RECEIVED
28/11/51

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิทยานิพนธ์เรื่อง ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง
(รหัสโครงการ BRT T_151006)

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2550 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2551

ชื่อหัวหน้าโครงการ ศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง

ชื่อนักศึกษา นางสาวสมจิต อ่ำอินทร์

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำนำ

การสำรวจความหลากหลายของยีสต์ในแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ เช่น ดิน ดอกไม้ ใบไม้ ขุยแมลง ยางไม้ เปลือกไม้ แหล่งน้ำจืด ป่าชายเลน และในทะเลนั้น นอกจากจะมีประโยชน์ในแง่ที่ทำให้รู้ถึงชนิดของยีสต์ซึ่งเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยแล้ว ยังมีประโยชน์อื่นอีกหลายประการ เช่น ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญ และมีศักยภาพสูงในทางอุตสาหกรรม บางชนิดมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหาร และพลังงานทำให้ระบบนิเวศป่าไม้ (forest ecosystem) ระบบนิเวศเกษตร (agricultural ecosystem) และระบบนิเวศประมง (fishery ecosystem) ยังคงสภาพเดิม การศึกษาและค้นพบยีสต์ที่อยู่ในสภาวะวิกฤต เช่น อุณหภูมิสูง ความเค็มสูง และพีเอชต่ำ จะช่วยอธิบายการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น และอาจนำไปสู่แนวทางที่จะลดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในบริเวณนั้น นอกจากนี้การศึกษายีสต์ในแหล่งต่างๆ อาจมีการค้นพบยีสต์ชนิดใหม่ที่เป็นประโยชน์ในอนาคต (Boekhout and Kurtzman, 1996)

การสำรวจความหลากหลายของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้ (culturable yeasts) ทำได้โดยการแยกและการจัดจำแนกยีสต์ สำหรับวิธีการจัดจำแนกยีสต์นั้นอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (conventional taxonomy) ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) สรีรวิทยา (physiology) และชีวเคมี (biochemistry) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว (described species) หรือ สปีชีส์ที่รู้จักแล้ว (known species) นั้นเป็นวิธีที่มีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลา ความถูกต้องแม่นยำ และความน่าเชื่อถือของผลที่ได้จากการทดสอบ บางครั้งการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของยีสต์ที่คล้ายคลึงกันได้ จึงเกิดปัญหาในการจัดจำแนกยีสต์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ทำให้เทคนิคระดับโมเลกุลเข้ามามีบทบาทสำคัญ ประกอบกับปัจจุบันมีเทคนิคที่สามารถ

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง หรือ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ช่วยในการศึกษาระดับโมเลกุล ทำให้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการนำมาจัดจำแนกยีสต์ เนื่องจากใช้เวลาน้อยกว่าวิธีการจัดจำแนกแบบดั้งเดิมมาก และให้ผลถูกต้องแม่นยำ โดยนิยมศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ที่มีขนาดประมาณ 500-600 นิวคลีโอไทด์ และอยู่ทางด้านปลาย 5' ของ 26S rDNA เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็วจึงเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีฐานข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์มาก ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้สามารถจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์ได้อย่างแม่นยำ (Kurtzman and Robnett, 1998)

สำหรับการศึกษายีสต์ในป่าชายเลนซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทั้งในด้านป่าไม้ ประมง และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นกลุ่มของสังคมพืช และสัตว์ซึ่งขึ้นอยู่ในเขตน้ำลงต่ำสุดและน้ำขึ้นสูงสุดบริเวณชายฝั่งทะเล ป่าชายเลนเป็นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ ระบบนิเวศวิทยาที่เกิดขึ้นในป่าชายเลนนั้นเป็นความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตกับสิ่งแวดล้อม ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่พบในป่าชายเลน โดยยีสต์และรามีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนธาตุอาหารในป่าชายเลน และเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำและแพลงก์ตอน (Nagahama, 2005) สำหรับประเทศไทยการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนยังมีน้อย โดยก่อนหน้านี้มีการศึกษายีสต์จากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนในจังหวัดพังงาของประเทศไทย พบว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยพบสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว คือ *Candida conglobata*, *Candida* cf. *glabrata, Candida membranifaciens*, *Candida parapsilosis*, *Candida picinguabensis*, *Candida tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia caribbica*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia fabianii* และ *Rhodotorula mucilaginosa* และพบเชื้อราที่คล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) คือ *Aureobasidium pullulans* (Limtong *et al.*, 2008) นอกจากนั้นยังพบยีสต์สปีชีส์ใหม่และได้รายงานแล้ว คือ *Candida thaimueangensis* sp. nov. (Limtong *et al.*, 2007) และ *Candida phangngensis* sp. nov. (Limtong *et al.*, 2008) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในบริเวณอื่น คือ ป่าชายเลนในบริเวณสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง ซึ่งตั้งอยู่บนเส้นรุ้งที่ 9^0 13' ถึง 9^0 32' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 16' ถึง 98^0 27' ตะวันออก ที่ตำบลกำพวน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง โดยการแยกยีสต์และนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ผลการสำรวจ

ทำให้ทราบถึงความหลากหลายของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณนี้ นอกจากนั้นยีสต์ที่แยกได้จัดว่าเป็นทรัพยากรที่มีความสำคัญสามารถเก็บและนำไปใช้ประโยชน์ในโอกาสต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง โดยการแยกยีสต์และจัดจำแนกโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy) ด้วยการปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (เนื่องจากการเสนอขอโครงการนี้ ทำเมื่อแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำเรียบร้อยแล้ว ดังนั้นจึงขอเริ่มงานภายใต้โครงการนี้ตั้งแต่การจัดจำแนกยีสต์)

2. ศึกษาลักษณะต่างๆ ตามอนุกรมวิธานโพลีฟาซิก (polyphasic taxonomy) ประกอบด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomy) รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เพื่ออธิบายพร้อมทั้งเสนอตั้งชื่อ (nomenclature) เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

วิธีการวิจัย

1. <u>ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา</u>

ยีสต์จำนวน 75 สายพันธุ์ ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง (ตารางที่ 1) โดยใช้เทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน (membrane filtration technique) โดยกรองน้ำปริมาตร 50 และ 100 มิลลิลิตร ผ่านแผ่นเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.45 จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาวางบนอาหาร acidified yeast extract malt extract (acidified YM) agar ที่เติมโซเดียมโพรพิโอเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอช 3.7-3.8 ด้วยกรดเกลือ 1 นอร์มอล บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนปรากฏโคโลนี นับจำนวนโคโลนียีสต์ที่ขึ้นบนแผ่นกรอง จากนั้นเก็บโคโลนียีสต์ที่มีสัณฐานวิทยาของโคโลนี

ที่แตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการครอสสตรีก (cross streak) บนอาหาร yeast extract malt extract (YM) agar

2. <u>การเก็บรักษายีสต์</u>

นำยีสต์ที่แยกได้มาทำการเก็บรักษาโดยตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการครอสสตรีกบนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บยีสต์บริสุทธิ์ใส่ในอาหาร YM broth ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมทั้งจัดทำรายละเอียดของการเก็บรักษา

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รหัสสายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง	พิกัด
RS1	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS2	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS3	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS5	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS6	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS7	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS8	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS9	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS10	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS11	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS12	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS13	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS14	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 53.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 26.7 ตะวันออก
RS16	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS17	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง	พิกัด
RS18	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS19	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS20	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS21	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS22	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS23	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS24	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS25	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS26	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS27	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS28	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS29	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS30	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS31	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS32	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 21' ถึง 9^0 48.8' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 19.6' ตะวันออก
RS34	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 14.9' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 38.2' ตะวันออก
RS35	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 14.9' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 38.2' ตะวันออก
RS36	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 14.9' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 38.2' ตะวันออก
RS39	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 14.9' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 38.2' ตะวันออก
RS41	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 14.9' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 38.2' ตะวันออก
RS42	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 14.9' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 38.2' ตะวันออก
RS43	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 14.9' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 38.2' ตะวันออก
RS47	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS48	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS49	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS50	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง	พิกัด
RS52	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS53	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS54	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS55	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS56	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS57	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS58	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS60	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS61	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 50.1' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24' ถึง 98^0 8.1' ตะวันออก
RS62	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS63	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS64	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS65	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS66	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS68	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS70	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS71	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS74	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS75	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
RS76	9 พ.ค. 49	เส้นรุ้งที่ 9^0 22' ถึง 9^0 12.6' เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23' ถึง 98^0 59.9' ตะวันออก
R1-1	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-2	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-3	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-4	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-5	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-6	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง	พิกัด
R1-7	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-8	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-9	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-10	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-11	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-20	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-21	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก
R1-22	29 ม.ค. 48	เส้นรุ้งที่ 9^0 เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 ตะวันออก

3. <u>การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ</u>

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lachance *et al.* (1999) โดยนำยีสต์ที่เพาะบนอาหาร YM agar อายุ 24-48 ชั่วโมง มาเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยในน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเซลล์ยีสต์แขวนลอยใส่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 15 นาที และนำกลับไปแช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยง (LABNET, USA) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายเหนือตะกอน (supernatant) ใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kurtzman และ Robnett (1998) โดยใช้ NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') เป็น forward primer และ NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') เป็น reverse primer

เตรียม PCR reaction mixture ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต *Taq* polymerase (Fermentas, USA) ที่มีองค์ประกอบ ดังนี้

PCR buffer (10X)	3	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25 mM)	2.4	ไมโครลิตร
dNTP mix (2.5 mM)	2.4	ไมโครลิตร
Primer NL1 (10 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Primer NL4 (10 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Taq polymerase (Fermentas; 5U/μl)	0.15	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร
Reverse osmosis sterile	17.25	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	30	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้จากการเตรียมข้างต้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ในเครื่อง PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) ที่ตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

1. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที (pre-denaturation)
2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที (denaturation)
3. อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที (annealing)
4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที (extension)
5. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที (final extension)

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ เมื่อสิ้นสุดการทำงาน เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ PCR product โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส และมี 100 bp DNA Ladder

(Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) นำเจลไปย้อมด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ (ethidium bromide) และส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตโดยเครื่อง UV transilluminator (Ultra-Lum Inc., Canada) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิตดังนี้ นำ PCR product ผสมกับ PB buffer (ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product) ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายลงใน QIAquick spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติม PE buffer ลงไปใน QIAquick spin column 0.75 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นเหวี่ยง QIAquick spin column อีกครั้งที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำส่วนของคอลัมน์วางลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างดีเอ็นเอที่ติดอยู่ในคอลัมน์ด้วยน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นตรวจสอบความเข้มของ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kit โดยนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยมี 100 bp DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย

3.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA

นำ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 2.2 มาทำ cycle sequencing โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) ไพรเมอร์ NL1 เป็น forward primer และ NL4 เป็น reverse primer โดยส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

Sequencing buffer (5X)	1	ไมโครลิตร
BigDye (2.5X)	2	ไมโครลิตร
Primer (1.6 pmol)	1	ไมโครลิตร
Reverse osmosis sterile	4	ไมโครลิตร
DNA template (5-20 ng)	2	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วงที่บริษัทผู้ผลิต BigDye แนะนำ)		
ปริมาตรทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

นำหลอด PCR ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาใส่ในเครื่อง PCR และตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

1. อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 30 วินาที (pre-denaturation)
2. อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที (denaturation)
3. อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 5 วินาที (annealing)
4. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที (extension)
5. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที (final extension)

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 25 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ cycle sequencing (sequencing product) มาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยผสม sequencing product กับสารละลายเอทานอล/โซเดียมอะซิเตท (เอทานอลบริสุทธิ์ 95 มิลลิลิตร 3M โซเดียมอะซิเตท (pH 4.6) 4 มิลลิลิตร และน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อแยกตะกอนดีเอ็นเอ ดูดสารละลายออกจากหลอดอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกมาด้วย จากนั้นเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายออกอย่างระมัดระวัง และทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยใช้เครื่อง Thermolyne (Barnstead, USA) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอัตโนมัติ

3.4 การจัดจำแนกยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) โดยใช้ BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide) homology search program (Altschul *et al.*, 1997) โดยมีเกณฑ์ว่าถ้า 2 สายพันธุ์มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (คือมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์) สายพันธุ์ทั้งสองนั้นจัดจำแนกได้เป็นคนละสปีชีส์ และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก (Kurtzman and Robnett, 1998)

3.5 การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

ทำโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดโดยใช้ multiple alignment program CLUSTAL X ver. 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) ส่วนต้นไม้วิวัฒนาการสร้างจากข้อมูลความแตกต่างทางวิวัฒนาการตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985)

4. <u>การศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี</u>

นำยีสต์ที่พบว่าเป็นสปีชีส์ใหม่เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA มาศึกษาลักษณะต่างๆ ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมซึ่งประกอบด้วย การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมี ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาตามวิธีของ Yarrow (1998) ในหนังสือ The Yeast: A Taxonomic Study, 4th edition ซึ่งได้แก่ สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ และการสร้างแอสโคสปอร์

4.1.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวทำโดยการเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหาร YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ตรวจสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูปร่าง กลไกการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ การจัดเรียงตัวของเซลล์ (เดี่ยว, คู่ หรืออยู่เป็นกลุ่มใหญ่) ขนาดของเซลล์ รวมทั้งสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อ (culture characteristic) ในอาหารเหลว เช่น เชื้อลอยเป็นฝ้าที่ผิวหน้า (pellicle) หรือจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอน (flocculent) หรือเป็นเมือกตกตะกอน (mucoid sediment) หรือเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด (ring) หรือเกาะกันเป็นก้อนเหนียว (coherent) หรือเกาะกันแน่นแข็ง (compact)

4.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

เพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง บนอาหาร YM agar และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 1-7 วัน ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของยีสต์บนอาหาร YM agar โดยดูสี เนื้อ ผิวหน้า ความนูน และขอบของโคโลนี

4.1.3 การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ตรวจสอบโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar (ภาคผนวก) หรือ potato dextrose agar (ภาคผนวก) ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) โดยนำสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อจุ่มลงไปในอาหารแข็งที่หลอมเหลวในจานเพาะเชื้อทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำสไลด์ที่อาหารแข็งตัวแล้วไปวางบนแท่งแก้วรูปตัวยูในจานเพาะเชื้อเพาะเชื้อบางๆ โดยการสตรีก (streak) บนอาหารแข็ง 1-2 เส้น ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ทำให้ปราศ จากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ เติมน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่วางสไลด์เพื่อให้ความชื้นป้องกันวุ้นบนสไลด์แห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.1.4 การสร้างแอสโคสปอร์

เพาะยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วันจากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ เช่น YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างแอสโคสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากบ่มเป็นเวลา 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยรายงานรูปร่าง สี และจำนวนของแอสโคสปอร์ ตลอดจนรูปร่าง สี และความคงทนของแอสคัส

4.2 ลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์และใช้ประจำในการจัดจำแนกยีสต์ ดังนี้

4.2.1 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนเป็นการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญแบบใช้ออกซิเจน เป็นการทดสอบที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ การแอสซิมิเลตสารประกอบบางชนิด เช่น กรดดี-กลูโคโรนิก ดี-ไซโลส และอินออซิทอลสามารถใช้เพื่อแยกสกุลของยีสต์ได้ การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลวทำตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยใช้สารประกอบคาร์บอนจำนวน 39 ชนิด ดังนี้

เฮกโซส	ดี-กลูโคส กาแลกโทส และซอร์โบส
ไดแซคคาไรด์	เซลโลไบโอส แลกโทส มอลโทส เมลลิไบโอส ซูโครส และทรีฮาโลส
ไตรแซคคาไรด์	เมลลิซิโทส และราฟฟีโนส
โพลีแซคคาไรด์	อินูลิน และแป้ง
เพนโทส	ดี-อะราบิโนส แอล-อะราบิโนส ดี-ไรโบส แอล-แรมโนส และดี-ไซโลส
แอลกอฮอล์	กาแลกทิทอล อิริทริทอล ดี-กลูซิทอล อินออซิทอล ดี-แมนนิทอล กลีเซอรอล ไรบิทอล เอทานอล และเมทานอล
กรดอินทรีย์	กรดซิตริก กรดแลคติก กรดซักซินิก กรดดี-กลูโคโรนิก กรดกาแลกตุโรนิก และกรดดี-กลูโคนิก
ไกลโคไซด์	แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์ และซาลิซิน
สารประกอบอื่น	เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต และ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต

สำหรับวิธีการที่ใช้ทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลว ทำโดยเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย โดยใช้ลูปถ่ายเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ลงไปในน้ำรีเวอร์ส ออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยการใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นเป็นแถบสีดำพร่า (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่อ

อ่านผลการเจริญ) จากนั้นเพาะเชื้อโดยใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน จำนวน 1 หยด ในการทดสอบใช้อาหารที่ไม่เติมสารประกอบคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (negative control) และใช้อาหารที่เติมกลูโคสเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก (positive control) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ โดยตรวจวัดระดับการเจริญซึ่งทำโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย ทาบหลอดลงด้านหน้าเส้น มองผ่านหลอดเลี้ยงเชื้อแล้วสังเกตเส้นสีดำ ดังนี้ +++ คือ การเจริญของเชื้อที่มีความขุ่นซึ่งจะลบเส้นสีดำอย่างสมบูรณ์, ++ เห็นเส้นพร่า, + เห็นเส้นแต่ขอบเห็นไม่ชัด และ – คือ เห็นเส้นและขอบชัดเจน จากนั้นทำการรายงานผลดังรายละเอียดต่อไปนี้

+	=	การเจริญเป็นบวก (positive) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ในสัปดาห์ที่ 1หรือสัปดาห์ที่ 2
l	=	การเจริญเป็นบวกล่าช้า (delayed positive, latent) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ อย่างรวดเร็ว แต่หลังจาก 2 สัปดาห์ หรือ นานกว่า
s	=	การเจริญเป็นบวกช้า (slow positive) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ช้าๆ ในระยะเวลาที่นานกว่า 2 สัปดาห์
w	=	การเจริญเป็นบวกอ่อน (weak positive) คืออ่านผลเป็น +
-	=	ไม่มีการเจริญ อ่านผลเป็นลบ
(+)	=	นานๆ ครั้งที่ผลเป็นบวก (seldom positive)
v	=	ผันแปร (variable) คือบางสายพันธุ์เป็นบวก และบางสายพันธุ์เป็นลบ
+/w	=	บวก หรือ บวกอ่อน คือทุกสายพันธุ์เจริญแต่บางสายพันธุ์เจริญน้อย
w/-	=	บวกอ่อน หรือ ลบ

4.2.2 การหมักคาร์โบไฮเดรต

การหมักหมายถึงการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งยีสต์มีความสามารถในการหมักน้ำตาลต่างๆ กัน โดยทั่วไปน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบความสามารถในการหมักของยีสต์ คือ ดี-กลูโคส ดี-กาแลกโทส มอลโทส ซูโครส ทรีฮาโลส แลกโทส ราฟฟิโนส และเมลลิไบโอส โดยทดสอบการหมักน้ำตาลตามวิธีของ Yarrow (1998)

วิธีทดสอบทำโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบการหมักน้ำตาล (fermentation basal medium) ใส่ลงในหลอดทดสอบซึ่งภายในบรรจุหลอดดักแก๊ส (Durham tube) หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย โดยใช้ลูปถ่ายเชื้ออายุ 24-48 ลงไปในน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยการใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นเป็นแถบสีดำพร่า (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่ออ่านผลการเจริญ) เพาะยีสต์โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบที่มีสารละลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ จำนวน 1 หยด บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจผลการหมักโดยสังเกตปริมาณแก๊สที่สะสมในหลอดดักแก๊ส และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทุกวันจนครบ 7 วัน จากนั้นตรวจสอบทุกสัปดาห์จนครบ 28 วัน ผลการหมักรายงานโดยอาศัยเวลาที่ใช้ในการสร้างแก๊สให้เต็มหลอดดักแก๊ส และปริมาณแก๊สที่สะสมไว้ในหลอดดักแก๊ส ดังนี้

