

ลักษณะของยีสต์โพรไบโอติกเพื่อการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

CHARACTERIZATION OF YEAST PROBIOTICS FOR MARINE SHRIMP CULTURE

ไตรมาศ บุญไทย^{1*} สาลินี ผลมาตย์² วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย¹ และ สุบัตินทิ นิมรัตน์³

Traimat Boonthai^{1*}, Salinee Phonmat², Verapong Vuthiphandchai¹, and Subuntith Nimrat³

¹ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²สำนักงานการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

³ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

¹Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University

²Office of Educational Affairs, Faculty of Science, Burapha University

³Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University

*corresponding author e-mail: traimat.bo@go.buu.ac.th

(Received: 23 April 2025; Revised: 9 June 2025; Accepted: 11 June 2025)

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลประสบปัญหาโรคระบาดและการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรค จึงจำเป็นต้องมีวิธีทางเลือกในการเพิ่มผลผลิตและเสริมความต้านทานโรค ยีสต์เป็นโพรไบโอติกชนิดหนึ่งที่ช่วยเสริมโภชนาการและป้องกันการติดเชื้อได้ การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคูณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกบางประการของยีสต์ 5 ไอโซเลท ได้แก่ BUU 01 BUU 02 BUU 03 BUU 04 และ BUU 05 โดยนำยีสต์มาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งทะเล การทนต่อความเค็ม อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง การผลิตเอนไซม์อะไมเลส การผลิตเอนไซม์ย่อยอาหาร การวัดการเจริญ และการจัดจำแนกชนิดยีสต์จากการศึกษาพบว่า ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทมีความปลอดภัยและไม่ก่อปัญหาด้านสุขภาพต่อเจ้าบ้าน เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสกุล *Vibrio* ได้แก่ *V. harveyi* *V. vulnificus* *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกอื่น พบว่า BUU 01 BUU 02 และ BUU 05 มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีบางประการในระดับหลอดทดลอง เนื่องจากเป็นยีสต์ที่เจริญอย่างรวดเร็ว เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณเกลือระหว่าง 25–37°C, pH 4–8 และ 0–6% (w/v) ตามลำดับ รวมทั้งผลิตเอนไซม์ย่อยอาหารได้ดี คือ เอนไซม์ไลเปส (81.43 ± 0.11 – 106.95 ± 0.14 U/mL) และโปรติเอส (19.12 ± 0.20 – 43.70 ± 0.15 U/mL) โดยสามารถจัดจำแนกได้เป็น *Debaryomyces* sp. BUU 01 *Rhodotorula* sp. BUU 02 และ *Saccharomyces* sp. BUU 05 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีสต์ทั้ง 3 ชนิดนี้

มีศักยภาพที่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาการใช้ยีสต์กลุ่มนี้เป็นโพรไบโอติกในกุ้งทะเลต่อไปในอนาคตเพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและสุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: ยีสต์ โพรไบโอติก กุ้งขาว *Debaryomyces Saccharomyces*

Abstract

Marine shrimp culture confronts significant challenges due to disease outbreaks and the increasing antibiotic resistance of pathogenic bacteria. Therefore, alternative methods are needed to enhance shrimp production and confer disease resistance. Yeast probiotics have been shown to provide nutritional benefits and protective effects against infectious agents. The objective of this study was to evaluate some probiotic features of five yeast isolates: BUU 01 BUU 02 BUU 03 BUU 04 and BUU 05. The isolates were assessed for their ability to lyse red blood cells, inhibit marine shrimp pathogens, tolerate various salinity levels, temperatures and pH values, produce catalase and digestive enzymes and their growth kinetics were monitored. Additionally, the isolates were identified their species. All five yeast isolates were considered safe and non-pathogenic to the host due to no hemolytic activity observed. These isolates also exhibited inhibitory effects against pathogenic *Vibrio* species, including *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. The three strains also showed other some *in vitro* promising probiotic properties, including rapid growth, tolerance to a wide range of temperatures (25–37°C), pH (4–8), and salt concentrations (0–6% (w/v)), as well as the ability to effectively produce digestive enzymes: lipase (81.43 ± 0.11 – 106.95 ± 0.14 U/mL) and protease (19.12 ± 0.20 – 43.70 ± 0.15 U/mL). These isolates were identified as *Debaryomyces* sp. BUU 01, *Rhodotorula* sp. BUU 02, and *Saccharomyces* sp. BUU 05. This study suggests that the three yeast strains have promising probiotic potential for marine shrimp culture. Further study focused on administration of the yeast probiotic in shrimp farming should be performed to confirm their efficacy in promoting shrimp growth and health.

Keywords: Yeast, Probiotic, *Litopenaeus vannamei*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*

บทนำ

กุ้งทะเล เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีปริมาณผลผลิตสูงถึง 392,600 ตัน คิดเป็นมูลค่า 57,435.40 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2566 โดยเฉพาะอย่างยิ่งกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่มีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายและมีปริมาณผลผลิต 370,300 ตัน คิดเป็นร้อยละ 94.30 ของผลผลิตกุ้งทะเลทั้งหมด (กรมประมง, 2567) การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลประสบปัญหาหลายด้าน อาทิเช่น ต้นทุนการผลิตและค่าอาหารสูง การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศและการระบาดของโรคติดเชื้อ เช่น โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease; AHPND) หรือเรียกสั้นๆ ว่า โรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome; EMS) ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ก่อโรค คือ *Vibrio parahaemolyticus* โรค AHPND มีการระบาดอย่างหนักตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 และสร้างผลกระทบต่อ การเพาะเลี้ยงกุ้งเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ในช่วงที่มีการระบาดอย่างรุนแรงผลผลิตกุ้งของประเทศไทยลดลงอย่างมากประมาณร้อยละ 65 ในระหว่างปี พ.ศ. 2554–2557 ในช่วงเวลาดังกล่าวปริมาณผลผลิตต่อหน่วยลดลงจาก 11.19 ตันต่อเฮกตาร์ เหลือ 6.14 ตันต่อเฮกตาร์ เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงกุ้งในหลายพื้นที่ เช่น จันทบุรี ระยองและฉะเชิงเทรา ประสบปัญหากุ้งตายจำนวนมาก สร้างความเสียหายประมาณร้อยละ 40 ของผลผลิตทั้งหมด (Kumar et al., 2021; Shinn et al., 2018) นอกจากนี้แบคทีเรียก่อโรคสกุล *Vibrio* ชนิดอื่นได้สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย ได้แก่ *V. harveyi* และ *V. vulnificus* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงและโรคจุดดำหรือโรคเสียน้ำ ตามลำดับ (ชนกันต์, 2559)

การระบาดของโรคทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมและรักษาโรคอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่จำเป็นและขาดการควบคุมทำให้เชื้อก่อโรคคือตัวยาปฏิชีวนะ เกิดการสะสมของยาปฏิชีวนะในตัวสัตว์น้ำและจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ สูญเสียความสมดุลส่งผลให้ภูมิคุ้มกันอ่อนแอลง (Digutā et al., 2023) นอกจากนี้การบริโภคสัตว์น้ำที่ติดเชื้อมีโอกาสทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยของผู้บริโภค เนื่องจากเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำหลายชนิดสามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (Ziarati et al., 2022) ปัจจุบันจึงมีการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีชีวิตเป็นวิธีทางเลือกที่ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต การรอดชีวิต กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพิ่มความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคและปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ (Ceseña et al., 2021; Nimrat et al., 2020) จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก เช่น *Lactobacillus* *Lactococcus* *Bifidobacterium* *Leuconostoc* *Pediococcus* *Enterococcus* และ *Streptococcus* และแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เช่น *B. subtilis* *B. licheniformis* *B. megaterium* *B. polymyxa* และ *B. coagulans* (Nimrat et al., 2020; Shen et al., 2022) การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีทั้งการผสมลงในอาหารและเติมลงใน

ในน้ำ โดยสามารถใช้ทั้งในรูปของเชื้อเดี่ยวและเชื้อแบคทีเรียผสม และการผสมรวมกับสารอื่นๆ เช่น โปรไบโอติกและสมุนไพร เป็นต้น

ข้อจำกัดหนึ่งของแบคทีเรียโปรไบโอติก คือ ความเสี่ยงในการถ่ายยีนดื้อยาปฏิชีวนะระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกกับแบคทีเรียก่อโรค (Li et al., 2020) ดังนั้นทางเลือกหนึ่งของการใช้โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ การใช้ยีสต์เป็นโปรไบโอติก ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตขนมปังและเบียร์เป็นระยะเวลายาวนาน รวมทั้งใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหารฟังก์ชัน (Functional food) ที่ให้คุณค่าทางโภชนาการ ช่วยปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกัน ปรับปรุงระบบและสภาพการทำงานของร่างกาย ชะลอการเสื่อมของอวัยวะต่างๆ และบำบัดอาการของโรคที่เกิดจากความผิดปกติ (Agboola et al., 2021; Staniszewski & Kordowska-Wiater, 2021) ในมุมมองของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในระบบนิเวศการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำทะเล รวมทั้งเป็นเชื้อประจำถิ่นในทางเดินอาหารของปลาหลายชนิด มีบทบาทสำคัญในการหลั่งเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยอาหารและดูดซึมสารอาหารของเจ้าบ้านให้ดียิ่งขึ้น ยีสต์และองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ เช่น เบต้า-กลูแคน (β -glucan) และแมนโนโปรตีน (Mannoproteins) มีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้สัตว์น้ำต้านทานต่อเชื้อก่อโรคสูงขึ้น สารพอลิเอมีน (Polyamine) ที่หลังจากยีสต์ยังมีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตและพัฒนาการของระบบทางเดินอาหารในปลาวัยอ่อน นอกจากนี้ยีสต์ยังเป็นแหล่งของโปรตีนที่ใช้เสริมลงในอาหารสัตว์น้ำเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ceseña et al., 2021) ตามธรรมชาติแล้วยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ทนต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย จึงทำให้ยีสต์ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำในระหว่างการรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้ยีสต์มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ปัจจุบันยีสต์ที่ได้รับการรับรองความปลอดภัย (Qualified Presumption of Safety; QPS) จากสำนักงานความปลอดภัยด้านอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority: EFSA) ได้แก่ *Debaryomyces hansenii* *Hanseniaspora uvarum* *Kluyveromyces lactis* *K. marxianus*, *Saccharomyces bayanus* *S. cerevisiae* *S. pastorianus* *S. boulardii* *Schizosaccharomyces pombe* และ *Xanthophyllomyces dendrorhous* จึงทำให้ยีสต์เหล่านี้มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับคนและสัตว์น้ำ (Pais et al., 2020)

ปัจจุบันยีสต์ได้รับความสนใจในการศึกษาศักยภาพการเป็นสารเสริมชีวิตและสารเติมแต่งในอาหารสัตว์น้ำ จากการศึกษาของ Diguță et al. (2023) พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* BB06 หรือ Baker's yeast หรือยีสต์ขนมปัง มีคุณสมบัติโปรไบโอติกที่ดีในการเสริมลงในอาหารปลาเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยต่อเจ้าบ้าน ทนต่ออุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นเกลือในช่วงกว้าง ยึดเกาะและรอดชีวิตในทางเดินอาหารได้ดี ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลายชนิดและมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ยังมีการนำยีสต์ขนมปังมาใช้

ในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาเทราท์สายรุ้ง (*Oncorhynchus mykiss*) เป็นต้น โดยมีบทบาทช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหาร เพิ่มพื้นที่ผิวของลำไส้และเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมสารอาหารของปลาเพิ่มสูงขึ้น (Islam et al., 2021; Jahan et al., 2021; Pooramini et al., 2009) อย่างไรก็ตามการศึกษาคูณสมบัติโพรไบโอติกของยีสต์เพื่อส่งเสริมสุขภาพของกุ้งทะเลยังมีไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาบทบาทของยีสต์ต่อสุขภาพของปลา การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคูณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกบางประการของยีสต์ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยนำยีสต์ 5 ไอโซเลท ได้แก่ BUU 01 BUU 02 BUU 03 BUU 04 และ BUU 05 มาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งทะเล การทนต่อความเค็ม อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง การผลิตเอนไซม์อะไมเลส การผลิตเอนไซม์ย่อยอาหาร การวัดการเจริญ และการจัดจำแนกชนิดยีสต์ งานวิจัยนี้จะทำให้ได้ยีสต์โพรไบโอติกที่มีความปลอดภัยและสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่เจริญได้ดีภายใต้สภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย ยีสต์โพรไบโอติกในการศึกษานี้จะมีบทบาทในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและปรับปรุงเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร ส่งผลให้กุ้งทะเลเจริญเติบโตได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่สร้างความกังวลด้านสุขภาพของผู้บริโภค

