ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา | จุลชีววิทยา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบน

Diversity of Yeast in Water and Sediment from Mangrove Forest in the Upper Coast of the Gulf of Thailand

นามผู้วิจัย นางสาวชนิตา บุญมาก

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ่มทอง, Dr.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, Dr.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกูล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลน บริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบน

Diversity of Yeast in Water and Sediment from Mangrove Forest in the Upper Coast of the Gulf of Thailand

โดย

นางสาวชนิตา บุญมาก

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2552

ชนิตา บุญมาก 2552: ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ่มทอง, Dr.Eng. 147 หน้า

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนด้านชายฝั่งตะวันออกที่จังหวัดจันทบุรีและตราด และชายฝั่งตะวันตกที่จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์โดยการแยกและจัดจำแนกด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่ายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ 138 สายพันธุ์ มี 134 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 34 สปีชีส์ ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis, Candida albicans, C. diversa, C.* cf. *glabrata, C. fukuyamaensis, C. intermedia, C. natalensis, C. parapsilosis , C. pseudolambica, C. quercitrusa, C. rugosa, C. sanittii, C. silvae, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Clavispora lusitaniae, Galactomyces reessii, Hanseniaspora clermontiae, H. guilliermondii, Kloeckera lindneri, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, L. veronae, Pichia caribbica, P. guilliermondii, P. kudriavzevii, P. occidentalis, P. terricola, Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii* และ *T. maleeae* มี 2 สายพันธุ์เหมือนสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Hanseniaspora* sp. ST-464 และ 2 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida astuarii* sp. nov. และ *Candida prachuapensis* sp. nov. ส่วนยีสต์จากตัวอย่างจากตะกอนดิน 56 สายพันธุ์ พบว่า 52 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 17 สปีชีส์ คือ *Candida chrysomelidarum, C. gotoi, C. pseudolambica, C. sanittii, C. silvae, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Debaryomyces hansenii, D. nepalensis, Hanseniaspora guilliermondii, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Metschnikowia koreensis, Pichia kudriavzevii, P. occidentalis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* ส่วน 1 สายพันธุ์เหมือนกับยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Pichia* sp. IS1-01 นอกจากนี้ 2 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Pichia tratensis* sp. nov. และ *Saturnispora siamensis* sp. nov. จากการศึกษาแสดงว่ายีสต์ที่พบทั้งในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยมี 7 สปีชีส์ โดยพบ *Pichia guilliermondii*, *P. kudriavzevii* และ *Rhodotorula mucilaginosa* ที่พบเฉพาะในน้ำ ส่วน *Metschnikowia koreensis* พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ และ *Candida thaimueangensis, C. tropicalis, Hanseniaspora guilliermondii, Kluyveromyces siamensis* และ *Kodamaea ohmeri* พบทั้งในน้ำและตะกอนดิน โดยยีสต์ที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ *Rhodotorula mucilaginousa* (35 สายพันธุ์), *Candida tropicalis* (31 สายพันธุ์) และ *Kluyveromyces siamensis* (19 สายพันธุ์)

_____ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Chanita Boonmak 2009: Diversity of Yeast in Water and Sediment from Mangrove Forest in the Upper Coast of the Gulf of Thailand. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Professor Savitree Limtong, Dr.Eng. 147 pages.

Diversity of yeast in water and sediment from mangrove forests on the upper coast of the Gulf of Thailand in east coast (Chantaburi and Trat) and west coast (Phetchaburi and Prachuap Khiri Khan) were investigated by isolation and identification on the basis of analysis of the D1/D2 domain of the large subunit rDNA sequence similarity. From 138 yeast strains which were isolated from water, 134 strains were identified to be 34 described yeast species consisted of *Brettanomyces naardenensis, Candida albicans, C. diversa, C.* cf. *glabrata, C. fukuyamaensis, C. intermedia, C. natalensis, C. parapsilosis , C. pseudolambica, C. quercitrusa, C. rugosa, C. sanittii, C. silvae, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Clavispora lusitaniae, Galactomyces reessii, Hanseniaspora clermontiae, H. guilliermondii, Kloeckera lindneri, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, L. veronae, Pichia caribbica, P. guilliermondii, P. kudriavzevii, P. occidentalis, P. terricola, Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii* and *T. maleeae*, two strains were similar to an undescribed species namely *Hanseniaspora* sp. ST-464, and two strains were assigned to be two novel species which were named as *Candida astuarii* sp. nov. and *Candida prachuapensis* sp. nov. Among 56 strains which were isolated from sediment, 52 strains were identified to be 17 described species, namely *Candida chrysomelidarum, C. gotoi, C. pseudolambica, C. sanittii, C. silvae, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Debaryomyces hansenii, D. nepalensis, Hanseniaspora guilliermondii, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Metschnikowia koreensis, Pichia kudriavzevii, P. occidentalis* and *Wickerhamomyces sydowiorum,* two strains were similar to an undescribed species *Pichia* sp. IS1-01. While two strains were assigned to be two novel species which were named as *Pichia tratensis* sp. nov. and *Saturnispora siamensis* sp. nov. The result of investigation revealed that seven yeast species were found in both east and west coasts of the Gulf of Thailand mangrove forests. The species which were found only in water of both east and west coastal mangrove forests of the Gulf of Thailand were *Pichia guilliermondii*, *P. kudriavzevii* and *Rhodotorula mucilaginosa* whereas *Metschnikowia koreensis* was particularly found in sediment. As well as *Candida thaimueangensis, C. tropicalis, Hanseniaspora guilliermondii, Kluyveromyces siamensis* and *Kodamaea ohmeri*, could be detected in both water and sediment. The species which were frequency isolated from mangrove forests in the upper coast of the Gulf of Thailand are *Rhodotorula mucilaginosa* (35 strains), *Candida tropicalis* (31 strains) and *Kluyveromyces siamensis* (19 strains).

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งให้ความช่วยเหลือสนับสนุนการทำวิจัยอย่างดียิ่ง และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความอนุเคราะห์ดูแลเสมอมา รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาและงานวิจัยบางส่วน

ขอขอบคุณดร. วิเชียร ยงมานิตชัย และ ดร. ศศิธร จินดามรกฎ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ เพื่อน และน้องๆ ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกคนที่ให้ความอบอุ่นตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา รวมทั้งให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ และอา ที่ช่วยอุดหนุนการศึกษา รวมทั้งให้กำลังใจ และให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา

ชนิตา บุญมาก

มกราคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	43
สรุปผล	125
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	128
ภาคผนวก	135
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	147

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำในป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีรายงานแล้ว	10
2	ความหลากหลายของยีสต์ในพืชในป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีรายงานแล้ว	12
3	การจำแนกประเภทของแอสโคมัยซีตัสยีสต์	16
4	การจำแนกประเภทของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์	17
5	การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (membrane filtration)	44
6	การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากตัวอย่างตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวน (enrichment technique)	46
7	สรุปยีสต์ที่แยกได้ในแต่ละแหล่ง	47
8	การจัดจำแนกยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกได้จากน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราด และจันทบุรี ในปี พ. ศ. 2549	51
9	การจัดจำแนกยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว และสปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตะกอนดินในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราด และจันทบุรี ในปี พ. ศ. 2549	61
10	ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	65
11	ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	68
12	การจัดจำแนกยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว และสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ในปี พ. ศ. 2549	70

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	การจัดจำแนกยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกได้จากตะกอนดินจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ในปี พ. ศ. 2549	73
14	ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	77
15	ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	79
16	ยีสต์ที่พบในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรี	84
17	ยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรี	88
18	ยีสต์ที่พบในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์	93
19	ยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์	95
20	ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน	100

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้าง rDNA; 18S rDNA, 5.8S rDNA, 26S rDNA, 5S rDNA, ITS (internal transcribed spacer) และ IGS (intergenic spacer)	20
2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสจากการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน และความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS1 ของยีสต์สกุล *Trichosporon* ในกลุ่มต่าง ๆ	23
3	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EA1^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	106
4	สัณฐานวิทยาของ *Candida astuarii* sp. nov. (EA1^{T})	109
5	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ WB15^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	111
6	สัณฐานวิทยาของ *Candida prachuapensis* sp. nov. (WB15^{T})	112

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
7	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EF17^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	116
8	สัณฐานวิทยาของ *Pichia tratensis* sp. nov. (EF17^{T})	119
9	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EF10^{T} และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	121
10	สัณฐานวิทยาของ *Saturnispora siamensis* sp. nov. (EF10^{T})	124

ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลน บริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบน

Diversity of Yeast in Water and Sediment from Mangrove Forest in the Upper Coast of the Gulf of Thailand

คำนำ

ยีสต์จัดเป็นเชื้อราชั้นสูงชนิดหนึ่งซึ่งมีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดียว นิเวศวิทยาของยีสต์เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่ควรพิจารณาสำหรับการค้นหายีสต์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และเป็นปัจจัยพื้นฐานในการเกิดวิวัฒนาการของยีสต์ เนื่องจากยีสต์สปีชีส์ใหม่นั้น เกิดโดยการคัดเลือกจากแรงกดดันจากสภาพแวดล้อม ดังนั้นการศึกษาติดตามชนิดยีสต์ในแต่ละแหล่งสภาพแวดล้อมอาจช่วยสนับสนุนให้สามารถศึกษาวิวัฒนาการของยีสต์ที่กำลังเกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ปัจจุบันยีสต์ที่รู้จักแล้วมีเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ทั้งหมดในธรรมชาติเท่านั้น และยังมีอีกกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ที่ยังไม่ถูกค้นพบ ดังนั้นการศึกษายีสต์ในแหล่งต่าง ๆ ในธรรมชาติจึงอาจมีการค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนที่อาจมีประโยชน์ในอนาคตได้

ป่าชายเลนเป็นป่าไม่ผลัดใบที่พบทั่วไปบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ อ่าวหรือทะเลสาบที่มีการสะสมตะกอนดิน และเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึงของประเทศในแถบโซนร้อนรวมทั้งประเทศไทย ซึ่งพบป่าชายเลนกระจายตามชายฝั่งทะเลในภาคตะวันออก ภาคกลางและภาคใต้ทั้งทางด้านทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีคุณค่ามหาศาลทั้งในด้านป่าไม้ การประมง และสิ่งแวดล้อม โดยเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสัตว์น้ำ เป็นที่อยู่อาศัยและที่อนุบาลสัตว์น้ำในระยะตัวอ่อน นอกจากนี้ป่าชายเลนยังมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลระหว่างระบบนิเวศทางทะเลและระบบนิเวศบนบก และยังช่วยป้องกันพื้นที่ชายฝั่งทะเลจากคลื่นลมแรงและการกัดเซาะดินอีกด้วย ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีความจำเพาะและความหลากหลายทางชีวภาพสูง จุลินทรีย์ซึ่งรวมถึงยีสต์นั้นมีบทบาทสำคัญต่อประชากรในระบบนิเวศป่าชายเลนเนื่องจากทำหน้าที่เป็นทั้งผู้ผลิตเริ่มต้นและผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบริเวณนั้น

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในป่าชายเลนทั้งในต่างประเทศและประเทศไทยนั้นมีไม่มากนัก โดยในประเทศไทยได้มีการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนเฉพาะด้านทะเลอันดามัน คือ ที่จังหวัดพังงา ณ อุทยานแห่งชาติเขาลำปีหาดท้ายเหมือง และอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะระ เกาะพระทอง และที่จังหวัดระนอง ณ อุทยานแห่งชาติแหลมสน ยีสต์ที่พบมีทั้งชนิดที่มีการค้นพบแล้วและชนิดที่ไม่เคยมีรายงานการค้นพบมาก่อนในโลก โดยขณะนี้ได้รายงานแล้ว 4 สปีชีส์คือ *Kluyveromyces siamensis, Candida phangngensis, Candida thaimueangensis* และ *Torulaspora maleeae* ผลจากการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนพบว่า ส่วนใหญ่เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ได้แก่ ยีสต์ในสกุล *Candida, Debaryomyces, Kluyveromyces, Pichia* เป็นต้น และมีความหลากหลายในระดับสปีชีส์สูงแต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่ายีสต์ชนิดใดเป็นสปีชีส์ที่พบมากในป่าชายเลน

เนื่องจากยังไม่มีการรายงานความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลด้านอ่าวไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้ในน้ำและตะกอนดินในป่าชายเลนบริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันออกของอ่าวไทย และบริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันตกของอ่าวไทย โดยการแยกยีสต์และนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และในกรณีที่พบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในโลกก็จะทำการศึกษาเพิ่มเติมตามหลักการของอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี จากนั้นจึงเสนอตั้งชื่อวิทยาศาสตร์และรายงานโดยการตีพิมพ์ต่อไป ผลจากการวิจัยนอกจากจะได้ข้อมูลด้านความหลากหลายของยีสต์ในบริเวณนี้แล้ว ยังสามารถนำไปเปรียบเทียบกับความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณด้านทะเลอันดามัน นอกจากนั้นยังสามารถเก็บรักษายีสต์ ซึ่งเป็นทรัพยากรชีวภาพที่สำคัญของประเทศเพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินที่เก็บจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลด้านอ่าวไทย ในเขตจังหวัดตราด จันทบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ โดยการแยกยีสต์และจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

2. จัดจำแนก ตั้งชื่อ และรายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนโดยอาศัยอนุกรมวิธานพอลีฟาซิก ซึ่งประกอบด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี

การตรวจเอกสาร

ความหลากหลายของยีสต์

1. ความหลากหลายทางชีวภาพ

อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ 2535 (The Biological Diversity Convention, 1992) ได้ให้คำนิยามของคำว่า ความหลากหลายทางชีวภาพไว้ว่า “หมายถึง ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตจากทุกแหล่งอันประกอบด้วยระบบนิเวศบนบก ระบบนิเวศในทะเล และระบบนิเวศในแหล่งน้ำอื่น ๆ ตลอดจนความซับซ้อนทางนิเวศของระบบนั้น รวมถึงความหลากหลายในสปีชีส์ ระหว่างสปีชีส์ และความหลากหลายของระบบนิเวศ” (ชนภัทร, 2538)

“ความหลากหลายทางชีวภาพ” มีอยู่ทั้งในระบบนิเวศบนบก ระบบนิเวศในทะเล และระบบนิเวศในแหล่งน้ำอื่น ๆ ซึ่งสามารถแยกย่อยได้เป็น 3 ประเภทคือ

1) ความหลากหลายของพันธุกรรม (genetic diversity) หมายถึง ความหลากหลายจากความแตกต่างของยีนในสิ่งมีชีวิตแต่ละประเภท ในคำอธิบายเบื้องต้นอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ 2535 ของสำนักงานนโยบายและทรัพยากรธรรมชาติและแผนสิ่งแวดล้อม ใช้คำว่า “ความหลากหลายในสปีชีส์” (ชนภัทร, 2538) เป็นความหลากหลายทางชีวภาพในประชากรของสปีชีส์เดียวกัน มีความหมายไปจนถึงรหัสพันธุกรรมในระดับนิวคลีโอไทด์ ยีน และโครโมโซม (Gaston, 2004) ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรของสปีชีส์ ใด ๆ มีพันธุกรรมที่แตกต่างหลากหลาย เป็นผลมาจากกระบวนการวิวัฒนาการ หากสิ่งมีชีวิตไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจทำให้ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของโลกที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และไม่สามารถพัฒนาความต้านทานต่อโรคใหม่ ๆ ได้ (สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม [สผ.], 2539) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความอยู่รอดของสปีชีส์ ใด ๆ จึงตกอยู่ในความเสี่ยงหากในประชากรของสปีชีส์นั้นไม่มีความหลากหลายในระบบพันธุกรรม

2) ความหลากหลายของสปีชีส์ (species diversity) หรือความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต หมายถึง ความหลากหลายจากความแตกต่างของสปีชีส์ที่มีอยู่ในโลก ในคำอธิบายเบื้องต้น

อนุสัญญาฯ ใช้คำว่า “ความหลากหลายระหว่างสปีชีส์” (ชนภัทร, 2538) เป็นความหลากหลายทางชีวภาพที่สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนที่สุด มีความหมายครอบคลุมในระดับการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นชั้นต่าง ๆ ตั้งแต่สปีชีส์ สกุล ไปจนถึงอาณาจักร (Gaston, 2004)

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

2. นิเวศวิทยาของยีสต์ในแหล่งน้ำและตะกอนดินใต้น้ำ

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

ยีสต์ไม่ได้พบทั่วไปทุกแห่งในชีวภาค หากแต่มีชุมชีพที่แน่นอนในแต่ละสปีชีส์ แต่ละชุมชีพอาจกล่าวได้ว่าเป็นแหล่งที่อยู่ของกลุ่มยีสต์หลายสปีชีส์ที่อาศัยในชุมชีพนั้น ซึ่งเป็นสถานที่ที่แท้จริงที่กลุ่มยีสต์นั้นดำรงชีพอยู่ โดยไม่ได้ปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่น และอาจกล่าวได้ว่าชุมชีพนั้น ๆ เป็นนิชของยีสต์ทุกสายพันธุ์ที่อยู่ในระบบนั้นด้วย (Lachance and Starmer, 1998)

โดยธรรมชาติ แหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์มีขอบเขตค่อนข้างจำกัด จำนวนของยีสต์ในบริเวณหนึ่ง ๆ ขึ้นกับสารอาหารและความสามารถในการดูดซึมสารอาหารเป็นสำคัญ ยีสต์ในแหล่งน้ำก็เช่นกัน ธาตุอาหารส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดในแหล่งน้ำได้จากแหล่งภายนอก เช่น พืช และสัตว์ รวมทั้งมนุษย์ โดยเฉพาะสิ่งที่มนุษย์สร้างขึ้นนั้นจัดว่าเป็นแหล่งสารอาหารที่ใหญ่ที่สุดของยีสต์ ซึ่งส่งผลให้เกิดมลภาวะตามมา บทบาทของยีสต์ในระบบนิเวศที่สำคัญคือ การเป็นผู้ย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ และมีส่วนช่วยในการหมุนเวียนของสารอาหารและแร่ธาตุในสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ยีสต์ยังเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและแพลงค์ตอนสัตว์ในทะเลอีกด้วย (Spencer and Spencer, 1997)

ยีสต์พบได้เสมอในแม่น้ำ ทะเลสาบ น้ำกร่อย ทะเล และมหาสมุทร แหล่งน้ำในปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่าไม่มีแหล่งน้ำธรรมชาติอีกแล้ว มีเพียงน้ำที่ปนเปื้อนมลภาวะน้อย ปานกลางและมาก ยีสต์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในน้ำทั้งสามประเภทนี้ และพบมีปริมาณมากในแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์มาก ในมหาสมุทรยีสต์มีจำนวนมากกว่าราชนิดอื่น โดยเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล ส่วนแอสโคมัยซีตัสยีสต์พบมากในแหล่งที่มีสารอินทรีย์มากกว่า สำหรับในน้ำจืดพบว่ายีสต์ที่พบมากในน้ำจืด เป็นยีสต์ที่พบได้ทั่ว ๆ ไปหรือเป็นยีสต์ที่สัมพันธ์กับมลภาวะ ยีสต์ที่พบมากในแหล่งน้ำ ได้แก่ ยีสต์ในสกุล *Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Hansenula, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Sporobolomyces, Trichosporon* เป็นต้น สำหรับในตะกอนดิน พบว่าเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์จำนวนมากทั้งในตะกอนดินใต้น้ำจืดและน้ำเค็มโดยเฉพาะในแหล่งน้ำเสีย ยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนชั้นบนส่วนใหญ่มักเป็นยีสต์ที่พบในแหล่งน้ำและไม่มีความสามารถในการหมัก ปริมาณยีสต์ในตะกอนดินขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประ กอบทางเคมีของตะกอน สารอินทรีย์ สารก่อมลภาวะ ความลึกของน้ำ และสิ่งมีชีวิตอื่นในชุมชีพ โดยทั่วไปปริมาณยีสต์ในแหล่งน้ำจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีระดับมลภาวะมากขึ้นโดย เฉพาะยีสต์สีแดงนั้นจัดเป็นหนึ่งในดัชนีบ่งชี้มลภาวะในน้ำเสียจากชุมชน ยีสต์สีแดงที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นสกุล *Rhodotorula* แต่พบบางสปีชีส์ของ *Rhodosporidium* และ *Sporobolomyces* ด้วยเช่นกัน โดย *Sporobolomyces* เป็น

เบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ที่เมแทบอลิซึมโดยอาศัยออกซิเจนและมักสัมพันธ์กับใบพืชที่อยู่บนบก ดังนั้นยีสต์สกุลนี้จึงอาจลงไปสู่แหล่งน้ำโดยการที่ใบไม้ตกลงไปหรือเป็นผลจากน้ำขึ้นน้ำลงซึ่งไปชะเอายีสต์ที่อยู่บนใบไม้หรือต้นหญ้าที่อยู่บริเวณริมฝั่งลงไปสู่แหล่งน้ำ ยีสต์สีแดงเหล่านี้ใช้สารประกอบหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สีดำแยกจากแหล่งน้ำได้บ่อยเช่นกันแต่มักมีปริมาณน้อยในน้ำทุกชนิด และที่เป็นตัวแทน คือ *Aureobasidium pullulans* ซึ่งภายหลังได้ถูกจัดจำแนกไปเป็นเชื้อรา โคโลนีของ *A. pullulans* บนอาหารที่ใช้แยกมักเริ่มด้วยลักษณะที่เหมือนยีสต์ทั่ว ๆ ไป คือมีสีครีม แดงและเขียว ขอบเรียบภายหลังมักสร้างสีดำและมีขอบซึ่งมีลักษณะคล้ายราก *A. pullulans* สัมพันธ์กับใบไม้และดิน ดังนั้นการเข้าไปอยู่ในแหล่งน้ำอาจเกิดด้วยวิธีเดียวกับ *Sporobolomyces* (สาวิตรี, 2549; Lachance and Starmer, 1998; Spencer and Spencer, 1997)

3. ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลน

ในป่าชายเลนและปากแม่น้ำบริเวณที่มีมลภาวะมากพบว่ามีความหลากหลายของยีสต์สูงโดยมีจำนวนสปีชีส์ของแอสโคมัยซีตัสยีสต์สูงกว่าในแหล่งน้ำประเภทอื่น แต่กลับมีจำนวนสปีชีส์ของเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์น้อยกว่าในแหล่งน้ำประเภทอื่นอย่างเห็นได้ชัด แม้ว่าจะมีการค้นพบแอสโคมัยซีตัสยีสต์จำนวนมาก แต่ในแต่ละสปีชีส์พบเพียง 1-2 ไอโซเลต ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่ายีสต์ชนิดใดเป็นสปีชีส์ที่พบมากในป่าชายเลน (Nagahama, 2006) สำหรับตัวอย่างการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลน เช่น Hagler และคณะ (1982) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในตะกอนดินบริเวณปากแม่น้ำที่ปนเปื้อนมลภาวะบริเวณเมืองริโอเดอจาเนโร ทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศบราซิล พบมียีสต์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับ *Candida krusei* (*Candida krusei*-like group) อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น *Candida krusei* , *Candida sorbosa, Candida valida,Pichia kluyveri, Pichia membranaefaciens* และ *Pichia terricola* จากนั้นในปี ค.ศ. 1993 ได้ศึกษายีสต์และแบคทีเรียโคลิฟอร์มในแหล่งน้ำและเนินทรายในป่าชายเลนซึ่งอยู่ใกล้กับเมืองริโอเดอจาเนโร พบว่ามีแบคทีเรียโคลิฟอร์มจำนวนมาก สำหรับความหลากหลายของยีสต์นั้นพบว่า ในแหล่งน้ำที่มีการสะสมใบของพืชในตระกูล *Neoregelia cruenta* เป็นหลักมีปริมาณ *Aureobasidium pullulans* และเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจำนวนมาก ส่วนในแหล่งน้ำที่มีการสะสมใบของพืชในตระกูล *Quesnelia quesneliana* เป็นหลักพบมีปริมาณแอสโคมัยซีตัสยีสต์สูง จากผลการวิจัยจึงได้สรุปว่ายีสต์ที่พบในแหล่งน้ำที่มีการสะสมใบพืชทั้งสองชนิดนี้เป็นยีสต์ที่มีความจำเพาะและเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของชุมชีพดังกล่าวโดยไม่ได้ปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่น

หรืออาจเรียกได้ว่าเป็นยีสต์ที่เป็นออทอกโทนัส (Hagler, 1993) ต่อมาในปี ค. ศ. 1997 Soares และคณะ ศึกษาความหลากหลายของแอสโคมัยซีตัสยีสต์ในตะกอนดินบริเวณป่าชายเลนใกล้เมืองริโอเดอจาเนโร พบว่ายีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นยีสต์ในสกุล *Candida* เช่น *Candida glabrata, Candida guilliermondii, Candida parapsilosis, Candida krusei* และ *Candida tropicalis* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. tropicalis* พบในทุกแหล่งที่ทำการศึกษา และพบว่าในบริเวณที่ปนเปื้อนมลภาวะพบมียีสต์สกุล *Candida* มากเป็นพิเศษนอกจากนี้ยังพบมียีสต์ในสกุล *Pichia* เช่น *Pichia anomala, P. kluyveri, P. membranaefaciens, P. terricola* และพบ *Kluyveromyces astuarii* กระจายอยู่ทั่วไปด้วย (Soares *et al*., 1997) ในปี ค. ศ. 1995 Araujo และคณะ ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณอ่าว Sepetiba ประเทศบราซิล พบว่ามีจำนวนเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ต่อจำนวนยีสต์ทั้งหมดในแหล่งต่าง ๆ ดังนี้12.6 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ในน้ำ 3.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ในตะกอนดิน และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และมียีสต์ในสปีชีส์ *Pichia membranaefaciens, Candida valida*-like*, Candida krusei, Candida sorbosa, Candida colliculosa*-like*, Candida famata*-like*, Candida guilliermondii, Candida albicans, Candida silvae, Candida boidinii, Kloeckera* spp. และ *Kluyveromyces aestuarii* ซึ่งเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์แพร่กระจายโดยทั่วไปในน้ำและตะกอนดิน (Araujo, 1995) และในปี ค.ศ. 2004 Almeida และคณะ ได้ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำบริเวณปากแม่น้ำทากัส ประเทศโปรตุเกสด้วยวิธี microsatellite primed PCR (MSP-PCR) fingerprinting ควบคู่กับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene พบว่าการกระจายตัวของยีสต์บริเวณปากแม่น้ำได้รับอิทธิพลจากสารอาหารที่ไหลมาพร้อมกับน้ำจากแม่น้ำมากกว่าการขึ้นลงของน้ำทะเล ยีสต์ชนิดที่พบเป็นหลัก ได้แก่ *Candida catenulata*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa* และ *Rhodosporidium diobovatum* (Almeida *et al*., 2004)

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

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในป่าชายเลนในประเทศไทยนั้นส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในป่าชายเลนด้านทะเลอันดามัน ที่มีรายงานแล้วเช่น การศึกษาความ

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

ตารางที่ 1 ความหลากหลายของยีสต์และราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ในน้ำในป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีรายงานแล้ว

สปีชีส์	จ.ระนอง	จ.พังงา	อ้างอิง
Aureobasidium			
Aureobasidium pullulans		+	Limtong *et al.,* 2008
Candida			
Candida berthetii	+		สมจิต, 2551
Candida boidinii	+		สมจิต, 2551
Candida butyri	+		สมจิต, 2551
Candida conglobata		+	Limtong *et al.,* 2008
Candida cf. Glabrata		+	Limtong *et al.,* 2008
Candida glabrata	+		สมจิต, 2551
Candida membranifaciens		+	Limtong *et al.,* 2008
Candida parapsilosis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong *et al.,* 2008
Candida picinguabensis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong *et al.,* 2008
Candida phangngensis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong *et al.,* 2009
Candida pseudolambica	+		สมจิต, 2551
Candida rugosa	+		สมจิต, 2551
Candida silvae	+		สมจิต, 2551
Candida thaimueangensis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong *et al.,* 2009
Candida tropicalis	+	+	สมจิต, 2551; Limtong *et al.,* 2008
Debaryomyces			
Debaryomyces nepalensis	+		สมจิต, 2551
Galactomyces			
Galactomyces geotrichum	+		สมจิต, 2551
Issatchenkia			
Issatchenkia occidentalis	+		สมจิต, 2551
Issatchenkia orientalis	+		สมจิต, 2551
Issatchenkia siamensis	+		สมจิต, 2551
Issatchenkia terricola	+		สมจิต, 2551

ตารางที่ 1 (ต่อ)

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

ตารางที่ 2 ความหลากหลายของยีสต์ในพืชในป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีรายงานแล้ว

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

ตารางที่ 2 (ต่อ)

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

อนุกรมวิธานของยีสต์ในปัจจุบัน

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

สำหรับหนังสือที่นิยมใช้เป็นคู่มือในการจัดจำแนกและจำแนกประเภทของยีสต์ในปัจจุบัน คือ The Yeasts, A Taxonomic Study ซึ่งพิมพ์ครั้งที่ 4 ในปี ค.ศ. 1998 โดยมี C.P. Kurtzman และ J.W. Fell เป็นบรรณาธิการ แบ่งยีสต์ออกเป็น 2 ไฟลัม โดยอาศัยความแตกต่างของการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ คือ Phylum Ascomycota ซึ่งมีการสร้างแอสโคสปอร์ ยีสต์ในกลุ่มนี้เรียกว่า แอสโคมัยซีตัสยีสต์ ซึ่งแบ่งออกเป็น แอสโคมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และแอสโคมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ประกอบด้วย 3 ชั้น คือ Archiascomycetes, Euascomycetes และ Hemiascomycetes และ Phylum Basidiomycota ซึ่งมีการ

สร้างเบสิดิโอสปอร์ เรียกยีสต์ในกลุ่มนี้ว่า เบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ ซึ่งแบ่งออกเป็นเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์แบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ Urediniomycetes, Hymenomycetes และ Ustilaginomycetes โดยมียีสต์ใน 2 ไฟลัมรวม 94 สกุล และ 689 สปีชีส์ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 2 และ 3 และได้กำหนดลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกยีสต์ดังนี้

1. การจัดจำแนกยีสต์โดยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม

สำหรับการจัดจำแนกยีสต์โดยวิธีดั้งเดิมอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีเป็นหลักดังนี้ (Yarrow, 1998)

1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

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

ตารางที่ 3 การจำแนกประเภทของแอสโคมัยซีตัสยีสต์

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

หมายเหตุ [a] เครื่องหมายคำถามที่อยู่หน้าชื่อสกุลแสดงให้เห็นว่าวงศ์นี้ยังมีการจัดจำแนกที่ไม่คงที่

[b] เครื่องหมายคำถามที่อยู่ในชั้น *Hemiascomycetes* แสดงว่าการจัดจำแนกยังไม่คงที่

[c] เครื่องหมายคำถามที่สกุล *Endomyces* และวงศ์ Endomycetaceae แสดงว่ามีการจัดจำแนกที่ไม่คงที่

ที่มา: Kurtzman and Fell (1998)

ตารางที่ 4 การจำแนกประเภทของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์

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

ที่มา: Nakase (2001)

1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

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

2. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมี

อนุกรมวิธานเคมี คือการประเมินองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งมีชีวิต ทั้งสารแมแทบอไลต์ปฐมภูมิ และสารแมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (สาวิตรี, 2549) ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ ได้แก่ ชนิดของโคเอนไซม์คิว องค์ประกอบของผนังเซลล์ ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น ปริมาณก้วนีนและไซโทซีน ปกติการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมีจะใช้ร่วมกับการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

3. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

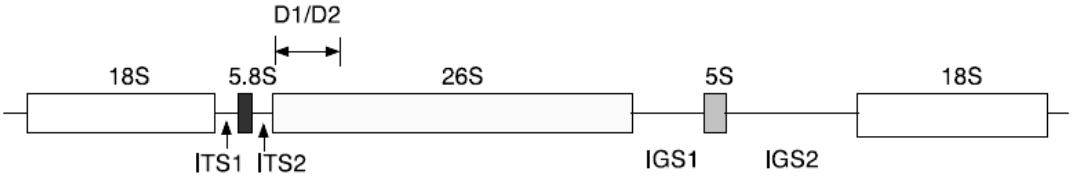
การศึกษาระดับโมเลกุลเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยให้การจัดจำแนกยีสต์เป็นไปอย่างถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมีนั้นเป็นการตรวจลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ การแสดงออกหรือผลที่ได้จากการทดสอบจึงอาจมีการเปลี่ยนแปลงไม่คงที่ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ และสภาพแวดล้อมในการบ่ม ทำให้มักได้ผลการจัดจำแนกที่ผิดพลาด อีกทั้งยังต้องใช้แรงงานและเวลาในการทดสอบมากอีกด้วย ปัจจุบันจึงมีการนำ

อนุกรม -วิธานระดับโมเลกุลซึ่งให้ผลที่แม่นยำกว่าเนื่องจากเป็นการศึกษาลักษณะทางยีโนไทป์โดยตรง เข้ามาช่วยในการจัดจำแนก นอกจากนี้อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอ ยังสามารถสะท้อนถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้อย่างชัดเจน ซึ่งวิธีการจัดจำแนกด้วยวิธีดั้งเดิมไม่สามารถทำได้ การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลประกอบด้วย การศึกษาในระดับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และการศึกษาดีเอ็นเอในนิวเคลียส ได้แก่ การทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน การหาปริมาณกัวนีนและไซโทซีน การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคต่าง ๆ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรดนิวคลีอิก (สาวิตรี, 2549)

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

สำหรับการศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์นั้นนิยมศึกษาดีเอ็นเอไรโบโซม เนื่องจากไรโบโซมเป็นออร์แกเนลที่ปรากฏในทุกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกัน แม้ว่าในเซลล์หนึ่งเซลล์จะมีไรโบโซมหลายชุด แต่ทุกชุดก็มีวิวัฒนาการเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอของไรโบโซมยังมีทั้งส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อยหรือบริเวณอนุรักษ์ และส่วนที่วิวัฒนาการมากหรือวิวัฒนาการเร็วที่เรียกว่าบริเวณผันแปร หรือบริเวณอนุรักษ์น้อย ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิงเพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณผันแปรได้ (สาวิตรี, 2549) โดยให้ความสำคัญกับทั้งบริเวณที่มีการ และบริเวณที่ไม่มีการแสดงออก บริเวณที่มีการแสดงออกที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ โดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์) และ 18S rDNA (ความยาวประมาณ 1700 นิวคลีโอไทด์) ส่วนบริเวณที่ไม่มีการแสดงออกที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกอีกบริเวณหนึ่งคือ internal transcribed spacer

(ITS) ทั้ง ITS1 และ ITS2 (ความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์) (Scorzetti และคณะ, 2002) ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างดีเอ็นเอไรโบโซม แสดงดังภาพที่ 1



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

ที่มา: Sugita and Nishikawa (2003)

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

โดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA มีขนาด 600 นิวคลีโอไทด์ อยู่ที่ปลายด้าน 5’ ของ 26S rDNA ใน *Saccharomyces cerevisiae* คือ นิวคลีโอไทด์ที่ 63-642 ของ rRNA เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็ว จึงมีความแตกต่างมากพอที่จะใช้จำแนกสปีชีส์ของยีสต์ได้ ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในการเพิ่มจำนวนในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ NL-1 (5’-GCATATCAATAAGCGGAGG AAAAG) และ NL-4 (5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) เกณฑ์ที่ใช้ในการจัดจำแนกเป็นไปตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น คือ ยีสต์สปีชีส์เดียวกันเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ควรมีมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ หรือเกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 6 นิวคลีโอ-ไทด์ ถ้ามีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันมากกว่านี้ให้จัดเป็นยีสต์ต่างสปีชีส์ (Kuztman and Robnett, 1998) ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการเลือกบริเวณที่จะใช้ในการศึกษาระดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการมีความสำคัญมาก ดังนั้นการเลือกใช้บริเวณใดในการจัดจำแนกจึงควรคำนึงถึงระดับความเร็วในการวิวัฒนาการของยีนในบริเวณนั้น ว่าควรมีอัตราการวิวัฒนาการอยู่ในระดับที่พอเหมาะ ไม่เร็วเกินไปจนยากในการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม แต่ก็ไม่ควรช้าเกินไปจนไม่สามารถใช้แยกสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก ๆ (sister species) ได้ นอกจากนี้ความยาวของบริเวณที่ต้อง

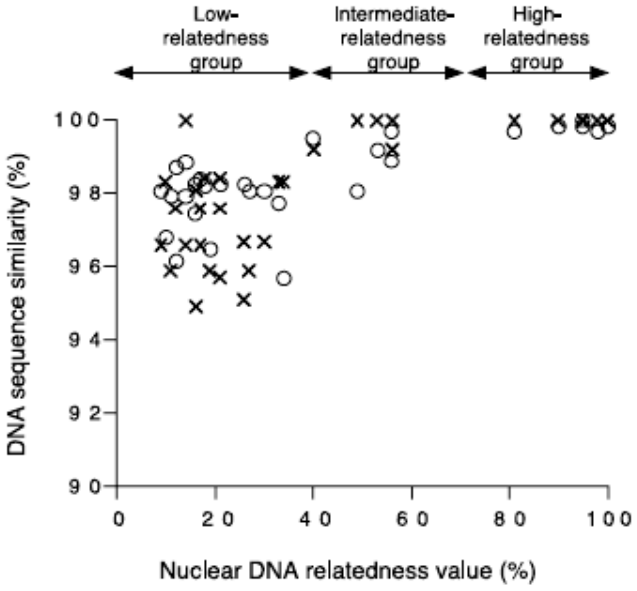
การวิเคราะห์ก็มีความสำคัญ ความยาวที่พอเหมาะไม่สั้นหรือยาวเกินไปจะทำให้ผลการจัดจำแนกนั้นมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น (Valente และคณะ, 1999)

สำหรับบริเวณที่ไม่มีการแสดงออกที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์คือ บริเวณ spacer ของ 26S rDNA ซึ่งมีหลายบริเวณที่ทำการศึกษา เช่น internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer (IGS) ซึ่งนิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ ราอื่น และพืช บริเวณ ITS เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของ 18S rDNA ของหน่วยย่อยขนาดเล็กของไรโบโซมกับปลายด้าน 5' ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซม โดยประกอบด้วยบริเวณ ITS1 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S rDNA กับ 5S rDNA และบริเวณ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่าง 5S rDNA กับ 26S rDNA (ภาพที่ 1) ความยาวของบริเวณ ITS แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสปีชีส์ แต่สายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีความยาวค่อนข้างคงที่แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์อาจมีการผันแปรสูง ทำให้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมทำได้ยาก และทำให้การใช้บริเวณ ITS ในการจัดจำแนกมีข้อจำกัดคือ ใช้ในการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากเท่านั้น เช่น การแยกสปีชีส์ที่วิเคราะห์ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ-ไทด์ในโดเมน D1/D2 แล้วพบว่ามีความใกล้ชิดกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ จึงจะทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ส่วนบริเวณ IGS เดิมเรียกว่า non-transcribed spacer (NTS) ประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ IGS1 อยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบ-โซมกับปลาย 5' ของ 5S rDNA และ IGS2 ซึ่งอยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของ 5S rDNA กับปลาย 5' ของ 18S rDNA ของหน่วยย่อยขนาดเล็กของไรโบโซมชุดถัดไป (ภาพที่ 1) บริเวณนี้เป็นบริเวณที่ได้รับความสนใจน้อยสำหรับการจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์เนื่องจากมีความแปรผันสูง (Valente และคณะ, 1999)

Kurtzman และ Robnett (1998) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และบริเวณ 18S rDNA ของแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ยีสต์สกุล *Candida* และยีสต์สกุลที่มีการการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศกลุ่มอื่น พบว่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองบริเวณมีความสอดคล้องกัน ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA หากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 600 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 คือ มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 6 นิวคลีโอไทด์ สายพันธุ์นั้นจะถูกจัดเป็นคนละสปีชีส์ และสายพันธุ์ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่าง

กัน 0-3 นิวคลีโอไทด์จัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก (Kurtzman และ Robnett, 1998)

จากการเปรียบเทียบการจัดจำแนกยีสต์สกุล *Trichosporon* โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอ-ไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS1 กับความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน พบว่าจากกราฟความสัมพันธ์ (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าในยีสต์กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันสูงมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS1 สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเป็นยีสต์ในสปีชีส์เดียวกันจริง เพราะเกณฑ์ในการจัดจำแนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS1 ตามวิธีของ Pharmaceutical Society of Japan และ Japanese Pharmacopoeia ระบุไว้ว่า ในยีสต์สปีชีส์เดียวกันความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ควรมีมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับบริเวณ ITS1 นั้นควรมีความเหมือนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์จึงจะจัดเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกันได้ และเมื่อพิจารณาในยีสต์กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันปานกลาง และยีสต์กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันต่ำจะเห็นว่า ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ให้ผลเป็นไปตามเกณฑ์ในการจัดจำแนกทั้งในแบบการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน แต่เมื่อพิจารณากรณีของ ITS1 แล้วกลับไม่เป็นไปตามนั้น ไม่ว่าจะเป็นยีสต์กลุ่มที่มีความสัมพันธ์กันปานกลางหรือต่ำ ความเหมือนของลำดับนิวคลี-โอไทด์ในบริเวณ ITS1 ก็มีค่ามากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์เสมอ ซึ่งตามเกณฑ์ของ Japanese Pharmacopoeia จะจัดให้เป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกันทั้งหมด ผลที่ได้นี้ไม่ตรงกับผลจากการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน สรุปได้ว่า การจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 มีความแม่นยำน้อยกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และอาจทำให้ผลการจัดจำแนกผิดพลาดได้ง่าย (Sugita และ Nishikawa, 2003)



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

ที่มา: Sugita และ Nishikawa, 2003

การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์นอกจากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บน rDNA แล้วยังมีอีกวิธีการหนึ่งซึ่งได้รับความนิยมและมีความแม่นยำสูง คือ ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน หรือดีเอ็นเอรีแอสโซซิเอชัน ซึ่งนิยมใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับสปีชีส์ ปกติเมื่อดีเอ็นเอสายคู่ได้รับความร้อนจะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และเมื่ออุณหภูมิค่อย ๆ ลดลง ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นสายคู่สมจะกลับมาจับกันเป็นดีเอ็นเอสายคู่อีกครั้งเรียกว่าเกิดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน หรือดีเอ็นเอรีแอสโซซิเอชัน การจับคู่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะ

เกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวสองสาย ดังนั้นถ้านำดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากจุลินทรีย์สองสายพันธุ์มาทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันจะสามารถบอกถึงความเหมือนและความแตกต่างของจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ ได้ โดยทั่วไปถ้าความสัมพันธ์มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์นั้นถือว่าอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ถ้าความสัมพันธ์เท่ากับ 40-70 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์นั้นถือว่าเป็นพันธุ์ของสปีชีส์เดียวกันแม้ว่าผลจาก genetic cross จะแสดงว่าไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ และถ้าความสัมพันธ์เท่ากับ 0-40 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไม่ได้เป็นสมาชิกในสปีชีส์เดียวกัน (สาวิตรี, 2549) แต่อย่างไรก็ตามจะต้องพิจารณาร่วมกับลักษณะอื่นด้วย เช่น ความสามารถในการสร้างสปอร์โดยอาศัยเพศและการมีชีวิตของสปอร์เหล่านั้น ในกรณีของ *Issatchenkia scutula* var. *scutala* และ *Issatchenkia scutula* var *exigua* มีค่าความสัมพันธ์ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ คือประมาณ 21-26 เปอร์เซ็นต์ แต่จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน เนื่องจากเกิดคอนจูเกชันได้ดีและให้แอสโคสปอร์ที่มีชีวิต ส่วนยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* แต่ละสปีชีส์แม้จะมีค่าความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันแต่จัดให้อยู่ต่างสปีชีส์เนื่องจากมีลักษณะอื่นแตกต่างกัน (มณี, 2544) ดังนั้นการศึกษาความความเหมือนและความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันจึงสามารถช่วยยืนยันผลการจัดจำแนกยีสต์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS ได้ และยังช่วยในการหาสายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันของโฮโมทาลลิกสปีชีส์และยีสต์ที่ไม่สร้างสปอร์ได้อีกด้วย (สาวิตรี, 2549)

ป่าชายเลน

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

สำหรับคำว่า mangrove forest นั้นเริ่มมีการใช้เป็นครั้งแรกในราวปี ค. ศ. 1878 โดย Bowman มาจากคำว่า “mangue” ในภาษาโปรตุเกส ซึ่งหมายถึงสังคมพืชที่ขึ้นอยู่ตามชายฝั่งทะเลดินเลน (สนิท, 2542) นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความหมายของป่าชายเลนมากมายไว้ดังนี้ ปี ค. ศ. 1903 Schimper ได้ให้ความหมายไว้ว่า “ป่าชายเลน” เป็นสังคมพืชที่ขึ้นอยู่ตามบริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ หรืออ่าว ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึงในช่วงที่ระดับน้ำทะเลขึ้นสูงสุด และได้ให้ชื่ออีก

