รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน และการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน

Diversity of Yeast in Mangrove Forest in the Upper Coast of the Gulf of Thailand: Comparison with the Andaman Sea Coastal Mangrove Forest

(รหัสโครงการ BRT T_351136)

โดย สาวิตรี ลิ่มทอง และ ชนิตา บุญมาก

เมษายน 2552

RECEIVED
BY Q7546 DATE 6/5/52

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน และการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน

Diversity of Yeast in Mangrove Forest in the Upper Coast of the Gulf of Thailand: Comparison with the Andaman Sea Coastal Mangrove Forest

(รหัสโครงการ BRT T_351136)

โดย สาวิตรี ลิ่มทอง และ ชนิตา บุญมาก

เมษายน 2552

รหัสโครงการ BRT T_351136

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง
ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน และการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน

Diversity of Yeast in Mangrove Forest in the Upper Coast of the Gulf of Thailand: Comparison with the Andaman Sea Coastal Mangrove Forest

คณะผู้วิจัย

1. ศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
2. นางสาว ชนิตา บุญมาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้
และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ
ในประเทศไทย (โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_351136 และขอขอบคุณภาควุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์สำหรับการสนับสนุนในการทำการวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2552

Abstract

Diversity of yeast in water and sediment from mangrove forests on the upper coast of the Gulf of Thailand in east coast (Chantaburi and Trat) and west coast (Phetchaburi and Prachuap Khiri Khan) were investigated by identified 112 isolated yeast strains on the basis of analysis of the D1/D2 domain of the large subunit rDNA sequence similarity. From 65 yeast strains which were isolated from water, 61 strains were identified to be 23 described yeast species in 12 genera consisted of *Brettanomyces naardenensis, Candida* cf. *glabrata, Candida fukuyamaensis, Candida parapsilosis, Candida rugosa, Candida sanittii, Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Clavispora lusitaniae, Hanseniaspora guilliermondii, Kloeckera lindneri, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Pichia guilliermondii, Pichia kudriavzevii, Pichia occidentalis, Pichia terricola, Rhodotorula mucilaginosa, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii* and *Torulaspora maleeae*, two strains were similar to an undescribed species namely *Hanseniaspora* sp. ST-464, and two strains were assigned to be two novel species which were named as *Candida suwanaritii* sp. nov. and *Candida prachuapensis* sp. nov. Among 43 strains which were isolated from sediment, 39 strains were identified to be 14 described species in eight genera, namely *Candida chrysomelidarum, Candida gotoi, Candida pseudolambica, Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Debaryomyces hansenii, Debaryomyces nepalensis, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Metschnikowia koreensis, Pichia kudriavzevii* and *Wickerhamomyces sydowiorum,* two strains were similar to an undescribed species namely *Pichia* sp. IS1-01 and *Aureobasidium* sp. CECT 11965 (yeast-like fungi). While two strains were found to represent two novel species which were assigned as *Candida siamensis* sp. nov. and *Candida tratensis* sp. nov.

The result of investigation revealed that seven yeast species were found in both east and west coasts of the Gulf of Thailand mangrove forests. The species which were found in water of both east and west coastal mangrove forests of the Gulf of Thailand was *Rhodotorula mucilaginosa* whereas *Metschnikowia koreensis* was particularly found in sediment. As well as *Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri* and *Pichia kudriavzevii*, could be detected in both water and sediment.

The diversity of yeast in water from mangrove forests on the upper coast of the Gulf of Thailand was compared with the diversity in water from the Andaman sea coastal mangrove forests including Khao Lumpee-Haad Thaimueang National Park, Phang-Nga Province (Limtong *et al.*, 2008),

and Laem Son National Park, Ranong Province (Am-In and Limtong, 2008; Am-In, 2008). The result comparison resveled that 17 species in 7 genera were found in water from mangrove forests on coastal areas, Andaman and Gulf of Thailand seas. They were *Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida rugosa, Candida sanittii* sp. nov., *Candida silvae, Candida thaimueangensis* sp. nov., *Candida tropicalis, Kloeckera lindneri, Kodamaea ohmeri, Kluyveromyces siamensis* sp. nov., *Lindnera subsufficiences, Pichia caribbica, Pichia guilliermondii, Pichia kluyveri, Pichia occidentalis Torulaspora maleeae* and *Rhodotorula mucilaginosa.* Ten species in seven genera, *Brettanomyces naardenensis, Candida fukuyamaensis, Candida suwanarit* sp. nov., *Candida prachuapensis* sp. nov., *Clavispora lusitaniae, Hanseniaspora guilliermondii, Metschnikowia koreensis, Pichia terricola, Saccharomyces cerevisiae,* and *Torulaspora delbruecki,* were obtained only in water of Gulf of Thailand sea. The species which were detected only in water from Andaman sea coastal mangrove forests consisted of 25 species in seven genera, *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida berthetii, Candida boidinii, Candida butyri, Candida conglobata, Candida* cf. *glabrata, Candida membranifaciens, Candida laemsonensis* sp. nov., *Candida picinguabensis, Candida phangngensis* sp. nov., *Candida pseudolambica, Candida ranongensis* sp. nov., *Candida* sp. nov. 1, *Candida* sp. nov. 2, *Debaryomyces nepalensis, Galactomyces geotrichum, Geotrichum siamensis* sp. nov., *Lodderomyces elongisporus, Pichia fabianii, Pichia galeiformis, Pichia siamensis, Pichia sporocuriosa, Trichosporon asahii, Trichosporon coremiiforme* and *Trichosporon japonicum.*

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	3
วิธีการวิจัย	24
ผลและวิจารณ์	37
สรุปผล	96
ผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงาน ปัญหาอุปสรรค และแนวทางแก้ไข	100
เอกสารอ้างอิง	102
ภาคผนวก	108

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความหลากหลายของยีสต์และราคล้ายยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีรายงานแล้ว	8
2	ความหลากหลายของยีสต์ในพืชในป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีรายงานแล้ว	10
3	การจำแนกประเภทของแอสโคมัยซีตัสยีสต์	13
4	การจำแนกประเภทของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์	14
5	ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออก และตะวันตกของอ่าวไทยที่นำมาจัดจำแนก	25
6	การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราด และจันทบุรี เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย พร้อม GenBank accession number	38
7	การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราด และจันทบุรี เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย พร้อม GenBank accession number	42
8	ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	45
9	ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	47
10	การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว และสปีชีส์ใหม่ พร้อม GenBank accession number	48
11	การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนดินในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว และราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ที่ยังไม่มีการอธิบาย พร้อม GenBank accession number	50
12	ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	54
13	ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ยีสต์ที่พบในน้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดตราดและจันทบุรี	58
15	ยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดตราดและจันทบุรี	60
16	ยีสต์ที่พบในน้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์	63
17	ยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์	64
18	ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน	67
19	การเปรียบเทียบความหลากหลายของยีสต์ ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบนกับชายฝั่งทะเลอันดามัน	70
20	รายละเอียดของข้อมูลการเก็บรักษายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน	90
21	ผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงาน ปัญหาอุปสรรค และแนวทางแก้ไข	100
22	แบบบันทึกข้อมูลยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน	109

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างดีเอ็นเอไรโบโซม; 18S rDNA, 5.8S rDNA, 26S rDNA, 5S rDNA, ITS (internal transcribed spacer) และ IGS (intergenic spacer)	17
2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสจากการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน และความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS1 ของยีสต์สกุล *Trichosporon* ในกลุ่มต่าง ๆ คือ (1) กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันสูง ซึ่งมีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสเท่ากับ 70-100 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน (2) กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันปานกลาง ซึ่งมีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสเท่ากับ 40-70 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นพันธุ์ของสปีชีส์เดียวกัน (3) กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันต่ำ ซึ่งมีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสเท่ากับ 0-40 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าไม่ได้เป็นสมาชิกในสปีชีส์เดียวกัน, Î คือ ITS1 และ คือ โดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA	20
3	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EA1^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน 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	74
4	สัณฐานวิทยาของ *Candida suwanaritii* sp. nov. (EA1^{T}) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)	77
5	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ WB15^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
6	สัณฐานวิทยาของ *Candida prachuapensis* sp. nov. (WB15^T) (a) การเจริญในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร) (b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 4 ไมโครเมตร)	79
7	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EF17^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน 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	82
8	สัณฐานวิทยาของ *Candida tratensis* sp. nov. (EF17^T) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)	85
9	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EF10^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน 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	86
10	สัณฐานวิทยาของ *Candida siamensis* sp. nov. (EF10^T) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)	89

บทนำ

นิเวศวิทยาและความหลากหลายของยีสต์เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่ควรพิจารณาสำหรับการค้นหายีสต์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และเป็นปัจจัยพื้นฐานในการเกิดวิวัฒนาการของยีสต์ ปัจจุบันยีสต์ที่รู้จักแล้วมีเพียงประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ทั้งหมดในธรรมชาติเท่านั้น สำหรับประเทศไทยซึ่งจัดเป็นประเทศในเขตร้อนที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูง แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์ในแหล่งธรรมชาติน้อยมาก

ยีสต์ไม่ได้พบทั่วไปทุกแห่งในชีวภาคหากแต่มีชุมชีพที่แน่นอนในแต่ละสปีชีส์ แต่ละชุมชีพอาจกล่าวได้ว่าเป็นแหล่งที่อยู่ของกลุ่มยีสต์หลายสปีชีส์ที่อาศัยในชุมชีพนั้น ซึ่งเป็นสถานที่ที่แท้จริงที่กลุ่มยีสต์นั้นดำรงชีพอยู่ โดยไม่ได้ปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่น และอาจกล่าวได้ว่าชุมชีพนั้น ๆ เป็นนีชของยีสต์ทุกสายพันธุ์ที่อยู่ในระบบนั้นด้วย (Lachance and Starmer, 1998) โดยธรรมชาติแหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์มีขอบเขตค่อนข้างจำกัด จำนวนของยีสต์ในบริเวณหนึ่ง ๆ ขึ้นกับสารอาหารและความสามารถในการดูดซึมสารอาหารเป็นสำคัญ (Spencer and Spencer, 1997)

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีความจำเพาะและความหลากหลายทางชีวภาพสูง จุลินทรีย์ซึ่งรวมถึงยีสต์นั้นมีบทบาทสำคัญต่อประชากรในระบบนิเวศป่าชายเลน เนื่องจากทำหน้าที่เป็นทั้งผู้ผลิตเริ่มต้นและผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบริเวณนั้น ประเทศไทยมีป่าชายเลนกระจายตามชายฝั่งทะเลในภาคตะวันออก ภาคกลางและภาคใต้ทั้งทางด้านทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในป่าชายเลนทั้งในต่างประเทศและประเทศไทยนั้นมีไม่มากนัก โดยในประเทศไทยได้มีการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนเฉพาะด้านทะเลอันดามัน คือ ที่จังหวัดพังงา ณ อุทยานแห่งชาติเขาลำปีหาดท้ายเหมือง และอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะระเกาะพระทอง และที่จังหวัดระนอง ณ อุทยานแห่งชาติแหลมสน ยีสต์ที่พบมีทั้งชนิดที่มีการค้นพบแล้วและชนิดที่ไม่เคยมีรายงานการค้นพบมาก่อนในโลก โดยขณะนี้ได้รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่แล้ว 4 สปีชีส์คือ *Candida phangngensis, Candida thaimueangensis, Kluyveromyces siamensis* และ *Torulaspora maleeae* (Limtong *et al.*, 2007; 2008a; 2008b และ Am-in *et al.*, 2008) ผลจากการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนพบว่า ส่วนใหญ่เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ได้แก่ ยีสต์ในสกุล *Candida, Debaryomyces, Kluyveromyces, Pichia* เป็นต้น และมีความหลากหลายในระดับสปีชีส์สูง

เนื่องจากยังไม่มีการรายงานความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลด้านอ่าวไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำและตะกอนดินใน

ป่าชายเลนบริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันออกและบริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน โดยการแยกยีสต์และนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ผลจากการวิจัยนอกจากจะได้ข้อมูลด้านความหลากหลายของยีสต์ในบริเวณนี้เพื่อเปรียบเทียบกับความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณด้านทะเลอันดามันแล้วยังสามารถเก็บรักษายีสต์ซึ่งเป็นทรัพยากรชีวภาพที่สำคัญของประเทศ ไว้ใช้ประโยชน์ในโอกาสต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำและตะกอนดินที่เก็บจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลด้านอ่าวไทย ในเขตจังหวัดตราด จันทบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ โดยการแยกยีสต์และจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (เนื่องจากก่อนการเสนอโครงการได้มีการเก็บตัวอย่างและแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติแล้ว ดังนั้นจึงเริ่มงานภายใต้โครงการนี้ตั้งแต่การจัดจำแนกยีสต์เป็นต้นไป)

2. จัดจำแนก ตั้งชื่อ และรายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนโดยอาศัยอนุกรมวิธานพอลีฟาซิก (polyphasic taxonomy) ซึ่งประกอบด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี

3. เปรียบเทียบความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินที่เก็บจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลด้านอ่าวไทยตอนบน และชายฝั่งทะเลอันดามันที่เคยมีรายงานไว้แล้ว เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวและความหลากหลายของยีสต์ในระบบนิเวศป่าชายเลนในประเทศไทย

ตรวจเอกสาร

1. ความหลากหลายของยีสต์

1.1 ความหลากหลายทางชีวภาพ

อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ 2535 (The Biological Diversity Convention, 1992) ได้ให้คำนิยามของคำว่า ความหลากหลายทางชีวภาพไว้ว่า "หมายถึง ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตจากทุกแหล่งอันประกอบด้วยระบบนิเวศบนบก ระบบนิเวศทางทะเล และระบบนิเวศทางน้ำอื่น ๆ ตลอดจนความซับซ้อนทางนิเวศน์ของระบบนั้น รวม ถึงความหลากหลายในสปีชีส์ ระหว่างสปีชีส์ และความหลากหลายของระบบนิเวศ" (ชนภัทร, 2535) ความหลากหลายทางชีวภาพมีอยู่ทั้งในระบบนิเวศบนบก ระบบนิเวศทางทะเล และระบบนิเวศทางน้ำอื่น ๆ ซึ่งสามารถแยกย่อยได้เป็น 3 ประเภทคือ

1) ความหลากหลายของพันธุกรรม (genetic diversity) หมายถึง ความหลากหลายจากความแตกต่างของยีนในสิ่งมีชีวิตแต่ละประเภท ในคำอธิบายเบื้องต้นอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ 2535 ของสำนักงานนโยบายและทรัพยากรธรรมชาติและแผนสิ่งแวดล้อม ใช้คำว่า "ความหลากหลายในสปีชีส์" (ชนภัทร, 2535) เป็นความหลากหลายทางชีวภาพในประชากรของสปีชีส์ เดียวกัน มีความหมายไปจนถึงรหัสพันธุกรรม (genetic coding) ในระดับนิวคลีโอไทด์ ยีน และโครโมโซม (Gaston, 2004) ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรของสปีชีส์ใด ๆ มีพันธุกรรมที่แตกต่างหลากหลาย เป็นผลมาจากกระบวนการวิวัฒนาการ หากสิ่งมีชีวิตไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจทำให้ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของโลกที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และไม่สามารถพัฒนาความต้านทานต่อโรคใหม่ ๆ ได้ (สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม [สผ.], 2539) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความอยู่รอดของสปีชีส์ ใด ๆ จึงตกอยู่ในความเสี่ยง หากในประชากรของสปีชีส์ นั้นไม่มีความหลากหลายในระบบพันธุกรรม

2) ความหลากหลายของสปีชีส์ (species diversity) หรือความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต หมายถึง ความหลากหลายจากความแตกต่างของสปีชีส์ที่มีอยู่ในโลก ในคำอธิบายเบื้องต้นอนุสัญญาฯ ใช้คำว่า "ความหลากหลายระหว่างสปีชีส์" (ชนภัทร, 2535) เป็นความหลากหลายทางชีวภาพที่สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนที่สุด มีความหมายครอบคลุมในระดับการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นชั้นต่าง ๆ ตั้งแต่สปีชีส์ สกุล (genera) ไปจนถึงอาณาจักร (domain) (Gaston, 2004)

3) ความหลากหลายของระบบนิเวศ (ecological diversity) หมายถึง ความหลากหลายจากความแตกต่างของระบบนิเวศแต่ละระบบ (ชนภัทร, 2535) เป็นความแตกต่างผันแปรในที่อยู่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่กลุ่มของสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่ร่วมกัน และประกอบรวมกันเป็นหน่วยหนึ่งของระบบของโลก เช่น ป่าผสมผลัดใบ ป่าดิบชื้น ป่าชายเลน ป่าชายหาด ชายหาด ทะเลสาบ แนวปะการัง เป็นต้น (สัผ., 2539)

1.2 นิเวศวิทยาของยีสต์ในแหล่งน้ำและตะกอนดินใต้น้ำ

การศึกษานิเวศวิทยาของยีสต์เป็นปัจจัยพื้นฐานในการเกิดวิวัฒนาการของยีสต์ เนื่องจากการเกิดยีสต์สปีชีส์ใหม่นั้น เกิดโดยการคัดเลือกจากแรงกดดันจากสภาพแวดล้อม ดังนั้นการศึกษาติดตามความเหมือนและความแตกต่างของชนิดยีสต์ในแต่ละแหล่งสภาพแวดล้อมอาจช่วยสนับสนุนให้สามารถศึกษาวิวัฒนาการของยีสต์ที่กำลังเกิดขึ้นได้ (Spencer and Spencer, 1997) ตัวอย่างเช่น การศึกษาติดตามการวิวัฒนาการของ *Kluyveromyces aestuarii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่พบมากในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลน และพบในแหล่งเฉพาะคือ ในน้ำทะเลและป่าชายเลน ในปี ค. ศ. 2003 C.P. Kurtzman ศึกษาไฟโลจีนีของ *K. aestuarii* โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS พบว่ายีสต์ชนิดนี้มีเชื้อสายใกล้เคียงกับ *Kluyveromyces marxianus* และเมื่อพิจารณาในด้านแหล่งที่อยู่ที่จำเพาะแล้ว พบว่า *K. aestuarii* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากกับ *Kluyveromyces lactis* และ *Kluyveromyces nonfermentans* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อยู่ในกลุ่มเชื้อสายเดียวกัน โดยเฉพาะ *K. lactis* ซึ่งมีแหล่งที่อยู่อาศัยอยู่ในตะกอนดินรอบรากพืชบริเวณพื้นที่ลุ่มต่ำซึ่งมีน้ำทะเลท่วมถึง จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีการวิวัฒนาการจาก *K. lactis* ในเขตที่ลุ่มมาเป็น *K. aestuarii* ในป่าชายเลน แต่จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกลับพบว่า *K. aestuarii* นั้นมีบรรพบุรุษร่วมกับ *K. nonfermentans* ซึ่งเป็นยีสต์ที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและตะกอนดินในทะเลลึก แยกออกจาก *K. lactis* อย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ *K. nonfermentans* จากพื้นใต้ทะเลลึกจะสูญเสียความสามารถในการหมักและสามารถปรับตัวให้อยู่สภาพน้ำที่มีความเค็มน้อยกว่าและเกิดวิวัฒนาการมาเป็น *K. aestuarii* (Araujo *et al.*, 1995; Nagahama, 2006)

ยีสต์ไม่ได้พบทั่วไปทุกแห่งในชีวภาค หากแต่มีชุมชีพที่แน่นอนในแต่ละสปีชีส์ แต่ละชุมชีพอาจกล่าวได้ว่าเป็นแหล่งที่อยู่ของกลุ่มยีสต์หลาย สปีชีส์ที่อาศัยในชุมชีพนั้น ซึ่งเป็นสถานที่ที่แท้จริงที่กลุ่มยีสต์นั้นดำรงชีพอยู่ โดยไม่ได้ปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่น และอาจกล่าวได้ว่าชุมชีพนั้น ๆ เป็นนีชของยีสต์ทุกสายพันธุ์ที่อยู่ในระบบนั้นด้วย (Lachance and Starmer, 1998) โดยธรรมชาติ แหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์มีขอบเขตค่อนข้างจำกัด จำนวนของยีสต์ในบริเวณหนึ่ง ๆ ขึ้นกับสารอาหารและความสามารถในการดูดซึมสารอาหารเป็นสำคัญ ยีสต์ในแหล่งน้ำก็เช่นกัน ธาตุอาหารส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดในแหล่งน้ำได้จากแหล่งภายนอก เช่น พืช และสัตว์ รวมทั้งมนุษย์ โดยเฉพาะสิ่งที่มนุษย์สร้างขึ้นนั้นจัดว่าเป็นแหล่งสารอาหารที่ใหญ่ที่สุดของยีสต์ ซึ่งส่งผลให้เกิดมลภาวะตามมา บทบาทของยีสต์ในระบบนิเวศที่สำคัญคือ การเป็นผู้-

ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และมีส่วนช่วยในการหมุนเวียนของสารอาหารและแร่ธาตุในสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ยีสต์ยังเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและแพลงค์ตอนสัตว์ในทะเลอีกด้วย (Spencer and Spencer, 1997)

ยีสต์พบได้เสมอในแม่น้ำ ทะเลสาบ น้ำกร่อย ทะเล และมหาสมุทร แหล่งน้ำในปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่าไม่มีแหล่งน้ำธรรมชาติอีกแล้ว มีเพียงน้ำที่ปนเปื้อนมลภาวะน้อย ปานกลางและมาก ยีสต์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในน้ำทั้งสามประเภทนี้ และพบมีปริมาณมากในแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์มาก ในมหาสมุทรยีสต์มีจำนวนมากกว่าราชนิดอื่น โดยเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล ส่วนแอสโคมัยซีตัสยีสต์พบมากในแหล่งที่มีสารอินทรีย์มากกว่า สำหรับในน้ำจืด พบว่ายีสต์ที่พบมากในน้ำจืด เป็นยีสต์ที่พบได้ทั่วไปหรือเป็นยีสต์ที่สัมพันธ์กับมลภาวะ ยีสต์ที่พบมากในแหล่งน้ำ เช่น ยีสต์ในสกุล *Aureobasidium,Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Hansenula, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Sporobolomyces, Trichosporon* เป็นต้น สำหรับในตะกอนดินพบว่าเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์จำนวนมากทั้งในตะกอนดินใต้น้ำจืดและน้ำเค็มโดยเฉพาะในแหล่งน้ำเสีย ยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนชั้นบนส่วนใหญ่มักเป็นยีสต์ที่พบในแหล่งน้ำและไม่มีความสามารถในการหมัก ปริมาณยีสต์ในตะกอนดินขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประ กอบทางเคมีของตะกอน สารอินทรีย์ สารก่อมลภาวะ ความลึกของน้ำ และสิ่งมีชีวิตอื่นในชุมชีพ โดยทั่วไปปริมาณยีสต์ในแหล่งน้ำจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีระดับมลภาวะมากขึ้นโดย เฉพาะยีสต์สีแดงนั้นจัดเป็นหนึ่งในดัชนีบ่งชี้มลภาวะในน้ำเสียจากชุมชน ยีสต์สีแดงที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นสกุล *Rhodotorula* แต่พบบางสปีชีส์ของ *Rhodosporidium* และ *Sporobolomyces* ด้วยเช่นกัน โดย *Sporobolomyces* เป็นเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ที่เมแทบอลิซึมโดยอาศัยออกซิเจนและมักสัมพันธ์กับใบพืชที่อยู่บนบก ดังนั้นยีสต์สกุลนี้จึงอาจลงไปสู่แหล่งน้ำโดยการที่ใบไม้ตกลงไปหรือเป็นผลจากน้ำขึ้นน้ำลงซึ่งไปชะเอายีสต์ที่อยู่บนใบไม้หรือต้นหญ้าที่อยู่บริเวณริมฝั่งลงไปสู่แหล่งน้ำ ยีสต์สีแดงเหล่านี้ใช้สารประกอบหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สีดำแยกจากแหล่งน้ำได้บ่อยเช่นกันแต่มักมีปริมาณน้อยในน้ำทุกชนิด และที่เป็นตัวแทน คือ *Aureobasidium pullulans* ซึ่งโคโลนีบนอาหารที่ใช้แยกมักเริ่มด้วยลักษณะที่เหมือนยีสต์ทั่ว ๆ ไป คือ มีสีครีม แดง และเขียว ขอบเรียบ ภายหลังมักสร้างสีดำและมีขอบซึ่งมีลักษณะคล้ายราก *Aureobasidium pullulans* สัมพันธ์กับใบไม้และดิน ดังนั้นการเข้าไปอยู่ในแหล่งน้ำอาจเกิดด้วยวิธีเดียวกับ *Sporobolomyces* (สาวิตรี, 2549; Lachance and Starmer, 1998; Spencer and Spencer, 1997)

1.3 ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลน

ในป่าชายเลนและปากแม่น้ำบริเวณที่มีมลภาวะมากพบว่ามีความหลากหลายของยีสต์สูงโดยมีจำนวนสปีชีส์ของแอสโคมัยซีตัสยีสต์สูงกว่าในแหล่งน้ำประเภทอื่น แต่กลับมีจำนวนสปีชีส์ของ เบสิดิโอ-มัยซีตัสยีสต์น้อยกว่าในแหล่งน้ำประเภทอื่นอย่างเห็นได้ชัด แม้ว่าจะมีการค้นพบแอสโคมัยซีตัสยีสต์จำนวน

มาก แต่ในแต่ละสปีชีส์พบเพียง 1-2 สายพันธุ์ ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่ายีสต์ชนิดใดเป็นสปีชีส์ที่พบมากในป่าชายเลน (Nagahama, 2006) สำหรับตัวอย่างการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลน เช่น Hagler และคณะ (1982) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในตะกอนดินบริเวณปากแม่น้ำที่ปนเปื้อนมลภาวะบริเวณเมืองริโอเดอจาเนโร ทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศบราซิล พบมียีสต์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับ *Candida krusei* (*Candida krusei*-like group) อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น *Candida krusei* , *Candida sorbosa, Candida valida,Pichia kluyveri, Pichia membranaefaciens* และ *Pichia terricola* จากนั้นในปี ค.ศ. 1993 ได้ศึกษายีสต์และแบคทีเรียโคลิฟอร์มในแหล่งน้ำและเนินทรายในป่าชายเลนซึ่งอยู่ใกล้กับเมืองริโอเดอจาเนโร พบว่ามีแบคทีเรียโคลิฟอร์มจำนวนมาก สำหรับความหลากหลายของยีสต์นั้นพบว่า ในแหล่งน้ำที่มีการสะสมใบของพืชในตระกูล *Neoregelia cruenta* เป็นหลักมีปริมาณ *Aureobasidium pullulans* และเบสิดิโอ-มัยซีตัสยีสต์ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจำนวนมาก ส่วนในแหล่งน้ำที่มีการสะสมใบของพืชในตระกูล *Quesnelia quesneliana* เป็นหลักพบมีปริมาณแอสโคมัยซีตัสยีสต์สูง จากผลการวิจัยจึงได้สรุปว่ายีสต์ที่พบในแหล่งน้ำที่มีการสะสมใบพืชทั้งสองชนิดนี้เป็นยีสต์ที่มีความจำเพาะและเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของชุมชีพดังกล่าวโดยไม่ได้ปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่นหรืออาจเรียกได้ว่าเป็นยีสต์ที่เป็นออทอกโทนัส (Hagler, 1993) ต่อมาในปี ค. ศ. 1997 Soares และคณะ ศึกษาความหลากหลายของแอสโคมัยซีตัสยีสต์ในตะกอนดินบริเวณป่าชายเลนใกล้เมืองริโอเดอจาเนโร พบว่ายีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นยีสต์ในสกุล *Candida* เช่น *Candida glabrata, Candida guilliermondii, Candida parapsilosis, Candida krusei* และ *Candida tropicalis* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. tropicalis* พบในทุกแหล่งที่ทำการศึกษา และพบว่าในบริเวณที่ปนเปื้อนมลภาวะพบมียีสต์สกุล *Candida* มากเป็นพิเศษนอกจากนี้ยังพบมียีสต์ในสกุล *Pichia* เช่น *Pichia anomala, Pichia kluyveri, Pichia membranaefaciens, Pichia terricola* และพบ *Kluyveromyces astuarii* กระจายอยู่ทั่วไปด้วย (Soares *et al.*, 1997) ในปี ค. ศ. 1995 Araujo และคณะ ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณอ่าว Sepetiba ประเทศบราซิล พบว่ามีจำนวนเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ต่อจำนวนยีสต์ทั้งหมดในแหล่งต่าง ๆ ดังนี้12.6 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ในน้ำ 3.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ในตะกอนดิน และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และมียีสต์ในสปีชีส์ *Pichia membranaefaciens, Candida valida*-like, *Candida krusei, Candida sorbosa, Candida colliculosa*-like, *Candida famata*-like, *Candida albicans, Candida guilliermondii, Candida silvae, Candida boidinii, Kloeckera* spp. และ *Kluyveromyces aestuarii* ซึ่งเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์แพร่กระจายโดยทั่วไปในน้ำและตะกอนดิน (Araujo, 1995) และในปี ค.ศ. 2004 Almeida และคณะ ได้ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำบริเวณปากแม่น้ำทากัส ประเทศโปรตุเกสด้วยวิธี microsatellite primed PCR (MSP-PCR) fingerprinting ควบคู่กับการหาลำดับนิวคลีโอ-ไทด์ของ rRNA gene พบว่าการกระจายตัวของยีสต์บริเวณปากแม่น้ำได้รับอิทธิพลจากสารอาหารที่ไหลมาพร้อมกับน้ำจากแม่น้ำ มากกว่าการขึ้นลงของน้ำทะเล ยีสต์ชนิดที่พบเป็นหลัก ได้แก่ *Candida catenulata*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa* และ *Rhodosporidium diobovatum* (Almeida *et al.*, 2004)

