รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากอุทยานแห่งชาติ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน

Diversity of Yeast in Soil from National Parks in the North Eastern Part of Thailand and Their Role in Degradation of Organic Matters in Soil

เสนอ

Biodiversity Research and Training Program (BRT)

โดย

ศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง

นางสาว รุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

RECEIVED
BY [illegible] DATE 5/1/53

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากอุทยานแห่งชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน

Diversity of Yeast in Soil from National Parks in the North Eastern Part of Thailand and Their Role in Degradation of Organic Matters in Soil

เสนอ

Biodiversity Research and Training Program (BRT)

โดย

ศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง

นางสาว รุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยที่ให้ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์นี้เป็นระยะเวลา 1 ปี

ศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง
น. ส. รุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร
ธันวาคม 2552

บทคัดย่อ

โครงการวิทยานิพนธ์เรื่อง	ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากอุทยานแห่งชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน (รหัสโครงการ BRT T_352001)
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่	มกราคม 2552 ถึง ธันวาคม 2552
ชื่อหัวหน้าโครงการ	ศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง
ชื่อนักศึกษา	นางสาว รุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร
สถาบัน	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในอุทยานแห่งชาติ 9 แห่ง วนอุทยานแห่งชาติ 3 แห่ง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า 2 แห่ง และป่าไม้อื่นอีก 8 แห่งใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือประเทศไทย จากการจัดจำแนกยีสต์ 102 สายพันธุ์ โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่ายีสต์ 81 สายพันธุ์ จัดจำแนกได้เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ถึง 32 สปีชีส์ใน 11 สกุล คือ *Candida akabanensis, C. diversa, C. ghanaensis, C. glabrata, C. nivariensis, C. orthopsilosis, C. pararugosa, C. pseudolambica, C. rugosa, C. saopaulonensis, C. tropicalis, Geotrichum fragrans, G. vulgare, Debaryomyces hansenii var. fabryi, D. nepalensis, D. vanrijiae var. vanrijiae, Kazachstania aquatic, K. bovina, K. siamensis, K. unispora, Kluyveromyces hubeiensis, Kodamaea ohmeri, Pichia caribbica, P. galeiformis, P. kluyveri var kluyveri , P. kudriavzevii, P. occidentalis, P. pijperi, Tetrapisispora namnaoensis, Torulaspora globosa, Williopsis saturnus var. mrakii, W. saturnus var. sargentensis* และ *Zygosaccharomyces fermentati* และเป็นแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 1 สายพันธุ์ คือ *Trichosporon mycotoxinivorans* ส่วนยีสต์อีก 12 สายพันธุ์ เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Candida* sp. ST-533, *Geotrichum* sp. CICC 1364, *Geotrichum* sp. MTCC 3974, *Pichia* sp. RV60, *Pichia* sp. ST84 และ *Torulaspora* sp. WB17 และอีก 6 สายพันธุ์อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ นอกจากนี้ยังพบ 2 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ สำหรับรายงานนี้เสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่โดยอาศัยอนุกรมวิธานพอลิฟาซิกรวม 4 สปีชีส์ คือ *Candida mokdahanensis* sp. nov. และ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. เสนอจากสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ ส่วน *Candida asiaensis* sp. nov. และ

Candida sekii sp. nov. เสนอจากสายพันธุ์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย ผลการศึกษาในดินจากป่าไม้มีความหลากหลายของยีสต์สูง โดยเฉพาะยีสต์ในสกุล *Candida* มีมากถึง 15 สปีชีส์ ส่วนสปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุดคือ *Kazachstania siamensis* การทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งของยีสต์ที่แยกได้ พบยีสต์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสทั้งในรูปไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลส และคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส 9 สปีชีส์ คือ *Candida glabrata, C. nivariensis, C. pararugosa, Torulaspora globosa, Williopsis saturnus* var. *mrakii*, สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533, สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17, *Candida mokdahanensis* sp. nov. และ *Candida sekii* sp. nov. ส่วนยีสต์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในรูปคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสได้เพียงอย่างเดียวมี 6 สปีชีส์ คือ *Candida orthopsilosis, Kazachstania aquatic, K. unispora, Kodamaea ohmeri, Pichia caribbica* และ *Zygosaccharomyces fermentati* ยีสต์ที่ย่อยสลายไซแลนมี 4 สปีชีส์ คือ *Candida pararugosa, Torulaspora globosa, Candida sekii* sp. nov. และสปีชีส์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17 และพบยีสต์ที่ย่อยสลายแป้ง 5 สปีชีส์ คือ *Candida pseudolambica, Geotrichum fragrans, Pichia sporocuriosa, Trichosporon mycotoxinivorans* และสปีชีส์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. MTCC 3974 จากผลการวิจัยนี้พอจะประเมินได้ว่ายีสต์หลายชนิดน่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน

Diversity of yeast in forest soils from nine national parks, three forest parks, two wildlife sanctuaries and eight other forests in the north-eastern part of Thailand was studied. Yeast strains were isolated using enrichment technique and identified on the basis of molecular taxonomy by analysis of the D1/D2 domain of the large subunit rRNA gene similarity and phylogeny. A total of 102 yeast strains were obtained from soil samples. Eighty-one strains were identified to be 32 ascomycetous yeast species namely *Candida akabanensis*, *C. diversa*, *C. ghanaensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. saopaulonensis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, *D. nepalensis*, *D. vanrijiae* var. *vanrijiae*, *Geotrichum fragrans*, *G. vulgare*, *Kazachstania aquatic*, *K. bovina*, *K. siamensis*, *K. unispora*, *Kluyveromyces hubeiensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica*, *P. galeiformis*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *P. occidentalis*, *P. pijperi*, *Tetrapisispora namnaoensis*, *Torulaspora globosa*, *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, *W. saturnus* var. *sargentensis* and *Zygosaccharomyces fermentati*. One strain was belonged to a basidiomycetous yeast, *Trichosporon mycotoxinivorans*. Twelve strains were found to be similar to six undescribed species i.e. *Candida* sp. ST-533, *Pichia* sp.

ST84, *Geotrichum* sp. CICC1364, *Geotrichum* sp. MTCC 3974, *Pichia* sp. RV60 and *Torulaspora* sp. WB17 whereas the other six strains could be known or new species however, more study has to be carried out. Moreover, two strains were found to represent two new species. In this report, four new species were proposed on the basis of polyphasic taxonomy. *Candida mokdahanensis* sp. nov. and *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. were proposed from two strains which were found to be new species while *Candida asiaensis* sp. nov. and *Candida sekii* sp. nov. were proposed from the strains similar to undescribed species. Results of this study revealed high diversity of yeasts in forest soils in the north-eastern part of Thailand, especially yeasts in the genus *Candida* were found as many as 15 species whereas *Kazachstania siamensis* was the most frequently isolated species. Degradation of cellulose xylan and starch, which are the main components of soil organic matters, by the isolated yeast strains was investigated in order to estimate their possible role in degradation of soil organic matters. The ability to hydrolyze microcrystalline cellulose and carboxyl methyl cellulose were found in nine species i.e. *Candida glabrata*, *C. nivariensis*, *C. pararugosa*, *Torulaspora globosa*, *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, species similar to *Candida* sp. ST-533, species similar to *Torulaspora* sp. WB17, *Candida mokdahanensis* sp. nov. and *Candida sekii* sp. nov. whereas six species namely *Candida orthopsilosis*, *Kazachstania aquatic*, *K. unispora*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica* and *Zygosaccharomyces fermentati* were found to hydrolyze carboxyl methyl cellulose only. Xylan degrading ability were observed in four species named *Candida pararugosa*, *Torulaspora globosa*, *Candida sekii* sp. nov. and species similar to *Torulaspora* sp. WB17 as well as five species, *Candida pseudolambica*, *Geotrichum fragrans*, *Pichia sporocuriosa*, *Trichosporon mycotoxinivorans* and species similar to *Geotrichum* sp. MTCC 3974, were found to hydrolyze starch. The result of this research revealed that various yeast species may play role in degradation of soil organic matters.

บทสรุปผู้บริหาร

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศ ทั้งนี้เพราะยีสต์บางชนิดมีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในธรรมชาติทำให้มีธาตุอาหารสำหรับสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนั้น การศึกษายีสต์ในแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติเพื่อให้รู้ว่ามียีสต์ชนิดใดอยู่ในแหล่งที่อยู่นั้น ๆ บ้าง นอกจากนั้นการแยกและรวบรวมยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ นั้นเพื่อที่จะได้นำทรัพยากรยีสต์เหล่านั้นมาตรวจสอบคุณสมบัติที่อาจจะนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าไม้ที่ยังอุดมสมบูรณ์มากโดยเฉพาะในเขตอุทยานแห่งชาติ วนอุทยาน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า โดยดินป่าจะมีอินทรีย์วัตถุปริมาณมากซึ่งเหมาะสำหรับเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงน่าที่จะมีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์รวมทั้งยีสต์สูง แต่การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินในป่าเขตอุทยานแห่งชาติ วนอุทยาน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในประเทศไทยมีไม่มากนัก เช่น การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ที่พบยีสต์สกุล *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Pichia* และ *Saccharomyces* (สาวิตรี และคณะ, 2541) การศึกษายีสต์จากดินในป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าสนเขาในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว พบ *Candida, Debaryomyces, Hanseniaspora, Issatchenkia, Kazachstania, Kloeckera, Kluyveromyces Kodamae, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Torulaspora, Williopsis* และ *Zygosaccharomyces* (Sumpradit, 2005) โดยมีหลายสายพันธุ์ที่จัดจำแนกได้เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ ขณะนี้ที่ตั้งชื่อและรายงานแล้ว คือ *Tetrapisispora namnaonensis* (Sumpradit *et al.*, 2005) นอกจากนั้น Limtong *et al.* (2007) รายงานแอสโคมัยซีตัสยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Kazachstania siamensis* ซึ่งแยกได้จากดินจากป่าในเขตอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่ามีรายงานเพียงไม่กี่แห่ง ข้อมูลความหลากหลายของยีสต์ที่พบจึงยังไม่เพียงพอที่จะใช้สรุปว่ายีสต์ที่พบในดินจากป่าจะเป็นชนิดใดบ้าง นอกจากนั้นยังไม่เคยมีการวิจัยเพื่อประเมินบทบาทของยีสต์ในดินในระบบนิเวศธรรมชาติมาก่อน ดังนั้นจึงได้ทำโครงการวิทยานิพนธ์นี้เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าเขตอุทยานแห่งชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าเขตอุทยานแห่งชาติแห่งอื่นที่ได้ศึกษาไว้แล้ว เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะใช้สรุปเป็นความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าในเขตอุทยานแห่งชาติในประเทศไทย นอกจากนั้นในการวิจัยนี้ยังศึกษาความสามารถในการย่อยลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งของยีสต์ที่แยกได้ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของอินทรีย์วัตถุในดิน เพื่อประเมินว่ายีสต์เหล่านั้นน่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินซึ่งมักจะประกอบด้วย ลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตอื่นหรือไม่

ผลจากการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในอุทยานแห่งชาติ 9 แห่ง วนอุทยานแห่งชาติ 3 แห่ง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า 2 แห่ง และป่าไม้อื่นอีก 8 แห่งใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือประเทศไทย จัดจำแนกยีสต์ 102 สายพันธุ์ โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่ายีสต์ 81 สายพันธุ์ จัดจำแนกได้เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ถึง 32 สปีชีส์ใน 11 สกุล คือ *Candida akabanensis, C. diversa, C. ghanaensis, C. glabrata, C. nivariensis, C. orthopsilosis, C. pararugosa, C. pseudolambica, C. rugosa, C. saopaulonensis, C. tropicalis, Geotrichum fragrans, G. vulgare, Debaryomyces hansenii var. fabryi, D. nepalensis, D. vanrijiae var. vanrijiae, Kazachstania aquatic, K. bovina, K. siamensis, K. unispora, Kluyveromyces hubeiensis, Kodamaea ohmeri, Pichia caribbica, P. galeiformis, P. kluyveri var kluyveri , P. kudriavzevii, P. occidentalis, P. pijperi, Tetrapisispora namnaoensis, Torulaspora globosa, Williopsis saturnus var. mrakii, W. saturnus var. sargentensis* และ *Zygosaccharomyces fermentati* และเป็นแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 1 สายพันธุ์ คือ *Trichosporon mycotoxinivorans* ส่วนยีสต์อีก 12 สายพันธุ์ เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Candida* sp. ST-533, *Geotrichum* sp. CICC 1364, *Geotrichum* sp. MTCC 3974, *Pichia* sp. RV60, *Pichia* sp. ST84 และ *Torulaspora* sp. WB17 และอีก 6 สายพันธุ์อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ นอกจากนี้ยังพบ 2 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ สำหรับรายงานนี้เสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่โดยอาศัยอนุกรมวิธานพอลิฟาซิกรวม 4 สปีชีส์ คือ *Candida mokdahanensis* sp. nov. และ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. เสนอจากสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ ส่วน *Candida asiaensis* sp. nov. และ *Candida sekii* sp. nov. เสนอจากสายพันธุ์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย ผลการศึกษาแสดงว่าดินในป่าไม้มีความหลากหลายของยีสต์สูง โดยเฉพาะยีสต์ในสกุล *Candida* มีมากถึง 15 สปีชีส์ ส่วนสปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุดคือ *Kazachstania siamensis*

สำหรับการทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งซึ่งเป็นองค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุในดินของยีสต์ที่แยกได้ เพื่อนำผลไปประเมินว่ายีสต์เหล่านั้นน่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุเหล่านั้นในดินหรือไม่ ผลการทดสอบยีสต์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสทั้งในรูปไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลสและคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส 9 สปีชีส์ คือ *Candida glabrata, C. nivariensis, C. pararugosa, Torulaspora globosa, Williopsis saturnus* var. *mrakii*, สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533, สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17, *Candida mokdahanensis* sp. nov. และ *Candida sekii* sp. nov. ส่วนยีสต์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในรูปคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสได้เพียงอย่างเดียวมี 6 สปีชีส์ คือ *Candida orthopsilosis, Kazachstania aquatic,*

K. unispora, Kodamaea ohmeri, Pichia caribbica และ *Zygosaccharomyces fermentati* ยีสต์ที่ย่อยสลายไซแลนมี 4 สปีชีส์ คือ *Candida pararugosa, Torulaspora globosa, Candida sekii* sp. nov. และสปีชีส์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17 และพบยีสต์ที่ย่อยสลายแป้ง 5 สปีชีส์ คือ *Candida pseudolambica, Geotrichum fragrans, Pichia sporocuriosa, Trichosporon mycotoxinivorans* และสปีชีส์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. MTCC 3974 จากผลการวิจัยนี้พอจะประเมินได้ว่ายีสต์หลายชนิดน่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน

Yeast is one of the microorganisms that play important role in ecosystem. Some yeast species play role in degradation of organic matters which result in production of nutrients for other microorganisms within that ecosystem. Yeast bioresources obtain from isolation from various natural habitats may be further used for biotechnological applications.

Forests in Thailand are very rich in nutrients and their environments are suitable for living organisms, especially forests in national parks, forest parks and wildlife sanctuaries. Therefore, they should be rich in microbial diversity including yeast. However, only a few researches had been conducted to determined yeast diversity of a few forests soils in national parks and wildlife sanctuaries of Thailand. Limtong *et al.*, (1998) reported that yeast in the genus *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Pichia* and *Saccharomyces* were found in soils and plants from Huay Kar Kang Wildlife Sanctuary. In soil of Num Nao National Park high diversity of yeast was reported and various species in the genus *Candida, Debaryomyces, Hanseniaspora, Issatchenkia, Kazachstania, Kloeckera, Kluyveromyces, Kodamae, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Torulaspora, Williopsis* and *Zygosaccharomyces* could be isolated (Sumpradit, 2005). Various strains were found to represent new species. So far *Tetrapisispora namnaonensis* was already described (Sumpradit *et al.*, 2005). *Kazachstania siamensis*, a novel ascomycetous yeast, was isolated from forest soil in Wang Nam Keaw district, Nakhon Ratchasima province (Limtong *et al.*, 2007). Because there were only a few researches on yeast diversity of forest soil in national parks and wildlife sanctuaries of Thailand, therefore, it is not realizable to summarize the whole picture of it diversity in forest soil of natural ecosystem. Moreover, there is no research to determine possible role of yeast in soil in natural ecosystem of Thailand. Therefore, we are proposing a project to determine yeast diversity of forest soils in national parks, forest parks and wildlife sanctuaries in the north eastern part of Thailand and

evaluate their possible role in degradation of organic matters by determination their ability to hydrolyze cellulose, xylan and starch which are the main components of soil organic matters.

Diversity of yeast in forest soils from nine national parks, three forest parks, two wildlife sanctuaries and eight other forests in the north-eastern part of Thailand was studied. Yeast strains were isolated using enrichment technique and identified on the basis of molecular taxonomy by analysis of the D1/D2 domain of the large subunit rRNA gene similarity and phylogeny. A total of 102 yeast strains were obtained from soil samples. Eighty-one strains were identified to be 32 ascomycetous yeast species namely *Candida akabanensis*, *C. diversa*, *C. ghanaensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. saopaulonensis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, *D. nepalensis*, *D. vanrijiae* var. *vanrijiae*, *Geotrichum fragrans*, *G. vulgare*, *Kazachstania aquatic*, *K. bovina*, *K. siamensis*, *K. unispora*, *Kluyveromyces hubeiensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica*, *P. galeiformis*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *P. occidentalis*, *P. pijperi*, *Tetrapisispora namnaoensis*, *Torulaspora globosa*, *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, *W. saturnus* var. *sargentensis* and *Zygosaccharomyces fermentati*. One strain was belonged to a basidiomycetous yeast, *Trichosporon mycotoxinivorans*. Twelve strains were found to be similar to six undescribed species i.e. *Candida* sp. ST-533, *Pichia* sp. ST84, *Geotrichum* sp. CICC1364, *Geotrichum* sp. MTCC 3974, *Pichia* sp. RV60 and *Torulaspora* sp. WB17 whereas the other six strains could be known or new species however, more study has to be carried out. Moreover, two strains were found to represent two new species. In this report, four new species were proposed on the basis of polyphasic taxonomy. *Candida mokdahanensis* sp. nov. and *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. were proposed from two strains which were found to be new species while *Candida asiaensis* sp. nov. and *Candida sekii* sp. nov. were proposed from the strains similar to undescribed species. Results of this study revealed high diversity of yeasts in forest soils in the north-eastern part of Thailand, especially yeasts in the genus *Candida* were found as many as 15 species whereas *Kazachstania siamensis* was the most frequently isolated species.

Degradation of cellulose xylan and starch, which are the main components of soil organic matters, by the isolated yeast strains was investigated in order to estimate their possible role in degradation of soil organic matters. The ability to hydrolyze microcrystalline cellulose and carboxyl methyl cellulose were found in nine species i.e. *Candida glabrata*, *C. nivariensis*,

C. pararugosa, *Torulaspora globosa*, *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, species similar to *Candida* sp. ST-533, species similar to *Torulaspora* sp. WB17, *Candida mokdahanensis* sp. nov. and *Candida sekii* sp. nov. whereas six species namely *Candida orthopsilosis*, *Kazachstania aquatic*, *K. unispora*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica* and *Zygosaccharomyces fermentati* were found to hydrolyze carboxyl methyl cellulose only. Xylan degrading ability were observed in four species named *Candida pararugosa*, *Torulaspora globosa*, *Candida sekii* sp. nov. and species similar to *Torulaspora* sp. WB17 as well as five species, *Candida pseudolambica*, *Geotrichum fragrans*, *Pichia sporocuriosa*, *Trichosporon mycotoxinivorans* and species similar to *Geotrichum* sp. MTCC 3974, were found to hydrolyze starch. The result of this research revealed that various yeast species may play role in degradation of soil organic matters.

