3. ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อยีสต์จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

การคัดเลือกยีสต์ ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติทั้งหมด 120 ตัวอย่าง ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มทั้งหมดจำนวน 6 ฟาร์ม ในบริเวณจังหวัดพัทลุง สงขลา และ นครศรีธรรมราช พบว่าสามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 198 ไอโซเลต โดยทำการแบ่งระบบทางเดินอาหารของตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนปาก – กระเพาะ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และส่วนซีกัม โดยพบว่ามียีสต์จำนวน 50, 54, 49 และ 45 ไอโซเลต ตามลำดับ ซึ่งผลจากการคัดเลือกยีสต์จากระบบทางเดินอาหารจะพบปริมาณยีสต์ที่บริเวณลำไส้ส่วนต้นมากที่สุด และต่ำสุดในส่วนของซีกัม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 จำนวนยีสต์ทั้งหมดที่พบในแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

ระบบทางเดินอาหาร	จำนวนยีสต์ (CFU/g)
ปาก-กระเพาะ	$1 \times 10^2 \pm 0$
ลำไส้ส่วนต้น	$1.19 \times 10^2 \pm 6.9 \times 10$
ลำไส้ส่วนปลาย	$1.3 \times 10^2 \pm 1.45 \times 10^2$
ซีกัม	$1.25 \times 10^2 \pm 7.1 \times 10$

จากการนำผลการคัดเลือกยีสต์มาทำการทดสอบทางสถิติแบบ ONE WAY ANOVA ซึ่งประมวลผลโดยโปรแกรม SPSS เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนยีสต์ที่พบในแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

2. คัดเลือกยีสต์จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

2.1 การเจริญต่อ pH

นำยีสต์จำนวน 198 ไอโซเลต ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ มาทดสอบการทนต่อกรดที่ระดับ pH 4, 5, 6, 7 และ 8 พบว่ามียีสต์ที่เจริญได้ในระดับ pH 4 ได้ 83 ไอโซเลต, pH 5 ได้ 87 ไอโซเลต, pH 6 ได้ 97 ไอโซเลต, pH 7 ได้ 99 ไอโซเลต และ pH 8 ได้ 103 ไอโซเลต โดยยีสต์ที่สามารถเจริญต่อทุกระดับ pH ที่ทำการทดสอบได้ทั้งหมด 76 ไอโซเลต (ตารางที่ 6)

2.2 การเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

นำยีสต์จำนวน 76 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 18, 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ที่สามารถเจริญต่ออุณหภูมิที่ 18 องศาเซลเซียสได้ 97 ไอโซเลต, อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสได้ 100 ไอโซเลต และอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสได้ 113 ไอโซเลต โดยยีสต์ที่สามารถเจริญต่ออุณหภูมิทั้งสามได้เป็นจำนวน 63 ไอโซเลต (ตารางที่ 6)

2.3 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

การทดสอบความสามารถ ในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธีขีดไขว้ (Cross streak method) และ การยับยั้งบนอาหารแข็งด้วยวิธี agar spot (ตารางที่ 6) โดยยีสต์ 63 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้ โดยใช้แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่*Vibrio harveyi, Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio marinus* และ *Vibrio salmonicida* พบว่า ทั้ง 76 ไอโซเลต ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้

2.4 ศึกษาความสามารถในการใช้เกลือไนเตรท

จากการคัดเลือกการใช้เกลือไนเตรทของยีสต์ โดยนำยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบจำนวน 63 ไอโซเลต พบว่าเชื้อสามารถใช้เกลือไนเตรท (Sodium nitrite) ได้จำนวน 36 ไอโซเลต โดยคิดเป็นร้อยละ 57.14 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ (ตารางที่ 6)

2.5 ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน

นำยีสต์จำนวน 36 ไอโซเลต ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 2.4 มาทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน โดยสังเกตการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีที่เชื้อเจริญจากการย่อยสลายเคซีน (casein) ซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนมทำให้น้ำนมมีลักษณะขุ่นขาว เมื่อเคซีนสลายทำให้สามารถละลายได้ดีขึ้น และใสขึ้น พบว่าเชื้อสามารถย่อยโปรตีนได้จำนวน 7 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 19.44 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 6)

2.6 ทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง

นำยีสต์จำนวน 7 ไอโซเลต ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 2.5 มาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง หยด Lugol’s iodine ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีที่เชื้อเจริญแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้ พบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยแป้งได้ทั้ง 7 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 0 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 6)

2.7 ทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน

นำยีสต์จำนวน 7 ไอโซเลต ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 2.5 มาทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน ตรวจดูการเจริญโดยสังเกตบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนีของยีสต์ ซึ่งแสดงว่ายีสต์สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสย่อย tributyrine ได้

