บทที่ 1 บทนำ (Introduction)

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สิ่งมีชีวิตทั้งหมดบนโลกไม่สามารถบอกจำนวนสปีชีส์ที่แน่นอนได้ จากการสำรวจจำนวนสปีชีส์แปรผันอยู่ในช่วงตั้งแต่ 3-5 ล้านสปีชีส์ จนถึง 1.4 ล้านล้านสปีชีส์ มีการศึกษาแล้วตั้งชื่อประมาณ 1.4-1.8 ล้านสปีชีส์สำหรับยีสต์มีการค้นพบและอธิบายแล้วประมาณ 900 สปีชีส์ (Hammond, 1996; Kurtzman and Fell, 1998; Walker, 1998) การสำรวจความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแต่ละแหล่งที่อยู่มีประโยชน์หลายประการ เช่น จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญและมีศักยภาพสูงสำหรับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารและพลังงาน ทำให้ระบบนิเวศน์ป่าไม้ ระบบนิเวศน์เกษตร และระบบนิเวศน์ประมงยังคงสภาพเดิม จุลินทรียบางชนิดทำลายสารพิษจากของเหลือใช้ต่างๆในธรรมชาติ การค้นพบและศึกษาจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาวะวิกฤต เช่น อุณหภูมิสูง ความเค็มสูง และพีเอชต่ำ สามารถอธิบายสิ่งเหล่านั้นอยู่ได้อย่างไรในสภาวะแบบนั้น นอกจากนั้นการรู้องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในแหล่งต่างๆนำไปสู่การจัดการเกี่ยวกับจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น และยังเป็นพื้นฐานให้รู้ถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมแหล่งนั้น สำหรับการสำรวจความหลากหลายของยีสต์ในแหล่งที่อยู่ต่างๆนั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย ทำให้ทราบถึงระนิเวศน์แหล่งนั้นและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้ยีสต์จุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์ เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณถึงกับมีผู้กล่าวว่ายีสต์นั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่ มนุษย์นำมาใช้ รายงานแรกเกี่ยวกับการใช้ยีสต์ คือการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 6,000 ปีก่อนคริสตศักราช คนไทยรู้จักใช้ประโยชน์จากยีสต์มาเป็นเวลานาน เช่นในการทำอาหารหมักบางชนิด ได้แก่ ข้าวหมาก ปลาเจ่า เครื่องดองของเมาหลายชนิดเช่น อุ สาโทและกระแช่เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม หลายประเภท เป็นต้นว่าการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆเช่น เบียร์ ไวน์ และ วิสกี้ การผลิตเอธิลแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นสารเคมี และเชื้อเพลิง การผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้เป็นยีสต์ขนมปังและเป็นโปรตีนเซลล์เดียว

ยีสต์คือรากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบเช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง แบบคณโฑ หรือยาว เป็นต้น ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) บางชนิดสร้างเส้นใยแท้ (true mycelium) ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดย วิธีการแตกหน่อ หรือแบบอาศัยเพศโดยสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือแบสิดิโอสปอร์ (basidiospove) ยีสต์ส่วนใหญ่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน

และแหล่งคาร์บอน พบทั่วไปในธรรมชาติ เช่นในดิน ในน้ำ ส่วนต่างๆ ของพืช ในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์อยู่บ่อยๆ คือแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง

วิธีการแยกเชื้อ (Isolation)

1. เทคนิคการเพิ่มจำนวน (Enrichment technique)

เป็นการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่ต้องการในตัวอย่าง ซึ่งในตัวอย่างนั้นอาจมีจุลินทรีย์หลายชนิดผสมกันอยู่จึงต้องมีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการในสภาวะการเจริญที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ต้องการหรือเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อเชื้ออื่นๆที่ไม่ต้องการ เช่น การเติมสับสเตรตหรือสารบางชนิดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเหลว (enrichment liquid culture) โดยการนำตัวอย่างมาเพาะลงในอาหาร ซึ่งการเพิ่มจำนวนนี้อาจจะยังมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้ ดังนั้นจึงมีการคัดเลือกโดยนำเชื้อที่มีการเพิ่มจำนวนที่ได้นำไปเพาะลงในอาหารใหม่โดยนำออกมาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เหมาะสม สิ่งสำคัญของวิธีนี้คือเวลาในการถ่ายเชื้อควรสัมพันธ์กับเวลาที่จุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการมากที่สุด (สาวิตรี ลิ่มทอง , 2549)

2. เทคนิคการแยกเชื้อโดยใช้เทคนิคการเจือจาง

เป็นการแยกเชื้อทั้งหมดในตัวอย่างโดยการนำตัวอย่างที่ต้องการแยกเชื้อมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยหรือสารละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำการเจือจางและนำลงใส่ในอาหารที่เหมาะสมในจานเพาะเชื้อ อาจใช้วิธี pour plate, spread plate ,streak plate ,drop plate เป็นการแยกตัวอย่างและคัดเลือกตัวที่สนใจมาทำการศึกษาต่อในขั้นต่อไป