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	11
สารบัญตาราง	12
สารบัญภาพ	13
คำนำ	15
วัตถุประสงค์	16
อุปกรณ์และวิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	34
สรุปผล	95
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	97
ภาคผนวก	104

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ยีสต์และข้อมูลของแหล่งตัวอย่างดินที่นำมาแยก	17
2	การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย ยีสต์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ และยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากตัวอย่างดินใน อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และป่าไม้อื่นใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในปี พ. ศ. 2550	36
3	ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	46
4	สายพันธุ์ที่เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายและสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	52
5	ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในอุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และป่าไม้อื่นใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	81
6	ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจากในเขตป่าไม้ที่ตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	90
7	ข้อมูลการเก็บรักษายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างดินในเขตป่าไม้ที่ตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	105

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Candidaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	48
2	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	49
3	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae และ *Trichosporon mycotoxinivorans* และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	50
4	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	53
5	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ สปีชีส์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	54
6	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ LYSM9, RV60^{T}, SC5L04, GE19S05 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	57
7	สัณฐานวิทยาของ *Candida asiaensis* sp. nov. (RV60^{T})	60
8	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ MD9^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	62
9	สัณฐานวิทยาของ *Candida mokdahanensis* sp. nov. (MD9^{T})	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ SR16, UB13, ST84^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	67
11	สัณฐานวิทยาของ *Candida sekii* sp. nov. (ST84^{T})	70
12	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ LYSM5^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	72
13	สัณฐานวิทยาของ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. (LYSM5^{T})	75

คำนำ

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศ ทั้งนี้เพราะยีสต์บางชนิดมีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในธรรมชาติทำให้มีธาตุอาหารสำหรับสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนั้น การศึกษายีสต์ในแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติเพื่อให้รู้ว่ามียีสต์ชนิดใดอยู่ในแหล่งที่อยู่นั้น ๆ บ้าง นอกจากนั้นการแยกและรวบรวมยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ นั้นเพื่อที่จะได้นำทรัพยากรยีสต์เหล่านั้นมาตรวจสอบคุณสมบัติที่อาจจะนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าไม้ที่ยังอุดมสมบูรณ์มากโดยเฉพาะในเขตอุทยานแห่งชาติ วนอุทยาน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า โดยดินป่าจะมีอินทรีย์วัตถุปริมาณมากซึ่งเหมาะสำหรับเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงน่าที่จะมีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์รวมทั้งยีสต์สูง แต่การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินในป่าเขตอุทยานแห่งชาติ วนอุทยาน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในประเทศไทยมีไม่มากนัก การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ที่พบยีสต์สกุล *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Pichia* และ *Saccharomyces* (สาวิตรี และคณะ, 2541) การศึกษายีสต์จากดินในป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าสนเขาในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว พบ *Candida, Debaryomyces, Hanseniaspora, Issatchenkia, Kazachstania, Kloeckera, Kluyveromyces Kodamae, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Torulaspora, Williopsis* และ *Zygosaccharomyces* (Sumpradit, 2005) โดยมีหลายสายพันธุ์ที่จัดจำแนกได้เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ ขณะนี้ที่ตั้งชื่อและรายงานแล้ว คือ *Tetrapisispora namnaonensis* (Sumpradit *et al.*, 2005) นอกจากนั้น Limtong *et al.* (2007) รายงานแอสโคมัยซีตัสยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Kazachstania siamensis* ซึ่งแยกได้จากดินจากป่าในเขตอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่ามีรายงานเพียงไม่กี่แห่ง ข้อมูลความหลากหลายของยีสต์ที่พบจึงยังไม่เพียงพอที่จะใช้สรุปว่ายีสต์ที่พบในดินจากป่าจะเป็นชนิดใดบ้าง นอกจากนั้นยังไม่เคยมีการวิจัยเพื่อประเมินบทบาทของยีสต์ในดินในระบบนิเวศธรรมชาติมาก่อน ดังนั้นจึงได้ทำโครงการวิทยานิพนธ์นี้เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าเขตอุทยานแห่งชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าเขตอุทยานแห่งชาติแห่งอื่นที่ได้ศึกษาไว้แล้ว เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะใช้สรุปเป็นความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าในเขตอุทยานแห่งชาติในประเทศไทย นอกจากนั้นในการวิจัยนี้ยังศึกษาความสามารถในการย่อยลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งของยีสต์ที่แยกได้ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของอินทรีย์วัตถุในดิน เพื่อประเมินว่ายีสต์เหล่านั้นน่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินซึ่งมักจะประกอบด้วย ลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตอื่นหรือไม่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าจากอุทยานแห่งชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยการแยกยีสต์และจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ large subunit ribosomal RNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

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

3. ศึกษาบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินโดยการวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลาย แป้ง เซลลูโลส และไซแลน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

ยีสต์ที่รวบรวมไว้ 102 สายพันธุ์ แยกโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวน (enrichment technique) จากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติ (9 แห่ง) วนอุทยานแห่งชาติ (3 แห่ง) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า (2 แห่ง) และป่าไม้อื่น (8 แห่ง) รวม 22 แห่งในจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดศรีสะเกษ จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดเลย และจังหวัดสกลนคร ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ยีสต์และข้อมูลของแหล่งตัวอย่างดินที่นำมาแยก

รหัสยีสต์	การเก็บตัวอย่าง			พิกัด	
	จุด	สถานที่	วัน เดือน ปี	เส้นรุ้ง (เหนือ)	เส้นแวง (ตะวันออก)
SR1	1	วนอุทยานพนมสวาย	2 พ.ค. 2550	14°46' 38.9"	103°21' 47.0"
SR3	2	อ.ปราสาท จ.สุรินทร์		14°45' 38.9"	103°21' 42.6"
SR7, SR9	3			14°45' 46.8"	103°22' 10.5"
SR16, SR18, SR19, SR20	1	เขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าห้วยทับทัน อ.กาบเชิง จ. สุรินทร์	2 พ.ค. 2550	14°27' 02.8"	103°42' 00.8"
SR22, SR23	1	ป่าละเมาะ บ้านสะเดาพัฒนา อ. บัวเชด จ.สุรินทร์	2 พ.ค. 2550	14°28' 49.6"	103°49' 29.2"
SSK1,SSK2	1	อุทยานแห่งชาติปราสาท	2 พ.ค. 2550	14°24' 02.3"	104°41' 02.6"
SSK7	2	เขาพระวิหาร อ.กันทรลักษ์		14°25' 23.1"	104°41' 28.6"
SSK8,SSK9	3	จ.ศรีสะเกษ		14°25' 56.6"	104°42' 21.2"
SSK11, SSK13	4			14°26' 32.4"	104°43' 53.9"
UB2	1	เขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืช	3 พ.ค. 2550	15°12' 25.4"	105°25' 22.8"
UB5, UB6	2	อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี		15°12' 32.4"	105°26' 31.0"
UB9	1	อุทยานแห่งชาติแก่งตะนะ	3 พ.ค. 2550	15°17' 58.5"	105°28' 37.1"
UB13,UB14	2	อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี		15°16' 32.3"	105°28' 58.6"
UB19, UB20	1	อุทยานแห่งชาติผาแต้ม อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	3 พ.ค. 2550	15°23' 50.3"	105°30' 29.9"

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัสยีสต์	การเก็บตัวอย่าง			พิกัด	
	จุด	สถานที่	วัน เดือน ปี	เส้นรุ้ง (เหนือ)	เส้นแวง (ตะวันออก)
MD1	1	วนอุทยานภูหมู	3 พ.ค. 2550	16°19' 44.9"	104°32' 39.7"
MD3, MD4	2	อ.นิคมคำสร้อย จ.มุกดาหาร		16°18' 36.3"	104°31' 31.2"
MD8, MD9	1	อุทยานแห่งชาติภูผาเทิบ อ.ดอนตาล จ.มุกดาหาร	4 พ.ค. 2550	16°26' 05.1"	104°48' 18.4"
MD12	1	ป่าละเมาะ อ.ดอนตาล	4 พ.ค. 2550	16°13' 38.4"	104°50' 37.8"
MD15	1	อุทยานแห่งชาติภูสระดอกบัว อ.ดอนตาล จ.มุกดาหาร	4 พ.ค. 2550	16°14' 07.1"	104°47' 03.2"
RA1	1	ป่าละเมาะ หมู่บ้านน้อยคำแม็ก อ. หนองพอก จ.ร้อยเอ็ด	4 พ.ค. 2550	16°18' 27.4"	104°20' 38.0"
RA2, RA3	1	วนอุทยานเขาน้ำย้อย	4 พ.ค. 2550	16°19' 44.6"	104°18' 39.8"
RA4	2	อ.หนองพอก จ.ร้อยเอ็ด		16°20' 00.8"	104°18' 07.4"
CP1, CP2	1	อุทยานแห่งชาติป่าหินงาม	7 ก.ค. 2550	15°32'09.8"	101°25'14.0"
CP3, CP4, CP5	2	อ.เทพสถิต จ.ชัยภูมิ		15°32'06.1"	101°25'30.3"
CP6, CP7	1	หน่วยพิทักษ์สวนป่านายาง	7 ก.ค. 2550	15°26'01.2"	101°25'45.1"
CP8	2	หลวง อ.เทพสถิต จ.ชัยภูมิ		15°26'02.9"	101°25'53.2"
LY1, LY2, LY4	1	ป่าไม้ อ.ด่านซ้าย จ.เลย	7 ก.ค. 2550	17°04'11.9"	101°10'14.7"
LY5, LY6	2			17°13'02.2"	101°10'37.4"
LY7, LYSM1, LYSM2, LYSM3,LYSM4 LY8, LY9, LY10	3			17°13'40.0"	101°11'28.2"
	4			17°18'28.7"	101°14'35.9"
LY11	1	ป่าไม้ อ.ภูเรือ จ.เลย	7 ก.ค. 2550	17°20'12.2"	101°15'54.0"
LY12	2		8 ก.ค. 2550	17°19'27.0"	101°17'10.0"
LY16	3		8 ก.ค. 2550	17°20'13.0"	101°16'55.7"
LY17,LY18,LY19	1	อุทยานแห่งชาติภูเรือ	8 ก.ค. 2550	17°28'07.1"	101°21'18.6"
LY20	2	อ.ภูเรือ จ.เลย		17°28'42.2"	101°21'09.8"
LY21, LYSM5, LYSM6, LYSM7	3			17°29'21.0"	101°21'07.1"

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัสยีสต์	การเก็บตัวอย่าง			พิกัด	
	จุด	สถานที่	วัน เดือน ปี	เส้นรุ้ง (เหนือ)	เส้นแวง (ตะวันออก)
LY22, LYSM8, LYSM9	4	อุทยานแห่งชาติภูเรือ อ.ภูเรือ จ.เลย	8 ก.ค. 2550	17°29'49.2"	101°21'08.4"
LY24, LY25	5			17°30'36.5"	101°20'45.6"
LY26	6			17°30'41.1"	101°20'42.5"
LY27	7			17°30'44.3"	101°20'40.2"
LY28	8			17°30'46.0"	101°20'41.0"
LY29, LYSM10, LYSM11,LYSM12	9			17°30'47.4"	101°20'39.7"
LY32	1	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ภูหลวง อ.ภูหลวง จ.เลย	8 ก.ค. 2550	17°21'38.7"	101°30'29.6"
LY33	2			17°21'20.2"	101°30'21.8"
LYSM13, LYSM14	3			17°20'44.8"	101°30'31.7"
LYSM15, LYSM17	4			17°19'57.2"	101°30'17.3"
SKK1,SKK2	1	อุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก อ.ส่องดาว จ.สกลนคร	9 ก.ค. 2550	17°15'39.8"	103°27'22.7"
SKK3	2			17°15'56.5"	103°27'25.8"
SKK4	3			17°16'21.0"	103°27'35.2"
SKK5	4			17°16'40.1"	103°27'23.2"
SKK7	1	อุทยานแห่งชาติภูพาน อ.ภูพาน จ.สกลนคร	9 ก.ค. 2550	16°58'58.0"	103°57'54.8"
SKK8	2			17°06'13.2"	103°59'41.6"
SKK9	3			17°06'56.9"	104°00'20.0"
SKK10	4			17°07'04.4"	104°01'41.6"
SKK14,SKK15	5		10 ก.ค. 2550	16°58'12.7"	103°55'46.2"
SKK16	6			16°50'34.5"	103°54'24.2"
SKK17	7			16°49'05.4"	103°53'49.0"
SKK20	8			16°47'38.6"	103°51'46.5"
SKK11	1	ป่าเต็งรัง ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตสกลนคร อ. เมือง จ.สกลนคร	9 ก.ค. 2550	17°17'52.3"	104°06'43.5"
SKK12	2			17°17'57.1"	104°06'32.6"

2. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

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

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kurtzman and Robnett (1998) โดยใช้ NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') เป็น forward primer และ NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') เป็น reverse primer เตรียม PCR reaction mixture ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต Taq polymerase (Fermentas, USA) ที่มีองค์ประกอบ ดังนี้

PCR buffer (10X)	3	ไมโครลิตร
MgCl2 (25 mM)	2.4	ไมโครลิตร
dNTP mix (2.5 mM)	2.4	ไมโครลิตร
Primer NL1 (10 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Primer NL4 (10 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Taq polymerase (Fermentas; 5U/μl)	0.15	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร
Reverse osmosis sterile	17.25	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	30	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้จากการเตรียมข้างต้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ในเครื่อง PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) ที่ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

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

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ เมื่อสิ้นสุดการทำงาน เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ PCR product โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส นำเจลไปย้อมด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ (ethidium bromide) และส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตโดยเครื่อง UV transilluminator (Ultra-Lum Inc., Canada) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยมี 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) จากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ นำ PCR product ผสมกับ PB buffer (ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product) ในหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายลงใน QIAquick spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติม PE buffer ลงไปใน QIAquick spin column 0.75 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นเหวี่ยง QIAquick spin column อีกครั้งที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนของคอลัมน์วางลงในหลอด micro centrifuge หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างดีเอ็นเอที่ติดอยู่ในคอลัมน์ด้วยน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นตรวจสอบความเข้มของ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kit โดยนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยมี 100 bp DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย

2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene

นำ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 3.2 มาทำ cycle sequencing โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) ไพรเมอร์ NL1 เป็น forward primer และ NL4 เป็น reverse primer โดยส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

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

(ความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วงที่บริษัทผู้ผลิต BigDye แนะนำ)

นำหลอด PCR ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาใส่ในเครื่อง PCR และตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

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

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 25 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ cycle sequencing (sequencing product) มาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยผสม sequencing product กับสารละลายเอทานอล/โซเดียมอะซิเตท (เอทานอลบริสุทธิ์ 95 มิลลิลิตร โซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 4.6 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ในหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนดีเอ็นเอ ดูดสารละลายออกจากหลอดอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกมาด้วย จากนั้นเติม

เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายออกอย่างระมัดระวัง และทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยใช้เครื่อง Thermolyne (Barnstead, USA) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอัตโนมัติ (Automated DNA sequencer)

2.4 การจัดจำแนกยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTn (basic local alignment search tool for nucleotide) homology search program (Altschul *et al.*, 1997) โดยมีเกณฑ์ว่าถ้า 2 สายพันธุ์มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (คือมีการแทนที่ 6 นิวคลีโอไทด์) สายพันธุ์ทั้งสองนั้นจัดจำแนกได้เป็นคนละสปีชีส์ และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก (sister species) (Kurtzman and Robnett, 1998)

2.5 การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

ทำโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยใช้ multiple alignment program CLUSTAL X ver. 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) ส่วนต้นไม้วิวัฒนาการสร้างจากข้อมูลความแตกต่างทางวิวัฒนาการตามวิธี two-parameter of Kimura (Kimura, 1980) และ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstein, 1985)

3. การศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี

นำยีสต์ที่พบว่าเป็นสปีชีส์ใหม่เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง

วิวัฒนาการมาศึกษาลักษณะต่างๆ ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม ซึ่งประกอบด้วย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมี ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

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

3.1.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวทำโดยการเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหาร YM broth บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ตรวจสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูปร่าง กลไกการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ การจัดเรียงตัวของเซลล์ (เดี่ยว, คู่ หรืออยู่เป็นกลุ่มใหญ่) ขนาดของเซลล์ รวมทั้งสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อ (culture characteristic) ในอาหารเหลว เช่น เชื้อลอยเป็นฝ้าที่ผิวหน้า (pellicle) หรือจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอน (flocculent) หรือเป็นเมือกตกตะกอน (mucoid sediment) หรือเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด (ring) หรือเกาะกันเป็นก้อนเหนียว (coherent) หรือเกาะกันแน่นแข็ง (compact)

3.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

เพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง บนอาหาร YM agar และบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1-7 วัน ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของยีสต์บนอาหาร YM agar โดยดูสีเนื้อ (texture) ผิวหน้า ความนูน และขอบของโคโลนี

3.1.3 การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ตรวจสอบโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar หรือ potato dextrose agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) โดยนำสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อจุ่มลงไปในอาหารแข็งที่หลอมเหลวในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำ

สไลด์ที่อาหารแข็งตัวแล้วไปวางบนแท่งแก้วรูปตัวยูในจานเพาะเชื้อ เพาะเชื้อบางๆ โดยการสตรีกบนอาหารแข็ง 1-2 เส้น ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่วางสไลด์เพื่อให้ความชื้นป้องกันวุ้นบนสไลด์แห้ง บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 3 วัน

3.1.4 การสร้างแอสโคสปอร์

เพาะยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ เช่น YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างแอสโค-สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากบ่มเป็นเวลา 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยรายงานรูปร่าง สี และจำนวนของแอสโคสปอร์ ตลอดจนรูปร่าง สี และความคงทนของแอสคัส

3.2 ลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์และใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ ดังนี้

3.2.1 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนเป็นการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญแบบใช้ออกซิเจน เป็นการทดสอบที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ การแอสซิมิเลตสารประกอบบางชนิด เช่น กรดดี-กลูโคโรนิก ดี-ไซโลส และอินออซิทอลสามารถใช้เพื่อแยกสกุลของยีสต์ได้ การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลวทำตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยใช้สารประกอบคาร์บอนจำนวน 40 ชนิด ดังนี้

เฮกโซส	ดี-กลูโคส กาแลกโทส และซอร์โบส
ไดแซกคาไรด์	เซลโลไบโอส แลกโทส มอลโทส เมลลิไบโอส ซูโครส และทรีฮาโลส

ไตรแซกคาไรด์	เมลลิซิโทส และราฟฟีโนส
พอลิแซกคาไรด์	อินูลิน และแป้ง
เพนโทส	ดี-อะราบิโนส แอ่ล-อะราบิโนส ดี-ไรโบส แอล-แรมโนส และดี-ไซโลส
แอลกอฮอล์	กาแลกทิทอล อิริทริทอล ดี-กลูซิทอล อินออซิทอล ดี-แมนนิทอล กลีเซอรอล ไรบิทอล เอทานอล และเมทานอล
กรดอินทรีย์	กรดซิตริก กรดแลคติก กรดซักซินิก กรดดี-กลูโคโรนิก กรดกาแลกตุโรนิก และกรดดี-กลูโคนิก
ไกลโคไซด์	แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์ และซาลิซิน
สารประกอบอื่น	เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน และ ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน

บางครั้งอาจต้องเพิ่มการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบบางอย่างเพื่อแยกระหว่างสปีชีส์ของบางสกุล สารประกอบเหล่านั้น คือ 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต และ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต

การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลวใช้อาหารไนโตรเจนเบสที่ไม่เติมสารประกอบคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (negative control) และใช้อาหารไนโตรเจนเบสที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก (positive control)

เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง โดยใช้ลูปถ่ายเชื้อลงไปในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของยีสต์ที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยการใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของยีสต์ที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นแต่เห็นขอบไม่ชัด (ซึ่งเท่ากับ + เมื่ออ่านผลการเจริญ) จากนั้นเพาะเชื้อโดยใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดต่างๆ จำนวน 1 หยด บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ โดยตรวจวัดระดับการเจริญซึ่งทำโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย ทาบหลอดลงด้านหน้าเส้น มองผ่านหลอดเลี้ยงเชื้อแล้วสังเกตเส้นสีดำ ดังนี้ +++ คือ

การเจริญของเชื้อที่มีความขุ่นซึ่งจะลบเส้นสีดำอย่างสมบูรณ์, ++ เห็นเส้นพร่า, + เห็นเส้นแต่เห็นขอบไม่ชัด และ – คือ เห็นเส้นและขอบชัดเจน จากนั้นทำการรายงานผลดังรายละเอียดต่อไปนี้

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

3.2.2 การหมักคาร์โบไฮเดรต

การหมักหมายถึงการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งยีสต์มีความสามารถในการหมักน้ำตาลต่าง ๆ กัน โดยทั่วไปน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบความสามารถในการหมักของยีสต์ คือ ดี-กลูโคส ดี-กาแลกโทส มอลโทส ซูโครส ทรีฮาโลส แลกโทส ราฟฟิโนส และเมลลิไบโอส โดยทดสอบการหมักน้ำตาลตามวิธีของ Yarrow (1998) วิธีทดสอบทำโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบการหมักน้ำตาล (fermentation basal medium) ใส่ลงในหลอดทดสอบซึ่งภายในบรรจุหลอดดักแก๊ส (Durham tube) หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง โดยใช้ลูปถ่ายเชื้อลงไปในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของยีสต์ที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยการใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของยีสต์ที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นแต่เห็น

ขอบไม่ชัด (ซึ่งเท่ากับ + เมื่ออ่านผลการเจริญ) เพาะยีสต์โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดต่าง ๆจำนวน 1 หยด บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลการหมักโดยสังเกตปริมาณแก๊สที่สะสมในหลอดดักแก๊สและการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทุกวันจนครบ 7 วัน จากนั้นตรวจสอบทุกสัปดาห์จนครบ 28 วัน ผลการหมักรายงานโดยอาศัยเวลาที่ใช้ในการสร้างแก๊สให้เต็มหลอดดักแก๊ส และปริมาณที่สะสมแก๊สไว้ในหลอดดักแก๊ส ดังนี้

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

3.2.3 การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ศึกษาการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนโดยเพาะยีสต์บนอาหาร YM agar เพื่อเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจำนวนน้อยๆ ลงในอาหาร Yeast Carbon Base (YCB) broth บ่มที่

