

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์จากดิน

บริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา

Diversity of yeast from soil at the University of Phayao



ทัตดาว อินทร์ประสิทธิ์

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาพัฒนางานประจำสู่งานวิจัย รุ่นที่ 9

การพิจารณาโดยอาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาได้พิจารณาผลการศึกษางานวิจัยเพื่อการพิจารณางานประจำ เรื่อง ความหลากหลายของยีสต์บริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา (Diversity of yeast from soil at the University of Phayao) ฉบับนี้เป็นที่เรียบร้อยแล้วและเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัย เพื่อการพัฒนางานประจำของมหาวิทยาลัยพะเยา



กิตติกรรมประกาศ

ในการพัฒนางานประจำสู่งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.สมศักดิ์ ธรรมวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำการศึกษาวิจัย ตลอดจนแก้ไขปัญหาต่าง ๆ รวมทั้งให้วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี ระหว่งการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.กฤตปักษ์ ตันตือมรกุล และ ผศ. ดร.ธัชพล เมธารัฐกุล อาจารย์ประจำสาขาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา สำหรับคำแนะนำและให้ความช่วยเหลือและแก้ปัญหาระหว่างทำปฏิบัติการทางด้านชีวโมเลกุล รวมทั้งขอขอบคุณนิสิตสาขาจุลชีววิทยา นายธนกร บุญส่ง ที่เป็นกำลังใจและคอยตามข้อซักถามตลอดเวลา ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา ที่ให้การสนับสนุนด้านวัสดุอุปกรณ์ สถานที่ และทำให้การศึกษารพัฒนางานประจำสู่งานวิจัยในครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ทัตดาว อินทร์ประสิทธิ์

นักวิทยาศาสตร์

ผู้ดำเนินการวิจัย

ชื่อโครงการ ภาษาไทย: การศึกษาความหลากหลายของยีสต์จากดินบริเวณ
มหาวิทยาลัยพะเยา
ภาษาอังกฤษ: Diversity of yeast from soil at the University of Phayao.

หัวหน้าโครงการวิจัย (Prior Investigator)

ชื่อ-สกุล	นางสาวทัตดาว อินทร์ประสิทธิ์
ตำแหน่ง	นักวิทยาศาสตร์
สังกัด (คณะ/กอง/วิทยาลัย/ศูนย์)	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
ที่อยู่	19 ม.2 มหาวิทยาลัยพะเยา ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา 56000
โทรศัพท์ภายใน	3886
E-mail address	dow558@hotmail.com



บทคัดย่อ

การศึกษาการแยกยีสต์และระบุสปีชีส์จากดินบริเวณศูนย์อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช ในป่าบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา โดยการเก็บตัวอย่างดิน 24 ตัวอย่าง สามารถวัดค่าความเป็นกรดต่างได้เท่ากับ 6 ซึ่งมีความเป็นกรดอ่อน และสามารถแยกตัวอย่างยีสต์ทั้งหมดได้ 78 ไอโซเลท โดยการใช้วิธี Enrichment ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol และ Sodium propionate เมื่อทำการจัดกลุ่มยีสต์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถแบ่งกลุ่มยีสต์ได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม จากเชื้อยีสต์ทั้งหมด 78 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อยีสต์ที่ได้ ไปทดสอบทางชีวโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domains ของ 26S rRNA gene สามารถระบุสปีชีส์ได้ 7 สปีชีส์ คือ *Schwanniomyces vanrijiae* var. *vanrijiae*, *Saturnispora sekii* *Debaryomyces* sp. UFMG-CM-Y343, *Vanrija humicola* *Scheffersomyces goslingicus*, *Candida dendronema* และ *Tetrapisispora namnaoensis* ซึ่งจากจำนวนสปีชีส์ทั้งหมด พบว่า เชื้อยีสต์ *Schwanniomyces vanrijiae* var. *vanrijiae* เป็นเชื้อที่พบได้สูงที่สุดจากบริเวณป่าในศูนย์อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช และจากเชื้อยีสต์ที่แยกได้และรู้ชื่อ สปีชีส์จะนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้ในการเรียนการสอนปฏิบัติการในรายวิชายีสต์และยีสต์เทคโนโลยีต่อไป

คำสำคัญ: ยีสต์, วิธีเอ็นริชเมนต์, เทกนิคพี ซี อาร์, สไลด์ถาวร

ABSTRACT

This study was to explore yeast diversity. Yeast strains were isolated and identified from soil in Plant Genetic Conservation Center at University of Phayao. The 24 samples were collected and measured the pH. The pH of all samples were weak acidify (pH6). The total 78 isolates of yeast were isolated from soil by enrichment method in Yeast extracted malt extracted (YM broth) including chloramphenicol and sodium propionate. The 18 groups from 78 isolates of yeasts were gathered by used morphological physiological and biochemical characteristic. The 18 groups of yeasts were identified the species by comparison of the D1/D2 sequence of the 26S rRNA gene. As the result, yeast strains were identified as the 7 species including *Schwanniomyces vanriijiae* var. *vanriijiae*, *Saturnispora sekii*, *Debaryomyces* sp. UFMG-CM-Y343, *Vanrija humicola*, *Scheffersomyces goslingicus*, *Candida dendronema* and *Tetrapisispora namnaoensis*. The dominant species was found in Plant Genetic Conservation Center at University of Phayao area was found *Schwanniomyces vanriijiae* var. *vanriijiae*. The total of yeast which are known species will make the permanent slide for the subject of yeast and yeast technology at Microbiological Laboratory in the future.

Keyword: Yeast, Enrichened method, PCR Technique permanent slide

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 ขอบเขตการศึกษา.....	2
2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1 ยีสต์.....	3
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์.....	4
2.3 ความหลากหลายของยีสต์.....	4
3 วิธีการดำเนินการ.....	7
3.1 ตัวอย่างดินที่ศึกษา.....	7
3.2 วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีและครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	7
3.2.1 วัสดุอุปกรณ์เครื่องแก้ว.....	7
3.2.2 ครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์.....	8
3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	9
3.3 วิธีการดำเนินวิจัย.....	9
3.3.1 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างดิน.....	9
3.3.2 การหาค่าความเป็นกรดต่างในดิน.....	10
3.3.3 การแยกเชื้อยีสต์โดยวิธี Enrichment.....	11
3.3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีววิทยาของยีสต์.....	11

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.4 การระบุยีนของยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA gene.....	13
3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากยีสต์โดยการต้ม.....	13
3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการทำให้บริสุทธิ์.....	14
3.4.3 วิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis.....	14
3.4.4 การทำให้ PCR product มีความบริสุทธิ์.....	15
3.4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 และการระบุยีน ของยีสต์ โดย PCR products ส่งไปวิเคราะห์ เพื่อหาลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2.....	15
3.5 การทำสไลด์ถาวรของยีสต์.....	16
4 ผลการวิจัย	17
ผลการวิจัย.....	17
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	81
สรุปผลการทดลอง.....	81
อภิปรายผลการทดลอง.....	82
ข้อเสนอแนะ.....	82
บรรณานุกรม.....	84
ภาคผนวก.....	87
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	
ภาคผนวก ข ภาพสไลด์ถาวรของยีสต์	
ประวัติผู้วิจัย.....	93

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงผลค่าความเป็นกรดต่าง.....	16
2 จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างดินโดยใช้วิธี Enrichment.....	17
3 การแบ่งกลุ่มยีสต์ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ชีวเคมี.....	19
4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด.....	20
5 การจัดกลุ่มยีสต์ตามลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี.....	60
6 การระบุสปีชีส์.....	69
7 ระยะเวลาของเซลล์ยีสต์แต่ละไอโซเลทที่เป็นตัวแทนแต่ละกลุ่ม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	72



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพ 1 แปลงเก็บตัวอย่างดิน	9
ภาพ 2 การระบุชนิดของยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์ บริเวณ D1/D2 domains ของ 26S rDNA gene.....	68



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เนื่องจากในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีตัวอย่างยีสต์ที่ใช้สำหรับการเรียนการสอนดังต่อไปนี้ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* และ *Rhodotorula* sp. ซึ่งยีสต์ดังกล่าวมีไม่หลากหลายและไม่เพียงพอต่อการจัดการเรียนการสอนปฏิบัติการในหลักสูตรจุลชีววิทยา และเนื่องจากยีสต์สปีชีส์ต่างๆ นั้น สามารถแยกได้จากตัวอย่างธรรมชาติในพื้นที่ป่ารอบๆ มหาวิทยาลัยพะเยา โดยสภาพป่าที่พบส่วนใหญ่เป็นป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณ พันธุ์ไม้สำคัญที่พบได้แก่ เต็ง รัง ไม้สัก มะค่าโมง ตะเคียน ยางแดง ประดู่ ก่อ ตะแบก เหวียง พลวง เกิดดำ เกิดแดง และกระบก เป็นต้น สัตว์ป่าที่พบโดยทั่วไปได้แก่ นกชนิดต่างๆ รวมถึงสัตว์เลื้อยคลานและแมลงหลากหลายชนิด นอกจากนี้ยังได้ฐานข้อมูลสปีชีส์ของยีสต์ที่พบในพื้นที่ป่าบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา และสามารถนำยีสต์ดังกล่าวมาจัดทำสไลด์ถาวร สำหรับใช้ในการเรียนการสอนปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาได้

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดจะทำการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ โดยทำการแยกยีสต์ จัดจำแนกยีสต์ และระบุสปีชีส์ที่แยกได้จากดินที่เก็บจากป่าบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา และจัดทำสไลด์ถาวรประกอบการเรียนการสอนปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อแยกยีสต์ จัดจำแนกยีสต์ และระบุสปีชีส์ยีสต์ ที่แยกได้จากดินที่เก็บจากป่าบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา
- 1.2.2 เพื่อจัดทำสไลด์ถาวรประกอบการเรียนการสอนปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา
- 1.2.3 จัดเก็บรักษาสายพันธุ์ยีสต์เพื่อใช้ในการเรียนการสอนปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ความหลากหลายของสปีชีส์ยีสต์ในดินป่าไม้ ณ มหาวิทยาลัยพะเยาจังหวัดพะเยา ยังขาดการสำรวจ รวบรวม ศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบ และขาดการนำสายพันธุ์ยีสต์จากท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ ประกอบกับการที่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยามีตัวอย่างของยีสต์ที่ใช้ในการเรียนการสอนน้อย จึงมีความสนใจที่จะทำการแยก จัดจำแนก และระบุสปีชีส์ยีสต์ และนำยีสต์ที่แยกได้นำมาจัดทำเป็นสไลด์ถาวรของยีสต์เพื่อใช้ในการเรียนการสอนปฏิบัติการต่อไป

1.4 ขอบเขตการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อทำการแยกเชื้อยีสต์จากดิน ในส่วนของศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืช บริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา แล้วทำการระบุสปีชีส์ของยีสต์โดยใช้เทคนิคระดับชีวโมเลกุล (เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D12D2 ของ 26S rDNA gene) นำเชื้อที่ยีสต์ได้ทั้งหมด มาทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอนในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

2.1 ยีสต์ (Yeasts)