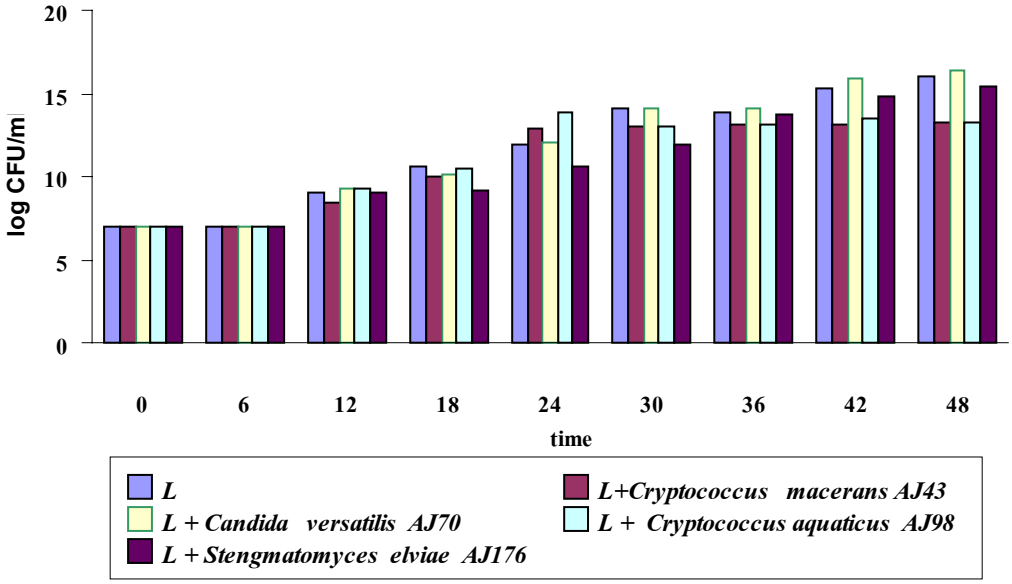
พบว่าเชื้อไม่สามารถย่อยแป้งได้ทั้ง 7 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 0 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 6)

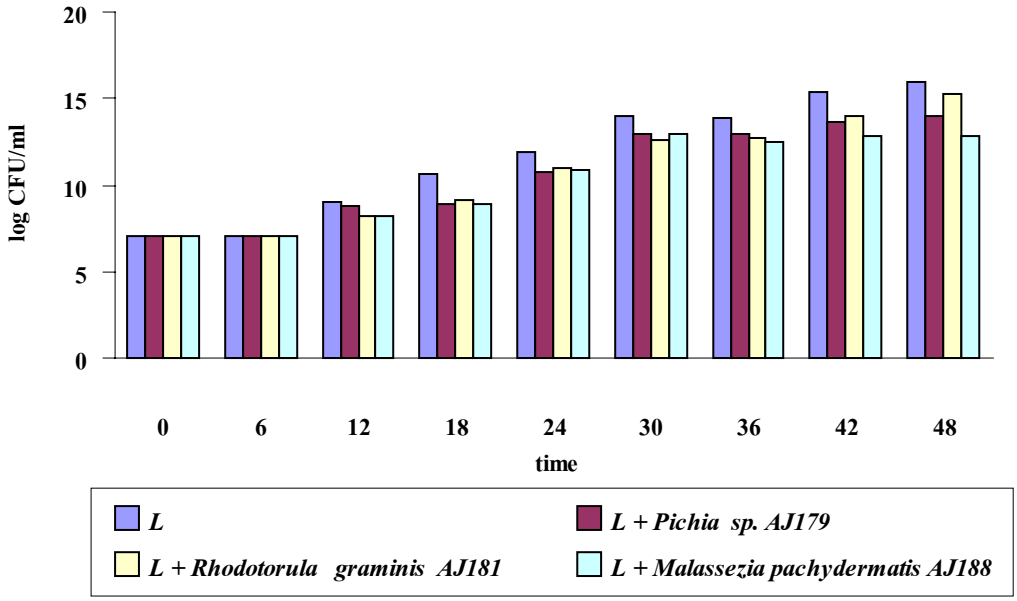
ตารางที่ 6 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของยีสต์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

สมบัติการเป็นโปรไบโอติก		**จำนวนไอโซเลตที่ทดสอบ**	**จำนวนไอโซเลตที่คัดเลือกได้**	**จำนวนไอโซเลตที่เลือกได้**
การเจริญต่อ pH	4	198	83	76
	5	198	87	
	6	198	97	
	7	198	99	
	8	198	103	
การเจริญที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	18	76	97	63
	25	76	100	
	30	76	113	
ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของกุ้งกุลาดำ		63	0	63
ความสามารถในการใช้เกลือไนเตรท		63	36	36
ความสามารถในการย่อยโปรตีน		36	7	7
ความสามารถในการย่อยแป้ง		7	0	0
ความสามารถในการย่อยไขมัน		7	0	0

3. ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่มีประโยชน์อื่น ๆ (*Leuconostoc dextranicum* AM20) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

นำเชื้อยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ที่แยกได้จากข้อ 2.5 และแบคทีเรียแลกติก 1 สายพันธุ์ คือ *Leuconostoc dextranicum* AM20 มาเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหาร MRS เพื่อทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่เพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเลี้ยงร่วมกับยีสต์ ในอาหาร MRS และ อาหาร MRS ที่ผสมอาหาร YA พบว่ามียีสต์สายพันธุ์ AJ70 ที่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลกติก (รูปที่ 7) ส่วนยีสต์สายพันธุ์ AJ43, AJ98, AJ176, AJ179, AJ181 และ AJ188 ไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลกติก (รูปที่ 6-12) จะเห็นได้ว่า ยีสต์สายพันธุ์ AJ70 ส่งเสริมแบคทีเรียแลกติกให้มีการเจริญเติบโตสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงร่วมกันกับยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ รวมทั้งชุดควบคุมด้วย โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเพิ่มขึ้นจาก $1x10^{16}$ CFU/ml ในชุดควบคุม (อาหาร MRS) ให้เป็น $2.2x10^{17}$ CFU/ml





รูปที่ 6 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก (*Leuconostoc dextranicum* AM20) เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS เพียงเชื้อเดียว และเลี้ยงร่วมกันกับยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ ในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ pH 6.0

4. จัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่ได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำโดยลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา

เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของยีสต์ที่แยกได้ จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำทั้งหมด 120 ตัวอย่าง เมื่อทำการเทียบเคียงชนิดยีสต์ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ตาม The yeasts, A Taxonomic Study, 4th edition (Kurtzman และ Fell, 1998) ขนิษฐา, 2543 และ Kregervan Rij, 1984 พบว่าสามารถจัดจำแนกแต่ละไอโซเลต โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และผลการทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์ สามารถสรุปผลการพิสูจน์ได้ดังนี้

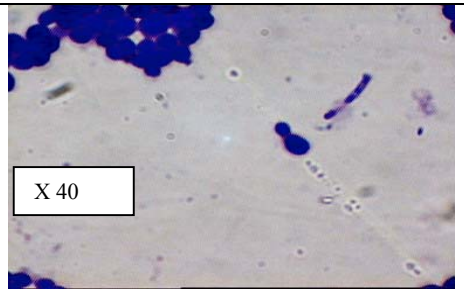
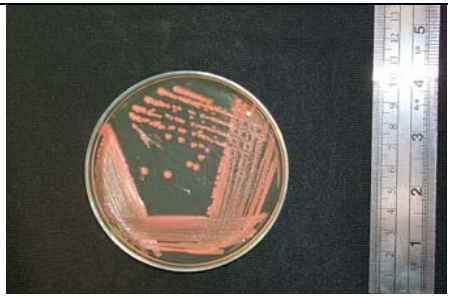
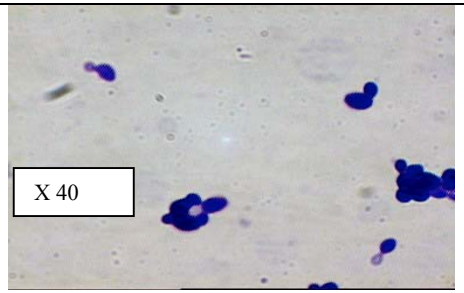
ตารางที่ 7 ผลทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์

