระหว่างชุดการทดลองด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

## 1. การคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์

จากการคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ พบว่า ในการเก็บตัวอย่างกุ้งทะเล 3 ครั้ง จากตลาดนัด ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง มีสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้ จำนวนทั้งสิ้น 48 ไอโซเลท แยกเป็น ครั้งที่ 1 จำนวน 15 ไอโซเลท ครั้งที่ 2 จำนวน 12 ไอโซเลท และครั้งที่ 3 จำนวน 21 ไอโซเลท และทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่เชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ด้วยวิธี modified agar well technique พบว่า มีสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 16 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* จำนวน 16 ไอโซเลท และยับยั้งเชื้อ *V. vulnificus* จำนวน 16 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1)

**ตารางที่ 3.1** จำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้ และจำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม

| ครั้งที่เก็บตัวอย่าง | จำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้ | จำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม | | |
|---|---|---|---|---|
| | | *V. parahaemolyticus* | *V. harveyi* | *V. vulnificus* |
| 1 | 15 | 5 | 5 | 5 |
| 2 | 12 | 4 | 4 | 4 |
| 3 | 21 | 7 | 7 | 7 |
| รวม | 48 | 16 | 16 | 16 |

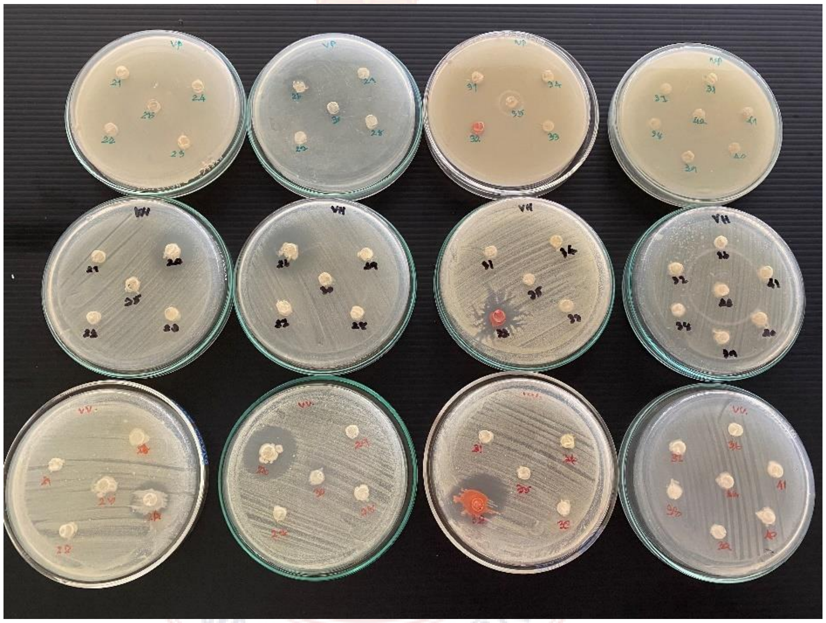
**2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคของยีสต์โปรไบโอติก**

จากการนำสายพันธุ์ยีสต์ 16 ไอโซเลท ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่ เชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ด้วยวิธี modified agar well technique (ภาพที่ 3.1) พบว่า ยีสต์ 10 ไอโซเลท มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี ได้แก่ CC8, CC12, CC15, CC16, CC18, CC20, CC24, CC26, CC30 และ CC 32 โดยยีสต์ไอโซเลท CC26 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ได้สูงสุด มีกิจกรรมการยับยั้ง 13.8, 21.8 และ 23.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท CC7 มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* น้อยที่สุด คือ 6.9 และ 6.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท CC22 มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harveyi* น้อยที่สุด คือ 6.8 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3.2)

**ตารางที่ 3.2** ผลกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ของสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้

| ไอโซเลท | กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค (มิลลิเมตร) | | |
|---|---|---|---|
| | *V. parahaemolyticus* | *Vibrio harveyi* | *V. vulnficus* |
| CC4 | 7.2 | 7.3 | 7.5 |
| CC7 | 6.9 | 7.1 | 6.8 |
| CC8 | 10.2 | 10.5 | 11.1 |
| CC10 | 7.0 | 7.3 | 7.2 |
| CC12 | 9.0 | 10.1 | 9.9 |
| CC14 | 7.3 | 7.2 | 7.3 |
| CC15 | 9.1 | 9.5 | 9.3 |
| CC16 | 10.5 | 10.4 | 9.1 |
| CC18 | 11.1 | 9.2 | 10.0 |
| CC20 | 12.9 | 14.5 | 15.0 |
| CC22 | 7.0 | 6.8 | 7.1 |
| CC24 | 12.5 | 18.1 | 15.9 |
| CC26 | 13.8 | 21.8 | 23.1 |
| CC30 | 10.0 | 11.2 | 9.1 |
| CC32 | 13.1 | 14.6 | 16.1 |
| CC34 | 7.8 | 7.1 | 7.8 |

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคเมื่อก่อนนี้นิยมใช้เทคนิค cross streak ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายและให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว (Lertcanawanichakul and Sawangnop, 2008) อย่างไรก็ตาม หากอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดที่ทดสอบมีความแตกต่างกัน จะทำให้ไม่สามารถสังเกตกิจกรรมการยับยั้งได้อย่างชัดเจน การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไมได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ครั้งนี้ จึงใช้เทคนิค modified agar well technique โดยนำ agar block ของยีสต์ซึ่งปกติจะมี generation time นานกว่าแบคทีเรีย และสารยับยั้งที่ผลิตขึ้นในระยะ stationary phase หรือ decline phase จะถูกเก็บไว้ใน agar block ของยีสต์ เมื่อนำ agar block ของยีสต์ทดสอบกับแบคทีเรียจึงสามารถเห็น clear zone หรือกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้อย่างชัดเจน (Chalad *et al*., 2018)



**ภาพที่ 3.1** กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม (*V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus*) ของยีสต์ ด้วยวิธี modified agar well technique