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมยีสต์

นำยีสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม จำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งแยกมาได้จากทางเดินอาหารและดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง (Nimrat et al., 2021) ที่เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose; YPD broth (BD Biosciences, Sparks, Maryland, USA) เติม 15% (v/v) Glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C มาชิตลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนให้พร้อมทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกต่อไป

2. ความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

นำยีสต์มาชิต (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ที่เติม 7% (v/v) Blood ที่ได้อาณาเคราะห์จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยบูรพา นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นประเมินความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ได้แก่ 1) การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (β -hemolysis) คือ ปรากฏวงใสรอบโคโลนี 2) การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบางส่วน (α -hemolysis) คือ ปรากฏเกิดวงโปร่งแสงสีเขียวรอบโคโลนี และ 3) ไม่ย่อยสลายเม็ด

เลือดแดง (γ -hemolysis) คือ ไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงหรือไม่เกิดวงไฮรอปโคโลนี การทดลองดำเนินการ 3 ซ้ำ

3. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

นำยีสต์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth บ่มที่อุณหภูมิ 25°C ในตู้บ่มแบบเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ Cell suspension มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง

ศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของสารที่ผลิตขึ้นจากยีสต์ด้วยเทคนิค Agar well diffusion (Vaseeharan & Ramasamy, 2003) โดยเริ่มจากเพาะแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Vibrio harveyi* *V. vulnificus* *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth ที่เติม 3% (w/v) NaCl บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30±1°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียโดยอาศัยกราฟมาตรฐานที่เปรียบเทียบระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate technique) จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 1.50×10^6 CFU/mL มาป้าย (Swab) ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (Sterile cotton swab) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar ที่เติม 3% (w/v) NaCl แล้วเจาะรูอาหารเลี้ยงเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วย Cork borer ปราศจากเชื้อ เติมส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ของยีสต์แต่ละชนิดลงในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงไฮรอปหลุม (มิลลิเมตร) และประเมินความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยนำขนาดวงไฮรอปด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม การทดลองดำเนินการ 3 ซ้ำ

4. การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างและความเค็มต่อการเจริญของยีสต์

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 4 6 8 และ 10 หรือเติม NaCl ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10% (w/v) บ่มบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar และคำนวณปริมาณเซลล์เป็น Log CFU/mL (Nielsen & Arneborg, 2007) การทดลองดำเนินการ 3 ซ้ำ

5. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของยีสต์

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 25 37 45 และ 55°C นาน 48 ชั่วโมง ก่อนนำมานับจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar (Nielsen & Arneborg, 2007) การทดลองดำเนินการ 3 ซ้ำ

6. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

นำยีสต์มาขีด (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสด้วยสารละลาย 3% (v/v) Hydrogen peroxide (Diguṭṭa et al., 2023) การทดลองดำเนินการ 3 ซ้ำ

7. การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยอาหาร

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสวิเคราะห์ด้วยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Caseinase assay method โดยใช้สารละลายไทโรซีนเป็นสารมาตรฐาน (Walter, 1984) มีรายละเอียดแบบย่อ ดังนี้ นำยีสต์มาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์โปรติเอส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ Cell suspension มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที นำส่วนใสมาผสมกับสารละลาย 1.50% (w/v) เคซีนและสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้น 0.40 โมลาร์ เพื่อหยุดปฏิกิริยานำสารผสมที่ผ่านการกรองมาเติมสารละลาย Folin's reagent และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อบ่งชี้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยอาศัยกราฟมาตรฐานไทโรซีน

การผลิตเอนไซม์อะไมเลสวิเคราะห์ด้วยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิค DNS method โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน (Bernfeld, 1955) นำ Cell suspension ของยีสต์ที่ได้การเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์อะไมเลสภายใต้สภาวะเดียวกับเอนไซม์โปรติเอส มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เพื่อเก็บส่วนใส จากนั้นเจือจางส่วนใสด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ เพื่อนำมาผสมกับสารละลาย 1% (w/v) Soluble starch ที่ใช้เป็นสับสเตรท เติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS reagent) ความเข้มข้น 0.045 โมลาร์ ต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เพื่อบ่งชี้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสโดยอาศัยกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

การผลิตเอนไซม์ไลเปสวิเคราะห์ด้วยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Titrimetric assay โดยใช้กรดโอเลอิกเป็นสารมาตรฐาน (Gilbert, Drodzd & Jones, 1991) นำน้ำมันมะกอกความเข้มข้น 10% (v/v) ที่ผสมกับสารละลาย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.20 โมลาร์ ผสมกับส่วนใสของยีสต์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงหลังเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปส จากนั้นเติมสารหยุดปฏิกิริยา (อะซิโตนกับแอมโซลูทเฮลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร) หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีนความเข้มข้น 1% (w/v) และไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน นำค่าที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยอาศัยกราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก การทดลองดำเนินการ 3 ซ้ำ

8. การวัดการเจริญของยีสต์

นำยีสต์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25°C แล้วนำ Cell suspension มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และนับปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิค Spread plate method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของเซลล์มาตรฐาน (Nielsen & Arneborg, 2007) โดยวัดอัตราการเจริญทุกๆ 2 ชั่วโมง

9. การจัดจำแนกชนิดยีสต์

นำยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท มาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกชนิดของยีสต์ (Barnett, Payne & Yarrow, 2000; Campbell & Duffus, 1991)

10. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทดสอบทางสถิติด้วยเทคนิค One-way ANOVA และ Tukey's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ ด้วยโปรแกรม Minitab เวอร์ชัน 17