นอกจากนี้ยังมีการค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ได้แก่ *Lachancea meyersii* sp. nov. จากป่าชายเลนบนเกาะบาฮามา (Fell *et al.*, 2004) และ *Kwoniella mangroviensis* sp. nov. จากป่าชายเลนบริเวณบึงฟลอริดา และหมู่เกาะบาฮามาส ประเทศสหรัฐอเมริกา (Statzell-Tallman *et al.*, 2007)

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในป่าชายเลนในประเทศไทยนั้นส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในป่าชายเลนด้านทะเลอันดามัน ที่มีรายงานแล้วเช่น การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนที่จังหวัดพังงา ณ อุทยานแห่งชาติเขาลำปีหาดท้ายเหมือง และอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะระเกาะพระทอง โดยยีสต์ที่พบมีทั้งสปีชีส์ที่เป็นที่รู้จักแล้วหรือมีรายงานแล้ว ได้แก่ *Candida conglobata*, *Candida* cf. *glabrata*, *Candida membranifaciens*, *Candida parapsilosis*, *Candida picinguabensis*, *Candida tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia caribbica*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia fabianii* และ *Rhodotorula mucilaginosa* (Limtong et al., 2008bb) และสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานการค้นพบ ซึ่งขณะนี้ได้รายงานแล้ว 2 สปีชีส์ คือ *Candida thaimueangensis* sp. nov. (Limtong *et al.*, 2007) และ *Candida phangngensis* sp. nov. (Limtong et al., 2008bb) การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง พบว่ายีสต์ส่วนใหญ่เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ได้แก่ *Candida berthetii*, *Candida boidinii*, *Candida glabrata*, *Candida pseudolambica*, *Candida rugosa*, *Candida silvae*, *Candida thaimueangensis*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces nepalensis*, *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia siamensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica*, *Pichia sporocuriosa*, *Torulaspora maleeae* และ *Williopsis saturnus* และพบเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 4 สปีชีส์ คือ *Trichosporon asahii*, *Trichosporon coremiiforme*, *Trichosporon japonicum* และ *Rhodotorula mucilaginosa* และพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ 7 สปีชีส์ ซึ่งขณะนี้ได้รายงานแล้ว 1 สปีชีส์คือ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (สมจิต, 2551; Am-in *et al.*, 2008) นอกจากนี้มีรายงานการพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Torulaspora maleeae* sp. nov. ซึ่งแยกได้จากตะกอนดินในป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนองด้วย (Limtong et al., 2008ba) การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่แยกจากกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วงที่แช่อยู่ในน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนด้านอ่าวไทยในจังหวัดตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี พบยีสต์สปีชีส์ที่รู้จักแล้ว ได้แก่ *Candida palmioleophila, Candida fermentati, Candida fukuyamaensis, Candida intermedia, Candida natalensis, Candida parapsilosis, Candida pseudointermedia, Candida silvae, Candida tropicalis, Debaryomyces pseudopolymorphus, Debaryomyces vanrija, Issatchenkia occidentalis, Issatchenkia orientalis, Kodamaea ohmeri, Pichia sydowiorum, Pichia guilliermondii* และ *Williopsis saturnus* นอกจากนั้นยังพบยีสต์สปีชีส์ใหม่หลายสปีชีส์ (กุสุมาวดี, 2549)

ตารางที่ 1 ความหลากหลายของยีสต์และราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ในน้ำในป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีรายงานแล้ว

สปีชีส์	จ.ระนอง	จ.พังงา	อ้างอิง
Aureobasidium			
Aureobasidium pullulans		+	Limtong et al., 2008b
Candida			
Candida berthetii	+		สมจิต, 2551
Candida boidinii	+		สมจิต, 2551
Candida butyri	+		สมจิต, 2551
Candida conglobata		+	Limtong et al., 2008b
Candida cf. *Glabrata*		+	Limtong et al., 2008b
Candida glabrata	+		สมจิต, 2551
Candida membranifaciens		+	Limtong et al., 2008b
Candida parapsilosis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong et al., 2008b
Candida picinguabensis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong et al., 2008b
Candida phangngensis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong et al., 2008b
Candida pseudolambica	+		สมจิต, 2551
Candida rugosa	+		สมจิต, 2551
Candida silvae	+		สมจิต, 2551
Candida thaimueangensis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong *et al.*, 2007
Candida tropicalis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong et al., 2008b
Debaryomyces			
Debaryomyces nepalensis	+		สมจิต, 2551
Galactomyces			
Galactomyces geotrichum	+		สมจิต, 2551
Issatchenkia			
Issatchenkia occidentalis	+		สมจิต, 2551
Issatchenkia orientalis	+		สมจิต, 2551
Issatchenkia siamensis	+		สมจิต, 2551
Issatchenkia terricola	+		สมจิต, 2551

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สปีชีส์	จ.ระนอง	จ.พังงา	อ้างอิง
Kluyveromyces			
Kluyveromyces siamensis	+		สมจิต, 2551
Kodamaea			
Kodamaea ohmeri	+		สมจิต, 2551
Lodderomyces			
Lodderomyces elongisporus		+	Limtong et al., 2008b
Pichia			
Pichia burtonii	+		สมจิต, 2551
Pichia caribbica	+	+	สมจิต, 2551; Limtong et al., 2008b
Pichia fabianii		+	Limtong et al., 2008bb
Pichia galeiformis	+		สมจิต, 2551
Pichia guilliermondii		+	Limtong et al., 2008bb
Pichia kluyveri	+		สมจิต, 2551
Pichia sporocuriosa	+		สมจิต, 2551
Torulaspora			
Torulaspora maleeae	+		สมจิต, 2551
Williopsis			
Williopsis saturnus	+		สมจิต, 2551
Rhodotorula			
Rhodotorula mucilaginosa	+	+	สมจิต, 2551; Limtong et al., 2008bb
Trichosporon			
Trichosporon asahii	+		สมจิต, 2551
Trichosporon coremiiforme	+		สมจิต, 2551
Trichosporon japonicum	+		สมจิต, 2551

หมายเหตุ : + = พบยีสต์

ตารางที่ 2 ความหลากหลายของยีสต์ในพืชในป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีรายงานแล้ว

สปีชีส์	จ. ชุมพร	จ.ระนอง	จ. สุราษฎ์ ธานี	จ.ประจวบ คีรีขันธ์	จ. เพชรบุรี	จ. จันทบุรี	จ. ตราด	อ้างอิง
Candida								
Candida fermentati						+		กุสุมาวดี, 2549
Candida fukuyamaensis						+		กุสุมาวดี, 2549
Candida intermedia						+		กุสุมาวดี, 2549
Candida natalensis							+	กุสุมาวดี, 2549
Candida parapsilosis						+		กุสุมาวดี, 2549
Candida pseudointermedia				+				กุสุมาวดี, 2549
Candida quercitrusa		+						Sasitorn, 2006
Candida silvae			+	+			+	กุสุมาวดี, 2549
Candida tropicalis						+	+	กุสุมาวดี, 2549
Debaryomyces								
Debaryomyces polymorphus							+	Sasitorn, 2006
Debaryomyces pseudopolymorphus						+	+	กุสุมาวดี, 2549
Debaryomyces vanrijae						+		กุสุมาวดี, 2549

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สปีชีส์	จ. ชุมพร	จ.ระนอง	จ. สุราษฎ์ ธานี	จ.ประจวบ คีรีขันธ์	จ. เพชรบุรี	จ. จันทบุรี	จ. ตราด	อ้างอิง
Issatchenkia								
Issatchenkia occidentalis			+		+			กุสุมาวดี, 2549
Issatchenkia orientalis			+	+	+	+	+	กุสุมาวดี, 2549
Kluyveromyces								
Kluyveromyces siamensis					+			กุสุมาวดี, 2549
Kodamaea								
Kodamaea ohmeri				+		+		กุสุมาวดี, 2549
Metschnikowia								
Metschnikowia koreensis							+	Sasitorn, 2006
Pichia								
Pichia guilliermondii						+	+	กุสุมาวดี, 2549
Pichia syndowiorum	+		+	+				กุสุมาวดี, 2549
Williopsis								
Williopsis saturnus							+	กุสุมาวดี, 2549
Trichosporon								
Trichosporon asahii							+	Sasitorn, 2006

2. อนุกรมวิธานของยีสต์ในปัจจุบัน

"อนุกรมวิธาน" (taxonomy) ประกอบด้วย การจำแนกประเภท (classification) การจัดจำแนก (identification) และการตั้งชื่อ (nomenclature) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า อนุกรมวิธานของยีสต์เริ่มครั้งแรกในปี ค.ศ. 1838 เมื่อ Mayers ได้กำหนดชื่อสกุล *Saccharomyces* จากคำภาษากรีกว่า sakenar ซึ่งแปลว่าน้ำตาล และ mykes ซึ่งหมายถึง เชื้อรา สำหรับการสร้างระบบสำหรับการจัดอนุกรมวิธานของยีสต์นั้นเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1878 โดย Hensen ได้แสดงว่ายีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดียว และได้แยกเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ได้เป็นครั้งแรกใน ค.ศ. 1881 จากนั้นระหว่าง ค.ศ. 1888 – 1904 Hensen ได้ตีพิมพ์รายงานการศึกษายีสต์อย่างน้อย 17 สปีชีส์ เช่น *Pichia mem branaefaciens, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces pastorianus, Saccharomycodes ludwigii* เป็นต้น หลังจากนั้นเป็นต้นมาก็ได้มีการศึกษาเรื่อยมา โดยใน ปี ค.ศ. 1952 Lodder และ Kreger van Rij ได้รวบรวมและสรุปการจำแนกประเภทยีสต์พิมพ์เป็นหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 1 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนก และเมื่อเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีความก้าวหน้ามากขึ้น ก็ได้เริ่มมีการกล่าวถึงการนำเกณฑ์ของอนุกรมวิธานเคมี และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล เช่น การศึกษาองค์ประกอบของเบสกัวนีนและไซโทซีน การทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน การหาลำดับของเบสใน rDNA เป็นต้น ดังนั้นในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 2 และ 3 จึงได้เพิ่มเกณฑ์ของอนุ-กรมวิธานแบบใหม่ทั้งสองเข้าไปด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลซึ่งปัจจุบันมีความสำคัญในการจัดจำแนกยีสต์มากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากการจัดประเภทยีสต์ที่ดีนั้นควรจัดตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลสามารถใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (ศศิธร, 2543; สาวิตรี, 2549; Takashima, 2001)

สำหรับหนังสือที่นิยมใช้เป็นคู่มือในการจัดจำแนกและจำแนกประเภทของยีสต์ในปัจจุบัน คือ The Yeasts, A Taxonomic Study ซึ่งพิมพ์ครั้งที่ 4 ในปี ค.ศ. 1998 โดยมี C.P. Kurtzman และ J.W. Fell เป็นบรรณาธิการ แบ่งยีสต์ออกเป็น 2 ไฟลัมโดยอาศัยความแตกต่างของการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ คือ Phylum Ascomycota ซึ่งมีการสร้างแอสโคสปอร์ ยีสต์ในกลุ่มนี้เรียกว่า แอสโคมัยซีตัสยีสต์ ซึ่งแบ่งออกเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และแอสโคมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ประกอบด้วย 3 ชั้น คือ Archiascomycetes, Euascomycetes และ Hemiascomycetes และ Phylum Basidiomycota ซึ่งมีการสร้างเบสิดิโอสปอร์ เรียกยีสต์ในกลุ่มนี้ว่า เบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ ซึ่งแบ่งออกเป็นเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์แบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ Urediniomycetes, Hymenomycetes และ Ustilaginomycetes โดยมียีสต์ใน 2 ไฟลัมรวม 94 สกุล และ 689 สปีชีส์ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 2 และ 3 และได้กำหนดลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกยีสต์ดังนี้

ตารางที่ 3 การจำแนกประเภทของแอสโคมัยซีตัสยีสต์

Class Order Family[a] Genus	Family[a] Genus
Phylum: Ascomycota "Archiascomycetes" Schizosaccharomycetales Prillinger, Dörfler, Laaser, Eckerlein & Lehle ex Kurtzman Schizosaccharomycetceae Beijerinck ex Klöcker *Schizosaccharomyces* Taphrinales Gäumann & C.W. Dodge *Taphrina* *Lalaria* (Anamorph of *Taphrina*) Protomycetales Luttrell ex D.Hawksworth & O.E. Eriksson Protomycetaceae Gray *Protomyces* ?*Saitoella* (Anamorphic genus) Pneumocystidaceae O.E. Eriksson *Pneumocystis* Euascomycetes ? *Endomyces*[b,c] (*E. scopularum*) *Oosporidium* Hemiascomycetes Saccharomycetales Kudryavtsev (synonym Endomycetales Gäumann) Ascoideaceae J. Schröter *Ascoidea* Cephaloascaceae L.R. Batra *Cephaloascus* Dipodascaceae Engler & E. Gilg *Dipodascus* *Galactomyces* ? *Sporopachydermia* ? *Stephanoascus* ? *Wickerhamiella* ? *Yarrowia* ? *Zygoascus* Endomycetaceae J. Schröter ? *Endomyces*[b,c] (*E. decipiens*) ? *Helicogonium*[b] ? *Myriogonium* ? *Phialoascus* ? *Trichromonascus* Eremotheciaceae Kurtzman *Eremothecium* ? *Coccidiascus*	Lipomycetaceae E.K. Novák & Zsolt *Babjevia* *Dipodascopsis* *Lipomyces* *Zygozyma* Metschnikowiaceae T. Kamienski *Clavispora* *Metschnikowia* Saccharomycetaceae G. Winter ? *Arxiozyma* ? *Citeromyces* ? *Cyniclomyces* ? *Debaryomyces* ? *Dekkera* ? *Issatchenkia* *Kluyveromyces* ? *Lodderomyces* ? *Pachysolen* ? *Pichia* *Saccharomyces* ? *Saturnispora* *Torulaspora* ? *Williopsis* *Zygosaccharomyces* Saccharomycodaceae Kudryavtsev ? *Hanseniaspora* ? *Nadsonia* *Saccharomycodes* ? *Wickerhamia* Saccharomycopsidaceae von Arx & van der Walt ? *Ambrosiozyma* *Saccharomycopsis* Candidaceae Windisch ex van der Walt *Aciculoconidium* *Arxula* *Blastobotrys* *Botryozyma* *Candida* *Geotrichum* *Kloeckera* *Myxozyma* *Schizoblastosporion* *Sympodiomyces* *Trigonopsis*

หมายเหตุ [a] เครื่องหมายคำถามที่อยู่หน้าชื่อสกุลแสดงให้เห็นว่าวงศ์นี้ยังมีการจัดจำแนกที่ไม่คงที่

[b] เครื่องหมายคำถามที่อยู่ในชั้น *Hemiascomycetes* แสดงว่าการจัดจำแนกยังไม่คงที่

[c] เครื่องหมายคำถามที่สกุล *Endomyces* และวงศ์ Endomycetaceae แสดงว่ามีการจัดจำแนกที่ไม่คงที่

ที่มา: Kurtzman and Fell (1998)

ตารางที่ 4 การจำแนกประเภทของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์

Class	Teleomorphic genus	Anamorphic genus
1. Urediniomycetes	*Rhodosporidium*	*Bensingtonia*
	Leucosporidium	*Kurtzmanomyces*
	Kondoa	*Rhodotorula*
	Sporidiobolus	*Sporobolomyces*
	Sakaguchia	*Sterigmatomyces*
	Mastigobasidium	
	Erythrobasidium	
2. Hymenomycetes	*Bulleromyces*	*Bullera*
	Cystifilobasidium	*Cryptococcus*
	Fibulobasidium	*Fellomyces*
	Filobasidiella	*Kockovaella*
	Holtermannia	*Phaffia*
	Itersonilia	*Trichosporon*
	Mrakia	*Tsuchiyaea*
	Sirobasidium	*Udeniomyces*
	Sterigmatosporidium	
	Tremella	
	Xanthophyllomyces	
3. Ustilaginomycetes	*Ustilago*	*Malassezia*
	Tilletia	*Pseudozyma*
		Rhodotorula (in part)
		Sympodiomycopsis
		Tilletiopsis

ที่มา: Nakase (2001)

2.1 การจัดจำแนกยีสต์โดยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม

สำหรับการจัดจำแนกยีสต์โดยวิธีดั้งเดิมอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเป็นหลักดังนี้ (Yarrow, 1998)

2.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

เป็นการศึกษาสัณฐานวิทยาของยีสต์ทั้งที่อยู่ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยทั่วไปการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกประเภทได้ในระดับสกุลหรือสูงกว่าสกุล (สาวิตรี, 2549) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนก ได้แก่ รูปร่างของเซลล์ การเจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม การสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศภายในเซลล์ การสร้างคลามัยโดสปอร์ การสร้างบอลลิสโตสปอร์ การสร้างแอสโคสปอร์ การสร้างเบสิดิโอสปอร์ การตรวจหาเมติงไทป์ (Yarrow, 1998)

2.1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีมีความสำคัญในการจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์และสกุล การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีสำหรับการจัดจำแนกยีสต์หลายลักษณะไม่มีวิธีการทดสอบที่เป็นมาตรฐาน ผลการทดสอบที่ได้จึงมักขึ้นอยู่กับเทคนิคและวิธีที่เลือกนำมาทดสอบ (Yarrow, 1998) ลักษณะทั่วไปที่นิยมใช้ในการจัดจำแนก ได้แก่ การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรท การใช้สารประกอบคาร์บอน การใช้สารประกอบไนโตรเจน การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน การเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิอื่น ๆ การสร้างกรดจากการใช้กลูโคส การสร้างการประกอบอมัยลอยด์ การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การทนต่อไซโคลเฮกซิมีด การทนต่อกรดอะซิติกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ การใช้เจลาติน การทดสอบปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี การทนต่อ คานาวานีน-ไดลซีน-โบรโมไธมอลบลู การสังเคราะห์เมลานินบนไดไฮดรอกซีฟีนิลานีน จำนวนโครโมโซม เป็นต้น

2.2 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมี

อนุกรมวิธานเคมี คือการประเมินองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งมีชีวิต ทั้งสารแมแทบอไลต์ปฐมภูมิและสารแมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (สาวิตรี, 2549) ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ได้แก่ ชนิดของโคเอนไซม์คิว องค์ประกอบของผนังเซลล์ ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น ปริมาณกัวนีนและไซโท-

ซีน ปกติการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมีจะใช้ร่วมกับการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

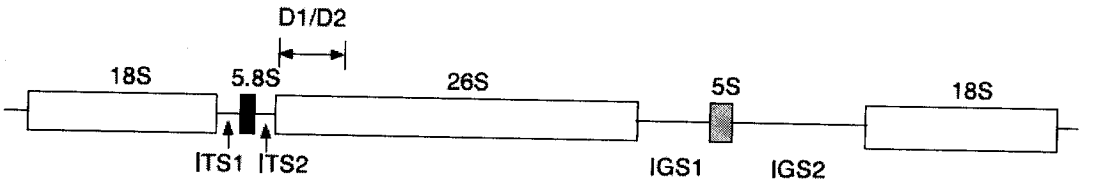
2.3 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

การศึกษาระดับโมเลกุลเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยให้การจัดจำแนกยีสต์เป็นไปอย่างถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมีนั้นเป็นการตรวจลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ การแสดงออกหรือผลที่ได้จากการทดสอบจึงอาจมีการเปลี่ยนแปลงไม่คงที่ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ และสภาพแวดล้อมในการบ่ม ทำให้มักได้ผลการจัดจำแนกที่ผิดพลาด อีกทั้งยังต้องใช้แรงงานและเวลาในการทดสอบมากอีกด้วย ปัจจุบันจึงมีการนำอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลซึ่งให้ผลที่แม่นยำกว่าเนื่องจากเป็นการศึกษาลักษณะทางยีโนไทป์โดยตรง เข้ามาช่วยในการจัดจำแนก นอกจากนี้อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอยังสามารถสะท้อนถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้อย่างชัดเจน ซึ่งวิธีการจัดจำแนกด้วยวิธีดั้งเดิมไม่สามารถทำได้ การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลประกอบด้วย การศึกษาในระดับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และการศึกษาดีเอ็นเอในนิวเคลียส ได้แก่ การทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน การหาปริมาณกัวนีนและไซโทซีน การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคต่าง ๆ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรดนิวคลีอิก (สาวิตรี, 2549)

ในบรรดาวิธีการต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว ในปัจจุบันกล่าวได้ว่า การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือและได้รับความนิยมมากที่สุด การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอยืนอยู่บนหลักการพื้นฐานที่ว่า ยีโนมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดประกอบด้วยบริเวณที่มีอัตราการวิวัฒนาการแตกต่างกันหลายบริเวณ และความแตกต่างนี้เองที่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นการเลือกบริเวณที่จะใช้ในการศึกษาระดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจึงมีความสำคัญมาก (Valente และคณะ, 1999) บริเวณที่นิยมใช้ในการศึกษาได้แก่ ดีเอ็นเอและอาร์เอนเอของไรโบโซม ทั้งในหน่วยย่อยขนาดใหญ่ และหน่วยย่อยขนาดเล็ก และดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย

สำหรับการศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์นั้นนิยมศึกษาดีเอ็นเอไรโบโซม เนื่องจากไรโบโซมเป็นออร์แกเนลที่ปรากฏในทุกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกัน แม้ว่าในเซลล์หนึ่งเซลล์จะมีไรโบโซมหลายชุด แต่ทุกชุดก็มีวิวัฒนาการเช่น เดียวกัน นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอของไรโบโซมยังมีทั้งส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อย หรือบริเวณอนุรักษ์ และส่วนที่วิวัฒนาการมากหรือวิวัฒนาการเร็วที่เรียกว่าบริเวณผันแปร หรือบริเวณอนุรักษ์น้อย ทำให้สามารถใช้

บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิงเพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณผันแปรได้ (สาวิตรี, 2549) โดยให้ความสำคัญกับทั้งบริเวณที่มีการ และบริเวณที่ไม่มีการแสดงออก บริเวณที่มีการแสดงออกที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ โดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์) และ 18S rDNA (ความยาวประมาณ 1700 นิวคลีโอไทด์) ส่วนบริเวณที่ไม่มีการแสดงออกที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกอีกบริเวณหนึ่งคือ internal transcribed spacer (ITS) ทั้ง ITS1 และ ITS2 (ความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์) (Scorzetti และคณะ, 2002) ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างดีเอ็นเอไรโบโซม แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างดีเอ็นเอไรโบโซม; 18S rDNA, 5.8S rDNA, 26S rDNA, 5S rDNA, ITS (internal transcribed spacer) และ IGS (intergenic spacer)

ที่มา: Sugita and Nishikawa (2003)

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Kurtzman และ Robnett (1998) ซึ่งได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 500 สปีชีส์ และ Fell และคณะ (2000) ที่ได้ศึกษาเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 230 สปีชีส์ พบว่า สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ในการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้เป็นอย่างดี

โดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA มีขนาด 600 นิวคลีโอไทด์ อยู่ที่ปลายด้าน 5' ของ 26S rDNA ใน *Saccharomyces cerevisiae* คือ นิวคลีโอไทด์ที่ 63-642 ของ rRNA เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็ว จึงมีความแตกต่างมากพอที่จะใช้จำแนกสปีชีส์ของยีสต์ได้ ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในการเพิ่มจำนวนในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ NL-1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) และ NL-4 (5'-GGTCC GTGTTTCAAGACGG) เกณฑ์ที่ใช้ในการจัดจำแนกเป็นไปตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น คือ ยีสต์สปีชีส์เดียวกันเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ควรมีมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ หรือเกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 6 นิวคลีโอไทด์ ถ้ามีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันมากกว่านี้ให้จัดเป็นยีสต์ต่างสปีชีส์ (Kuztman and Robnett, 1998) ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการเลือกบริเวณที่จะใช้ในการศึกษาระดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการมีความสำคัญมาก ดังนั้นการเลือกใช้บริเวณใดในการจัดจำแนกจึงควรคำนึงถึงระดับความเร็วในการวิวัฒนาการของยีนในบริเวณนั้น ว่าควรมีอัตราการวิวัฒนาการอยู่ในระดับที่พอ เหมาะ ไม่เร็วเกินไปจนยากในการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม แต่ก็ไม่ควรช้า

เกินไปจนไม่สามารถใช้แยกสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก ๆ ได้ นอกจากนี้ความยาวของบริเวณที่ต้อง การวิเคราะห์ก็มีความสำคัญ ความยาวที่พอเหมาะไม่สั้นหรือยาวเกินไปจะทำให้ผลการจัดจำแนกนั้นมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น (Valente และคณะ, 1999)

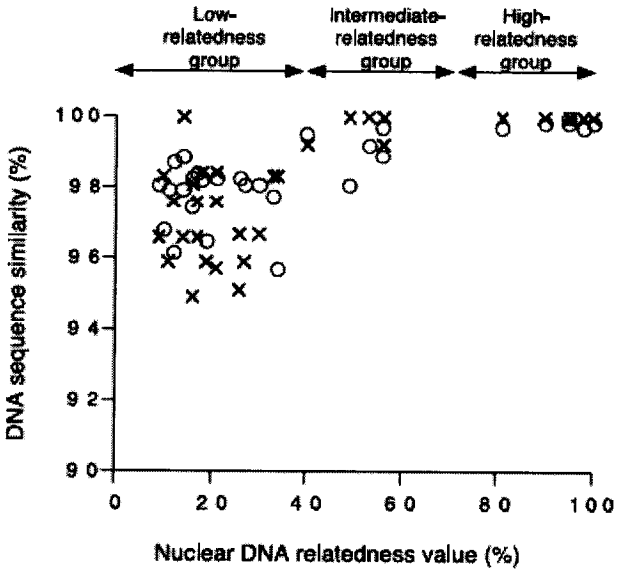
สำหรับบริเวณที่ไม่มีการแสดงออกที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์คือ บริเวณ spacer ของ 26S rDNA ซึ่งมีหลายบริเวณที่ทำการศึกษา เช่น internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer (IGS) ซึ่งนิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ ราอื่น และพืช บริเวณ ITS เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของ 18S rDNA ของหน่วยย่อยขนาดเล็กของไรโบโซมกับปลายด้าน 5' ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซม โดยประกอบด้วยบริเวณ ITS1 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S rDNA กับ 5S rDNA และบริเวณ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่าง 5S rDNA กับ 26S rDNA (ภาพที่ 1) ความยาวของบริเวณ ITS แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสปีชีส์ แต่สายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีความยาวค่อนข้างคงที่แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์อาจมีการผันแปรสูง ทำให้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมทำได้ยากและทำให้การใช้บริเวณ ITS ในการจัดจำแนกมีข้อจำกัดคือ ใช้ในการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากเท่านั้น เช่น การแยกสปีชีส์ที่วิเคราะห์ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 แล้วพบว่ามีความใกล้ชิดกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ จึงจะทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ส่วนบริเวณ IGS เดิมเรียกว่า non-transcribed spacer (NTS) ประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ IGS1 อยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซมกับปลาย 5' ของ 5S rDNA และ IGS2 ซึ่งอยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของ 5S rDNA กับปลาย 5' ของ 18S rDNA ของหน่วยย่อยขนาดเล็กของไรโบโซมชุดถัดไป (ภาพที่ 1) บริเวณนี้เป็นบริเวณที่ได้รับความสนใจน้อยสำหรับการจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์ เนื่องจากมีความแปรผันสูง (Valente *et al.*, 1999)