25 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้ยีสต์ใช้ไนโตรเจนที่สะสมไว้ภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอย 1 หยดลงบนจานอาหาร YCB agar ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในการทดลองใช้อาหาร YCB agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ และอาหาร YCB agar ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก ตรวจผลโดยสังเกตการเจริญของยีสต์ทุก 2-4 วัน จนครบ 28 วัน

3.2.4 การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) ภายนอกเซลล์

การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์จะตรวจสอบตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยตรวจภายหลังการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน และสารประกอบไนโตรเจนเสร็จเรียบร้อย โดยหยด Lugol's solution ลงในหลอดทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และบนจานอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีน้ำเงินแกมเขียว แสดงว่ามีการสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์

3.2.5 การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน

การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินจะทำการทดสอบตามวิธีของ Komagata and Nakase (1967) โดยเพาะยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆลงในอาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อให้ยีสต์ใช้วิตามินที่สะสมภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาณน้อย ๆ ลงในอาหารที่ปราศจากวิตามินหลอดใหม่ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลโดยสังเกตการเจริญของเชื้อทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

3.2.6 การสร้างกรดจากกลูโคส

การสร้างกรดจากกลูโคสสามารถตรวจสอบได้ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ใน Custer's chalk medium บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยดูการเกิดโซนใสบริเวณรอบ ๆ เชื้อ

3.2.7 ความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์

ตรวจสอบความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยทดสอบในอาหารเหลวที่มีแบกโต-ยีสต์ไนโตรเจนเบส และ ดี-กลูโคส ที่มีการเติมไซโคลเฮกซิไมด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ส่วนต่อล้านส่วน และ 1000 ส่วนต่อล้านส่วน เพาะยีสต์ลงในอาหารทดสอบ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสังเกตการเจริญของยีสต์และรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

3.2.8 การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

ตรวจสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงหรือเกลือความเข้มข้นสูงตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมงลงบนอาหารแข็ง 4 ชนิด คือ อาหารแข็งที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของยีสต์บนอาหารแข็งทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

3.2.9 การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมงในอาหาร YM broth และบ่มในตู้บ่ม (incubator) ที่ 20, 25, 35, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยดูการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับการตรวจผลการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

3.2.10 การไฮโดรไลซ์ยูเรีย

ตรวจการไฮโดรไลซ์ยูเรียตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนอาหาร Christensen's urea agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน ถ้ามีการไฮโดรไลซ์ยูเรียพีเอชที่เพิ่มขึ้นจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นสีชมพูแดง ในการทดสอบการไฮโดรไลซ์ยูเรียใช้ยีสต์ในสกุล *Rhodotorula* เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก

3.2.11 การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี

ทดสอบการทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบีบนอาหารแข็งตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเลี้ยงยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปบ่มต่อที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดปล่อยให้เย็นจนเท่าอุณหภูมิห้อง หยด DBB reagent ลงที่ผิวหน้าโคโลนี ถ้าเกิดสีแดงเข้มจนถึงสีม่วงภายในเวลา 1-2 นาที ที่อุณหภูมิห้องแสดงว่าผลเป็นบวก

3.3 ลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานเคมี

อนุกรมวิธานเคมีมีพื้นฐานมาจากองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ ทั้งที่เป็นเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) รวมถึงกิจกรรมทางเคมี หรือสรีรวิทยาของยีสต์ด้วย

การวิเคราะห์สารประกอบยูบิควิโนนทำตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yamada and Kondo (1973) โดยเพาะยีสต์ในอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) broth ปริมาตร 400 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เก็บเซลล์ยีสต์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยโดยเติมน้ำกลั่น 12.5 มิลลิลิตร และเทใส่ฟลาสก์ก้นกลม (round bottom flask) เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 กรัม ไพโรแกลออล 1.5 กรัม และเมทานอล 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และใส่ glass bead เพื่อป้องกันการระเบิดในระหว่าง refluxed ทำการ refluxed ด้วยน้ำเย็น นาน 30 นาที โดยใช้ heating mantle เมื่อ refluxed เสร็จแล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 45 นาที เติมเฮกเซน 40 มิลลิลิตร และถ่ายใส่ funnel เขย่าให้เฮกเซนผสมกับเมทานอลมากที่สุด เพื่อดึงยูบิควิโนนที่อยู่ในเมทานอลให้มาละลายในเฮกเซนระหว่างเขย่าให้เปิดจุกเพื่อปล่อยอากาศที่อยู่ภายใน funnel ออก เก็บสารละลายเฮกเซนที่อยู่ด้านบน funnel และล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ถ่ายสารละลายเฮกเซนลงในบีกเกอร์ และเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสปริมาณน้อยๆ เพื่อดึงน้ำออก ถ่ายสารละลายลงในฟลาสก์สำหรับระเหย (evaporating flask) ทำการระเหยที่ 40 องศาเซลเซียส จนแห้งและละลายด้วยอะซิโตน 0.5 มิลลิลิตร ทำยูบิควิโนนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Thin layer chromatography (TLC) บนแผ่นซิลิกาเจล (F254TLC Merck, Germany) ใช้เฮกเซน และไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) ในอัตราส่วน 85 ต่อ 15 เป็น mobile phase ตรวจสอบแถบของยูบิควิโนน

ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ขูดแถบของยูบิควิโนนที่ปรากฏบนแผ่น TLC และสกัดด้วยอะซิโตน 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยแผ่นเมมเบรนขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน และทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นด้วยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นวิเคราะห์ชนิดของยูบิควิโนนด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Waters, USA) โดยใช้คอลัมน์ Cosmosil 5C18 (Nacalai tesque, Japan) และใช้เมทานอลผสมกับไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 เป็น mobile phase ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจผลที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร จำแนกชนิดของยูบิควิโนนที่ทำการวิเคราะห์โดยเทียบกับยูบิควิโนนมาตรฐาน

4. การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้ง

4.1 ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

การศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Teather and Wood (1982) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร YM agar นาน 1-2 วัน จากนั้นเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงในอาหาร carboxyl methyl cellulose (CMC) -YM agar ที่มีคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร microcrystalline cellulose-YM agar ที่เติมไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลสในรูปของ Avicel 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ตรวจผลโดยนำมาย้อมด้วยสารละลาย congo red 15 นาที แล้วล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ดูบริเวณใสที่เกิดขึ้นใต้หรือรอบโคโลนี หากมีบริเวณใสแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้

4.2 ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายไซแลน

การศึกษาการย่อยสลายไซแลนทำตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Teather and Wood (1982) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร YM agar นาน 1-2 วัน จากนั้นเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงในอาหาร xylan - YM agar ที่เติมไซแลนในรูป oat spelts 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ตรวจผลโดยนำมาย้อมด้วยสารละลาย congo red 15 นาที แล้วล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ดูบริเวณใสที่เกิดขึ้นใต้หรือรอบโคโลนี หากมีบริเวณใสแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยสลายไซแลนได้

4.3 ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแป้ง

การศึกษาการย่อยสลายแป้งทำตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Limtong *et al.* (2002) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร YM agar นาน 1-2 วัน จากนั้นเพาะเชื้อแบบ point inoculation ลงในอาหาร starch - YM agar ที่เติมสารละลายแป้ง (soluble starch) 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นราดด้วยสารละลายไอโอดีน ตรวจดูบริเวณใสใต้หรือรอบโคโลนี หากมีบริเวณใสแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยสลายแป้งได้

ผลและวิจารณ์

1. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การจัดจำแนกยีสต์ด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลทำโดย (1) การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene (ยาวประมาณ 500-600 นิวคลีโอไทด์) ของยีสต์สายพันธุ์ที่ต้องการจัดจำแนกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของยีสต์สปีชีส์ต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank จากเว็บไซด์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast โดยใช้โปรแกรม BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) และใช้เกณฑ์ของ Kurtzman and Robnett (1998) ในการระบุว่าเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว (described species) หรือที่รู้จักแล้ว (known species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย (undescribed species) หรือสปีชีส์ใหม่ (new species) โดยพิจารณาจากหลักเกณฑ์ คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูล หากมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene มีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (คือมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์) จะจัดเป็นยีสต์ต่างสปีชีส์กัน และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก และ (2) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยดูจากตำแหน่งบนต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene จากหลักการทั้ง 2 ข้อดังกล่าวสามารถจัดจำแนกยีสต์ 102 สายพันธุ์ ออกเป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 2) คือ

1.1 ยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ที่รู้จักแล้ว

ยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ที่รู้จักแล้ว หมายถึง ยีสต์ที่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ที่มีการตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์แล้วในฐานข้อมูลแล้วมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 0-3 นิวคลีโอไทด์ จากการจัดจำแนกยีสต์ 102 สายพันธุ์ พบจำนวน 82 สายพันธุ์ที่เป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว (80.4 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษา) โดยส่วนใหญ่เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ไฟลัม Ascomycota จำนวน 81 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น 11 สกุล 32 สปีชีส์ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1, 2, 3) ในชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ต่าง ๆ ดังนี้

1.1.1 วงศ์ Candidaceae มี 2 สกุล คือ

1) *Candida* 11 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida akabanensis*, *C. diversa*, *C. ghanaensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. saopaulonensis* และ *C. tropicalis*

2) *Geotrichum* 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Geotrichum fragrans* และ *G. vulgare*

1.1.2 วงศ์ Saccharomycetaceae มี 9 สกุล คือ

1) *Debaryomyces* 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, *D. nepalensis* และ *D. vanrijiae* var. *vanrijiae*

2) *Kazachstania* 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Kazachstania aquatic*, *K. bovina*, *K. siamensis* และ *K. unispora*

3) *Kluyveromyces* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Kluyveromyces hubeiensis*

4) *Kodamaea* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Kodamaea ohmeri*

5) *Pichia* 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pichia caribbica, P. galeiformis*, *P. kluyveri var. kluyveri, P. kudriavzevii*, *P. occidentalis* และ *P. pijperi*

6) *Tetrapisispora* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Tetrapisispora namnaoensis*

7) *Torulaspora* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Torulaspora globosa*

8) *Williopsis* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Williopsis saturnus* var. *mrakii* และ *W. saturnus* var. *sargentensis*

9) *Zygosaccharomyces* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Zygosaccharomyces fermentati*

ส่วนยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วอีก 1 สายพันธุ์ จัดเป็นแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ อยู่ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Hymenomycetes ได้แก่ *Trichosporon mycotoxinivorans*

ตารางที่ 2 การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย ยีสต์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ และยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และป่าไม้อื่นใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในปี พ. ศ. 2550 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
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions no.	nucleotide substitutions %	
Ascomycetous yeasts								
LYSM15	AB499000	*Candida akabanensis* (EU100744)	520/520	100	0	0	0	*Candida akabanensis*
LY7	AB499012	*Candida diversa* (U71064)	533/533	100	0	0	0	*Candida diversa*
LY22	AB499024	*Candida diversa* (U71064)	533/533	100	0	0	0	*Candida diversa*
LY33	AB499032	*Candida diversa* (U71064)	533/533	100	0	0	0	*Candida diversa*
SR19	AB500188	*Candida ghanaensis* (AF271083)	523/524	99.8	0	1	0.2	*Candida ghanaensis*
LY6	AB499011	*Candida glabrata* (U44808)	580/581	99.8	0	1	0.2	*Candida glabrata*
LY17	AB499019	*Candida glabrata* (U44808)	578/581	99.5	0	3	0.5	*Candida glabrata*
LY18	AB499020	*Candida glabrata* (U44808)	542/544	99.6	0	2	0.4	*Candida glabrata*
UB14	AB500196	*Candida glabrata* (U44808)	580/581	99.8	0	1	0.2	*Candida glabrata*
SSK1	AB499984	*Candida nivariensis* (AY627305)	546/548	99.6	2	0	0	*Candida nivariensis*

ตารางที่ 2 (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
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions		
						no.	%	
CP3	AB500000	*Candida orthopsilosis* (FJ746056)	569/570	99.8	1	0	0	*Candida orthopsilosis*
CP4	AB500001	*Candida orthopsilosis* (FJ746056)	568/570	99.6	1	1	0.2	*Candida orthopsilosis*
UB2	AB500192	*Candida orthopsilosis* (FJ746056)	567/570	99.4	1	2	0.4	*Candida orthopsilosis*
UB20	AB500198	*Candida orthopsilosis* (FJ746056)	569/570	99.8	1	0	0	*Candida orthopsilosis*
LY32	AB499031	*Candida pararugosa* (U62306)	542/543	100	0	0	0	*Candida pararugosa*
SR1	AB500183	*Candida pseudolambica* (U71063)	557/559	99.8	0	2	0.2	*Candida pseudolambica*
LYSM3	AB498988	*Candida rugosa* (U45727)	483/485	99.8	1	1	0.2	*Candida rugosa*
LYSM7	AB498992	*Candida saopaulonensis* (AY695398)	484/486	99.6	0	2	0.4	*Candida saopaulonensis*
RA4	AB499036	*Candida* sp. ST-533 (DQ404531)	450/450	100	0	0	0	Undescribed species
MD15	AB499997	*Candida* sp. ST-533 (DQ404531)	450/450	100	0	0	0	Undescribed species
SR22	AB500190	*Candida* sp. ST-533 (DQ404531)	450/450	100	0	0	0	Undescribed species
UB6	AB500194	*Candida* sp. ST-533 (DQ404531)	450/450	100	0	0	0	Undescribed species

ตารางที่ 2 (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
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions		
						no.	%	
MD9	AB499995	*Candida sorbosivorans* (AJ277846)	423/441	96	3	15	3.4	new specise
LYSM4	AB498989	*Candida tropicalis* (U45749)	590/590	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
LY11	AB499016	*Candida tropicalis* (U45749)	578/578	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
SKK14	AB500210	*Candida tropicalis* (U45749)	578/578	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
LYSM6	AB498991	*Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* (U94927)	570/570	100	0	0	0	*Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*
LYSM11	AB498996	*Debaryomyces nepalensis* (U45839)	570/570	100	0	0	0	*Debaryomyces nepalensis*
LYSM10	AB498995	*Debaryomyces vanrijiae* var. *vanrijiae* (U45842)	563/563	100	0	0	0	*Debaryomyces vanrijiae* var. *vanrijiae*
MD1	AB499991	*Debaryomyces vanrijiae* var. *vanrijiae* (U45842)	570/570	100	0	0	0	*Debaryomyces vanrijiae* var. *vanrijiae*
LYSM5	AB498990	*Galactomyces geotrichum* (U40118)	532/549	97	7	10	1.8	new specise
LYSM2	AB498987	*Galactomyces reessii* (U40111)	540/546	99.1	1	5	0.9	could be known/ new species

ตารางที่ 2 (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
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions		
						no.	%	
LY19	AB499021	*Geotrichum fragrans* (U40119)	403/404	99.8	0	1	0.2	*Geotrichum fragrans*
LYSM17	AB499001	*Geotrichum vulgare* (AJ511334)	480/481	99.8	0	1	0.2	*Geotrichum vulgare*
LY16	AB499018	*Geotrichum* sp. CICC1364 (DQ912840)	542/545	99.5	0	3	0.5	Undescribed species
RA1	AB499033	*Geotrichum* sp. CICC1364 (DQ912840)	541/545	99.3	0	4	0.7	could be Undescribed species/ new species
SR23	AB500191	*Geotrichum* sp. CICC1364 (DQ912840)	542/545	99.4	0	3	0.6	Undescribed species
SKK15	AB500211	*Geotrichum* sp. CICC1364 (DQ912840)	547/550	99.5	0	3	0.5	Undescribed species
LY5	AB499010	*Geotrichum* sp. MTCC 3974 (AY225313)	545/545	100	0	0	0	Undescribed species
RA2	AB499034	*Kazachstania aquatica* (AY881651)	572/573	99.8	0	1	0.2	*Kazachstania aquatica*
RA3	AB499035	*Kazachstania aquatica* (AY881651)	572/573	99.8	0	1	0.2	*Kazachstania aquatica*
SSK7	AB499986	*Kazachstania aquatica* (AY881651)	573/573	100	0	0	0	*Kazachstania aquatica*

ตารางที่ 2 (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
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions		
						no.	%	
SSK13	AB499990	*Kazachstania aquatica* (AY881651)	573/573	100	0	0	0	*Kazachstania aquatica*
UB19	AB500197	*Kazachstania aquatica* (AY881651)	573/573	100	0	0	0	*Kazachstania aquatica*
SKK4	AB500202	*Kazachstania aquatica* (AY881651)	573/573	100	0	0	0	*Kazachstania aquatica*
SKK10	AB500207	*Kazachstania aquatica* (AY881651)	572/573	99.8	0	1	0.2	*Kazachstania aquatica*
MD4	AB499993	*Kazachstania bovina* (AJ508556)	571/572	99.8	1	0	0	*Kazachstania bovina*
SSK11	AB499989	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
MD3	AB499992	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
MD8	AB499994	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
CP5	AB500002	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
SR18	AB500187	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
SR20	AB500189	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*

ตารางที่ 2 (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
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions		
						no.	%	
UB5	AB500193	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
UB9	AB500195	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
SKK3	AB500201	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
SKK5	AB500203	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
SKK8	AB500205	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
SKK9	AB500206	*Kazachstania siamensis* (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	*Kazachstania siamensis*
LY2	AB499008	*Kazachstania unispora* (AY007912)	569/572	99.5	0	3	0.5	*Kazachstania unispora*
LYSM12	AB498997	*Kluyveromyces hubeiensis* (AY325967)	570/574	99.6	2	2	0.4	*Kluyveromyces hubeiensis*
LYSM14	AB498999	*Kluyveromyces hubeiensis* (AY325967)	570/574	99.6	2	2	0.4	*Kluyveromyces hubeiensis*
MD12	AB499996	*Kodamaea ohmeri* (AJ508563)	493/493	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
CP7	AB500004	*Kodamaea ohmeri* (AJ508563)	493/493	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*

ตารางที่ 2 (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
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions		
						no.	%	
LY1	AB499007	*Pichia caribbica* (EU348786)	570/570	100	0	1	0	*Pichia caribbica*
LY4	AB499009	*Pichia caribbica* (EU348786)	570/570	100	0	1	0	*Pichia caribbica*
LY28	AB499029	*Pichia caribbica* (EU348786)	570/570	100	0	1	0	*Pichia caribbica*
LY21	AB499023	*Pichia galeiformis* (U75738)	560/560	100	0	0	0	*Pichia galeiformis*
LY8	AB499013	*Pichia kluyveri* var. *kluveri* (U75727)	566/568	99.6	0	2	0.4	*Pichia kluyveri* var. *kluveri*
LY9	AB499014	*Pichia kluyveri* var. *kluveri* (U75727)	566/568	99.6	0	2	0.4	*Pichia kluyveri* var. *kluveri*
SKK20	AB500214	*Pichia kluyveri* var. *kluveri* (U75727)	525/526	100	0	0	0	*Pichia kluyveri* var. *kluveri*
LY12	AB499017	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	573/573	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
CP8	AB500005	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	572/572	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
SKK1	AB500199	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	527/527	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
SKK2	AB500200	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	572/572	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
SKK12	AB500209	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	572/572	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
SKK7	AB500204	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*

ตารางที่ 2 (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
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions		
						no.	%	
SKK17	AB500213	*Pichia occidentalis* (U76348)	517/517	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
LYSM1	AB498986	*Pichia pijperi* (U75418)	566/568	99.6	0	2	0.4	*Pichia pijperi*
LYSM9	AB498994	*Pichia* sp. RV60 (AB334112)	542/545	99.4	0	3	0.6	Undescribed species
SR16	AB495287	*Pichia* sp. ST84 (DQ404448)	531/531	100	0	0	0	Undescribed species
UB13	AB495288	*Pichia* sp. ST84 (DQ404448)	531/531	100	0	0	0	Undescribed species
LY20	AB499022	*Pichia spartinae* (U45764)	563/568	99.1	0	5	0.9	Could be known species/ new species
LY24	AB499025	*Pichia spartinae* (U45764)	563/568	99.1	0	5	0.9	Could be known species/ new species
CP1	AB499998	*Pichia spartinae* (U45764)	563/568	99.1	0	5	0.9	Could be known species/ new species
SKK16	AB500212	*Pichia sporocuriosa* (EF550232)	554/559	99.1	0	5	0.9	Could be known species/ new species