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาคุณสมบัติด้านความปลอดภัยและความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ BUU 01 BUU 02 BUU 03 BUU 04 และ BUU 05 ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ สังเกตได้จากให้ผลการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงเป็น γ -hemolysis ดังตารางที่ 1 และยีสต์ทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสกุล *Vibrio* ทุกชนิด ได้แก่ *V. harveyi* *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ความสามารถในการการย่อยเม็ดเลือดแดงและการผลิตเอนไซม์คะตะเลสของยีสต์

ไอโซเลท	รูปแบบการการย่อยเม็ดเลือดแดง	การผลิตเอนไซม์คะตะเลส
BUU 01	γ -hemolysis	++
BUU 02	γ -hemolysis	+
BUU 03	γ -hemolysis	++
BUU 04	γ -hemolysis	++
BUU 05	γ -hemolysis	++

หมายเหตุ γ -hemolysis: ไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงหรือวงใสรอบโคโลนี +: เกิดฟองอย่างช้าๆ ++: เกิดฟองจำนวนมากและรวดเร็ว

2. ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษา พบว่า ยีสต์ BUU 01 BUU 03 BUU 04 และ BUU 05 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้อย่างรวดเร็ว ขณะที่ Yeast BUU 02 ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้อย่างอ่อนดังตารางที่ 1

ตารางที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของยีสต์

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค*			
	<i>V. harveyi</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
BUU 01	2.53±0.65 ^a	2.25±0.45 ^a	2.33±0.48 ^a	2.08±0.21 ^a
BUU 02	2.33±0.29 ^a	1.75±0.32 ^b	2.07±0.24 ^b	1.67±0.22 ^b
BUU 03	1.58±0.21 ^c	1.88±0.26 ^b	2.50±0.32 ^a	1.53±0.25 ^b
BUU 04	1.43±0.22 ^c	2.00±0.18 ^a	2.32±0.16 ^a	1.75±0.26 ^b
BUU 05	2.10±0.11 ^b	1.77±0.13 ^b	1.93±0.15 ^b	1.63±0.18 ^b

หมายเหตุ *ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบหลุม/ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม (มิลลิเมตร) ตัวอักษรตามแนวตั้งแสดงว่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. ผลของอุณหภูมิ ความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญของยีสต์

ยีสต์ทุกไอโซเลทเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25–37°C และไม่เจริญที่อุณหภูมิ 10°C และ 55°C ดังตารางที่ 3 ส่วนด้านความเค็ม ยีสต์ BUU 01 สามารถเจริญภายใต้สภาวะความเค็มกว้างตั้งแต่ 0–10% (w/v) รองลงมา คือ BUU 02 และ BUU 05 ที่เจริญภายใต้ความเค็ม 0–8% (w/v) ส่วนยีสต์ BUU 04 และ BUU 03 เจริญได้ที่ความเค็ม 0–4% (w/v) และ 0–2% (w/v) ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ยีสต์ BUU 02 เป็นยีสต์ที่เจริญในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างกว้างที่สุด คือ อยู่ในช่วง 2–8 ส่วน BUU 01 BUU 03 และ BUU 05 เจริญได้ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4–8 และยีสต์ทุกไอโซเลทเจริญได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิต่างกัน

ไอโซเลท	ปริมาณเซลล์ยีสต์ (Log CFU/mL) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (°C)				
	10	25	37	45	55
BUU 01	ไม่เจริญ	7.98±1.02	6.88±0.92	4.24±0.93	ไม่เจริญ
BUU 02	ไม่เจริญ	7.62±0.85	6.51±0.63	2.97±0.41	ไม่เจริญ
BUU 03	ไม่เจริญ	7.03±0.72	6.95±1.04	4.31±0.82	ไม่เจริญ
BUU 04	ไม่เจริญ	8.07±0.96	7.04±0.84	2.13±0.81	ไม่เจริญ
BUU 05	ไม่เจริญ	7.69±0.62	6.68±0.53	2.19±0.62	ไม่เจริญ

ตารางที่ 4 ปริมาณเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือต่างกัน

ไอโซเลท	ปริมาณเซลล์ยีสต์ (Log CFU/mL) ที่ความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ (% w/v)					
	0	2	4	6	8	10
BUU 01	7.69±1.02	6.38±0.73	6.31±0.63	4.27±0.75	2.88±0.43	2.10±0.51
BUU 02	7.02±0.03	6.37±0.63	6.32±0.53	4.69±0.82	2.83±0.61	ไม่เจริญ
BUU 03	7.12±0.73	6.29±0.84	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
BUU 04	7.88±0.84	6.88±0.95	3.19±0.82	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
BUU 05	7.01±1.05	6.40±1.08	6.31±0.96	4.22±0.71	2.14±0.71	ไม่เจริญ

ตารางที่ 5 ปริมาณเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน

ไอโซเลท	ปริมาณเซลล์ยีสต์ (Log CFU/mL) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ				
	2	4	6	8	10
BUU 01	ไม่เจริญ	7.84± 0.85	7.51±0.96	5.10±0.95	ไม่เจริญ
BUU 02	3.12±0.59	7.12±0.21	6.87±0.29	4.45±0.72	ไม่เจริญ
BUU 03	ไม่เจริญ	7.01±0.61	6.92±0.42	5.31±0.98	ไม่เจริญ
BUU 04	ไม่เจริญ	7.52±1.09	6.45±0.93	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ
BUU 05	ไม่เจริญ	7.83±1.05	6.89±0.92	4.28±1.03	ไม่เจริญ

4. ผลการศึกษากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปสของยีสต์

จากการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่า BUU 04 มีกิจกรรมอะไมเลสและไลเปสสูงที่สุด เท่ากับ 12.13 ± 0.13 U/mL และ 109.83 ± 0.09 U/mL ตามลำดับ ส่วน BUU 03 และ BUU 02 มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 45.42 ± 0.11 และ 43.70 ± 0.15 U/mL ตามลำดับ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปสของยีสต์

ไอโซเลท	อะไมเลส (U/mL)*	โปรติเอส (U/mL) ^ψ	ไลเปส (U/mL) ^φ
BUU 01	2.40 ± 0.11^b	19.12 ± 0.20^b	106.95 ± 0.14^b
BUU 02	1.51 ± 0.09^c	43.70 ± 0.15^a	81.43 ± 0.11^c
BUU 03	2.86 ± 0.12^b	45.42 ± 0.11^a	85.33 ± 0.15^c
BUU 04	12.13 ± 0.13^a	1.35 ± 0.11^c	109.83 ± 0.09^a
BUU 05	2.14 ± 0.14^b	19.68 ± 0.08^b	106.66 ± 0.10^b