+	=	มีการหมักรุนแรง (strong positive) คือมีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สภายใน 7 วัน
l	=	การหมักเกิดล่าช้า (delayed positive หรือ latent positive) คือมีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สอย่างรวดเร็ว แต่การหมักเกิดหลังจากบ่มนานกว่า 7 วัน
s	=	การหมักเกิดช้าๆ (slowly positive) คือมีแก๊สค่อยๆ เข้าไปจนเต็มหลอดดักแก๊ส หลังจากบ่มนานกว่า 7 วัน
+w	=	การหมักอ่อน (weak positive) คือมีแก๊สไม่เต็มหลอดดักแก๊ส (มีแก๊สน้อยกว่าหนึ่งในสามของหลอด ในขณะที่ถ้ามีแก๊สมากกว่าหนึ่งในสามของหลอดจัดว่าเป็นบวก)
-	=	ไม่มีการหมัก คือในหลอดดักแก๊สไม่มีแก๊ส
v	=	บางสายพันธุ์หมักน้ำตาลได้ บางสายพันธุ์ไม่หมัก

4.2.3 การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนศึกษาบนอาหารแข็งโดยใช้ starved inoculum ตามวิธีของ Nakase และ Suzuki (1986a) ยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ สารประกอบไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาการแอสซิมิเลตมี 6 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) โปแตสเซียมไนเตรต (nitrate) โซเดียมไนไตรต์ (nitrite) เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (ethylamine HCl) แอล-ไลซีน (L-lysine) และคาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverinedihydrochloride)

การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนในอาหารแข็งทำโดยเพาะยีสต์บนอาหาร YM agar เพื่อเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจำนวนน้อยๆ ลงในอาหาร Yeast Carbon Base (YCB) broth บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้ยีสต์ใช้ไนโตรเจนที่สะสมไว้ภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอย 1 หยด ลงบนจานอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในการทดสอบใช้อาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ และอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก ตรวจผลโดยสังเกตการเจริญของยีสต์ทุก 2-4 วัน จนครบ 28 วัน

4.2.4 การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) ภายนอกเซลล์

การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ทำตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยตรวจภายหลังการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน และสารประกอบไนโตรเจนเสร็จเรียบร้อย โดยหยด Lugol's solution ลงในหลอดทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และบนจานอาหารที่ทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีน้ำเงินแกมเขียวแสดงว่ามีการสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์

4.2.5 การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน

ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินตามวิธีของ Komagata และ Nakase (1967) โดยเพาะยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆ ลงในอาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7

วัน เพื่อให้ยีสต์ใช้วิตามินที่สะสมภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆ ลงในอาหารที่ปราศจากวิตามินหลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสังเกตการณ์เจริญของเชื้อ และรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

4.2.6 การสร้างกรดจากกลูโคส

การสร้างกรดจากกลูโคสทดสอบได้ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ใน Custer's chalk medium บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยดูการเกิดโซนใสบริเวณรอบๆ เชื้อ

4.2.7 ความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์

ทดสอบความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีแบกโต-ยีสต์ไนโตรเจนเบส และ ดี-กลูโคส ที่มีการเติมไซโคลเฮกซิไมด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ส่วนต่อล้านส่วน และ 1000 ส่วนต่อล้านส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสังเกตการเจริญของยีสต์และรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

4.2.8 การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

ตรวจสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงและเกลือความเข้มข้นสูงตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนอาหารแข็ง 4 ชนิด คือ อาหารแข็งที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของยีสต์บนอาหารแข็งทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

4.2.9 การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ทดสอบการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหาร YM broth และบ่มในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 20, 25, 37, 40, 42 และ

45 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วันโดยสังเกตการเจริญของยีสต์และรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

4.2.10 การไฮโดรไลซ์ยูเรีย

ทดสอบการไฮโดรไลซ์ยูเรียตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนอาหาร Christensen's urea agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน ถ้ามีการไฮโดรไลซ์ยูเรียพีเอชที่เพิ่มขึ้นจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นสีชมพูแดง ในการทดสอบใช้ยีสต์ในสกุล *Rhodotorula* เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก

4.2.11 การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี

ทดสอบการทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบีบนอาหารแข็งตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเลี้ยงยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด DBB reagent ลงที่ผิวหน้าโคโลนี ถ้าเกิดสีแดงเข้มจนถึงสีม่วงภายในเวลา 1-2 นาที ที่อุณหภูมิห้องแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

4.3 ลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานเคมี

การวิเคราะห์สารประกอบยูบิควิโนนทำตามวิธีของ Nakase และ Suzuki (1986b) โดยเพาะยีสต์ในอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) broth 400 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 16-30 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำเซลล์ไประเหิดแห้ง (freeze dried) นาน 4-5 วัน จากนั้นนำเซลล์มาบด และเติมคลอโรฟอร์ม /เมทานอล (อัตราส่วน 2 ต่อ 1) 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน กรองสารละลายผ่านแผ่นเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน และนำมาระเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง ละลายยูบิควิโนนด้วยอะซิโตน 0.5 มิลลิลิตร และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Thin layer chromatography (TLC) บนแผ่นซิลิกาเจล (F254TLC Merck, Germany) และใช้เฮกเซนกับ ไดเอทิลอีเทอร์ (อัตราส่วน 85 ต่อ 15) เป็น mobile phase ส่องแถบของยูบิควิโนนที่อยู่บนแผ่น TLC ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ขูดแถบของยูบิควิโนนที่ปรากฏบนแผ่น TLC ใส่หลอด และเติมอะซิโตน 1 มิลลิลิตร

ทิ้งไว้ข้ามคืน กรองสารละลายผ่านแผ่นเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน และเป่าด้วยแก๊ส ไนโตรเจนเพื่อให้ยูบิควิโนนเข้มข้นขึ้น วิเคราะห์ชนิดของยูบิควิโนนด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Waters, USA) โดยใช้คอลัมน์ Cosmosil 5C18 (Nacalai tesque, Japan) และใช้เมทานอลผสมกับไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 2 ต่อ 1) เป็น mobile phase ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ผลที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร จำแนกชนิดของยูบิควิโนนที่วิเคราะห์โดยเทียบกับยูบิควิโนนมาตรฐาน

ผลและวิจารณ์

1. การรวบรวมและการแยกยีสต์จากน้ำในป่าชายเลน

ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสนกิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง ซึ่งอยู่ประมาณเส้นรุ้งที่ 9^0 13′ ถึง 9^0 32′เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 16′ ถึง 98^0 27′ ตะวันออก โดยเก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมด 5 จุด (ตารางที่ 2) โดยจุดที่ 1 เป็นบริเวณน้ำจืด จุดที่ 2, 3, 4 และ 5 เป็นบริเวณน้ำกร่อยที่ได้รับอิทธิพลจากการขึ้นและลงของน้ำทะเล ทำให้ความเค็มของน้ำในแต่ละบริเวณแตกต่างกันออกไป

ตารางที่ 2 ตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จุดเก็บ	ตำแหน่งที่เก็บ	พิกัด
1	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ 9^0 22′ 14.9″ เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24′ 38.2″ ตะวันออก
2	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ 9^0 21′ 48.8″ เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24′ 19.6″ ตะวันออก
3	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ 9^0 21′ 53.6″ เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24′ 26.7″ ตะวันออก
4	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ 9^0 22′ 50.1″ เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 24′ 08.1″ ตะวันออก
5	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ 9^0 22′ 12.6″ เหนือ เส้นแวงที่ 98^0 23′ 59.9″ ตะวันออก

หมายเหตุ น้ำบน = ตัวอย่างน้ำที่เก็บบริเวณใต้ผิวน้ำเล็กน้อย
น้ำล่าง = ตัวอย่างน้ำที่เก็บที่ระดับความลึกจากผิวน้ำลงไป 1 เมตร

การรวบรวมและการแยกยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ

1.1 ยีสต์รหัส R1 จำนวน 14 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 และมีลักษณะของตัวอย่างน้ำดังนี้ อุณหภูมิ 27.5-29.7 องศาเซลเซียส พีเอช 7.7-8.2 ความเค็ม 34 ส่วนในพัน

ส่วน และมียีสต์จำนวน 20-125 เซลล์ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยเก็บรักษาอยู่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดย รศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง

1.2 ในปี พ.ศ. 2549 ขณะที่ทำวิทยานิพนธ์นี้ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากจุดเก็บตัวอย่าง 5 จุด พบว่ามีลักษณะของตัวอย่างน้ำดังนี้ อุณหภูมิ 27.3-29.3 องศาเซลเซียส พีเอช 6.9-7.5 ความเค็ม 0-21 ส่วนในพันส่วน และมียีสต์จำนวน 76-202 เซลล์ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 3) โดยแยกยีสต์ได้ 61 สายพันธุ์ จากตัวอย่างน้ำในจุดต่างๆ

ตารางที่ 3 การเก็บตัวอย่างน้ำ ลักษณะของตัวอย่าง จำนวนยีสต์ และยีสต์ที่แยกได้

วันที่เก็บตัวอย่าง	จุดเก็บ	ตำแหน่ง	อุณหภูมิ (^{0}C)	พีเอช	ความเค็ม (ppt)	จำนวนยีสต์ (เซลล์/100 มล.)	รหัสยีสต์ที่แยกได้
9 พ.ค. 49	1	น้ำบน	28.3	7.28	0	120	RS34, RS35, RS36,
		น้ำล่าง	28.1	7.15	0	100	RS39, RS41, RS42, RS43
9 พ.ค. 49	2	น้ำบน	27.4	6.86	14	178	RS16, RS17, RS18,
		น้ำล่าง	27.3	7.01	13	202	RS19, RS20, RS21,
							RS22, RS23, RS24,
							RS25, RS26, RS27,
							RS28, RS29, RS30,
							RS31, RS32
9 พ.ค. 49	3	น้ำบน	27.8	6.90	12	126	RS1, RS2, RS3, RS5,
		น้ำล่าง	28.0	6.88	12	146	RS6 RS7, RS8, RS9,
							RS10, RS11, RS12,
							RS13, RS14
9 พ.ค. 49	4	น้ำบน	29.3	7.47	19	146	RS47, RS48, RS49,
		น้ำล่าง	29.1	7.47	21	76	RS50, RS52, RS53,
							RS54, RS55, RS56,
							RS57, RS58, RS60, RS61
9 พ.ค. 49	5	น้ำบน	28.7	7.10	17	188	RS62, RS63, RS64,
		น้ำล่าง	28.5	7.11	18	122	RS65, RS66, RS68,
							RS70, RS71, RS74,
							RS75, RS76

ดังนั้นในการศึกษานี้มียีสต์ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 75 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ยีสต์รหัส R1 14 สายพันธุ์ และยีสต์รหัส RS 61 สายพันธุ์