## 3. การทดสอบความเป็นพิษของยีสต์โปรไบโอติก

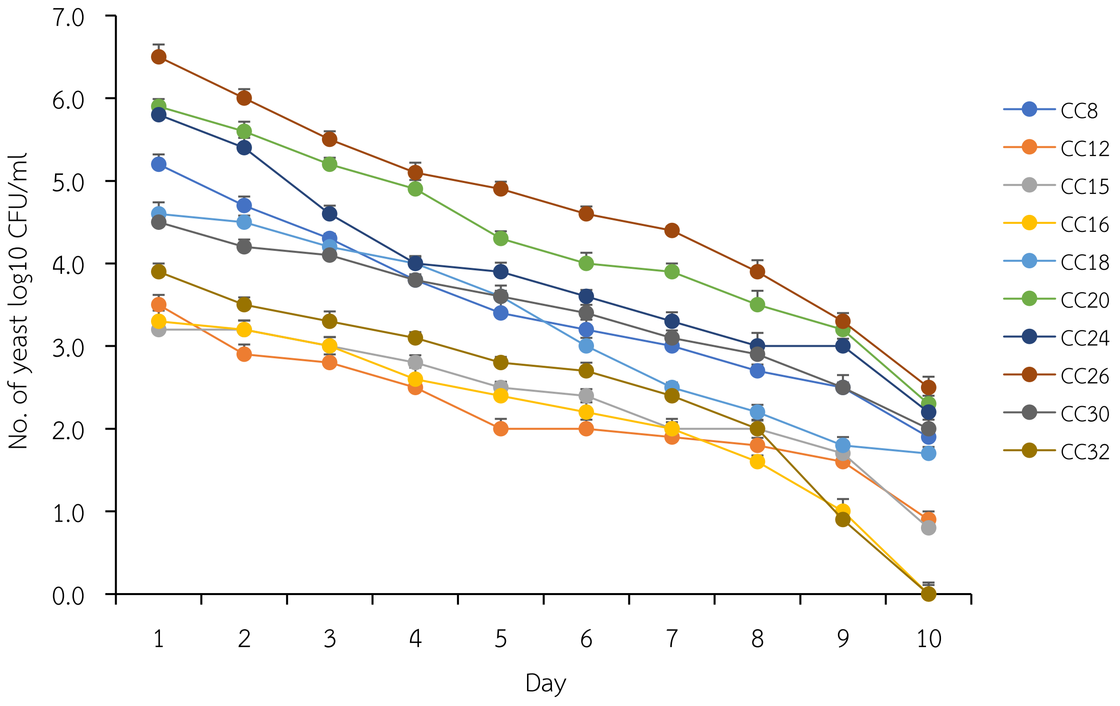
จากการนำสายพันธุ์ยีสต์ 10 ไอโซเลท มาทดสอบความเป็นพิษต่อกุ้งขาวแวนนาไม โดยนำ cell pellet แต่ละไอโซเลทมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 x $10^8$ CFU/ml และนำ suspension จำนวน 20 µl ฉีดเข้าไปในกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน พบว่า กุ้งที่ฉีดไอโซเลท CC8 CC18 CC20 CC24 และ CC26 มีอัตรารอดชีวิตร้อยละ 100 ในขณะที่กุ้งฉีดไอโซเลท CC12 CC15 CC16 และ CC30 มีอัตรารอดร้อยละ 96.7 ± 4.7 และกุ้งที่ฉีดไอโซเลท CC32 มีอัตรารอดร้อยละ 93.3 ± 0 (ตารางที่ 3.3)

**ตารางที่ 3.3** อัตราการรอดชีวิตของยีสต์ในกุ้งขาวแวนนาไม

| ไอโซเลท | อัตราการอยู่รอดของกุ้ง (%) (n = 15) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 24 ชม. | 48 ชม. | 72 ชม. | 96 ชม. | 120 ชม. |
| CC8 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CC12 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.7 ± 4.7 |
| CC15 | 100 | 100 | 100 | 96.7 ± 4.7 | 96.7 ± 4.7 |
| CC16 | 100 | 100 | 100 | 96.7 ± 4.7 | 96.7 ± 4.7 |
| CC18 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CC20 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CC24 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CC26 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CC30 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.7 ± 4.7 |
| CC32 | 100 | 100 | 100 | 96.7 ± 4.7 | 93.3 ± 0 |

**4. การทดสอบการรอดชีวิตของยีสต์โปรไบโอติก**

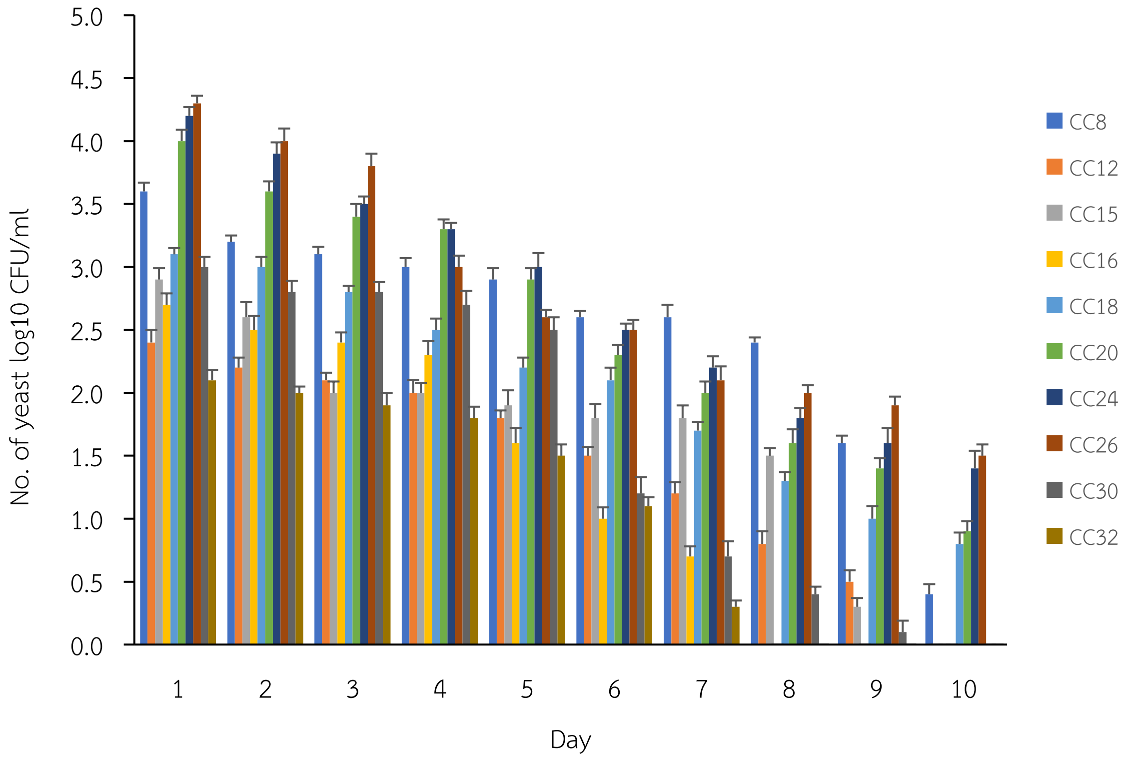
จากการทดสอบการรอดชีวิตของยีสต์ 10 ไอโซเลท โดยนำ suspension แต่ละไอโซเลทที่ปรับความเข้มข้นได้ 1 x $10^8$ CFU/ml จำนวน 20 µl ฉีดเข้าไปในกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ปริมาณการรอดชีวิตของยีสต์ไอโซเลท CC26 มีอัตราการรอดสูงสุด คือ 3.6 x $10^6$ CFU/ml และไอโซเลท CC20 CC24 CC8 CC30 CC18 CC32 CC12 CC16 และ CC15 มีจำนวนการรอดชีวิตของยีสต์ลดลงตามลำดับ และแต่ละไอโซเลทมีจำนวนลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน โดยปริมาณการรอดชีวิตของยีสต์ไอโซเลท CC26 ยังคงมีปริมาณรอดชีวิตสูงสุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น คือ 8.5 x $10^2$ CFU/ml และ CC20 CC24 CC30 CC8 CC18 CC12 และ CC15 มีจำนวนลดลง คือ 5.5 x $10^2$, 2.1 x $10^2$, 1.6 x $10^2$, 9.4 x 10, 4.3 x 10 และ 3.8 x 10 CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท CC16 และ CC32 ไม่พบการรอดชีวิตเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน (ภาพที่ 3.2)