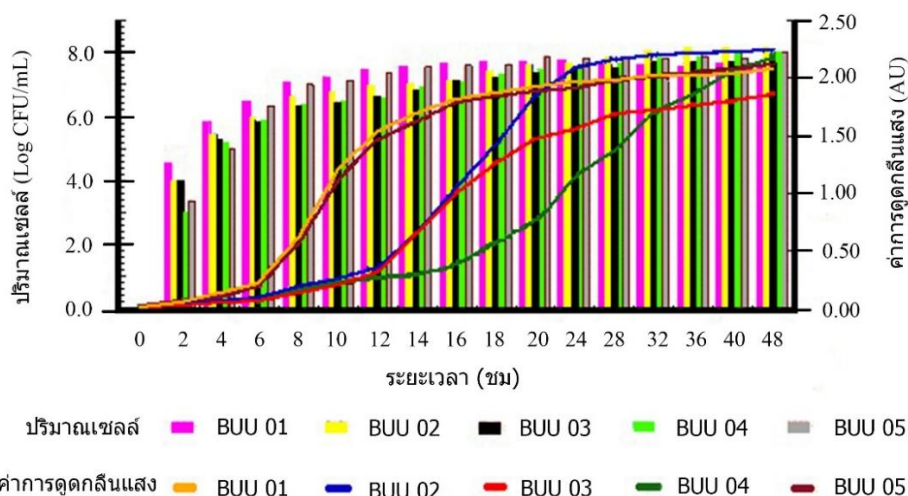
หมายเหตุ *1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อย Soluble starch ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ^ψ1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ไทโรซินในอัตราเท่ากับ 1 ไมโครโมลต่อมิลลิเมตรที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ^φ1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยไขมันให้เป็นกรดไขมันในรูปของกรดโอเลอิก 1 ไมโครโมล ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน N=3; ตัวอักษรตามแนวตั้งแสดงว่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

5. ผลการศึกษาการเจริญของยีสต์

เมื่อนำยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท มาศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth ที่อุณหภูมิ 25°C ได้ผลการศึกษา ดังภาพที่ 1 โดย BUU 03 มีระยะ Lag phase 12 ชั่วโมง และมีระยะ Log phase อยู่ช่วงเวลาที่ 12–28 ส่วน BUU 01 และ BUU 05 มีระยะในการเจริญใกล้เคียงกัน คือ มีระยะ Lag phase 6 ชั่วโมง และระยะ Log phase อยู่ช่วงเวลาที่ 6–18 สำหรับ BUU 02 มีระยะ Lag phase 12 ชั่วโมง ระยะ Log phase อยู่ช่วงเวลาที่ 12–24 และระยะ Stationary phase อยู่ที่ช่วงเวลาที่ 24 เป็นต้นไป และ BUU 04 เป็นยีสต์ที่มีสีดำที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ค่อนข้างช้า โดยมีระยะ Lag phase และ Log phase อยู่ช่วงเวลาที่ 15 และ 16–48 ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาอันสั้น เช่น BUU 01 และ BUU 05

6. ผลการศึกษาการจัดจำแนกชนิดยีสต์

เมื่อนำยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท มาจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี สามารถจำแนกได้เป็น 4 สกุล 5 ชนิด ได้แก่ *Debaryomyces* sp. BUU 01 *Rhodotorula* sp. BUU 02 *Saccharomyces* sp. BUU 03 *Aureobasidium* sp. BUU 04 และ *Saccharomyces* sp. BUU 05 ดังภาพที่ 2 และตารางที่ 7

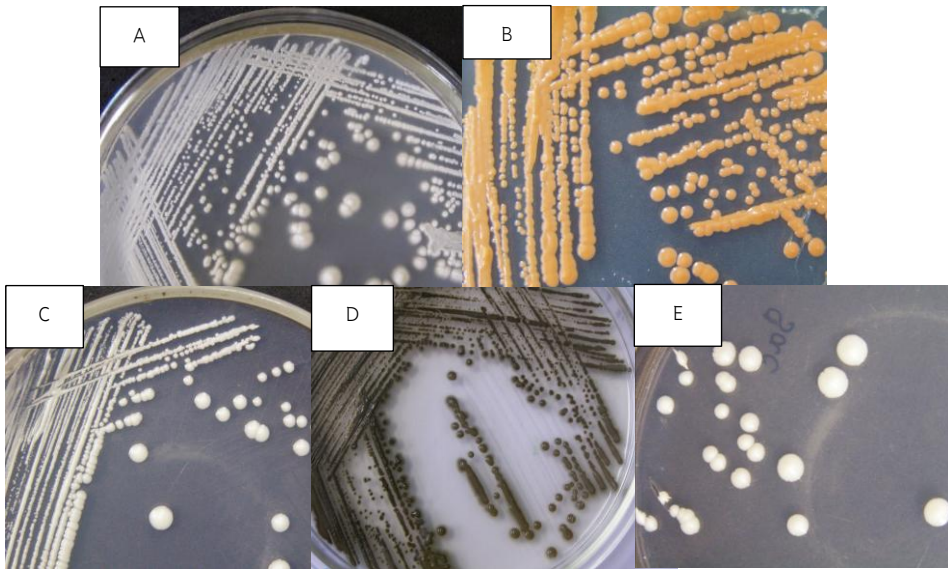


ภาพที่ 1 การเจริญของยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth ที่อุณหภูมิ 25°C