ยีสต์ (yeast) เป็นจุลินทรีย์ยูคาริโอตชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มของเชื้อรา โดยปกติแล้วยีสต์มักมีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม ทรงรี รูปไข่ รูปร่างคล้ายมะนาวฝรั่ง หรือเป็นเส้นสาย เป็นต้น ยีสต์มีความต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic microorganism) และมีการดำรงชีวิตแบบ chemooorganotroph คือ ใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่พบในยีสต์มีหลายแบบ เช่น การแตกหน่อ (budding) การแบ่งเซลล์ตามขวาง (fission) การสร้างอาร์โทโคนิเดีย (arthroconidia) และการสร้างบอลิสโตโคนิเดีย (ballistoconidia) แต่ที่พบบ่อยที่สุดคือการแตกหน่อ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์มี 2 แบบ คือ การสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore formation) และการสร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore formation) ยีสต์สามารถพบการแพร่กระจายได้ตามแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ พืช สัตว์ และแมลง นอกจากนี้ยังพบยีสต์ปนเปื้อนในอาหารชนิดต่างๆ เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน ซึ่งการปนเปื้อนของยีสต์อาจเป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียได้ ปัจจุบันมนุษย์นำยีสต์มาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (สุรา เบียร์ ไวน์) วิตามิน เอนไซม์ (ไลเพส โปรตีเอส) ยีสต์ขนมปัง ยีสต์อาหารสัตว์ สารให้ความหวาน (อะราบิทอล ซิลิทอล) และที่นิยมมากในปัจจุบันคือการใช้ยีสต์ในการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนแหล่งพลังงานเดิมที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมันดิบหรือก๊าซธรรมชาติที่มีปริมาณเหลือล้นอยู่ลงทุกวัน ในปัจจุบันสปีชีส์ยีสต์ที่มีรายงานการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตไบโอเอทานอลอย่างกว้างขวาง คือ *Saccharomyces cerevisiae*

นอกจากนี้ยีสต์ยังมีบทบาทสำคัญหลายอย่างในระบบนิเวศ เช่น ทำให้เกิดการหมุนเวียนแร่ธาตุภายในดินโดยการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสหรือ ไลเพสเพื่อช่วยในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ในดิน ยกตัวอย่างเช่น ยีสต์สปีชีส์ *Aureobasidium pullulans*, *Candida cylindracea*, *Candida lipolytica*, *Candida punicea* และ *Candida rugosa*

(Aheard, Meyers and Nichols.,1968; Benjamin and Pandey., 2001) ส่วนยีสต์ในสกุล *Cryptococcus* และ *Lipomyces* สามารถสร้างสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ที่ช่วยทำให้ดินเกาะตัวเป็นก้อน ส่งผลให้เกิดการหมุนเวียนอากาศในดิน ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์และอุ้มน้ำได้ดีมากขึ้น

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์

2.2.1 อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของยีสต์ ปกติจุลินทรีย์จะเจริญได้เร็วขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการเจริญ การเลี้ยงยีสต์ ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 30–35 องศาเซลเซียส หรือ อุณหภูมิที่ก่อนที่จะลดลงถึง 20 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดลงมากกว่า 20 องศาเซลเซียส ยีสต์จะไม่เจริญที่อุณหภูมิ 60–70 องศาเซลเซียส (สาวิตรี, 2549)

2.2.2 ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในกระบวนการหายใจ (Respiratory chain) นอกจากนี้ ออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็น Growth factor ของยีสต์โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ กรดไขมันที่มีพันธะคู่ เช่น กรดโอเลอิก (Oleic acid) เออร์โกสแตอล และกรดนิโคตินิก ซึ่งช่วยในการส่งเสริมการเจริญของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (สาวิตรี, 2549)

2.2.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ต่ำกว่าอุณหภูมิ เนื่องจากค่าพีเอชมีผลเกี่ยวข้องกับควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น พีเอชที่ใช้สำหรับอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์จะมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 (สาวิตรี, 2549)

3.2.4 คาร์บอนไดออกไซด์ เชื้อยีสต์บางชนิด เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณที่ต่ำ ในขบวนการบางอย่าง สามารถเจริญได้ในคาร์บอนไดออกไซด์เพียง 25 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ ถ้าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์จะอยู่ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ของอากาศทั้งหมด (สาวิตรี, 2549)

2.3 ความหลากหลายของยีสต์

ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาและค้นพบยีสต์ทั่วโลกแล้วประมาณ 1,500 สปีชีส์ แต่จากการประเมินของผู้เชี่ยวชาญชี้ให้เห็นว่าสปีชีส์ของยีสต์ที่ค้นพบและทำการศึกษาแล้วนั้นมีจำนวนเพียงเล็กน้อย คิดเป็น 1% ของยีสต์ทั้งหมดที่มีอยู่จริงในธรรมชาติ Kurtzman and Fell (2006) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังมียีสต์ในธรรมชาติอีกมากมายที่ยังรอการค้นพบเพื่อทำการจัดจำแนกและ

ศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต ในปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ในการระบุสปีชีส์ของยีสต์มากที่สุดคือ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain (มีตำแหน่งอยู่ที่ด้านปลาย 5' ของ 26S rRNA gene และมีความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์) เพราะเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำสูง โดยมีหลักการที่ว่าถ้าลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของยีสต์ที่นำมาทำการเปรียบเทียบมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ หรือมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 6 นิวคลีโอไทด์ขึ้นไปจะถือว่ายีสต์เหล่านั้นมีความแตกต่างกันในระดับสปีชีส์ และสายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์จัดว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) แต่ถ้าสายพันธุ์ยีสต์ที่มี นิวคลีโอไทด์ต่างกัน 3-6 นิวคลีโอไทด์อาจจะเป็นสปีชีส์เดียวกันหรือเป็นต่างสปีชีส์ แต่มีความใกล้เคียงกันมาก (closest species) ก็ได้ (Kurtzman and Robnett.,1998; Hierro et al., 2006)

ในประเทศไทยนั้นมีภูมิภาคเป็นเขตร้อนชื้น ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ จากจำนวนสิ่งมีชีวิตทั้งหมดบนโลกที่มีประมาณ 5 ล้าน ชนิด จำนวนประมาณ 350,000 ชนิด พบอยู่ในประเทศไทย ดังนั้นประเทศไทยจึงนับได้ว่ามีความร่ำรวยอย่างมากในด้านความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในส่วน ของจุลินทรีย์ คาดว่าจะมีในประเทศไทยถึง 200,000 ชนิด หรือมากกว่า อย่างไรก็ตามประมาณ 1 ใน 10 ส่วน ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่านั้นที่มีการศึกษาและรายงานผลการวิจัยทั้ง ภายในประเทศและ ต่างประเทศ ทำให้จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่คาดว่ามีในประเทศไทย (ธวัชชัย, 2552) น่าจะมีปริมาณมากกว่าที่ค้นพบ

การศึกษาคความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินในอดีตโดยทั่วไปมักเป็นการศึกษายีสต์ที่อาศัยอยู่ในดินที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในหลายภูมิภาคของโลกที่มีความแตกต่างกันในด้านลักษณะของภูมิภาค ในส่วนของการศึกษาคความหลากหลายของยีสต์ในดินที่ทำการเก็บรวบรวมมาจากพื้นที่ป่าอนุรักษ์ยังมีอยู่น้อยมาก (อนุพล, 2556) เช่น Sumpradit et al.,2005 ได้ทำการศึกษาคความหลากหลายของยีสต์จากดินในป่าเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ได้ยีสต์ที่เป็น ascomycetous yeast จำนวน 21 สายพันธุ์ และเมื่อนำเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทั้งหมดไปศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง D1/D2 domains rDNA พบว่าทั้งหมดมีจีโนมที่ให้ใกล้เคียงกันคือ *Tetrapisispora* แต่เมื่อพิจารณาตามลักษณะทั้งหมด พบว่า สามารถค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ ชื่อว่า *Tetrapisispora namnaoensis*. sp. Nov. TN1-01 และ Tammawong et al., 2010 ยังได้คัดแยกยีสต์โดยใช้วิธีตาม Kurtzman., 1998 ในเขตป่าอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว พบเชื้อยีสต์ที่มีความใกล้เคียงกับ

สายพันธุ์ของ *Millerozyma acaciae* and *Pichia koratensis* โดยมีการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 1.2% (7 นิวคลีโอไทด์) และ 1.4% (8 นิวคลีโอไทด์) ตามลำดับ ลักษณะพื้นฐานเบื้องต้นมีความคล้ายคลึงกันมากกับเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้ เมื่อนำไปทดสอบทาง Phylogenetic มีความใกล้เคียงกับ *Millerozyma acaciae* มากกว่า *Pichia koratensis* ดังนั้น จึงให้ชื่อ *Millerozyma phetchabunensis* sp. nov. DS2-1T.

จากการศึกษาของ (Chin Feng et al., 2010) ได้ร่วมสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์กับนักวิจัยไทย โดยจะทำการแยกยีสต์จากดินในป่าในประเทศไทยได้ทุกวัน และ ดินจากประเทศไทย พบว่า ยีสต์ 10 สายพันธุ์ ที่ทำการแยกมาจากตัวอย่างดินที่แตกแตกต่างกัน มีลักษณะที่ใกล้เคียงกันทางสรีรวิทยา เมื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ rDNA, the D1/D2 domains ได้เชื้อที่มีความใกล้เคียงกับ *Scheffersomyces spartinae* แต่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 12 นิวคลีโอไทด์ ถือว่าน่าจะเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ และมีรูปแบบของ electrophoretic karyotypes มีความแตกต่างกับ *S. spartinae* ดังนั้นจึงให้ชื่อยีสต์สปีชีส์ใหม่ว่า *Candida gosinica* sp. Nov.

ยังมีการสำรวจและศึกษาด้านความหลากหลายของยีสต์ในประเทศไทยอีกมาก เนื่องจากยังมีข้อมูลเชื้อยีสต์ที่พบในพื้นที่ประเทศไทยน้อย เพื่อค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ และสามารถนำยีสต์ที่ค้นพบไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมภายในประเทศต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างดินที่ศึกษา

ตัวอย่างดินจากบริเวณศูนย์อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช ในบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยการสุ่มตัวอย่าง 24 แปลง

3.2 วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีและครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 วัสดุอุปกรณ์เครื่องแก้ว

- จานเพาะเชื้อ (plate)
- หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16x150 และ 13x100 มิลลิลิตร
- ฝาปิดหลอดทดลองพลาสติก (Test tube cap)
- ตะแกรงวางหลอดทดลอง (Rack) 50 ช่อง สำหรับขนาด 16x150 มิลลิเมตร และ 13x100 มิลลิลิตร
- แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)
- สไลด์ (Slide)
- กระจกปิดสไลด์ (Cover slipe)
- หลอดดักแก๊ส (Durham tube)
- ปิเปต (pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร
- ขวดเก็บสารละลาย (Laboratory bottle)
- กระบอกล้างจานเพาะเชื้อ (Plate can)
- กระบอกล้างปิเปต (Pipette can)
- ไมโครปิเปตทิป ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Micropipette tip)

- ไมโครปิเปตทิป ขนาด 200 ไมโครลิตร (Micropipette tip)
- ไมโครปิเปตทิป ขนาด 0.2 ไมโครลิตร (Micropipette tip)
- หลอด ไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microcentrifuge tube)
- หลอด พี ซี อาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube)
- ช้อนตักสารสแตนเลส (Spatula Stainless)
- ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- สำลี (cotton)

3.2.2 ครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์

- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Electrical Balance)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaking Incubator)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Safety Cabinet Class II)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ขนาดเล็ก (Microcentrifuge)
- เครื่องแยกดีเอ็นเอกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR)
- เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation)