**ภาพที่ 3.2** จำนวนการรอดชีวิตของไอโซเลทยีสต์ที่ฉีดเข้าในกุ้งขาวแวนนาไม เป็นระยะเวลา 10 วัน

## 5. การทดสอบการยึดเกาะกับโฮสต์ของยีสต์โปรไบโอติก

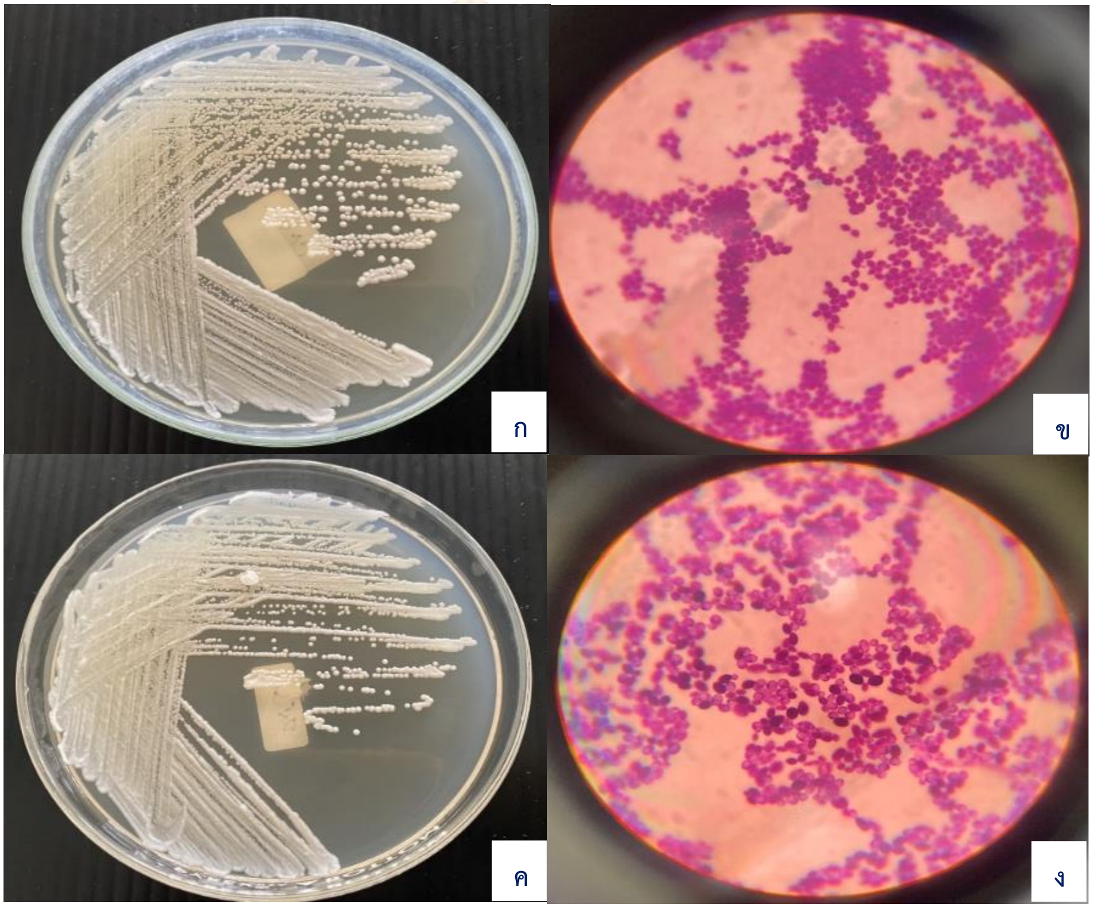
จากการทดสอบการยึดเกาะกับโฮสต์ของยีสต์โดยนำ suspension แต่ละไอโซเลทที่ปรับความเข้มข้นได้ 1 x $10^8$ CFU/ml จำนวน 20 µl ฉีดเข้าไปในกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน จำนวนการเกาะติดของไอโซเลท CC26 CC24 CC20 มีจำนวนใกล้เคียงกัน คือ 2.9 x $10^4$, 2.1 x $10^4$ และ 1.8 x $10^4$ CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน จำนวนการเกาะติด คือ 6.2 x 10, 4.1.9 x 10 และ 3.7 x 10 CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท CC18 มีจำนวน 2.7 x 10 CFU/ml และไอโซเลท CC8 มีจำนวน 0.8 x 10 CFU/ml โดยพบว่าไอโซเลท CC12 CC15 และ CC30 ไม่มีการเกาะติดกับโฮสต์เมื่อเวลาผ่านไป 9 วัน และไอโซเลท CC16 และ CC32 ไม่มีการเกาะติดกับโฮสต์เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน (ภาพที่ 3.3)