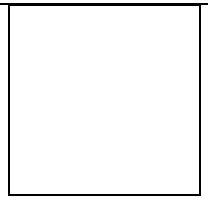
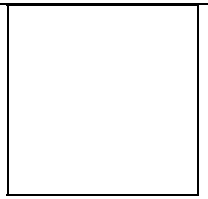
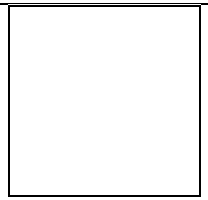
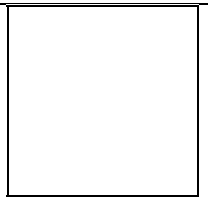
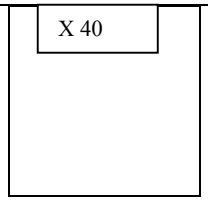
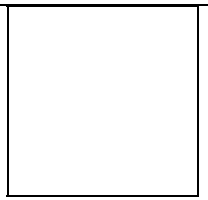
รหัสเชื้อ	ลักษณะเซลล์	Fermentation					Assimilation						ยูเรีย	ไนเตรท
		maltose	lactose	glucose	galactose	surcrose	xylose	maltose	lactose	surcrose	galactose	glucrose		
AJ 43	โคโลนี เรียบ ขอบเรียบ	-	-	-	-	-	+	±	-	±	±	+	+	+
AJ 70	โคโลนี เรียบ ขอบเรียบ	-	-	+	-	-	-	+	±	+	+	+	-	+
AJ 98	โคโลนี เรียบ	-	-	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+
AJ 176	โคโลนีเรียบ ขอบเรียบ	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
AJ 179	โคโลนีเรียบ ขอบเรียบ	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
AJ 181	โคโลนีเรียบ ขอบเรียบ	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
AJ 188	โคโลนีเรียบ ขอบเรียบ	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

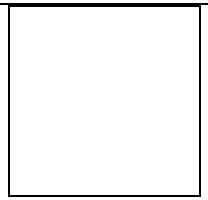
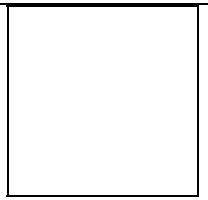
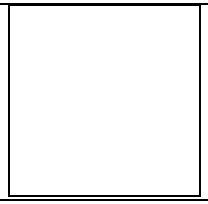
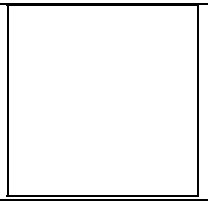
หมายเหตุ + หมายถึงยีสต์มีการใช้น้ำตาล

- หมายถึงยีสต์ไม่มีการใช้น้ำตาล

ตารางที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์

รหัส	สายพันธุ์	ลักษณะเด่น	ลักษณะเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์	ลักษณะเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ
AJ43	*Cryptococcus* sp.	โคโลนีสีชมพู หรือ สีแดง แบ่งเซลล์แบบ budding ลักษณะโคโลนีแบบ butyrous		
AJ70	*Candida* sp.	โคโลนีสีขาว หรือ สีครีม แบ่งเซลล์แบบ budding ลักษณะโคโลนีแบบ butyrous		

AJ98	*Cryptococcus* sp.	โคโลนีสีครีม แบ่งเซลล์แบบ polar budding ลักษณะเซลล์ เป็นรูปมะนาว	 X 40	
รหัส	**สายพันธุ์**	**ลักษณะเด่น**	**ลักษณะเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์**	**ลักษณะเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ**
AJ176	*Stengmatomyces* sp.	โคโลนีสีครีม ลักษณะโคโลนีแบบ butyrous แบ่งเซลล์แบบ budding		
AJ179	*Pichia* sp.	โคโลนีสีขาว หรือ สีครีม แบ่งเซลล์แบบ budding โคโลนีขอบเรียบ	 X 40 X 40	

รหัส	สายพันธุ์	ลักษณะเด่น	ลักษณะเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์	ลักษณะเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ
AJ181	*Rhodotorula* sp.	โคโลนีสีชมพู แบ่งเซลล์แบบ budding ลักษณะโคโลนีแบบ butyrous	 X 40	
AJ188	*Malassezia* sp.	โคโลนีสีครีม หรือสีแทน แบ่งเซลล์แบบpolar budding	 X 40	

5. ศึกษาผลการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ได้รับยีสต์ที่คัดเลือกได้

ทำการชั่งน้ำหนักของกุ้งกุลาดำก่อนการทดลองและหลังการทดลอง จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด และต่ำสุด คือ กลุ่มที่เลี้ยงด้วยยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ98 และ *Rhodotorula* sp. AJ181 ให้ผลน้ำหนักเพิ่มขึ้น 12.53 กรัม และ 4.62 กรัม ตามลำดับ ส่วนยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ43, *Candida* sp. AJ70, *Stengmatomyces* sp. AJ176, *Pichia* sp. AJ179, *Malassezia* sp. AJ188 และชุดควบคุม มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 7.58, 11.59, 10.24 9.53, 9.2 และ 7.37 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 9) พบว่ามีเพียงยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula* sp. AJ181 ที่ให้ผล ต่ำกว่าชุดควบคุม คือ ให้ผลน้ำหนักเพิ่มขึ้นเพียง 4.62 กรัม และเมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่า กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม *Cryptococcus* sp. AJ98 มีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างจากกลุ่มยีสต์ *Cryptococcus* sp. AJ43, *Rhodotorula* sp. AJ181 และชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญที่ ($P<0.05$) ส่วนกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. AJ70, *Stengmatomyces* sp. AJ176, *Pichia* sp. AJ179, *Malassezia* sp. AJ188 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

6. ศึกษาอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำ

เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสมยีสต์คัดเลือกได้ เป็นเวลา 30 วัน พบว่ากุ้งที่มีอัตราการรอดตาย 100% ได้แก่ กุ้งที่รับอาหารผสมยีสต์ สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ43, *Cryptococcus* sp. AJ98 และ *Stengmatomyces* sp. AJ176 ซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยยีสต์ทั้งสามชนิดข้างต้น มีอัตราการรอดตายแตกต่างกับกลุ่มทดลองอื่น ๆ อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมยีสต์, *Candida* sp. AJ70, *Pichia* sp. AJ179, *Rhodotorula* sp. AJ181, *Malassezia* sp. AJ188 และชุดควบคุม มีอัตราการรอดตาย 86.89, 86.89, 86.89, 77.78 และ 86.89 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) จะเห็นได้ว่า *Malassezia* sp. AJ188 มีอัตรารอดตายต่ำกว่าชุดควบคุม ส่วนอีกสามตัวมีอัตราการรอดตายเท่ากับชุดควบคุม

7. อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของกุ้งกุลาดำต่อวัน

จากการทดลองในทุกกลุ่มการทดลองพบว่า อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของกุ้งกุลาดำต่อวัน อยู่ในช่วง 3.64 – 4.40 โดยพบว่ากลุ่มที่ได้รับยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ98 มีอัตราการเจริญต่อวันสูงที่สุด คือ 4.40 สำหรับกลุ่มอื่น ๆ มีอัตราใกล้เคียงกัน สำหรับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยีสต์จะมีอัตราการเจริญต่อวัน เท่ากับ 3.86 (ตารางที่9) เมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตต่อวันในยีสต์ทั้ง 7 กลุ่มกับกลุ่มควบคุม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 9 น้ำหนักเฉลี่ยก่อนและหลังเลี้ยง อัตราการรอดตายสัมพัทธ์ (%) และการเจริญเติบโตต่อวัน (G) ของกุ้งกุลาดำที่ผสมยีสต์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเป็นเวลา 30 วัน

สายพันธุ์ยีสต์	น้ำหนักกุ้งกุลาดำก่อนเลี้ยง (N)	น้ำหนักกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยง (N)	เปอร์เซนต์การรอดตายสัมพัทธ์ (N)	การเจริญเติบโตต่อวัน (N)
Control	4.78 ± 1.69 (27)	5.60 ± 3.35 (27)	86.89 ± 0.05 (9)	3.86 ± 0.11 (9)
Cryptococcus sp. AJ43	4.57 ± 4.39 (27)	5.42 ± 5.89 (27)	100.0 ± 0.00 (9)	3.90 ± 0.07 (9)
Candida sp. AJ70	4.95± 5.78 (24)	6.40 ± 7.69 (24)	86.89 ± 0.55 (8)	4.28 ± 0.41 (8)
Cryptococcus sp. AJ98	4.46± 9.17 (27)	5.85 ± 7.38 (27)	100.0 ± 0.00 (9)	4.40 ± 0.49 (9)
Stengmatomyces sp. AJ176	5.78 ± 3.94 (21)	7.24 ± 1.25 (21)	100.0 ± 0.00 (7)	4.16 ± 0.31 (7)
Pichia sp. AJ179	5.33 ± 7.04 (24)	6.52 ± 7.35 (24)	86.89 ± 0.05 (8)	4.05 ± 0.19 (8)
Rhodotorula sp. AJ181	5.51 ± 4.82 (24)	6.09 ± 6.40 (24)	86.89 ± 0.05 (8)	3.64 ± 0.89 (8)
Malassezia sp. AJ188	5.57 ± 5.73 (21)	6.88 ± 8.04 (21)	77.78 ± 0.49 (7)	4.08 ± 0.15 (7)

หมายเหตุ : N หมายถึง จำนวนกุ้งกุลาดำ (ตัว) ที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่มทดลอง

8. การตรวจนับเชื้อยีสต์ *Vibrio* spp. และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