- ไมโครไพเปต (Micropipette)
- กล้องจุลทรรศน์ (Brightfield Microscope)

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- อาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth
- ยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol
- โซเดียม โพรพิโอเนต (Sodium Propionate)
- อะการ์โรส (Agarose)
- ยูเรีย (Urea)
- โพรเมอร์ (Primer)
- ดี เอ็น เอ โพรซีเมอเรส (DNA polymerase)
- ที บี อี บัฟเฟอร์ (TBE buffer)
- สีย้อมดีเอ็นเอ (Loading dye)
- ชุดทดสอบสำหรับการ Purified PCR product
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)
- กลูโคส (Glucose)
- แลคโตส (Lactose)
- ซูโครส (Sucrose)
- เซลโลไบโอส (Cellobiose)
- ไซโลส (Xylose)
- ไฮโดรเจล สตราซ (Soluble Starch)
- มอลโตส (Maltose)
- ทรีฮาโลส (Trehalose)
- ราฟฟิโนส (Raffinose)

- อะราบิโนส (Arabinose)
- กาแลคโตส (Galactose)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea Broth base
- กลีเซอรอล (Glycerol)
- น้ำยาเปอร์เมาท์ (Permout)
- สีเมทิลลีนบลู (Methylene Blue)
- กรดแทนนิก (Tannic acid)
- สีซาฟรานิน โอ (Srafanin O)

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 สำรวจพื้นที่ และเก็บตัวอย่างดินบริเวณศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืช โดยมีการกำหนดพื้นที่กว้าง 6 เมตร ยาว 4 เมตร และแบ่งออกเป็นแปลงย่อย ๆ ขนาดกว้าง 1 เมตร ยาว 1 เมตร จากนั้นเก็บตัวอย่างดินในแต่ละแปลงแยกกันทั้ง 24 แปลง เก็บให้ได้ 24 ตัวอย่าง โดยต้องสุ่มตัวอย่างดินให้ครอบคลุมทั้งแปลง



ภาพ 1 แปลงเก็บตัวอย่างดิน

3.3.2 การหาค่าความเป็นกรดต่างในดิน

1. ชั่งตัวอย่างดินที่แห้งและร่อนแล้วมา 20 กรัม เติลงในปิกรเกอร์ แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้อัตราส่วนดิน : น้ำ เท่ากับ 1 : 5
2. ใช้แท่งแก้วคนดินนานเวลา 30 วินาที แล้วพักทิ้งไว้ 3 นาที ทำอย่างนี้ 5 ครั้ง

3. เมื่อคนดินครบ 5 ครั้งแล้ว ตั้งทิ้งไว้จนดินในปีกเกอร์ตกตะกอน จะเห็นน้ำใส อยู่บริเวณด้านบน

4. จุ่มหัวโพรบของเครื่องวัดพีเอช ที่จะต้องมีการปรับค่ามาตรฐานก่อนวัด โดยที่ต้องจุ่มลงไปในพื้นที่น้ำใสๆ ข้อควรระวัง อย่าจุ่มลงไปให้โดนดินด้านล่าง รอจนค่าหยุดนิ่ง แล้วอ่านค่าพีเอช

5. เมื่อวัดค่าพีเอชเสร็จแล้ว ให้นำก้านล่างหัวโพรบวัดค่าพีเอชบริเวณส่วนที่สัมผัสกับดินให้สะอาด แล้วใช้กระดาษทิชชูซับให้แห้ง

3.3.3 นำตัวอย่างดินไปชั่งบนเครื่องชั่งไฟฟ้า ปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงไปในอาหารเหลว Yeast extracted Malt extracted broth 45 มิลลิลิตร (Yarrow., 1998; Yurkov Kemler and Begerow., 2012) ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เกลือโซเดียมโพแทสเซียมไอโอเนต 1 กรัมต่อลิตร ที่ปรับ pH 4.7 ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ และอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องบ่มเชื้อที่เขย่า (rotary shaker) ที่เขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 2-3 วัน หรือจนกว่ายีสต์เจริญนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์เจริญอยู่มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-6} นำตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} - 10^{-6} มาเกลี่ยให้กระจาย (spread) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extracted Malt extracted agar (YM Agar) ที่เติมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมโพแทสเซียมไอโอเนต 1 กรัมต่อลิตร ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 48-72 ชั่วโมง ทำการศึกษาลักษณะโคโลนียีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บแยกยีสต์ให้บริสุทธิ์ด้วย cross streak technique และทำการเก็บยีสต์บริสุทธิ์ในหลอดทดลองอาหาร YM agar เพื่อทำเป็นเชื้อตั้งต้น

3.3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์

3.3.4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี

ศึกษาการเจริญบนอาหาร YM agar จากการ cross streak โดยดูจากลักษณะรูปร่าง ขนาดของโคโลนี โดยนำยีสต์มาเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำมาส่องดูลักษณะของโคโลนี ภายใต้กล้องสเตอริโอ จดลักษณะโคโลนี เช่นลักษณะของขอบ การเจริญบนผิวหน้าอาหาร ลักษณะความมันวาว หรือแห้งของโคโลนี

3.3.4.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ โดยดูลักษณะรูปร่าง ขนาดของเซลล์ และการสีบัพนั้แบบไม่อาศัยเพศ โดยนำห้วงเยื่อเชื้อและยีสต์จากเชื้อตั้งต้น เชื้อเชื้อมาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Malt extract broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง จากนั้น นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereo Microscope)

3.3.4.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีตามรายละเอียดใน The Yeasts, A Taxonomic Study Volume 4 (Kurtzman., 1998)

การหมักคาร์โบไฮเดรต และน้ำตาล 11 ชนิด คือ กลูโคส (Glucose) กาแล็กโทส (galactose) ไซโลส (xylose) ซูโครส (sucrose) มอลโทส (maltose) แล็กโทส (lactose) ทรีฮาโลส (trehalose) เซลโลไบโอส (cellobiose) ราฟิโนส (raffinose) โซลูเบิลสตาช (soluble starch) และ อะราบินอ (arabinose) นั้น จะต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium (Kurtzman et al., 2011) ซึ่งเป็นอาหารเหลวใสในหลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร พร้อมทั้งใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) ลงไป นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เมื่อครบเวลานำมาเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ลงไป โดยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ก่อนที่จะเติมลงไป จะต้องผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเมมเบรนที่มี ขนาด 0.45 ไมครอนใน ภาชนะที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองอาหาร basal medium หลอดละ 4 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 5 วัน 7 วัน และ 14 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อยีสต์ ดูการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส และ ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง โดยที่จะต้องรายงานผลตามนี้

- + = มีการหมักรุนแรง (Strong Positive) คือ มีแก๊สในหลอดดักแก๊สเต็มภายใน 7 วัน
- I = มีการหมักล่าช้า (Delayed Positive) คือ มีแก๊สเต็มในหลอดดักแก๊ส แต่ภายใน จาก 7 วัน
- S = มีการหมักเกิดช้าๆ (Slowly Positive) คือ มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส น้อยกว่า 1 ใน 3 ของหลอดดักแก๊ส และเกิดขึ้นภายใน 7 วัน
- W = มีการหมักเกิดช้าๆ (Weakly Positive) คือ มีแก๊สไม่เต็มหลอดดักแก๊ส และน้อยกว่า 1 ใน 3 ของหลอดดักแก๊ส และเกิดขึ้นภายหลังจาก 7 วัน (ถ้ามีแก๊สมากกว่า 1 ใน 3 ของหลอดดักแก๊ส ถือว่า เป็น +)
- = ไม่มีการหมัก (Negative) คือ ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส
- V = บางสายพันธุ์หมักน้ำตาลได้ บางสายพันธุ์ไม่หมัก

การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25, 37 และ 42 องศาเซลเซียส เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วจากนั้น ลงเชื้อยีสต์แต่ละไอโซเลท ลงไปจากนั้นนำไปใส่ตู้บ่มเพาะเชื้อในแต่ละอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 5 วัน 7 วัน และ 14 วัน สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละวัน โดยเทียบกับเส้นสีดำบนกระดาษ บันทึกรูปผล

- = อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น
- + = อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น แต่ยังมองเห็นเส้นสีดำบนกระดาษอย่างชัดเจน
- ++ = อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น มองเห็นเส้นสีดำบนกระดาษไม่ชัดเจน
- +++ = อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น มองไม่เห็นเส้นสีดำบนกระดาษ

การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมติสสูง โดยดูการเจริญบนอาหาร 3 ชนิด คือ 50% glucose agar 60% glucose- agar และ 10% sodium chloride + 5% glucose medium เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด (ภาคผนวก ก) อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารแข็ง วิธีการถ่ายเชื้อจะต้องขูดเชื้อลงไปบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลท นำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 7 วัน และ 14 วัน จากนั้น ดูการเจริญที่ขึ้นบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละชนิด

ทดสอบการใช้ ยูเรีย (Urea hydrolysis) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar (ภาคผนวก ก) จากนั้นถ่ายเชื้อลงไปบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน 7 วัน และ 14 วัน สังเกตการเจริญ โดยดูการเปลี่ยนของอาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar ถ้าเชื้อยีสต์สามารถใช้ Urea ได้ จะเปลี่ยนสีจากสีส้มอ่อน ๆ เป็นสีชมพู แต่ถ้าเชื้อยีสต์ ไม่ได้ใช้ Urea สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่มี การเปลี่ยนแปลง

3.3.5 การจัดกลุ่มยีสต์

ยีสต์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโคโคนี ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ที่เหมือนกันจะถูกนำมาจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันและสุ่มเลือกกลุ่มละ 2 ไอโซเลท ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA gene

3.4 การระบุยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA gene

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากยีสต์โดยการต้มดู่น้ำก้นลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขี่ยเชื้อยีสต์ 1 หลวงเขี่ยเชื้อใส่ลงในน้ำก้นปริมาณ 50 ไมโครลิตร

แล้งผสมให้เข้ากัน นำหลอดไมโครเซนตริฟิวรัลขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มียีสต์วางบนน้ำแข็งนาน 10 นาที แล้วนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งนาน 10 นาที (ทำซ้ำ 3 รอบ ในกรณีที่ไม่มี DNA หลุดออกมา) นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ดูคส่วนใสด้านบนซึ่งมีดีเอ็นเอของยีสต์อยู่ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ไปใส่หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 ไมโครลิตร เติมสาร DNA template solution 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมไพรเมอร์ NL1 0.25 ไมโครลิตร และ NL4 จำนวน 0.25 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้จำนวน DNA template ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต้องเติมน้ำ DI ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป 19.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ D1/D2 ด้วย PCR

3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการทำให้บริสุทธิ์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA gene ทำได้โดยวิธี PCR จำนวน 30 รอบด้วยเครื่อง DNA Thermal Cycle ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ NL-1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA3') และ NL-4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR ใช้โปรแกรม ดังนี้

Pre-denaturation	ที่ 95 °C	เป็นเวลา 5	นาที
Denaturation	ที่ 95 °C	เป็นเวลา 40	วินาที
Annealing	ที่ 55 °C	เป็นเวลา 40	วินาที
Extension	ที่ 72 °C	เป็นเวลา 40	วินาที
Final extension	ที่ 72 °C	เป็นเวลา 7	นาที