**ภาพที่ 3.3** จำนวนการยึดเกาะกับโฮสต์ของไอโซเลทยีสต์กับกุ้งขาวแวนนาไม เป็นระยะเวลา 10 วัน

## 6. การบ่งชี้ชนิดยีสต์โปรไบโอติก

จากการศึกษา พบว่า ยีสต์ที่มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ผ่านการทดสอบความเป็นพิษ การรอดชีวิต การเกาะติดกับโฮสต์ พบว่า ส่วนใหญ่มีโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างทรงรี และรูปไข่ (ภาพที่ 3.4) และเมื่อนำไปทำการบ่งชี้ชนิด พบว่า ยีสต์มีจำนวนทั้งหมด 4 จีนัส และ 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Yarrowia lipolytica* และ *C. glabrata* โดยมี %identity ระหว่าง 99 - 100 (ตารางที่ 3.4)




**ภาพที่ 3.4** โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar (ก และ ค) และสัณฐานวิทยาของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข และ ง)

**ตารางที่ 3.4** ผลการบ่งชี้ชนิดของไอโซเลทยีสต์ 10 สายพันธุ์

| ไอโซเลท | ITS region | % Identity |
|---|---|---|
| CC8 | *Saccharomyces cerevisiae* | 99 |
| CC12 | *Candida tropicalis* | 99 |
| CC15 | *Candida tropicalis* | 99 |
| CC16 | *Candida tropicalis* | 99 |
| CC18 | *Wickerhamomyces anomalus* | 99 |
| CC20 | *Saccharomyces cerevisiae* | 99 |
| CC24 | *Saccharomyces cerevisiae* | 100 |
| CC26 | *Yarrowia lipolytica* | 99 |
| CC30 | *Wickerhamomyces anomalus* | 100 |
| CC32 | *Candida glabrata* | 100 |

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดย amplify และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่ง the internal transcribed spacer (ITS) region จะเห็นได้ว่ามีประสิทธิภาพสำหรับการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ จากการศึกษาของ Hesham *et al*., 2014 รายงานว่าการเพิ่มปริมาณ DNA และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่ง ITS region สามารถทำให้บ่งชี้เชื้อยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* และ *Kluyveromyces lactis* โดยมี homology 97% และในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่ง ITS region ของเชื้อราเส้นสายหรือ filamentous fungi สามารถบ่งชี้ยีสต์ระดับจีนัสและมี homology 97.7% (Kwiatkowki *et al*., 2012) บน ITS region มีตำแหน่งที่เป็น conservation and variable non-coding sequences ดังนั้นจึงเป็นเครื่องหมายที่ดีสำหรับการบ่งชี้ความสัมพันธ์ของยีสต์แต่ละจีนัส (Groenewald *et al*., 2011).

## สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยประสิทธิภาพยีสต์โปรไบโอติกในการควบคุมเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม สามารถคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ด้วยวิธี modified agar well technique และเมื่อทดสอบความเป็นพิษ อัตราการรอดชีวิต และการเกาะติดกับโฮสต์ พบว่า ยีสต์ไอโซเลท CC26 CC24 CC20 CC18 และ CC8 ไม่มีความเป็นพิษต่อกุ้ง มีอัตราการรอดชีวิตดี สามารถเกาะติดกับโฮสต์ได้ และจากการบ่งชี้ชนิดยีสต์ พบว่า เป็นยีสต์ชนิด *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* และ *W. anomalus* สามารถนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคได้ เป็นการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน เพื่อผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำ

สำหรับงานวิจัยในอนาคตจะศึกษาเพิ่มเติมในส่วนยีสต์ทั้ง 3 ชนิดนี้ จะสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต และภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมได้หรือไม่ เพื่อให้การนำยีสต์ 3 ชนิดดังกล่าว ไปใช้กับการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้อย่างมีเต็มศักยภาพ

# บรรณานุกรม


ชณัฐกานต์ แสงศรีคำ. 2555. คุณลักษณะของ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 1-89.

ธวัชชัย สันติกุล. 2545. มารู้จักกุ้งขาว *Penaeus vannamei*. มติชนบทเทคโนโลยีชาวบ้าน. 14: 102-103.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2554. เห็ด-รา และยีสต์. ใน กนิษฐา กิตติคุณ (บรรณาธิการ). จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 323-378.

นิตยา ยิ้มเจริญ, นนทวิทย์ อารีย์ชน, ชุมพล ศรีทอง และ นิติ ชูเชิด. 2549. การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. 214-228

นันทพร สุทธิ, สุปราณี วิกรัยบูรณ์ และ พันธภรณ์ สุภัคกาญจน์กุล. 2561. ผลของอาหารเสริมยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและค่าชีวเคมีของเลือดในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่มีระดับการเลี้ยงหนาแน่นต่างกัน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 23: 649-668.

วัฒนา วัฒนกุล, อุไรวรรณ วัฒนกุล และเจษฎา อิสเหาะ. 2554. รายงานการวิจัยระดับที่เหมาะสมของน้ำนึ่งปลาและกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.

อมรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ. 2536. การศึกษาชนิดของเชื้อวิบริโอและการตกค้างของยาออกโซลินิก แอซิดในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

Balcazar, J.L., Vendrell, D., deBlas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O., and Muzquiz, J.L. 2006. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 29: 335-343.

Baticados, M.C.L., Lavilla-Pitogo, C.R., Cruz-Lacierda, E.R., de la Pena, L.D. and Sunaz, N. A.. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Disease of Aquatic Organism. 9: 133-139.

Chalad, C., Kongrueng, J., Vongkamjan, K., Robins, W., Vuddhakul, V and Mekalanos, J. 2018. Modification of agar well diffusion technique for isolation of yeasts against Vibrio parahaemolyticus. Aquaculture Research. 49:3838-3444.

Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y. and Liao, I.C. 2003. Dietary β-1, 3-glucan effectively improve immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology. 15: 297-310.

Chen, S.N., Huang, S.L. and Kou, G.H. 1992. Studies on the epizootiology and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon*, in Taiwan. In: Disease of cultured penaeid shrimp in Asia and the United State (eds) Fulks, W. and Matin K.I., The Oceanic Institute, Hawaii. 195-205.

Chi, Z.M., Liu, G., Zhao, S., Li, J. and Peng, Y. 2010. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. Applied Microbiology and Biotechnology. 86: 1227-1241.

Das, S., Ward, L.R. and Burke, C. 2008. Prospects of using marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture. Applied Microbiology and Biotechnology. 81: 419-29.

Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 48: 149-158.