หลังจากให้ยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก ผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำให้แก่กุ้งกุลาดำทั้ง 7 กลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม เป็นระยะเวลา 30 วัน หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำแต่ละกลุ่มทดลองกลุ่มละ 3 ตัว มาตรวจนับเชื้อ ยีสต์ (อาหาร YA) *Vibrio* sp. (TCBS) และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (PCA) ที่พบในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ (การผ่าตัดเหมือนกับการเก็บตัวอย่าง) ผลการนับเชื้อยีสต์พบปริมาณเชื้อยีสต์มากที่สุดและปริมาณน้อยที่สุด คือ 2.57×10^5 CFU/ml และ 9.3×10^3 CFU/ml ในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับเชื้อ *Candida* sp. AJ70 และชุดควบคุมที่ไม่ได้รับยีสต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า บริเวณลำไส้ส่วนปลายของระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ จะพบปริมาณยีสต์มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทุกส่วนของระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำในทุกชุดของการทดลอง โดยพบว่าบริเวณที่พบยีสต์น้อยที่สุด ได้แก่ บริเวณปาก-กระเพาะ ส่วนบริเวณซีกัมและลำไส้ส่วนต้น จะพบยีสต์ในปริมาณที่ลดหลั่นกันมาตามลำดับ

สำหรับผลการทดลองการตรวจนับจำนวน *Vibrio* sp. ที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ จะพบจำนวน *Vibrio* sp. มากที่สุด 4.55×10^5 CFU/g ในชุดการทดลองที่ 7 ซึ่งได้รับยีสต์สายพันธุ์ *Malassezia* sp. AJ188 และพบจำนวนน้อยที่สุด 1.05×10^4 CFU/g ในชุดควบคุม โดยจะพบเชื้อบริเวณทุกส่วนของระบบทางเดินอาหารของกุ้ง คือ ปาก-กระเพาะ, ลำไส้ส่วนต้น, ลำไส้ส่วนปลาย และบริเวณซีกัม โดยจะพบบริเวณลำไส้ส่วนปลายมากที่สุด

นอกจากนี้จะพบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุด จำนวน 8.42×10^6 CFU/g และพบน้อยที่สุด 1.61×10^6 CFU/ml ในชุดการทดลองที่ได้รับยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ43 และยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ98 ตามลำดับ โดยจะพบบริเวณลำไส้ส่วนปลายมากที่สุด สำหรับบริเวณปาก-กระเพาะ และลำไส้ส่วนต้นจะพบในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 เชื้อยีสต์ *Vibrio* sp. และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ (CFU/g)

ยีสต์	เชื้อที่พบในระบบทางเดินอาหาร (CFU/g)		
	Vibrio sp. ทั้งหมด	ยีสต์ทั้งหมด	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด
ชุดควบคุม	1.05×10^4	9.3×10^3	7.05×10^7
*Cryptococcus*sp. AJ43	3.3×10^4	8.78×10^4	8.42×10^6
Candida sp. AJ70	1.58×10^4	2.57×10^5	1.37×10^7
Cryptococcus sp. AJ98	2.28×10^5	8.3×10^4	1.61×10^6
Stengmatomyces sp. AJ176	2.49×10^5	5.3×10^4	1.38×10^7
Pichia sp. AJ179	2.3×10^5	4.65×10^4	8.18×10^7
Rhodotorula sp. AJ181	3.8×10^5	6.24×10^4	1.35×10^7
Malassezia sp. AJ188	4.55×10^5	9.87×10^4	2.12×10^6

9. การทดสอบกับเชื้อก่อโรค (Pathogen challenge test)

นำกุ้งที่เหลือจากการทดลองที่มีอายุ 30 วันหลังจากที่ได้ผ่านการให้อาหารที่ผสมยีสต์ที่คัดเลือกได้แล้ว ในขั้นต้นมาทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคจาก *V. harveyi* โดยทำการฉีดเชื้อ *V. harveyi* อายุ 24 ชั่วโมง โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 3×10^7 CFU/ml แล้วฉีดให้แก่กุ้งกุลาดำทุกตัว ตัวละ 0.1 ml ในทุกชุดการทดลอง และติดตามการตายของกุ้งเป็นเวลา 7 วันโดยให้อาหารแก่กุ้งกุลาดำตามปกติ ผลการทดลองพบว่ากลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารที่ผสมยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ98, *Stengmatomyces* sp. AJ176 และ *Pichia* sp. AJ179 มีอัตรารอด 100% สำหรับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการผสมยีสต์ในอาหารมีอัตราการรอด 28.57% ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีอัตราการรอดตายน้อยที่สุด นอกจากนี้มีอัตราการรอดตาย 66.67%, 75.00%, 80.00% และ 75.00% ในกลุ่มการทดลองที่ได้รับยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ43, *Candida*