3.4.3 วิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

ละลายผง agarose ให้มีความเข้มข้น 1% (W/V) ใน TBE buffer นำไปหลอมในเตาไมโครเวฟจนวุ้นละลาย (ประมาณ 3-5 นาที) เติม Red safe ลงไป 5 ไมโครลิตร รอให้วุ้นเย็นลงประมาณ 55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดวางซี่หวี (comb) ลงไป เพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับเติมตัวอย่างรอจนวุ้นแข็งตัว (ประมาณ 30-40 นาที) ตั้งซี่หวีออกวางถาดลงในแท็งค์ที่มี TBE buffer อยู่เตรียมตัวอย่าง DNA 5 ไมโครลิตร (ในกรณีที่ไม่ใช่ สาร DNA template solution จะต้องผสมตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรกับสี 6x gel loading dry 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบนแผ่นพาราฟิล์มดูดตัวอย่างทั้งหมด) แล้วหยดลงในช่องที่เตรียมไว้ปิดฝาแท็งค์แล้วต่อสายไฟ โดยให้หลอดของเจลของตัวอย่างอยู่ทางด้านซ้าย เนื่องจาก DNA จะเคลื่อนจากซ้ายไปยังขวาก โดยจะใช้เวลาเวลาในการทำงานของเครื่องประมาณ 30 นาที ถ้าที่ความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์

(ถ้าความต่างศักย์ต่ำ จะใช้เวลานานขึ้น) เสร็จแล้ว นำแผ่นเจลไปวางบนกล่องที่มีแสงอัลตราไวโอเล็ต จะเห็นแถบ DNA เรืองแสง และทำการถ่ายภาพเจล

3.4.4 การทำให้ PCR product มีความบริสุทธิ์

การทำให้ PCR product บริสุทธิ์นั้น จะใช้ชุด PCR cleanup & Gel extraction kit โดยวิธีการจะทำตามขั้นตอนของชุด kit คู่มือ Buffer B ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ปริมาตร 225 ไมโครลิตร จากนั้น เติม PCR product ทั้งหมดลงไป ปริมาตรประมาณ 45 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเทลง PG column ที่วางบนหลอดพลาสติก เพื่อใช้เป็นที่ยึดจับ แล้วนำทั้ง PG column และส่วนที่ยึดจับไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ 14000xG นาน 30 วินาที จากนั้นเทส่วนที่ยึดจับทิ้ง แล้วเติม Buffer W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงไปใน PG column อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 14000xG นาน 30 วินาที เมื่อครบเวลา นำส่วนที่อยู่ด้านล่างที่ยึดจับ PG column ไปเททิ้ง หลังจากขั้นตอนนี้ เติม W2 ลงไป ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใน PG column อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 14000xG นาน 30 วินาที แล้วนำส่วนด้านล่างมาเททิ้ง แล้วนำไปเซนตริฟิวก์อีกรอบที่ 14000xG นาน 2 นาที เมื่อครบเวลา เติม Buffer E แล้วตั้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000xG นาน 2 นาที ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการล้าง PCR product ให้ตกลงมาในไมโครเซนตริฟิวก์อันใหม่ โดยครั้งนี้ จะไม่เทส่วนที่ยึดจับ เก็บสารไว้เพื่อส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 และการระบุสปีชีส์ของยีสต์

PCR products ส่งไปวิเคราะห์ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 โดยมีและนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีสต์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI เพื่อระบุสปีชีส์ของยีสต์โดยอาศัยหลักการที่ว่าถ้าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของยีสต์มีความแตกต่างกันมากกว่า 1% substitutions หรือแตกต่างกันตั้งแต่ 6 นิวคลีโอไทด์ขึ้นไป จะถือว่ายีสต์เหล่านั้นมีความแตกต่างของสปีชีส์ และสายพันธุ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์จัดว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน แต่ถ้าสายพันธุ์ยีสต์ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 3-6 นิวคลีโอไทด์อาจเป็นสปีชีส์เดียวกันหรือเป็นต่างสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกันมากก็ได้ (Kurtzman and Robnett., 1998)

3.5 การทำไส้ถั่วของยีสต์

3.5.1 เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar โดยวิธี cross streak technique นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25–30 องศาเซลเซียส นาน 2–3 วัน เก็บเชื้อบริสุทธิ์ ไว้ทำต่อในขั้นตอนต่อไป

3.5.2 ใช้ห้วงเชี่ยเชื้อยีสต์ลงบนแผ่นสไลด์ เกลี่ยให้กระจายออกเป็นแผ่นบาง ๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งหรือใช้เปลมไฟอ่อน ๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง

3.5.3 หยดสีเมทิลีนบลู ความเข้มข้น ร้อยละ 1 ที่ละลายในน้ำลงไป แช่ไว้ นาน 2–3 นาที นำมาล้างออกไป ด้วยน้ำไหลแล้วหยดกรดแทนนิก ความเข้มข้น ร้อยละ 5 ลงไป ปลอ่ยทิ้งไว้ 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

3.5.4 หยดสีซาฟานิน ความเข้มข้นร้อยละ 1 หยดลงไปให้ท่วม ทิ้งไว้ นาน 2 นาที จากนั้น ล้างออกด้วยน้ำไหล ปลอ่ยสไลด์ให้แห้งจึงหยดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น ร้อยละ 95 และ 100 ลงไปในช่วงละ 2 นาที ในขั้นสุดท้ายเปลี่ยนเป็นไซลีน ทิ้งไว้ให้แห้งปิดทับด้วย น้ำยาเปอร์เมต แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการหาค่าความเป็นกรดและความเป็นด่างในดิน

จากผลวิเคราะห์ที่ได้ ตัวอย่างดินทั้ง 24 ตัวอย่าง มีค่าความเป็น กรดต่าง เท่ากับ 6 ซึ่งมีความเป็นกรดอ่อน เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ เพราะ พีเอชที่เชื้อยีสต์เจริญได้ดีจะมีพีเอชเท่ากับ 4.5 (สาวิตรี, 2549)

ตาราง 1 แสดงผลของค่าความเป็นกรดต่าง

ตัวอย่างดิน	ค่าความเป็น กรด-ด่าง
1	6
2	6
3	6
4	6
5	6
6	6
7	6
8	6
9	6
10	6
11	6
12	6
13	6
14	6
15	6
16	6
17	6

ตาราง 1 (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	ค่าความเป็น กรด-ด่าง
18	6
19	6
20	6
21	6
22	6
23	6
24	6

จากผลวิเคราะห์ที่ได้ ตัวอย่างดินทั้ง 24 ตัวอย่าง มีค่าความเป็น กรดต่าง เท่ากับ 6 ซึ่งมีความเป็นกรดอ่อน เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ เพราะ พีเอชที่เชื้อยีสต์เจริญได้ดีจะมีพีเอชเท่ากับ 4.5 (สาวิตรี, 2549)

4.2 ผลการคัดแยกยีสต์จากดินโดยวิธีการ Enrichment

โดยทั่วไปแล้วดิน 1 กรัม จะมียีสต์น้อยกว่า 10^4 CFU/g ดังนั้นในการแยกยีสต์จึงจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ช่วยในการส่งเสริมหรือกระตุ้นการเจริญของยีสต์แต่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและรา โดยมีการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ ตลอดจนมีการเติมสารปฏิชีวนะ (antibiotic) และสารยับยั้งการเจริญของรา (fungistatic agents) ลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและรา อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้แยกยีสต์คือ YM broth ที่ปรับค่าพีเอชเป็น 4.7 เติมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 100–200 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) และเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต (sodium propionate) 1 กรัมต่อลิตร (g/L) ซึ่งผลการแยกยีสต์จากตัวอย่างดินที่เก็บตัวอย่างจากป่าดิบแล้งในเขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืชจำนวน 2 แปลง ให้ผลการทดลองดังตาราง 2 ในตัวอย่างดิน 1 แปลง จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 24 ตัวอย่างจากศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชมาทำการแยกเชื้อ ยีสต์ทั้งหมด 78 ไอโซเลท โดยจะแยกเป็นกลุ่มเชื้อยีสต์

ตาราง 2 จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างดินโดยการใช้วิธี Enrichment

ตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลต	
	ยีสต์บริสุทธิ์ (isolate)	ชื่อไอโซเลท
1	4	Y1/1, Y1/2, Y1/3, Y1/4
2	8	Y2/1, Y2/2, Y2/3, Y2/4, Y2/5, Y2/6, Y2/7, Y2/8
3	6	Y3/1, Y3/2, Y3/3, Y3/4, Y3/5, Y3/6
4	1	Y4/1
5	4	Y5/1, Y5/2, Y5/3, Y5/4
6	5	Y6/1, Y6/2, Y6/3, Y6/4, Y6/5
7	4	Y7/1, Y7/2, Y7/3, Y7/4
8	5	Y8/1, Y8/2, Y8/3, Y8/4, Y8/5
9	3	Y9/1, Y9/2, Y9/3
10	3	Y10/1, Y10/2, Y10/3
11	1	Y11/1
12	4	Y12/1, Y12/2, Y12/3, Y12/4
13	5	Y13/1, Y13/2, Y13/3, Y13/4, Y13/5
14	3	Y14/1, Y14/2, Y14/3
15	1	Y15/1
16	4	Y16/1, Y16/2, Y16/3, Y16/4
17	1	Y17/1
18	1	Y18/1
19	2	Y19/1, Y19/2
20	3	Y20/1, Y20/2, Y20/3
21	2	Y21/1, Y21/2
22	2	Y22/1, Y22/2
23	3	Y23/1, Y23/2, Y23/3
24	3	Y24/1, Y24/2, Y24/3

จากตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ทั้ง 78 ไอโซเลต ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และผลจากการศึกษา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น การใช้สารประกอบคาร์บอน การใช้สารประกอบ ไนโตรเจน ความสามารถในการหมักน้ำตาล การเจริญในอาหารที่มีแรงดัน ออสโมซิสสูง การไฮโดรไลซ์ยูเรีย การย่อยสลายเจลาติน การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถจัดกลุ่มยีสต์ ออกเป็น 18 กลุ่ม ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี ดังตาราง 4 และ 5

ผลการศึกษาลักษณะโคโลนี พบว่า เชื้อมีลักษณะโคโลนี รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะ เบนราบผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม เป็นลักษณะโคโลนี ที่พบมากที่สุดจากดินบริเวณศูนย์อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช

ตาราง 3 การแบ่งกลุ่มยีสต์ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

กลุ่มของยีสต์	จำนวนไอโซเลตยีสต์บริสุทธิ์ (isolate)	ชื่อไอโซเลต
1	25	Y1/1, Y1/4, Y2/1, Y2/5, Y2/8, Y3/1, Y3/2, Y5/1, Y6/1, Y6/3, Y6/5, Y8/2, Y9/3, Y11/1, Y12/2, Y13/5, Y14/1, Y14/3, Y16/1, Y17/1, Y18/1, Y20/1, Y22/1, Y23/1, Y24/3
2	17	Y2/3, Y2/4, Y2/6, Y5/4, Y6/2, Y7/3, Y8/1, Y8/4, Y10/2, Y12/1, Y14/2, Y16/2, Y19/2, Y20/2, Y20/3, Y22/2, Y24/1
3	16	Y1/3, Y5/2, Y6/4, Y7/2, Y7/4, Y8/3, Y9/2, Y12/4, Y13/1, Y13/2, Y13/4, Y16/3, Y16/4, Y19/1, Y23/2, Y24/2
4	4	Y1/2, Y2/2, Y3/4, Y4/1
5	3	Y3/5, Y5/3, Y21/1
6	1	Y21/2
7	1	Y2/7
8	1	Y3/3