2. การเก็บรักษายีสต์

เก็บรักษายีสต์ทั้งหมด 75 สายพันธุ์ โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รายละเอียดของข้อมูลการเก็บรักษาแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รายละเอียดของข้อมูลการเก็บรักษายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รหัสสายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่แยกยีสต์	วันที่เก็บรักษา	ตำแหน่งที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง
RS1	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/C7, C8
RS2	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/C9, C10
RS3	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/D1, D2
RS5	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/D5, D6
RS6	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/D7, D8
RS7	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/D9, D10
RS8	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/E1, E2
RS9	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7E3, E4
RS10	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/E5, E6
RS11	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/E7, E8
RS12	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/E9, E10
RS13	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/F1, F2
RS14	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/F3, F4
RS16	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/F7, F8
RS17	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/F9, F10
RS18	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/G1, G2
RS19	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/G3, G4

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่แยกยีสต์	วันที่เก็บรักษา	ตำแหน่งที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง
RS20	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/G5, G6
RS21	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/G7, G8
RS22	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/G9, G10
RS23	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/H1, H2
RS24	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/H3, H4
RS25	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/H5, H6
RS26	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/H7, H8
RS27	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/H9, H10
RS28	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/I1, I2
RS29	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/I3, I4
RS30	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/I5, I6
RS31	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/I7, I8
RS32	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/I9, I10
RS34	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/J3, J4
RS35	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7/J5, J6
RS36	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	7J7, J8
RS39	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/A3, A4
RS41	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/A7, A8
RS42	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/A9, A10
RS43	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/B1, B2
RS47	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/B7, B8
RS48	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/B9, B10
RS49	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/C1, C2
RS50	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/C3, C4
RS52	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/C7, C8
RS53	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/C9, C10

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่แยกยีสต์	วันที่เก็บรักษา	ตำแหน่งที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง
RS54	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/D1, D2
RS55	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/D3, D4
RS56	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/D5, D6
RS57	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/D7, D8
RS58	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/D9, D10
RS60	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/E3, E4
RS61	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/E5, E6
RS62	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/E7, E8
RS63	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/E9, E10
RS64	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/F1, F2
RS65	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/F3, F4
RS66	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/F5, F6
RS68	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/F9, F10
RS70	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/G3, G4
RS71	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/G5, G6
RS74	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/H1, H2
RS75	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/H3, H4
RS76	9 พ.ค. 49	16 พ.ค. 49	พ.ค. 49	8/H5, H6
R1-1	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/F9, F10
R1-2	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/G1, G2
R1-3	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/G3, G4
R1-4	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/G5, G6
R1-5	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/G7, G8
R1-6	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/G9, G10
R1-7	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/H1, H2
R1-8	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/H3, H4

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่แยกยีสต์	วันที่เก็บรักษา	ตำแหน่งที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง
R1-9	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/H5, H6
R1-10	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/H7, H8
R1-11	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/H9, H10
R1-20	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/J7, J8
R1-21	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	6/J9, J10
R1-22	29 ม.ค. 48	ก.พ. 48	มิ.ย. 49	7/A1, A2

3. <u>การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ</u>

นำยีสต์จำนวน 75 สายพันธุ์ ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนในบริเวณสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง มาจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้ BLASTN homology search program โดยมีเกณฑ์ว่า ถ้า 2 สายพันธุ์มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (คือมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์) สายพันธุ์ทั้งสองนั้นเป็นคนละสปีชีส์ และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก ผลการจัดจำแนกพบว่าสามารถจัดจำแนกยีสต์ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

3.1. สปีชีส์ที่รู้จักแล้วหรือมีการอธิบายแล้ว (known or described species) เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามเกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) จำนวน 44 สายพันธุ์ คิดเป็น 58.7 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยสปีชีส์ที่รู้จักแล้วหรือมีการอธิบายแล้วทั้งหมดจัดจำแนกได้เป็น 6 สกุล 17 สปีชีส์ (ตารางที่ 5) ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales แบ่งเป็นอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae 4 สกุล 9 สปีชีส์ วงศ์ Candidaceae 1 สกุล 7 สปีชีส์ และวงศ์ Dipodascaceae 1 สกุล 1 สปีชีส์ สำหรับรายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ที่รู้จักแล้วหรือมีการอธิบายแล้วแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ผลการจัดจำแนกยีสต์ที่รู้จักแล้วหรือมีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีสต์	สายพันธุ์	จำนวน
Saccharomycetaceae		
Debaryomyces		
Debaryomyces nepalensis	RS11	1
Issatchenkia		
Issatchenkia occidentalis	RS5, RS26, RS29	3
Issatchenkia orientalis	RS6, RS34, RS35, RS39, RS52, RS56, RS61, RS66	8
Issatchenkia siamensis	RS12	1
Issatchenkia terricola	RS30	1
Kodamaea		
Kodamaea ohmeri	RS25, RS43, RS48, RS49,	4
Pichia		
Pichia burtonii	RS36	1
Pichia galeiformis	RS3	1
Pichia kluyveri	RS19, RS21, RS47, RS75	4
Candidaceae		
Candida		
Candida butyri	RS55	1
Candida parapsilosis	RS32	1
Candida picinguabensis	R1-7, R1-9, R1-10	3
Candida rugosa	R1-5, R1-21	2
Candida silvae	RS1, RS57	2
Candida thaimueangensis	R1-3, R1-8, R1-11	3
Candida tropicalis	R1-6, R1-20, RS13, RS22, RS31, RS60, RS64	7
Dipodascaceae		
Galactomyces		
Galactomyces geotrichum	RS74	1

ตารางที่ 6 การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ที่รู้จักแล้วหรือมีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RS55	*Candida butyri* CBS 6421 (U45780)	531/531	100	0	0	0	*Candida butyri*
RS32	*Candida parapsilosis* CBS 2617 (U45754)	565/570	99.1	5	0.9	0	*Candida parapsilosis*
R1-7	*Candida picinguabensis* UNESP 00-89 (AY566407)	439/439	100	0	0	0	*Candida picinguabensis*
R1-9	*Candida picinguabensis* UNESP 00-89 (AY566407)	488/488	100	0	0	0	*Candida picinguabensis*
R1-10	*Candida picinguabensis* UNESP 00-89 (AY566407)	488/488	100	0	0	0	*Candida picinguabensis*
R1-5	*Candida rugosa* CBS 613 (U45727)	479/484	99.0	2	0.4	3	*Candida rugosa*
R1-21	*Candida rugosa* CBS 613 (U45727)	483/487	99.1	1	0.2	3	*Candida rugosa*
RS1	*Candida silvae* CBS 5498 (U71065)	541/541	100	0	0	0	*Candida silvae*
RS57	*Candida silvae* CBS 5498 (U71065)	541/541	100	0	0	0	*Candida silvae*
R1-3	*Candida thaimueangensis* TM1-01 (AB264009)	559/559	100	0	0	0	*Candida thaimueangensis*
R1-8	*Candida thaimueangensis* TM1-01 (AB264009)	557/566	100	0	0	9	*Candida thaimueangensis*
R1-11	*Candida thaimueangensis* TM1-01 (AB264009)	558/559	99.8	1	0.2	0	*Candida thaimueangensis*
R1-6	*Candida tropicalis* CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
R1-20	*Candida tropicalis* CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
RS13	*Candida tropicalis* CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RS22	*Candida tropicalis* CBS 94 (U45749)	498/498	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
RS31	*Candida tropicalis* CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
RS60	*Candida tropicalis* CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
RS64	*Candida tropicalis* CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
RS11	*Debaryomyces nepalensis* CBS 5921 (U45839)	570/570	100	0	0	0	*Debaryomyces nepalensis*
RS74	*Galactomyces geotrichum* GSXR (EF564398)	520/520	100	0	0	0	*Galactomyces geotrichum*
RS5	*Issatchenkia occidentalis* CBS 5459 (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Issatchenkia occidentalis*
RS26	*Issatchenkia occidentalis* CBS 5459 (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Issatchenkia occidentalis*
RS29	*Issatchenkia occidentalis* CBS 5459 (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Issatchenkia occidentalis*
RS6	*Issatchenkia orientalis* CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Issatchenkia orientalis*
RS34	*Issatchenkia orientalis* CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Issatchenkia orientalis*
RS35	*Issatchenkia orientalis* CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Issatchenkia orientalis*
RS39	*Issatchenkia orientalis* CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Issatchenkia orientalis*
RS52	*Issatchenkia orientalis* CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Issatchenkia orientalis*
RS56	*Issatchenkia orientalis* CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Issatchenkia orientalis*

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RS61	*Issatchenkia orientalis* CBS 5147 (U76347)	562/562	100	0	0	0	*Issatchenkia orientalis*
RS66	*Issatchenkia orientalis* CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Issatchenkia orientalis*
RS12	*Issatchenkia siamensis* (AB247501)	555/555	100	0	0	0	*Issatchenkia siamensis*
RS30	*Issatchenkia terricola* CBS 2617 (U76345)	552/554	99.6	2	0.4	0	*Issatchenkia terricola*
RS25	*Kodamaea ohmeri* ATCC 46053 (AF335976)	512/513	99.8	0	0	1	*Kodamaea ohmeri*
RS43	*Kodamaea ohmeri* ATCC 46053 (AF335976)	512/512	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
RS48	*Kodamaea ohmeri* ATCC 46053 (AF335976)	512/512	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
RS49	*Kodamaea ohmeri* ATCC 46053 (AF335976)	512/512	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
RS36	*Pichia burtonii* CBS 2352 (U45712)	524/524	100	0	0	0	*Pichia burtonii*
RS3	*Pichia galeiformis* CBS 7324 (U75738)	495/495	100	0	0	0	*Pichia galeiformis*
RS19	*Pichia kluyveri* CBS 188 (U75727)	567/568	99.8	1	0.2	0	*Pichia kluyveri*
RS21	*Pichia kluyveri* CBS 188 (U75727)	567/568	99.8	1	0.2	0	*Pichia kluyveri*
RS47	*Pichia kluyveri* CBS 188 (U75727)	567/568	99.8	1	0.2	0	*Pichia kluyveri*
RS75	*Pichia kluyveri* CBS 188 (U75727)	539/542	99.5	2	0.4	1	*Pichia kluyveri*