sp. AJ70, *Rhodotorula* sp. AJ181 และ *Malassezia* sp. AJ188 (ตารางที่ 11) เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยยีสต์ทั้ง 7 กลุ่ม มีอัตราการรอดตายที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งหมด ($P<0.05$) หลังจากนั้นนำกุ้งกุลาดำที่ตายมาตรวจดูลักษณะภายนอกพบว่า กุ้งที่ติดเชื้อจะมีลักษณะอ่อนเพลีย ไม่กินอาหาร ว่ายน้ำอยู่บริเวณผิวน้ำ ตับมีสีซีดลง ซี่เหงือกมีสีดำ ตัวหลวม ตัวกุ้งเริ่มมีสีแดง เวลากลางคืนจะสังเกตเห็นลักษณะเรืองแสงจากตัวกุ้งกุลาดำ และมาผ่าตัดเอาส่วนทางเดินอาหาร, ตับ และกล้ามเนื้อมาแยกเชื้อ *V. harveyi* โดยนำมาตรวจสอบสมบัติการย้อมสีแกรม รูปร่าง การเรียงตัว การเรืองแสงบนอาหาร TSA ที่มีการเติม 1.5% NaCl และการหมักน้ำตาลซูโครสในอาหาร TCBS ที่เติม 1.5% NaCl เพื่อยืนยันว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงตายด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่ทำการฉีดเข้าไปในตัวกุ้งและเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงจริง

10. วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมในเลือด

หลังจากทำการเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสมยีสต์เป็นเวลา 30 วันแล้ว จึงทำการดูดเลือดกุ้งมานับปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำที่กินอาหารทั้ง 8 กลุ่ม (กลุ่มการทดลองละ 3 ตัวทั้งหมด 24 ตัว) โดยพบว่าจะมีค่าแตกต่างกัน โดยในกลุ่มที่มีการผสมยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula* sp. AJ181 จะให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุด คือ 5.03×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มที่มีการผสมยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ43, *Candida* sp. AJ70, *Cryptococcus* sp. AJ98, *Stengmatomyces* sp. AJ176, *Pichia* sp. AJ179 และ *Malassezia* sp. AJ188 จะมีค่าเท่ากับ 3.39×10^7, 2.98×10^7, 4.37×10^7 3.83×10^7, 4.93×10^7 และ 3.14×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ยกเว้นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการผสมยีสต์ลงไป จะให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 2.45×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 11) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

11. กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity)

หลังจากทำการเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสมยีสต์เป็นเวลา 30 วันแล้วจึงนำกุ้งกุลาดำมาหาค่า กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ (กลุ่มการทดลองละ 3 ตัวทั้งหมด 24 ตัว) ที่ได้รับอาหารที่ผสมยีสต์ จะเห็นว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus*

sp. AJ98 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมากที่สุด คือ 305.84 unit/min/mg protein สำหรับยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ43, *Candida* sp. AJ70, *Stengmatomyces* sp. AJ176, *Pichia* sp. AJ179 , *Rhodotorula* sp. AJ181, *Malassezia* sp. AJ188 และชุดควบคุม มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เท่ากับ 106.16, 79.40, 55.51, 11.00, 81.79, 82.65 และ 135.74 unit/min/mg protein ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า กลุ่มทดลองที่ให้อาหารที่ผสมยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ98 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับทุกชุดของการทดลองกับกลุ่มอื่น ๆ ทั้งหมด ($P<0.05$) ดังตารางที่ 11

12. ค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในเลือด (Clearance ability of bacteria)

หลังจากทำการเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสมยีสต์เป็นเวลา 30 วันแล้วจึงนำกุ้งกุลาดำมาหาค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในเลือด (กลุ่มการทดลองละ 3 ตัวทั้งหมด 24 ตัว) เมื่อฉีดสารละลายเชื้อ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้น 3×10^7 CFU/ml ให้กับกุ้งทดลองตัวละ 0.1 มิลลิลิตร เมื่อครบ 3 ชั่วโมง จึงดูดเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร เพื่อนำไปนับเชื้อ *V. harveyi* ที่เหลืออยู่ในเลือดกุ้ง ผลการทดลองการหาค่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำกลุ่มต่าง ๆ พบว่า ชุด *Malassezia* sp. AJ188 เป็นชุดที่มีการกำจัดแบคทีเรียในเลือดได้น้อยที่สุด โดยมีแบคทีเรียเหลือในเลือด 3.8×10^3 CFU/ml สำหรับกลุ่มที่มีการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดได้มากที่สุด ได้แก่ กลุ่มที่ให้อาหารที่ผสมยีสต์ สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ43 และ *Pichia* sp. AJ179 โดยมีแบคทีเรียเหลือในน้ำเลือด 1.33×10^2 CFU/ml และสำหรับกลุ่มอื่น ๆ ที่ให้ยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. AJ70, *Cryptococcus* sp. AJ98, *Stengmatomyces* sp. AJ176, *Rhodotorula* sp. AJ181 และ ชุดควบคุม ตามลำดับ มีปริมาณแบคทีเรียเหลือในน้ำเลือด เท่ากับ 1.66×10^2 CFU/ml 1.4×10^3 CFU/ml, 5.66×10^2 CFU/ml, 5.33×10^2 CFU/ml และ 1.5×10^3 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่เหลือในน้ำเลือดเมื่อทดสอบข้อมูลทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในเลือดของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมยีสต์

สายพันธุ์ยีสต์	อัตราการรอดตาย (%) หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	ปริมาณเม็ดเลือดรวมในกุ้งกุลาดำ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mgprotein)	ความสามารถในการกำจัด *V. harveyi.* ในเลือด (log CFU/ml)
Control	28.57 ± 0.29	$2.45 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^6$	135.74 ± 69.66^{ns}	7.47
Cryptococcus sp. AJ43	66.67 ± 0.34	$3.39 \times 10^7 \pm 6.04 \times 10^6$	106.16 ± 82.50^{ns}	7.47
Candida sp. AJ70	75.00 ± 0.19	$2.98 \times 10^7 \pm 1.05 \times 10^7$	79.40 ± 125.53^{ns}	7.47
Cryptococcus sp. AJ98	100.0 ± 0.00	$4.37 \times 10^7 \pm 1.36 \times 10^7$	305.84 ± 123.44	7.47
Stengmatomyces sp.AJ176	100.0 ± 0.00	$3.83 \times 10^7 \pm 5.74 \times 10^6$	55.51 ± 46.91^{ns}	7.47
Pichia sp. AJ179	100.0 ± 0.00	$4.93 \times 10^7 \pm 1.91 \times 10^7$	11.00 ± 19.05^{ns}	7.47
Rhodotorula sp. AJ181	80.00 ± 1.18	$5.03 \times 10^7 \pm 3.39 \times 10^7$	81.79 ± 35.83^{ns}	7.47
Malassezia sp. AJ188	75.00 ± 0.32	$3.14 \times 10^7 \pm 1.72 \times 10^7$	82.65 ± 27.76^{ns}	7.47

ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ns = non significant แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

13. การศึกษาความสามารถในการเกาะเม็ดอาหารของยีสต์ในสภาวะสิ่งแวดล้อมของการเลี้ยงกุ้งในตู้ทดลอง

การศึกษาความสามารถในการเกาะเม็ดอาหารของยีสต์ ในสภาวะสิ่งแวดล้อมของการเลี้ยงกุ้งในตู้ทดลอง โดยทำการเก็บตัวอย่างอาหารที่ผสมยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ให้กับกุ้งกุลาดำในตู้ทดลองที่เลี้ยงกุ้งที่มีการพ่นอากาศปกติ จำนวน 10 เม็ด ในชั่วโมงที่ 0 (เริ่มการให้อาหาร) และชั่วโมงที่ 5 (ครบเวลาให้อาหารอีกครั้ง) มาหาจำนวนของยีสต์ทั้งหมด พบว่าอัตราการกระจายตัวสูงที่สุดในยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus.* sp. AJ98 คือ 23.41 CFU/h ในขณะที่กลุ่มที่มีอัตราการกระจายตัวน้อยที่สุด คือ ยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus.* sp. AJ43 ซึ่งมีอัตราการกระจายตัว 3.9 CFU/h เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์*Candida* sp. AJ70, *Stengmatomyces* sp. AJ176, , *Pichia* sp. AJ179 *Rhodotorula* sp. AJ181 และ *Malassezia* sp. AJ188 ซึ่งมีอัตราการกระจายตัวเท่ากับ 8.17, 7.55, 9.49, 6.28 และ 8.76 และเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า จำนวนของยีสต์ที่เกาะกับเม็ดอาหารในชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 5 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 12 ปริมาณยีสต์ในอาหารกุ้งในชั่วโมงที่ 0 และ ชั่วโมงที่ 5

สายพันธุ์ยีสต์	**ปริมาณยีสต์ CFU/g**		**อัตราการเกาะติดของยีสต์ /ชม**
	ชั่วโมงที่ 0	**ชั่วโมงที่ 5**	
Cryptococcus sp. AJ43	1.28×10^6	4.9×10^5	3.9
Candida sp. AJ70	3.58×10^7	3.12×10^6	8.17
Cryptococcus sp. AJ98	9.5×10^7	1.35×10^6	23.41
Stengmatomyces sp.AJ176	3.6×10^7	5.8×10^6	7.55
Pichia sp. AJ179	4.3×10^7	5.05×10^6	9.49
Rhodotorula sp. AJ181	2.8×10^7	2.9×10^6	6.28
Malassezia sp. AJ188	4×10^7	4.95×10^6	8.76