ตารางที่ 2 (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
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions no.	nucleotide substitutions %	
LYSM8	AB498993	*Tetrapisispora namnaoensis* (AB180480)	575/575	100	0	0	0	*Tetrapisispora namnaoensis*
LY25	AB499026	*Tetrapisispora namnaoensis* (AB180480)	575/575	100	0	0	0	*Tetrapisispora namnaoensis*
LY26	AB499027	*Tetrapisispora namnaoensis* (AB180480)	575/575	100	0	0	0	*Tetrapisispora namnaoensis*
LY27	AB499028	*Tetrapisispora namnaoensis* (AB180480)	521/521	100	0	0	0	*Tetrapisispora namnaoensis*
LY29	AB499030	*Tetrapisispora namnaoensis* (AB180480)	574/575	99.8	0	1	0.2	*Tetrapisispora namnaoensis*
SSK2	AB499985	*Tetrapisispora namnaoensis* (AB180480)	575/575	100	0	0	0	*Tetrapisispora namnaoensis*
SKK11	AB500208	*Tetrapisispora namnaoensis* (AB180480)	572/576	99.5	1	3	0.5	*Tetrapisispora namnaoensis*
LY10	AB499015	*Torulaspora globosa* (U72166)	570/573	99.5	0	3	0.5	*Torulaspora globosa*
SSK8	AB499987	*Torulaspora globosa* (U72166)	570/573	99.5	0	3	0.5	*Torulaspora globosa*
SSK9	AB499988	*Torulaspora globosa* (U72166)	570/573	99.5	0	3	0.5	*Torulaspora globosa*
SR3	AB500184	*Torulaspora* sp. WB17 (AB456554)	573/573	100	0	0	0	Undescribed species

ตารางที่ 2 (ต่อ)

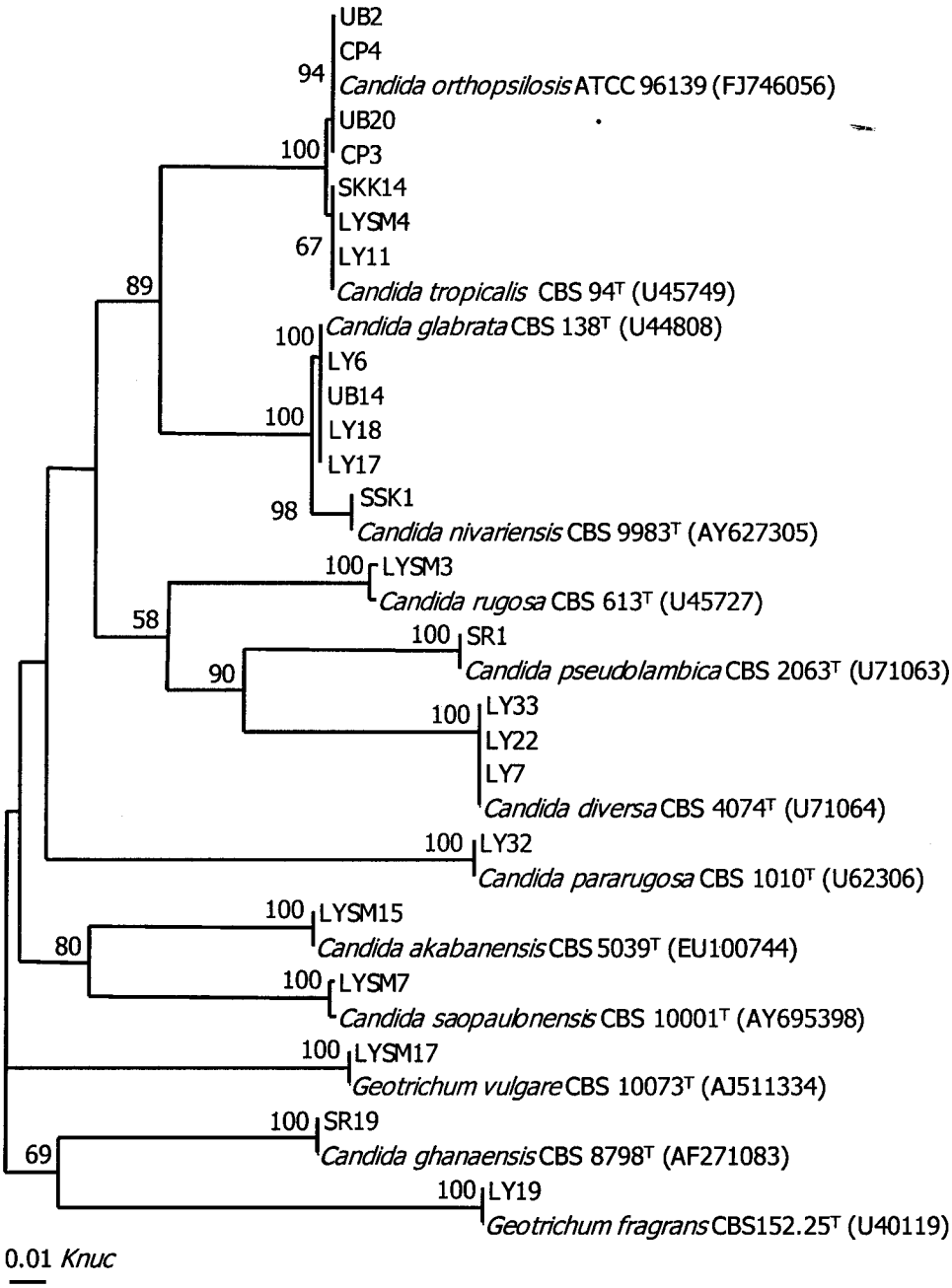
Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions		
						no.	%	
SR7	AB500185	*Williopsis saturnus* var. *mrakii* (U94929)	574/574	100	0	0	0	*Williopsis saturnus* var. *mrakii*
SR9	AB500186	*Williopsis saturnus* var. *mrakii* (U94929)	574/574	100	0	0	0	*Williopsis saturnus* var. *mrakii*
LYSM13	AB498998	*Williopsis saturnus* var. *sargentensis* (U94936)	573/574	99.8	0	1	0.2	*Williopsis saturnus* var. *sargentensis*
CP6	AB500003	*Zygosaccharomyces fermentati* (U84239)	570/570	100	0	0	0	*Zygosaccharomyces fermentati*
Basidiomycetous yeasts								
CP2	AB499999	*Trichosporon mycotoxinivorans* (AJ601388)	556/557	99.8	1	0	0	*Trichosporon mycotoxinivorans*

ตารางที่ 3 ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

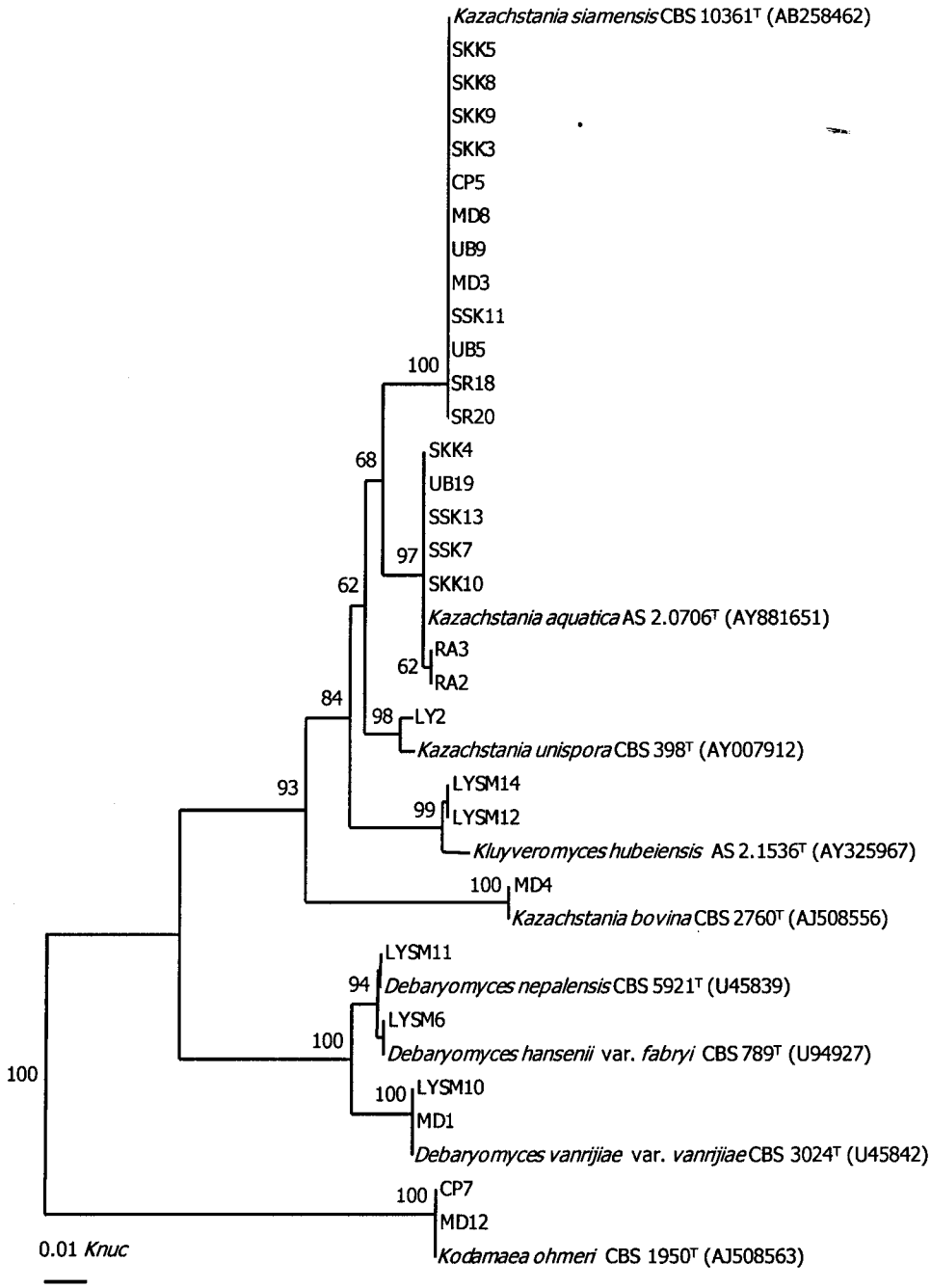
Group Family Genus Species	Strain	No. of strain
Ascomycetous yeast		
Candidaceae		
Candida		
Candida akabanensis	LYSM15	1
Candida diversa	LY7, LY22, LY33	3
Candida ghanaensis	SR19	1
Candida glabrata	UB14, LY6, LY17, LY18	4
Candida nivariensis	SSK1	1
Candida orthopsilosis	CP3, CP4, UB2, UB20	4
Candida pararugosa	LY32	1
Candida pseudolambica	SR1	1
Candida rugosa	LYSM3	1
Candida saopaulonensis	LYSM7	1
Candida tropicalis	LY11, LYSM4, SKK14	3
Geotrichum		
Geotrichum fragrans	LY19	1
Geotrichum vulgare	LYSM17	1
Saccharomycetaceae		
Debaryomyces		
Debaryomyces hansenii var. *fabryi*	LYSM6	1
Debaryomyces nepalensis	LYSM11	1
Debaryomyces vanrijiae var. *vanrijiae*	MD1, LYSM10	2
Kazachstania		
Kazachstania aquatica	SSK7, SSK13, UB19, RA2, RA3, SKK4, SKK10	7
Kazachstania bovina	MD4	1
Kazachstania siamensis	SR18, SR20, SSK11, UB5, UB9, MD3, MD8, CP5, SKK3, SKK5, SKK8, SKK9	12

ตารางที่ 3 (ต่อ)

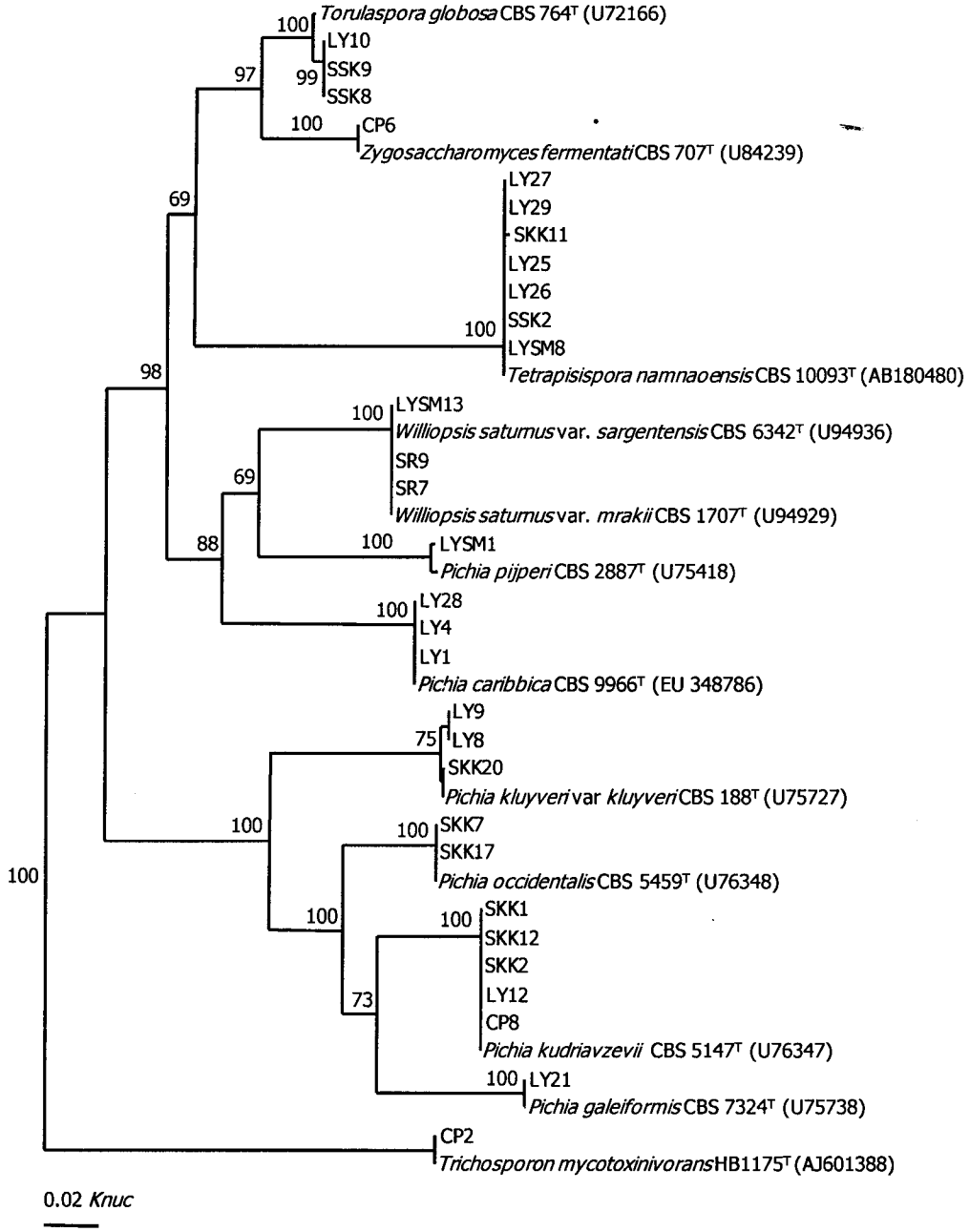
Group Family Genus Species	Strain	No. of strain
Kazachstania unispora	LY2	1
Kluyveromyces		
Kluyveromyces hubeiensis	LYSM12, LYSM14	2
Kodamaea		
Kodamaea ohmeri	MD12, CP7	2
Pichia		
Pichia caribbica	LY1, LY4, LY28	3
Pichia galeiformis	LY21	1
Pichia kluyveri var. *kluyveri*	LY8, LY9, SKK20	3
Pichia kudriavzevii	CP8, LY12, SKK1, SKK2, SKK12	5
Pichia occidentalis	SKK7, SKK17	2
Pichia pijperi	LYSM1	1
Tetrapisispora		
Tetrapisispora namnaoensis	SSK2, LY25, LY26, LY27, LY29, LYSM8, SKK11	7
Torulaspora		
Torulaspora globosa	SSK8, SSK9, LY10	3
Williopsis		
Williopsis saturnus var. *mrakii*	SR7, SR9	2
Williopsis saturnus var. *sargentensis*	LYSM13	1
Zygosaccharomyces		
Zygosaccharomyces fermentati	CP6	1
รวม 11 สกุล 32 สปีชีส์ 81 สายพันธุ์		
Basidiomycetous yeast		
Trichosporon		
Trichosporon mycotoxinivorans	CP2	1
รวม 1 สกุล 1 สปีชีส์ 1 สายพันธุ์		



ภาพที่ 1 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Candidaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด 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



ภาพที่ 2 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด 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



ภาพที่ 3 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae และ *Trichosporon mycotoxinivorans* และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด 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

1.2 ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย หมายถึง ยีสต์ที่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลแล้วมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 0-3 นิวคลีโอไทด์กับยีสต์ที่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล แต่ยังไม่ได้มีการตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์ จากการจัดจำแนกยีสต์ 102 สายพันธุ์ พบว่า 12 สายพันธุ์ (11.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษา) เหมือนกับยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบาย โดยอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales ใน 2 วงศ์ คือ วงศ์ Candidaceae พบ 2 สกุล ได้แก่ สายพันธุ์ MD15, RA4, SR22 และ UB6 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533 สายพันธุ์ LY16 SKK15 และ SR23 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. CICC 1364 และสายพันธุ์ LY5 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. MTCC 3974 ส่วนในวงศ์ Saccharomycetaceae พบ 3 สปีชีส์ ได้แก่ สายพันธุ์ LYSM9 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. RV60 สายพันธุ์ SR16 และ UB13 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. ST84 และสายพันธุ์ SR3 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17

1.3 ยีสต์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ (could be known or new species)

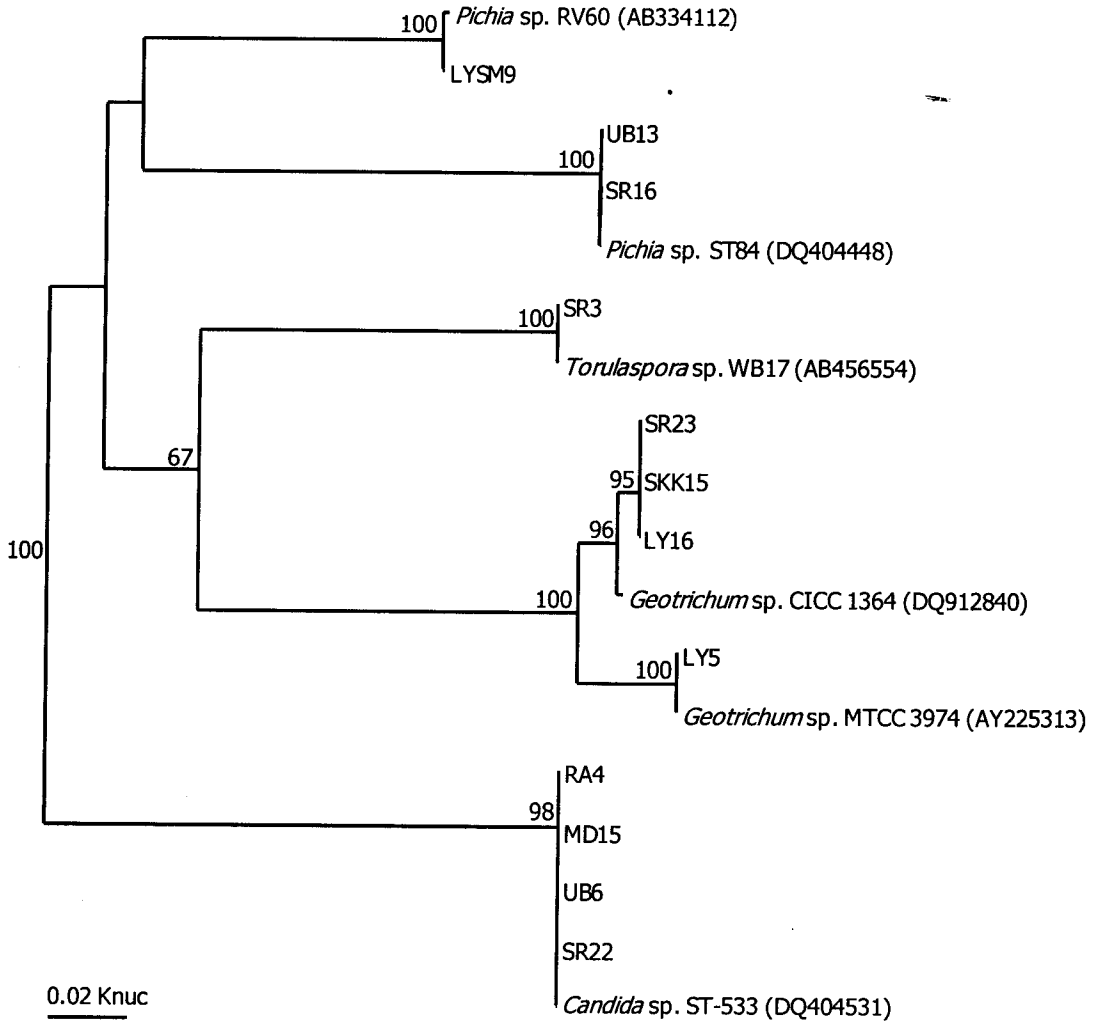
ยีสต์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ หมายถึง ยีสต์ที่เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับสปีชีส์ที่อธิบายแล้วมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 3 นิวคลีโอไทด์ แต่มีเปอร์เซ็นต์การแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 6 นิวคลีโอไทด์หรือ 1 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงยังสรุปไม่ได้ว่าเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยในการจัดจำแนกยีสต์ 102 สายพันธุ์ พบจำนวน 6 สายพันธุ์ (5.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษา) ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ อยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales ใน 3 วงศ์ คือ วงศ์ Candidaceae พบ 1 สกุล ได้แก่ สายพันธุ์ RA1 ที่ใกล้เคียงกับ *Geotrichum* sp. CICC 1364 ส่วนในวงศ์ Dipodascaceae พบ 1 สปีชีส์ คือ สายพันธุ์ LYSM2 ที่ใกล้เคียงกับ *Galactomyces reessii* และวงศ์ Saccharomycetaceae พบ 1 สกุล 2 สปีชีส์ คือ สายพันธุ์ LY20, LY24 และ CP1 ที่ใกล้เคียงกับ *Pichia spartinae* และสายพันธุ์ SKK16 ที่ใกล้เคียงกับ *Pichia sporocuriosa* (ตารางที่ 4 และภาพที่ 4, 5)