3.2 สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย (non-described species) จำนวน 12 สายพันธุ์ คิดเป็น 16 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายทั้งหมดจัดจำแนกได้เป็น 2 สกุล 5 สปีชีส์ (ตารางที่ 7) ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales แบ่งเป็นอยู่ในวงศ์ Saccharomycodaceae 1 สกุล 3 สปีชีส์ และวงศ์ Candidaceae 1 สกุล 2 สปีชีส์ โดยเหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 จำนวน 1 สายพันธุ์ เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27665 จำนวน 1 สายพันธุ์ เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. CS-2008b จำนวน 3 สายพันธุ์ เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. ST-250 จำนวน 1 สายพันธุ์ และเหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. YS DN19 จำนวน 6 สายพันธุ์ สำหรับรายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 สปีชีส์ของยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สปีชีส์	สายพันธุ์	จำนวน
Candida sp. NRRL Y-27127	R1-4	1
Candida sp. NRRL Y-27665	RS16	1
Hanseniaspora sp. CS-2008b	R1-1, R1-22, RS18	3
Hanseniaspora sp. ST-250	RS17	1
Hanseniaspora sp. YS DN19	RS7, RS10, RS24, RS41, RS50, RS62	6

ตารางที่ 8 การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
R1-4	*Candida* sp. NRRL Y-27127 (EF550293)	594/594	100	0	0	0	*Candida* sp. NRRL Y-27127
RS16	*Candida* sp. NRRL Y-27665 (DQ839394)	468/472	99.2	4	0.9	0	*Candida* sp. NRRL Y-27665
R1-1	*Hanseniaspora* sp. CS-2008b (EU285515)	586/591	99.2	5	0.8	0	*Hanseniaspora* sp. CS-2008b
R1-22	*Hanseniaspora* sp. CS-2008b (EU285515)	587/591	99.3	4	0.7	0	*Hanseniaspora* sp. CS-2008b
RS18	*Hanseniaspora* sp. CS-2008b (EU285515)	587/591	99.3	4	0.7	0	*Hanseniaspora* sp. CS-2008b
RS71	*Hanseniaspora* sp. ST-250 (DQ404489)	560/560	100	0	0	0	*Hanseniaspora* sp. ST-250
RS7	*Hanseniaspora* sp. YS DN19 (AM397848)	572/572	100	0	0	0	*Hanseniaspora* sp. YS DN19
RS10	*Hanseniaspora* sp. YS DN19 (AM397848)	572/572	100	0	0	0	*Hanseniaspora* sp. YS DN19
RS24	*Hanseniaspora* sp. YS DN19 (AM397848)	585/585	100	0	0	0	*Hanseniaspora* sp. YS DN19
RS41	*Hanseniaspora* sp. YS DN19 (AM397848)	585/585	100	0	0	0	*Hanseniaspora* sp. YS DN19
RS50	*Hanseniaspora* sp. YS DN19 (AM397848)	585/585	100	0	0	0	*Hanseniaspora* sp. YS DN19
RS62	*Hanseniaspora* sp. YS DN19 (AM397848)	585/585	100	0	0	0	*Hanseniaspora* sp. YS DN19

3.3. สปีชีส์ใหม่ (new species) เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (closet species) ตามเกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) จำนวน 19 สายพันธุ์ คิดเป็น 25.3 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา ยีสต์สปีชีส์ใหม่จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ Candidaceae สกุล *Candida* 3 สปีชีส์ และอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae สกุล *Kluyveromyces* 1 สปีชีส์ (ตารางที่ 9) สำหรับรายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ใหม่แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 9 ยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สปีชีส์	สปีชีส์ใกล้เคียง	สายพันธุ์	จำนวน
Candida sp. 1	*Candida silvae*	R1-2, RS9, RS58	3
Candida sp. 2	*Candida* sp. BG 2-7-17-001A-1-1	RS17, RS28	2
Candida sp. 3	*Candida sinolaborantium*	RS42	1
Kluyveromyces sp.	*Kluyveromyces aestuarii*	RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76	13

ตารางที่ 10 การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
R1-2	*Candida silvae* NRRL Y-6725 (EF550215)	484/565	85.7	66	11.7	15	New species
RS9	*Candida silvae* NRRL Y-6725 (EF550215)	469/543	86.4	63	11.6	11	New species
RS58	*Candida silvae* NRRL Y-6725 (EF550215)	487/562	86.7	64	11.4	11	New species
RS17	*Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 (AY520387)	467/492	94.9	25	5.1	0	New species
RS28	*Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 (AY520387)	467/492	94.9	25	5.1	0	New species
RS42	*Candida sinolaborantium* CBS 9940 (AY520328)	505/515	98.1	8	1.6	2	New species
RS2	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS8	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS14	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS20	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS23	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS27	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS53	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RS54	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS63	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS65	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	536/544	98.5	7	1.3	1	New species
RS68	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS70	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	474/479	98.9	5	1.0	0	New species
RS76	*Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species

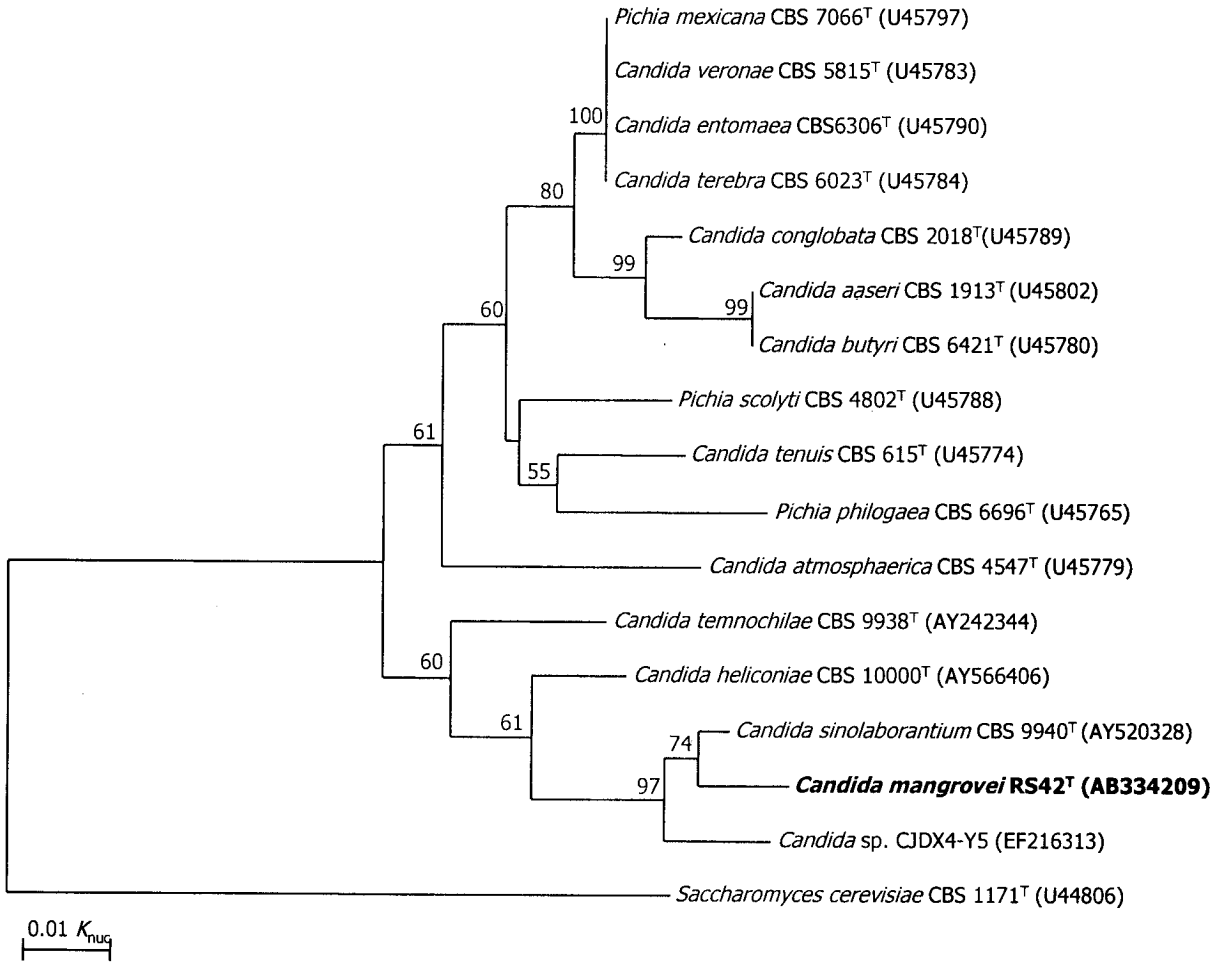
4. การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่

การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่ได้ศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่ ดังนี้

4.1 *Candida mangrovei* sp. nov. ($RS42^T$)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RS42 และนำมาปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida sinolaborantium* CBS 9940^T ซึ่งมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.6 เปอร์เซ็นต์ (8 นิวคลีโอไทด์ ใน 515 นิวคลีโอไทด์) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RS42 (ภาพที่ 1) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RS42 อยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างจากสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วบนต้นไม้วิวัฒนาการ และสร้างคลัสเตอร์กับ *Candida sinolaborantium* CBS 9940^T และ *Candida* sp. CJDX4-Y5

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RS42 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida mangrovei* sp. nov. โดยมี RS42 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "mangrovei" เนื่องจากเป็นยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลน สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection ($BCC 25963^T$) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center ($NBRC 103860^T$) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures ($CBS 10862^T$) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 1 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RS42^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida mangrovei* sp. nov. (RS42^{T})

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาด 3-6 x 3-6 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เชื้อมีการเจริญแบบปีนขึ้นข้างหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนที่ก้นหลอด มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 2A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีการเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ โคโลนีมีสีครีม เนื้อคล้ายเนยเหลว รูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ ขอบหยัก และเจริญแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 2B)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	Latent	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมลลิไบโอส	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	+
ซอร์โบส	+	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไรบิทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	+	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	+	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	+	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกตุโรนิก	-