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของยีสต์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี	BUU 01	BUU 02	BUU 03	BUU 04	BUU 05
Colony characteristic	Spherical/ Smooth	Spherical/ Smooth	Spherical/ Smooth	Spherical/ Smooth	Spherical/ Smooth
Mucoid colony	–	+	–	+	–
Colony coloration	Cream	Orange	White	Greenish black	Cream
Cell shape	Spheroid	Spheroid	Spheroid	Oval	Spheroid
Vegetative reproduction	Multilateral budding	Multilateral budding	Multilateral budding	Bipolar budding	Multilateral budding
Sexual spore	Ascospore	–	Ascospore	Ascospore	Ascospore
Asci formation	+	–	+	+	+
Spore shape	Spheroid	–	Spheroid	Spheroid	Spheroid
Pseudomycelium	+	–	+	+	+
Glucose fermentation	+	–	+	–	+
Galactose fermentation	+	–	+	–	+
Sucrose fermentation	+	–	+	–	+
Maltose fermentation	+	–	+	–	+
Lactose fermentation	–	–	–	–	–
Mannitol fermentation	+	–	–	–	–
Lysine fermentation	–	–	–	–	–
Nitrate assimilation	–	–	–	–	–
Glucose assimilation	+	+	+	+	+
Galactose assimilation	+	+	+	+	+
Sucrose assimilation	+	+	+	+	+
Maltose assimilation	+	–	+	+	+
Lactose assimilation	+	–	–	–	–
Mannitol assimilation	+	+	–	–	+
Lysine assimilation	+	–	–	+	–
Urea hydrolysis	–	+	–	–	–
Identified as	<i>Debaryomyces</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Saccharomyces</i> sp.	<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Saccharomyces</i> sp.
	BUU 01	BUU 02	BUU 03	BUU 04	BUU 05

หมายเหตุ + ; ผลการทดสอบเป็นบวก – ; ผลการทดสอบเป็นลบ



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของยีสต์โพรไบโอติกทั้ง 5 ไอโซเลท (A) *Debaryomyces* sp. BUU 01 (B) *Rhodotorula* sp. BUU 02 (C) *Saccharomyces* sp. BUU 03 (D) *Aureobasidium* sp. BUU 04 และ (E) *Saccharomyces* sp. BUU 05

อภิปรายผล

1. คุณสมบัติด้านความปลอดภัยและความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งทะเลของยีสต์

ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ถือว่ามีความปลอดภัยและไม่ก่อปัญหาด้านสุขภาพต่อเจ้าบ้าน จึงเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Digutä et al., 2023) แต่อย่างไรก็ตามการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (β -hemolysis) คือ การเกิดวงใสรอบโคโลนี และการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบางส่วน (α -hemolysis) อาจไม่ได้เกิดจาก Virulence factors หรือสารพิษที่ยีสต์ผลิตขึ้น แต่อาจเกี่ยวข้องกับยีสต์ผลิตสารชีวโมเลกุลบางชนิดที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกได้ เช่น สารลดแรงตึงผิวและแอลกอฮอล์ เป็นต้น (Shirron et al., 2008) การทดสอบด้วยเทคนิคนี้จึงเป็นการทดสอบเบื้องต้นที่ทำได้ง่ายและบ่งชี้คุณสมบัติด้านความปลอดภัยได้อย่างชัดเจน

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำถือเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของโพรไบโอติก คณะผู้วิจัยได้ใช้คุณสมบัตินี้ร่วมกับการประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นในการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่เป็นโพรไบโอติกที่ดีเพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ยีสต์ BUU 01 BUU 02 BUU 03 BUU 04 และ BUU 05 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสกุล *Vibrio* ทุกชนิด

ได้แก่ *V. harveyi* *V. vulnificus* *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* สอดคล้องกับการศึกษาของ Digutä et al. (2023) ที่รายงานว่า *S. cerevisiae* BB06 เป็นยีสต์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งกว้าง โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรค ได้แก่ *Bacillus cereus* *Enterococcus faecalis* *Listeria ivanovii* *Listeria monocytogenes* Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* และ Methicillin resistant *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Proteus vulgaris* นอกจากนี้ Fadahunsi & Olubodun (2021) ยังพบว่า ยีสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก คือ *Metschnikowia pulcherrima* และ *S. cerevisiae* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทางอาหารได้หลายชนิด ได้แก่ *Campylobacter jejuni* *Vibrio cholerae* *L. monocytogenes* และ *Salmonella* การยับยั้งเชื้อก่อโรคของยีสต์ทั้ง 5 ไส้เหลท อาจเกิดจากการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ เช่น สารปฏิชีวนะ สาร Volatile organic compounds Hydrolytic enzymes Siderophores Glycolipids และ Killer toxins เป็นต้น (Arrarte et al., 2021; Hatoum, Labrie & Fliss, 2012) การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีสต์ทั้ง 5 ไส้เหลท มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย เช่น *V. harveyi* *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสง โรคจุดดำหรือโรคเสี้ยนดำ และโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน ตามลำดับ (ชนกันต์, 2559; Kumar et al., 2021) ซึ่งควรมีการศึกษาความสามารถในการต้านทานโรคในกุ้งทะเลต่อไปในอนาคตเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของยีสต์เหล่านี้ในการป้องกันโรคติดเชื้อ

2. ผลของอุณหภูมิ ความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญของยีสต์

การเป็นโปรไบโอติกที่ดีเชื้อจุลินทรีย์ต้องมีชีวิตและสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างและความเค็มกว้าง กุ้งทะเลเป็นสัตว์เลือดเย็นที่อุณหภูมิของร่างกายขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำที่กุ้งอาศัยอยู่ ดังนั้นอุณหภูมิของน้ำจึงมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของโปรไบโอติก การศึกษาครั้งนี้ยีสต์ทุกไส้เหลทเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25–37°C และไม่เจริญที่อุณหภูมิ 10°C และ 55°C โดย Hossain et al. (2020) รายงานว่ายีสต์โปรไบโอติกที่มีชื่อว่า *Saccharomyces boulardii* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 50°C ความเค็มเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของโปรไบโอติกเมื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ไม่ว่าจะเป็นการใช้ผสมลงในอาหารหรือการเติมลงไปในน้ำโดยตรง การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีสต์เหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลความเค็มต่ำและความเค็มสูงได้ โดย Hossain et al. (2020) รายงานว่า ยีสต์โปรไบโอติกหลายสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือสูงถึง 8% (w/v) และ *D. hansenii* เป็นยีสต์ที่ทนต่อเกลือความเข้มข้นสูงได้ดี (Barnett, Payne & Yarrow, 2000) ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของโปรไบโอติก ตามปกติแล้วค่าความเป็นกรด-ด่างของการ