Kurtzman และ Robnett (1998) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และบริเวณ 18S rDNA ของแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ยีสต์สกุล *Candida* และยีสต์สกุลที่มีการการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศกลุ่มอื่น พบว่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองบริเวณมีความสอดคล้องกัน ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA หากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ใน 600 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 คือ มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 6 นิวคลีโอไทด์ สายพันธุ์นั้นจะถูกจัดเป็นคนละสปีชีส์ และสายพันธุ์ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่าง กัน 0-3 นิวคลีโอไทด์จัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก (Kurtzman and Robnett, 1998)

จากการเปรียบเทียบการจัดจำแนกยีสต์สกุล *Trichosporon* โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS1 กับความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำดีเอ็นเอไฮบริได-

เซชัน พบว่าจากกราฟความสัมพันธ์ (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าในยีสต์กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันสูงมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS1 สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเป็นยีสต์ในสปีชีส์เดียวกันจริง เพราะเกณฑ์ในการจัดจำแนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS1 ตามวิธีของ Pharmaceutical Society of Japan และ Japanese Pharmacopoeia ระบุไว้ว่าในยีสต์สปีชีส์เดียวกันความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ควรมีมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับบริเวณ ITS1 นั้นควรมีความเหมือนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์จึงจะจัดเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกันได้ และเมื่อพิจารณาในยีสต์กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันปานกลาง และยีสต์กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันต่ำจะเห็นว่า ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ให้ผลเป็นไปตามเกณฑ์ในการจัดจำแนกทั้งในแบบการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน แต่เมื่อพิจารณากรณีของ ITS1 แล้วกลับไม่เป็นไปตามนั้น ไม่ว่าจะเป็นยีสต์กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันปานกลางหรือต่ำ ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1 ก็มีค่ามากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์เสมอ ซึ่งตามเกณฑ์ของ Japanese Pharmacopoeia จะจัดให้เป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกันทั้งหมด ผลที่ได้นี้ไม่ตรงกับผลจากการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน สรุปได้ว่า การจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 มีความแม่นยำน้อยกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และอาจทำให้ผลการจัดจำแนกผิดพลาดได้ง่าย (Sugita and Nishikawa, 2003)

การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์นอกจากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ-ไทด์บน rDNA แล้วยังมีอีกวิธีการหนึ่งซึ่งได้รับความนิยมและมีความแม่นยำสูง คือ ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน หรือดีเอ็นเอรีแอสโซซิเอชัน ซึ่งนิยมใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับสปีชีส์ ปกติเมื่อดีเอ็นเอสายคู่ได้รับความร้อนจะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และเมื่ออุณหภูมิค่อย ๆ ลดลง ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นสายคู่สมจะกลับมาจับกันเป็นดีเอ็นเอสายคู่อีกครั้งเรียกว่าเกิดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน หรือดีเอ็นเอรีแอสโซซิเอชัน การจับคู่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวสองสาย ดังนั้นถ้านำดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากจุลินทรีย์สองสายพันธุ์มาทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันจะสามารถบอกถึงความเหมือนและความแตกต่างของจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ ได้ โดยทั่วไปถ้าความสัมพันธ์มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์นั้นถือว่าอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ถ้าความสัมพันธ์เท่ากับ 40-70 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์นั้นถือว่าเป็นพันธุ์ของสปีชีส์เดียวกันแม้ว่าผลจาก genetic cross จะแสดงว่าไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ และถ้าความสัมพันธ์เท่ากับ 0-40 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไม่ได้เป็นสมาชิกในสปีชีส์เดียวกัน (สาวิตรี, 2549) แต่อย่างไรก็ตามจะต้องพิจารณาร่วมกับลักษณะอื่นด้วย เช่น ความสามารถในการสร้างสปอร์โดยอาศัยเพศและการมีชีวิตของสปอร์เหล่านั้น ในกรณีของ *Issatchenkia scutula* var. *scutala* และ *Issatchenkia scutula* var *exigua* มีค่าความสัมพันธ์ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ คือ ประมาณ 21-26 เปอร์เซ็นต์ แต่จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน เนื่องจากเกิดคอนจูเกชันได้ดีและให้แอสโคสปอร์ที่มี



ภาพที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสจากการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน และความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS1 ของยีสต์สกุล *Trichosporon* ในกลุ่มต่าง ๆ คือ (1) กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันสูง ซึ่งมีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสเท่ากับ 70-100 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน (2) กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันปานกลาง ซึ่งมีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสเท่ากับ 40-70 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นพันธุ์ (varity) ของสปีชีส์เดียวกัน (3) กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันต่ำ ซึ่งมีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสเท่ากับ 0-40 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าไม่ได้เป็นสมาชิกในสปีชีส์เดียวกัน, × คือ ITS1 และ ○ คือ โดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

ที่มา: Sugita และ Nishikawa, 2003

ชีวิต ส่วนยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* แต่ละสปีชีส์แม้จะมีค่าความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันแต่จัดให้อยู่ต่างสปีชีส์เนื่องจากมีลักษณะอื่นแตกต่างกัน (มณี, 2544) ดังนั้นการศึกษาความความเหมือนและความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันจึงสามารถช่วยยืนยันผลการจัดจำแนกยีสต์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS ได้ และยังช่วยในการหาสายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันของโฮโมทาลลิกสปีชีส์และยีสต์ที่ไม่สร้างสปอร์ได้อีกด้วย (สาวิตรี, 2549)

3. <u>ป่าชายเลน</u>

ความหมายของคำว่า ป่าชายเลน (mangrove forest หรือ intertidal forest) หรือป่าโกงกาง ตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ. ศ. 2542 คือ "ป่าที่อยู่ตามชายทะเลที่มีเลน และน้ำทะเลขึ้นถึง ต้นไม้ในป่าประเภทนี้มักมีรากงอกอยู่เหนือพื้นดินเพื่อค้ำยันลำต้น โดยมากเป็นไม้โกงกาง แสม และลำพู"

สำหรับคำว่า mangrove forest นั้นเริ่มมีการใช้เป็นครั้งแรกในราวปี ค. ศ. 1878 โดย Bowman มาจากคำว่า "mangue" ในภาษาโปรตุเกส ซึ่งหมายถึงสังคมพืชที่ขึ้นอยู่ตามชายฝั่งทะเลดินเลน (สนิท, 2542) นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความหมายของป่าชายเลนมากมายไว้ดังนี้ ปี ค. ศ. 1903 Schimper ได้ให้ความหมายไว้ว่า "ป่าชายเลน" เป็นสังคมพืชที่ขึ้นอยู่ตามบริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ หรืออ่าว ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึงในช่วงที่ระดับน้ำทะเลขึ้นสูงสุด และได้ให้ชื่ออีกอย่างไว้ว่า "tidal forest" ปี ค. ศ. 1962 Du ได้ให้ความหมายของป่าชายเลนไว้อย่างกว้างขวางสองประการคือ ประการแรก หมายถึงสังคมพืชที่ประกอบด้วยพันธุ์ไม้หลายชนิด หลายตระกูล และเป็นพวกที่มีใบสีเขียวตลอดทั้งปี ซึ่งมีลักษณะทางสรีรวิทยาและความต้องการสิ่งแวดล้อมที่คล้ายกัน และประการที่สองหมายถึง กลุ่มของสังคมพืชที่ขึ้นบริเวณปากอ่าว ชายฝั่งทะเลบริเวณเขตร้อน ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยไม้สกุลโกงกาง (*Rhizophora* spp.) เป็นไม้สำคัญและมีไม้ตระกูลอื่นปนอยู่บ้าง (สนิท, 2542) ปี ค. ศ. 1983 Saenger และคณะ ให้คำจำกัดความของป่าชายเลนว่า เป็นกลุ่มของพืชในเขตร้อนหรือกึ่งเขตร้อนที่ขึ้นอยู่ตามพื้นที่ชายฝั่ง และในปี ค. ศ. 1984 Hamilton และ Snedaker ได้ให้คำนิยามว่า ป่าชายเลนคือ ระบบนิเวศวิทยาของป่าชายฝั่งที่ทนต่อสภาพความเค็มได้ (อาณัติ, 2531)

ป่าชายเลนเป็นป่าไม่ผลัดใบที่พบทั่วไปบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ อ่าวหรือทะเลสาบที่มีการสะสมตะกอนดิน สองข้างลำคลองที่ต่อเนื่องกับทะเล และเกาะขนาดเล็กที่มีการทับถมของตะกอนดิน ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึงในประเทศแถบโซนร้อน โดยปัจจัยจำกัดที่ทำให้เกิดสังคมพืชชนิดนี้คือ สภาพของดินที่เป็นตะกอนดิน การขึ้นลงของน้ำทะเล การท่วมของน้ำทะเลหรือน้ำกร่อย และการที่ดินขาดออกซิเจน ทำให้พันธุ์ไม้ที่เจริญในบริเวณดังกล่าวต้องมีการปรับตัวให้รับกับสภาพแวดล้อมหลายประการที่ไม่พบในสังคมพืชชนิดอื่น เช่น การมีรากค้ำยัน เพื่อค้ำยันให้ลำต้นตั้งตัวอยู่ได้บนตะกอนดินซึ่งมีความอ่อนสูง การมีรากอากาศช่วยในการหายใจ การมีใบหนาอวบน้ำ การมีไขเคลือบที่ผิวเพื่อลดการคายน้ำ การมีต่อมขับเกลือที่ใบ เป็นต้น อาหารปฐมภูมิของสิ่งมีชีวิตในป่าชายเลน คือ อินทรียวัตถุที่ย่อยสลายจากซากพืชในป่าชายเลน ปริมาณเฉลี่ยของซากพืชในป่าชายเลนมีค่าประมาณสูงถึง 1.1-1.5 ตันแห้ง/ไร่/ปี ซากพืชซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูงจะเป็นแหล่งอาหารหลักสำหรับผู้บริโภคปฐมภูมิในป่าชายเลนเช่น หอย ปู และหนอนปล้อง ซึ่งสามารถเปลี่ยนซากพืชให้กลายเป็นอินทรียวัตถุขนาดเล็กลงโดยผ่านระบบย่อยอาหาร นอกจากนี้ยังมีสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำที่ได้จากการย่อยสลายของอินทรียวัตถุในป่าชายเลน ซึ่งจุลินทรีย์ แพลงตอนพืช และแพลงตอนสัตว์ใช้เป็นแหล่งอาหารได้ ด้วยปัจจัยดังกล่าวทำให้ป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์สูง ในด้านนิเวศวิทยาป่าชายเลนมีความสำคัญในฐานะเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและที่อนุบาลสัตว์น้ำในระยะตัวอ่อน เช่น กุ้ง หอย ปู หนอนปล้อง และปลาบางชนิด (สนิท, 2542; สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2531; [สผ.], 2547)

3.1 การกระจายตัวของป่าชายเลนในประเทศไทย

ประเทศไทยมีพื้นที่ 512,820 ตร. กม. มีความยาวชายฝั่งทะเล 2,612 กม. แบ่งเป็นชายฝั่งทะเลอ่าวไทย 1,873 กม. และชายฝั่งทะเลอันดามัน 739 กม. มีป่าชายเลนปกคลุมอยู่ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของความยาวชายฝั่ง จากการสำรวจโดยภาพถ่ายดาวเทียมในปี พ. ศ. 2539 พบว่ามีพื้นที่ป่าชายเลนเหลืออยู่ 1,047,387.5 ไร่ โดย 80 เปอร์เซ็นต์เป็นพื้นที่ป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน และอีก 20 เปอร์เซ็นต์เป็นพื้นที่ป่าชายเลนบริเวณฝั่งอ่าวไทย แต่จากข้อมูลล่าสุดของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งในปี พ. ศ. 2547 พบว่าป่าชายเลนบริเวณฝั่งอ่าวไทยเพิ่มขึ้นเป็น 446,062 ไร่ เนื่องจากมีการอนุรักษ์และฟื้นฟูทรัพยากรป่าชายเลนบริเวณฝั่งอ่าวไทยเพื่อเพิ่มพูนสัตว์น้ำและรักษาสมดุลของระบบนิเวศน์ชายฝั่งทะเล (สนใจ, 2548) ป่าชายเลนในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 4 เขตใหญ่ (สนิท, 2542) ดังนี้

เขต 1 บริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันออกของอ่าวไทย จากจังหวัดตราดถึงชลบุรี

เขต 2 บริเวณฝั่งทะเลตอนใต้ของที่ราบเจ้าพระยา จากจังหวัดสมุทรปราการถึงสมุทรสงคราม

เขต 3 บริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันตกของอ่าวไทย จากจังหวัดเพชรบุรีถึงนราธิวาส

เขต 4 บริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันออกของของทะเลอันดามัน จากจังหวัดระนองถึงสตูล

ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้จะทำการวิจัยในป่าชายเลนเขต 1 และ 3 คือ บริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันออกของอ่าวไทย ในจังหวัดจันทบุรีและตราด และบริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันตกของอ่าวไทย ในจังหวัดเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

3.2 ป่าชายเลนในบริเวณอ่าวไทย

ป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยคือ ป่าชายเลนในเขต 1 – 3 ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ฝั่งตะวันออก ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณปากแม่น้ำหรือปากอ่าว และบริเวณชายฝั่งที่มีคลื่นไม่รุนแรงนัก ป่าชายเลนตลอดแนวชายฝั่งอ่าวไทยในปี พ. ศ. 2547 มีพื้นที่ 446,062 ไร่ โดยแบ่งเป็นพื้นที่ในภาคกลาง 67,963 ไร่ ภาคตะวันออก 165,205 ไร่ และภาคใต้ฝั่งตะวันออก 212,894 ไร่ จากรายงานของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งในปี พ. ศ. 2548 พบว่า จังหวัดที่มีป่าชายเลนหนาแน่นได้แก่ ปัตตานี นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ชุมพร จันทบุรี และตราด (สนใจ, 2548)

ระบบนิเวศของป่าชายเลนเกิดจากการผสมผสานระหว่างสภาพแวดล้อมของทะเลและแผ่นดินบริเวณชายฝั่ง ดังนั้นการกระจายตัวของป่าชายเลนจึงขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อมหลายอย่าง ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ สภาพภูมิอากาศ สภาพดิน และน้ำ

3.2.1 สภาพภูมิอากาศ

ภูมิอากาศของประเทศไทยได้รับอิทธิพลจากมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ และมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ทำให้เกิดการพัดของลมจากตะวันตกเฉียงใต้และลมจากตะวันออกเฉียงเหนือพัดผ่านประเทศไทย (อาณัติ, 2531)

3.2.2 สภาพดิน

ดินในป่าชายเลนเป็นดินที่เกิดจากการทับถมของดินตะกอนในแม่น้ำที่ไหลลงสู่บริเวณที่มีน้ำนิ่ง (อาณัติ, 2531) และการตกตะกอนของสารแขวนลอยในน้ำ ตลอดจนการสลายตัวของอินทรีย์สารตามช่วงเวลาทับถมที่แตกต่างกัน (สนิท, 2542) โดยพบมีการตกตะกอนของอนุภาคดินที่มีขนาดใหญ่ประเภทกรวดและทรายก่อน จากนั้นจึงมีการตกตะกอนของดินทรายแป้งและดินเหนียว ดินในป่าชายเลนมีปริมาณเกลือสูงและมีสัดส่วนของน้ำมาก ปริมาณออกซิเจนน้อย แต่มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ค่อนข้างสูง เนื้อดินมีลักษณะละเอียด แฉะ เหลวไม่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน และมีปริมาณอินทรียวัตถุสูง (อาณัติ, 2531)

3.2.3 น้ำ

ป่าชายเลนในประเทศไทยส่วนใหญ่พบในบริเวณที่มีความเค็มของน้ำระหว่าง 10 – 30 ppt เมื่อพิจารณาจากลักษณะการเจริญเติบโตของไม้ในป่าชายเลน พบว่าป่าชายเลนจำเป็นที่จะต้องมีน้ำทะเลท่วมถึงเป็นครั้งคราว (อาณัติ, 2531) เนื่องจากพรรณไม้ในป่าหลายชนิดเป็นพันธุ์ไม้ป่าชายเลนแท้ซึ่งขึ้นได้เฉพาะบริเวณที่เป็นน้ำเค็มหรือน้ำกร่อยเท่านั้น มีรายงานว่าป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยมีพันธุ์ไม้ 71 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นพันธุ์ไม้ป่าชายเลนแท้ 27 ชนิด และอีก 44 ชนิด เป็นพันธุ์ไม้ที่ปรับตัวกับสภาพความเค็มเพื่อให้ขึ้นอยู่ร่วมกับพันธุ์ไม้ป่าชายเลนแท้ในบริเวณที่มีน้ำทะเลท่วมถึงได้ พันธุ์ไม้ป่าชายเลนแท้ที่พบทั่วไปได้แก่ พันธุ์ไม้ในวงศ์ Avicenniaceae (แสม) วงศ์ Rhizophoraceae (โกงกาง ถั่ว โปรง และพังกาหัวสุม) และวงศ์ Sonneratiaceae (ลำพูและลำแพน) (สนใจ, 2548) นอกจากนี้โดยธรรมชาติแล้วการขึ้นอยู่ของพันธุ์ไม้ในป่าชายเลนในบริเวณอ่าวไทยมีการแบ่งเขตที่ชัดเจน เนื่องมาจากความสามารถในการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับระดับพื้นที่ที่น้ำทะเลท่วมถึงที่แตกต่างกัน และปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ เช่น ชนิดและความเค็มของดิน ตัวอย่างการศึกษาการจัดโซนของพันธุ์ไม้ในป่าชายเลน เช่น ในปี ค. ศ. 1975 Aksornkoae ได้ศึกษาพันธุ์ไม้เด่นในป่าชายเลนภาคตะวันออกของไทย และได้สรุปรูปแบบของโซนต่าง ๆ จากริมแม่น้ำจนถึงพื้นที่บนบกที่ห่างจากชายฝั่ง ได้แก่ โกงกางใบเล็กและโกงกางใบใหญ่ เป็นพันธุ์ไม้เด่นบริเวณริมแม่น้ำและชายฝั่งทะเล ในขณะที่แสมและไม้ถั่วที่ขึ้นร่วมกับโกงกางในพื้นที่บริเวณที่อยู่ถัดเข้าไปบนฝั่งเป็น

อีกโซนหนึ่ง ถัดจากโซนนี้ขึ้นไปจะเป็นโซนของตะบูนและตาตุ่ม ซึ่งมีพื้นดินเลนแข็งกว่า เนื่องจากมีน้ำท่วมน้อย และยังพบไม้โปรงและไม้ฝาดในบริเวณนี้อีกด้วย สำหรับไม้เสม็ดจะมีมากในบริเวณชายฝั่งเหนือป่าชายเลน เนื่องจากได้รับอิทธิพลของน้ำทะเลน้อยมาก มีน้ำจืดขังอยู่ทั่วไปในพื้นที่ (สนใจ, 2548)

วิธีการวิจัย

1. <u>ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา</u>

ยีสต์ที่รวบรวมไว้ 112 สายพันธุ์ แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลน 5 แหล่ง อยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลด้านตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน 3 แหล่ง คือ (1) ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน (2) ป่าชายเลนอำเภอคลองใหญ่ ในจังหวัดตราด และ (3) ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศน์ป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี และอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลด้านตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน 2 แหล่ง คือ (1) โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี และ (2) วนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

สำหรับยีสต์ 112 สายพันธุ์นั้น แบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (membrane filtration) 69 สายพันธุ์ โดยได้จากตัวอย่างน้ำในจังหวัดตราดและจันทบุรีบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย 47 สายพันธุ์ และได้จากตัวอย่างน้ำในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์บริเวณชายฝั่งด้านตะวันตกของอ่าวไทย 22 สายพันธุ์ และแบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนดินใต้น้ำด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวน (enrichment technique) 43 สายพันธุ์ โดยได้จากตัวอย่างตะกอนดินในจังหวัดตราดและจันทบุรีบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย 18 สายพันธุ์ และได้จากตัวอย่างตะกอนดินในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์บริเวณชายฝั่งด้านตะวันตกของอ่าวไทย 25 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยที่นำมาจัดจำแนก

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ยีสต์จากน้ำ		ยีสต์จากตะกอนดิน		รวม
	รหัส	จำนวน	รหัส	จำนวน	
ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	EA1, EA4, EA5, EA8, EA9, EA10, EA12, EA14, EA16, EA17, EA18, EA20, EA21, EA22, EA23, EA25, EA28, W1, W2, W5, W7, W11, W13	23	EA30, EA31, EA32, EA33, EA35, EA36	6	29
ป่าโกงกาง อ.คลองใหญ่ จ. ตราด	EF1, EF2, EF3, EF4, EF5, W27	6	EF6, EF7, EF8, EF9, EF10, EF11, EF12, EF13, EF14, EF15, EF16, EF17	12	18
ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	EE1, EE2, EE3, EE4, EE5, EE6, EE7, EE8, EE11, EE12, EE13, EE14, EE15, EE16, W61, W62, W63, W64	18	-	0	18
โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	WA1, WA10, WA11, WA12	4	WA3, WA4, WA6, WA7, WA8, WA9	6	10
วนอุทยานปราณบุรี อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	WB1,WB2, WB3, WB4, WB6, WB7, WB8, WB9, WB10, WB11, WB12, WB13, WB15, WB16, WB17, WB18, WB19, WB43	18	WB20, WB22, WB24, WB25, WB26, WB27, WB28, WB29, WB30, WB31, WB32, WB33, WB34, WB35, WB36, WB37, WB38, WB41, WB42	19	37
รวม		69		43	112

2. การเก็บรักษายีสต์

เก็บรักษายีสต์ทั้งหมดที่ศึกษาใน YM broth ที่มีกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

3. การจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lachance *et al.* (1999) มีขั้นตอนดังนี้ เตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตรในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เชื้อที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอควรมีอายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง นำหลอดที่มีเซลล์แขวนลอยใส่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นจึงแช่ในน้ำเดือดอุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และนำกลับไปแช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสอีกครั้ง เป็นเวลา 30 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยการเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายใสเหนือตะกอนที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนโดเมน D1/D2 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA โดยวิธี PCR ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kurtzman และ Robnett (1998) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) เป็น forward primer และ NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) เป็น reverse primer การเตรียม PCR mixture reaction มีดังนี้

Sterile reverse osmosis water	17.25	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	3	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25 mM)	2.4	ไมโครลิตร
dNTP (25 mM)	2.4	ไมโครลิตร
Primer NL1 (20 pmol)	0.9	ไมโครลิตร

Primer NL4 (20 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Taq polymerase (Fermentas; 5 U/μl)	0.15	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร
Total volume	30	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมเสร็จแล้วใส่เครื่อง PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, USA) ที่ตั้งโปรแกรมการเพิ่มลดอุณหภูมิดังนี้

1. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที

2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่คู่ของดีเอ็นเอแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว)

3. อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นที่ลดอุณหภูมิลงมาเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA template ที่ complementary กันได้)

4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ในทิศ 5' ไป 3')

5. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ จากนั้นจึงตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล-อิเล็คโทรโฟรีซีส โดยใช้ไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ และส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transilluminator (Bioinstrument – ATTO, Yamato) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA marker (Fermentas, USA) แล้ว PCR product ที่ได้ควรมีขนาด 500 – 600 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดความยาวของโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

3.3 การทำให้ PCR product บริสุทธิ์

ทำให้ PCR product บริสุทธิ์โดยใช้ QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีจากบริษัทผู้ผลิต โดยเติม PB buffer ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product ลงใน QIA quick column จากนั้นจึงดูด PCR product ที่เหลือจากการทำของเจลอิเล็คโทรโฟรีซีสทั้งหมดใส่ตามลงไปในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทิ้งไป จากนั้นจึงเติม PE buffer ที่เติมเอทานอลแล้ว 750 ไมโครลิตร เหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทิ้งไป เหวี่ยงอีกครั้งที่ 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ค้างอยู่ในคอลัมน์ นำหลอดคอลัมน์ที่มีแผ่นกรอง (ซึ่งมีดีเอ็นเอติดอยู่) ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ เติม

น้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 15 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกรอง เพื่อละลายดีเอ็นเอ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นจึงเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 1 นาที PCR product ที่ผ่านการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์แล้วจะถูกชะลงสู่หลอดใหม่ ตรวจสอบปริมาณ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็ค - โทรโฟรีซีส

3.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) ไพรเมอร์ที่ใช้คือ NL1 และ NL4 เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA เตรียม reaction mixture ดังนี้

Sterile reverse osmosis water	3.5	ไมโครลิตร
5X sequencing buffer	1.5	ไมโครลิตร
BigDye	2	ไมโครลิตร
Primer NL1 หรือ NL4 (1.6 pmol)	1	ไมโครลิตร
DNA template	2	ไมโครลิตร
Total volume	30	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมเสร็จแล้วใส่เครื่อง PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, USA) ที่ตั้งโปรแกรมการเพิ่มลดอุณหภูมิดังนี้

1. อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 30 วินาที
2. อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่คู่ของดีเอ็นเอแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว)
3. อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 5 วินาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นที่ลดอุณหภูมิลงมาเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA template ที่ complementary กันได้)
4. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ในทิศ 5' ไป 3')
5. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 25 รอบ จากนั้นจึงนำ PCR product ที่ได้มาตกตะกอนด้วยสารละลายผสมเอทานอลและโซเดียมอะซีเตท ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ

14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดีเอ็นเอจะถูกเหวี่ยงตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งอย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันการสูญเสียปริมาณดีเอ็นเอไปในขั้นตอนนี้ เติม 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ปริมาตร250 ไมโครลิตร เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งอย่างระมัดระวัง จากนั้นจึงทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยใช้ Thermolyne (Type 17600 DriBath, USA) ที่ตั้งอุณหภูมิ 90 องศาเซล - เซียส สุดท้ายจึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI PRISM 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, USA)

3.5 การจัดจำแนกยีสต์โดยเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของยีสต์ชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih. gov/blast) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul *et al.*, 1997) และใช้เกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) ในการระบุว่าเป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วหรือที่รู้จักแล้ว หรือเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีรายงานหรือสปีชีส์ใหม่ โดยพิจารณาจากหลักเกณฑ์คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 บน 26S rDNA กับของยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด หากพบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จัดเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกัน แต่ถ้าหากมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จะจัดเป็นยีสต์ต่างสปีชีส์กัน

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทำโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันด้วยโปรแกรม Clustal X ver 1.8 (Thompson *et al.*, 1997)

4. <u>การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ใหม่ด้วยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี</u>

วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการจำแนกประเภทของยีสต์ ปัจจุบันทำตามวิธีของ D. Yarrow ในหนังสือ The Yeast, A Taxonomic Study ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 4 โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ลักษณะทางเคมี ชีวเคมีและสรีรวิทยา (Yarrow, 1998) ดังต่อไปนี้

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.1.1 สัณฐานวิทยาของยีสต์ในอาหารเหลว

เพาะยีสต์ลงใน YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 3-5 วัน จากนั้นจึงตรวจสอบรูปร่าง ขนาด ลักษณะการแตกหน่อ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว

เพาะยีสต์ลงใน YM agar และ YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งโดยการสังเกตความหยาบละเอียดของผิวเนื้อ สี ผิวหน้า ลักษณะการนูนของโคโลนี และขอบโคโลนี สำหรับการสังเกตการเจริญในอาหารเหลวนั้น จะรายงานผลเป็นว่าลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ ยีสต์จับตัวกันเป็นก้อนแข็ง เป็นก้อนเหนียว ตกตะกอนที่ก้นหลอด ตกเป็นตะกอนที่คล้ายเมือก จับเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด จับกันเป็นเม็ดเล็ก ๆ และลอยเป็นฝ้าที่ผิวหน้า