อย่างไว้ว่า “tidal forest” ปี ค. ศ. 1962 Du ได้ให้ความหมายของป่าชายเลนไว้อย่างกว้างขวางสอง ประการคือ ประการแรก หมายถึงสังคมพืชที่ประกอบด้วยพันธุ์ไม้หลายชนิด หลายตระกูล และเป็นพวกที่มีใบสีเขียวตลอดทั้งปี ซึ่งมีลักษณะทางสรีรวิทยาและความต้องการสิ่งแวดล้อมที่คล้ายกัน และประการที่สองหมายถึง กลุ่มของสังคมพืชที่ขึ้นบริเวณปากอ่าว ชายฝั่งทะเลบริเวณเขตร้อน ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยไม้สกุลโกงกาง (*Rhizophora* spp.) เป็นไม้สำคัญและมีไม้ตระกูลอื่นปนอยู่บ้าง (สนิท, 2542) ปี ค. ศ. 1983 Saenger และคณะ ให้คำจำกัดความของป่าชายเลนว่า เป็นกลุ่มของพืชในเขตร้อนหรือกึ่งเขตร้อนที่ขึ้นอยู่ตามพื้นที่ชายฝั่ง และในปี ค. ศ. 1984 Hamilton และ Snedaker ได้ให้คำนิยามว่า ป่าชายเลนคือ ระบบนิเวศวิทยาของป่าชายฝั่งที่ทนต่อสภาพความเค็มได้ (อาณัติ, 2531)

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

1. การกระจายตัวของป่าชายเลนในประเทศไทย

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

เขต 1 บริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันออกของอ่าวไทย จากจังหวัดตราดถึงชลบุรี

เขต 2 บริเวณฝั่งทะเลตอนใต้ของที่ราบเจ้าพระยา จากจังหวัดสมุทรปราการถึงสมุทรสงคราม

เขต 3 บริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันตกของอ่าวไทย จากจังหวัดเพชรบุรีถึงนราธิวาส

เขต 4 บริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันออกของของทะเลอันดามัน จากจังหวัดระนองถึงสตูล

ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้จะทำการวิจัยในป่าชายเลนเขต 1 และ 3 คือ บริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันออกของอ่าวไทย ในจังหวัดจันทบุรีและตราด และบริเวณฝั่งทะเลด้านตะวันตกของอ่าวไทย ในจังหวัดเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

2. ป่าชายเลนในบริเวณอ่าวไทย

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

ระบบนิเวศของป่าชายเลนเกิดจากการผสมผสานระหว่างสภาพแวดล้อมของทะเลและแผ่นดินบริเวณชายฝั่ง ดังนั้นการกระจายตัวของป่าชายเลนจึงขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อมหลายอย่าง ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ สภาพภูมิอากาศ สภาพดิน และน้ำ

2.1 สภาพภูมิอากาศ

ภูมิอากาศของประเทศไทยได้รับอิทธิพลจากมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ และมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ทำให้เกิดการพัดของลมจากตะวันตกเฉียงใต้และลมจากตะวันออกเฉียงเหนือพัดผ่านประเทศไทย (อาณัติ, 2531)

2.2 สภาพดิน

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

2.3 น้ำ

ป่าชายเลนในประเทศไทยส่วนใหญ่พบในบริเวณที่มีความเค็มของน้ำระหว่าง 10 – 30 ppt เมื่อพิจารณาจากลักษณะการเจริญเติบโตของไม้ในป่าชายเลน พบว่าป่าชายเลนจำเป็นที่จะต้องมีน้ำทะเลท่วมถึงเป็นครั้งคราว (อาณัติ, 2531) เนื่องจากพรรณไม้ในป่าหลายชนิดเป็นพันธุ์ไม้ป่าชายเลนแท้ซึ่งขึ้นได้เฉพาะบริเวณที่เป็นน้ำเค็มหรือน้ำกร่อยเท่านั้น มีรายงานว่าป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยมีพันธุ์ไม้ 71 ชนิด ในจำนวนนี้ เป็นพันธุ์ไม้ป่าชายเลนแท้ 27 ชนิด และอีก 44 ชนิด เป็นพันธุ์ไม้ที่ปรับตัวกับสภาพความเค็มเพื่อให้ขึ้นอยู่ร่วมกับพันธุ์ไม้ป่าชายเลนแท้ในบริเวณที่มีน้ำทะเลท่วมถึงได้ พันธุ์ไม้ป่าชายเลนแท้ที่พบทั่วไปได้แก่ พันธุ์ไม้ในวงศ์ Avicenniaceae (แสม) วงศ์

Rhizophoraceae (โกงกาง ถั่ว โปรง และพังกาหัวสุม) และวงศ์ Sonneratiaceae (ลำพูและลำแพน) (สนใจ, 2548) นอกจากนี้โดยธรรมชาติแล้วการขึ้นอยู่ของพันธุ์ไม้ในป่าชายเลนในบริเวณอ่าวไทยมีการแบ่งเขตที่ชัดเจน เนื่องมาจากความสามารถในการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับระดับพื้นที่ที่น้ำทะเลท่วมถึงที่แตกต่างกัน และปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ เช่น ชนิดและความเค็มของดิน ตัวอย่างการศึกษาการจัดโซนของพันธุ์ไม้ในป่าชายเลน เช่น ในปี ค. ศ. 1975 Aksornkoae ได้ศึกษาพันธุ์ไม้เด่นในป่าชายเลนภาคตะวันออกของไทย และได้สรุปรูปแบบของโซนต่าง ๆ จากริมแม่น้ำจนถึงพื้นที่บนบกที่ห่างจากชายฝั่ง ได้แก่ โกงกางใบเล็กและโกงกางใบใหญ่ เป็นพันธุ์ไม้เด่นบริเวณริมแม่น้ำและชายฝั่งทะเล ในขณะที่แสมและไม้ถั่วที่ขึ้นร่วมกับโกงกางในพื้นที่บริเวณที่อยู่ถัดเข้าไปบนฝั่งเป็นอีกโซนหนึ่ง ถัดจากโซนนี้ขึ้นไปจะเป็นโซนของตะบูนและตาตุ่ม ซึ่งมีพื้นดินเลนแข็งกว่า เนื่องจากมีน้ำท่วมน้อย และยังพบไม้โปรงและไม้ฝาดในบริเวณนี้อีกด้วย สำหรับไม้เสม็ดจะมีมากในบริเวณชายฝั่งเหนือป่าชายเลน เนื่องจากได้รับอิทธิพลของน้ำทะเลน้อยมาก มีน้ำจืดขังอยู่ทั่วไปในพื้นที่ (สนใจ, 2548)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พื้นที่ที่ศึกษา

ป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยที่จังหวัดตราดและจันทบุรี และบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยที่จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ของประเทศไทย

2. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ น้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลน การเก็บตัวอย่างน้ำทำโดยเก็บน้ำที่อยู่บริเวณผิวหน้าใส่ขวดพลาสติกที่สะอาดจุดละ 1000 มิลลิลิตร สำหรับตะกอนดินจะเก็บตะกอนดินที่อยู่ใต้น้ำบริเวณผิวหน้าดินลึกลงไปไม่เกิน 2-3 เซนติเมตรใส่ถุงพลาสติก นำมาทำการแยกยีสต์ในขั้นตอนถัดไป

3. การแยกยีสต์

กรณีตัวอย่างน้ำ แยกยีสต์โดยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรนที่มีรูกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตรที่ปราศจากเชื้อ โดยใช้น้ำ 100-200 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นเมมเบรน จากนั้นจึงนำแผ่นเมมเบรนวางลงบนผิวหน้าอาหาร yeast extract malt extract (YM) agar ที่เติมโซเดียมโพรพิโอเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ สารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และปรับพีเอชเป็น 3.7-3.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล บ่มที่อุณหภูมิห้องจนปรากฏโคโลนี นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนแผ่นกรอง

สำหรับตัวอย่างตะกอนดิน ทำการแยกยีสต์ด้วยเทคนิคการเพิ่มโดยการชั่งดิน 1 กรัม ใส่ลงใน yeast extract malt extract (YM) broth ที่เติมโซเดียมโพรพิโอเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ คลอแรมฟีนิคอล 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และปรับพีเอชเป็น 3.7-3.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมากระจายลงบน YM agar ปรับพีเอช 3.7-3.8 เติมโซเดียมโพรพิโอเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ และคลอแรมฟีนิคอล 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องจนปรากฏโคโลนี เลือก

เก็บโคโลนียีสต์ และมีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา เช่น สี ขนาด ความมันวาวที่ผิวหน้าโคโลนี และขอบโคโลนี แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการสตรีกลงบน YM agar จากนั้นจึงเก็บลง YM broth ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศา-เซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

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

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนโดเมน D1/D2 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

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

Sterile reverse osmosis water	17.25	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	3	ไมโครลิตร

$MgCl_2$ (25 mM)	2.4	ไมโครลิตร
dNTP (25 mM)	2.4	ไมโครลิตร
Primer NL1 (20 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Primer NL4 (20 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Taq polymerase (Fermentas; 5 U/μl)	0.15	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร
Total volume	30	ไมโครลิตร

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

1. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที

2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่คู่ของดีเอ็นเอแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว)

3. อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นที่ลดอุณหภูมิลงมาเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นคู่สมกันได้)

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

5. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

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

4.3 การทำให้ PCR product บริสุทธิ์

ทำให้ PCR product บริสุทธิ์โดยใช้ QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีจากบริษัทผู้ผลิต โดยเติม PB buffer ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product ลงใน QIA quick column จากนั้นจึงดูด PCR product ที่เหลือจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีสทั้งหมดใส่ตามลงไปในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทิ้งไป จากนั้นจึงเติม PE buffer ที่เติมเอทานอลแล้ว 750 ไมโครลิตร เหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทิ้งไป เหวี่ยงอีกครั้งที่ 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ค้างอยู่ในคอลัมน์ นำหลอดคอลัมน์ที่มีแผ่นกรอง (ซึ่งมีดีเอ็นเอติดอยู่) ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ เติมน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 15 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกรอง เพื่อละลายดีเอ็นเอ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นจึงเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 1 นาที PCR product ที่ผ่านการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์แล้วจะถูกชะลงสู่หลอดใหม่ ตรวจสอบปริมาณ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส

4.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) ไพรเมอร์ที่ใช้คือ NL1 และ NL4 เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณโดเมนD1/D2 ของ 26S rDNA เตรียม reaction mixture ดังนี้

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

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

1. อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 30 วินาที

2. อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่คู่ของดีเอ็นเอแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว)

3. อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 5 วินาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นที่ลดอุณหภูมิลงมาเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นคู่สมกันได้)

4. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที (ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ในทิศ 5’ ไป 3’)

5. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 25 รอบ จากนั้นจึงนำ PCR product ที่ได้มาตกตะกอนด้วยสารละลายผสมเอทานอลและโซเดียมอะซีเตท ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดีเอ็นเอจะถูกเหวี่ยงตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งอย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันการสูญเสียปริมาณดีเอ็นเอไปในขั้นตอนนี้ เติม 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ปริมาตร250 ไมโครลิตร เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งอย่างระมัดระวัง จากนั้นจึงทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยใช้ Thermolyne (Type 17600 DriBath, USA) ที่ตั้งอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส สุดท้ายจึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI PRISM 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, USA)

4.5 การจัดจำแนกยีสต์โดยเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ไฟโลจีนี

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

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทำโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันด้วยโปรแกรม Clustal X ver 1.8 (Thompson *et al*., 1997) หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงมาสร้างต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้ neighbour-joining method (Saitou and Nai, 1987)

5. การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ใหม่ด้วยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี

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

5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

5.1.1 สัณฐานวิทยาของยีสต์ในอาหารเหลว

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

5.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว

เพาะยีสต์ลงใน YM agar และ YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งโดยการสังเกตความหยาบละเอียดของผิวเนื้อ สีผิวหน้า ลักษณะการนูนของโคโลนี และขอบโคโลนี สำหรับการสังเกตการเจริญในอาหารเหลวนั้นจะรายงานผลเป็นว่าลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ ยีสต์จับตัวกันเป็นก้อนแข็ง เป็นก้อนเหนียว ตกตะกอนที่ก้นหลอด ตกเป็นตะกอนที่คล้ายเมือก จับเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด จับกันเป็นเม็ดเล็ก ๆ และลอยเป็นฝ้าที่ผิวหน้า

5.1.3 การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อบนสไลด์

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

5.1.4 การสร้างแอสโคสปอร์

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

5.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

5.2.1 การหมักคาร์โบไฮเดรต

การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตทำโดยการเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมงลงในอาหารสำหรับทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเตรียมเป็นหลอดอาหารเหลวที่ใส่หลอดดักก๊าซหลอดละ 2 มิลลิลิตร หลังจากที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จึงเติมสารละลายสารประกอบคาร์บอนที่ต้องการทดสอบลงไป ซึ่งสารละลายดังกล่าวนี้ได้ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร ความเข้มข้นที่ใช้คือ ความเข้มข้นที่คำนวณแล้วว่า เมื่อเติมลงไปในอาหารจะทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ยกเว้นน้ำตาลราฟฟิโนสจะเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพาะเชื้อยีสต์ที่แขวนลอยในน้ำปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอด

ทดสอบแต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ และการเปลี่ยนสีของอาหารทุกวันจนครบ 7 วัน จากนั้นจึงตรวจผลทุกสัปดาห์จนครบ 28 วัน ผลที่ได้จากการสังเกต รายงานดังนี้

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

5.2.2 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

ตรวจสอบการใช้สารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลว โดยใช้สารประกอบคาร์บอน 40 ชนิด ในการทดสอบสารประกอบคาร์บอนแต่ละชนิดจะทำโดยการเตรียมอาหารไนโตรเจนเบสในมีความเข้มข้นมากกว่าที่ต้องการ 10 เท่า ซึ่งประกอบด้วยแบคโต-ยีสต์ไนโตรเจนเบส 6.7 กรัม และสารประกอบคาร์บอนที่ต้องการทดสอบ 5 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร (ยกเว้นเอทานอลใช้ 3 เปอร์เซ็นต์ และ 5-ketogluconic acid ใช้ 0.3 เปอร์เซ็นต์) ทำให้อาหารปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.2 ไมโครเมตร นำอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นมากกว่าที่ต้องการ 10 เท่าดังกล่าว 0.2 มิลลิลิตร เจือจางลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร (สารประกอบคาร์บอนกลุ่ม inulin, soluble starch, ethanol, galactitol, 2-ketogluconic acid และ 5-ketogluconic acid ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ) โดยกำหนดให้อาหารไนโตรเจนเบสที่

ไม่เติมสารประกอบคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ และให้อาหารไนโตรเจนเบสที่เติมกลูโคสเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก

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

การตรวจการเจริญทำโดยการทาบหลอดลงบนกระดาษที่มีเส้นขีดสีดำ 5 เส้น กว้างเส้นละ 0.75 มิลลิเมตร และห่างเส้นละ 5 มิลลิเมตรแบบเดียวกับที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อ สังเกตความชัดเจนของแถบสีดำผ่านหลอด ดังนี้

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

จากนั้นจึงบันทึกผลการสังเกตการเจริญทั้ง 4 สัปดาห์ ดังนี้

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

(+) คือ นาน ๆ ครั้งที่ผลเป็นบวก (seldom positive)

v คือ ผันแปร (variable) หมายถึง บางสายพันธุ์เป็นบวก และบางสายพันธุ์เป็นลบ

+/w คือ บวกหรือบวกอ่อน หมายถึง ทุกสายพันธุ์เจริญแต่บางสายพันธุ์เจริญน้อย

w/- คือ บวกอ่อนหรือลบ

5.2.3 การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

5.2.4 การสร้างสารประกอบอมัยลอยด์ภายนอกเซลล์

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

5.2.5 ความต้องการวิตามินในการเจริญ

เพาะเชื้อยีสต์ที่เจริญบน YM agar อายุ 2-4 วัน ลงในอาหารสำหรับการทดสอบที่ขาดวิตามิน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 5-7 วัน เพื่อให้ยีสต์ใช้วิตามินที่สะสมไว้ในเซลล์จนหมด จากนั้นจึงถ่ายเชื้อปริมาณน้อย ๆ ลงในอาหารที่มีวิตามินที่ต้องการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลการเจริญทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

5.2.6 การสร้างกรดจากกลูโคส

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

5.2.7 ความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์

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

5.2.8 การเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคส 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์

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

5.2.9 การเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์

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

5.2.10 การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิอื่น ๆ

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

5.2.11 การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส

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

5.2.12 การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (Diazonium Blue B)

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

5.3 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (การวิเคราะห์ยูบิควิโนน)

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

การเตรียมเซลล์

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

การสกัดยูบิควิโนนจากเซลล์ยีสต์

เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 กรัมลงในฟลาสก์ที่มีสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมไพโรแกลออล 1.5 กรัม และเมทานอลปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึง refluxed ด้วยน้ำเย็นนาน 30 นาที ใน heating mantle โดยใส่ลูกแก้วลงไปในระหว่างการต้มเพื่อป้องกันการเดือดรุนแรง เมื่อ refluxed เสร็จแล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 45 นาที เติมเฮกเซนปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เฮกเซนผสมกับเมทานอล เพื่อดึงยูบิควิโนนที่อยู่ในเมทานอลให้อยู่ในเฮกเซน ถ่ายใส่กรวยแยกเขย่าให้เข้ากัน ระหว่างเขย่าให้เปิดจุกเพื่อปล่อยอากาศที่อยู่ภายในกรวยแยกออก เก็บสารละลายในส่วนของเฮกเซนซึ่งอยู่ชั้นบนสุด ปล่อยชั้นเมทานอลที่มีตะกอนดำของไพโรแกลออลและชั้นของน้ำทิ้งไป ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2-3 ครั้ง ถ่ายสารละลายเฮกเซนใส่ในบีกเกอร์ และเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปในปริมาณน้อย ๆ เพื่อดึงน้ำออก ถ่ายสารละลายลงในฟลาสก์สำหรับระเหย ทำการระเหยเฮกเซนออกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และละลายด้วยอะซิโตน 0.5 มิลลิลิตร

การทำให้ยูบิควิโนนบริสุทธิ์

เตรียมสารประกอบยูบิควิโนนให้บริสุทธิ์ด้วยการทำ Thin layer chromatography (TLC) บนแผ่นซิลิกาเจล (F254TLC Merck, Germany)โดยใช้เฮกเซน และไดเอทิลอีเทอร์ในอัตราส่วน 85 ต่อ 15 เป็น mobile phase ยูบิควิโนนจะปรากฏเป็นแถบสีเหลืองที่มีค่า Rf ประมาณ 0.21 ตรวจสอบแถบของยูบิควิโนนอีกครั้งภายใต้แสงอัลตราไวโอเลทที่ความยาวคลื่น 254

นาโนเมตร ยูบิควิโนนจะปรากฏเป็นแถบสีดำ ขูดแถบสีเหลืองที่ปรากฏบนแผ่น TLC และสกัดด้วยอะซิโตนหรือเมทานอล 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน

การวิเคราะห์ชนิดของยูบิควิโนนด้วย High performance liquid chromatography

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

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน

การเก็บตัวอย่างครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราดและจันทบุรี และบริเวณชายฝั่งด้านตะวันตกของอ่าวไทยที่จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์โดยเก็บจากป่าชายเลน 9 แห่งใน 4 จังหวัดที่กล่าวมาแล้วข้างต้นผลการการเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำ และตะกอนดินใต้น้ำแสดงดังตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ

สำหรับตัวอย่างน้ำที่นับจำนวนและแยกด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน พบว่ามียีสต์ตั้งแต่ 5 เซลล์ต่อ 100 มิลลิลิตร ถึง 200 เซลล์ต่อ 100 มิลลิลิตร แยกได้ยีสต์ 138 สายพันธุ์ โดยได้จากตัวอย่างน้ำในจังหวัดตราดและจันทบุรีบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย 109 สายพันธุ์ และได้จากตัวอย่างน้ำในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์บริเวณชายฝั่งด้านตะวันตกของอ่าวไทย 29 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5) ส่วนตัวอย่างตะกอนดินเนื่องจากใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนในการแยกเชื้อดังนั้นจึงไม่สามารถนับจำนวนได้ แยกได้ยีสต์ 56 สายพันธุ์ โดยได้จากตัวอย่างตะกอนดินในจังหวัดตราดและจันทบุรีบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย 29 สายพันธุ์ และได้จากตัวอย่างตะกอนดินในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์บริเวณชายฝั่งด้านตะวันตกของอ่าวไทย 27 สายพันธุ์ รวมยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด 194 สายพันธุ์ รหัสและจำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลนในแต่ละแหล่งแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 5 ผลการเก็บตัวอย่าง การนับจำนวน และการแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน

การเก็บตัวอย่าง				จำนวนยีสต์ (เซลล์/100 มล.)	รหัสยีสต์ที่แยกได้
แหล่ง	สถานที่	วัน เดือน ปี	จุด		
1	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด ชายฝั่งตะวันออก	10 ต.ค. 2549	1	131	EA1, EA4, EA5, EA8, EA9, EA10, W1, W2
			2	66	EA12, EA14, EA16, W5, W7
			3	142	EA17, EA18, EA20, W11
			4	131	EA21, EA22, W13, W15, W16
			5	172	EA23, EA25, W18
			6	133	EA28, W24, W25, W26
2	ป่าโกงกาง อ.คลองใหญ่ จ. ตราด ชายฝั่งตะวันออก	11 ต.ค. 2549	1	54	EF1, EF2, EF3, EF4, EF5, W27
3	ป่าโกงกางวัดเขาสลัก อ. เขาสมิง จ. ตราด ชายฝั่งตะวันออก	12 ต.ค. 2549	1	206	EB1, EB2, EB3, EB4, EB6, W33, W34, W35
			2	121	EB7, EB8, EB9, EB11, EB12, EB13, W38
4	ป่าโกงกางในเขตชุมชน อ. ขลุง จ. จันทบุรี ชายฝั่งตะวันออก	12 ต.ค. 2549	1	56	EC1, EC2, EC3, EC4, EC5, EC6, EC7, EC8, EC9, EC10, EC11
			2	61	EC14, EC15, EC16, W44, W45, W46
5	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง จ. จันทบุรี ชายฝั่งตะวันออก	12 ต.ค. 2549	1	131	ED1, ED2, ED4, ED6, ED7, ED8, W47, W49, W50
			2	119	ED9, ED11, W53, W54, W55

ตารางที่ 5 (ต่อ)