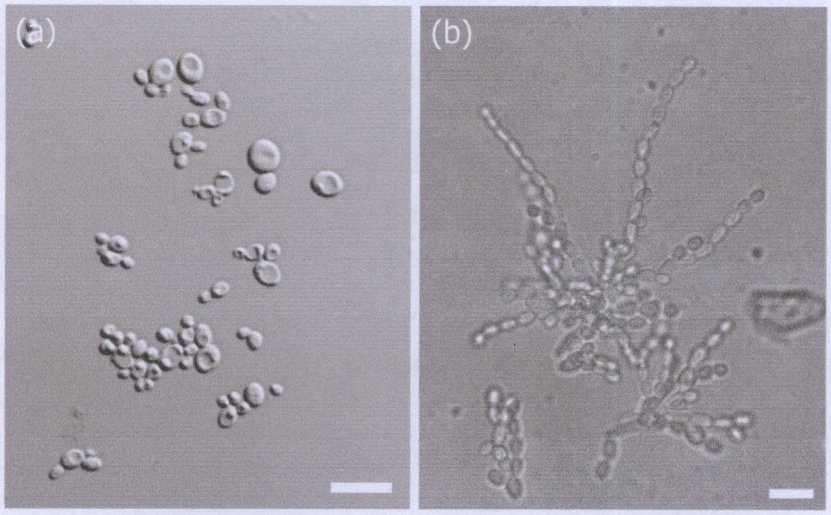
ซาลิซิน	+	กรดแลคติก	Latent
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	Weak
ราฟฟีโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	+	เอทานอล	+
อินูลิน	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	+
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 2 สัณฐานวิทยาของ *Candida mangrovei* sp. nov. (RS42^{T})

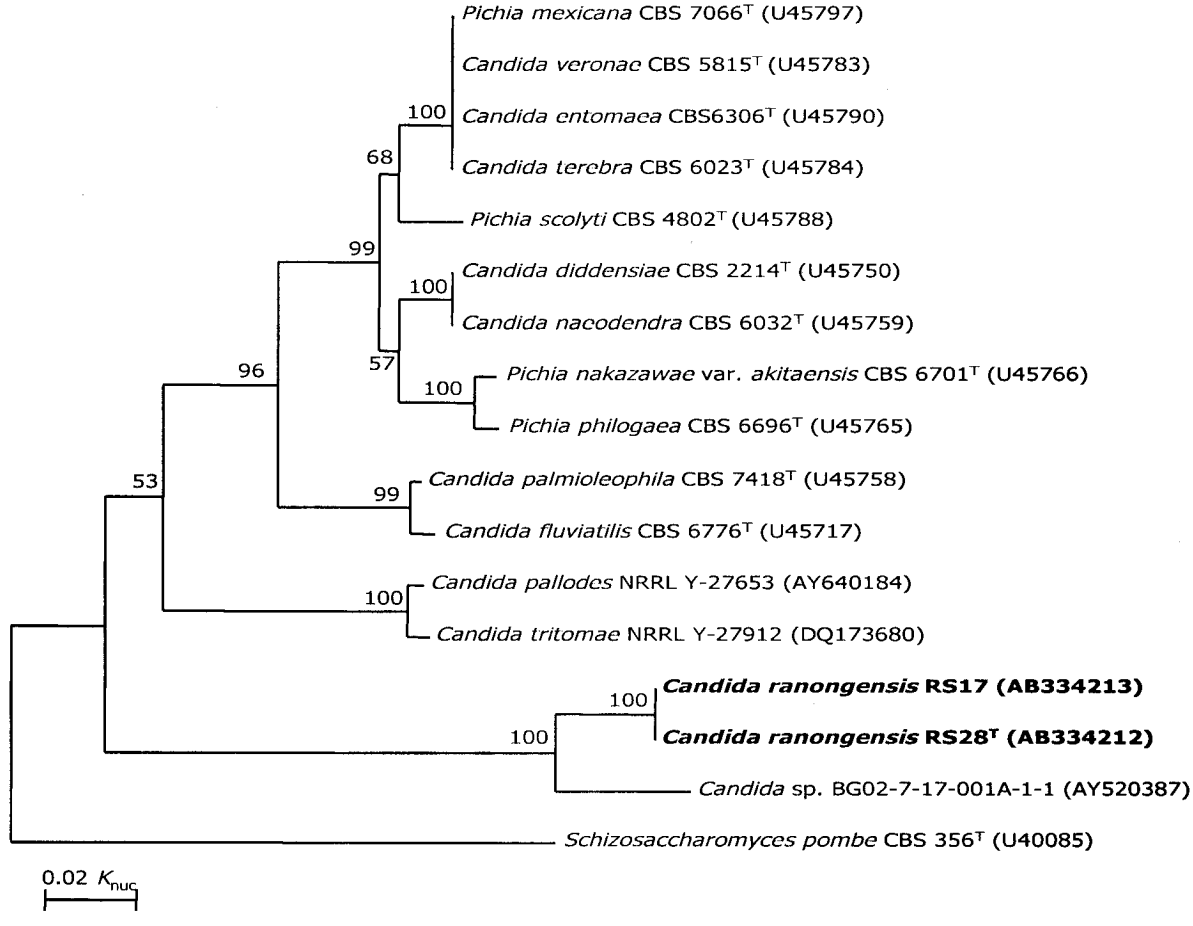
(a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

(b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

4.2 *Candida ranongensis* sp. nov. (RS17 และ RS28^{T})

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RS17 และ RS28 พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RS17 และ RS28 เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์เดียวกัน และเมื่อปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS17 และ RS28 พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 5.1 เปอร์เซ็นต์ (25 นิวคลีโอไทด์ ใน 492 นิวคลีโอไทด์) และมี *Candida tritomae* NRRL Y-27912 เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่ใกล้เคียงที่สุดโดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 10.03 เปอร์เซ็นต์ (52 นิวคลีโอไทด์ ใน 518 นิวคลีโอไทด์) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RS17 และ RS28 (ภาพที่ 3) พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ และสร้างคลัสเตอร์กับ *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย โดยมีค่า bootstrap สูงถึง 100 แต่อยู่ห่างจากสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วสปีชีส์อื่นๆ มากดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า RS17 และ RS28 เป็นสปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะต่างๆ เหมือนกัน ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida ranongensis* sp. nov. โดยมี RS28 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "ranongensis" เนื่องจากยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์แยกได้จากตัวอย่างน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 25964^{T}) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 103861^{T}) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 10861^{T}) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 3 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RS17, RS28^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida ranongensis* sp. nov. (RS17 และ RS28^{T})

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างรี ขนาด 3-4 x 4-7 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือ เป็นคู่ เชื้อมีการเจริญแบบปีนขึ้นข้างหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนที่ก้นหลอด เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 4A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ โคโลนีมีสีครีม เนื้อคล้ายเนยเหลว รูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าเรียบ ขอบโค้งเพียงเล็กน้อย และโคโลนีเจริญแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ และเมื่อนำเชื้อทั้ง 2 ชนิดมาผสมกันบนอาหารทดสอบการสร้างสปอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์ แสดงว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์เฮเทอโรทาลลิกที่มีเมติงไทป์เดียวกัน

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมแบบที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 4B)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	-	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟีโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมลลิไบโอส	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	Latent
ซอร์โบส	+	อิริทริทอล	-

เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไรบิทอล	Latent
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	Weak
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	-	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	-	กรดแลคติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-		

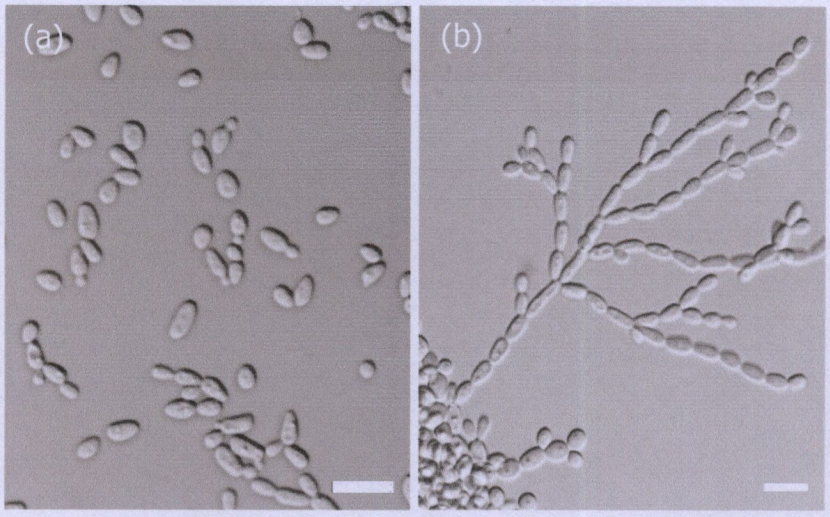
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	+
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+

การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q9
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 4 สัณฐานวิทยาของ *Candida ranongensis* sp. nov. (RS17 และ RS28^{T})

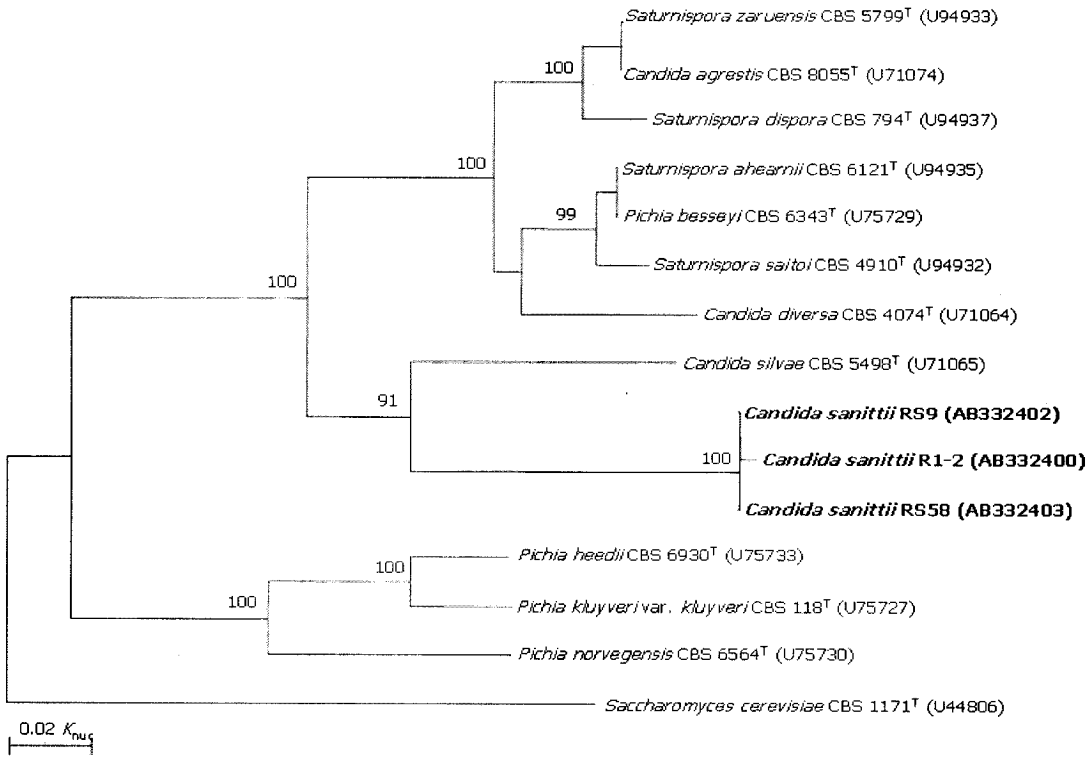
(a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