4.1.3 การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อบนสไลด์

ศึกษาการสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมโดยการจุ่มสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงใน molten agar ที่หลอมเหลว จากนั้นจึงนำสไลด์ที่ผ่านการชุบอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางบนแท่งแก้วโค้งงอที่อยู่ในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ รอจนอาหารแข็งตัว จะได้แผ่นสไลด์ที่มี molten agar เคลือบอยู่บาง ๆ เพาะเชื้อที่ต้องการศึกษาลงบนอาหารแข็งโดยขีดเป็นเส้น 2-3 เส้น ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ซึ่งฆ่าเชื้อโดยจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ เติมน้ำปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อเพื่อป้องกันวุ้นแห้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่เหมาะสมนาน 21 วัน ตรวจลักษณะการเจริญภายใต้กล้องทุก ๆ 2-3 วัน

4.1.4 การสร้างแอสโคสปอร์

เพาะยีสต์ที่เจริญบน YM agar อายุ 1-2 วัน ลงในอาหารสำหรับการสร้างแอสโคสปอร์เช่น Fowell's acetate agar, McClary's acetate agar, Corn meal agar, Gorodkowa agar, 5% malt extract agar บ่มที่ 20-25 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ตรวจผลโดยศึกษาการสร้างแอสคัส ดูรูปร่าง พื้นผิวและจำนวนของแอสโคสปอร์ในแอสคัสทุก ๆ 7 วัน

4.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

4.2.1 การหมักคาร์โบไฮเดรต

การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตทำโดยการเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมงลงในอาหารสำหรับทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเตรียมเป็นหลอดอาหารเหลวที่ใส่หลอดดักก๊าซ หลอดละ 2 มิลลิลิตร หลังจากที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จึงเติมสารละลายสารประกอบคาร์บอนที่ต้องการทดสอบลงไป ซึ่งสารละลายดังกล่าวนี้ได้ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร ความเข้มข้นที่ใช้คือ ความเข้มข้นที่คำนวณแล้วว่า เมื่อเติมลงไปในอาหารจะทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ยกเว้นน้ำตาลราฟฟิโนสจะเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพาะเชื้อยีสต์ที่แขวนลอยในน้ำปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบแต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ และการเปลี่ยนสีของอาหารทุกวันจนครบ 7 วัน จากนั้นจึงตรวจผลทุกสัปดาห์จนครบ 28 วัน ผลที่ได้จากการสังเกต รายงานดังนี้

+	คือ เกิดการหมักรุนแรง (strong positive) หมายถึง มีก๊าซเต็มหลอดดักก๊าซภายใน 7 วัน
l	คือ การหมักเกิดล่าช้า (delayed positive หรือ latent positive) หมายถึง หลังจากบ่มนานเกินกว่า 7 วัน จึงเริ่มเกิดการหมักขึ้น และการหมักดังกล่าวก็เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว
s	คือ การหมักเกิดขึ้นช้า ๆ (slowly positive) หมายถึง การที่ก๊าซค่อย ๆ เข้าไปจนเต็มหลอดดักก๊าซ หลังจากเริ่มบ่มได้นานกว่า 7 วัน
+/w	คือ เกิดการหมักอย่างอ่อน (weak positive) หมายถึง มีก๊าซไม่เต็มหลอดดักก๊าซ(มีก๊าซน้อยกว่าหนึ่งในสามของหลอด แต่ถ้ามีก๊าซมากกว่าหนึ่งในสามของหลอดจัดว่าเป็นบวก)
-	คือ ไม่มีการหมัก หมายถึง ในหลอดดักแก๊สไม่มีก๊าซ
v	คือ บางสายพันธุ์ให้ผลบวก แต่บางสายพันธุ์ให้ผลลบ

4.2.2 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

ตรวจสอบการใช้สารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลว โดยใช้สารประกอบคาร์บอน 40 ชนิด ในการทดสอบสารประกอบคาร์บอนแต่ละชนิดจะทำโดยการเตรียมอาหารไนโตรเจนเบสในมีความ

เข้มข้นมากกว่าที่ต้องการ 10 เท่า ซึ่งประกอบด้วยแบคโต-ยีสต์ไนโตรเจนเบส 6.7 กรัม และสารประกอบคาร์บอนที่ต้องการทดสอบ 5 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร (ยกเว้นเอทานอลใช้ 3 เปอร์เซ็นต์ และ 5-ketogluconic acid ใช้ 0.3 เปอร์เซ็นต์) ทำให้อาหารปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.2 ไมโครเมตร นำอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นมากกว่าที่ต้องการ 10 เท่าดังกล่าว 0.2 มิลลิลิตร เจือจางลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร (สารประกอบคาร์บอนกลุ่ม inulin, soluble starch, ethanol, galactitol, 2-ketogluconic acid และ 5-ketogluconic acid ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ) โดยกำหนดให้อาหารไนโตรเจนเบสที่ไม่เติมสารประกอบคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (negative control) และให้อาหารไนโตรเจนเบสที่เติมกลูโคสเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก (positive control)

สำหรับการเตรียมเชื้อยีสต์เพื่อใช้ทดสอบ ทำโดยใช้ถ่ายเชื้อลงในน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบคือ ระดับความขุ่นที่เมื่อทาบหลอดอาหารกับแผ่นกระดาษขาวที่มีเส้นขีดสีดำ 5 เส้น กว้างเส้นละ 0.75 มิลลิเมตร และห่างเส้นละ 5 มิลลิเมตร แล้วเห็นเส้นสีดำเป็นแถบพร่า (กำหนดให้ระดับความขุ่นนี้มีค่าเท่ากับ +1 เมื่อตรวจผลการเจริญ) จากนั้นจึงเติมเชื้อทดสอบปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารไนโตรเจนเบสที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ตรวจผลทุก ๆ 7 วัน การตรวจการเจริญทำโดยการทาบหลอดลงบนกระดาษที่มีเส้นขีดสีดำ 5 เส้น กว้างเส้นละ 0.75 มิลลิเมตร และห่างเส้นละ 5 มิลลิเมตรแบบเดียวกับที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อ สังเกตความชัดเจนของแถบสีดำผ่านหลอด ดังนี้

+ + + คือ การเจริญที่ทำให้เชื้อมีความขุ่นลบเส้นดำสมบูรณ์
+ + คือ การเจริญที่ทำให้เชื้อมีความขุ่นลบเส้นดำพร่า
+ คือ การเจริญที่ทำให้เชื้อมีความขุ่นลบเส้นดำแต่เห็นขอบไม่ชัดเจน
- คือ ไม่มีการเจริญ อาหารไม่ขุ่น จึงเห็นเส้นดำชัดเจน

จากนั้นจึงบันทึกผลการสังเกตการเจริญทั้ง 4 สัปดาห์ ดังนี้

+ คือ การเจริญเป็นบวก (positive) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ในสัปดาห์ที่ 1 หรือสัปดาห์ที่ 2
l คือ การเจริญเป็นบวกล่าช้า (delayed positive, latent) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ อย่างรวดเร็ว แต่หลังจาก 2 สัปดาห์หรือนานกว่า
s คือ การเจริญเป็นบวกช้า (slow positive) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ช้า ๆ ในระยะเวลาที่นานกว่า 2 สัปดาห์
w คือ การเจริญเป็นบวกอ่อน (weak positive) คืออ่านผลเป็น +

- คือ ไม่มีการเจริญ อ่านผลเป็นลบ

(+) คือ นาน ๆ ครั้งที่ผลเป็นบวก (seldom positive)

v คือ ผันแปร (variable)หมายถึง บางสายพันธุ์เป็นบวก และบางสายพันธุ์เป็นลบ

+/w คือ บวกหรือบวกอ่อน หมายถึง ทุกสายพันธุ์เจริญแต่บางสายพันธุ์เจริญน้อย

w/ คือ บวกอ่อนหรือลบ

4.2.3 การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

การศึกษาการใช้สารประกอบไนโตรเจนทำบนอาหารแข็งและใช้กล้าเชื้อที่ไม่มีสารประกอบไนโตรเจนสะสมในเซลล์ที่เรียกว่า starved inoculum ตามวิธีของ Nakase และ Suzuki (1986) โดยใช้สารประกอบไนโตรเจน 6 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ไนเตรต ไนไตรต์ เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ แอล-ไลซีน และคาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ การทดสอบทำโดยการเพาะยีสต์จากอาหาร YM agar จำนวนน้อย ๆ ลงในอาหารเหลวยีสต์คาร์บอนเบส (YCB) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 7 วัน เพื่อให้ยีสต์ใช้ไนโตรเจนที่สะสมไว้ในเซลล์ให้หมด จากนั้นจึงหยดเซลล์แขวนลอยในอาหารดังกล่าวลงบนอาหารที่ใช้ในการทดสอบการใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน บันทึกผลการเจริญทุก ๆ 2-4 วัน สำหรับตัวควบคุมให้ใช้อาหาร YCB agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลลบ และใช้อาหาร YCB agar ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวก

4.2.4 การสร้างสารประกอบอมัยลอยด์ (amyloids) ภายนอกเซลล์

การตรวจสอบการสร้างสารประกอบอมัยลอยด์ภายนอกเซลล์สามารถทำได้ทันทีหลังจากการทดสอบการใช้สารประกอบคาร์บอน และสารประกอบไนโตรเจน โดยเติม Lugol's solution ลงในหลอดอาหารที่ใช้ในการทดสอบการใช้สารประกอบคาร์บอน และสารประกอบไนโตรเจนที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีเชื้อเจริญ ถ้ามีการสร้างสารประกอบอมัยลอยด์ภายนอกเซลล์อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีเขียว ให้รายงานผลเป็นบวก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสี ให้รายงานผลเป็นลบ

4.2.5 ความต้องการวิตามินในการเจริญ

เพาะเชื้อยีสต์ที่เจริญบน YM agar อายุ 2-4 วัน ลงในอาหารสำหรับการทดสอบที่ขาดวิตามิน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 5-7 วัน เพื่อให้ยีสต์ใช้วิตามินที่สะสมไว้ในเซลล์จนหมด จากนั้นจึง

ถ่ายเชื้อปริมาณน้อย ๆ ลงในอาหารที่มีวิตามินที่ต้องการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลการเจริญทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

4.2.6 การสร้างกรดจากกลูโคส

ตรวจสอบโดยการเพาะเชื้อยีสต์ลงใน Custer's chalk medium บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 2 สัปดาห์ ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยการสังเกตโซนใสรอบบริเวณที่มีการเจริญของเชื้อ ซึ่งเกิดจากการที่แคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารถูกกรดที่สร้างจากเชื้อย่อยสลายไป

4.2.7 ความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์

ตรวจสอบโดยการเพาะเชื้อยีสต์ลงในอาหารเหลวแบคโต-ยีสต์ไนโตรเจนเบส ที่เติมกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน และมีไซโคลเฮกซิไมด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 3 สัปดาห์ ตรวจผลการเจริญทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยรายงานผลเช่นเดียวกับการรายงานผลการใช้สารประกอบคาร์บอน

4.2.8 การเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคส 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์

ตรวจสอบโดยการเพาะเชื้อยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมงลงในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคส 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 3 สัปดาห์ ตรวจผลการเจริญทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

4.2.9 การเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์

ตรวจสอบโดยการเพาะเชื้อยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมงลงในอาหารที่มีความเข้มข้นโซเดียม-คลอไรด์ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 3 สัปดาห์ ตรวจผลการเจริญทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

4.2.10 การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิอื่น ๆ

เพาะเชื้อยีสต์ลงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 37 และ 42 องศาเซลเซียส ตรวจผลการเจริญทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน การรายงานผลรายงานเช่นเดียวกับการบันทึกผลการใช้สารประกอบคาร์บอน

4.2.11 การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส

ตรวจสอบโดยการเพาะเชื้อลงบนอาหาร Christensen's urea agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 3 สัปดาห์ ตรวจผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง เนื่องจากพีเอชของอาหารสูงขึ้นเมื่อเชื้อมีการย่อยสลายยูเรีย

4.2.12 การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (Diazonium Blue B)

เพาะยีสต์ลงบน YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส อีก 16 ชั่วโมง ปล่อยให้จานเพาะเชื้อลดอุณหภูมิลงจนเท่าอุณหภูมิห้อง หยด Diazonium Blue B (DBB) reagent ลงบนผิวหน้าโคโลนี หากเกิดสีแดงเข้มจนถึงสีม่วงภายใน 1-2 นาทีที่อุณหภูมิห้องให้รายงานผลเป็นบวก

4.3 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (การวิเคราะห์ยูบิควิโนน)

ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือ การศึกษาชนิดโคเอนไซม์คิว (coenzyme Q) หรือยูบิควิโนน (ubiquinone) ซึ่งเป็นไอโซพรีนอยด์ยูบิควิโนนที่มีความสำคัญในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในการหายใจของยีสต์ การวิเคราะห์ยูบิควิโนนทำตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yamada และ Kondo (1973)

การเตรียมเซลล์

เพาะยีสต์ในอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที นาน 3 วัน เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เตรียมเป็นสารแขวนลอยเซลล์ โดยเติมน้ำกลั่น 12.5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเทใส่ฟลาสก์เพื่อเตรียมสกัดยูบิควิโนนในขั้นตอนถัดไป

การสกัดยูบิควิโนนจากเซลล์ยีสต์

เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 กรัมลงในฟลาสก์ที่มีสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมไพโรแกลออล 1.5 กรัม และเมทานอลปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึง refluxed

ด้วยน้ำเย็นนาน 30 นาที ใน heating mantle โดยใส่ลูกแก้วลงไปในระหว่างการต้มเพื่อป้องกันการเดือดรุนแรง เมื่อ refluxed เสร็จแล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 45 นาที เติมเฮกเซน ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เฮกเซนผสมกับเมทานอล เพื่อดึงยูบิควิโนนที่อยู่ในเมทานอลให้อยู่ในเฮกเซน ถ่ายใส่กรวยแยกเขย่าให้เข้ากัน ระหว่างเขย่าให้เปิดจุกเพื่อปล่อยอากาศที่อยู่ภายในกรวยแยกออก เก็บสารละลายในส่วนของเฮกเซนซึ่งอยู่ชั้นบนสุด ปล่อยชั้นเมทานอลที่มีตะกอนดำของไพโรแกลออลและชั้นของน้ำทิ้งไป ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2-3 ครั้ง ถ่ายสารละลายเฮกเซนใส่ในบีกเกอร์และเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปในปริมาณน้อย ๆ เพื่อดึงน้ำออก ถ่ายสารละลายลงในฟลาสก์สำหรับระเหย ทำการระเหยเฮกเซนออกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และละลายด้วยอะซิโตน 0.5 มิลลิลิตร

การทำให้ยูบิควิโนนบริสุทธิ์

เตรียมสารประกอบยูบิควิโนนให้บริสุทธิ์ด้วยการทำ Thin layer chromatography (TLC) บนแผ่นซิลิกาเจล (F254TLC Merck, Germany) โดยใช้เฮกเซนและไดเอทิลอีเทอร์ในอัตราส่วน 85 ต่อ 15 เป็น mobile phase ยูบิควิโนนจะปรากฏเป็นแถบสีเหลืองที่มีค่า Rf ประมาณ 0.21 ตรวจสอบแถบของยูบิควิโนนอีกครั้งภายใต้แสงอัลตราไวโอเลทที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ยูบิควิโนนจะปรากฏเป็นแถบสีดำ ขูดแถบสีเหลืองที่ปรากฏบนแผ่น TLC และสกัดด้วยอะซิโตนหรือเมทานอล 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน

การวิเคราะห์ชนิดของยูบิควิโนนด้วย High performance liquid chromatography

วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบยูบิควิโนนด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (LC2100, USA) โดยใช้คอลัมน์ Cosmosil 5C18 (Nacalai tesque, Japan) และใช้เมทานอลและไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 เป็น mobile phase อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจผลที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร จำแนกชนิดของยูบิควิโนนที่วิเคราะห์โดยเทียบกับยูบิควิโนนมาตรฐาน

ผลและวิจารณ์

1. การจัดจำแนกยีสต์

การจัดจำแนกยีสต์จำนวน 112 สายพันธุ์ที่แยกจากน้ำและตะกอนดินใต้น้ำที่เก็บจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบน ด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลทำโดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของยีสต์ชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) โดยใช้โปรแกรม BLAST และใช้เกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) ในการระบุว่าเป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วหรือที่รู้จักแล้ว หรือเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีรายงานหรือสปีชีส์ใหม่ โดยพิจารณาจากหลักเกณฑ์คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA กับของยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด หากพบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จะจัดเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกัน แต่ถ้าหากมีการแทนที่มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์แสดงว่าเป็นยีสต์ต่างสปีชีส์ จากหลักการดังกล่าวจึงสามารถจัดจำแนกยีสต์ 112 สายพันธุ์ได้ดังนี้

1.1 ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราดและจันทบุรี

ผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราดและจันทบุรี จำนวน 65 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ 47 สายพันธุ์ และจากตัวอย่างตะกอนดิน 18 สายพันธุ์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 6 และ 7 ยีสต์ที่ทำการศึกษาสามารถจัดจำแนกเป็น 3 กลุ่ม คือ สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 60 สายพันธุ์ (92.3 เปอร์เซ็นต์) สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 2 สายพันธุ์ (3.1 เปอร์เซ็นต์) และเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการรายงานหรือสปีชีส์ใหม่ 3 สายพันธุ์ (4.6 เปอร์เซ็นต์) ดังนี้

ตารางที่ 6 การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราด และจันทบุรี เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย พร้อม GenBank accession number

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
Ascomycetous yeasts								
EA4	AB436467	*Candida* cf. *glabrata* (AF313362)	590/590	100	0	0	0	*Candida glabrata*
EE2	AB436391	*Candida fukuyamaensis* (U62311)	568/570	99.65	0	2	0.35	*Candida fukuyamaensis*
EF1	AB436406	*Candida rugosa* (U45727)	483/486	99.38	2	1	0.21	*Candida rugosa*
EA22	AB439217	*Candida sanittii* (AB332397)	553/553	100	0	0	0	*Candida sanittii*
EA1	AB439256	*Candida sanittii* (AB332397)	526/535	98.32	2	7	1.31	New species
EE4	AB436414	*Candida silvae* (U71065)	539/541	99.63	0	2	0.37	*Candida silvae*
EA5	AB435073	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	506/507	99.8	0	1	0.2	*Candida thaimueangensis*
EA28	AB435180	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE3	AB435191	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE8	AB435192	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE11	AB435193	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EE12	AB435194	*Candida tropicalis* (U45749)	569/570	99.82	0	1	0.18	*Candida tropicalis*
EE13	AB435195	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE14	AB435196	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE16	AB435197	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EA18	AB435075	*Clavispora lusitaniae* (U44817)	517/517	100	0	0	0	*Clavispora lusitaniae*
EA25	AB439218	*Hanseniaspora* sp. ST-464 (DQ404527)	587/592	99.16	2	3	0.51	Undescribed species
EF2	AB436453	*Kloeckera lindneri* (U84226)	568/572	99.3	0	4	0.7	*Kloeckera lindneri*
EA8	AB456535	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EA9	AB456536	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EA12	AB456537	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EA14	AB456538	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EA16	AB456539	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EA17	AB456540	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EE1	AB456542	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
EE5	AB456543	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
EE6	AB456544	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
EE7	AB456545	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
EA21	AB435390	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	573/574	99.8	0	1	0.2	*Lindnera subsufficiens*
EF3	AB436448	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
EF4	AB436445	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EF5	AB436446	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EA10	AB436451	*Pichia terricola* (U76345)	550/554	99.28	0	4	0.72	*Pichia terricola*
EA23	AB436452	*Pichia terricola* (U76345)	549/554	99.1	0	5	0.9	*Pichia terricola*
EA20	AB435076	*Saccharomyces cerevisiae* (U44806)	578/578	100	0	0	0	*Saccharomyces cerevisiae*
EE15	AB436466	*Torulaspora delbrueckii* (U72156)	508/509	99.8	1	0	0	*Torulaspora delbrueckii*

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
Basidiomycetous yeasts								
W1	AB439222	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	447/447	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W2	AB439223	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	521/521	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W5	AB439224	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	524/524	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W7	AB439225	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	425/425	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W11	AB439226	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	487/488	99.8	0	1	0.2	*Rhodotorula mucilaginosa*
W13	AB456557	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	386/386	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W61	AB439248	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	512/515	99.42	2	1	0.19	*Rhodotorula mucilaginosa*
W62	AB439249	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	538/541	99.45	1	2	0.37	*Rhodotorula mucilaginosa*
W63	AB439250	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	486/486	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W64	AB439251	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	503/505	99.6	1	1	0.2	*Rhodotorula mucilaginosa*
W27	AB439252	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	454/454	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*

ตารางที่ 7 การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราด และจันทบุรี เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย พร้อม GenBank accession number

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
Ascomycetous yeasts								
EF12	AB436390	*Candida diversa* (U71064)	533/533	100	0	0	0	*Candida diversa*
EA31	AB456534	*Candida gotoi* (AY489112)	534/540	98.8	2	4	0.74	*Candida gotoi*
EF7	AB436401	*Candida pseudolambica* (U71063)	555/559	99.28	0	4	0.75	*Candida pseudolambica*
EF8	AB436402	*Candida pseudolambica* (U71063)	557/559	99.64	0	2	0.36	*Candida pseudolambica*
EF11	AB436415	*Candida silvae* (U71065)	541/541	100	0	0	0	*Candida silvae*
EA32	AB435181	*Candida tropicalis* (U45749)	570/568	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EA33	AB435182	*Candida tropicalis* (U45749)	570/569	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EA35	AB435183	*Candida tropicalis* (U45749)	570/569	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EA36	AB435184	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EF14	AB436458	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	492/493	99.8	0	1	0.2	*Kodamaea ohmeri*

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EA30	AB435077	*Metschnikowia koreensis* (AF296438)	517/517	100	0	0	0	*Metschnikowia koreensis*
EF10	AB439259	*Saturnispora mendoncae* (AY923242)	496/535	92.71	7	32	5.98	New species
EF9	AB435392	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	573/574	99.83	0	1	0.17	*Lindnera subsufficiens*
EF13	AB439215	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	573/574	99.83	0	1	0.17	*Lindnera subsufficiens*
EF15	AB435393	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	566/567	99.82	0	1	0.18	*Lindnera subsufficiens*
EF16	AB435394	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	568/572	99.3	0	4	0.7	*Lindnera subsufficiens*
EF6	AB439220	*Pichia* sp. IS1-01 (AB247501)	555/555	100	0	0	0	Undescribed species
EF17	AB439257	*Pichia terricola* (U76345)	547/555	99.56	2	6	1.08	New species

1.1.1 สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

จากผลการจัดจำแนกพบว่าจากทั้งหมด 61 สายพันธุ์ของสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 50 สายพันธุ์ (82 เปอร์เซ็นต์) เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ โดยจัดจำแนกเป็น 11 สกุล 22 สปีชีส์ (ตารางที่ 8) ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales และกระจายอยู่ในวงศ์ต่าง ๆ ดังนี้

1.) วงศ์ Candidaceae 2 สกุล 10 สปีชีส์ คือ ยีสต์ในสกุล *Candida* และ *Kloeckera* ได้แก่ *Candida* cf. *glabrata, Candida fukuyamaensis, Candida rugosa, Candida sanittii, Candida thaimueangensis* และ *Kloeckera lindneri* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ *Candida gotoi* และ *Candida pseudolambica* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน นอกจากนั้นพบ *Candida silvae* และ *Candida tropicalis* ซึ่งพบในทั้งตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน

2.) วงศ์ Metschnikowiaceae 2 สกุล 2 สปีชีส์ คือ *Clavispora lusitaniae* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ และ *Metschnikowia koreensis* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน

3.) วงศ์ Saccharomycetaceae 6 สกุล 9 สปีชีส์ โดยเป็นยีสต์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ 6 สปีชีส์ คือ *Kluyveromyces siamensis, Pichia kudriavzevii, Pichia occidentalis, Pichia terricola, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii* และ *Torulaspora* maleeae ยีสต์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน 1 สปีชีส์ คือ *Kodamaea ohmeri* และยีสต์ที่พบทั้งในตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน คือ *Lindnera subsufficiens*

ส่วนอีก 11 สายพันธุ์ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ คือ *Rhodotorula mucilaginosa* ซึ่งเป็นยีสต์ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Urediniomycetes อันดับ Sporidiobolales คือ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

Species	Strain from water		Strain from sediment		Total
	Strain	Number of strain	Strain	Number of strain	
Ascomyceteous yeast					
Candida					
Candida cf. *glabrata*	EA4	1	-	-	1
Candida gotoi	-	-	EA31	1	1
Candida fukuyamaensis	EE2	1	-	-	1
Candida pseudolambica	-	-	EF7, EF8	2	2
Candida rugosa	EF1	1	-	-	1
Candida sanittii	EA22	1	-	-	1
Candida silvae	EE4	1	EF11	1	2
Candida thaimueangensis	EA5	1	-	-	1
Candida tropicalis	EA28, EA32, EE3, EE8, EE11, EE12, EE13, EE14, EE16	9	EA33, EA35, EA36	3	12
Clavispora					
Clavispora lusitaniae	EA18	1	-	-	1
Kloeckera					
Kloeckera lindneri	EF2	1	-	-	1
Kluyveromyces					
Kluyveromyces siamensis	EA8, EA9, EA12, EA14, EA16, EA17, EE1, EE5, EE6, EE7	10	-	-	10
Kodamaea					
Kodamaea ohmeri	-	-	EF14	1	1
Lindnera					
Lindnera subsufficiens	EA21, EF9	2	EF13, EF15, EF16	3	5
Metschnikowia					
Metschnikowia koreensis	-	-	EA30	1	1

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Species	Strain from water		Strain from sediment		Total
	Strain	Number of strain	Strain	Number of strain	
Pichia					
Pichia kudriavzevii	EF3	1	-	-	1
Pichia occidentalis	EF4, EF5	2	-	-	2
Pichia terricola	EA10 , EA23	2	-	-	2
Saccharomyces					
Saccharomyces cerevisiae	EA20	1	-	-	1
Torulaspora					
Torulaspora delbrueckii	EE15	1	-	-	1
Basidiomyceteous yeast					
Rhodotorula mucilaginosa	W1, W2, W5, W7, W11, W13, W27, W61, W62, W63, W64	11	-	-	11
Total 11 genera 21 species					

1.1.2 สปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

การระบุว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ใช้การพิจารณาจากเกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) ดังที่กล่าวไว้แล้ว คือ มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 บน 26S rDNA มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด ผลการจัดจำแนกพบว่ามี 3 สายพันธุ์ เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ (ตารางที่ 6, 7) โดยจัดจำแนกอยู่ใน 3 สกุล 3 สปีชีส์ ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตะกอนดินจัดอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae ที่ใกล้เคียงกับ *Pichia terricola* 1 สายพันธุ์ และ *Saturnispora mendoncae* 1 สายพันธุ์ ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำอยู่ในวงศ์ Candidaceae ที่ใกล้เคียงกับ *Candida sanittii* นอกจากนี้ยังพบว่าเหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Hanseniaspora* sp. ST-464 และ *Pichia* sp. IS1-01 ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales วงศ์ Saccharomycodaceae (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

Strain	Source for isolation	% nucleotide substitution	Closest species
New species			
EA1	water	1.31	*Candida sanittii* RV154 (AB332397)
EF17	sediment	1.08	*Pichia terricola* CBS 2617^{T} (U76345)
EF10	sediment	5.98	*Saturnispora mendoncae* CBS 5620^{T} (AY923242)
Undescribed species			
EA25	water	0.51	*Hanseniaspora* sp. ST-464 (DQ404527)
EF6	sediment	0	*Pichia* sp. IS1-01 (AB247501)