การเก็บตัวอย่าง				จำนวนยีสต์ (เซลล์/100 มล.)	รหัสยีสต์ที่แยกได้
แหล่ง	สถานที่	วัน เดือน ปี	จุด		
5	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง จ. จันทบุรี ชายฝั่งตะวันออก	12 ต.ค. 2549	3	112	ED13, ED14, ED16, W57
			4	134	ED17, ED18, ED19, ED20, W59, W60
6	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี ชายฝั่งตะวันออก	12 ต.ค. 2549	1	121	EE1, EE2, EE3, EE4, EE5, EE6, EE7
			2	127	EE8, EE11, W61, W62
			3	136	EE12, EE13, EE14, EE15, EE16, W63, W64
7	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี ชายฝั่งตะวันตก	26 ธ.ค. 2549	1	44	WA1
			2	70	WA10, WA11, WA12
8	วนอุทยานปราณบุรี อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์ ชายฝั่งตะวันตก	27 ธ.ค. 2549	1	174	WB1,WB2, WB3, WB4, WB6
			2	57	WB7, WB8, WB9, WB10, WB11, WB12
			3	32	WB16, WB!7, WB18
			4	30	WB13, WB15
			5	31	WB19
			6	6	WB43
9	อุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอด อ. กุยบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์ ชายฝั่งตะวันตก	27 ธ.ค. 2549	1	5	WC1, WC2
			2	55	WC4, WC5, WC8
			3	51	WC9, WC26

ตารางที่ 6 ผลการเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากตัวอย่างตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวน

การเก็บตัวอย่าง				รหัสยีสต์ที่แยกได้
แหล่ง	สถานที่	วัน เดือน ปี	จุด	
1	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน	10 ต.ค. 49	1	EA30, EA31
	จ. ตราด		2	EA32, EA33
	ชายฝั่งตะวันออก		3	EA35, EA36
2	ป่าโกงกาง อ.คลองใหญ่	11 ต.ค. 49	1	EF6, EF7, EF8, EF9
	จ. ตราด		2	EF10, EF11, EF12, EF13, EF14,
	ชายฝั่งตะวันออก			EF15, EF16, EF17
3	ป่าโกงกางวัดเขาสลัก	12 ต.ค. 49	1	EB13, EB14, EB15, EB16, EB17,
	อ. เขาสมิง จ. ตราด			EB18
	ชายฝั่งตะวันออก			
4	ป่าโกงกางในเขตชุมชน	12 ต.ค. 49	1	EC17, EC18
	อ. ขลุง จ. จันทบุรี			
	ชายฝั่งตะวันออก			
5	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน	12 ต.ค. 49	1	ED22, ED23, ED24, ED26
	อ. ขลุง จ. จันทบุรี			
	ชายฝั่งตะวันออก			
6	โครงการในพระราชดำริแหลม	26 ธ.ค. 49	1	WA3, WA4, WA6, WA7
	ผักเบี้ย จ. เพชรบุรี		2	WA8, WA9
	ชายฝั่งตะวันตก			
7	วนอุทยานปราณบุรี อ. ปราณบุรี	27 ธ.ค. 49	1	WB20, WB22
	จ. ประจวบคีรีขันธ์		2	WB24, WB25, WB26, WB27
	ชายฝั่งตะวันตก		3	WB28
			4	WB29, WB30
			5	WB31, WB32, WB33, WB34, WB35
			6	WB36, WB37, WB38, WB41, WB42
8	อุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอด	27 ธ.ค. 49	1	WC12, WC13
	อ. กุยบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์			
	ชายฝั่งตะวันตก			

ตารางที่ 7 สรุปยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในแต่ละแหล่ง

แหล่ง	สถานที่	ยีสต์จากน้ำ		ยีสต์จากตะกอนดิน		รวม
		รหัส	จำนวน	รหัส	จำนวน	
1	ศูนย์ศึกษาป่าชายเลน บ้านเปร็ดใน จ. ตราด ชายฝั่งตะวันออก	EA1, EA4, EA5, EA8, EA9, EA10, EA12, EA14, EA16, EA17, EA18, EA20, EA21, EA22, EA23, EA25, EA28, W1, W2, W5, W7, W11, W13, W15, W16, W18, W24, W25, W26	29	EA30, EA31, EA32, EA33, EA35, EA36	6	35
2	ป่าโกงกาง อ.คลองใหญ่ จ. ตราด ชายฝั่งตะวันออก	EF1, EF2, EF3, EF4, EF5, W27	6	EF6, EF7, EF8, EF9, EF10, EF11, EF12, EF13, EF14, EF15, EF16, EF17	12	18
3	ป่าโกงกางวัดเขาสลัก อ. เขาสมิง จ. ตราด ชายฝั่งตะวันออก	EB1, EB2, EB3, EB4, EB6, EB7, EB8, EB9, EB11, EB12, EB13, W33, W34, W35, W38	14	EB13, EB14, EB15, EB16, EB17, EB18	6	20
4	ป่าโกงกางในเขตชุมชน อ. ขลุง จ. จันทบุรี ชายฝั่งตะวันออก	EC1, EC2, EC3, EC4, EC5, EC6, EC7, EC8, EC9, EC10, EC11, EC14, EC15, EC16, W44, W45, W46	17	EC17, EC18	2	19

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	ยีสต์จากน้ำ		ยีสต์จากตะกอนดิน		รวม
		รหัส	จำนวน	รหัส	จำนวน	
5	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง จ. จันทบุรี ชายฝั่งตะวันออก	ED1, ED2, ED4, ED6, ED7, ED8, ED9, ED11, ED13, ED14, ED17, ED18, ED19, ED20, W47, W49, W50, W53, W54, W55, W59, W60	24	ED22, ED23, ED24, ED26	4	28
6	ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี ชายฝั่งตะวันออก	EE1, EE2, EE3, EE4, EE5, EE6, EE7, EE8, EE11, EE12, EE13, EE14, EE15, EE16, W61, W62, W63, W64	18	-	0	18
7	โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี ชายฝั่งตะวันตก	WA1, WA10, WA11, WA12	4	WA3, WA4, WA6, WA7, WA8, WA9	6	10
8	วนอุทยานปราณบุรี อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์ ชายฝั่งตะวันตก	WB1,WB2, WB3, WB4, WB6, WB7, WB8, WB9, WB10, WB11, WB12, WB13, WB15, WB16, WB17, WB18, WB19, WB43	18	WB20, WB22, WB24, WB25, WB26, WB27, WB28, WB29, WB30, WB31, WB32, WB33, WB34, WB35, WB36, WB37, WB38, WB41, WB42	19	37

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	ยีสต์จากน้ำ		ยีสต์จากตะกอนดิน		รวม
		รหัส	จำนวน	รหัส	จำนวน	
9	อุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอด อ. กุยบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์ ชายฝั่งตะวันตก	WC1, WC2, WC4, WC5, WC8, WC9, WC26	7	WC12, WC13	2	9
รวม			**166**		**63**	**194**

2. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การจัดจำแนกยีสต์ด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลทำโดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ความยาวประมาณ 500-600 นิวคลีโอไทด์) ของยีสต์สายพันธุ์ที่ต้องการจัดจำแนกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของยีสต์สปีชีส์ต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) โดยใช้โปรแกรม BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) และใช้เกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) ในการระบุว่าเป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วหรือที่รู้จักแล้ว หรือเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีรายงานหรือสปีชีส์ใหม่ โดยพิจารณาจากหลักเกณฑ์ คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA กับของยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด หากพบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จะจัดเป็นยีสต์สปีชีส์เดียว แต่ถ้าหากมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จะจัดเป็นยีสต์ต่างสปีชีส์กัน จากหลักการดังกล่าวจึงสามารถจัดจำแนกยีสต์ 194 สายพันธุ์ออกเป็นสปีชีส์ต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราดและจันทบุรี

ผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราดและจันทบุรี จำนวน 138 สายพันธุ์ โดยแยกได้จากตัวอย่างน้ำ 109 สายพันธุ์ และจากตัวอย่างตะกอนดิน 29 สายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 8 และ 9 สำหรับ109 สายพันธุ์ที่ได้จากตัวอย่างน้ำเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว 106 สายพันธุ์ (97.2 เปอร์เซ็นต์) เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 2 สายพันธุ์ (1.8 เปอร์เซ็นต์) และเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการรายงานหรือสปีชีส์ใหม่ 1 สายพันธุ์ (0.9 เปอร์เซ็นต์) ส่วนยีสต์จากตะกอนดิน 29 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว 26 สายพันธุ์ (89.7 เปอร์เซ็นต์) สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สายพันธุ์ (3.5 เปอร์เซ็นต์) และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการรายงานหรือสปีชีส์ใหม่ 2 สายพันธุ์ (6.9 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 8 การจัดจำแนกยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกได้จากน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราด และจันทบุรี ในปี พ. ศ. 2549 พร้อม GenBank accession number

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
Ascomycetous yeasts								
EC6	AB436387	*Candida albicans* (U45776)	570/571	99.82	0	1	0.17	*Candida albicans*
EC11	AB436389	*Candida diversa* (U71064)	533/533	100	0	0	0	*Candida diversa*
EA4	AB436467	*Candida* cf. *glabrata* (AF313362)	590/590	100	0	0	0	*Candida glabrata*
EE2	AB436391	*Candida fukuyamaensis* (U62311)	568/570	99.65	0	2	0.35	*Candida fukuyamaensis*
EB9	AB436392	*Candida intermedia* (U44809)	515/517	99.61	0	2	0.39	*Candida intermedia*
EB3	AB436393	*Candida natalensis* (U45818)	556/559	99.46	0	3	0.54	*Candida natalensis*
EC9	AB436394	*Candida natalensis* (U45818)	563/566	99.47	0	3	0.53	*Candida natalensis*
ED16	AB436395	*Candida natalensis* (U45818)	562/566	99.29	1	3	0.53	*Candida natalensis*
ED8	AB436399	*Candida pseudolambica* (U71063)	557/559	99.64	0	2	0.36	*Candida pseudolambica*
EC14	AB436403	*Candida quercitrusa* (U45831)	564/565	99.82	0	1	0.18	*Candida quercitrusa*

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EB2	AB436404	*Candida rugosa* (U45727)	476/476	100	0	0	0	*Candida rugosa*
EB4	AB436405	*Candida rugosa* (U45727)	483/485	99.59	1	1	0.21	*Candida rugosa*
EF1	AB436406	*Candida rugosa* (U45727)	483/486	99.38	2	1	0.21	*Candida rugosa*
EA22	AB439217	*Candida sanittii* (AB332397)	553/553	100	0	0	0	*Candida sanittii*
EA1	AB439256	*Candida sanittii* (AB332397)	526/535	98.32	2	7	1.31	New species
EB1	AB436411	*Candida silvae* (U71065)	541/541	100	0	0	0	*Candida silvae*
EB11	AB436412	*Candida silvae* (U71065)	541/541	100	0	0	0	*Candida silvae*
EE4	AB436414	*Candida silvae* (U71065)	539/541	99.63	0	2	0.37	*Candida silvae*
EA5	AB435073	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	506/507	99.8	0	1	0.2	*Candida thaimueangensis*
EB8	AB436416	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	559/559	100	0	0	0	*Candida thaimueangensis*
EC10	AB436417	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	559/559	100	0	0	0	*Candida thaimueangensis*
ED1	AB436418	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	557/560	99.46	1	2	0.36	*Candida thaimueangensis*

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EA28	AB435180	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EB6	AB435185	*Candida tropicalis* (U45749)	570/569	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EC5	AB435186	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EC15	AB435187	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
ED6	AB435189	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE3	AB435191	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE8	AB435192	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE11	AB435193	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE12	AB435194	*Candida tropicalis* (U45749)	569/570	99.82	0	1	0.18	*Candida tropicalis*
EE13	AB435195	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE14	AB435196	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EE16	AB435197	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EA18	AB435075	*Clavispora lusitaniae* (U44817)	517/517	100	0	0	0	*Clavispora lusitaniae*
ED2	AB436431	*Galactomyces reessii* (U40111)	543/546	99.45	0	3	0.55	*Galactomyces reessii*
EC3	AB436432	*Hanseniaspora clermontiae* (AJ512456)	580/584	99.32	0	4	0.68	*Hanseniaspora clermontiae*
EC7	AB436433	*Hanseniaspora clermontiae* (AJ512456)	579/584	99.14	0	5	0.86	*Hanseniaspora clermontiae*
ED9	AB436435	*Hanseniaspora guilliermondii* (U84230)	569/574	99.13	2	3	0.52	*Hanseniaspora guilliermondii*
EA25	AB439218	*Hanseniaspora* sp. ST-464 (DQ404527)	587/592	99.16	2	3	0.51	Undescribed species
ED20	AB439219	*Hanseniaspora* sp. ST-464 (DQ404527)	588/590	99.66	0	2	0.34	Undescribed species
EF2	AB436453	*Kloeckera lindneri* (U84226)	568/572	99.3	0	4	0.7	*Kloeckera lindneri*
EA8	AB456535	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EA9	AB456536	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EA12	AB456537	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EA14	AB456538	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EA16	AB456539	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EA17	AB456540	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
ED18	AB456541	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
EE1	AB456542	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
EE5	AB456543	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
EE6	AB456544	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
EE7	AB456545	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
EB12	AB436454	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	493/493	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
EC1	AB436455	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	493/493	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
EC8	AB436456	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	493/493	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
ED11	AB436457	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	493/493	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
EA21	AB435390	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	573/574	99.8	0	1	0.2	*Lindnera subsufficiens*
ED7	AB436465	*Lindnera veronae* (U73576)	570/570	100	0	0	0	*Lindnera veronae*

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EA20	AB435076	*Saccharomyces cerevisiae* (U44806)	578/578	100	0	0	0	*Saccharomyces cerevisiae*
ED13	AB435395	*Pichia guilliermondii* (U45709)	568/570	99.65	0	2	0.35	*Pichia guilliermondii*
ED19	AB435396	*Pichia guilliermondii* (U45709)	569/570	99.82	0	1	0.18	*Pichia guilliermondii*
ED17	AB436447	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
EF3	AB436448	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
EB7	AB436437	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EB13	AB436438	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EC2	AB436440	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EC14	AB436441	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EC16	AB436442	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
ED4	AB436443	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
ED14	AB436444	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EF4	AB436445	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EF5	AB436446	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EA10	AB436451	*Pichia terricola* (U76345)	550/554	99.28	0	4	0.72	*Pichia terricola*
EA23	AB436452	*Pichia terricola* (U76345)	549/554	99.1	0	5	0.9	*Pichia terricola*
EE15	AB436466	*Torulaspora delbrueckii* (U72156)	508/509	99.8	1	0	0	*Torulaspora delbrueckii*
Basidiomycetous yeasts								
W59	AB439221	*Rhodotorula glutinis* (AF070430)	536/541	99.08	1	4	0.74	*Rhodotorula glutinis*
W1	AB439222	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	447/447	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W2	AB439223	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	521/521	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W5	AB439224	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	524/524	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W7	AB439225	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	425/425	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
W11	AB439226	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	487/488	99.8	0	1	0.2	*Rhodotorula mucilaginosa*
W13	AB456557	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	386/386	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W15	AB439227	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	517/518	99.81	0	1	0.19	*Rhodotorula mucilaginosa*
W16	AB439228	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	443/443	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W18	AB439229	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	492/492	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W24	AB439230	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	535/536	99.81	0	1	0.19	*Rhodotorula mucilaginosa*
W25	AB439231	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	538/538	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W26	AB439232	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	390/390	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W33	AB439233	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	536/536	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W34	AB439234	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	499/500	99.8	0	1	0.2	*Rhodotorula mucilaginosa*
W35	AB439235	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	536/536	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W38	AB439236	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	447/448	99.78	0	1	0.22	*Rhodotorula mucilaginosa*

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
W44	AB439237	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	505/506	99.8	0	1	0.2	*Rhodotorula mucilaginosa*
W45	AB439238	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	510/510	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W46	AB439239	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	509/510	99.8	0	1	0.2	*Rhodotorula mucilaginosa*
W47	AB439240	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	539/540	99.81	0	1	0.19	*Rhodotorula mucilaginosa*
W49	AB439241	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	513/513	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W50	AB439242	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	539/541	99.63	1	1	0.18	*Rhodotorula mucilaginosa*
W53	AB439243	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	526/526	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W54	AB439244	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	537/540	99.44	0	3	0.56	*Rhodotorula mucilaginosa*
W55	AB439245	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	522/526	99.24	0	4	0.76	*Rhodotorula mucilaginosa*
W57	AB439246	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	508/510	99.61	2	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W60	AB439247	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	540/540	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W61	AB439248	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	512/515	99.42	2	1	0.19	*Rhodotorula mucilaginosa*

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
W62	AB439249	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	538/541	99.45	1	2	0.37	*Rhodotorula mucilaginosa*
W63	AB439250	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	486/486	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
W64	AB439251	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	503/505	99.6	1	1	0.2	*Rhodotorula mucilaginosa*
W27	AB439252	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	454/454	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*

ตารางที่ 9 การจัดจำแนกยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว สปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกได้จากตะกอนดินในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราด และจันทบุรีในปี พ. ศ. 2549 พร้อม GenBank accession number

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
Ascomycetous yeasts								
EF12	AB436390	*Candida diversa* (U71064)	533/533	100	0	0	0	*Candida diversa*
EA31	AB456534	*Candida gotoi* (AY489112)	534/540	98.8	2	4	0.74	*Candida gotoi*
ED26	AB436400	*Candida pseudolambica* (U71063)	541/544	99.45	1	2	0.37	*Candida pseudolambica*
EF7	AB436401	*Candida pseudolambica* (U71063)	555/559	99.28	0	4	0.75	*Candida pseudolambica*
EF8	AB436402	*Candida pseudolambica* (U71063)	557/559	99.64	0	2	0.36	*Candida pseudolambica*
EB15	AB439216	*Candida sanittii* (AB332397)	546/551	99.1	1	4	0.7	*Candida sanittii*
EB16	AB436413	*Candida silvae* (U71065)	540/541	99.82	0	1	0.18	*Candida silvae*
EF11	AB436415	*Candida silvae* (U71065)	541/541	100	0	0	0	*Candida silvae*
ED22	AB436419	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	559/559	100	0	0	0	*Candida thaimueangensis*
ED24	AB436420	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	559/559	100	0	0	0	*Candida thaimueangensis*

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EA32	AB435181	*Candida tropicalis* (U45749)	570/568	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EA33	AB435182	*Candida tropicalis* (U45749)	570/569	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EA35	AB435183	*Candida tropicalis* (U45749)	570/569	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EA36	AB435184	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EB14	AB439214	*Candida tropicalis* (U45749)	570/569	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EC17	AB435188	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
ED23	AB435190	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
EC18	AB436434	*Hanseniaspora guilliermondii* (U84230)	570/572	99.65	0	2	0.35	*Hanseniaspora guilliermondii*
EF14	AB436458	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	492/493	99.8	0	1	0.2	*Kodamaea ohmeri*
EB17	AB435391	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	573/574	99.8	0	1	0.2	*Lindnera subsufficiens*
EF9	AB435392	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	573/574	99.83	0	1	0.17	*Lindnera subsufficiens*
EF13	AB439215	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	573/574	99.83	0	1	0.17	*Lindnera subsufficiens*

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
EF15	AB435393	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	566/567	99.82	0	1	0.18	*Lindnera subsufficiens*
EF16	AB435394	*Lindnera subsufficiens* (U75960)	568/572	99.3	0	4	0.7	*Lindnera subsufficiens*
EA30	AB435077	*Metschnikowia koreensis* (AF296438)	517/517	100	0	0	0	*Metschnikowia koreensis*
EB18	AB436439	*Pichia occidentalis* (U76348)	559/559	100	0	0	0	*Pichia occidentalis*
EF6	AB439220	*Pichia* sp. IS1-01 (AB247501)	555/555	100	0	0	0	Undescribed species
EF17	AB439257	*Pichia terricola* (U76345)	547/555	99.56	2	6	1.08	New species
EF10	AB439259	*Saturnispora mendoncae* (AY923242)	496/535	92.71	7	32	5.98	New species

2.1.1 ยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

ผลการจัดจำแนกพบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่คือ 100 สายพันธุ์ ซึ่งเท่ากับ 75.2 เปอร์เซ็นต์ ของสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ไฟลัม Ascomycota (ตารางที่ 10) โดยจัดจำแนกได้เป็น 12 สกุล 30 สปีชีส์ ในชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ต่าง ๆ ดังนี้

1.) วงศ์ Candidaceae มี 2 สกุล คือ *Candida* และ *Kloeckera* รวม 15 สปีชีส์ ประกอบด้วย สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ 9 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida albicans, C. diversa, C. glabrata, C. fukuyamaensis, C. intermedia, C. natalensis, C. quercitrusa, C. rugosa,* และ *Kloeckera lindneri* สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน คือ *Candida gotoi* และสปีชีส์ที่พบในทั้งตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน 5 สปีชีส์ คือ *Candida pseudolambica, C. sanittii, C. silvae, C. thaimueangensi* และ *C. tropicalis*

2.) วงศ์ Saccharomycetaceae มี 6 สกุล รวม 10 สปีชีส์ แบ่งเป็นสปีชีส์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Kluyveromyces siamensis, Lindnera veronae, Pichia guilliermondii, P. kudriavzevii , P. terricola, Saccharomyces cerevisiae,* และ *Torulaspora delbrueckii* และสปีชีส์ที่พบทั้งตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens* และ *Pichia occidentalis*

3.) วงศ์ Saccharomycodaceae มี 1 สกุล 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Hanseniaspora clermontiae* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ และ *Hanseniaspora guilliermondii* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน

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

5.) วงศ์ Dipodascaceae 1 สกุล 1 สปีชีส์ คือ *Galactomyces reessii* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ

สำหรับสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่เหลือ 33 สายพันธุ์ (24.8 เปอร์เซ็นต์ของสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว) เป็นเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Urediniomycetes อันดับ Sporidiobolales 2 สกุล 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Rhodotorula glutinis* และ *R. mucilaginosa* (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน

สปีชีส์	ยีสต์จากน้ำ		ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ		รวม
	รหัส	จำนวนสายพันธุ์	รหัส	จำนวนสายพันธุ์	
Ascomyceteous yeast					
Candida					
Candida albicans	EC6	1	-	-	1
Candida diversa	EC11	1	-	-	1
Candida cf. glabrata	EA4	1	-	-	1
Candida gotoi	-	-	EA31	1	1
Candida fukuyamaensis	EE2	1	-	-	1
Candida intermedia	EB9	1	-	-	1
Candida natalensis	EB3, EC9, ED16	3	-	-	3
Candida pseudolambica	ED8	1	ED26, EF7, EF8	3	4
Candida quercitrusa	EC14	1	-	-	1
Candida rugosa	EB2, EB4, EF1	3	-	-	3
Candida sanittii	EA22	1	EB15	1	2
Candida silvae	EB1, EE4	2	EB11, EB16, EF11	3	5
Candida thaimueangensis	EA5, EB8, EC10, ED1	4	ED22, ED24	2	6

ตารางที่ 10 (ต่อ)