(b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

4.3 *Candida sanittii* sp. nov. (R1-2, RS9, RS58)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ R1-2, RS9 และ RS58 พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RS9 และ RS58 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ R1-2 พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เพียง 2 นิวคลีโอไทด์ ใน 556 นิวคลีโอไทด์ สรุปได้ว่าทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์เดียวกัน เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และเมื่อปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ 3 สายพันธุ์ กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida silvae* NRRL Y-6725^{T} โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ RS58 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 11.4 เปอร์เซ็นต์ (64 นิวคลีโอไทด์ ใน 562 นิวคลีโอไทด์) เปรียบเทียบกับ R1-2 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 11.7 เปอร์เซ็นต์ (64 นิวคลีโอไทด์ ใน 565 นิวคลีโอไทด์) และเปรียบเทียบกับ RS9 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 11.6 เปอร์เซ็นต์ (63 นิวคลีโอไทด์ ใน 543 นิวคลีโอไทด์) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ R1-2, RS9 และ RS58 (ภาพที่ 5) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RS9 และ RS58 อยู่ในตำแหน่งเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ แต่ต่างจาก R1-2 เพียงเล็กน้อย และสร้างคลัสเตอร์กับ *Candida silvae* NRRL Y-6725^{T} แต่อยู่ในตำแหน่งที่ต่างจาก *Candida silvae* NRRL Y-6725^{T} ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และสปีชีส์ที่รู้จักแล้วสปีชีส์อื่นๆ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า R1-2, RS9 และ RS58 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีลักษณะต่างๆ เหมือนกัน คือ ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida sanittii* sp. nov. การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "sanittii" ตามชื่อของ ศ. ดร. สนิท อักษรแก้ว ผู้เชี่ยวชาญเกี่ยวกับป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีชื่อเสียงระดับโลก



ภาพที่ 5 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ R1-2, RS9, RS58 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida sanittii* sp. nov. (R1-2, RS9 และ RS58)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาด 3-5 x 3-5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เชื้อมีการเจริญเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนที่ก้นหลอด มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 6A)

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม เนื้อคล้ายเนยเหลว รูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ ขอบโค้งเล็กน้อย และเจริญแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ และเมื่อนำเชื้อทั้ง 3 ชนิดมาผสมกันบนอาหารทดสอบการสร้างสปอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์ แสดงว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์เฮเทอโรทาลลิกที่มีเมติงไทป์เดียวกัน

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 6B)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	-	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟีโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมลลิไบโอส	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	+
ซอร์โบส	-	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	-
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	-
ดี-ไซโลส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	-
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	-	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	-	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	-	กรดแลคติก	+

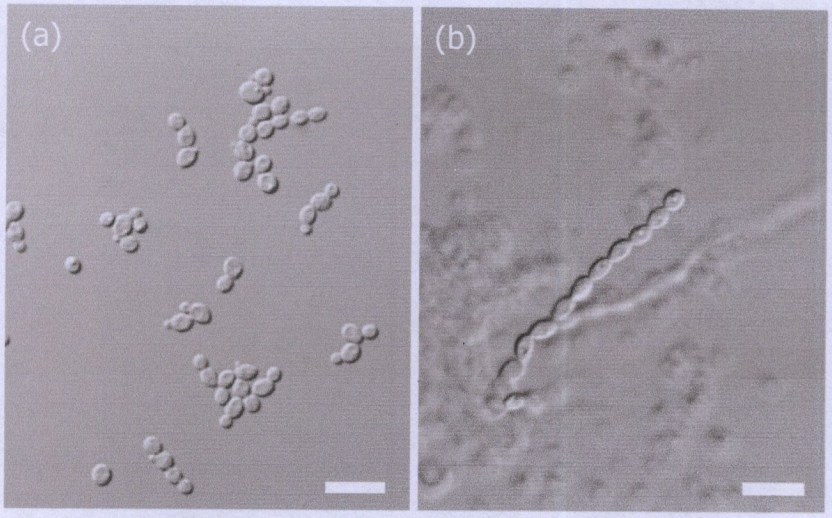
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟฟีโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q8
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 6 สัณฐานวิทยาของ *Candida sanittii* sp. nov (R1-2, RS9 และ RS58)

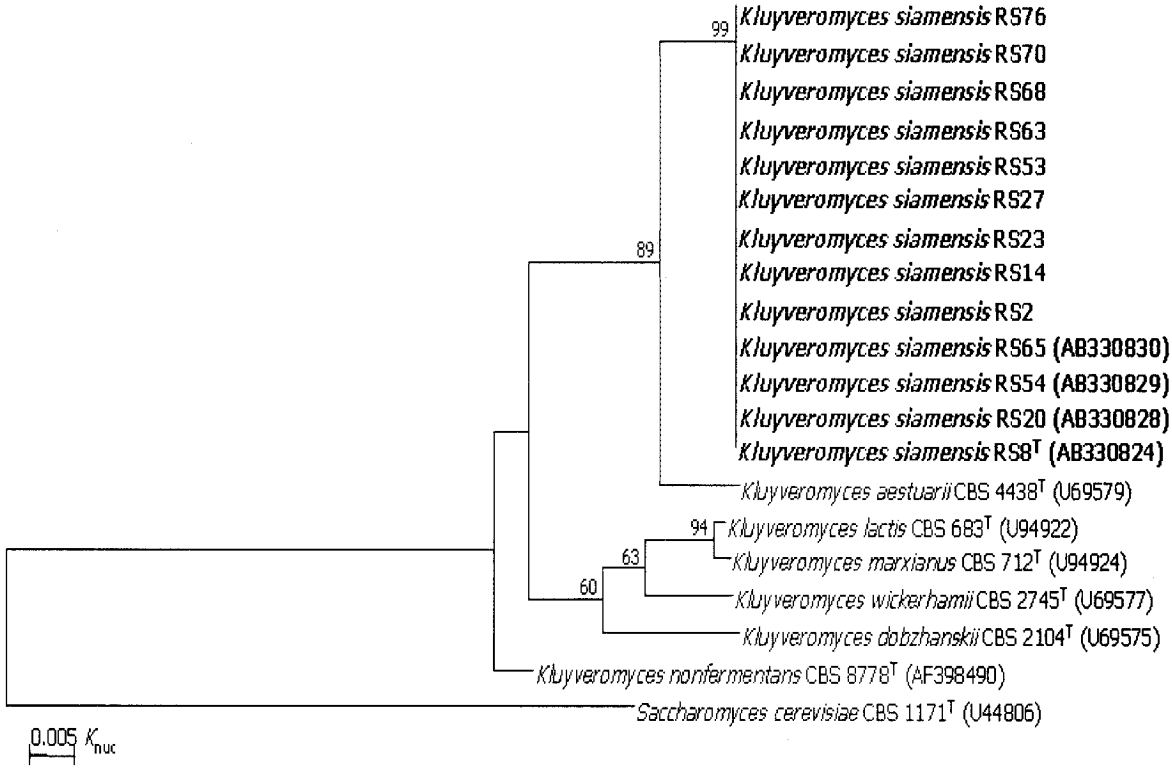
(a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

(b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม14 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

4.4 *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (RS2, RS8^{T}, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70 และ RS76)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ 13 สายพันธุ์ (RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70 และ RS76) พบว่ายีสต์ 12 สายพันธุ์ คือ RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS68, RS70 และ RS76 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS65 พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (1 นิวคลีโอไทด์ ใน 562 นิวคลีโอไทด์) จึงสรุปได้ว่ายีสต์ทั้ง 13 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์เดียวกันเนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และเมื่อปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438^{T} โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS68 และ RS76 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.1 เปอร์เซ็นต์ (6 นิวคลีโอไทด์ ใน 544 นิวคลีโอไทด์) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS 70 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (5 นิวคลีโอไทด์ ใน 479 นิวคลีโอไทด์) และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์

RS65 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.3 เปอร์เซ็นต์ (7 นิวคลีโอไทด์ ใน 544 นิวคลีโอไทด์) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ทั้ง 13 สายพันธุ์ (ภาพที่ 7) พบว่ายีสต์ทั้ง 13 สายพันธุ์ อยู่ในตำแหน่งเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ และสร้างคลัสเตอร์กับสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วของสกุล *Kluyveromyces* อีก 6 สปีชีส์ และอยู่ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับสปีชีส์ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438^{T} ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ดังนั้นจึงเสนอ RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70 และ RS76 เป็นสปีชีส์ใหม่



ภาพที่ 7 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RS2, RS8^{T}, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor- joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 13 สายพันธุ์มีลักษณะต่างๆ เหมือนกัน คือ มีการสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar หลังจากบ่ม 3 วัน ที่ 28 องศาเซลเซียส โดยสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม จำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส และแอสคัสไม่คงทน สลายง่าย นอกจากนี้การสร้างแอสโคสปอร์และลักษณะอื่นๆ เป็นลักษณะของสกุล *Kluyveromyces* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Kluyveromyces* และตั้งชื่อเป็น *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. โดยมี RS8 เป็น type strain (BCC 25962^{T}, NBRC 103859^{T}, CBS 10860^{T}) การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "siamensis" เนื่องจากแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำที่เก็บในประเทศไทยซึ่งมีชื่อเดิมว่าสยาม

สำหรับยีสต์สปีชีส์ใหม่นี้ได้มีการส่งผลงานตีพิมพ์ เรื่อง *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from water in a mangrove forest in Ranong Province, Thailand ในวารสารระดับนานาชาติ โดยได้รับการยอมรับให้มีการตีพิมพ์ในวารสาร FEMS Yeast Research 8 (2008) 823-828

ลักษณะของ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (RS2, RS8^{T}, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70 และ RS76)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลมจนถึงรี ขนาด 2.3-5.4 x 2.3-6.9 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ มีการเจริญเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนที่ก้นหลอด เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 8A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ โคโลนีมีสีครีม เนื้อคล้ายเนยเหลว รูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ และโคโลนีเจริญสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar หลังจากบ่ม 3 วัน ที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่ามีการสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม จำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส และแอสคัสไม่คงทน สลายง่าย