Food and Drug Administration (FDA). 2005. Quantitative risk assessment on the public health impact of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. http://www.foodsafety.gov/~dms/vpra-toc. html (accessed 25 March 2015).

Fredlund, E., Druvefors, U., Boysen, M.E., Lingsten, K. and Schnurer, J. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. FEMS Yeast Research. 2: 395-402.

Gismondo, M.R., Drago, L. and Lombardi, A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. International Journal of Antimicrobial Agents. 12: 287-292.

Groenewald, M., Robert, V. and Smith, M. T. 2011. The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus Yamadazyma. Persoonia 26: 40-46.

Hatoum, R., Labrie, S. and Fliss, I. 2012. Review Article: Antimicrobial and probiotic properties of yeast: from fundamental to novel applications. Frontiers in Microbiology. 3: 1-12.

Hesham, A.E.L., V. Wambui, H. Ogola and J.M. Maina. 2014. Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 12: 37-43.

Joseph, S.W., Colwell, R.R. and Kaper, J.B. 1982. *V. parahaemolyticus* and related halophilicvibrios. Critical Reviews in Microbiology. 10: 77-124.

Kaneko, T. and Colwell, R.R. 1975. Adsorption of *V. parahaemolyticus* on to chitin and copepods. Applied Microbiology. 29: 269-274.

Kühlwein, H., Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D. and Davies, S.J. 2014. Effects of dietary β-(1,3)(1,6)- D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 98: 279-289.

Kumar, V., Roy, S., Meena, D.K. and Sarkar, U.K. 2016. Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. Reviews in Fisheries Science. 24: 342-368.

Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 2000. In: The yeast handbook, biodiversity and ecophysiology of yeasts, P. Gábor. and C.L. de la Rosa, eds., Berlin Springer, 11-30.

Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:331-371.

Kwiatkowki, N.P., W.M. Babiker, W.G. Merz, K.C. Carroll and S.X. Zhang. 2012. Evaluation of nucleic acid sequencing of the D1/D2 region of the large subunit of the 28S rDNA and the Internal transcribed spacer region using SmartGene IDNS software for identification of filamentous fungi in a clinical laboratory. The Journal of Molecular Diagnostics. 14: 393-401.

Lavilla-Pitogo, C.R., Albright, L.J., Paner, M.G. and Suñaz, N.A. 1992. Studies on the sources of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries. AQD Conference Proceedings.

Lee, J.V. 1990. *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas.* In Parker, M.T. and Duerden, B.I. (eds.). Principle of Bacteriology, Virology and Immunity (Vol.II). 8$^{th}$ (ed). pp. 514-527. Philadephia: B.C. Decker.

Lertcanawanichakul, M. and Sawangnop, S. 2008. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of Bacillus species. Walailak Journal of Science and Technology 5: 161-171.

Linkous, D.A. and Oliver,J.D. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol Lett. 174: 207-214.

Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimi, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hatton, M. and Lida, T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. Lancet. 361: 743-749.

Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture, Fish Nutrition, and Feeding Proceedings of the Sixth International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish. 151: 333-349.

Navarrete, P. and Tovar-Ramírez, D. 2014. Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. In: Sustainable aquaculture techniques. M. HernandezVergara and C. Pérez-Rostro., eds., INTECH Open Science. 135-172.

Nayak, S. K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish and Shellfish Immunology. 29:2-14.

Nayak, S. K. 2011. Biology of eukaryotic probiotics. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York.

Paz, S., Bisharat, N., Paz, E., Kidar, O. and Cohen, D. 2007. Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel. Environ Res. 103: 390-396.

Raa, J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Reviews in Fisheries Science. 3: 229-288.

Ringø, E., Rolf, E.O., Jensen, I., Romero, J. and Lauzon, H.L. 2014. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 24: 1005-1032.

Ruangpan, L., Tabkaew, R., Yoshida, T., Kawatsu, H. and Saitanu, K. 1995. Numerical taxonomy of *Vibrio* spp. Isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Thailand. In: Disease in Asian Aquaculture II. Fish Health Section, 131-140.

Thompson, F.L. Iida, T. and Swing, J. 2004. Biodiversity of vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68: 403.

Wang, Y.F., Chi, Z.M., Chi, Z., Li, J. and Wang, X.H. 2009. Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. Bioresource Technology. 100: 2639-2641.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. M. A. Innis, D. H. Gefland, J. J. Sninsky, T. J. White., eds., Academic Press, New York, 315-322.

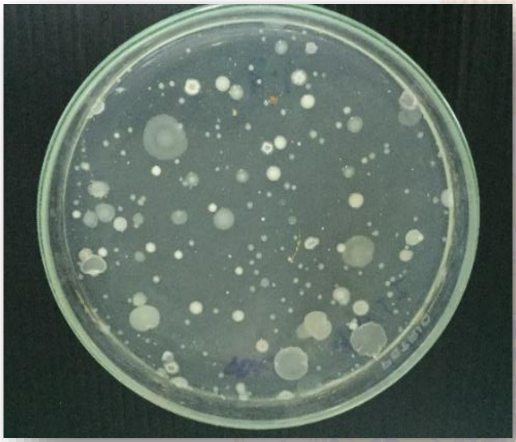
Zhenming, C., Zhiqiang, L., Lingmei, G., Fang, G., Chunling, M., Xianghong, W. and Haifeng, L. 2006. Marine yeasts and their applications in mariculture. The Journal of Ocean University of China. 5: 251-256.

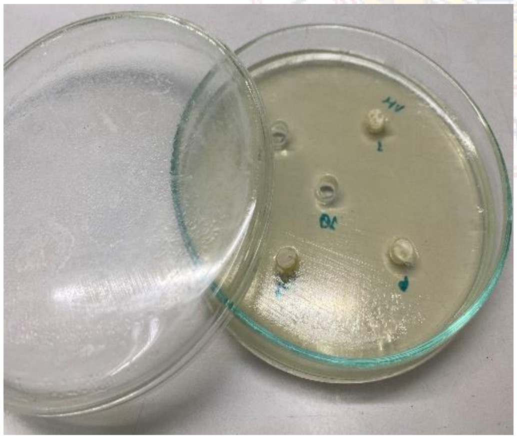
Ziegler M.M. and Baldwin, T.O. 1981. Biochemistry of Bacterial Bioluminescence. Current Topics in Bioenergetics. 12: 65-113.