สปีชีส์	ยีสต์จากน้ำ		ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ		รวม
	รหัส	จำนวนสายพันธุ์	รหัส	จำนวนสายพันธุ์	
Candida tropicalis	EA28, EA32, EB6, EC5, EC15,ED6, EE3, EE8, EE11, EE12, EE13, EE14, EE16	13	EA33, EA35, EA36, EB14, EC17, ED23	6	19
Clavispora					
Clavispora lusitaniae	EA18	1	-	-	1
Galactomyces					
Galactomyces reessii	ED2	1	-	-	1
Hanseniaspora					
Hanseniaspora clermontiae	EC3, EC7	2	-	-	2
Hanseniaspora guilliermondii	-	-	EC8, EC9	2	2
Kloeckera					
Kloeckera lindneri	EF2	1	-	-	1
Kluyveromyces					
Kluyveromyces siamensis	EA8, EA9, EA12, EA14, EA16, EA17, ED18, EE1, EE5, EE6, EE7	11	-	-	11
Kodamaea					
Kodamaea ohmeri	EC1, EC8, ED11	3	EB12, EF14	2	5
Lindnera					
Lindnera subsufficiens	EA21, EF9	2	EB17, EF13, EF15, EF16	4	6
Lindnera veronae	ED7	1	-	-	1
Metschnikowia					
Metschnikowia koreensis	-	-	EA30	1	1

ตารางที่ 10 (ต่อ)

สปีชีส์	ยีสต์จากน้ำ		ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ		รวม
	รหัส	จำนวนสายพันธุ์	รหัส	จำนวนสายพันธุ์	
Saccharomyces					
Saccharomyces cerevisiae	EA20	1	-	-	1
Pichia					
Pichia guilliermondii	ED13, ED19	2	-	-	2
Pichia kudriavzevii	ED17, EF3	2	-	-	2
Pichia occidentalis	EB7, EB8, EC2, EC14, EC16, ED4, ED14, EF4, EF5	9	EB13	1	10
Pichia terricola	EA10 , EA23	2	-	-	2
Torulaspora					
Torulaspora delbrueckii	EE15	1	-	-	1
Basidiomyceteous yeast					
Rhodotorula glutinis	W59	1	-	-	1
Rhodotorula mucilaginosa	W1, W2, W5, W7, W11, W13, W15, W16, W18, W24, W25, W26, W27, W33, W34, W35, W38, W44, W45, W46, W47, W49, W50, W53, W54, W55, W57, W60, W61, W62, W63, W64	32	-	-	32
รวม 12 สกุล 30 สปีชีส์					

2.1.2. ยีสต์สปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

การระบุว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ใช้การพิจารณาจากเกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) โดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA กับของยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุดจากฐานข้อมูล GenBank หากพบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จะจัดจำแนกให้เป็นสปีชีส์ใหม่ ผลการจัดจำแนกพบว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ EA1, EF10 และ EF17 (ตารางที่ 8, 9) โดยจัดจำแนกเป็น 3 สกุล 3 สปีชีส์ ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตะกอนดิน คือ สายพันธุ์ EF10 และ EF17 จัดอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae โดยสายพันธุ์ EF10 ใกล้เคียงกับ *Pichia terricola* และสายพันธุ์ EF17 ใกล้เคียงกับ *Saturnispora mendoncae* ส่วนยีสต์สปีชีส์ใหม่อีก 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ EA1 ที่แยกได้จากน้ำพบว่าอยู่ในวงศ์ Candidaceae ที่ใกล้เคียงกับ *Candida sanittii*

นอกจากนี้ยังพบว่ามี 3 สายพันธุ์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดย สายพันธุ์ EA25 และ ED20 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. ST-464 ในวงศ์ Saccharomycodaceae และสายพันธุ์ EF6 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. IS1-01 ในวงศ์ Saccharomycetaceae แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ยีสต์สปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน

Strains	Closet species	Isolated from
New species		
EA1	*Candida sanittii*	water
EF17	*Pichia terricola*	sediment
EF10	*Saturnispora siamensis*	sediment
Undescribed species		
EA25	*Hanseniaspora* sp. ST-464	water
ED20	*Hanseniaspora* sp. ST-465	water
EF6	*Pichia* sp. IS1-01	sediment

2.2 ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์

ผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์จำนวน 56 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ 28 สายพันธุ์ และจากตัวอย่างตะกอนดิน 28 สายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 12 และ 13 โดย 28 สายพันธุ์ที่ได้จากตัวอย่างน้ำจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว 27 สายพันธุ์ (96.4 เปอร์เซ็นต์) และเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการรายงานหรือสปีชีส์ใหม่ 1 สายพันธุ์ (3.6 เปอร์เซ็นต์) ส่วนยีสต์จากตะกอนดิน 28 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นมีสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว 27 สายพันธุ์ (96.4 เปอร์เซ็นต์) และราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สายพันธุ์ (3.6 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 12 การจัดจำแนกยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว และสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากน้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ในปี พ. ศ. 2549 พร้อม GenBank accession number

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
Ascomycetous yeasts								
WB16	AB436425	*Brettanomyces naardenensis* (U76200)	579/579	100	0	0	0	*Brettanomyces naardenensis*
WB18	AB436426	*Brettanomyces naardenensis* (U76200)	579/579	100	0	0	0	*Brettanomyces naardenensis*
WC9	AB436427	*Brettanomyces naardenensis* (AY969108)	576/576	100	0	0	0	*Brettanomyces naardenensis*
WB15	AB439258	*Candida lodderae* (U45755)	560/571	98.07	2	9	1.58	New species
WA11	AB436396	*Candida parapsilosis* (EF620918)	575/576	99.83	0	1	0.17	*Candida parapsilosis*
WA12	AB436397	*Candida parapsilosis* (EF620918)	586/589	99.49	0	3	0.51	*Candida parapsilosis*
WC8	AB436398	*Candida parapsilosis* (U45754)	530/530	100	0	0	0	*Candida parapsilosis*
WB9	AB436421	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	556/560	99.29	2	2	0	*Candida thaimueangensis*
WA10	AB435199	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
WB1	AB435200	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB3	AB435201	*Candida tropicalis* (U45749)	568/570	99.65	0	2	0.35	*Candida tropicalis*
WB4	AB435202	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB8	AB435203	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB11	AB435204	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB13	AB436436	*Hanseniaspora guilliermondii* (U84230)	570/572	99.65	0	2	0.35	*Hanseniaspora guilliermondii*
WB19	AB436459	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	493/493	100	0	0	0	*Kodamaea ohmeri*
WC26	AB436463	*Pichia caribbica* (AB304748)	570/570	100	0	0	0	*Pichia caribbica*
WA1	AB435397	*Pichia guilliermondii* (U45709)	569/570	99.82	0	1	0.18	*Pichia guilliermondii*
WB6	AB435398	*Pichia guilliermondii* (U45709)	569/570	99.82	0	1	0.18	*Pichia guilliermondii*
WB10	AB435399	*Pichia guilliermondii* (U45709)	569/570	99.82	0	1	0	*Pichia guilliermondii*

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
WB43	AB435400	*Pichia guilliermondii* (U45709)	567/570	99.47	0	3	0.53	*Pichia guilliermondii*
WC2	AB435401	*Pichia guilliermondii* (U45709)	563/567	99.29	0	4	0.71	*Pichia guilliermondii*
WC5	AB435402	*Pichia guilliermondii* (U45709)	535/536	99.81	0	1	0.19	*Pichia guilliermondii*
WB12	AB436449	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
WC1	AB456555	*Torulaspora maleeae* (AB087395)	542/543	99.82	0	1	0.81	*Torulaspora maleeae*
Basidiomycetous yeasts								
WB2	AB439253	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	597/600	99.5	1	2	0.33	*Rhodotorula mucilaginosa*
WB7	AB439254	*Rhodotorula mucilaginos* (AF070432)	601/602	99.83	1	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*
WC4	AB439255	*Rhodotorula mucilaginosa* (AF070432)	485/485	100	0	0	0	*Rhodotorula mucilaginosa*

ตารางที่ 13 การจัดจำแนกยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว และราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกได้จากตะกอนดินในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ในปี พ. ศ. 2549 พร้อม GenBank accession number

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
Ascomycetous yeasts								
WB42	AB436388	*Candida chrysomelidarum* (AY520294)	501/502	99.8	0	1	0.2	*Candida chrysomelidarum*
WB22	AB436422	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	558/560	99.64	1	1	0.18	*Candida thaimueangensis*
WB30	AB436423	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	559/560	99.82	1	0	0	*Candida thaimueangensis*
WB33	AB436424	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	558/560	99.64	1	1	0.18	*Candida thaimueangensis*
WA8	AB435198	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB20	AB435205	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB25	AB435206	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB26	AB435207	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB31	AB435208	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*
WB34	AB435209	*Candida tropicalis* (U45749)	570/570	100	0	0	0	*Candida tropicalis*

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
WA6	AB436428	*Debaryomyces hansenii* (DQ513292)	583/588	99.15	3	2	0.34	*Debaryomyces hansenii*
WC13	AB436429	*Debaryomyces hansenii* (DQ513292)	583/588	99.12	3	2	0.34	*Debaryomyces hansenii*
WA7	AB436430	*Debaryomyces nepalensis* (U45839)	569/570	99.82	0	1	0.18	*Debaryomyces nepalensis*
WA3	AB456546	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/562	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
WA4	AB456547	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/563	99.82	1	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
WA9	AB456548	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	543/543	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
WB24	AB456549	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	548/549	99.82	0	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
WB28	AB456550	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	561/561	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
WB29	AB456551	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	562/562	100	0	0	0	*Kluyveromyces siamensis*
WB32	AB456552	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	593/596	99.5	2	1	0.18	*Kluyveromyces siamensis*
WC12	AB456553	*Kluyveromyces siamensis* (AB330824)	563/564	99.82	1	0	0	*Kluyveromyces siamensis*

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Strain	Accession Number	Closest Species with Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of gap	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
WB38	AB436460	*Kodamaea ohmeri* (U45702)	512/513	99.81	1	0	0	*Kodamaea ohmeri*
WB36	AB436461	*Metschnikowia koreensis* (AF296438)	515/518	99.42	1	2	0.39	*Metschnikowia koreensis*
WB41	AB436462	*Metschnikowia koreensis* (AF296438)	517/517	100	0	0	0	*Metschnikowia koreensis*
WB35	AB436450	*Pichia kudriavzevii* (U76347)	564/564	100	0	0	0	*Pichia kudriavzevii*
WB17	AB456554	*Torulaspora maleeae* (AB087395)	572/573	99.83	0	1	0.17	*Torulaspora maleeae*
WB37	AB436464	*Wickerhamomyces sydowiorum* (AJ508573)	570/570	100	0	0	0	*Wickerhamomyces sydowiorum*
Basidiomycetous yeasts								
WB27	AB456556	*Aureobasidium* sp. CECT 11965 (AY167611)	591/592	99.83	1	0	0	Undescribed species

2.2.1 ยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

ผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินในป่าชายเลนพบว่า ยีสต์ 51 สายพันธุ์ ซึ่งเท่ากับ 94.4 เปอร์เซ็นต์ของสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ไฟลัม Ascomycota (ตารางที่ 14) 10 สกุล 16 สปีชีส์ โดยอยู่ในชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยกระจายอยู่ในวงศ์ต่าง ๆ 4 วงศ์ ดังนี้

1.) วงศ์ Saccharomycetaceae มี 6 สกุล 9 สปีชีส์ โดยมี 3 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำ คือ *Pichia caribbica, P. guilliermondii* และ *Torulaspora maleeae* สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Debaryomyces hansenii, D. nepalensis, Kluyveromyces siamensis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum*และสปีชีส์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดิน ได้แก่ *Kodamaea ohmeri* และ *Pichia kudriavzevii*

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

3.) วงศ์ Saccharomycodaceae ได้แก่ *Hanseniaspora guilliermondii* ที่แยกจากน้ำ

4.) วงศ์ Metschnikowiaceae คือ *Metschnikowia koreensis* ซึ่งพบเฉพาะในตัวอย่างตะกอนดิน

สำหรับยีสต์ที่เหลืออีก 3 สายพันธุ์ เป็นเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Urediniomycetes อันดับ Sporidiobolales ได้แก่ *Rhodotorula mucilaginosa* ซึ่งพบในเฉพาะตัวอย่างน้ำ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน

สปีชีส์	ยีสต์จากน้ำ		ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ		รวม
	สายพันธุ์	จำนวนสายพันธุ์	สายพันธุ์	จำนวนสายพันธุ์	
Ascomyceteous yeast					
Brettanomyces					
Brettanomyces naardenensis	WB16, WB18, WC9	3	-	-	3
Candida					
Candida chrysomelidarum	-	-	WB42	1	1
Candida parapsilosis	WA11, WA12, WC8	3	-	-	2
Candida thaimueangensis	WB9	1	WB22, WB30, WB33	3	4
Candida tropicalis	WA10, WB1, WB3, WB4, WB8, WB11	6	WA8, WB20, WB25, WB26, WB31, WB34	6	12
Debaryomyces					
Debaryomyces hansenii	-	-	WA6, WC13	2	2
Debaryomyces nepalensis	-	-	WA7	1	1
Hanseniaspora					
Hanseniaspora guilliermondii	WB13	1	-	-	1
Kluyveromyces					
Kluyveromyces siamensis	-	-	WA3, WA4, WA9, WB24, WB28, WB29, WB32, WC12		8
Kodamaea					
Kodamaea ohmeri	WB19	1	WB38	1	2

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สปีชีส์	ยีสต์จากน้ำ		ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ		รวม
	สายพันธุ์	จำนวนสายพันธุ์	สายพันธุ์	จำนวนสายพันธุ์	
Metschnikowia					
Metschnikowia koreensis	-	-	WB36, WB41	2	2
Pichia					
Pichia caribbica	WC26	1	-	-	1
Pichia guilliermondii	WA1, WB6, WB10, WB43, WC2, WC5	6	-	-	6
Pichia kudriavzevii	WB12	1	WB35	1	2
Torulaspora					
Torulaspora maleeae	WB17, WC1	2	-	-	2
Wickerhamomyces sydowiorum	-	-	WB37	1	1
Basidiomyceteous yeast					
Rhodotorula mucilaginosa	WB2, WB7, WC4	3	-	-	3
รวม 10 สกุล 16 สปีชีส์					

2.2.2. ยีสต์สปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

ผลการจัดจำแนกโดยใช้การพิจารณาจากเกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) พบว่ามีเพียงสายพันธุ์ WB15 เท่านั้นที่จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales วงศ์ Candidaceae ที่ใกล้เคียงกับ *Candida lodderae* และพบว่าสายพันธุ์ WB27 เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายของราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ในสกุล *Aureobasidium* คือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Dothideomycetes วงศ์ Dothioraceae (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ยีสต์สปีชีส์ใหม่และสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน

สายพันธุ์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด	ชนิดตัวอย่างที่แยกได้
New species		
WB15	*Candida lodderae*	water
Undescribed species		
WB27	*Aureobasidium* sp. CECT 11965	sediment

จากการจัดจำแนกยีสต์ทั้งหมด 194 สายพันธุ์ ที่แยกจากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำที่เก็บจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยพบว่าจัดจำแนกได้เป็น 18 สกุล 46 สปีชีส์ โดยส่วนใหญ่ คือ 186 สายพันธุ์ (96 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษาทั้งหมด) เป็นยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว 16 สกุล 40 สปีชีส์ ในจำนวนนี้มี 150 สายพันธุ์ (80.6 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว) จัดจำแนกเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 15 สกุล 38 สปีชีส์ โดยแอสโคมัยซีตัสยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำมี 10 สกุล 21 สปีชีส์ ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis, Candida albicans, C. diversa, C.* cf *glabrata, C. fukuyamaensis, C. intermedia, C. natalensis, C. parapsilosis , C. quercitrusa, C. rugosa, Clavispora lusitaniae, Hanseniaspora clermontiae, Galactomyces reessii, Kloeckera lindneri, Lindnera veronae, Pichia caribbica, P. guilliermondii, P. terricola, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii* และ *T. maleeae* ในขณะที่แอสโคมัยซีตัสยีสต์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำมี 4 สกุล 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida chrysomelidarum, C. gotoi, Debaryomyces hansenii, D. nepalensis, Metschnikowia koreensis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum*ส่วนแอสโคมัยซีตัสยีสต์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินมี 6 สกุล 11 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida pseudolambica, C. sanittii, C. silvae, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Hanseniaspora guilliermondii, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Pichia kudriavzevii* และ *P. occidentalis* สำหรับสายพันธุ์ที่เหลือ 36 สายพันธุ์ (19.3 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว) จัดจำแนกเป็นเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Rhodotorula glutinis* และ *R. mucilaginosa* นอกจากนั้นมี 4 สายพันธุ์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายโดยเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) *Aureobasidium* sp. CECT 11965 1 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. ST-464 2 สายพันธุ์ และ

เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. IS1-01 1 สายพันธุ์ สำหรับสายพันธุ์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงมากที่สุดบนฐานข้อมูล GenBank แล้วพบมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ มี 4 สายพันธุ์ (2.1 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาศึกษาทั้งหมด) จัดจำแนกเป็น 3 สกุล 4 สปีชีส์ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Candida lodderae, C. sanittii, Pichia terricola* และ *Saturnispora mendoncae*

3. ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน

3.1 ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน

จากผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดตราดและจันทบุรีทั้งหมดจำนวน 138 สายพันธุ์ แบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำ 109 สายพันธุ์ สรุปได้ว่าจัดจำแนกเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 76 สายพันธุ์ (70 เปอร์เซ็นต์) และเบสิดิโอ-มัยซีตัสยีสต์ 34 สายพันธุ์ (30 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 16) ส่วนยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนดินใต้น้ำพบว่าทั้งหมดเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์จำนวน 29 สายพันธุ์ (ตารางที่ 17) โดยเมื่อพิจารณาความหลากหลายของยีสต์ในแต่ละแหล่งพบว่ามีรายละเอียดดังนี้

ยีสต์จากป่าชายเลนในศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จังหวัดตราด ทั้งที่แยกจากน้ำและตะกอนดินใต้น้ำจำนวน 35 สายพันธุ์จัดจำแนกได้ดังนี้ ยีสต์ที่พบในน้ำ 29 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 7 สกุล10 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida* cf. *glabrata, C. sanittii, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Clavispora lusitaniae, Kluyveromyces siamensis, Lindnera subsufficiens, Pichia terricola, Rhodotorula mucilaginosa* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยมีสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* 1 สปีชีส์ คือ สายพันธุ์ EA1 และมี 1 สายพันธุ์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่มียังไม่มีการอธิบาย *Hanseniaspora* sp. ST-464 โดยพบสายพันธุ์ที่เป็นยีสต์สีแดงสปีชีส์ *Rhodotorula mucilaginosa* มากที่สุด คือ 12 สายพันธุ์ (44 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่พบในน้ำ) และที่พบมากในน้ำรองลงมาคือ *K. siamensis* ซึ่งพบ 6 สายพันธุ์ สำหรับยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำ 6 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Candida gotoi, C. tropicalis* และ *Metschnikowia koreensis* โดยสปีชีส์ที่พบจำนวน

สายพันธุ์มากที่สุดในตะกอนดินคือ *C. tropicalis* (4 สายพันธุ์) นอกจากนี้ *C. tropicalis* ยังเป็นยีสต์เพียงสปีชีส์เดียวที่พบในทั้งน้ำและตะกอนดินในศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน

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

ผลการจัดจำแนกยีสต์จากป่าโกงกางวัดเขาสลัก อำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด จำนวน 20 สายพันธุ์ พบว่าเป็นยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำ 10 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น 3 สกุล 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida intermedia, C. natalensis, C. rugosa, C. thaimueangensis, Kodamaea ohmeri* และ *Rhodotorula mucilaginosa* เป็นยีสต์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Candida sanittii* และ *Lindnera subsufficiens* และเป็นยีสต์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida silvae* (3 สายพันธุ์), *C. tropicalis* (2 สายพันธุ์) และ *Pichia occidentalis* (3 สายพันธุ์) รวมแล้วพบเป็นยีสต์ในสกุล *Candida* มากที่สุดคือ 11 สายพันธุ์

ยีสต์จากป่าโกงกางในเขตชุมชน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 19 สายพันธุ์จัดจำแนกได้ดังนี้ ยีสต์ที่พบในน้ำ 17 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็น 5 สกุล10 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida albicans, C. diversa, C. natalensis, C. quercitrusa, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Hanseniaspora clermontiae, Pichia occidentalis, Kodamaea ohmeri* และ *Rhodotorula mucilaginosa* ยีสต์ที่พบในตะกอนดิน 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Hanseniaspora guilliermondii* ซึ่งพบเฉพาะในตะกอนดินและ *C. tropicalis* ซึ่งพบทั้งในน้ำและตะกอนดิน ยีสต์ที่พบจำนวนมากที่สุดคือยีสต์ในสกุล *Candida* (8 สายพันธุ์)

ผลการจัดจำแนกยีสต์จากป่าชายเลนในศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลนอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 28 สายพันธุ์ พบว่า 27 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 8 สกุล 14 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida natalensis, C. pseudolambica, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Galactomyces reessii, Hanseniaspora guilliermondii, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera veronae, Pichia guilliermondii, P. kudriavzevii, P. occidentalis, Rhodotorula glutinis* และ *R. mucilaginosa* โดยพบ *C. pseudolambica, C. thaimueangensis* และ *C. tropicalis* ทั้งในน้ำและตะกอนดิน พบยีสต์ที่มียังไม่มีการอธิบายซึ่งเหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. ST-464 1 สายพันธุ์ ยีสต์ในสกุล *Rhodotorula* ที่พบในน้ำในศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลนอำเภอขลุงพบมากถึง 9 สายพันธุ์ เป็น *R. glutinis* 1 สายพันธุ์และเป็น *R. mucilaginosa* 8 สายพันธุ์

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

เมื่อพิจารณาเฉพาะยีสต์ที่พบในน้ำในป่าชายเลนแหล่งต่าง ๆ ในบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่กล่าวข้างต้นพบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว ได้แก่ *Candida albicans, C. diversa, C. glabrata, C. fukuyamaensis, C. intermedia, C. natalensis, C. quercitrusa, C. rugosa, Clavispora lusitaniae, Galactomyces reessii, Hanseniaspora clermontiae, Kluyveromyces siamensis, Kloeckera lindneri, Lindnera veronae, Pichia guilliermondii, P. kudriavzevii, P. terricola, Rhodotorula glutinis, R. mucilaginosa, Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulaspora delbrueckii* (ตารางที่ 16) นอกจากนั้นยังพบสปีชีส์ใหม่ 1 สปีชีส์ในสกุล *Candida* (สายพันธุ์ EA1) และสปีชีส์ที่มียังไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. ST-464 (สาย-พันธุ์ EA25 และ ED20) ในขณะที่เมื่อพิจารณาเฉพาะยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำพบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว ได้แก่ *Candida gotoi, Hanseniaspora guilliermondii* และ *Metschnikowia koreensis* เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ Pichia sp. IS1-01 (สายพันธุ์ EF6) และพบมี 2 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Pichia* (สายพันธุ์ EF17) และ *Saturnispora*