เพาะเลี้ยงกึ่งทะเลทรายฝั่งมักมีค่าเป็นด่างอยู่ในช่วง 7.50–8.50 ขณะที่ทางเดินอาหารของกึ่งทะเลมีสภาพเป็นกรดเล็กน้อย โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 5–7 (Dall et al., 1990) โดยยีสต์สายพันธุ์ BUU 02 เป็นยีสต์ที่เจริญในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างกว้างที่สุด คือ อยู่ในช่วง 2–8 และยีสต์ทุกไอโซเลทในการศึกษาครั้งนี้เจริญได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4

3. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ยีสต์ BUU 01 BUU 03 BUU 04 และ BUU 05 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้อย่างรวดเร็ว Hernandez et al. (2007) รายงานว่า *S. cerevisiae* *D. hansenii* *R. minuta* และ *R. glutinis* เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ยีสต์ที่มีคุณสมบัตินี้สามารถป้องกันการเกิดสารประกอบเปอร์ออกไซด์และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัว ส่งผลให้ยีสต์สายพันธุ์ BUU 01 BUU 03 BUU 04 และ BUU 05 มีศักยภาพนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารสัตว์น้ำ เช่น อาหารกุ้ง เพื่อป้องกันการเหม็นหืนได้

4. กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปสของยีสต์

เอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร เช่น อะไมเลส ไลเปส และโปรติเอส มีบทบาทสำคัญในการเสริมสร้างกระบวนการย่อยและดูดซึมสารอาหาร การเจริญเติบโต การลอกคราบ และความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของกึ่งทะเล การศึกษาหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าการเสริมโพรไบโอติกช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมสารอาหารดีขึ้น รวมถึงเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหารของกึ่งทะเล (Ceseña et al., 2021) เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารสัตว์น้ำทำให้สัตว์น้ำสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนเอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างซับซ้อน (Complex carbohydrate) เช่น แป้ง ให้มีโครงสร้างที่มีขนาดเล็กลง เช่น ซูโครส มอลโทส รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน (Simple carbohydrate) และน้ำตาลที่มีกลูโคสเป็นหน่วยย่อยในสายพอลิเมอร์ และไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งมีบทบาทในการย่อยไขมันที่เรียกว่าไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) ให้มีขนาดเล็กลง คือ กลีเซอรอลและกรดไขมัน การศึกษาครั้งนี้พบว่า BUU 04 มีกิจกรรมอะไมเลสและไลเปสสูงที่สุด ส่วน BUU 02 และ BUU 03 มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงใกล้เคียงกัน การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ยีสต์สกุล *Saccharomyces* *Candida* *Kluyveromyces* *Debaryomyces* *Aureobasidium* *Yarrowia* และ *Rhodotorula* หลายชนิด เช่น *D. hansenii* *A. pullulans* *S. cerevisiae* *R. graminis* *K. marxianus* *Y. lipolytica* และ *R. mucilaginosa* เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปสและอะไมเลส (Ceseña et al., 2021) การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่ายีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญใน

กระบวนการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ดังนั้นยีสต์เหล่านี้จึงน่าจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งทะเลได้โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ไลเปสและอะไมเลส

5. การจัดจำแนกชนิดยีสต์และยีสต์โพรไบโอติก

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ *Debaryomyces* sp. BUU 01 *Rhodotorula* sp. BUU 02 *Saccharomyces* sp. BUU 03 *Aureobasidium* sp. BUU 04 และ *Saccharomyces* sp. BUU 05 ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสกุล *Vibrio* ได้ทั้ง 4 ชนิด สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส อะไมเลส ไลเปส และโปรติเอส และเจริญได้ในสภาพแวดล้อมกว้าง อย่างไรก็ตามยีสต์กลุ่มนี้ถูกจัดจำแนกเบื้องต้นโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี ทั้งนี้ควรดำเนินการยืนยันด้วยเทคนิคที่ทันสมัยและมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น เช่น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่อไป

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจำเป็นต้องอาศัยเทคโนโลยีและกระบวนการที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตและสร้างความยั่งยืน จุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นหนึ่งในเครื่องมือที่มีศักยภาพในการปรับปรุงคุณภาพและปริมาณผลผลิตกุ้งทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต เพิ่มการย่อยอาหารและการดูดซึมสารอาหาร การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและเสริมความต้านทานโรค การศึกษาลักษณะเฉพาะของยีสต์และศักยภาพของยีสต์ในการใช้เป็นสารเติมแต่งเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตและสุขภาพของกุ้งทะเลมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ปัจจุบันยีสต์หลายชนิดถูกนำมาใช้ในงานด้านเทคโนโลยีการเกษตร ยกตัวอย่างเช่น *D. hansenii* มักนำมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol agent) เพื่อยับยั้งการเจริญและลดการเกิดโรคจากเชื้อก่อโรค รวมทั้ง *Rhodotorula* sp. ซึ่งเป็นยีสต์ที่ผลิตตรงควัดกลูสสังจำพวกเบต้า-คาโรทีนอยด์ที่สามารถนำไปเพิ่มเม็ดสีให้กับสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนได้ เป็นต้น (Arrarte et al., 2021; Ceseña et al., 2021)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท มีความปลอดภัยและไม่ก่อปัญหาด้านสุขภาพต่อเจ้าบ้าน เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งสกุล *Vibrio* 4 ชนิด ได้แก่ *V. harveyi* *V. vulnificus* *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* โดยจัดจำแนกได้เป็น *Debaryomyces* sp. BUU 01 *Rhodotorula* sp. BUU 02 *Saccharomyces* sp. BUU 03 *Aureobasidium* sp. BUU 04 และ *Saccharomyces* sp. BUU 05 เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกอื่น พบว่า *Debaryomyces* sp. BUU 01 *Rhodotorula* sp. BUU 02 และ *Saccharomyces* sp. BUU 05 มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีบางประการในระดับหลอดทดลอง เนื่องจากเป็นยีสต์ที่เจริญอย่างรวดเร็ว สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณเกลือกว้าง รวมทั้ง

ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสได้ดี ดังนั้นยีสต์ทั้ง 3 ชนิดนี้จึงน่าจะมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ *Rhodotorula* spp. BUU 02 ยังเป็นยีสต์ที่น่าสนใจนำมาเสริมลงในอาหารเพื่อเพิ่มเม็ดเงินให้กับกุ้งทะเล เนื่องจากเป็นยีสต์ที่ผลิตเบต้า-คาร์โรทีนออกได้ปริมาณมาก การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาขั้นต้นเกี่ยวกับความปลอดภัย คุณสมบัติของโปรไบโอติกบางประการและการจัดจำแนกยีสต์ การวิจัยในอนาคตควรศึกษาเชิงลึกถึงการนำยีสต์กลุ่มนี้ใช้เป็นโปรไบโอติก เช่น เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ควบคู่กับการใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น อนุชีววิทยา โปรตีโอมิกส์และไมโครไบโอมในทางเดินอาหาร ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์กับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบนิเวศทางเดินอาหารและปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งทะเลชัดเจนยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้แต่งขอขอบคุณภาควิชาวาริชศาสตร์และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับการสนับสนุนอุปกรณ์และสิ่งอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. (2567). **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2566**. กรุงเทพฯ: กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง, กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ชนกันต์ จิตมนัส. (2559). **โรคสัตว์น้ำ**. (พิมพ์ครั้งที่ 4). เชียงใหม่: คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- Agboola, J.O., Øverland, M., Skrede, A., & Hansen, J.Ø. (2021). Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. **Reviews in Aquaculture**, **13**, 949–970.
- Arrarte, E., Garmendia, G., Wisniewski, M., & Vero, S. (2021). Biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* against blue mold on apple and pear during cold storage. **Agrociencia Uruguay**, **25**(NE2), e839.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., & Yarrow, D. (2000). **Yeast: characteristics and identification**. (3rd edition). Cambridge: Cambridge University Press.
- Bernfeld, P. (1955). Amylase [alpha] and [beta]. In S.P. Kolowick, & N.O. Kaplan (Eds.), **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press.
- Campbell, I., & Duffus, J.H. (1991). **Yeast: a practical approach**. Oxford: IRL Press.
- Ceseña, C.E., Vega-Villasante, F., Aguirre-Guzman, A., Luna-González, A., & Campa-Córdova, A.I. (2021). Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: a minireview. **International Aquatic Research**, **13**, 1–16.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C., & Staples, D.J. (1990). The biology of Penaeidae. In J.H.S. Blaxter & A.J. Southward (Eds.), **Advances in Marine Biology**. London: Academic Press.

- Diguță, C.F., Mihai, C., Toma, R.C., Cîmpeanu, C., & Matei, F. (2023). *In vitro* assessment of yeasts strains with probiotic attributes for aquaculture use. **Foods**, **12**, 124.
- Fadahunsi, I.F., & Olubodun, S. (2021). Antagonistic pattern of yeast species against some selected food-borne pathogens. **Bulletin of the National Research Centre**, **45**, 34.
- Gilbert, E.J., Drodzd, J.W., & Jones, C.W. (1991). Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. **Journal of General Microbiology**, **137**, 2215–2221.
- Hatoun, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. **Frontiers in Microbiology**, **3**, 421.
- Hernandez, A., Martin, A., Aranda, E., Perez–Nevado, F., & Cordoba, M.G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. **Food Microbiology**, **24**, 346–351.
- Hossain, M.N., Afrin, S., Humayun, S., Ahmed, M.M., & Saha, B.K. (2020). Identification and growth characterization of a novel strain of *Saccharomyces boulardii* isolated from soya paste. **Frontiers in Nutrition**, **7**, 27.
- Islam, S.M.M., Rohani, M.F., & Shahjahan, M. (2021). Probiotic yeast enhances growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through morphological modifications of intestine. **Aquaculture Reports**, **21**, 100800.
- Jahan, N., Islam, S.M.M., Rohani, M.F., Hossain, M.T., & Shahjahan, M. (2021). Probiotic yeast enhances growth performance of rohu (*Labeo rohita*) through upgrading hematology, and intestinal microbiota and morphology. **Aquaculture**, **545**, 737243.
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B.K., Bossier, P., & Das, B.K. (2021). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. **Toxins**, **13**, 524.
- Li, T., Teng, D., Mao, R., Hao, Y., Wang, X., & Wang, J.A. (2020). A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Food Research International**, **136**, 109571.
- Nielsen, M.K., & Arneborg, N. (2007). The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. **Food Microbiology**, **24**, 101–105.
- Nimrat, S., Khaopong, W., Sangsong, J., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2020). Improvement of growth performance, water quality and disease resistance against *Vibrio harveyi* of postlarval whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by administration of mixed microencapsulated *Bacillus* probiotics. **Aquaculture Nutrition**, **26**, 1407–1418.
- Nimrat, S., Khaopong, W., Sangsong, J., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2021). Dietary administration of *Bacillus* and yeast probiotics improves the growth, survival, and microbial community of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Applied Aquaculture**, **33**, 15–31.
- Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., & Teixeira, M.C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic? **Journal of Fungi**, **6**, 78.

- Pooramini, M., Kamali, A., Hajimoradloo, A., Alizadeh, M., & Ghorbani, R. (2009). Effect of using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as probiotic on growth parameters, survival and carcass quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry. **International Aquatic Research**, **1**, 39–44.
- Shen, Y., Bai, X., Zhang, Y., Gao, Q., Bu, X., Xu, Y., & Guo, N. (2022). Evaluation of the potential probiotic yeast characteristics with anti-MRSA abilities. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, **14**, 727–740.
- Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Griffiths, D., Trong, T.Q., Vu, N.T., Jiravanichpaisal, P., & Briggs, M. (2018). Asian shrimp production and the economic costs of disease. **Asian Fisheries Science**, **31S**, 29–58.
- Shirron, N., Korem, M., Shuster, A., Leikin-Frenkel, A., & Rosenberg, M. (2008). Effect of alcohol on bacterial hemolysis. **Current Microbiology**, **57**, 318.
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts—Characteristics and food application. **Foods**, **10**, 1306.
- Vaseeharan, B., & Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**, **36**, 83–87.
- Walter, H.E. (1984). **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim: Verlag Chemie.
- Ziarati, M., Zorriehzohra, M.J., Hassantabar, F., Mehrabi, Z., Dhawan, M., Sharun, K., Emran, T.B., Dhama, K., Chaicumpa, W., & Shamsi, S. (2022). Zoonotic diseases of fish and their prevention and control. **Veterinary Quarterly**, **42**(1), 95–118.