ตารางที่ 4 สายพันธุ์ที่เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายและสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

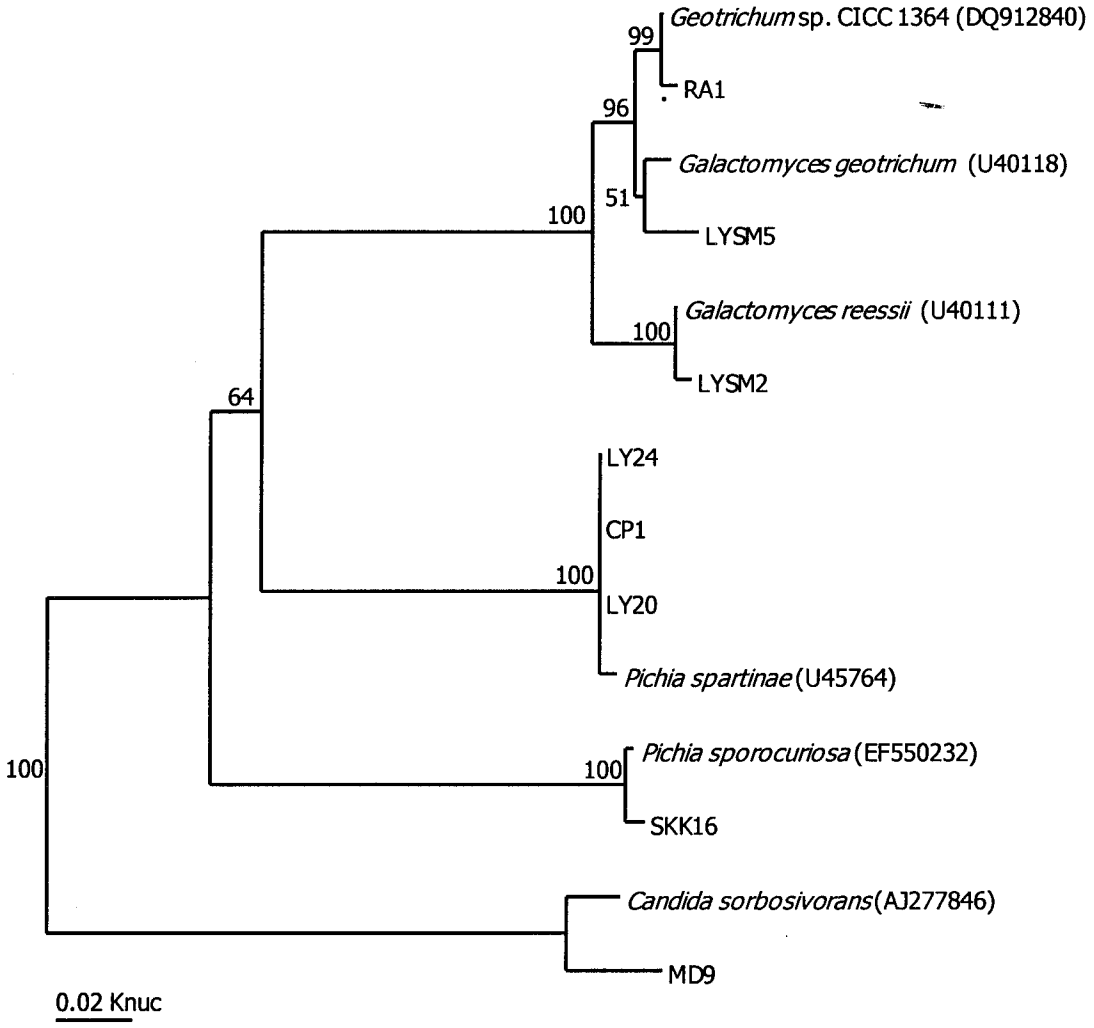
Strain	Similar to
สายพันธุ์ที่เหมือนสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	
SR22, UB6, MD15, RA4	*Candida* sp. ST-533
SR23, LY16, SKK15	*Geotrichum* sp. CICC1364
LY5	*Geotrichum* sp. MTCC 3974
LYSM9	*Pichia* sp. RV60
SR16, UB13	*Pichia* sp. ST84
SR3	*Torulaspora* sp. WB17
รวม 4 สกุล 6 สปีชีส์ 12 สายพันธุ์	
สายพันธุ์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	
LYSM2	*Galactomyces reessii*
RA1	*Geotrichum* sp. CICC1364
LY20, LY24, CP1	*Pichia spartinae*
SKK16	*Pichia sporocuriosa*
รวม 3 สกุล 4 สปีชีส์ 6 สายพันธุ์	

1.4 ยีสต์สปีชีส์ใหม่ (new species)

สำหรับการระบุว่าเป็นสปีชีส์ใหม่จะใช้การพิจารณาจากเกณฑ์ของ Kurtzman and Robnett (1998) โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดในฐานข้อมูล GenBank หากพบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จะจัดจำแนกให้เป็นสปีชีส์ใหม่ ผลการจัดจำแนกพบว่ามี 2 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales ที่อยู่ในวงศ์ Candidaceae 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ MD9 ซึ่งมี *Candida sorbosivorans* เป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดและวงศ์ Dipodascaceae 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ LYSM5 ซึ่งมี *Galactomyces geotrichum* เป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์จะได้ศึกษาลักษณะต่าง ๆ เพิ่มเติมตามเกณฑ์มาตรฐานและเสนอตั้งชื่อต่อไป



ภาพที่ 4 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายและสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุดตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำ ซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ สปีชีส์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว หรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุดตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำ ซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

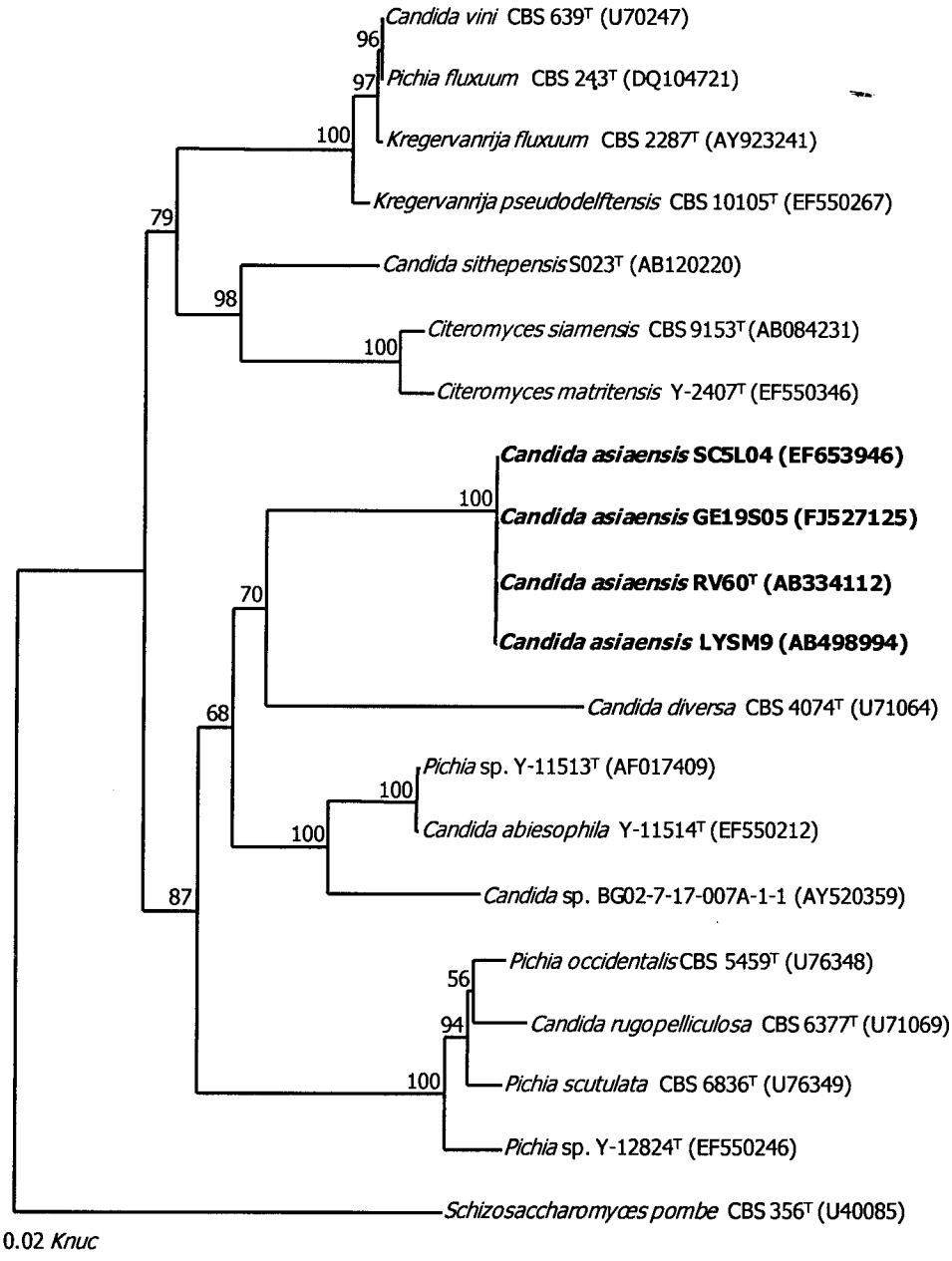
2. การอธิบายสปีชีส์ใหม่

การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่ทำโดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของยีสต์ ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและตั้งชื่อเพื่อเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่ ดังนี้

2.1 *Candida asiaensis* sp. nov. (LYSM9, RV60^{T}, SC5L04, GE19S05)

จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LYSM9 กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเหมือนกับ *Candida* sp. SC5L04 (EF653946) และ *Candida* sp. GE19S05 (FJ527125) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แต่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ไว้ใน GenBank (Lee and Liu, 2007; Lee and Hsieh, 2008) 100 เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์แยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไต้หวัน นอกจากนี้สายพันธุ์ LYSM9 ยังเหมือนกับ *Pichia* sp. RV60 (AB334112) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แต่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ไว้ใน GenBank (Limtong and Am-In, 2007) โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เพียง 1 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกันหรือสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก โดยยีสต์สายพันธุ์ RV60 แยกได้จากตัวอย่างน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง ประเทศไทย ดังนั้นจึงได้ขออนุญาตนำยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ เพื่ออธิบายเสนอตั้งชื่อและตีพิมพ์เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ร่วมกับสายพันธุ์ LYSM9 จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ LYSM9, RV60, SC5L04 และ GE19S05 ในฐานข้อมูล พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida abiesophila* NRRL Y-11514^{T} โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 8.3 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 47 นิวคลีโอไทด์และมีช่องว่างหรือ gap 31 ตำแหน่งใน 563 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน แต่ห่างจากยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วสปีชีส์อื่น และสร้างคลัสเตอร์กับ *Candida diversa* CBS 4074^{T} (ภาพที่ 6) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์ 4 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่และจะเสนอตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์ร่วมกัน

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่สร้างแอสโคสปอร์ทั้งที่อยู่สายพันธุ์เดียวและผสมเป็นคู่กับสายพันธุ์อื่น และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida asiaensis* sp. nov. โดยมีสายพันธุ์ RV60 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*asiaensis*" เนื่องจาก 2 สายพันธุ์แยกได้ในประเทศไทย คือ สายพันธุ์ RV60 แยกได้จากตัวอย่างน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง และสายพันธุ์ LYSM9 แยกได้จากตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติภูเรือ อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย ส่วนอีก 2 สายพันธุ์แยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไต้หวัน ซึ่งทั้ง 2 ประเทศอยู่ในทวีปเอเชีย สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 25966^{T}) ประเทศไทย NITE Biological Resources Center (NBRC 103863^{T}) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 10863^{T}) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 6 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ LYSM9, RV60^{T}, SC5L04, GE19S05 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 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 asiaensis* sp. nov. (LYSM9, RV60^{T}, SC5L04, GE19S05)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างรี ขนาด 2-5 x 3-8 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ เชื้อเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 7A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนีมีสีครีมเนื้อคล้ายเนยเหลว (butyrous) รูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ และโคโลนีเจริญแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ทั้งที่อยู่สายพันธุ์เดียวและผสมเป็นคู่กับสายพันธุ์อื่น

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบการสร้างเส้นใยเทียมแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 7B)

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-δ-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	-

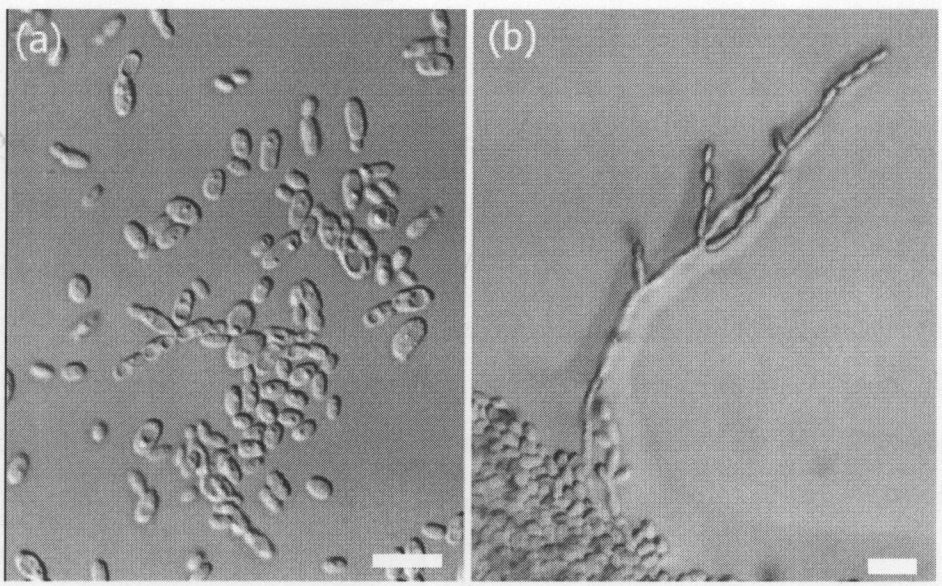
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+

การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q7



ภาพที่ 7 สัณฐานวิทยาของ *Candida asiaensis* sp. nov. (RV60^{T})

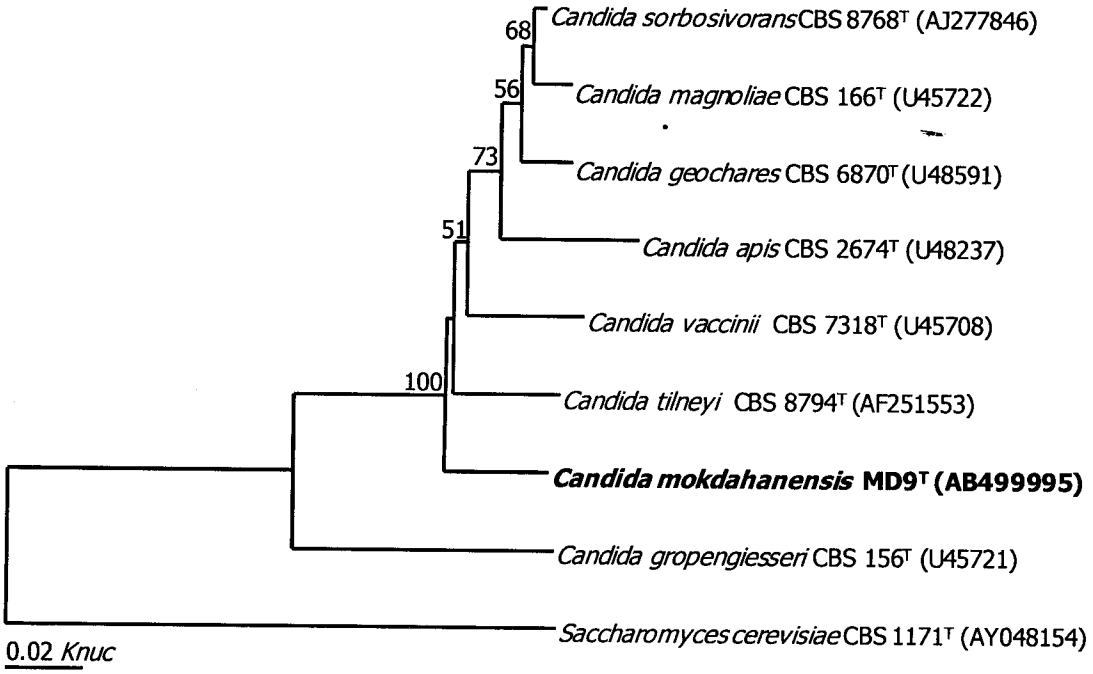
A. เซลล์ปกติในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

B. การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลัง บ่ม 7 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

2.2 *Candida mokdahanensis* sp. nov. (MD9^{T})

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ MD9 เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida sorbosivorans* CBS 8768^{T} แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 3.4 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 15 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 3 ตำแหน่งใน 441 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ MD9 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์ MD9 อยู่ในตำแหน่งห่างจากยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว โดยอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันกับ *Candida sorbosivorans* CBS 8768^{T}, *C. geochares* CBS 6870^{T}, *C. tilneyi* CBS 8794^{T} *C. magnolia* CBS 166^{T}, *C. vaccinii* CBS 7318^{T} และ *C. apis* CBS 2674^{T} โดยมีค่า bootstrap ที่สูง (ภาพที่ 8) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์สายพันธุ์ MD9 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ MD9 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida mokdahanensis* sp. nov. โดยมี MD9 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*mokdahanensis*" เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บป่าในเขตอุทยานแห่งชาติภูผาเทิบ อำเภอดอนตาล จังหวัดมุกดาหาร สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 34758^{T}) ประเทศไทย และ NITE Biological Resources Center (NBRC 105673^{T}) ประเทศญี่ปุ่น



ภาพที่ 8 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ MD9^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 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 mokdahanensis* sp. nov. (MD9^{T})

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมมีขนาด 2.0-4.5 x 2.0-4.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายสั้น ๆ มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 9)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ

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	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	l	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

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

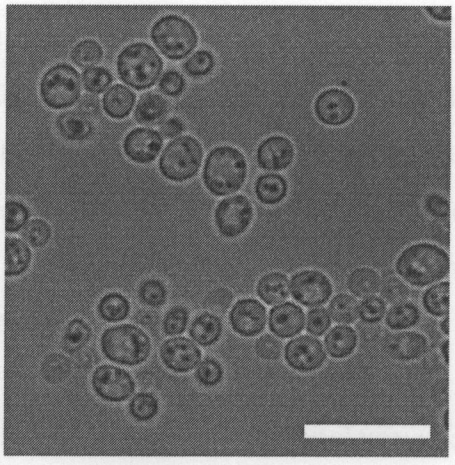
ราฟฟีโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	-
อินูลิน	-	ไซลิทอล	+

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	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q9



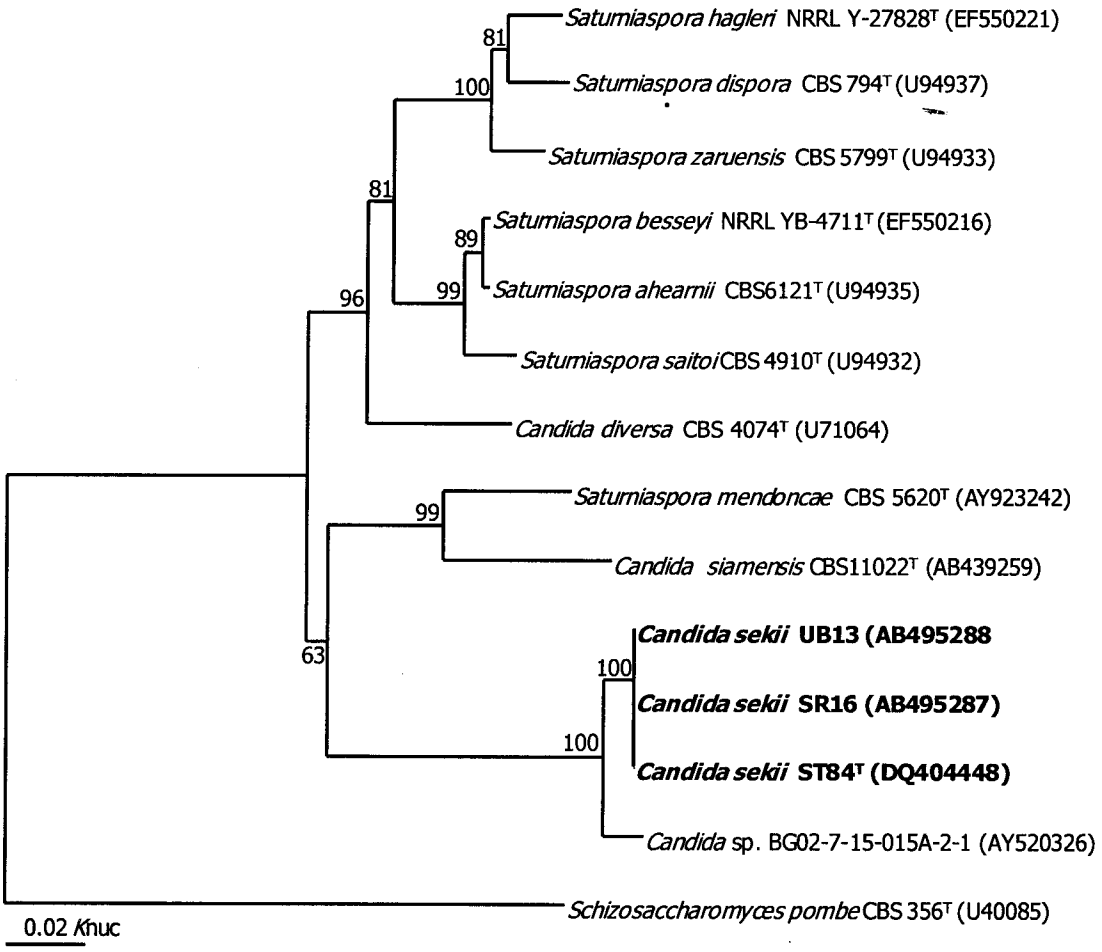
ภาพที่ 9 สัณฐานวิทยาของ *Candida mokdahanensis* sp. nov. ($MD9^T$) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

