



# วิทยานิพนธ์

ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลน  
ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง

**YEAST DIVERSITY IN WATER FROM MANGROVE FOREST  
IN LAEM SON NATIONAL PARK, RANONG PROVINCE**

นางสาวสมจิต อ้ออินทร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551





ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน  
จังหวัดระนอง

Yeast Diversity in Water from Mangrove Forest in Laem Son National Park,  
Ranong Province

นามผู้วิจัย นางสาวสมจิต อ่าอินทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( รองศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ้มทอง, Dr.Eng. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( อาจารย์วิเชียร ยงมานิตชัย, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์ปณทริกา หะริณสุต, Dr.Agr.Sci. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง

Yeast Diversity in Water from Mangrove Forest in Laem Son National Park, Ranong Province

โดย

นางสาวสมจิต อ่าอินทร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2551

สมจิต อ่าอินทร์ 2551: ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติ  
แหลมสน จังหวัดระนอง ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชา  
จุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ้มทอง, Dr.Eng. 198 หน้า

การศึกษากความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง  
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ  
จังหวัดระนอง โดยการแยกยีสต์ด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน และจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับ  
โมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่ายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำ  
ที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จำนวน 56 สายพันธุ์ เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 17 สปีชีส์  
คือ *Candida berthetii*, *C. boidinii*, *C. glabrata*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. silvae*, *C. thaimueangensis*,  
*C. tropicalis*, *Debaryomyces nepalensis*, *Issatchenkia occidentalis*, *I. orientalis*, *I. siamensis*, *Kodamaea*  
*ohmeri*, *Pichia caribbica*, *P. sporocuriosa*, *Torulaspora maleeae* และ *Williopsis saturnus* ในไฟลัม  
Basidiomycota 4 สปีชีส์ คือ *Trichosporon asahii*, *T. coremiiforme*, *T. japonicum* และ *Rhodotorula*  
*mucilaginosa* และเหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Candida* sp. NRRL Y-27127 และ *Hanseniaspora*  
sp. ST-464 ส่วนสายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จำนวน 32 สายพันธุ์ พบว่าเป็นสปีชีส์ที่มี  
การอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 6 สปีชีส์ คือ *C. phangngensis*, *C. pinguabensis*, *C. rugosa*, *C.*  
*thaimueangensis*, *C. tropicalis* และ *K. ohmeri* ในไฟลัม Basidiomycota 1 สปีชีส์ คือ *T. asahii* และเหมือนกับ  
สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Candida* sp. NRRL Y-27127 และ *Hanseniaspora* sp. CS-2008b สำหรับสาย  
พันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จำนวน 61 สายพันธุ์ พบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วใน  
ไฟลัม Ascomycota 14 สปีชีส์ คือ *C. butyri*, *C. parapsilosis*, *C. silvae*, *C. tropicalis*, *D. nepalensis*,  
*Galactomyces geotrichum*, *I. occidentalis*, *I. orientalis*, *I. siamensis*, *I. terricola*, *K. ohmeri*, *P. burtonii*,  
*P. galeiformis* และ *P. kluyveri* และเหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Candida* sp. NRRL Y-27665,  
*Hanseniaspora* sp. CS-2008b, *Hanseniaspora* sp. ST-250 และ *Hanseniaspora* sp. YS DN19 จากการศึกษา  
นี้มี 34 สายพันธุ์ จากตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 3 ช่วงเวลาที่จัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานโพลีฟาซิกและเสนอเป็น  
ยีสต์สปีชีส์ใหม่ 7 สปีชีส์ ดังนี้ *Candida andamanensis* sp. nov. (3 สายพันธุ์), *Candida laemsonensis* sp. nov.  
(2 สายพันธุ์), *Candida mangrovei* sp. nov. (1 สายพันธุ์), *Candida ranongensis* sp. nov. (2 สายพันธุ์), *Candida*  
*sanittii* sp. nov. (8 สายพันธุ์), *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (7 สายพันธุ์) และ *Pichia ranongensis* sp. nov.  
(1 สายพันธุ์) จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่ายีสต์ที่พบในน้ำจากป่าชายเลนในพื้นที่ที่ศึกษาในช่วงเวลาต่างๆ มีความ  
แตกต่างกันซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่น้ำมีสภาวะต่างๆ แตกต่างกัน โดยยีสต์ชนิดที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง  
3 ช่วงเวลา คือ *Candida tropicalis*, *Kodamaea ohmeri* และ *Candida sanittii* sp. nov.

Somjit Am-In 2008: Yeast Diversity in Water from Mangrove Forest in Laem Son National Park, Ranong Province. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor Savitree Limtong, Dr.Eng. 198 pages.

Diversity of yeast in waters from a mangrove forest in Laem Son National Park, King Amphoe Suksamran, Ranong Province was studied by isolation using membrane filtration technique and identification based on comparative sequence analysis of the D1/D2 domain of the 26S rDNA. The fifty-six strains obtained from waters collected in 1998-1999 were identified to be 17 described species in the Phylum Ascomycota namely *Candida berthetii*, *C. boidinii*, *C. glabrata*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. silvae*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces nepalensis*, *Issatchenkia occidentalis*, *I. orientalis*, *I. siamensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica*, *P. sporocuriosa*, *Torulaspota maleeae*, *Williopsis saturnus*, four described species in the Phylum Basidiomycota namely *Trichosporon asahii*, *T. coremiiforme*, *T. japonicum* and *Rhodotorula mucilaginosa* and two undescribed ascomycetous species, similar to *Candida* sp. NRRL Y-27127 and *Hanseniaspora* sp. ST-464. Thirty-two strains isolated from waters collected in 2005 were identified as six described species in the Phylum Ascomycota namely *C. phangngensis*, *C. picinguabensis*, *C. rugosa*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *K. ohmeri*, one described species in the Phylum Basidiomycota namely *T. asahii* and two undescribed ascomycetous species similar to *Candida* sp. NRRL Y-27127 and *Hanseniaspora* sp. CS-2008b. Among 61 strains isolated from waters collected in 2006 were identified to be 14 described species in the Phylum Ascomycota namely *C. butyri*, *C. parapsilosis*, *C. silvae*, *C. tropicalis*, *D. nepalensis*, *Galactomyces geotrichum*, *I. occidentalis*, *I. orientalis*, *I. siamensis*, *I. terricola*, *K. ohmeri*, *P. burtonii*, *P. galeiformis* and *P. kluyveri* and four undescribed ascomycetous species similar to *Candida* sp. NRRL Y-27665, *Hanseniaspora* sp. CS-2008b, *Hanseniaspora* sp. ST-250 and *Hanseniaspora* sp. YS DN19. From this study, 34 strains obtained from the water samples collected in the three collecting periods were identified to be seven novel species. They were named as *Candida andamanensis* sp. nov. (3 strains), *Candida laemsonensis* sp. nov. (2 strains), *Candida mangrovei* sp. nov. (1 strain), *Candida ranongensis* sp. nov. (2 strains), *Candida sanittii* sp. nov. (8 strains), *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (17 strains) and *Pichia ranongensis* sp. nov. (1 strain). The results of this study showed that different yeast species could be detected in different period. This may result from different water conditions. Yeast species which were found in all three collecting periods were *Candida tropicalis*, *Kodamaea ohmeri* and *Candida sanittii* sp. nov.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้  
คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้ง  
ให้ความช่วยเหลือและอุดหนุนการทำวิจัยอย่างดียิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วิเชียร ขงมานิตชัย  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้  
เครื่องมือต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัย รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ และ  
ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปุณศรี หะริณสุต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. นันทนา สีสุข ประธานกรรมการสอบ และ ดร. บัณฑิต ผึ้งสินธุ์  
ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพใน  
ประเทศไทยที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยบางส่วน

ขอขอบคุณ ดร. ศศิธร จินดามรกฏ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการทำ  
วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ เพื่อน และน้องๆ ภาคจุลชีวะวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกคน  
ที่ให้ความอบอุ่นตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา รวมทั้งให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้าน  
ต่างๆ อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ ป้า และน้อง ที่ช่วยอุดหนุนการศึกษา รวมทั้งให้กำลังใจ และให้  
คำปรึกษาที่ดีตลอดมา

สมจิต อ้ออินทร์

พฤษภาคม 2551

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	36
ผลและวิจารณ์	51
สรุปผล	134
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	138
ภาคผนวก	150
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	151
ภาคผนวก ข ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 กับ พ.ศ. 2548 และยีสต์ที่แยกได้	163
ภาคผนวก ค ผลงานที่ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร FEMS Yeast Research	168
ภาคผนวก ง GenBank accession number ของยีสต์ที่ศึกษา	192

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนกประเภทของแอสโคไมซีต์สปีชีส์	18
2	การจำแนกประเภทของแบสิดิโอไมซีต์สปีชีส์	20
3	บริเวณที่มักทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้ในอนุกรมวิธานของยีสต์	27
4	ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA สำหรับใช้ในอนุกรมวิธานของยีสต์	28
5	สารเคมีที่ใช้ในการตัดนิวคลีโอไทด์อย่างจำเพาะ	31
6	ตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและ พัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	51
7	ยีสต์รหัส RV และ R1 ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนของสถานีวิจัย ทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	52
8	การเก็บตัวอย่างน้ำ ลักษณะของตัวอย่าง จำนวนยีสต์ และยีสต์ที่แยกได้	54
9	ยีสต์รหัส RV ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	56
10	การจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่ เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	58
11	ยีสต์รหัส RV ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	62
12	การจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำ ที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	63
13	ยีสต์รหัส RV ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่	64
14	การจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัย และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	65
15	ยีสต์รหัส R1 ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	67

### สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	การจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	68
17	ยีสต์รหัส R1 ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	70
18	การจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	71
19	ยีสต์รหัส R1 ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่	72
20	การจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	73
21	ยีสต์รหัส RS ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	75
22	การจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	76
23	ยีสต์รหัส RS ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	79
24	การจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	80
25	ยีสต์รหัส RS ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่	81
26	การจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	82
27	การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน	86

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
28	การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน	88
29	การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน	90
30	การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 ในฤดูต่างๆ	92
31	การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 ในฤดูต่างๆ	93
32	การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 ในฤดูต่างๆ	94
33	การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อนปี พ.ศ. 2541-2542 (RV) กับ พ.ศ. 2549 (RS)	96
34	การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อนปี พ.ศ. 2541-2542 (RV) กับ พ.ศ. 2549 (RS)	97
35	การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อนปี พ.ศ. 2541-2542 (RV) กับ พ.ศ. 2549 (RS)	98
<b>ตารางผนวกที่</b>		
ข1	การเก็บตัวอย่างน้ำ ลักษณะของตัวอย่าง จำนวนยีสต์ และยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542	164
ข2	การเก็บตัวอย่างน้ำ ลักษณะของตัวอย่าง จำนวนยีสต์ และยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548	167
ง1	GenBank accession number ของยีสต์ที่ศึกษา	193

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของดีเอ็นเอไรโบโซม ซึ่งประกอบด้วย 18S rDNA, 5.8S rDNA, 26S rDNA, ITS (Internal Transcribed Spacer), IGS (Inter-Genic Spacer), NTS (Non-Transcribed Spacer) และ ETS (External Transcribed Spacer)	26
2	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ R1-27, R1-31 <sup>T</sup> , R1-32 และ สปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	100
3	สัณฐานวิทยาของ <i>Candida andamanensis</i> sp. nov. (R1-27, R1-31 <sup>T</sup> , R1-32)	103
4	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RV5 <sup>T</sup> , RV140 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	105
5	สัณฐานวิทยาของ <i>Candida laemsonensis</i> sp. nov. (RV5 <sup>T</sup> , RV140)	108
6	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RS42 <sup>T</sup> และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	109
7	สัณฐานวิทยาของ <i>Candida mangrovei</i> sp. nov. (RS42 <sup>T</sup> )	112

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	<p>ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RS17, RS28<sup>T</sup> และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์</p>	114
9	<p>ลักษณะวิทยาของ <i>Candida ranongensis</i> sp. nov. (RS17, RS28<sup>T</sup>)</p>	117
10	<p>ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96, RV152<sup>T</sup> และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์</p>	119
11	<p>ลักษณะวิทยาของ <i>Candida sanittii</i> sp. nov. (R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96, RV152<sup>T</sup>)</p>	122
12	<p>ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RS2, RS8<sup>T</sup>, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89, RV94, RV153 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์</p>	125
13	<p>ลักษณะวิทยาของ <i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov. (RS2, RS8<sup>T</sup>, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89, RV94, RV153)</p>	128

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
14	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RV60 <sup>T</sup> และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	129
15	สัณฐานวิทยาของ <i>Pichia ranongensis</i> sp. nov. (RV60 <sup>T</sup> )	133

## ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง

### Yeast Diversity in Water from Mangrove Forest in Laem Son National Park, Ranong Province

#### คำนำ

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

การสำรวจความหลากหลายของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้ (culturable yeasts) ทำได้โดยการแยกและการจัดจำแนกยีสต์ สำหรับวิธีการจัดจำแนกยีสต์นั้นอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (conventional taxonomy) ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) สรีรวิทยา (physiology) และชีวเคมี (biochemistry) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว (described species) หรือ สปีชีส์ที่รู้จักแล้ว (known species) นั้นเป็นวิธีที่มีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลา ความถูกต้องแม่นยำ และความน่าเชื่อถือของผลที่ได้จากการทดสอบ บางครั้งการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของยีสต์ที่คล้ายคลึงกันได้ จึงเกิดปัญหาในการจัดจำแนกยีสต์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ทำให้เทคนิคระดับโมเลกุลเข้ามามีบทบาทสำคัญ ประกอบกับปัจจุบันมีเทคนิคที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง หรือ ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ช่วยในการศึกษาระดับโมเลกุล ทำให้การหาลำดับนิวคลีโอ

โหนดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการนำมาจัดจำแนกยีสต์ เนื่องจากใช้เวลาน้อยกว่าวิธีการจัดจำแนกแบบดั้งเดิมมาก และให้ผลถูกต้องแม่นยำ โดยนิยมศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ที่มีขนาดประมาณ 500-600 นิวคลีโอไทด์ และอยู่ทางด้านปลาย 5' ของ 26S rDNA เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็วจึงเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีฐานข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์มาก ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้สามารถจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์ได้อย่างแม่นยำ (Kurtzman and Robnett, 1998)

สำหรับการศึกษายีสต์ในป่าชายเลนซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทั้งในด้านป่าไม้ ประมง และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นกลุ่มของสังคมพืช และสัตว์ซึ่งขึ้นอยู่กับเขตน้ำลงต่ำสุดและน้ำขึ้นสูงสุดบริเวณชายฝั่งทะเล ป่าชายเลนเป็นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ ระบบนิเวศวิทยาที่เกิดขึ้นในป่าชายเลนนั้นเป็นความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตกับสิ่งแวดล้อม ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่พบในป่าชายเลน โดยยีสต์และรามิบบทบาทสำคัญในการหมักเวียนธาตุอาหารในป่าชายเลน และเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำและแมลงก้นดุน (Nagahama, 2006) สำหรับประเทศไทยการศึกษาคความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนยังมีน้อยมาก โดยก่อนหน้านี้นี้มีการศึกษายีสต์จากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลนในจังหวัดพังงาของประเทศไทย พบว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยพบสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว คือ *Candida conglobata*, *Candida cf. glabrata*, *C. membranifaciens*, *C. parapsilosis*, *C. picinguabensis*, *C. tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia caribbica*, *P. guilliermondii*, *P. fabianii*, *Rhodotorula mucilaginosa* และเชื้อราที่คล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) คือ *Aureobasidium pullulans* (Limtong et al., 2008b) นอกจากนี้ยังพบยีสต์สปีชีส์ใหม่และได้รายงานแล้ว คือ *Candida thaimueangensis* sp. nov. (Limtong et al., 2007b) และ *Candida phangngensis* sp. nov. (Limtong et al., 2008b) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาคความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในจังหวัดอื่นคือ ป่าชายเลนในบริเวณสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง โดยการแยกยีสต์และนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ผลการสำรวจทำให้ทราบถึงความหลากหลายของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณนี้ซึ่งจะทำให้รู้ว่ายีสต์ที่พบในป่าชายเลนในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทยเหมือนกันหรือไม่ นอกจากนี้ยีสต์ที่แยกได้จัดว่าเป็นทรัพยากรที่มีความสำคัญสามารถเก็บและนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง โดยการแยกยีสต์และนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy) ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

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

## การตรวจเอกสาร

### ลักษณะทั่วไปของยีสต์

ยีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular) มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งเซลล์แบบฟิชชัน (fission) ยีสต์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโกสปอร์ (ascospore) หรือเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) คือ แอสโคไมซีตัสยีสต์ (ascomycetous yeast) และเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeast) จากการดำรงชีวิตที่มีลักษณะเป็นแบบเซลล์เดี่ยวทำให้เจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าที่เป็นเส้นสาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้เร็วกว่าเนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่า โดยทั่วไปเซลล์ยีสต์จะมีขนาดใหญ่ และมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ความกว้าง 1-7 ไมโครเมตร และความยาว 1-10 ไมโครเมตร ขนาดของเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และอายุของยีสต์ ความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร และปัจจัยอื่นๆ ยีสต์มีรูปร่างหลายแบบ คือ กลม (round, spheroidal, spherical) เช่น *Citeromyces* spp. รี (ellipsoidal) หรือรูปไข่ (oval, ovoidal) เช่น *Saccharomyces* spp. รีและปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival หรือ boat) เช่น *Dekkera* spp. รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง (apiculate) เช่น *Hanseniaspora* spp. คนโท หรือฟลาสก์ (flask) เช่น *Pityrosporum* sp. สามเหลี่ยม (triangular) เช่น *Trigonopsis* sp. ยาว (elongated) และเป็นสาย (filamentous) เช่น *Candida* spp.

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นคีโมออร์กาโนโทรฟที่แท้จริง (strictly chemoorganotroph) หรือแซโปรโทรฟ (saprotroph) มีความสัมพันธ์กับพืชหรือสัตว์ที่มีชีวิต หรือสารอินทรีย์ที่ได้จากพืชและสัตว์ที่ตายแล้ว โดยบางชนิดทำให้เกิดโรคกับพืชและสัตว์ ยีสต์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน ขุยแมลง ส่วนต่างๆ ของพืช คือ ใบ ดอก ผล ลำต้น หรือแม้กระทั่งในยางไม้ บางชนิดพบในน้ำจืด น้ำทะเล ซึ่งเป็นแหล่งที่มีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ การพบยีสต์แต่ละชนิดในแหล่งที่อยู่ต่างๆ นั้นขึ้นอยู่กับลักษณะทางสรีรวิทยาของยีสต์ชนิดนั้น เช่น ความสามารถในการใช้สารประกอบบางอย่าง หรือการเจริญในที่อุณหภูมิต่ำหรือสูง (Kreger van Rij, 1984; Phaff and Starmer, 1980) โดยทั่วไปยีสต์ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeast) เจริญดีที่อุณหภูมิ 20-28 องศาเซลเซียส แต่สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการหมักสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน

*S. bayanus* เจริญที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ยีสต์ค่อนข้างชอบอาหารที่เป็นกรด มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญระหว่าง 5 และ 7 โดยช่วงพีเอชที่ยีสต์เจริญได้ดีค่อนข้างกว้าง คือ พีเอช 3-10 (Nakase, 2001)

ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภทเป็นต้นว่า การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ ผลิตภัณฑ์จากการหมัก เช่น เอทานอล และกลีเซอรอล ผลิตภัณฑ์ในรูปของเซลล์ยีสต์ เช่น ยีสต์ขนมปัง ยีสต์อาหารคน ยีสต์อาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์ที่แยกได้จากเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามินบีและดี เอนไซม์ (อินเวอร์เทส แลคเตส และ ไลเพส) เอทีพี (ATP) เอ็นเอดี (NAD) และอาร์เอ็นเอ (RNA) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่ผลิตโดยยีสต์และสามารถนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม เช่น น้ํานมที่ปราศจากแลคโตส (lactose-free milk) สารให้ความหวาน เช่น อะราบิทอล (arabitol) อิริทริทอล (erythritol) และไซลิตอล (xylitol) สารให้สี เช่น แอสตาแซนทิน (astaxanthin) และคาโรทีนอยด์ (carotenoid) โพลีแซ็กคาไรด์พวกฟอสโฟแมนแนน (phosphomannan) และพลูลูแลน (pullulan) กรดอะมิโน เช่น แอล-ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine) และสารให้กลิ่นรส เป็นต้น ยิ่งไปกว่านั้นยังมีการใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเพื่อการผลิตโปรตีนที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภท (สาวิตรี, 2549)

### ความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์

ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) เป็นสภาพโดยรวมของสิ่งมีชีวิตและพันธุกรรมทั้งหมดที่ปรากฏอยู่ในโลกนี้ หากกล่าวโดยสรุปความหลากหลายทางชีวภาพจะหมายถึงความหลากหลายใน 3 ประเด็น ที่เห็นได้ชัดเจน คือ 1. ความหลากหลายทางสปีชีส์ (species diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ พืช สัตว์ รวมทั้งมนุษย์ 2. ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ที่มีอยู่ในแต่ละหน่วยสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มของประชากร 3. ความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity) ตามแหล่งที่อยู่อาศัยต่างๆ กันของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงอาจกล่าวถึงความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงพันธุกรรมหรือยีน (gene) ในเชิงสปีชีส์และในเชิงนิเวศวิทยาได้ (วิสุทธิ์, 2538) มีผู้กล่าวว่าการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพเป็นงานที่หนัก ถึงแม้ว่าการศึกษาจะหยุดอยู่เพียงความหลากหลายของสปีชีส์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ การศึกษาความหลากหลายจะเน้นสปีชีส์ที่เพาะเลี้ยงได้ และอาศัยผู้เชี่ยวชาญในด้านอนุกรมวิธาน เชื่อกันว่านักอนุกรมวิธาน 1 คน สามารถศึกษาเพื่อจัดจำแนก (identify) และจำแนกประเภท

(classify) ได้เพียง 200-300 สปีชีส์ เมื่อรวมกับปัญหาอื่นๆ แล้วจึงเชื่อกันว่าอาจจะต้องใช้เวลาเป็นศตวรรษที่จะสามารถศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ แต่จากการสูญเสียถิ่นอาศัยของสิ่งมีชีวิตที่เกิดอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการประเมินกันว่าในกลางศตวรรษหน้าสิ่งมีชีวิตที่อยู่บนบกจะสูญเสียชีวิตไปถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของสปีชีส์ที่มีอยู่ ดังนั้นจึงควรที่จะศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพให้รวดเร็วขึ้น (สชาติวี, 2549)

ในปี ค.ศ. 2001 Dunlap พบว่าความหลากหลายของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรีย อาร์เคีย รา โพรโตซัว และสาหร่ายชนิดต่างๆ ได้ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา เมแทบอลิซึมภายในเซลล์ การกระจายตัวและกิจกรรมในระบบนิเวศ ความแตกต่างของโครงสร้างยีนอม การแสดงออกของยีน และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ สำหรับความหลากหลายของยีสต์จะเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี นิเวศวิทยา และลักษณะทางพันธุกรรม ต่อมามีการอธิบายสปีชีส์ของยีสต์เป็นจำนวนมากแต่เป็นเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ (Fell *et al.*, 2000) จนถึงปี ค.ศ. 2000 มีการค้นพบและศึกษายีสต์แล้ว 100 สกุล มากกว่า 700 สปีชีส์ ถือเป็นเพียงบางส่วนเท่านั้นเมื่อเทียบกับความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ทั้งหมดบนโลกใบนี้ (Barnett *et al.*, 2000)

### ความหลากหลายของยีสต์ในแหล่งที่อยู่ธรรมชาติ

ยีสต์พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ สามารถแบ่งแหล่งที่อยู่ (habitat) ของยีสต์ได้ 2 แหล่ง คือ แหล่งที่อยู่ของยีสต์ที่อยู่บนบก (terrestrial yeast habitat) ได้แก่ พืช สัตว์ ดิน และบรรยากาศ ส่วนแหล่งที่อยู่ในน้ำ (aquatic habitat) ได้แก่ น้ำจากแม่น้ำ ทะเลสาบ น้ำกร่อย น้ำทะเล และน้ำในมหาสมุทร ตะกอน (sediment) จากแม่น้ำและทะเล รวมถึงพืชน้ำและสัตว์น้ำ การพบยีสต์ในแหล่งที่อยู่ต่างๆ นั้น ขึ้นอยู่กับลักษณะทางสรีรวิทยาของยีสต์ เช่น การใช้สารประกอบคาร์บอนในการเจริญ หรือการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นต้น

#### 1. ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำ

ยีสต์พบได้เสมอในแม่น้ำ ทะเลสาบ น้ำกร่อย ทะเล และมหาสมุทร (Spencer and Spencer, 1997) มีรายงานว่ายีสต์ที่พบในแหล่งน้ำจืดโดยทั่วไปจะเป็นยีสต์ที่อยู่ร่วมกับน้ำที่มีมลภาวะ

สำหรับยีสต์ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด ได้แก่ สกุล *Rhodospira*, *Sporobolomyces* และบ่อยครั้งที่สามารถแยก *Debaryomyces hansenii* จากน้ำทะเล ส่วน *Candida parapsilosis* แยกได้จากน้ำจืดและน้ำทะเล ยีสต์สปีชีส์นี้มีความสัมพันธ์กับมนุษย์เนื่องจากอยู่ในน้ำที่มีมลภาวะและสามารถอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล ในขณะที่ *C. diddensiae* มักพบในมหาสมุทรเปิด และ *C. intermedia* พบในน้ำเค็มชายฝั่งทะเลและน้ำจืดที่มีมลภาวะ (Hagler and Ahearn, 1987) สำหรับชนิดของยีสต์ที่พบในน้ำที่ไม่มีมลภาวะนั้นไม่ค่อยแตกต่างกันไม่ว่าจะเป็นในน้ำจืดหรือในน้ำเค็ม ความแตกต่างจะขึ้นอยู่กับปริมาณของธาตุอาหารที่ถูกชะล้างจากบนบก เช่นเดียวกับจำนวนของยีสต์ที่เข้าไปในทะเลสาบหรือมหาสมุทรโดยตรง จำนวนของยีสต์ลดลงเมื่อห่างจากฝั่งมากขึ้นเนื่องจากสารอาหารและจำนวนของยีสต์ที่ถูกชะล้างลงไปในน้ำลดลง ยีสต์บางชนิดสามารถเมแทบอลิซึมไฮโดรคาร์บอนซึ่งทำให้เกิดมลภาวะในทะเล ทำให้การปนเปื้อนของน้ำมันในทะเลน้อยลง ยีสต์ที่พบในทะเลและสามารถเมแทบอลิซึมไฮโดรคาร์บอนทั้งชนิดที่มีโครงสร้างแบบเป็นเส้นตรง (aliphatic) และที่เป็นวงอะโรมาติก (aromatic) คือ *Yarrowia lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. maltosa*, *Debaryomyces hansenii* และ *Rhodospiridium* spp. (สาวิตรี, 2549) จากการศึกษายีสต์ในแม่น้ำและทะเลสาบในยุโรป ส่วนใหญ่พบยีสต์ในสกุล *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia* (*Hansenula*) และ *Rhodotorula* ซึ่งบางสปีชีส์ในสกุลเหล่านี้สามารถใช้เป็นตัวชี้ระดับมลภาวะของน้ำได้ สปีชีส์ที่พบบ่อย ได้แก่ *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), *Rhodotorula mucilaginosa* (*Rhodotorula rubra*) และเชื้อราที่คล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ที่พบ คือ *Aureobasidium pullulans* (Nagahama, 2005) จากการศึกษาแม่น้ำที่มีมลภาวะมากในทะเลสาบน้ำจืดของกรีซ พบยีสต์สกุล *Trichosporon*, *Rhodotorula* และ *Candida* ในอัตราส่วนที่มากกว่าสกุลอื่นๆ (Cooke et al., 1960) ต่อมาในปี ค.ศ. 1970 มีการศึกษายีสต์ในน้ำจืดที่มีมลภาวะของสหรัฐอเมริกาพบ *Candida* เป็นจำนวนมากในบริเวณแหล่งน้ำที่ห่างจากบ้านเรือนและพบ *Rhodotorula* กระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำ ขณะที่ *Cryptococcus* พบได้ทั้งในแหล่งน้ำจืดที่ไม่มีมลภาวะหรือมีมลภาวะน้อย (Woollett and Hedrick, 1970)

ยีสต์เป็นราที่พบมากในทะเลถึงแม้จะมีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย โดยพบแบคทีเรียอิมยซ์ดีดส์ยีสต์ได้ในน้ำทะเลทั่วไป ส่วนแอสโคไมยซ์ดีดส์ยีสต์จะพบในแหล่งน้ำที่มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูง สกุลที่พบมาก คือ *Rhodotorula* และ *Candida* (Fell et al., 1960) ในขณะที่ *Debaryomyces* พบจำนวนมากบริเวณใกล้ฝั่ง (Sieburth, 1979) นอกจากนี้มีรายงานว่าบางครั้งพบ *Kluyveromyces aestuarii* ในน้ำทะเล โดยยีสต์สปีชีส์นี้ทนโซเดียมคลอไรด์ได้มากกว่าสปีชีส์อื่นในสกุล *Kluyveromyces* (Lachance and Starmer, 1998) ส่วนน้ำทะเลที่มีมลภาวะใน Dead sea,

ทะเลสาบ Enriquillo และทะเลสาบกริซนั้ มียีสต์ที่พบบ่อย คือ *Pichia guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* และ *Candida parapsilosis* (Butinar *et al.*, 2005) สำหรับ *Metschnikowia* พบอยู่ร่วมกับสัตว์และพืชที่อยู่ในทะเล เช่น ปลา และสาหร่าย (Fell, 1976)

การศึกษายีสต์ที่แยกจากธารน้ำแข็งในประเทศอาร์เจนตินา และจัดจำแนกโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล พบยีสต์ในสกุล *Cryptococcus*, *Leucosporidiella*, *Dioszegia*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Mrakia*, *Sporobolomyces*, *Udeniomyces* และ *Candida* สำหรับสกุลที่พบมากคือ *Cryptococcus* และ *Leucosporidiella* คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนยีสต์ทั้งหมด (Garcia *et al.*, 2007)

ยีสต์สีแดง (red yeast) เป็นยีสต์ที่พบเสมอในน้ำ ส่วนใหญ่เป็นสกุล *Rhodotorula* แต่ก็สามารถพบ *Rhodospiridium* และ *Sporobolomyces* ด้วยเช่นกัน สำหรับการศึกษายีสต์ที่ผลิตคาโรทีนอยด์ในน้ำจากประเทศอาร์เจนตินา จำนวน 64 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น 6 สกุล 15 สปีชีส์ และพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ คือ *Sporidiobolus longiusculus* sp. nov. และ *Sporidiobolus patagonicus* sp. nov. โดยการจัดจำแนกอาศัย microsatellite-primed PCR (MSP-PCR) profile และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA นอกจากนี้ยังพบยีสต์ที่สร้างบอลลิสโทคอนิเดียในสกุล *Sporobolomyces* และ *Sporidiobolus* เป็นจำนวนมาก (Libkind *et al.*, 2005)

การศึกษายีสต์ที่แยกจากตะกอนในทะเลสาบ Jakubov สาธารณรัฐสโลวาเกีย ซึ่งเก็บตัวอย่างในฤดูร้อนและฤดูใบไม้ร่วง แยกได้ยีสต์ 183 สายพันธุ์ จัดจำแนกอยู่ใน 16 สกุล 26 สปีชีส์ โดยพบว่าในฤดูร้อนยีสต์ที่พบเป็นพวกที่มีความสามารถในการหมัก ในฤดูใบไม้ร่วงพบแบลคิโอมัยซีตส์ยีสต์ในสกุล *Cryptococcus*, *Trichosporon* และ *Sporobolomyces* โดยบางสปีชีส์ของสกุลที่พบเหล่านี้มีรายงานว่าสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายพืชและไม้ จึงเป็นไปได้ว่ายีสต์เหล่านั้นมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายพืชและสารอินทรีย์ที่พบในน้ำและตะกอนในบริเวณทะเลสาบนี้ (Vadkertiova and Slavikova, 1994) ส่วนการแยกยีสต์จากตะกอนที่เก็บในทะเลลึกของประเทศญี่ปุ่น พบแบลคิโอมัยซีตส์ยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Cryptococcus surugaensis* sp. nov. (Nagahama *et al.*, 2003b) และ *Rhodotorula pacifica* sp. nov. (Nagahama *et al.*, 2006)

ยีสต์สามารถแยกได้จากสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น หอยนางรม หอยกาบ หอยแมลงภู่ ฟองน้ำ เม่นทะเล กุ้ง และปู โดยแยกได้ยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Kluyveromyces nonfermentans* sp. nov. จาก หอยกาบ และปูในทะเลที่มีความลึก 1000-2000 เมตร ในประเทศญี่ปุ่น โดยการจดจำแนกอาศัย ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S, 5.8S rDNA และ internal transcribed spacer (ITS) (Nagahama *et al.*, 1999) ต่อมามีการแยกยีสต์จากสัตว์ที่อยู่ในทะเลลึกของประเทศญี่ปุ่น พบยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ คือ *Rhodotorula benthica* sp. nov. ที่แยกจาก *Lamellibrachia* sp. และ *Rhodotorula calyptogenae* sp. nov. ที่แยกจากหอย *Calyptogena* sp. (Nagahama *et al.*, 2003a)

สำหรับการศึกษายีสต์ที่แยกจากน้ำเสียของโรงงานผลิตกระดาษในประเทศจีน พบ แอสโคไมซีตยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Kazachstania aquatica* sp. nov. (Wu and Bai, 2005) และพบ *Candida khmerensis* sp. nov. จากน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำปลาในประเทศกัมพูชา (Nagatsuka *et al.*, 2005)

## 2. ความหลากหลายของยีสต์ในดิน

Phaff และ Starmer (1987) รายงานว่ายีสต์ที่แยกได้เสมอจากดิน คือ *Lipomyces* spp., *Debaryomyces* (*Schwaniomyces*) *occidentalis*, *Schizoblastosporion* sp. และ *Cryptococcus albidus* สำหรับดินในบริเวณที่มีสภาพทางภูมิศาสตร์ และภูมิอากาศที่แตกต่างกันนั้นมีรายงานว่าพบยีสต์ชนิดต่างกัน เช่น ดินในอเมริกาใต้พบ *Saccharomyces pretoriensis*, *Kloeckera lodderi*, *Pichia terricola* และ *Hansenula beijerinckii* ส่วน *H. saturnus* พบกระจายทั่วไปในดินในอเมริกาเหนือ ออฟริกา นิวซีแลนด์ และรัสเซีย ดินในประเทศเดนมาร์กพบ *Debaryomyces polymorphus* ดินในประเทศฟินแลนด์พบ *Torulopsis castellii* ดินในสวีเดนพบ *Candida humicola* ดินในประเทศญี่ปุ่นพบ *Pichia methanolica* และ *Candida hydrocarbofumarica* และดินในประเทศเนปาลพบ *Debaryomyces nepalensis* (Kreger van Rij, 1984) ดินในประเทศไต้หวันพบยีสต์ใหม่ ของ *Arthroascus* คือ *A. fermentans* sp. nov. (Lee *et al.*, 1994) และยีสต์ใหม่ของ *Kazachstania* คือ *Kazachstania jainicus* sp. nov. (Lee *et al.*, 2007) ดินในประเทศญี่ปุ่นพบยีสต์ใหม่ 3 สปีชีส์ คือ *Saccharomyces naganishii* sp. nov., *Saccharomyces humaticus* sp. nov. และ *Saccharomyces yakushimaensis* sp. nov. (Mikata *et al.*, 2001) ดินในประเทศจีนพบแอสโคไมซีตยีสต์สปีชีส์ใหม่