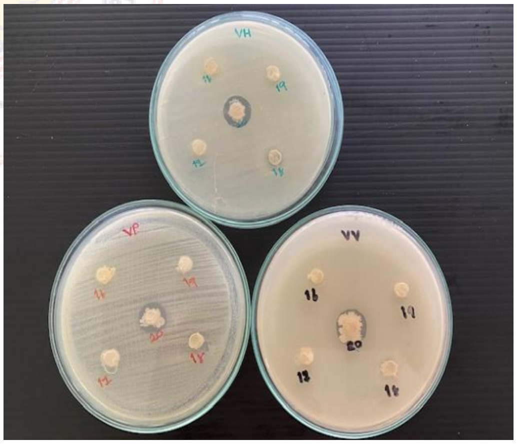
Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik., K., Dhama, K. and Lazado, C. C. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quarterly* 36: 228-241.

**ภาคผนวก ก**

**การคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม (*V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. vulnificus*) ด้วยวิธี modified agar well technique**







# ภาคผนวก ข
## การทดสอบความเป็นพิษของยีสต์โปรไบโอติก

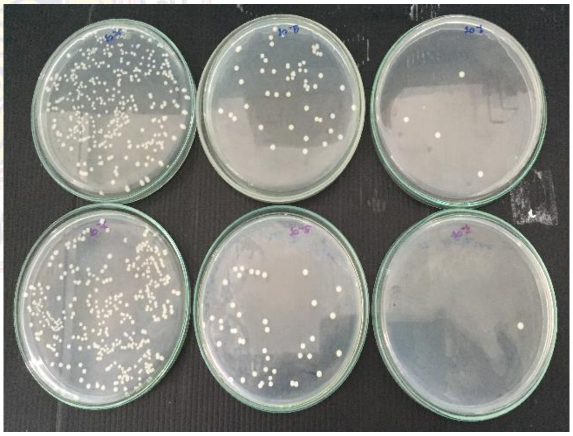
0.00
MF-Units

# ภาคผนวก ค

## การทดสอบการรอดชีวิตของยีสต์โปรไบโอติก

## การทดสอบการยึดเกาะกับโฮสต์ของยีสต์โปรไบโอติก

min. volume 2 ml
On
0.50
DEN-1B
McFarland Densitometer
MF-Units



# ภาคผนวก ง
# ผลการบ่งชี้ชนิดยีสต์

# Standard ID

ITS Region Sequencing | Humanizing Genomics macrogen

## ITS region service report

Order Number : HC00431111
Sample name : CC8_contig_1

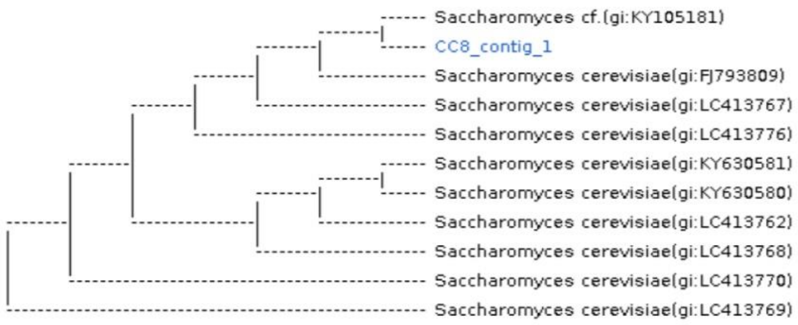
Information

**Primer Information**

| Sequencing Primer Name Primer Sequences | PCR Primer Name Primer Sequences |
|---|---|
| ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' | ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' |
| ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' | ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' |

| Subject | | | | | | Score | | Identities | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Accession | Description | Length | Start | End | Coverage | Bit | E-Value | Match/Total | Pct.(%) |
| FJ793809.1 | Saccharomyces cerevisiae | 874 | 13 | 848 | 95 | 1524 | 0.0 | 833/836 | 99 |

| Kingdom | Family | Genus | Species |
|---|---|---|---|
| Eukaryota | Saccharomycetaceae | Saccharomyces | Saccharomyces cerevisiae |




**Characterization**

Saccharomyces is a genus of fungi that includes many species of yeasts. Many members of this genus are considered very important in food production. It is known as the brewer's yeast or baker's yeast.

Saccharomyces cerevisiae is a species of yeast. It has been instrumental to winemaking, baking, and brewing since ancient times. It is believed to have been originally isolated from the skin of grapes (one can see the yeast as a component of the thin white film on the skins of some dark-colored fruits such as plums; it exists among the waxes of the cuticle).

# Standard ID

## ITS region service report

Order Number : HC00439840
Sample name : CC15_contig_1

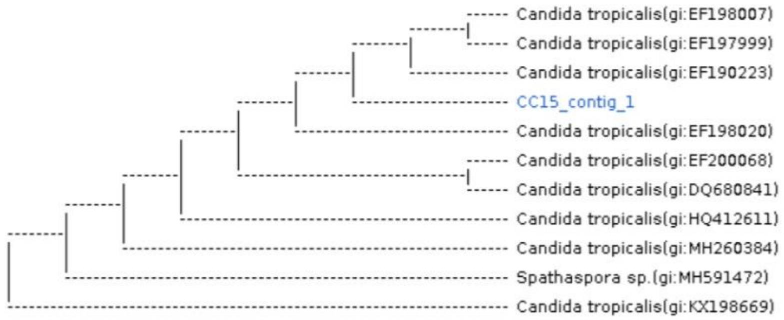
Information

**Primer Information**

| Sequencing Primer Name Primer Sequences | PCR Primer Name Primer Sequences |
|---|---|
| ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' | ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' |
| ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' | ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' |

| Subject | | | | | | Score | | Identities | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Accession | Description | Length | Start | End | Coverage | Bit | E-Value | Match/Total | Pct.(%) |
| EF190223.1 | Candida tropicalis | 556 | 20 | 556 | 96 | 968 | 0.0 | 534/538 | 99 |

| Kingdom | Family | Genus | Species |
|---|---|---|---|
| Eukaryota | Debaryomycetaceae | Candida | Candida tropicalis |




**Characterization**

Candida is a genus of yeasts and is the most common cause of fungal infections worldwide. Many species are harmless commensals or endosymbionts of hosts including humans; however, when mucosal barriers are disrupted or the immune system is compromised they can invade and cause disease.