1.2 ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์

ผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์จำนวน 47 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำ 22 สายพันธุ์ และจากตัวอย่างตะกอนดิน 25 สายพันธุ์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 10 และ 11 โดยยีสต์ที่ทำการศึกษาสามารถจัดจำแนกเป็น 3 กลุ่ม คือ สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 45 สายพันธุ์ (95.7 เปอร์เซ็นต์) และเป็นสปีชีส์ใหม่เพียง 1 สายพันธุ์ (2.1 เปอร์เซ็นต์) ส่วนอีก 1 สายพันธุ์เหมือนราที่คล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ที่ยังไม่มีการอธิบายในสกุล *Aureobasidium* คือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965

ตารางที่ 10 การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว และสปีชีส์ใหม่ พร้อม GenBank accession number

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
Ascomycetous yeasts								
WB16	AB436425	*Brettanomyces naardenensis* (U76200)	579/579	100	0	0	0	*Brettanomyces naardenensis*
WB18	AB436426	*Brettanomyces naardenensis* (U76200)	579/579	100	0	0	0	*Brettanomyces naardenensis*
WB15	AB439258	*Candida lodderae* (U45755)	560/571	98.07	2	9	1.58	New species
WA11	AB436396	*Candida parapsilosis* (EF620918)	575/576	99.83	0	1	0.17	*Candida parapsilosis*
WA12	AB436397	*Candida parapsilosis* (EF620918)	586/589	99.49	0	3	0.51	*Candida parapsilosis*
WB9	AB436421	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	556/560	99.29	2	2	0	*Candida thaimueangensis*
WA10	AB435199	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB1	AB435200	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB3	AB435201	*Candida tropicalis* (U45749)	568/570	99.65	0	2	0.35	*Candida tropicalis*
WB4	AB435202	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
WB8	AB435203	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB11	AB435204	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB13	AB436436	*Hanseniaspora guilliermondii* (U84230)	570/572	99.65	0	2	0.35	*Hanseniaspora guilliermondii*
WB19	AB436459	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	493/493	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
WA1	AB435397	*Pichia guilliermondii* (U45709)	569/570	99.82	0	1	0.18	*Pichia guilliermondii*
WB6	AB435398	*Pichia guilliermondii* (U45709)	569/570	99.82	0	1	0.18	*Pichia guilliermondii*
WB10	AB435399	*Pichia guilliermondii* (U45709)	569/570	99.82	0	1	0	*Pichia guilliermondii*
WB43	AB435400	*Pichia guilliermondii* (U45709)	567/570	99.47	0	3	0.53	*Pichia guilliermondii*
WB12	AB436449	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
Basidiomycetous yeasts								
WB2	AB439253	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	597/600	99.5	1	2	0.33	*Rhodotorula mucilaginosa*
WB7	AB439254	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	601/602	99.83	1	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*

ตารางที่ 11 การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนดินในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว และราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ที่ยังไม่มีการอธิบาย พร้อม GenBank accession number

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
Ascomycetous yeasts								
WB42	AB436388	*Candida chrysomelidarum* (AY520294)	501/502	99.8	0	1	0.20	*Candida chrysomelidarum*
WB22	AB436422	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	558/560	99.64	1	1	0.18	*Candida thaimueangensis*
WB30	AB436423	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	559/560	99.82	1	0	0	*Candida thaimueangensis*
WB33	AB436424	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	558/560	99.64	1	1	0.18	*Candida thaimueangensis*
WA8	AB435198	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB20	AB435205	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB25	AB435206	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB26	AB435207	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB31	AB435208	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB34	AB435209	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
WA6	AB436428	*Debaryomyces hansenii* (DQ513292)	583/588	99.15	3	2	0.34	*Debaryomyces hansenii*
WA7	AB436430	*Debaryomyces nepalensis* (U45839)	569/570	99.82	0	1	0.18	*Debaryomyces nepalensis*
WA3	AB456546	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
WA4	AB456547	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/563	99.82	1	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
WA9	AB456548	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
WB24	AB456549	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	548/549	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
WB28	AB456550	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/561	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
WB29	AB456551	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	562/562	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
WB32	AB456552	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	593/596	99.5	2	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
WB38	AB436460	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	512/513	99.81	1	0	0	*Kodamaea ohmeri*
WB36	AB436461	*Metschnikowia koreensis* (AF296438)	515/518	99.42	1	2	0.39	*Metschnikowia koreensis*

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
WB41	AB436462	*Metschnikowia koreensis* (AF296438)	517/517	100	0	0	0	*Metschnikowia koreensis*
WB35	AB436450	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
WB17	AB456554	*Torulaspora maleeae* (AB087395)	572/573	99.83	0	1	0.17	*Torulaspora maleeae*
WB37	AB436464	*Wickerhamomyces sydowiorum* (AJ508573)	570/570	100	0	0	0	*Wickerhamomyces sydowiorum*
Basidiomycetous yeasts								
WB27	AB456556	*Aureobasidium* sp. CECT 11965 (AY167611)	591/592	99.83	1	0	0	Undescribed species

1.2.1 สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

ผลการจัดจำแนกพบว่าจาก 47 สายพันธุ์ ของสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว มี 43 สายพันธุ์ (96 เปอร์เซ็นต์) จัดเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ โดยจัดจำแนกได้เป็น 10 สกุล 16 สปีชีส์ (ตารางที่ 12) โดยอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales และกระจายอยู่ใน 3 วงศ์ ดังนี้

1.) วงศ์ Saccharomycetaceae 6 สกุล 8 สปีชีส์ โดยมี 2 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ คือ *Pichia guilliermondii* และ *Torulaspora maleeae* 4 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน ได้แก่ *Debaryomyces hansenii, Debaryomyces nepalensis, Kluyveromyces siamensis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* และ 2 สปีชีส์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดิน ได้แก่ *Kodamaea ohmeri* และ *Pichia kudriavzevii*

2.) วงศ์ Candidaceae 2 สกุล 5 สปีชีส์ คือ ยีสต์ในสกุล *Brettanomyces* และ *Candida* ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis* และ *Candida parapsilosis* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ *Candida chrysomelidarum* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน และ *Candida thaimueangensis* และ *Candida tropicalis* ซึ่งพบทั้งในน้ำและตะกอนดิน

3.) วงศ์ Saccharomycodaceae 1 สปีชีส์ คือ *Hanseniaspora guilliermondii* ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำ

4.) วงศ์ Metschnikowiaceae 1 สปีชีส์ คือ *Metschnikowia koreensis* ซึ่งพบเฉพาะในตะกอนดิน

สายพันธุ์ที่เหลือ 4 สายพันธุ์ซึ่งพบในตัวอย่างน้ำจัดจำแนกเป็นยีสต์ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Urediniomycetes อันดับ Sporidiobolales 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Rhodotorula mucilaginosa* (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

Species	Strain from water		Strain from sediment		Total
	Strain	Number of strain	สายพันธุ์	Number of strain	
Ascomyceteous yeast					
Brettanomyces					
Brettanomyces naardenensis	WB16, WB18	2	-	-	2
Candida					
Candida chrysomelidarum	-	-	WB42	1	1
Candida parapsilosis	WA11, WA12	2	-	-	2
Candida thaimueangensis	WB9	1	WB22, WB30, WB33	3	4
Candida tropicalis	WA10, WB1, WB3, WB4, WB8, WB11	6	WA8, WB20, WB25, WB26, WB31, WB34	6	12
Debaryomyces					
Debaryomyces hansenii	-	-	WA6	1	1
Debaryomyces nepalensis	-	-	WA7	1	1
Hanseniaspora					
Hanseniaspora guilliermondii	WB13	1	-	-	1
Kluyveromyces					
Kluyveromyces siamensis	-	-	WA3, WA4, WA9, WB24, WB28, WB29, WB32	7	7
Kodamaea					
Kodamaea ohmeri	WB19	1	WB38	1	2
Metschnikowia					
Metschnikowia koreensis	-	-	WB36, WB41	2	2
Pichia					
Pichia guilliermondii	WA1, WB6, WB10, WB43	4	-	-	4

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Species	Strain from water		Strain from sediment		Total
	Strain	Number of strain	Strain	Number of strain	
Pichia kudriavzevii	WB12	1	WB35	1	2
Torulaspora					
Torulaspora maleeae	-	-	WB17	1	1
Wickerhamomyces					
Wickerhamomyces sydowiorum	-	-	WB37	1	1
Basidiomyceteous yeast					
Rhodotorula mucilaginosa	WB2, WB7	2	-	-	2
Total 10 genera 16 species					

1.2.2 สปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

ผลการจัดจำแนกโดยใช้การพิจารณาจากเกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) พบว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่เพียง 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 10) โดยจัดจำแนกอยู่ไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales วงศ์ Candidaceae ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida lodderae* และพบว่าเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 11) โดยเป็นราที่คล้ายยีสต์ในสกุล *Aureobasidium* คือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Dothideomycetes วงศ์ Dothioraceae (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

Strain	Source for isolation	% nucleotide substitution	Closest species
New species			
WB15	water	1.58	*Candida lodderae* CBS 1924^{T} (U45755)
Undescribed species			
WB27	sediment	0	*Aureobasidium* sp. CECT 11965 (AY167611)

จากการจัดจำแนกยีสต์ทั้งหมด 112 สายพันธุ์ ที่แยกจากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำที่เก็บจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยพบว่า 105 สายพันธุ์ (93.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษาทั้งหมด) เป็นยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว 15 สกุล 30 สปีชีส์ โดยยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำมี 9 สกุล 16 สปีชีส์ ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis, Candida cf. glabrata, Candida fukuyamaensis, Candida parapsilosis, Candida rugosa, Candida sanittii, Clavispora lusitaniae, Hanseniaspora guilliermondii, Kloeckera lindneri, Saccharomyces cerevisiae, Pichia guilliermondii, Pichia occidentalis, Pichia terricola, Torulaspora delbrueckii, Torulaspora maleeae* และ *Rhodotorula mucilaginosa* ในขณะที่ยีสต์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำมี 4 สกุล 7 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida chrysomelidarum, Candida gotoi, Candida pseudolambica, Debaryomyces hansenii, Debaryomyces nepalensis, Metschnikowia koreensis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* ส่วนยีสต์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินมี 5 สกุล 7 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens* และ *Pichia kudriavzevii* สำหรับสายพันธุ์ที่เหลือ 7 สายพันธุ์ พบว่า 4 สายพันธุ์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายโดยเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับราคล้ายยีสต์ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 1 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. ST-464 2 สายพันธุ์ และ เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. IS1-01 1 สายพันธุ์ และ 4 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงมากที่สุดบนฐานข้อมูล GenBank แล้วพบมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ โดยจัดจำแนกเป็นยีสต์ 4 สปีชีส์ในสกุล *Candida* ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Candida lodderae, Candida sanittii, Pichia terricola* และ *Saturnispora mendoncae*

2. <u>ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน</u>

2.1 ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน

จากผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราดและจันทบุรีทั้งหมดจำนวน 65 สายพันธุ์ แบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำ 47 สายพันธุ์ สรุปได้ว่าจัดจำแนกเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 36 สายพันธุ์ (77 เปอร์เซ็นต์) และเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 11 สายพันธุ์ (23 เปอร์เซ็นต์) ส่วนยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนดินใต้น้ำพบว่าทั้งหมดเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์จำนวน 18 สายพันธุ์ โดยเมื่อพิจารณาความหลากหลายของยีสต์ในแต่ละแหล่งพบว่ามีรายละเอียดดังนี้

ยีสต์จากป่าชายเลนในศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จังหวัดตราด ทั้งที่แยกจากน้ำและตะกอนดินใต้น้ำจำนวน 29 สายพันธุ์จัดจำแนกได้ดังนี้ ยีสต์ที่พบในน้ำ 23 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 7 สกุล10 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida* cf. *glabrata, Candida sanittii, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Clavispora lusitaniae, Kluyveromyces siamensis, Lindnera subsufficiens, Pichia terricola, Rhodotorula mucilaginosa* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยมีสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* 1 สปีชีส์ คือ สายพันธุ์ EA1 และมี 1 สายพันธุ์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่มียังไม่มีการอธิบาย *Hanseniaspora* sp. ST-464 โดยยีสต์ที่พบมากที่สุดในน้ำ คือ ยีสต์สีแดง *R.. mucilaginosa* (6 สายพันธุ์) และ *K. siamensis* (6 สายพันธุ์) สำหรับยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำ 6 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Candida gotoi, C. tropicalis* และ *Metschnikowia koreensis* โดยสปีชีส์ที่พบจำนวนสายพันธุ์มากที่สุดในตะกอนดินคือ *C. tropicalis* (3 สายพันธุ์) นอกจากนี้ *C. tropicalis* ยังเป็นยีสต์เพียงสปีชีส์เดียวที่พบในทั้งน้ำและตะกอนดินในศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน

ยีสต์จากป่าโกงกาง อำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด จำนวน 18 สายพันธุ์จัดจำแนกได้ดังนี้ ยีสต์ที่พบในน้ำ 6 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Candida rugosa, Pichia kudriavzevii, Pichia occidentalis, Kloeckera lindneri, Lindnera subsufficiens* และ *Rhodotorula mucilaginosa* ยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำจำนวน 11 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 3 สกุล 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida diversa, Candida pseudolambica, Candida silvae, Kodamaea ohmeri* และ *Lindnera subsufficiens* เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ *Pichia* sp. IS1-01 1 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ EF6) และ 2 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ EF10 และ EF17) เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ ซึ่งใกล้ชิดกับยีสต์ในสกุล *Pichia* และ *Saturnispora* ยีสต์ที่พบจำนวนสายพันธุ์มากที่สุดในป่าโกงกางในอำเภอคลองใหญ่ คือ *L. subsufficiens* ซึ่งเป็นเพียงสปีชีส์เดียวที่พบในทั้งน้ำและตะกอนดินโดยพบในน้ำ 1 สายพันธุ์และพบในตะกอนดิน 3 สายพันธุ์

ผลการจัดจำแนกยีสต์จากป่าชายเลนในศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรีโดยทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากน้ำ จำนวน 18 สายพันธุ์ พบว่าจัดจำแนกเป็นยีสต์ 4 สกุล 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida fukuyamaensis, Candida silvae, Candida tropicalis, Kluyveromyces siamensis, Rhodotorula mucilaginosa* และ *Torulaspora delbrueckii* โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *C. tropicalis* ซึ่งพบ 7 สายพันธุ์ รองลงมาคือ *K. siamensis* (4 สายพันธุ์) และ *R. mucilaginosa* (4 สายพันธุ์)

เมื่อพิจารณายีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำในป่าชายเลนแหล่งต่าง ๆ ในบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่กล่าวข้างต้นพบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 14 สปีชีส์ ได้แก่

Candida cf. glabrata, Candida fukuyamaensis, Candida rugosa, Candida sanittii, Candida thaimueangensis, Clavispora lusitaniae, Kloeckera lindneri, Kluyveromyces siamensis, Saccharomyces cerevisiae, Pichia kudriavzevii, Pichia occidentalis, Pichia terricola, Torulaspora delbrueckii และ *Rhodotorula mucilaginosa* นอกจาก นั้นยังพบสปีชีส์ใหม่ 1 สปีชีส์ในสกุล *Candida* (สายพันธุ์ EA1) และสปีชีส์ที่มียังไม่มีการอธิบายที่เหมือน กับ *Hanseniaspora* sp. ST-464 (สายพันธุ์ EA25 และ ED20) ในขณะที่เมื่อพิจารณายีสต์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำพบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida gotoi, Candida pseudolambica, Kodamaea ohmeri* และ *Metschnikowia koreensis* พบเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ *Pichia* sp. IS1-01(สายพันธุ์ EF6) และพบมี 2 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์ใหม่ที่ใกล้ชิดกับสกุล *Pichia* (สายพันธุ์ EF17) และ *Saturnispora* (สายพันธุ์ EF10) ส่วนยีสต์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินนั้นจัดจำแนกเป็นยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida silvae, Candida tropicalis* และ *Lindnera subsufficiens* เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบชนิดของยีสต์จากตัวอย่างที่เก็บจากทั้งสองจังหวัดพบว่า ยีสต์ที่พบในน้ำและตะกอนดินทั้งที่จังหวัดตราดและจันทบุรี ได้แก่ *Candida tropicalis* และ *Rhodotorula mucilaginosa* ส่วนยีสต์ที่พบในน้ำทั้งที่จังหวัดตราดและจันทบุรี คือ *Kluyveromyces siamensis* นอกจากนั้นยังพบมี *Lindnera subsufficiens* อยู่ในทั้งน้ำและตะกอนดินของจังหวัดตราด (ตารางที่ 14 และ 15)

ตารางที่ 14 ยีสต์ที่พบในน้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดตราดและจันทบุรี

สปีชีส์	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จังหวัดตราด	ป่าโกงกาง อำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี
Ascomyceteous yeast			
Candida			
Candida glabrata	EA4	-	-
Candida fukuyamaensis	-	-	EE2
Candida rugosa	-	EF1	-
Candida sanittii	EA22	-	-
Candida silvae	-	-	EE4
Candida thaimueangensis	EA5	-	-
Candida tropicalis	EA28	-	EE3, EE8, EE11, EE12, EE13, EE14, EE16 (7)
Clavispora			
Clavispora lusitaniae	EA18	-	-

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สปีชีส์	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จังหวัดตราด	ป่าโกงกาง อำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี
Kloeckera			
Kloeckera lindneri	-	EF2	-
Kluyveromyces			
Kluyveromyces siamensis	EA8, EA9, EA12, EA14, EA16, EA17 (6)	-	EE1, EE5, EE6, EE7
Lindnera			
Lindnera subsufficiens	EA21	EF9	-
Metschnikowia			
Metschnikowia koreensis	EA30	-	-
Saccharomyces			
Saccharomyces cerevisiae	EA20	-	-
Pichia			
Pichia kudriavzevii	-	EF3	-
Pichia occidentalis	-	EF4, EF5	-
Pichia terricola	EA10, EA23	-	-
Torulaspora			
Torulaspora delbrueckii	-	-	EE15
Basidiomyceteous yeast			
Rhodotorula			
Rhodotorula mucilaginosa	W1, W2, W5, W7, W11, W13	W27	W61, W62, W63, W64
New species			
Candida sp. 1	EA1	-	-
Undescribed species			
Hanseniaspora sp. ST-464	EA25	-	-
11 สกุล 20 สปีชีส์			

ตารางที่ 15 ยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดตราดและจันทบุรี

สปีชีส์	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จังหวัดตราด	ป่าโกงกาง อำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด
Ascomyceteous yeast		
Candida		
Candida diversa	-	EF12
Candida gotoi	EA31	-
Candida pseudolambica	-	EF7, EF8
Candida silvae	-	EF11
Candida tropicalis	EA32, EA33, EA35, EA36	-
Kodamaea		
Kodamaea ohmeri	EF14	-
Lindnera		
Lindnera subsufficiens	-	EF9, EF13, EF15, EF16
New species		
Pichia sp.	EF17	-
Saturnispora sp.	EF10	-
Undescribed species		
Pichia sp. IS1-01	-	EF6
5 สกุล 10 สปีชีส์		

แอสโคมัยซีตัสยีสต์ที่พบมากที่สุดในน้ำและตะกอนดินในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจังหวัดจันทบุรี คือ สกุล *Candida* โดยพบในน้ำเป็นจำนวนมากที่สุดถึง 15 สายพันธุ์ซึ่งคิดเป็น 32 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่พบในน้ำทั้งหมด และพบในตะกอนดิน 8 สายพันธุ์ซึ่งคิดเป็น 44.4 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่พบในตะกอนดินทั้งหมด โดยเฉพาะ *Candida tropicalis* นั้นพบกระจายทั้งในน้ำ (8 สายพันธุ์) และในตะกอนดิน (4 สายพันธุ์) สำหรับแอสโคมัยซีตัสยีสต์ที่พบในน้ำจำนวนมากรองลงมาคือ *Kluyveromyces siamensis* (10 สายพันธุ์) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่พบเฉพาะในน้ำเท่านั้น ส่วนเบสิโอมัยซีตัสยีสต์ที่พบมากที่สุดคือ *Rhodotorula mucilaginosa* (11 สายพันธุ์) ซึ่งพบเฉพาะในน้ำและพบกระจายในป่าชายเลนทุกแห่งที่ทำการศึกษา

จากผลการศึกษาพบว่ายีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรีซึ่งตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยมีการปนเปื้อนมลภาวะจากชุมชนมากนั้นเป็นยีสต์สกุล *Candida* และ *Rhodotorula* ทั้งนี้เนื่องจากตั้งอยู่ใกล้แหล่งชุมชน บ่อเลี้ยงกุ้งและโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งพบมากในภาคตะวันออก นอกจากนี้ป่าชายเลนหลายแห่งที่ทำการศึกษานั้นเป็นป่าชายเลนปลูกใหม่ตามโครงการอนุรักษ์และฟื้นฟูทรัพยากรป่าชายเลนบริเวณฝั่งอ่าวไทยเพื่อเพิ่มพูนสัตว์น้ำและรักษาสมดุลของระบบนิเวศน์ชายฝั่งทะเล (สนใจ, 2548) และมีการเปิดให้เป็นศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนให้บุคคลทั่วไปเข้าชม จึงอาจเป็นสาเหตุให้มีการปนเปื้อนมลภาวะจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ได้ ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงสอดคล้องกับรายงานการพบยีสต์กลุ่ม *Candida* และยีสต์สีแดงมากเป็นพิเศษในบริเวณที่ปนเปื้อนมลภาวะโดยเฉพาะยีสต์สีแดงที่จัดเป็นดัชนีชี้วัดความสกปรกของน้ำที่ Lachance และ Starmer (1998) และ Spencer และ Spencer (1997) รายงานไว้ นอกจากนี้ช่วงที่เก็บตัวอย่างเป็นช่วงฤดูฝนและมีน้ำหลาก กระแสน้ำที่พัดลงมาหลังฝนตกได้ชะเอาสารอาหารจากแม่น้ำและริมฝั่งออกมาด้วยจึงอาจเป็นสาเหตุให้พบยีสต์สกุลที่เจริญอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีสารอินทรีย์สูง เช่น ยีสต์สกุล *Candida* และ *Rhodotorula*

2.2 ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์

จากผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ทั้งหมดจำนวน 47 สายพันธุ์ แบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำจำนวน 21 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 19 สายพันธุ์ และเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 2 สายพันธุ์ และยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนดินใต้น้ำ 26 สายพันธุ์ ซึ่งทั้งหมดจัดจำแนกเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 24 สายพันธุ์ มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 16 ดังนี้

การจัดจำแนกยีสต์จากป่าชายเลนในโครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี จำนวน12 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่พบเฉพาะในน้ำ 3 สายพันธุ์จัดจำแนกได้เป็น *Candida parapsilosis* และ *Pichia guilliermondii* ส่วนสายพันธุ์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ 5 สายพันธุ์เป็น *Debaryomyces hansenii, Debaryomyces nepalensis* และ *Kluyveromyces siamensis* ส่วนสายพันธุ์ ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำคือ *Candida tropicalis* (4 สายพันธุ์)

สำหรับการจัดจำแนกยีสต์จากป่าชายเลนในวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 37 สายพันธุ์พบว่า ยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำ 11 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 6

สปีชีส์ ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis, Hanseniaspora guilliermondii, Metschnikowia koreensis, Pichia guilliermondii, Torulaspora maleeae* และ *Rhodotorula mucilaginosa* โดยมีสปีชีส์ใหม่ 1 สปีชีส์ ในสกุล *Candida* (สายพันธุ์ WB15) ยีสต์ที่พบในเฉพาะตะกอนดินใต้น้ำ 6 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 3 สปีชีส์คือ *Candida chrysomelidarum, Kluyveromyces siamensis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* นอกจากนั้นยังพบสายพันธุ์ที่เหมือนราคล้ายยีสต์ที่มียังไม่มีการอธิบาย คือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 สำหรับยีสต์ที่พบในทั้งน้ำและตะกอนดินในวนอุทยานปราณบุรี ได้แก่ *Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Kodamaea ohmeri* และ *Pichia kudriavzevii* ยีสต์ที่พบมากที่สุดคือยีสต์ในสกุล *Candida* โดยพบในน้ำ 7 สายพันธุ์และพบในตะกอนดิน 9 สายพันธุ์

จากการศึกษายีสต์ที่พบในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยจำนวนรวม 47 สายพันธุ์ จัดจำแนกได้เป็น 12 สกุล 18 สปีชีส์ โดยเป็นยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำ 7 สกุล 7 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis, Candida parapsilosis, Hanseniaspora guilliermondii, Pichia guilliermondii, Rhodotorula mucilaginosa* และ *Torulaspora maleeae* และสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* 1 สปีชีส์ (สายพันธุ์ WB15) สำหรับยีสต์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำพบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 5 สกุล 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida chrysomelidarum, Debaryomyces hansenii, Debaryomyces nepalensis, Kluyveromyces siamensis, Metschnikowia koreensis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* และเป็นราคล้ายยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สายพันธุ์ คือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 ส่วนยีสต์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินมี 3 สกุล 4 สปีชีส์ได้แก่ *Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Kodamaea ohmeri* และ *Pichia kudriavzevii* (ตารางที่ 16 และ 17)

จากผลการศึกษาเมื่อพิจารณาเฉพาะยีสต์ชนิดที่พบในน้ำจากป่าชายเลนทั้งในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ พบว่ามี *Pichia guilliermondii* กระจายอยู่ในน้ำจากป่าชายเลนของทั้งสองจังหวัด และเมื่อพิจารณาเฉพาะยีสต์ชนิดที่พบในตะกอนดินใต้น้ำก็พบว่ามี *Kluyveromyces siamensis* อยู่ในตะกอนดินจากป่าชายเลนทั้งในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ ส่วนยีสต์ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลนของทั้งสองจังหวัดนั้น ได้แก่ *Candida tropicalis* (ตารางที่ 15 และ 16)

ตารางที่ 16 ยีสต์ที่พบในน้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์

สปีชีส์	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี	วนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
Ascomyceteous yeast		
Brettanomyces		
Brettanomyces naardenensis	-	WB16, WB18
Candida		
Candida parapsilosis	WA11, WA12	-
Candida thaimueangensis	-	WB9
Candida tropicalis	WA10	WB1, WB3, WB4, WB8, WB11
Hanseniaspora		
Hanseniaspora guilliermondii	-	WB13
Kodamaea		
Kodamaea ohmeri	-	WB19
Pichia		
Pichia guilliermondii	WA1	WB6, WB10, WB43
Pichia kudriavzevii	-	WB12
Torulaspora		
Torulaspora maleeae	-	WB17
Basidiomyceteous yeast		
Rhodotorula		
Rhodotorula mucilaginosa	-	WB2, WB7
New species		
Candida sp. 2	-	WB15
Undescribed species		
Aureobasidium sp. CECT 11965	-	WB27
8 สกุล 12 สปีชีส์		

ตารางที่ 17 ยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์

สปีชีส์	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี	วนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
Ascomyceteous yeast		
Candida		
Candida chrysomelidarum	-	WB42
Candida thaimueangensis	-	WB22, WB30, WB33
Candida tropicalis	WA8	WB20, WB25, WB26, WB31, WB34
Debaryomyces		
Debaryomyces hansenii	WA6	-
Debaryomyces nepalensis	WA7	-
Kluyveromyces		
Kluyveromyces siamensis	WA3, WA4, WA9	WB24, WB28, WB29, WB32
Kodamaea		
Kodamaea ohmeri	-	WB38
Metschnikowia		
Metschnikowia koreensis	-	WB36, WB41
Pichia		
Pichia kudriavzevii	-	WB35
Wickerhamomyces		
Wickerhamomyces sydowiorum	-	WB37
7 สกุล 10 สปีชีส์		

เมื่อพิจารณาความหลากหลายของยีสต์ที่พบในป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ในบริเวณชายฝั่งด้านตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนโดยเปรียบเทียบกับป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรีซึ่งอยู่บริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนแล้วพบว่ามีความหลากหลายของชนิดแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือการที่ไม่พบยีสต์กลุ่มใดมากเป็นพิเศษในป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์เหมือนที่พบในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรี อาจเป็นเพราะบริเวณจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์มีโรงงานอุตสาหกรรมน้อยกว่าจังหวัดทางภาค