คือ *Kazachstania solicola* sp. nov. (Wu and Bai, 2005) ดินในประเทศอินเดียพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Debaryomyces singareniensis* sp. nov. (Saluja and Prasad, 2007) ดินในประเทศเวียดนามพบแบสิดิโอไมซีตส์ยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Rhodotorula cycloclastica* sp. nov., *Rhodotorula retinophila* sp. nov., *Rhodotorula terpenoidalis* sp. nov. (Thanh et al., 2004) และแอสโคไมซีตส์ยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Lipomyces orientalis* sp. nov. (Thanh, 2006) ส่วนผลการศึกษายีสต์ในดินที่แอนตาร์กติกพบว่ายีสต์ที่พบได้เสมอ คือ *Cryptococcus albidus* (Atlas et al., 1978) และต่อมามีรายงานการพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Cryptococcus waticus* sp. nov. (Guffogg et al., 2004) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการแยกยีสต์จากดินในป่า 4 ชนิด คือ ป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าสนเขา และป่าเต็งรัง ในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว พบแอสโคไมซีตส์ยีสต์ 34 สปีชีส์ ในสกุล *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Issatchankia*, *Kazachstania*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Kadamaea*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulaspora*, *Williopsis* และ *Zygosaccharomyces* นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ในดินในที่ต่างๆ คือ *Candida krabiensis* sp. nov. พบในดินในจังหวัดกระบี่ *Candida sithepensis* sp. nov. พบในดินในอุทยานประวัติศาสตร์ศรีเทพ จังหวัดเพชรบูรณ์ (Limtong et al., 2004), *Tetrapisispora namnaonensis* พบในดินจากป่าในอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว (Sumpradit et al., 2005) และ *Kazachstania siamensis* sp. nov. พบในดินจากป่าในอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา (Limtong et al., 2007a)

### 3. ความหลากหลายของยีสต์ในบรรยากาศ

ยีสต์ที่พบในบรรยากาศส่วนมากพบเหนือผิวดินเพียงเล็กน้อย โดยยีสต์ที่พบ เช่น *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp. และ *Debaryomyces* spp. (Walker, 1998) นอกจากนี้ยังมีการศึกษายีสต์ที่แยกจากบรรยากาศในแถบแอฟริกาใต้ พบแบสิดิโอไมซีตส์ยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Cryptococcus anemochoreius* sp. nov. ที่ยังไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Pohl et al., 2006)

#### 4. ความหลากหลายของยีสต์บนดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้

การศึกษายีสต์ในดอกไม้หลายชนิดของประเทศแคนาดาและสหรัฐอเมริกา พบว่าภูมิภาคมีผลต่อความแตกต่างของชนิดของยีสต์น้อยมาก โดยพบ *Cryptococcus albidus* บ่อยที่สุด นอกจากนั้นพบ *Torulopsis apicola*, *Sporobolomyces roseus*, *Metschnikowia reukaufii*, *M. pulcherrima*, *Cryptococcus macerans* และ *Cryptococcus Infirmominiatus* (Kerger van Rij, 1984) ส่วนการแยกยีสต์จากดอกไม้สกุล *Hibiscus* ในประเทศออสเตรเลียพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ คือ *Kodamaea kakaduensis* sp. nov. และ *Candida tolerans* sp. nov. (Lachance et al., 1999)

ยีสต์ที่พบบนส่วนต่างๆ ของผลไม้จะแตกต่างกันไป เช่น ยีสต์ที่มีรูปร่างเหมือนมะนาวฝรั่ง สกุล *Hansenula* และ *Kloeckera* รวมทั้ง *Trichosporon atellata* และ *Candida krusei* ส่วนมะเขือเทศที่เริ่มมีการหมักพบยีสต์หลายชนิด เช่น *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata* และ *Pichia* spp. ในขณะที่การศึกษายีสต์บนผลส้มแมนดารินที่เน่าเสียในประเทศอาร์เจนตินา พบว่ามียีสต์ที่มีรูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง สกุล *Kloeckera* นอกจากนั้นพบ *Pichia* และ *Geotrichum candidum* (Phaff, 1990) ยีสต์ที่พบอยู่เป็นปกติบนผิวใบพืชทั้งพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียอิมยซ์ยีสต์ เช่น *Sporobolomyces* spp., *Rhodotorula* และ *Cryptococcus* นอกจากนั้นพบ *Candida* บางสปีชีส์ คือ *C. javanica*, *C. foliarum*, *C. diffuens*, *C. bogoriensis* และ *Pichia* spp. แม้กระทั่งยางไม้ยังอาจพบยีสต์ได้ เช่น ยางไม้ไอ้คพบ *Saccharomyces ludwingii* (สาวิตรี, 2549)

#### 5. ความหลากหลายของยีสต์ในขุยแมลง

การศึกษายีสต์ที่แยกจากขุยแมลง (insect frass) พบว่ามียีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกจากขุยไม้ที่เกิดจากแมลงกัดเจาะไม้ของต้นสนและต้นไม้ประเภทสน จำนวน 3 สปีชีส์ คือ *Pichia ramenticola* sp. nov. (NRRL YB-1985), *Candida wyoningensis* sp. nov. (NRRL YB-2152) และ *Candida piceae* sp. nov. (NRRL YB-2170) นอกจากนั้นยังพบ *P. ramenticola* และ *C. piceae* ที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน (Kurtzman, 2000) ในประเทศไทยมีการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากขุยแมลง โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี อนุกรมวิธานเคมี และการ

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida easanensis* sp. nov., *Candida pattaniensis* sp. nov., *Candida nakhonratchasimensis* sp. nov. (Jindamorakot et al., 2004), *Candida thailandica* sp. nov. และ *Candida lignicola* sp. nov. (Jindamorakot et al., 2007)

### ความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลน

ป่าชายเลน หรือ ป่าโกงกาง หรือป่าฟังกา (Mangrove forest หรือ intertidal forest) จัดอยู่ในประเภทป่าที่ไม่ผลัดใบ เป็นกลุ่มของสังคมพืชที่มีลักษณะทางสรีรวิทยา การปรับตัวทางโครงสร้าง และถิ่นกำเนิดคล้ายคลึงกัน พบตามชายฝั่งทะเลต่างๆ ไปตามปากแม่น้ำต่างๆ ที่ไหลลงสู่ทะเล ลักษณะที่เด่นชัดของป่าชายเลน คือ มีน้ำทะเลท่วมถึงเสมอ มีดินเป็นดินเลนหรือดินปนทราย ในประเทศไทยมีป่าชายเลนกระจุกกระจายตามชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ เนื่องจากป่าชายเลนเป็นบริเวณที่มีน้ำจืดผสมกับน้ำเค็ม ทำให้ความเค็มของน้ำในแต่ละบริเวณแตกต่างกันออกไปโดยได้รับอิทธิพลมาจากการขึ้นและลงของน้ำทะเล (สนิท, 2541) โดยทั่วไปความเค็มของน้ำในป่าชายเลนจะอยู่ระหว่าง 10-30 ส่วนในพันส่วน (Aksornkoae et al., 1991)

ระบบนิเวศป่าชายเลนค่อนข้างจะมีลักษณะเฉพาะตัว เนื่องจากป่าชนิดนี้ขึ้นอยู่กับเฉพาะในแถบร้อน และอยู่ตามชายฝั่งทะเล องค์ประกอบและกิจกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระบบนิเวศป่าชายเลนในทุกแห่งทั่วโลกมีลักษณะคล้ายกัน ระบบนิเวศป่าชายเลนประกอบด้วยองค์ประกอบสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นโครงสร้างของระบบนิเวศ และส่วนที่เป็นหน้าที่หรือกิจกรรมของระบบนิเวศ จากการที่มีน้ำขึ้นและลงตลอดเวลาทำให้เกิดการทับถมของตะกอนดินจึงทำให้ป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์สูงซึ่งการหมุนเวียนธาตุอาหารและการถ่ายทอดพลังงานในระบบนิเวศของป่าชายเลนนั้นเริ่มจากพันธุ์พืชชนิดต่างๆ ที่อยู่ป่าชายเลนได้รับพลังงานแสงอาทิตย์เพื่อสังเคราะห์แสง ทำให้เกิดอินทรีย์วัตถุและการเจริญเติบโตขึ้น กลุ่มนี้เรียกว่า ผู้ผลิต และเมื่อส่วนต่างๆ ของต้นไม้ โดยเฉพาะใบไม้ กิ่งไม้ และเศษไม้ที่ร่วงหล่นทับถมในดินและน้ำก็จะกลายเป็นแร่ธาตุอาหารของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา เป็นต้น เรียกกลุ่มสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ว่าผู้บริโภคหรือพวกที่กินอินทรีย์วัตถุ จุลินทรีย์เหล่านี้จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วกลายเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยโปรตีนของสัตว์น้ำเล็กๆ เมื่อสัตว์น้ำเล็กๆ เจริญเติบโตจะกลายเป็นอาหารของกุ้ง ปู และปลาขนาดใหญ่ต่อไปตามห่วงโซ่อาหาร ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เกิดความแตกต่างของโครงสร้างป่าชายเลน คือ ภูมิประเทศชายฝั่ง (coastal physiography) ภูมิอากาศ (climate) น้ำขึ้นน้ำลง (tides)

คลื่นและกระแสน้ำ (wave and currents) ความเค็มของน้ำ (water salinity) ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) ดิน (soil) และธาตุอาหาร (nutrients) ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์สภาพธรรมชาติโดยรวมของป่าชายเลน (สนิท, 2541)

สำหรับการศึกษายีสต์ในป่าชายเลน พบว่าสามารถพบยีสต์ได้ทั่วไปในป่าชายเลน โดยยีสต์และรา มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนธาตุอาหารในป่าชายเลน และเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำ และแพลงก์ตอน (Nagahama, 2005) ยีสต์ที่พบในแหล่งที่อยู่ต่างๆ ในป่าชายเลน ได้แก่

## 1. น้ำ

ในปี ค.ศ. 1981 มีการศึกษายีสต์ในน้ำทะเลและน้ำในป่าชายเลนที่มีมลภาวะในประเทศบราซิล พบ *Candida krusei* จำนวนมากในน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนที่มีมลภาวะแต่พบน้อยในน้ำทะเลที่ไม่มีมลภาวะ นอกจากนี้ยังพบยีสต์ในสกุล *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces* และ *Trichosporon* ในน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนที่มีมลภาวะอีกด้วย (Hagler *et al.*, 1981) น้ำในป่าชายเลนของเกาะบาฮามามีรายงานการพบแอสโคไมซีตส์ยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Lachancea meyersii* sp. nov. (Fell *et al.*, 2004) น้ำในป่าชายเลนของประเทศโปรตุเกศพบ *Candida catenulate*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa* และ *Rhodospidium diobovatum* (Almeida, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบแบสิดิโอไมซีตส์ยีสต์สกุลใหม่ คือ *Kwoniella mangroviensis* gen. nov., sp. nov. ในน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนแถบฟลอริดาและเกาะบาฮามา (Statze Tallman *et al.*, 2007)

จากการศึกษายีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติเขาลำปี-หาดท้ายเหมืองและอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะระ-เกาะพระทอง จังหวัดพังงา โดยการแยกด้วยเทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน (membrane filtration technique) พบ *C. conglobata*, *Candida* cf. *glabrata*, *C. membranifaciens*, *C. parapsilosis*, *C. picinguabensis*, *C. tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia caribbica*, *P. guilliermondii*, *P. fabianii* และ *Rhodotorula mucilaginosa* (Limtong *et al.*, 2008b) และรายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ คือ *Candida thaimueangensis* sp. nov. (Limtong *et al.*, 2007b) และ *Candida phangngensis* sp. nov. (Limtong *et al.*, 2008b)

## 2. ตะกอน

จากการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากตะกอนในป่าชายเลนที่มีมลภาวะในประเทศบราซิล จำนวน 93 สายพันธุ์ พบว่ายีสต์ที่มีจำนวนมากที่สุด คือ *Candida krusei* และ *Pichia membranefaciens* นอกจากนี้ยังพบ *Rhodotorula rubra* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอมัยซีตัสยีสต์ แต่พบจำนวนน้อย (Hagler *et al.*, 1982) ในประเทศไทยพบแอสโคไมซีตัสยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Torulaspora maleeae* sp. nov. ที่แยกจากตะกอนในป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง (Limtong *et al.*, 2008a)

## 3. พืช

บริเวณรอบๆ รากของต้นหญ้าที่มีน้ำท่วมขังในมลรัฐหลุยเซียนา พบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Saturnospora ahearnii* sp. nov. (Kurtzman, 1991) สำหรับการศึกษายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างกิ่งไม้ ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วง ที่เก็บในป่าชายเลนของประเทศไทย และจัดจำแนกโดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/ D2 ของ 26S rDNA จัดจำแนกได้เป็น *Issatchenkia orientalis*, *I. occidentalis*, *Debaryomyces vanrijae*, *D. pseudopolymorphus* var. *yarrowia*, *Pichia sydowiorum*, *P. guilliermondii*, *Kodamaea ohmeri*, *Williopsis saturnus* var. *subsufficiens*, *Candida pseudointermedia*, *C. silvae*, *C. intermedia*, *C. tropicalis*, *C. palmiophila*, *C. fermentati*, *C. fukuyamaensis*, *C. natalensis* และ *C. parapsilosis* ในขณะที่สปีชีส์ใหม่ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Candida* (กุสุมาวดี, 2549)

## 4. สัตว์

ยีสต์สามารถแยกได้จากสัตว์น้ำหลายชนิดรวมทั้งหอยนางรม หอยกาบ หอยแมลงภู่ กุ้ง และปู โดยเมื่อยีสต์อยู่กับสัตว์มันจะได้สารอาหารความเข้มข้นสูงกว่าอยู่อย่างอิสระในน้ำ และความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์กับสัตว์ที่เคลื่อนที่ได้เหล่านี้จะมีความสำคัญในการกระจายตัวของยีสต์ มีรายงานการพบแอสโคไมซีตัสยีสต์อยู่ร่วมกับหอยและปูในป่าชายเลนของประเทศบราซิล จำนวน 322 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ 44 สปีชีส์ ยีสต์ที่พบบ่อย ได้แก่ *Pichia membranaefaciens*, *Candida valida*-like, *Candida krusei*, *Candida sorbosa*, *Candida colliculosa*-like, *Candida famata*-like, *Kloeckera* spp., *Candida guilliermondii*, *Candida albicans*, *Candida silvae*,

*Geotrichum* spp., *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp. และเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ (methylotrophic yeast) คือ *Candida boidinii* (de Araujo et al., 1995)

## การแยก อนุกรมวิธาน และการจัดจำแนกยีสต์

### 1. การแยกยีสต์

สำหรับการแยกยีสต์จากแหล่งที่อยู่ต่างๆ ต้องกำหนดให้ชัดเจนว่าต้องการที่จะหาเชื้อทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในแหล่งที่อยู่นั้น หรือต้องการรู้ถึงเชื้อที่มีความสำคัญที่สุดในแหล่งที่อยู่นั้น วิธีการเก็บตัวอย่าง วิธีการแยกเชื้อ องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อ และสภาวะของการแยกเชื้อ ถือเป็นปัจจัยสำคัญในการแยกยีสต์จากแหล่งที่อยู่ต่างๆ การแยกยีสต์นั้นควรกำหนดจุดประสงค์ของการแยกที่ชัดเจนว่าจะแยกยีสต์ทั้งหมดหรือแยกยีสต์ที่มีลักษณะเฉพาะ วิธีที่ใช้ในการแยกไม่ควรเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวเคมี ความต้องการธาตุอาหาร และสภาพทางกายภาพของเชื้อในระหว่างการแยก และในการแยกเชื้อทุกขั้นตอนต้องใช้เทคนิคที่ป้องกันการปะปนของเชื้ออื่น (สวาวิตรี, 2549) สำหรับการแยกยีสต์จากธรรมชาตินั้นอาจต้องมีการกำจัดหรือลดจำนวนจุลินทรีย์อื่นที่มีอยู่ในตัวอย่าง ปกติมักใช้อาหาร acidified yeast extract malt extract medium agar ที่มีพีเอช 3.7-3.8 (ปรับพีเอชโดยการเติมกรดเกลือ 1 นอร์มอล 0.7 เปอร์เซ็นต์) (Kreger van Rij, 1984) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่แบคทีเรียที่ทนกรดบางชนิดสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่ทนกรดอาจทำได้โดยการเติมสารปฏิชีวนะชนิดที่มีการยับยั้งกว้าง มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียหลายกลุ่มลงในอาหาร เช่น คลอแรมฟินิโคล ซึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในไมโทคอนเดรีย สำหรับการยับยั้งการเจริญของราเส้นใยอาจทำได้โดยการเติมโซเดียมโพรฟิไอเนต หรือ แคลเซียมโพรฟิไอเนต ลงในอาหาร acidified yeast extract malt extract medium agar ที่ปรับสภาพให้เป็นกรดซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นสูงอาจยับยั้งทั้งราเส้นใย และลดจำนวนของยีสต์ที่เจริญได้เฉพาะเมื่อมีออกซิเจน (obligate aerobic yeasts) (Beech and Davenport, 1971)

การแยกยีสต์โดยเทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน (membrane filtration technique) เป็นวิธีที่ใช้ทั้งในกรณีตัวอย่างเป็นของเหลวและของแข็ง โดยตัวอย่างที่เป็นของแข็งต้องนำมาเตรียมเป็นสารละลายหรือสารแขวนลอยก่อน สำหรับการกรองนั้นแผ่นกรองที่เลือกใช้อาจจะต้องมีขนาดของรูกรอง (pore size) 0.8-1.2 ไมครอน หรือถ้ายีสต์มีขนาดเล็กมากอาจต้องใช้ขนาด 0.45 ไมครอน ซึ่ง

ยีสต์และจุลินทรีย์อื่นที่มีขนาดใหญ่จะติดอยู่บนแผ่นกรอง จากนั้นนำแผ่นกรองไปไว้บนผิวหน้าอาหารแข็งที่เหมาะสมสำหรับยีสต์จนกว่ามีโคโลนีของยีสต์เจริญขึ้นมา (สาวิตรี, 2549)

## 2. อนุกรมวิธานของยีสต์

อนุกรมวิธาน (taxonomy) ของยีสต์เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1838 โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาที่ต้องใช้เวลานาน ความถูกต้องแม่นยำ และความน่าเชื่อถือของผลที่ได้จากการทดสอบ บางครั้งการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของยีสต์ที่คล้ายคลึงกันได้ จึงเกิดปัญหาในการจัดจำแนกยีสต์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ทำให้เทคนิคระดับโมเลกุลเข้ามามีบทบาทสำคัญในการจัดจำแนกยีสต์ ประกอบกับปัจจุบันมีเทคนิคที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ช่วยในการศึกษาระดับโมเลกุล ปัจจุบันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการนำมาจัดจำแนกยีสต์ เนื่องจากใช้เวลาน้อยกว่าวิธีการจัดจำแนกแบบดั้งเดิมมากและให้ผลถูกต้องแม่นยำ และครอบคลุมสปีชีส์ได้อย่างกว้างขวางโดยนิยมศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ที่มีขนาด 500-600 นิวคลีโอไทด์ และอยู่ทางด้านปลาย 5' ของ 26S rDNA เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็ว จึงเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีฐานข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์มาก ความแตกต่างในบริเวณนี้สามารถจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์ได้อย่างแม่นยำ (Kurtzman and Robnett, 1998) อย่างไรก็ตามอนุกรมวิธานของยีสต์ในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากการนำเทคนิคระดับโมเลกุลมาใช้ ทำให้การจัดจำแนกยังไม่มีความคงที่นัก ดังนั้นการจัดจำแนกประเภทใน *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4<sup>th</sup> edition ถือว่าเป็นระบบที่ยังคงมีการเปลี่ยนแปลงได้ และเชื่อว่าอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงในเวลาต่อมา (Nakase, 2001)

การจัดจำแนกยีสต์ในปัจจุบันอาศัยอนุกรมวิธานโพลีฟาซิก ประกอบด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี อนุกรมวิธานเคมี และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จึงแบ่งยีสต์ออกเป็น 2 ไฟลัม คือ Ascomycota และ Basidiomycota ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

## ไฟลัม Ascomycota

ยีสต์ที่อยู่ในไฟลัมนี้มีทั้งสกุลที่มีเฉพาะระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่าสกุลอะนามอร์ฟิก (anamorphic genus) และสกุลที่มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เรียกว่าสกุลเทลิโอเมอร์ฟิก (teleomorphic genus) โดยการสร้างสปอร์แบบมีเพศชนิดแอสโคสปอร์ จึงเรียกโดยทั่วไปว่าแอสโคไมซีตส์ยีสต์ (ascomycetous yeast) ประกอบด้วย 3 ชั้น คือ Archiascomycetes, Euascomycetes และ Hemiascomycetes ดังแสดงในตารางที่ 1 ทั้ง 3 ชั้น คือ (Kurtzman and Fell, 1998)

ชั้น 1 Archiascomycetes แบ่งเป็น 4 อันดับ คือ Schizosaccharomycetales, Taphrinales, Protomycetales, Pneumocystidales และในชั้นนี้มีการสร้างแอสโคสปอร์ แต่ขาดเส้นใยที่สร้างแอสโคสปอร์ (ascogenous hypha) มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อหรือฟิสชัน และแสดงปฏิกริยากับสปีโดอะโซเนียมบลูปีเป็นลบ

ชั้น 2 Euascomycetes แบ่งเป็น 2 สกุล คือ สกุล *Endomyces* เฉพาะ *E. scopularum* เท่านั้นที่จัดอยู่ในชั้นนี้ และสกุล *Oosporidium*

ชั้น 3 Hemiascomycetes สำหรับชั้นนี้หลังจากที่มีการเปลี่ยนแปลงประกอบด้วยยีสต์ที่เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อและสกุลที่คล้ายยีสต์ เช่น *Ascoidea* และ *Cephaloascus* ซึ่งแต่เดิมอยู่ในอันดับ Endomycetales โดยที่ชั้น Hemiascomycetes นี้มี 1 อันดับ คือ Saccharomycetales ประกอบด้วย 15 สกุล ซึ่งรวมทั้ง *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* และ *Zygosaccharomyces* สำหรับวงศ์ Candidaceae ประกอบด้วย 12 สกุล และทุกสกุลเป็นระยะที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น *Candida*, *Geotrichum*, *Kloeckera* และ *Trigonopsis*

ตารางที่ 1 การจำแนกประเภทของแอสโคไมซีตัสซิสต์

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

หมายเหตุ <sup>a</sup> เครื่องหมายคำถามที่อยู่หน้าชื่อสกุลแสดงให้เห็นว่าวงศ์นี้ยังมีการจัดจำแนกที่ไม่คงที่

<sup>b</sup> เครื่องหมายคำถามที่อยู่ในชั้น *Hemiascomycetes* แสดงว่าการจัดจำแนกยังไม่คงที่

<sup>c</sup> เครื่องหมายคำถามที่สกุล *Endomyces* และวงศ์ Endomycetaceae แสดงว่ามีการจัดจำแนกที่ไม่คงที่

ที่มา: Kurtzman and Fell (1998)

## ไฟลัม Basidiomycota

ยีสต์ที่อยู่ในไฟลัมนี้มีทั้งสกุลที่มีเฉพาะระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และสกุลที่มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์แบบมีเพศชนิดเบสิดิโอสปอร์ จึงเรียกโดยทั่วไปว่าเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeast) ลักษณะสำคัญของเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ คือระยะที่มีการเจริญจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่างกลม รี หรือยาว เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อแบบเอนเทอโรบลาสติก สร้างเอนเทอโรบลาสติกบลาสโทโคนิเดีย (enteroblastic blastoconidia) ฟิสชันหรือสร้างอาร์โทรโคนิเดีย และ/หรือสร้างบอลิสโทโคนิเดีย มีการแตกหน่อที่ขั้วโดยอาจเป็นการแตกหน่อขั้วเดียวหรือแตกหน่อสองขั้ว อาจพบเส้นใยที่เซลล์มีสองนิวเคลียส มีการเชื่อมแคลมป์ มีการแตกกิ่งก้านฮอสโทเรียล (haustorial branch) มีการสร้างเทลิโอสปอร์และเบสิดิเทียม

เบสิดิโอไมซีตัสยีสต์แบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ Urediniomycetes, Hymenomycetes และ Ustilaginomycetes ดังแสดงในตารางที่ 2 การจัดจำแนกสกุลของเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์อาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ส่วนการจัดจำแนกสปีชีส์ใช้ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ลักษณะสำคัญในแต่ละชั้นมีดังต่อไปนี้ (สาวิตรี, 2549)

ชั้น 1 Urediniomycetes มีผนังแบบมีรูธรรมดา หรือแบบเหมือนไดอะแฟรม และไม่มี Woronin body ไม่สร้างสารประกอบคล้ายแป้งออกมานอกเซลล์ ส่วนใหญ่มีโคเอนไซม์ Q-9 และ Q-10 ยกเว้น *Reniforma strues* ที่มี Q-7

ชั้น 2 Hymenomycetes เส้นใยมีผนังเป็นแบบโคลิพอร์ สปีชีส์ส่วนใหญ่สร้างสารประกอบคล้ายแป้งได้

ชั้น 3 Ustilaginomycetes ผนังเซลล์ประกอบด้วยกลูโคสปริมาณมากที่สุด ผนังเส้นใยเป็นแบบเหมือนไมโครพอร์ (micropore like) มีโคเอนไซม์ Q-10 ยกเว้น *Malassezia* ที่มี Q-9 ไม่สร้างสารประกอบคล้ายแป้ง

ปัจจุบันยีสต์ถูกจำแนกประเภทโดยอาศัยอนุกรมวิธานโพลีฟาซิก ประกอบด้วยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (Kurtzman and Fell, 1998) อนุกรมวิธานเคมี (Phaff, 1998) และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (Kurtzman and Blanz, 1998) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ตารางที่ 2 การจำแนกประเภทของเบสิดิโอไมซีตส์

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

## 2.1 การจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม

ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ ซึ่งรวบรวมโดย Yarrow (1998) ประกอบด้วย

### 2.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา และการเพิ่มจำนวนแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ

สัณฐานวิทยาของเซลล์ ประกอบด้วยสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวและอาหารแข็ง การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งอาจเกิดโดยการแตกหน่อ การแบ่งเซลล์แบบฟิชชัน การแตกหน่อร่วมกับการแบ่งเซลล์แบบฟิชชัน และการสร้างโคนิเดีย (conidiogenesis) การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม การสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศภายในเซลล์ (asexual endospore) การสร้างคลอสมัยโดสปอร์ (chlamydospore) การสร้างบอลลิสโตสปอร์ (ballistospore) และการสร้าง germ tube

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ประกอบด้วย การสร้างแอสโกสปอร์ การสร้างแบบสิดิโอสปอร์ และการตรวจหาเมติงไทด์ (mating type)

### 2.1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์ และใช้ประจำในการจัดจำแนกยีสต์ ประกอบด้วย การหมักคาร์โบไฮเดรต การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน ความต้องการวิตามินในการเจริญ การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิอื่นๆ การสร้างกรดจากการใช้กลูโคส การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) หรือแป้งภายนอกเซลล์ การไฮโดรไลซ์ยูเรีย ความต้านทานไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) การทนกรดอะซิติกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และการทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (diazonium blue B)

## 2.2 การจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมี

อนุกรมวิธานเคมี คือ อนุกรมวิธานที่ใช้องค์ประกอบทางเคมีของสิ่งมีชีวิต ทั้งเมแทบอลิต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เป็นเกณฑ์ในการจำแนกประเภท ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมี รวบรวมโดย Yamada (1998) และ Roelijmans (1998) ประกอบด้วย การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ผนังเซลล์ และแคปซูล การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน ชนิดของโคเอนไซม์คิว (coenzyme Q) และการเปรียบเทียบเอนไซม์และ โปรตีน โดยอิเล็กโทรโฟรีซิส

## 2.3 การจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

การศึกษากรดนิวคลีอิกเพื่อการจำแนกประเภทยีสต์กลายเป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากการจำแนกประเภทสิ่งมีชีวิตควรสะท้อนวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้น สำหรับการจำแนกประเภทของยีสต์ ความแตกต่างทางพันธุกรรมให้ผลที่แม่นยำกว่าความแตกต่างทางฟีโนไทป์ ดังนั้นการจำแนกประเภทที่คงที่ น่าจะได้จากการศึกษากรดนิวคลีอิกนี้

การศึกษานุกรมวิธานระดับโมเลกุลนั้น ประกอบด้วย การศึกษาระดับดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ ซึ่งรวมถึงการศึกษาองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอหรือปริมาณกัวนีนกับไซโทซีนในดีเอ็นเอที่จัดเป็นการศึกษาสำหรับอนุกรมวิธานทางเคมีได้เช่นกัน การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) โดยการทำให้ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) แต่ทั้งสองวิธียังมีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถแยกยีสต์สปีชีส์ที่มีพันธุกรรมหรือความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้ ดังนั้นนักอนุกรมวิธานจึงสนใจการเปรียบเทียบระดับโมเลกุลอื่นๆ เช่น การเทียบโครโมโซมโดยใช้ pulsed field gel electrophoresis (PFGE), restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing) ในกรดนิวคลีอิก วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรดนิวคลีอิกเป็นวิธีการที่มีความเชื่อถือมากกว่าวิธีอื่น เพราะไม่ว่าจะสัมพันธ์น้อยหรือมากก็สามารถพิสูจน์ได้ด้วยโมเลกุลหรือยีนของบริเวณที่ทำการวิเคราะห์ และมีจำนวนฐานข้อมูลในการเปรียบเทียบมากกว่า ดังนั้นจึงเป็นที่นิยมมากในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา (สาวิตรี, 2549)

### 2.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเป็นสาย polydeoxyribonucleotide 2 สาย ซึ่งประกอบด้วย nitrogenous base 4 ชนิด คือ อะดีนีน (adenine, A) ไทมิน (thymine, T) กัวนีน (guanine, G) และไซโทซีน (cytosine, C) จากการวิเคราะห์ปริมาณกัวนีนและไซโทซีน พบว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดจะมีปริมาณกัวนีนและไซโทซีนที่แตกต่างกัน สำหรับยีสต์มีปริมาณกัวนีนและไซโทซีน อยู่ระหว่าง 27-70 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์ในกลุ่มแอสโคไมซิดส์ยีสต์มีปริมาณกัวนีนและไซโทซีนอยู่ระหว่าง 27-50 โมลเปอร์เซ็นต์ ส่วนยีสต์ในกลุ่มเบสิดิโอไมซิดส์ยีสต์มีปริมาณกัวนีนและไซโทซีนอยู่ระหว่าง 50-70 โมลเปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่เป็นยีสต์สกุลเดียวกัน ปริมาณกัวนีนและไซโทซีนจะแตกต่างกันไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ปริมาณกัวนีนและไซโทซีนจะแตกต่างกันไม่เกิน 1-2 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มณี, 2544)

### 2.3.2 ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันหรือดีเอ็นเอรีแอสโซซิเอชัน

ปกติเมื่อดีเอ็นเอสายคู่ได้รับความร้อนจะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และเมื่ออุณหภูมิค่อยๆ ลดลง ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นสายคู่สม (complementary) จะกลับมากับกันเป็นดีเอ็นเอสายคู่อีกครั้งเรียกว่าเกิดดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) หรือดีเอ็นเอรีแอสโซซิเอชัน (DNA reassociation) การจับคู่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% relatedness) ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว 2 สาย ดังนั้นถ้านำดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากจุลินทรีย์ 2 ชนิด มาทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันจะสามารถบอกถึงความเหมือนและความแตกต่างของจุลินทรีย์ทั้งสองได้ โดยทั่วไปถ้าค่าความเหมือนมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ จะถือว่าจุลินทรีย์ทั้งสองอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามจะต้องพิจารณาร่วมกับลักษณะอื่นด้วย เช่นความสามารถในการสร้างสปอร์โดยอาศัยเพศและการมีชีวิตของสปอร์เหล่านั้น ในกรณีของ *Issatchenkia scutula* var *scutula* และ *Issatchenkia scutula* var *exigua* มีค่าความเหมือนต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ คือประมาณ 21-26 เปอร์เซ็นต์ แต่จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกันเนื่องจากเกิดคอนจูเกชันได้ดีและให้แอสโคสปอร์ที่มีชีวิต ส่วนยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* แต่ละสปีชีส์จะมีค่าความเหมือนใกล้เคียงกันแต่จัดให้อยู่ต่างสปีชีส์เนื่องจากมีลักษณะอื่นๆ ที่แตกต่างกัน (มณี, 2544)

### 2.3.3 การระบุชนิดโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger printing) คือวิธีการสำหรับการทำให้เกิดรูปแบบที่เป็นเอกลักษณ์ของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะช่วยในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ วิธีการระบุชนิดโดยใช้ดีเอ็นเอ (DNA typing method) ที่สำคัญประกอบด้วย

ก. อิเล็กโทรโฟรีติกคาริโอไทป์ (electrophoretic karyotyping) หรือรูปแบบอิเล็กโทรโฟรีซิสของโครโมโซม สามารถให้ข้อมูลที่จำเป็นสำหรับอนุกรมวิธานของยีสต์ วิธีการอิเล็กโทรโฟรีติกคาริโอไทป์ใช้เพื่อวิเคราะห์จำนวนและขนาดของแต่ละโครโมโซม รวมทั้งสามารถใช้ประเมินขนาดของยีนทั้งหมด การจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม และการประเมินยีนด้วยการใช้ pulsed field gel electrophoresis (PAGE) ซึ่งให้กระแสไฟฟ้าหลายทิศทางเป็นจังหวะ โดยได้มีการพัฒนาเทคนิคและเครื่องมือสำหรับการทำ PAGE ของโครโมโซม เช่น orthogonal field alternation gel electrophoresis (OFAGE) สำหรับ PAGE สามารถใช้แยกโครโมโซมขนาดใหญ่ถึง 6 กิโลนิวคลีโอไทด์ (สาวิตรี, 2549)

ข. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจหาความเหมือนหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยใช้เอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับเอนไซม์นั้นๆ โดยไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลทางพันธุกรรม จากนั้นแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และตรวจรูปแบบที่เกิดขึ้นโดยการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หรือโดยการทำ Southern blotting และไฮบริดซ์ด้วยตัวตรวจจับ (probe) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น จากรูปแบบที่แตกต่างกันของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสตัดจำเพาะ ทำให้เทคนิคนี้สามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ในระดับสปีชีส์ และระดับสายพันธุ์ (strain) หรือ variety (สุรินทร์, 2548) โดยดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์อาจเป็นยีน (Clemon *et al.*, 1997) หรือดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mitochondria DNA) (Piskur *et al.*, 1998)

ค. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาความเหมือนหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ เนื่องจาก

เป็นการเพิ่มจำนวนแบบสุ่มทำให้รูปแบบของ RAPD ที่ได้ขึ้นอยู่กับสถานะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน ซีนดีเอ็นเอ เช่น อุณหภูมิ จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน ซีนดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase และชนิดของเครื่อง DNA Thermal cycle ที่ใช้ ดังนั้นสถานะที่เปลี่ยนแปลงไปมีผลต่อ รูปแบบของ RAPD สำหรับการจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์และสายพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD ในกรณีที่รูปแบบของ RAPD ไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างได้อาจใช้รูปแบบที่ได้จากการใช้ ไพรเมอร์จำเพาะแล้วนำซีนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี RAPD ไปตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ (สาวิตรี, 2549)

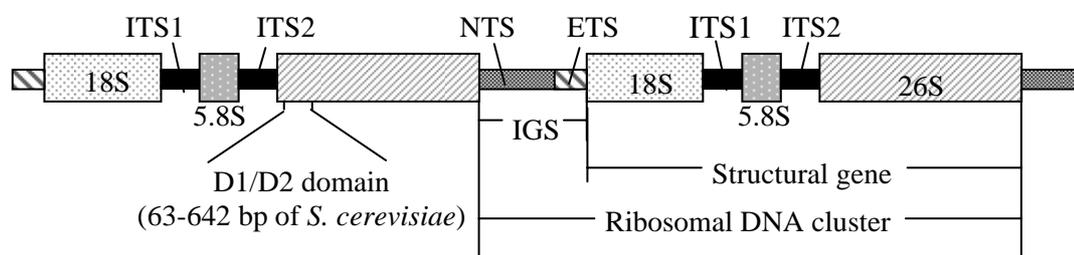
๓. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) คือ การตรวจสอบซีน ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ดังนั้นจึงรวมเอา ประโยชน์ของเทคนิค AFLP และประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR เข้าด้วยกัน การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของซีน ดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้นๆ ที่มีปลาย ด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียว (sticky end ligation) เหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงสามารถเชื่อมต่อกับซีนดีเอ็นเอที่ตัดไว้ซึ่งมีปลายเหนียว และจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป รูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่งๆ เรียกว่า ลายพิมพ์ AFLP (AFLP fingerprint) แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์แต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึงความแตกต่างของซีนดีเอ็นเอที่ตัดได้ ด้วยเอนไซม์จำเพาะจึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายเรียกว่า เครื่องหมาย AFLP (AFLP marker) หรือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) (สุรินทร์, 2548)

#### 2.3.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอไรโบโซมและดีเอ็นเอไรโบโซม

สิ่งสำคัญในการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับจำแนกประเภทและจัดจำแนก ยีสต์ คือการเลือกว่าจะนำบริเวณใดของยีนอมมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากยีนอมของสิ่งมีชีวิต ประกอบด้วยส่วนที่มีวิวัฒนาการด้วยอัตราที่ต่างกัน มีผลทำให้ความสามารถในการแยกแตกต่างกัน เหตุผลที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอไรโบโซมหรือดีเอ็นเอไรโบโซม (ribosomal RNA /ribosomal DNA หรือ rRNA/rDNA) ในการจัดจำแนกยีสต์ เนื่องจากไรโบโซมปรากฏในเซลล์ของ สิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกัน และไรโบโซมยังมีหลายชุดในแต่ละเซลล์ โดยทุกชุดมีวิวัฒนาการเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอไรโบโซม หรือ

ดีเอ็นเอไรโบโซม มีทั้งส่วนที่วิวัฒนาการน้อยหรือบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และส่วนที่วิวัฒนาการมากหรือวิวัฒนาการเร็วที่เรียกว่าบริเวณผันแปร (variable region) หรือบริเวณอนุรักษ์น้อย (less conserved region) ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิงเพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณผันแปรได้ (Kurtzman, 1992; Valente *et al.*, 1999; Kurtzman and Sugiyama, 2001)

อาร์เอ็นเอไรโบโซม หรือ ดีเอ็นเอไรโบโซม เป็นโครงสร้างอย่างหนึ่งที่เป็นในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของสิ่งมีชีวิต สำหรับยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มยูคาริโอต พบอาร์เอ็นเอไรโบโซมหรือดีเอ็นเอไรโบโซมหลายขนาด คือ 25-28S rRNA ในหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) ที่มีขนาด 80S และในหน่วยย่อยขนาดเล็ก (small subunit) ที่มีขนาด 40S ประกอบด้วย 18S rRNA และ 5.8S rRNA สำหรับ rRNA ทั้ง 3 ชนิดนี้จะกำหนดการสร้างโดย rDNA 3 ชนิดซึ่งเรียงต่อๆ กัน (ภาพที่ 1) และถอดรหัสเป็น pre-rRNA 1 โมเลกุล โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส I (RNA polymerase I) จากนั้นผ่านกระบวนการต่อไปจนได้ mature rRNAs คือ 18S rRNA, 5.8S rRNA และ 25-28S rRNA นอกจากนี้ยังมีชิ้นของ 5S rRNA ด้วย



**ภาพที่ 1** โครงสร้างของดีเอ็นเอไรโบโซม ซึ่งประกอบด้วย 18S rDNA, 5.8S rDNA, 26S rDNA, ITS (Internal Transcribed Spacer), IGS (Inter-Genic Spacer), NTS (Non-Transcribed Spacer) และ ETS (External Transcribed Spacer)

**ที่มา:** คัดแปลงจาก [http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/110300/rna\\_polymerases.html](http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/110300/rna_polymerases.html).