2.3 *Candida sekii* sp. nov. ($SR16, UB13, ST84^T$)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ SR16 และ UB13 เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเหมือนกับ *Pichia* sp. ST84 ซึ่งเป็นยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แต่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank (Jindamorakot *et. al.*, 2006) 100 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน โดยยีสต์สายพันธุ์ ST84 แยกได้จากตัวอย่างขุยแมลง จากเขื่อนห้วยหลวง จังหวัดอุดรธานี ประเทศไทย ดังนั้นจึงได้ขออนุญาตนำยีสต์สายพันธุ์ ST84 มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ เพื่ออธิบายเสนอตั้งชื่อ และตีพิมพ์เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ร่วมกับสายพันธุ์ SR16 และ UB13 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์กับข้อมูลใน Genbank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida* sp. BG02-7-15-015A-2-1 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.1 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์ และพบช่องว่าง 2 ตำแหน่งใน 522 นิวคลีโอไทด์) และ *Candida* sp. FN7S06 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.2 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์และพบช่องว่าง 4 ตำแหน่งใน 506 นิวคลีโอไทด์) นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ใกล้เคียงกับยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วคือ *C. diversa* $CBS\ 4074^T$ แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 7.7 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 42 นิวคลีโอไทด์และพบช่องว่าง 20 ตำแหน่งใน 542 นิวคลีโอไทด์) จากข้อมูลดังกล่าว ยีสต์ทั้ง 3

สายพันธุ์อยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ SR16, UB13, ST84 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่บนตำแหน่งเดียวกัน และอยู่ในตำแหน่งที่ต่างจาก *Candida* sp. BG02-7-15-015A-2-1 โดยมีค่า bootstrap ที่สูงถึงแม้ว่าจะอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน (ภาพที่ 10) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์สายพันธุ์ SR16 UB13 และ ST84 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่และจะเสนอตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์ร่วมกัน

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ SR16 UB13 และ ST84 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ทั้งที่อยู่สายพันธุ์เดียวและผสมเป็นคู่กับสายพันธุ์อื่น และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida sekii* sp. nov. โดยมี ST84 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*sekii*" ตามชื่อของ Professor Dr. Tatsuji Seki ผู้เชี่ยวชาญชาวญี่ปุ่นที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและความหลากหลายของยีสต์ในประเทศไทยมาเป็นเวลามากกว่า 25 ปี สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 8320^{T}) ประเทศไทย NITE Biological Resources Center (NBRC 105671^{T}) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 10931^{T}) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 10 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ SR16, UB13, ST84^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 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 sekii* sp. nov. (SR16, UB13, ST84^T)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมถึงรีและมีรูปร่างทรงกระบอกมีขนาด 2.0-4.5 x 2.5-8.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวและเป็นคู่ มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 11A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ทั้งที่อยู่สายพันธุ์เดียวและผสมเป็นคู่กับสายพันธุ์อื่น

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบการสร้างเส้นใยเทียมแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 11B)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

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

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

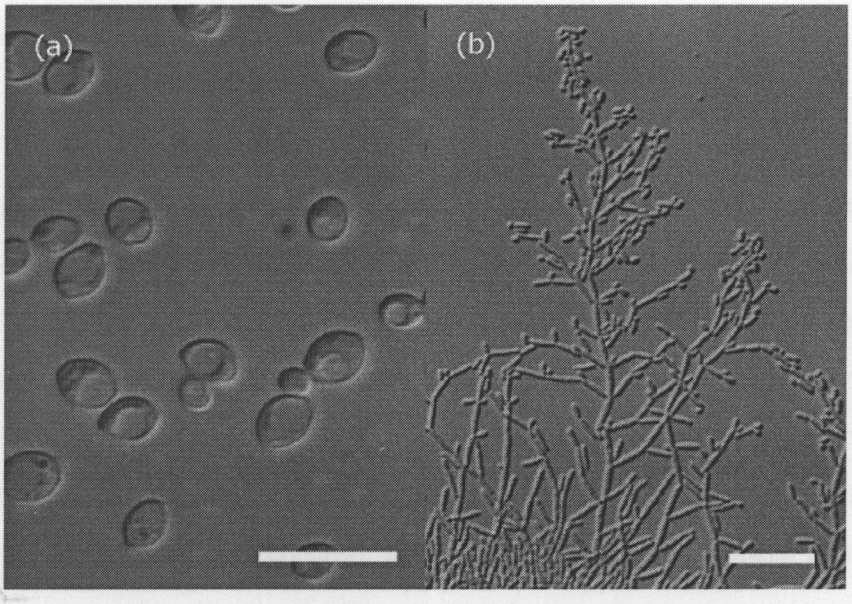
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	w
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	w
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-

การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q7



ภาพที่ 11 สัณฐานวิทยาของ *Candida sekii* sp. nov. ($ST84^T$)

A. เซลล์ปกติในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

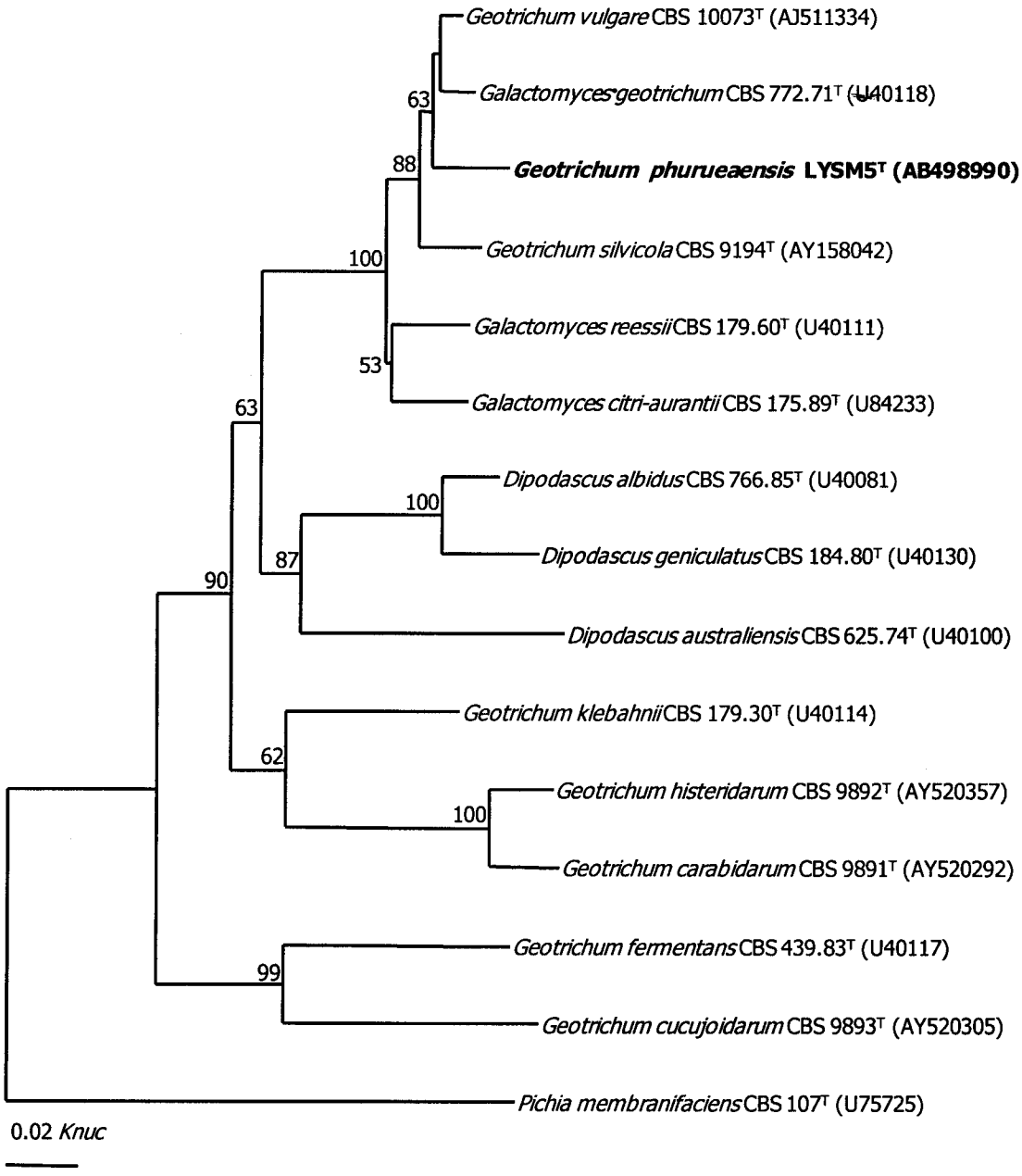
B. การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลัง บ่ม 7 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

2.4 *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. ($LYSM5^T$)

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LYSM5 ไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Galactomyces geotrichum* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 2.9 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 16 นิวคลีโอไทด์และพบช่องว่าง 1 ตำแหน่ง ใน 546

นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LYSM5 และยีสต์สปีชีส์อื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์ LYSM5 อยู่ห่างจากสปีชีส์ที่รู้จักแล้วสปีชีส์อื่น และอยู่คนละตำแหน่งกับ *Galactomyces geotrichum* CBS 772.71^{T} และ *Geotrichum vulgare* CBS 10073^{T} ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่ายีสต์สายพันธุ์ LYSM5 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ (ภาพที่ 12)

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LYSM5 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ เหมือนสกุล *Geotrichum* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Geotrichum* และตั้งชื่อเป็น *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. โดยมี LYSM5 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*phurueaensis*" เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บป่าในเขตอุทยานแห่งชาติภูเรือ อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 34756^{T}) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 105674^{T}) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11418^{T}) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 12 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ LYSM5^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 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 *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. (LYSM5^{T})

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างทรงกระบอกขนาด 3-6 x 4-12 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นสายสั้น ๆ มีการสร้างเส้นใยโดยมีลักษณะคล้ายรา ที่ปลายเส้นใยโป่งพองออก เพิ่มจำนวนได้โดยการสร้างอาร์โธรโคนีเดียขนาด 3x5 ไมโครเมตร

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบหยักมีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายโคโลนีของรา ผิวหน้ามีลักษณะเป็นเส้นใย

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkowa agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบการสร้างเส้นใยแท้ มีผนังกั้น (ภาพที่ 13)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	w
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-δ-แลกโตน	+
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	-	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	-	กรดกาแลกตุโรนิก	+
ซาลิซิน	-	กรดแลคติก	w
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	+
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	w
อินูลิน	w	ไซลิทอล	-

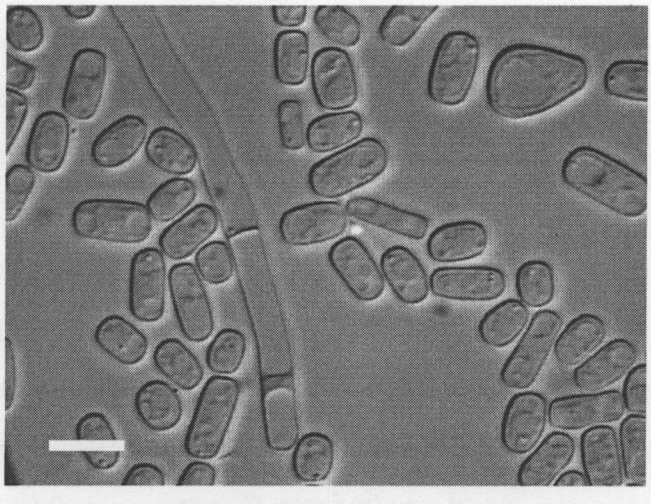
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-

การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	w
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q9



ภาพที่ 13 สัณฐานวิทยาของ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. (LYSM5^{T}) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3. ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ใน อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และป่าไม้อื่นในจังหวัดที่ตั้งอยู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ผลการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ใน อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และป่าไม้อื่นใน 8 จังหวัดที่ตั้งอยู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าส่วนใหญ่เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 11 สกุล 32 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida akabanensis*, *C. diversa*,*C. ghanaensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. saopaulonensis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, *D. nepalensis*, *D. vanrijiae* var. *vanrijiae*, *Geotrichum fragrans*, *G. vulgare*, *Kazachstania aquatic*, *K. bovina*, *K. siamensis*, *K. unispora*, *Kluyveromyces hubeiensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica*, *P. galeiformis*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *P. occidentalis*, *P. pijperi*, *Tetrapisispora namnaoensis*, *Torulaspora globosa*, *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, *W. saturnus* var. *sargentensis* และ *Zygosaccharomyces fermentati* และพบแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์เพียง 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Tricosporon mycotoxinivorans* นอกจากนี้ยังพบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 12 สายพันธุ์ โดยเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533 (4 สายพันธุ์) สายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. ST84 (2 สายพันธุ์) ซึ่งเสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida sekii* sp. nov. สายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. CICC1364 (3 สายพันธุ์) สายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. MTCC 3974 (1 สายพันธุ์) สายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. RV60 (1 สายพันธุ์) ซึ่งเสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่คือ *Candida asiaensis* sp. nov. และสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17 (1 สายพันธุ์) รวมทั้งสายพันธุ์ที่อาจจะจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ 6 สายพันธุ์ ที่ใกล้เคียงกับ *Galactomyces reessii* (1 สายพันธุ์) ที่ใกล้เคียงกับ *Geotrichum* sp. CICC1364 (1 สายพันธุ์) *Pichia spartinae* (3 สายพันธุ์) และ *Pichia sporocuriosa* (1 สายพันธุ์) นอกจากนี้ยังพบยีสต์สปีชีส์ใหม่อีก 2 สปีชีส์ คือ *Candida mokdahanensis* sp. nov. และ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. สปีชีส์ละ 1 สายพันธุ์

เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ และป่าไม้อื่นใน 8 จังหวัดที่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (ตารางที่ 5) ได้ผลดังนี้ คือ

(1) จังหวัดสุรินทร์ จากตัวอย่างดิน 5 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 10 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Candida ghanaensis*, *C. pseudolambica*, *Kazachstania siamensis* และ *Williopsis saturnus* var. *mrakii* นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ที่เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายคือ *Candida* sp. ST-533 (1 สายพันธุ์) *Geotrichum* sp. CICC1364 (1 สายพันธุ์) *Torulaspora* sp. WB17 (1 สายพันธุ์) และ *Pichia* sp. ST84 (1 สายพันธุ์) ซึ่งเสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida sekii* sp. nov.

(2) จังหวัดศรีสะเกษ จากตัวอย่างดิน 4 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 7 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Candida nivariensis*, *Kazachstania aquatic*, *K. siamensis*, *Tetrapisispora namnaoensis* และ *Torulaspora globosa*

(3) จังหวัดอุบลราชธานี จากตัวอย่างดิน 5 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 8 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Candida glabrata*, *C. orthopsilosis*, *Kazachstania aquatic* และ *K. siamensis* นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533 (1 สายพันธุ์) และ *Pichia* sp. ST84 (1 สายพันธุ์) ซึ่งเสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida sekii* sp. nov.

(4) จังหวัดมุกดาหาร จากตัวอย่างดิน 5 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 7 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Debaryomyces vanrijiae* var. *vanrijiae*, *Kazachstania bovina*, *K. siamensis* และ *Kodamaea ohmeri* และเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533 (1 สายพันธุ์) นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 1 สายพันธุ์ คือ *Candida mokdahanensis* sp. nov.

(5) จังหวัดร้อยเอ็ด จากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 4 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Kazachstania aquatic* และเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533 (1 สายพันธุ์) นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงกับ *Geotrichum* sp. CICC1364 (1 สายพันธุ์)

(6) จังหวัดชัยภูมิ จากตัวอย่างดิน 4 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 8 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Candida orthopsilosis*, *K. siamensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia kudriavzevii*, *Zygosaccharomyces fermentati* และ *Tricosporon mycotoxinivorans* นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงกับ *Pichia spartinae* (1 สายพันธุ์)

(7) จังหวัดเลย จากตัวอย่างดิน 20 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 42 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Candida akabanensis*, *C. diversa*, *C. glabrata*, *C. pararugosa*, *C. rugosa*, *C. saopaulonensis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, *D. nepalensis*, *D. vanrijiae* var. *vanrijiae*, *Geotrichum fragrans*, *G. vulgare*, *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces hubeiensis*, *Pichia caribbica*, *P. galeiformis*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *P. pijperi*, *Tetrapisispora namnaoensis*, *Torulaspora globosa* และ *Williopsis saturnus* var. *sargentensis* และเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. CICC1364 (1 สายพันธุ์) *Geotrichum* sp. MTCC 3974 (1 สายพันธุ์) และ *Pichia* sp. RV60 (1 สายพันธุ์) ซึ่งเสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่คือ *Candida asiaensis* sp. nov. นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงกับ *Galactomyces reessii* (1 สายพันธุ์) และ *Pichia spartinae* (2 สายพันธุ์) และพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ 1 สายพันธุ์ คือ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov.