Under investigation

# Standard ID

## ITS region service report

Order Number : HC00431111
Sample name : CC16_contig_1

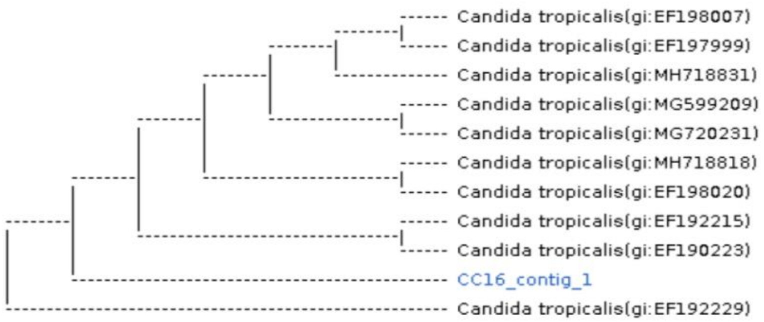
Information

**Primer Information**

| Sequencing Primer Name Primer Sequences | PCR Primer Name Primer Sequences |
|---|---|
| ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' | ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' |
| ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' | ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' |

| Subject | | | | | | Score | | Identities | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Accession | Description | Length | Start | End | Coverage | Bit | E-Value | Match/Total | Pct.(%) |
| EF190223.1 | Candida tropicalis | 556 | 8 | 537 | 95 | 961 | 0.0 | 528/531 | 99 |

| Kingdom | Family | Genus | Species |
|---|---|---|---|
| Eukaryota | Debaryomycetaceae | Candida | Candida tropicalis |




**Characterization**

Candida is a genus of yeasts and is the most common cause of fungal infections worldwide. Many species are harmless commensals or endosymbionts of hosts including humans; however, when mucosal barriers are disrupted or the immune system is compromised they can invade and cause disease.

Under investigation

# Standard ID

## ITS region service report

Order Number : HC00434369
Sample name : CC18_contig_1

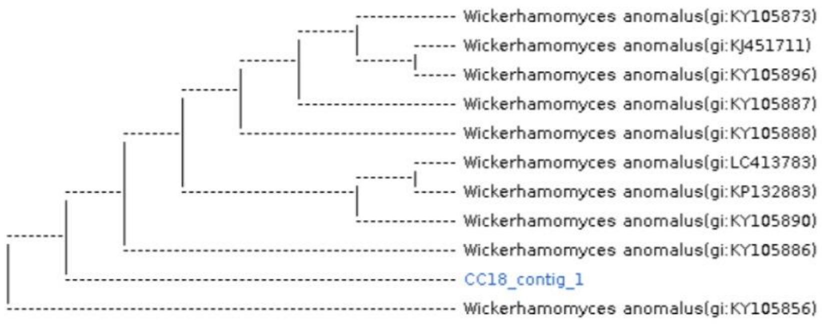
Information

**Primer Information**

| Sequencing Primer Name Primer Sequences | PCR Primer Name Primer Sequences |
|---|---|
| ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' | ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' |
| ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' | ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' |

| Subject | | | | | | Score | | Identities | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Accession | Description | Length | Start | End | Coverage | Bit | E-Value | Match/Total | Pct.(%) |
| KP132883.1 | Wickerhamomyces anomalus | 643 | 7 | 629 | 96 | 1133 | 0.0 | 620/623 | 99 |

| Kingdom | Family | Genus | Species |
|---|---|---|---|
| Eukaryota | Phaffomycetaceae | Wickerhamomyces | Wickerhamomyces anomalus |




**Characterization**

under investigation

Wickerhamomyces anomalus, also known as Pichia anomala and Hansenula anomala, is frequently associated with spoilage or processing of food and grain products. Its capacity for growth on a wide range of carbon sources at low pH under high osmotic pressure and with little or no oxygen enables it to propagate in a wide range of environments. It is a non-Saccharomyces wine yeast that contributes to wine aroma through the production of volatile compounds.

# Standard ID

## ITS region service report

Order Number : HC00434369
Sample name : CC20_contig_1

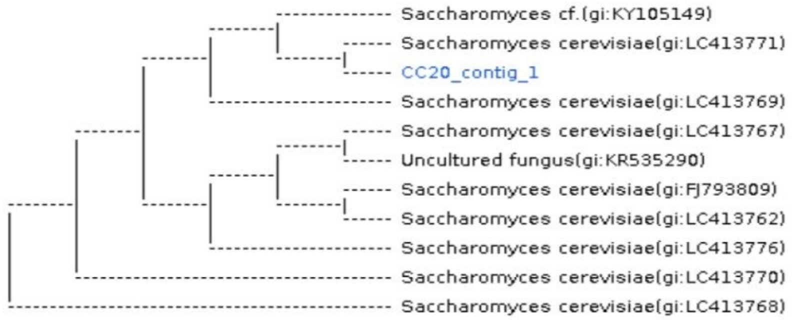
Information

**Primer Information**

| Sequencing Primer Name Primer Sequences | PCR Primer Name Primer Sequences |
|---|---|
| ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' | ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' |
| ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' | ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' |

| Subject | | | | | | Score | | Identities | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Accession | Description | Length | Start | End | Coverage | Bit | E-Value | Match/Total | Pct.(%) |
| KY105149.1 | Saccharomyces cf. | 845 | 10 | 835 | 97 | 1513 | 0.0 | 824/826 | 99 |

| Kingdom | Family | Genus | Species |
|---|---|---|---|
| Eukaryota | Saccharomycetaceae | Saccharomyces | Saccharomyces cf. |




**Characterization**

Saccharomyces is a genus of fungi that includes many species of yeasts. Many members of this genus are considered very important in food production. It is known as the brewer's yeast or baker's yeast.

under investigation

# Standard ID

## ITS region service report

Order Number : HC00434369
Sample name : CC24_contig_1

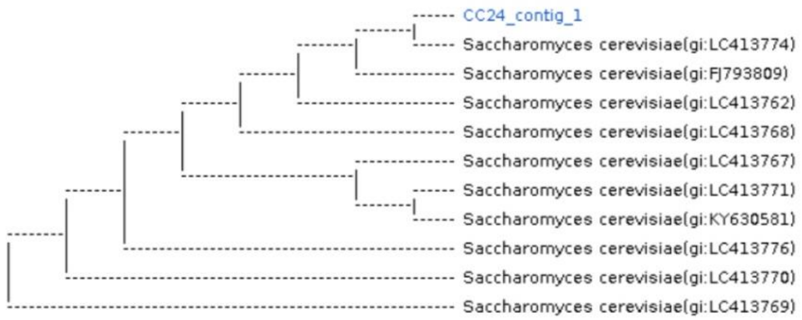
Information

**Primer Information**

| Sequencing Primer Name Primer Sequences | PCR Primer Name Primer Sequences |
|---|---|
| ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' | ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' |
| ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' | ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' |

| Subject | | | | | | Score | | Identities | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Accession | Description | Length | Start | End | Coverage | Bit | E-Value | Match/Total | Pct.(%) |
| CP006448.1 | Saccharomyces cerevisiae | 1606260 | 439795 | 438976 | 0 | 1515 | 0.0 | 820/820 | 100 |

| Kingdom | Family | Genus | Species |
|---|---|---|---|
| Eukaryota | Saccharomycetaceae | Saccharomyces | Saccharomyces cerevisiae |




### Characterization

Saccharomyces is a genus of fungi that includes many species of yeasts. Many members of this genus are considered very important in food production. It is known as the brewer's yeast or baker's yeast.