Valente *et al.* (1999) รวบรวมบริเวณที่มักทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้ในอนุกรมวิธานของยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 3 และรวบรวมไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ

ปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนรวมทั้งบอกขนาดของแต่ละบริเวณไว้ดังแสดงในตารางที่ 4 สำหรับบริเวณที่มักทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับอนุกรมวิธานของยีสต์ตามที่สาวิตรี (2549) รวบรวมไว้ดังนี้

ก. 5S rRNA มีขนาดเล็กโดยในยีสต์มีขนาดเพียง 120 นิวคลีโอไทด์ ทำให้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ง่าย เดิมใช้สำหรับการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างกว้างๆ เช่น วิเคราะห์ไฟโลจีนีระดับอาณาจักร

ตารางที่ 3 บริเวณที่มักทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้ในอนุกรมวิธานของยีสต์

โมเลกุล	บริเวณ	Higher categories						
		Family	Genus	Species	Sister species	Subspecies/variety	Strains	
5S rDNA	ทั้งหมด	+	+					
5.8S rDNA	ทั้งหมด			+				
18S rDNA	ทั้งหมด	+	++	+++	++			
18S rDNA	18S-1627 (1451-1618)	+ <sup>a</sup>		+++	++			
25S rDNA	25S-635 (D2, V3, B หรือ 463-622)	+ <sup>a</sup>		+++	+++		+	
25S rDNA	25S-1841 (1611-1835)	+ <sup>a</sup>		++				
25S rDNA	D1/D2			+	+++	++	+	
ITS	ทั้งหมด				+	+	+	
IGS	<sup>b</sup>				+		+	+
ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย	<sup>b</sup>				+	+		+

หมายเหตุ <sup>a</sup> ใช้บริเวณ 18S (18S-1627) และ 25S rDNA (25S-1841 และ 25S-635) ประกอบกัน

<sup>b</sup> วิเคราะห์การตัด และลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด หรือบางส่วน

+ ใช้น้อย; ++ ใ้; +++ ใ้มาก

ที่มา: Valente *et al.* (1999)

ตารางที่ 4 ไพรมเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA สำหรับใช้ใน  
อนุกรมวิธานของยีสต์

บริเวณ	ไพรมเมอร์ (ลำดับนิวคลีโอไทด์)	ความยาวโดยประมาณ
5S rDNA ทั้งหมด	<sup>a</sup>	120 bp
5.8S rDNA ทั้งหมด	Sequenced with the entire ITS region	150 bp
18S rDNA ทั้งหมด	Direct sequencing 5' TGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACC 3' 5' CCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCC 3' 5' TCTGGGCCGCACGCGCTACACTG 3' 5' GACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAG 3'	1750 bp
18S rDNA ทั้งหมด	Sequencing of PCR product NS1-5' GTAGTCATATGCTTGTCTC 3' NS8-5' TCCGCAGGTTACCTACGGA 3' Basid2-5' CTGTTAAGACTACAACGGAGCAGGC 3' Basid3-5' AGAGTGTCAAAGCAGGA 3'	1800 bp
18S rDNA 18S-1627 (1451-1618)	Direct sequencing 5' ACGGGCGGTGTGTAC 3'	167-172 bp
25S rDNA 25S-635 (D2, B, V3 หรือ 493-622)	Direct sequencing 5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'	200-300 bp
25S rDNA 25S-1841 (1611-1835)	Direct sequencing 5' TTGGAGACCTGCTGCGG 3'	225 bp
25S rDNA D1/D2	Sequencing of PCR product NL1-5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3' NL4-5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'	600 bp
ITS	Sequencing of PCR product ITS1-5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' or ITS5-5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3' ITS4-5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	ผันแปรได้ (<400->800 bp)
IGS <sup>b</sup>	Sequencing of PCR product AC10-5' GAGGCTAGAGGTGCCAG 3' AC19-5' ATTCGAGAAGTTATTATG 3'	ผันแปรได้ (~2.4 kb)

หมายเหตุ \*การศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลนี้ถูกจำกัด โดยการแยกและการวิเคราะห์บริเวณต่อจาก 5S rRNA หรือ  
วิเคราะห์บริเวณทั้งหมด IGS

†บริเวณ IGS ส่วนมากวิเคราะห์โดยการตัดจำเพาะ

ที่มา: Valente *et al.* (1999)

ข. 18S rRNA มีขนาด 1,800 นิวคลีโอไทด์ จึงสามารถแสดงความแตกต่างได้มากกว่า 5.8S rRNA และ 5S rRNA โดย 18S rRNA มีขนาดใหญ่พอที่จะใช้เพื่อแยกยีสต์ทั้งชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด และที่มีความสัมพันธ์ห่างกันเนื่องจากมีบริเวณที่มีระดับการอนุรักษ์ที่แตกต่างกัน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA ใช้แยกความสัมพันธ์ของอนุกรมวิธานระดับอันดับ ชั้น และวงศ์ของรา และใช้สำหรับนำเบสดีโอเมทิลซิติสียีสต์เข้าสู่ระบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของการจำแนกประเภท

ค. 25S-28S rRNAs มีหลายบริเวณที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น บริเวณ 25S-635 (บริเวณ D2) บริเวณ 25S-1841 และบริเวณ D1/D2 เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการผันแปร สำหรับบริเวณ 25S-1841 พบว่ามีประโยชน์น้อยในการแยกสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมากๆ ยกเว้นจะใช้ร่วมกับบริเวณอื่น ส่วนบริเวณ 25S-635 มีขนาด 300 นิวคลีโอไทด์ สามารถแยกสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมากๆ ได้ และในสปีชีส์เดียวกันมักมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์บริเวณ 25S-635 ไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ โดยถ้ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่านี้ก็จะถือว่าเป็นคนละสปีชีส์

ง. บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA มีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ อยู่ที่ปลายด้าน 5' ของ 26S rDNA เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง และนิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ใน *Saccharomyces cerevisiae* จะอยู่ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 63-642 บริเวณปลายด้าน 5' ของ 26S rDNA เป็นบริเวณที่วิวัฒนาการเร็วจึงเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างกันมากในบรรดาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26S rDNA ความแตกต่างในบริเวณนี้สามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ในระดับสปีชีส์ ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนบริเวณดังกล่าวคือ ไพรมเมอร์ NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') เป็น forward primer และไพรมเมอร์ NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') เป็น reverse primer จากการศึกษาของ Kurtzman และ Robnett (1998) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA มีความน่าเชื่อถือในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ โดยทำการศึกษายีสต์ที่เป็นแอสโคไมยซิติสียีสต์ รวมถึงยีสต์ในกลุ่ม *Candida* และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และบริเวณ 18S rDNA พบว่า

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองบริเวณมีความสอดคล้องกัน ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA หากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 600 นิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 คือ มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 6 นิวคลีโอไทด์ สายพันธุ์นั้นจะถูกจัดเป็นคนละสปีชีส์ และสายพันธุ์ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์จัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก (sister species)

จ. Internal transcribed spacer (ITS) อยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของดีเอ็นเอไรโบโซม ของหน่วยย่อยขนาดเล็กกับปลายด้าน 5' ของดีเอ็นเอไรโบโซม ในหน่วยย่อยขนาดใหญ่ ITS ประกอบด้วย ITS1 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S ดีเอ็นเอไรโบโซม กับ 5.8S ดีเอ็นเอไรโบโซม และ ITS2 ที่อยู่ระหว่าง 5.8S rDNA และ 26S rDNA เป็นบริเวณที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานของยีสต์ รา และพืช โดยใช้มากเพื่อกำหนดสปีชีส์ของรา ความยาวของ ITS ในสายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันค่อนข้างคงที่แต่ลำดับของนิวคลีโอไทด์อาจผันแปร ข้อเสียในการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS คือความยากในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม เนื่องจากมีความแตกต่างในอัตราสูง ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS

ฉ. Intergenic spacer (IGS) อยู่ระหว่างกลุ่มของดีเอ็นเอไรโบโซมโดยอยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของดีเอ็นเอไรโบโซม ในหน่วยย่อยขนาดใหญ่กับ 5' ของดีเอ็นเอไรโบโซม ในหน่วยย่อยขนาดเล็ก ได้รับความสนใจน้อยมากในการนำมาใช้สำหรับอนุกรมวิธานของยีสต์

### การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ

เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ (DNA sequencing) มีรายงานเป็นครั้งแรกที่อธิบายเกี่ยวกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้วิธีแบบสมัยใหม่ในปี ค.ศ. 1977 (Alphey, 1997) เทคนิคนี้ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การหาลำดับนิวคลีโอไทด์มี 2 วิธี คือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีทางเคมี (chemical sequencing) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีใช้เอนไซม์ (enzymatic sequencing) วิธีทั้งสองนี้อาศัยหลักการทำให้เกิดซันดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันเพียง 1 นิวคลีโอไทด์ โดยใช้ปฏิกิริยาที่ทำให้ซันดีเอ็นเอถูกตัดตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะหรือสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ได้ซันดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นนิวคลีโอไทด์จำเพาะทั้ง 4 ชนิด แล้วจึงแยกซันดีเอ็นเอดังกล่าวโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

ชั้นดีเอ็นเอนั้นจะเคลื่อนที่ในระยะเวลาที่เป็นสัดส่วนกับขนาดโมเลกุล โดยไม่ขึ้นกับชนิดของ นิวคลีโอไทด์ที่มีในชั้นดีเอ็นเอ สามารถแยกความแตกต่างได้แม้ว่าชั้นดีเอ็นเอแต่ละชั้นจะมีขนาดแตกต่างกันเพียง 1 นิวคลีโอไทด์ ต่อมามีการพัฒนาเครื่องมือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) ที่อาศัยหลักการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์โดยวิธีใช้เอนไซม์ รายละเอียดของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีต่างๆ มีดังนี้

### 1. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีทางเคมี

วิธีนี้ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1977 โดย Maxam และ Gilbert ซึ่งใช้สารเคมีในการทำ ปฏิกิริยาที่จำเพาะสำหรับการเลือกตัดสายดีเอ็นเอที่นิวคลีโอไทด์ใดนิวคลีโอไทด์หนึ่งหรือสอง นิวคลีโอไทด์ โดยนำชั้นดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มาแยกให้บริสุทธิ์ ดัดผลากที่ปลาย ด้านใดด้านหนึ่ง จากนั้นทำการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัดที่ชั้นดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากพอแล้วนำมาแบ่งเป็น 4 ส่วน นำแต่ละส่วนมาทำปฏิกิริยาเพื่อตัด นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งจำเพาะ คือ G; A กับ G; C กับ T และ C ตามลำดับ โดยใช้สารเคมีดังแสดง ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการตัดนิวคลีโอไทด์อย่างจำเพาะ

สารเคมี	นิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะ
Dimethyl sulfate pH 8.0	G
Piperidine formate pH 2.0	A+G
Hydrazine	C+T
Hydrazine + 1.5 M NaCl	C
1.2 M NaOH (90°C)	A>C

ที่มา: Alphey (1997)

จากการทำปฏิกิริยาแบบสุ่มในแต่ละหลอดทำให้ได้สายดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกัน นำมาแยกโดยทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในพอลิอะคริลามายด์เจล (polyacrylamide gel) และนำเจลไปทำให้แห้งบนกระดาษกรอง ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละแถวโดยวิธีอโตเรดิโอกราฟ

ซึ่งปรากฏแถบสีดำในแต่ละแถว สามารถแปลผลเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างๆ เรียงจากปลายที่ติดฉลากไว้ โดยอ่านจากแถบล่างสุดมายังด้านบนตามลำดับ (Alphey, 1997)

## 2. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีโซ่นาซิม

วิธีนี้เป็นวิธีของ Sanger และคณะ ในปี ค.ศ. 1977 โดยใช้เอนไซม์ที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เรียกว่า ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส I (DNA polymerase I) สร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นสายคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการทำงานต้องอาศัยไพโรเมอร์เป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทางด้านปลาย 3' ของไพโรเมอร์ โดยการต่อสายนิวคลีโอไทด์จากไพโรเมอร์นี้จะหยุดเมื่อมีการต่อ 2', 3'-ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (2', 3'-dideoxyribonucleotide, ddNTP) ชนิดใดชนิดหนึ่งเข้าไป เนื่องจากขาดหมู่ไฮดรอกซีที่ปลาย 3' วิธีนี้เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า dideoxy chain terminating method วิธีการเริ่มจากการเตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นสายเดี่ยว และเตรียมไพโรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับส่วนของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นแบ่งดีเอ็นเอออกเป็น 4 ส่วน นำมาทำปฏิกิริยาให้จับคู่กับไพโรเมอร์ในหลอดที่มีไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด แต่มีไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวเพื่อหยุดปฏิกิริยาเมื่อใส่ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส I ลงไป ปฏิกิริยาจะทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยมีการหยุดปฏิกิริยาแบบสุ่มที่นิวคลีโอไทด์ชนิดใดชนิดหนึ่งในแต่ละหลอด นำผลที่ได้ทั้ง 4 หลอดมาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจสอบโดยออโตเรดิโอกราฟ เกิดแถบดีเอ็นเอในแต่ละแถว ซึ่งแปลผลเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจากปลาย 5' ทางด้านล่างมาปลาย 3' ส่วนบน จากนั้นกลับให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Alphey, 1997)

## 3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติใช้หลักการเกี่ยวกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีโซ่นาซิม คือใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส I สร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นสายคู่สมขึ้นมา การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการไพโรเมอร์ในการเริ่มต้นเพื่อต่อนิวคลีโอไทด์เข้าไปทางด้านปลาย 3' ของไพโรเมอร์ การต่อสายนิวคลีโอไทด์จากไพโรเมอร์นี้จะหยุดที่นิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะแต่ละนิวคลีโอไทด์โดยเติม 2', 3'-ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ การต่อสายพอลินิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ต้องอาศัยไพโรเมอร์ และซึ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้าน 3' เป็นหมู่ไฮดรอกซี (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) การใช้นิวคลีโอไทด์ที่เป็นไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (ddATP, ddTTP,

ddGTP, ddCTP) ซึ่งแต่ละชนิดจะต่ออยู่กับสารเรืองแสงที่ต่างชนิดกัน ทำให้การสังเคราะห์สิ้นสุดลงเนื่องจากขาดหมู่ไฮดรอกซี เมื่อจบปฏิกิริยาแล้วจึงนำไปทำอิเล็กโทรโฟริซิสขึ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้นที่ได้จากปฏิกิริยานั้นจะมีขนาดไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับว่าจะหยุดการสังเคราะห์ที่นิวคลีโอไทด์ตัวใดในสายนั้น นอกจากนี้ดีเอ็นเอสายที่มีการหยุดสังเคราะห์ที่นิวคลีโอไทด์แต่ละตัวนี้จะมีสีเรืองแสงที่ติดอยู่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อขึ้นดีเอ็นเอสายที่มีขนาดสั้นที่สุดเคลื่อนที่ลงมา เครื่องตรวจจับที่เป็นระบบเลเซอร์จะจับความยาวช่วงคลื่นของสีเรืองแสงแต่ละตัวที่เปล่งออกมาได้ และบันทึกผลที่ออกมาว่าแถบดีเอ็นเอแถบแรกนั้นเป็นแถบที่มีปลายเป็นนิวคลีโอไทด์ตัวใด และตรวจจับแถบถัดมาเรื่อยๆ และเก็บข้อมูลไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ เมื่อจบการทำอิเล็กโทรโฟริซิสก็สามารถอ่านข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ทันทีโดยไม่ต้องทำอโตเรดิโอกราฟ (Prescott *et al.*, 1999)

### ต้นไม้วิวัฒนาการ

การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการมีจุดมุ่งหมายในการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตตามบรรพบุรุษ ซึ่งหมายถึงการจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) คือ การจำแนกประเภทไฟโลจีนีติก (phylogenetic classification) ปัจจุบันเชื่อว่าการจำแนกประเภทที่เชื่อถือได้ต้องอาศัยพื้นฐานของวิวัฒนาการ (phylogeny) และควรพิจารณาความเหมือนหรือความต่างของพันธุกรรมด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอซึ่งสามารถใช้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในทุกระดับอนุกรมวิธาน (สวาตรี, 2549) ความสัมพันธ์ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตสามารถแสดงได้ด้วยต้นไม้วิวัฒนาการซึ่งประกอบด้วย nodes และแขนง (branch) โดยแขนงหนึ่งแขนงจะเชื่อม nodes ที่ใกล้กันสอง nodes เข้าด้วยกัน โดย nodes จะแสดงถึงสิ่งที่ต้องการศึกษา และแขนงแสดงถึงความสัมพันธ์ของสิ่งที่ทำการศึกษาในเชิงบรรพบุรุษ สำหรับการวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการจากดีเอ็นเอมีขั้นตอนตามที่สวาตรี (2549) ได้รวบรวมจากข้อสรุปของ Takashima (2001) และ Valente *et al.* (1999) ดังนี้

#### 1. เทียบ

เป็นการเทียบ (align) ลำดับนิวคลีโอไทด์และการประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เทียบ ในทางปฏิบัติเริ่มจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเทียบกัน โดยปรับแนวให้ตรงกัน ซึ่งอาจวิเคราะห์ตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกันได้ การเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) นั้น อาจตรง

ไปตรงมาถ้าความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์น้อยและความแตกต่างส่วนใหญ่เกิดจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) แต่จะยากขึ้นเมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันมากขึ้น และมีการแทรก (insertion) หรือการขาดหาย (deletion) ของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นมาก การวิเคราะห์ไฟโลจีนีติกนั้นต้องใช้ผลที่ได้จากการเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง ดังนั้นขั้นนี้จึงเป็นขั้นที่สำคัญที่สุดในการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

## 2. การเลือกวิธีวิเคราะห์ไฟโลจีนีติก จำนวน และประเมินต้นไม้วิวัฒนาการ

วิธีวิเคราะห์ไฟโลจีนีติกวิธีต่างๆ นั้นมีข้อสรุปร่วมกัน คือ ลักษณะต่างๆ มีวิวัฒนาการอย่างเป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกัน การเปรียบเทียบรวมเอา orthologous genes ไว้ด้วย ตำแหน่งที่เหมือนกันนั้นต้องถูกต้อง และการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ต้องเป็นกลาง วิธีวิเคราะห์ไฟโลจีนีติก เช่น

2.1 Distance method เป็นวิธีที่อาศัยระยะทางของวิวัฒนาการ (evolutionary distances) โดยประเมินค่าความแตกต่างของเชื้อทุกคู่ และสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ โดยใช้ขั้นตอนที่อาศัยความสัมพันธ์ของค่าระยะทาง (distance value) มีวิธีการหลายอย่างที่ใช้ในการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ เช่น arithmetic method (UPGMA และ WPGMA) และ neighbor joining method

2.2 Character-based method วิธีนี้ถือว่าการแทนที่แต่ละนิวคลีโอไทด์แยกจากกัน ซึ่งวิธีที่ใช้มากคือ Parsimony method ที่ใช้ในการพิจารณาชุดของนิวคลีโอไทด์หรือข้อมูลระดับโมเลกุลอื่น และจำนวนของการแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่ต่ำที่สุด ซึ่งอธิบายกระบวนการวิวัฒนาการทั้งหมดที่ให้ topology นั้น โดย topology ที่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ต่ำสุดถูกเลือกเป็นต้นไม้วิวัฒนาการที่ดีที่สุดอีกวิธีหนึ่งคือ maximum likelihood method เพื่อหาความเป็นไปได้ในข้อมูลโดยพิจารณาแต่ละด้านแยกจากกันด้วยการหา maximum likelihood value สำหรับตัวอักษรของนิวคลีโอไทด์ในบรรดาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษา เพื่อให้ได้ต้นไม้วิวัฒนาการที่เป็นไปได้ แล้วจึงเลือกต้นไม้ออกมาหนึ่งต้นที่มี maximum likelihood value สูงสุด

2.3 การประเมินความน่าเชื่อถือของต้นไม้วิวัฒนาการ เมื่อสร้างต้นไม้วิวัฒนาการแล้ว จำเป็นต้องประเมินความน่าเชื่อถือของข้อมูลเหล่านี้และสนับสนุนต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างได้ โดยทำการตรวจความน่าเชื่อถือของแขนงในต้นไม้ด้วยค่าสถิติเข้ามาช่วย ค่า bootstrap value บ่งบอกว่าจากการวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้งๆ จะได้ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในต้นไม้วิวัฒนาการ

เป็นเช่นนั้น เช่น bootstrap value เท่ากับ 99 ที่ตำแหน่งที่ nodes บนต้นไม้วิวัฒนาการ แสดงว่ามีค่าความน่าเชื่อถือของตำแหน่งในต้นไม้วิวัฒนาการดังกล่าว 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยทั่วไปค่าที่มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นผลเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ วิธีการทดสอบ bootstrap ออกแบบโดย Felsenstein (1985) และเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดในการอ้างอิงถึงการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ

1.1 ยีสต์จำนวน 88 สายพันธุ์ ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง ซึ่งอยู่ประมาณเส้นรุ้งที่  $9^{\circ} 13'$  ถึง  $9^{\circ} 32'$  เหนือ เส้นแวงที่  $98^{\circ} 16'$  ถึง  $98^{\circ} 27'$  ตะวันออก ประกอบด้วยยีสต์รหัส RV จำนวน 56 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 ยีสต์รหัส R1 จำนวน 32 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 และเก็บรักษาอยู่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดย รศ. ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง

1.2 ยีสต์จำนวน 61 สายพันธุ์ ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2549 ในขณะที่ทำวิทยานิพนธ์นี้

### 2. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง จำนวน 5 จุด แต่ละจุดเก็บตัวอย่างน้ำ 2 ตัวอย่าง คือ

2.1 ตัวอย่างน้ำที่เก็บบริเวณใต้ผิวน้ำเล็กน้อยเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากอากาศ การเก็บตัวอย่างน้ำที่บริเวณใต้ผิวน้ำเล็กน้อยใช้ขวดพลาสติกฝาเกลียวที่มีความจุ 600 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างจุดละ 1 ขวด

2.2 ตัวอย่างน้ำที่ระดับความลึกจากผิวน้ำลงไป 1 เมตร เก็บโดยใช้ Nishin biosampler แล้วใส่ตัวอย่างน้ำในขวดพลาสติก จุดละ 1 ขวด

นำตัวอย่างน้ำที่เก็บได้มาวัดอุณหภูมิ พีเอช และความเค็มของตัวอย่างน้ำทันที ณ จุดที่เก็บ

### 3. การแยกยีสต์

ทำการแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยใช้เทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน โดยกรองน้ำปริมาตร 50 และ 100 มิลลิลิตร ผ่านแผ่นเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปวางบนอาหาร acidified yeast extract malt extract agar ที่เติมโซเดียมโพรฟิไอเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอช 3.7-3.8 ด้วยกรดเกลือ 1 นอร์มอล (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนปรากฏโคโลนี นับจำนวนโคโลนียีสต์ที่ขึ้นบนแผ่นกรอง จากนั้นเก็บโคโลนียีสต์ที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการครอสสตรีก (cross streak) บนอาหาร yeast extract malt extract (YM) agar (ภาคผนวก) เก็บยีสต์บริสุทธิ์ในอาหาร YM broth ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก) นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และเก็บรวบรวมข้อมูลของยีสต์ที่แยกได้

### 4. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

#### 4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

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

#### 4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

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

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

PCR buffer (10X)	3	ไมโครลิตร
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.4	ไมโครลิตร
dNTP mix (2.5 mM)	2.4	ไมโครลิตร
Primer NL1 (10 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Primer NL4 (10 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> polymerase (Fermentas; 5U/μl)	0.15	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร
Reverse osmosis sterile	17.25	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	30	ไมโครลิตร

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

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

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ เมื่อสิ้นสุดการทำงาน เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ PCR product โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และมี 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) นำเจลไปย้อมด้วย เอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเครื่อง UV transilluminator (Ultra-Lum Inc., Canada) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิตดังนี้ นำ PCR product ผสมกับ PB buffer (ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product) ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายลงใน QIAquick spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติม PE buffer ลงไปใน QIAquick spin column 0.75 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นเหวี่ยง QIAquick spin column อีกครั้ง ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำส่วนของคอลัมน์วางลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างดีเอ็นเอที่ติดอยู่ในคอลัมน์ด้วยน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นตรวจสอบความเข้มของ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kit โดยนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมี 100 bp DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย

#### 4.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA

นำ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 4.2 มาทำ cycle sequencing โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) ไพร์เมอร์ NL1 เป็น forward primer และ NL4 เป็น reverse primer โดยส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

Sequencing buffer (5X)	1	ไมโครลิตร
BigDye (2.5X)	2	ไมโครลิตร
Primer (1.6 pmol)	1	ไมโครลิตร
Reverse osmosis sterile	4	ไมโครลิตร

DNA template (5-20 ng)	2	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วงที่บริษัทผู้ผลิต BigDye แนะนำ)		
ปริมาตรทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

นำหลอด PCR ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาใส่ในเครื่อง PCR และตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

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

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

#### 4.4 การจัดจำแนกยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) โดยใช้

BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide) homology search program (Altschul *et al.*, 1997) โดยมีเกณฑ์ว่าถ้า 2 สายพันธุ์มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (คือมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์) สายพันธุ์ทั้งสองนั้นจัดจำแนกได้เป็นคนละสปีชีส์ และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมาก (Kurtzman and Robnett, 1998)

#### 4.5 การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

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

### 5. การศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี

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

#### 5.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

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

### 5.1.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว

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

### 5.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

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

### 5.1.3 การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ตรวจสอบโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar (ภาคผนวก) หรือ potato dextrose agar (ภาคผนวก) ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) โดยนำสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อจุ่มลงไป ในอาหารแข็งที่หลอมเหลวในงานเพาะเชื้อทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำสไลด์ที่อาหารแข็งตัวแล้วไปวางบนแท่งแก้วรูปตัวยูในงานเพาะเชื้อเพาะเชื้อบางๆ โดยการสตรีก (streak) บนอาหารแข็ง 1-2 เส้น ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการจุ่มแอลกอฮอล์ลงไฟ เติมน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ปราศจากเชื้อลงในงานเพาะเชื้อที่วางสไลด์เพื่อให้ความชื้นป้องกันวุ้นบนสไลด์แห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### 5.1.4 การสร้างแอสโคสปอร์

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

#### 5.2 ลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์และใช้ประจำในการจัดจำแนกยีสต์ ดังนี้

##### 5.2.1 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

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

เฮกไซส	ดี-กลูโคส กาแลกโทส และซอร์โบส
ไดแซคคาไรด์	เซลโลไบโอส แลกโทส มอลโทส เมลลิไบโอส ซูโครส และทรีฮาโลส
ไตรแซคคาไรด์	เมลลิซิโทส และราฟฟิโนส
โพลีแซคคาไรด์	อินูลิน และแป้ง
เพนโทส	ดี-อะราบิโนส แอล-อะราบิโนส ดี-ไรโบส แอล-แรมโนส และดี-ไซโลส
แอลกอฮอล์	กาแลกทิทอล อิริทริทอล ดี-กลูซิทอล อินอซิทอล

	ดี-แมนนิทอล กลีเซอรอล ไรบิทอล เอทานอล และเมทานอล
กรดอินทรีย์	กรดซิตริก กรดแลคติก กรดซัคซินิก กรดดี-กลูโคโรนิก กรดกาแลกตุโรนิก และกรดดี-กลูโคนิก
ไกลโคไซด์	แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์ และซาลิซิน
สารประกอบอื่น	เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต และ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต

สำหรับวิธีการที่ใช้ทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลว ทำโดยเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย โดยใช้ลูปถ่ายเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ลงไปในน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นเป็นแถบสีดำพร่า (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่ออ่านผลการเจริญ) จากนั้นเพาะเชื้อ โดยใช้พาสเจอร์ปีเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน จำนวน 1 หยด ในการทดสอบใช้อาหารที่ไม่เติมสารประกอบคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (negative control) และใช้อาหารที่เติมกลูโคสเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก (positive control) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ โดยตรวจวัดระดับการเจริญซึ่งทำโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย ทาบหลอดลงด้านหน้าเส้น มองผ่านหลอดเฉียงเชื้อแล้วสังเกตเส้นสีดำ ดังนี้ +++ คือ การเจริญของเชื้อที่มีความขุ่นซึ่งจะลบเส้นสีดำอย่างสมบูรณ์, ++ เห็นเส้นพร่า, + เห็นเส้นแต่ขอบเห็นไม่ชัด และ - คือ เห็นเส้นและขอบชัดเจน จากนั้นทำการรายงานผลดังรายละเอียดต่อไปนี้

- + = การเจริญเป็นบวก (positive) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ในสัปดาห์ที่ 1 หรือสัปดาห์ที่ 2
- 1 = การเจริญเป็นบวกล่าช้า (delayed positive, latent) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ อย่างรวดเร็ว แต่หลังจาก 2 สัปดาห์ หรือ นานกว่า

s	=	การเจริญเป็นบวกช้า (slow positive) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ช้าๆ ในระยะเวลาที่นานกว่า 2 สัปดาห์
w	=	การเจริญเป็นบวกอ่อน (weak positive) คืออ่านผลเป็น +
-	=	ไม่มีการเจริญ อ่านผลเป็นลบ
(+)	=	นานๆ ครั้งที่ผลเป็นบวก (seldom positive)
v	=	ผันแปร (variable) คือบางสายพันธุ์เป็นบวก และบางสายพันธุ์เป็นลบ
+/w	=	บวก หรือ บวกอ่อน คือทุกสายพันธุ์เจริญแต่บางสายพันธุ์เจริญน้อย
w/-	=	บวกอ่อน หรือ ลบ

### 5.2.2 การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

วิธีทดสอบทำโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบการหมักน้ำตาล (fermentation basal medium) (ภาคผนวก) ใส่ลงในหลอดทดสอบซึ่งภายในบรรจุหลอดดักแก๊ส (Durham tube) หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย โดยใช้ลูปถ่ายเชื้ออายุ 24-48 ลงไปในน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยการใช้กระดาศขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นเป็นแถบสีดำพราว (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่ออ่านผลการเจริญ) เพาะยีสต์โดยใช้พาสเจอร์ปีเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบที่มีสารละลายน้ำตาล

ชนิดต่าง ๆ จำนวน 1 หยด บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการหมักโดยสังเกตปริมาณแก๊สที่สะสมในหลอดดักแก๊ส และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทุกวันจนครบ 7 วัน จากนั้นตรวจสอบทุกสัปดาห์จนครบ 28 วัน ผลการหมักรายงานโดยอาศัยเวลาที่ใช้ในการสร้างแก๊สให้เต็มหลอดดักแก๊ส และปริมาณแก๊สที่สะสมไว้ในหลอดดักแก๊ส ดังนี้

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

### 5.2.3 การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนในอาหารแข็งทำโดยเฉพาะยีสต์บนอาหาร YM agar เพื่อเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจำนวนน้อยๆ ลงในอาหาร Yeast Carbon Base (YCB) broth (ภาคผนวก) บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้ยีสต์ใช้ในโตรเจนที่สะสมไว้ในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นใช้ฟาสเจอร์รี่เปิดหอคเซลล์ยีสต์แขวนลอย

1 หยด ลงบนจานอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในการทดสอบใช้อาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ และอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเจริญของยีสต์ทุก 2-4 วัน จนครบ 28 วัน

#### 5.2.4 การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) ภายนอกเซลล์

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

#### 5.2.5 การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน

ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินตามวิธีของ Komagata และ Nakase (1967) โดยเฉพาะยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆ ลงในอาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium) (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อให้ยีสต์ใช้วิตามินที่สะสมภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆ ลงในอาหารที่ปราศจากวิตามินหลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ตรวจสอบผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสังเกตการเจริญของเชื้อและรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

#### 5.2.6 การสร้างกรดจากกลูโคส

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

### 5.2.7 ความต้านทานไซโคลเฮกซีไมด์

ทดสอบความต้านทานไซโคลเฮกซีไมด์ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีแบคโต-ยีสต์ในโตรเจนเบส และ ดี-กลูโคส ที่มีการเติมไซโคลเฮกซีไมด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ส่วนต่อล้านส่วน และ 1000 ส่วนต่อล้านส่วน (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ตรวจสอบผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสังเกตการเจริญของยีสต์และรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

### 5.2.8 การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

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

### 5.2.9 การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ทดสอบการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหาร YM broth และบ่มในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 20, 25, 37, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ตรวจสอบผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสังเกตการเจริญของยีสต์และรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

### 5.2.10 การไฮโดรไลซ์ยูเรีย

ทดสอบการไฮโดรไลซ์ยูเรียตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนอาหาร Christensen's urea agar (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน

21 วัน ถ้ามีการไฮโดรไลซ์ยูเรียที่เพิ่มขึ้นจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นสีชมพูแดง ในการทดสอบใช้ยีสต์ในสกุล *Rhodotorula* เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก

### 5.2.11 การทำปฏิกิริยากับสีโคอะโซเนียมบลูปี

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

## 5.3 ลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานเคมี

การวิเคราะห์สารประกอบยูบิควิโนนทำตามวิธีของ Nakase และ Suzuki (1986b) โดยเพาะยีสต์ในอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) broth (ภาคผนวก) 400 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 16-30 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำเซลล์ไประเหิดแห้ง (freeze dried) นาน 4-5 วัน จากนั้นนำเซลล์มาบด และเติมคลอโรฟอร์ม/เมทานอล (อัตราส่วน 2 ต่อ 1) 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน กรองสารละลายผ่านแผ่นเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน และนำมาระเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง ละลายยูบิควิโนนด้วยอะซิโตน 0.5 มิลลิลิตร และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Thin layer chromatography (TLC) บนแผ่นซิลิกาเจล (F254TLC Merck, Germany) และใช้เฮกเซนกับไดเอทิลอีเทอร์ (อัตราส่วน 85 ต่อ 15) เป็น mobile phase ส่องแถบของยูบิควิโนนที่อยู่บนแผ่น TLC ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จุดแถบของยูบิควิโนนที่ปรากฏบนแผ่น TLC ไล่หลอด และเติมอะซิโตน 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน กรองสารละลายผ่านแผ่นเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน และเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อให้ยูบิควิโนนเข้มข้นขึ้น วิเคราะห์ชนิดของยูบิควิโนนด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Waters, USA) โดยใช้คอลัมน์ Cosmosil 5C18 (Nacalai tesque, Japan) และใช้เมทานอลผสมกับไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 2 ต่อ 1) เป็น mobile phase ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์

ผลที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร จำแนกชนิดของยูบิควิโนนที่วิเคราะห์โดยเทียบกับยูบิควิโนน  
มาตรฐาน

## ผลและวิจารณ์

### 1. การรวบรวมและการแยกยีสต์จากน้ำในป่าชายเลน

ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง ซึ่งอยู่ประมาณเส้นรุ้งที่  $9^{\circ} 13'$  ถึง  $9^{\circ} 32'$  เหนือ เส้นแวงที่  $98^{\circ} 16'$  ถึง  $98^{\circ} 27'$  ตะวันออก โดยเก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมด 5 จุด (ตารางที่ 6) โดยจุดที่ 1 เป็นบริเวณน้ำจืด จุดที่ 2, 3, 4 และ 5 เป็นบริเวณน้ำกร่อยที่ได้รับอิทธิพลจากการขึ้นและลงของน้ำทะเล ทำให้ความเค็มของน้ำในแต่ละบริเวณแตกต่างกันออกไป

ตารางที่ 6 ตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จุดเก็บ	ตำแหน่งที่เก็บ	พิกัด
1	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ $9^{\circ} 22' 14.9''$ เหนือ เส้นแวงที่ $98^{\circ} 24' 38.2''$ ตะวันออก
2	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ $9^{\circ} 21' 48.8''$ เหนือ เส้นแวงที่ $98^{\circ} 24' 19.6''$ ตะวันออก
3	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ $9^{\circ} 21' 53.6''$ เหนือ เส้นแวงที่ $98^{\circ} 24' 26.7''$ ตะวันออก
4	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ $9^{\circ} 22' 50.1''$ เหนือ เส้นแวงที่ $98^{\circ} 24' 08.1''$ ตะวันออก
5	น้ำบน น้ำล่าง	เส้นรุ้งที่ $9^{\circ} 22' 12.6''$ เหนือ เส้นแวงที่ $98^{\circ} 23' 59.9''$ ตะวันออก

หมายเหตุ น้ำบน = ตัวอย่างน้ำที่เก็บบริเวณใต้ผิวน้ำเล็กน้อย

น้ำล่าง = ตัวอย่างน้ำที่เก็บที่ระดับความลึกจากผิวน้ำลงไป 1 เมตร

การรวบรวมและการแยกยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ

1.1 ยีสต์จำนวน 88 สายพันธุ์ ประกอบด้วยยีสต์รหัส RV จำนวน 56 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 (ตารางที่ 7) โดยมีลักษณะของตัวอย่างน้ำดังนี้ อุณหภูมิ 20.1-29.6 องศาเซลเซียส พีเอช 6.6-8.2 ความเค็ม 0-30 ส่วนในพันส่วน และมียีสต์จำนวน 22-230 เซลล์ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ยีสต์รหัส R1 จำนวน 32 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 (ตารางที่ 7) และมีลักษณะของตัวอย่างน้ำดังนี้ อุณหภูมิ 27.5-29.7 องศาเซลเซียส พีเอช 7.7-8.2 ความเค็ม 34 ส่วนในพันส่วน และมียีสต์จำนวน 20-125 เซลล์ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยทั้งหมดเก็บรักษาอยู่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดย รศ. ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง

1.2 ในปี พ.ศ. 2549 ขณะที่ทำวิทยานิพนธ์นี้ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากจุดเก็บตัวอย่าง 5 จุด เช่นเดียวกับที่ใช้สำหรับแยกยีสต์รหัส RV และ R1 พบว่ามีลักษณะของตัวอย่างน้ำดังนี้ อุณหภูมิ 27.3-29.3 องศาเซลเซียส พีเอช 6.9-7.5 ความเค็ม 0-21 ส่วนในพันส่วน และมียีสต์จำนวน 76-202 เซลล์ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 8) โดยแยกยีสต์ได้ 61 สายพันธุ์ จากตัวอย่างน้ำในจุดต่างๆ

ตารางที่ 7 ยีสต์รหัส RV และ R1 ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รหัส	ตัวอย่างน้ำ	
	จุดที่เก็บ/ตำแหน่ง	วัน เดือน ปี ที่เก็บ
RV1, RV2, RV3, RV4, RV5, RV6, RV7	1/บน	13 ธ.ค. 41
RV9, RV10	2/บน	13 ธ.ค. 41
RV11	3/บน	13 ธ.ค. 41
RV19	5/บน	13 ธ.ค. 41
RV22, RV24, RV25	1/ล่าง	13 ธ.ค. 41
RV28	2/ล่าง	13 ธ.ค. 41
RV29, RV31	3/ล่าง	13 ธ.ค. 41
RV17	4/ล่าง	13 ธ.ค. 41
RV35	4/ล่าง	13 ธ.ค. 41

## ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัส	ตัวอย่างน้ำ	
	จุดที่เก็บ/ตำแหน่ง	วัน เดือน ปี ที่เก็บ
RV39, RV40, RV42	5/ล่าง	13 ธ.ค. 41
RV57, RV59	1/บน	26 เม.ย. 42
RV60, RV61, RV62, RV63	2/บน	26 เม.ย. 42
RV64	3/บน	26 เม.ย. 42
RV74	5/บน	26 เม.ย. 42
RV85, RV86	3/ล่าง	26 เม.ย. 42
RV87, RV88, RV89, RV90, RV91, RV93, RV94	4/ล่าง	26 เม.ย. 42
RV96	5/ล่าง	26 เม.ย. 42
RV132	1/บน	29 ก.ค. 42
RV134, RV137	1/ล่าง	29 ก.ค. 42
RV138, RV140	2/บน	29 ก.ค. 42
RV144, RV145, RV147	3/บน	29 ก.ค. 42
RV148, RV149	3/ล่าง	29 ก.ค. 42
RV152, RV153	4/บน	29 ก.ค. 42
RV155	4/ล่าง	29 ก.ค. 42
RV158	5/บน	29 ก.ค. 42
RV162, RV165	5/ล่าง	29 ก.ค. 42
R1-1, R1-2, R1-3, R1-4, R1-5, R1-6, R1-21	1/ล่าง	29 ม.ค. 48
R1-7, R1-8, R1-9, R1-10, R1-11, R1-20, R1-22	1/บน	29 ม.ค. 48
R1-12, R1-13, R1-14, R1-15, R1-16, R1-17, R1-18, R1-19, R1-23, R1-25, R1-26, R1-27, R1-29, R1-30, R1-31, R1-32, R1-33, R1-34	2/ล่าง	29 ม.ค. 48

ตารางที่ 8 การเก็บตัวอย่างน้ำ ลักษณะของตัวอย่าง จำนวนยีสต์ และยีสต์ที่แยกได้

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

ดังนั้นในการศึกษานี้มียีสต์ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 149 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ยีสต์รหัส RV 56 สายพันธุ์ ยีสต์รหัส R1 32 สายพันธุ์ และยีสต์รหัส RS 61 สายพันธุ์

## 2. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

จากการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้ BLASTN homology search program (Altschul *et al.*, 1997) โดยมีเกณฑ์ว่าถ้า 2 สายพันธุ์มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (คือมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์) สายพันธุ์ทั้งสองนั้นเป็นคนละสปีชีส์ และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก (Kurtzman and Robnett, 1998) ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั้ง 3 กลุ่ม มีดังนี้

### 2.1 การจัดจำแนกยีสต์รหัส RV

ผลการจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จำนวน 56 สายพันธุ์ สามารถจัดจำแนกยีสต์เป็น 3 กลุ่ม คือ

2.1.1 สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว (described species) หรือ สปีชีส์ที่รู้จักแล้ว (known species) เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA จำนวน 42 สายพันธุ์ คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วส่วนใหญ่เป็นแอสโคไมซีตยีสต์จัดจำแนกได้ 7 สกุล 17 สปีชีส์ (ตารางที่ 9) ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae 6 สกุล 9 สปีชีส์ คือ *Debaryomyces nepalensis*, *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia siamensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica*, *Pichia sporocuriosa*, *Torulasporea maleae* และ *Williopsis saturnus* และวงศ์ Candidaceae ซึ่งเป็นระยะที่มีเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 1 สกุล 8 สปีชีส์ คือ *Candida berthetii*, *Candida boidinii*, *Candida glabrata*, *Candida pseudolambica*, *Candida rugosa*, *Candida silvae*, *Candida thaimueangensis* และ *Candida tropicalis* ส่วนแบคทีเรียโอมัยซีตยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วจัดจำแนกเป็น 2 สกุล 4 สปีชีส์ (ตารางที่ 9) ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Hymenomycetes 1 สกุล 3 สปีชีส์ คือ *Trichosporon asahii*, *Trichosporon coremiiforme* และ *Trichosporon japonicum* และชั้น Urediniomycetes 1 สกุล

1 สปีชีส์ คือ *Rhodotorula mucilaginosa* สำหรับรายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่  
เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 9 ยีสต์รหัส RV ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

Species	Strain	No. of strain
<b><u>Ascomycetous yeast</u></b>		
<b><i>Candida</i></b>		
<i>Candida berthetii</i>	RV22, RV62	2
<i>Candida boidinii</i>	RV11	1
<i>Candida glabrata</i>	RV144	1
<i>Candida pseudolambica</i>	RV63, RV134, RV149	3
<i>Candida rugosa</i>	RV2, RV147	2
<i>Candida silvae</i>	RV7	1
<i>Candida thaimueangensis</i>	RV88, RV90, RV158	3
<i>Candida tropicalis</i>	RV132, RV138	2
<b><i>Debaryomyces</i></b>		
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	RV61	1
<b><i>Issatchenkia</i></b>		
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	RV28, RV74, RV91	3
<i>Issatchenkia orientalis</i>	RV31, RV85, RV145	3
<i>Issatchenkia siamensis</i>	RV10, RV6, RV25, RV4, RV40	5
<b><i>Kodamaea</i></b>		
<i>Kodamaea ohmeri</i>	RV29	1
<b><i>Pichia</i></b>		
<i>Pichia caribbica</i>	RV148, RV155	2
<i>Pichia sporocuriosa</i>	RV137	1
<b><i>Torulasporea</i></b>		
<i>Torulasporea maleeae</i>	RV17, RV19	2
<b><i>Williopsis</i></b>		
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i>	RV39, RV64, RV86	3
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>	RV93	1

รวม 7 สกุล 17 สปีชีส์ 37 สายพันธุ์

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Species	Strain	No. of strain
<b><u>Basidiomycetous yeast</u></b>		
<b><i>Rhodotorula</i></b>		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	RV162, RV165	2
<b><i>Trichosporon</i></b>		
<i>Trichosporon asahii</i>	RV24	1
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	RV1	1
<i>Trichosporon japonicum</i>	RV59	1
รวม 2 สกุล 4 สปีชีส์ 5 สายพันธุ์		

ตารางที่ 10 การจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัย  
ทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
<b>Ascomycetous yeast</b>							
RV22	<i>Candida berthetii</i> CBS 5452 (U62298)	474/476	99.6	1	0.2	1	<i>Candida berthetii</i>
RV62	<i>Candida berthetii</i> CBS 5452 (U62298)	570/577	98.8	2	0.4	5	<i>Candida berthetii</i>
RV11	<i>Candida boidinii</i> NRRL Y-2332 (EU011598)	562/564	99.6	1	0.2	1	<i>Candida boidinii</i>
RV144	<i>Candida glabrata</i> CBS 138 (U44808)	579/581	99.7	2	0.3	0	<i>Candida glabrata</i>
RV63	<i>Candida pseudolambica</i> CBS 2063 (U71063)	550/552	99.6	2	0.4	0	<i>Candida pseudolambica</i>
RV134	<i>Candida pseudolambica</i> CBS 2063 (U71063)	557/559	99.6	2	0.4	0	<i>Candida pseudolambica</i>
RV149	<i>Candida pseudolambica</i> CBS 2063 (U71063)	557/559	99.6	2	0.4	0	<i>Candida pseudolambica</i>
RV2	<i>Candida rugosa</i> CBS 613 (U45727)	483/485	99.6	1	0.2	1	<i>Candida rugosa</i>
RV147	<i>Candida rugosa</i> CBS 613 (U45727)	483/485	99.6	1	0.2	1	<i>Candida rugosa</i>
RV7	<i>Candida silvae</i> CBS 5498 (U71065)	541/541	100	0	0	0	<i>Candida silvae</i>
RV88	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	559/559	100	0	0	0	<i>Candida thaimueangensis</i>
RV90	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	559/559	100	0	0	0	<i>Candida thaimueangensis</i>

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RV158	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	559/559	100	0	0	0	<i>Candida thaimueangensis</i>
RV132	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	532/532	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
RV138	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	569/570	99.8	0	0	1	<i>Candida tropicalis</i>
RV61	<i>Debaryomyces nepalensis</i> CBS 5921 (U45839)	502/502	100	0	0	0	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
RV28	<i>Issatchenkia occidentalis</i> CBS 5459 (U76348)	559/559	100	0	0	0	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
RV74	<i>Issatchenkia occidentalis</i> CBS 5459 (U76348)	559/559	100	0	0	0	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
RV91	<i>Issatchenkia occidentalis</i> CBS 5459 (U76348)	494/494	100	0	0	0	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
RV31	<i>Issatchenkia orientalis</i> NRRL Y-5396 (EF550222)	582/582	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RV85	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RV145	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RV4	<i>Issatchenkia siamensis</i> (AB247501)	555/555	100	0	0	0	<i>Issatchenkia siamensis</i>
RV6	<i>Issatchenkia siamensis</i> (AB247501)	555/555	100	0	0	0	<i>Issatchenkia siamensis</i>
RV10	<i>Issatchenkia siamensis</i> (AB247501)	555/555	100	0	0	0	<i>Issatchenkia siamensis</i>
RV25	<i>Issatchenkia siamensis</i> (AB247501)	555/562	98.8	0	0	7	<i>Issatchenkia siamensis</i>
RV40	<i>Issatchenkia siamensis</i> (AB247501)	504/504	100	0	0	0	<i>Issatchenkia siamensis</i>

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RV29	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	512/512	100	0	0	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>
RV148	<i>Pichia caribbica</i> ACE11 (EF063131)	580/580	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
RV155	<i>Pichia caribbica</i> NRRL Y-27274 (EU348786)	540/540	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
RV137	<i>Pichia sporocuriosa</i> NRRL Y-27347 (EF550232)	574/578	99.3	4	0.7	0	<i>Pichia sporocuriosa</i>
RV17	<i>Torulaspora maleeae</i> IFO 11061 (AB087395)	572/573	99.8	1	0.1	0	<i>Torulaspora maleeae</i>
RV19	<i>Torulaspora maleeae</i> IFO 11061 (AB087395)	572/573	99.8	1	0.1	0	<i>Torulaspora maleeae</i>
RV39	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i> CBS 1707 (U94929)	574/574	100	0	0	0	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i>
RV64	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i> CBS 1707 (U94929)	530/530	100	0	0	0	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i>
RV86	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i> CBS 1707 (U94929)	547/552	99.1	2	0.3	3	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i>
RV93	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i> CBS 5673 (U75960)	573/574	99.8	1	0.1	0	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
<b>Basidiomycetous yeast</b>							
RV162	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 8383 (AF189959)	574/574	100	0	0	0	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
RV165	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 8383 (AF189959)	574/574	100	0	0	0	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
RV24	<i>Trichosporon asahii</i> CBS 7137 (AF189882)	598/599	99.8	1	0.1	0	<i>Trichosporon asahii</i>
RV1	<i>Trichosporon coremiiforme</i> CBS 2478 (AF189863)	585/585	100	0	0	0	<i>Trichosporon coremiiforme</i>
RV59	<i>Trichosporon japonicum</i> CBS 8641 (AF308657)	573/573	100	0	0	0	<i>Trichosporon japonicum</i>

2.1.2 สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย (non-described species) จำนวน 4 สายพันธุ์ คิดเป็น 7.1 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายจัดจำแนกได้เป็น 2 สกุล 2 สปีชีส์ (ตารางที่ 11) ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ Saccharomycodaceae 1 สปีชีส์ ที่เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. ST-464 จำนวน 2 สายพันธุ์ และอยู่ในวงศ์ Candidaceae 1 สปีชีส์ ที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 จำนวน 2 สายพันธุ์ รายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แสดงในตารางที่ 12

**ตารางที่ 11** ยีสต์รหัส RV ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

Species	Strain	No. of strain
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127	RV9, RV57	2
<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-464	RV3, RV87	2

**ตารางที่ 12** การจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัย  
ทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RV9	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127 (EF550293)	575/575	100	0	0	0	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127
RV57	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127 (EF550293)	573/573	100	0	0	0	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127
RV3	<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-464 (DQ404527)	591/591	100	0	0	0	<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-464
RV87	<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-464 (DQ404527)	590/591	99.8	1	0.2	0	<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-464

2.1.3 สปีชีส์ใหม่ (new species) เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (closest species) ตามเกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) จำนวน 10 สายพันธุ์ คิดเป็น 17.9 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยยีสต์สปีชีส์ใหม่จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae สกุล *Kluyveromyces* 1 สปีชีส์ ที่ใกล้เคียงกับ *Kluyveromyces aestuarii* และสกุล *Pichia* 1 สปีชีส์ที่ใกล้เคียงกับ *Pichia fluxuum* และอยู่ในวงศ์ Candidaceae สกุล *Candida* 2 สปีชีส์ ที่ใกล้เคียงกับ *Candida berthetii* และ *Candida silvae* (ตารางที่ 13) สำหรับรายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่เป็นสปีชีส์ใหม่แสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 13 ยีสต์รหัส RV ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่

Species	Closest species	Strain	No. of strain
<i>Candida</i> sp. 1	<i>Candida berthetii</i>	RV5, RV140	2
<i>Candida</i> sp. 2	<i>Candida silvae</i>	RV35, RV96, RV152	3
<i>Kluyveromyces</i> sp. 1	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	RV42, RV89, RV94, RV153	4
<i>Pichia</i> sp. 1	<i>Pichia fluxuum</i>	RV60	1
<b>รวม 3 สกุล 4 สปีชีส์ 10 สายพันธุ์</b>			

ตารางที่ 14 การจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่ง  
ระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RV5	<i>Candida berthetii</i> CBS 5452 (U62298)	563/573	98.3	6	1.1	4	New species
RV140	<i>Candida berthetii</i> CBS 5452 (U62298)	499/510	97.8	6	1.2	5	New species
RV35	<i>Candida silvae</i> NRRL Y-6725 (EF550215)	399/445	89.7	42	9.5	4	New species
RV96	<i>Candida silvae</i> NRRL Y-6725 (EF550215)	451/525	85.9	63	12.0	11	New species
RV152	<i>Candida silvae</i> NRRL Y-6725 (EF550215)	476/550	86.5	63	11.5	11	New species
RV42	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RV89	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RV94	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RV153	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	536/544	98.5	7	1.3	1	New species
RV60	<i>Pichia fluxuum</i> CBS 2287 (U75719)	367/493	93.2	43	8.7	83	New species

## 2.2 การจัดจำแนกยีสต์รหัส R1

ผลการจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จำนวน 32 สายพันธุ์ จัดจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

2.2.1 สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA จำนวน 23 สายพันธุ์ คิดเป็น 71.9 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วส่วนใหญ่เป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์ จัดจำแนกได้เป็น 2 สกุล 6 สปีชีส์ (ตารางที่ 15) ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales แบ่งเป็นอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae 1 สปีชีส์ คือ *Kodamaea ohmeri* และวงศ์ Candidaceae ซึ่งเป็นระยะที่มีเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 1 สกุล 5 สปีชีส์ คือ *Candida phangngensis*, *Candida pinguabensis*, *Candida rugosa*, *Candida thaimueangensis* และ *Candida tropicalis* ส่วนแบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วจัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Hymenomycetes 1 สปีชีส์ คือ *Trichosporon asahii* (ตารางที่ 15) สำหรับรายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 15 ยีสต์รหัส R1 ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

Species	Strain	No. of strain
<b><u>Ascomycetous yeast</u></b>		
<b><i>Candida</i></b>		
<i>Candida phangngensis</i>	R1-34	1
<i>Candida picinguabensis</i>	R1-7, R1-9, R1-10	3
<i>Candida rugosa</i>	R1-5, R1-21	2
<i>Candida thaimueangensis</i>	R1-3, R1-8, R1-11, R1-15, R1-16, R1-26, R1-29, R1-30, R1-33	9
<i>Candida tropicalis</i>	R1-6, R1-12, R1-13, R1-19, R1-20, R1-23	6
<b><i>Kodamaea</i></b>		
<i>Kodamaea ohmeri</i>	R1-25	1
รวม 2 สกุล 6 สปีชีส์ 22 สายพันธุ์		
<b><u>Basidiomycetous yeast</u></b>		
<b><i>Trichosporon</i></b>		
<i>Trichosporon asahii</i>	R1-18	1
รวม 1 สกุล 1 สปีชีส์ 1 สายพันธุ์		

ตารางที่ 16 การจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
<b>Ascomycetous yeast</b>							
R1-34	<i>Candida phangngensis</i> PT1-17 (AB304772)	498/498	100	0	0	0	<i>Candida phangngensis</i>
R1-7	<i>Candida picinguabensis</i> UNESP 00-89 (AY566407)	439/439	100	0	0	0	<i>Candida picinguabensis</i>
R1-9	<i>Candida picinguabensis</i> UNESP 00-89 (AY566407)	488/488	100	0	0	0	<i>Candida picinguabensis</i>
R1-10	<i>Candida picinguabensis</i> UNESP 00-89 (AY566407)	488/488	100	0	0	0	<i>Candida picinguabensis</i>
R1-5	<i>Candida rugosa</i> CBS 613 (U45727)	479/484	99	2	0.4	3	<i>Candida rugosa</i>
R1-21	<i>Candida rugosa</i> CBS 613 (U45727)	483/487	99.1	1	0.2	3	<i>Candida rugosa</i>
R1-3	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	559/559	100	0	0	0	<i>Candida thaimueangensis</i>
R1-8	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	557/566	100	0	0	9	<i>Candida thaimueangensis</i>
R1-11	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	558/559	99.8	1	0.2	0	<i>Candida thaimueangensis</i>
R1-15	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	559/559	100	0	0	0	<i>Candida thaimueangensis</i>
R1-16	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	559/559	100	0	0	0	<i>Candida thaimueangensis</i>
R1-26	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	559/559	100	0	0	0	<i>Candida thaimueangensis</i>
R1-29	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	557/560	99.5	2	0.4	1	<i>Candida thaimueangensis</i>

ตารางที่ 16 (ต่อ)

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
R1-30	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	557/560	99.5	2	0.4	1	<i>Candida thaimueangensis</i>
R1-33	<i>Candida thaimueangensis</i> TM1-01 (AB264009)	559/559	100	0	0	0	<i>Candida thaimueangensis</i>
R1-6	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
R1-12	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	568/568	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
R1-13	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
R1-19	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
R1-20	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
R1-23	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
R1-25	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	512/512	100	0	0	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>
<b>Basidiomycetous yeast</b>							
R1-18	<i>Trichosporon asahii</i> CBS 7137 (AF189882)	599/599	100	0	0	0	<i>Trichosporon asahii</i>

2.2.2 สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย จำนวน 3 สายพันธุ์ คิดเป็น 9.4 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายจัดจำแนกได้เป็น 2 สกุล 2 สปีชีส์ (ตารางที่ 17) ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ Saccharomycodaceae 1 สปีชีส์ ที่เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. CS-2008b และวงศ์ Candidaceae 1 สปีชีส์ ที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 รายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายแสดงในตารางที่ 18

**ตารางที่ 17** ยีสต์รหัส R1 ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

Species	Strain	No. of strain
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127	R1-4	1
<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b	R1-1, R1-22	2

**ตารางที่ 18** การจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
R1-4	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127 (EF550293)	594/594	100	0	0	0	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127
R1-1	<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b (EU285515)	586/591	99.2	5	0.8	0	<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b
R1-22	<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b (EU285515)	587/591	99.3	4	0.7	0	<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b

2.2.3 สปีชีส์ใหม่ เนื่องจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด ตามเกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) จำนวน 6 สายพันธุ์ คิดเป็น 18.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยยีสต์สปีชีส์ใหม่จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ Candidaceae สกุล *Candida* 2 สปีชีส์ ที่ใกล้เคียงกับ *Candida conglobata* และ *Candida silvae* (ตารางที่ 19) รายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่เป็นสปีชีส์ใหม่แสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 19 ยีสต์รหัส R1 ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่

Species	Closest species	Strain	No. of strain
<i>Candida</i> sp. 1	<i>Candida conglobata</i>	R1-27, R1-31, R1-32	3
<i>Candida</i> sp. 2	<i>Candida silvae</i>	R1-2, R1-14, R1-17	3

**ตารางที่ 20** การจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
R1-27	<i>Candida globata</i> CBS 2018 (U45789)	525/530	99	5	0.9	0	New species
R1-31	<i>Candida globata</i> CBS 2018 (U45789)	525/530	99	5	0.9	0	New species
R1-32	<i>Candida globata</i> CBS 2018 (U45789)	525/530	99	5	0.9	0	New species
R1-2	<i>Candida silvae</i> NRRL Y-6725 (EF550215)	484/565	85.7	66	11.7	15	New species
R1-14	<i>Candida silvae</i> NRRL Y-6725 (EF550215)	486/562	86.5	64	11.4	12	New species
R1-17	<i>Candida silvae</i> NRRL Y-6725 (EF550215)	484/559	86.6	64	11.4	11	New species

## 2.3 การจัดจำแนกยีสต์รหัส RS

ผลการจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จำนวน 61 สายพันธุ์ จัดจำแนกได้ 3 กลุ่ม คือ

2.3.1 สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA จำนวน 34 สายพันธุ์ คิดเป็น 53.7 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วจัดจำแนกได้เป็น 6 สกุล 14 สปีชีส์ (ตารางที่ 21) ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae 4 สกุล 9 สปีชีส์ คือ *Debaryomyces nepalensis*, *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia siamensis*, *Issatchenkia terricola*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia burtonii*, *Pichia galeiformis* และ *Pichia kluyveri* อยู่ในวงศ์ Dipodascaceae 1 สปีชีส์ คือ *Galactomyces geotrichum* และวงศ์ Candidaceae 1 สกุล 4 สปีชีส์ คือ *Candida butyri*, *Candida parapsilosis*, *Candida silvae* และ *Candida tropicalis* รายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 21 ยีสต์รหัส RS ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

Species	Strain	No. of strain
<b><u>Ascomycetous yeast</u></b>		
<b><i>Candida</i></b>		
<i>Candida butyri</i>	RS55	1
<i>Candida parapsilosis</i>	RS32	1
<i>Candida silvae</i>	RS1, RS57	2
<i>Candida tropicalis</i>	RS13, RS22, RS31, RS60, RS64	5
<b><i>Debaryomyces</i></b>		
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	RS11	1
<b><i>Galactomyces</i></b>		
<i>Galactomyces geotrichum</i>	RS74	1
<b><i>Issatchenkia</i></b>		
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	RS5, RS26, RS29	3
<i>Issatchenkia orientalis</i>	RS6, RS34, RS35, RS39, RS52, RS56, RS61, RS66	8
<i>Issatchenkia siamensis</i>	RS12	1
<i>Issatchenkia terricola</i>	RS30	1
<b><i>Kodamaea</i></b>		
<i>Kodamaea ohmeri</i>	RS25, RS43, RS48, RS49	4
<b><i>Pichia</i></b>		
<i>Pichia burtonii</i>	RS36	1
<i>Pichia galeiformis</i>	RS3	1
<i>Pichia kluyveri</i>	RS19, RS21, RS47, RS75	4
<b>รวม 6 สกุล 14 สปีชีส์ 34 สายพันธุ์</b>		

**ตารางที่ 22** การจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
<b>Ascomycetous yeast</b>							
RS55	<i>Candida butyri</i> CBS 6421 (U45780)	531/531	100	0	0	0	<i>Candida butyri</i>
RS32	<i>Candida parapsilosis</i> CBS 2617 (U45754)	565/570	99.1	5	0.9	0	<i>Candida parapsilosis</i>
RS1	<i>Candida silvae</i> CBS 5498 (U71065)	541/541	100	0	0	0	<i>Candida silvae</i>
RS57	<i>Candida silvae</i> CBS 5498 (U71065)	541/541	100	0	0	0	<i>Candida silvae</i>
RS13	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
RS22	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	498/498	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
RS31	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
RS60	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
RS64	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
RS11	<i>Debaryomyces nepalensis</i> CBS 5921 (U45839)	570/570	100	0	0	0	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
RS74	<i>Galactomyces geotrichum</i> GSXR (EF564398)	520/520	100	0	0	0	<i>Galactomyces geotrichum</i>
RS5	<i>Issatchenkia occidentalis</i> CBS 5459 (U76348)	559/559	100	0	0	0	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
RS26	<i>Issatchenkia occidentalis</i> CBS 5459 (U76348)	559/559	100	0	0	0	<i>Issatchenkia occidentalis</i>

ตารางที่ 22 (ต่อ)

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RS29	<i>Issatchenkia occidentalis</i> CBS 5459 (U76348)	559/559	100	0	0	0	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
RS6	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RS34	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RS35	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RS39	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RS52	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RS56	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RS61	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	562/562	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RS66	<i>Issatchenkia orientalis</i> CBS 5147 (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
RS12	<i>Issatchenkia siamensis</i> ( AB247501)	555/555	100	0	0	0	<i>Issatchenkia siamensis</i>
RS30	<i>Issatchenkia terricola</i> CBS 2617 (U76345)	552/554	99.6	2	0.4	0	<i>Issatchenkia terricola</i>
RS25	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	512/513	99.8	0	0	1	<i>Kodamaea ohmeri</i>
RS43	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	512/512	100	0	0	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>
RS48	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	512/512	100	0	0	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>
RS49	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	512/512	100	0	0	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>

ตารางที่ 22 (ต่อ)

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RS36	<i>Pichia burtonii</i> CBS 2352 (U45712)	524/524	100	0	0	0	<i>Pichia burtonii</i>
RS3	<i>Pichia galeiformis</i> CBS 7324 (U75738)	495/495	100	0	0	0	<i>Pichia galeiformis</i>
RS19	<i>Pichia kluyveri</i> CBS 188 (U75727)	567/568	99.8	1	0.2	0	<i>Pichia kluyveri</i>
RS21	<i>Pichia kluyveri</i> CBS 188 (U75727)	567/568	99.8	1	0.2	0	<i>Pichia kluyveri</i>
RS47	<i>Pichia kluyveri</i> CBS 188 (U75727)	567/568	99.8	1	0.2	0	<i>Pichia kluyveri</i>
RS75	<i>Pichia kluyveri</i> CBS 188 (U75727)	539/542	99.5	2	0.4	1	<i>Pichia kluyveri</i>

2.3.2 สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย จำนวน 9 สายพันธุ์ คิดเป็น 14.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายจัดจำแนกเป็น 2 สกุล 4 สปีชีส์ (ตารางที่ 23) ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales แบ่งเป็นอยู่ในวงศ์ Saccharomycodaceae 1 สกุล 3 สปีชีส์ ที่เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. CS-2008b, *Hanseniaspora* sp. ST-250 และ *Hanseniaspora* sp. YS DN19 และวงศ์ Candidaceae 1 สปีชีส์ ที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27665 รายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายแสดงในตารางที่ 24

**ตารางที่ 23** ยีสต์รหัส RS ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

Species	Strain	No. of strain
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27665	RS16	1
<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b	RS18	1
<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-250	RS71	1
<i>Hanseniaspora</i> sp. YS DN19	RS7, RS10, RS24, RS41, RS50, RS62	6

ตารางที่ 24 การจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

2.3.3 สปีชีส์ใหม่ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดตามเกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) จำนวน 18 สายพันธุ์ คิดเป็น 29.5 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ทำการศึกษา โดยยีสต์ สปีชีส์ใหม่จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae ที่ใกล้เคียงกับ *Kluyveromyces aestuarii* และอยู่ในวงศ์ Candidaceae ที่ใกล้เคียงกับ *Candida silvae*, *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 และ *Candida* sp. CJD4-Y5 (ตารางที่ 25) รายละเอียดของการจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่เป็นสปีชีส์ใหม่แสดงใน ตารางที่ 26

ตารางที่ 25 ยีสต์รหัส RS ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่

Species	Closest species	Strain	No. of strain
<i>Candida</i> sp. 1	<i>Candida silvae</i>	RS9, RS58	2
<i>Candida</i> sp. 2	<i>Candida</i> sp. BG 2-7-17-001A-1-1	RS17, RS28	2
<i>Candida</i> sp. 3	<i>Candida sinolaborantium</i>	RS42	1
<i>Kluyveromyces</i> sp. 1	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76	13

ตารางที่ 26 การจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
RS9	<i>Candida silvae</i> NRRL Y-6725 (EF550215)	469/543	86.4	63	11.6	11	New species
RS58	<i>Candida silvae</i> NRRL Y-6725 (EF550215)	487/562	86.7	64	11.4	11	New species
RS17	<i>Candida</i> sp. BG02-7-17-001A-1-1 (AY520387)	467/492	94.9	25	5.1	0	New species
RS28	<i>Candida</i> sp. BG02-7-17-001A-1-1 (AY520387)	467/492	94.9	25	5.1	0	New species
RS42	<i>Candida sinolaborantium</i> CBS 9940 (AY520328)	505/515	98.1	8	1.6	2	New species
RS2	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS8	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS14	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS20	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS23	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS27	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS53	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS54	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species
RS63	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 (U69579)	537/544	98.7	6	1.1	1	New species

ตารางที่ 26 (ต่อ)

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

จากการจัดจำแนกยีสต์รหัส RV ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จำนวน 56 สายพันธุ์ พบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว จำนวน 42 สายพันธุ์ โดยสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว ส่วนใหญ่เป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์ จัดจำแนกได้เป็น 7 สกุล 17 สปีชีส์ 37 สายพันธุ์ และเป็นแบล็ดิโอมัยซีตัสยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว 2 สกุล 4 สปีชีส์ 5 สายพันธุ์ สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วส่วนใหญ่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida* สปีชีส์ที่พบมาก คือ *Issatchenkia siamensis* (5 สายพันธุ์), *Issatchenkia occidentalis* (3 สายพันธุ์), *Issatchenkia orientalis* (3 สายพันธุ์), *Candida pseudolambica* (3 สายพันธุ์), *Candida thaimueangensis* (3 สายพันธุ์) และ *Williopsis saturnus* var. *mrakii* (3 สายพันธุ์)

ส่วนผลการจัดจำแนกยีสต์รหัส R1 ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จำนวน 32 สายพันธุ์ พบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 23 สายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่เป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์ เช่นกัน โดยจัดจำแนกเป็น 2 สกุล 6 สปีชีส์ 22 สายพันธุ์ และเป็นแบล็ดิโอมัยซีตัสยีสต์ 1 สปีชีส์ คือ *Trichosporon asahii* สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Candida* และสปีชีส์ที่พบเป็นจำนวนมาก คือ *Candida thaimueangensis* (9 สายพันธุ์) และ *Candida tropicalis* (6 สายพันธุ์)

สำหรับผลการจัดจำแนกยีสต์รหัส RS ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จำนวน 61 สายพันธุ์ พบว่าเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว 34 สายพันธุ์ ทั้งหมดเป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์ จัดจำแนกได้เป็น 6 สกุล 14 สปีชีส์ 34 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Candida*, *Issatchenkia* และ *Pichia* สปีชีส์ที่พบมาก คือ *Issatchenkia orientalis* (8 สายพันธุ์)

ยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน จากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ส่วนใหญ่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida* ซึ่งเป็นสกุลที่พบได้เสมอในแม่น้ำ ทะเลสาบ น้ำกร่อย น้ำทะเลมหาสมุทร และน้ำที่มีมลภาวะ (Fell *et al.*, 1960 และ de Araujo, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับที่มีการรายงานว่ายีสต์ที่แยกจากกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วงที่แช่ในน้ำจากป่าชายเลนของประเทศไทย ส่วนใหญ่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida* (กุสุมาวดี, 2549) นอกจากนี้ยังพบยีสต์ในสกุลอื่น คือ *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Issatchenkia*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Williopsis*, *Rhodotorula* และ *Trichosporon* ยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่พบเป็นจำนวนมากจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กันจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คือ *Candida tropicalis* (13 สายพันธุ์), *Candida*

*thaimueangensis* (12 สายพันธุ์) และ *Issatchenkia orientalis* (11 สายพันธุ์) นอกจากนั้นพบว่า ยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วบางสปีชีส์พบได้ในแหล่งที่อยู่บนบกด้วย เช่น *Candida tropicalis* พบในดอกไม้ และขุยแมลง *Candida parapsilosis* พบในเห็ด (Jindamorakot, 2004) *Issatchenkia orientalis* และ *Issatchenkia siamensis* พบในดิน (Sumpradit, 2005) เป็นต้น และเมื่อเปรียบเทียบ ยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน พบว่าบางสปีชีส์แยกได้จากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 (RV), พ.ศ. 2548 (R1) และ พ.ศ. 2549 (RS) แต่ในขณะที่บางสปีชีส์พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บในปีใดปีหนึ่งเท่านั้น (ตารางที่ 27)

จากตารางที่ 27 แสดงให้เห็นว่ายีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยส่วนใหญ่เป็นแอสโคมัยซีตสปีชีส์ สำหรับสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 3 ช่วงเวลา คือ *Candida tropicalis* และ *Kodamaea ohmeri* แสดงว่าทั้ง 2 สปีชีส์นี้พบได้เสมอในน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเมื่อเปรียบเทียบผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 (RV) ซึ่งเป็นช่วงเวลาก่อนเกิดเหตุการณ์ซึนามิ (Tsunami) กับยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 (RS) ซึ่งเป็นช่วงเวลาลงเกิดซึนามิแล้ว 1 ปี พบว่าในช่วงก่อนเกิดซึนามิมี *Issatchenkia siamensis* (5 สายพันธุ์) เป็นจำนวนมาก โดยยีสต์สปีชีส์นี้พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บหลังเกิดซึนามิด้วย ในขณะที่ยีสต์ที่พบจำนวนมากในตัวอย่างน้ำที่เก็บหลังเกิดซึนามิ คือ *Issatchenkia orientalis* (8 สายพันธุ์) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่พบในช่วงก่อนเกิดซึนามิด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ามียีสต์ที่มีการอธิบายแล้วที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บก่อนเกิดซึนามิ แต่ไม่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บหลังเกิดซึนามิอีกหลายสปีชีส์ คือ *Candida berthetii*, *Candida boidinii*, *Candida glabrata*, *Candida pseudolambica*, *Candida rugosa*, *Candida thaimueangensis*, *Pichia caribbica*, *Pichia sporocuriosa*, *Torulasporea maleeae*, *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, *Williopsis saturnus* var. *subsufficiens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon coremiiforme* และ *Trichosporon japonicum* สำหรับสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บหลังเกิดซึนามิ แต่ไม่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บก่อนเกิดซึนามิ คือ *Candida butyri*, *Candida parapsilosis*, *Galactomyces geotrichum*, *Issatchenkia terricola*, *Pichia burtonii*, *Pichia galeiformis* และ *Pichia kluyveri* แสดงให้เห็นว่าการเกิดเหตุการณ์ซึนามิมีผลกระทบต่อความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัย

เกษตรศาสตร์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในน้ำ โดยบางสปีชีส์พบภายหลัง  
เกิดขึ้นมาซึ่งอาจเกิดจากการพัดพาของตะกอน กระจก แผลม และกระแสน้ำ

**ตารางที่ 27** การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลา  
ต่างๆ กัน

Species	Strain		
	RV (collected in 1998-1999)	R1 (collected in 2005)	RS (collected in 2006)
<b>Ascomycetous yeast</b>			
<i>Candida berthetii</i>	RV22, RV62	-	-
<i>Candida boidinii</i>	RV11	-	-
<i>Candida butyri</i>	-	-	RS55
<i>Candida glabrata</i>	RV144	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	RS32
<i>Candida phangngensis</i>	-	R1-34	-
<i>Candida picinguabensis</i>	-	R1-7, R1-9, R1-10	-
<i>Candida pseudolambica</i>	RV63, RV134, RV149	-	-
<i>Candida rugosa</i>	RV2, RV147	R1-5, R1-21	-
<i>Candida silvae</i>	RV7	-	RS1, RS57
<i>Candida thaimueangensis</i>	RV88, RV90, RV158	R1-3, R1-8, R1-11, R1-15, R1-16, R1-26, R1-29, R1-30, R1-33	-
<i>Candida tropicalis</i>	RV132, RV138	R1-6, R1-12, R1-13, R1-19, R1-20, R1-23	RS13, RS22, RS31, RS60, RS64
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	RV61	-	RS11
<i>Galactomyces geotrichum</i>	-	-	RS74
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	RV28, RV74, RV91	-	RS5, RS26, RS29
<i>Issatchenkia orientalis</i>	RV31, RV85, RV145	-	RS6, RS34, RS35, RS39, RS52, RS56, RS61, RS66
<i>Issatchenkia siamensis</i>	RV4, RV6, RV10, RV25, RV40	-	RS12
<i>Issatchenkia terricola</i>	-	-	RS30

ตารางที่ 27 (ต่อ)

Species	Strain		
	RV (collected in 1998-1999)	R1 (collected in 2005)	RS (collected in 2006)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	RV29	R1-25	RS25, RS43, RS48, RS49
<i>Pichia burtonii</i>	-	-	RS36
<i>Pichia caribbica</i>	RV148, RV155	-	-
<i>Pichia galeiformis</i>	-	-	RS3
<i>Pichia kluyveri</i>	-	-	RS19, RS21, RS47, RS75
<i>Pichia sporocuriosa</i>	RV137	-	-
<i>Torulasporea maleeae</i>	RV17, RV19	-	-
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i>	RV39, RV64, RV86	-	-
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>	RV93	-	-
<b>Basidiomycetous yeast</b>			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	RV162, RV165	-	-
<i>Trichosporon asahii</i>	RV24	R1-18	-
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	RV1	-	-
<i>Trichosporon japonicum</i>	RV59	-	-

สำหรับยีสต์รหัส RV ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จัดจำแนกเป็น ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายจำนวน 4 สายพันธุ์ โดยเหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 (2 สายพันธุ์) และเหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. ST-464 (2 สายพันธุ์) ส่วนยีสต์รหัส R1 ที่แยกจาก ตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 จำนวน 3 สายพันธุ์ พบว่าเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย โดยเหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 (1 สายพันธุ์) และเหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. CS-2008b (2 สายพันธุ์) และยีสต์รหัส RS ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 จำนวน 9 สายพันธุ์ เป็นยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย โดยเหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27665 (1 สายพันธุ์), *Hanseniaspora* sp. CS-2008b (1 สายพันธุ์), *Hanseniaspora* sp. ST-250

(1 สายพันธุ์) และ *Hanseniaspora* sp. YS DN19 (6 สายพันธุ์) และ เมื่อเปรียบเทียบสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน พบว่าบางสปีชีส์พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน แต่สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายทั้งหมดอยู่ในสกุล *Candida* และ *Hanseniaspora* และเมื่อเปรียบเทียบสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บก่อนเกิดชีนามิกับเก็บหลังเกิดชีนามิ พบว่ามีความแตกต่างของชนิดยีสต์ที่พบดังแสดงในตารางที่ 28

ตารางที่ 28 การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน

Species	Strain		
	RV (collected in 1998-1999)	R1 (collected in 2005)	RS (collected in 2006)
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127	RV9, RV57	R1-4	-
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27665	-	-	RS16
<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b	-	R1-1, R1-22	RS18
<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-250	-	-	RS17
<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-464	RV3, RV87	-	-
<i>Hanseniaspora</i> sp. YS DN19	-	-	RS7, RS10, RS24, RS41, RS50, RS62

สำหรับสายพันธุ์ที่จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่นั้น พบว่าสายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 จำนวน 10 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida berthetii* CBS 5452 (2 สายพันธุ์), *Candida silvae* NRRL Y-6725 (3 สายพันธุ์), *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (4 สายพันธุ์) และ *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 (2 สายพันธุ์) และ *Candida* sp. CJDX4-Y5 (4 สายพันธุ์)

ส่วนสายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 พบว่ามี 6 สายพันธุ์ ที่จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida conglobata* CBS 2018 (3 สายพันธุ์) และ *Candida silvae* NRRL Y-6725 (3 สายพันธุ์) ในขณะที่สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 พบว่ามียีสต์สปีชีส์ใหม่ 18 สายพันธุ์ ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida silvae* NRRL Y-6725 (2 สายพันธุ์), *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 (2 สายพันธุ์), *Candida sinolaborantium*

(1 สายพันธุ์) และ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 (13 สายพันธุ์) เมื่อเปรียบเทียบการพบยีสต์สปีชีส์ใหม่จากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน พบว่าสปีชีส์ใหม่ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Candida* โดยพบว่าสปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida silvae* NRRL Y-6725 พบได้ในตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 3 ช่วงเวลา (ตารางที่ 29) สำหรับสปีชีส์ใหม่ที่พบมากที่สุด คือ สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 ซึ่งพบในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 กับ ตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 แต่ไม่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 สำหรับประเทศไทย รายงานการศึกษายีสต์จากตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของจังหวัดพังงา พบยีสต์สปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* คือ *Candida thaimueangensis* sp. nov. (Limtong et al., 2007b) และ *Candida phangngaensis* sp. nov. (Limtong et al., 2008b) ที่พบได้ในตัวอย่างน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนของจังหวัดระนอง เมื่อเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่พบก่อนเกิดชีนามิกับหลังเกิดชีนามิ พบว่ามีบางสปีชีส์พบก่อนเกิดชีนามิ คือ ยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida berthetii* CBS 5452 และ *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 บางสปีชีส์พบภายหลังเกิดชีนามิ คือ ยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 และ *Candida sinolaborantium* แต่บางสปีชีส์สามารถพบได้ทั้งก่อนเกิดชีนามิและหลังเกิดชีนามิ คือ ยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida silvae* NRRL Y-6725 และ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 แสดงให้เห็นว่าการเกิดชีนามิมีผลต่อความหลากหลายและชนิดของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งยืนยันจากผลที่แสดงในการศึกษานี้

ตารางที่ 29 การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในเวลาต่างๆ กัน

Species	Closest species	Strains		
		RV (collected in 1998-1999)	R1 (collected in 2005)	RS (collected in 2006)
<i>Candida</i> sp. 1	<i>Candida berthetii</i>	RV5, RV140	-	-
<i>Candida</i> sp. 2	<i>Candida conglobata</i>	-	R1-27, R1-31, R1-32	-
<i>Candida</i> sp. 3	<i>Candida silvae</i>	RV35, RV96, RV152	R1-2, R1-14, R1-17	RS9, RS58
<i>Candida</i> sp. 4	<i>Candida</i> sp. BG02-7-17-001A-1-1	-	-	RS17, RS28
<i>Candida</i> sp. 5	<i>Candida sinolaborantium</i>	-	-	RS42
<i>Kluyveromyces</i> sp. 1	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	RV42, RV89, RV94, RV153	-	RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76
<i>Pichia</i> sp. 1	<i>Pichia fluxuum</i>	RV60	-	-

จากผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติ  
 แหวมสน จังหวัดระนอง เมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 ซึ่งเก็บตัวอย่างในฤดูต่างๆ คือ ฤดูร้อน (กุมภาพันธ์  
 -เมษายน) ฤดูฝน (พฤษภาคม-ตุลาคม) และฤดูหนาว (พฤศจิกายน-มกราคม) แสดงว่าชนิดของยีสต์  
 ที่พบมีความแตกต่างกันในแต่ละฤดู (ตารางที่ 30) โดยพบว่ายีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่พบใน  
 ตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 3 ฤดู มีเพียงสปีชีส์เดียว คือ *Issatchenkia orientalis* มีบางสปีชีส์ที่พบใน 2 ฤดู  
 คือ *C. pseudolambica* และ *C. thaimueangensis* พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อน และฤดูฝน  
*C. berthetii*, *I. occidentalis* และ *W. saturnus* พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อน และฤดูหนาว  
 และ *Candida rugosa* พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูฝน และฤดูหนาว ในขณะที่บางสปีชีส์พบเพียง  
 ฤดูเดียว คือ *Debaryomyces nepalensis* และ *Trichosporon japonicum* พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บ  
 ในฤดูร้อน *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Pichia caribbica*, *P. sporocuriosa* และ *Rhodotorula*  
*mucilaginosa* พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูฝน *C. boidinii*, *C. silvae*, *I. siamensis*,  
*K. ohmeri*, *Torulaspota maleeae*, *T. asahii* และ *T. coremiiforme* พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บใน  
 ฤดูหนาว

ส่วนสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 ในฤดู  
 ต่างๆ พบว่าสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 และ  
*Hanseniaspora* sp. ST-464 พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อน และฤดูหนาว แต่ไม่พบสปีชีส์ที่ยังไม่  
 มีการอธิบายในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูฝน (ตารางที่ 31)

ตารางที่ 30 การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ.  
2541-2542 ในฤดูต่างๆ

Species	Strain		
	Summer season (February-April)	Rain season (May-October)	Winter season (November-January)
<b>Ascomycetous yeast</b>			
<i>Candida berthetii</i>	RV62	-	RV22
<i>Candida boidinii</i>	-	-	RV11
<i>Candida glabrata</i>	-	RV144	-
<i>Candida pseudolambica</i>	RV63	RV134, RV149	-
<i>Candida rugosa</i>	-	RV147	RV2
<i>Candida silvae</i>	-	-	RV7
<i>Candida thaimueangensis</i>	RV88, RV90	RV158	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	RV132, RV138	-
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	RV61	-	-
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	RV74, RV91	-	RV28
<i>Issatchenkia orientalis</i>	RV85	RV145	RV31
<i>Issatchenkia siamensis</i>	-	-	RV4, RV6, RV10, RV25, RV40
<i>Kodamaea ohmeri</i>	-	-	RV29
<i>Pichia caribbica</i>	-	RV148, RV155	-
<i>Pichia sporocuriosa</i>	-	RV137	-
<i>Torulasporea maleeae</i>	-	-	RV17, RV19
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i>	RV64, RV86	-	RV39
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i>	RV93	-	-
<b>Basidiomycetous yeast</b>			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	RV162, RV165	-
<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	RV24
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	-	-	RV1
<i>Trichosporon japonicum</i>	RV59	-	-

ตารางที่ 31 การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 ในฤดูต่างๆ

Species	Strain		
	Summer season (February-April)	Rain season (May-October)	Winter season (November-January)
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127	RV57	-	RV9
<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-464	RV87	-	RV3

สำหรับยีสต์สปีชีส์ใหม่พบสปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida silvae* NRRL Y-6725 และ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 ในตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 3 ฤดู ส่วนสปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida berthetii* CBS 5452 พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูฝน และฤดูหนาว ในขณะที่สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Pichia fluxuum* CBS 2287 พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อน (ตารางที่ 32)

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในฤดูต่างๆ พบยีสต์แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลจากความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างน้ำ และสภาวะแวดล้อมต่างๆ

ตารางที่ 32 การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 ในฤดูต่างๆ

Species	Closest species	Strain		
		Summer season (February-April)	Rain season (May-October)	Winter season (November-January)
<i>Candida</i> sp. 1	<i>Candida berthetii</i>	-	RV140	RV5
<i>Candida</i> sp. 3	<i>Candida silvae</i>	RV96	RV152	RV35
<i>Kluyveromyces</i> sp. 1	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	RV89, RV94	RV153	RV42
<i>Pichia</i> sp. 1	<i>Pichia fluxuum</i>	RV60	-	-

เมื่อเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อนปี พ.ศ. 2541-2542 กับ พ.ศ. 2549 พบว่ายีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 2 ครั้ง คือ *Candida tropicalis* และ *Issatchenkia orientalis* ในขณะที่มีบางสปีชีส์ คือ *Candida glabrata*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. thaimueangensis*, *Pichia caribbica*, *P. sporocuriosa* และ *Rhodotorula mucilaginosa* ที่พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อนปี พ.ศ. 2541-2542 และ *Candida butyri*, *C. parapsilosis*, *C. silvae*, *Debaryomyces nepalensis*, *Galactomyces geotrichu*, *Issatchenkia occidentalis*, *I. siamensis*, *I. terricola*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia burtonii*, *P. galeiformis* และ *Pichia kluyveri* พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อนปี พ.ศ. 2549 (ตารางที่ 33) ส่วนยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายพบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงฤดูร้อนปี พ.ศ. 2549 คือ สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27665, *Hanseniaspora* sp. CS-2008b, *Hanseniaspora* sp. ST-250 และ *Hanseniaspora* sp. YS DN19 (ตารางที่ 34)

ตารางที่ 33 การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อน  
ปี พ.ศ. 2541-2542 (RV) กับ พ.ศ. 2549 (RS)

Species	Strain	
	Rain season (2541-2542)	Rain season (2549)
<b>Ascomycetous yeast</b>		
<i>Candida butyri</i>	-	RS55
<i>Candida glabrata</i>	RV144	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	RS32
<i>Candida pseudolambica</i>	RV134, RV149	-
<i>Candida rugosa</i>	RV147	-
<i>Candida silvae</i>	-	RS1, RS57
<i>Candida thaimueangensis</i>	RV158	-
<i>Candida tropicalis</i>	RV132, RV138	RS13, RS22, RS31, RS60, RS64
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	-	RS11
<i>Galactomyces geotrichum</i>	-	RS74
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	-	RS5, RS26, RS29
<i>Issatchenkia orientalis</i>	RV145	RS6, RS34, RS35, RS39, RS52, RS56, RS61, RS66
<i>Issatchenkia siamensis</i>	-	RS12
<i>Issatchenkia terricola</i>	-	RS30
<i>Kodamaea ohmeri</i>	-	RS25, RS43, RS48, RS49
<i>Pichia burtonii</i>	-	RS36
<i>Pichia caribbica</i>	RV148, RV155	-
<i>Pichia galeiformis</i>	-	RS3
<i>Pichia kluyveri</i>	-	RS19, RS21, RS47, RS75
<i>Pichia sporocuriosa</i>	RV137	-
<b>Basidiomycetous yeast</b>		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	RV162, RV165	-

ตารางที่ 34 การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อน  
ปี พ.ศ. 2541-2542 (RV) กับ พ.ศ. 2549 (RS)

Species	Strain	
	Rain season (2541-2542)	Rain season (2549)
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27665	-	RS16
<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b	-	RS18
<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-250	-	RS71
<i>Hanseniaspora</i> sp. YS DN19	-	RS7, RS10, RS24, RS41, RS50, RS62

สำหรับยีสต์สปีชีส์ใหม่ พบว่ายีสต์สปีชีส์ใหม่ที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 2 ครั้ง คือ ยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida silvae* NRRL Y-6725 และ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438 สำหรับยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อนเฉพาะปีใดปีหนึ่ง คือ ที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 พบเฉพาะยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida berthetii* CBS 5452 และที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 พบเฉพาะยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 และ *Candida sinolaborantium* CBS 9940 (ตารางที่ 35) ผลการเปรียบเทียบนี้น่าจะช่วยยืนยันว่าหลังจากเกิดซึนามิ ชนิดของยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

จากการศึกษาครั้งนี้ยืนยันว่าสามารถพบยีสต์ได้ในน้ำจากป่าชายเลน โดยมีผู้กล่าวว่ายีสต์และรามิบบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนธาตุอาหารในป่าชายเลน และเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำและแพลงก์ตอน (Nagahama, 2006) ส่วนยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่จัดจำแนกได้นั้นจะนำไปศึกษาลักษณะต่างๆ ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม ซึ่งประกอบด้วย การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่ออธิบายพร้อมทั้งเสนอตั้งชื่อเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ต่อไป

ตารางที่ 35 การเปรียบเทียบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บในฤดูร้อน เมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 (RV) กับ พ.ศ. 2549 (RS)

Species	Closest species	Strain	
		Rain season (2541-2542)	Rain season (2549)
<i>Candida</i> sp. 1	<i>Candida berthetii</i>	RV140	-
<i>Candida</i> sp. 2	<i>Candida silvae</i>	RV152	RS9, RS58
<i>Candida</i> sp. 3	<i>Candida</i> sp. BG02-7-17-001A-1-1	-	RS17, RS28
<i>Candida</i> sp. 4	<i>Candida sinolaborantium</i>	-	RS42
<i>Kluyveromyces</i> sp. 1	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	RV153	RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76

### 3. การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่

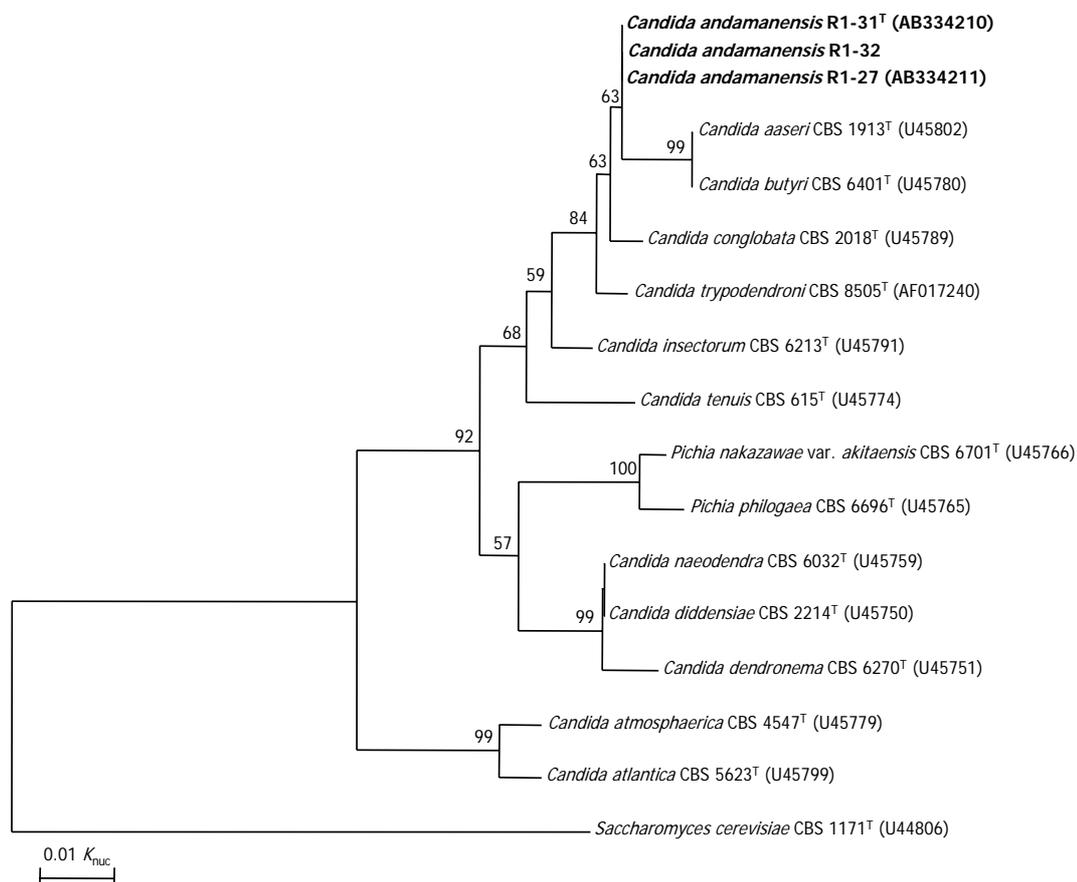
การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่ได้ศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่ ดังนี้

#### 3.1 *Candida andamanensis* sp. nov. (R1-27, R1-31<sup>T</sup>, R1-32)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ R1-27, R1-31 และ R1-32 พบว่าเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นสปีชีส์เดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida conglobata* CBS 2018<sup>T</sup> โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ R1-27, R1-31 และ R1-32 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (5 นิวคลีโอไทด์ ใน 530 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ R1-27, R1-31 และ R1-32 (ภาพที่ 2) พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ และสร้างคลัสเตอร์กับ *Candida aaseri* CBS 1913<sup>T</sup>, *Candida butyri* CBS 6401<sup>T</sup>, *Candida conglobata* CBS 2018<sup>T</sup>, *Candida trypodendroni* CBS 8505<sup>T</sup>, *Candida insectorum* CBS 6213<sup>T</sup> และ *Candida tenuis* CBS 615<sup>T</sup> แต่อยู่ในตำแหน่งที่ต่างจาก *Candida conglobata* CBS 2018<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และสปีชีส์ที่รู้จักแล้วสปีชีส์อื่นๆ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า R1-27, R1-31 และ R1-32 เป็นสปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีลักษณะต่างๆ เหมือนกัน คือ ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida andamanensis* sp. nov. โดยมี R1-31 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “andamanensis” เนื่องจากยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ แยกได้จากตัวอย่างน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง ซึ่งอยู่ทางฝั่งทะเลอันดามัน สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และ

มี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 25965<sup>T</sup>) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 103862<sup>T</sup>) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 10859<sup>T</sup>) ประเทศเนเธอร์แลนด์



**ภาพที่ 2** ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ R1-27, R1-31<sup>T</sup>, R1-32 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida andamanensis* sp. nov. (R1-27, R1-31<sup>T</sup>, R1-32)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างรี ขนาด 3-5 x 3-7 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือ เป็นคู่ เชื้อมีการเจริญเป็นวง

แหวนที่ขอบหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอน เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 3A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ โคลนนี้มีสีครีม เนื้อคล้ายเนยเหลว โคลนนี้รูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ ขอบเป็นโค้งเว้าเพียงเล็กน้อย และเจริญเบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร

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

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 3B)

#### การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	-	แลคโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมลลิไบโอส	-

#### การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	+
ซอร์บอส	+	อิริทริทอล	+
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไรบิทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+

แอล-อะราบีโนส	+	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบีโนส	+	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟามะทิล-ดี-กลูโคไซด์	+	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	+	กรดแลกติก	-
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟไฟโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	+	เอทานอล	+
อินูลิน	-		

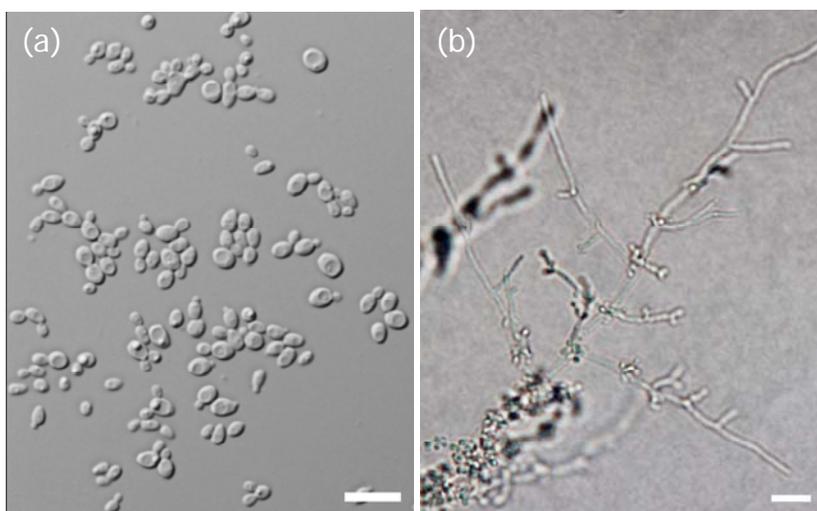
#### การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

#### ลักษณะอื่นๆ:

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

การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโครไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสปีโคอะโซเนียมบลูปี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q6
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	+



ภาพที่ 3 สัณฐานวิทยาของ *Candida andamanensis* sp. nov. (R1-27, R1-31<sup>T</sup>, R1-32)

- (a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- (b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลัง บ่ม 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

### 3.2 *Candida laemsonensis* sp. nov. (RV5<sup>T</sup>, RV140)

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RV5 กับ RV140 พบว่าเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์เดียวกัน และเมื่อ

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida berthetii* CBS 5452<sup>T</sup> โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RV5 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.1 เปอร์เซ็นต์ (6 นิวคลีโอไทด์ ใน 573 นิวคลีโอไทด์) และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RV140 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.2 เปอร์เซ็นต์ (6 นิวคลีโอไทด์ ใน 510 นิวคลีโอไทด์) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากการลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA (ภาพที่ 4) พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในตำแหน่งเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ และสร้างคลัสเตอร์ (cluster) กับ *Candida berthetii* CBS 5452<sup>T</sup> ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว และ *Candida* sp. ST-239 ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แต่อยู่ในตำแหน่งที่ต่างจาก *Candida berthetii* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า RV5 และ RV140 เป็นสปีชีส์ใหม่

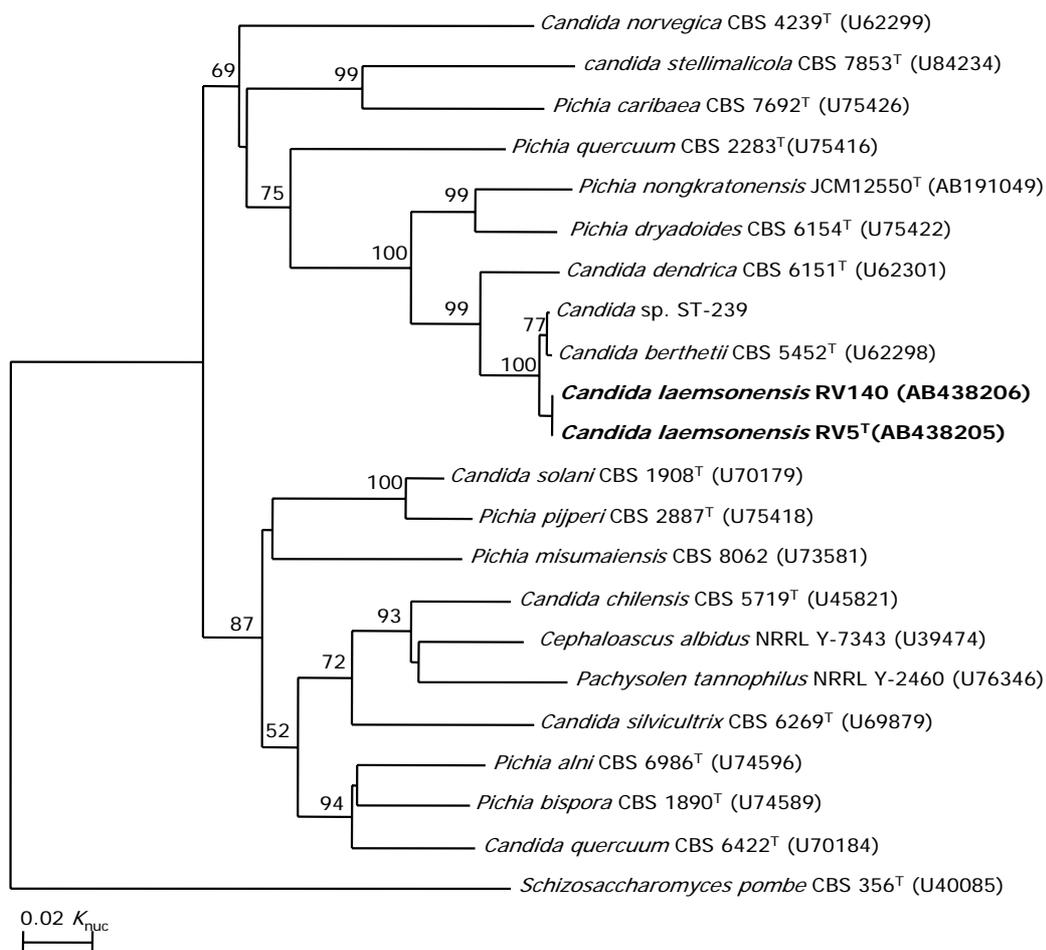
จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะต่างๆ เหมือนกัน คือ ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida laemsonensis* sp. nov. โดยมี RV5 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “laemsonensis” เนื่องจากยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์แยกได้จากตัวอย่างน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง

#### ลักษณะของ *Candida laemsonensis* sp. nov. (RV5<sup>T</sup>, RV140)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อป่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาด 3-6 x 3-7 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือ เป็นคู่ เซลล์จับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ และตกตะกอนที่ก้นหลอด เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 5A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อป่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ โคลนินมีสีครีม เนื้อคล้ายเนยเหลว โคลนินรูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ ขอบหยัก และ โคลนินเจริญสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ และเมื่อนำเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มาผสมกันบนอาหารทดสอบการสร้างสปอร์ และบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการสร้างสปอร์แสดงว่าทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์เฮเทอโรทาลิกที่มีเมดิังไทป์เดียวกัน



ภาพที่ 4 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RV5<sup>T</sup>, RV140 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมแบบที่ไม่มีการพัฒนา (rudimentary) แต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 5B)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	Weak	แล็กโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมลลิไบโอส	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	+
ซอร์โบส	Latent	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	-
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	-
ดี-ไซโลส	-	ดี-แมนนิทอล	-
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินอซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	Weak
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	-	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟามะทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	+	กรดแลคติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แล็กโทส	-	กรดซิตริก	+
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+

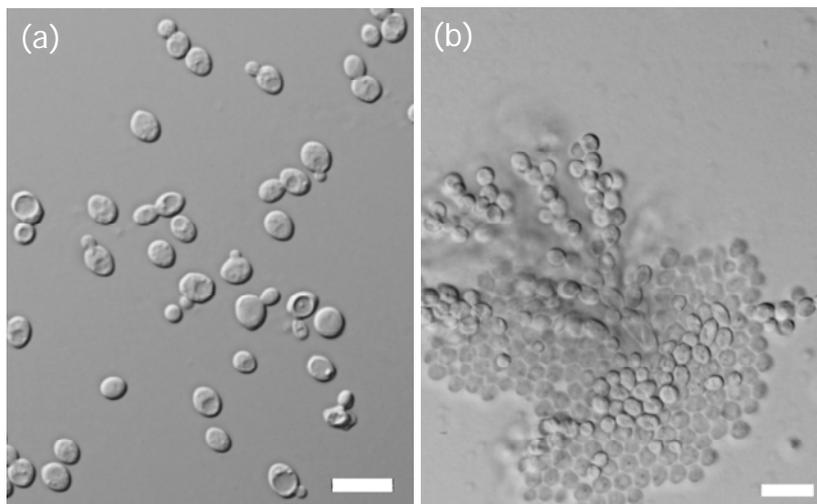
อินูลิน -

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซีไมด์	+
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซีไมด์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสไปโดอะโซเนียมบลูปี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q7
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 5 ลักษณะวิทยาของ *Candida laemsonensis* sp. nov. (RV5<sup>T</sup>, RV140)

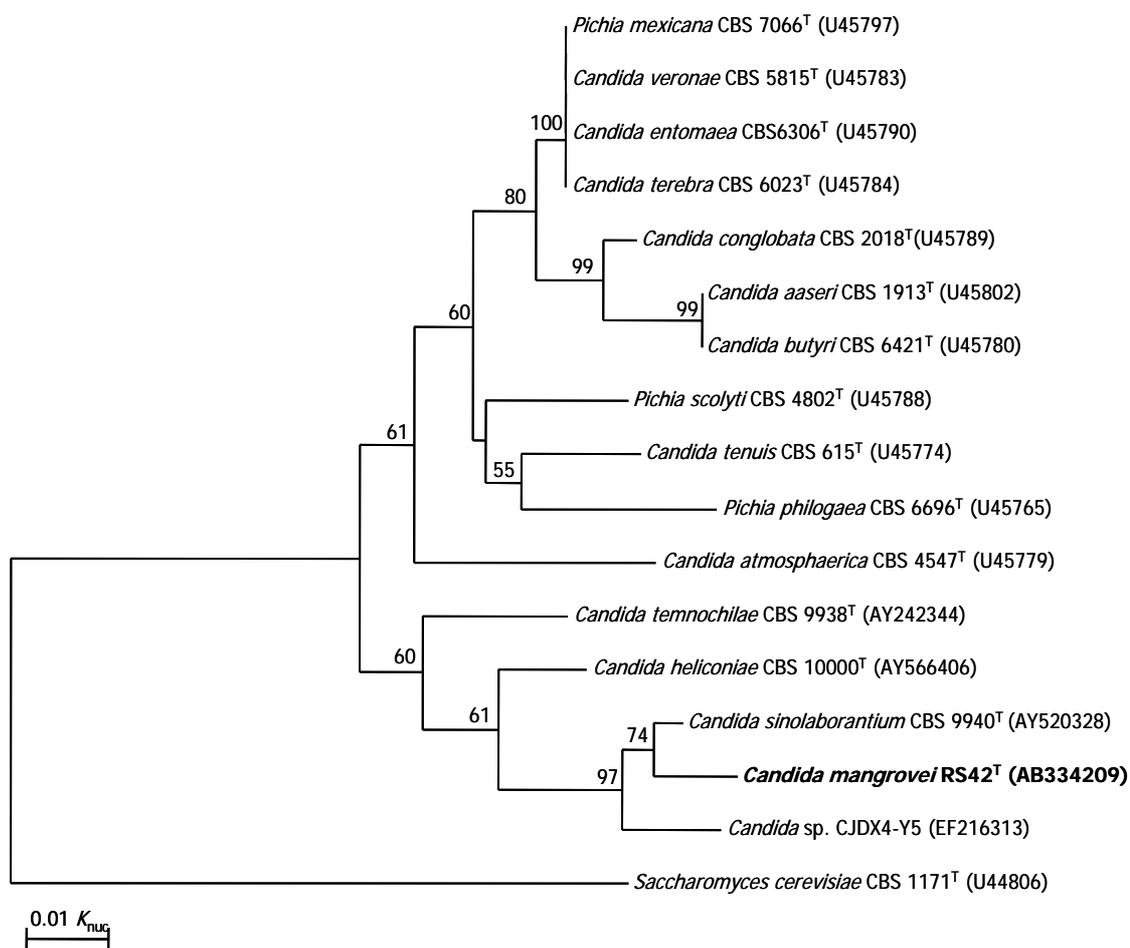
- (a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- (b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

### 3.3 *Candida mangrovei* sp. nov. (RS42<sup>T</sup>)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RS42 และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida sinolaborantium* CBS 9940<sup>T</sup> ซึ่งมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.6 เบอ์เซ็นต์ (8 นิวคลีโอไทด์ ใน 515 นิวคลีโอไทด์) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RS42 (ภาพที่ 6) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RS42 อยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างจากสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วบนต้นไม้วิวัฒนาการ และสร้างคลัสเตอร์กับ *Candida sinolaborantium* CBS 9940<sup>T</sup> และ *Candida* sp. CJD4-Y5

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RS42 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัด

จำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida mangrovei* sp. nov. โดยมี RS42 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “mangrovei” เนื่องจากเป็นยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในป่าชายเลน สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 25963<sup>T</sup>) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 103860<sup>T</sup>) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 10862<sup>T</sup>) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 6 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RS42<sup>T</sup> และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida mangrovei* sp. nov. (RS42<sup>T</sup>)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาด 3-6 x 3-6 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เชื้อมีการเจริญแบบป็นขึ้นข้างหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนที่ก้นหลอด มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 7A)

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

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

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 7B)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	+
ซอร์บอส	+	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไรบิทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+

แอล-อะราบีโนส	+	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบีโนส	+	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟามะทิล-ดี-กลูโคไซด์	+	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	+	กรดแลกติก	Latent
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	Weak
ราฟไฟโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	+	เอทานอล	+
อินูลิน	-		

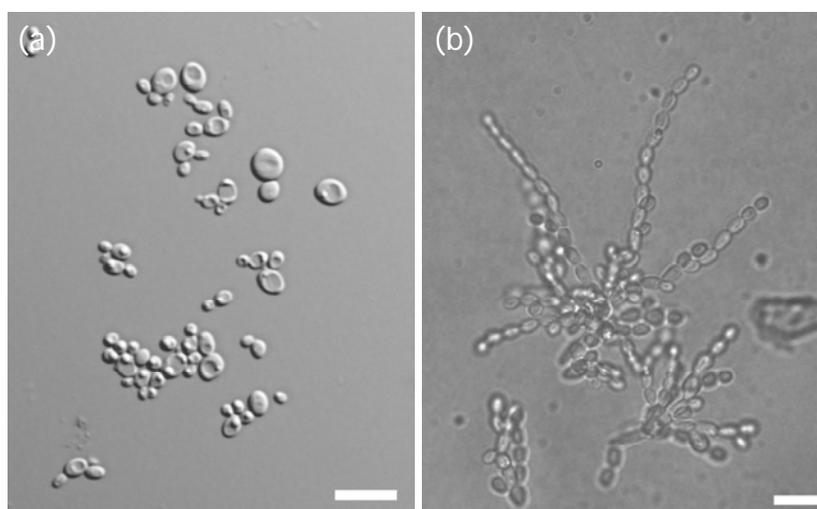
#### การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

#### ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซีไมด์	+
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซีไมด์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+

การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโครไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสปีโคอะโซเนียมบลูปี	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 7 สัณฐานวิทยาของ *Candida mangrovei* sp. nov. (RS42<sup>T</sup>)

- (a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- (b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

#### 3.4 *Candida ranongensis* sp. nov. (RS17, RS28<sup>T</sup>)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RS17 และ RS28 พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RS17 และ RS28 เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์เดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S

rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS17 และ RS28 พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 5.1 เปอร์เซ็นต์ (25 นิวคลีโอไทด์ ใน 492 นิวคลีโอไทด์) และมี *Candida tritomae* NRRL Y-27912 เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่ใกล้เคียงที่สุดโดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 10.03 เปอร์เซ็นต์ (52 นิวคลีโอไทด์ ใน 518 นิวคลีโอไทด์) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RS17 และ RS28 (ภาพที่ 8) พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ และสร้างคลัสเตอร์กับ *Candida* sp. BG02-7-17-001A-1-1 ที่เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย โดยมีค่า bootstrap สูงถึง 100 แต่อยู่ห่างจากสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วสปีชีส์อื่นๆ มาก ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า RS17 และ RS28 เป็นสปีชีส์ใหม่

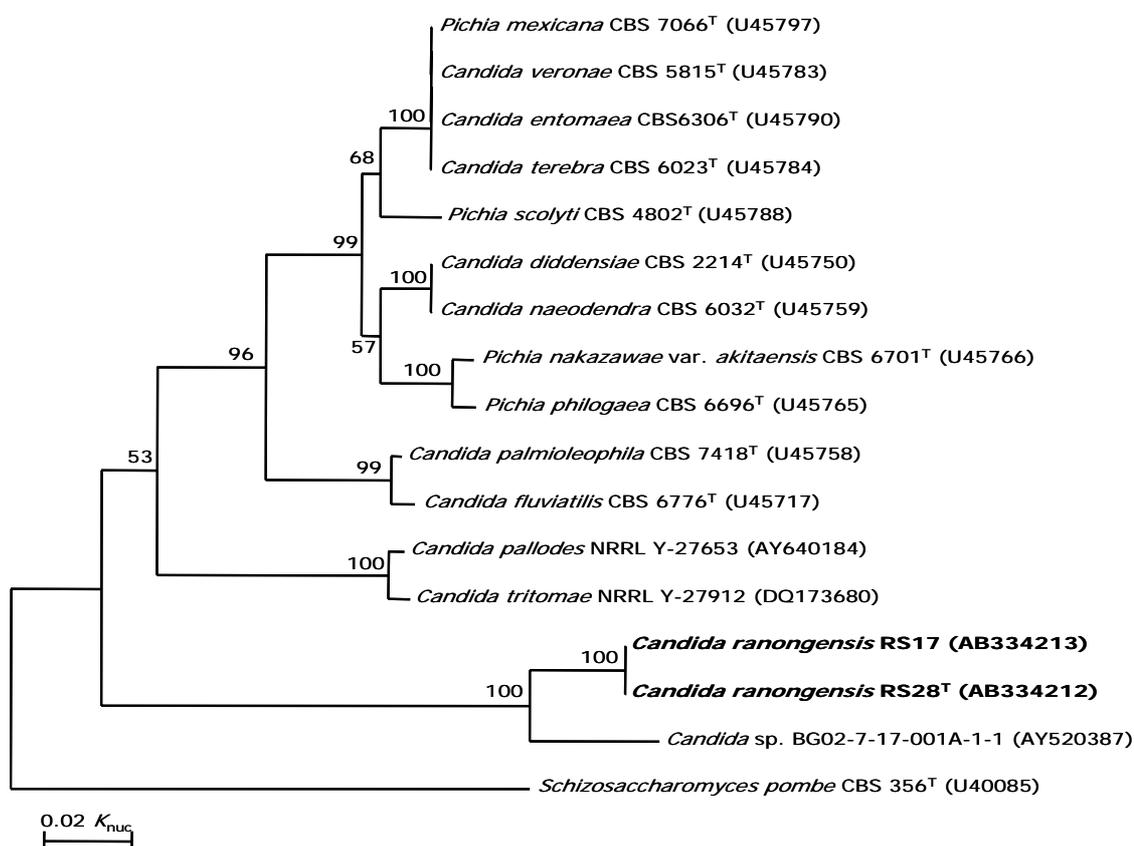
จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะต่างๆ เหมือนกัน ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida ranongensis* sp. nov. โดยมี RS28 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า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

#### ลักษณะของ *Candida ranongensis* sp. nov. (RS17 และ RS28<sup>T</sup>)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างรี ขนาด 3-4 x 4-7 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือ เป็นคู่ เชื้อมีการเจริญแบบป็นขึ้นข้างหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนที่ก้นหลอด เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 9A)

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

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



ภาพที่ 8 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RS17, RS28<sup>T</sup> และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี

two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมแบบที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 9B)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	-	แล็กโทส	-
กาแล็กโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมลลิไบโอส	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแล็กโทส	+	กลีเซอรอล	Latent
ซอร์โบส	+	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิดิล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไบริทอล	Latent
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแล็กทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	Weak
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟามेतิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	-	กรดกาแลคตุโรนิก	-
ซาลิซิน	-	กรดแลคติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แล็กโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+

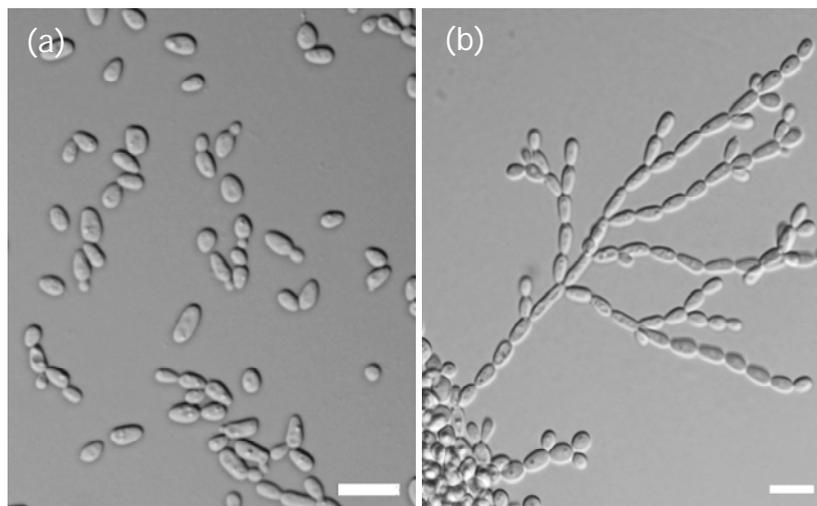
อินูลิน -

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซีไมด์	+
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซีไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสไปโดอะโซเนียมบลูปี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q9
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 9 สัณฐานวิทยาของ *Candida ranongensis* sp. nov. (RS17, RS28<sup>T</sup>)

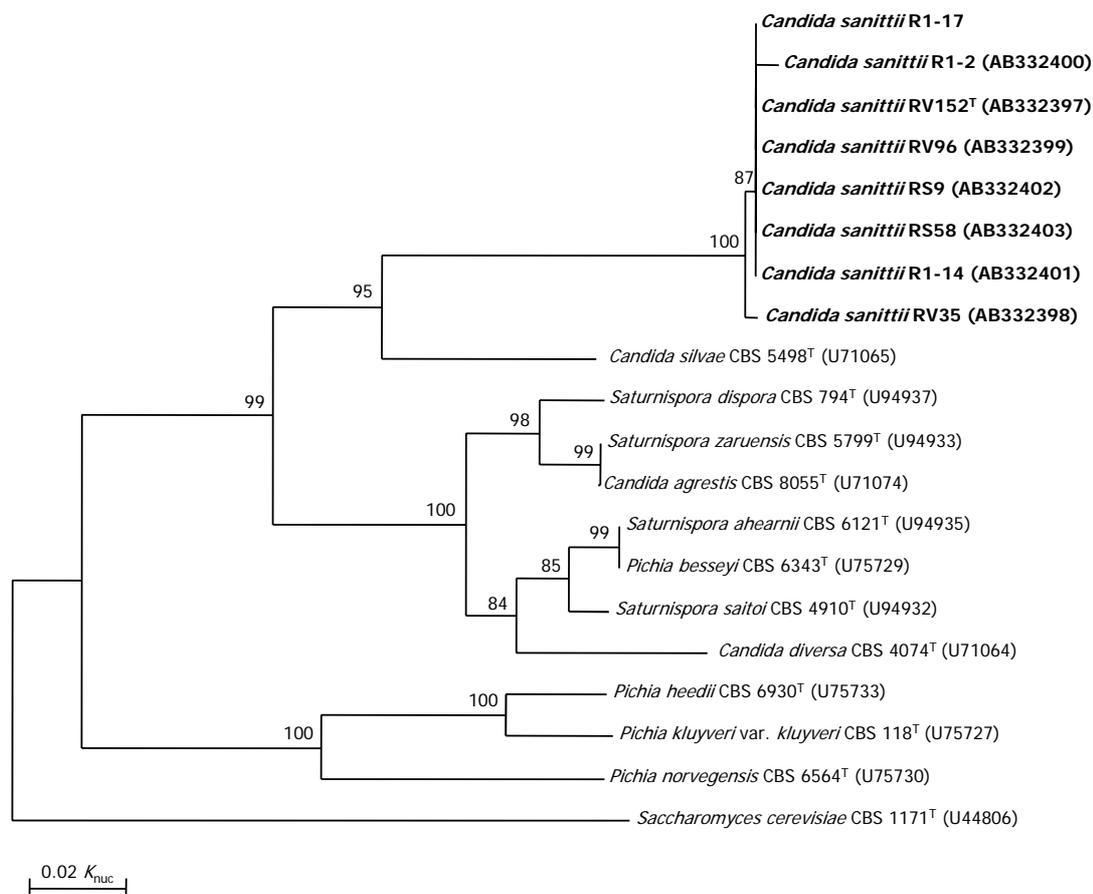
- (a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- (b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

### 3.5 *Candida sanittii* sp. nov. (R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96, RV152<sup>T</sup>)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ 8 สายพันธุ์ คือ R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96 และ RV152 พบว่ายีสต์ 6 สายพันธุ์ คือ R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV96 และ RV152 เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ R1-2 พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เพียง 2 นิวคลีโอไทด์ ใน 556 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RV35 พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1 นิวคลีโอไทด์ ใน 448 นิวคลีโอไทด์ แสดงว่าทั้ง 8 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์เดียวกัน เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ 8 สายพันธุ์ กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida silvae* NRRL Y-6725<sup>T</sup> โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ R1-14 และ RS58 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 11.4 เปอร์เซ็นต์ (64 นิวคลีโอไทด์ ใน 562 นิวคลีโอไทด์) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ R1-2 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 11.7 เปอร์เซ็นต์ (64 นิวคลีโอไทด์ ใน 565 นิวคลีโอไทด์)

เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ R1-17 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 11.4 เปอร์เซ็นต์ (64 นิวคลีโอไทด์ ใน 559 นิวคลีโอไทด์) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS9 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 11.6 เปอร์เซ็นต์ (63 นิวคลีโอไทด์ ใน 543 นิวคลีโอไทด์) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RV35 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 9.44 เปอร์เซ็นต์ (42 นิวคลีโอไทด์ ใน 445 นิวคลีโอไทด์) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RV96 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 12 เปอร์เซ็นต์ (63 นิวคลีโอไทด์ ใน 525 นิวคลีโอไทด์) และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RV152 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 11.5 เปอร์เซ็นต์ (63 นิวคลีโอไทด์ ใน 550 นิวคลีโอไทด์) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96 และ RV152 (ภาพที่ 10) พบว่ายีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ แต่ต่างจาก R1-2 และ RV35 เพียงเล็กน้อย และสร้างคลัสเตอร์กับ *Candida silvae* NRRL Y-6725<sup>T</sup> แต่อยู่ในตำแหน่งที่ต่างจาก *Candida silvae* NRRL Y-6725<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และสปีชีส์ที่รู้จักแล้วสปีชีส์อื่นๆ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96 และ RV152 เป็นสปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 8 สายพันธุ์มีลักษณะต่างๆ เหมือนกัน ไม่สร้างแอสโกสปอร์ และมีลักษณะต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida sanittii* sp. nov. โดยมี RV152 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “sanittii” ตามชื่อของ ศ. ดร. สนิท อักษรแก้ว ผู้เชี่ยวชาญเกี่ยวกับป่าชายเลนของประเทศไทยที่มีชื่อเสียงระดับโลก สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 25967<sup>T</sup>) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 103864<sup>T</sup>) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 10864<sup>T</sup>) ประเทศเนเธอร์แลนด์



**ภาพที่ 10** ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96, RV152<sup>T</sup> และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 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 sanitii* sp. nov. (R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96, RV152<sup>T</sup>)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาด 3-5 x 3-5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม

เชื้อมีการเจริญเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนที่ก้นหลอด มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 11A)

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

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ และเมื่อนำเชื้อทั้ง 8 ชนิดมาผสมกันบนอาหารทดสอบการสร้างสปอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์ แสดงว่าเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์เฮเทอโรทาลิกที่มีเมดิังไทป์เดียวกัน

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 11B)

#### การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	-	แลคโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟไฟโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมลลิไบโอส	-

#### การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	+
ซอร์บอส	-	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไרבิทอล	-
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	-
ดี-ไซโลส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-

ดี-อะราบิโนส	-	อินอซิทอล	-
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	-	กรดแลกติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-		

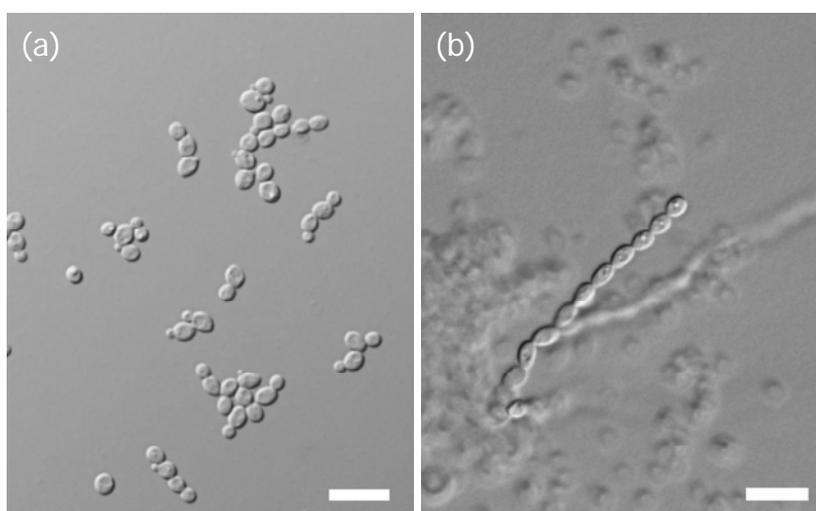
#### การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

#### ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	Weak

การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะโซเนียมบลูปี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q8
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



ภาพที่ 11 สัณฐานวิทยาของ *Candida sanittii* sp. nov (R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96, RV152<sup>T</sup>)

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

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

3.6 *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (RS2, RS8<sup>T</sup>, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89, RV94, RV153)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89, RV94 และ RV153 พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89 และ RV94 เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS65 พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (1 นิวคลีโอไทด์ ใน 562 นิวคลีโอไทด์) และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RV153 พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (1 นิวคลีโอไทด์ ใน 562 นิวคลีโอไทด์) โดยที่ RS65 และ RV153 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ต่างกันเมื่อเทียบกับยีสต์อีก 15 สายพันธุ์ จึงสรุปได้ว่ายีสต์ทั้ง 17 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์เดียวกันเนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438<sup>T</sup> โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS68, RS76, RV42, RV89 และ RV94 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.1 เปอร์เซ็นต์ (6 นิวคลีโอไทด์ ใน 544 นิวคลีโอไทด์) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS 70 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (5 นิวคลีโอไทด์ ใน 479 นิวคลีโอไทด์) และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ RS65 และ RV153 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.3 เปอร์เซ็นต์ (7 นิวคลีโอไทด์ ใน 544 นิวคลีโอไทด์) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ 17 สายพันธุ์ (ภาพที่ 12) พบว่ายีสต์ทั้ง 16 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งเดียวกันบนต้นไม้วิวัฒนาการ แต่ต่างจาก RV153 เพียงเล็กน้อย และสร้างคลัสเตอร์กับสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วของสกุล *Kluyveromyces* อีก 6 สปีชีส์ และอยู่ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับสปีชีส์ *Kluyveromyces aestuarii* CBS 4438<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ดังนั้นจึงเสนอ RS2, RS8, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89, RV94 และ RV153 เป็นสปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 17 สายพันธุ์มีลักษณะต่างๆ เหมือนกัน คือ มีการสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar หลังจากบ่ม 3 วัน ที่ 28 องศา

เซลเซียส โดยสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม จำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส และแอสคัสไม่คงทน สลายง่าย นอกจากนี้การสร้างแอสโคสปอร์และลักษณะอื่นๆ เป็นลักษณะของสกุล *Kluyveromyces* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Kluyveromyces* และตั้งชื่อเป็น *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. โดยมี RS8 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “siamensis” เนื่องจากแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำที่เก็บในประเทศไทยซึ่งมีชื่อเดิมว่าสยาม สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 25962<sup>T</sup>) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 103859<sup>T</sup>) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 10860<sup>T</sup>) ประเทศเนเธอร์แลนด์

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

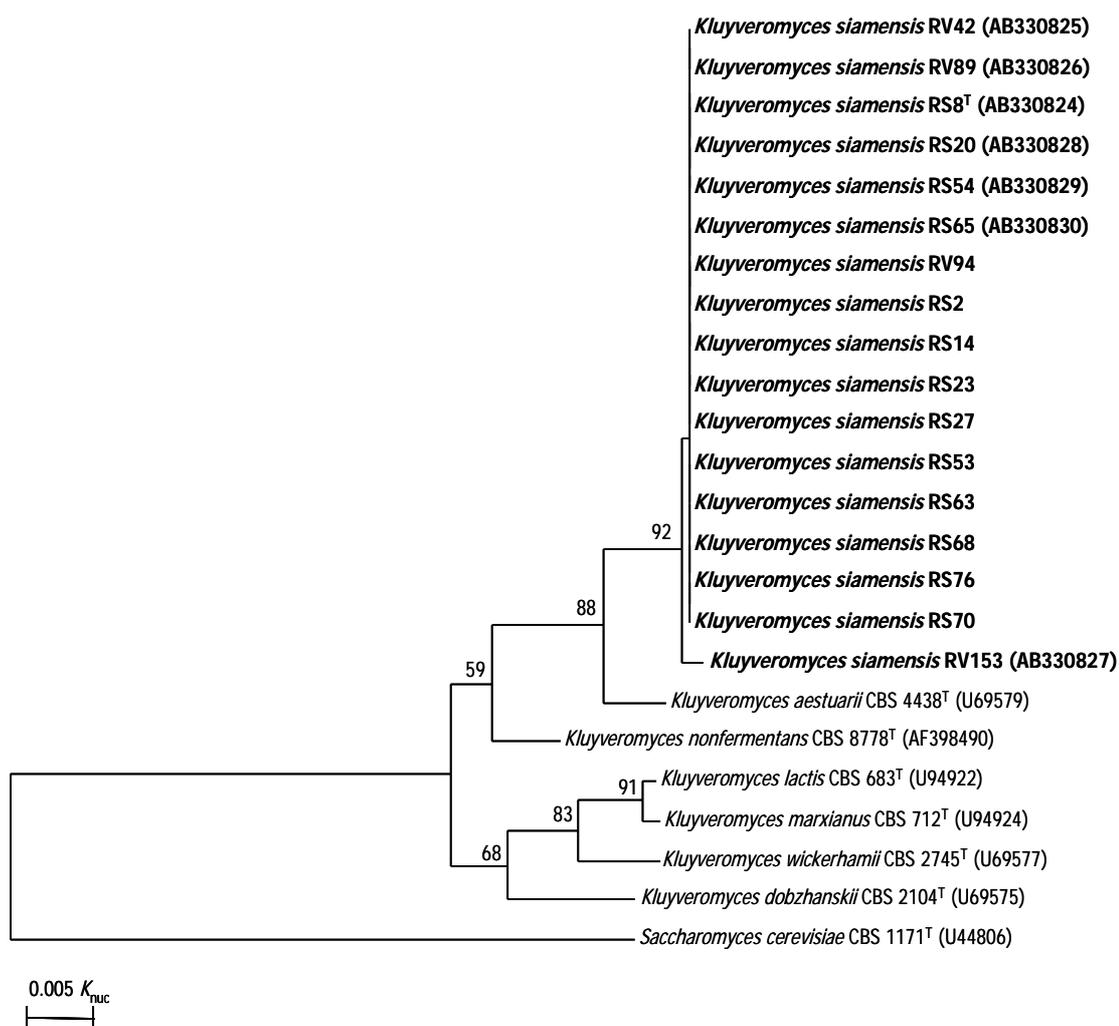
ลักษณะของ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (RS2, RS8<sup>T</sup>, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89, RV94, RV153)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลมจนถึงรี ขนาด 2.3-5.4 x 2.3-6.9 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ มีการเจริญเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนที่ก้นหลอด เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 13A)

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

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

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) พบการสร้างเส้นใยเทียมแบบที่ไม่มีการพัฒนา (rudimentary) แต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 13B)



ภาพที่ 12 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RS2, RS8<sup>T</sup>, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89, RV94, RV153 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

## การหมักคาร์โบไฮเดรต

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

## การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

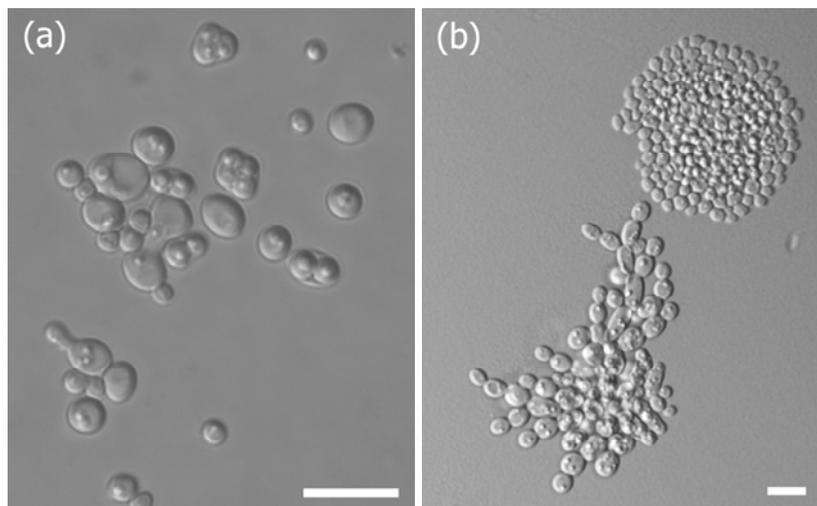
กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	+
ซอร์โบส	+	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	Latent
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินอซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต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

## การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

## ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซีไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซีไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	Weak
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสிடอะโซเนียมบลูปี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q6
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์	-



**ภาพที่ 13** สัณฐานวิทยาของ *Kluveromyces siamensis* sp. nov. (RS2, RS8<sup>T</sup>, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89, RV94, RV153)

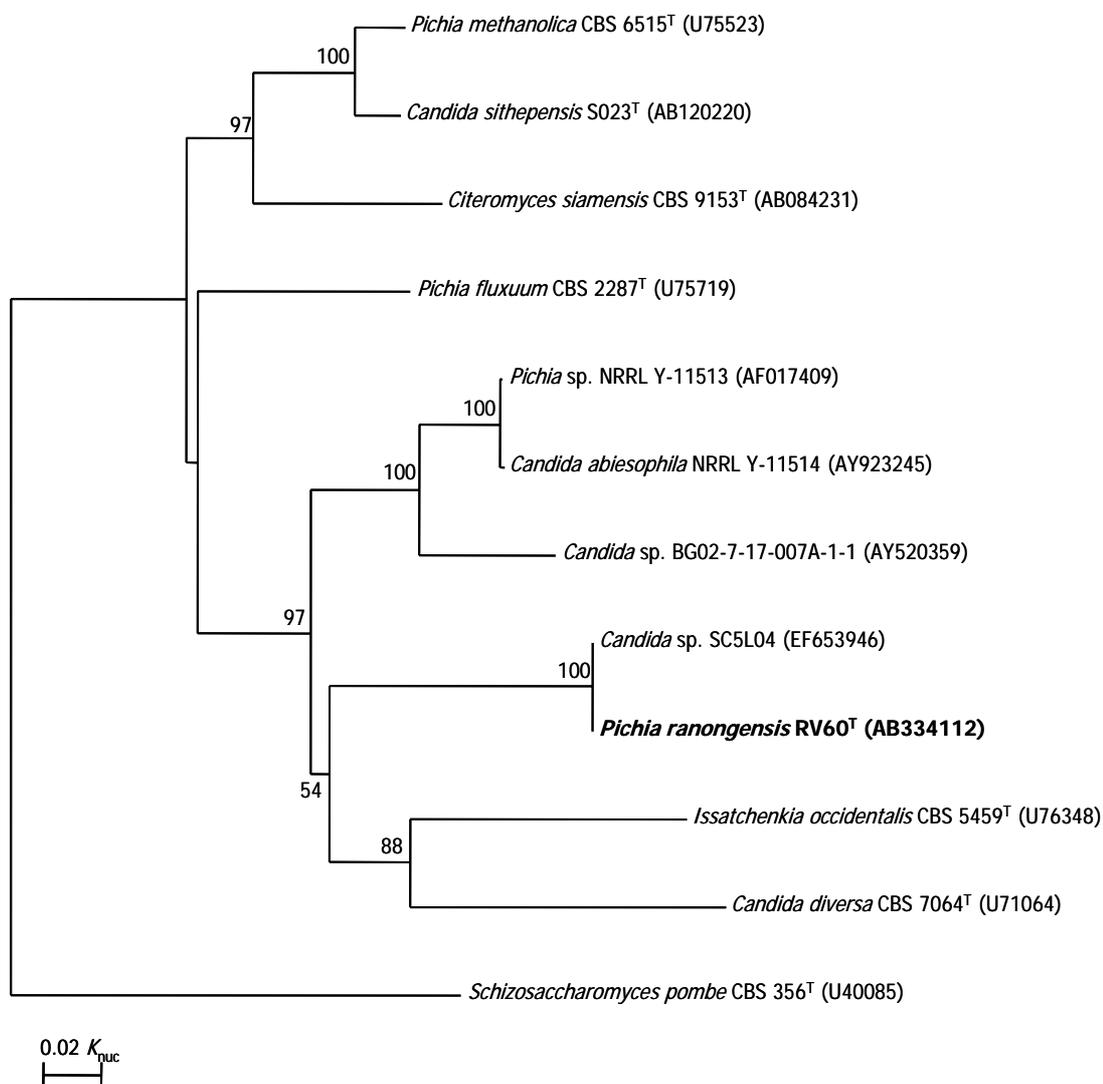
(a) เซลล์ปกติและแอสโคสปอร์ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

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

### 3.7 *Pichia ranongensis* sp. nov. (RV60<sup>T</sup>)

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RV60 และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Pichia fluxuum* CBS 2287<sup>T</sup> โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 8.3 เปอร์เซ็นต์ (43 นิวคลีโอไทด์ ใน 493 นิวคลีโอไทด์) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ RV60 (ภาพที่ 14) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ RV60 อยู่ในตำแหน่งเดียวกับ *Candida* sp. SC5L04 บนต้นไม้วิวัฒนาการ และสร้างคลัสเตอร์กับ *Pichia fluxuum* CBS 2287<sup>T</sup>, *Pichia* sp. NRRL Y-11513, *Candida abiesophila* NRRL Y-11514, *Candida* sp. BG02-7-17-007A-1-1,

*Issatchenkia occidentalis* CBS 5459<sup>T</sup> และ *Candida diversa* CBS 7064<sup>T</sup> จึงทำการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี เพื่อยืนยันว่า RV60 เป็นสปีชีส์ใหม่



**ภาพที่ 14** ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ RV60<sup>T</sup> และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ RV60 มีลักษณะต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* แต่พบการสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ และตั้งชื่อเป็น *Pichia ranongensis* sp. nov. โดยมี RV60 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “ranongensis” เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์นี้แยกได้จากตัวอย่างน้ำในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง สำหรับ type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 25966<sup>T</sup>) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC 103863<sup>T</sup>) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 10863<sup>T</sup>) ประเทศเนเธอร์แลนด์

#### ลักษณะของ *Pichia ranongensis* sp. nov. (RV60<sup>T</sup>)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างรี ขนาด 2-5 x 3-8 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ เชื้อมีการเจริญแบบป็น ขึ้นข้างหลอด และจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอนที่ก้นหลอด เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 15A)

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ โคลนินมีสีครีม เนื้อคล้ายเนยเหลว รูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ และโคโลนีเจริญแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar และ malt extract agar เป็นเวลา 7 วัน ที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่าสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม 1-2 แอสโคสปอร์ใน 1 แอสคัส โดยแอสคัสมีความคงทน ย่อยสลายยาก

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมแบบที่ไม่มีการพัฒนา (rudimentary) แต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 15B)

## การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	Weak	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟไฟโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมลลิไบโอส	-

## การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

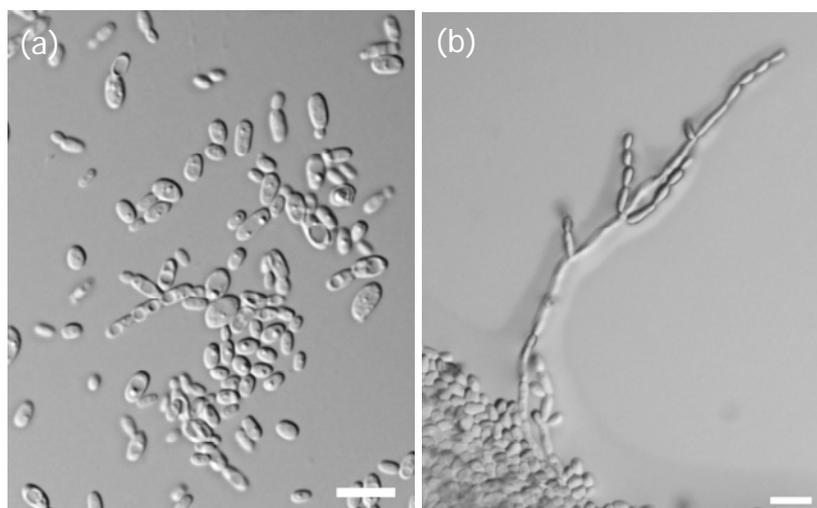
กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	+
ซอร์โบส	+	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	-	อินอซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	-
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-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

## การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

## ลักษณะอื่นๆ:

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



ภาพที่ 15 ลักษณะวิทยาของ *Pichia ranongensis* sp. nov. (RV60<sup>T</sup>)

- (a) เซลล์ปกติและแอสโคสปอร์ในอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- (b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลัง บ่ม 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

## สรุปผล

ยีสต์ที่แยกโดยวิธีการกรองผ่านเมมเบรนจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน กิ่งอำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง ประกอบด้วยยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 (รหัส RV) จำนวน 56 สายพันธุ์ จากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 (รหัส R1) จำนวน 32 สายพันธุ์ และยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 (รหัส RS) ในขณะที่ทำวิทยานิพนธ์ จำนวน 61 สายพันธุ์ ที่แยกจากตัวอย่างน้ำในบริเวณดังกล่าว 5 จุด ซึ่งมีลักษณะของตัวอย่างน้ำดังนี้ อุณหภูมิ 27.3-29.3 องศาเซลเซียส พีเอช 6.9-7.5 ความเค็ม 0-21 เปอร์เซ็นต์ และมียีสต์จำนวน 76-202 เซลล์ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร รวมเป็นยีสต์ที่นำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ทั้งหมด 149 สายพันธุ์ พบว่ามีผลการจัดจำแนกดังนี้

ผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 (รหัส RV) 56 สายพันธุ์ พบว่า 37 สายพันธุ์ เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วโดยอยู่ในไฟลัม Ascomycota 17 สปีชีส์ คือ *Candida berthetii*, *C. boidinii*, *C. glabrata*, *C. pseudolambica*, *C. rugosa*, *C. silvae*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces nepalensis*, *Issatchenkia occidentalis*, *I. orientalis*, *I. siamensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia caribbica*, *P. sporocuriosa*, *Torulaspora maleae* และ *Williopsis saturnus* และอยู่ในไฟลัม Basidiomycota 4 สปีชีส์ คือ *Trichosporon asahii*, *T. coremiiforme*, *T. japonicum* และ *Rhodotorula mucilaginosa* ส่วนยีสต์อีก 4 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 (2 สายพันธุ์) และ *Hanseniaspora* sp. ST-464 (2 สายพันธุ์) และยีสต์ที่เหลือ 10 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ 4 สปีชีส์ คือ *Candida laemsonensis* sp. nov. (2 สายพันธุ์), *Candida sanittii* sp. nov. (3 สายพันธุ์), *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (4 สายพันธุ์) และ *Pichia ranongensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์)

จากการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 (รหัส R1) 32 สายพันธุ์ พบว่า 23 สายพันธุ์ เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 6 สปีชีส์ คือ *C. phangngensis*, *C. pinguabensis*, *C. rugosa*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis* และ *K. ohmeri* และไฟลัม Basidiomycota 1 สปีชีส์ คือ *T. asahii* ส่วนยีสต์ 3 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยัง

ไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 (1 สายพันธุ์) และ *Hanseniaspora* sp. CS-2008b (2 สายพันธุ์) นอกจากนี้ 6 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ คือ *Candida andamanensis* sp. nov. (3 สายพันธุ์) และ *Candida sanittii* sp. nov. (3 สายพันธุ์)

การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 (รหัส RS) 61 สายพันธุ์ พบว่า 34 สายพันธุ์ เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วใน ไฟล์ม Ascomycota 14 สปีชีส์ คือ *C. butyri*, *C. parapsilosis*, *C. silvae*, *C. tropicalis*, *D. nepalensis*, *G. geotrichum*, *I. occidentalis*, *I. orientalis*, *I. siamensis*, *I. terricola*, *K. ohmeri*, *P. burtonii*, *P. galeiformis* และ *P. kluyveri* ส่วน 9 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27665 (1 สายพันธุ์), *Hanseniaspora* sp. CS-2008b (1 สายพันธุ์), *Hanseniaspora* sp. ST-250 (1 สายพันธุ์) และ *Hanseniaspora* sp. YS DN19 (6 สายพันธุ์) นอกจากนี้มียีสต์ 18 สายพันธุ์ ที่พบว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ ในไฟล์ม Ascomycota 4 สปีชีส์ คือ *Candida mangrovei* sp. nov. (1 สายพันธุ์), *Candida ranongensis* sp. nov. (2 สายพันธุ์), *Candida sanittii* sp. nov. (2 สายพันธุ์) และ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (13 สายพันธุ์)

จากการศึกษายีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่ง ระนอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง พบว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ยีสต์ที่จัดจำแนกได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Candida* และสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่พบเป็นจำนวนมาก คือ *C. tropicalis* (13 สายพันธุ์), *C. thaimueangensis* (12 สายพันธุ์) และ *I. orientalis* (11 สายพันธุ์) สำหรับยีสต์ที่จัดจำแนกเป็น สปีชีส์ใหม่ 7 สปีชีส์ โดยอาศัยอนุกรมวิธานโพลีฟาซิกที่ประกอบด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานเคมี และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้น คือ *Candida andamanensis* sp. nov. (R1-27, R1-31<sup>T</sup>, R1-32), *Candida laemsonensis* sp. nov. (RV5<sup>T</sup>, RV140), *Candida mangrovei* sp. nov. (RS42<sup>T</sup>), *Candida ranongensis* sp. nov. (RS17, RS28<sup>T</sup>), *Candida sanittii* sp. nov. (R1-2, R1-14, R1-17, RS9, RS58, RV35, RV96, RV152<sup>T</sup>), *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (RS2, RS8<sup>T</sup>, RS14, RS20, RS23, RS27, RS53, RS54, RS63, RS65, RS68, RS70, RS76, RV42, RV89, RV94, RV153) และ *Pichia ranongensis* sp. nov. (RV60<sup>T</sup>)

เมื่อเปรียบเทียบผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 3 ช่วงเวลา คือ ตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 (รหัส RV) ซึ่งเป็นช่วงเวลาก่อนเกิดซึนามิ, ตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 (รหัส R1) ซึ่งเป็นช่วงเวลาหลังเกิดซึนามิทันที และตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 (รหัส RS) ซึ่งเป็นช่วงเวลาหลังเกิดซึนามิแล้ว 1 ปี พบว่ายีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 3 ช่วงเวลา คือ *Candida tropicalis* และ *Kodamaea ohmeri* ในขณะที่พบ *Candida rugosa*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *Kodamaea ohmeri* และ *Trichosporon asahii* ในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 และตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 ส่วนยีสต์ที่พบได้ในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 และตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 คือ *C. silvae*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces nepalensis*, *Issatchenkia occidentalis*, *I. orientalis*, *I. siamensis* และ *K. ohmeri* ในขณะที่พบ *C. tropicalis* และ *K. ohmeri* ในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 และ พ.ศ. 2549 สำหรับยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วที่พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงใดช่วงหนึ่งมีดังนี้ ในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 พบเฉพาะ *C. berthetii*, *C. boidinii*, *C. glabrata*, *C. pseudolambica*, *P. caribbica*, *P. sporocuriosa*, *Torulaspota maleeae*, *W. saturnus*, *R. mucilaginoso*, *T. coremiiforme* และ *T. japonicum* ส่วนในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 พบเฉพาะ *C. phangngensis* และ *C. picinguabensis* และในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 พบเฉพาะ *C. butyri*, *C. parapsilosis*, *Galactomyces geotrichum*, *I. terricola*, *P. burtonii*, *P. galeiformis* และ *P. kluyveri* ส่วนยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บมากกว่า 1 ช่วงเวลา คือ สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27127 พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 และ พ.ศ. 2549 และสปีชีส์ที่เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. CS-2008b พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 และ พ.ศ. 2549 ส่วนยีสต์สปีชีส์ที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บในช่วงเวลาเดียว คือ สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Hanseniaspora* sp. ST-464 พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27665, *Hanseniaspora* sp. ST-250 และ *Hanseniaspora* sp. YS DN19 พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2549 สำหรับยีสต์สปีชีส์ใหม่พบ *Candida sanittii* sp. nov. ในตัวอย่างน้ำที่เก็บทั้ง 3 ช่วงเวลา นอกจากนี้ยังพบ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. ในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 และ พ.ศ. 2549 สำหรับยีสต์ที่พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บเพียงช่วงเดียว คือ *Candida laemsonensis* sp. nov. และ *Pichia ranongensis* sp. nov. พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 *Candida andamanensis* sp. nov. พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548 ในขณะที่พบ *Candida mangrovei* sp. nov. และ *Candida ranongensis* sp. nov. เฉพาะในตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี

พ.ศ. 2549 จากการศึกษาี้แสดงให้้เห็นว่ายีสต์ที่พบในตัวอย่างน้ำที่เก็บในแต่ละช่วงเวลามีทั้งชนิดที่เหมือนกันและแตกต่างกัน ซึ่งยีสต์ชนิดที่พบแตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลมาจากการเกิดชีนามิ

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กุสุมาวดี ประสาทศรี. 2549. การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุที่ได้จากป่าชายเลนโดย  
อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มณี ดันตี่รุ่งกิจ. 2544. เทคนิคทางด้านอนุวิทยาเพื่อการจัดจำแนกชนิดของยีสต์. เอกสาร  
ประกอบการฝึกอบรมยีสต์: การจำแนกประเภท การจัดจำแนก การเก็บรักษา และการใช้  
ประโยชน์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิสุทธิ ไบไม้. 2538. สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย. สำนักงานกองทุน  
สนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ.
- สนิท อักษรแก้ว. 2541. ป่าชายเลน นิเวศวิทยาและการจัดการ. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 2.  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยโชคคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Aksornkoae, S., W. Arirob, K. G. Boto, H. T. Chan, P. F. Chong, B. F. Clough, W. K. Gong, S.  
Hardjowigeno, S. Havanond, V. Jintana, C. Khemnark, J. Kongsangchai, S.  
Limpiyaprapant, S. Muksombut, J. E. Ong, A. B. Samarakoon and K. Supappikul. 1991.  
Soil and forestry studies, pp. 35-81. **In The Integrated Multidisciplinary Survey and  
Research Programmed of the Ranong Mangrove Ecosystem.** UNDP/UNESCO  
Regional Mangroves Ecosystem. Project RAS/86/120. Final Report.

Alphey, L. 1997. **DNA Sequencing from Experimental Methods to Bioinformatics.**

Springer-Varlag, Berlin.

Altschul, S. F., T. L. Madden, J. Z. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman.

1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389-3402.

Atlas, R. M., T. A. Horowitz and M. Busdosh. 1978. Prudoe crude oil in Arctic marine ice

water and sediment ecosystems: degradation and interactions with microbial and benthic communities. **J. Fish. Res. Board Can.** 35: 585-590.

Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow. 2000. **Yeasts: Characteristics and Identification.**

Cambridge University Press, Cambridge.

Beech, M. J. and R. R. Davenport. 1971. Isolation, purification and maintenance of yeasts, pp.

153-182. In C. Booth, ed. **Methods in Microbiology Vol. 4.** Academic Press, NewYork.

Boekhout, T. and C. P. Kurtzman. 1996. Principles and methods used in yeast classification and

an overview of currently accepted yeast genera, pp. 1-81. In K. Wolf, ed. **A Handbook: Non conventional Yeasts in Biotechnology.** Springer-Verlag, Berlin.

Butinar, L., S. Santos, I. Spencer-Martins, A. Oren and N. Gunde-Cimerman. 2005. Yeast

diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiol. Lett.** 244: 229-234.

Clemon, K. V., P. S. Park, J. H. McCusker, M. J. McCullough, R. W. Davis and D. A. Stevens.

1997. Application of DNA typing methods and genetic analysis to epidemiology and taxonomy of *Saccharomyces* isolates. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1822-1828.

- Cooke, W. B., H. J. Phaff, M. W. Miller, M. Shifrine and E. P. Knapp. 1960. Yeasts in polluted water and sewage. **Mycologia**. 52: 210–230.
- de Almeida, J. M. G. C. F., 2005. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiol. Ecol.** 53: 295-303.
- de Araujo, F. V., C. A. Soares, A. N. Hagler and L. C. Mendonca-Hagler. 1995. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in Southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 68: 91-99.
- de Garcia, V., S. Brizzio, D. Libkind, P. Buzzini and M. V. Broock. 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. **FEMS Microbiol. Ecol.** 59: 331-341.
- Dunlap, P. V. 2001. **Microbial Diversity**. Academic Press, New York.
- Fell, J. W. 1976. Yeast in oceanic regions, pp. 93-124. In E. B. G. Jones, ed. **Recent Advances in Aquatic Mycology**. Elec, London.
- \_\_\_\_\_, D. G. Ahearn, S. P. Meyers and F. J. Roth. 1960. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida, and adjacent benthic areas. **Limnol. Oceanogr.** 5: 366–371.
- \_\_\_\_\_, T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti and A. Stazzell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetes yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 1351-1371.
- \_\_\_\_\_, A. Stazzell-Tallman and C. P. Kurtzman. 2004. *Lachancea meyersii* sp. nov., an ascosporegenous yeast from mangrove regions in the Bahama Islands. **Mycologia**. 50: 359–363.

- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**. 39: 738-791.
- Guffogg, S. P., S. Thomas-Hall, P. Holloway and K. Watson. 2004. A novel psychrotolerant member of the hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus waticus* sp. nov., **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 275–277.
- Hagler, A. N. and D. G. Ahearn. 1981. Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.** 41: 173-178.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1987. Ecology of Aquatic Yeasts, pp. 181-205. In A. H. Rose and Harrison, eds. **The Yeasts. Vol. 1, 2<sup>nd</sup> edition.** Academic Press, London.
- \_\_\_\_\_, R. B. de Oliveira and L. C. M. Hagler. 1982. Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek.** 48: 53-56.
- Jindamorakot, S., S. Am-In, T. T. Thanh, D. D. Ngo, H. Kawasaki, W. Potacharoen, S. Limtong, M. Tanticharoen and T. Nakase. 2004. *Candida easanensis* sp. nov., *Candida pattaniensis* sp. nov. and *Candida nakhonratchasimensis* sp. nov., three new species of yeasts isolated from insect frass in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 261-269.
- \_\_\_\_\_, S. Limtong, W. Yongmanitchai, M. Tuntirungkij, W. Potacharoen, H. Kawasaki and T. Nakase. 2007. Two new anamorphic yeasts, *Candida thailandica* sp. nov. and *Candida lignicola* sp. nov., isolated from insect frass in Thailand. **FEMS Yeast Res.** 7: 1409-1414.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** 16: 111-120.

- Komagata, K. and T. Nakase. 1967. Reitoshokuin no biseibutsu nikansuru kenkyu. V. Shihan reituoshokushin yori bunri shita kobo no seijo (Microbiological study in foods. V. General properties of yeasts isolated from frozen foods) (in Japanese). **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**. 8: 53-57.
- Kreger-van Rij, N. J. W. 1984. **The Yeasts: A Taxonomic Study, 3<sup>rd</sup> edition**. Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C. P. 1991. *Saturnospora ahearnii*, a new salt marsh yeast from Louisiana. **Antonie van Leeuwenhoek**. 60: 31-34.
- \_\_\_\_\_. 1992. rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 42(1): 1-6.
- \_\_\_\_\_. 2000. Three new ascomycetous yeasts from insect associated arboreal habitats. **Can. J. Microbiol.** 46: 50-58.
- \_\_\_\_\_ and P. A. Blanz. 1998. Ribosomal RNA/DNA Sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships, pp. 69-74. In C. P. Kurtzman and J. W. Fell, eds. **The Yeasts: A Taxonomic Study, 4<sup>th</sup> edition**. Elsevier, Amsterdam.
- \_\_\_\_\_ and J. W. Fell. 1998. **The Yeasts : A Taxonomic Study, 4<sup>th</sup> edition**. Elsevier, Amsterdam.
- \_\_\_\_\_ and C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**. 73: 331-371.

\_\_\_\_\_ and J. Sugiyama. 2001. Ascomycetous yeasts and yeast-like taxa, pp. 179-200. In D. J. McLaughlin and P. A. Lemke, eds. **The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research VII Systematics and Evolution, Part A**. Springer-Verlag, Berlin.

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

\_\_\_\_\_ and W. T. Starmer. 1998. Ecology and yeasts, pp. 21-30. In C. P. Kurtzman and J. W. Fell, eds. **The Yeasts: A Taxonomic Study, 4<sup>th</sup> edition**. Elsevier, Amsterdam.

Lee, C-F., F. L. Lee, W. H. Hus and H. J. Phaff. 1994. *Arthroascus fermentans*, new species isolated from soil in Taiwan. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44: 303-307.

\_\_\_\_\_, C-H. Liu, S-S. Young and K-S. Chang. 2007. *Kazachstania jainicus* sp. nov., an Ascomycetous yeast species isolated from soil in Taiwan. **FEMS Yeast Res.** pp. 1-5.

Libkind, D., M. Gadanho, M. V. Broock and J. P. Sampaio. 2005. *Sporidiobolus longiusculus* sp. nov. and *Sporobolomyces patagonicus* sp. nov., novel yeasts of the Sporidiobolales isolated from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 503-509.

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

\_\_\_\_\_, N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Kawasaki, H. Yurimoto, T. Nakase and N. Kato. 2004. Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp. nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolated in Thailand.

**J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 119-127.

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

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 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.

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

Mikata, K., K. Ueda-Nishimura and T. Hisatomi. 2001. Three new species of *Saccharomyces sensu lato* van der Walt from Yaku Island in Japan: *Saccharomyces naganishii* sp. nov., *Saccharomyces humaticus* sp. nov. and *Saccharomyces yakushimaensis* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 2189-2198.

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

\_\_\_\_\_, M. Hamamoto and K. Horikoshi. 2006. *Rhodotorula pacifica* sp. nov., a novel yeast species from sediment collected on the deep-sea floor of the north-west Pacific Ocean. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 295-299.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, T. Nakase and K. Horikoshi. 1999. *Kluyveromyces nonfermentans* sp. nov., a new yeast species isolated from the deep sea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 49: 1899-1905.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 2003a. *Rhodotorula benthica* sp. nov. and *Rhodotorula calyptogena* sp. nov., novel yeast species from animals collected from the deep-sea floor, and *Rhodotorula lysiniphila* sp. nov., which is related phylogenetically. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 897-903.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, Y. Takaki and K. Horikoshi. 2003b. *Cryptococcus surugaensis* sp. nov., a novel yeast species from sediment collected on the deep-sea floor of Suruga Bay. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 2095-2098.

Nagatsuka, Y., H. Kawasaki, K. Mikata and T. Seki. 2005. *Candida khmerensis* sp. nov., a novel cation-tolerant yeast isolated from dry salted shrimp and sewage in Cambodia. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 51: 235-243.

Nakase, T. 2001. What is the 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.

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

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

Phaff, H. J. 1990. Isolation of yeasts from natural sources, pp. 53-76. In D. P. Labeda, ed. **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**. Mc Graw Hill Publishing Company, New York.

- \_\_\_\_\_. 1998. Chemotaxonomy based on the polysaccharide composition of cell walls and capsules, pp. 45-47. In C. P. Kurtzman and J. W. Fell, eds. **The Yeasts: A Taxonomic Study, 4<sup>th</sup> edition**. Elsevier, Amsterdam.
- \_\_\_\_\_ and W. T. Starmer. 1980. Specificity of natural habitats for yeasts and yeast-like organisms, pp. 79-101. In F. A. Skinner, S. M. Passmore and R. R. Davenport, eds. **Biology and Activities of Yeast**. Academic Press, London.
- \_\_\_\_\_ and W. T. Starmer. 1987. Yeast associated with plants, insects and soil, pp. 123-180. In A. H. Rose and J. S. Harrison, eds. **The Yeasts Vol. 1: Biology of Yeasts**. Academic Press, New York.
- Piskur, J., S. Smole, C. Groth, R. F. Petersen and M. B. Pedersen. 1998. Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus *Saccharomyces*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 48: 1015-1024.
- Prescott, L. M., J. P. Harley and D. A. Klein. 1999. **Microbiology 4<sup>th</sup> edition**. McGraw Hill Publishing Company, New York.
- Pohl, C. H., J. L. F. Kock, P. W. J. van Wyk and J. Albertyn. 2006. *Cryptococcus anemochoreius* sp. nov., a novel anamorphic basidiomycetous yeast isolated from the atmosphere in central South Africa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 2703–2706.
- Roeijmans, H., H. Prillinger, C. Umile, J. Sugiyama, T. Nakase and T. Boekhout. Analysis of carbohydrate composition of cell walls and extracellular carbohydrates, pp. 103-105. In C. P. Kurtzman, and J. W. Fell, eds. **The Yeasts: a Taxonomic Study, 4<sup>th</sup> edition**. Elsevier, Amsterdam.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4: 406-425.

- Saluja, P. and G. S. Prasad. 2007. *Debaryomyces singareniensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from a coal mine soil in India. **FEMS Yeast Res.** 7: 482-488.
- Sieburth, J. M. 1979. **Sea Microbes**. Oxford University Press, New York.
- Spencer, J. F. T. and D. M. Spencer. 1997. Ecology: Where yeast live, pp. 35-58. In J. F. T. Spencer and D. M. Spencer, eds. **Yeasts in Natural and Artificial Habitats**. Springer-Verlag, 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.
- Stillan, J. 2008. **Eukaryotic ribosomal gene structure (tandem repeats)**. Biology 221-Molecular Biology. Available Source: [http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/110300/rna\\_polymerases.html](http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/110300/rna_polymerases.html), April 8, 2008.
- Sumpradit, T. 2006. **Yeast diversity in soils from hill evergreen, mixed deciduous, dry dipterocarp, and pine forest of Nam Nao National Park**. Ph. D. thesis, Kasetsart University.
- \_\_\_\_\_, S. Limtong, W. Yongmanitchai, H. Kawasaki and T. Seki. 2005. *Tetrapisispora namnaonensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from forest soil of Nam Nao National Park, Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 1735-1738.
- Takashima, M. 2001. Molecular phylogeny. Lecture Note for **Workshop on Yeasts: Classification, Identification, Preservation and Application**. At Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Thanh, V. N. 2006. *Lipomyces orientalis* sp. nov., a yeast species isolated from soil in Vietnam.

**Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 2009–2013.

\_\_\_\_\_, S. S. Martha, N. Moleleki and J. W. Fell. 2004. *Rhodotorula cycloclastica* sp. nov., *Rhodotorula retinophila* sp. nov. and *Rhodotorula terpenoidalis* sp. nov., three limonene-utilizing yeasts isolated from soil. **FEMS Yeast Res.** 4: 857-863.

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

Vadkertiova, R. and E. Slavikova. 1994. Yeasts from sediment and soils along the lake Jakubov. **Abstract Book of IUMS Congress' 94, 7<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division and 7<sup>th</sup> International Congress of mycology Division Prague.** Czech Republic.

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

Walker, G. M. 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology.** Wiley, Chichester.

Wei, Z. W. and F. Y. Bai. 2005. *Kazachstania aquatica* sp. nov. and *Kazachstania solicola* sp. nov., novel ascomycetous yeast species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 2219-2224.

Woollett, L. L. and L. R. Hedrick. 1970. Ecology of yeasts in polluted water. **Antonie van Leeuwenhoek.** 36: 427-435.

Yamada, Y. 1998. Identification of coenzyme Q (ubiquinone) homologs, pp. 59-77. In C. P. Kurtzman and J. W. Fell, eds. **The Yeasts: A Taxonomic Study, 4<sup>th</sup> edition.** Elsevier, Amsterdam.

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

**ภาคผนวก**

ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. Yeast extract malt extract (YM) agar

ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์	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

ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

### 3. Acidified yeast extract malt extract agar

ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
คลอแรมฟินิคอล	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

ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์	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

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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 5% malt extract agar

มอลท์เอ็กซ์แทรกซ์	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. Gorodkova 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)

ยีสต์ <sup>๓</sup> ไนโตรเจนเบส (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 ที่ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดสอบ 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) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 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  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  0.5 กรัม โปแตสเซียมไนเตรต ( $\text{KNO}_3$ ) 0.78 กรัม โซเดียมไนไตรต์ ( $\text{NaNO}_2$ ) 0.26 กรัม เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (ethylamine-HCl) 0.64 กรัม แอล-ไลซีน (L-lysine-HCl) 0.56 กรัม และคาดาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverinedihydrochloride) 0.68 กรัม

## 16. อาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

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

## 17. Fermentation basal medium

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	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

รุกรอง 0.2 ไมครอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์  
(ยกเว้นราฟฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์)

#### 18. Fermentation test of glucose

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	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

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	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. อาหารตรวจสอบความต้านทานไซโคลเฮกซอไมด์

### 1) การเตรียม Basal medium (10X)

ไซโคลเฮกซอไมด์ 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) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตรซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร

## 22. การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

### 1) อาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์

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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

## 2) อาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์

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

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

## 3) อาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 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 กับ โซเดียมคลอไรด์ 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 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	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

ละลายให้เข้ากัน โดยใช้ น้ำรีเวอร์สออสโมซิส 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

ละลายให้เข้ากัน โดยใช้น้ำรีเวอร์สออสโมซิส ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 6. Stock ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 7. Loading dye

บรอมฟีนอล บลู	0.25	กรัม
กลีเซอรอล	30	มิลลิลิตร
เติมน้ำรีเวอร์สออสโมซิสให้ครบ	100	มิลลิลิตร

## 8. เอทานอล/โซเดียมอะซิเตท

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

**ภาคผนวก ข**

ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542 กับ พ.ศ. 2548 และยีสต์ที่แยกได้

ตารางผนวกที่ ข1 การเก็บตัวอย่างน้ำ ลักษณะของตัวอย่าง จำนวนยีสต์ และยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2541-2542

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	จุดเก็บ	ตำแหน่ง ที่เก็บ	อุณหภูมิ ( <sup>o</sup> C)	พีเอช	ความเค็ม (ppt)	จำนวนยีสต์ (เซลล์/100 มล.)	รหัวยีสต์ที่แยกได้
13 ธ.ค. 41	1	น้ำบน	25.3	7.74	0	52	RV1, RV2, RV3, RV4, RV5, RV6, RV7
		น้ำล่าง	24.4	7.43	0	108	RV22, RV24, RV25
13 ธ.ค. 41	2	น้ำบน	23.3	7.42	0	230	RV8, RV9, RV10
		น้ำล่าง	23.3	7.29	0	112	RV26, RV27, RV28
13 ธ.ค. 41	3	น้ำบน	25.8	7.29	10	151	RV11, RV13
		น้ำล่าง	25.9	7.24	12	197	RV29, RV30, RV31, RV34
13 ธ.ค. 41	4	น้ำบน	25.0	7.58	16	22	RV17
		น้ำล่าง	24.9	7.66	28	59	RV35, RV36
13 ธ.ค. 41	5	น้ำบน	26.0	7.42	16	31	RV19
		น้ำล่าง	26.0	7.29	25	173	RV39, RV40, RV42
26 เม.ย. 42	1	น้ำบน	25.4	6.75	0	23	RV57, RV59
		น้ำล่าง	25.9	7.78	0	31	-
26 เม.ย. 42	2	น้ำบน	25.8	6.83	0	27	RV60, RV61, RV62, RV63
		น้ำล่าง	25.9	7.54	0	22	RV79, RV81

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	จุดเก็บ	ตำแหน่ง ที่เก็บ	อุณหภูมิ ( <sup>0</sup> C)	พีเอช	ความเค็ม (ppt)	จำนวนยีสต์ (เซลล์/100 มล.)	รหัสยีสต์ที่แยกได้
26 เม.ย. 42	3	น้ำบน	26.0	6.70	10	125	RV64
		น้ำล่าง	27.0	7.00	12	103	RV82, RV83, RV85, RV86
26 เม.ย. 42	4	น้ำบน	28.3	6.90	16	70	-
		น้ำล่าง	28.0	7.10	28	70	RV87, RV88, RV89, RV90, RV91, RV92, RV93, RV94
26 เม.ย. 42	5	น้ำบน	29.6	6.60	16	72	RV71, RV73, RV74
		น้ำล่าง	28.9	6.60	25	86	RV95, RV96, RV97
29 ก.ค. 42	1	น้ำบน	25.4	7.43	0	60	RV132, RV133
		น้ำล่าง	20.1	7.16	0	53	RV134, RV135, RV137
29 ก.ค. 42	2	น้ำบน	25.2	7.40	0	126	RV138, RV139, RV140
		น้ำล่าง	24.5	7.40	0	98	RV143
29 ก.ค. 42	3	น้ำบน	27.0	7.79	10	78	RV144, RV145, RV147
		น้ำล่าง	26.8	7.71	10	85	RV148, RV149

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	จุดเก็บ	ตำแหน่ง ที่เก็บ	อุณหภูมิ ( <sup>o</sup> C)	พีเอช	ความเค็ม (ppt)	จำนวนยีสต์ (เซลล์/100 มล.)	รหัสยีสต์ที่แยกได้
29 ก.ค. 42	4	น้ำบน	28.3	8.23	30	33	RV151, RV152, RV153
		น้ำล่าง	28.2	8.18	30	33	RV155
29 ก.ค. 42	5	น้ำบน	28.1	8.16	27	30	RV157, RV158, RV160, RV161
		น้ำล่าง	28.1	8.14	27	82	RV162, RV165, RV170

ตารางผนวกที่ ข2 การเก็บตัวอย่างน้ำ ลักษณะของตัวอย่าง จำนวนยีสต์ และยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำที่เก็บเมื่อปี พ.ศ. 2548

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	จุดเก็บ	ตำแหน่ง ที่เก็บ	อุณหภูมิ ( <sup>0</sup> C)	พีเอช	ความเค็ม (ppt)	จำนวนยีสต์ (เซลล์/100 มล.)	รหัสยีสต์ที่แยกได้
29 ม.ค. 48	1	น้ำบน	27.5	7.73	34	50	R1-7, R1-8, R1-9, R1-10, R1-11, R1-20, R1-22
		น้ำล่าง	28.9	8.19	34	79	R1-1, R1-2, R1-3, R1-4, R1-5, R1-6, R1-21
29 ม.ค. 48	2	น้ำบน	28.7	8.24	34	125	-
		น้ำล่าง	29.7	8.02	34	20	R1-12, R1-13, R1-14, R1-15, R1-16, R1-17, R1-18, R1-19, R1-23, R1-25, R1-26, R1-27, R1-29, R1-30, R1-31, R1-32, R1-33, R1-34

**ภาคผนวก ค**

ผลงานที่ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร FEMS Yeast Research

FEMS Yeast Research

YEAST  
RESEARCH

<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

**Kluyveromyces siamensis sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from water in a mangrove forest in Ranong Province, Thailand**

Journal:	<i>FEMS Yeast Research</i>
Manuscript ID:	FMSYR-08-01-0013.R1
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	28-Mar-2008
Complete List of Authors:	Am-In, Somjit; Kasetsart University, Microbiology Yongmanitchai, Wichien; Kasetsart University, Department of Microbiology Limtong, Savitree; Faculty of Science, Department of Microbiology
Keywords:	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov., novel species, ascomycetous yeast, water, mangrove forest, Thailand

 scholarONE  
Manuscript Central

## FEMS Yeast Research

1 **Full paper**2 ***Kluyveromyces siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from**  
3 **water in a mangrove forest in Ranong Province, Thailand**

4 Somjit Am-In, Wichien Yongmanitchai &amp; Savitree Limtong

5

6 Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900,

7 Thailand

8

9 **\*Correspondence:** Savitree Limtong, Department of Microbiology, Faculty of

10 Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand. Tel.: +66 2 562 5444, ext: 4017;

11 fax: +66 2 579 2081; e-mail: [fscistl@ku.ac.th](mailto:fscistl@ku.ac.th)

12

13 **Keywords:** *Kluyveromyces siamensis* sp. nov.; novel species; ascomycetous yeast; water;

14 mangrove forest and Thailand

15

16

17

18

19

20

21

## FEMS Yeast Research

1 **Abstract**

2 Seven strains of a novel *Kluyveromyces* species were isolated from seven water samples  
3 collected from a mangrove forest. Analysis of the D1/D2 domain of the large subunit (LSU)  
4 rRNA gene sequences revealed that the sequences of five strains (RS8<sup>T</sup>, RS20, RS54, RV42,  
5 and RV89) were identical and differed from the other two strains (RS65 and RV153) by only  
6 one nucleotide substitution in 544 nucleotides. The closest species in terms of pairwise  
7 sequences similarity was *Kluyveromyces aestuarii*, but the level of nucleotide substitution  
8 (6-7 nucleotide substitutions in 544 nt) was sufficient to justify the description of a separate  
9 species. The phylogenetic tree based on the sequence of the D1/D2 domain of the LSU rRNA  
10 gene rather suggested that the new species is a sister species of *K. aestuarii* and form a clade  
11 with the other six recognized species of *Kluyveomyces*. Sequence analysis of the internal  
12 transcribed spacer (ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2) region supported their distinct status as a  
13 species. The phenotypic characteristics of the seven strains were typical of the genus  
14 *Kluyveromyces*. On this basis the seven strains were assigned to a single novel species of the  
15 genus *Kluyveromyces*, for which the name *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. is proposed.  
16 The type strain is RS8<sup>T</sup> (BCC 25962<sup>T</sup> = NBRC 103859<sup>T</sup> = CBS 10860<sup>T</sup>).

17

18 **Introduction**

19 The ascomycetous yeast genus *Kluyveromyces* was first proposed by van der walt (1956)  
20 to accommodate *K. polysporus*. Van der walt (1965) transferred a number of *Saccharomyces*  
21 species to the genus *Kluyveromyces*. In the description of the genus *Kluyveromyces* in "The  
22 Yeasts, A Taxonomic Study, 4<sup>th</sup> edition, *Kluyveromyces* consisted of 15 species which  
23 *K. polysporus*, the type species, was included (Lachance, 1998). Nagahama *et al.* (1999)  
24 described a novel species of the genus *Kluyveromyces* as *K. nonfermentans*. On the basis of  
25 multigene analyses of Kurtzman (2003) only six species, *K. aestuarii*, *K. dobzhanskii*, *K.*

## FEMS Yeast Research

1 *lactis*, *K. maxianus*, *K. wickerhamii* and *K. nonfermentans* are continued to be the recognized  
2 species of the genus *Kluyveromyces*. Though the original type species *K. polysporus*, was  
3 transferred to the genus *Vanderwaltozyma*, Kurtzman *et al.* (2001) proposed to conserve the  
4 genus *Kluyveromyces*. The proposal has been officially accepted by the International  
5 Botanical Congress and *K. maxianus* was chosen as the new type species (Lachance, 2007).

6  
7 In mangrove ecosystems yeasts play an important role in the detrital food web that  
8 they may be a food source of some marine invertebrates and zooplanktons (Nagahama,  
9 2006). Yeasts are abundant in the water adjacent to and within mangrove swamps (Fell *et al.*,  
10 2004). Recently, *Lachancea meyersii* was described for 18 strains isolated from waters in  
11 mangrove habitats in the northern Bahamas (Fell *et al.*, 2004). In Thailand, we reported that  
12 yeasts could be isolated from all 32 water samples collected from the surface and below the  
13 surface the two mangrove forests in Khao Lumpee-Haad Thaimueang National Park (8<sup>0</sup> N,  
14 98<sup>0</sup> E) and Mu Ko Ra-Ko Prathong National Park (9<sup>0</sup> N, 98<sup>0</sup> E), Phang-Nga Province, and the  
15 two novel species, *Candida thaimueangensis* and *Candida phangngensis* were described  
16 (Limtong *et al.*, 2007b; 2008).

17  
18 In the course of investigation of yeasts in waters in a mangrove forest in Laem Son  
19 National Park (9<sup>0</sup> N, 98<sup>0</sup> E), Ranong Province, Thailand. Seven strains (RS8<sup>T</sup>, RS20, RS54,  
20 RS65, RV42, RV89 and RV153) were found to represent a novel species of the genus  
21 *Kluyveromyces*, therefore, in this study we describe and propose *Kluyveromyces siamensis*  
22 sp. nov.

23

24

25

## FEMS Yeast Research

**1 Materials and methods****2 Yeast strains**

3 Seven yeast strains, RS8<sup>T</sup>, RS20, RS54, RS65, RV42, RV89 and RV153, were isolated  
4 from seven water samples collected from a mangrove forest in Laem Son National Park  
5 (9<sup>o</sup> N, 98<sup>o</sup> E), Ranong Province, Thailand by membrane filtration following the method of  
6 Limtong *et al.* (2007b). Purified yeast strains were suspended in yeast extract malt extract  
7 (YM) broth (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone and 1% glucose)  
8 supplemented with 10% glycerol and maintained at -80<sup>o</sup>C.

9

**10 DNA sequencing and phylogenetic analysis**

11 The sequences of the D1/D2 domain of the large subunit (LSU) rRNA gene and the internal  
12 transcribed spacer (ITS) (ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2) region were determined from PCR  
13 products from genomic DNA extracted from yeast cells by using a slightly modified version  
14 of the method described by Lachance *et al.* (1999). The D1/D2 domain of the LSU rRNA  
15 gene was amplified by a PCR with the forward primer NL1 and the reverse primer NL4  
16 (O'Donnell, 1993), amplification of the ITS region including the 5.8S rRNA gene was done  
17 with the forward primer pITS-F and the reverse primer pITS-R (Sugita *et al.*, 1999). The PCR  
18 product was checked by agarose gel electrophoresis, purified using the QIAquick purification  
19 kit (Qiagen) and cycle-sequenced using ABI BigDye terminator cycle sequencing kit, version  
20 3.1 (Applied Biosystems) with the external primers, NL1 and NL4, for the D1/D2 domain  
21 (Kurtzman & Robnett, 1998) and the external primers, pITS-F and pITS-R, for the ITS region  
22 (Sugita *et al.*, 1999). The sequences were determined with ABI PRISM 3100 automated DNA  
23 sequencer (Applied Biosystems) according to the instructions of the manufacturer. The  
24 sequences were compared pairwise by using BLASTn homology search program (Altschul *et*  
25 *al.*, 1997) and were aligned with the sequences of related species retrieved from GenBank by

## FEMS Yeast Research

1 using the multiple alignment program CLUSTAL\_X version 1.81 (Thompson *et al.*, 1997). A  
2 phylogenetic tree was constructed from the evolutionary distance data with Kimura's two-  
3 parameter correction (Kimura, 1980), by using the neighbour-joining method (Saitou & Nei,  
4 1987). Confidence levels of the clades were estimated from bootstrap analysis (1000  
5 replicates) (Felsenstein, 1985).

6

### 7 **Examination of taxonomic characteristics**

8 The strains were characterized morphologically, biochemically and physiologically according  
9 to the standard methods described by Yarrow (1998). Assimilation of nitrogen compounds  
10 was investigated on solid media with starved inocula following the method of Nakase &  
11 Suzuki (1986). Vitamin requirement was determined according to the method of Komagata &  
12 Nakase (1967). Growth at various temperatures was determined by cultivation in YM broth.

13

### 14 **Ubiquinone system**

15 Ubiquinones were extracted from intact cells cultivated in yeast extract peptone dextrose  
16 (YPD) broth (1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose) on a rotary shaker at 28 °C for  
17 24-48 h and purified according to the methods described by Yamada & Kondo (1973) and  
18 Kuraishi *et al.* (1985). Isoprenologues were identified by HPLC as described previously  
19 (Limtong *et al.*, 2007a).

20

## 21 **Results and discussion**

### 22 **Phylogenetic analysis**

23 The sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene of the five strains (RS8<sup>T</sup>, RS20,  
24 RS54, RV42, and RV89) were identical and differed from the other two strains (RS65 and  
25 RV153) by only one nucleotide substitution in 544 nucleotides (nt). The closet species in

1 terms of pairwise sequence similarity was *Kluyveromyces aestuarii* but with 1.1-1.3%  
2 nucleotide substitutions (6-7 nucleotide substitutions in 544 nt). According to Kurtzman &  
3 Robnett (1998), yeast strains showing nucleotide substitutions greater than 1% in the D1/D2  
4 domain of the LSU rRNA gene are usually different species. The phylogenetic tree based on  
5 the sequence of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene rather suggested that the new  
6 species is a sister species of *K. aestuarii* and form a clade with the other six recognized  
7 species of the genus *Kluyveromyces*, *K. aestuarii*, *K. dozhanskii*, *K. lactis*, *K. maxianus*,  
8 *K. wickerhamii* and *K. nonfermentans* which constitute a monophyletic clade (Fig. 1).  
9 Therefore, the seven novel strains are considered to represent a single novel phylogenetically  
10 distinct species. As the difference in the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene was relatively  
11 small, therefore the ITS region was determined to confirm the distinct status of the novel  
12 species. The sequences of the ITS region of the five strains (RS8<sup>T</sup>, RS54, RV42, RV89 and  
13 RV153) were identical and differed from the other two strains (RS20 and RS65) by only one  
14 nucleotide substitution in 636 nucleotides. The closet species to the seven strains in terms of  
15 pairwise ITS region sequence similarity was *K. aestuarii* but with 1.0 -1.1% nucleotide  
16 substitutions (6-7 nucleotide substitutions in 636 nt). Sugita *et al.* (1999) indicated that  
17 conspecific yeast strains usually have a nucleotide difference of less than 1% in the internal  
18 transcribed spacer (ITS) (ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2) region. These results lend further  
19 supported to the conclusion that the seven strains represent a single novel species of the  
20 genus *Kluyveromyces* closely related to *K. aestuarii*.

## FEMS Yeast Research

1 **Phenotypic characteristics**

2 Cells of *Kluyveromyces siamensis* were spheroidal to ellipsoidal, proliferated by multilateral  
 3 budding, and formed one to four spheroidal ascospores in a conjugated and evanescent ascus  
 4 that may be produced parthenogenetically or by conjugation between a cell and its bud or  
 5 between independent cells. Pseudohyphae were formed but true hyphae were not formed.  
 6 *Kluyveromyces siamensis* fermented glucose, did not assimilate nitrate, gave negative results  
 7 for the diazonium blue B and urease reactions and had Q-6 as the major ubiquinone as do  
 8 other members of the genus *Kluyveromyces*.

9 The novel species, *Kluyveromyces siamensis* differed from *Kluyveromyces aestuarii*,  
 10 its closet phylogenetic relative by some phenotypic characteristics as shown in Table 1.

11 On the basis of the data reported above, it is therefore concluded that the seven strains  
 12 represent a single novel species of the genus *Kluyveromyces*. The name *Kluyveromyces*  
 13 *siamensis* sp. nov. is proposed for these strains.

14 **Latin diagnosis of *Kluyveromyces siamensis* Am-In, Yongmanitchai et**15 **Limtong sp. nov.**

16 In medio liquido: 'YM', post dies 3 ad 28 °C cellulae globosae aut ellipsoideae  
 17 (2.3-5.4 x 2.3-6.9 µm), singulae aut binae, per germinationem multipolarem reproducentes.

18 In agar 'YM', post dies 3 ad 28 °C, cultura butyrosa, crenea, sublatum, glabra et margine  
 19 glabra. Pseudohyphae formantur nec hyphae non formantur. Ascus formatur per  
 20 parthenogenesis vel conjunction. Ascosporae globosae, 1-4 in asco.

21 D-Glucosum, sucrosus et raffinosis (exiguis) fermentantur at non D-galactosus,  
 22 maltosus, lactosus, trehalosus nec melibiosus. D-Glucosus, D-galactosus, L-sorbosus,  
 23 sucrosus, cellobiosus, lactosus, raffinosis, D-xylosus, ethanolus, glycerolus, ribitolus  
 24 (lente), D-mannitolus, D-glucitolus, salicinus, D-glucono-δ-lactonus, acidus DL-

## FEMS Yeast Research

1 lacticum, acidum succinicum assimilantur at non maltosum, trehalosum, melibiosum,  
 2 melizitosum, inulinum, amyllum solubile, L-arabinosum, D-arabinosum, D-ribosum, L-  
 3 rhamnosum, *N*-acetyl-D-glucosaminum, methanolum, erytritolum, galactitolum,  $\alpha$ -methyl-D-  
 4 glucosidum, acidum D-gluconicum, acidum D-glucuronicum, acidum D-galacturonicum,  
 5 acidum 2-keto-D-gluconicum, acidum 5-keto-D-gluconicum, acidum citricum nec  
 6 inositolum. Ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilantur at non nitrosum nec  
 7 nitricum. Vitamina externa ad crescentiam necessaria non sunt. Crescit in 10% NaCl/5%  
 8 glucosum et non crescit in 15% NaCl/5% glucosum. Non crescit in 0.01% cycloheximido et  
 9 0.1% cycloheximido. Crescit in 50% glucosum et 60% glucosum. Crescere potest in  
 10 temperatura 37 (infirmis) et 42°C (infirmis). Diazonium caeruleum B non respondens. Ureum  
 11 non hydrolysat. Ubiquinonum majus: Q-6.

12 Holotypus: Stirps RS8 isolatus aqua, Ranong Provincia, Thailandia. Cultura et  
 13 conservatus in Collectione Culturarum in BIOTEC Culture Collection (BCC), National  
 14 Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailandia ut  
 15 BCC 25962<sup>T</sup>; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology,  
 16 National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonia conservatus ut NBRC  
 17 103859<sup>T</sup> et Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands ut  
 18 CBS 10860<sup>T</sup>.

19

20 **Description of *Kluyveromyces siamensis* Am-In, Yongmanitchai & Limtong**  
 21 **sp. nov.**

22 Growth in YM broth: After 3 days at 28 °C, cells are spheroidal to ellipsoidal  
 23 (2.3-5.4 x 2.3-6.9  $\mu$ m) and occur singly or in pairs (Fig. 2). Budding is multilateral. Growth  
 24 on YM agar: After 3 days at 28 °C, the streak culture is butyrous, cream-coloured, raised,

**FEMS Yeast Research**

1 with a smooth surface and have an entire margin. Formation of hyphae: Slide culture on corn  
 2 meal agar after 7 days at 28 °C, pseudohyphae are formed but true hyphae are not formed  
 3 (Fig. 2).

4 Formation of ascospores: Ascospores are produced on YM agar, 5% malt extract agar,  
 5 corn meal agar, Gorodkova agar and Fowell's acetate agar after 3 days at 28 °C. The ascus is  
 6 evanescent and formed parthenogenetically or by conjugation between a cell and its bud or  
 7 between independent cells. Ascospores are spheroidal and one to four ascospores are formed  
 8 in one ascus. No pellicle is present on the surface of assimilation medium.

9

10 Fermentation

11	D-Glucose	+
12	D-Galactose	-
13	Sucrose	+
14	Maltose	-
15	Lactose	-
16	Trehalose	-
17	Raffinose	Weak
18	Melibiose	-

19

20 Assimilation of carbon compounds

21	D-Glucose	+
22	D-Galactose	+
23	L-Sorbose	+
24	Sucrose	+
25	Maltose	-
26	Cellobiose	+

## FEMS Yeast Research

1	Trehalose	-
2	Lactose	+
3	Melibiose	-
4	Raffinose	+
5	Melizitose	-
6	Inulin	-
7	Soluble starch	-
8	D-Xylose	+
9	L-Arabinose	-
10	D-Arabinose	-
11	D-Ribose	-
12	L-Rhamnose	-
13	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	-
14	Methanol	-
15	Ethanol	+
16	Glycerol	+
17	Erythritol	-
18	Adonitol (Ribitol)	Delayed
19	Galactitol	-
20	D-Mannitol	+
21	D-Glucitol	+
22	$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-
23	Salicin	+
24	D-Gluconic acid	-
25	D-Glucuronic acid	-

## FEMS Yeast Research

1	D-Galacturonic acid	-
2	D-Glucono- $\delta$ -lactone	+
3	2-Keto-D-gluconate	-
4	5-Keto-D-gluconate	-
5	DL-Lactic acid	+
6	Succinic acid	+
7	Citric acid	-
8	Inositol	-
9		
10	Assimilation of nitrogen compounds	
11	Nitrate	-
12	Nitrite	-
13	Ethylamine	+
14	L-Lysine	+
15	Cadaverine	+
16		
17	Growth in vitamin-free medium	+
18	Growth on NaCl 10% and Glucose 5%	+
19	Growth on NaCl 15% and Glucose 5%	-
20	Growth on medium containing 0.01% cycloheximide	-
21	Growth on medium containing 0.1% cycloheximide	-
22	Growth on medium with 50% glucose	+
23	Growth on medium with 60% glucose	+
24	Growth at 20 °C	+
25	Growth at 25 °C	+

#### FEMS Yeast Research

1	Growth at 37 °C	Weak
2	Growth at 42 °C	Weak
3	Diazonium blue B color reaction	-
4	Urease	-
5	Acid formation from glucose	+
6	Amyloid production	-
7	Major ubiquinone	Q-6

8

9           Holotype: RS8 is the holotype of *Kluyveromyces siamensis*. The strain was isolated  
10 from estuarine water collected from a mangrove forest in Laem Son National Park, Ranong  
11 Province, Thailand. The living culture from type was deposited at the BIOTEC Culture  
12 Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC),  
13 Pathumthani, Thailand, as BCC 25962<sup>T</sup>; NITE Biological Resources Center (NBRC),  
14 Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba,  
15 Japan, as NBRC 103859<sup>T</sup> and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the  
16 Netherlands as CBS 10860<sup>T</sup>.

17           Etymology: The species epithet *siamensis* (si.a.men'sis N.L. fem. adj. *siamensis*)  
18 referring to Siam, the old name of Thailand, where the strains were isolated.

19

#### 20 **Acknowledgements**

21 We are grateful to “Biodiversity Research and Training Program”, Thailand for the financial  
22 support. We thank Dr Sasitorn Jindamorakot and Ms Suthida Tuntigumton for laboratory  
23 assistance.

24

25

## 1 **References**

- 2 Altschul SF, Madden TL, Schäffer JZ, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997)  
3 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.  
4 *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- 5 Fell JW, Statzell-Tallman I A, & Kurtzman CP (2004) *Lachancea meyersii* sp. nov., an  
6 ascosporogenous yeast from mangrove regions in the Bahama Islands. *Mycologia* **50**:  
7 359–363.
- 8 Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.  
9 *Evolution* **39**: 783-791.
- 10 Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions  
11 through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**: 111-120.
- 12 Komagata K & Nakase T (1967) Reitoshokuin no biseibutsu nikansuru kenkyu V. Shihan  
13 reitushokushin yori bunri shita kobo no seijo (Microbiological study in foods. V.  
14 General properties of yeasts isolated from frozen foods) (in Japanese). *Shokuhin*  
15 *Eiseigaku Zasshi* **8**: 53-57.
- 16 Kuraishi H, Katayama-Fujimura Y, Sugiyama J & Yokoyama T (1985) Ubiquinone systems  
17 in fungi I. Distribution of ubiquinones in the major families of ascomycetes,  
18 basidimycetes and deuteromycetes, and their taxonomic implications. *Trans Mycol Soc*  
19 *Jpn* **26**: 383–395.
- 20 Kurtzman CP (2003) Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and  
21 other members of the the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera  
22 *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulaspota*. *FEMS*  
23 *Yeast Res* **4**: 233–245.

## FEMS Yeast Research

- 1 Kurtzman CP, Lachance MA, Nguyen HV & Prillinger H (2001) Proposal to conserve the  
2 name *Kluyveromyces* with a conserved type (Ascomycota: Hemiascomycetes,  
3 Saccharomycetaceae). *Taxonomy* **50**: 907–908.
- 4 Kurtzman CP & Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts  
5 from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie*  
6 *van Leeuwenhoek* **73**: 331–371.
- 7 Lachance MA (1998) *Kluyveromyces*. van der Walt emend. van der Walt. *The Yeasts, A*  
8 *Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 227–247. Elsevier,  
9 Amsterdam, the Netherlands.
- 10 Lachance MA (2007) Current status of *Kluyveromyces* systematics. *FEMS Yeast Res* **7**:  
11 642–645.
- 12 Lachance MA, Bowles JM, Starmer WT & Barker SF (1999) *Kodamaea kakaduensis* and  
13 *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers.  
14 *Can J Microbiol* **45**: 172–177.
- 15 Limtong S, Yongmanitchai W, Tun MM, Kawasaki H & Seki T (2007a) *Kazachstania*  
16 *siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from forest soil in Thailand. *Int J Syst*  
17 *Evol Microbiol* **57**: 419–422.
- 18 Limtong S, Yongmanitchai W, Kawasaki H & Seki T (2007b) *Candida thaimueangensis* sp.  
19 nov., an anamorphic yeast species from estuarine water in mangrove forest in Thailand.  
20 *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 650–653.
- 21 Limtong S, Yongmanitchai W, Kawasaki H & Seki T (2008) *Candida phangngensis* sp. nov.,  
22 an anamorphic yeast species in the *Yarrowia* clade, isolated from water in mangrove  
23 forest in Phang-Nga Province, Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* (in press).

## FEMS Yeast Research

- 1 Nagahama T (2006) Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environment.  
2 *The Yeast Handbook, Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (Rosa CA & Gábor Péter,  
3 eds), pp. 241-262. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- 4 Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T & Horikoshi K (1999) *Kluyveromyces nonfermentans*  
5 sp. nov., a new yeast species isolated from the deep sea. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 1899–  
6 1905.
- 7 Nakase T & Suzuki M (1986) *Bullera megalospora*, a new species of yeast forming larger  
8 ballistospores isolated from dead leaves of *Oryza sativa*, *Miscanthus sinensis* and *Sasa* sp.  
9 in Japan. *J Gen Appl Microbiol* **32**: 225-240.
- 10 O'Donnell K (1993) *Fusarium* and its near relatives. *The Fungal Holomorph: Mitotic,*  
11 *Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (Reynolds DR & Taylor JW,  
12 eds), pp. 225-233. Wallingford, UK: CAB International.
- 13 Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing  
14 phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- 15 Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R & shinoda T (1999) Identification of medically relevant  
16 *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and  
17 construction of a database for *Trichosporon* identification. *J Clin Microbiol* **37**: 1985-  
18 1993.
- 19 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) CLUSTAL\_X  
20 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality  
21 analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- 22 van der Walt JP (1956) *Kluyveromyces* – a new yeast genus of the Endomycetales. *Antonie*  
23 *van Leeuwenhoek* **22**: 265–272.
- 24 van der Walt JP (1965) The emendation of the genus *Kluyveromyces* van der Walt. *Antonie*  
25 *van Leeuwenhoek* **31**: 341–348.

## FEMS Yeast Research

1 Yamada Y & Kondo K (1973) Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera  
2 *Rhodotorula* and *Cryptococcus* and the yeast like genera *Sporobolomyces* and  
3 *Rhodospiridium*. *J Gen Appl Microbiol* **19**: 59-77.

4 Yarrow D (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts.  
5 *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 77-100.  
6 Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

## FEMS Yeast Research

1 Table 1. Characteristics that distinguish *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. from  
 2 *Kluyveromyces aestuarii*

3

Characteristic	<i>K. siamensis</i>	<i>K. aestuarii</i> *
Fermentation:		
Galactose	-	v
Raffinose	w	+
Assimilation:		
D-Xylose	+	-
Ribitol	l	-
Growth:		
At 37 °C	w	-
At 42 °C	w	-
With 50% glucose	+	-
With 60% glucose	+	-
Vitamin-free medium	+	-

4 +, positive; -, negative; l, latent; w, weak; v, variable

5 \* data from Lachance (1998)

6

7

8

9

10

11

12

1

2 **Figure legends**

3 **Fig. 1.** Phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA  
4 gene, showing positions of the seven strains of the novel species, *Kluyveromyces siamensis*  
5 sp. nov., with respect to closely related species. The phylogenetic tree was constructed from  
6 evolutionary distance data corrected by two-parameter transformation of Kimura (1980),  
7 using the neighbour-joining method. Numbers indicate percentages of bootstrap sampling,  
8 derived from 1000 samples.

9

10 **Fig. 2.** *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. RS8<sup>T</sup>. (a) Vegetative cells and ascospores on YM  
11 agar after 4 days at 28 °C. (b) Pseudohyphae formed on corn meal agar after 7 days at 28 °C.  
12 Scale bar = 10 µm.

## FEMS Yeast Research

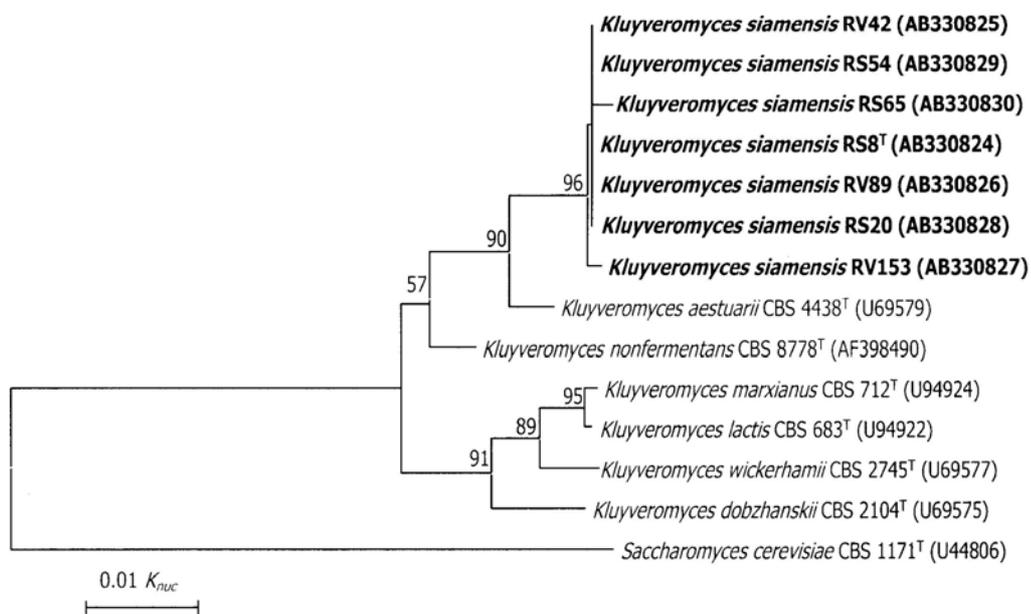
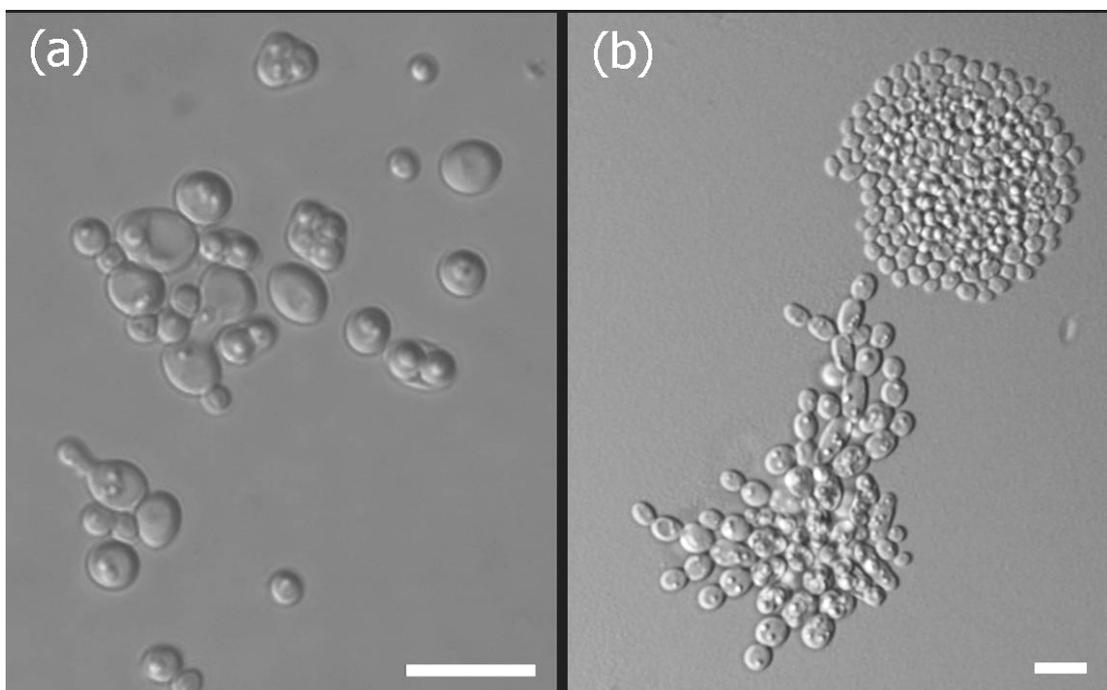


Fig. 1.

## FEMS Yeast Research



193x120mm (150 x 150 DPI)

## FEMS Yeast Research

26-Apr-2008  
MANUSCRIPT CHECKLIST

Journal name: FEMS Yeast Research  
Manuscript number (Editor's Ref. No.): FEMSYR-08-01-0013.R1  
Accepting Editor: Dr. Cletus Kurtzman  
Publication item type: Research Paper

Title: *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from water in a mangrove forest in Ranong Province, Thailand

Corresponding Author: Dr. Savitree Limtong  
Surname: Limtong  
First name: Savitree  
Full details:  
Dr. Limtong, Savitree  
Department of Microbiology, Faculty of Science,  
Kasetsart University, Bangkok 10900,  
Thailand.

Tel.: +66 2 562 5444, ext: 4017;  
fax: +66 2 579 2081  
E-mail: fscistl@ku.ac.th

Submitted date: 29-Jan-2008  
Revised date: 28-Mar-2008  
Accepted date: 26-Apr-2008

No. of tables: 1  
No. of figure files: 2  
Logical number of figures (not of files): 2  
Which figures are colour figures: none  
Running Head: Somjit Am-In, Wichien Yongmanitchai & Savitree Limtong  
Keywords: *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., novel species, ascomycetous yeast, water, mangrove forest, Thailand

Supplementary Material to be published: no  
COPYRIGHT:

CAF  
We have received a signed CAF, date: 06.05.08  
The author replied to the data protection query: [yes]  
If yes, the author wishes to be contacted via: [email]

NOTE TO PUBLISHER: copy editing remarks from the editor:  
p.2, l.10. forms, not form.  
p.2, l.11. *Kluyveromyces*  
p.3, l.13. 'surface in two mangrove...', not 'the'  
p.5, l.25. closest, not closet

**FEMS Yeast Research**

p.6, l.6. forms, not form  
p.7, l.2. spherical, not spheroidal  
p.7, l.10. closest, not closet  
p.8, l.22. spherical, not spheroidal  
p.9, l.1. has, not have  
p.9, l.7. spherical, not spheroidal

\*\*\*\*\*

Dr. Frédérique Belliard  
FEMS Editorial Administrator  
FEMS Yeast Research

\*\*\*\*\*

**ภาคผนวก ง**

GenBank accession number ของยีสต์ที่ศึกษา

ตารางผนวกที่ ง1 GenBank accession number ของยีสต์ที่ศึกษา

Strain	Species	GenBank accession number
RV22	<i>Candida berthetii</i>	AB437374
RV62	<i>Candida berthetii</i>	AB437375
RV11	<i>Candida boidinii</i>	AB437376
RS55	<i>Candida butyri</i>	AB437377
RV144	<i>Candida glabrata</i>	AB437378
RS32	<i>Candida parapsilosis</i>	AB437379
R1-34	<i>Candida phangngensis</i>	AB334208
R1-7	<i>Candida picinguabensis</i>	AB437380
R1-9	<i>Candida picinguabensis</i>	AB437381
R1-10	<i>Candida picinguabensis</i>	AB437382
RV63	<i>Candida pseudolambica</i>	AB437383
RV134	<i>Candida pseudolambica</i>	AB437384
RV149	<i>Candida pseudolambica</i>	AB437385
RV2	<i>Candida rugosa</i>	AB437386
RV147	<i>Candida rugosa</i>	AB437387
R1-5	<i>Candida rugosa</i>	AB437388
R1-21	<i>Candida rugosa</i>	AB437391
RV7	<i>Candida silvae</i>	AB437390
RS1	<i>Candida silvae</i>	AB437391
RS57	<i>Candida silvae</i>	AB437392
RV88	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437393
RV90	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437394
RV158	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437395
R1-3	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437396
R1-8	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437397
R1-11	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437398
R1-15	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437399

## ตารางผนวกที่ ง1 (ต่อ)

Strain	Species	GenBank accession number
R1-16	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437400
R1-26	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437401
R1-29	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437402
R1-30	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437403
R1-33	<i>Candida thaimueangensis</i>	AB437404
RV132	<i>Candida tropicalis</i>	AB438113
RV138	<i>Candida tropicalis</i>	AB438114
R1-6	<i>Candida tropicalis</i>	AB438115
R1-12	<i>Candida tropicalis</i>	AB438116
R1-13	<i>Candida tropicalis</i>	AB438117
R1-19	<i>Candida tropicalis</i>	AB438118
R1-20	<i>Candida tropicalis</i>	AB438119
R1-23	<i>Candida tropicalis</i>	AB438120
RS13	<i>Candida tropicalis</i>	AB438121
RS22	<i>Candida tropicalis</i>	AB438122
RS31	<i>Candida tropicalis</i>	AB438123
RS60	<i>Candida tropicalis</i>	AB438124
RS64	<i>Candida tropicalis</i>	AB438125
RV61	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	AB438126
RS11	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	AB438127
RS74	<i>Galactomyces geotrichum</i>	AB438128
RV28	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	AB438129
RV74	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	AB438130
RV91	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	AB438131
RS5	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	AB438132
RS26	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	AB438133
RS29	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	AB438134

## ตารางผนวกที่ ง1 (ต่อ)

Strain	Species	GenBank accession number
RV31	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438135
RV85	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438136
RV145	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438137
RS6	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438138
RS34	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438139
RS35	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438140
RS39	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438141
RS52	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438142
RS56	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438143
RS61	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438144
RS66	<i>Issatchenkia orientalis</i>	AB438145
RV4	<i>Issatchenkia siamensis</i>	AB438146
RV6	<i>Issatchenkia siamensis</i>	AB438147
RV10	<i>Issatchenkia siamensis</i>	AB438148
RV25	<i>Issatchenkia siamensis</i>	AB438149
RV40	<i>Issatchenkia siamensis</i>	AB438150
RS12	<i>Issatchenkia siamensis</i>	AB438151
RS30	<i>Issatchenkia terricola</i>	AB438152
RV29	<i>Kodamaea ohmeri</i>	AB438153
R1-25	<i>Kodamaea ohmeri</i>	AB438154
RS25	<i>Kodamaea ohmeri</i>	AB438155
RS43	<i>Kodamaea ohmeri</i>	AB438156
RS48	<i>Kodamaea ohmeri</i>	AB438157
RS49	<i>Kodamaea ohmeri</i>	AB438158
RS36	<i>Pichia burtonii</i>	AB438159
RV148	<i>Pichia caribbica</i>	AB438160
RV155	<i>Pichia caribbica</i>	AB438161

## ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

Strain	Species	GenBank accession number
RS3	<i>Pichia galeiformis</i>	AB438162
RS19	<i>Pichia kluyveri</i>	AB438163
RS21	<i>Pichia kluyveri</i>	AB438164
RS47	<i>Pichia kluyveri</i>	AB438165
RS75	<i>Pichia kluyveri</i>	AB438166
RV137	<i>Pichia sporocuriosa</i>	AB438167
RV17	<i>Torulasporea maleeae</i>	-
RV19	<i>Torulasporea maleeae</i>	-
RV39	<i>Williopsis saturnus</i>	AB438168
RV64	<i>Williopsis saturnus</i>	AB438169
RV86	<i>Williopsis saturnus</i>	AB438170
RV93	<i>Williopsis saturnus</i>	AB438171
RV162	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AB438172
RV165	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AB438173
RV24	<i>Trichosporon asahii</i>	AB438174
R1-18	<i>Trichosporon asahii</i>	AB438175
RV1	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	AB438176
RV59	<i>Trichosporon japonicum</i>	AB438177
R1-1	<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b	AB438207
R1-22	<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b	AB438208
RS18	<i>Hanseniaspora</i> sp. CS-2008b	AB438209
RS17	<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-250	AB438210
RV3	<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-464	AB438211
RV87	<i>Hanseniaspora</i> sp. ST-464	AB438212
RS7	<i>Hanseniaspora</i> sp. YS DN19	AB438213
RS10	<i>Hanseniaspora</i> sp. YS DN19	AB438214
RS24	<i>Hanseniaspora</i> sp. YS DN19	AB438215

## ตารางผนวกที่ ง1 (ต่อ)

Strain	Species	GenBank accession number
RS41	<i>Hanseniaspora</i> sp. YS DN19	AB438216
RS50	<i>Hanseniaspora</i> sp. YS DN19	AB438217
RS62	<i>Hanseniaspora</i> sp. YS DN19	AB438218
RV9	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127	AB438219
RV57	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127	AB438220
R1-14	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27127	AB438221
RS16	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27665	AB438222
R1-27	<i>Candida andamanensis</i> sp. nov.	AB334210
R1-31	<i>Candida andamanensis</i> sp. nov.	AB334211
R1-32	<i>Candida andamanensis</i> sp. nov.	-
RV5	<i>Candida laemsonensis</i> sp. nov.	AB438205
RV140	<i>Candida laemsonensis</i> sp. nov.	AB438206
RS42	<i>Candida mangrovei</i> sp. nov.	AB334209
RS17	<i>Candida ranongensis</i> sp. nov.	AB334213
RS28	<i>Candida ranongensis</i> sp. nov.	AB334212
R1-2	<i>Candida sanittii</i> sp. nov	AB332400
R1-14	<i>Candida sanittii</i> sp. nov	AB332401
R1-17	<i>Candida sanittii</i> sp. nov	-
RS9	<i>Candida sanittii</i> sp. nov	AB332402
RS58	<i>Candida sanittii</i> sp. nov	AB332403
RV35	<i>Candida sanittii</i> sp. nov	AB332398
RV96	<i>Candida sanittii</i> sp. nov	AB332399
RV152	<i>Candida sanittii</i> sp. nov	AB332397
RS2	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RS8	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	AB330824
RS14	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RS20	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	AB330828

## ตารางผนวกที่ ๑ (ต่อ)

Strain	Species	GenBank accession number
RS23	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RS27	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RS53	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RS54	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	AB330829
RS63	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RS65	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	AB330830
RS68	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RS70	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RS76	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RV42	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	AB330825
RV89	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	AB330826
RV94	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	-
RV153	<i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	AB330827
RV60	<i>Pichia ranongensis</i> sp. nov.	AB334112