(8) จังหวัดสกลนคร จากตัวอย่างดิน 14 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 16 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Candida tropicalis*, *Kazachstania aquatic*, *K. siamensis*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *P. occidentalis* และ*Tetrapisispora namnaoensis* และเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. CICC1364 (1 สายพันธุ์) นอกจากนี้พบสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงกับ *Pichia sporocuriosa* (1 สายพันธุ์)

จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ในดินจังหวัดเลย จากตัวอย่างดิน 20 ตัวอย่าง พบยีสต์ที่แยกมาจัดจำแนกถึง 42 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น 28 สปีชีส์ (ตารางที่ 5) แต่กลับพบยีสต์มากถึง 17 สปีชีส์ในดินจากจังหวัดอื่นที่มีจำนวนตัวอย่างน้อยกว่า แต่ไม่พบในดินจากจังหวัดเลย คือ *C. ghanaensis*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. pseudolambica*, *Kazachstania aquatic*, *K. bovina*, *K. siamensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia occidentalis*, *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Tricosporon mycotoxinivorans* สายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533, *Pichia* sp. ST84 และ*Torulaspora* sp. WB17 สายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงกับ *Geotrichum* sp. CICC1364 และ *Pichia sporocuriosa* ซึ่งความแตกต่างของยีสต์ที่ไม่พบในดินจังหวัดเลยนั้นน่าจะเกิดจากความแตกต่างของชนิดและองค์ประกอบของดินที่แตกต่างกัน

พื้นที่ป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่ศึกษา ส่วนใหญ่เป็นป่าเต็งรัง วัตถุต้นกำเนิดดินจะเป็นหินทราย หินดินดาน และหินปูน มีเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทรายในดินบน และดินร่วนเหนียวในดินล่าง รองลงมาจะเป็นป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้ง ดินมักจะเป็นดินปนทรายและดินลูกรัง (กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, ม.ป.ป.) ลักษณะของดินในแต่ละแห่งที่ศึกษาไม่แตกต่างกัน แต่กลับพบยีสต์หลายสปีชีส์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดินจากป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนั้น มีความหลากหลายของยีสต์สูง โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ซึ่งยีสต์ชนิดที่พบมากที่สุด คือ ยีสต์ในสกุล *Candida* มีจำนวน 29 สายพันธุ์ คิดเป็น 28.4 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา โดยจัดอยู่ใน 15 สปีชีส์ได้แก่ *Candida akabanensis*, *C. diversa*, *C. ghanaensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. saopaulonensis*, *C. tropicalis* สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533, *C. asiaensis* sp. nov., *C. mokdahanensis* sp. nov. และ *C. sekii* sp. nov. รองลงมาคือ ยีสต์สกุล *Pichia* โดยพบอยู่ใน 6 สปีชีส์ คือ *Pichia caribbica, P. galeiformis, P. kluyveri var. kluyveri, P. kudriavzevii, P. occidentalis* และ *P. pijperi* ส่วนสปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุดคือ *Kazachstania siamensis* (12 สายพันธุ์) โดยพบจากดินใน 6 จังหวัดจาก 8 จังหวัดที่ศึกษา ได้แก่ จังหวัดสุรินทร์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี มุกดาหาร ชัยภูมิ และ สกลนคร และสปีชีส์ที่พบบ่อยรองลงมาคือ *Kazachstania aquatic* และ *Tetrapisispora namnaoensis* ซึ่งพบสปีชีส์ละ 7 สายพันธุ์ โดยพบ *Kazachstania aquatic* ในจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี ร้อยเอ็ด และ สกลนคร ส่วน *Tetrapisispora namnaoensis* พบในจังหวัดศรีสะเกษ เลย และ สกลนคร จากการศึกษาในครั้งนี้ สปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุดคือ *Kazachstania siamensis* และสปีชีส์ที่พบรองลงมาคือ *Tetrapisispora namnaoensis* ต่างก็มี type strain ที่แยกจากตัวอย่างดินจากป่าในอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา (Limtong *et al*, 2007) และอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ (Sumpradit *et al*, 2005) ตามลำดับ แสดงว่ายีสต์ 2 สปีชีส์ดังกล่าวเป็นยีสต์ชนิดที่พบประจำในดินจากป่าของประเทศไทย

จากการศึกษาในครั้งนี้ที่พบ ยีสต์สกุล *Candida* มากที่สุดในดินนั้นสอดคล้องกับรายงานที่มีอยู่ก่อนหน้า คือ สาวิตรี และคณะ (2541) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง พบยีสต์สกุล *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Pichia* และ *Saccharomyces* โดยพบยีสต์สกุล *Candida* มากที่สุดเช่นกัน และนอกจากนี้ยังพบยีสต์สกุล *Debaryomyces*, *Geotrichum* และ *Pichia* เหมือนกันกับยีสต์ที่พบในเขตพื้นที่ป่าไม้ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่

ศึกษาอีกด้วย และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษายีสต์จากดินในป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าสนเขาในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ซึ่งมีรายงานก่อนหน้า (Sumpradit, 2005) ที่พบ *Candida* ถึง 8 สปีชีส์ คือ *Candida albicans, C. diversa, C. fermentati, C. glabrata, C. parapsilosis, C. quercifrusa, C. tropicalis* และ *C. maltose* โดยมี 3 สปีชีส์ที่เหมือนกับที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ คือ *C. diversa, C. glabrata* และ *C. tropicalis* และยังพบสปีชีส์อื่น ๆ จากดินในป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าสนเขาในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาวอีก คือ *Debaryomyces hensenii* var *fabryi, D. nepalensis, D. vanrijiae* var *yarrowii, D. polymorphus, Hanseniaspora uvarum, Kazachstania telluris, Kloeckera lindneri, Kluyveromyces lactis, Kodamae ohmeri,Ogataea siamensis, Pichia galeiformis, P. pini, P. kluyveri, P. spartinae, P. terricola, P. capsulate, Saccharomyces cevevisiae, S. crataegensis, Saccharomycopsis crataegensis, Torulaspora pretoriensis, Williopsis saturnus* และ *Zygosaccharomyces fermentati* ซึ่งพบสปีชีส์ที่เหมือนกันกับการศึกษาในครั้งนี้ คือ *D. hensenii* var *fabryi, D. nepalensis, K. ohmeri, P. galeiformis, P. kluyveri, W. saturnus* และ *Z. fermentati*

ตารางที่ 5 ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในอุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และป่าไม้อื่นใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Group Family Genus Species	สุรินทร์ 5 ตัวอย่าง	ศรีสะเกษ 4 ตัวอย่าง	อุบลราชธานี 5 ตัวอย่าง	มุกดาหาร 5 ตัวอย่าง	ร้อยเอ็ด 3 ตัวอย่าง	ชัยภูมิ 4 ตัวอย่าง	เลย 20 ตัวอย่าง	สกลนคร 14 ตัวอย่าง
Described species								
Ascomycetous yeast								
Candidaceae								
Candida								
Candida akabanensis							+ (1)	
Candida diversa							+ (3)	
Candida ghanaensis	+ (1)							
Candida glabrata			+ (1)				+ (3)	
Candida nivariensis		+ (1)						
Candida orthopsilosis			+ (2)			+ (2)		
Candida pararugosa							+ (1)	
Candida pseudolambica	+ (1)							
Candida rugosa							+ (1)	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Group / Family / Genus / Species	สุรินทร์ 5 ตัวอย่าง	ศรีสะเกษ 4 ตัวอย่าง	อุบลราชธานี 5 ตัวอย่าง	มุกดาหาร 5 ตัวอย่าง	ร้อยเอ็ด 3 ตัวอย่าง	ชัยภูมิ 4 ตัวอย่าง	เลย 20 ตัวอย่าง	สกลนคร 14 ตัวอย่าง
Candida saopaulonensis							+ (1)	
Candida tropicalis							+ (2)	+ (1)
Geotrichum								
Geotrichum fragrans							+ (1)	
Geotrichum vulgare							+ (1)	
Saccharomycetaceae								
Debaryomyces								
Debaryomyces hansenii var. *fabryi*							+ (1)	
Debaryomyces nepalensis							+ (1)	
Debaryomyces vanrijiae var. *vanrijiae*				+ (1)			+ (1)	
Kazachstania								
Kazachstania aquatica		+ (2)	+ (1)		+ (2)			+ (2)
Kazachstania bovina				+ (1)				

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Group / Family / Genus / Species	สุรินทร์ 5 ตัวอย่าง	ศรีสะเกษ 4 ตัวอย่าง	อุบลราชธานี 5 ตัวอย่าง	มุกดาหาร 5 ตัวอย่าง	ร้อยเอ็ด 3 ตัวอย่าง	ชัยภูมิ 4 ตัวอย่าง	เลย 20 ตัวอย่าง	สกลนคร 14 ตัวอย่าง
Kazachstania siamensis	+ (2)	+ (1)	+ (2)	+ (2)		+ (1)		+ (4)
Kazachstania unispora							+ (1)	
Kluyveromyces								
Kluyveromyces hubeiensis							+ (2)	
Kodamaea								
Kodamaea ohmeri				+ (1)		+ (1)		
Pichia								
Pichia caribbica							+ (3)	
Pichia galeiformis							+ (1)	
Pichia kluyveri var. *kluyveri*							+ (2)	+ (1)
Pichia kudriavzevii						+ (1)	+ (1)	+ (3)
Pichia occidentalis								+ (2)
Pichia pijperi							+ (1)	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Group / Family / Genus / Species	สุรินทร์ 5 ตัวอย่าง	ศรีสะเกษ 4 ตัวอย่าง	อุบลราชธานี 5 ตัวอย่าง	มุกดาหาร 5 ตัวอย่าง	ร้อยเอ็ด 3 ตัวอย่าง	ชัยภูมิ 4 ตัวอย่าง	เลย 20 ตัวอย่าง	สกลนคร 14 ตัวอย่าง
Tetrapisispora								
Tetrapisispora namnaoensis		+ (1)					+ (5)	+ (1)
Torulaspora								
Torulaspora globosa		+ (2)					+ (1)	
Williopsis								
Williopsis saturnus var. *mrakii*	+ (2)							
Williopsis saturnus var. *sargentensis*							+ (1)	
Zygosaccharomyces								
Zygosaccharomyces fermentati						+ (1)		
Trichosporon								
Trichosporon mycotoxinivorans						+ (1)		

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Group Family Genus Species	สุรินทร์ 5 ตัวอย่าง	ศรีสะเกษ 4 ตัวอย่าง	อุบลราชธานี 5 ตัวอย่าง	มุกดาหาร 5 ตัวอย่าง	ร้อยเอ็ด 3 ตัวอย่าง	ชัยภูมิ 4 ตัวอย่าง	เลย 20 ตัวอย่าง	สกลนคร 14 ตัวอย่าง
Undescribed species								
Candida sp. ST-533	+ (1)		+ (1)	+ (1)	+ (1)			
Geotrichum sp. CICC1364	+ (1)						+ (1)	+ (1)
Geotrichum sp. MTCC 3974							+ (1)	
Pichia sp. RV60							+ (1)	
Pichia sp. ST84	+ (1)		+ (1)					
Torulaspora sp. WB17	+ (1)							
Could be known or new species								
Galactomyces reessii							+ (1)	
Geotrichum sp. CICC1364					+ (1)			
Pichia spartinae						+ (1)	+ (2)	
Pichia sporocuriosa								+ (1)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Group Family Genus Species	สุรินทร์ 5 ตัวอย่าง	ศรีสะเกษ 4 ตัวอย่าง	อุบลราชธานี 5 ตัวอย่าง	มุกดาหาร 5 ตัวอย่าง	ร้อยเอ็ด 3 ตัวอย่าง	ชัยภูมิ 4 ตัวอย่าง	เลย 20 ตัวอย่าง	สกลนคร 14 ตัวอย่าง
New Species								
Candida mokdahanensis sp. nov.				+ (1)				
Geotrichum phurueaensis sp. nov.							+ (1)	
รวม (สายพันธุ์)	10	7	8	7	4	8	42	16

หมายเหตุ: ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนสายพันธุ์ที่พบในแต่ละจังหวัด

4. การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้ง

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ และป่าไม้อื่นในจังหวัดต่าง ๆ ที่ตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยตรวจการเจริญของยีสต์และการย่อยสลายสารดังกล่าวจากการสร้างบริเวณใสใต้หรือรอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารที่ใช้ในการทดสอบ นั่นคือ การย่อยสลายเซลลูโลสทำโดยนำยีสต์ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร carboxyl methyl cellulose (CMC) -YM agar ที่มีคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร micro crystalline cellulose-YM agar ที่เติมไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลสในรูปของ Avicel 1 เปอร์เซ็นต์ และการย่อยสลายไซแลนก็นำยีสต์ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร xylan - YM agar ที่เติมไซแลนในรูป oat spelts 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตรวจผลโดยราดสารละลาย congo red แล้วล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หากมีการย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจะเกิดบริเวณใสใต้หรือรอบโคโลนี (Teather and Wood, 1982) ส่วนการย่อยสลายแป้งจะนำยีสต์ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร starch - YM agar ที่เติมสารละลายแป้ง (soluble starch) 1 เปอร์เซ็นต์ ตรวจผลโดยการราดสารละลายไอโอดีนแล้วดูบริเวณใสที่เกิดจากการย่อยแป้ง (Limtong *et al.*, 2002).

จากยีสต์ 102 สายพันธุ์ พบยีสต์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสทั้งในรูปคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสและไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลส 19 สายพันธุ์ ยีสต์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในรูปคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสได้เพียงอย่างเดียว 18 สายพันธุ์ ยีสต์ที่สามารถย่อยสลายไซแลน 7 สายพันธุ์ และยีสต์ที่สามารถย่อยสลายแป้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6) โดยมีรายละเอียดดังนี้

(1) ยีสต์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส

สำหรับการทดสอบความสามารถการย่อยสลายเซลลูโลสนั้นใช้เซลลูโลส 2 ชนิด คือ คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสและไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลส จากผลการทดสอบยีสต์ที่สามารถย่อยสลายไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลสได้จะสามารถย่อยสลายคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสได้ด้วย เนื่องจากคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลส โดยพบยีสต์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ทั้งหมด 37 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสทั้งในรูปไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลสและคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสมี 19 สายพันธุ์ใน 9 สปีชีส์ คือ *Candida glabrata* (LY6, LY17, LY18 และ UB14), *C. nivariensis* (SSK1), *C.*

pararugosa (LY32), *Torulaspora globosa* (LY10, SSK8 และ SSK9), *Williopsis saturnus* var. *mrakii* (SR7 และ SR9), สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533 (RA4, MD15, SR22 และ UB6), สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17 (SR3) และสปีชีส์ใหม่คือ *Candida mokdahanensis* sp. nov. (MD9) และ *Candida sekii* sp. nov. (SR16 และ UB13) ส่วนยีสต์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในรูปคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสได้เพียงอย่างเดียวมี 18 สายพันธุ์ ใน 6 สปีชีส์ คือ *Candida orthopsilosis* (CP3, CP4, UB2 และ UB20), *Kazachstania aquatic* (RA2, RA3, SSK7, SSK13, UB19, SKK4 และ SKK10), *K.unispora* (LY2), *Kodamaea ohmeri* (MD12 และ CP7), *Pichia caribbica* (LY1, LY4 และ LY28) และ *Zygosaccharomyces fermentati* (CP6)

(2) ยีสต์ที่ย่อยสลายไซแลน

การทดสอบการย่อยสลายไซแลน พบยีสต์ที่สามารถย่อยสลายไซแลนมี 7 สายพันธุ์ ใน 4 สปีชีส์ คือ *Candida pararugosa* (LY32), *Torulaspora globosa* (LY10, SSK8 และ SSK9), สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17 (SR3) และสปีชีส์ใหม่คือ *Candida sekii* sp. nov. (SR16 และ UB13)

(3) ยีสต์ที่ย่อยสลายแป้ง

สำหรับการทดสอบการย่อยสลายแป้ง พบยีสต์ที่สามารถย่อยสลายแป้งมี5 สายพันธุ์ ใน 5 สปีชีส์ คือ *Candida pseudolambica* (SR1), *Geotrichum fragrans* (LY19), *Pichia sporocuriosa* (SKK6), *Trichosporon mycotoxinivorans* (CP2) และสปีชีส์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. MTCC 3974 (LY5)

จากการทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งซึ่งเป็นอินทรีย์วัตถุที่สะสมในดินเกิดจากการทับถมของพืช พบว่ายีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด 102 สายพันธุ์ มียีสต์จำนวน 42 สายพันธุ์ (41.2 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษาทั้งหมด) ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์วัตถุชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดได้ ส่วนยีสต์อีกจำนวน 60 สายพันธุ์ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน หรือแป้งได้เลย นอกจากนี้ความสามารถในการย่อยสลายของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ก็แตกต่างกัน กล่าวคือ ในจำนวนยีสต์ 42 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสทั้งในรูปรูปคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสและไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลสได้ถึง 19 สายพันธุ์ และโดยส่วนใหญ่ยีสต์ที่สามารถ

ย่อยสลายคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส ไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลส และไซแลนอยู่ในสกุล *Candida* ซึ่งเหมือนกับรายงานที่มีก่อนหน้าที่แยกและจัดจำแนกยีสต์จากดินในแอฟริกาใต้พบยีสต์สปีชีส์ใหม่อยู่ในสกุล *Candida* คือ *Candida mokoenati* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท (Mokwena *et al.*, 2000) นอกจากนี้พบรายงานก่อนหน้าที่กล่าวถึงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่ผลิตจากยีสต์สปีชีส์อื่น ๆ อีก เช่น *Trichosporon pullulans* (Stevens *et al.*, 1997), *Trichosporon cutaneum* (Hrmova *et al.*, 1984) และการศึกษาเอนไซม์ extracellular carboxymethy cellulase จาก *Cryptococcus* sp. S-2 (Thonggekkaew *et al.*, 2008) ส่วนยีสต์ที่สามารถย่อยแป้งได้พบว่าอยู่ในสกุล *Candida*, *Geotrichum*, *Pichia* และ *Trichosporon* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่กล่าวถึงการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลสโดยยีสต์ เช่น *Debaryomyces occidentalis* (*Schwanniomyces alluvius*) (Wilson *et al.*, 1982; Moranelli *et al.*, 1982), *Trichosporon pullulans* (De Mot and Verachtert, 1986), *Candida antarctica* (De Mot and Verachtert, 1987), *Lipomyces kononenkoae* (Prieto *et al.*, 1995) และ *Cryptococcus flavus* (Wanderley *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบยีสต์ในลูกแป้งที่สามารถผลิตเอนไซม์อะมัยเลสได้ดี คือ *Saccharomycopsis fibuligera* และพบสปีชีส์อื่น ๆ อีก เช่น *Candida rhagii, C. glabrata, Pichia anomala, P. orientalis, P. burtonii, P. fabianii, P. mexicana, P. heimii, Rhodotorula philyla, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora globosa, T. delbrueckii* and *Trichosporon asahii* (Limtong *et al.*, 2002)

แต่อย่างไรก็ตามยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะมีระดับความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์วัตถุต่างกัน เช่นในการย่อยสลายเซลลูโลสในรูปคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส พบว่ายีสต์บางสายพันธุ์สามารถย่อยสลายคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสได้เล็กน้อยเนื่องจากเมื่อทดสอบแล้วให้บริเวณใสที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดโคโลนี แต่บางสายพันธุ์สามารถย่อยสลายคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสได้ดีกว่าเนื่องจากพบบริเวณใสที่มีขนาดเท่ากับขนาดของโคโลนี

ตารางที่ 6 ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจากในเขตป่าไม้ที่ตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Group Species	Strain	No. of strain	ability of degradation			
			carboxyl methyl cellulose (CMC)	microcrystalline cellulose (Avicel)	xylan (oat spelts)	soluble starch
Described species						
Candida akabanensis	LYSM15	1	-	-	-	-
Candida diversa	LY7, LY22, LY33	3	-	-	-	-
Candida ghanaensis	SR19	1	-	-	-	-
Candida glabrata	LY6, LY17, LY18, UB14	4	+	+	-	-
Candida nivariensis	SSK1	1	+	+	-	-
Candida orthopsilosis	CP3, CP4, UB2, UB20	4	+	-	-	-
Candida pararugosa	LY32	1	+	+	+	-
Candida pseudolambica	SR1	1	-	-	-	+
Candida rugosa	LYSM3	1	-	-	-	-
Candida saopaulonensis	LYSM7	1	-	-	-	-
Candida tropicalis	LYSM4, LY11, SKK14	3	-	-	-	-
Geotrichum fragrans	LY19	1	-	-	-	+

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Group Species	Strain	No. of strain	ability of degradation			
			carboxyl methyl cellulose (CMC)	microcrystalline cellulose (Avicel)	xylan (oat spelts)	soluble starch
Geotrichum vulgare	LYSM17	1	-	-	-	-
Debaryomyces hansenii var. *fabryi*	LYSM6	1	-	-	-	-
Debaryomyces nepalensis	LYSM11	1	-	-	-	-
Debaryomyces vanrijiae var. *vanrijiae*	LYSM10, MD1	2	-	-	-	-
Kazachstania aquatica	RA2, RA3, SSK7, SSK13, UB19, SKK4, SKK10	7	w	-	-	-
Kazachstania bovina	MD4	1	-	-	-	-
Kazachstania siamensis	SR18, SR20, SSK11, UB5, UB9, MD3, MD8, CP5, SKK3, SKK5, SKK8, SKK9	12	-	-	-	-
Kazachstania unispora	LY2	1	w	-	-	-
Kluyveromyces hubeiensis	LYSM12, LYSM14	2	-	-	-	-
Kodamaea ohmeri	MD12, CP7	2	w	-	-	-
Pichia caribbica	LY1, LY4, LY28	3	w	-	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Group Species	Strain	No. of strain	ability of degradation			
			carboxyl methyl cellulose (CMC)	microcrystalline cellulose (Avicel)	xylan (oat spelts)	soluble starch
Pichia galeiformis	LY21	1	-	-	-	-
Pichia kluyveri var. *kluyveri*	LY8, LY9, SKK20	3	-	-	-	-
Pichia kudriavzevii	LY12, CP8, SKK1, SKK2, SKK12	5	-	-	-	-
Pichia occidentalis	SKK7, SKK17	2	-	-	-	-
Pichia pijperi	LYSM1	1	-	-	-	-
Tetrapisispora namnaoensis	SSK2, LY25, LY26, LY27, LY29, LYSM8, SKK11	7	-	-	-	-
Torulaspora globosa	SSK8, SSK9, LY10	3	+	+	+	-
Williopsis saturnus var. *mrakii*	SR7, SR9	2	+	+	-	-
Williopsis saturnus var. *sargentensis*	LYSM13	1	-	-	-	-
Zygosaccharomyces fermentati	CP6	1	w	-	-	-
Trichosporon mycotoxinivorans	CP2	1	-	-	-	+
Could be known or new species						
Closest to *Galactomyces reessii*	LYSM2	1	-	-	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Group Species	Strain	No. of strain	ability of degradation			
			carboxyl methyl cellulose (CMC)	microcrystalline cellulose (Avicel)	xylan (oat spelts)	soluble starch
Closest to *Pichia spartinae*	LY20, LY24, CP1	3	-	-	-	-
Closest to *Pichia sporocuriosa*	SKK16	1	-	-	-	+
Closest to *Geotrichum* sp. CICC1364	RA1	1	-	-	-	-
Undescribed species						
Simila to *Candida* sp. ST-533	RA4, MD15, SR22, UB6	4	+	+	-	-
Similar to *Geotrichum* sp. CICC1364	LY16, SR23, SKK15	3	-	-	-	-
Similar to *Geotrichum* sp. MTCC 3974	LY5	1	-	-	-	+
Similar to *Pichia* sp. RV60	LYSM9	1	-	-	-	-
Similar to *Pichia* sp. ST84	SR16, UB13	2	+	+	+	-
Similar to *Torulaspora* sp. WB17	SR3	1	+	+	+	-
New Species						
Candida mokdahanensis sp. nov.	MD9	1	+	+	-	-
Geotrichum phurueaensis sp. nov.	LYSM5	1	-	-	-	-