ตาราง 3 (ต่อ)

กลุ่ม ของยีสต์	จำนวนไอโซเลต ยีสต์บริสุทธิ์ (isolate)	ชื่อไอโซเลต
9	1	Y3/6
10	1	Y7/1
11	1	Y8/5
12	1	Y9/1
13	1	Y10/1
14	1	Y10/3
15	1	Y12/3
16	1	Y15/1
17	1	Y13/3
18	1	Y23/3

ตาราง 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนี ภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y1/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y1/2	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y1/3	รูปร่างไม่แน่นอน ชอบ หยัก ลักษณะนุ่มเล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y1/4	รูปร่างไม่แน่นอน ชอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม้อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y2/1	รูปร่างไม่แน่นอน ชอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y2/2	รูปร่างกลม ชอบไม่เรียบ ลักษณะคล้ายไขดาว ลักษณะนุ่มเล็กน้อย ผิวหน้าด้านไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y2/3	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y2/4	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y2/5	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y2/6	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y2/7	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y2/8	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y3/1	รูปร่างไม่แน่นอน ชอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y3/2	รูปร่างไม่แน่นอน ชอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y3/3	รูปร่างกลม ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิว ขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y3/4	รูปร่างกลม ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวหน้า ขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีคร	แตกหน่อ (Buddin		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y3/5	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y3/6	รูปร่างกลม ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อน แสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ ไตกล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y4/1	รูปร่างกลม ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y5/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y5/2	รูปร่างไม่แน่นอน ชอบ หยัก ลักษณะนุ่ม เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนี สีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y5/3	รูปร่างกลม ชอบเรียบ ลักษณะนุ่มเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y5/4	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะนุ่มเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y6/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนี สีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y6/2	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y6/3	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สแตอริโอไมครอสโคป	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y6/4	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะนุ่ม เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y6/5	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y7/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะนุ่ม เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อน แสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y7/2	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะนุ่ม เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อน แสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอไมครอสโคป	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y7/3	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้าไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y7/4	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะหนูน เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อน แสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y8/1	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y8/2	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y8/3	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะนุ่ม เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y8/4	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะนุ่มเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y8/5	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y9/1	รูปร่างกลม ขอบหยัก ลักษณะนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้าทึบแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

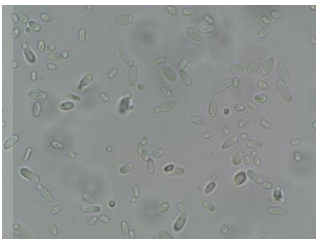

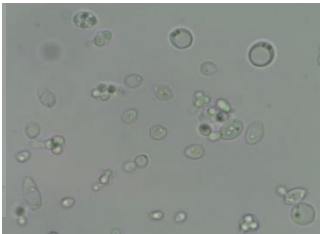
ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y9/2	รูปร่างไม่แน่นอน ชอบ หยัก ลักษณะนุ่ม เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อน แสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y9/3	รูปร่างไม่แน่นอน ชอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนี สีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y10/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ เรียบ ลักษณะแบน ราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อน แสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y10/2	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

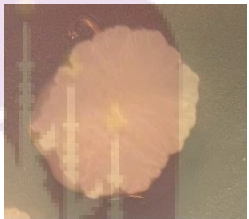
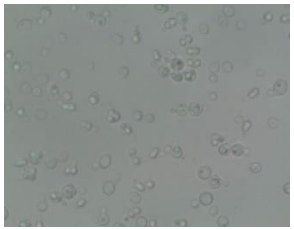

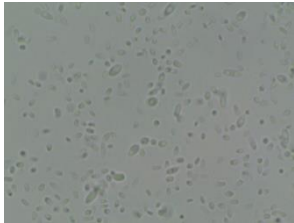
ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x
Y10/3	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะนุ่ม เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y11/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอไมครอสโคป	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y12/1	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y12/2	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y12/3	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ ไม่เรียบ ลักษณะแบน ราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้า ด้านไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y12/4	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะนูน เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อน แสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y13/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะนุ่มเล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y13/2	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะนุ่มเล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่ สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอไมครอสโคป	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y13/3	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y13/4	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะหนูน เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อน แสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม้อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y13/5	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y14/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ ไตกล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y14/2	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y14/3	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y15/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y16/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x
Y16/2	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะนุ่มเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y16/3	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะนุ่มเล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

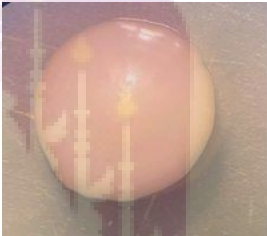
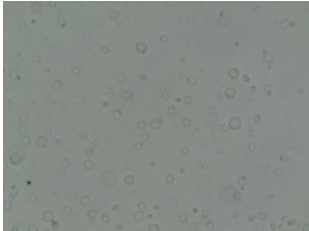
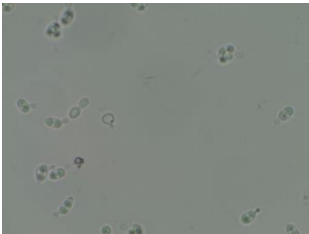
ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม้อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้อง สเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y16/4	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะนุ่ม เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y17/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y18/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y19/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะนูน เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y19/2	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y20/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y20/2	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y20/3	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y21/1	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y21/2	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบ หยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสี ครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสีบพันธุ์ แบบไม้อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y22/1	รูปร่างไมเนนออน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y22/2	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		


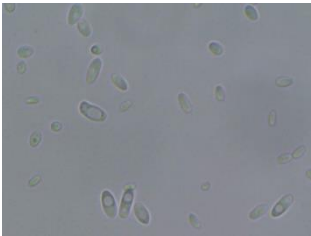
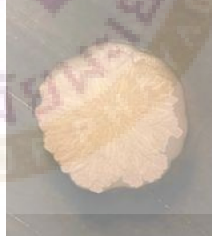
ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y23/1	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y23/2	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะนูน เล็กน้อย ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้านไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y23/3	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y24/1	รูปร่างกลม ขอบเรียบ ลักษณะหนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวหน้ามันวาว โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะโคโลนี	การสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ	รูปแสดงลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอ	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x
Y24/2	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		
Y24/3	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ลักษณะแบนราบ ผิวขรุขระ ผิวหน้าด้าน ไม่สะท้อนแสง โคโลนีสีครีม	แตกหน่อ (Budding)		

ตาราง 5 การจัดกลุ่มยีสต์ตามลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

Group	Isolate	Grow in a high osmotic pressure				Urea Hydrolysis	Temperature			Fermentation of carbon compound									
		50% Glucose	60% Glucose	10% Sodium Chloride +5% Glucose			25 °C	37 °C	42 °C	glucose	lactose	sucrose	cellobiose	xylose	soluble starch	maltose	trehalose	raffinose	arabinose
1	Y1/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y1/4	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y2/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y2/5	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y2/8	+	-	+	V	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y3/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y3/2	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y5/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y6/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y6/3	+	-	+		+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

ตาราง 5 (ต่อ)

Group	Isolate	Grow in a high osmotic pressure				Urea Hydrolysis	Temperature			Fermentation of carbon compound									
		50% Glucose	60% Glucose	10% Sodium Chloride +5% Glucose			25 °C	37 °C	42 °C	glucose	lactose	sucrose	cellobiose	xylose	soluble starch	maltose	trehalose	raffinose	arabinose
1	Y6/5	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y8/2	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y9/3	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y11/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y12/2	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y13/5	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y14/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y14/3	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y16/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

ตาราง 5 (ต่อ)

Group	Isolate	Grow in a high osmotic pressure				Urea Hydrolysis	Temperature			Fermentation of carbon compound								
		50% Glucose	60% Glucose	10% Sodium Chloride +5% Glucose			25 °C	37 °C	42 °C	glucose	lactose	sucrose	cellobiose	xylose	soluble starch	maltose	trehalose	raffinose
1	Y17/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y18/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y20/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y22/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y23/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	Y24/3	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
2	Y2/3	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	Y2/4	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	Y2/6	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-

ตาราง 5 (ต่อ)

Group	Isolate	Grow in a high osmotic pressure				Urea Hydrolysis	Temperature			Fermentation of carbon compound									
		50% Glucose	60% Glucose	10% Sodium Chloride +5% Glucose			25 °C	37 °C	42 °C	glucose	lactose	sucrose	cellobiose	xylose	soluble starch	maltose	trehalose	raffinose	arabinose
2	Y5/4	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y6/2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y7/3	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y8/1	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y8/4	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y10/2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y12/1	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y14/2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y16/2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

ตาราง 5 (ต่อ)

Group	Isolate	Grow in a high osmotic pressure				Urea Hydrolysis	Temperature			Fermentation of carbon compound									
		50% Glucose	60% Glucose	10% Sodium Chloride +5% Glucose			25 °C	37 °C	42 °C	glucose	lactose	sucrose	cellobiose	xylose	soluble starch	maltose	trehalose	raffinose	arabinose
2	Y19/2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y20/2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y20/3	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y22/2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Y24/1	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
3	Y1/3	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Y5/2	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Y6/4	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Y7/2	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

ตาราง 5 (ต่อ)

Group	Isolate	Grow in a high osmotic pressure				Urea Hydrolysis	Temperature			Fermentation of carbon compound									
		50% Glucose	60% Glucose	10% Sodium Chloride +5% Glucose			25 °C	37 °C	42 °C	glucose	lactose	sucrose	cellobiose	xylose	soluble starch	maltose	trehalose	raffinose	arabinose
3	Y7/4	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y8/3	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y9/2	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y12/4	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y13/1	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y13/4	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y16/3	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y16/4	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y19/1	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 5 (ต่อ)

Group	Isolate	Grow in a high osmotic pressure				Urea Hydrolysis	Temperature			Fermentation of carbon compound										
		50% Glucose	60% Glucose	10% Sodium Chloride +5% Glucose			25 °C	37 °C	42 °C	glucose	lactose	sucrose	cellobiose	xylose	soluble starch	maltose	trehalose	raffinose	arabinose	galactose
3	Y23/2	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Y24/2	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	Y1/2	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	✓	+	+
	Y2/2	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	✓	+	+
	Y4/1	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	✓	+	+
5	Y3/5	+	-	+	-	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y5/3	+	-	+	-	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Y21/1	+	-	+	-	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Y14/3	-	-	-	+	+	+/w	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	✓	+	+
	Y21/2	-	-	-	+	+	+/w	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	✓	+	+

Group	Isolate	Grow in a high osmotic pressure				Urea Hydrolysis	Temperature			Fermentation of carbon compound										
		50% Glucose	60% Glucose	10% Sodium Chloride +5% Glucose			25 °C	37 °C	42 °C	glucose	lactose	sucrose	cellobiose	xylose	soluble starch	maltose	trehalose	raffinose	arabinose	galactose
7	Y2/7	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
8	Y3/3	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
9	Y3/6	-	-	-	+	+	+/w	-	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+		
10	Y7/1	+	-	+	-	+	+/w	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
11	Y8/5	+	-	+	-	+	+/w	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
12	Y9/1	-	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	Y10/1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/w	
14	Y10/3	+	-	-	-	+	+/w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	Y12/3	+	-	+	-	+	+//w	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	

ตาราง 5 (ต่อ)

Group	Isolate	Grow in a high osmotic pressure				Urea Hydrolysis	Temperature			Fermentation of carbon compound									
		50% Glucose	60% Glucose	16% Sodium Chloride +5% Glucose			25 °C	37 °C	42 °C	glucose	lactose	sucrose	cellobiose	xylose	soluble starch	maltose	trehalose	raffinose	arabinose
16	Y13/3	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
17	Y15/1	-	-	+	-	+	+//w	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
18	Y23/3	-	-	-	+	+	+/w	-	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+

หมายเหตุ: +, Positive; l, delayed positive; s, slow positive; w, weakly positive; and -, negative.

4.3 การระบุปีซีส์ของยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26s rDNA gene

4.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ด้วย PCR

จากยีสต์ทั้งหมด 78 ไอโซเลท เมื่อนำไปเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดีเอ็นเอ เอบริเวณ D1/D2 domains ของ 26S rDNA gene ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 และ NL4 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าบริเวณ D1/D2 domains ของ 26s rDNA gene ของยีสต์ทุกกลุ่มมีขนาดประมาณ 500–600 นิวคลีโอไทป์ ให้ผลดังภาพ 2



ภาพ 2 แสดง PCR products บริเวณ D1/D2 domains ของแต่ละไอโซเลทที่เป็นตัวแทนแต่ละกลุ่ม Y1/1–Y24/3

หมายเหตุ: DNA marker 100 BP DNA Ladder

4.3.2 การระบุสปีชีส์ของยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ทั้ง 18 กลุ่ม สุ่มเลือกมา กลุ่มละ 1 ไอโซเลต เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อระบุสปีชีส์ของยีสต์ ให้ผลดังตาราง 6 จากงานวิจัยของ Kurtzman and Robnett (1998) ที่มีผลการรายงานว่าถ้านิวคลีโอไทด์ของยีสต์บริเวณ D1/D2 เหมือนกัน 99% ขึ้นไปแสดงว่าเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกัน แต่ถ้าแตกต่างกันมากกว่า 1% แสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์ ดังนั้น

-ยีสต์กลุ่มที่ 1 จำนวน 25 ไอโซเลต คือ Y1/1, Y1/4, Y2/1, Y2/5, Y2/8, Y3/1, Y3/2, Y5/1, Y6/1, Y6/3, Y6/5, Y8/2, Y9/3, Y11/1, Y12/2, Y13/5, Y14/1, Y14/3, Y16/1, Y17/1, Y18/1, Y20/1, Y22/1, Y23/1 และ Y24/3 สามารถระบุสปีชีส์ได้เป็น *Schwanniomyces vanrijae* var. *vanrijae*

-ยีสต์กลุ่มที่ 2 จำนวน 17 ไอโซเลต คือ Y2/3, Y2/4, Y2/6, Y5/4, Y6/2, Y7/3, Y8/1, Y8/4, Y10/2, Y12/1, Y14/2, Y16/2, Y19/2, Y20/2, Y20/3, Y22/2, Y24/1 สามารถระบุสปีชีส์ได้เป็น *Scheffersomyces goslingicus*

-ยีสต์กลุ่มที่ 3 จำนวน 16 ไอโซเลต คือ Y2/3, Y2/4, Y2/6, Y5/4, Y6/2, Y7/3, Y8/1, Y8/4, Y10/2, Y12/1, Y14/2, Y16/2, Y19/2, Y20/2, Y20/3, Y22/2, Y24/1 สามารถระบุสปีชีส์ได้เป็น *Saturnispora sekii*

-ยีสต์กลุ่มที่ 4 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ Y1/2, Y2/2, Y3/4, Y4/1 สามารถระบุสปีชีส์ได้เป็น *S. sekii*

-ยีสต์กลุ่มที่ 5 จำนวน 3 ไอโซเลต คือ Y3/5, Y5/3, Y21/1 สามารถระบุสปีชีส์ได้เป็น *Tetrapisispora namnaonaensis*

-ยีสต์กลุ่มที่ 6 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y3/5, Y5/3, Y21/1 สามารถระบุสปีชีส์ได้เป็น *Vanjira humicola*

-ยีสต์กลุ่มที่ 7 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y2/7 สามารถระบุสปีชีส์ได้เป็น *V. humicola*

- ยีสต์กลุ่มที่ 8 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y3/3 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
Debaryomyces sp. UFMG-CM-Y343
- ยีสต์กลุ่มที่ 9 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y3/6 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
V. humicola
- ยีสต์กลุ่มที่ 10 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y7/1 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
Debaryomyces sp. UFMG-CM-Y343
- ยีสต์กลุ่มที่ 11 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y8/5 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
S. vanrijae var. *vanrijae*
- ยีสต์กลุ่มที่ 12 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y9/1 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
Candida dendronema
- ยีสต์กลุ่มที่ 13 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y10/1 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
S. vanrijae var. *vanrijae*
- ยีสต์กลุ่มที่ 14 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ Y10/3 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น *S.sekii*
- ยีสต์กลุ่มที่ 15 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y12/3 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
S. vanrijae var. *vanrijae*
- ยีสต์กลุ่มที่ 16 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y13/3 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
S. goslingicus
- ยีสต์กลุ่มที่ 17 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y15/1 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
S. vanrijae var. *vanrijae*
- ยีสต์กลุ่มที่ 18 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ Y23/3 สามารถระบุปีซีส์ได้เป็น
V. humicola

ตาราง 6 การระบุชนิด

Group	Isolate	Nucleotide number	%Identity	Clearly related species	Accession
1	Y1/1	593	100	<i>S. vanrijae</i> var. <i>vanrijae</i>	KY109643
2	Y5/4	602	99.17	<i>S. gosinicus</i>	KY109563
3	Y13/1	548	99.82	<i>S. sekii</i>	MT626071
4	Y4/1	612	99.84	<i>V. humicola</i>	FJ515231
5	Y21/1	591	99.83	<i>T. namnaonaoensis</i>	AB500208
6	Y21/2	606	99.83	<i>V. humicola</i>	FJ515231
7	Y2/7	549	100	<i>S. sekii</i>	MT606271
8	Y3/3	577	99.65	<i>Debaryomyces</i> sp. UFMG-CM-Y343	MF975536
9	Y3/6	576	99.83	<i>V. humicola</i>	KX791406
10	Y7/1	583	100	<i>Debaryomyces</i> sp. UFMG-CM-Y343	MF975536
11	Y8/5	590	100	<i>S. vanrijae</i> var. <i>vanrijae</i>	KY109643
12	Y9/1	550	99.82	<i>C. dendronema</i>	KY106411
13	Y10/1	589	100	<i>S. vanrijae</i> var. <i>vanrijae</i>	KY109643
14	Y10/3	551	100	<i>S. sekii</i>	MT626071
15	Y12/3	589	99.32	<i>S. vanrijae</i> var. <i>vanrijae</i>	KY109643
16	Y13/3	595	99.66	<i>S. gosinicus</i>	KY109563
17	Y15/1	589	99.83	<i>S. vanrijae</i> var. <i>vanrijae</i>	KY109643
18	Y23/3	571	100	<i>V. humicola</i>	KY110013

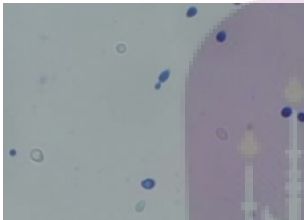
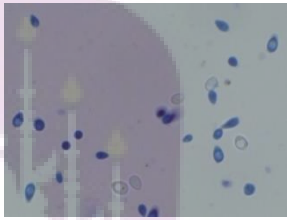
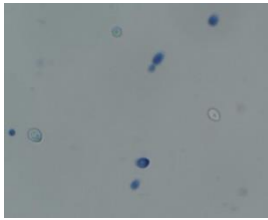
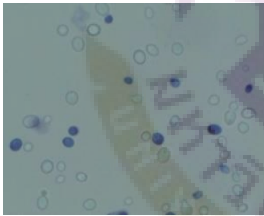

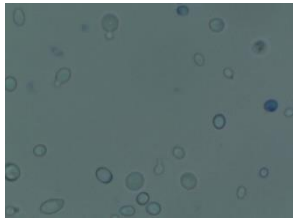
หมายเหตุ: ใช้ไอซีเอสแทนตำแหน่งของแต่ละกลุ่ม

4.5 ผลการทำสไลด์ถาวรของยีสต์

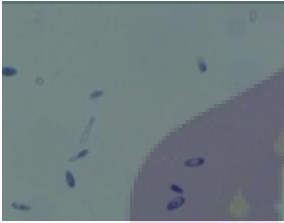
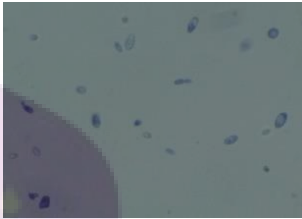
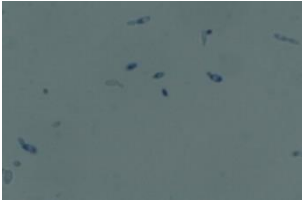
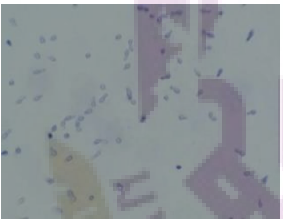


นำเชื้อยีสต์แต่ละไอโซเลทในตัวแทนแต่ละกลุ่มมาทำสไลด์ถาวรของยีสต์ โดยจะทำได้ทั้งหมด 18 สไลด์ที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ในไอโซเลทที่กลุ่มที่ 1 คือ Y1/1 ยีสต์กลุ่มที่ 2 คือ Y5/4 ยีสต์กลุ่มที่ 3 คือ Y13/1 ยีสต์กลุ่มที่ 4 คือ Y4/1 ยีสต์กลุ่มที่ 5 คือ Y21/1 และยีสต์ตั้งแต่กลุ่มที่ 6 ถึง กลุ่มที่ 18 คือ Y21/2, Y2/7, Y3/3, Y3/6, Y7/1, Y8/5, Y9/1, Y10/1, Y10/3, Y12/3, Y15/1, Y13/3 และ Y23/3 ตามลำดับ และแสดงภาพของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามตาราง 7 จากผลศึกษาการทำสไลด์ถาวรสามารถทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 100x ในระยะเวลา 1 เดือน ที่เซลล์ของยีสต์ยังคงสภาพเดิม




ตาราง 7 ระยะเวลาของเซลล์ยีสต์แต่ละไอโซเลทที่เป็นตัวแทนแต่ละกลุ่มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (100x)

กลุ่มที่	รหัสตัวอย่าง	1 วัน	1 สัปดาห์	1 เดือน
1	Y1/1			
2	Y5/4			

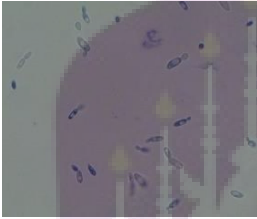
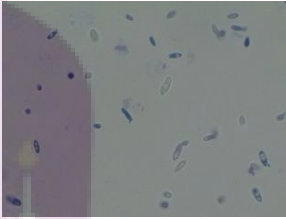
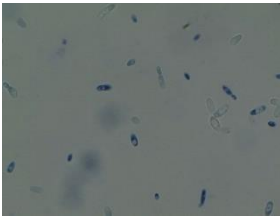

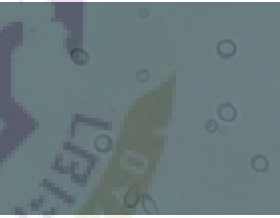
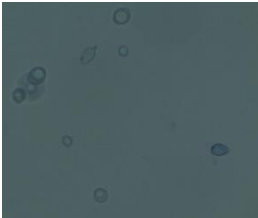
ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสตัวอย่าง	1 วัน	1 สัปดาห์	1 เดือน
3	Y13/1			
4	Y4/1			

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสตัวอย่าง	1 วัน	1 สัปดาห์	1 เดือน
5	Y21/1			
6	Y21/2			

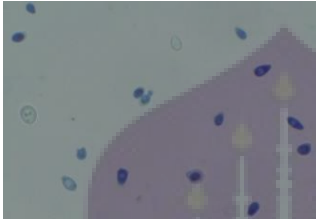
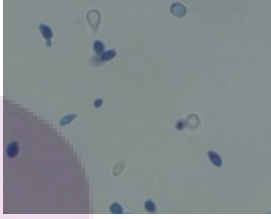
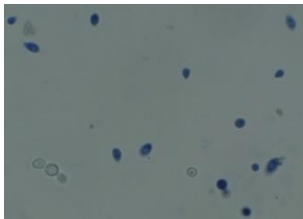

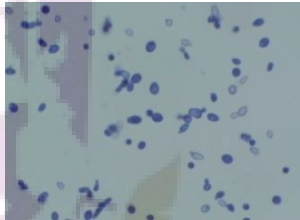
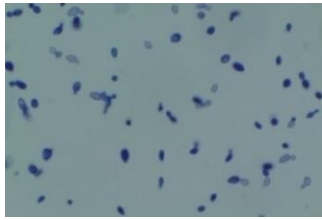
ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสตัวอย่าง	1 วัน	1 สัปดาห์	1 เดือน
7	Y2/7			
8	Y3/3			

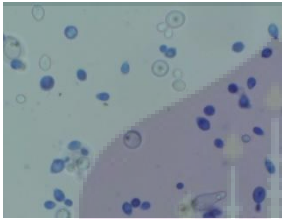
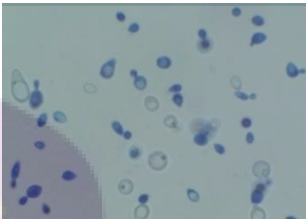
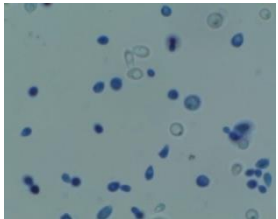



ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสตัวอย่าง	1 วัน	1 สัปดาห์	1 เดือน
9	Y3/6			
10	Y7/1			

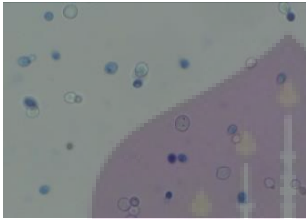
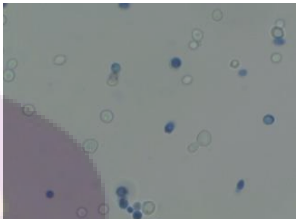
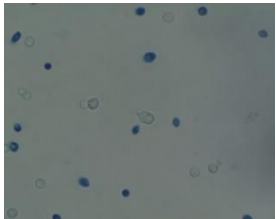
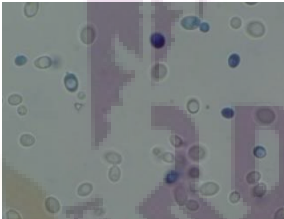
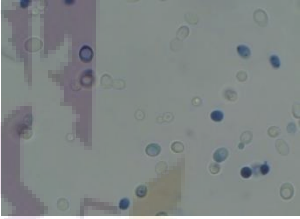
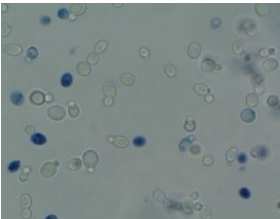
ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสตัวอย่าง	1 วัน	1 สัปดาห์	1 เดือน
11	Y8/5			
12	Y9/1			

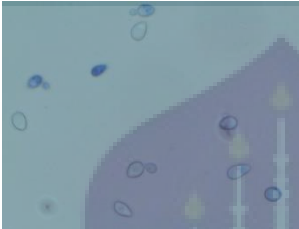
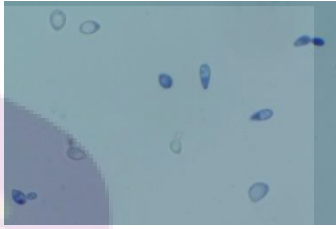
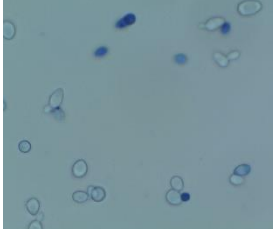


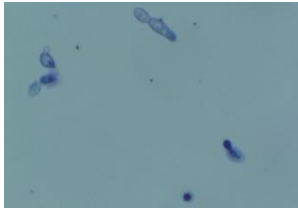
ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสตัวอย่าง	1 วัน	1 สัปดาห์	1 เดือน
13	Y10/1			
14	Y10/3			

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสตัวอย่าง	1 วัน	1 สัปดาห์	1 เดือน
15	Y12/3			
16	Y13/3			

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสตัวอย่าง	1 วัน	1 สัปดาห์	1 เดือน
17	Y15/1			
18	Y23/3			

บทที่ 5

การสรุป อภิปรายผล และขอเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินจำนวน 24 ตัวอย่าง นั้น สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 78 ไอโซเลท และเมื่อนำจำนวนยีสต์ทั้งหมดไปจัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี จะได้กลุ่มยีสต์ทั้งหมด 18 กลุ่ม โดยที่ลักษณะเหมือนกันมากที่สุดให้เป็นเชื้อยีสต์กลุ่มที่ 1 มี 25 ไอโซเลท คือ Y1/1, Y1/4, Y2/1, Y2/5, Y2/8, Y3/1, Y3/2, Y5/1, Y6/1, Y6/3, Y6/5, Y8/2, Y9/3, Y11/1, Y12/2, Y13/5, Y14/1, Y14/3, Y16/1, Y17/1, Y18/1, Y20/1, Y22/1, Y23/1 และ Y24/3 ยีสต์กลุ่มที่ 2 มี 17 ไอโซเลท คือ Y2/3, Y2/4, Y2/6, Y5/4, Y6/2, Y7/3, Y8/1, Y8/4, Y10/2, Y12/1, Y14/2, Y16/2, Y19/2, Y20/2, Y20/3, Y22/2 และ Y24/1 ยีสต์กลุ่มที่ 3 มี 16 ไอโซเลท คือ Y1/3, Y5/2, Y6/4, Y7/2, Y7/4, Y8/3, Y9/2, Y12/4, Y13/1, Y13/2, Y13/4, Y16/3, Y16/4, Y19/1, Y23/2 และ Y24/2 ยีสต์กลุ่มที่ 4 มี 4 ไอโซเลท Y1/2, Y2/2, Y3/4 และ Y4/1 ยีสต์กลุ่มที่ 5 มี 3 ไอโซเลท Y3/5, Y5/3 และ Y21/1 และยีสต์ตั้งแต่กลุ่มที่ 6-กลุ่มที่ 18 มีกลุ่มละ 1 ไอโซเลท คือ Y21/2, Y2/7, Y3/3, Y3/6, Y7/1, Y8/5, Y9/1, Y10/1, Y10/3, Y12/3, Y15/1, Y13/3 และ Y23/3

จากนั้นนำยีสต์ที่ได้ในแต่ละกลุ่มไปเพิ่มจำนวน DNA ที่ D1/D2 domains ของยีสต์ทั้งหมด ด้วยการทำ PCR และได้ PCR product ประมาณ 500-600 bp จากนั้นส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทป์ในต่างประเทศ เมื่อได้ผล นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI จากผลการศึกษาทั้งหมด พบว่า เชื้อยีสต์กลุ่มที่ 1 คือ *S. Var. vanrijae* ยีสต์กลุ่มที่ 2 คือ *S. goslingicus* เชื้อยีสต์กลุ่มที่ 3 คือ *Saturnispora sekii* เชื้อยีสต์กลุ่มที่ 4 คือ *S. sekii* เชื้อยีสต์กลุ่มที่ 5 คือ *T. namnaonaensis* เชื้อยีสต์กลุ่มที่ 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 และ 18 คือ *V. humicola*, *S. sekii*, *Debaryomyces sp. UFMG-CM-Y343*, *V. humicola*, *Debaryomyces sp. UFMG-CM-Y343*, *S. vanrijae* Var. *vanrijae*, *Candida drendonema*, *S. vanrijae* Var. *vanrijae*, *S. sekii*, *S. vanrijae* Var. *vanrijae*, *S. goslingicus*, *S. vanrijae* Var. *vanrijae* และ *V. humicola* ตามลำดับ

อภิปรายผลการทดลอง

สิ่งมีชีวิตทั้งหมดบนโลกนั้น ไม่สามารถบอกจำนวนและสปีชีส์ที่แน่นอนได้ การสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) เป็นงานหนัก แม้ว่าการสำรวจจะหยุดอยู่ที่ความหลากหลายทางสปีชีส์ และโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ส่วนใหญ่นำมาเพาะเลี้ยงได้ จากการสูญเสียถิ่นอาศัยของสิ่งมีชีวิตที่อยู่บนบก จะสูญเสียไปถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของสปีชีส์ที่มีอยู่ ดังนั้นจึงควรที่จะมีการสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพให้รวดเร็วขึ้น การสำรวจความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแต่ละแหล่งที่อยู่ มีประโยชน์หลายประการ เช่น จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญและมีศักยภาพสูงสำหรับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารและพลังงาน ทำให้ระบบนิเวศต่าง ๆ ยังคงสภาพเดิม (สาวิตรี, 2549) และ ธวัชชัย, 2552 ได้สำรวจหาความหลากหลายของสปีชีส์ของยีสต์ที่พบในดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จำนวน 24 สปีชีส์ คือ *Asterotremella humicola*, *Blastobotrys mokoena*, *Candida albicans*, *C. boidinii*, *C. cylindracea*, *C. diversa*, *C. fructus*, *C. maltosa*, *C. pseudolambica*, *C. zeylanoides*, *Candida sp.*, *Debaryomyces hansenii*, *D. vanrijae*, *Geotrichum fragans*, *G. silvicola*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania humicola*, *K. unisporus*, *Kluyveromyces sp.*, *Pichia acaciae*, *P. spartinae*, *Pichia sp.*, *Tetrapisispora namnaoensis* และ *Williopsis saturnus* และ ความหลากหลายของสปีชีส์ของยีสต์ที่พบในดินป่าสนสองใบของอุทยานแห่งชาติ น้ำหนาว จำนวน 24 สปีชีส์ คือ *Asterotremella humicola*, *Blastobotrys mokoena*, *Candida boidinii*, *C. maltosa*, *C. silvae*, *C. tropicalis*, *Candida sp. I*, *Candida sp. II*, *Debaryomyces hansenii*, *D. vanrijae*, *Galactomyces reessii*, *Geotrichum silvicola*, *Issatchenkia siamensis*, *Lachancea fermentati*, *Ogataea reessii*, *Pichia membranifaciens*, *P. pijperi*, *Pichia spartinae*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Tetrapisispora namnaoensis*, *Torulasporea delbrueckii*, *Trichosporon asahii* และ *Williopsis saturnus*

เนื่องจากบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา มีพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นป่าไม้เต็งรังล้อมรอบพื้นที่ของมหาวิทยาลัย ซึ่งน่าจะมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ จากผลการศึกษาที่ได้บริเวณดินในศูนย์อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช ที่นำมาตัดแยกเชื้อยีสต์ได้ยีสต์ทั้งหมด 78 ไอโซเลทนั้น และสามารถระบุสปีชีส์ที่แตกต่างกันทั้งหมด 7 สปีชีส์ ในเชื้อไอโซเลท ที่ Y21/1 สามารถระบุสปีชีส์ได้ *S. vanrijae* Var. *vanrijae* (*Debaryomyces vanrijae*) และ *T. namnaoensis* ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจของ ธวัชชัย, 2552 ที่สามารถพบเชื้อสายพันธุ์นี้ จากดินในป่าเขตร้อน และเชื้อยีสต์

S. gosinicus (*Candida gosinicus*) ที่พบจากดินบริเวณศูนย์อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยายังสอดคล้องกับงานวิจัยจากการศึกษาของ (Chin Feng et al., 2010) โดยจะทำการแยกยีสต์จากดินในป่าในประเทศไต้หวัน และ ดินจากประเทศไทย พบยีสต์ 10 สายพันธุ์ ที่ทำการแยกมาจากตัวอย่างดินที่แตกต่างกัน และได้ยีสต์สปีชีส์ใหม่ และมีรูปแบบของ electrophoretic karyotypes มีความแตกต่างกับ *S. spartinae* ดังนั้นจึงให้ชื่อยีสต์สปีชีส์ใหม่ว่า *Candida gosinica* sp. Nov.

จากผลการคัดแยกยีสต์จากดิน ณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชนั้น ได้ทั้งหมด 7 สปีชีส์ คือ *S. vanriijae* var. *vanriijae*, *S. sekii*, *Debaryomyces* sp. UFMG-CM-Y343, *V. humicola*, *S. gosinicus*, *Candida dendronema* and *T. namnaonaoensis*. และจำนวนเชื้อที่พบมากที่สุดคือ *S. vanriijae* var. *vanriijae*

ข้อเสนอแนะ

ทำการศึกษาคุณสมบัติยีสต์ที่ทราบสปีชีส์ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างไร โดยเฉพาะเชื้อยีสต์ที่พบมากที่สุดบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา และการนำเชื้อยีสต์ที่ค้นพบไปใช้ประโยชน์ต่อไป และการทำสไลด์ถาวร จะต้องทำในระยะเวลาที่นานขึ้นมากกว่า 1 เดือน เป็นเวลา 2 เดือน และ 6 เดือน ต่อไป

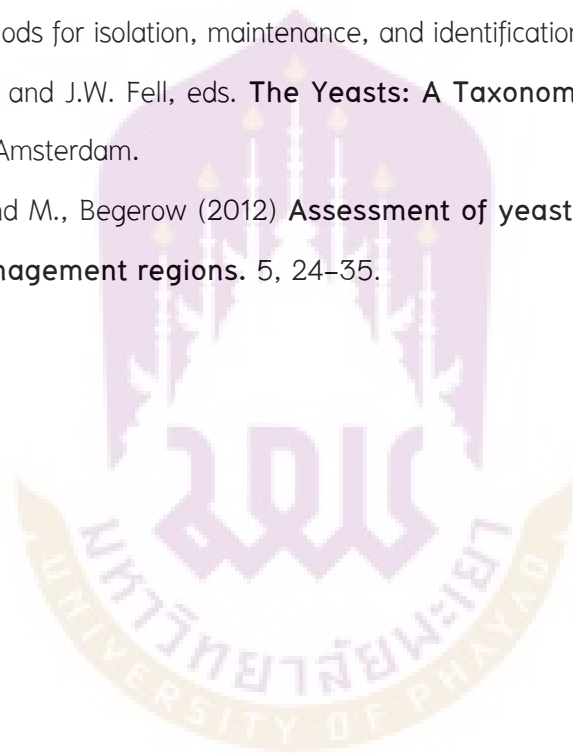
บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์. (2552). ความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินป่าดิบแล้งและ ดินป่าสนสองใบ อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว. กองบริหารงานวิจัย. มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- สาวิตรี ลิ่มทอง. (2549). ยีสต์:ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2549.
- Aheard, D. G., Meyers, S. P. and Nichols, R. A. (1968). Extracellular proteinases of yeasts and yeast like Fungi. **Applied Environmental Microbiology**, 16(9), 1370–1374.
- Benjamin, S. and Pandey, A. (2001). Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 44 (2), 213–221.
- Chang, C.F., Yao, C.H., Young S.S, Limtong, S. Keawwichian, R. Srisuk, N. and Lee, C. F. (2011) *Candida goslingica* sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast closely related to *Scheffersomyces spartinae*. **Systematic Evaluatory Microbiology**, 61, 690–694.
- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (2006). Yeast systematics and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology. In C. A. Rosa, and G. Peter (Eds.), **The Yeast Handbook** (pp. 11–30). Germany: Springer–Verlag Berlin Herdelberg.
- Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, 73, 331–371.
- Hierro, N. Gonzalez, A. Mas, A. and Guillamon, J.M. (2004) New PCR based method for yeast identification. **Applied Microbiology**, 97, 792–801.
- Limthong, S. Sintara, S. Suwanarit, P. and Lutong, N. (2002) Yeast Diversity in Thai Traditional Fermentation Starter (Loog–pang). *Kasetsart journal*. 36: 149 – 158
- Sumpradit, T., Limtong, S., Yongmanitchai, W. Kawasaki, H. and Seki, T. (2005) *Tetrapisispora namnaonensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from forest soil of Nam Nao National Park, Thailand. **Systematic Evaluatory Microbiology**, 55(4), 1735–1738.

- Tamawong, S. Ninomiya, S. Kawasaki, H. Boonchird, C. and Sumprasdit, T. (2010) *Millerozyma phetchabunensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from Nam Nao Forest soil in Thailand, and the transfer of *Pichia koratensis* to the genus *Millerozyma*. **General Applied Microbiology**, 56, 37–42.
- Sumpradit T, Limtong S, Yongmanitchai W, Kawasaki H, Seki T. (2005) *Tetrapisispora namnaonensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from forest soil of Nam Nao National Park, Thailand. **Systematic Evaluation Microbiology**, 55(4), 1735–1738.
- 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**. 4th ed. Elsevier Science, Inc., Amsterdam.
- Yurkov A.M., Kemler and M., Begerow (2012) **Assessment of yeast diversity in soils under different management regions**. 5, 24–35.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ และการเตรียมสารเคมี

1. Yeast Extracted Malt Extracted agar (YM agar)

Glucose	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Malt Extracted	3	กรัม
Yeast Extracted	3	กรัม
Agar	15	กรัม
RO water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร คนให้องค์ประกอบต่าง ๆ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. Yeast Extracted Malt Extracted broth (YM broth)

Glucose	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Malt Extracted	3	กรัม
Yeast Extracted	3	กรัม
RO water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร คนให้องค์ประกอบต่าง ๆ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3. Yeast Extracted Malt Extracted agar with Chloramphenicol and Sodium Propionate

Glucose	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Malt Extracted	3	กรัม
Yeast Extracted	3	กรัม
Chloramphenicol	0.2	กรัม
Sodium Propionate	1	กรัม

Agar	15	กรัม
RO water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร คนให้องค์ประกอบต่าง ๆ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่ออนาทิ

4. 50% Glucose

Glucose	50	กรัม
Peptone	5	กรัม
Malt Extracted	3	กรัม
Yeast Extracted	3	กรัม
RO water	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร คนให้องค์ประกอบต่าง ๆ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่ออนาทิ

5. 60% Glucose

Glucose	50	กรัม
Peptone	5	กรัม
Malt Extracted	3	กรัม
Yeast Extracted	3	กรัม
RO water	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร คนให้องค์ประกอบต่าง ๆ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่ออนาทิ

6. 5% Glucose + 10% Sodium Chloride

Glucose	5	กรัม
Sodium Chloride	10	กรัม
Peptone	5	กรัม

Malt Extracted	3	กรัม
Yeast Extracted	3	กรัม
RO water	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร คนให้องค์ประกอบต่างๆ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่ออนาที่

7. Urea agar

Potassium Dihydrogen Phosphate	2	กรัม
Glucose	1	กรัม
Sodium Chloride	2	กรัม
Peptone	1	กรัม
Phenol Red	0.012	กรัม
Yeast Extracted	3	กรัม
RO water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร คนให้องค์ประกอบต่างๆ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่ออนาที่ เติม Urea 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ลงไป 600 ไมโครลิตร โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร

8. Basal Medium

Yeast Extracted	4.5	กรัม
Peptone	7.5	กรัม
RO water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร คนให้องค์ประกอบต่างๆ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่ออนาที่ ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจะต้องมีการเติม Bromothymol blue ลงไป 4 มิลลิลิตร ของ stock solution ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ดูการเกิดสีจะต้องเป็นสีเขียวเข้ม เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ คือ

Glucose Lactose Sucrose Cellobiose Xylose Maltose Trehalose Raffinose Arabinose Galactose 2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยวิธีการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดรูของเมมเบรน 0.45 ไมครอน ใส่หลอดดักแก๊สลงไปในแต่ละหลอด หลังจากเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ลงไป

9. Soluble starch

Yeast Extracted	4.5	กรัม
Peptone	7.5	กรัม
Soluble Starch	20	กรัม
RO water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร คนให้องค์ประกอบต่างๆ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจะต้องมีการเติม Bromothymol blue ลงไป 4 มิลลิลิตร ของ stock solution ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่ออนาที

10. สีเมทาสีนบลู 1 เปอร์เซ็นต์

Methylene blue	1	กรัม
RO water	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด

11. สีเมทาสีนบลู 1 เปอร์เซ็นต์

Safranin O	1	กรัม
RO water	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้ ละลายเข้าด้วยกันจนหมด

12. กรดแทนนิก

Tannic acid 5 กรัม

RO water 100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้าด้วยกันจนหมด

13. Stock Solution Bromothymol blue

Bromothymol Blue 0.05 กรัม

RO water 75 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ลงในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้าด้วยกันจนหมด

ภาคผนวก ข ภาพสไลด์ถาวรของยีสต์





ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - ชื่อสกุล	ทัตดาว อินทร์ประสิทธิ์
วัน เดือน ปี เกิด	1 กรกฎาคม 2520
ที่อยู่ปัจจุบัน	68 ม.12 ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา 56000
ที่ทำงานปัจจุบัน	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัย พะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000
ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์
ประสบการณ์การทำงาน	
2 พ.ย. 2549- ปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยพะเยา
24 ก.ค. 2549-31 ต.ค.2549	บริษัท ยูโนเด็ต แอนด์ เอ็นจินเนียลิ่ง จำกัด
1 พ.ค. 2546 -14 ก.ค. 2549	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ นครสวรรค์
1 ก.พ. 2545-30 เม.ย. 2546	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ พิษณุโลก
1 ก.พ. 2544 -31 ม.ค. 2545	บริษัท การพิมพ์บางกอก จำกัด
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2553	วท.ม (วิทยาศาสตร์การแพทย์) มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
พ.ศ. 2543	วท.บ (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
พ.ศ.2539	โรงเรียนสตรีนครสวรรค์ จังหวัด นครสวรรค์