(สายพันธุ์ EF10) ส่วนยีสต์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินเป็นยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว ได้แก่ *Candida pseudolambica, C. sanittii, C. silvae, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens*และ *Pichia occidentalis* (ตารางที่ 17)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบชนิดของยีสต์จากตัวอย่างที่เก็บจากทั้งสองจังหวัด ยีสต์ที่พบในน้ำทั้งที่จังหวัดตราดและจันทบุรีได้แก่ *Candida natalensis, C. silvae, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Pichia kudriavzevii, P. occidentalis* และ *Rhodotorula mucilaginosa* ส่วนยีสต์ที่พบในตะกอนดินทั้งที่จังหวัดตราดและจันทบุรีได้แก่ *Candida pseudolambica*, *C. tropicalis* และ *Kodamaea ohmeri* นอกจากนั้นยังพบ *Lindnera subsufficiens* ทั้งในน้ำและตะกอนดินของจังหวัดตราด (ตารางที่ 16 และ 17)

ตารางที่ 16 ยีสต์ที่พบในน้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดตราดและจันทบุรี

สปีชีส์	จังหวัดตราด			จังหวัดจันทบุรี		
	บ้านเปร็ดใน[1]	คลองใหญ่[2]	เขาสมิง[3]	เขตชุมชน อ. ขลุง[4]	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง[5]	คุ้งกระเบน[6]
Described species						
Ascomyceteous yeast						
Candida						
Candida albicans	-	-	-	EC6	-	-
Candida diversa	-	-	-	EC11	-	-
Candida glabrata	EA4	-	-	-	-	-
Candida fukuyamaensis	-	-	-	-	-	EE2
Candida intermedia	-	-	EB9	-	-	-
Candida natalensis	-	-	EB3	EC9	ED16	-
Candida pseudolambica	-	-	-	-	ED8	-
Candida quercitrusa	-	-	-	EC14	-	-
Candida rugosa	-	EF1	EB2, EB4	-	-	-
Candida sanittii	EA22	-	-	-	-	-
Candida silvae	-	-	EB1, EB11	-	-	EE4
Candida thaimueangensis	EA5	-	EB8	EC10	ED1	-

ตารางที่ 16 (ต่อ)

สปีชีส์	จังหวัดตราด			จังหวัดจันทบุรี		
	บ้านเปร็ดใน[1]	คลองใหญ่[2]	เขาสมิง[3]	เขตชุมชน อ. ขลุง[4]	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง[5]	คุ้งกระเบน[6]
Candida tropicalis	EA28	-	EB6	EC5, EC15	ED6	EE3, EE8, EE11, EE12, EE13, EE14, EE16 (7)
Clavispora						
Clavispora lusitaniae	EA18	-	-	-	-	-
Galactomyces						
Galactomyces reessii	-	-	-	-	ED2	-
Hanseniaspora						
Hanseniaspora clermontiae	-	-	-	EC3, EC7	-	-
Kloeckera						
Kloeckera lindneri	-	EF2	-	-	-	-
Kluyveromyces						
Kluyveromyces siamensis	EA8, EA9, EA12, EA14, EA16, EA17 (6)	-	-	-	ED18	EE1, EE5, EE6, EE7
Kodamaea						
Kodamaea ohmeri	-	-	EB12	EC1, EC8	ED11	-

ตารางที่ 16 (ต่อ)

สปีชีส์	จังหวัดตราด			จังหวัดจันทบุรี		
	บ้านเปร็ดใน[1]	คลองใหญ่[2]	เขาสมิง[3]	เขตชุมชน อ. ขลุง[4]	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง[5]	คุ้งกระเบน[6]
Lindnera						
Lindnera veronae	-	-	-	-	ED7	-
Lindnera subsufficiens	EA21			-	-	-
Saccharomyces						
Saccharomyces cerevisiae	EA20	-	-	-	-	-
Pichia						
Pichia guilliermondii	-	-	-	-	ED13, ED19	-
Pichia kudriavzevii	-	EF3	-	-	ED17	-
Pichia occidentalis	-	EF4, EF5	EB7, EB8, EB13	EC2, EC14, EC16	ED4, ED14	-
Pichia terricola	EA10, EA23	-	-	-	-	-
Torulaspora						
Torulaspora delbrueckii	-	-	-	-	-	EE15

ตารางที่ 16 (ต่อ)

สปีชีส์	จังหวัดตราด			จังหวัดจันทบุรี		
	บ้านเปร็ดใน[1]	คลองใหญ่[2]	เขาสมิง[3]	เขตชุมชน อ. ขลุง[4]	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง[5]	คุ้งกระเบน[6]
Basidiomyceteous yeast						
Rhodotorula						
Rhodotorula glutinis	-	-	-	-	W59	-
Rhodotorula mucilaginosa	W1, W2, W5, W7, W11, W13, W15, W16, W18, W24, W25, W26 (12)	W27	W33, W34, W35, W38	W44, W45, W46	W47, W49, W50, W53, W54, W55, W57, W60 (8)	W61, W62, W63, W64
Undescribed species						
Ascomycetous yeast						
Hanseniaspora sp. ST-464	EA25	-	-	-	ED20	-
New species						
Ascomycetous yeast						
Candida sp. 1	EA1	-	-	-	-	-

หมายเหตุ
1. ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด
2. ป่าโกงกาง อ.คลองใหญ่ จ. ตราด
3. ป่าโกงกางวัดเขาสลัก อ. เขาสมิง จ. ตราด
4. ป่าโกงกางในเขตชุมชน อ. ขลุง จ. จันทบุรี
5. ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง จ. จันทบุรี
6. ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี

- ไม่พบยีสต์สปีชีส์นั้น

ตารางที่ 17 ยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดตราดและจันทบุรี

สปีชีส์	จังหวัดตราด			จังหวัดจันทบุรี	
	บ้านเปร็ดใน[1]	คลองใหญ่[2]	เขาสมิง[3]	เขตชุมชนอ. ขลุง[4]	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง[5]
Described species					
Ascomyceteous yeast					
Candida					
Candida diversa	-	EF12	-	-	-
Candida gotoi	EA31	-	-	-	-
Candida pseudolambica	-	EF7, EF8	-	-	ED26
Candida sanittii	-	-	EB15	-	-
Candida silvae	-	EF11	EB16	-	-
Candida thaimueangensis	-	-	-	-	ED22, ED24
Candida tropicalis	EA32, EA33, EA35, EA36	-	EB14	EC17	ED23
Hanseniaspora					
Hanseniaspora guilliermondii	-	-	-	EC18	-
Kodamaea					
Kodamaea ohmeri	-	EF14	-	EC1, EC8	-
Lindnera					
Lindnera subsufficiens	-	EF9, EF13, EF15, EF16	EB17	-	-

ตารางที่ 17 (ต่อ)

สปีชีส์	จังหวัดตราด			จังหวัดจันทบุรี	
	บ้านเปร็ดใน[1]	คลองใหญ่[2]	เขาสมิง[3]	เขตชุมชน อ. ขลุง[4]	ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง[5]
Metschnikowia					
Metschnikowia koreensis	EA30	-	-	-	-
Undescribed species					
Ascomyceteous yeast					
Pichia sp. IS1-01	-	EF6	-	-	-
New species					
Ascomyceteous yeast					
Pichia sp.	-	EF17	-	-	-
Saturnispora sp.	-	EF10	-	-	-

หมายเหตุ 1. ศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จ. ตราด

2. ป่าโกงกาง อ.คลองใหญ่ จ. ตราด

3. ป่าโกงกางวัดเขาสลัก อ. เขาสมิง จ. ตราด

4. ป่าโกงกางในเขตชุมชน อ. ขลุง จ. จันทบุรี

5. ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลน อ. ขลุง จ. จันทบุรี

- ไม่พบยีสต์สปีชีส์นั้น

แอสโคมัยซีตัสยีสต์ที่พบมากที่สุดในน้ำและตะกอนดินในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจังหวัดจันทบุรี คือ สกุล *Candida* โดยพบในน้ำเป็นจำนวนมากที่สุดถึง 33 สายพันธุ์ซึ่งคิดเป็น 30.3 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่พบในน้ำทั้งหมด และพบในตะกอนดิน 16 สายพันธุ์ซึ่งคิดเป็น 55.2 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่พบในตะกอนดินทั้งหมด โดยเฉพาะ *C. tropicalis* ซึ่งพบกระจายทั้งในน้ำ (13 สายพันธุ์) และในตะกอนดิน (6 สายพันธุ์) จากป่าชายเลนเกือบทุกแห่งที่ทำการศึกษา ยกเว้นป่าชายเลนที่อำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด สำหรับแอสโคมัยซีตัสยีสต์ที่พบในน้ำจำนวนมากรองลงมาคือ สกุล *Pichia* (16 สายพันธุ์) และ *Kluyveromyces siamensis* (11 สายพันธุ์) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่พบเฉพาะในน้ำเท่านั้น ส่วนเบสิโอมัยซีตัสยีสต์ที่พบมากที่สุดคือ *Rhodotorula mucilaginosa* (32 สายพันธุ์) ซึ่งพบเฉพาะในน้ำและพบกระจายในทุกแหล่งที่ทำการศึกษา

จากผลการศึกษาพบว่ายีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรีซึ่งตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยมีการปนเปื้อนมลภาวะจากชุมชนมากนั้นเป็นยีสต์สกุล *Candida* และ *Rhodotorula* ทั้งนี้เนื่องจากตั้งอยู่ใกล้แหล่งชุมชน บ่อเลี้ยงกุ้งและโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งพบมากในภาคตะวันออก เช่น ป่าโกงกางในอำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราดและในเขตชุมชน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี นอกจากนี้ป่าชายเลนหลายแห่งที่ทำการศึกษานั้นเป็นป่าชายเลนปลูกใหม่ตามโครงการอนุรักษ์และฟื้นฟูทรัพยากรป่าชายเลนบริเวณฝั่งอ่าวไทยเพื่อเพิ่มพูนสัตว์น้ำและรักษาสมดุลของระบบนิเวศน์ชายฝั่งทะเล (สนใจ, 2548) และมีการเปิดให้เป็นศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนให้บุคคลทั่วไปเข้าชม เช่น ป่าโกงกางวัดเขาสลัก อำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด, ศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลนอำเภอขลุง และ ศูนย์ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี จึงอาจเป็นสาเหตุให้มีการปนเปื้อนมลภาวะจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ได้ ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงสอดคล้องกับรายงานการพบยีสต์กลุ่ม *Candida* และยีสต์สีแดงมากเป็นพิเศษในบริเวณที่ปนเปื้อนมลภาวะ โดยเฉพาะยีสต์สีแดงที่จัดเป็นดัชนีชี้วัดความสกปรกของน้ำที่ Lachance และ Starmer (1998) และ Spencer และ Spencer (1997) รายงานไว้

นอกจากนี้ในช่วงที่เก็บตัวอย่างเป็นช่วงฤดูฝนและมีน้ำหลาก น้ำฝนอาจชะยีสต์จากกิ่งไม้ใบไม้จากแหล่งอื่นมาปนเปื้อนในน้ำและตะกอนดินในป่าชายเลนได้ ทำให้พบยีสต์ในป่าชายเลนของจังหวัดทางฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยเป็นจำนวนมาก และกระแสน้ำที่พัดลงมาหลังฝนตกได้ชะเอาสารอาหารจากแม่น้ำและริมฝั่งออกมาด้วยจึงอาจเป็นสาเหตุให้พบยีสต์สกุลที่เจริญอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีสารอินทรีย์สูง เช่น ยีสต์สกุล *Candida* และ *Rhodotorula*

3.2 ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์

จากผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรี ขันธ์ทั้งหมดจำนวน 56 สายพันธุ์ แบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำจำนวน 28 สายพันธุ์ ซึ่งทั้งหมดเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ และยีสต์ที่แยกได้จากตะกอนดินใต้น้ำ 28 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 24 สายพันธุ์ และเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 4 สายพันธุ์ มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 18 และ 19 ดังนี้

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

การจัดจำแนกยีสต์จากป่าชายเลนในวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 37 สายพันธุ์จัดจำแนกได้ดังนี้ ยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำ 11 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis, Hanseniaspora guilliermondii, Metschnikowia koreensis, Pichia guilliermondii, Torulaspora maleeae* และ *Rhodotorula mucilaginosa* โดยมีสปีชีส์ใหม่ 1 สปีชีส์ ในสกุล *Candida* (สายพันธุ์ WB15) ยีสต์ที่พบในเฉพาะตะกอนดินใต้น้ำ 6 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 3 สปีชีส์คือ *Candida chrysomelidarum, Kluyveromyces siamensis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* นอกจากนั้นยังพบสายพันธุ์ที่เหมือนราคล้ายยีสต์ที่มียังไม่มีการอธิบาย คือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 สำหรับยีสต์ที่พบในทั้งน้ำและตะกอนดินในวนอุทยานปราณบุรีได้แก่ *Candida thaimueangensis, C. tropicalis, Kodamaea ohmeri* และ *Pichia kudriavzevii* ยีสต์ที่พบมากที่สุดคือยีสต์ในสกุล *Candida* โดยพบในน้ำ 7 สายพันธุ์และพบในตะกอนดิน 9 สายพันธุ์

สำหรับการจัดจำแนกยีสต์ในป่าชายเลนในอุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์จำนวน 9 สายพันธุ์ พบว่ายีสต์ที่พบในน้ำ 7 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่

มีการอธิบายแล้ว 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis, Candida parapsilosis, Pichia caribbica, Pichia guilliermondii, Torulaspora maleeae* และ *Rhodotorula mucilaginosa* ส่วนยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำทั้ง 2 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็น *Debaryomyces hansenii* และ *Kluyveromyces siamensis* รวม 9 สายพันธุ์

จากการศึกษายีสต์ที่พบในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยจำนวนรวม 56 สายพันธุ์ จัดจำแนกได้เป็น 12 สกุล 19 สปีชีส์ โดยเป็นยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำ ได้แก่ *Brettanomyces naardenensis, Candida parapsilosis, Hanseniaspora guilliermondii, Pichia caribbica, P. guilliermondii, Rhodotorula mucilaginosa, Torulaspora maleeae* และสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* (สายพันธุ์ WB15) ส่วนสปีชีส์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ ได้แก่ ยีสต์ในสปีชีส์ *Candida chrysomelidarum, Debaryomyces hansenii, D. nepalensis, Kluyveromyces siamensis, Metschnikowia koreensis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* และราคล้ายยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สายพันธุ์ คือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 สำหรับยีสต์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดินมี 3 สปีชีส์ได้แก่ *Candida thaimueangensis C. tropicalis, Kodamaea ohmeri* และ *Pichia kudriavzevii* (ตารางที่ 18 และ 19)

จากผลการศึกษาเมื่อพิจารณาเฉพาะยีสต์ชนิดที่พบในน้ำจากป่าชายเลนทั้งในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ พบว่ามี *Candida parapsilosis* และ *Pichia guilliermondii* กระจายอยู่ในน้ำจากป่าชายเลนของทั้งสองจังหวัด ส่วนยีสต์ที่พบเฉพาะในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เท่านั้นมี 2 สปีชีส์ คือ *Brettanomyces naardenensis* และ *Torulaspora maleeae* เมื่อพิจารณาเฉพาะยีสต์ชนิดที่พบในตะกอนดินใต้น้ำ พบว่ามี *Debaryomyces hansenii* และ *Kluyveromyces siamensis* กระจายในตะกอนดินจากป่าชายเลนทั้งในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ นอกจากนี้ยังพบมี *Candida tropicalis* กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลนของทั้งสองจังหวัด (ตารางที่ 18 และ 19)

ตารางที่ 18 ยีสต์ที่พบในน้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์

สปีชีส์	จังหวัดเพชรบุรี	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	
	แหลมผักเบี้ย[1]	วนอุทยานปราณบุรี[2]	เขาสามร้อยยอด[3]
Described species			
Ascomyceteous yeast			
Brettanomyces			
Brettanomyces naardenensis	-	WB16, WB18	WC9
Candida			
Candida parapsilosis	WA11, WA12	-	WC8
Candida thaimueangensis	-	WB9	-
Candida tropicalis	WA10	WB1, WB3, WB4, WB8, WB11	-
Hanseniaspora			
Hanseniaspora guilliermondii	-	WB13	-
Kodamaea			
Kodamaea ohmeri	-	WB19	-
Pichia			
Pichia caribbica	-	-	WC26
Pichia guilliermondii	WA1	WB6, WB10, WB43	-
Pichia kudriavzevii	-	WB12	-

ตารางที่ 18 (ต่อ)

สปีชีส์	จังหวัดเพชรบุรี	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	
	แหลมผักเบี้ย[1]	วนอุทยานปราณบุรี[2]	เขาสามร้อยยอด[3]
Torulaspora			
Torulaspora maleeae	-	WB17	WC1
Basidiomyceteous yeast			
Rhodotorula			
Rhodotorula mucilaginosa	-	WB2, WB7	WC4
New species			
Ascomyceteous yeast			
Candida sp. 2	-	WB15	-

หมายเหตุ 1. โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี

2. วนอุทยานปราณบุรี อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์

3. อุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอด อ. กุยบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์

- ไม่พบยีสต์สปีชีส์นั้น

ตารางที่ 19 ยีสต์ที่พบในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์

สปีชีส์	จังหวัดเพชรบุรี	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	
	แหลมผักเบี้ย[1]	วนอุทยานปราณบุรี[2]	เขาสามร้อยยอด[3]
Described species			
Ascomyceteous yeast			
Candida			
Candida chrysomelidarum	-	WB42	-
Candida parapsilosis	-	-	-
Candida thaimueangensis	-	WB22, WB30, WB33	-
Candida tropicalis	WA8	WB20, WB25, WB26, WB31, WB34	-
Debaryomyces			
Debaryomyces hansenii	WA6	-	WC13
Debaryomyces nepalensis	WA7	-	-
Kluyveromyces			
Kluyveromyces siamensis	WA3, WA4, WA9	WB24, WB28, WB29, WB32	WC12
Kodamaea			
Kodamaea ohmeri	-	WB38	-
Metschnikowia			
Metschnikowia koreensis	-	WB36, WB41	-

ตารางที่ 19 (ต่อ)

สปีชีส์	จังหวัดเพชรบุรี	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	
	แหลมผักเบี้ย[1]	วนอุทยานปราณบุรี[2]	เขาสามร้อยยอด[3]
Pichia			
Pichia kudriavzevii	-	WB35	-
Wickerhamomyces			
Wickerhamomyces sydowiorum	-	WB37	-
Undescribed species			
Ascomyceteous yeast			
Aureobasidium sp. CECT 11965	-	WB27	-

หมายเหตุ 1. โครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ. เพชรบุรี

2. วนอุทยานปราณบุรี อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์

3. อุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอด อ. กุยบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์

- ไม่พบยีสต์สปีชีส์นั้น

เมื่อพิจารณาความหลากหลายของยีสต์ที่พบในป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ในบริเวณชายฝั่งด้านตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน โดยเปรียบเทียบกับป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรีซึ่งอยู่บริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนแล้วพบว่ามีความหลากหลายของชนิดแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือการที่ไม่พบยีสต์กลุ่มใดมากเป็นพิเศษในป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์เหมือนที่พบในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรี อาจเป็นเพราะบริเวณจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์มีโรงงานอุตสาหกรรมน้อยกว่าจังหวัดทางภาคตะวันออก ป่าชายเลนที่ทำการศึกษาตั้งอยู่ไกลแหล่งชุมชน อีกทั้งยังเก็บตัวอย่างในฤดูหนาว ทำให้ไม่มีการปนเปื้อนยีสต์จากแหล่งอื่นเช่น กิ่งไม้ใบไม้ลงมาปะปนในน้ำและตะกอนดินของป่าชายเลน นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาดังข้างต้นแล้ว ป่าชายเลนในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ยังมีสภาพแวดล้อมเฉพาะต่างจากป่าชายเลนที่ทำการศึกษาในจังหวัดตราดและจันทบุรีดังนี้

ป่าชายเลนในวนอุทยานปราณบุรีเป็นป่าชายเลนเก่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศน์สูงและถูกรบกวนจากกิจกรรมของมนุษย์น้อย เนื่องจากได้รับการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมมาจาก “โครงการพัฒนาป่าไม้ปากน้ำปราณบุรี” ตามพระราชประสงค์ของสมเด็จพระนางเจ้าพระบรมราชินีนาถ และกรมป่าไม้ได้ประกาศจัดตั้งเป็นวนอุทยานเมื่อวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2525 (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพืชพันธุ์, 2550) จนถึงเวลานี้เป็นเวลากว่า 25 ปี จึงน่าจะเป็นสาเหตุทำให้พบว่ามีความหลากหลายของยีสต์ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยอีกสองแห่ง คือ พบยีสต์ถึง 11 สกุล 15 สปีชีส์ ป่าชายเลนที่มีความหลากหลายของยีสต์รองลงมาคือ ป่าชายเลนในอุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอดซึ่งพบยีสต์ 7 สกุล 8 สปีชีส์ ทั้งนี้เนื่องจากมีสภาพภูมิประเทศเป็นภูเขาหินปูนในยุคเพอร์เมียนทำให้น้ำและดินมีค่าพีเอชสูงประมาณ 8.05 ไม่เหมาะสมต่อยีสต์ซึ่งปกติเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีค่าพีเอชเป็นกรดเล็กน้อย และยังพบว่าพื้นที่บริเวณนี้ในอดีตเคยเป็นทะเลหรืออ่าว ซึ่งต่อมาถูกปิดกั้นด้วยตะกอนและสันทรายและมีการสะสมของตะกอนที่ราบลุ่ม และเปลี่ยนสภาพเป็นทุ่งน้ำกร่อยซึ่งได้รับอิทธิพลความเค็มของน้ำทะเลท่วมถึงแต่ไม่ท่วมต่อเนื่องกันทุกปี (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพืชพันธุ์, 2550) ทำให้ดินมีความเค็มเฉลี่ยสูงถึง 32 ส่วนต่อพันส่วน มากกว่าระดับความเค็มเฉลี่ยของน้ำทะเลในอ่าวไทยซึ่งมีค่าความเค็มเฉลี่ยเพียง 30 ส่วนต่อพันส่วน ปัจจัยทั้งสองนี้จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้พบความหลากหลายของยีสต์ที่พบในป่าชายเลนในอุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอดน้อย และป่าชายเลนที่พบมีความหลากหลายของยีสต์น้อยที่สุดในบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าว