ตะวันออก ป่าชายเลนที่ทำการศึกษาตั้งอยู่ไกลแหล่งชุมชน อีกทั้งยังเก็บตัวอย่างในฤดูหนาว ทำให้ไม่มีการปนเปื้อนยีสต์จากแหล่งอื่นเช่น กิ่งไม้ใบไม้ลงมาปะปนในน้ำและตะกอนดินของป่าชายเลน นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาดังข้างต้นแล้ว ป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ยังมีสภาพแวดล้อมเฉพาะต่างจากป่าชายเลนที่ทำการศึกษาในจังหวัดตราดและจันทบุรี โดยป่าชายเลนในวนอุทยานปราณบุรีเป็นป่าชายเลนเก่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศน์สูงและถูกรบกวนจากกิจกรรมของมนุษย์น้อย เนื่องจากได้รับการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมมาจาก "โครงการพัฒนาป่าไม้ปากน้ำปราณบุรี" ตามพระราชประสงค์ของสมเด็จพระนางเจ้าพระบรม -ราชินีนาถ และกรมป่าไม้ได้ประกาศจัดตั้งเป็นวนอุทยานเมื่อวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2525 (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพืชพันธุ์, 2550) จนถึงเวลานี้เป็นเวลากว่า 25 ปี จึงน่าจะเป็นสาเหตุทำให้พบว่ามีความหลากหลายของยีสต์มากกว่าป่าชายเลนในโครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ยซึ่ง ถูกใช้เป็นบ่อบำบัดน้ำเสียใน "โครงการศึกษาวิจัยและพัฒนาสิ่งแวดล้อมแหลมผักเบี้ย อันเนื่องมาจาก พระราชดำริ" ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2535 เป็นต้นมา ซึ่งโครงการนี้มีระบบบำบัดน้ำเสียด้วยแปลงพืชป่าชายเลนอันมีโกงกางและแสมเป็นหลัก (มูลนิธิชัยพัฒนา, 2535) จึงทำให้พื้นที่บริเวณนี้เกิดการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ยีสต์ที่มีการเจริญได้ดีในน้ำเสียที่นำมาบำบัดก็จะมีจำนวนมาก ในขณะเดียวกันยีสต์ที่ไม่สามารถเจริญได้ หรือเจริญได้น้อยก็จะลดน้อยลงจนหายไปในที่สุด ทำให้ยีสต์ที่พบในป่าชายเลนในโครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ยมีความหลากหลายค่อนข้างต่ำ แต่อีกนัยหนึ่งยีสต์ที่พบได้ในบ่อน้ำเสียนี้อาจเป็นยีสต์ที่สามารถใช้ในการบำบัดน้ำเสียได้ดี

จากการพิจารณาเปรียบเทียบการกระจายตัวของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทย พบมียีสต์ 6 สกุล 7 สปีชีส์ ที่พบทั้งในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตก โดยพบ *Rhodotorula mucilaginosa* เฉพาะในน้ำ พบ *Metschnikowia koreensis* เฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ และพบ *Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri และ Pichia kudriavzevii* กระจายอยู่ทั้งในน้ำและตะกอนดินของทั้งในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตก โดยพบมี *K. siamensis* เฉพาะในน้ำของป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและในตะกอนดินป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยเท่านั้น รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 18

ผลการศึกษาพบว่ายีสต์ที่พบมากที่สุดในน้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือยีสต์ในสกุล *Candida* และ *Rhodotorula* ยีสต์ในสกุล *Candida* เป็นยีสต์ที่มีรายงานการพบเสมอในแม่น้ำ ทะเลสาบ น้ำกร่อย น้ำทะเล มหาสมุทร และน้ำที่มีมลภาวะ (Fell *et al.*, 1960 และ de Araujo, 1995) และสอดคล้องกับที่มีการรายงานว่ายีสต์ที่แยกจากกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วงที่แช่ในน้ำจากป่าชายเลนด้านอ่าวไทยในจังหวัดตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี และน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัย-

เกษตรศาสตร์ ซึ่งส่วนใหญ่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida* เช่นกัน (กุสุมาวดี, 2549; สมจิต, 2550) โดยพบในน้ำมากถึง 22 สายพันธุ์ คิดเป็น 31.9 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดในน้ำ และในจำนวนนี้พบเป็น *Candida tropicalis* มากที่สุด (12 สายพันธุ์) สำหรับยีสต์สีแดงในสกุล *Rhodotorula* (13 สายพันธุ์) นั้น พบว่า 11 สายพันธุ์แยกได้จากในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรี ในขณะที่พบในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เพียง 2 สายพันธุ์ และจากการที่ยีสต์สีแดงเป็นดัชนีบ่งชี้มลภาวะในน้ำเสียจากชุมชน (สาวิตรี, 2549) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าน้ำในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรีมีการปนเปื้อนน้ำเสียจากชุมชนซึ่งอาจเนื่องมาจากการที่ป่าชายเลนที่ทำการศึกษาตั้งอยู่ใกล้แหล่งชุมชนและบ่อเลี้ยงกุ้ง และยังอาจเนื่องมาจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างอยู่ในช่วงฤดูมรสุมดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น มีฝนตกหนักและเกิดน้ำท่วมขังในตัวจังหวัดตราดและจันทบุรี ทำให้ต้องมีการระบายน้ำที่ท่วมขังลงสู่แม่น้ำและป่าชายเลนที่ติดกับทะเล จึงเป็นเหตุให้น้ำในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรีมีการปนเปื้อนน้ำเสียจากชุมชน ยีสต์ที่พบรองลงมาในน้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือ *Kluyveromyces siamensis* และ *Pichia guilliermondii* ซึ่งพบ 10 และ 4 สายพันธุ์ตามลำดับ

สำหรับยีสต์ที่พบมากที่สุดในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือยีสต์ในสกุล *Candida* (19 สายพันธุ์) คิดเป็น 44.2 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดในตะกอนดิน และในจำนวนนี้พบเป็น *Candida tropicalis* มากที่สุด (12 สายพันธุ์) ยีสต์ที่พบรองลงมาคือ *Kluyveromyces siamensis* (7 สายพันธุ์), *Candida thaimueangensis* (4 สายพันธุ์) และ *Lindnera subsufficiens* (4 สายพันธุ์) (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน

สปีชีส์	ชายฝั่งตะวันออก		ชายฝั่งตะวันตก	
	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ
Ascomyceteous yeast				
Brettanomyces				
Brettanomyces naardenensis	-	-	WB16, WB18	-
Candida				
Candida chrysomelidarum	-	-	-	WB42
Candida cf. *glabrata*	EA4	-	-	-
Candida gotoi	-	EA31	-	-
Candida fukuyamaensis	EE2	-	-	-
Candida parapsilosis	-	-	WA11, WA12	-
Candida pseudolambica	-	EF7, EF8	-	-
Candida rugosa	EF1	-	-	-
Candida sanittii	EA22	-	-	-
Candida silvae	EE4	EF11	-	-
Candida thaimueangensis	EA5	-	WB9	WB22, WB30, WB33
Candida tropicalis	EA28, EA32, EE3, EE8, EE11, EE12, EE13, EE14, EE16 (9)	EA33, EA35, EA36	WA10, WB1, WB3, WB4, WB8, WB11 (6)	WA8, WB20, WB25, WB26, WB31, WB34 (6)
Clavispora				
Clavispora lusitaniae	EA18	-	-	-
Debaryomyces				
Debaryomyces hansenii	-	-	-	WA6
Debaryomyces nepalensis	-	-	-	WA7
Hanseniaspora				
Hanseniaspora guilliermondii	-	-	WB13	-
Kloeckera				
Kloeckera lindneri	EF2	-	-	-

ตารางที่ 18 (ต่อ)

สปีชีส์	ชายฝั่งตะวันออก		ชายฝั่งตะวันตก	
	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ
Kluyveromyces				
Kluyveromyces siamensis	EA8, EA9, EA12, EA14, EA16, EA17, EE1, EE5, EE6, EE7 (10)	-	-	WA3, WA4, WA9, WB24, WB28, WB29, WB32 (7)
Kodamaea				
Kodamaea ohmeri	-	EF14	WB19	WB38
Lindnera				
Lindnera subsufficiens	EA21, EF9	EF13, EF15, EF16	-	-
Metschnikowia				
Metschnikowia koreensis	-	EA30	-	WB36, WB41
Saccharomyces				
Saccharomyces cerevisiae	EA20	-	-	-
Pichia				
Pichia guilliermondii	-	-	WA1, WB6, WB10, WB43	-
Pichia kudriavzevii	EF3	-	WB12	WB35
Pichia occidentalis	EF4, EF5	-	-	-
Pichia terricola	EA10 , EA23	-	-	-
Torulaspora				
Torulaspora delbrueckii	EE15	-	-	-
Torulaspora maleeae	-	-	WB17	-
Wickerhamomyces				
Wickerhamomyces sydowiorum	-	-	-	WB37
Basidiomyceteous yeast				
Rhodotorula				
Rhodotorula mucilaginosa	W1, W2, W5, W7, W11, W13, W27, W61, W62, W63, W64 (11)	-	WB2, WB7	-

ตารางที่ 18 (ต่อ)

สปีชีส์	ชายฝั่งตะวันออก		ชายฝั่งตะวันตก	
	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ
New species				
Candida sp. 1	EA1	-	-	-
Candida sp. 2	-	-	WB15	-
Candida sp. 3	-	EF17	-	-
Candida sp. 4	-	EF10	-	-
Undescribed species				
Aureobasidium sp. CECT 11965	-	-	-	WB27
Hanseniaspora sp. ST-464	EA25, ED20	-	-	-
Pichia sp. IS1-01	-	EF6	-	-

3. <u>การวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนเปรียบเทียบกับบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน</u>

จากการเปรียบเทียบความหลากหลายของยีสต์ ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน ซึ่งเป็นผลจากการวิจัยของโครงการนี้ กับความหลากหลายของยีสต์ ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามันทางภาคใต้ของประเทศไทย ณ อุทยานแห่งชาติเขาลำปีหาดท้ายเหมือง และอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะระเกาะพระทอง จังหวัดพังงา ที่รายงานโดย Limtong et al., 2008bb และอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนองที่รายงานโดย สมจิต (2551) และสาวิตรี และสมจิต (2551) พบยีสต์ที่พบในน้ำในป่าชายเลนทั้งบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน และป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน มี 17 สปีชีส์ ใน 7 สกุล ดังนี้ *Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida rugosa, Candida sanittii* sp. nov., *Candida silvae, Candida thaimueangensis* sp. nov., *Candida tropicalis, Kloeckera lindneri, Kodamaea ohmeri, Kluyveromyces siamensis* sp. nov., *Lindnera subsufficiences, Pichia caribbica, Pichia guilliermondii, Pichia kluyveri, Pichia occidentalis Torulaspora maleeae*, และ *Rhodotorula mucilaginosa* โดยใน 17 สปีชีส์ เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ของโลก 3 สปีชีส์ (ตารางที่ 19)

ส่วนยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบนแต่ไม่พบในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน มี 10 สปีชีส์ใน 7 สกุล ดังนี้ *Brettanomyces naardenensis, Candida fukuyamaensis, Candida suwanarit* sp. nov., *Candida prachuapensis* sp. nov., *Clavispora lusitaniae, Hanseniaspora guilliermondii, Metschnikowia koreensis, Pichia terricola, Saccharomyces cerevisiae*, และ

Torulaspora delbrueckii (ตารางที่ 19) โดยมียีสต์สปีชีส์ใหม่อยู่ด้วย 2 สปีชีส์ ในขณะที่ยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน แต่ไม่พบในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน มี 25 สปีชีส์ใน 7 สกุล ดังนี้ *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida berthetii*, *Candida boidinii*, *Candida butyri*, *Candida conglobata*, *Candida* cf. *glabrata*, *Candida membranifaciens*, *Candida laemsonensis* sp. nov., *Candida picinguabensis*, *Candida phangngensis* sp. nov., *Candida pseudolambica*, *Candida ranongensis* sp. nov., *Candida* sp. nov. 1, *Candida* sp. nov. 2, *Debaryomyces nepalensis*, *Galactomyces geotrichum*, *Geotrichum siamensis* sp. nov., *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia fabianii*, *Pichia galeiformis*, *Pichia siamensis*, *Pichia sporocuriosa*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon coremiiforme* และ *Trichosporon japonicum* (ตารางที่ 19) โดยในบรรดายีสต์เหล่านี้เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ถึง 5 ปีชีส์

จากการเปรียบเทียบแสดงว่าความหลากหลายของยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามันมีสูงกว่าความหลากหลายของยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน

ตารางที่ 19 การเปรียบเทียบความหลากหลายของยีสต์ ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบนกับชายฝั่งทะเลอันดามัน

สปีชีส์	อ่าวไทยตอนบน[a]				อันดามัน	
	ฝั่งตะวันออก		ฝั่งตะวันตก			
	ตราด	จันทบุรี	เพชรบุรี	ประจวบ	จ.ระนอง[b]	จ.พังงา[c]
Ascomycetous yeast						
Brettanomyces						
Brettanomyces naardenensis	-	-	-	+	-	-
Candida						
Candida andamanensis sp. nov.[d]	-	-	-	-	+	-
Candida berthetii	-	-	-	-	+	-
Candida boidinii	-	-	-	-	+	-
Candida butyri	-	-	-	-	+	-
Candida conglobata	-	-	-	-	-	+
Candida glabrata	+	-	-	-	+	-
Candida cf. *glabrata*	-	-	-	-	-	+
Candida membranifaciens	-	-	-	-	+	-
Candida fukuyamaensis	-	+	-	-	-	-
Candida laemsonensis sp. nov.[e]	-	-	-	-	+	-

สปีชีส์	อ่าวไทยตอนบน[a]				อันดามัน	
	ฝั่งตะวันออก		ฝั่งตะวันตก			
	ตราด	จันทบุรี	เพชรบุรี	ประจวบ	จ.ระนอง[b]	จ.พังงา[c]
Candida parapsilosis	-	+	-	+	+	+
Candida picinguabensis	-	-	-	-	+	+
Candida phangngensis sp. nov.[f]	-	-	-	-	+	+
Candida prachuapensis sp. nov.[g]	-	-	-	+	-	-
Candida pseudolambica	-	-	-	-	+	-
Candida ranongensis sp. nov.[h]	-	-	-	-	+	-
Candida rugosa	+	-	-	-	+	-
Candida sanittii sp. nov.[i]	+	-	-	-	+	-
Candida silvae	-	+	-	-	+	-
Candida suwanarit sp. nov.[j]	+	-	-	-	-	-
Candida thaimueangensis sp. nov.[k]	+	-	-	+	+	+
Candida tropicalis	+	+	+	+	+	+
Candida sp. nov. 1[l]	-	-	-	-	+	-
Candida sp. nov. 2[m]	-	-	-	-	+	-
Clavispora						
Clavispora lusitaniae	+	-	-	-	-	-
Debaryomyces						
Debaryomyces nepalensis	-	-	-	-	+	-
Galactomyces						
Galactomyces geotrichum	-	-	-	-	+	-
Geotrichum						
Geotrichum siamensis sp. nov.[o]	-	-	-	-	-	+
Hanseniaspora						
Hanseniaspora guilliermondii	-	-	-	+	-	-
Kloeckera						
Kloeckera lindneri	+	-	-	-	+	-
Kodamaea						
Kodamaea ohmeri	-	-	-	+	+	-
Kluyveromyces						

สปีชีส์	อ่าวไทยตอนบน[a]				อันดามัน	
	ฝั่งตะวันออก		ฝั่งตะวันตก			
	ตราด	จันทบุรี	เพชรบุรี	ประจวบ	จ.ระนอง[b]	จ.พังงา[c]
Kluyveromyces siamensis sp. nov.[p]	+	+	-	-	+	-
Lindnera						
Lindnera subsufficiences	+	-	-	-	+	-
Lindnera mrakii	-	-	-	-	+	-
Lodderomyces						
Lodderomyces elongisporus	-	-	-	-	-	+
Metschnikowia						
Metschnikowia koreensis	+	-	-	-	-	-
Pichia						
Pichia burtonii	-	-	-	-	+	-
Pichia caribbica	-	-	-	-	+	+
Pichia fabianii	-	-	-	-	-	+
Pichia galeiformis	-	-	-	-	+	-
Pichia guilliermondii	-	-	+	+	-	+
Pichia kluyveri	-	+	-	-	+	-
Pichia kudriavzevii	+	-	-	+	-	-
Pichia occidentalis	-	+	-	-	+	-
Pichia siamensis	-	-	-	-	+	-
Pichia sporocuriosa	-	-	-	-	+	-
Pichia terricola	+	-	-	-	-	-
Saccharomyces						
Saccharomyces cerevisiae	+	-	-	-	-	-
Torulaspora						
Torulaspora delbrueckii	+	-	-	-	-	-
Torulaspora maleeae	-	-	-	+	+	-
Trichosporon						
Trichosporon asahii	-	-	-	-	+	-
Trichosporon coremiiforme	-	-	-	-	+	-
Trichosporon japonicum	-	-	-	-	+	-

สปีชีส์	อ่าวไทยตอนบน[a]				อันดามัน	
	ฝั่งตะวันออก		ฝั่งตะวันตก			
	ตราด	จันทบุรี	เพชรบุรี	ประจวบ	จ.ระนอง[b]	จ.พังงา[c]
Basidiomyceteous yeast	-	-	-	-	-	-
Rhodotorula mucilaginosa	+	+	-	+	+	+

[a] ผลจากการวิจัยในโครงการนี้ [b] สมจิต, 2551; สาวิตรี และสมจิต 2551

[c] Limtong et al., 2008bb

[d, e, f, h, ij, k, l, m , n, o] สปีชีส์ใหม่จาก สมจิต, 2551; สาวิตรี และสมจิต 2551

[f, j, o] สปีชีส์ใหม่จาก Limtong et al., 2008bb

[j, g] สปีชีส์ใหม่จากการวิจัยในโครงการนี้

+ = มีเชื้อสปีชีส์นั้น - = ไม่มีเชื้อสปีชีส์นั้น

4. <u>การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่</u>

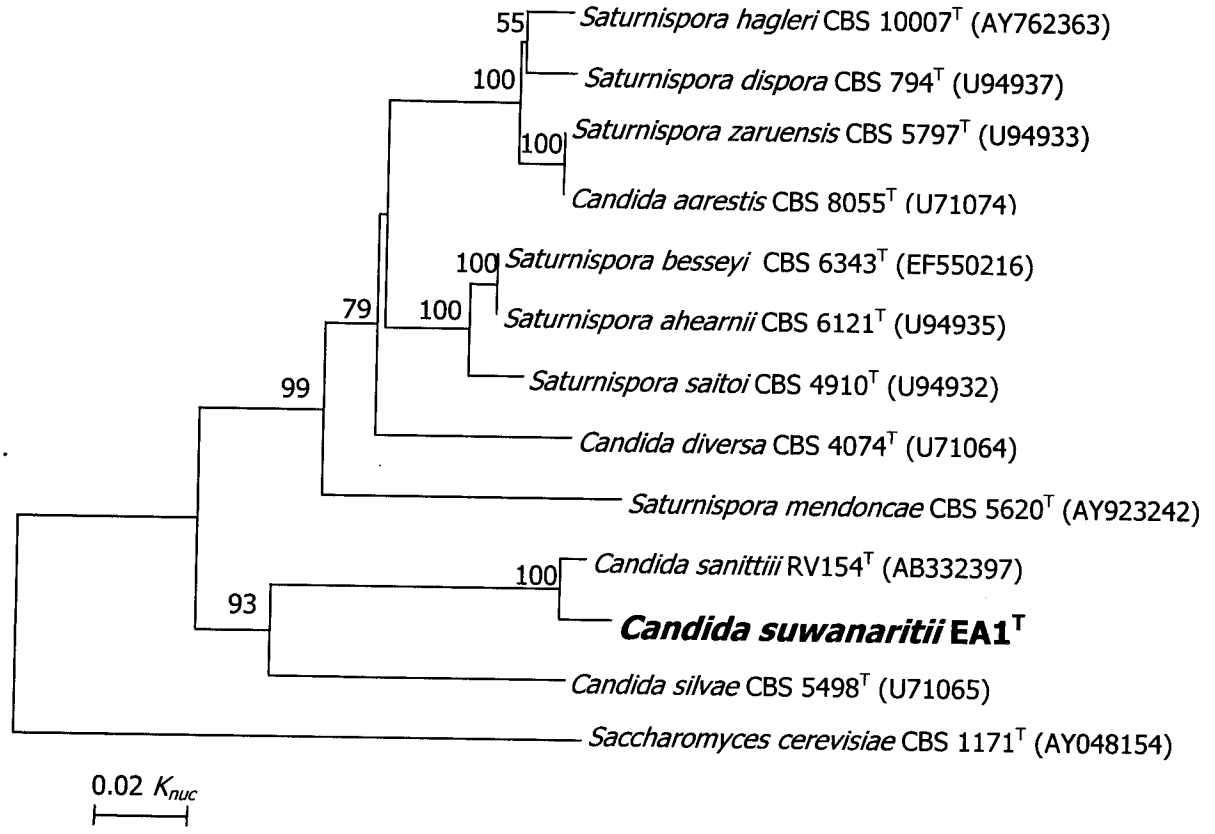
การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่ได้ศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่ ดังนี้

4.1 *Candida suwanaritii* sp. nov. ($EA1^T$)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EA1 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida sanittii* $RV154^T$ โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.3 เปอร์เซ็นต์ (7 นิวคลีโอไทด์ ใน 535 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EA1 (ภาพที่ 3) พบว่ายีสต์ EA1 สร้างคลัสเตอร์กับ *Candida sanittii* $RV154^T$ และ *Candida silvae* NRRL $Y\text{-}6725^T$ แต่อยู่ในตำแหน่งที่ต่างจาก *Candida sanittii* $RV154^T$ ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และสปีชีส์ที่รู้จักแล้วสปีชีส์อื่น ๆ

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ EA1 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida suwanaritii* sp. nov. โดยมี EA1 เป็น type

strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*suwanaritii*" เพื่อเป็นเกียรติแด่รศ. ดร. พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ ผู้เชี่ยวชาญและผู้บุกเบิกการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราของประเทศไทย สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 29900^T) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 104877^T) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11021^T) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 3 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EA1^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน 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 suwanaritii* sp. nov. ($EA1^T$)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมรีขนาด 2.3-3.6 x 2.7-4.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายสั้น ๆ เชื้อจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็ก ๆ ตกตะกอนก้นหลอด มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 4)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยและทึบกว่าบริเวณขอบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 15 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

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	w	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	-	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	-	กรดแลคติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-	ไซลิทอล	w

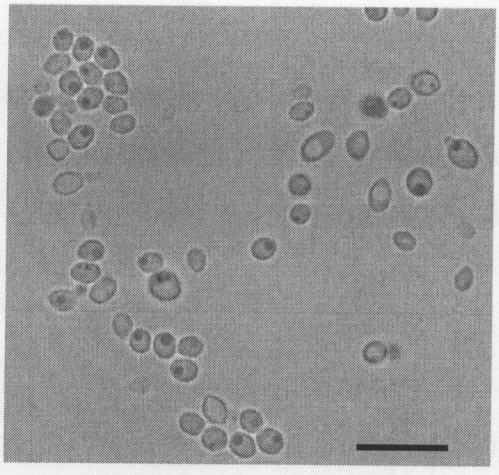
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-

การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี -
สารประกอบยูบิควิโนน Q8
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ -
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์ -



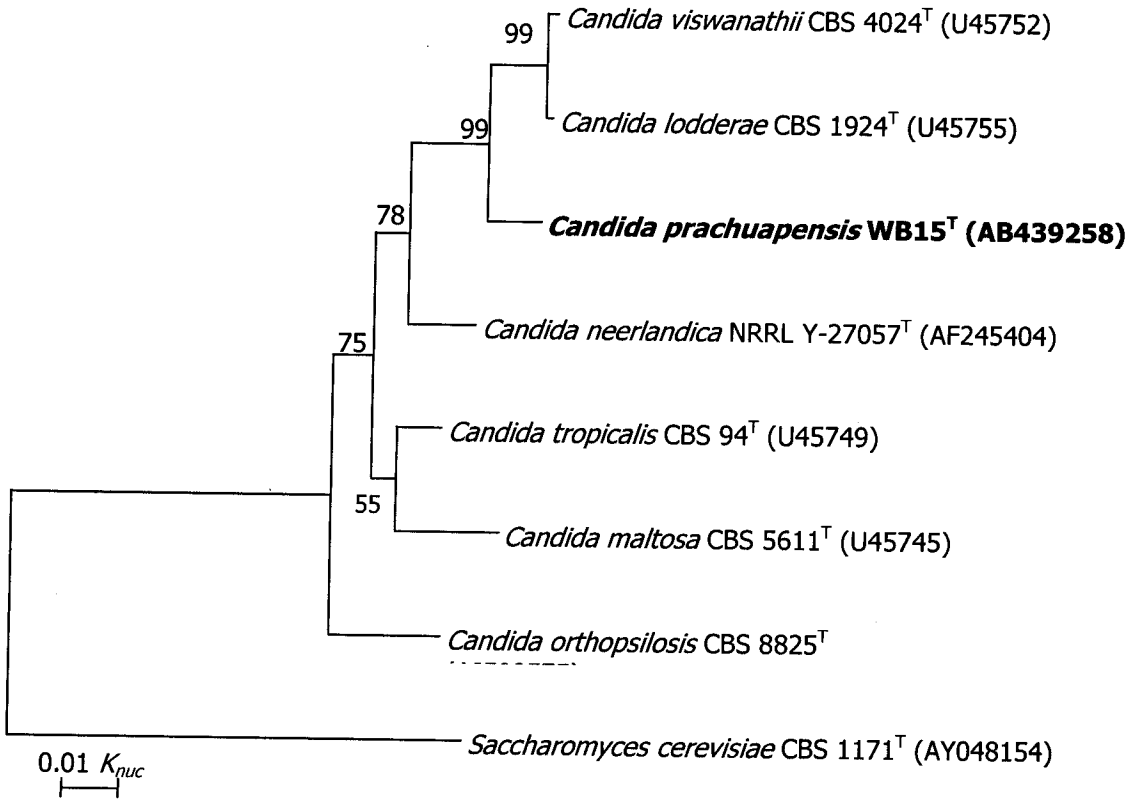
ภาพที่ 4 สัณฐานวิทยาของ *Candida suwanaritii* sp. nov. (EA1^T) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

4.2 *Candida prachuapensis* sp. nov. (WB15^T)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ WB15 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida lodderae* CBS 1924^T โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.6 เปอร์เซ็นต์ (9 นิวคลีโอไทด์ ใน 571 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ WB15 (ภาพที่ 5) พบว่า WB15 สร้างคลัสเตอร์กับ *Candida lodderae* CBS 1924^T ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดและ *Candida viswanathii* CBS 4024^T เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และสปีชีส์ที่รู้จักแล้วสปีชีส์อื่น ๆ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์สายพันธุ์ WB15 เป็นสปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ WB15 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida prachuapensis* sp. nov. โดยมี WB15 เป็น type

strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*prachuapensis*" เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างน้ำในเขตวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ยีสต์สายพันธุ์ WB15 ซึ่งเป็น type strain ของยีสต์สปีชีส์ใหม่นี้ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 29904^{T}) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 104881^{T}) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11024^{T}) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 5 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ WB15^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

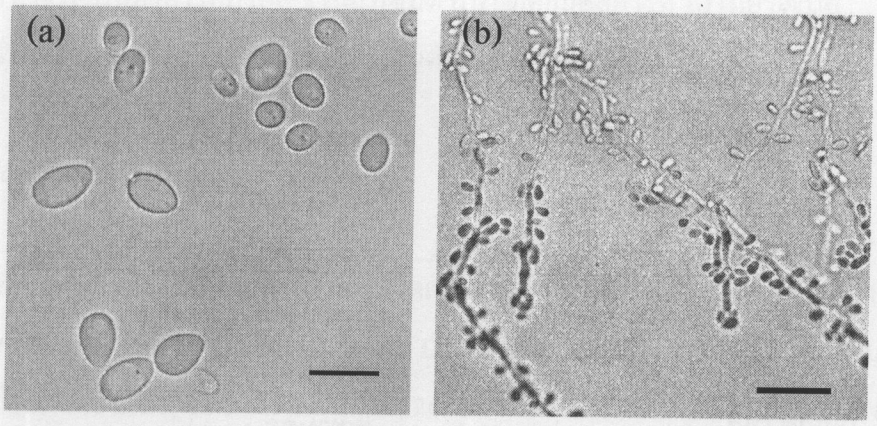
ลักษณะของ *Candida prachuapensis* sp. nov. ($WB15^T$)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างรี บางเซลล์ค่อนข้างยาว ขนาด 3.2-6.8 x 3.6-13.6 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายสั้น ๆ เชื้อมีการเจริญเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็ก ๆ ตกตะกอน เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 6a)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีครีม รูปร่างกลม ผิวหน้าขรุขระมีลักษณะทึบด้านตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยและทึบกว่าบริเวณขอบ ซึ่งมีลักษณะการเจริญคล้ายเส้นใยของเชื้อรา