หมายเหตุ: + หมายถึง เกิดบริเวณใส (clear zone) ที่มีขนาดเท่ากับขนาดของโคโลนี แสดงว่ายีสต์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์วัตถุได้

w หมายถึง เกิดบริเวณใสที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดของโคโลนี แสดงว่ายีสต์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์วัตถุได้เพียงเล็กน้อย

- หมายถึง ไม่เกิดบริเวณใส แสดงว่ายีสต์ไม่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์วัตถุได้

ในการทดสอบการย่อยสลายแป้งนำยีสต์สกุล *Endomycopsis* เป็น Positive control ที่ให้ผลเป็น +++ เนื่องจากเกิดบริเวณใสที่มีขนาดใหญ่กว่าขนาดโคโลนี 2 เท่า

สรุปผล

ทำการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้รวม 22 แห่ง ประกอบด้วย ป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า (2 แห่ง) อุทยานแห่งชาติ (9 แห่ง) วนอุทยานแห่งชาติ (3 แห่ง) และป่าไม้อื่น (8 แห่ง) ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยใน 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสุรินทร์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี มุกดาหาร ร้อยเอ็ด ชัยภูมิ เลย และสกลนคร ยีสต์ที่ศึกษา 102 สายพันธุ์ นำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ผลดังนี้

จากการจัดจำแนกยีสต์ 102 สายพันธุ์ พบว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วจำนวน 82 สายพันธุ์ (80.4 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษา) โดยยีสต์ส่วนใหญ่ (81 สายพันธุ์) เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ จัดจำแนกเป็น 11 สกุล 32 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida akabanensis*, *C. diversa*, *C. ghanaensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. saopaulonensis*, *C. tropicalis*, *Geotrichum fragrans*, *G. vulgare*, *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, *D. nepalensis*, *D. vanrijiae* var. *vanrijiae*, *Kazachstania aquatic*, *K. bovina*, *K. siamensis*, *K. unispora*, *Kluyveromyces hubeiensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica*, *P. galeiformis*, *P. kluyveri* var *kluyveri* , *P. kudriavzevii*, *P. occidentalis*, *P. pijperi*, *Tetrapisispora namnaoensis*, *Torulaspora globosa*, *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, *W. saturnus* var. *sargentensis* และ *Zygosaccharomyces fermentati* และมีเพียง 1 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ คือ *Trichosporon mycotoxinivorans* ส่วนยีสต์อีก 12 สายพันธุ์ (11.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษา) เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 6 สปีชีส์ คือ เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533 (4 สายพันธุ์) *Geotrichum* sp. CICC 1364 (3 สายพันธุ์) *Geotrichum* sp. MTCC 3974 (1 สายพันธุ์) *Pichia* sp. RV60 (1 สายพันธุ์ ซึ่งได้ศึกษาและตั้งชื่อเป็น *Candida asiaensis* sp. nov.) เหมือนกับ *Pichia* sp. ST84 (2 สายพันธุ์ ซึ่งได้ศึกษาและตั้งชื่อเป็น *Candida sekii* sp. nov.) และเหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17 (1 สายพันธุ์) และอีก 6 สายพันธุ์อาจจะจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ (5.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษา) ที่ใกล้เคียงกับ *Geotrichum* sp. CICC 1364 (1 สายพันธุ์) *Galactomyces reessii* (1 สายพันธุ์) *Pichia spartinae* (3 สายพันธุ์) และ *Pichia sporocuriosa* (1 สายพันธุ์) นอกจากนี้ยังพบยีสต์สปีชีส์ใหม่อีก 2 สปีชีส์ คือ *Candida mokdahanensis* sp. nov. และ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. สปีชีส์ละ 1 สายพันธุ์

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ และป่าไม้อื่นของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยใน 8 จังหวัด แสดงว่ายีสต์ชนิดที่พบมากที่สุด คือ ยีสต์ในสกุล *Candida* มีจำนวน 29 สายพันธุ์ คิดเป็น 28.4 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา โดยจัดอยู่ใน 15 สปีชีส์ได้แก่ *Candida akabanensis*, *C. diversa*, *C. ghanaensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. saopaulonensis*, *C. tropicalis* สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533, *C. asiaensis* sp. nov., *C. mokdahanensis* sp. nov. และ *C. sekii* sp. nov. รองลงมาคือ ยีสต์สกุล *Pichia* โดยพบอยู่ใน 6 สปีชีส์ คือ *Pichia caribbica, P. galeiformis, P. kluyveri var. kluyveri, P. kudriavzevii, P. occidentalis* และ *P. pijperi* ส่วนสปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุดคือ *Kazachstania siamensis* (12 สายพันธุ์) และสปีชีส์ที่พบรองลงมาคือ *Kazachstania aquatic* และ *Tetrapisispora namnaoensis* ซึ่งพบสปีชีส์ละ 7 สายพันธุ์

สำหรับการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งของยีสต์ที่แยกได้ 102 สายพันธุ์ พบยีสต์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ทั้งหมด 37 สายพันธุ์ โดย 19 สายพันธุ์ อยู่ใน 9 สปีชีส์ สามารถย่อยสลายเซลลูโลสทั้งในรูปไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลสและคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส คือ *Candida glabrata, C. nivariensis, C. pararugosa, Torulaspora globosa, Williopsis saturnus* var. *mrakii*, สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. ST-533, สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17 และสปีชีส์ใหม่คือ *Candida mokdahanensis* sp. nov. และ *Candida sekii* sp. nov. ส่วนยีสต์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในรูปคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสได้เพียงอย่างเดียวมี 18 สายพันธุ์ ใน 6 สปีชีส์ คือ *Candida orthopsilosis, Kazachstania aquatic, K.unispora, Kodamaea ohmeri, Pichia caribbica* และ *Zygosaccharomyces fermentati* ส่วนการทดสอบการย่อยสลายไซแลน พบยีสต์ที่สามารถย่อยสลายไซแลน 7 สายพันธุ์ ใน 4 สปีชีส์ คือ *Candida pararugosa, Torulaspora globosa*, สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Torulaspora* sp. WB17 และสปีชีส์ใหม่ คือ *Candida sekii* sp. nov. และการทดสอบการย่อยแป้ง พบยีสต์ที่สามารถย่อยสลายแป้ง 5 สายพันธุ์ ใน 5 สปีชีส์ คือ *Candida pseudolambica, Geotrichum fragrans, Pichia sporocuriosa, Trichosporon mycotoxinivorans* และสปีชีส์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. MTCC 3974 จากผลงานวิจัยนี้พอจะประเมินได้ว่ายีสต์หลายชนิดน่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม. ม.ป.ป. **ความหลากหลายทางชีวภาพ.** แหล่งที่มา: http://www.environnet.in.th/evdb/info/bio/bio.html, 19 มิถุนายน 2551.

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม. 2549. **อุทยานแห่งชาติ ธรรมชาติ...และนันทนาการ.** ม.ป.ท.

ยงยุทธ โอสถสภา, ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์ และ ชัยสิทธิ์ ทองจู. 2541. **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.** พิมพ์ครั้งที่ 2 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, มณี ตันติรุ่งกิจ และ พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์. 2541. **การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง.** สิ่งพิมพ์ ม.ก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์, กรุงเทพฯ.

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

Atlas, R. M., T. A. Horowitz and M. Busdosh. 1978. Prudoe crude oil in Arctic marine ice water and sediment ecosystems: degradation and interactions with microbial and benthic communities. **J. Fish. Res. Board Can.** 35: 585-590.

Bastawde, K.B. 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8: 353-368.

Connell, L., R. Redman, S. Craig and G. Scorzetti. 2008. Diversity of soil yeasts isolated from south victoria land, Antarctica. **Microb. Ecol.** 56: 448-459.

Demain, A.L., H.J. Phaff and C.P. Kurtzman. 1998. The industrial and agricultural singnificance of yeast, pp. 13-17. *In* C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The yeasts, A Taxonomic Study, 4th edn.** Elsevier Scince, Amsterdum.

De Mot, R. and H. Verachtert. 1986. Secretion of α-amylase and multiple forms of glucoamylase by the yeast *Trichosporon pullulans*. **Can. J. Microbiol.** 32: 47-51.

_____ and _____. 1987. Purification and characterization of extracellular α-amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. **Eur. J. Biochem.** 164: 643-654.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution.** 39: 783-791.

Hrmová, M., P. Biely1, M. Vrsanská1 and E. Petráková1. 1984. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme complex in the yeast *Trichosporon cutaneum*. **Arch. Microbiol.** 138: 371-376.

Jindamorakot, S., S. Limtong and T. Nakase. 2006. **Direct Submission.** BLAST. Available Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/89146424, August 18, 2009.

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

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

Kurtzman, C.P. and J. W. Fell. 1998. **The Yeasts : A Taxonomic Study, 4th edition.** Elsevier, Amsterdam.

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

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

_____ and 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.

Lee, C.F. and C. H. Liu. 2007. **Direct Submission.** BLAST. Available Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/150248364, August 18, 2009.

_____ and C. W. Hsieh. 2008. **Direct Submission.** BLAST. Available Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/223930774, August 18, 2009.

Limtong, S. and S. Am-in, 2007. **Direct Submission.** BLAST. Available Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/165264000, August 18, 2009.

_____, S. Sintara, P. Suwannarit and N. Lotong. 2002. Yeast Diversity in Thai Traditional Fermentation Starter (Loog-pang). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 36: 149-158.

Limtong, S. W. Yongmanitchai, M. Tun, H. Kawasaki and T. Seki. 2007. *Kazachstania siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from forest soil in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 419-422.

Middelhoven, W.J. 2004. *Trichosporon wieringae* sp.nov., an anamorphic basidiomycetous yeast from soil, and assimilation of some phenolic compounds, polysaccharides and other non-conventional carbon sources by saprophytic *Trichosporon* species. **Antonie van Leeuwenhoek**. 86: 329-337.

_____, G. Scorzetti and J.W. Fell. 2001. *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the loubieri / laibachii group of species that assimilate hemicellulose and phenolic compounds. **FEMS Yeast Res.** 1: 15-22.

Mokwena, T.A., E. Jansen van Rensburg and J. Myburgh. 2000. The isolation and classification of *Candida mokoenaii* sp. nov. A new yeast isolate from South African soil. **Antonie van Leeuwenhoek**. 77: 43-47.

Moranelli, F., M. Yaguchi, B. Calleja and A. Nasim. 1982. Purification and characterization of the extracellular α-amylase activity of the yeast *Schwanniomyces alluvius*. **Biochem. Cell Biol.** 65, 899-907.

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

Phaff, H.J. and W.T. Starmer. 1987. Yeasts associated with plants, insects and soil. pp. 123-176. *In* A.H. Rose and J. H. Harrison (eds). **The Yeast. Vol. 1.2nd edition.** Academic Press, London.

Prieto, J.A., , B.R. Bort, J. Martinez, F. Randez-Gil, C. Buesa and P. Sanz. 1995. Purification and characterization of a new α-amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. **Biochem. Cell Biol.** 73, 41-49.

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

Sato, I. H. Kobayashi, Y. Hanya, K. Abe, S. Murakami, G. Scorzetti and J.W. Fell. 1999. *Cryptococcus nodaensis* sp. nov., a yeast isolated from soil in Japan that produces a salt-tolerant and thermostable glutaminase. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 22: 127-132.

Scorzetii, G., J.W. Fell and 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 Res.** 2: 495-517.

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

Stevens, B. J. H and J. Payne. 1997. Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon*. **J. Gen. Microbiol.** 100: 381-393.

Sumpradit, T. 2005. Yeast diversity in soils from hill evergreen, mixed deciduous, dry dipterocarp, and pine forest of Nam Nao National Park. **Thesis.** Kasetsart University.

_____, S. Limtong., W. Yongmanitchai., H. Kawasaki and T. Seki. 2005. *Tetrapisispora namnaonensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from forest soil of Nam Nao National Park, Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 1735-1738.

Teather, R.M., P. J. Wood. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** 4: 777-780.

Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and 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.

Thongekkaew J., I. Hiroko, K. Masaki and H. Iefuji. 2008. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purif.** 60: 140-146.

Tinker, P. B. 1996. Inventorying and monitoring biodiversity, pp. 166–179. *In* F. di Castri, and T. Younes, eds. **Biodiversity, sciences and development: towards a new partnership.** CAB International, UK.

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

Wanderley K. J., F.A.G. Torres, L.M.P. Moraes and C. J. Ulhoa. 2004. Biochemical characterization of α-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 231: 165-169

Wilson, J. J. and W. M. Ingledew. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 301-307.

Wuczkowski, M. and H. Prillinger. 2004. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria (''Nationalpark Donauauen''). **Microbiol. Res.** 159: 263-275.

Yamada, Y. 1998. Identification of Coenzyme Q (Ubiquinone) homologs, pp. 101-102. *In* C. P. Kurtzman and J. W. Fell (eds). **The yeasts, A Taxonomic Study, 4th edn**. Elsevier. Amsterdam.

_____. and 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. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, pp. 77-100. *In* C. P. Kurtzman and J. W. Fell (eds). **The yeasts, A Taxonomic Study, 4th edn.** Elsevier. Amsterdam.

ภาคผนวก

การเก็บรักษายีสต์

เก็บรักษายีสต์ทั้งหมด 102 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อใน YM broth ที่มีกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ซ้ำ และเก็บแช่แข็ง (deep freezer) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน รายละเอียดของข้อมูลการเก็บรักษาแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 รายละเอียดของข้อมูลการเก็บรักษายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างดินในเขตป่าไม้ที่ตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวน (enrichment technique)

Strain	Species	Date of sample collection	Date of isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
SR1	*Candida pseudolambica*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/1, 2
SR3	*Torulaspora* sp. WB17	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/5, 6
SR7	*Williopsis saturnus* var. mrakii	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/13, 14
SR9	*Williopsis saturnus* var. mrakii	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/17, 18
SR16	*Pichia* sp. ST84	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/31, 32
SR18	*Kazachstania siamensis*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/35, 36
SR19	*Candida ghanaensis*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/37, 38
SR20	*Kazachstania siamensis*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/39, 40
SR22	*Candida* sp. ST-533	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/43, 44
SR23	*Geotrichum* sp. CICC1364	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/45, 46
SSK1	*Candida nivariensis*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/47, 48
SSK2	*Tetrapisispora namnaoensis*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/49, 50
SSK7	*Kazachstania aquatica*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/59, 60
SSK8	*Torulaspora globosa*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/61, 62
SSK9	*Torulaspora globosa*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/63, 64
SSK11	*Kazachstania siamensis*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/67, 68
SSK13	*Kazachstania aquatica*	2 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/71, 72
UB2	*Candida parapsilosis*	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/75, 76
UB5	*Kazachstania siamensis*	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	10/81, 11/1

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Strain	Species	Date of sample collection	Date of isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
UB6	*Candida* sp. ST-533	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/2, 3
UB9	*Kazachstania siamensis*	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/8, 9
UB13	*Pichia* sp. ST84	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/16, 17
UB14	*Candida glabrata*	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/18, 19
UB19	*Kazachstania aquatica*	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/28, 29
UB20	*Candida parapsilosis*	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/30, 31
MD1	*Debaryomyces vanrijiae* var. vanrijiae	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/34, 35
MD3	*Kazachstania siamensis*	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/38, 39
MD4	*Kazachstania bovina*	3 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/40, 41
MD8	*Kazachstania siamensis*	4 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/48, 49
MD9	New species of *Candida sorbosivorans*	4 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/50, 51
MD12	*Kodamaea ohmeri*	4 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/56, 57
MD15	*Candida* sp. ST-533	4 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/62, 63
RA1	*Geotrichum* sp. CICC1364	4 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/72, 73
RA2	*Kazachstania aquatica*	4 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/74, 75
RA3	*Kazachstania aquatica*	4 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/76, 77
RA4	*Candida* sp. ST-533	4 พ.ค. 2550	พ.ค. 2550	ก. ค. 2550	11/78, 79
CP1	*Pichia spartinae*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/A1, 2
CP2	*Trichosporon mycotoxinivorans*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/A3, 4
CP3	*Candida orthopsilosis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/A5, 6
CP4	*Candida orthopsilosis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/A7, 8
CP5	*Kazachstania siamensis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/A9, 10
CP6	*Zygosaccharomyces fermentati*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/B1, 2
CP7	*Kodamaea ohmeri*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/B3, 4
CP8	*Pichia kudriavzevii*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/B5, 6

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Strain	Species	Date of sample collection	Date of isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
LY1	*Candida fermentati*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/B7, 8
LY2	*Kazachstania unispora*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/B9, 10
LY4	*Candida fermentati*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/C3, 4
LY5	*Galactomyces geotrichum*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/C5, 6
LY6	*Candida glabrata*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/C7, 8
LY7	*Candida diversa*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/C9, 10
LY8	*Pichia kluyveri*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/D1, 2
LY9	*Pichia kluyveri*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/D3, 4
LY10	*Torulaspora globosa*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/D5, 6
LY11	*Candida tropicalis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/D7, 8
LY12	*Pichia kudriavzevii*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/D9, 10
LY16	*Geotrichum* sp. CICC1364	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/E7, 8
LY17	*Candida glabrata*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/E9, 10
LY18	*Candida glabrata*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/F1, 2
LY19	*Geotrichum fragrans*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/F3, 4
LY20	*Pichia spartinae*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/F5, 6
LY21	*Pichia galeiformis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/F7, 8
LY22	*Candida diversa*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/F9, 10
LY24	*Pichia spartinae*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/G3, 4
LY25	*Tetrapisispora namnaoensis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/G5, 6
LY26	*Tetrapisispora namnaoensis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/G7, 8
LY27	*Tetrapisispora namnaoensis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/G9, 10
LY28	*Candida fermentati*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/H1, 2
LY29	*Tetrapisispora namnaoensis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/H3, 4
LY32	*Candida pararugosa*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/H9, 10

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Strain	Species	Date of sample collection	Date of isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
LY33	*Candida diversa*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/I1, 2
LYSM1	*Pichia pijperi*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/G1, 2
LYSM2	*Galactomyces reessii*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/G3, 4
LYSM3	*Candida rugosa*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/G5, 6
LYSM4	*Candida tropicalis*	7 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/G7, 8
LYSM5	New species of *Galactomyces geotrichum*	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/G9, 10
LYSM6	*Debaryomyces hansenii* var. fabryi	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/H1, 2
LYSM7	*Candida saopaulonensis*	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/H3, 4
LYSM8	*Tetrapisispora namnaoensis*	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/H5, 6
LYSM9	*Pichia* sp. RV60	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/H7, 8
LYSM10	*Debaryomyces vanrijiae* var. vanrijiae	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/H9, 10
LYSM11	*Debaryomyces nepalensis*	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/I1, 2
LYSM12	*Kluyveromyces hubeiensis*	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/I3, 4
LYSM13	*Williopsis saturnus* var. sargentensis	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/I5, 6
LYSM14	*Kluyveromyces hubeiensis*	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/I7, 8
LYSM15	*Candida akabanensis*	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/I9, 10
LYSM17	*Geotrichum vulgare*	8 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	16/J3, 4
SKK1	*Pichia kudriavzevii*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/I3, 4
SKK2	*Pichia kudriavzevii*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/I5, 6
SKK3	*Kazachstania siamensis*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/I7, 8
SKK4	*Kazachstania aquatica*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/I9, 10
SKK5	*Kazachstania siamensis*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/J1, 2
SKK7	*Pichia occidentalis*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/J5, 6
SKK8	*Kazachstania siamensis*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/J7, 8
SKK9	*Kazachstania siamensis*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	12/J9, 10

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Strain	Species	Date of sample collection	Date of isolation	Storage date	Culture position in -80°C freezer
SKK10	*Kazachstania aquatica*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	13/A1, 2
SKK11	*Tetrapisispora namnaoensis*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	13/A3, 4
SKK12	*Pichia kudriavzevii*	9 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	13/A5, 6
SKK14	*Candida tropicalis*	10 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	13/A9, 10
SKK15	*Geotrichum* sp. CICC1364	10 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	13/B1, 2
SKK16	*Pichia sporocuriosa*	10 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	13/B3, 4
SKK17	*Pichia occidentalis*	10 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	13/B5, 6
SKK20	*Pichia kluyveri*	10 ก.ค. 2550	ก.ค. 2550	ส. ค. 2550	13/C1, 2

สรุปกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลงานจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. นำยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้คือ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. ไปใช้ในการเรียนการสอนของวิชายีสต์และยีสต์เทคโนโลยี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้ง ของยีสต์ที่แยกได้ พบว่ามียีสต์หลายสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสารดังกล่าวได้ ดังนั้นในอนาคต จะนำยีสต์กลุ่มนี้มาศึกษาเพิ่มเติมและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ลงนาม.....รุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร.....
(นางสาวรุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร)
นักศึกษา

ลงนาม.....
(ศ. ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง)
อาจารย์ที่ปรึกษา

วันที่.....28 ธันวาคม 2552.....