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) พบการสร้างเส้นใยเทียมแบบที่ไม่มีการพัฒนา (rudimentary) แต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 8B)

การหมักคาร์โบไฮเดรต			
กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟีโนส	Weak
ซูโครส	+	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมลลิไบโอส	-

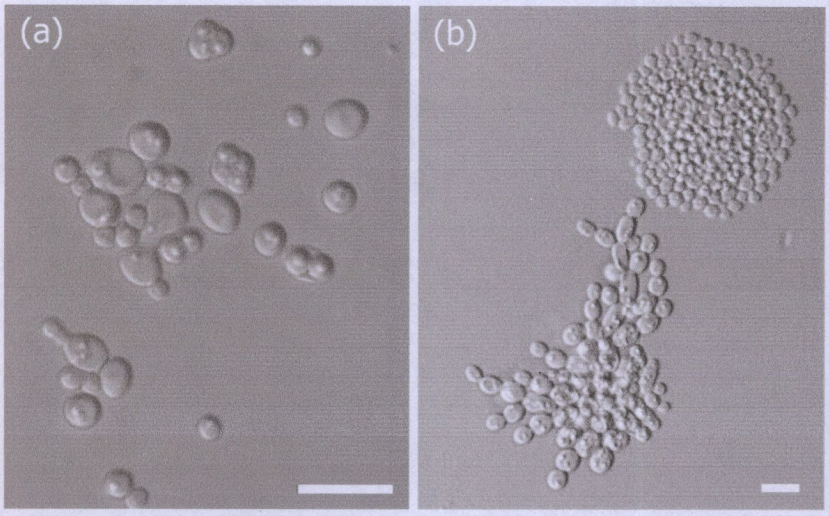
การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน			
กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	+
ซอร์โบส	+	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	Latent
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	-	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	+	กรดแลคติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	+	กรดซิตริก	-
ราฟฟีโนส	+	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q6
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 8 สัณฐานวิทยาของ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (RS2, RS8^{T}, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70 และ RS76)

(a) เซลล์ปกติและแอสโคสปอร์ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

(b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

สรุปและวิจารณ์ผล

ยีสต์ที่แยกโดยวิธีการกรองผ่านเมมเบรนจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง ประกอบด้วยยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 (รหัส R1) จำนวน 14 สายพันธุ์ และยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 (รหัส RS) ในขณะที่ทำวิทยานิพนธ์ จำนวน 61 สายพันธุ์ ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในบริเวณดังกล่าว 5 จุด โดยมีลักษณะของตัวอย่างน้ำดังนี้ อุณหภูมิ 27.3-29.3 องศาเซลเซียส พีเอช 6.9-7.5 ความเค็ม 0-21 เปอร์เซ็นต์ และมียีสต์จำนวน 76-202 เซลล์ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร รวมเป็นยีสต์ที่นำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆที่อยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้ BLASTN homology search program ทั้งหมด 75 สายพันธุ์ จากผลการจัดจำแนกพบว่าทั้งหมดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales แบ่งเป็นสปีชีส์ที่รู้จักแล้วหรือมีการอธิบายแล้ว 44 สายพันธุ์ (58.7 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา) โดยจัดจำแนกได้เป็น 6 สกุล 17 สปีชีส์ คือ *Candida butyri*, *Candida parapsilosis*, *Candida picinguabensis*, *Candida rugosa*, *Candida silvae*, *Candida thaimueangensis*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces nepalensis*, *Galactomyces geotrichum*, *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia siamensis*, *Issatchenkia terricola*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia burtonii*, *Pichia galeiformis* และ *Pichia kluyveri* ส่วนยีสต์อีก 12 สายพันธุ์ (16 เปอร์เซ็นต์) จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 (1 สายพันธุ์), *Candida* sp. NRRL Y-27665 (1 สายพันธุ์), *Hanseniaspora* sp. CS-2008b (3 สายพันธุ์), *Hanseniaspora* sp. ST-250 (1 สายพันธุ์) และ *Hanseniaspora* sp. YS DN19 (6 สายพันธุ์)

ยีสต์สปีชีส์ที่รู้จักแล้วหรือมีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ส่วนใหญ่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida* เนื่องจากสามารถพบได้เสมอในแม่น้ำ ทะเลสาบ น้ำกร่อย น้ำทะเล มหาสมุทร และน้ำที่มีมลภาวะ (Fell *et al.*, 1960) ซึ่งสอดคล้องกับที่มีการรายงานว่ายีสต์ที่แยกจากกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วงที่แช่ในน้ำในป่าชายเลนของประเทศไทย ส่วนใหญ่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida* (กุสุมาวดี, 2549) นอกจากนี้ยังพบยีสต์ในสกุลอื่น คือ *Issatchenkia*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Kodamaea*, *Debaryomyces* และ *Galactomyces* ยีสต์ที่พบบ่อยที่สุดจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คือ *Issatchenkia orientalis* (8 สายพันธุ์) และ *Candida tropicalis* (7 สายพันธุ์) ยีสต์บางสปีชีส์ที่แยกได้จาก

ตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนสามารถพบได้ในแหล่งที่อยู่บนบกด้วย เช่น *Candida tropicalis* พบในดอกไม้ และขุยแมลง *Candida parapsilosis* พบในเห็ด (Jindamorakot, 2004) *Issatchenkia orientalis* และ *Issatchenkia siamensis* พบในดิน (Sumpradit, 2005) เป็นต้น

นอกจากนั้นพบว่า 19 สายพันธุ์ (25.3 เปอร์เซ็นต์) เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 4 สปีชีส์ ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida silvae* NRRL Y-6725 (3 สายพันธุ์), *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 (2 สายพันธุ์), *Candida* sp. CJDX4-Y5 (1 สายพันธุ์) และ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (13 สายพันธุ์) โดยก่อนรายงานนี้ได้มีการศึกษายีสต์จากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนในจังหวัดพังงาประเทศไทย และรายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* คือ *Candida thaimueangensis* sp.nov. (Limtong *et al.*, 2007) และ *Candida phangngensis* sp. nov. (Limtong *et al.*, 2008) สำหรับยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ 4 สปีชีส์นั้น ได้นำไปศึกษาลักษณะต่างๆ โดยอาศัยอนุกรมวิธานโพลีฟาซิกที่ประกอบด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานเคมี และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เพื่ออธิบายพร้อมทั้งเสนอตั้งชื่อเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida mangrovei* sp. nov. (RS42^{T}), *Candida ranongensis* sp. nov. (RS17, RS28^{T}), *Candida sanittii* sp. nov. (R1-2, RS9, RS58) และ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (RS2, RS8^{T}, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76) จากการศึกษาครั้งนี้ยืนยันว่าสามารถพบยีสต์ได้ในน้ำในป่าชายเลน โดยยีสต์และรามีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนธาตุอาหารในป่าชายเลน และยังเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำและแพลงก์ตอน (Nagahama, 2005)

เอกสารอ้างอิง

กุสุมาวดี ประสาทศรี. 2549. **การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุที่ได้จากป่าชายเลนโดยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Altschul, S. F., T. L. Madden, J. Z. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**. 25: 3389-3402.

Boekhout, T. and C. P. Kurtzman. 1996. Principles and methods used in yeast classification and an overview of currently accepted yeast genera, pp. 1-81. In K. Wolf, ed. **A Handbook: Non conventional Yeasts in Biotechnology**. Springer-Verlag, Berlin.

Fell, J. W., D. G. Ahearn, S. P. Meyers and F. J. Roth. 1960. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida, and adjacent benthic areas. **Limnol. Oceanogr**. 5: 366–371.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**. 39: 738-791.

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

Jindamorakot, S., S. Am-In, T. T. Thanh, D. D. Ngo, H. Kawasaki, W. Potacharoen, S. Limtong, M. Tanticharoen and T. Nakase. 2004. *Candida easanensis* sp. nov., *Candida pattaniensis* sp. nov. and *Candida nakhonratchasimensis* sp. nov., three new species of yeasts isolated from insect frass in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 261-269.

Kimura, M. 1980. A sample method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol**. 16: 111-120.

Komagata, K. and T. Nakase. 1967. Reitoshokuin no biseibutsu nikannsuru kenkyu. V. Shihan reituoshokushin yori bunri shita kobo no seijo (Microbiological study in foods. V. General properties of yeasts isolated from frozen foods) (in Japanese). **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**. 8: 53-57.

Lachance, M. A., J. M. Bawies, W. T. Atarmer and J. S. F. Barker. 1999. *Kodamaea kakadeuensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Can. J. Microbiol**. 45: 172-177.

Limtong, S., W. Yongmanitchai, H. Kawasaki and T. Seki. 2007. *Candida thaimueangensis* sp. nov., an anamorphic yeast species from estuarine water in mangrove forest in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 57: 650-653.

_____, _____, _____ and _____. 2008. *Candida phangngensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Yarrowia* clade, isolated from water in mangrove forest in Phang-Nga Province, Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 58: 515-519.

Nagahama, T. 2005. Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments. pp. 241-262. In C. A. Rosa and G. Peter, eds. **The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer-Verlag, Berlin.

Nakase, T. and M. Suzuki. 1986a. *Bullera megalospora*, a new species of yeast forming large ballistospores isolated from dead leaves of *Oryza sativa*, *Miscanthus sinensis* and *Sasa* sp. in Japan. **J. Gen. Appl. Microbiol**. 32: 225-240.

_____ and _____. 1986b. The ubiquinone system in strains of species in the ballistospore-forming yeast genera *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces* and *Bullera*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 32: 251-258.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol**. 4: 406-425.

Sumpradit, T. 2006. **Yeast diversity in soils from hill evergreen, mixed deciduous, dry dipterocarp, and pine forest of Nam Nao National Park**. Ph. D. thesis, Kasetsart University.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and J. D. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acid Res**. 24: 4876-4882.

Yarrow, D. 1998. Methods for isolation, maintenance, and identification of yeasts, pp. 77-100. In C. P. Kurtzman and J. W. Fell, eds. **The Yeasts: A Taxonomic Study, 4th edition.** Elsevier, Amsterdam.

ลงนาม.....สมจิต อำไพเพ็ง.....

นักศึกษา

ลงนาม.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

วันที่ 26 พ.ย 51