3. การแยกยีสต์โดยเทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน

การแยกเชื้อด้วยวิธีนี้ใช้ได้ทั้งตัวอย่างที่เป็นของหลวและของแข็ง แผ่นกรองที่นำมากรองนั้นต้องมีขนาดของรูกรอง 0.8-1.2 ไมครอน ถ้ายีสต์มีขนาดเล็กมากต้องใช้ขนาด 0.45 ไมครอน ยีสต์และจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่จะติดอยู่บนแผ่นกรองเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นกรองไปวางบนผิวหน้าอาหารสำหรับยีสต์จนกว่าจะมีโคโลนีขึ้นมา

อนุกรมวิธานของยีสต์ (taxonomy of yeast)

ยีสต์เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีหลายรูปแบบ คือ กลม (round) รี (oval) สามเหลี่ยม (triangular) ยาวปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival, boat) รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง (apiculated) คนโท (flask) ยาว (elongate) และเป็น

สาย (filamentous) ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) และเส้นใยแท้ (true mycelium) วิธีการสืบพันธุ์ของยีสต์มีทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ วิธีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้แก่ การแตกหน่อ (budding) การแตกหน่อแบบมีฐานกว้าง (bud-fission) การแบ่งเซลล์โดยการขยายขนาดของเซลล์แล้วสร้างผนังกั้นแบ่งเซลล์เป็นสองส่วน (fission) ยีสต์บางชนิดอาจมีการสร้างคอนิเดีย (conidia) ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมี 2 พวก คือ พวกที่สร้างแอสโคสปอร์ (ascosporogenous yeasts) และพวกที่สร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiosporogenous yeasts) ซึ่งสปอร์ทั้งสองชนิดนี้เกิดขึ้นจากการรวมตัวของนิวเคลียส และตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีส (meiosis)

ลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกประเภท (classification) ของยีสต์

ลักษณะที่สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกประเภทของยีสต์ ตามหลักการของ numerical toxynomy ที่รวบรวมโดย Kurtzman และ Fell (1998) ประกอบด้วย

1. **ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเพิ่มจำนวนแบบไม่มีเพศ**

1. รูปร่างของเซลล์
2. การเจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว
3. การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม
4. การสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศภายในเซลล์ (asexual endospore)
5. การสร้างคลามัยโดสปอร์ (chlamydospore)
6. การสร้างบอลิสโตสปอร์ (ballistospore)
7. การสร้าง germ tube

2. **การเพิ่มจำนวนแบบมีเพศ**

1. การสร้างแอสโคสปอร์
2. การสร้างแบสิดิโอสปอร์
3. การตรวจหา mating type

3. **ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี**

1. การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรท
2. การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน
3. การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน
4. การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน
5. การเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์

6. การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิอื่น ๆ
7. การสร้างกรดจากการใช้กลูโคส
8. การสร้างสารประกอบอมัยลอยด์ (amyloid)
9. การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease)
10. การทนต่อไซโคลเฮกซิมีด (cycloheximide)
11. การทนต่อกรดอะซิติกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์
12. การย่อยเจลาติน
13. การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (diazonium blue b)
14. การทนต่อคานาวานีน-ไกลซีน-โบรโมไธมอลบลู(canavanine-clycine-bromothymol blue)
15. การสังเคราะห์เมลานิน (melanin) บนไดไฮดรอกซีฟีนิลานีน (dihydroxyphenylanine)
16. การรีดิวซ์เตเตระโซเลียม (tetraolium)
17. จำนวนโครโมโซม

ส่วนลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกประเภทตามหลักการของ chemotaxonomy นั้น ตามที่ Kurtzman และ Fell (1998) ได้รวบรวมไว้ คือ

1. ชนิดของโคเอนไซม์คิว (coenzyme Q)
2. องค์ประกอบของผนังเซลล์
3. DNA-DNA hybridization
4. DNA-base composition
5. G+C contents

การพิสูจน์ความเหมือนเพื่อระบุเชื้อยีสต์ (Identification of Yeast)

ปัจจุบันนี้ยีสต์ถูกจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีรวมทั้งเกณฑ์อนุกรมวิธานเคมีและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

1. Conventional taxonomy

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics)

หลักการสำคัญเบื้องต้นก่อนนำเชื้อมาทำการพิสูจน์ความเหมือนเพื่อระบุเชื้อยีสต์ คือ ต้องใช้เชื้อที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ส่วนลักษณะที่สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกประเภทของยีสต์ คือ ลักษณะการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบบไม่มีเพศ

ลักษณะการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบบไม่มีเพศ

การแตกหน่อ วิธีการแตกหน่อแบ่งเป็น holoblastic budding และ enteroblastic budding โดยใน holoblastic budding ผนังเซลล์ของเซลล์แม่ทุกชั้นร่วมในการสร้างหน่อ การแตกหน่อแบบนี้เป็นลักษณะของ Saccharomycetales และยีสต์ที่มีความสัมพันธ์กับยีสต์กลุ่มนี้ ส่วน enteroblastic budding นั้น การแตกหน่อแรกจะเกิดจากการมีรอยแยกบนผนังเซลล์ของเซลล์แม่ โดยที่ชั้นในของผนังเซลล์แม่ยื่นเจริญออกไปเพื่อสร้างชั้นนอกสุดของผนังหน่อ และท้ายสุดขาดออกจากเซลล์แม่ หลังจากที่มีหน่อจำนวนมากเกิดที่บริเวณเดียวกัน ตำแหน่งที่สร้างหน่อบนเซลล์แม่ล้อมรอบด้วยคอลลา (colla) วิธีการแตกหน่อแบบนี้พบใน basidiosporogenous yeast และพวกที่มีความสัมพันธ์กับยีสต์กลุ่มนี้

การแตกหน่ออาจแบ่งตามตำแหน่งที่เกิด คืออาจเกิดที่ขั้วเดียวของเซลล์แม่เรียกว่า monopolar หรือ unipolar budding โดยอาจเกิดบนฐานที่กว้าง เช่น ยีนัส Malassezia บางชนิดอาจเกิดที่ขั้วทั้งสอง คือ bipolar budding โดยหน่อแยกออกจากเซลล์แม่เมื่อมีการสร้างผนังกั้นทางระหว่างเซลล์ใหม่ทั้งสอง ดังนั้นจึงเป็นการแตกหน่อบนฐานที่กว้าง หรือที่เรียกว่า "budfission" การแตกหน่อซ้ำ ๆ กัน ทำให้เกิดรอยแผลเป็นตามขวางหลาย ๆ แผลที่ขั้วทั้งสองด้าน การแตกหน่อที่ขั้วทั้งสองข้างเป็นลักษณะประจำของ apiculate yeast เช่น Nadsonia, Hanseniaspora และ Kloeckera ยีสต์ที่เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อส่วนใหญ่จะมีการแตกหน่อแบบ multilateral หรือmultipolar budding ซึ่งสามารถแตกหน่อได้ที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนเซลล์แม่เช่น ยีนัส Saccharomyces, Debaryomyces, Hansenula และ Pichia

การแบ่งเซลล์แบบ Fission เป็นการเพิ่มจำนวนโดยมีการเพิ่มขนาดของเซลล์ก่อนแล้วจึงมีผนังกั้นตามขวางแบ่งเซลล์ออกเป็นสองส่วน เซลล์ที่สร้างใหม่ เรียกว่า อาร์โธรคอนิเดีย (arthroconidia) หรือ อาร์โธรสปอร์ พบเฉพาะในยีนัส Schizosaccharomyces

การสร้างคอนิเดีย (conidia) บนก้าน (stalk) การสร้างคอนิเดียเกิดโดยมีโครงสร้างลักษณะเป็นท่อโผล่ออกไปจากเซลล์ 1 ท่อ หรือมากกว่า 1 จากโครงสร้างนี้จะพบคอนิเดียที่ส่วนปลาย เมื่อแก่เต็มที่จะแยกออก โดยการสร้างผนังกั้นที่บริเวณกลาง ๆ ของท่อ และคอนิเดียถูกปล่อยออกไป พบในยีนัส Sterigmatomyces

ลักษณะของเซลล์

ลักษณะต่าง ๆ ของเซลล์ที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกเชื้อยีสต์ มีหลายลักษณะดังที่จะได้กล่าวต่อไป

สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวและอาหารแข็ง ยีสต์มีรูปร่างของเซลล์หลายแบบ เช่น กลม (spheroidal) ค่อนข้างกลม (subglobose) รี (ellipsoidal) รูปไข่ (oval) ทรงกระบอก (cylindrical) ยาว (elongate) เป็นสาย (filamentous) แหลมหัวแหลมท้ายแบบมะนาว

(apiculate) ปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival) สามเหลี่ยม (triangular) และคนโท (flask) เป็นต้น การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์นั้นอาจใช้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว หรือบนอาหารแข็ง

สำหรับอาหารเหลวโดยปกติใช้ Malt extract broth หรือ 2-4% Glucose yeast extract peptone water การตรวจผลทำโดยใช้กล้องจุลทรรศน์บันทึก รูปร่าง กลไกการเพิ่มจำนวน การเรียงตัวของเซลล์ (เดี่ยว, คู่ หรืออยู่เป็นกลุ่มใหญ่) เซลล์สร้างแคปซูลหรือไม่ ขนาดของเซลล์ รวมทั้งสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว

สำหรับการเจริญบนอาหารแข็งก็เช่นเดียวกัน คือใช้เพื่อศึกษาทั้งสัณฐานวิทยาของเซลล์และลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง อาหารแข็งที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ Malt extract agar และ 2% Glucose yeast extract peptone agar ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง โดยลักษณะที่ต้องให้ความสนใจ คือ เนื้อ (texture) สี ผิวหน้า ความนูน และขอบของโคโลนี

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ การเพิ่มจำนวนของยีสต์โดยการแตกหน่อนั้นเมื่อหน่อที่ได้ยังติดอยู่กับเซลล์แม่ ทำให้เกิดกลุ่มหรือสายของเซลล์ที่เรียกว่า เส้นใยเทียม (pseudohypha) ซึ่งอาจเป็นแบบที่ไม่มีการพัฒนา (rudimentary) ประกอบด้วยเซลล์ยาวขนาดเท่า ๆ กัน หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงบางอย่างไปจากเซลล์เดิม อธิบายรายละเอียดของเส้นใยเทียมแบบต่าง ๆ

1. Mycotorula-type เป็นเส้นใยเทียมที่ค่อนข้าง compact มีบลาสโตสปอร์ รูปร่างค่อนข้างกลมอยู่เป็นรอบ ๆ รอยต่อของเซลล์ยาว ๆ ที่ต่อกันเป็นเส้นใยเทียม

2. Mycotoruloides-type ชนิดนี้ มีบลาสโตสปอร์ที่แตกแขนงอย่างหลวม ๆ เกาะอยู่ที่รอยต่อ

3. Candida-type มีสายของบลาสโตสปอร์ เกิดที่รอยต่อของเซลล์

4. Mycocandida-type เป็นเส้นใยเทียมที่มีการแตกกิ่งก้านสาขามาก มักมีบลาสโตสปอร์ 1-2 สปอร์ ที่รอยต่อ หรือบลาสโตสปอร์อาจเรียงเป็นขด (whorl) หรือตั้งตรง (verticils) ที่รอยต่อของเซลล์

5. Blastodendrion-type ชนิดนี้มีบลาสโตสปอร์รูปร่างเป็นหยดน้ำ เรียงตัวคล้ายกับโครงสร้างของเพนนิซิเลียม

ยีสต์บางชนิดอาจพบว่ามีการสร้างทั้งเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม เช่น Saccharomycopsis และ Trichosporon สำหรับยีสต์บางชนิดที่มีเส้นใยแท้อาจสร้างอาร์โธรสปอร์หรืออาร์โธรคอนิเดีย จากการแตกหักของเส้นใย และเรียงตัวแบบซิกแซก

ปกติการศึกษาการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ทำบน Corn meal agar, Potato dextrose agar, Rice agar หรือ Morphology agar โดยวิธี Slide cluture และ Dalmau plate

การสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศ ยีสต์สามารถสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศชนิดต่างๆ เช่น เอนโด-สปอร์ (endospore) ซึ่งไม่ใช่ลักษณะปกติของยีสต์ทั่วไป พบเฉพาะในยีนัส Candida, Trichosporon, Cryptococcus และ OOsporidium เอนโดสปอร์ที่พบในยีสต์เป็นเซลล์ที่มีการกั้นขอบเขตภายในทำให้มีลักษณะเหมือนสปอร์อยู่ภายในเซลล์ มักพบในเชื้อที่มีอายุมาก ๆ ซึ่งเก็บอุณหภูมิ

ยีสต์บางชนิดสามารถสร้างคัลมัยโดสปอร์ (chlamydospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่มีผนังหนาอาจเกิดที่เซลล์ตรงกลางหรือปลายเส้นใย เป็นลักษณะเฉพาะในยีสต์บางชนิด เช่น Candida albicans และยีนัส Metschnikowi ยีสต์บางชนิดสร้างสปอร์ที่สามารถดีดออกไปในอากาศได้ เรียกว่า บอลลิสโตสปอร์ พบเฉพาะใน basidiosporogenous yeast เช่น Sporobolomyces

ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

ยีสต์มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ มี 2 พวก คือ พวกที่สร้างแอสโคสปอร์ และพวกที่สร้างแบสิดิโอสปอร์ ลักษณะการสร้างแอสโคสปอร์ เนื่องจากยีสต์ที่สามารถสืบพันธุ์โดยการสร้างแอสโคสปอร์นั้น มีทั้งพวกที่เป็น homothallic yeast ซึ่งวงจรชีวิตอาจเป็น haplontic, diplontic และ diplohaplonic กับพวกที่เป็น heterothallic yeast ดังนั้นการเกิดแอสโคสปอร์จึงมีความแตกต่างกัน

สำหรับ homothallic yeast ที่มีวงจรชีวิตแบบ haplontic นั้น เซลล์อยู่ใน haplophase เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้ plasmogamy, karyogamy และ meiosis เกิดในไซโกตซึ่งเป็นช่วงเดียวที่นิวเคลียสเป็น haploid แตกหน่อแล้วหน่อยังติดอยู่กับเซลล์แม่ มีการรวมตัวของนิวเคลียส ต่อมาเซลล์แม่และหน่อนั้นจะเปลี่ยนเป็นแอสคัส และภายในมี 1-4 แอสโคสปอร์ กลไกการสร้างแอสคัสแบบนี้เรียกว่า mother daughter cell conjugation หรือ bud meiosis เพราะนิวเคลียสที่มารวมตัวกันเกิดจาก 2 นิวเคลียส ที่มาจากนิวเคลียสเดียวกัน จึงถือว่าเป็นการผสมพันธุ์ในพวก (inbreeding) การเกิด diploid แบบนี้พบในยีนัส Torulaspora, Debaryomyces, Wingea และ Schwanniomyces รวมทั้งสปีชีส์ของ Pichia และ Hansenula กลไกการเกิดแอสคัสแบบที่คล้าย ๆ กันนี้พบใน apiculate yeast ยีนัส Nadsonia ซึ่ง karyogamy เกิดจากนิวเคลียสของหน่อและของเซลล์แม่ แต่เมื่อรวมกันแล้วองค์ประกอบทั้งหมดจะไหลเข้าไปในหน่อที่สองซึ่งอยู่ที่ขั้วตรงข้าม จากนั้นหน่อที่สองแยกออกโดยผนังกั้น และกลายเป็นแอสคัส นอกจากนั้นการเกิด diploid อาจมาจากการรวมตัวกันของเซลล์ 2 เซลล์ ที่มีนิวเคลียสเป็น haploid โดยตรง ได้เป็น amoeboid conjugated asci เช่นใน Schizosaccharomyces หรือเซลล์อาจสร้าง conjugation tube ยาว ๆ เชื่อมระหว่างเซลล์ทั้งสองทำให้เกิด conjugated asci ที่มีรูปร่างแบบดัมเบล เช่นใน Debaryomyces, Torulaspora, Wingea และ Zygosaccharomyces บางครั้ง conjugation tube ไม่

หลอมรวมกันเกิดเป็น abortive conjugation tube ซึ่งเซลล์ที่มี conjugation tube แบบนี้ อาจกลายเป็นแอสคัสที่มี 1-2 แอสโคสปอร์ โดยเชื่อว่าเกิดจากนิวเคลียสมีการแบ่งตัวแบบไมโตซีสได้ 2 นิวเคลียส แล้วมีการหลอมรวมกันสร้างนิวเคลียสที่เป็น diploid เชื้อบางชนิดสร้างแอสคัสทั้งชนิดปกติ และชนิดที่มี abortive conjugation tube เช่น Debaryomyces, Torulaspora และ Wingea

สำหรับ homothallic yeast ที่มีวงจรชีวิตแบบ diplontic ซึ่งเซลล์จะคงตัวใน diploid phase นั้น เซลล์ที่มีนิวเคลียสเป็น diploid จะเกิดไมโอซีสกลายเป็น unconjugated ascus เช่นในยีนัส Saccharomyces และเซลล์ diploid จะเกิดอีกอย่างรวดเร็ว โดย conjugation ของแอสโคสปอร์ที่กำลังงอกภายในแอสคัสหรือระหว่างสองนิวเคลียสที่เกิดจากการแบ่งแบบไมโตซีสของแอสโคสปอร์ที่กำลังงอก ซึ่งวิธีหลังนี้เรียกว่า direct diploidization หรือ auto-diploidization

โดยทั่วไปการสร้างแอสคัสจะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม เช่น อาหาร อุณหภูมิ pH และการให้อากาศ สำหรับยีสต์บางชนิดสามารถสร้างสปอร์ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงเชื้อตามปกติ ในขณะที่บางชนิดจำเป็นต้องใช้อาหารสำหรับการสร้างสปอร์ (sporulation medium) โดยเฉพาะบางชนิดต้องเลี้ยงในอาหารที่อุดมสมบูรณ์ ซึ่งเรียกว่า presporulation medium ก่อน เมื่อเซลล์มีการเจริญดีแล้วจึงถ่ายไปยังอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ โดยปกติอาหารที่ใช้เพื่อให้มีการสร้างสปอร์จะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรทต่ำ ทำให้ยีสต์มีการเจริญแบบไม่มีเพศน้อย อาหารที่ใช้สำหรับการสร้างแอสโคสปอร์มีมากมายหลายชนิด เช่น Gorodkowa agar, acetate agar, diluted V8 agar, 2% malt extract agar, V8 vegetative juice agar, Herman's growth-restriction agar, com meal agar ยีสต์บางชนิดตรวจพบแอสโคสปอร์เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิเหมาะสมเพียง 3 วัน บางชนิดสร้างสปอร์ช้าต้องใช้เวลา 3-6 สัปดาห์ โดยทั่วไปยีสต์ที่แยกมาใหม่จะสร้างสปอร์ได้ง่าย แต่เมื่อถ่ายเชื้อไปนาน ๆ ความสามารถในการสร้างสปอร์จะลดลง การสร้างแอสโคสปอร์ของยีสต์บางชนิดอาจต้องการสภาวะที่แตกต่างกันไป เช่น Saccharomyces สร้างสปอร์ดีที่สุดบน acetate agar ส่วน Zygosaccharomyces rouxii ซึ่งเป็น osmophilic yeast สร้างสปอร์ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2% ในขณะที่ยีสต์ในยีนัส Lipomyces สร้างสปอร์ดีบนอาหารที่ขาดไนโตรเจน เป็นต้น สภาวะแวดล้อมที่มีผลมากต่อการสร้างสปอร์อีกประการหนึ่ง คือ อุณหภูมิ ยีสต์ส่วนใหญ่สร้างสปอร์ดีที่ 20-25 องศาเซลเซียส และโดยปกติอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ จะต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ชนิดนั้น

แอสโคสปอร์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี รูปถั่ว (reniform) ทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical with obtuse ends) รูปหมวก (hat) รูปกระสวยและมีเส้น (spindle with appendages) รูปดาวเสาร์ (saturniform) ทั้งนี้ผิวของแอสโคสปอร์อาจมีลักษณะเรียบบาง หรือ

หนา และขรุขระเป็นรอยหยักที่ผิว (warty) นอกจากนั้นการเรียงตัวของแอสโคสปอร์ในแอสคัส สีของแอสโคสปอร์ ขนาด และจำนวนต่อแอสคัสซึ่งอาจมีตั้งแต่หนึ่งจนถึงหลายแอสโคสปอร์ มีความสำคัญในการจัดจำแนกเชื้อยีสต์

การตรวจแอสโคสปอร์ และแอสคัสทำให้ง่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน (oil immersion objective) ตรวจสปอร์บนสไลด์ โดยเตรียมซัสเพนชันของสปอร์ด้วยน้ำ หรืออาจหยดสี methylene blue หรือไอโอดีน (iodine) ลงไปด้วยเล็กน้อย และอาจย้อมด้วย malachite green เช่นเดียวกับที่ย้อม เอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย แต่การย้อมด้วยสปอร์ด้วย malachite green นี้ เป็นสิ่งที่ไม่จำเป็นสำหรับการตรวจแอสโคสปอร์ของยีสต์

ลักษณะการสร้างแบสิดิโอสปอร์ การสืบพันธุ์แบบมีเพศของ basidiosporogenous yeast ยังไม่เข้าใจกันอย่างสมบูรณ์ ใน heterothallic strain ซึ่งพบว่า อาจมีทั้ง bipolar mating system และ tetrapolar mating system ทั้งนี้ dikaryotic mycelium ที่สร้างขึ้นจาก mating ของเซลล์ที่ compatible กันนั้น จะสร้าง clamp cell ที่มีขนาดใหญ่พองมีไขมันมากเป็นที่เกิด karyogamy เซลล์นี้ คือ โปรแบสิเดียม (probasidium) ซึ่งอาจพบที่ปลายเส้นใย ในเส้นใย หรือด้านข้างของเส้นใย และมีผนังหนาหรือบางก็ได้ ส่วนใน homothallic strain ซึ่งพบมี 2 ชนิด คือ primary homothallic ที่ uninucleate mycelium ไม่มี clamp connection และ secondary homothallic ซึ่งเส้นใยเป็นแบบ dikaryotic mycelium ที่มี clamp connection

ยีสต์ยีนัส Rhodosporidium และ Leucosporidium สร้างสปอร์มีเพศซึ่งมีผนังหนาที่เรียกว่า เทลิโอสปอร์ (teliospore) หรือ เทลิวโตสปอร์ (teleutospore) และ อัสติโลสปอร์ (ustilospore) มีรูปร่างกลมไข่และเหลี่ยม เมื่อแก่เต็มที่เทลิโอสปอร์จะงอกโดยการสร้าง germ tube หรือ โปรมัยซีเลียม ซึ่งในบางสปีชีส์นิวเคลียสที่เป็น diploid แบ่งแบบโอซีส ได้นิวเคลียส 4 นิวเคลียส กระจายในโปรมัยซีเลียม มีผนังกั้นแบ่งเป็น 4 เซลล์ แต่ละเซลล์สร้างสปอริเดีย (sporidia) ซึ่งจัดว่าเป็นแบสิดิโอสปอร์ชนิดหนึ่งออกมาด้านข้าง หรือไมโอซีสอาจเกิดในเทลิโอสปอร์แล้วนิวเคลียสทั้ง 4 ที่ได้จึงเคลื่อนเข้าไปในโปรมัยซีเลียม และมีการสร้างสปอริเดีย สปอริเดียอาจมีการแตกหน่อออกมาเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสแบบ haploid หรือบางครั้งเทลิโอสปอร์งอกโดยไม่มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีส ผลที่ได้คือ เซลล์ธรรมดาซึ่งสามารถสร้างเส้นใย เทลิโอสปอร์ โปรมัยซีเลียม และสปอริเดีย ต่อไปได้เช่นกัน

ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and Biochemical Characteristics)

ลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีที่จัดว่ามีความสำคัญสำหรับการจัดจำแนกเชื้อยีสต์ คือลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ความต้องการปัจจัยส่งเสริมการเจริญ (growth factor) การเจริญที่อุณหภูมิสูง การเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลหรือเกลือโซเดียมคลอ

ไรด์ ความเข้มข้นสูง การสร้างเมตาบอไลท์ (metabolite) บางชนิด ตลอดจนการถูกทำลายด้วยสารปฏิชีวนะ ซึ่งจะได้กล่าวรายละเอียด

การใช้สารประกอบคาร์บอน (Utilizetion of Carbon Compound) ปกติยีสต์ที่ใช้แหล่งคาร์บอนโดยการหมัก มักจะใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนั้นโดยการออกซิเดชันได้ด้วย ทั้งนี้อาจมีข้อยกเว้นแต่ก็น้อยมาก

การหมักคาร์โบไฮเดรท (Fermentation of Carbohydrate) ยีสต์มีความสามารถในการหมักน้ำตาลต่าง ๆ กัน ยีสต์บางชนิด เช่น Kluyveromyces, Saccharomyces, Torulaspora และ Zygosaccharomyces สามารถหมักน้ำตาลอย่างรุนแรง โดยเฉพาะกลูโคส ในขณะที่ Lipomyces และ Sterigmatomyces เป็นพวกที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลได้ และสำหรับในบางยีนัสมีบางสปีชีส์ไม่สามารถหมักน้ำตาลและบางสปีชีส์หมักน้ำตาลได้อย่างรุนแรง

ปกตินำ้ตาลที่ใช้ตรวจความสามารถในการหมักของยีสต์เป็นประจำ คือ กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส มัลโตส แลคโตส และราฟฟีโนส โดยปกติ ถ้ายีสต์ชนิดนั้นมีความสามารถในการหมักจะพบว่าหมักกลูโคสได้เสมอ และมักจะหมักฟรุคโตสและแมนโนสได้ด้วย เช่นเดียวกับยีสต์ที่หมักซูโครสมักหมักราฟฟีโนสได้ด้วย ทั้งนี้อาจจะมีข้อยกเว้นแต่ก็น้อยมาก

Assimilation สารประกอบคาร์บอน จะได้เห็นได้ว่ากลูโคสไม่ได้รวมอยู่ในสารประกอบคาร์บอนข้างต้น ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ทุกชนิดใช้กลูโคสได้อยู่แล้ว สำหรับวิธีการที่ใช้ทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนของยีสต์มีอยู่ 3 วิธี คือ

1. การทดสอบ assimilation ในอาหารเหลว
2. การทดสอบ assimilation บนอาหารแข็ง
3. Auxanographic method

Assimilation สารประกอบไนโตรเจน ยีสต์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนอย่างกว้างขวาง แต่ที่มีประโยชน์สำหรับการจัดจำแนก คือ การใช้ไนเตรท, ไนไตรท์, ethylamine HCI, cadaverine dihydrochloride, L-lysine, creatinine และ creatine เป็นแหล่งไนโตรเจน

ความสามารถในการใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญในการแบ่งยีนัส โดยยีสต์หลายยีนัสไม่ใช้ไนเตรท เช่น Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia และ Debaryomyces ในขณะที่ทุกสปีชีส์ของยีนัส Hansenula, Pachysolen, Citeromy และ Wickerhamiella ใช้ไนเตรท ได้ ส่วนในยีนัสที่เป็น imperfect yeast มีทั้งสปีชีส์ที่ใช้ไนเตรทได้และสปีชีส์ที่ใช้ไม่ได้ เช่น ยีนัส Candida และ Trichosporon ไนเตรทอาจใช้แยกทั้งยีนัสและสปีชีส์ แต่แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นใช้เพียงเพื่อแยกสปีชีส์

การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน (Growth in vitamin free medium) การเจริญหรือไม่เจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินเป็นลักษณะหนึ่งที่สำคัญในการจัดจำแนกเชื้อยีสต์

การเจริญบน 50% glucose-yeast extract agar และอาหารยีสต์ไนโตรเจนเบสที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10% และกลูโคส 5% ปกติยีสต์ที่พบจากแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงหรือเกลือความเข้มข้นสูง มักเป็นพวก oxmophilic yeast ซึ่งเจริญดีที่กลูโคสความเข้มข้นสูงถึง 40% แต่จะเจริญได้น้อยบนอาหารที่มีกลูโคส 50-70% ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50% และอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10% กับกลูโคส 5% ใช้เพื่อทดสอบความสามารถในการเจริญในที่มีแรงดันออสโมสีทสูงปานกลาง

การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิอื่น ๆ ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile ซึ่งมี otpimum temperaturn สำหรับการเจริญ 20-28 องศาเซลเซียส แต่มีบางชนิดที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างไป ดังนั้นจึงเป็นลักษณะหนึ่งที่ช่วยในการจัดจำแนก

โครงสร้างของโคเอนไซม์ Q เมื่อปี ค.ศ. 1972 เริ่มมีรายงานที่แสดงว่ายีสต์มี ubiquinone system คือ มีจำนวนของ isoprene unit ต่อโมเลกุลแตกต่างกัน โดยพวก ascosporogenous yeast มีจำนวน Co-Q เท่ากับ 6-10 ส่วนใน basidiosporogenous yeast มีจำนวน Co-Q เป็น 8-10

การสร้างสารประกอบอมัยลอยด์ (amyloid) ภายนอกเซลล์ จากการศึกษาการสร้างสาร อมัยลอยด์ หรือสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายแป้งโดยยีสต์ที่สร้างแคปซูลพบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ยีสต์หลายสายพันธุ์สร้างสารอมัยลอยด์ภายนอกเซลล์ ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยสารละลายไอโอดีนจะให้สีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินอมเขียว

นอกจากลักษณะต่าง ๆ ข้างต้นที่ใช้เพื่อช่วยในการจัดจำแนกของยีสต์แล้ว ยังมีบางลักษณะที่อาจต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อช่วยการจัดจำแนกให้ง่ายและชัดเจนยิ่งขึ้น

2. Chemo Taxonomy

อนุกรมวิธานเคมีหรือ Biochemical systematics มีพื้นฐานทางลักษณะเคมี และเป็นส่วนสำคัญของอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตมาเป็นเวลานานหลายทศวรรษเป็นการประเมินองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งมีชีวิต ทั้งเมทาบอไลท์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) และเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) รวมถึงกิจกรรมทางเคมี

3. Molecular Taxonomy

การศึกษากรดนิวคลีอิกเพื่อการจัดจำแนกประเภทยีสต์กลายเป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากการจำแนกประเภทสิ่งมีชีวิตสะท้อนวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้น สำหรับการจัดจำแนกประเภทยีสต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมให้ผลที่แม่นยำกว่าความแตกต่างทางด้านฟีโนไทป์ สำหรับวิธีการ

ศึกษาจะอาศัยในระดับโมเลกุลประกอบด้วย การศึกษาดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอรวมทั้งการศึกษาองค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอหรือปริมาณกัวนีนกับไซโทซีน และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอในนิวเคลียสโดยการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน ทั้งสองวิธียังมีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถแยกสปีชีส์ที่มีพันธุกรรมหรือความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันได้ดีนัก ดังนั้นนักอนกรมวิธานจึงได้หันความสนใจไปสู่การเปรียบเทียบระดับโมเลกุลอื่นๆ เช่นการเปรียบเทียบโครโมโซมโดยใช้ pulsed field gel electrophoresis (PFGE), restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP) และการหาลำดับเบส (base sequencing) ในกรดนิวคลีอิก ในบรรดาวิธีต่างๆการหาลำดับเบส (base sequencing) ในกรดนิวคลีอิกเป็นวิธีการที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่าวิธีอื่นเพราะไม่ว่าจะมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือมากสามารถพิสูจน์ได้ด้วยโมเลกุลหรือยีนหรือบริเวณที่ถูกวิเคราะห์ และเพราะมีจำนวนข้อมูลมากกว่า ดั้งนั้นวิธีหาลำดับเบสใช้เพื่อบอกความสัมพันธ์ในบรรดายีสต์ได้โดยในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา (Kurtzman, 1992; Valente *et al.*, 1999)

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกยีสต์บริเวณเขื่อนอุบลรัตน์
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของยีสต์จากเขื่อนอุบลรัตน์
3. เพื่อระบุสายพันธุ์ยีสต์ชนิดที่น่าสนใจที่แยกได้จากเขื่อนอุบลรัตน์
4.

3. ขอบเขตของการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างดิน ดอกไม้ ใบไม้ และผลไม้ บริเวณป่าเขื่อนอุบลรัตน์
2. คัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ในด้านต่างๆ
3. ศึกษาการระบุชนิดของยีสต์ด้วยวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rRNA

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกยีสต์บริเวณเขื่อนอุบลรัตน์ได้
2. ทราบคุณสมบัติบางประการของยีสต์ที่แยกจากบริเวณเขื่อนอุบลรัตน์
3. สามารถระบุชนิดของยีสต์สายพันธุ์ที่น่าสนใจที่แยกได้จากเขื่อนอุบลรัตน์