Saccharomyces cerevisiae is a species of yeast. It has been instrumental to winemaking, baking, and brewing since ancient times. It is believed to have been originally isolated from the skin of grapes (one can see the yeast as a component of the thin white film on the skins of some dark-colored fruits such as plums; it exists among the waxes of the cuticle).

# Standard ID

## ITS region service report

Order Number : HC00431111
Sample name : CC30_contig_1

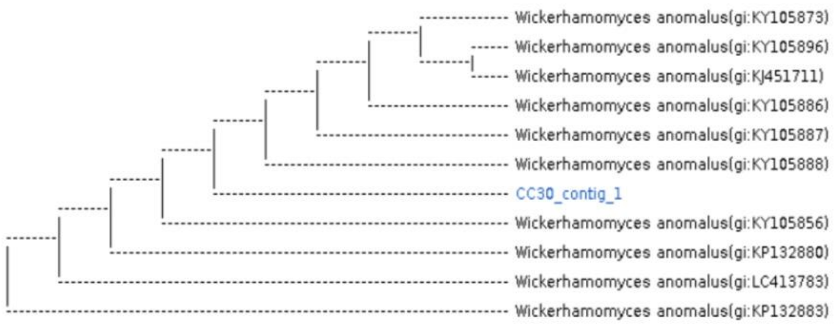
Information

**Primer Information**

| Sequencing Primer Name Primer Sequences | PCR Primer Name Primer Sequences |
|---|---|
| ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' | ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' |
| ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' | ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' |

| Subject | | | | | | Score | | Identities | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Accession | Description | Length | Start | End | Coverage | Bit | E-Value | Match/Total | Pct.(%) |
| LC413783.1 | Wickerhamomyces anomalus | 625 | 10 | 622 | 98 | 1133 | 0.0 | 613/613 | 100 |

| Kingdom | Family | Genus | Species |
|---|---|---|---|
| Eukaryota | Phaffomycetaceae | Wickerhamomyces | Wickerhamomyces anomalus |




**Characterization**

under investigation

Wickerhamomyces anomalus, also known as Pichia anomala and Hansenula anomala, is frequently associated with spoilage or processing of food and grain products. Its capacity for growth on a wide range of carbon sources at low pH under high osmotic pressure and with little or no oxygen enables it to propagate in a wide range of environments. It is a non-Saccharomyces wine yeast that contributes to wine aroma through the production of volatile compounds.

# Standard ID

## ITS region service report

Order Number : HC00431111
Sample name : CC32_contig_1

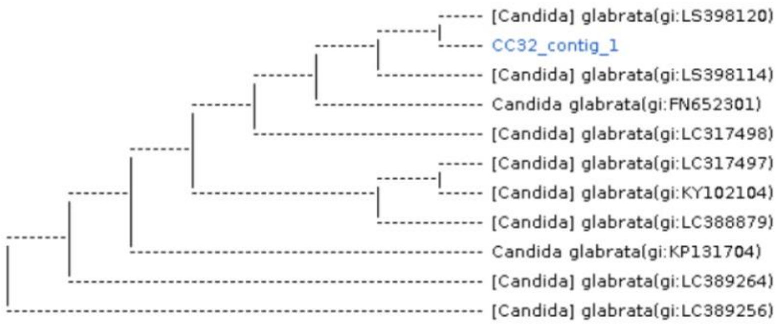
Information

**Primer Information**

| Sequencing Primer Name Primer Sequences | PCR Primer Name Primer Sequences |
|---|---|
| ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' | ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3' |
| ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' | ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' |

| Subject | | | | | | Score | | Identities | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Accession | Description | Length | Start | End | Coverage | Bit | E-Value | Match/Total | Pct.(%) |
| LS398120.1 | [Candida] glabrata | 886 | 1 | 860 | 97 | 1589 | 0.0 | 860/860 | 100 |

| Kingdom | Family | Genus | Species |
|---|---|---|---|
| Eukaryota | Saccharomycetaceae | Nakaseomyces | [Candida] glabrata |




**Characterization**

Candida is a genus of yeasts and is the most common cause of fungal infections worldwide. Many species are harmless commensals or endosymbionts of hosts including humans; however, when mucosal barriers are disrupted or the immune system is compromised they can invade and cause disease.

Under investigation

# ภาคผนวก จ
## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

**1. Mueller Hinton broth (Difco, USA)**

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใน กรัมต่อลิตร

| | | |
|---|---|---|
| Beef, infusion from | 300 | กรัม |
| Casein acid hydrolysate | 17.5 | กรัม |
| Starch | 1.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 21 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิตร นำไปต้มจนใสหรือวุ้นละลาย นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที (pH 7.3 ± 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส)

**2. Mueller Hinton agar (Difco, USA)**

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใน กรัมต่อลิตร

| | | |
|---|---|---|
| Beef Extract | 2 | กรัม |
| Casein acid hydrolysate | 17.5 | กรัม |
| Starch | 1.5 | กรัม |
| Agar | 17 | กรัม |

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 38 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิตร นำไปต้มจนใสหรือวุ้นละลาย นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที (pH 7.3 ± 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส)

**3. Sabouraud dextrose broth (Difco, USA)**

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใน กรัมต่อลิตร

| | | |
|---|---|---|
| Dextrose | 20 | กรัม |
| Peptone | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิตร นำไปต้มจนใสหรือวุ้นละลาย นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่เวลา 15-20 นาที (pH 5.6 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส)

**4. Sabouraud dextrose agar (Difco, USA)**

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใน กรัมต่อลิตร

| | | |
|---|---|---|
| Dextrose | 40 | กรัม |
| Peptone | 10 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 65 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิตร นำไปต้มจนใสหรือวุ้นละลาย นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่เวลา 15-20 นาที (pH 5.6 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส)