ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
ปริญญา

จุลชีววิทยา — **สาขา**

จุลชีววิทยา — **ภาควิชา**

เรื่อง ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์

Diversity of Yeast in Forest Soil in the North Eastern Part of Thailand and Their Ability in Degradation of Organic Compounds

นามผู้วิจัย นางสาวรุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....

(ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ่มทอง, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา ....

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกูล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ .... **เดือน** .... **พ.ศ.** ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์

Diversity of Yeast in Forest Soil in the North Eastern Part of Thailand and Their Ability in Degradation of Organic Compounds

โดย

นางสาวรุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2552

รุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร 2552: ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ่มทอง, D.Eng. 137 หน้า

ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า 2 แห่ง อุทยานแห่งชาติ 9 แห่ง วนอุทยานแห่งชาติ 3 แห่ง และป่าไม้อื่นอีก 8 แห่งใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างรวม 60 ตัวอย่าง นำมาแยกยีสต์ด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวน ได้ยีสต์ 102 สายพันธุ์ เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน 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 พบยีสต์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสทั้งในรูปไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลสและคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส 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

/ /

____________________ ____________________ ____ ____ ____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Rungluk Kaewwichian 2009: Diversity of Yeast in Forest Soil in the North Eastern Part of Thailand and Their Ability in Degradation of Organic Compounds. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Professor Savitree Limtong, D.Eng. 137 pages.

Diversity of yeast in forest soils from 2 wildlife sanctuaries, 9 national parks, 3 forest parks and 8 other forests in the north-eastern part of Thailand was studied. Yeast strains were isolated using enrichment technique and identified on the basis of sequences analysis of the D1/D2 domain of the large subunit rRNA gene and phylogeny. A total of 102 yeast strains were obtained from 60 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 basidiomycetous yeast, *Tricosporon 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 identified as known or new species. Moreover, two strains were identified to be two novel 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 revealed high diversity of yeasts in forest soils from 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 by the isolated yeast strains was investigated. 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.

/ /

________________________ ________________________ ___ ___ ____

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งให้ความช่วยเหลือสนับสนุนการทำวิจัยอย่างดียิ่ง และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทนา สีสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความอนุเคราะห์ดูแลเสมอมา รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ ประธานการสอบ และ ดร. ศศิธร จินดามรกฎ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยที่ให้ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์เป็นระยะเวลา 1 ปี

ขอขอบคุณ ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ เพื่อน และน้อง ๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกคนที่ให้ความอบอุ่นตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา รวมทั้งให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ พ่อและแม่ ที่ช่วยอุดหนุนการศึกษา รวมทั้งให้กำลังใจ และให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา

รุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร

ตุลาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	31
สรุปผล	96
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	98
ภาคผนวก	105
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	106
ภาคผนวก ข ผลงานที่ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร FEMS Yeast Research	120
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	137

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
1	แหล่งเก็บตัวอย่าง และผลการแยกยีสต์จากตัวอย่างดินในป่าไม้ที่ตั้งอยู่ใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	31
2	การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย ยีสต์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ และยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ และป่าไม้อื่นใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในปี พ. ศ. 2550	37
3	ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	47
4	สายพันธุ์ที่เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายและสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	53
5	ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ และป่าไม้อื่นใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	82
6	ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้งของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจากในเขตป่าไม้ที่ตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	91

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่		หน้า
1	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Candidaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	49
2	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	50
3	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae และ *Trichosporon mycotoxinivorans* และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	51
4	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	54
5	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ สปีชีส์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีไทด์ใกล้เคียงที่สุด	55
6	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ LYSM9, RV60^{T}, SC5L04, GE19S05 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	58
7	สัณฐานวิทยาของ *Candida asiaensis* sp. nov. (RV60^{T})	61
8	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ MD9^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	63
9	สัณฐานวิทยาของ *Candida mokdahanensis* sp. nov. (MD9^{T})	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ SR16, UB13, ST84^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	68
11	สัณฐานวิทยาของ *Candida sekii* sp. nov. (ST84^{T})	71
12	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ LYSM5^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	73
13	สัณฐานวิทยาของ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. (LYSM5^{T})	76

ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์

Diversity of Yeast in Forest Soil in the North Eastern Part of Thailand and Their Ability in Degradation of Organic Compounds

คำนำ

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) บนโลกถือเป็นงานหนัก ถึงแม้ว่าจะเป็นเพียงการศึกษาความหลากหลายของสปีชีส์ (species diversity) เท่านั้น โดยเฉพาะการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิดที่เพาะเลี้ยงได้ ทั้งนี้นอกจากจะสามารถศึกษาบทบาทและความสำคัญของจุลินทรีย์เหล่านั้นในแต่ละแหล่งที่อยู่แล้ว ยังสามารถนำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาประยุกต์ใช้เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดแก่มนุษย์อีกด้วย สำหรับการตรวจความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ผ่านมาพบว่า จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารในระบบนิเวศต่าง ๆ ได้แก่ ระบบนิเวศป่าไม้ (forest ecosystem) ระบบนิเวศเกษตร (agricultural ecosystem) และระบบนิเวศประมง (fishery ecosystem) จุลินทรีย์บางชนิดทำลายสารพิษในธรรมชาติ การค้นพบและการศึกษาจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาวะวิกฤต เช่น อุณหภูมิสูง ความเค็มสูง และ pH ต่ำ ช่วยอธิบายว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอยู่ได้อย่างไรในสภาวะดังกล่าว อีกทั้งการรู้องค์ประกอบจุลินทรีย์ในแหล่งต่าง ๆ อาจนำไปสู่การจัดการเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ดีขึ้น อาทิ การปรับปรุงประสิทธิภาพของระบบกำจัดของเสีย (waste treatment system) และยังเป็นแนวทางสำหรับช่วยลดความเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในแหล่งเหล่านั้น นอกจากนี้จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ยังอาจผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม เช่น การผลิตแอลกอฮอล์ การผลิตเอนไซม์ การผลิตสารต่าง ๆ สำหรับการรักษาและดูแลสุขภาพ เป็นต้น

ยีสต์และราเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญอันดับแรกในการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในธรรมชาติ โดยเฉพาะในบริเวณเขตร้อนและกึ่งร้อนที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์มาก จะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์สูง ในขณะเดียวกันการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของสารอินทรีย์ในแหล่งที่อยู่นี้เอง จะมีผลให้เกิดการสูญเสียและเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์รวมทั้ง

ยีสต์ด้วย ดังนั้นจึงควรแยกและรวบรวมยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ ไว้เพื่อที่จะสามารถนำกลับไปยังแหล่งที่อยู่เดิมเมื่อต้องการ

ดินเป็นระบบนิเวศ (Ecological system) ซึ่งมีพลวัต (dynamic) ที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทั้งหลายบนโลก ทั้งนี้เพราะดินเป็นแหล่งที่มาที่สำคัญของธาตุอาหารต่าง ๆ ซึ่งเกิดขึ้นจากการแปรสภาพหรือผุพังของหินและแร่ผสมคลุกเคล้ากับอินทรีย์วัตถุที่มาจากธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่จะเป็นเศษซากพืชนานาชนิดที่ทับถมกันเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะในบริเวณป่าไม้ สารประกอบที่มากที่สุดในพืช คือ เซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสเรียงต่อกันมีโครงสร้างที่แข็งแรงย่อยสลายได้ยาก รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทพอลิเมอร์ของน้ำตาลเฮกโซส เพนโตส และกรดยูโรนิก นอกจากนี้ยังมีโปรตีน แป้ง และน้ำตาล ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกแบคทีเรียและเชื้อราจะสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ออกมาย่อยสลายสารประกอบดังกล่าวให้ได้สารประกอบที่นำไปใช้เป็นแหล่งอาหารได้ง่าย สำหรับยีสต์พบว่ามีบางชนิดที่สามารถย่อยสารประกอบเหล่านี้ได้ เช่น *Trichosporon cutaneum* ที่สามารถย่อยเซลลูโลสและไซแลน (Hrmova *et al.*, 1984), *Cryptococcus albidus* (Bastawde, 1992) และ *Candida mokoenaii* (Mokwena *et al.*, 2000) ที่สามารถย่อยไซแลน และ *Trichosporon wieringae* ที่สามารถย่อยสารประกอบฟีโนลิกบางชนิดและพอลิแซ็กคาไรด์ (Middelhoven, 2004)

จากรายงานยีสต์ที่พบในดินมีทั้งแอสโคมัยซีตัสยีสต์และแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ โดยจำนวนยีสต์ที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศในแต่ละพื้นที่ กล่าวคือ อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์และมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์ในธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อให้รู้ถึงความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าของประเทศไทยและเปรียบเทียบกับรายงานอื่น จึงทำงานวิจัยนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้ในดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ และป่าไม้อื่นในจังหวัดที่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยซึ่งยังมีการศึกษาน้อยมาก โดยการแยกยีสต์และจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy) ด้วยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ large subunit ribosomal RNA (LSU rRNA) gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) และในกรณีที่พบว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่จะทำการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ที่สำคัญตามเกณฑ์ของอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (conventional taxonomy) ซึ่งได้แก่ การศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี และ

อนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomy) พร้อมทั้งเสนอตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถของยีสต์ที่แยกได้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยวิเคราะห์การย่อยเซลลูโลส ไซแลน และแป้ง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยการแยกยีสต์และจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

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

3. ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยการวิเคราะห์การย่อยเซลลูโลส ไซแลน และแป้ง

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของยีสต์

ยีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular form) เป็นส่วนใหญ่ มีรูปร่างหลายแบบ ยีสต์บางชนิดจะมีการสร้างเส้นใยแท้หรือเส้นใยเทียม มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งเซลล์แบบ fission สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) สำหรับยีสต์ในกลุ่มแอสโคมัยซีตัสยีสต์ (ascomycetous yeast) หรือสร้างแบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) สำหรับยีสต์ในกลุ่มแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeast) หรือไม่พบระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยสปอร์แบบมีเพศที่สร้างขึ้นไม่ได้อยู่ในฟรูติงบอดี (fruiting body) ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นคีโมออร์กาโนโทรฟที่แท้จริง (strictly chemoorganotroph) หรือแซโพรโทรฟ (saprotroph) มีความสัมพันธ์กับพืชหรือสัตว์ที่มีชีวิตหรือสารอินทรีย์ที่ได้จากพืชและสัตว์ที่ตายไปแล้ว โดยยีสต์สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย เช่น น้ำตาล พอลิออล (polyol) กรดอินทรีย์ กรดไขมัน ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ และพอลิเมอร์หลายชนิด ยีสต์บางชนิดเป็นเชื้อโรคโดยทำให้เกิดโรคพืชและโรคสัตว์ (Kurtzman and Fell, 1998)

ยีสต์ไม่ได้พบทั่วไปในทุกแห่งของชีวภาค (biosphere) โดยธรรมชาติแล้วยีสต์แต่ละชนิดหรือแต่ละกลุ่มจะมีแหล่งที่อยู่ (habitat) ที่แน่นอน เป็นสถานที่แท้จริงที่กลุ่มยีสต์นั้นดำรงชีวิตอยู่โดยไม่ได้ปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่น สำหรับการปรากฏของยีสต์แต่ละชนิดในแหล่งที่อยู่นั้นขึ้นอยู่กับลักษณะสรีรวิทยาของยีสต์ ได้แก่ ความสามารถในการใช้สารประกอบบางชนิดและความสามารถในการเจริญในสภาวะแวดล้อมนั้น ๆ โดยมีสารประกอบอินทรีย์ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและสารอาหารต่าง ๆ และสภาวะแวดล้อมของแหล่งที่อยู่เหล่านั้นจะร่วมกันกำหนดชนิดของยีสต์ที่พบ และเนื่องจากยีสต์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้นการแพร่กระจายของยีสต์ในธรรมชาติอาจเกิดโดยละอองลอยในอากาศ มีสัตว์เป็นพาหะ และแพร่กระจายโดยมนุษย์ (Lachance and Starmer, 1998)

ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จำพวก เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ ผลิตภัณฑ์จากการหมัก เช่น เอทานอล และกลีเซอรอล ผลิตภัณฑ์ในรูปของเซลล์ยีสต์ เช่น ยีสต์ขนมปัง ยีสต์อาหารคน และยีสต์อาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์ที่แยกได้จากเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามิน (B และ D) เอนไซม์ (invertase, lactase, lipase) ATP

NAD^+ และ RNA นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่มีการผลิตโดยยีสต์และสามารถนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เช่น น้ำนมที่ปราศจากแลคโตส (lactose-free milk) สารให้ความหวาน เช่น อะราบิทอล (arabitol) อิริทริทอล (erythritol) และไซลิทอล (xylitol) สารให้สี เช่น แอสต้าแซนทิน (astaxanthin) และ แอลฟา-คาโรทีนอยด์ (α-carotenoid) พอลิแซ็กคาไรด์พวกฟอสโฟแมนแนน (phosphomannan) และพูลลูแลน (pullulan) กรดอะมิโนแอล-ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine) และสารให้กลิ่นรส นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนดีเอ็นเอเพื่อการผลิตโปรตีนที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภท (สาวิตรี, 2549; Demain *et al*., 1998)

ความหลากหลายของยีสต์

1. ความหลากหลายทางชีวภาพ

ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) หมายถึง การที่มีสิ่งมีชีวิตมากมายหลากหลายสายพันธุ์และหลายชนิดรวมอยู่ในบริเวณหนึ่งบริเวณใด มีองค์ประกอบอยู่ 3 อย่าง คือ ความหลากหลายในเรื่องชนิด (species diversity) หมายถึง ความหลากหลายชนิดของสิ่งมีชีวิต (species) ที่มีอยู่ในพื้นที่หนึ่ง มีความหมาย 2 แง่ คือ ความมากชนิด (species richness) กับความสม่ำเสมอของชนิด (species evenness) ความมากชนิด คือ จำนวนชนิดของสิ่งมีชีวิตต่อหน่วยเนื้อที่ส่วนความสม่ำเสมอของชนิด หมายถึง สัดส่วนของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีอยู่ ส่วนความหลากหลายของพันธุกรรม (genetic diversity) หมายถึง ความหลากหลายของยีนที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมียีนแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ และความหลากหลายของระบบนิเวศ (ecosystem diversity) มี 3 ประเด็น คือ (1) ความหลากหลายของถิ่นตามธรรมชาติ โดยแต่ละถิ่นกำเนิดก็มีสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่แตกต่างกันไป โดยทั่วไปแล้วที่ใดมีถิ่นกำเนิดตามธรรมชาติหลากหลาย ที่นั่นจะมีชนิดสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายอาศัยอยู่ตามไปด้วย (2) ความหลากหลายของการทดแทน เช่น เกิดภัยธรรมชาติแล้วทำให้บริเวณนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น แต่เหมาะสมต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่เคยเจริญบริเวณนี้มาก่อน (3) ความหลากหลายของภูมิประเทศ ในท้องที่บางแห่งมีแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติที่หลากหลาย เช่น ลำน้ำ บึง หาดทราย หุบเขา ภูเขา ลานหิน ทำให้มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดด้วย (กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, ม.ป.ป.)

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพบนโลกถือเป็นงานหนัก ถึงแม้ว่าการสำรวจจะหยุดอยู่เพียงความหลากหลายของสปีชีส์ (species diversity) โดยเฉพาะจุลินทรีย์ และนอกจากนี้ยังต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในด้านอนุกรมวิธาน ซึ่งเชื่อกันว่านักอนุกรมวิธาน 1 คน สามารถศึกษาเพื่อจัดจำแนก (identify) และจำแนกประเภท (classify) ได้เพียง 200-300 สปีชีส์ ในช่วงชีวิตเมื่อรวมกับปัญหาอื่น ๆ และเชื่อกันว่าอาจจะต้องใช้เวลาเป็นศตวรรษที่จะสามารถสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ แต่จากการสูญเสียถิ่นอาศัยของสิ่งมีชีวิต ที่เกิดอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการประเมินกันว่าในกลางศตวรรษหน้าสิ่งมีชีวิตที่อยู่บนบกจะสูญเสียไปถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของสปีชีส์ที่มีอยู่ ดังนั้นจึงควรที่จะสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพให้รวดเร็วขึ้น (Tinker, 1996)

โดยธรรมชาติแหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์มีขอบเขตค่อนข้างจำกัด จำนวนของยีสต์ในบริเวณหนึ่ง ๆ ขึ้นกับสารอาหารและความสามารถในการดูดซึมสารอาหารเป็นสำคัญ ยีสต์ในแหล่งน้ำก็เช่นกัน ธาตุอาหารส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดในแหล่งน้ำได้จากแหล่งภายนอก เช่น พืช และสัตว์ รวมทั้งมนุษย์ โดยเฉพาะสิ่งที่มนุษย์สร้างขึ้นนั้นจัดว่าเป็นแหล่งสารอาหารที่ใหญ่ที่สุดของยีสต์ ซึ่งส่งผลให้เกิดมลภาวะตามมา บทบาทของยีสต์ในระบบนิเวศที่สำคัญคือ การเป็นผู้ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และมีส่วนช่วยในการหมุนเวียนของสารอาหารและแร่ธาตุในสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ยีสต์ยังเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและแพลงค์ตอนสัตว์ในทะเลอีกด้วย (Spencer and Spencer, 1997)

2. ความหลากหลายของยีสต์ในดิน

การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ทำให้ดินมีธาตุอาหารที่อุดมสมบูรณ์และประกอบกับการมีอากาศ และ น้ำ จึงเอื้ออำนวยต่อการดำรงชีวิตและเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด โดยเฉพาะจุลินทรีย์ซึ่งมีทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท เชื้อรา และ ยีสต์ สำหรับยีสต์ที่มีรายงานว่าพบในดิน เช่น จากการสำรวจยีสต์ในดินแอนตาร์กติกพบ *Cryptococcus albidus, Aureobasidium pullulans, Rhodotorula minuta, Sporobolomyces salmonicolor*, *Candida scottii* และ สกุล *Lecosporidium* (Atlas *et al*.,1978) นอกจากนี้ยังพบยีสต์สกุล *Saccharomyces, Torulaspora* และ *Kluyveromyces* ในดินที่อัฟริกาใต้ ส่วน *Williopsis* sp. พบกระจายอยู่ทั่วไปในดินอเมริกาเหนือ อัฟริกา นิวซีแลนด์ และสหภาพโซเวียตรัสเซีย ในขณะที่ *Candida humicola* พบในดินนิวซีแลนด์ *C. hydrocarbofumarica, C. ishiwadae, C. terebra* และ *Pichia methanolica* พบในดินประเทศญี่ปุ่น สำหรับ *Debaryomyces nepalensis* พบในดินประเทศเนปาล และ *Torulopsis*

pampelonsis ในดินป่าประเทศสเปน (Phaff and Starmer, 1987) *Cryptococcus nodaensis* พบในดินประเทศญี่ปุ่น (Sato *et al*., 1999), *Candida mokoenaii* พบในดินอัฟริกาใต้ (Mokwena *et al*., 2000), *Trichosporon porosum* comb พบในดินประเทศเนเธอร์แลนด์ (Middelhoven *et al*., 2001)

สำหรับการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินและแหล่งที่อยู่อาศัยธรรมชาติต่าง ๆ ในประเทศไทยมีอยู่ไม่มากนักที่มีรายงาน เช่น สาวิตรี และคณะ (2541) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง พบยีสต์สกุล *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Pichia* และ *Saccharomyces* ยีสต์จากดินในป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าสนเขาในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว พบว่าจัดจำแนกเป็น *Candida albicans, C. diversa, C. fermentati, C. glabrata, C. parapsilosis, C. quercifrusa, C. tropicalis, C. maltosa, Debaryomyces hensenii* var fabryi*, D. nepalensis, D. vanrijiae* var yarrowii*, D. polymorphus, Hanseniaspora uvarum, Kazachstania telluris, Kloeckera lindneri, Kluyveromyces lactis, Kodamae ohmeri, Pichia galeiformis, P. pini, P. kluyveri, P. spartinae, P. capsulate, P. terricola, P. siamensis, Saccharomyces cevevisiae, S. crataegensis, Saccharomycopsis crataegensis, Torulaspora pretoriensis, Williopsis saturnus* และ *Zygosaccharomyces fermentati* (Sumpradit, 2005) อีกทั้งยังพบว่ามีหลายสายพันธุ์เป็นสปีชีส์ใหม่ โดยได้ตั้งชื่อและรายงาน 1 สปีชีส์ คือ *Tetrapisispora namnaonensis* ซึ่งเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ (Sumpradit *et al*., 2005) นอกจากนั้น Limtong *et al.* (2007) รายงานแอสโคมัยซีตัสยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Kazachstania siamensis* ที่แยกได้จากดินจากป่าในเขตอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา

จากรายงานยีสต์ที่พบในดินมีทั้งที่เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์และแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ โดยจำนวนยีสต์ที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศในแต่ละพื้นที่ กล่าวคือ อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์และมีความสัมพันธ์กับแหล่งอาศัยของยีสต์ในธรรมชาติ เช่น ยีสต์ในดินจากเขตอุทยานแห่งชาติ Donauauen ประเทศออสเตรียซึ่งเป็นประเทศในเขตหนาว จัดจำแนกได้เป็น 16 สกุล โดยเป็นแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ทั้งหมด และส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Cryptococcus* (Wuczkowski and Prillinger, 2004) สำหรับดินในบริเวณตอนใต้วิคตอเรียแลนด์ ทวีปแอนตาร์กติกา พบว่าเป็นแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 89 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ทั้งหมด โดยเป็นสกุล *Cryptococcus* 33 เปอร์เซ็นต์ และสกุล *Leucosporidium* 22 เปอร์เซ็นต์ (Connell *et al*., 2008) แต่สำหรับประเทศที่มีอากาศร้อน เช่นประเทศไทยนั้นมีรายงานการจัดจำแนกยีสต์จากดินในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งจำนวน

ทั้งสิ้น 255 ไอโซเลท จัดเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 173 ไอโซเลท ส่วนอีก 82 ไอโซเลท เป็นแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ (สาวิตรี และคณะ, 2541) ในขณะที่พบว่ายีสต์ทั้งหมดที่แยกจากดินในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ทั้งหมด (Sumpradit, 2005)

การจัดจำแนกยีสต์

อนุกรมวิธาน (taxonomy) ประกอบด้วย การจำแนกประเภท (classification) การจัดจำแนก (identification) และการตั้งชื่อ (nomenclature) สำหรับการจัดจำแนกยีสต์เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1838 โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) สรีรวิทยา (physiology) และคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemistry) ในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลา ความถูกต้องแม่นยำ และความน่าเชื่อถือของผลที่ได้จากการทดสอบ บางครั้งที่การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของลักษณะที่คล้ายคลึงกันได้ ทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (closely related species) ดังนั้นเทคนิคระดับโมเลกุลจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์มากขึ้น ประกอบกับปัจจุบันมีเทคนิคที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยปฏิกิริยาลูกโซ่หรือ Polymerase Chain Reaction (PCR) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) มาจัดจำแนกชนิดของยีสต์ ทั้งนี้เนื่องจากใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าวิธีการจัดจำแนกแบบดั้งเดิม ให้ผลถูกต้องแม่นยำ ปัจจุบันนิยมทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ที่มีขนาด 500-600 นิวคลีโอไทด์ และอยู่ที่ปลายด้าน 5′ ของ LSU rRNA gene เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็ว จึงเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันมาก และความแตกต่างในบริเวณนี้เพียงพอที่จะจัดจำแนกชนิดของยีสต์ในระดับสปีชีส์ได้ (Kurtzman and Robnett, 1998)

สำหรับหนังสือที่นิยมใช้เป็นคู่มือในการจัดจำแนกยีสต์ในปัจจุบัน คือ The Yeasts, A Taxonomic Study ซึ่งพิมพ์ครั้งที่ 4 ในปี ค.ศ. 1998 โดย C.P. Kurtzman และ J.W. Fell เป็นบรรณาธิการนั้น ได้แบ่งยีสต์ออกเป็น 2 ไฟลัม คือ Phylum Ascomycota โดยยีสต์ในกลุ่มนี้เรียกว่าแอสโคมัยซีตัสยีสต์ แบ่งออกเป็น แอสโคมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorphic ascomycetous yeasts) และแอสโคมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphic ascomycetous yeasts) และ Phylum Basidiomycota เรียกยีสต์ในกลุ่มนี้ว่า

แบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ แบ่งออกเป็นแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorphic basidiomycetous yeasts) และแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphic basidiomycetous yeasts) โดยมียีสต์ใน 2 ไฟลัมรวม 94 สกุล และ 689 สปีชีส์ และนอกจากนี้ยังกำหนดลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกยีสต์ดังนี้

1. การจำแนกยีสต์โดยลักษณะแบบดั้งเดิม (Conventional characteristic)

ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกประเภทของยีสต์ ซึ่งรวบรวมโดย Kurtzman and Fell (1998) ประกอบด้วย

1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

เป็นการศึกษาสัณฐานวิทยาของยีสต์ทั้งที่อยู่ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยทั่วไปการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกประเภทได้ในระดับสกุลหรือสูงกว่าสกุล ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนก เช่น ลักษณะรูปร่างของเซลล์ การเจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม การสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศภายในเซลล์ (asexual endospore) การสร้างคลามัยโดสปอร์(chlamydospore) การสร้างบอลลิสโตสปอร์ (ballistospore) การสร้างแอสโคสปอร์ การสร้างแบสิดิโอสปอร์ และการตรวจหาเมติงไทป์ (mating type)

1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีมีความสำคัญในการจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์และสกุล แต่การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีนั้นไม่มีวิธีการทดสอบที่เป็นมาตรฐาน ผลการทดสอบที่ได้จึงมักขึ้นอยู่กับเทคนิคและวิธีที่เลือกนำมาทดสอบ (Yarrow, 1998) ลักษณะทั่วไปที่นิยมใช้ในการจัดจำแนก ได้แก่ การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต การใช้สารประกอบคาร์บอน การใช้สารประกอบไนโตรเจน การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน การเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์และ 60 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิอื่น ๆ

การสร้างกรดจากการใช้กลูโคส การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) หรือแป้งภายนอกเซลล์ การไฮโดรไลซ์ยูเรีย การทนต่อไซโคลเฮกซิไมด์ (cycloheximide) การทดสอบปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (diazonium blue b)

2. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมี

อนุกรมวิธานเคมี คือ การประเมินองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งมีชีวิต ทั้งสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) รวมถึงกิจกรรมทางเคมี หรือสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ ได้แก่ ชนิดของโคเอนไซม์คิว (coenzyme Q) การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ผนังเซลล์ และแคปซูล การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน และการเปรียบเทียบเอนไซม์และโปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟรีซีส ปกติการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมีจะใช้ร่วมกับการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (Yamada, 1998)

3. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

การศึกษาระดับโมเลกุลเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยให้การจัดจำแนกยีสต์เป็นไปอย่างถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมีนั้นเป็นการตรวจลักษณะทางฟีโนไทป์ของยีสต์ การแสดงออกหรือผลที่ได้จากการทดสอบจึงอาจมีการเปลี่ยนแปลงไม่คงที่ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ และสภาพแวดล้อมในการบ่ม ซึ่งมีผลทำให้การจัดจำแนกผิดพลาด อีกทั้งยังต้องใช้แรงงานและเวลาในการทดสอบมากอีกด้วย ปัจจุบันจึงมีการนำอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลซึ่งให้ผลที่แม่นยำกว่า เนื่องจากเป็นการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์โดยตรง เข้ามาช่วยในการจัดจำแนก นอกจากนี้อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอ ยังสามารถสะท้อนถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้อย่างชัดเจน ซึ่งวิธีการจัดจำแนกด้วยวิธีดั้งเดิมไม่สามารถทำได้ การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลประกอบด้วย การศึกษาในระดับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และการศึกษาดีเอ็นเอในนิวเคลียส ได้แก่ การทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) การหาปริมาณกัวนีนและไซโทซีน (G+C contents) การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger printing) ด้วยเทคนิคต่าง ๆ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ในกรดนิวคลีอิก (สาวิตรี, 2549)

ในบรรดาวิธีการต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว ในปัจจุบันกล่าวได้ว่า การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือและได้รับความนิยมมากที่สุด การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอบนหลักการพื้นฐานที่ว่า จีโนมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดประกอบด้วยบริเวณที่มีอัตราการวิวัฒนาการแตกต่างกันหลายบริเวณ และความแตกต่างนี้เองที่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นการเลือกบริเวณที่จะใช้ในการศึกษาระดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจึงมีความสำคัญมาก บริเวณที่นิยมใช้ในการศึกษาได้แก่ อาร์เอ็นเอของไรโบโซมหรือดีเอ็นเอของไรโบโซม (ribosomal RNA/ ribosomal DNA หรือ rRNA/rDNA) ทั้งในหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (Large subunit, LSU) และหน่วยย่อยขนาดเล็ก (Small subunit, SSU) และดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย (Valente *et al.*, 1999)

สำหรับการศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์นั้น นิยมศึกษาอาร์เอ็นเอของไรโบโซมหรือดีเอ็นเอของไรโบโซม โดยให้ความสำคัญกับทั้งบริเวณที่มีการแสดงออก (coding region) และบริเวณที่ไม่มีการแสดงออก (non coding region) บริเวณที่มีการแสดงออกที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene (ความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์) และ 18S rDNA (ความยาวประมาณ 1700 นิวคลีโอไทด์) ส่วนบริเวณที่ไม่มีการแสดงออกที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกอีกบริเวณหนึ่งคือ internal transcribed spacer (ITS) ทั้ง ITS1 และ ITS2 (ยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์) (Scorzetii *et al.*, 2002) จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน D1/D2 ที่มีขนาด 600 นิวคลีโอไทด์อยู่ที่ปลายด้าน 5′ ของ LSU rRNA gene ใน *S. cerevisiae* คือนิวคลีโอไทด์ที่ 63-642 บน rRNA gene เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็วจึงเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างมากในบรรดาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LSU rRNA gene ความแตกต่างในบริเวณนี้เพียงพอที่จะแบ่งแยกสปีชีส์ของยีสต์ได้ Kurtzman and Robnett (1998) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ที่สร้างแอสโคสปอร์ 500 สปีชีส์ รวมทั้ง *Candida* และสกุลที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยนำโดเมน D1/D2 มาเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ NL1 (5-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) และ NL4 (5-GGTCCGTGTTTCAAGA CGG-3) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์แล้วหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 สาย ของ rDNA โดย ABI Tag Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit แต่ละตัวอย่างทำปฏิกิริยาหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ 4 ปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด คือ NL1, NL4, NL2A (5-CTTGTTGCCTATCGGTCTC-3) และ NL3A (5-GAGACCGATAGCGAACAAG-3) จากผลการวิเคราะห์แสดงว่าสายพันธุ์ในสปีชีส์ส่วนใหญ่มีการผันแปร 0-2 นิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตามมีสายพันธุ์ของ 3 สปีชีส์ ที่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์ ส่วนสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *Metschnikowia agaves* แตกต่างกันถึง 5

นิวคลีโอไทด์ สำหรับ *Williopsis califonica* ที่ตรวจสอบ 17 สายพันธุ์มีความแตกต่าง 0 - 6 นิวคลีโอไทด์ แต่ 3 สายพันธุ์ ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 5-6 นิวคลีโอไทด์นั้นเป็นการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ที่ติดกัน (base contiguous deletion) มากกว่าการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (base substitution) การผันแปรที่เห็นได้จากการเปรียบเทียบข้างต้นใช้ทำนายว่าถ้าสายพันธุ์ที่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ใน 600 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 คือ มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 6 นิวคลีโอไทด์ สายพันธุ์นั้นจะถูกจัดเป็นคนละสปีชีส์ และสายพันธุ์ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0 - 3 นิวคลีโอไทด์จัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก (sister species)

จนถึงปัจจุบันมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene ของยีสต์หลายร้อยสปีชีส์และมีการรวบรวมข้อมูลเหล่านี้ไว้ในคลังข้อมูล ที่ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) หรือ EMBL (http://www.emblheidelberg.de) หรือ DDBJ (http://www.ddbj.nig.ac.jp)

บทบาทของยีสต์ในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน

ดินเป็นระบบนิเวศ (ecological system) ซึ่งมีพลวัต (dynamic) ที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทั้งหลายบนโลก ทั้งนี้เพราะดินเป็นแหล่งที่มาที่สำคัญของธาตุอาหารต่าง ๆ ซึ่งเกิดขึ้นจากการแปรสภาพหรือผุพังของหินและแร่ผสมคลุกเคล้ากับอินทรีย์วัตถุที่มาจากธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่จะเป็นเศษซากพืชนานาชนิดที่ทับถมกันเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะในบริเวณป่าไม้ ซึ่งสารประกอบที่มากที่สุดในพืช คือ เซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเรียงต่อกันอย่างแน่นหนาในรูปผลึก (crystalline form) ทำให้ย่อยสลายได้ยาก รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส เป็นสารประกอบประเภทพอลิเมอร์ของน้ำตาลเฮกโซส เพนโตส และ กรดยูโรนิก ตามโครงสร้างแล้วเฮมิเซลลูโลสย่อยสลายได้ง่าย แต่ในธรรมชาติเฮมิเซลลูโลสมักเกาะเป็นโครงสร้างซับซ้อนกับสารอื่น เช่น เซลลูโลส หรือลิกนิน ทำให้ย่อยสลายได้ยากขึ้น สำหรับลิกนิกมีอยู่ในพืชประมาณ 10–30 เปอร์เซ็นต์ มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อน โดยมีสารประกอบประเภทวงแหวนอะโรมาติกเป็นแกนหลักของโมเลกุล ทำให้ย่อยสลายได้ยากมาก นอกจากนี้สารอินทรีย์ที่พบในพืชยังมีโปรตีน แป้ง และ น้ำตาล ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกแบคทีเรียและเชื้อราจะมีการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ออกมาย่อยสลายสารประกอบดังกล่าวให้ได้สารประกอบที่ย่อยง่ายนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญ (ยงยุทธ และคณะ, 2541)

สำหรับยีสต์พบว่ามียีสต์บางชนิดที่สามารถย่อยสารประกอบประเภทเซลลูโลส ไซแลน และแป้งได้เช่นกัน ซึ่งมีรายงานการศึกษาเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส และไซแลนที่ผลิตจาก *Trichosporon cutaneum* (Hrmova *et al.*, 1984) Bastawde (1992) ศึกษาโครงสร้างของไซแลน บทบาทของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์รวมทั้ง *Cryptococcus albidus* และ รูปแบบการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายไซแลน Mokwena *et al.* (2000) คัดแยกและจัดจำแนกยีสต์จากดินในแอฟริกาใต้พบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida mokoenaii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท Middelhoven (2004) พบ *Trichosporon wieringae* สามารถแอสซิมิเลต สารประกอบฟีโนลิกบางชนิด พอลิแซ็กคาไรด์ และสารประกอบคาร์บอนอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

อุทยานแห่งชาติและป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ในระยะแรกของการจัดตั้งอุทยานแห่งชาติ มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันแหล่งธรรมชาติที่สวยงามเท่านั้น ต่อมาคำว่า “อุทยานแห่งชาติ” ได้ถูกหลายประเทศนำไปใช้เรียกพื้นที่ในสถานภาพและวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันมากขึ้นทุกที ดังนั้นสหภาพสากลว่าด้วยการอนุรักษ์ธรรมชาติของโลก (The World Conservation Union หรือ IUCN) ได้ให้คำจำกัดความของคำว่า “อุทยานแห่งชาติ” ซึ่งเป็นพื้นที่คุ้มครองประเภทที่ 2 ตามการแบ่งประเภทของ IUCN คือ “พื้นที่ธรรมชาติทางบกและ/หรือทางทะเล ที่จัดตั้งขึ้นเพื่อคุ้มครองรักษาระบบนิเวศที่ปรากฏในพื้นที่เพื่อประชาชนรุ่นปัจจุบันและอนาคต เพื่อไม่ให้มีการใช้ประโยชน์หรืออนุญาตเข้าครอบครองที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อระบบนิเวศและเพื่อเปิดโอกาสให้มีการใช้ประโยชน์ด้านวิจัย ศึกษาหาความรู้และนันทนาการที่สอดคล้องกับสภาพวัฒนธรรมท้องถิ่น” ส่วนประเทศไทยได้ประกาศพระราชบัญญัติอุทยานแห่งชาติ พ.ศ. 2504 ระบุว่า อุทยานแห่งชาติ หมายถึง “ที่ดินซึ่งรวมความทั้งพื้นที่ดินทั่วไป ภูเขา ห้วย หนอง คลอง บึง ลำน้ำ ทะเลสาบ เกาะ และที่ชายทะเล ที่ได้รับการกำหนดให้เป็นอุทยานแห่งชาติ ต้องมีลักษณะเป็นบริเวณที่มีสภาพธรรมชาติเป็นที่น่าสนใจและต้องการให้คงอยู่ในสภาพธรรมชาติเดิม เพื่อสงวนไว้ให้เป็นประโยชน์แก่การศึกษาและรื่นรมย์ของประชาชน และมิได้อยู่ในกรรมสิทธิ์หรือครอบครองโดยชอบด้วยกฎหมายของบุคคลใดซึ่งมิใช่ทบวงการเมือง” (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2549)

สำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนั้น มีลักษณะภูมิประเทศ คือ ทั้งภาคยกตัวสูงเป็นขอบแยกตัวออกจากภาคกลางอย่างชัดเจน ประกอบด้วยเทือกเขาสูงทางทิศตะวันตกและ

ทิศใต้ เทือกเขาทิศตะวันตกมีความสูงเฉลี่ย 500-1,000 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล ป่าไม้ที่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนี้ส่วนใหญ่เป็นป่าเต็งรัง คือ ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ของป่าชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในภาคนี้ทั้งหมด วัตถุต้นกำเนิดดินเป็นหินทราย หินดินดาน และหินปูน มีเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทรายในดินบน และดินร่วนเหนียวในดินล่าง รองลงมาจะเป็นป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้ง ดินมักจะเป็นดินปนทรายและดินลูกรัง ส่วนลักษณะภูมิอากาศจะแบ่งออกเป็น 3 ฤดู คือ ฤดูฝนอยู่ในเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม ฤดูหนาวอยู่ในเดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม และฤดูร้อนอยู่ในเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน (กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, ม.ป.ป.)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พื้นที่ศึกษา

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า (2 แห่ง) อุทยานแห่งชาติ (9 แห่ง) วนอุทยานแห่งชาติ (3 แห่ง) และป่าไม้อื่น (8 แห่ง) รวม 22 แห่งในจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดศรีสะเกษ จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดเลย และจังหวัดสกลนคร

2. การเก็บตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ และป่าไม้อื่นที่ตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในเดือนพฤษภาคมและเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550 โดยการใช้พลั่วขนาดเล็กขุดหน้าดินออกไปประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วตักดินใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิท หลังจากนั้นก็นำมาแยกยีสต์ในขั้นตอนต่อไป

3. การแยกยีสต์

สำหรับการแยกยีสต์ใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวน (enrichment technique) โดยนำตัวอย่างดินมาประมาณ 1 กรัม เลี้ยงใน yeast extract malt extract (YM) broth ที่เติมโซเดียมโพรพิโอเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ และสารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอช 3.7-3.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์แมล ปริมาตร 40 มิลลิลิตรในเออร์เลนเมเยอร์ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้มาสตรีก (streak) ลงบนอาหาร YM agar ปรับพีเอช 3.7-3.8 ที่เติมโซเดียมโพรพิโอเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ และสารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องจนปรากฏโคโลนี เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่เป็นยีสต์ และมีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา เช่น สี ขนาด ความมันวาวที่ผิวหน้าโคโลนี ขอบโคโลนี เป็นต้น แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการสตรีกลงบนอาหาร YM agar จากนั้นจึงเก็บลง YM broth ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง –70 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lachance *et al.* (1999) โดยนำยีสต์ที่เพาะบนอาหาร YM agar อายุ 24-48 ชั่วโมง มาเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยในน้ำรีเวอร์ส ออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 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

4.2 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

4.3 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)

4.4 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)

4.5 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)

5. การศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี

นำยีสต์ที่พบว่าเป็นสปีชีส์ใหม่เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาศึกษาลักษณะต่างๆ ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมี ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

5.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

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

5.1.1 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)

5.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

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

5.1.3 การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ตรวจสอบโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar หรือ potato dextrose agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) โดยนำสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อจุ่มลงไปในอาหารแข็งที่หลอมเหลวในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำสไลด์ที่อาหารแข็งตัวแล้วไปวางบนแท่งแก้วรูปตัวยูในจานเพาะเชื้อ เพาะเชื้อบางๆ โดยการสตรีกบนอาหารแข็ง 1-2 เส้น ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่วางสไลด์เพื่อให้ความชื้นป้องกันวุ้นบนสไลด์แห้ง บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 3 วัน

5.1.4 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

5.2 ลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์และใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ ดังนี้

5.2.1 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนเป็นการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญแบบใช้ออกซิเจน เป็นการทดสอบที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ การแอสซิมิเลตสารประกอบบางชนิด เช่น กรดดี-กลูโคโรนิก ดี-ไซโลส และอินออซิทอลสามารถใช้เพื่อแยกสกุลของยีสต์ได้ การทดสอบการแอสซิมิเลต

สารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลวทำตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยใช้สารประกอบคาร์บอนจำนวน 40 ชนิด ดังนี้

เฮกโซส	ดี-กลูโคส กาแลกโทส และซอร์โบส
ไดแซกคาไรด์	เซลโลไบโอส แลกโทส มอลโทส เมลลิไบโอส ซูโครส และทรีฮาโลส
ไตรแซกคาไรด์	เมลลิซิโทส และราฟฟิโนส
พอลิแซกคาไรด์	อินูลิน และแป้ง
เพนโทส	ดี-อะราบิโนส แอล-อะราบิโนส ดี-ไรโบส แอล-แรมโนส และดี-ไซโลส
แอลกอฮอล์	กาแลกทิทอล อิริทริทอล ดี-กลูซิทอล อินออซิทอล ดี-แมนนิทอล กลีเซอรอล ไรบิทอล เอทานอล และเมทานอล
กรดอินทรีย์	กรดซิตริก กรดแลคติก กรดซักซินิก กรดดี-กลูโคโรนิก กรดกาแลกตุโรนิก และกรดดี-กลูโคนิก
ไกลโคไซด์	แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์ และซาลิซิน
สารประกอบอื่น	เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน 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 +++ คือการเจริญของเชื้อที่มีความขุ่นซึ่งจะลบเส้นสีดำอย่างสมบูรณ์, ++ 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

5.2.2 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 ความขุ่นของยีสต์ที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นแต่เห็นขอบไม่ชัด (ซึ่งเท่ากับ + เมื่ออ่านผลการเจริญ) เพาะยีสต์โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดต่าง ๆจำนวน 1 หยด บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลการหมักโดยสังเกตปริมาณแก๊สที่สะสมในหลอดดักแก๊ส และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทุกวันจนครบ 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

5.2.3 การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนศึกษาบนอาหารแข็งโดยใช้ starved inoculum ตามวิธีของ Nakase and Suzuki (1986) ยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่ง

ไนโตรเจนได้ 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

5.2.4 การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) ภายนอกเซลล์

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

5.2.5 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

5.2.6 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 วันโดยดูการเกิดโซนใสบริเวณรอบ ๆ เชื้อ

5.2.7 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

5.2.8 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

5.2.9 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 วันโดยดูการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับการตรวจผลการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

5.2.10 การไฮโดรไลซ์ยูเรีย

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

5.2.11 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

5.3 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 ไพโรแกลลอล 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 ตรวจสอบแถบของยูบิควิโนนภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 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

6. การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ไซแลน และแป้ง

6.1 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

6.2 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

6.3 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. การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า (2 แห่ง) อุทยานแห่งชาติ (9 แห่ง) วนอุทยานแห่งชาติ (3 แห่ง) และป่าไม้อื่น (8 แห่ง) รวม 22 แห่ง ในจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสุรินทร์ (3 แห่ง) จังหวัดศรีสะเกษ (1 แห่ง) จังหวัดอุบลราชธานี (3 แห่ง) จังหวัดมุกดาหาร (4 แห่ง) จังหวัดร้อยเอ็ด (2 แห่ง) จังหวัดชัยภูมิ (2 แห่ง) จังหวัดเลย (4 แห่ง) และจังหวัดสกลนคร (3 แห่ง) ได้ตัวอย่างรวม 60 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างมาแยกยีสต์โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนและอาศัยความแตกต่างของโคโลนี พบว่าจากตัวอย่างดินทั้งหมด 60 ตัวอย่าง แยกได้ยีสต์ 102 สายพันธุ์ ดังนี้ จังหวัดสุรินทร์ 5 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 10 สายพันธุ์ จังหวัดศรีสะเกษ 4 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 7 สายพันธุ์ จังหวัดอุบลราชธานี 5 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 8 สายพันธุ์ จังหวัดมุกดาหาร 5 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 7 สายพันธุ์ จังหวัดร้อยเอ็ด 3 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 4 สายพันธุ์ จังหวัดชัยภูมิ 4 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 8 สายพันธุ์ จังหวัดเลย 20 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 42 สายพันธุ์ และจังหวัดสกลนคร 14 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 16 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แหล่งเก็บตัวอย่าง และผลการแยกยีสต์จากตัวอย่างดินในป่าไม้ที่ตั้งอยู่ใน 8 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

การเก็บตัวอย่าง			พิกัด		
สถานที่	วัน เดือน ปี	จุด	เส้นรุ้ง (เหนือ)	เส้นแวง (ตะวันออก)	รหัสยีสต์ที่แยกได้
จ.สุรินทร์					
วนอุทยานพนมสวาย อ.ปราสาท	2 พ.ค. 2550	1	14°46' 38.9"	103°21' 47.0"	SR1
		2	14°45' 38.9"	103°21' 42.6"	SR3
		3	14°45' 46.8"	103°22' 10.5"	SR7, SR9
เขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่า ห้วยทับทัน อ.กาบเชิง	2 พ.ค. 2550	1	14°27' 02.8"	103°42' 00.8"	SR16, SR18, SR19, SR20
ป่าละเมาะ บ้านสะเดาพัฒนา อ. บัวเชด	2 พ.ค. 2550	1	14°28' 49.6"	103°49' 29.2"	SR22, SR23
					รวม 10 สายพันธุ์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

การเก็บตัวอย่าง			พิกัด		
สถานที่	วัน เดือน ปี	จุด	เส้นรุ้ง (เหนือ)	เส้นแวง (ตะวันออก)	รหัสยีสต์ที่แยกได้
จ.ศรีสะเกษ					
อุทยานแห่งชาติปราสาท	2 พ.ค. 2550	1	14°24' 02.3"	104°41' 02.6"	SSK1,SSK2
เขาพระวิหาร อ.กันทรลักษ์		2	14°25' 23.1"	104°41' 28.6"	SSK7
		3	14°25' 56.6"	104°42' 21.2"	SSK8,SSK9
		4	14°26' 32.4"	104°43' 53.9"	SSK11, SSK13
					รวม 7 สายพันธุ์
จ.อุบลราชธานี					
เขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืช	3 พ.ค. 2550	1	15°12' 25.4"	105°25' 22.8"	UB2
อ.สิรินธร		2	15°12' 32.4"	105°26' 31.0"	UB5, UB6
อุทยานแห่งชาติแก่งตะนะ	3 พ.ค. 2550	1	15°17' 58.5"	105°28' 37.1"	UB9
อ.โขงเจียม		2	15°16' 32.3"	105°28' 58.6"	UB13,UB14
อุทยานแห่งชาติผาแต้ม	3 พ.ค. 2550	1	15°23' 50.3"	105°30' 29.9"	UB19, UB20
อ.โขงเจียม					รวม 8 สายพันธุ์
จ.มุกดาหาร					
วนอุทยานภูหมู	3 พ.ค. 2550	1	16°19' 44.9"	104°32' 39.7"	MD1
อ.นิคมคำสร้อย		2	16°18' 36.3"	104°31' 31.2"	MD3, MD4
อุทยานแห่งชาติภูผาเทิบ	4 พ.ค. 2550	1	16°26' 05.1"	104°48' 18.4"	MD8, MD9
อ.ดอนตาล					
ป่าละเมาะ อ.ดอนตาล	4 พ.ค. 2550	1	16°13' 38.4"	104°50' 37.8"	MD12
อุทยานแห่งชาติภูสระดอกบัว	4 พ.ค. 2550	1	16°14' 07.1"	104°47' 03.2"	MD15
อ.ดอนตาล					รวม 7 สายพันธุ์
จ.ร้อยเอ็ด					
ป่าละเมาะ หมู่บ้านน้อย	4 พ.ค. 2550	1	16°18' 27.4"	104°20' 38.0"	RA1
คำเม็ก อ. หนองพอก					
วนอุทยานเขาน้ำย้อย	4 พ.ค. 2550	1	16°19' 44.6"	104°18' 39.8"	RA2, RA3
อ.หนองพอก		2	16°20' 00.8"	104°18' 07.4"	RA4
					รวม 4 สายพันธุ์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

การเก็บตัวอย่าง			พิกัด		รหัสยีสต์ที่แยกได้
สถานที่	วัน เดือน ปี	จุด	เส้นรุ้ง (เหนือ)	เส้นแวง (ตะวันออก)	
จ.ชัยภูมิ					
อุทยานแห่งชาติป่าหินงาม	7 ก.ค. 2550	1	15°32'09.8"	101°25'14.0"	CP1, CP2
อ.เทพสถิต		2	15°32'06.1"	101°25'30.3"	CP3, CP4, CP5
หน่วยพิทักษ์สวนป่า	7 ก.ค. 2550	1	15°26'01.2"	101°25'45.1"	CP6, CP7
นายางหลวง อ.เทพสถิต		2	15°26'02.9"	101°25'53.2"	CP8
					รวม 8 สายพันธุ์
จ.เลย					
ป่าไม้ อ.ด่านซ้าย	7 ก.ค. 2550	1	17°04'11.9"	101°10'14.7"	LY1, LY2, LY4
		2	17°13'02.2"	101°10'37.4"	LY5, LY6
		3	17°13'40.0"	101°11'28.2"	LY7, LYSM1, LYSM2,
		4	17°18'28.7"	101°14'35.9"	LYSM3, LYSM4 LY8, LY9, LY10
ป่าไม้ อ.ภูเรือ	7 ก.ค. 2550	1	17°20'12.2"	101°15'54.0"	LY11
	8 ก.ค. 2550	2	17°19'27.0"	101°17'10.0"	LY12
	8 ก.ค. 2550	3	17°20'13.0"	101°16'55.7"	LY16
อุทยานแห่งชาติภูเรือ	8 ก.ค. 2550	1	17°28'07.1"	101°21'18.6"	LY17,LY18,LY19
อ.ภูเรือ		2	17°28'42.2"	101°21'09.8"	LY20
		3	17°29'21.0"	101°21'07.1"	LY21, LYSM5, LYSM6, LYSM7
		4	17°29'49.2"	101°21'08.4"	LY22, LYSM8, LYSM9
		5	17°30'36.5"	101°20'45.6"	LY24, LY25
		6	17°30'41.1"	101°20'42.5"	LY26
		7	17°30'44.3"	101°20'40.2"	LY27
		8	17°30'46.0"	101°20'41.0"	LY28
		9	17°30'47.4"	101°20'39.7"	LY29, LYSM10, LYSM11,LYSM12

ตารางที่ 1 (ต่อ)

การเก็บตัวอย่าง			พิกัด		
สถานที่	วัน เดือน ปี	จุด	เส้นรุ้ง (เหนือ)	เส้นแวง (ตะวันออก)	รหัสยีสต์ที่แยกได้
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ภูหลวง อ.ภูหลวง	8 ก.ค. 2550	1	17^{o}21'38.7"	101^{o}30'29.6"	LY32
		2	17^{o}21'20.2"	101^{o}30'21.8"	LY33
		3	17^{o}20'44.8"	101^{o}30'31.7"	LYSM13, LYSM14
		4	17^{o}19'57.2"	101^{o}30'17.3"	LYSM15, LYSM17
					รวม 42 สายพันธุ์
จ.สกลนคร					
อุทยานแห่งชาติภูผาเหล็ก อ.ส่องดาว	9 ก.ค. 2550	1	17^{o}15'39.8"	103^{o}27'22.7"	SKK1,SKK2
		2	17^{o}15'56.5"	103^{o}27'25.8"	SKK3
		3	17^{o}16'21.0"	103^{o}27'35.2"	SKK4
		4	17^{o}16'40.1"	103^{o}27'23.2"	SKK5
อุทยานแห่งชาติภูพาน อ.ภูพาน	9 ก.ค. 2550	1	16^{o}58'58.0"	103^{o}57'54.8"	SKK7
		2	17^{o}06'13.2"	103^{o}59'41.6"	SKK8
		3	17^{o}06'56.9"	104^{o}00'20.0"	SKK9
		4	17^{o}07'04.4"	104^{o}01'41.6"	SKK10
	10 ก.ค. 2550	5	16^{o}58'12.7"	103^{o}55'46.2"	SKK14,SKK15
		6	16^{o}50'34.5"	103^{o}54'24.2"	SKK16
		7	16^{o}49'05.4"	103^{o}53'49.0"	SKK17
		8	16^{o}47'38.6"	103^{o}51'46.5"	SKK20
ป่าเต็งรัง ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตสกลนคร อ. เมือง	9 ก.ค. 2550	1	17^{o}17'52.3"	104^{o}06'43.5"	SKK11
		2	17^{o}17'57.1"	104^{o}06'32.6"	SKK12
					รวม 16 สายพันธุ์

2. 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 จากเว็บไซต์ 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

2.1 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

2.1.1 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*

2.1.2 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 และยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ 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.	%	
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: nucleotides identity / total nucleotides	Nucleotide identity in D1/D2 domain: % identity	Nucleotide different in D1/D2 domain: no. gap	Nucleotide different in D1/D2 domain: nucleotide substitutions no.	Nucleotide different in D1/D2 domain: nucleotide substitutions %	Result of identification
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.	%	
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)

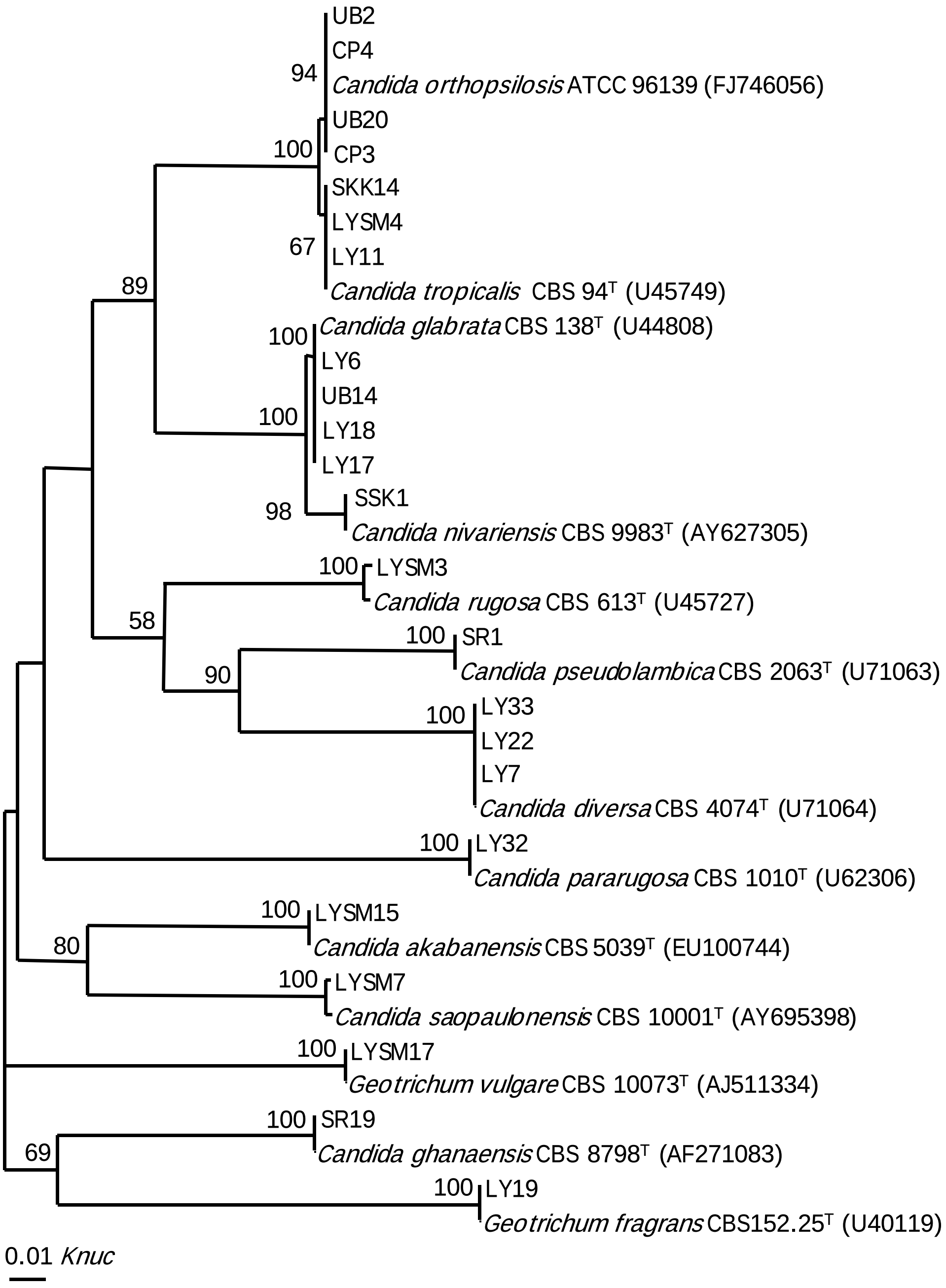
Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. gap	nucleotide substitutions		
						no.	%	
SR7	AB500185	*Williopsis 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

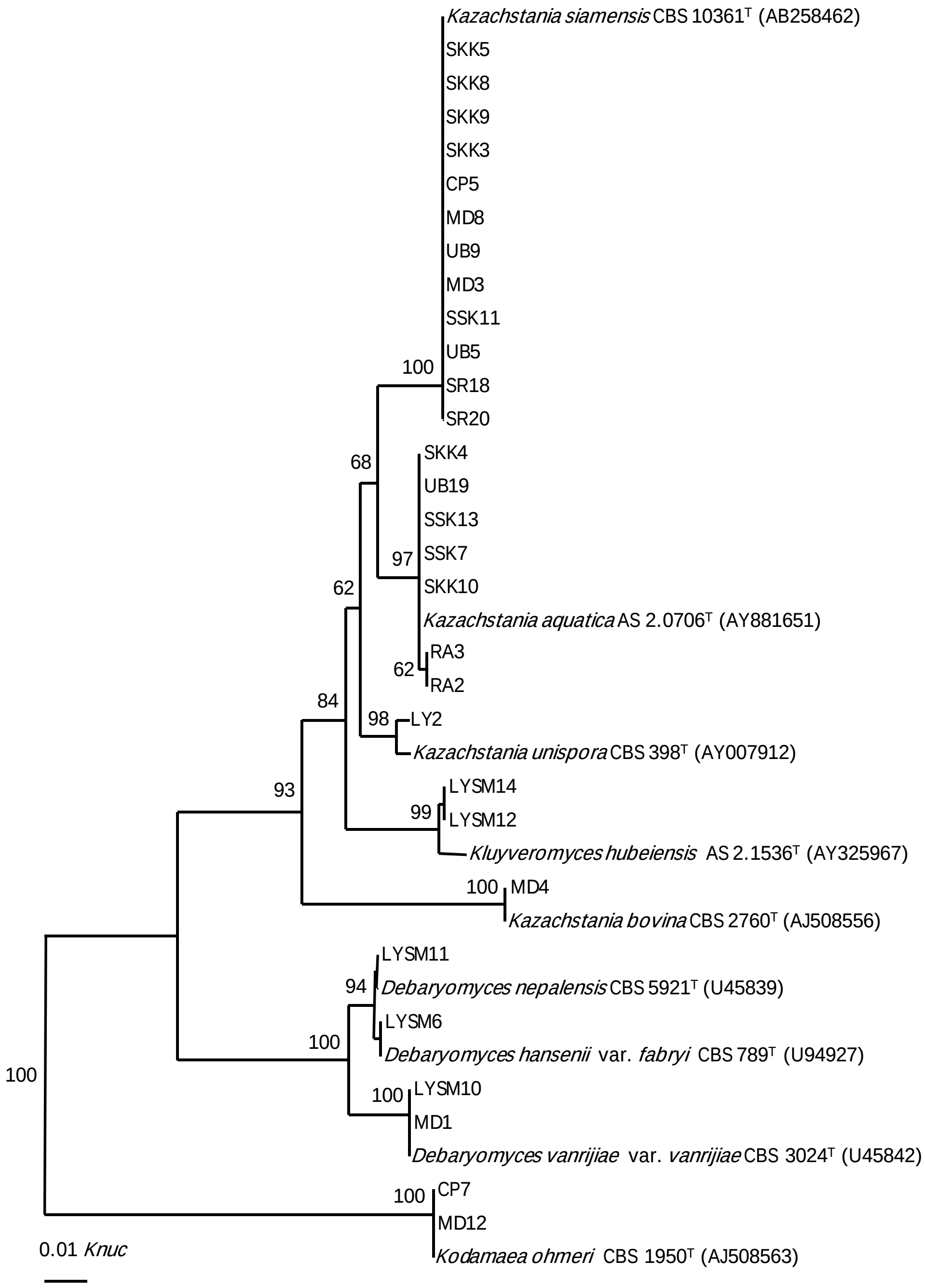
Group Family Genus Species	Strain	No. of strain
Ascomycetous yeast		
Candidaceae		
Candida		
Candida akabanensis	LYSM15	1
Candida diversa	LY7, LY22, LY33	3
Candida ghanaensis	SR19	1
Candida glabrata	UB14, LY6, LY17, LY18	4
Candida nivariensis	SSK1	1
Candida orthopsilosis	CP3, CP4, UB2, UB20	4
Candida 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)

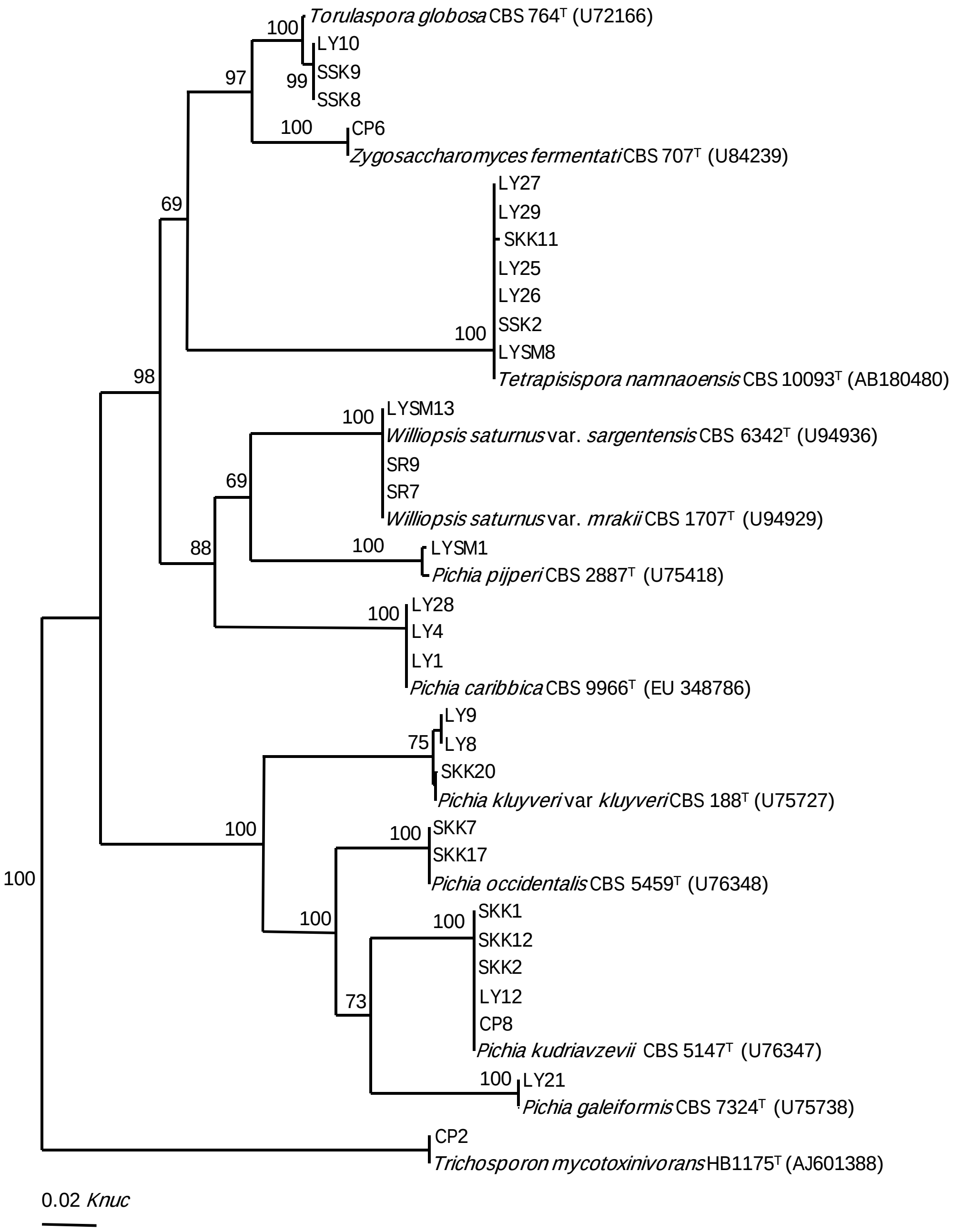
Group Family Genus Species	Strain	No. of strain
Kazachstania unispora	LY2	1
Kluyveromyces		
Kluyveromyces hubeiensis	LYSM12, LYSM14	2
Kodamaea		
Kodamaea ohmeri	MD12, CP7	2
Pichia		
Pichia caribbica	LY1, LY4, LY28	3
Pichia galeiformis	LY21	1
Pichia kluyveri var. *kluyveri*	LY8, LY9, SKK20	3
Pichia kudriavzevii	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 และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด 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

2.2 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

2.3 ยีสต์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ (could be known or new species)

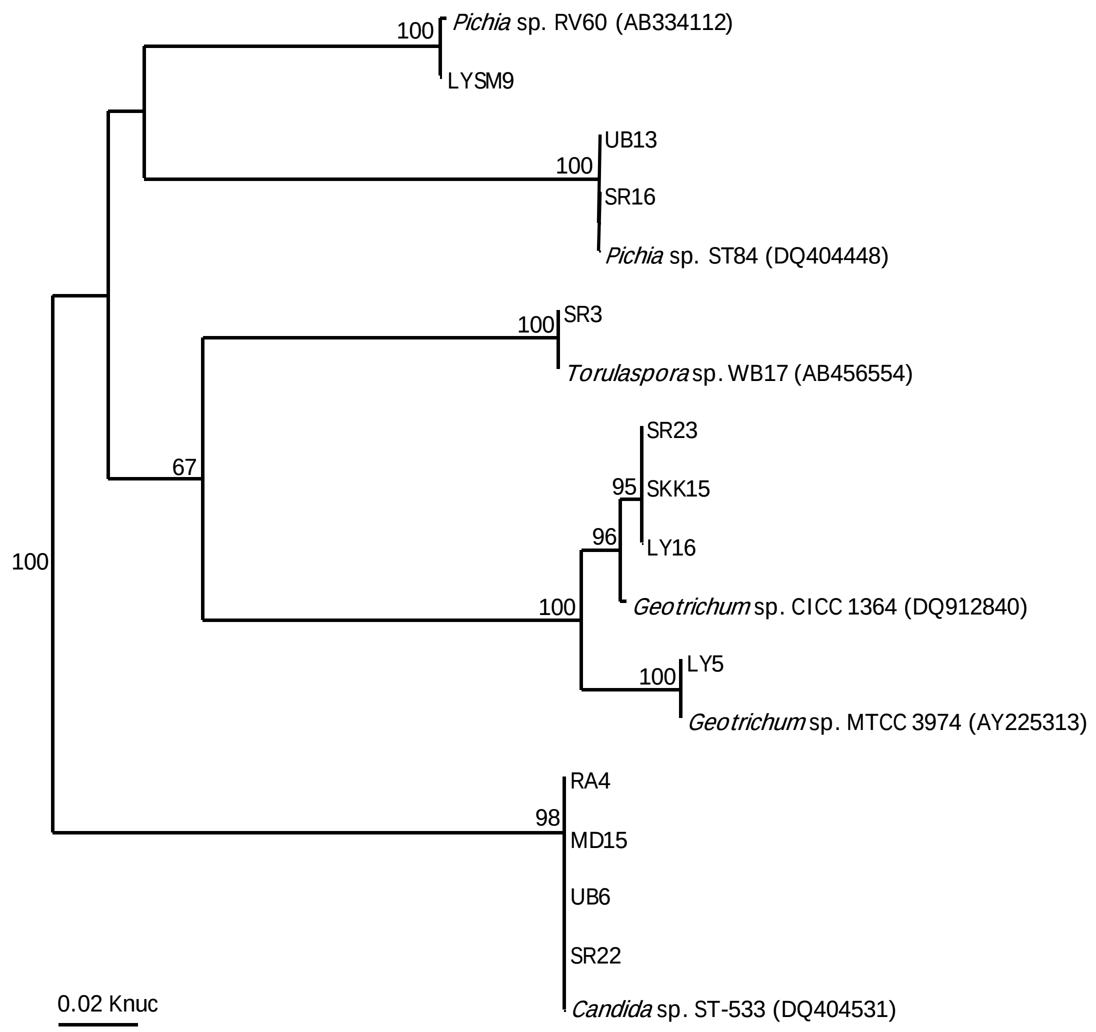
ยีสต์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ หมายถึง ยีสต์ที่เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับสปีชีส์ที่อธิบายแล้วมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 3 นิวคลีโอไทด์ แต่มีเปอร์เซ็นต์การแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 6 นิวคลีโอไทด์หรือ 1 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงยังสรุปไม่ได้ว่าเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 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

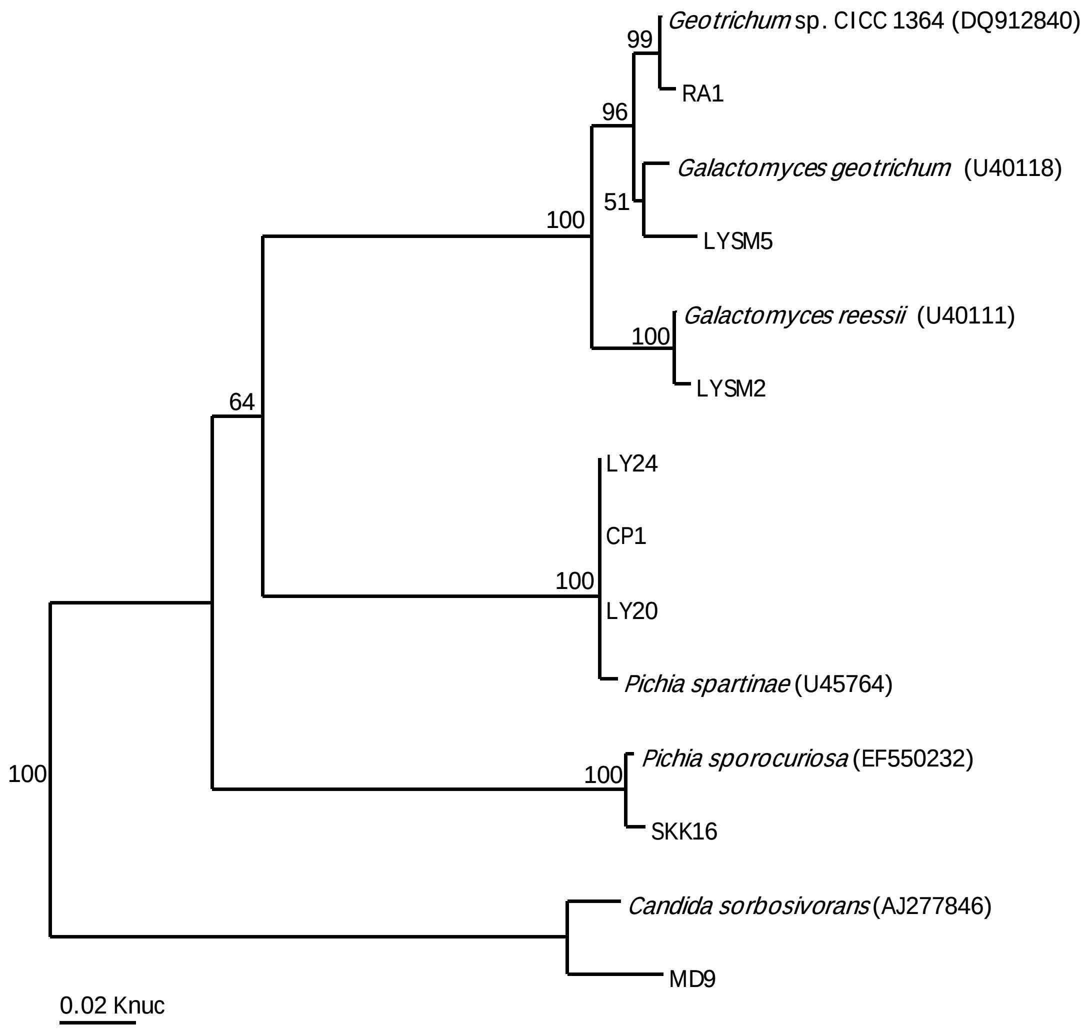
Strain	Similar to
สายพันธุ์ที่เหมือนสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	
SR22, UB6, MD15, RA4	*Candida* sp. ST-533
SR23, LY16, SKK15	*Geotrichum* sp. CICC1364
LY5	*Geotrichum* sp. MTCC 3974
LYSM9	*Pichia* sp. RV60
SR16, UB13	*Pichia* sp. ST84
SR3	*Torulaspora* sp. WB17
รวม 4 สกุล 6 สปีชีส์ 12 สายพันธุ์	
สายพันธุ์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่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

2.4 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

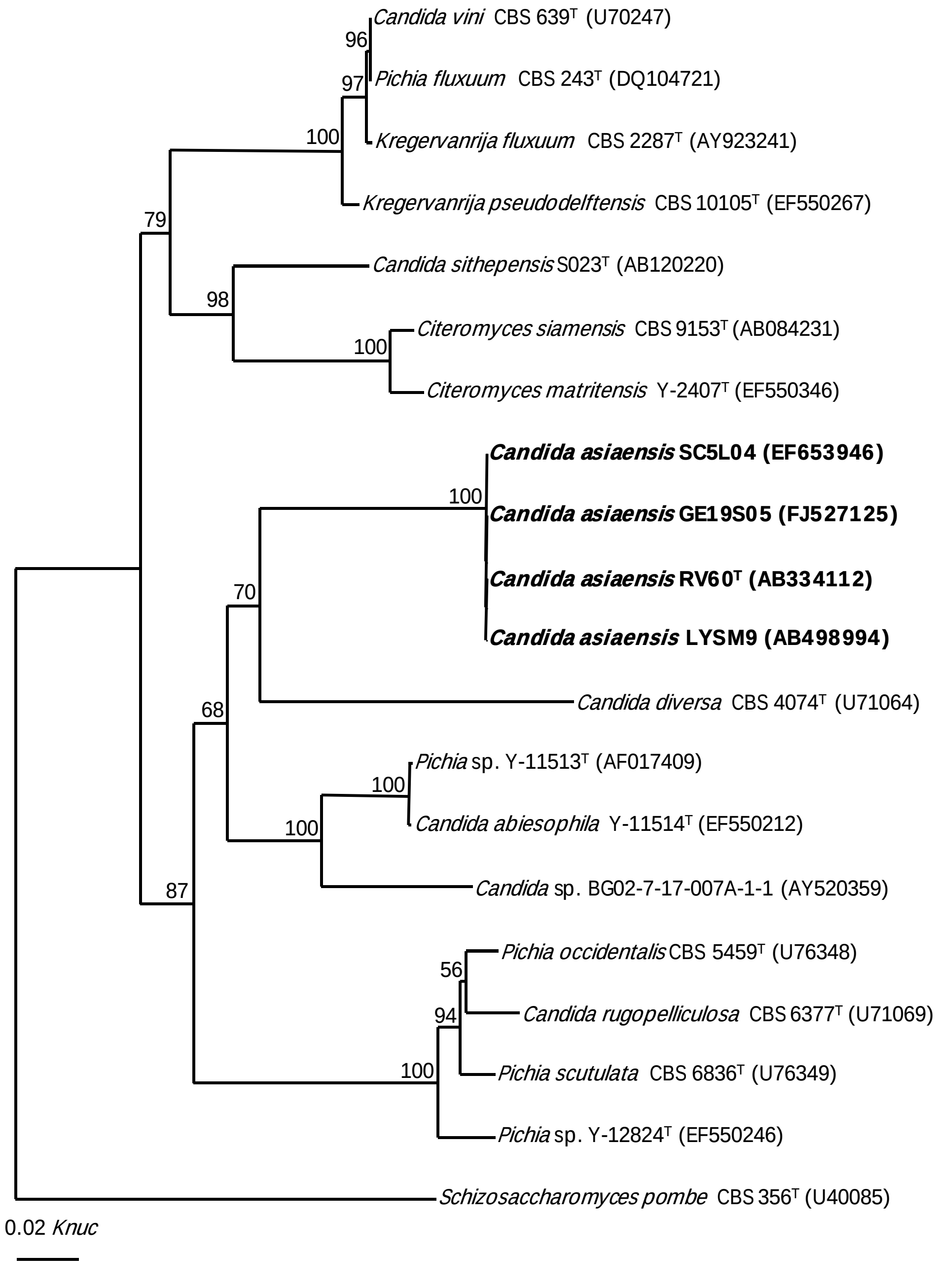
3. การอธิบายสปีชีส์ใหม่

การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่ทำโดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของยีสต์ ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและตั้งชื่อเพื่อเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่ ดังนี้

3.1 *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	+
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	-
อินูลิน	-	ไซลิทอล	-

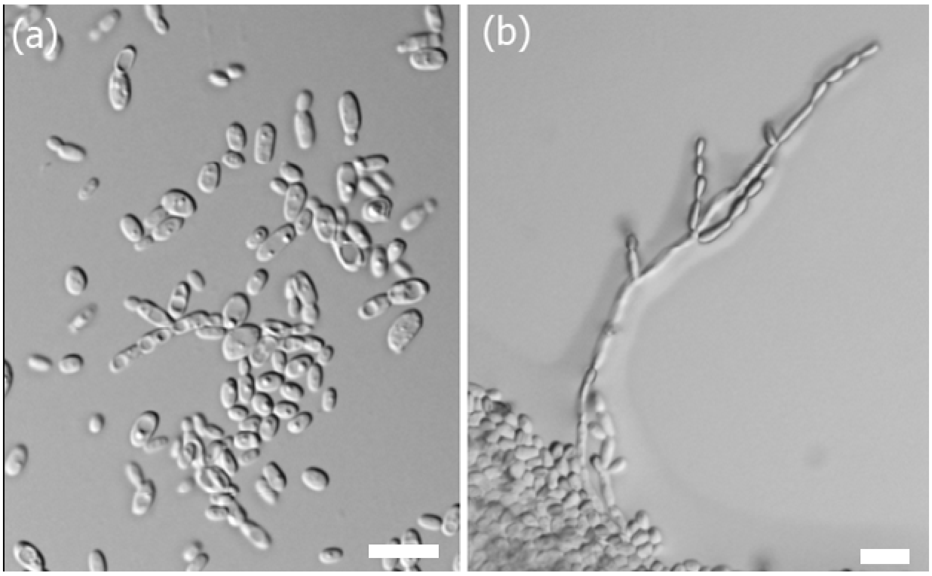
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ลักษณะอื่นๆ:

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

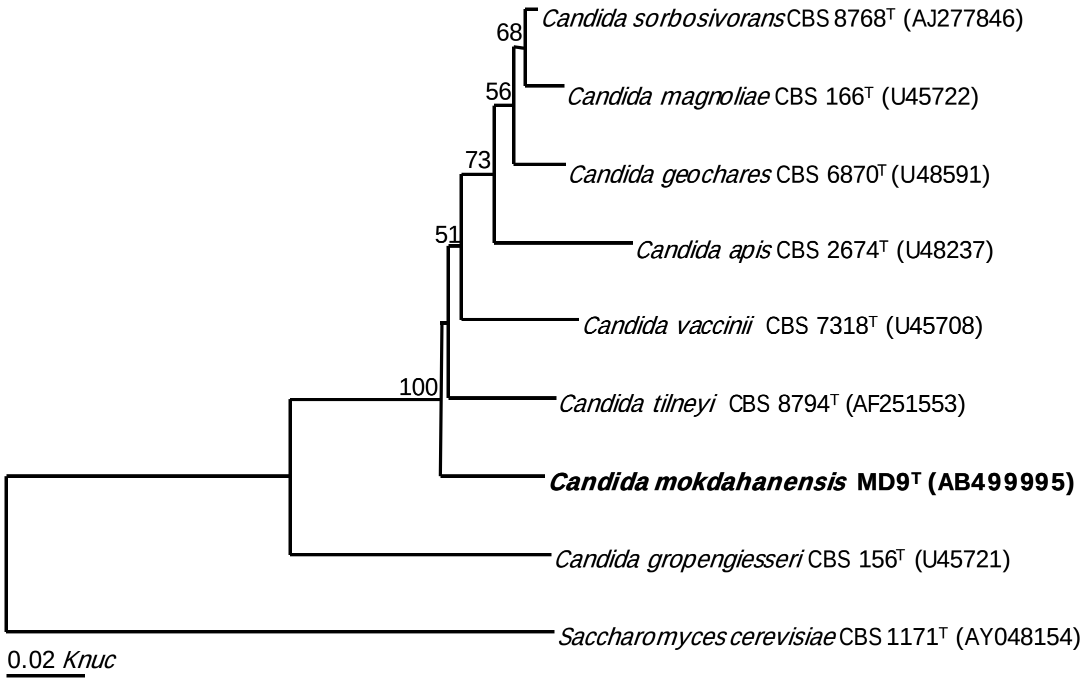
A. เซลล์ปกติในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

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

3.2 *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 ตำแหน่ง ใน 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

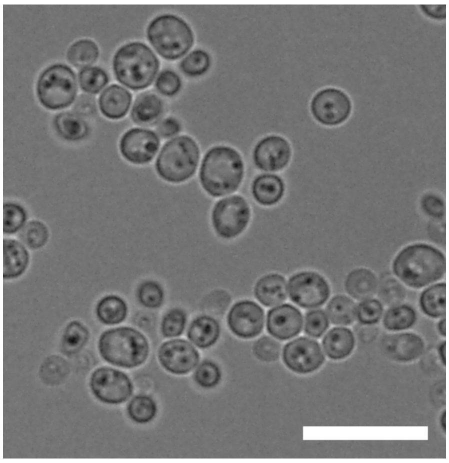
กลูโคส	+	แป้ง	+
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	+
ซอร์โบส	+	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	-
ดี-ไรโบส	s	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-δ-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	w
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-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

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ลักษณะอื่นๆ:

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



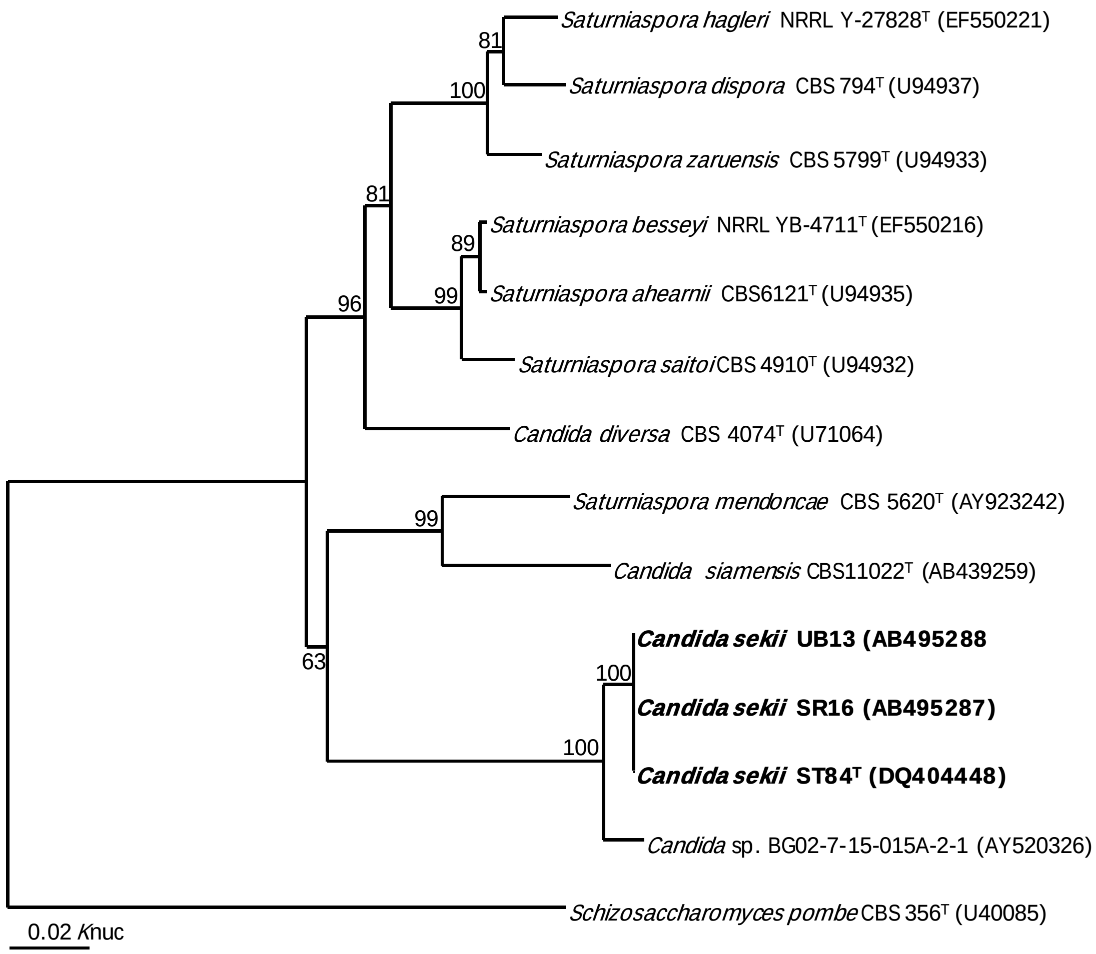
ภาพที่ 9 สัณฐานวิทยาของ *Candida mokdahanensis* sp. nov. (MD9^T) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3.3 *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 และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับ

นิวคลีโอไทด์ในโดเมน 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	-	ราฟฟิโนส	-
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	+
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-	ไซลิทอล	-

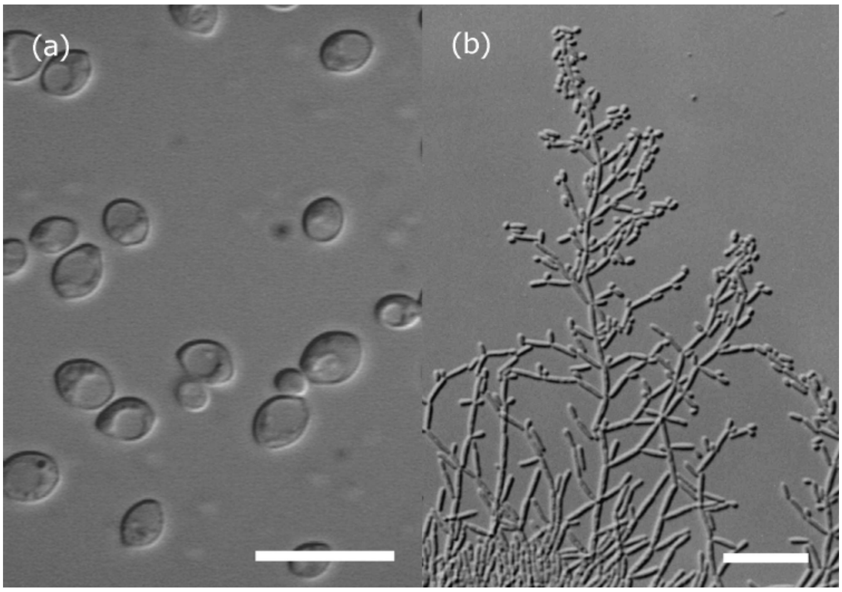
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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)

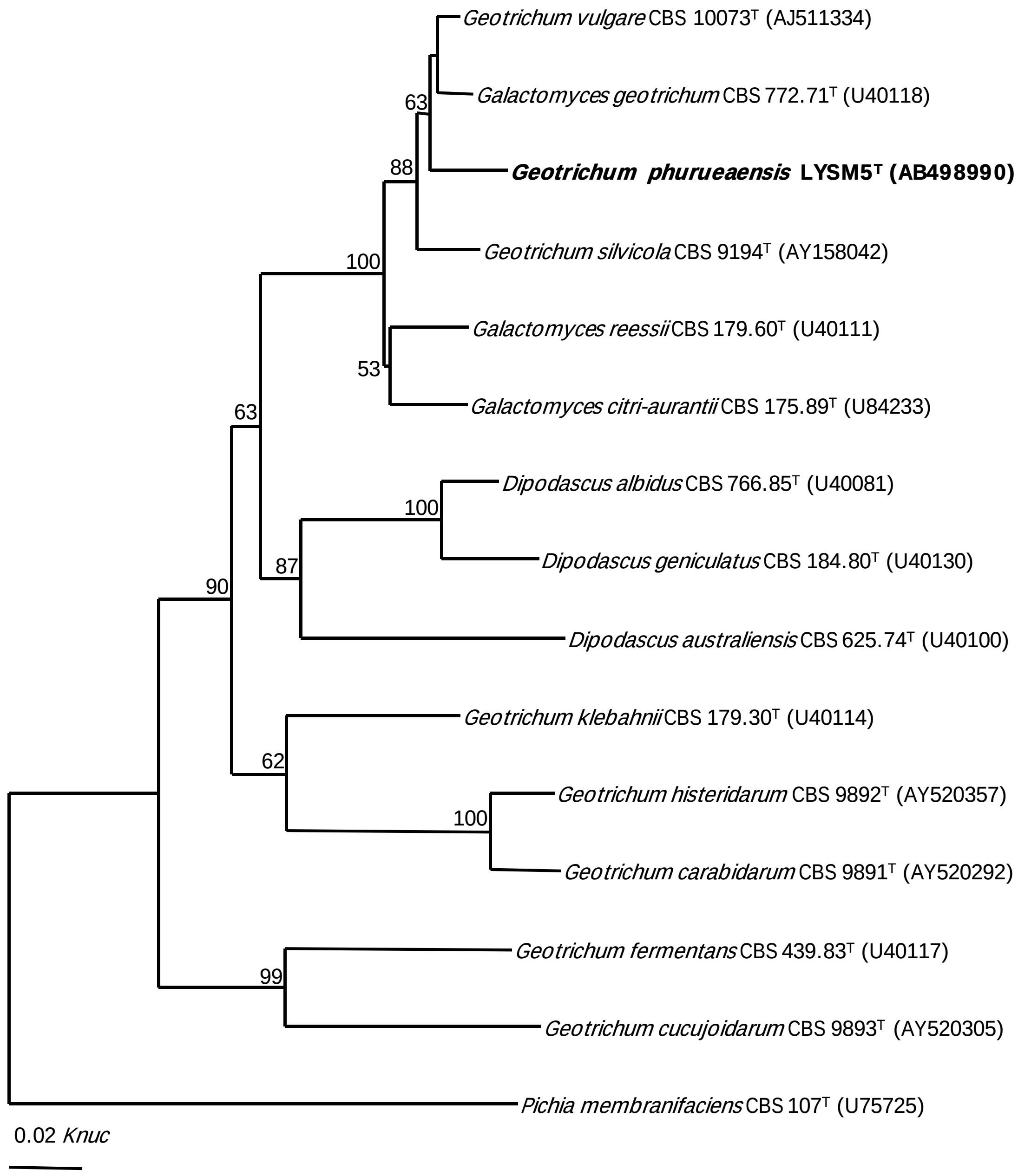
B. การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลัง บ่ม 7 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3.4 *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 และยีสต์

สปีชีส์อื่น 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 พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ 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 เพิ่มจำนวนได้โดยการสร้าง อาร์โธรโคนีเดียขนาด 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	-	ราฟฟิโนส	-
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	-

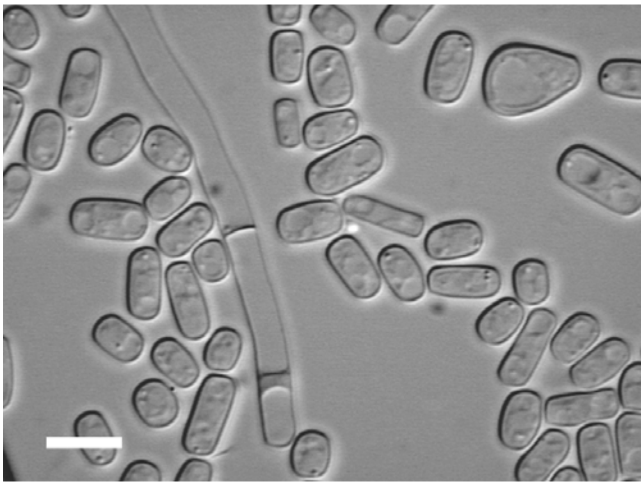
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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)

4. ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ และป่าไม้อื่นในจังหวัดที่ตั้งอยู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ผลการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ 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 จังหวัดนคร-ราชสีมา (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* เหมือนกันกับยีสต์ที่พบในเขตพื้นที่ป่าไม้ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ศึกษาอีกด้วย และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษายีสต์จากดินในป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าสนเขาในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ซึ่งมีรายงาน

ก่อนหน้า (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 ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ วนอุทยานแห่งชาติ 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

5. 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 และโดยส่วนใหญ่ยีสต์ที่สามารถย่อยสลายคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส ไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลส และไซแลนอยู่ในสกุล *Candida* ซึ่งเหมือนกับรายงานที่มีก่อนหน้าที่แยกและจัดจำแนกยีสต์จากดินในแอฟริกาใต้พบ

ยีสต์สปีชีส์ใหม่อยู่ในสกุล *Candida* คือ *Candida mokoenaii* 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 โดยเก็บตัวอย่างดินรวม 60 ตัวอย่าง นำมาแยกยีสต์โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวน และเก็บยีสต์โดยอาศัยความแตกต่างของโคโลนี ได้ยีสต์ 102 สายพันธุ์และนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ผลดังนี้

จากการจัดจำแนกยีสต์ 102 สายพันธุ์ พบว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วจำนวน 82 สายพันธุ์ (80.4 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษา) โดยยีสต์ส่วนใหญ่ (81 สายพันธุ์) เป็นแอสโคมัย-ซีตัสยีสต์ 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

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. Vrsanskà1 and E. Petrákovál. 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

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract malt extract (YM) agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Yeast extract malt extract broth

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Acidified yeast extract malt extract agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
คลอแรมฟีนิคอล	0.2	กรัม
โซเดียมโพรพิโอเนต	0.25	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 3.7-3.8 ด้วยกรดเกลือ 1 นอร์แมล และฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Yeast extract malt extract broth ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
กลีเซอรอล	100	มิลลิลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast extract peptone dextrose (YPD) agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	10	กรัม
เปปโทน	20	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 5% malt extract agar

มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	50	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Fowell' s acetate agar

โซเดียมอะซิเตท	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Corn meal agar

Corn meal agar	1.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Gorodkowa agar

กลูโคส	0.1	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
วุ้น	2.0	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
เด็กซ์โทส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. Stock carbon solution (10X)

ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
สารประกอบคาร์บอน	5	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน และเก็บใน ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

12. อาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ stock carbon solution (10X) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 วัน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน การเตรียมอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนนั้น มีสารประกอบคาร์บอน 7 ชนิด ที่ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ ได้แก่ อินูลิน เอทานอล เมทานอล แป้ง กาแลกทิทอล 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต และ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต

13. Yeast carbon base (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14. Yeast carbon base broth (1X)

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ yeast carbon base (10X) ลงในหลอดขนาด13 x 100 มิลลิเมตรซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร

15. Stock nitrogen solution (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
สารประกอบไนโตรเจน*	X	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอนและเก็บในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

สารประกอบไนโตรเจน*: แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ 0.5 กรัม โปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) 0.78 กรัม โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) 0.26 กรัม เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (ethylamine-HCl) 0.64 กรัม แอล-ไลซีน (L-lysine-HCl) 0.56 กรัม และคาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverinedihydrochloride) 0.68 กรัม

16. อาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

ชั่งวุ้น 1.67 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 90 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอจนวุ้นอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เติม stock nitrogen solution (10X) ปริมาตร10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงเพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

17. Fermentation basal medium

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	4.5	กรัม
เปปโทน	7.5	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

บรอมไทมอลบลูจำนวนเล็กน้อยเพื่อให้มีสีเขียวเข้ม

แบ่ง fermentation basal medium ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์)

18. Fermentation test of glucose

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	4.5	กรัม
เปปโทน	7.5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

บรอมไทมอลบลูจำนวนเล็กน้อยเพื่อให้มีสีเขียวเข้ม

แบ่งใส่หลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 5 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

19. อาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium)

กลูโคส	10	กรัม
Vitamin assay casamino acids (Difco)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 5.5 และฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

20. Custer's chalk medium

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	5	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เมื่ออุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทำการเทลงบนเพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเขย่าขวดเพื่อให้แคลเซียมคาร์บอเนตละลายเป็นเนื้อเดียวกับอาหาร

21. อาหารตรวจสอบความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์

1) การเตรียม Basal medium (10X)

ไซโคลเฮกซิไมด์ 1 กรัม ละลายในอะซิโตน 2.5 มิลลิลิตร

ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน

2) Active medium

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ basal medium (10X) ลงในหลอดขนาด13 x 100 มิลลิเมตรซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร

22. การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

1) อาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์

กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	1	กรัม
วุ้น	1.3	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2) อาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์

กลูโคส	60	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	1	กรัม
วุ้น	1.3	กรัม

น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3) อาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์	100	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4) อาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์	160	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

23. Christensen’s urea agar

1) การเตรียมสารละลายยูเรีย 20 เปอร์เซ็นต์

ยูเรีย	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน

2) การเตรียมอาหารทดสอบการไฮโดรไลต์ยูเรีย

กลูโคส	1	กรัม
เปปโทน	1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัม
วุ้น	20	กรัม
ฟีนอลเรด	0.012	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 6.8 แบ่งใส่หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายยูเรีย 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

24. Carboxyl methyl cellulose (CMC) -YM agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

25. Microcrystalline cellulose-YM agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
ไมโครคริสตอลไลน์เซลลูโลส (Avicel)	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

26. Xylan - YM agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
ไซแลน (oat spelts)	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

27. Starch - YM agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
สารละลายแป้ง (soluble starch)	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

สารเคมี

1. Bromthymol blue stock solution

ละลายบรอมไทมอลบลู 50 มิลลิกรัม ในน้ำปริมาตร 75 มิลลิลิตร วิธีใช้ คือ เติม bromothymol blue stock solution ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงใน fermentation basal medium และ fermentation test of glucose ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. Lugol's solution

ไอโอดีน	1	กรัม
โปแตสเซียม ไอโอไดด์	2	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	300	มิลลิลิตร

3. Diazonium blue B reagent (DBB reagent)

Diazonium blue B salt	0.15	กรัม
0.25 M Tris hydroxymethyl aminomethane (pH 7.0)	10	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมเสร็จแล้วควรเก็บไว้ในที่เย็น และใช้ภายใน 30 นาที หลังจากเตรียมเสร็จ

4. 50X TAE buffer

Tris base	48.4	กรัม
0.5M EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันโดยใช้น้ำรีเวอร์สออสโมซิส ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. 10X TBE buffer

Tris base	10.8	กรัม
กรดบอริก	5.5	กรัม
0.5 mM EDTA (pH 8.0)	4.0	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันโดยใช้น้ำรีเวอร์สออสโมซิส ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Stock ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. Loading dye

บรอมฟีนอล บลู	0.25	กรัม
กลีเซอรอล	30	มิลลิลิตร
เติมน้ำรีเวอร์สออสโมซิสให้ครบ	100	มิลลิลิตร

8. 1 kb DNA ladder (DNA marker)

DNA ladder	1	ไมโครลิตร
6X loading Dye	1	ไมโครลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	4	ไมโครลิตร

9. 2.5 mM dNTP

dATP	25	ไมโครลิตร
dCTP	25	ไมโครลิตร
dGTP	25	ไมโครลิตร
dTTP	25	ไมโครลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	900	ไมโครลิตร

10. เอทานอล/โซเดียมอะซิเตท

3M sodium acetate (pH 4.6)	4	มิลลิลิตร
Absolute ethanol	95	มิลลิลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ผลงานที่ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร FEMS Yeast Research

RESEARCH ARTICLE

Geotrichum siamensis sp. nov. and *Geotrichum phurueaensis* sp. nov., two asexual arthroconidial yeast species isolated in Thailand

Rungluk Kaewwichian[1], Wichien Youngmanitchai[1], Nantana Srisuk[1], Kazuhito Fujiyama[2] & Savitree Limtong[1]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand; and [2]International Center for Biotechnology, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

Correspondence: Savitree Limtong, Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand. Tel.: +66 2 562 5444, ext. 4017; fax: +66 2 579 2081; e-mail: fscistl@ku.ac.th

Received 1 May 2009; revised 3 July 2009; accepted 7 August 2009.

DOI:10.1111/j.1567-1364.2009.00572.x

Editor: Cletus Kurtzman

Keywords
Geotrichum siamensis sp. nov; *Geotrichum phurueaensis* sp. nov.; arthroconidial yeast; ascomycetous yeast; new yeast species; Thailand.

Abstract

Two asexual arthroconidial yeast strains, TM3-44^{T} and LYSM5^{T}, were isolated, respectively, from estuarine water in a mangrove forest and soil in a terrestrial forest in Thailand. Analysis of the D1/D2 domains of the large-subunit rRNA gene sequences revealed that strain TM3-44^{T} differed from the closest species in terms of pairwise sequence similarity, *Dipodascus albidus*, by 11.7% nucleotide substitutions, while strain LYSM5^{T} was closest to *Galactomyces geotrichum* with only 2.9% nucleotide substitutions. The phylogenetic tree further demonstrated that strain TM3-44^{T} was at a distant position from the closest species, *D. albidus*, and other related species in the *Dipodascus* clade, while strain LYSM5^{T} clustered with *G. geotrichum*, it closest relative in the *Galactomyces* clade. The phenotypic characteristics of the two strains were typical of the genus *Geotrichum*. On the basis of the above findings, strain TM3-44^{T} was assigned as a novel species of *Geotrichum*, for which the name *Geotrichum siamensis* sp. nov. is proposed. The type strain is TM3-44^{T} (BCC 29903^{T} = NBRC 104880^{T} = CBS 10929^{T}). Strain LYSM5^{T} represented another novel species of *Geotrichum*, which was named *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. The type strain is LYSM5^{T} (BCC 34756^{T} = NBRC 105674^{T} = CBS 11418^{T}).

UNCORRECTED PROOF

Introduction

Geotrichum Link: Fries is an asexual state of the two arthroconidial ascomycetous yeast genera *Dipodascus* Lagerhein and *Galactomyces* Redhead & Malloch (Kurtzman & Robnett, 1998). The arthroconidial yeast species were placed in two widely divergent groups on the basis of small-subunit (SSU) rRNA gene data including SSU rDNA sequences and SSU rRNA secondary structure (Ueda-Nishimura & Mikata, 2000; de Hoog & Smith, 2004), large-subunit (LSU) rRNA (Kurtzman & Robnett, 1998), internal transcribed spacer (ITS) (de Hoog & Smith, 2004), nDNA/DNA reassociation and morphological characteristics (de Hoog *et al.*, 1986). Group 1 consists of *Galactomyces* and *Dipodascus* with *Geotrichum* anamorphs and group 2 consists of *Magnusiomyces* with *Saprochaete* anamorphs (de Hoog & Smith, 2004). de Hoog & Smith (2004) suggested that taxonomy at the species level should be based on ITS rRNA gene sequences and nDNA/DNA reassociation data, and proposed a key to the species. At present, the genus *Geotrichum* consists of 13 recognized species. Eight species were confirmed as *Geotrichum citri-aurantii*, *Geotrichum europaeum*, *Geotrichum pseudocandidum*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum fermentans*, *Geotrichum decipiens*, *Geotrichum restrictum* and *Geotrichum klebahnii* (de Hoog & Smith, 2004). *Geotrichum silvicola* in the *Galactomyces* clade was proposed later for four strains associated with *Drosophila* flies in Brazil and two strains from oak tasar silk worm larvae in India (Pimenta *et al.*, 2005). Three *Geotrichum* species, *Geotrichum carabidarum*, *Geotrichum histeridarum* and *Geotrichum cucujoidarum*, were proposed for the strains isolated from the digestive tract of basidiome-feeding beetles and lepidopteran larvae (Suh & Blackwell, 2006). *Geotrichum vulgare* was proposed for two strains isolated from soil in an alluvial forest in Austria and from a drain in a Turkish soft drinks factory (Wuczkowski *et al.*, 2006).

During the courses of the investigation of yeasts in mangrove and terrestrial forest ecosystems in Thailand, various yeast species, both known and novel species, were found and two strains, one strain from each ecosystem, were

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

FEMSYR	572	B	Dispatch: 7.9.09	Journal: FEMSYR	CE: Nidhi
Journal Name	Manuscript No.		Author Received:	No. of pages: 7	Op: Deepa/Arsath

FEMSYR 572

UK FEMSYR 572 Webpdf=09/07/2009 06:38:20 574794 Bytes 7 PAGES n operator=S.arsathali) 9/7/2009 6:38:27 PM

found to represent two novel *Geotrichum* species. In this paper, strain TM3-44^T is described as *Geotrichum siamensis* sp. nov. and strain LYSM5^T is described as *Geotrichum phurueaensis* sp. nov.

Materials and methods

Yeast isolation

Strain TM3-44^T was isolated from a water sample collected below the surface at a depth of approximately 3 m using a Niskin Biosampler in a mangrove forest in Khao Lumpee-Haad Thaimueang National Park (08°31′36.8″N), Phang-Nga Province, in 2005 by membrane filtration following the method of Limtong *et al.* (2007a). Fifty to 200 mL of water was filtered through 0.8-μm pore size membrane filters, which was placed on acidified yeast extract–malt extract (YM) broth (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% glucose, adjusted to pH 3.7–3.8 with 1 M HCl) supplemented with 0.025% sodium propionate and 200 mg chloramphenicol L^{-1} and incubated for 2–3 days at room temperature. Yeast colonies were picked and purified by cross streaking on YM agar. Strain LYSM5^T was isolated from a forest soil sample collected from Phu Ruea National Park (17°29′21.0″N), Loei Province, in 2007, using an enrichment technique as described by Limtong *et al.* (2007b). The soil sample (5 g) was added to 50 mL acidified YM broth supplemented with 0.025% sodium propionate and 200 mg chloramphenicol L^{-1} in a 250-mL Erlenmeyer flask and incubated on a rotary shaker for 3–4 days at room temperature. The enrichment culture was then spread out on YM agar supplemented with 0.025% sodium propionate and 200 mg chloramphenicol L^{-1}. When necessary, colonies were restreaked onto YM agar. Purified yeast strains were suspended in YM broth supplemented with 10% glycerol and maintained at − 80 °C.

DNA sequencing and phylogenetic analysis

The sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene were determined from PCR products from genomic DNA extracted from yeast cells using a slightly modified version of the method described by Lachance *et al.* (1999). The D1/D2 domain of the LSU rRNA gene was amplified by a PCR with the forward primer NL-1 and the reverse primer NL-4 (O'Donnell, 1993). The PCR product was checked by agarose gel electrophoresis, purified using the QIAquick purification kit (Qiagen) and cycle-sequenced using the ABI BigDye terminator cycle sequencing kit, version 3.1 (Applied Biosystems), with the external primers NL-1 and NL-4 for the D1/D2 domain (Kurtzman & Robnett, 1998). The sequences were determined using an ABI PRISM 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). The sequences were compared pairwise using BLASTN homology search (Altschul *et al.*, 1997) and were aligned with the sequences of related species retrieved from GenBank using the multiple alignment program CLUSTAL_X version 1.81 (Thompson *et al.*, 1997). A phylogenetic tree was constructed from the evolutionary distance data with Kimura's (1980) two-parameter correction, using the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987). Confidence levels of the clades were estimated from bootstrap analysis (1000 replicates) (Felsenstein, 1985). The accession numbers for the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene of strains TM3-44^T and LYSM5^T are AB499616 and AB498990, respectively.

Yeast characterization

The strains were characterized morphologically, biochemically and physiologically according to the standard methods described by Yarrow (1998). Carbon assimilation tests were conducted in liquid medium using the method described by Yarrow (1998). Assimilation of nitrogen compounds was examined on solid media with starved inocula following the method of Nakase & Suzuki (1986). Growth at various temperatures was determined by cultivation in YM broth. Ubiquinones were extracted from cells cultivated in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL of yeast extract peptone dextrose broth (1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose) on a rotary shaker at 28 °C for 24–48 h and purified according to the method described by Yamada & Kondo (1973) and Kuraishi *et al.* (1985). Isoprenologues were identified by HPLC as described previously (Limtong *et al.*, 2007b).

Results and discussion

Phylogenetic analysis

The sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene revealed that strain TM3-44^T differed by 11.7% nucleotide substitutions (64 nucleotide substitutions and eight gaps out of 547 nt) from the type strain of *Dipodascus albidus*, the closest species in terms of pairwise sequence similarity. Strain LYSM5^T was closest to *Galactomyces geotrichum*, but with 2.9% nucleotide substitutions (16 nucleotide substitutions and one gap out of 546 nt). According to the observations of Kurtzman & Robnett (1998), yeast strains showing nucleotide substitutions > 1% in the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene are usually different species. The phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domains of the LSU rRNA gene further demonstrated that strain TM3-44^T was at a distant position from *D. albidus* and related species in the *Dipodascus* clade (Fig. 1). Strain LYSM5^T occurred in a clade with *G. geotrichum* and the related species in the *Galactomyces* clade (Fig. 1); the branches were supported by high bootstrap values.

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

UNCORRECTED PROOF

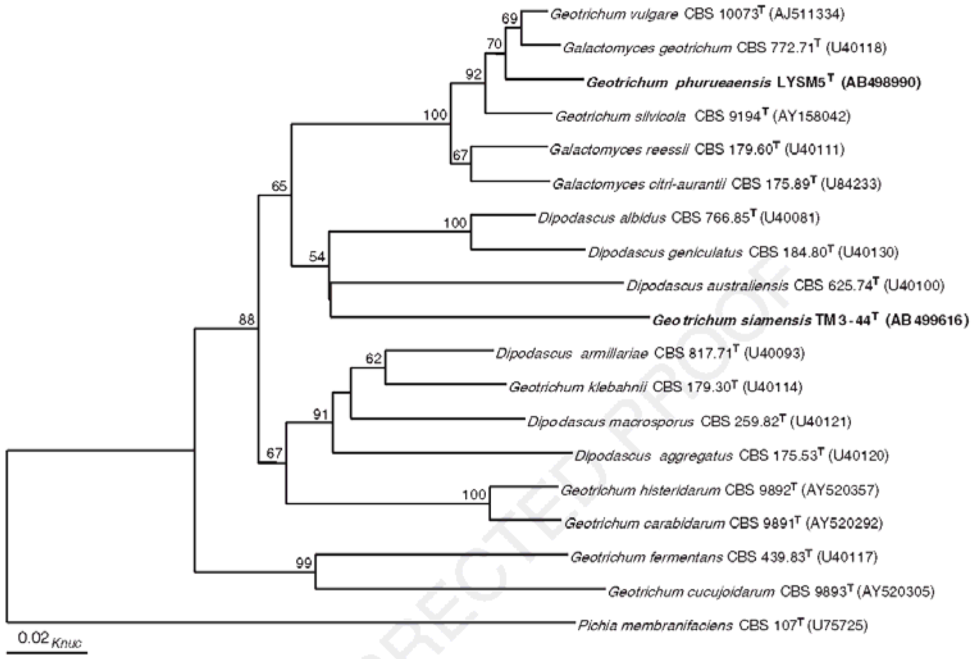


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene, showing positions of *Geotrichum siamensis* sp. nov. (TM3-44^T) and *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. (LYSM5^T), with respect to closely related species. The phylogenetic tree was constructed from evolutionary distance data corrected by two-parameter transformation of Kimura (1980), using the neighbor-joining method. Numbers indicate percentages of bootstrap sampling, derived from 1000 samples.

UNCORRECTED PROOF

Phenotypic characteristics, identification and ecology

Strains TM3-44^T and LYSM5^T showed the characteristics of *Geotrichum* as follows: colonies were white, farinose, dry, consisting of hyphae that disarticulated into rectangular arthroconidia. Budding was not observed. No ascospores were produced. Sugars were not fermented, and nitrate was not assimilated. Diazonium blue B color and urease reactions were negative.

On the basis of morphological, biochemical, physiological and chemotaxonomic characteristics, and the sequence analysis of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene, we concluded that the two strains, TM3-44^T and LYSM5^T, represent two novel species of *Geotrichum*. The name *G. siamensis* sp. nov. is proposed for the strain TM3-44^T and *G. phurueaensis* sp. nov. is assigned for the strain LYSM5^T.

In practice, *G. siamensis* sp. nov. can be distinguished from *D. albidus*, its closest species in terms of pairwise sequence similarity, on the basis of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene sequences and a few phenotypic characteristics including the ability to assimilate ethylamine and the inability to assimilate D-galactose, L-sorbose, D-mannitol and D-glucitol (Table 1). *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. is separated from *G. geotrichum* by its ability to assimilate inulin, soluble starch and D-glucono-δ-lactone; and inability to assimilate D-galactose, D-ribose, ribitol, D-mannitol, D-glucitol and D-gluconate (Table 1).

Members of the genus *Geotrichum* have been isolated mainly from plant materials (de Hoog *et al.*, 1998c), but also from clinical sources, soil and the drain in a soft drinks factory (de Hoog *et al.*, 1998c; Wuczkowski *et al.*, 2006). The two novel *Geotrichum* species were obtained from different habitats and geographic regions. *Geotrichum siamensis* were isolated from estuarine water in a mangrove forest in the southern part of Thailand, while *G. phurueaensis* was obtained from forest soil in the northeastern part of Thailand. In addition to *G. siamensis*, the other yeasts isolated from the same sampling area included *Candida conglobata*, *Candida membranifaciens*, *Candida parapsilosis*, *Candida picinguabensis*, *Candida tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia caribbica*, *Pichia guilliermondii* and

UK FEMSYR 572 Webpdf:=09/07/2009 06:38:20 574794 Bytes 7 PAGES n operator=Saraswathi) 9/7/2009 6:38:27 PM

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

Table 1. Phenotypic characteristics of *Geotrichum siamensis* sp. nov. and *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. with their closest species, *Dipodascus albidus* and *Galactomyces geotrichum*

	Species			
Characteristics	*G. siamensis*	*D. albidus**	*G. phurueaensis*	*G. geotrichum*†
Fermentation				
D-Glucose	–	–	–	v
D-Galactose	–	–	–	v
Sucrose	–	–	–	–
Maltose	–	–	–	–
Lactose	–	–	–	–
Trehalose	–	–	–	–
Raffinose	–	–	–	–
Assimilation of carbon compounds				
D-Glucose	+	+	+	+
D-Galactose	–	+	–	+
L-Sorbose	–	+	+	+
Sucrose	–	–	–	–
Maltose	–	–	–	–
Cellobiose	–	–	–	–
Trehalose	–	–	–	–
Lactose	–	–	–	–
Melibiose	–	–	–	–
Raffinose	–	–	–	–
Melezitose	–	–	–	–
Inulin	–	–	w	–
Soluble starch	–	–	w	–
D-Xylose	+	+	+	+
L-Arabinose	–	–	–	–
D-Arabinose	–	–	–	–
D-Ribose	–	–	–	v
L-Rhamnose	–	–	–	–
N-acetyl-D-glucosamine	–	n	–	n
Methanol	–	n	–	–
Ethanol	+	+	w	+
Glycerol	+	+	+	+
Erythritol	–	–	–	–
Ribitol	–	–	–	v
Galactitol	–	–	–	–
D-Mannitol	–	+	–	v
D-Glucitol	–	+	–	v
α-Methyl-D-glucoside	–	–	–	–
Salicin	–	–	–	–
D-Gluconate	–	–	–	v
D-Glucuronate	–	n	–	n
D-Galacturonate	–	n	+	n
2-Keto-D-gluconate	–	–	–	–
5-Keto-D-gluconate	–	n	–	n
D-Glucono-δ-lactone	–	–	+	v
DL-Lactic acid	l	+	w	v
Succinic acid	+	+	+	v
Citric acid	–	–	+	v
Inositol	–	–	–	–

Table 1. Continued.

	Species			
Characteristics	*G. siamensis*	*D. albidus**	*G. phurueaensis*	*G. geotrichum*†
Nitrate	–	–	–	–
Nitrite	–	n	–	n
Ethylamine	+	–	+	+
L-Lysine	+	n	+	n
Cadaverine	+	n	+	n
Other growth characteristics				
Vitamin-free medium	–	–	+	+
10% NaCl/5% glucose	–	n	–	n
16% NaCl/5% glucose	–	n	–	n
50% glucose	–	n	+	n
60% glucose	–	n	–	n
0.01% cycloheximide	–	n	–	n
Growth at 25 °C	+	+	+	+
Growth at 30 °C	+	n	+	n
Growth at 35 °C	w	n	w	n
Growth at 37 °C	–	–	–	v
Growth at 40 °C	–	–	–	–
Acid formation from glucose	n	–	–	–
Amyloid production	–	–	–	–
Diazonium blue B color reaction	–	–	–	–
Urease	–	–	–	–
Major ubiquinone	Q-9	n	Q-9	n

*Data from de Hoog *et al.* (1998a) and Barnett *et al.* (2000).

†Data from de Hoog *et al.* (1998b) and Barnett *et al.* (2000).

+, positive; –, negative; l, delayed positive; w, weak; v, variable; n, no data.

Rhodotorula mucilaginosa (Limtong *et al.*, 2008). From the forest soils in the same sampling area as *G. phurueaensis*, various described yeast species were found: *Candida akabanensis*, *Candida diversa*, *Candida fermentati*, *Candida glabrata*, *Candida rugosa*, *Candida saopaulonensis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, *Debaryomyces nepalensis*, *Debaryomyces vanrijiae* var. *vanrijiae*, *Galactomyces reessii*, *Geotrichum fragrans*, *G. vulgare*, *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces hubeiensis*, *Pichia galeiformis*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia pijperi*, *Torulaspora globosa*, *Tetrapisispora namnaoensis* and *Williopsis saturnus* var. *sargentensis*. From our investigations, a single strain of each novel species was discovered. The result implies that only small populations of these species exist in the environment. Investigation of similar environments did not yield any additional isolates, which may indicate that these species are very rare. It was noted that the species of *Dipodascus*

UNCORRECTED PROOF

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

FUK FEMSYR 572 Web pdf =09/07/2009 06:38:20 574794 Bytes 7 PAGES n operator=S.sathali) 9/7/2009 6:38:27 PM

showed a strong substrate preference, particularly for plant materials. The genus *Galactomyces* can be found in broader habitats (de Hoog & Smith, 2004). In this study, *G. siamensis*, which is closest to *D. albidus*, but obtained from estuarine water. Therefore, estuarine water seems to be a new habitat of asexual species of the genus *Dipodascus*. However, based on the limited number of strains the ecological aspect is difficult to evaluate.

Latin diagnosis of *Geotrichum siamensis* sp. nov. Limtong, Kaewwichian, Youngmanitchai, Srisuk et Fujiyama

In agaro YM post dies 7 ad 25 °C cultura plana, sicca, capillata et candida. In agaro farinae Zeae maydis post dies 3 ad 25 °C hyphae verum et arthroconidiies formantur. Hyphae ramosae (2–5 × 6–12 μm) cum arthroconidiies (2–3 × 2–5 μm). Ascosporae non formantur.

Fermentatio nulla. D-Glucosum, D-xylosum, ethanolum, glycerolum, acidum DL-lacticum (lente), acidum succinicum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilatur at non D-galactosum, L-sorbosum, sucrosum, maltosum, cellobiosum, trehalosum, salicinum, lactosum, melibiosum, raffinosum, melezitosum, inulinum, amylum solubile, L-arabinosum, D-arabinosum, D-ribosum, L-rhamnosum, *N*-acetyl-D-glucosaminum, methanolum, erythritolum, ribitolum, galactitolum, D-mannitolum, D-glucitolum, a-methyl-D-glucosidium, salicinum, D-gluconatum, acidum D-glucuronicum, acidum D-galacturonicum, 2-keto-D-gluconatum, 5-keto-D-gluconatum, D-glucono-δ-lactonum, acidum citricum, inositolum, kalium nitricum nec nitrium nitrosum. Crescit in temperatura 25, 30 et 35 °C (infirme) at non in 37 °C. Ad crescentiae vitaminum necessarium est. Non crescit in 0.01% cycloheximido, 50% glucosum, 60% glucosum, 10% natrii chloridum/5% glucosum nec 16% natrii chloridum. Amylum non formatur. Ureum non hydrolysatur. Diazonium caeruleum B non respondens. Ubiquinonum majus: Q-9.

Typus: Stirps TM3-44^T isolatus aqua, Phangnga Provicia, Thailandia. Cultura et conservatus in Collectionie Culturarum in BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailandia ut BCC 29903^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonia conservatus ut NBRC 104880^T et Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands ut CBS 10929^T.

Description of *Geotrichum siamensis* sp. nov. Limtong, Kaewwichian, Youngmanitchai, Srisuk & Fujiyama

Growth on YM agar occurs after 7 days at 25 °C, and colonies are white, flat, dry and powdery to fine hairy. True hyphae are 2–5 × 6–12 μm wide, which disarticulate into rectangular arthroconidia. Arthroconidia are abundantly produced. Arthroconidia are hyaline with 2–3 μm width and 2–5 μm length. In Dalmau plate culture on cornmeal agar at 25 °C after 7 days, true hyphae and arthroconidia are abundantly produced (Fig. 2a). Budding is absent. No ascospores were produced on YM agar, 5% malt extract agar, Fowell's acetate agar, corn meal agar or Gorodkowa agar after 6 weeks at 15 and 25 °C. After 3 weeks at 25 °C in YM broth, pellicles are thick, sink to the bottom of the tube and the medium becomes viscous. The other phenotypic characteristics are shown in Table 1.

The type strain of *G. siamensis*, TM3-44^T, was isolated from estuarine water in a mangrove forest in Khao Lumpee-Haad Thaimueang National Park, Amphoe Thaimueang, Phang-Nga Province, Thailand. The living culture from type was deposited at the BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailand, as BCC 29903^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Q3

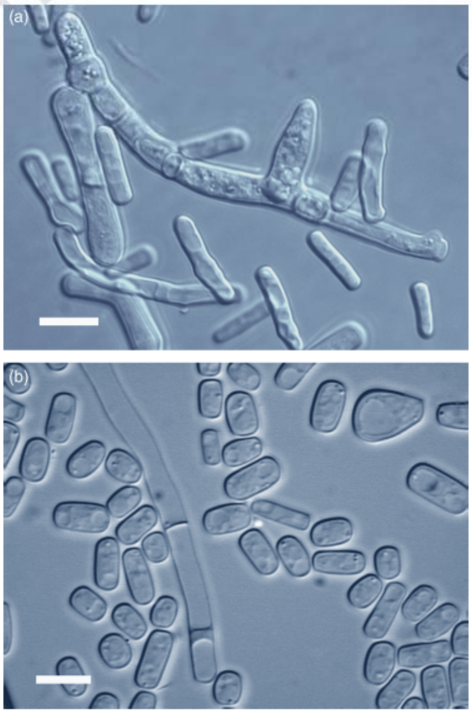


Fig. 2. *Geotrichum siamensis* TM3-44^T (a) and *Geotrichum phurueaensis* LYSM5^T (b) after 3 days on YM agar at 25 °C. True hyphae and arthroconidia; scale bar = 10 μm. Q5

Colour Online
B & W in Print

UNCORRECTED PROOF

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

UK FEMSYR 572 Web pdf =09/07/2009 06:38:20 574794 Bytes 7 PAGES n operator=S.arathali) 9/7/2009 6:38:27 PM

Evaluation, Chiba, Japan, as NBRC 104880^T, and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands, as CBS 10929^T.

Etymology: The species epithet *siamensis* (si.a.men/sis N.L. fem. adj.) was chosen for this novel species referring to Siam, the old name of Thailand, where the type strain was isolated.

Latin diagnosis of *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. Kaewwichian, Youngmanitchai, Srisuk, Fujiyama et Limtong

Ascosporae non fiunt. In agaro 'YM', post dies 3 ad 25 °C, candida, plana, sicca et capillata. In agaro farinae Zeae maydis post dies 3 ad 25 °C hyphae verum et arthroconidiies formantur. Hyphae ramosae (3–6 × 4–12 μm) cum arthroconidiies (3–5 × 4–8 μm). Ascosporae non formantur.

Fermentatio nulla. D-Glucosum, L-sorbosum, inulinum (infirme), amylum solubile (infirme), D-xylosum, ethanolum (infirme), glycerolum, acidum D-galacturonicum, D-glucono-δ-lactonum, acidium DL-lacticum (infirme), acidum succinicum, acidum citricum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilantur at non D-galactosum, sucrosum, maltosum, cellobiosum, trehalosum, lactosum, melibiosum, raffinosum, melizitosum, L-arabinosum, D-arabinosum, D-ribosum, L-rhamnosum, *N*-acetyl-D-gluosaminum, methanolum, erytritolum, ribitolum, galactitolum, D-mannitolum, D-glucitolum, a-methyl-D-glucosidium, salicinum, D-gluconatum, acidum D-glucuronicum, 2-keto-D-gluconatum, 5-keto-D-gluconatum, inositolum, kalium nitricum nec nitrium nitrosum. Vitamina externa ad crescentiam necessaria non sunt. Crescit in 50% glucosum. Non crescit in 60% glucosum, 10% natrii chloridum/5% glucosum, 16% natrii chloridum/5% glucosum et 0.01% cycloheximido. Crescere potest in temperatura 25, 30 et 35 °C (infirme) at non crescit in temperatura 37 °C. Amylum et acidum non formatur. Diazonium caeruleum B non respondens. Ureum non hydrolysatur. Ubiquinonum majus: Q-9.

Typus: Stirps $LYSM5^T$ isolatus ex solo, Loei Provincia, Thailandia. Cultura et conservatus in Collectionie Culturarum in BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailandia ut BCC 34756^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonia conservatus ut NBRC 105674^T et Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands ut CBS 11418^T.

Description of *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. Kaewwichian, Youngmanitchai, Srisuk, Fujiyama & Limtong

Growth on YM agar occurs after 3 days at 25 °C, and colonies are white, flat, dry and powdery to fine hairy. True hyphae are 3–6 × 4–12 μm wide, which disarticulate into rectangular arthroconidia (Fig. 2b). The terminal part of the hyphae may swell. Arthroconidia are abundantly produced. Arthroconidia are hyaline with 3–5 μm width and 4–8 μm length in Dalmau plate culture on cornmeal agar at 25 °C. After 7 days, true hyphae and arthroconidia are abundantly produced. Budding is absent. No ascospores were produced on YM agar, 5% malt extract agar, Fowell's acetate agar, corn meal agar or Gorodkowa agar after 6 weeks at 15 °C. The other phenotypic characteristics are shown in Table 1.

The type strain of *G. phurueaensis*, $LYSM5^T$, was isolated from forest soil collected from Phu Ruea National Park, Loei Province, Thailand. The living culture from type was deposited at the BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailand, as BCC 34756^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan, as NBRC 105674^T, and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands, as CBS 11418^T.

Etymology: The species epithet *phurueaensis* (phu.r-hea.en.sis N.L. fem. adj.) was chosen for this novel species referring to Phu Ruea National Park, Loei Province, where the type strain was isolated.

Acknowledgements

This work was supported in part by the 'Joint Program in the Field of Biotechnology' under the National Research Council of Thailand, National Science and Technology Development Agency of Thailand, and Japan Science and Technology Agency and the TRF/BIOTEC Special Program for 'Biodiversity Research and Training' grant BRT T_352001. Special thanks are due to Assoc. Prof. Dr Hiroko Kawasaki for the confirmation of sequence analysis. Many thanks are due to Dr Pradit Sangthong, Ms Somjit Am-In, Ms Chanita Boonmark and Ms Thanaporn Pinpart for their assistance.

References

Altschul SF, Madden TL, Schäffer JZ, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.

Barnett JA, Payne RW & Yarrow D (2000) *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

de Hoog GS & Smith MTh (2004) Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorph. *Stud Mycol* **50**: 489–515.

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

de Hoog GS, Smith MTh & Gueho E (1986) A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs. *Stud Mycol* **29**: 1–131.

de Hoog GS, Smith MTh & Gueho E (1998a) *Dipodascus* de Lagerheim. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 181–193. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

de Hoog GS, Smith MTh & Gueho E (1998b) *Galactomyces* Redhead & Malloach. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 209–213. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

de Hoog GS, Smith MTh & Gueho E (1998c) *Geotrichum* link: fries. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 544–579. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.

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.

Kuraishi H, Katayama-Fujimura Y, Sugiyama J & Yokoyama T (1985) Ubiquinone systems in fungi. I. Distribution of ubiquinones in the major families of ascomycetes, basidiomycetes, and deuteromycetes, and their taxonomic implications. *T Mycol Soc Jpn* **26**: 383–395.

Kurtzman CP & Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leewenhoek* **73**: 331–371.

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

Limtong S, Yongmanitchai W, Tun MM, Kawasaki H & Seki T (2007b) *Kazachstania siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from forest soil in Thailand. *Int J Syst Evol Micr* **57**: 419–422.

Limtong S, Yongmanitchai W, Kawasaki H & Seki T (2008) *Candida phangngensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Yarrowia* clade, isolated from water in mangrove forests in Phang-Nga Province, Thailand. *Int J Syst Evol Micr* **58**: 515–519.

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

Pimenta RS, Alves PDD, Correa A Jr, Lachance M-A, Prasad GS, Rajaram, Sinha BRRP & Rosa CA (2005) *Geotrichum silvicola* sp. nov. a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. *Int J Syst Evol Micr* **55**: 497–501. Q4

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

Suh S-O & Blackwell M (2006) Three new asexual arthroconidial yeasts, *Geotrichum carabidarum* sp. nov., *Geotrichum histeridarum* sp. nov. and *Geotrichum cucujoidarum* sp. nov. isolated from the gut of insects. *Mycol Res* **110**: 220–228.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**: 4876–4882.

Ueda-Nishimura K & Mikata K (2000) Two distinct 18S rRNA secondary structures in *Dipodascus* (Hemiascomycetes). *Microbiology* **146**: 1045–1051.

Wuczkowski M, Bond C & Prillinger H (2006) *Geotrichum vulgare* sp. nov. a novel asexual arthroconidial yeast. *Int J Syst Evol Micr* **56**: 301–303.

Yamada Y & Kondo K (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. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 77–100. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

UNCORRECTED PROOF

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

UK FEMSYR 572 Web pdf =09/07/2009 06:38:20 574794 Bytes 7 PAGES n operator=S.arsathali) 9/7/2009 6:38:27 PM

RESEARCH ARTICLE

Three anamorphic yeast species *Candida sanitii* sp. nov., *Candida sekii* sp. nov. and *Candida suwanaritii*, three novel yeasts in the *Saturnispora* clade isolated in Thailand

Savitree Limtong[1], Rungluk Kaewwichian[1], Somjit Am-In[1,2], Chanita Boonmak[1], Sasitorn Jindamorakot[1,2], Wichien Yongmanitchai[1], Natana Srisuk[1], Hiroko Kawasaki[3] & Takashi Nakase[2,3]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand; [2]Central Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani, Thailand; and [3]Department of Biotechnology, NITE Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan

Correspondence: Savitree Limtong, Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand. Tel.: +66 2 562 5444, ext. 4017; fax: +66 2 579 2081; e-mail: fscistl@ku.ac.th

Received 20 April 2009; revised 26 June 2009; accepted 29 July 2009.

DOI:10.1111/j.1567-1364.2009.00566.x

Editor: Cletus Kurtzman

Keywords

Candida sanitii sp. nov.; *Candida sekii* sp. nov.; *Candida suwanaritii* sp. nov.; ascomycetous yeast; new yeast species; Thailand.

Abstract

Nine strains of three novel anamorphic yeast species were obtained from samples collected in Thailand including six strains (RV96, RV152, R14, RS9, RS58 and EA1) obtained from estuarine waters collected from two mangrove forests, one strain (ST84) from insect frass and two strains (SR16 and UB13) from forest soils. On the basis of morphological, biochemical, physiological and chemotaxonomic characteristics, and the sequence analysis of the D1/D2 domain of the large subunit rRNA gene, the nine strains were found to represent three novel *Candida* species in the *Saturnispora* clade. Five strains (RV96, RV152, R14, RS9 and RS58) were assigned as a single novel species, which was named *Candida sanitii* sp. nov. The type strain is RV152^T (BCC 25967^T = NBRC 103864^T = CBS 10864^T). Strain EA1 was named as *Candida suwanaritii* sp. nov. The type strain is EA1^T (BCC 29900^T = NBRC 104877^T = CBS 11021^T). Three strains (ST84, SR16 and UB13) represented another novel species, for which *Candida sekii* sp. nov. is proposed. The type strain is ST84^T (BCC 8320^T = NBRC 105671^T = CBS 10931^T).

Introduction

The *Saturnispora* clade was separated from the *Pichia* clade by phylogenetic analysis of rRNA gene divergence (Liu & Kurtzman, 1991; Kurtzman & Robnett, 1998). At present, the *Saturnispora* clade consists of seven recognized species of *Saturnispora*, *Saturnispora ahearnii*, *Saturnispora dispora*, *Saturnispora saitoi*, *Saturnispora zaruensis* (Liu & Kurtzman, 1991), *Saturnispora hagleri* (Morais *et al*., 2005), *Saturnispora mendoncae* and *Saturnispora besseyi* (Kurtzman, 2006), but with three anamorphic species *Candida diversa*, *Candida silvae* (Kurtzman *et al*., 2008) and *Candida siamensis* (Boonmak *et al*., 2009). Strains in this clade were found in various habitats. *Saturnispora dispora*, *S. saitoi* and *S. zaruensis* were found in association with soil and plants, especially exudates of trees (Kurtzman, 1998; Barnett *et al*., 2000). *Saturnispora ahearnii*, *S. besseyi*, *S. hagleri* and *S. mendoncae* were isolated from the muddy water in the rhizosphere of oyster grass (Kurtzman, 2006), marsh water (Kurtzman, 2006), two species of the *Drosophila repleta* group (Morais *et al*., 2005) and sauerkraut (Kurtzman, 2006), respectively. While *C. diversa* was found in grape must, *C. silvae* was observed in various habitats such as vagina, sputum, horse intestine and water in mangrove forest (Meyer *et al*., 1998; Am-In, 2008), and *C. siamensis* was found in sediments in the mangrove forest, rotten wood and wild mushroom (Boonmak *et al*., 2009).

In Thailand, until recently, only anamorphic species in the *Saturnispora* clade were reported. They were *C. diversa*, which was found in forest soil, moss, insect frass and water in mangrove forest (Sumpradit, 2005; Jindamorakot, 2006; Boonmak, 2008), and *C. silvae*, which was reported to be present in water and sediment in mangrove forest (Am-In, 2008; Boonmak, 2008; Boonmak *et al*., 2009).

During the investigations of yeasts in various natural habitats in Thailand, nine strains were found to represent three novel *Candida* species in the *Saturnispora* clade. In this paper, strains RV96, RV152^T, R14, RS9 and RS58, which

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

FEMSYR 566

were isolated from estuarine water in a mangrove forest in Ranong province, are described as a novel species, *Candida sanitii* sp. nov., strain EA1^T, which was obtained from estuarine water in a mangrove forest in Trat province, is proposed as *Candida suwanaritii* sp. nov. and *Candida sekii* sp. nov. is assigned to accommodate strains ST84^T, SR16 and UB13, which were derived from insect frass in Udon Thani province, and forest soils in Surin and Ubon Ratchathani province, respectively.

Materials and methods

Yeast isolation

Strains of the proposed novel species are shown in Table 1. Six yeast strains, RV96, RV152^T, R14, RS9, RS58 and EA1^T, were isolated from six water samples collected from two mangrove forests by membrane filtration following the method of Limtong *et al.* (2007a). Three yeast strains, ST84^T, SR16 and UB13, were isolated using an enrichment technique. Strain ST84^T was obtained from insect frass using yeast extract malt extract (YM) broth supplemented with 0.2% sodium propionate and 100 μg mL^{-1} chloramphenicol (Jindamorakot *et al.*, 2007), while strains SR16 and UB13 were derived from two forest soil samples by the same medium, but supplemented with 0.025% sodium propionate and 200 μg mL^{-1} chloramphenicol (Limtong *et al.*, 2007b). Purified yeast strains were suspended in YM broth (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone and 1% glucose) supplemented with 10% glycerol and maintained at − 80 °C.

DNA sequencing and phylogenetic analysis

Methods for DNA isolation, amplification of the D1/D2 domain of the large subunit (LSU) rRNA gene by PCR and sequencing with the ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) using an ABI PRISM 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems) were described previously (Limtong *et al.*, 2007b). The sequences were compared pairwise using BLASTN search (Altschul *et al.*, 1997), and were aligned with the sequences of related species retrieved from GenBank using the multiple alignment program CLUSTAL_X version 1.81 (Thompson *et al.*, 1997). A phylogenetic tree was constructed from the evolutionary distance data with Kimura's two-parameter correction (Kimura, 1980), using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987). Confidence levels of the clades were estimated from bootstrap analysis (1000 replicates) (Felsenstein, 1985).

Yeast characterization

The strains were characterized morphologically, biochemically and physiologically according to the standard methods described by Yarrow (1998). Carbon assimilation tests were conducted in liquid medium as per the method described by Yarrow (1998). Assimilation of nitrogen compounds was

Table 1. Strains of *Candida sanitii* sp. nov., *Candida suwanaritii* sp. nov. and *Candida sekii* sp. nov. used in this study

		Sample for yeast isolation		
Species/strain	GenBank accession number of D1/D2	Source	Locality	Date of collection
Candida sanitii sp. nov.				
RV96	AB33240	Estuarine water from mangrove forest	Laem Son national park, Ranong province	29 July 1999
RV152^T (= BCC 25967^T = NBRC 103864^T = CBS 10864^T)	AB33397	Estuarine water from mangrove forest	Laem Son national park, Ranong province	29 July 1999
R14	AB332401	Estuarine water from mangrove forest	Laem Son national park, Ranong province	29 January 2005
RS9	AB332402	Estuarine water from mangrove forest	Laem Son national park, Ranong province	9 November 2006
RS58	AB332403	Estuarine water from mangrove forest	Laem Son national park, Ranong province	9 November 2006
Candida suwanaritii sp. nov. EA1^T (= BCC 29900^T = NBRC 104877^T = CBS 11021^T)	AB439256	Estuarine water from mangrove forest	Pred Nai village, Trat province	10 October 2006
Candida sekii sp. nov.				
ST84^T (= BCC 8320^T = NBRC 105671^T = CBS 10931^T)	DQ404448	Insect frass	Haui Laung dam, Udon Thani province	2 February 2001
SR16	AB495287	Forest soil	Huai Thap Than wildlife sanctuary, Surin province	2 May 2007
UB13	AB495288	Forest soil	Kaeng Tana national park, Ubon Ratchathani province	3 May 2007

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

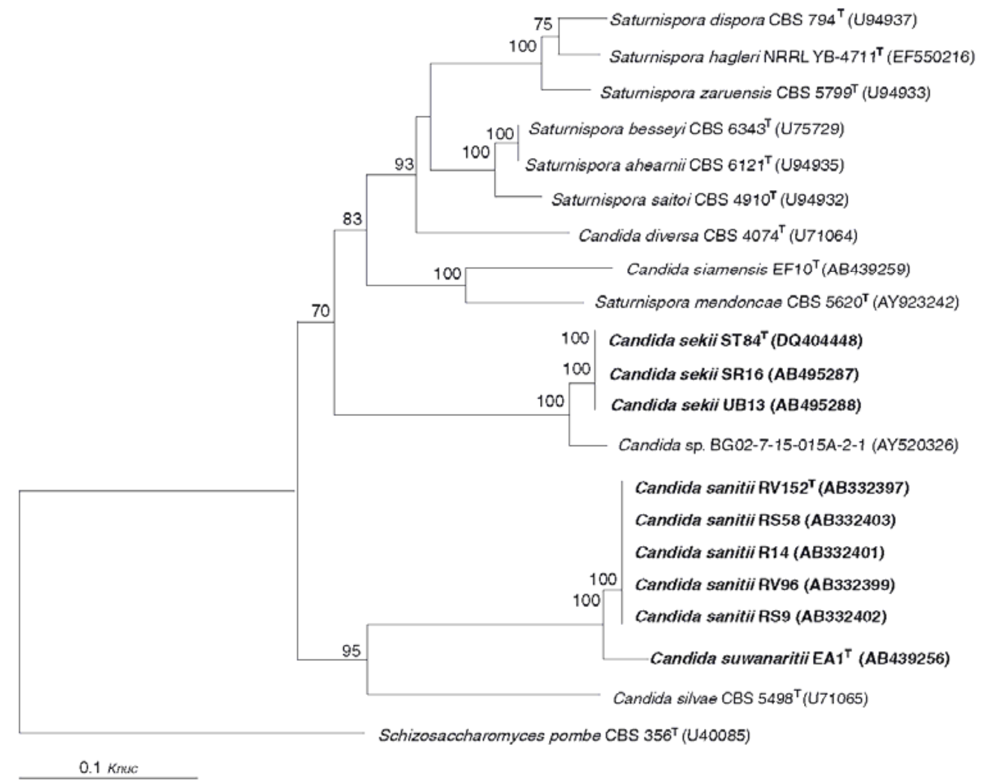


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene, showing the positions of *Candida sanitii* sp. nov. (RV96, RV152^{T}, R14, RS9 and RS58), *Candida suwanaritii* sp. nov. (EA1^{T}) and *Candida sekii* sp. nov. (ST84^{T}, SR16 and UB13) with respect to closely related species. The phylogenetic tree was constructed from the evolutionary distance data corrected by two-parameter transformation of Kimura (1980), using the neighbour-joining method. Numbers indicate percentages of bootstrap sampling, derived from 1000 samples. Bold font represents novel species in this study.

examined on solid media with starved inocula following the method of Nakase & Suzuki (1986). Growth at various temperatures was determined by cultivation in YM broth. Ubiquinones were extracted from cells cultivated in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL of yeast extract peptone dextrose broth (1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose) on a rotary shaker at 28 °C for 24–48 h and purified according to the method described by Yamada & Kondo (1973) and Kuraishi *et al.* (1985). Isoprenologues were identified by HPLC as described previously (Limtong *et al.*, 2007b).

Results and discussion

Phylogenetic analysis

The sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene of five strains (RV96, RV152^{T}, R14, RS9 and RS58) were the same. Their closest species in terms of pairwise sequence similarity was *C. silvae*, but with 12% nucleotide substitutions (63 nucleotide substitutions and 11 gaps out of 525 nt). Strain EA1^{T} differed from the five strains mentioned previously by 1.7% nucleotide substitution (nine nucleotide substitutions and no gap out of 534 nt) and from *C. silvae* by 13.7% nucleotide substitutions (74 nucleotide substitutions and five gaps out of 541 nt). Three strains (ST84^{T}, SR16 and UB13) had identical sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene. In terms of pairwise sequence similarity of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene, these three strains were closely related to *Candida* sp. BG02-7-15-015A-2-1 and *Candida* sp. FN7S06, but with 1.1% nucleotide substitutions (nine nucleotide substitutions out of 531 nt) and 2.2% nucleotide substitutions (11 nucleotide substitutions out of 506 nt), respectively. They differed by 11.1% nucleotide substitutions (59 nucleotide substitutions

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

and six gaps out of 533 nt) from the type strain of *C. diversa*, their closest described species. According to Kurtzman & Robnett (1998), yeast strains showing nucleotide substitutions > 1% in the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene are usually different species. Therefore, we concluded that the five strains (RV96, RV152^T, R14, RS9 and RS58) represented one novel species, strain EA1^T represented the second novel species and the three strains (ST84^T, SR16 and UB13) represented the third novel species. The phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene further demonstrated that the three novel species were placed in the *Saturnispora* clade, but at positions distinct from each other and the other species of the clade (Fig. 1). The five strains (RV96, RV152^T, R14, RS9 and RS58) of the first novel species were in the same position and clustered with *C. silvae*, their closest species in terms of pairwise sequence similarity supported by a high bootstrap value. The second species, strain EA1^T, was in the same clade as the first novel species, but at a distinct position. The three strains (ST84^T, SR16 and UB13) of the third novel species were in the same position and clustered with *Candida* sp. BG02-7-15-015A-2-1, their closest relative, with high bootstrap support.

Phenotypic characteristics

Cells of the first novel species (RV96, RV152^T, R14, RS9 and RS58) and the second novel species (EA1^T) were spherical to ovoidal (Figs 2 and 3) while cells of the third novel species (ST84^T, SR16 and UB13) were ovoidal, ellipsoidal to cylindrical (Fig. 4). Cells of the three novel species were proliferated by multilateral budding. No pseudohyphae and true hyphae were formed by the second novel species (EA1^T) while pseudohyphae were formed, but true hyphae were not formed by the other two novel species. Ascospores were not produced on 5% malt extract agar, Fowell's acetate agar, corn meal agar or Gorodkowa agar after 6 weeks at 15 °C.

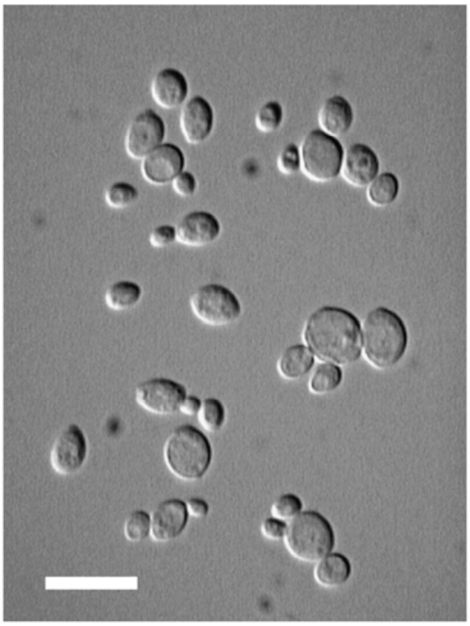


Fig. 3. *Candida suwanaritii* sp. nov. (EA1^T). Yeast cells on YM agar after 3 days at 25 °C. Scale bar = 10 μm.

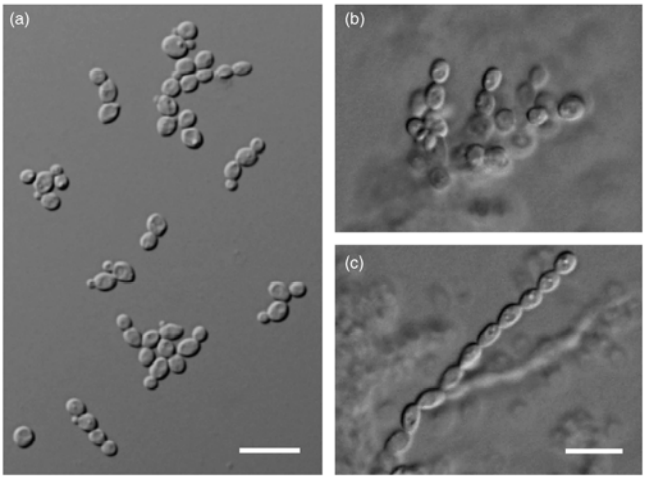


Fig. 2. *Candida sanitii* sp. nov. (RV152^T). (a) Yeast cells on YM agar after 4 days at 28 °C. (b, c) Pseudohyphae formed on corn meal agar after 7 days at 28 °C. Scale bar = 10 μm.

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

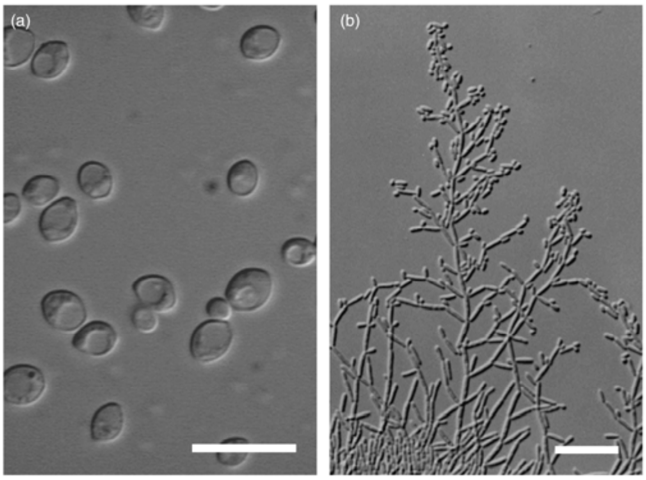


Fig. 4. *Candida sekii* sp. nov. (ST84[T]). (a) Yeast cells in YM broth for 3 days at 25 °C. (b) Pseudohyphae formed on corn meal agar after 7 days at 25 °C. Scale bar = 10 μm.

The other phenotypic characteristics of the novel species are shown in Table 2.

Species delineation and identification

On the basis of morphological, biochemical, physiological and chemotaxonomic characteristics, and the sequence analysis of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene, we concluded as follows: strains RV96, RV152[T], R14, RS9 and RS58 represent one novel species of *Candida* and the name *C. sanitii* sp. nov. is proposed. Strain EA1[T] represented the second novel species and the name *C. suwanaritii* sp. nov. is assigned to it. Similarly, *C. sekii* sp. nov. is named for the third novel species consisting of strains ST84[T], SR16 and UB13.

Candida sanitii sp. nov. can be distinguished from *C. silvae*, its closest species, by its inability to ferment glucose, inability to assimilate ribitol and D-glucitol, and ability to grow in a vitamin-free medium, on 50% glucose, and at 40 °C (weak) and 42 °C (weak) (Table 2). *Candida suwanaritii* sp. nov. can be separated from *C. sanitii* sp. nov. by its ability to ferment glucose, and to assimilate trehalose (weak) and soluble starch, inability to assimilate glycerol (weak) to grow at 40 and 42 °C and to produce acid from glucose (Table 2). From *C. silvae*, *C. suwanaritii* sp. nov. can be distinguished by its ability to assimilate trehalose (weak) and soluble starch, inability to assimilate glycerol, ribitol and D-glucitol, ability to grow in a vitamin-free medium and on 50% glucose and inability to grow at 40 °C (Table 2). *Candida sekii* sp. nov. is separated from *C. diversa*, its closest phylogenetic relative, by its inability to assimilate D-mannitol and D-glucitol, and ability to grow in a vitamin-free medium (weak) and on 50% and 60% glucose (Table 2).

Latin diagnosis of *Candida sanitii* Limtong, Am-In, Kaewwichian, Boonmak, Jindamorakot, Yongmanitchai, Srisuk, Kawasaki et Nakase sp. nov.

In medio liquido: 'YM', post dies 3 ad 28 °C cellulae globosae aut ovoideae (2.0–3.0 × 2.0–3.5 μm), singulae aut binae, per germinationem multipolarem reproducentes. In agaro 'YM', post dies 3 ad 28 °C, cultura butyrosa, cremea, sublatum, glabra et margine glabra. Pseudohyphae formantur nec hyphae non formantur. Ascosporae non formantur.

Fermentatio nulla. D-Glucosum, ethanolum, glycerolum (exigue), D-mannitolum, acidium DL-lacticum, acidum succinicum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilantur at non D-galactosum, L-sorbosum, sucrosum, maltosum, cellobiosum, trehalosum, lactosum, melibiosum, raffinosum, melezitosum, inulinum, amylum solubile, D-xylosum, L-arabinosum, D-arabinosum, D-ribosum, L-rhamnosum, D-glucosaminum, *N*-acetyl-D-glucosaminum, methanolum, erythritolum, ribitolum, galactitolum, D-glucitolum, α-methyl-D-glucosidum, salicinum, acidum D-gluconicum, acidum D-glucuronicum, acidum D-galacturonicum, acidum 2-keto-D-gluconicum, acidum 5-keto-D-gluconicum, D-glucono-δ-lactonum, acidum citricum, inositolum, nitrosum nec nitricum. Vitamina externa ad crescentiam necessaria non sunt. Crescit in 50% glucosum. Non crescit in 10% NaCl/5% glucosum, 15% NaCl/5% glucosum, 60% glucosum nec 0.01% cycloheximido.

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

Table 2. Phenotypic characteristics of *Candida sanitii* sp. nov., *Candida suwanaritii* sp. nov., *Candida sekii* sp. nov. and their closest described species, *Candida silvae* and *Candida diversa*

	Species				
Characteristics	*C. sanitii*	*C. suwanaritii*	*C. sekii*	*C. silvae**	*C. diversa**
Fermentation					
D-Glucose	–	+	+	s, D	+
D-Galactose	–	–	–	–	–
Sucrose	–	–	–	–	–
Maltose	–	–	–	–	–
Lactose	–	–	–	–	–
Trehalose	–	–	–	–	–
Raffinose	–	–	–	–	–
Assimilation of carbon compounds					
D-Glucose	+	+	+	+	+
D-Galactose	–	–	–	–	–
L-Sorbose	–	–	–	–	–
Sucrose	–	–	–	–	–
Maltose	–	–	–	–	–
Cellobiose	–	–	–	–	–
Trehalose	–	w	–	–	–
Lactose	–	–	–	–	–
Melibiose	–	–	–	–	–
Raffinose	–	–	–	–	–
Melezitose	–	–	–	–	–
Inulin	–	–	–	–	–
Soluble starch	–	+	–	–	–
D-Xylose	–	–	–	–	v
L-Arabinose	–	–	–	–	–
D-Arabinose	–	–	–	v	–
D-Ribose	–	–	–	–	–
L-Rhamnose	–	–	–	–	–
D-Glucosamine	–	n	–	–	–
N-Acetyl-D-glucosamine	–	–	–	–	–
Methanol	–	–	–	–	–
Ethanol	+	+	+	+	+
Glycerol	s	–	w	+/l	+/l/ –
Erythritol	–	–	–	–	–
Ribitol	–	–	–	+/l	+/l/ –
Galactitol	–	–	–	–	–
D-Mannitol	+	+	–	+	+
D-Glucitol	–	–	–	+	+
α-Methyl-D-glucoside	–	–	–	–	–
Salicin	–	–	–	–	–
D-Gluconate	–	–	–	– /l	–
D-Glucuronate	–	–	–	–	–
D-Galacturonate	–	–	–	–	–
2-Keto-D-gluconate	–	–	–	–	–
5-Keto-D-gluconate	–	–	–	–	–
D-Glucono-δ-lactone	–	–	–	n	v
DL-Lactic acid	+	+	w	v	D/ –
Succinic acid	+	+	+	+	+

Table 2. Continued.

	Species				
Characteristics	*C. sanitii*	*C. suwanaritii*	*C. sekii*	*C. silvae**	*C. diversa**
Citric acid	–	–	+	v	+
Inositol	–	–	–	–	–
Assimilation of nitrogen compounds					
Nitrate	–	–	–	–	–
Nitrite	–	–	–	–	–
Ethylamine	+	+	+	+	+
L-Lysine	+	+	+	+	+
Cadaverine	+	+	+	+	+
Other growth characteristics					
Vitamin-free medium	+	+	w	–	–
10% NaCl/5% glucose	–	–	–	–	–
16% NaCl/5% glucose	–	–	–	n	v
50% Glucose	+	+	+	–	–
60% Glucose	–	–	+	–	–
0.01% Cycloheximide	–	–	–	–	–
Growth at 20 °C	+	+	+	n	n
Growth at 25 °C	+	+	+	+	+
Growth at 30 °C	+	+	+	+	+
Growth at 37 °C	w	+	w	v	w/ –
Growth at 40 °C	w	–	–	–	–
Growth at 42 °C	w	–	–	–	–
Growth at 45 °C	–	–	–	–	–
Acid formation from glucose	+	–	–	–	–
Amyloid production	–	–	–	–	–
Diazonium blue B colour reaction	–	–	–	–	–
Urease	–	–	–	–	–
Major ubiquinone	Q-7	Q-7	Q-7	Q-7	Q-7

*Data from Meyer *et al.* (1998) and Barnett *et al.* (2000).
+, positive; –, negative; l, latent; w, weak; s, slow; v, variable; n, no data.

Crescere potest in temperatura 20, 25, 30, 37 (infirme), 40 (infirme) et 42 °C (infirme) et non crescit in temperatura 45 °C. Acidum formatur. Amylum non formatur. Diazonium caeruleum B non respondens. Ureum non hydrolysatur. Ubiquinonum majus: Q-7.

Holotypus: Stirps RV152^T isolatus aqua, Ranong provincia, Thailandia. Cultura et conservatus in Collectionie Culturarum in BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailandia ut BCC 25967^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonia conservatus ut NBRC 103864^T et Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands ut CBS 10864^T.

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

Description of *Candida sanitii* Limtong, Am-In, Kaewwichian, Boonmak, Jindamorakot, Yongmanitchai, Srisuk, Kawasaki & Nakase sp. nov.

Growth in YM broth: After 3 days at 28 °C, cells are spherical to ovoidal (2.0–3.0 × 2.0–3.5 μm) and occur singly or in pairs (Fig. 2a). Budding is multilateral. Growth on YM agar: After 3 days at 28 °C, the streak culture is butyrous, cream-coloured, raised, with a smooth surface and has an entire margin. Pseudohyphae are formed, but true hyphae are not formed in slide culture on corn meal agar after 7 days at 28 °C (Fig. 2b). Ascospores are not produced from individual strains or strains crossed on 5% malt extract agar, Fowell's acetate agar, corn meal agar and Gorodkowa agar after 6 weeks at 15 °C. The other phenotypic characteristics are shown in Table 2.

Holotype: RV152^{T} is the holotype of *C. sanitii*. The strain was isolated from estuarine water collected from a mangrove forest in Laem Son national park, Ranong province, Thailand. The living culture from the type was deposited at the BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailand, as BCC 25967^{T}; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan, as NBRC 103864^{T}; and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands, as CBS 10864^{T}.

Etymology: The species epithet *sanitii* (sa.ni.ti.i. N.L.gen.n) was chosen for this novel species in honour of Professor Dr Sanit Aksornkaew, who is the world expert in mangrove ecology and biodiversity.

Latin diagnosis of *Candida suwanaritii* Limtong, Boonmak, Kaewwichian, Am-In, Jindamorakot, Yongmanitchai, Srisuk, Kawasaki et Nakase sp. nov.

In medio liquido: 'YM', post dies 3 ad 25 °C cellulae globosae aut ovoideae (2.0–3.5 × 2.5–4.5 μm), singulae aut binae, per germinationem multipolarem reproducentes. In agaro 'YM', post dies 30 ad 25 °C, cultura butyrosa, cremea, sublatum, glabra et margine glabra. Pseudohyphae et hyphae non formantur. Ascosporae non formantur.

D-Glucose fermentatur at non D-galactosum, sucrosum, maltosum, lactosum, raffinosum nec trehalosum. D-Glucosum, trehalosum (infirme), amylum solubile, ethanolum, D-mannitolum, acidium DL-lacticum, acidum succinicum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilantur at non D-galactosum, L-sorbosum, sucrosum, maltosum, cellobiosum, lactosum, melibiosum, raffinosum, melezitosum, inulinum, D-xylosum, L-arabinosum, D-arabinosum, D-ribosum, L-rhamnosum, *N*-acetyl-D-glucosaminum, methanolum, glycerolum, erythritolum, ribitolum, galactitolum, D-glucitolum, α-methyl-D-glucosidum, salicinum, acidum D-gluconicum, acidum D-glucuronicum, acidum D-galacturonicum, acidum 2-keto-D-gluconicum, acidum 5-keto-D-gluconicum, D-glucono-δ-lactonum, acidum citricum, inositolum, nitrosum nec nitricum. Vitamina externa ad crescentiam necessaria non sunt. Crescit in 50% glucosum. Non crescit in 10% NaCl/5% glucosum, 15% NaCl/5% glucosum, 60% glucosum nec 0.01% cycloheximido. Crescere potest in temperatura 20, 25, 30 et 37 °C et non crescit in temperatura 40, 42 nec 45 °C. Amylum et acidum non formatur. Diazonium caeruleum B non respondens. Ureum non hydrolysatur. Ubiquinonum majus: Q-7.

Holotypus: Stirps EA1^{T} isolatus aqua, Trat provincia, Thailandia. Cultura et conservatus in Collectionie Culturarum in BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailandia ut BCC 29900^{T}; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonia conservatus ut NBRC 104877^{T} et Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands ut CBS 11021^{T}.

Description of *Candida suwanaritii* Limtong, Boonmak, Kaewwichian, Am-In, Jindamorakot, Yongmanitchai, Srisuk, Kawasaki & Nakase sp. nov.

Growth in YM broth: After 3 days at 25 °C, cells are spherical to ovoidal (2.0–3.5 × 2.5–4.5 μm) and occur singly or in pairs (Fig. 3). Budding is multilateral. Growth on YM agar: After 30 days at 25 °C, the streak culture is butyrous, cream-coloured, raised, with a smooth surface and has an entire margin. Pseudohyphae and true hyphae are not formed in slide culture on corn meal agar after 7 days at 25 °C (Fig. 2b). Ascospores are not produced on 5% malt extract agar, Fowell's acetate agar, corn meal agar and Gorodkowa agar after 6 weeks at 15 °C. The other phenotypic characteristics are shown in Table 2.

Holotype: EA1^{T} is the holotype of *C. suwanaritii*. The strain was isolated from estuarine water collected from a mangrove forest in Pred Nai village, Trat province, Thailand. The living culture from the type was deposited at the BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailand, as BCC 29900^{T}; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan, as NBRC 104877^{T}; and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands, as CBS 11021^{T}.

Etymology: The species epithet *suwanaritii* (su.wa.na.ri.ti.i. N.L.gen.n) was chosen for this novel species in honour of Associate Professor Poonpilai Suwanarit, who is one of the pioneers in Microbial Biodiversity research in Thailand.

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

Latin diagnosis of *Candida sekii* Limtong, Kaewwichian, Jindamorakot, Am-In, Boonmak, Yongmanitchai, Srisuk, Kawasaki et Nakase sp. nov.

In medio liquido: 'YM', post dies 3 ad 25 °C cellulae ovoideae, ellipsoideae, aut elongatae (2.0–4.5 × 2.5–8.5 μm), singulae aut binae, per germinationem multipolarem reproducentes. In agaro 'YM', post dies 30 ad 25 °C, cultura griseo albida, glabra, nittidae et margine grabra. Pseudohyphae formantur nec hyphae non formantur. Ascosporae non formantur.

D-Glucose fermentatur at non D-galactosum, sucrosum, maltosum, lactosum, trehalosum nec raffinosum. D-Glucosum, ethanolum, glycerolum (infirme), acidium DL-lacticum (infirme), acidum succinicum, acidum citricum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilantur at non D-galactosum, L-sorbosum, sucrosum, maltosum, cellobiosum, trehalosum, lactosum, melibiosum, raffinosum, melezitosum, inulinum, amylum solubile, D-xylosum, L-arabinosum, D-arabinosum, D-ribosum, L-rhamnosum, D-glucosaminum, *N*-acetyl-D-glucosaminum, methanolum, erythritolum, ribitolum, galactitolum, D-glucitolum, D-mannitolum, D-glucitolum, α-methyl-D-glucosidum, salicinum, acidum D-gluconicum, acidum D-glucuronicum, acidum D-galacturonicum, acidum 2-keto-D-gluconicum, acidum 5-keto-D-gluconicum, D-glucono-δ-lactonum, inositolum, nitrosum nec nitricum. Vitamina externa ad crescentiam necessaria non sunt (infirme). Crescit in 50% glucosum et 60% glucosum. Non crescit in 10% NaCl/5% glucosum, 15% NaCl/5% glucosum nec 0.01% cycloheximido. Crescere potest in temperatura 20, 25, 30 et 37 (infirme) at non crecit in temperatura 40, 42 nec 45 °C. Amylum et acidum non formatur. Diazonium caeruleum B non respondens. Ureum non hydrolysatur. Ubiquinonum majus: Q-7.

Holotypus: Stirps ST-84^{T} isolatus ex dejectus frassum, Haui Laung Dam, Udon Thani provincia, Thailandia. Cultura et conservatus in Collectionie Culturarum in BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailandia ut BCC 8320^{T}; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonia conservatus ut NBRC 105671^{T} et Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands ut CBS 10931^{T}.

Description of *Candida sekii* Limtong, Kaewwichian, Jindamorakot, Am-In, Boonmak, Yongmanitchai, Srisuk, Kawasaki & Nakase sp. nov.

Growth in YM broth: After 3 days at 25 °C, cells are ovoidal, ellipsoidal to cylindrical (2.0–4.5 × 2.5–8.5 μm) and occur singly or in pairs (Fig. 3a). Budding is multilateral. Growth on YM agar: After 30 days at 25 °C, the streak culture was greyish white, smooth, shining and had an entire margin. Pseudomycelia are formed, but true hyphae are not formed in slide culture on corn meal agar (Fig. 3b). Ascospores are not produced from individual strains or strains crossed on 5% malt extract agar, corn meal agar, Fowell's acetate agar, Gorodkowa agar and YM agar after 6 weeks at 15 °C. The other phenotypic characteristics are shown in Table 2.

Holotype: ST84^{T} is the holotype of *C. sekii*. The strain was isolated from insect frass collected from a tree in Khuan Haui Laung, Udon Thani Province, Thailand. The living culture from the type was deposited at the BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailand, as BCC 8320^{T}; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan, as NBRC 105671^{T}; and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands, as CBS 10931^{T}.

Etymology: The species epithet *sekii* (se.ki.i. N.L.gen.n) was chosen for this novel species in honour of Professor Dr Tatsuji Seki for the great contribution to Microbial Technology and Yeast Biodiversity researches in Thailand.

Acknowledgements

This work was partially supported by the TRF/BIOTEC Special Program for 'Biodiversity Research and Training' grant BRT T_151006, BRT T_351136 and BRT T_352001.

References

Altschul SF, Madden TL, Schäffer JZ, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.

Am-In S (2008) Yeast diversity in water from mangrove forest in Laem Son national park, Ranong province. MSc Thesis, Kasetsart University, Thailand.

Barnett JA, Payne RW & Yarrow D (2000) *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Boonmak C (2008) Diversity of yeast in water and sediment from mangrove forest in the upper coast of the Gulf of Thailand. MSc Thesis, Kasetsart University, Thailand.

Boonmak C, Jindamorakot S, Kawasaki H, Youngmanitchai W, Suwanarit P, Nakase T & Limtong S (2009) *Candida siamensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Saturnispora* clade isolated in Thailand. *FEMS Yeast Res* **9**: 668–672.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.

Jindamorakot S (2006) The species diversity of yeasts in some natural habitats of Thailand. PhD Thesis, Kasetsart University, Thailand.

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

Jindamorakot S, Limtong S, Yongmanitchai W, Tuntirungkij M, Potacharoen W, Kawasaki H & Nakase T (2007) Two new anamorphic yeasts, *Candida thailandica* sp. nov. and *Candida lignicola* sp. nov., isolated from insect frass in Thailand. *FEMS Yeast Res* **7**: 1409–1414.

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.

Kuraishi H, Katayama-Fujimura Y, Sugiyama J & Yokoyama T (1985) Ubiquinone systems in fungi. I. Distribution of ubiquinones in the major families of ascomycetes, basidiomycetes, and deuteromycetes, and their taxonomic implications. *T Mycol Soc Jpn* **26**: 383–395.

Kurtzman CP (1998) *Pichia* emend Kurtzman. *The Yeasts, a Taxonomic Study,* 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 273–352. Elsevier Sciences, Amsterdam, the Netherlands.

Kurtzman CP (2006) New species and new combinations in the yeast genera *Kregervanrija* gen. nov., *Saturnispora* and *Candida*. *FEMS Yeast Res* **6**: 288–297.

Kurtzman CP & Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leewenhoek* **73**: 331–371.

Kurtzman CP, Robnett CJ & Basehoar-Powers E (2008) Phylogenetic relationships among species of *Pichia, Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen.nov., *Lindera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res* **8**: 939–954.

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

Limtong S, Yongmanitchai W, Tun MM, Kawasaki H & Seki T (2007b) *Kazachstania siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from forest soil in Thailand. *Int J Syst Evol Micr* **57**: 419–422.

Liu ZW & Kurtzman CP (1991) Phylogenetic relationships among species of *Williopsis* and *Saturnispora* gen. nov. as determined from partial rRNA sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **60**: 21–30.

Meyer SA, Payne RW & Yarrow D (1998) *Candida*. Berkhout. *The Yeasts, a Taxonomic Study,* 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 454–573. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

Morais BM, Lachance MA & Rosa CA (2005) *Saturnispora hagleri* sp. nov., a yeast species isolated from *Drosophila* flies in Atlantic rainforest in Brazil. *Int J Syst Evol Micr* **55**: 1725–1727.

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

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

Sumpradit T (2005) Yeast diversity in soils from hill evergreen, mixed deciduous, dry dipterocarp and pine forests of Nam Nao national park. PhD Thesis, Kasetsart University, Thailand.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**: 4876–4882.

Yamada Y & Kondo K (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. *The Yeasts, a Taxonomic Study,* 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 77–100. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

© 2009 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวรุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร
เกิดวันที่	17 มกราคม 2528
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสุโขทัย
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ

รางวัลผลการเรียนดีเด่น เป็นผู้สอบได้แต้มระดับคะแนนเฉลี่ยในปีการศึกษา 2548 ตั้งแต่ 3.50 ขึ้นไป (พ.ศ. 2548)

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับสอง (พ.ศ. 2550)

ทุนการศึกษาที่ได้รับ ได้รับทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์จากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย เป็นระยะเวลา 1 ปี (พ.ศ. 2552)

ประวัติการฝึกงานและประสบการณ์การทำงาน

เข้ารับการฝึกงานในสังกัดแผนกจุลชีววิทยา ฝ่ายบริการห้องปฏิบัติการ สถาบันอาหาร (National Food Institute Thailand) เป็นระยะเวลา 1 เดือน (พ. ศ. 2549)