การสร้างแอสโคสปอร์พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เมื่อบ่มที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 7 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีการสร้างเส้นใยเทียมแบบที่มีการแตกกิ่งก้านสาขา แต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 6b)



ภาพที่ 6 สัณฐานวิทยาของ *Candida prachuapensis* sp. nov. ($WB15^T$)

(a) การเจริญในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

(b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 4 ไมโครเมตร)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	+	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	+		

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	w/-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	+
ราฟฟิโนส	+	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	+	เอทานอล	+
อินูลิน	+	ไซลิทอล	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

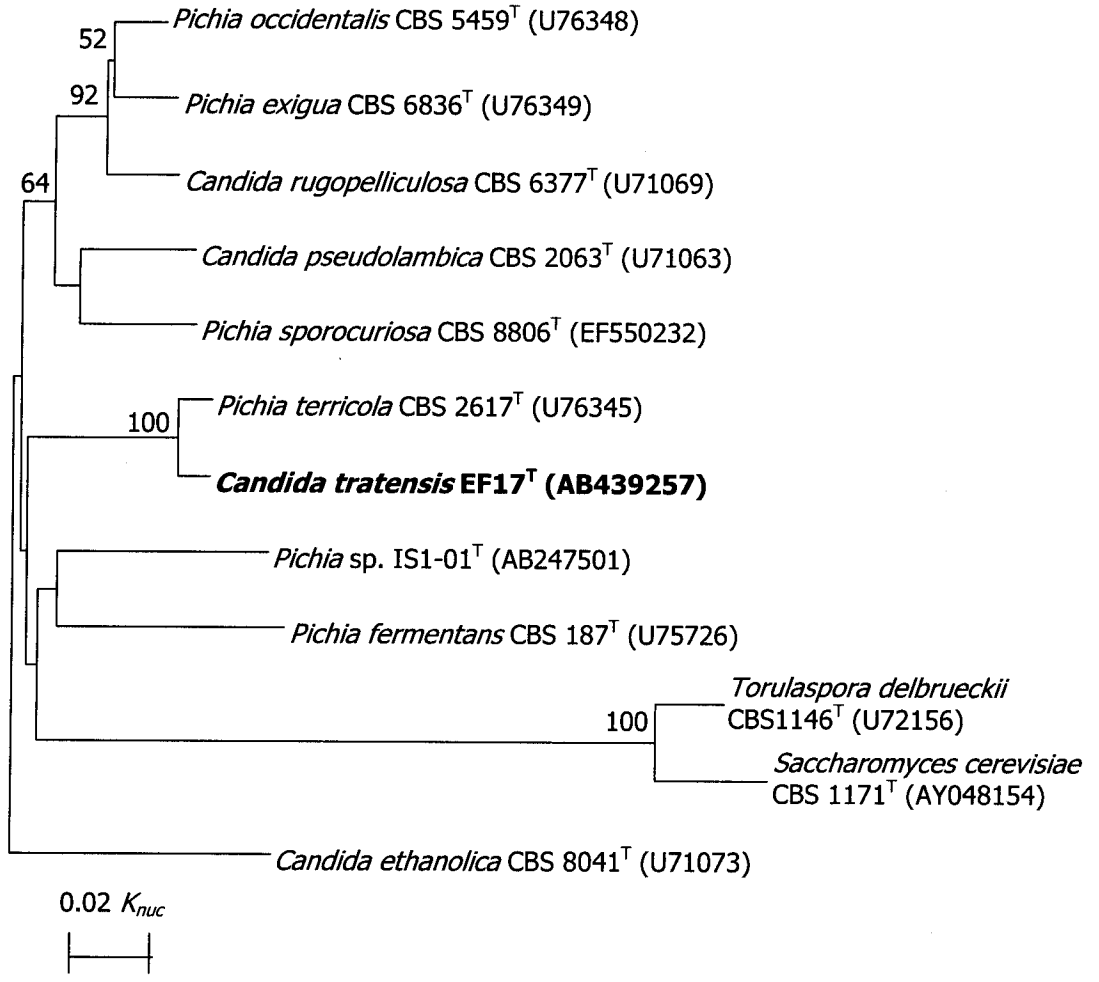
แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์	+

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	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	+
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q8
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-

3.3 *Candida tratensis* sp. nov. ($EF17^T$)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EF17 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Pichia terricola* CBS 2617^T โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.1 เปอร์เซ็นต์ (6 นิวคลีโอไทด์ ใน 555 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความ สัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EF17 (ภาพที่ 7) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ EF17 สร้างคลัสเตอร์กับ *Pichia terricola* CBS 2617^T ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA โดยอยู่บนแขนงที่แยกจากสปีชีส์ที่รู้จักแล้วสปีชีส์อื่น ๆ ดังนั้นจึงเสนอให้ยีสต์สายพันธุ์ EF17 เป็นสปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ EF17 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์อื่น ๆ เหมือนยีสต์ในกลุ่ม *Pichia* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของยีสต์สกุล *Candida* ใน *Pichia* clade และตั้งชื่อเป็น *Candida tratensis* sp. nov. โดยมี EF17 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*tratensis*" เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินในอำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด สำหรับ type strain EF17 ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 29902^T) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 104879^T) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11023^T) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 7 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EF17^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน 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 tratensis* sp. nov. ($EF17^T$)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างรียาวขนาด 1.8-4.1 x 2.7-7.3 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายสั้น ๆ เชื้อจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็ก ๆ ตกตะกอน มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 8)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีขาวครีมค่อนข้างโปร่งแสง ขอบเรียบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย ผิวหน้าตรงกลางโคโลนีนูนขึ้นเล็กน้อย

การสร้างแอสโคสปอร์พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เมื่อบ่มที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์บ่มนาน 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

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	-	ไซลิทอล	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

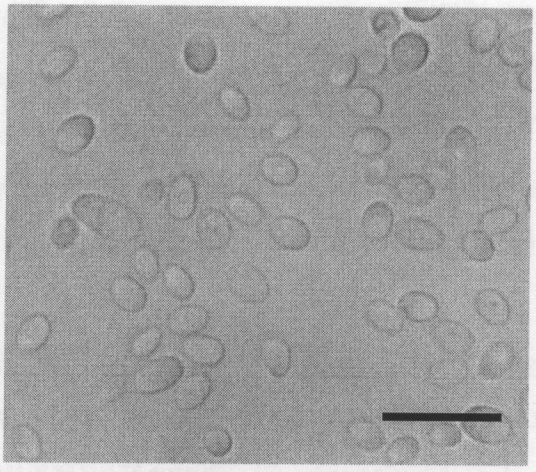
ลักษณะอื่นๆ:

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	w/l
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-

สารประกอบยูบิควิโนน Q7

การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ -

การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์ -

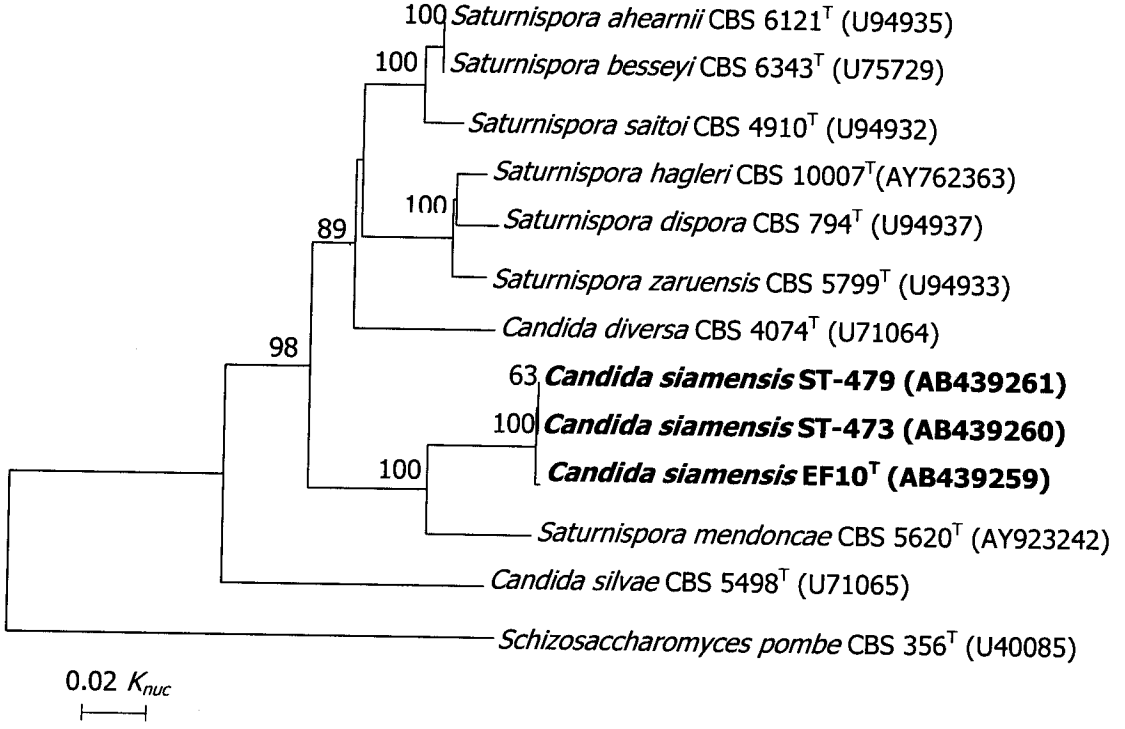


ภาพที่ 8 สัณฐานวิทยาของ *Candida tratensis* sp. nov. (EF17^T) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3.4 *Candida siamensis* sp. nov. (EF10^T)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EF10 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Saturnispora mendocae* CBS 5620^T โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 เปอร์เซ็นต์ (32 นิวคลีโอไทด์ ใน 535 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นพบว่า EF10 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA เหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ ST-473 และ ST-479 ซึ่ง ดร. ศศิธร จินดามรกฎ แยกได้จากกิ่งไม้ผุ และเห็ด (*Hygrophorus* sp.) ตามลำดับ ที่น้ำตกโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา เมื่อวันที่ 5 ก.พ. 2546 เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EF10, ST-473 และ ST-479 (ภาพที่ 9) พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันมากบนต้นไม้วิวัฒนาการโดย EF10 ต่างจาก ST-473 และ ST-479 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกันเพียงเล็กน้อย และทั้ง 3 สายพันธุ์สร้างคลัสเตอร์กับ *Saturnispora mendoncae* CBS 5620^T ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใน *Saturnispora* clade ดังนั้นจึงเสนอว่ายีสต์สายพันธุ์ EF10 เป็นสปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี ไม่พบว่ามีการสร้างแอสโคสปอร์ บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เมื่อบ่มที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ แต่มีลักษณะฟีโนไทป์อื่น ๆ เหมือนยีสต์ในกลุ่ม *Saturnispora* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของยีสต์สกุล *Candida* ใน *Saturnispora* clade และตั้งชื่อเป็น *Candida siamensis* sp. nov. โดยมี EF10 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*siamensis*"เนื่องจากแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำที่เก็บในประเทศไทยซึ่งมีชื่อเดิมว่าสยาม สำหรับ type strain EF10 ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 29901^T) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 104878^T) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11022^T) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 9 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EF10^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน 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 siamensis* sp. nov. ($EF10^T$)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมและรูปร่างรีขนาด 1.3-3.2 x 1.4-8.2 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ เชื้อจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็ก ๆ ตกตะกอนก้นหลอด มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 10)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบโค้งเว้าเล็กน้อย ผิวหน้าตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยและทึบกว่าบริเวณขอบ

การสร้างแอสโคสปอร์พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เมื่อบ่มที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ทั้งเมื่อเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมกับสายพันธุ์ ST-473 และ ST-479

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ บ่มนาน 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

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	w/-	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	-	กรดแลคติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-	ไซลิทอล	-

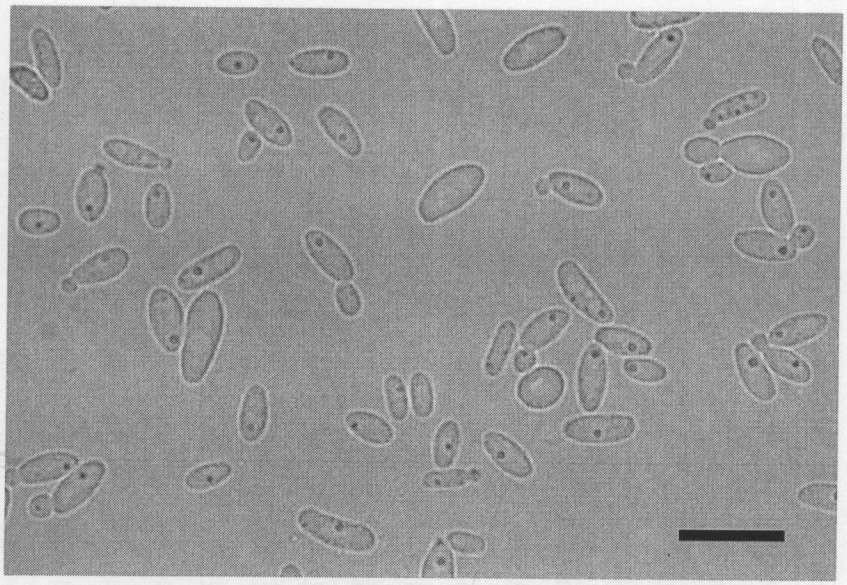
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	w
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	-

การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q7
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 10 สัณฐานวิทยาของ *Candida siamensis* sp. nov. (EF10^{T}) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

4. <u>การเก็บรักษายีสต์</u>

เก็บรักษายีสต์ทั้งหมด 112 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อใน YM broth ที่มีกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ซ้ำ และเก็บแช่แข็ง (deep freezer) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รายละเอียดของข้อมูลการเก็บรักษาแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 20 รายละเอียดของข้อมูลการเก็บรักษายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน

Strain	Species	Sample	Date of sample collection	Date of isolation	Method for isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
EA1	*Candida astuarii* sp. nov.	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/A1,2,3,4
EA4	*Candida* cf. *glabrata*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/A5,6
EA5	*Candida thaimueangensis*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/A7,8
EA8	*Kluyveromyces siamensis*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/B3,4
EA9	*Kluyveromyces siamensis*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/B5,6
EA10	*Pichia terricola*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/B7,8
EA12	*Kluyveromyces siamensis*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/C1,2
EA14	*Kluyveromyces siamensis*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/C5,6
EA16	*Kluyveromyces siamensis*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/C7,8
EA17	*Kluyveromyces siamensis*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/C9,10
EA18	*Clavispora lusitaniae*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/D1,2
EA20	*Saccharomyces cerevisiae*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/D3,4
EA21	*Lindnera subsufficiens*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/D5,6
EA22	*Candida sanittii*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/D7,8
EA23	*Pichia terricola*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/D9,10
EA25	*Hanseniaspora* sp. ST-464	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/E3,4
EA28	*Candida tropicalis*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	52/E9,10
EA30	*Metschnikowia koreensis*	sediment	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	52/F3,4
EA31	*Candida gotoi*	sediment	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	52/F5,6

ตารางที่ 19 (ต่อ)

Strain	Species	Sample	Date of sample collection	Date of isolation	Method for isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
EA32	*Candida tropicalis*	sediment	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	52/F7,8
EA33	*Candida tropicalis*	sediment	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	52/F9,10
EA35	*Candida tropicalis*	sediment	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	52/G1,2
EA36	*Candida tropicalis*	sediment	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	52/G3,4
W1	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	56/A3,4
W2	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	56/A5,6
W5	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	56/B1,2
W7	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	56/B5,6
W11	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	56/C1,2
W13	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	56/C5,6
EF1	*Candida rugosa*	water	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/C1,2
EF2	*Kloeckera lindneri*	water	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/C3,4
EF3	*Pichia kudriavzevii*	water	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/C5,6
EF4	*Pichia occidentalis*	water	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/C7,8
EF5	*Pichia occidentalis*	water	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/C9,10
EF6	*Pchia sp. IS1-01*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/D1,2,3,4
EF7	*Candida pseudolambica*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/D5,6
EF8	*Candida pseudolambica*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/D7,8
EF9	*Lindnera subsufficiens*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/D9,10

ตารางที่ 19 (ต่อ)

Strain	Species	Sample	Date of sample collection	Date of isolation	Method for isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
EF10	*Candida siamensis* sp. nov.	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/E1,2,3,4
EF11	*Candida silvae*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/E5,6
EF12	*Candida diversa*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/E7,8
EF13	*Lindnera subsufficiens*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/E9,10
EF14	*Kodamaea ohmeri*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/F1,2
EF15	*Lindnera subsufficiens*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/F3,4
EF16	*Lindnera subsufficiens*	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/F5,6
EF17	*Candida tratensis* sp. nov.	sediment	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/F7,8,9,10
W27	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	56/F1,2
EE1	*Kluyveromyces siamensis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	53/I7,8
EE2	*Candida fukuyamaensis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	53/I9,10
EE3	*Candida tropicalis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	53/J1,2
EE4	*Candida silvae*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	53/J3,4
EE5	*Kluyveromyces siamensis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	53/J5,6
EE6	*Kluyveromyces siamensis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	53/J7,8
EE7	*Kluyveromyces siamensis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/A1,2
EE8	*Candida tropicalis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/A3,4
EE11	*Candida tropicalis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/A9,10
EE12	*Candida tropicalis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/B1,2

ตารางที่ 19 (ต่อ)

Strain	Species	Sample	Date of sample collection	Date of isolation	Method for isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
EE13	*Candida tropicalis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/B3,4
EE14	*Candida tropicalis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/B5,6
EE15	*Torulaspora delbrueckii*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/B7,8
EE16	*Candida tropicalis*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/B9,10
W61	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	57/B9,10
W62	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	57/C1,2
W63	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	57/C3,4
W64	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	21 เม.ย. 2551	57/C5,6
WA1	*Pichia guilliermondii*	water	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/G1,2
WA3	*Kluyveromyces siamensis*	sediment	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/G5,6
WA4	*Kluyveromyces siamensis*	sediment	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/G7,8
WA6	*Debaryomyces hansenii*	sediment	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/H1,2
WA7	*Debaryomyces nepalensis*	sediment	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/H3,4
WA8	*Candida tropicalis*	sediment	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/H5,6
WA9	*Kluyveromyces siamensis*	sediment	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	54/H7,8
WA10	*Candida tropicalis*	water	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/H9,10
WA11	*Candida parapsilosis*	water	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/I1,2
WA12	*Candida parapsilosis*	water	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/I3,4
WB1	*Candida tropicalis*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/I5,6

ตารางที่ 19 (ต่อ)

Strain	Species	Sample	Date of sample collection	Date of isolation	Method for isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
WB2	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/I7,8
WB3	*Candida tropicalis*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/I9,10
WB4	*Candida tropicalis*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/J1,2
WB6	*Pichia guilliermondii*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/J5,6
WB7	*Rhodotorula mucilaginosa*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/J7,8
WB8	*Candida tropicalis*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	54/J9,10
WB9	*Candida thaimueangensis*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	57/E7,8
WB10	*Pichia guilliermondii*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/A1,2
WB11	*Candida tropicalis*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/A3,4
WB12	*Pichia kudriavzevii*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/A5,6
WB13	*Hanseniaspora guilliermondii*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/A7,8
WB15	*Candida prachuapensis sp. nov.*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/A9,10,B1,2
WB16	*Brettanomyces naardenensis*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/B3,4
WB17	*Torulaspora maleeae*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/B5,6,7,8
WB18	*Brettanomyces naardenensis*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/B9,10
WB19	*Kodamaea ohmeri*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/C1,2
WB20	*Candida tropicalis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/C3,4
WB22	*Candida thaimueangensis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	53/H7,8
WB24	*Kluyveromyces siamensis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/C5,6

ตารางที่ 19 (ต่อ)

Strain	Species	Sample	Date of sample collection	Date of isolation	Method for isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
WB25	*Candida tropicalis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/C7,8
WB26	*Candida tropicalis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/C9,10
WB27	*Aureobasidium sp. CECT 11965*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/D1,2
WB28	*Kluyveromyces siamensis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/D3,4
WB29	*Kluyveromyces siamensis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/D5,6
WB30	*Candida thaimueangensis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	53/B5,6
WB31	*Candida tropicalis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/D7,8
WB32	*Kluyveromyces siamensis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/D9,10
WB33	*Candida thaimueangensis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	53/I1,2
WB34	*Candida tropicalis*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/E1,2
WB35	*Pichia kudriavzevii*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/E3,4
WB38	*Kodamaea ohmeri*	sediment	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	22 มี.ค. 2551	55/E5,6
WB43	*Pichia guilliermondii*	water	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	22 มี.ค. 2551	55/E7,8

สรุปผล

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวัน - ออกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดตราดและจันทบุรี และในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ โดยนำยีสต์ที่แยกไว้แล้วจำนวน 112 สายพันธุ์มาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA พบเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว105 สายพันธุ์ (93.8 เปอร์เซ็นต์) สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 3 สายพันธุ์ (2.7 เปอร์เซ็นต์) และสปีชีส์ใหม่ 4 สายพันธุ์ (3.6 เปอร์เซ็นต์) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การจัดจำแนกยีสต์จากตัวอย่างน้ำ 69 สายพันธุ์ พบว่า 65 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 12 สกุล 23 สปีชีส์ คือ *Brettanomyces naardenensis, Candida* cf. *glabrata, Candida fukuyamaensis, Candida parapsilosis , Candida rugosa, Candida sanittii, Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Clavispora lusitaniae, Hanseniaspora guilliermondii, , Kloeckera lindneri, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Pichia guilliermondii, Pichia .kudriavzevii, Pichia occidentalis, Pichia terricola, Rhodotorula mucilaginosa, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii* และ *Torulaspora maleeae* เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 2 สายพันธุ์ คือ *Hanseniaspora* sp. ST-464 และเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ 2 สายพันธุ์ คือ *Candida suwanaritii* sp. nov. และ *Candida prachuapensis* sp. nov.

ส่วนยีสต์จากตัวอย่างจากตะกอนดิน 43 สายพันธุ์ พบว่า 39 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 8 สกุล 14 สปีชีส์ คือ *Candida chrysomelidarum, Candida gotoi, Candida pseudolambica, Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Debaryomyces hansenii, Debaryomyces nepalensis, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Metschnikowia koreensis, Pichia kudriavzevii* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* เป็นยีสต์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สายพันธุ์ คือ *Pichia* sp. IS1-01 และเหมือนกับราคล้ายยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สายพันธุ์ คือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 และเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ 2 สายพันธุ์ คือ *Candida tratensis* sp. nov. และ *Candida siamensis* sp. nov.

โดยสปีชีส์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำ มี 7 สปีชีส์ ใน สกุล คือ *Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Kluyveromyces siamensis* sp. nov., *Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiences* และ *Pichia kudriavzevii*

2. จากการพิจารณาการกระจายตัวของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทย พบว่ามีแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 8 สกุล 17 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย ประกอบด้วย 7 สกุล 12 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในน้ำ คือ *Candida* cf. *glabrata, Candida fukuyamaensis, Candida rugosa , Candida sanittii , Candida silvae, Clavispora lusitaniae, Kloeckera lindneri, Kluyveromyces siamensis, Pichia occidentalis, Pichia terricola, Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulaspora delbrueckii* และ 2 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตะกอนดิน คือ *Candida gotoi* และ *Candida pseudolambica* นอกจากนั้นพบ 2 สปีชีส์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดิน ได้แก่ *Candida silvae* และ *Lindnera subsufficiens*

ส่วนแอสโคมัยซีตัสยีสต์ที่พบเฉพาะในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยมี 9 สกุล 12 สปีชีส์ ประกอบด้วย ยีสต์ 6 สกุล 6 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในน้ำ คือ *Brettanomyces naardenensis, Candida parapsilosis, Hanseniaspora guilliermondii, Kodamaea ohmeri, Pichia guilliermondii* และ *Torulaspora maleeae* และ 5 สกุล 6 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ คือ *Candida chrysomelidarum, Debaryomyces hansenii , Debaryomyces nepalensis, Kluyveromyces siamensis, Pichia kudriavzevii* และ *Wickerhamomyces sydowiorum*

นอกจากนี้ยังพบมีแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 5 สกุล 6 สปีชีส์ที่พบทั้งในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทย โดยพบ *Pichia kudriavzevii* เฉพาะในน้ำ พบ *Metschnikowia koreensis* และ *Kodamaea ohmeri* เฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ และพบ *Candida thaimueangensis, Candida tropicalis* และ *Kluyveromyces siamensis* กระจายอยู่ทั้งในน้ำและตะกอนดินโดยพบมี *Candida thaimueangensis* อยู่ในน้ำของป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและในตะกอนดินของป่าชายเลนทั้งบริเวณชายฝั่งตะวันออกและชายฝั่งตะวันตก และพบมี *Kluyveromyces siamensis* เฉพาะในน้ำของป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและในตะกอนดินป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยเท่านั้น

สำหรับเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์นั้นพบกระจายทั่วไปในน้ำของป่าชายเลนเกือบทุกแห่งที่ทำการศึกษา โดยมีสปีชีส์ที่พบเป็นหลักคือ *Rhodotorula mucilaginosa* (13 สายพันธุ์) คิดเป็น 16 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดที่ทำการศึกษา

ยีสต์ที่พบมากที่สุดในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือ ยีสต์ในสกุล *Candida* (17 สายพันธุ์) คิดเป็น 39.5 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดในตะกอนดิน และในจำนวนนี้พบเป็น *Candida tropicalis* มากที่สุด (9 สายพันธุ์) ยีสต์ที่พบรองลงมาคือ *Kluyveromyces siamensis* (7 สายพันธุ์)

ผลการศึกษาพบว่ายีสต์ที่พบมากที่สุดในน้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือ ยีสต์ในสกุล *Candida* และ *Rhodotorula* โดยในน้ำพบยีสต์สกุล *Candida* มากถึง 24 สายพันธุ์ คิดเป็น 35.3 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดในน้ำ และในจำนวนนี้เป็น *Candida tropicalis* มากที่สุด (15 สายพันธุ์) สำหรับยีสต์สีแดงสกุล *Rhodotorula* (13 สายพันธุ์) นั้นพบว่า 11 สายพันธุ์แยกได้จากในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรี ในขณะที่พบในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เพียง 2 สายพันธุ์ ยีสต์ที่พบมากรองลงมาในน้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือ *Kluyveromyces siamensis* และ *Pichia occidentalis* ซึ่งแต่ละสปีชีส์พบ 10 สายพันธุ์ การที่พบยีสต์ในสกุล *Candida* และ *Rhodotorula* มากในน้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนนั้นสอดคล้องกับรายงานที่เคยมีมาแล้วว่า ยีสต์ในสกุล *Candida* เป็นยีสต์ที่มีรายงานว่าพบเสมอในแม่น้ำ ทะเลสาบ น้ำกร่อย น้ำทะเล และมหาสมุทร รวมทั้งในน้ำที่มีมลภาวะ โดยเฉพาะยีสต์สีแดงนั้นยิ่งจัดเป็นดัชนีสำคัญในการชี้วัดน้ำเสีย (Fell *et al.*, 1960 และ Araujo, 1995) แสดงให้เห็นว่าน้ำในป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยมีการปนเปื้อนมลภาวะ และมีสารอินทรีย์มาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษายีสต์ที่แยกจากกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วงที่แช่ในน้ำจากป่าชายเลนด้านอ่าวไทยในจังหวัดตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี และน้ำในป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida* เช่นกัน (กุสุมาวดี, 2549; สมจิต, 2550)