ไทยที่ทำการศึกษา คือ ป่าชายเลนในโครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ยซึ่งพบยีสต์เพียง 4 สกุล 6 สปีชีส์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพื้นที่ป่าชายเลนในบริเวณนี้ ได้ถูกใช้เป็นบ่อบำบัดน้ำเสียใน ‘‘โครงการศึกษาวิจัยและพัฒนาสิ่งแวดล้อมแหลมผักเบี้ย อันเนื่องมาจาก พระราชดำริ’’ ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2535 เป็นต้นมา ซึ่งโครงการนี้มีระบบบำบัดน้ำเสียด้วยแปลงพืชป่าชายเลนอันมีโกงกางและแสมเป็นหลัก (มูลนิธิชัยพัฒนา, 2535) จึงทำให้พื้นที่บริเวณนี้เกิดการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ยีสต์ที่มีการเจริญได้ดีในน้ำเสียที่นำมาบำบัดก็จะมีจำนวนมาก ในขณะเดียวกันยีสต์ที่ไม่สามารถเจริญได้ หรือเจริญได้น้อยก็จะลดน้อยลงจนหายไปในที่สุด ทำให้ยีสต์ที่พบในป่าชายเลนในโครงการในพระราชดำริแหลมผักเบี้ยมีความหลากหลายค่อนข้างต่ำ แต่อีกนัยหนึ่ง ยีสต์ที่พบได้ในบ่อน้ำเสียนี้อาจเป็นยีสต์ที่สามารถใช้ในการบำบัดน้ำเสียได้

จากการพิจารณาเปรียบเทียบการกระจายตัวของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทย พบมีแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 6 สกุล 7 สปีชีส์ ที่พบทั้งในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตก โดยพบ *Pichia guilliermondii* และ *P. kudriavzevii* เฉพาะในน้ำ พบ *Metschnikowia koreensis* เฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ และพบ *Candida thaimueangensis, C. tropicalis, Kluyveromyces siamensis* และ *Kodamaea ohmeri* กระจายอยู่ทั้งในน้ำและตะกอนดินของทั้งในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตก โดยพบมี *K. siamensis* เฉพาะในน้ำของป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและในตะกอนดินป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยเท่านั้น สำหรับเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์นั้นพบกระจายทั่วไปในน้ำของป่าชายเลนเกือบทุกแห่งที่ทำการศึกษาโดยมีสปีชีส์ที่พบเป็นหลักคือ *Rhodotorula mucilaginosa* (36 สายพันธุ์) คิดเป็น 18.0 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดที่ทำการศึกษา รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 20

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

Candida เช่นกัน (กุสุมาวดี, 2549; สมจิต, 2550) โดยพบมากถึง 37 สายพันธุ์ คิดเป็น 26 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดในน้ำ และในจำนวนนี้พบเป็น *Candida tropicalis* มากที่สุด (13 สายพันธุ์) สำหรับยีสต์สีแดงในสกุล *Rhodotorula* (37 สายพันธุ์) นั้นพบว่า 34 สายพันธุ์แยกได้จากในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรี ในขณะที่พบในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เพียง 3 สายพันธุ์ และจากการที่ยีสต์สีแดงเป็นดัชนีบ่งชี้มลภาวะในน้ำเสียจากชุมชน (สาวิตรี, 2549) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าน้ำในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรีมีการปนเปื้อนน้ำเสียจากชุมชนซึ่งอาจเนื่องมาจากการที่ป่าชายเลนที่ทำการศึกษาตั้งอยู่ใกล้แหล่งชุมชนและบ่อเลี้ยงกุ้ง และยังอาจเนื่องมาจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างอยู่ในช่วงฤดูมรสุมดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น มีฝนตกหนักและเกิดน้ำท่วมขังในตัวจังหวัดตราดและจันทบุรี ทำให้ต้องมีการระบายน้ำที่ท่วมขังลงสู่แม่น้ำและป่าชายเลนที่ติดกับทะเล จึงเป็นเหตุให้น้ำในป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรีมีการปนเปื้อนน้ำเสียจากชุมชน ยีสต์ที่พบรองลงมาในน้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือ *Kluyveromyces siamensis* และ *Pichia occidentalis* ซึ่งพบ 11 และ 9 สายพันธุ์ตามลำดับ

สำหรับยีสต์ที่พบมากที่สุดในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือ ยีสต์ในสกุล *Candida* (26 สายพันธุ์) คิดเป็น 46.4 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดในตะกอนดิน และในจำนวนนี้พบเป็น *Candida tropicalis* มากที่สุด (12 สายพันธุ์) ยีสต์ที่พบรองลงมาคือ *Kluyveromyces siamensis* (8 สายพันธุ์) และ *Lindnera subsufficiens* (4 สายพันธุ์) (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน

สปีชีส์	ชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน		ชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน	
	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ
Ascomyceteous yeast				
Brettanomyces				
Brettanomyces naardenensis	-	-	WB16, WB18, WC9	-
Candida				
Candida albicans	EC6	-	-	-
Candida chrysomelidarum	-	-	-	WB42
Candida diversa	EC11	-	-	-
Candida cf. *glabrata*	EA4	-	-	-
Candida gotoi	-	EA31	-	-
Candida fukuyamaensis	EE2	-	-	-
Candida intermedia	EB9	-	-	-
Candida natalensis	EB3, EC9, ED16	-	-	-
Candida parapsilosis	-	-	WA11, WA12, WC8	-
Candida pseudolambica	ED8	ED26, EF7, EF8	-	-
Candida quercitrusa	EC14	-	-	-
Candida rugosa	EB2, EB4, EF1	-	-	-
Candida sanittii	EA22	EB15	-	-
Candida silvae	EB1, EE4	EB11, EB16, EF11	-	-
Candida thaimueangensis	EA5, EB8, EC10, ED1	ED22, ED24	WB9	WB22, WB30, WB33

ตารางที่ 20 (ต่อ)

สปีชีส์	ชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน		ชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน	
	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ
Candida tropicalis	EA28, EA32, EB6, EC5, EC15,ED6, EE3, EE8, EE11, EE12, EE13, EE14, EE16 (13)	EA33, EA35, EA36, EB14, EC17, ED23 (6)	WA10, WB1, WB3, WB4, WB8, WB11 (6)	WA8, WB20, WB25, WB26, WB31, WB34 (6)
Clavispora				
Clavispora lusitaniae	EA18	-	-	-
Debaryomyces				
Debaryomyces hansenii	-	-	-	WA6, WC13
Debaryomyces nepalensis	-	-	-	WA7
Galactomyces				
Galactomyces reessii	ED2	-	-	-
Hanseniaspora				
Hanseniaspora clermontiae	EC3, EC7	-	-	-
Hanseniaspora guilliermondii	-	EC8, EC9	WB13	-
Kloeckera				
Kloeckera lindneri	EF2	-	-	-
Kluyveromyces				
Kluyveromyces siamensis	EA8, EA9, EA12, EA14, EA16, EA17, ED18, EE1, EE5, EE6, EE7 (11)	-	-	WA3, WA4, WA9, WB24, WB28, WB29, WB32, WC12 (8)

ตารางที่ 20 (ต่อ)

สปีชีส์	ชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน		ชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน	
	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ
Kodamaea				
Kodamaea ohmeri	EC1, EC8, ED11	EB12, EF14	WB19	WB38
Metschnikowia				
Metschnikowia koreensis	-	EA30	-	WB36, WB41
Lindnera				
Lindnera subsufficiens	EA21, EF9	EB17, EF13, EF15, EF16	-	-
Lindnera veronae	ED7	-	-	-
Pichia				
Pichia caribbica	-	-	WC26	-
Pichia guilliermondii	ED13, ED19	-	WA1, WB6, WB10, WB43, WC2, WC5	-
Pichia kudriavzevii	ED17, EF3	-	WB12	WB35
Pichia occidentalis	EB7, EB8, EC2, EC14, EC16, ED4, ED14, EF4, EF5 (9)	EB13	-	-
Pichia terricola	EA10 , EA23	-	-	-
Saccharomyces				
Saccharomyces cerevisiae	EA20	-	-	-
Torulaspora				
Torulaspora delbrueckii	EE15	-	-	-
Torulaspora maleeae	-	-	WB17, WC1	-

ตารางที่ 20 (ต่อ)

สปีชีส์	ชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน		ชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน	
	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ	ยีสต์จากน้ำ	ยีสต์จากตะกอนดินใต้น้ำ
Wickerhamomyces				
Wickerhamomyces sydowiorum	-	-	-	WB37
Basidiomyceteous yeast				
Rhodotorula glutinis	W59	-	-	-
Rhodotorula mucilaginosa	W1, W2, W5, W7, W11, W13, W15, W16, W18, W24, W25, W26, W27, W33, W34, W35, W38, W44, W45, W46, W47, W49, W50, W53, W54, W55, W57, W60, W61, W62, W63, W64	-	WB2, WB7, WC4	-
New species				
Candida sp. 1	EA1	-	-	-
Candida sp. 2	-	-	WB15	-
Pichia sp.	-	EF17	-	-
Saturnispora sp.	-	EF10	-	-
Undescribed species				
Aureobasidium sp. CECT 11965	-	-	-	WB27
Hanseniaspora sp. ST-464	EA25, ED20	-	-	-
Pichia sp. IS1-01	-	EF6	-	-

เมื่อเปรียบเทียบผลจากการศึกษาความหลากหลายของยีสต์จากน้ำในป่าชายเลนด้านอ่าวไทยกับด้านทะเลอันดามันทางภาคใต้ของประเทศไทย ณ อุทยานแห่งชาติเขาลำปีหาดท้ายเหมือง และอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะระเกาะพระทอง จังหวัดพังงา (Limtong *et al.*, 2008b) และในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง (สมจิต, 2551) พบมียีสต์ 10 สกุล 25 สปีชีส์ที่พบทั้งในป่าชายเลนบริเวณชายทะเลฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ได้แก่ *Candida* cf. *glabrata, C. fukuyamaensis, C. intermedia,C. natalensis, C. parapsilosis, C. pseudolambica, C. quercitrusa, C. rugosa, C. sanittii , C. silvae, C. thaimueangensis, C. tropicalis, Debaryomyces nepalensis, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Metschnikowia koreensis, Pichia caribbica, P. guilliermondii, P. kudriavzevii, P. occidentalis, P. terricola, Rhodotorula mucilaginosa , Torulaspora maleeae* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* ในขณะที่ยีสต์ที่พบเฉพาะด้านอ่าวไทยมี 10 สกุล 14 สปีชีส์คือ *Brettanomyces naardenensis, Candida albicans, C. chrysomelidarum, C. diversa, C. gotoi, Clavispora lusitaniae, Debaryomyces hansenii, Galactomyces reessii, Hanseniaspora clermontiae, H. guilliermondii, Kloeckera lindneri, Saccharomyces cerevisiae, Lindnera veronae* และ *Rhodotorula glutinis* และยีสต์ที่พบเฉพาะด้านทะเลอันดามันมี 7 สกุล 24 สปีชีส์คือ *Candida berthetii, C. boidinii, C. butyri, C. conglobata, C. fermentati, C. glabrata, C. membranifaciens, C. palmioleophila, C. picinguabensis, C. phangngensis, C. pseudointermedia, Debaryomyces polymorphus, D. pseudopolymorphus, D. vanrijae, Galactomyces geotrichum, Lodderomyces elongisporus, Pichia burtonii, P.(Lindnera.) fabianii, P. galeiformis, P.(L.) kluyveri, P. sporocuriosa, Trichosporon asahii, T. coremiiforme* และ *T. japonicum*

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาความหลากหลายของยีสต์จากกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วงในป่าชายเลนด้านอ่าวไทยในจังหวัดตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (กุสุมาวดี, 2549) พบมียีสต์ 5 สกุล 9 สปีชีส์ที่พบทั้งในน้ำ ตะกอนดินใต้น้ำ กิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วงในป่าชายเลนบริเวณชายทะเลฝั่งอ่าวไทย ได้แก่ *Candida parapsilosis, C. silvae, C. tropicalis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Pichia guilliermondii, P. kudriavzevii, P. occidentalis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* โดยยีสต์ทั้ง 9 สปีชีส์พบในน้ำในป่าชายเลนบริเวณทะเลอันดามันทางภาคใต้ของประเทศไทยดังที่กล่าวมาแล้วด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่ายีสต์ 5 สกุล 9 สปีชีส์นี้ พบกระจายอยู่ทั่วไปในถิ่นที่อยู่ต่าง ๆ ในป่าชายเลนของประเทศไทย นอกจากนี้การที่พบ *Kluyveromyces siamensis* กระจายอยู่ในทั่วไป

ในป่าชายเลนในบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามันเป็นจำนวนมากโดยที่ไม่มีรายงานการค้นพบ *K. siamensis* ในประเทศอื่นเลยนั้น จึงเป็นไปได้ว่ายีสต์สปีชีส์นี้อาจมีแหล่งที่อยู่อาศัยจำเพาะอยู่ในป่าชายเลนของประเทศไทย หรือประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้นแบบเดียวกับประเทศไทยที่ยังไม่มีการศึกษา

4. การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่

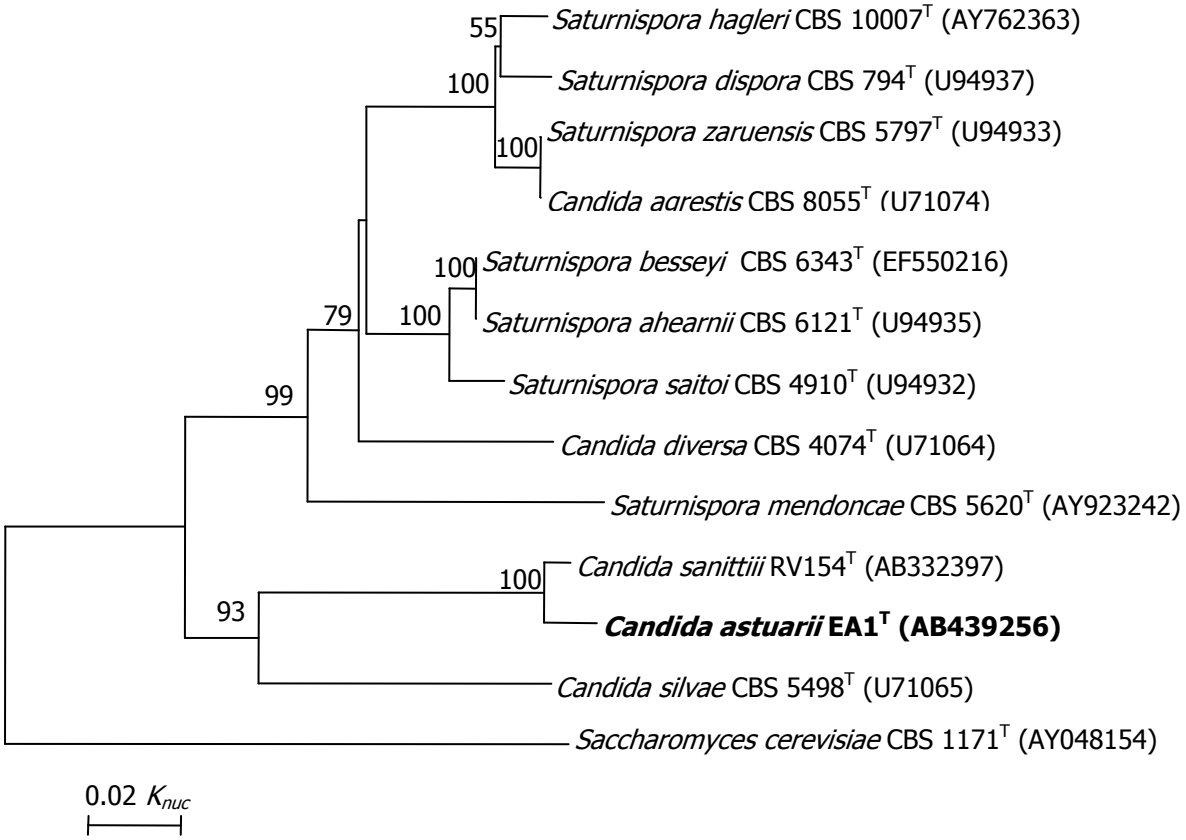
การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่ได้ศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่ ดังนี้

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

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EA1พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida sanittii* $RV154^T$ โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.3 เปอร์เซ็นต์ (7 นิวคลีโอไทด์ ใน 535 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EA1 (ภาพที่ 3) พบว่ายีสต์ EA1 สร้างคลัสเตอร์กับ *Candida sanittii* $RV154^T$ และ *Candida silvae* NRRL $Y\text{-}6725^T$ แต่อยู่ในตำแหน่งที่ต่างจาก *Candida sanittii* $RV154^T$ ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และสปีชีส์ที่รู้จักแล้วสปีชีส์อื่น ๆ

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ EA1 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida astuarii* sp. nov. โดยมี EA1 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*astuarii*" เนื่องจากแยกได้จากน้ำที่เก็บจากเขตศูนย์ศึกษาป่าชายเลนบ้านเปร็ดใน จังหวัดตราด สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสาย

พันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 29900^T) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 104877^T) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11021^T) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 3 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EA1^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida astuarii* sp. nov. ($EA1^T$)

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

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

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

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

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	+
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	-
ซอร์โบส	-	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	-
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	-

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

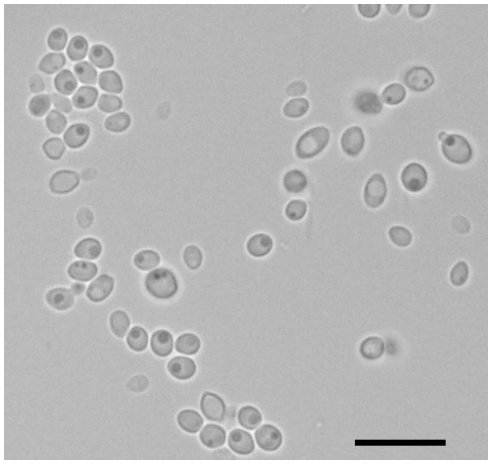
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+

การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q8
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



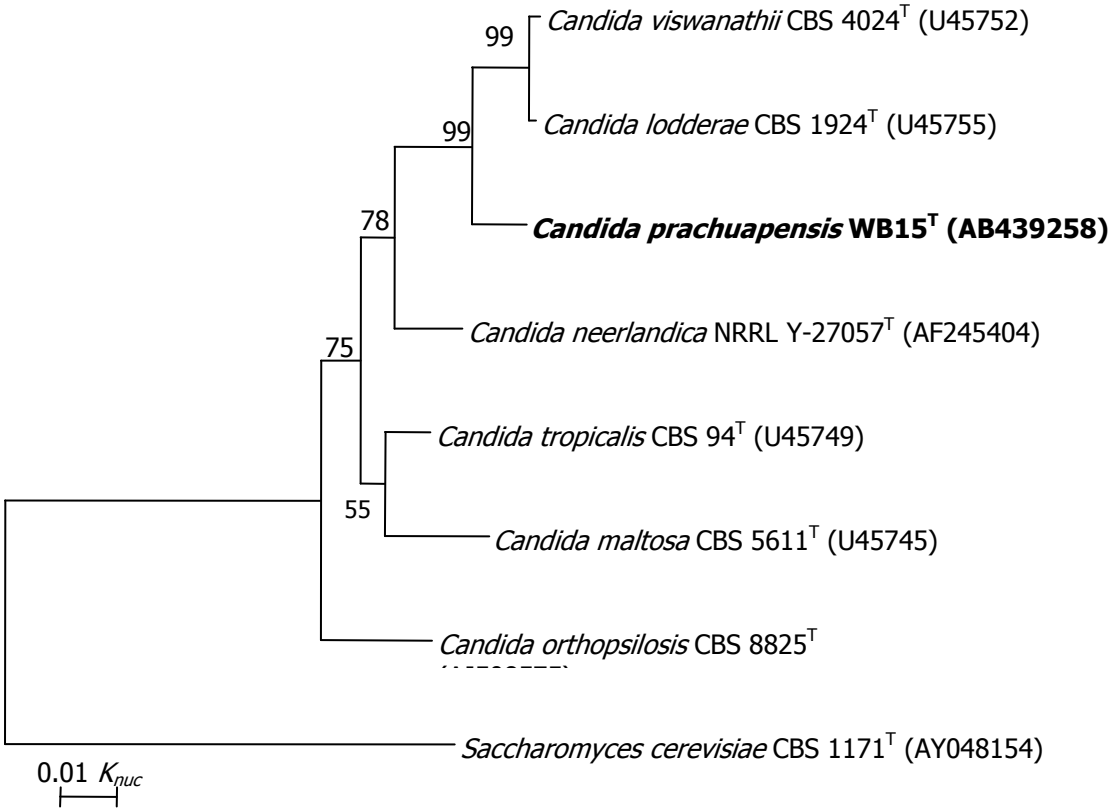
ภาพที่ 4 สัณฐานวิทยาของ *Candida astuarii* sp. nov. ($EA1^T$) ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

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

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ WB15 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida lodderae* CBS 1924^T โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.6 เปอร์เซ็นต์ (9 นิวคลีโอไทด์ ใน 571 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็น

สปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ WB15 (ภาพที่ 5) พบว่า WB15 สร้างคลัสเตอร์กับ *Candida lodderae* CBS 1924^{T} ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดและ *Candida viswanathii* CBS 4024^{T} เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และสปีชีส์ที่รู้จักแล้วสปีชีส์อื่น ๆ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์สายพันธุ์ WB15 เป็นสปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ WB15 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida prachuapensis* sp. nov. โดยมี WB15 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “*prachuapensis*” เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างน้ำในเขตวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ยีสต์สายพันธุ์ WB15 ซึ่งเป็น type strain ของยีสต์สปีชีส์ใหม่นี้ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 29904^{T}) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 104881^{T}) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11024^{T}) ประเทศเนเธอร์แลนด์



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

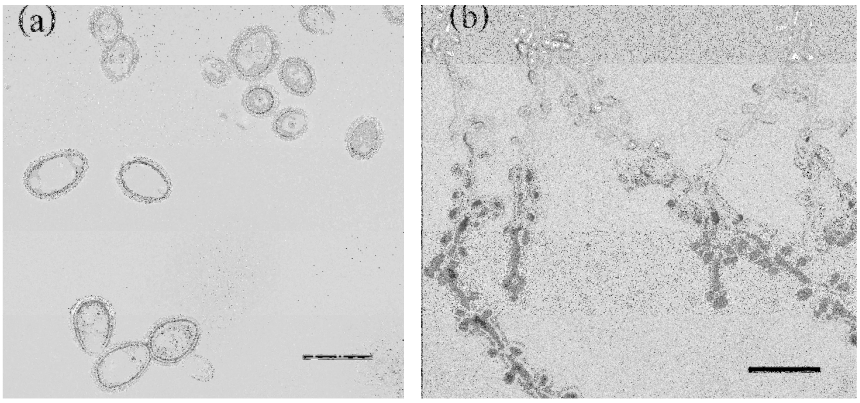
ลักษณะของ *Candida prachuapensis* sp. nov. (WB15^T)

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

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีโคโลนีสีครีม รูปร่างกลม ผิวหน้าขรุขระมีลักษณะทึบด้านตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยและทึบกว่าบริเวณขอบซึ่งมีลักษณะการเจริญคล้ายเส้นใยของเชื้อรา

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

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



ภาพที่ 6 สัณฐานวิทยาของ *Candida pr chuapensis* sp. nov. (WB15^{T})

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

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

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	+

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

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ลักษณะอื่นๆ:

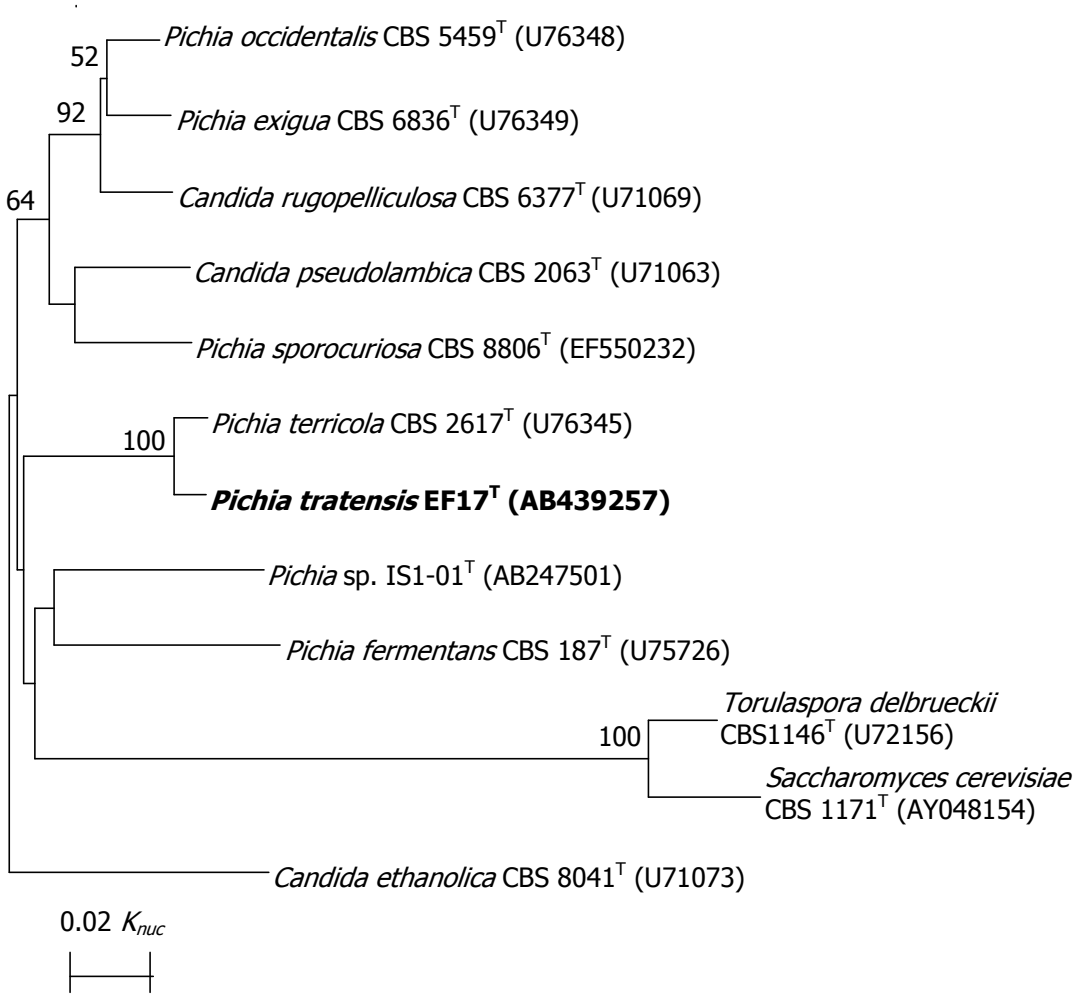
การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-

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

4.3 *Pichia tratensis* sp. nov. (EF17^{T})

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

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ามีการสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar และ acetate agar หลังจากบ่ม 7 วัน ที่ 15 องศาเซลเซียส โดยสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม จำนวน 1-2 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส และแอสคัสคงทน นอกจากนี้ EF17 มีลักษณะฟีโนไทป์อื่น ๆ ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Pichia* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Pichia* และตั้งชื่อเป็น *Pichia tratensis* sp. nov. โดยมี EF17 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า "*tratensis*" เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างตะกอนดินในอำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด สำหรับ type strain EF17 ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 29902^{T}) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 104879^{T}) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11023^{T}) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 7 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EF17^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Pichia tratensis* sp. nov. (EF17^T)

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

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีโคโลนีสีขาวครีมค่อนข้างโปร่งแสง ขอบเรียบโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย ผิวหน้าตรงกลางโคโลนีนูนขึ้นเล็กน้อย

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar และ acetate agar หลังจากบ่มนาน 7 วัน ที่ 15 องศาเซลเซียส พบว่ามีการสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม (spheroidal) จำนวน 1-2 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส และแอสคัสคงทน (persistent) (ภาพที่ 8b)

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์บ่มนาน 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

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

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

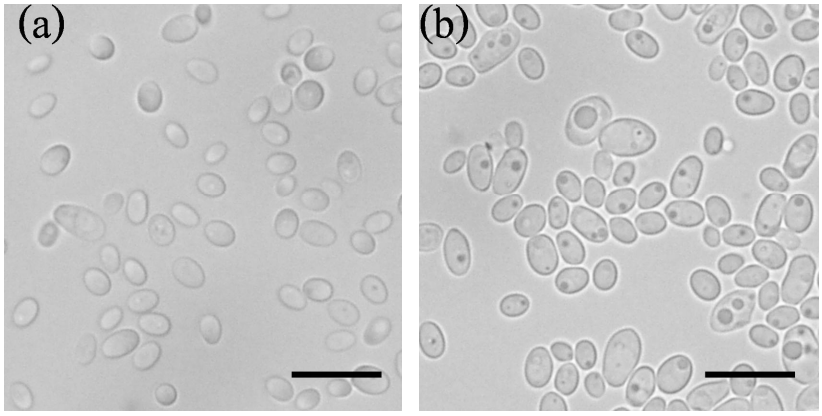
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	w/l
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-

การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q7
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 8 สัณฐานวิทยาของ *Pichia tratensis* sp. nov. (EF17^{T})

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

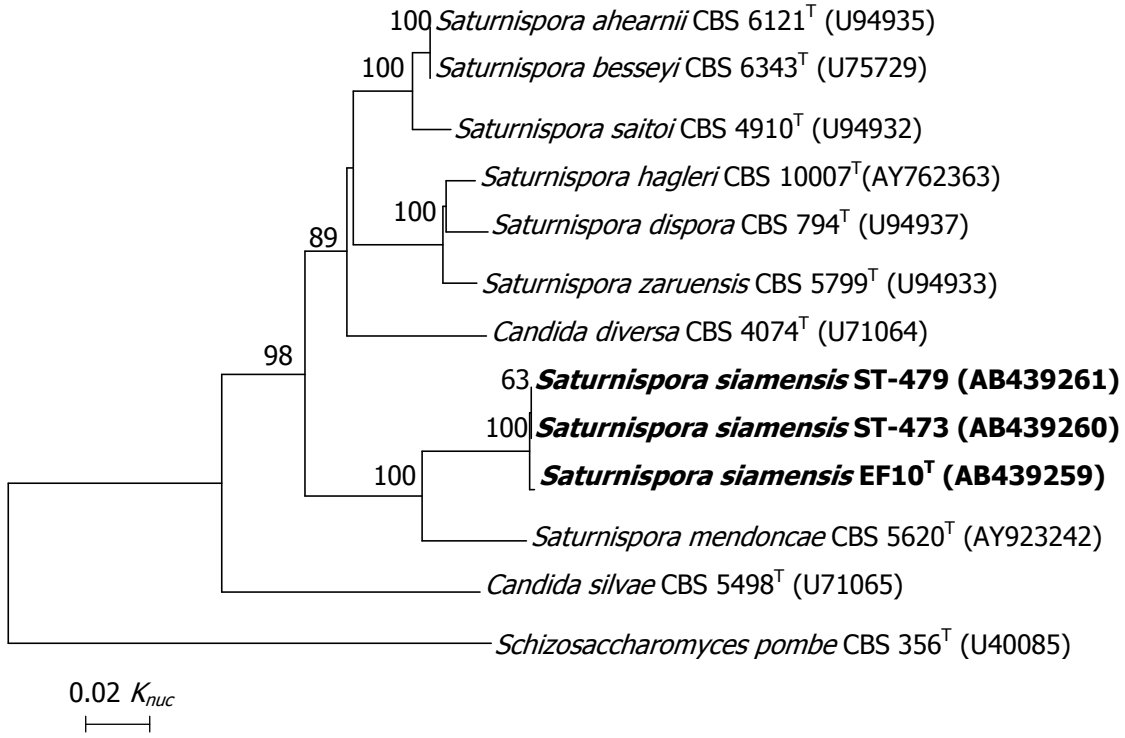
(b) การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar หลังบ่ม 7 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

4.4 *Saturnispora siamensis* sp. nov. (EF10^{T})

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EF10 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Saturnispora mendocae* CBS 5620^{T} โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 เปอร์เซ็นต์ (32 นิวคลีโอไทด์ ใน 535 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นพบว่า EF10 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA เหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ ST-473 และ ST-479 ซึ่ง ดร. ศศิธร จินดามรกฎ แยกได้จากกิ่งไม้ผุ และเห็ด (*Hygrophorus* sp.) ตามลำดับ

ที่น้ำตกโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา เมื่อวันที่ 5 ก.พ. 2546 เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EF10, ST-473 และ ST-479 (ภาพที่ 9) พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันมากบนต้นไม้วิวัฒนาการ โดย EF10 ต่างจาก ST-473 และ ST-479 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกันเพียงเล็กน้อย และทั้ง 3 สายพันธุ์สร้างคลัสเตอร์กับ *Saturnispora mendocae* CBS 5620^{T} ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใน *Saturnispora* clade ดังนั้นจึงเสนอว่ายีสต์สายพันธุ์ EF10 เป็นสปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ามีการสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar และ malt extract agar หลังจากบ่ม 7 วัน ที่ 15 องศาเซลเซียส โดยสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม จำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส และแอสคัสคงทน นอกจากนี้ลักษณะฟีโนไทป์อื่น ๆ เป็นลักษณะของสกุล *Saturnispora* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Saturnispora* และตั้งชื่อเป็น *Saturnispora siamensis* sp. nov. โดยมี EF10 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “*siamensis*”เนื่องจากแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำที่เก็บในประเทศไทยซึ่งมีชื่อเดิมว่าสยาม สำหรับ type strain EF10 ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 29901^{T}) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 104878^{T}) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11022^{T}) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 9 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ EF10^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Saturnispora siamensis* sp. nov. (EF10^T)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลมและรูปร่างรีขนาด 1.3-3.2 x 1.4-8.2 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ เชื้อจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนก้นหลอด มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 10a)

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

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar และ malt extract agar หลังจากบ่ม 7 วัน ที่ 15 องศาเซลเซียส พบการสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม (spheroidal) จำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส และแอสคัสคงทน (persistent) (ภาพที่ 10b)

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

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

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

มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	-	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	w/-	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	-	กรดแลคติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟฟีโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-	ไซลิทอล	-

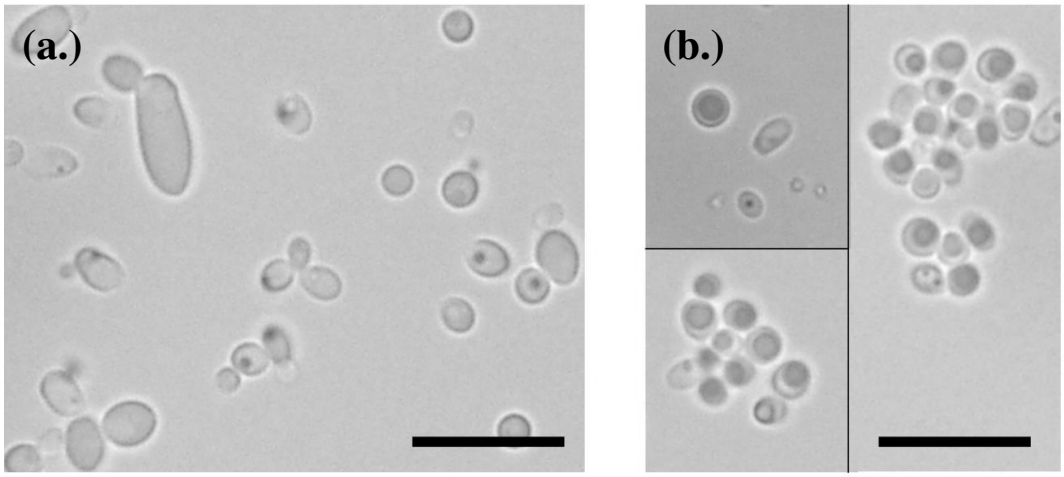
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	w
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	-

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



ภาพที่ 10 สัณฐานวิทยาของ *Saturnispora siamensis* sp. nov. ($EF10^T$)

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

(b) การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar หลังบ่ม 14 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

สรุปผล

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดตราดและจันทบุรี และในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบนที่จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์โดยการแยกยีสต์และจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ได้ผลดังนี้

1. แยกยีสต์ได้จากตัวอย่างน้ำด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นเมมเบรนจำนวน 138 สายพันธุ์ จาก 29 ตัวอย่าง โดยแยกได้จากตัวอย่างจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทยตอนบน 109 สายพันธุ์ และจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยตอนบน 29 สายพันธุ์ ส่วนตัวอย่างตะกอนดิน 17 ตัวอย่างแยกได้ยีสต์โดยเทคนิคการเพิ่มจำนวน 56 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งเป็น 29 สายพันธุ์จากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและ 27 สายพันธุ์จากตัวอย่างฝั่งตะวันตก

2. การจัดจำแนกยีสต์จากตัวอย่างน้ำ 138 สายพันธุ์ พบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 34 สปีชีส์ 134 สายพันธุ์ คือ *Brettanomyces naardenensis, Candida albicans, Candida diversa, Candida* cf. *glabrata, Candida fukuyamaensis, Candida intermedia, Candida natalensis, Candida parapsilosis , Candida pseudolambica, Candida quercitrusa, Candida rugosa, Candida sanittii, Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Clavispora lusitaniae, Galactomyces reessii, Hanseniaspora clermontiae, Hanseniaspora guilliermondii, Kloeckera lindneri, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Lindnera veronae, Pichia caribbica, Pichia guilliermondii, Pichia kudriavzevii, Pichia occidentalis, Pichia terricola, Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii* และ *Torulaspora maleeae* เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สปีชีส์ 2 สายพันธุ์ คือ *Hanseniaspora* sp. ST-464 และเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ 2 สายพันธุ์ คือ สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida sanittii* และ *Candida lodderae* ซึ่งตั้งชื่อเป็น *Candida astuarii* sp. nov. และ *Candida prachuapensis* sp. nov. ตามลำดับ

ส่วนยีสต์จากตัวอย่างจากตะกอนดิน 56 สายพันธุ์ จาก 17 ตัวอย่าง พบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 17 สปีชีส์ 52 สายพันธุ์ คือ *Candida chrysomelidarum, Candida gotoi, Candida pseudolambica, Candida sanittii, Candida silvae, Candida thaimueangensis, Candida tropicalis, Debaryomyces hansenii, Debaryomyces nepalensis, Hanseniaspora guilliermondii, Kluyveromyces siamensis, Kodamaea ohmeri, Lindnera subsufficiens, Metschnikowia koreensis, Pichia kudriavzevii, Pichia occidentalis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum*เป็นยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สปีชีส์ 1 สายพันธุ์ คือ *Pichia* sp. IS1-01 และเป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สปีชีส์ 1 สายพันธุ์ คือ *Aureobasidium* sp. CECT 11965 นอกจากนี้พบเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ 2 สายพันธุ์ คือ สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Pichia terricola* และ *Saturnispora mendoncae* ซึ่งตั้งชื่อเป็น *Pichia tratensis* sp. nov. และ *Saturnispora siamensis* sp. nov. ตามลำดับ

จากการจัดจำแนกยีสต์จากน้ำและตะกอนดินทั้งหมด 194 สายพันธุ์ พบเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 186 สายพันธุ์ (96 เปอร์เซ็นต์) สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 4 สายพันธุ์ (2 เปอร์เซ็นต์) และสปีชีส์ใหม่ 4 สายพันธุ์ (2 เปอร์เซ็นต์)

3. จากการพิจารณาการกระจายตัวของยีสต์ในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทยพบมีแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 11 สกุล 24 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย โดยมี 9 สกุล 16 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในน้ำ คือ *Candida albicans, C. diversa, C.* cf. *glabrata, C. fukuyamaensis, C. intermedia, C. natalensis, C. quercitrusa, C. rugosa, Clavispora lusitaniae, Galactomyces reessii, Hanseniaspora clermontiae, Kloeckera lindneri, Lindnera verona, Pichia terricola, Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulaspora delbrueckii* สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินมี 2 สกุล 2 สปีชีส์ คือ *Candida gotoi* และ *Issatchenkia siamensis* (*Pichia* sp. IS1-01) และมี 3 สกุล 5 สปีชีส์ที่พบทั้งในน้ำและตะกอนดิน ได้แก่ *Candida pseudolambica, C. sanittii, C. silvae, Lindnera subsufficiens* และ*Pichia occidentalis* พบแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 5 สกุล 8 สปีชีส์ ที่พบเฉพาะในป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย โดยมียีสต์ 4 สกุล 4 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในน้ำ คือ *Brettanomyces naardenensis, Candida parapsilosis, Pichia caribbica* และ *Torulaspora maleeae* มี 3 สกุล4 สปีชีส์ที่พบเฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ คือ *Candida chrysomelidarum*, *Debaryomyces hansenii, D. nepalensis* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* นอกจากนี้ยังพบมีแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 6 สกุล 7 สปีชีส์ที่พบทั้งใน

ป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของอ่าวไทย โดยพบ *Pichia guilliermondii* และ *Pichia kudriavzevii* เฉพาะในน้ำ พบ *Metschnikowia koreensis* เฉพาะในตะกอนดินใต้น้ำ และพบ *Candida thaimueangensis, C. tropicalis, Hanseniaspora guilliermondii, Kluyveromyces siamensis* และ *Kodamaea ohmeri* กระจายอยู่ทั้งในน้ำและตะกอนดิน โดยพบมี *H. guilliermondii* และ *K. siamensis* เฉพาะในน้ำของป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกและในตะกอนดินป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทยเท่านั้น

สำหรับเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์นั้นพบกระจายทั่วไปในน้ำของป่าชายเลนเกือบทุกแห่งที่ทำการศึกษาโดยมีสปีชีส์ที่พบเป็นหลักคือ *Rhodotorula mucilaginosa* (36 สายพันธุ์) คิดเป็น 18 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดที่ทำการศึกษา

ผลการศึกษาพบว่ายีสต์ที่พบมากที่สุดในน้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือ ยีสต์ในสกุล *Candida* และ *Rhodotorula* โดยพบยีสต์สกุล *Candida* มากถึง 37 สายพันธุ์ คิดเป็น 26 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดในน้ำ และในจำนวนนี้พบเป็น *Candida tropicalis* มากที่สุด (13 สายพันธุ์) สำหรับยีสต์สีแดงในสกุล *Rhodotorula* (37 สายพันธุ์) นั้นพบว่า 34 สายพันธุ์แยกได้จากในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรี ในขณะที่พบในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เพียง 3 สายพันธุ์ ยีสต์ที่พบรองลงมาในน้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือ *Kluyveromyces siamensis* และ *Pichia occidentalis* ซึ่งพบ 11 และ 9 สายพันธุ์ตามลำดับ

สำหรับยีสต์ที่พบมากที่สุดในตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนคือยีสต์ในสกุล *Candida* (26 สายพันธุ์) คิดเป็น 46.4 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยีสต์ทั้งหมดในตะกอนดิน และในจำนวนนี้พบเป็น *Candida tropicalis* มากที่สุด (12 สายพันธุ์) ยีสต์ที่พบรองลงมาคือ *Kluyveromyces siamensis* (8 สายพันธุ์) และ *Lindnera subsufficiens* (4 สายพันธุ์)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ศศิธร จินดามรกฎ. 2543. **การพิสูจน์ความเหมือนเพื่อระบุชื่อ การเก็บรักษา และการผลิตสารประกอบโพลีออลของ ยีสต์ทนเค็มที่แยกได้ในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**,** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาณัติ อาภาภิรม. 2531. **ประมวลทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของไทย : เราจะใช้ทรัพยากรธรรมชาติของประเทศได้อีกนานเท่าใด**. สถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศ, กรุงเทพฯ.

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

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

Am-in, S., W. Yongmanitchai and S. Limtong. 2008. *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from water in a mangrove forest in Ranong province, Thailand. . **FEMS yeast research**.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ภาคผนวก

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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 นอร์มอล และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast extract peptone dextrose (YPD) agar

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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 5% malt extract agar

มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	50	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Fowell' s acetate agar

โซเดียมอะซิเตท	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Corn meal agar

Corn meal agar	1.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Potato dextrose agar (PDA)

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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 ไมครอนและเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารประกอบไนโตรเจน*: แอมโมเนียมซัลเฟต $\left[(NH_4)_2SO_4\right]$ 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 13x100 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาด

รูกรอง 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 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2) อาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์

กลูโคส	60	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	1	กรัม
วุ้น	1.3	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4) อาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์	150	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายยูเรีย 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. Bromothymol 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 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Stock ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. Loading dye

บรอมฟีนอล บลู	0.25	กรัม
กลีเซอรอล	30	มิลลิลิตร
เติมน้ำรีเวอร์สออสโมซิสให้ครบ	100	มิลลิลิตร

8. เอทานอล/โซเดียมอะซิเตท

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

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวชนิตา บุญมาก
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 27 มีนาคม 2527
สถานที่เกิด	สมุทรปราการ
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ปี พ.ศ. 2548
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	พ.ศ. 2546 - รางวัลผลการเรียนดีเด่น เป็นผู้สอบได้แต้มระดับคะแนนเฉลี่ยในปีการศึกษา 2546 ตั้งแต่ 3.25 ขึ้นไป - รางวัลผลการเรียนดีเด่น เป็นผู้สอบได้แต้มระดับคะแนนเฉลี่ยสูงสุดในสาขาจุลชีววิทยา ปีการศึกษา 2546 พ.ศ. 2547 - รางวัลผลการเรียนดีเด่น เป็นผู้สอบได้แต้มระดับคะแนนเฉลี่ยในปีการศึกษา 2547 ตั้งแต่ 3.25 ขึ้นไป - รางวัลผลการเรียนดีเด่น เป็นผู้สอบได้แต้มระดับคะแนนเฉลี่ยสูงสุดในสาขาจุลชีววิทยา ปีการศึกษา 2547 พ.ศ. 2548 - ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิทยานิพนธ์จากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย รหัสโครงการ T_351136