3. จากการเปรียบเทียบความหลากหลายของยีสต์ ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน ซึ่งเป็นผลจากการวิจัยของโครงการนี้ กับความหลากหลายของยีสต์ ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามันทางภาคใต้ของประเทศไทย ณ อุทยานแห่งชาติเขาลำปีหาดท้ายเหมือง และอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะระเกาะพระทอง จังหวัดพังงา ที่รายงานโดย Limtong et al., 2008bb และอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนองที่รายงานโดย สมจิต (2551) และ สาวิตรี และสมจิต (2551) พบยีสต์ที่พบในน้ำในป่าชายเลนทั้งบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน และป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน มี 17 สปีชีส์ใน 7 สกุล ดังนี้ *Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida rugosa, Candida sanittii* sp. nov., *Candida silvae, Candida thaimueangensis* sp. nov., *Candida tropicalis, Kloeckera lindneri, Kodamaea ohmeri, Kluyveromyces siamensis* sp. nov., *Lindnera subsufficiences, Pichia caribbica, Pichia guilliermondii, Pichia kluyveri*, *Pichia occidentalis Torulaspora maleeae*, และ *Rhodotorula mucilaginosa* โดยใน 17 สปีชีส์ เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ของโลก 3 สปีชีส์

ส่วนยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบนแต่ไม่พบในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน มี 10 สปีชีส์ใน 7 สกุล ดังนี้ *Brettanomyces naardenensis*, *Candida fukuyamaensis, Candida suwanarit* sp. nov., *Candida prachuapensis* sp. nov., *Clavispora lusitaniae*,

Hanseniaspora guilliermondii, Metschnikowia koreensis, Pichia terricola, Saccharomyces cerevisiae, และ *Torulaspora delbrueckii* โดยมียีสต์สปีชีส์ใหม่อยู่ด้วย 2 สปีชีส์ ในขณะที่ยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน แต่ไม่พบในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน มี 25 สปีชีส์ใน 7 สกุล ดังนี้ *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida berthetii*, *Candida boidinii*, *Candida butyri*, *Candida conglobata*, *Candida* cf. *glabrata*, *Candida membranifaciens*, *Candida laemsonensis* sp. nov., *Candida picinguabensis*, *Candida phangngensis* sp. nov., *Candida pseudolambica*, *Candida ranongensis* sp. nov., *Candida* sp. nov. 1, *Candida* sp. nov. 2, *Debaryomyces nepalensis, Galactomyces geotrichum, Geotrichum siamensis* sp. nov., *Lodderomyces elongisporus, Pichia fabianii, Pichia galeiformis*, *Pichia siamensis, Pichia sporocuriosa*, *Trichosporon asahii, Trichosporon coremiiforme* และ *Trichosporon japonicum* โดยในบรรดายีสต์เหล่านี้เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ถึง 5 สปีชีส์ จากการเปรียบเทียบแสดงว่าความหลากหลายของยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามันมีสูงกว่าความหลากหลายของยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน

ตารางที่ 21 ผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงาน ปัญหาอุปสรรค และแนวทางแก้ไข

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน	ปัญหาและอุปสรรค	แนวทางแก้ไข
1. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของยีสต์ที่รวบรวมไว้	ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของยีสต์ที่รวบรวมไว้อย่างน้อย 100 สายพันธุ์ (ได้ยีสต์ที่บริสุทธิ์)	ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของยีสต์ที่รวบรวมไว้และได้ยีสต์บริสุทธิ์ 112 สายพันธุ์	-	-
2. เก็บรักษายีสต์ที่รวบรวมไว้โดยการแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส	เก็บรักษายีสต์อย่างน้อย 100 สายพันธุ์	เก็บรักษายีสต์ที่ศึกษาทั้งหมด 112 สายพันธุ์ โดยการเลี้ยงใน YM broth ที่มีกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ซ้ำ และเก็บในตู้แช่-แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	-	-
3. การจัดจำแนกชนิดของยีสต์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA	สามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ในระดับสปีชีส์อย่างน้อย 100 สายพันธุ์	ทำการจัดจำแนกยีสต์ จำนวน 112 สายพันธุ์ โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และนำมาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTn homology search program พบว่า สามารถจัดจำแนกเป็น สปีชีส์ที่รู้จักแล้วหรือมีการอธิบายแล้ว 105 สายพันธุ์ สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 3 สายพันธุ์ และสปีชีส์ใหม่ 4 สายพันธุ์	-	-

ตารางที่ 21 (ต่อ)

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน	ปัญหาและอุปสรรค	แนวทางแก้ไข
4. วิเคราะห์ลำดับความ สัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และศึกษาลักษณะต่าง ๆ เพื่ออธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่	- ข้อมูลยีสต์สปีชีส์ใหม่ - ต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ 1 เรื่อง	อธิบายลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 4 สปีชีส์ โดยมี 1 สปีชีส์ได้ตีพิมพ์ในวารสาร FEMS Yeast Research จำนวน 1 เรื่อง คือ *Candida siamensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Saturnispora* clade isolated in Thailand	-	-
5. เก็บรวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกยีสต์ที่รวบรวมไว้ และเปรียบเทียบข้อมูลความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน (จากวิทยานิพนธ์ของ น.ส. สมจิต อ่ำอินทร์ ซึ่งได้รับการสนับสนุนโครงการวิทยานิพนธ์จากโครงการ BRT)	1. การจัดจำแนกยีสต์ที่รวบรวมไว้ 2. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนและชายฝั่งทะเลอันดามัน	1. สรุปผลการจัดจำแนกยีสต์ 112 สายพันธุ์ที่ได้แยกไว้แล้วจากน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทย 2. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนและชายฝั่งทะเลอันดามัน	-	-
6. รายงาน	รายงานสรุปโครงการ	รายงานฉบับสมบูรณ์	-	-

เอกสารอ้างอิง

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

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพืชพันธุ์. 2550. วนอุทยานปราณบุรี. **อุทยานเขียว น้ำใส ทรายขาว.** แหล่งที่มา: http://www.dnp.go.th/parkreserve/asp/style2/default.asp?npid=89&lg=1. 2 กุมภาพันธ์ 2550

_____. 2550. อุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอด. **อุทยานเขียว น้ำใส ทรายขาว.** แหล่งที่มา: http://www.dnp.go.th/parkreserve/asp/style1/default.asp?npid= 8&lg=1. 1 กุมภาพันธ์ 2550

ชนภัทร วินยวัฒน์. 2538. **คำอธิบายเบื้องต้นอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ 2535**. สำนักงานนโยบายและทรัพยากรธรรมชาติและแผนสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

มณี ตันติรุ่งกิจ. 2544. เทคนิคทางด้านอณูวิทยาเพื่อการจัดจำแนกชนิดของยีสต์. **เอกสารประกอบการฝึกอบรมยีสต์: การจำแนกประเภท การจัดจำแนก การเก็บรักษา และการใช้ประโยชน์**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มูลนิธิชัยพัฒนา. 2535. แหลมผักเบี้ย การศึกษาวิจัยการกำจัดขยะแบบประหยัดและการบำบัดน้ำเสียโดยธรรมชาติ. **วารสารมูลนิธิชัยพัฒนา.** แหล่งที่มา: http://www.chaipat.or.th, 1สิงหาคม 2535.

สมจิต อ่ำอินทร์. 2551. **ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสนจังหวัดระนอง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สนใจ หะวานนท์. 2548. โครงการ UNEP GEF Project on "Reserving Environmental Degradation Treands in the South China Sea andGulf of Thailand". **เอกสารส่วนที่ 3 รายงานสถานการณ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. เล่มที่ 1, ป่าชายเลน**. กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, กรุงเทพฯ.

สนิท อักษรแก้ว. 2542. **ป่าชายเลน...นิเวศวิทยาและการจัดการ**. พิมพ์ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง และสมจิต อ่ำอินทร์. 2551. **ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสนจังหวัดระนอง.** รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการ BRT T_351136.

สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. 2531. **ประมวลทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมของไทย.** สถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 2539. **อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ : คิดในระดับโลกและทำในระดับประเทศ.** สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2547. **ความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่ชุ่มน้ำอุทยานแห่งชาติหาดเจ้าไหม-เขตห้ามล่าสัตว์ป่าหมู่เกาะลิบง-ปากน้ำตรัง จังหวัดตรัง.** สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

ศศิธร จินดามรกฎ. 2543. **การพิสูจน์ความเหมือนเพื่อระบุชื่อ การเก็บรักษา และการผลิตสารประกอบโพลี-ออลของ ยีสต์ทนเค็มที่แยกได้ในประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาณัติ อาภาภิรม. 2531. **ประมวลทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของไทย : เราจะใช้ทรัพยากรธรรม - ชาติของประเทศได้อีกนานเท่าใด.** สถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศ, กรุงเทพฯ.

Almeida, J. M. G. C. F.. 2005. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiol. Ecol.** 53: 295-303.

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Meyers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol** 215: 403-410.

Am-in, S., W. Yongmanitchai and S. Limtong. 2008. *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., an

ascomycetous yeast isolated from water in a mangrove forest in Ranong province, Thailand. . **FEMS yeast research**.

Araujo, E.V., C.A.G. Soares , A.N. Hagler , L.C. Mendonqa-Hagler. 1995. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. ***Antonie van Leeuwenhoek*** 68:91-99.

Fell, J. W., A. Statzell-Tallman and C. P. Kurtzman. 2004. *Lachancea meyersii* sp. nov., an ascosporogenous yeast from mangrove regions in the Bahama Island. **Studies Mycol.** 50: 359-363.

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

_____, T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetii, A. Statzell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int J Syst Evol Microbiol** 50: 1351-1371

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

Gaston, K.J. and J.I. Spicer. 2004. **Biodiversity : an introduction**. Blackwell, Oxford.

Hagler, A.N., C.A. Rosa, P.B. Morais, L.C. Mendonca-Hagler, G.M. Franco, F.V. Araujo and C.A. Soares. 1993. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Can J Microbiol.** 10: 973-977.

Jindamorakot, S. 2006. **The species diversity of yeasts in some natural habitats of Thailand**. Ph.D.thesis. Kasetsart University.

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.

Kurtzman, C.P.. 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces, Kluyveromyces* and orther member of Saccharomytaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea, Nakaseomyces, Noumovia, Vanderwaltozyma* and *Zygotorolaspora*. **FEMS yeast research** 4: 233-245.

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

_____, _____, E. Basehoar-Powers. 2008. Phylogenetic relationships among species of *Pichia, Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov.. **FEMS yeast research** 8: 939-954.

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

_____, M.A., W.T. Starmer. 1998. Ecology and yeasts, pp. 22-30. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The yeasts, A taxonomic study, 4th edn.** Elsevier Scince, Amsterdum.

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

_____, Y. Imanishi, S. Jindamorakot, S. Ninomiya, W. Yongmanitchai and T. Nakase. 2008a. *Torulaspora maleeae* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species from Japan and Thailand. **FEMS Yeast Res**. pp. 1-7.

_____, _____, _____ and _____. 2008b. *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.. 2006. Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments, pp. 241-262 In C.A. Rosa and G. Peter, eds. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer, Germany.

Nakase, T.. 2001. What is yeast? The definition and general properties of yeast. Lecture Note for **Workshop on Yeasts: Classification, Identification, Preservation and Application**. At Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 9-13 July 2001.

_____, M. Suzuki. 1986. The Ubiquinone system in strains of species in the ballistospore-forming yeast genera *Sporidiobolus, Sporoboromyces* and *Bullera*. **Int J Syst Evol Microbiol** 32: 251-258.

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

Scorzetii, G., J.W. Fell, A. Fonseca, A. Statzell-Tallman. 2002. Systematics of basidiomycetous yeast: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA region. **FEMS Yeast Research** 2: 495-517.

Soares C. A., M. Maury, F. C. Pagnocca, F. V. Araujo, L. C. Mendonca-Hagler and A. N. Hagler. 1997. Ascomycetous yeasts from tropical intertidal dark mud of southeast Brazillian estuaries. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 43: 265-272.

Spencer, J.F.T., Spencer D.M.. 1997. **Yeasts in natural and artificial habitats**. Springer, Berlin.

Statzell-Tallman, A., C. Belloch and J. W. Fell. 2007. *Kwoniella mangroviensis* gen.nov., sp. nov. (Tremellales, Basidiomycota), a teleomorphic yeast from mangrove habitats in the Florida Everglades and Bahamas. **FEMS Yeast Res**. pp. 1-11.

Sugita, T. and A. Nishikawa. 2003. Fungal identification method based on DNA sequence analysis: Reassessment of the methods of the Pharmaceutical Society of Japan and the Japanese Pharmacopoiea. **Journal of Health Science** 49: 531-533.

Takashima, M.. 2001. Molecular phylogeny. In T. Nakase, ed. **Workshop on Yeasts: Classification, Identification, Preservation and Applications**. n.p.

Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins. 1997. The CLASTAL_X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. **Nucleic Acids Res** 25:4876-4882.

Valente, P., J.P. Ramos, O. Leoncini. 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Can J Microbiol.** 45:949-958.

Yamada, Y., K. Kondo. 1973. Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus*, and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodosporidium*. **J Gen Appl Microbiol**. 19:59-77.

Yarrow, D.. 1998. Method for the isolation, maintenance and identification of yeasts, pp. 75-100. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The yeasts, A taxonomic study, 4th edn.** Elsevier Scince, Amsterdum.

ภาคผนวก

4.1 แบบบันทึกข้อมูลสำหรับบันทึกข้อมูลโครงการวิทยานิพนธ์ เรื่อง ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน และการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน

ตารางที่ 22 แบบบันทึกข้อมูลยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน

รหัสสายพันธุ์	ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่คัดแยก	วิธีการแยก	วิธีการจัดจำแนก	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเหตุ
EA1	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida suwanaritii sp. nov.*	New species
EA4	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida* cf. *glabrata*	
EA5	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida thaimueangensis*	
EA8	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
EA9	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
EA10	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia terricola*	
EA12	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
EA14	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
EA16	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
EA17	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
EA18	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Clavispora lusitaniae*	
EA20	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Saccharomyces cerevisiae*	

ตารางที่ 22 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่คัดแยก	วิธีการแยก	วิธีการจัดจำแนก	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเหตุ
EA21	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Lindnera subsufficiens*	
EA22	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida sanittii*	
EA23	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia terricola*	
EA25	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Hanseniaspora* sp. ST-464	Undescribed species
EA28	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
EA30	ตะกอนดิน	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Metschnikowia koreensis*	
EA31	ตะกอนดิน	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida gotoi*	
EA32	ตะกอนดิน	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
EA33	ตะกอนดิน	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
EA35	ตะกอนดิน	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
EA36	ตะกอนดิน	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
W1	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
W2	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	

ตารางที่ 22 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่คัดแยก	วิธีการแยก	วิธีการจัดจำแนก	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเหตุ
W5	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
W7	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
W11	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
W13	น้ำ	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด	10 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
EF1	น้ำ	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida rugosa*	
EF2	น้ำ	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kloeckera lindneri*	
EF3	น้ำ	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia kudriavzevii*	
EF4	น้ำ	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia occidentalis*	
EF5	น้ำ	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia occidentalis*	
EF6	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Pchia* sp. IS1-01	Undescribed species
EF7	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida pseudolambica*	

ตารางที่ 22 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่คัดแยก	วิธีการแยก	วิธีการจัดจำแนก	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเหตุ
EF7	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida pseudolambica*	
EF8	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida pseudolambica*	
EF9	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Lindnera subsufficiens*	
EF10	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida siamensis* sp. nov.	New species
EF11	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida silvae*	
EF12	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida diversa*	
EF13	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Lindnera subsufficiens*	
EF14	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Kodamaea ohmeri*	
EF15	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Lindnera subsufficiens*	
EF16	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Lindnera subsufficiens*	
EF17	ตะกอนดิน	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tratensis* sp. nov.	New species
W27	น้ำ	ป่าโกงกาง อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	11 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
EE1	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
EE2	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida fukuyamaensis*	

ตารางที่ 22 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่คัดแยก	วิธีการแยก	วิธีการจัดจำแนก	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเหตุ
EE4	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida silvae*	
EE5	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
EE7	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
EE8	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
EE11	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
EE12	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
EE13	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
EE14	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
EE15	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Torulaspora delbrueckii*	

ตารางที่ 22 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่คัดแยก	วิธีการแยก	วิธีการจัดจำแนก	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเหตุ
EE16	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
W61	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
W62	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
W63	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
W64	น้ำ	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี	12 ต.ค. 2549	ต.ค. 2549	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
WA1	น้ำ	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia guilliermondii*	
WA3	ตะกอนดิน	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
WA4	ตะกอนดิน	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
WA6	ตะกอนดิน	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Debaryomyces hansenii*	

ตารางที่ 22 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่คัดแยก	วิธีการแยก	วิธีการจัดจำแนก	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเหตุ
WA7	ตะกอนดิน	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Debaryomyces nepalensis*	
WA8	ตะกอนดิน	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
WA9	ตะกอนดิน	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
WA10	น้ำ	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
WA11	น้ำ	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida parapsilosis*	
WA12	น้ำ	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี	26 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida parapsilosis*	
WB1	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
WB2	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
WB3	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
WB4	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	

ตารางที่ 22 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่คัดแยก	วิธีการแยก	วิธีการจัดจำแนก	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเหตุ
WB6	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia guilliermondii*	
WB7	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Rhodotorula mucilaginosa*	
WB8	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
WB9	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida thaimueangensis*	
WB10	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia guilliermondii*	
WB11	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
WB12	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia kudriavzevii*	
WB13	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Hanseniaspora guilliermondii*	
WB15	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Candida prachuapensis* sp. nov.	New species
WB16	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Brettanomyces naardenensis*	
WB17	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Torulaspora maleeae*	
WB18	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Brettanomyces naardenensis*	
WB20	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
WB22	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida thaimueangensis*	
WB24	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
WB25	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	

ตารางที่ 22 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่คัดแยก	วิธีการแยก	วิธีการจัดจำแนก	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเหตุ
WB27	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Aureobasidium* sp. CECT 11965	Undescribed species
WB28	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
WB29	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
WB30	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida thaimueangensis*	
WB31	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
WB32	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Kluyveromyces siamensis*	
WB33	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida thaimueangensis*	
WB34	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida tropicalis*	
WB35	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Pichia kudriavzevii*	
WB38	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Kodamaea ohmeri*	
WB41	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	28 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Metschnikowia koreensis*	
WB42	ตะกอนดิน	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	29 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Enrichment technique	D1/D2 sequencing	*Candida chrysomelidarum*	
WB43	น้ำ	วนอุทยานปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	27 ธ.ค. 2549	ม.ค. 2550	Membrane filtration	D1/D2 sequencing	*Pichia guilliermondii*	

4.2 บทความเผยแพร่ประชาสัมพันธ์ผลงานวิจัยสู่สาธารณชน

ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน การค้นพบและรายงานยีสต์ชนิดใหม่ของโลก *Candida siamensis* sp. nov.

นางสาวชนิตา บุญมาก และ ศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ป่าชายเลนมีความสำคัญทั้งในด้านป่าไม้ การประมง และสิ่งแวดล้อม โดยเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสัตว์น้ำ เป็นที่อยู่อาศัยและที่อนุบาลสัตว์น้ำในระยะตัวอ่อน ดังนั้นป่าชายเลนจึงเป็นระบบนิเวศที่มีความจำเพาะและความหลากหลายทางชีวภาพสูง จุลินทรีย์ซึ่งรวมถึงยีสต์นั้นมีบทบาทสำคัญต่อประชากรในระบบนิเวศป่าชายเลน เนื่องจากทำหน้าที่เป็นทั้งผู้ผลิตเริ่มต้นและผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบริเวณนั้น โดยในประเทศไทยพบป่าชายเลนกระจายตามชายฝั่งทะเลในภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ทั้งทางด้านทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนด้านชายฝั่งตะวันออกที่จังหวัดจันทบุรีและตราด และชายฝั่งตะวันตกที่จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์โดยการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกมาได้ 112 สายพันธุ์ด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่ายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ 65 สายพันธุ์มี 61 สายพันธุ์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 23 สปีชีส์ ใน 12 สกุล ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis, Candida* cf. *glabrata, Candida fukuyamaensis, Candida parapsilosis, Candida rugosa, Candida sanittii, Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Clavispora lusitaniae, Hanseniaspora guilliermondii, Kloeckera lindneri, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Pichia guilliermondii, Pichia kudriavzevii, Pichia occidentalis, Pichia terricola, Rhodotorula mucilaginosa, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii* และ *Torulaspora maleeae* มี 2 สายพันธุ์เหมือนสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Hanseniaspora* sp. ST-464 และ 2 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida suwanaritii* sp. nov. และ *Candida prachuapensis* sp. nov. สำหรับยีสต์จากตัวอย่างจากตะกอนดิน 43 สายพันธุ์ พบว่า 39 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 8 สกุล 14 สปีชีส์ คือ *Candida chrysomelidarum, Candida gotoi, Candida pseudolambica, Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Debaryomyces hansenii, Debaryomyces nepalensis, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Metschnikowia koreensis, Pichia kudriavzevii* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* ส่วน 2 สายพันธุ์เหมือนกับยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Pichia* sp. IS1-01 และราคล้ายยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบายคือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 นอกจากนี้ยังพบมี 2 สายพันธุ์เป็น

ยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida siamensis* sp. nov. และ *Candida tratensis* sp. nov. โดยสปีชีส์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำ มี 7 สปีชีส์ ใน สกุล คือ *Candida silvae, Candida thaimueangensis*, *Candida tropicalis, Kluyveromyces siamensis*, *Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiences* และ *Pichia kudriavzevii*

จากการศึกษาการกระจายตัวพบว่ายีสต์ที่พบทั้งในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยมี 7 สปีชีส์ คือ *Rhodotorula mucilaginosa* ที่พบเฉพาะในน้ำ ส่วน *Metschnikowia koreensis* พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ และ *Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri* และ *Pichia kudriavzevii* พบทั้งในน้ำและตะกอนดิน

ผลจากการวิจัยนี้พบยีสต์ชนิดใหม่ถึง 4 สปีชีส์ โดยในขณะนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติแล้ว 1 สปีชีส์ คือ *Candida siamensis* sp. nov. (Boonmark *et al.*, 2009) ยีสต์ชนิดนี้ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และนอกจากจะพบในตะกอนดินในป่าชายเลนแล้วยังอาจพบได้จากไม้ผุ และบนดอกเห็ดอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

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

สมจิต อ่ำอินทร์. 2551. **ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Limtong, S., W. Yongmanitchai, H. Kawasaki and T. Nakase. 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.

4.3 สรุปกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลงานจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. จัดทำโปสเตอร์เรื่อง **Diversity of Yeast in Water and Sediment of Mangrove Forests in the Upper Coast of the Gulf of Thailand** จัดแสดงที่การประชุมวิชาการ BRT ครั้ง 12 ณ จังหวัดสุราษฎ์ธานี ระหว่างวันที่ 9 – 14 ตุลาคม พ.ศ. 2551

2. ตีพิมพ์บทความเพื่อเสนอตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ของยีสต์สปีชีส์ใหม่ในวารสาร FEMS Yeast Research จำนวน 1 เรื่อง คือ ***Candida siamensis*** **sp. nov., an anamorphic yeast species in the** ***Saturnispora*** **clade isolated in Thailand**

3. submit ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNAของยีสต์ที่ทำการศึกษาจำนวน 112 สายพันธุ์ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) เพื่อเป็นข้อมูลความหลากหลายของพันธุกรรมของยีสต์ในระดับสปีชีส์เพื่อการศึกษาต่อไปในอนาคต

เอกสารแนบ 1

สรุป OUTPUTS ที่ได้รับจากการดำเนินงาน

ชื่อโครงการวิจัย

ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน และการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน (รหัสโครงการ BRT T_351136)

ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึง เมษายน พ.ศ. 2552

1. การตีพิมพ์บทความในวารสารวิชาการ

1.1 ตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว (published) จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

(ระบุชื่อผู้แต่ง (Authors), ชื่อเรื่อง (Title), ชื่อวารสารพร้อม volume และเลขหน้า)

Chanita Boonmak, Sasitorn Jindamorakot, Hiroko Kawasaki, Wichien Yongmanitchai, Poonpilai Suwanarit, Takashi Nakase and Savitree Limtong, ***Candida siamensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the Saturnispora clade isolated in Thailand,** FEMS Yeast Research. **DOI:10.111/j.1567-1364.2009.00490.x.**

1.2 อยู่ระหว่างการตีพิมพ์ (in press) จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

(ระบุชื่อผู้แต่ง (Authors), ชื่อเรื่อง (Title), ชื่อวารสาร)

.....

.....

1.3 อยู่ระหว่างส่งต้นฉบับให้วารสารวิชาการ (submitted) จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

(ระบุชื่อผู้แต่ง (Authors), ชื่อเรื่อง (Title))

Savitree Limtong, Rungluk Kaewwichian, Somjit Am-In, Chanita Boonmak, Sasitorn Jindamorakot, Wichien Yongmanitchai, Nantana Srisuk, Hiroko Kawasaki & Takashi Nakase *Candida sanitii* sp. nov., *Candida sekii* sp. nov. and *Candida suwanaritii* three anamorphic yeast species in *Saturnispora* clade, isolated in Thailand.

1.4 อยู่ในระหว่างการจัดทำต้นฉบับ (in manuscript) จำนวน..... เรื่อง ดังนี้

(ระบุชื่อผู้แต่ง (Authors), ชื่อเรื่อง (Title))

.....

.....

2. การตีพิมพ์ผลงานในรูปแบบ Proceedings/คู่มือ/หนังสือ หรืออื่น ๆ (โปรดระบุ) จำนวน..... เรื่อง ดังนี้

.....

.....

3. การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

Diversity of Yeast in Water and Sediment of Mangrove Forests in the Upper Coast of the Gulf of Thailand นำเสนอ ณ งานประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 12 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ระหว่างวันที่ 10 - 13 ตุลาคม 2551

4. จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาตรี โท เอก ในโครงการ จำนวน 1 คน ดังนี้

(ระบุชื่อนักศึกษา, ชื่อวิทยานิพนธ์, ระดับการศึกษา)

นางสาว ชนิตา บุญมาก, วิทยานิพนธ์ เรื่อง ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบน, ปริญญาโท

ลงนาม.....

ผู้รับทุน

วันที่ 27 เมษายน 2551

สรุปรายงานการเงิน

ชื่อโครงการวิจัย: ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน และการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน (รหัสโครงการ BRT T_351136)

ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึง เมษายน พ.ศ. 2552 (12 เดือน)

เงินทุนที่ได้รับ

เงินงวดที่ 1 (21/พ.ค./51)	70,000 บาท
เงินงวดที่ 2.1	50,000 บาท
เงินงวดที่ 2.2	30,000 บาท
รวมทั้งสิ้น	150,000 บาท

รายจ่าย

ยอดรวมค่าใช้จ่ายจากรายงานการเงินครั้งที่ 1	68,951.29 บาท
ยอดรวมค่าใช้จ่ายจากรายงานการเงินครั้งที่ 2	51,048.71 บาท
จำนวนเงินเกิน	56.10 บาท

รายงานการเงินสะสม

ชื่อโครงการวิจัย: ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบน และการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน (รหัสโครงการ BRT T_351136)

ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึง เมษายน พ.ศ. 2552 (12 เดือน)

หมวดงบประมาณ	งบประมาณที่ได้รับแล้ว	ยอดค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นในงวดที่ 1	ยอดค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นในงวดปัจจุบัน (งวดที่ 2.1)	ยอดรวมค่าใช้จ่าย	ยอดคงเหลือ
1. ค่าตอบแทนนักศึกษา น.ส. ชนิตา บุญมาก	21,000	21,000.00	21,000.00	42,000.00	0.00
2. ค่าวัสดุ 2.1 ค่าสารเคมี และวัสดุอื่นๆ	23,000	16,355.18	7,818.58	24,173.76	1,173.79
3. ค่าใช้สอย 3.1 ค่าถ่ายเอกสาร 3.2 ค่าสมาชิกนิตยสาร BRT 3.3 ค่าจ้างเหมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย DNA sequencer 3.4 ค่าไปรษณีย์	55,000	31,569.11	22,309.15	53,878.26	-1,121.74
รวมทั้งสิ้น	120,000	68,924.29	51,127.73	120,052.02	-52.02

ลายมือชื่อ ชนิตา บุญมาก .....

(นางสาวชนิตา บุญมาก)

ผู้จัดทำ

ลายมือชื่อ.....

(ศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง)

หัวหน้าโครงการ